

Софийски университет „Св. Климент Охридски“
Биологически факултет
Катедра „Физиология на растенията“



Десислава Иванова Мантовска

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕН ПОДХОД ЗА *EX SITU* СЪХРАНЕНИЕ
НА ЗАСТРАШЕНИ ВИДОВЕ ОТ РОД *STACHYS* И
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТЕХНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕН
ПОТЕНЦИАЛ**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“

Направление 4.3. Биологически науки (Физиология на растенията – *in vitro* култивиране на лечебни растения)

Научен ръководител:
Доц. д-р Жения Петкова Йорданова

София, 2022

Дисертационният труд съдържа 102 страници, 23 фигури и 19 таблици. Цитирани са 174 литературни източника.

Докторантът е зачислен в докторантура на самостоятелна подготовка към Катедра „Физиология на растенията“ при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Изследванията по дисертацията са извършени в Катедра „Физиология на растенията“, Катедра „Биохимия“ при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, Институт по Органична химия при БАН – Център по Фитохимия и Агробиоинститут.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен съвет на Катедра „Физиология на растенията“ при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, състоял се на 15.06.2022 г.

Защитата на дисертационната работа ще се състои на 05.10.2022 г. от 13.00 часа в заседателната зала на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, 2-ри етаж, бул. „Драган Цанков № 8.

Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет

Десислава Иванова Мантовска

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕН ПОДХОД ЗА *EX SITU* СЪХРАНЕНИЕ НА
ЗАСТРАШЕНИ ВИДОВЕ ОТ РОД *STACHYS* И ИЗСЛЕДВАНЕ НА
ТЕХНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕН ПОТЕНЦИАЛ**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация за
присъждане на научно-образователна степен „Доктор“

Направление 4.3. Биологически науки (Физиология на растенията – *in vitro* култивиране на
лечебни растения)

Научен ръководител:
Доц. д-р Жения Петкова Йорданова

Рецензенти:

Проф. д-р Венета Капчина-Тотева
Проф. дбн. Лиляна Масленкова
Проф. д-р Елена Якимова

София, 2022

Използвани съкращения

БА	6-бензиладенин
ЯМР	ядрено-магнитен резонанс
MS	хранителна среда Murashige & Skoog
SRAP	sequence related amplified polymorphism
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
GAE	gallic acid equivalents
QE	quercetin equivalents
ТАА	total antioxidant activity
FRAP	ferric reducing ability of plasma
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
TEAC	тролокс еквивалентен антиоксидантен капацитет
IC ₅₀	50% инхибираща активност
DMSO	dimethylsulfoxide
МИК	минимална инхибираща концентрация
CP	класически път на комплемент

I. УВОД

Растенията са най-древното средство за лечение, използвано от човечеството. Днес, природните продукти с растителен произход продължават да бъдат предпочитано терапевтично средство поради ниската си токсичност и липса на странични ефекти. Според статистиката близо 80% от населението на развитите държави разчита на продукти с природен произход. Близо 90 % от растителните видове, използвани в индустриален мащаб се събират от естествените им местообитания, което е предпоставка за значително намаляване на растителното разнообразие и недостиг на суровини за производство на терапевтични природни препарати. Урбанизацията, антропогенния фактор, променящите се климатични условия значително влияят на все по-лимитираното разпространение на видовете. Растителното царство е едно от най-разнообразните във видово отношение и с най-голяма тенденция за загуба на това разнообразие. Някои видове изчезват дори още преди да бъдат описани от учените. До момента, 40 % от растителните видове в световен мащаб са застрашени от изчезване, като 21 % от тях са локализирани в Европа. Всичко това налага прилагането на алтернативни методи, целящи не само съхранението на видовете, но и тяхното същевременно изучаване и приложение в практиката.

За забавяне и спиране на загубата на растителното биоразнообразие се разработват както *in situ*, така и *ex situ* методи за съхранение, подпомогнати от Глобална Стратегия за Опазване на Растенията (IUCN Global Strategy for Plant Conservation, 2002). Микроразмножаването е един от подходите за *ex situ* съхранение на застрашени и ценни медицински растения и позволява те да бъдат отглеждани в контролирани условия върху хранителна среда в затворени стерилни съдове, целогодишно, независимо от сезона и климатичните условия на средата. Чрез вариране на състава на хранителната среда и условията на култивиране е възможно да се постигне оптимален добив на биологично активни вещества и впоследствие да бъде изследван техния фармакологичен потенциал.

Растенията от род *Stachys* са едни от най-старите лечебни видове, които са използвани от човечеството. От рода в България са разпространени 22 вида, 5 от които са защитени от Закона за Биологичното разнообразие.

Stachys thracica (тракийски ранилист), *Stachys bulgarica* (български ранилист) и *Stachys scardica* (шарпланински ранилист) са балкански ендемитни видове, разпространени в страните от Балканския полуостров. Някои от находищата и на трите застрашени вида попадат в рамките на Европейската екологична мрежа Натура 2000. В литературата няма информация за

ex situ съхранението на трите ендемитни вида, а биологично-активните вещества, продуцирани от тях са слабо проучени.

В настоящия дисертационен труд са разработени и оптимизирани протоколи за *ex situ* съхранението на застрашените от изчезване балкански ендемитни видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* чрез индуциране на *in vitro* стъблени култури, които успешно са адаптирани в условия на опитно поле. В процеса на консервация е извършено и сравнително метаболитно профилиране и анализ на биологичния потенциал на екстрактите, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от трите растителни вида. Чрез използване на ядрено магнитен резонанс (ЯМР) са идентифицирани фенилетаноидни гликозиди (вербаскозид, левкосептозид А), фенолни киселини (хлорогенова киселина), иридоиди (алобетоникозид, харпагид и ацетилхарпагид) и алкалоиди (тригонелин), характеристични за растенията, принадлежащи към род *Stachys*. Висока антиоксидантна и радикал улавяща активност е установена при *in situ* и *ex vitro* адаптираните растения *S. scardica*, *S. thracica* и *S. bulgarica*, което е в пълна корелация с отчетената при тези варианти висока концентрация на общи феноли и флавоноиди. Изследваните представители притежават и добре изразен противовъзпалителен потенциал, като проявяват висока инхибираща активност спрямо системата на комплемента. Чрез прилагане на диск дифузионен метод е отчетена умерена активност на екстрактите от *S. bulgarica*, *S. thracica* и *S. scardica*, предимно спрямо Грам “-”, бактерии. От проведените изследвания прави впечатление, че асептичните условия на култивиране и миксотрофното хранене значително намаляват количеството на вторичните метаболити, а оттам и асоцираната с тях биологична активност и при трите изследвани представителя от род *Stachys*. При адаптиране на растенията в *ex vitro* условия обаче, биосинтетичният потенциал и свързаната с него биологична активност се възстановяват.

Получените резултати дават нова и потвърдителна информация и разширяват съществуващите сведения за представителите от род *Stachys* и биосинтеза на биологично активни метаболити при променящи се условия на заобикалящата ги среда. Индуцираните *in vitro* и *ex vitro* култури от тези застрашени растения и потенциала за биотехнологична продукция на биологично активни вещества, ще позволи съхранение на *S. bulgarica*, *S. thracica* и *S. scardica* в природата и ще даде възможност в бъдеще за мащабен биосинтез на ценни вторични метаболити с възможно приложение във фармацевтичната, козметичната и хранително-вкусова индустрии.

II. Литературен обзор

1. Род *Stachys* – разпространение и таксономична характеристика

- 1.1. *Stachys thracica* – тракийски ранилист
- 1.2. *Stachys bulgarica* – български ранилист
- 1.3. *Stachys scardica* – шарпланински ранилист

2. Употреба на род *Stachys* в етномедицината

3. *Ex situ* съхранение на представители от род *Stachys*

- 3.1 Генетична стабилност на *in vitro* култивирани растения от род *Stachys*

4. Вторични метаболити, идентифицирани при представители от род *Stachys*

4.1. Фенолни съединения

4.1.1. Вербаскозид

4.1.2. Хлорогенова киселина

4.2. Иридоиди

4.3. Етерични масла

4.4. Други метаболити изолирани от род *Stachys*, с потенциално практическо приложение

5. Биологична активност на екстракти от представители на род *Stachys*

5.1. Антиоксидантна активност

5.2. Противовъзпалителна активност

5.3. Антимикробна активност

5.4. Цитотоксичност

5.5. Активност за стимулиране зарастването на рани

5.6. Други биологични активности

III. Цел и задачи

Разработването на подходящ метод за съхранение на популациите от видовете от род *Stachys* в България се налага поради тяхното ограничено разпространение и природозащитен статус, както и продължаващото намаляване на отделните индивиди под влияние на човешката дейност. Прилагането на биотехнологичен подход за индуциране на *in vitro* и *ex vitro* култури ще помогне за съхранението на видовете от една страна, и от друга ще даде възможност за анализ и идентификация на веществата, отговорни за техния фармакологичен потенциал и оценка на възможността за приложението им във фармацевтичната и козметичната индустрии.

Целта на дисертационния труд е *ex situ* съхранение на застрашени и ендемитни видове от род *Stachys* посредством прилагане на биотехнологичен подход и сравнително метаболитно

профилиране и биологична активност на екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения.

За постигане на целта са разработени следните експериментални задачи:

1. *In vitro* размножаване на ендемитните и застрашени видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*.
2. *Ex vitro* адаптация на *in vitro* регенерирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*.
3. Проследяване на физиологичния статус и генетичната стабилност на *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от род *Stachys*.
4. Сравнително ЯМР - метаболитно профилиране на *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от род *Stachys*.
5. Антиоксидантна и радикал улавяща активност на екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от род *Stachys*.
6. Антимикробна активност на екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от род *Stachys*.
7. Противовъзпалителна активност на екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от род *Stachys*.
8. Корелационен анализ.

Получените резултати от дисертационния труд ще повишат знанието за биосинтез на фармацевтично значими метаболити, което ще помогне за ефективното управление и подобрата “експлоатация“ на вторичния метаболизъм на растенията от род *Stachys* и по този начин ще доведе до създаването на т.нар. “растителни клетъчни/тъканни фабрики“. *In vitro* култивирането на тези застрашени растения и биотехнологичната продукция на биологично активни вещества е иновативен подход, който ще позволи съхранението на тези видове в природата и възможност за мащабен биосинтез на ценни вторични метаболити с възможно приложение във фармацевтичната, козметичната и хранително-вкусова индустрии.

IV. Материали и методи

1. *Ex situ* съхранение на балканските ендемитни видове *Stachys thracica*, *Stachys bulgarica* и *Stachys scardica*
- 1.2 Индуциране на *in vitro* култури
- 1.3 Микроразмножаване в *in vitro* условия

- 1.4 *Ex vitro* адаптация на *in vitro* култивираните растения от вида *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*
2. Проследяване на генетичната стабилност на *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения чрез прилагане на SRAP анализ (*Li and Quiros, 2001*).
3. Метаболитно профилиране на ендемитните видове от род *Stachys* – *S. thracica*, *S. bulgarica*, *S. scardica*.
4. Екстракция на растителен материал за определяне на биологична активност
5. Количествено определяне на вторични метаболити – феноли и флавоноиди в метанолови екстракти, получени от *in situ* диворастящи, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от *Stachys* (*Singleton et al., 1999; Chang et al., 2002*)
6. Определяне на биологичната активност на метанолови екстракти, получени от *in situ* диворастящи, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от *Stachys*
 - 6.1. Антиоксидантна активност и радикал-улавяща способност (*Prieto, Pineda and Aguilar, 1999; Blois, 1958; Re et. al., 1999; Benzie and Strain, 1999*)
 - 6.2. Изследване на антимикробна активност (*CLSI, Wiegand, 2008*)
 - 6.3. Изследване на противовъзпалителната активност (*Klerx et. al., 1984; Tsacheva et. al., 2004*)
7. Корелационен анализ
8. Статистическа обработка на резултатите

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. *Ex situ* съхранение на балканските ендемитни видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*

1.1 Стерилизация на семената и въвеждане в *in vitro* условия

Все по-голяма част от ендемитните растителни видове в България, с изразени лечебни свойства са под силен антропогенен, биотичен и абиотичен натиск, което сериозно застрашава тяхната численост и разнообразие.

Местообитанията на ендемитните видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* са съсредоточени в области от България, в които все повече се засилва антропогенното влияние. Въпреки предприетите мерки от страна на държавните институции, като включването на видовете в защитени местности част от НАТУРА 2000, техните популации са твърде ограничени и малочислени. Прилагането на биотехнологичен подход и въвеждане на избраните видове от *pod Stachys* в *in vitro* култури дава възможност за тяхното съхранение, бързо размножаване, изследване и разкриване на фармакологичния им потенциал.

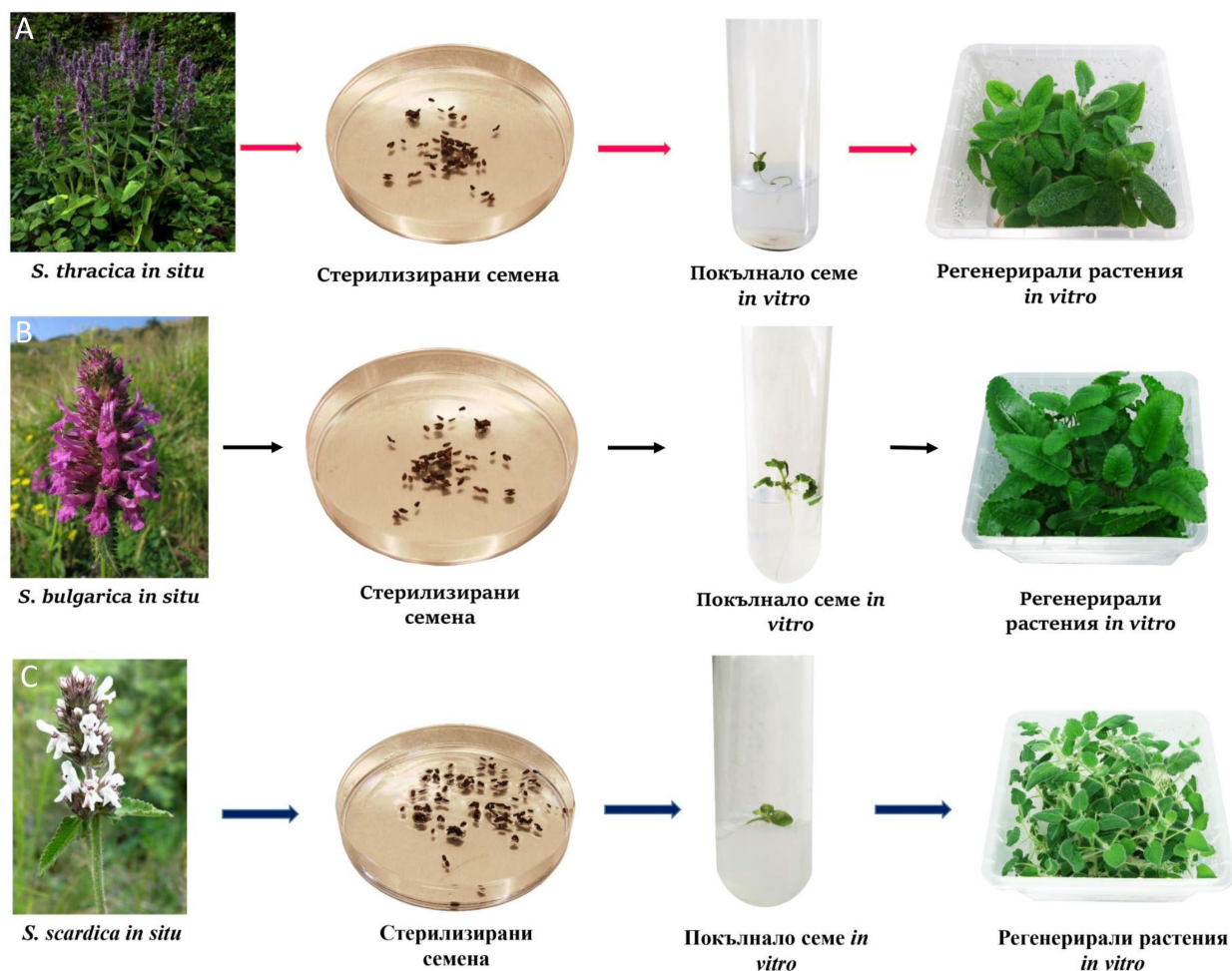
In vitro култура от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* е иницирана от семена, събрани от *in situ* диворастящи растения. Семената са подложени на последователно стерилизиране първоначално със 70 % етанол за 5 минути и 96 % етанол за 1 минута. По 50 стерилизирани семена от *S. thracica* бяха заложили на хранителна среда за покълване – ½ MS (хранителна среда, съдържаща ½ концентрация на макро- и микро-соли), (Murashige and Skoog, 1962) и WA (среда съдържаща 0.7 % агар), съответно и по 30 семена от *S. bulgarica* и *S. scardica* бяха заложили на същите хранителни среди. След 14 дневно култивиране единствено семената от *S. thracica* покълнаха на WA хранителна среда и беше отчетена 10 % кълняемост, докато на ½ MS не беше установено покълване.

Поради липсата на кълняемост при *S. bulgarica* и *S. scardica*, по 86 стерилизирани семена от всеки вид бяха инокулирани на 1/2 MS хранителна среда и WA среда с добавени растежни регулатори в следните концентрации: 0.5 mg/L гиберелинова киселина (GA), 1 mg/L GA, 2 mg/L GA, 0.5 mg/L кинетин, 1 mg/L кинетин, 2 mg/L кинетин. Най-висока кълняемост при *S. bulgarica* беше отчетена на ½ MS хранителна среда с добавени 0.5 mg/L GA. При *S. scardica* приложените растежните регулатори не оказаха ефект върху покълването на семената спрямо контролните варианти и беше отчетена 0.5 % кълняемост. (Таблица 1).

Таблица 1. Покълнали семена от *S. bulgarica* и *S. scardicana* на $\frac{1}{2}$ MS хранителна среда и WA с добавени различни концентрации растежни регулатори – гиберелинова киселина (GA) и кинетин (kin) (0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 2.0 mg/L).

Варианти	<i>S. bulgarica</i> (%)	<i>S. scardica</i> (%)
WA control		0.5
$\frac{1}{2}$ MS control	0.5	
$\frac{1}{2}$ MS + 0.5 mg/L GA	3.0	
$\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L GA	1.0	0.5
$\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/L GA	0.5	
$\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L kin		0.5
$\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L kin		
$\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/L kin	0.5	
WA + 0.5 mg/L GA	0.5	
WA + 1 mg/L GA	0.5	
WA + 2 mg/L GA	0.5	0.5
WA + 0.5 mg/L kin		
WA + 1 mg/L kin		
WA + 2 mg/L kin	0.5	

В следващ етап, семеначетата и от трите вида растения бяха преместени във фитокултивационно помещение с контролирани условия (описани в част Материал и методи), за да не етиолират и да продължат нормалното си развитие. След един месец растенията бяха микроразмножени на MS хранителна среда без растежни регулатори. При *S. thracica* близо 78% от заложените експланти (част от стъбло с прилежаща пъпка) образуват странични разклонения и формират нови 11.14 ± 0.73 експланти след едномесечно култивиране. Регенериралите микро-растения се характеризират с буен растеж, добре развити “надземни” органи и силно развита коренова система Фиг. 1А, (Таблица 2). В *in vitro* условия *S. bulgarica* формира много добре развита коренова система и обилна листна маса, но тъй като видът се характеризира с растеж под формата на розетка, растенията не образуват междувъзлия, растежният коефициент (РК) е изчислен само по брой нови стъбла и всяко едно растение формира по 1.25 ± 0.43 нови експланти (Фиг. 1В, Таблица 2). *S. scardica* в *in vitro* среда се характеризира с добре развити надземни части и коренова система, но растенията формират малко на брой странични стъбла с издължени междувъзлия и всяко растение образува по 3.38 ± 1.11 нови експланти (Фиг. 1С, Таблица 2).



Фиг 1. Индуциране на *in vitro* култура от ендемитни видове от род *Stachys*: A – *S. thracica*, B – *S. bulgarica*, C – *S. scardica*

Таблица 2. Морфометрични показатели на *in vitro* култивирани видове от род *Stachys* на хранителна среда MS, без добавени растежни регулатори

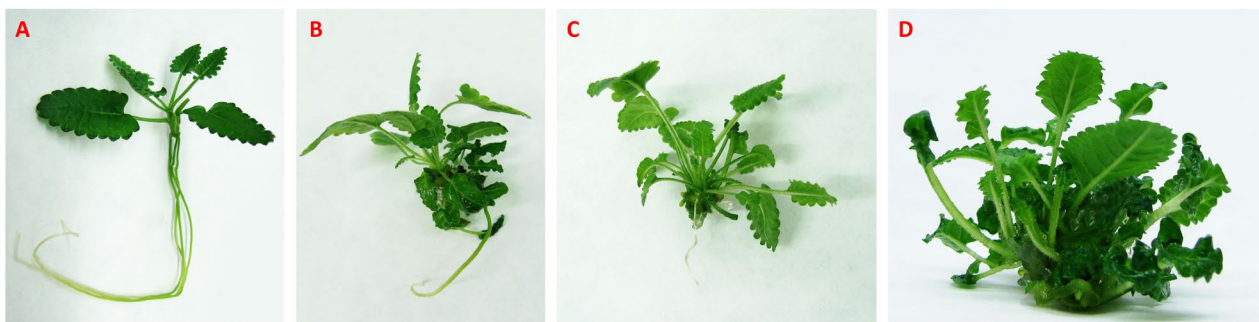
Растителен вид	Свежо тегло (g)	Сухо тегло (g)	Брой стъбла	Брой междувъзлия	Растежен коефициент	Дължина корен (cm)
<i>S. thracica</i>	6.5 ± 0.4	0.6 ± 0.04	3.25 ± 0.43	3.43 ± 0.53	11.14 ± 0.73	9.37 ± 0.41
<i>S. bulgarica</i>	0.59 ± 0.02	0.07 ± 0.008	1.25 ± 0.43	-	1.25 ± 0.43	8.75 ± 1.48
<i>S. scardica</i>	0.34 ± 0.23	0.05 ± 0.03	2.2 ± 0.40	1.54 ± 0.47	3.38 ± 1.11	5.73 ± 1.64

Растежни регулатори са успешно прилагани за индуциране на покълване и при други видове от род *Stachys*, характеризиращи се с ниска кълняемост. При *S. germanica subsp. bithynica* е установена близо 93% кълняемост при прилагане на GA и комбинация между GA и кинетин (Guleryuz et al., 2011). При инициране на *in vitro* култура от *S. recta* също е приложена гиберелинова киселина за индуциране на покълването, тъй като студената

стратификация не оказва ефект (Kozuharova et al., 2009). Cuce et al. (2017) успяват да инициират *in vitro* култура от *S. annua*, като най-висока кълняемост е наблюдавана при варианта на MS хранителна среда без добавени растежни регулатори.

1.2 Влияние на бензиладенин (ВА) върху *in vitro* мултипликацията на *S. bulgarica* и *S. scardica*.

За да се проследи ефекта на цитокинина бензиладенин (ВА) върху *in vitro* размножаването на *S. bulgarica* и *S. scardica*, мононадални стъблени сегменти от *in vitro* култивирани растения бяха инокулирани на MS хранителна среда с добавени различни концентрации ВА (0.1; 0.5; 1.0 mg/L). Тъй като приложените концентрации на ВА не оказаха значително стимулиране на растежния индекс при *S. scardica*, диапазонът на тестваните концентрации беше разширен с включване на по-високи концентрации на растежния регулатор (1.5; 2.0 и 2.5 mg/L). След 28 дни и при двата растителни вида върху всички варианти, съдържащи ВА се установи стимулиране на броя на формираните се стъбла от един заложен експлант (Фиг. 2; Фиг. 3 и Таблици 3 и 4).



Фиг. 2. Влияние на ВА върху *in vitro* размножаването на *S. bulgarica*; A – контрола ВА, B – MS+0.1 mg/L ВА, C – MS+0.5 mg/L ВА, D – MS+1 mg/L ВА

При *S. bulgarica*, хранителната среда, съдържаща 1 mg/L ВА се оказа най-ефективна по отношение на стимулирането на странични разклонения и близо 80% от регенериралите растения формират стъбла и образуват 8 ± 0.71 нови експланта (Таблица 3). За *in vitro* размножаването на *S. scardica* най-ефективна е хранителната среда, с добавени 1.5 mg/L ВА, където 80% от растенията образуват стъбла и формират 22.6 ± 2.47 нови експланта (Таблица 4). При по-високите концентрации на ВА (над 1.5 mg/L) не се наблюдава чувствително повишаване на растежния индекс и се установи интензивно калусообразуване. Забелязва се, че и при двата растителни вида ВА потискат коренообразуването, но при прехвърляне на растенията на MS хранителна среда без растежни регулатори, коренообразуването се възстановява.

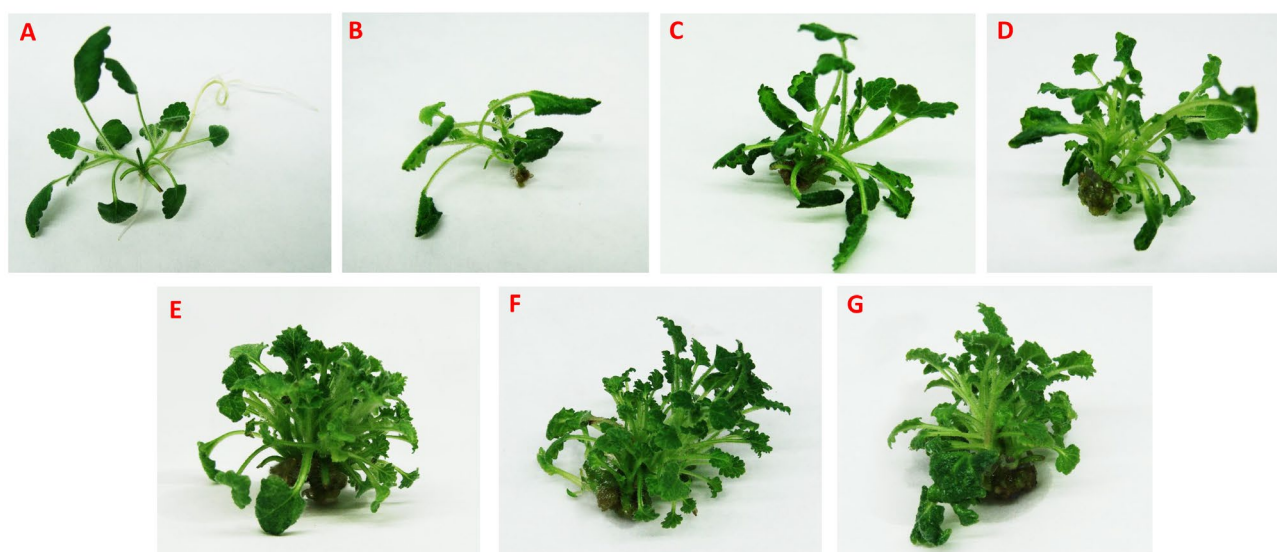
Таблица 3. Влияние на различни концентрации ВА (0.1 – 1.0 mg/L) върху дължината и броя на стъблата, коренообразуването и калусогенеза при *in vitro* размножени растения *S. bulgarica*. Отклоненията представят *S.E.M.* (*n-1*).

Варианти	Свежо тегло (g)	Сухо тегло (g)	Брой стъбла	Растежен коефициент	Дължина корен (cm)	Калусообразуване	Витрификация
Контрола	0.59 ± 0.02	0.07 ± 0.008	1.25 ± 0.43	1.25 ± 0.43	8.75 ± 1.48	-	-
0.1 mg/L ВА	0.853* ± 0.09	0.08 ± 0.006	1.75 ± 0.83	1.75 ± 0.83	5.5* ± 0.8	-	-
0.5 mg/L ВА	0.677* ± 0.07	0.06* ± 0.008	3.25* ± 0.43	3.25* ± 0.43	-	-	-
1 mg/L ВА	1.36* ± 0.27	0.16* ± 0.04	8* ± 0.71	8* ± 0.71	-	+ ¹	-

представено е стандартно отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - * $p \leq 0.05$

¹ слабо калусообразуване

² значително калусообразуване



Фиг. 3. Влияние на ВА върху *in vitro* размножаването на *S. scardica*; A – контрола, B – MS+0.1 mg/L ВА, C – MS+0.5 mg/L ВА, D – MS+1 mg/L ВА, E – MS+1.5 mg/L ВА, F – MS+2 mg/L ВА, G – MS+2.5 mg/L ВА

Бензиладенинът успешно е прилаган за повишаване на растежния коефициент и при други *in vitro* култивирани ендемитни видове. При *Achillea thracica* и *Veronica caucasica* 1 mg/L ВА стимулира растежа в *in vitro* условия, докато при *Verbascum eriophorum* 0.5 mg/L ВА стимулирала образуването на 14.22 ± 0.2 броя стъбла без да се наблюдава витрификация и калусообразуване (Yordanova et al., 2016, 2017, Mantovska et al., 2021).

Въпреки ниската кълняемост на семената, *in vitro* култивираните растения *S. thracica* се характеризират с активен и буен растеж, а при *S. bulgarica* и *S. scardica* се наблюдава умерен растеж. И трите вида се характеризират с добре оформени листа и стъбла, както и добре развита коренова система. В сходно изследване Panayotova et al. (2008) съобщават за

иницииране на *in vitro* култура от *S. maritima*, при която също се наблюдава ниска кълняемост на семената, но буен растеж на хранителна среда без добавени растежни регулатори.

Таблица 4. Влияние на различни концентрации ВА (0.1 – 2.5 mg/L) върху дължината и броя на стъблата, коренообразуването и калусогенеза при *in vitro* размножени растения *S. scardica*. Отклоненията представят S.E.M. (n-1).

Вариант	Свежо тегло (g)	Сухо тегло (g)	Брой стъбла	Брой междувъзлия	Растежен коефициент	Дължина корен (cm)	Калусо образуване	Витрификация
Контрола	0.34 ± 0.2	0.05 ± 0.0	2.2 ± 0.40	1.54 ± 0.47	3.3 ± 1.1	5.73 ± 1.6	-	-
0.1 mg/L ВА	0.18 ± 0.04	0.04 ± 0.02	2 ± 0.00	1.5 ± 0.5	3.0 ± 1.0	-	-	-
0.5 mg/L ВА	0.53 ± 0.10	0.075* ± 0.01	3.2* ± 0.4	1.56 ± 0.25	5.0 ± 1.0	-	-	-
1 mg/L ВА	0.76* ± 0.28	0.085 ± 0.02	6.4* ± 1.2	1.67 ± 0.16	10.8 ± 2.8	-	+ ¹	+
1.5 mg/L ВА	0.98* ± 0.16	0.083* ± 0.01	16.2* ± 2.0	1.3* ± 0.25	22.6 ± 2.4	-	+ ¹	+
2 mg/L ВА	0.9* ± 0.07	0.08* ± 0.01	17.3* ± 3.1	1.5 ± 0.29	24.0 ± 8.6	-	+ ²	+
2.5 mg/L ВА	1.38* ± 0.22	0.12* ± 0.01	15.2* ± 2.7	1.6* ± 0.35	23.8 ± 3.2	-	+ ²	+

представено е стандартно отклонение (±SD) и статистически значимите стойности - * $p \leq 0.05$

¹ слабо калусообразуване

² значително калусообразуване

In vitro културите от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* са подходящи моделни системи за по нататъшно изследване на съдържанието на вторични метаболити и техния биологичен потенциал. Микроразмножаването позволява дълготрайно поддържане на колекция от трите растителни вида и периодично събиране на материал за изследователски цели, без това да засяга техните естествени местообитания.

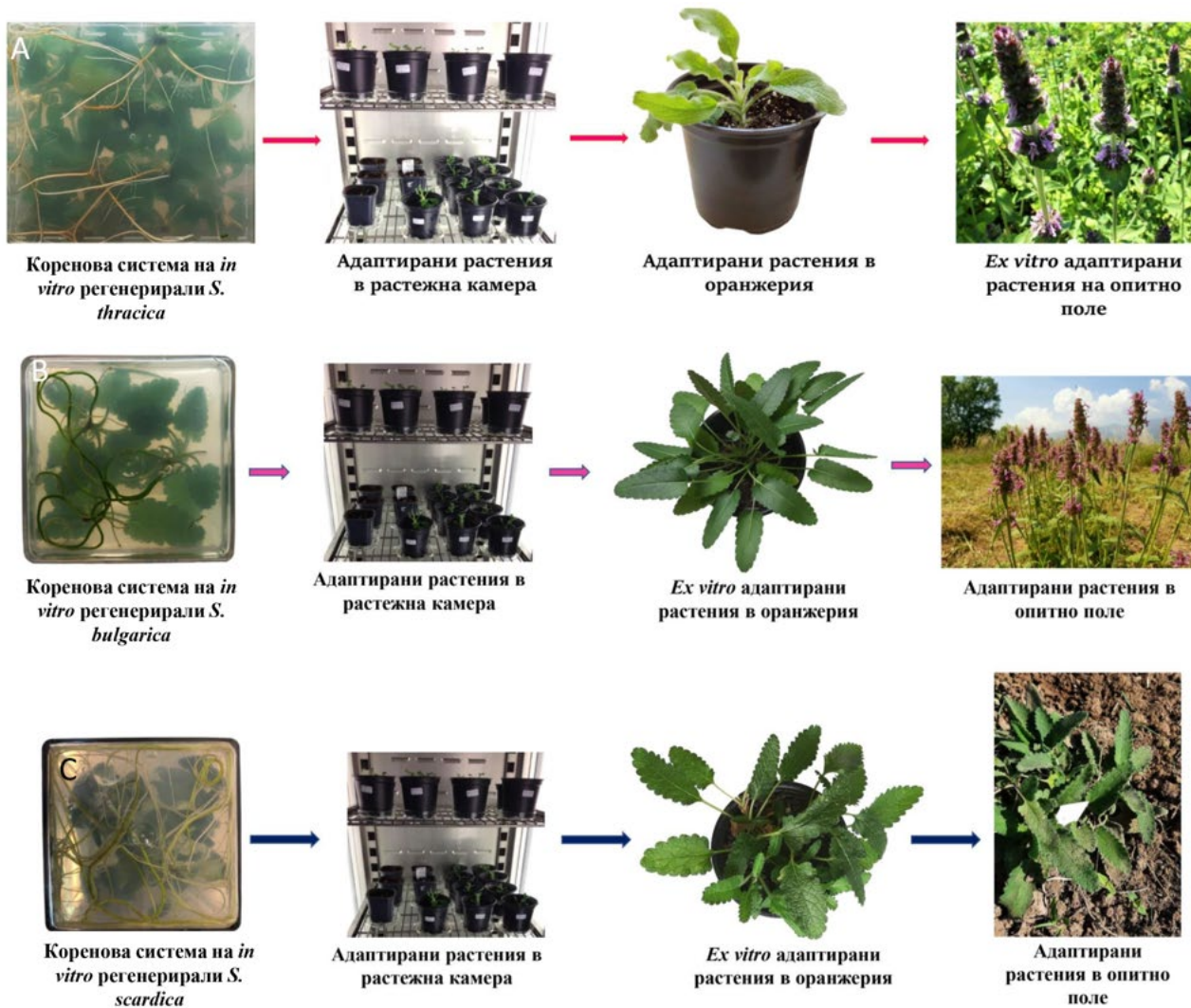
1.2 *Ex vitro* адаптация на *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*.

След достигане на физиологична зрялост на растенията, беше проведен опит за *ex vitro* адаптация, като за целта бяха подбрани 12 регенеранти *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* с добре развита коренова система. Аклиматизацията беше извършена на три последователни етапа – в растежна камера с контролирани условия, оранжерия и опитно поле.

За *ex vitro* адаптация са подбрани по 12 регенерирани *in vitro* растения от видовете *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* с дължина на стъблото 1 см и добре развита коренова

система. Растенията са прехвърлени в саксии със стерилна почвена смес. Аклиматизацията е извършена в три последователни етапа – в растежна камера с контролирани условия, оранжерия и опитно поле (Фиг. 4А, В, С). В растежната камера режимът на контролирани условия в продължение на четири седмици е организиран така, че да протича с намаляваща влажност, която се сменя всяка седмица

- 90% > 80% > 70% > 60%.



Фиг. 4. *Ex vitro* адаптирани ендемитни видове от род *Stachys*: A – *S. thracica*, B – *S. bulgarica*, C – *S. scardica*

Ex vitro регенерантите, адаптирани в условия на растежна камера бяха адаптирани успешно и в оранжерийни условия и след това бяха засадени на опитното поле на СУ „Св. Климент Охридски“ – база „Драгалевци“. И при трите ендемитни вида се постигна висок процент на адаптиране в *ex vitro* условия – 83% за *S. thracica*, 96% за *S. bulgarica* и 92% за *S. scardica*, като всички индивиди се развиват нормално с акумулиране на надземна биомаса два месеца след засаждането им на опитното поле. Съобщено е за успешна тристепенна *ex vitro*

адаптация при ендемитните видове *Stachys maritima* и *Achillea thracica* (Yordanova et al., 2017, Panayotova et al., 2008).

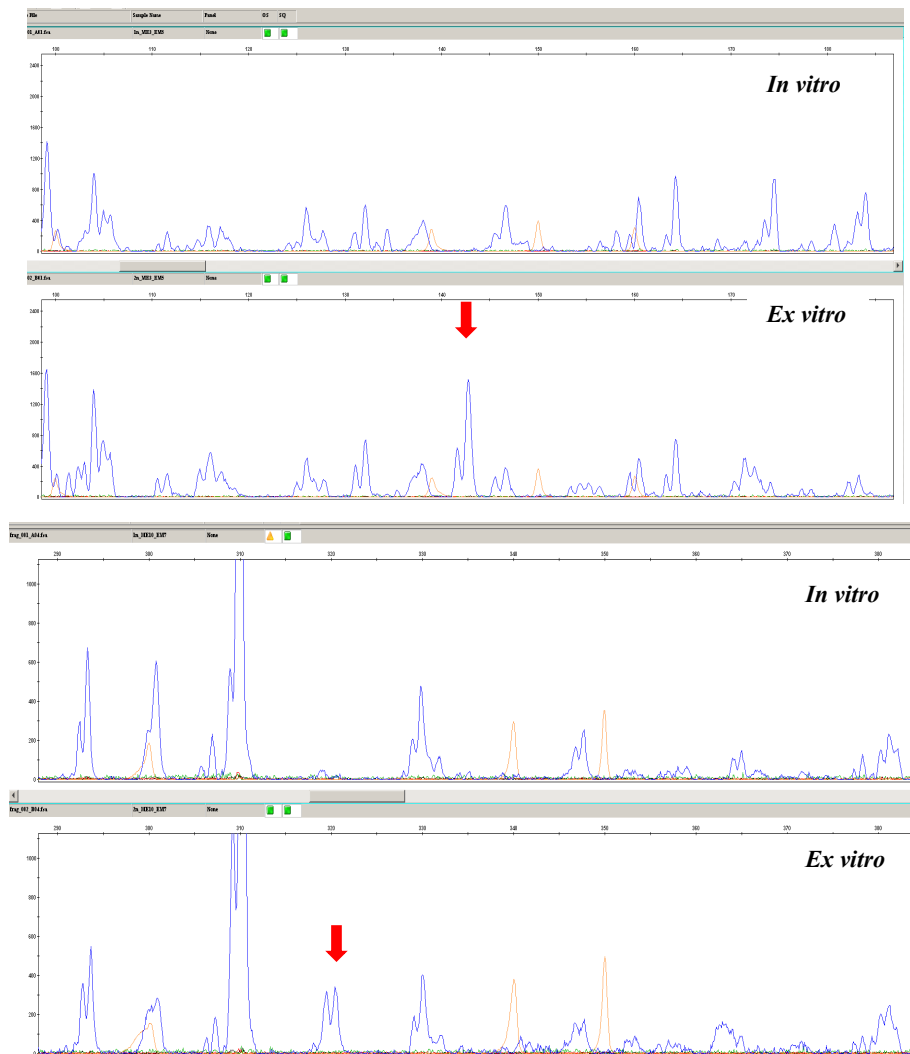
Микроразмножаването и *ex situ* съхранението успешно се прилагат при редки растения, с ограничено разпространение и ниска кълняемост на семената. Индуцирането на *in vitro* и *ex vitro* колекции от видовете *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* позволява провеждането на последващи изследвания за разкриване на фармакологичния потенциал на ендемитните видове, както и сравняване на метаболитния профил на растения, отглеждани при различни условия на заобикалящата ги среда.

2. Проследяване на генетичната стабилност на *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от род *Stachys*

Осъществено е сравнителното определяне на генетичната стабилност на *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения чрез прилагане на т.нар. SRAP метод (Sequence related amplified polymorphism). За целта са използвани общо 16 SRAP праймерни двойки, чрез които бяха идентифицирани общо за *in vitro* и *ex vitro* растенията 1308 алела (фрагмента). При видовете *S. thracica* и *S. scardica* бяха идентифицирани по 496 и 587 алела съответно и не беше установена разлика между SRAP профилите на *in vitro* култивираните и *ex vitro* адаптираните растения.

При *S. bulgarica* се установи незначителна 0.4 % изменчивост при общо 538 идентифицирани алела. Отчетените разлики представляват наличие на алел с дължина 142.74 bp при *ex vitro* линията, който отсъства при *in vitro* линията при анализ с праймерната двойка ME3-EM5, както и наличие на фрагмент с размер 319.46 bp в *ex vitro* линията, който отсъства при *in vitro* линията при анализ с праймерната двойка ME10-EM7 (Фиг. 5). Предполагаме, че най-вероятна тази изменчивост в *ex vitro* адаптираните растения *S. bulgarica* се дължи на разликите в условията на култивиране и адаптиране на растенията в изменящите се условия на заобикалящата ги средата.

SRAP маркерите успешно са прилагани при анализиране на генетичното разнообразие на естествените популации от видове от сем. *Lamiaceae* (Zagorcheva et al., 2020; Alekseeva et al., 2021). Според изследване на Alekseeva et al., (2021) върху генетичното разнообразие на *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, SRAP маркерите са достатъчно чувствителни, за да детектират хетерогенетичност между индивиди от популации на един и същи вид. Също така при сравняване на SRAP профилите на различни разновидности на лавандула е установена значително ниво на хетерогенетичност (Zagorcheva et al., 2020).



Фиг. 5. Фрагменти от електрофореграма от SRAP анализ на *in vitro* и *ex vitro* *S. bulgarica*: А - с праймерна двойка ME3-EM5; В - с праймерна двойка ME10-EM7. С червена стрелка е показан SRAP фрагмент наличен в *ex vitro* линията, но отсъстващ в *in vitro* линията.

Изследването на генетичната стабилност на *in vitro* култивирани растителни видове е важна част от разработването на протокол за микроразмножаване, тъй като едно от най-честите последствия от *in vitro* култивирането е проявата на соматонално вариране. Фактори като тип и донор на експланта, генотип, продължителност на *in vitro* култивирането са решаващи за проявата на соматонално вариране (Ngezahayo, 2018). Предполагаме, че най-вероятно липсата на чувствително генетично вариране в *in vitro* стъблените култури на *S. thracica*, *S. scardica* и *S. bulgarica* се дължи на това, че и трите култури са индуцирани от семена, при които генетична вариация е рядко вероятна. Вероятността за проява на генетични вариации се увеличава значително при инициране на калусна и суспензионна култури, поради което за съхранение и изследване на редки и застрашени растителни видове се препоръчва индуцирането и култивирането на стъблена култура, индуцирана от семена (Kumar, 2018).

3. Сравнително метаболитно профилиране на *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*.

3.1. ЯМР - метаболитно профилиране на *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*.

За проследяване на промените в метаболитния състав по време на процеса на *ex situ* съхранение на видовете *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* беше направен сравнителен метаболитен анализ на *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения посредством ядрено-магнитен резонанс (ЯМР). Идентифицирани са общо 18 съединения, които са част от първичния и вторичния метаболизъм при различните видове от род *Stachys* – аминокиселини, захари, органични киселини, фенолни съединения, иридоиди и алкалоиди (Таблица 5).

При всички варианти на трите изследвани представителя от род *Stachys* е установена акумулация на захари като захароза, глюкоза и фруктоза. От аминокиселините са идентифицирани аланин и валин, като последната не е установена при нито един от вариантите на *S. scardica*. Изследвания през последните години показват, че непротеиновата аминокиселина β -аланин може да се акумулира в клетки като генерична молекула за реакция на стрес, участваща в защитата на растенията от температурен шок, хипоксия, засушаване, тежки метали и биотичен стрес (Parthasarathy et al., 2019). В изследваните представители от род *Stachys* са идентифицирани също и няколко нискомолекулни органични киселини, като оцетна, млечна, янтарна, мравчена и ябълчена киселини. В екстрактите, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани *S. thracica* са усатнивени и петте органични киселини, докато при *S. bulgarica* в *in situ* и *ex vitro* адаптираните растения са идентифицирани само оцетна и янтарна киселини, а в *in vitro* култивираните растения не е отчетена нито една. При *in situ* и *ex vitro* *S. scardica* са установени оцетна, янтарна и мравчена киселини, а при *in vitro* култивираните растения са идентифицирани млечна, мравчена и ябълчена киселини. Съобщено е, че при стрес и адаптация към променящи се условия на средата, растенията реагират с повишена биосинтеза на органични киселини и ексудацията им в почвата през корените. Наблюдавано е, че растенията секретират органични киселини, за да мобилизират усвояването на фосфор в дефицитни почви (Panchal et al., 2021). Тъй като тези молекули са химически заредени, те могат да балансират излишъка на йони в клетките и по този начин да играят критична роля в регулацията на клетъчно рН и осмотичния потенциал (López-Bucio et al., 2000b; Xiang et al., 2019). Зарядът им ги прави отлични метални хелатори в голямо разнообразие от среди. Установено е, че янтарната киселина участва в свързването на метални катиони и освобождаване на фосфор от свързани комплекси (Shahbaz et al., 2006) и също така може да повлияе растежа на първичния корен по време на фосфорен дефицит

(Mora-Macias et al., 2017). Наблюдавана е акумулация на оцетна киселина при растения, подложени на засушаване и оксалат при биотичен стрес (Lehner et al., 2008; Kim et al., 2017).

И при трите ендемитни вида са установени вторични метаболити типични за представителите на род *Stachys* – фенилетаноидни гликозиди, иридоиди, фенолни киселини и алкалоиди.

При *S. thracica* не са установени разлики в качествения метаболитен състав между *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения, с изключение на две неидентифицирани флавоноидни съединения, чиито сигнали са регистрирани само в ЯМР спектъра на *ex vitro* адаптираните растения. Фенилетаноидният гликозид - вербаскозид е идентифициран в екстрактите, изолирани от всички варианти и при трите растителни вида, а левкосептозид А е установен при всички варианти на *S. thracica*, в *in situ* и *ex vitro* растения *S. scardica*, но липсва в екстрактите от *S. bulgarica*. Хлорогеновата киселина (фенолна киселина) е установена в *S. thracica* и *S. scardica*, но не присъства в метаболитния профил при нито един от вариантите на *S. bulgarica* (Таблица 5).

При *S. bulgarica* преобладаващите вторични метаболити спадат към групата на иридоидите – идентифицирани са алобетоникозид, харпагид и ацетилхарпагид. Забелязва се, че условията на култивиране повлияват в значителна степен метаболитните профили при различните варианти на този растителен вид. Алобетоникозидът е идентифициран при *in situ*, *in vitro* култивираните и *ex vitro* адаптираните растения, докато харпагидът е установен само в екстракта, изолиран от *in vitro S. bulgarica*. Ацетилхарпагидът присъства в профилите на *in vitro* култивираните и *ex vitro* адаптираните растения и липсва при диворастящите растения (Таблица 5). В метаболитния профил на *S. thracica* не са установени съединения с иридоидна природа при нито един от изследваните варианти, а при *S. scardica* са идентифицирани алобетоникозид и ацетилхарпагид единствено в екстрактите, изолирани от *in vitro* култивираните растения.

Таблица 5. Идентифицирани метаболити при *in situ* диворастящи, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от род *Stachys*.

Метаболит										Сигнали, мултиплетност и константа на свързване
	<i>S. thracica in situ</i>	<i>S. thracica in vitro</i>	<i>S. thracica ex vitro</i>	<i>S. bulgarica in situ</i>	<i>S. bulgarica in vitro</i>	<i>S. bulgarica ex vitro</i>	<i>S. scardica in situ</i>	<i>S. scardica in vitro</i>	<i>S. scardica ex vitro</i>	
Аминокиселини										
Аланин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	δ 1.47 (d, J = 7.2)
Валин	+	+	+	-	+	+	-	-	-	δ 0.99 (d, J = 7.0) / δ 1.04 (d, J = 7.0)

Захари										
α-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	δ 5.17 (d, J = 3.8)
β-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	δ 4.56 (d, J = 7.9) / 3.18 (dd, J = 7.9, 9.2)
захароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	δ 5.37 (d, J = 3.8)
Органични киселини										
Оцетна киселина	+	+	+	+	-	+	+	-	+	δ 1.92 (s)
Млечна киселина	+	+	+	-	-	-	-	+	-	δ 1.31 (d, J = 6.9) / δ 4.08 m
Янтарна киселина	+	+	+	+	-	+	+	-	+	δ 2.48 (s)
Мравчена киселина	+	+	+	-	-	-	+	+	+	δ 8.45 (s)
Ябълчена киселина	+	+	+	-	-	-	-	+	-	δ 2.80 (dd, J = 16.9, 8.2) / δ 2.93 (dd, J = 16.9, 3.9)
Фенолни киселина										
Хлорогенова киселина	+	+	+	-	-	-	+	+	+	δ 7.60 (d, J = 15.7) / δ 7.13 (d, J = 2.2) / δ 7.06 (dd, J = 8.2, 2.2) / δ 6.86 (d, J = 8.3) / δ 6.33 (d, J = 15.9) / δ 5.30 (td, J = 4.9, 10.9) / δ 4.18 (br q, J = 3.1)
Фенилетаноидни гликози										
Вербаскозид	+	+	+	+	+	+	+	+	+	δ 7.63 (d, J = 15.9) / δ 7.14 (d, J = 2.0) / 7.05 (dd, J = 8.3, 2.0) / δ 6.67 (dd, J = 8.3, 2.0) / δ 6.34 (d, J = 15.9) / 4.93 (t, J = 9.6) / 4.47 (d, J = 7.9) / δ 2.81 (t, J = 7.2) 1.04 (d, J = 6.4)
Левкосептозид А	+	+	+	-	-	-	+	-	+	δ 7.70 (d, J = 15.8) / δ 7.23 (d, J = 1.9) / 7.16 (dd, J = 8.3, 2.0) / δ 6.89 (dd, J = 8.3, 2.0) / δ 6.41 (d, J = 16.0) / 4.93 (t, J = 9.6) / 4.47 (d, J = 7.9) / δ 3.88 (s) / δ 2.81 (t, J = 7.1) 1.04 (d, J = 6.4)
Иридоиди										
Алобетоникозид	-	-	-	+	+	+	-	+	-	δ 6.46 (d, J = 6.4) / δ 6.10 (bs) / δ 5.92 (d, J = 1.3) / δ 5.30 (d, J = 8.3) / δ 5.02 (dd, J = 6.4, 1.2) / δ 4.71 (d, J = 7.8) / δ 2.33 (s)
Харпагид	-	-	-	-	+	-	-	-	-	δ 6.35 (d, J = 6.5) / δ 5.71 (bs) / δ 4.56 (d, J = 7.9) / δ 1.24 (s)
8-Ацетилхарпагид	-	-	-	-	+	+	-	+	-	δ 6.42 (d, J = 6.5) / δ 6.04 (d, J = 1.3) / δ 4.96 (dd, J = 6.5, 1.7) / δ 4.67 (d, J = 7.9) / δ 2.04 (s) / δ 1.43 (s)
Алкалоиди										
Тригонелин	+	+	+	-	+	-	+	-	+	δ 9.12 (s) / δ 8.83 (m) / δ 8.07 (m) / δ 4.43 (s)
Други										
Холин	+	+	+	-	+	+	-	+	-	δ 3.19 (s)
Неидентифицирани фенолни съединения	-	-	+	-	-	-	-	-	-	δ 7.99 (d, J = 8.9) / δ 7.10 (d, J = 8.9) / δ 7.93 (d, J = 8.9) / δ 6.99 (d, J = 8.9)

“+“ – наличие на съответното съединение; “-“ – липса на съответното съединение

Алколоидът тригонелин е идентифициран при всички изследвани варианти на *S. thracica*, а при останалите два растителни вида е установен само в *in vitro* култивирани *S. bulgarica* и при *in situ* и *ex vitro* адаптирани растения *S. scardica* (Таблица 5).

Една от основните физиологични роли на вторичните метаболити при растенията е да медираат взаимодействието им с околната среда и тяхното съдържание се променя под влияние на различни фактори като високи и ниски температури, осветеност, патогени, тревоядни животни и др. Промените в метаболитния състав при трите изследвани ендемитни представители от род *Stachys* са показателни за различните съединения, които имат значение при адаптацията на отделните видове, както от *in situ* в *in vitro* среда, така и от *in vitro* към *ex vitro* условия. От получените резултати, прави впечатление, че съдържанието на вербаскозид не се променя в зависимост от условията на култивиране при нито един от изследваните растителни видове, което предполага, че други съединения са отговорни за адаптирането им. При иридоидите обаче се наблюдава различна тенденция. При *S. bulgarica* съдържанието на алобетоникозид не се променя при различните варианти, докато при *S. scardica* е идентифициран само при *in vitro* култивирани растения. Харпагидът се открива само при *in vitro* култивирани *S. bulgarica*, а ацетилираната му форма и в *ex vitro* адаптираните растения. По принцип биосинтеза на иридоидите силно се повлиява от условията на околната среда и това е демонстрирано в редица експерименти. При отглеждането на *Scrophularia lanceolata* на сянка и на по-интензивна осветеност е установено повишаване на съдържанието на харпагозид, който е произведен на харпагида, при растенията, отглеждани на светло, което вероятно е свързано със значението на харпагозида при защита на растението от UVB лъчите. В друго изследване е установено, че *in vitro* култивирани *Scrophularia takesimensis*, отглеждани на синя LED светлина акумулират повече харпагозид, в сравнение с тези, отглеждани на бяла флуоресцентна светлина и червена LED светлина (Brownstein et al., 2021). Демонстрирано е също така, че харпагид се открива предимно в стъблата при видовете *Scrophularia spp.*, а неговото производно харпагозида се акумулира в листата при по-високи температури. Според Georgiev et al., (2013) харпагидът най-вероятно се транспортира по флоема до листата, където се синтезират негови производни - харпагозид и ацетилхарпагид.

Вербаскозидът е един от най-характерните вторични метаболити за род *Stachys*. Вербаскозид и левкосептозид А са идентифицирани също и в *S. officinalis*, *S. recta*, *S. affinis*, *S. alpina subsp. dinarica*, *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. byzantine*, *S. plumose*, *S. iva*, *S. candida*, *S. schtschegleevii*, и други (Tundis et al., 2014; Tomou et al., 2020). И двете съединения се характеризират с широк спектър на биологична активност – антиоксидантна, противовъзпалителна, хепатопротективна, анти-диабетична и други (Alipieva et al. 2014,).

Хлорогеновата киселина е друг основен метаболит, който присъства с висок интензитет в ЯМР спектрите на екстрактите от *S. thracica* и *S. scardica*. Представява биологично-активна фенолна киселина, характерен за семействата *Asteraceae* и *Lamiaceae* (Naveed et al., 2018). Хлорогеновата киселина проявява ценни терапевтични свойства – антиоксидантна, антибактериална, хепатопротективна, кардиопротективна, противовъзпалителна, антипиретична, невропротективна и анривирална активност. Установено е също, че хлорогеновата киселина може да модулира липидния метаболизъм и нивата на глюкоза както при генетични, така и при придобити метаболитни нарушения (Naveed et al., 2018).

Харпагидът се счита за таксономичен маркер за род *Stachys*. През последните години съединението предизвика интереса на редица учени, поради потенциалното си приложение като противовъзпалително средство. Установено е, че след хидролиза, полученото съединение освен, че може да инхибира експресията на COX-2 ензима, намалява продуцираните от него простагландини, играейки ролята на конкурентен инхибитор (Frezza et al., 2020). Освен противовъзпалителна активност, за харпагида е демонстрирано, че проявява и антиоксидантна активност, невропротективна, антитуморна, спазмолитична и антимикробна (Frezza et al., 2020). Алобетоникозидът се среща доста по-рядко и е идентифициран само при отделни представители от род *Stachys* – *S. macrantha*, *S. glutinosa* и *S. officinalis* (Venditti et al., 2015).

Биологичните свойства на тригонелина, производно съединение на витамин В6, са обстойно проучени, особено при състояние на диабет и заболявания на централната нервна система. Проявява също хипогликемичен, хиполипидемичен, невропротективен, антимигренозен и успокоителен ефект, както и има способност да подобрява паметта и да намалява диабетната невропатия и агрегацията на еритроцитите. Установено е също, че тригонелина засяга клетъчната регенерация, инсулиновата секреция, активността на ензими, свързани с глюкозния метаболизъм, активните кислородни форми, аксоналното разширение и възбудимост на невроните (Zhou et al., 2012).

3.2. Екстракция с метанол на растителен материал от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*

Метанолови екстракти са получени чрез използване на фино смляна суха биомаса от надземни части на *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*. Добивът на груб екстракт за всеки един от вариантите спрямо изходното количество сух растителен материал, използван за екстракцията е представен в Таблица 6.

Най-висок добив на екстракт е получен при *in vitro* култивираните растения *S. thracica* (28 %), последван от *S. scardica* (26.7 %) и *S. bulgarica* (23.5 %). Добивът на екстракт при *in situ* и *ex vitro* вариантите на изследваните представители е по-нисък и е в диапазона 14 – 20 %. Получените екстракти са използвани за последващи изследвания, свързани с количествено определяне на фенолни съединения и проследяване на биологичната активност.

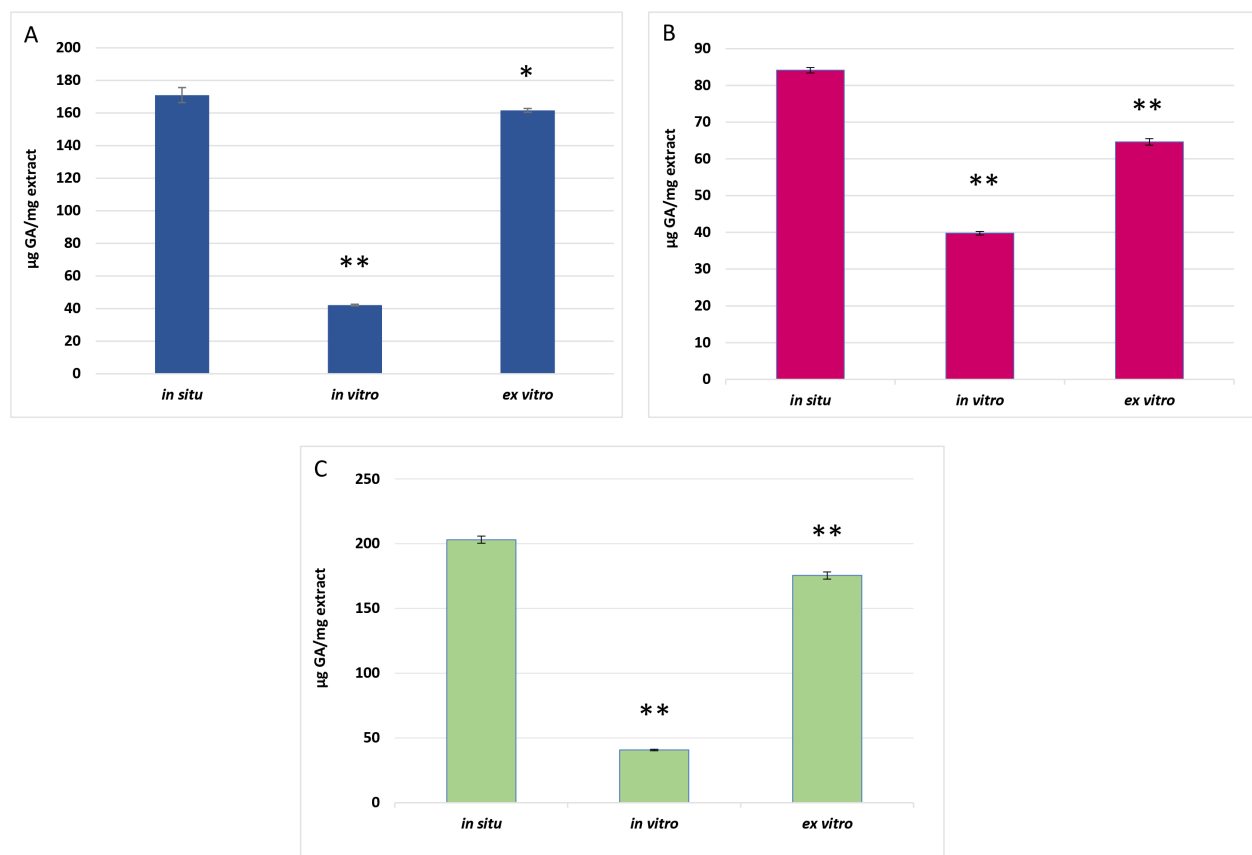
Таблица 6. Добив (%) на груб екстракт след екстракция с метанол

	<i>S. thracica</i>			<i>S. bulgarica</i>			<i>S. scardica</i>		
	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i>
Добив (%)	14.3	28	13.75	12.3	23.5	19.9	19.4	26.7	19.8

3.3. Количествено определяне на феноли и флавоноиди в екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения

Фенолите са една от най-разнообразните в химично отношение група вторични метаболити при растенията и се характеризират с разнообразни фармакологични свойства като антиоксиданта, противовъзпалителна, антимикробна, антитуморна и кардиопротективна активност (*Tungmunnithum et al., 2018*) Като част от вторичния метаболизъм, техния биосинтез и количество значително се повлиява от условията на средата. Определянето на общото съдържание на феноли и флавоноиди при *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* дава информация за промяната в количеството на тези метаболити при растения с един и същ генотип, но култивирани в различни условия.

Най-високо количество феноли при *S. thracica* е отчетено в екстрактите, изолирани от *in situ* и *ex vitro* адаптирани растения (171 ± 4.5 и 161.6 ± 1.24 $\mu\text{g GAE mg/екстракт}$), като не се наблюдава чувствителна разлика между двата варианта. Обратна зависимост се наблюдава при съдържанието на флавоноиди, което е най-високо при *ex vitro* адаптираните растения, следвано от *in situ* диворастящите растения (41.7 ± 0.68 и 29.7 ± 0.65 $\mu\text{g QE mg/екстракт}$, съответно). При *in vitro* култивираните растения общото съдържание на феноли намалява почти четири пъти, а това на флавоноидите два пъти в сравнение с диворастящите растения (Фиг.11). Подобна зависимост се наблюдават и при *S. scardica*, като най-високо количество феноли е отчетено в *in situ* диворастящите и *ex vitro* адаптираните растения – 203.14 ± 2.7 и 175.5 ± 2.7 $\mu\text{g GAE mg/екстракт}$ съответно, докато най-високо количество флавоноиди е установено в *ex vitro* адаптираните растения, следвано от *in situ* диворастящите – 41.6 ± 0.8 и 34.6 ± 0.8 $\mu\text{g Q mg/екстракт}$ съответно (Фиг. 6).

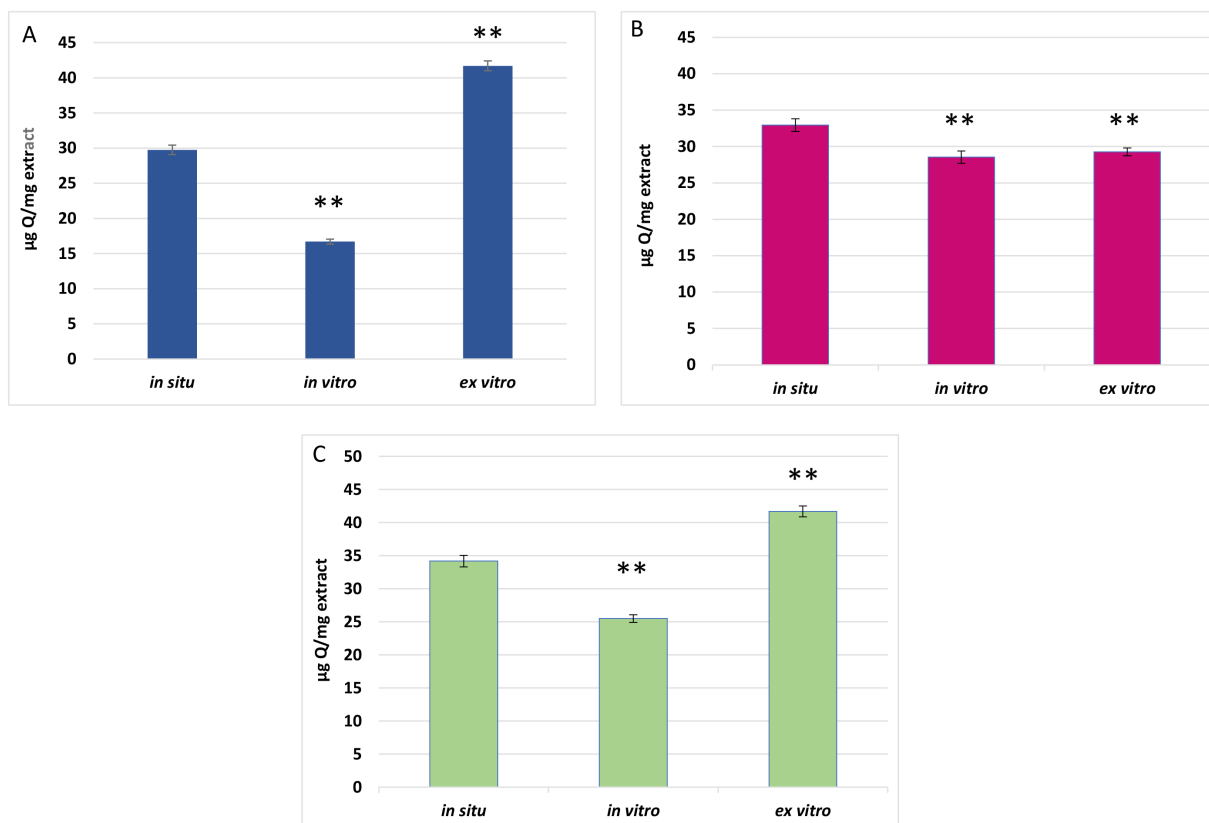


Фигура 6. Тотално съдържание на феноли ($\mu\text{g GA/mg}$ екстракт) в метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения; A – *S. thracica*; B – *S. bulgarica*; C - *S. scardica*; представено е стандартно; отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$

При *S. bulgarica* се наблюдава същата тенденция по отношение на количеството на фенолните съединения, както при *S. thracica* и *S. scardica*, с тази разлика, че видът синтезира два пъти по-ниско количество в сравнение с тях. Съдържанието на флавоноидите обаче е съизмеримо с това при останалите два вида, като не се наблюдава разлика при *in vitro* култивираните и *ex vitro* адаптираните растения (Фиг. 6 и Фиг. 7).

И при трите вида растения се наблюдава тенденция за намаляване на общото количество на феноли и флавоноиди при *in vitro* култивираните растения, в сравнение с диворастящите и *ex vitro* адаптираните растения. Сходни резултати докладват и *Cuce et al.* (2017), като установяват близо седем пъти по-ниско съдържание на тотални феноли в *in vitro* култивирани растения *S. annua* в сравнение с диворастящите растения от същия вид. При други растителни моделни системи също е установено намаляване на общото съдържание на феноли и флавоноиди при *in vitro* култивирани растения, в сравнение с диворастящите и *ex vitro* адаптираните растения (*Al Khateeb et al.* 2012; *Danova et al.* 2012; *Nikolova et al.* 2013). Вероятно асептичните условия на култивиране в контролирана среда, както и миксотрофното

хранене оказват влияние върху количеството на фенолните съединения и флавоноидите в изследваните *in vitro* култивирани представители от род *Stachys*.



Фиг. 7. Съдържание на флавоноиди ($\mu\text{g QA/mg}$ екстракт) в метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения; A - *S. thracica*; B - *S. bulgarica*; C - *S. scardica*; представено е стандартно отклонение ($\pm\text{SD}$) и статистически значимите стойности - $*p\leq 0.05$, $**p\leq 0.001$

Като характерна група за род *Stachys*, фенолните съединения и тяхното съдържание е добре проучено при всички изследвани представители. Тъй като родът е космополитен, количеството на фенолните съединения варира значително между различните видове, които обитават различни местообитания. Редица изследователи обаче установяват, че именно фенолетанонидните гликозиди са основните фенолни съединения при представителите на рода. При *S. cretica. subsp. Vacillans*, който е в една субсекция със *S. thracica*, е установено значително количество на общите феноли и флавоноиди (57.65 ± 2.33 mg GAE/g extract; 40.24 ± 1.38 mg QE/g extract, съответно, като в най-високо количество е установен вербаскозидът - 1362.53 ± 15.47 $\mu\text{g/g}$ (Kirkan, 2019). При друг подвид - *S. cretica. subsp. merinaea*, ендемит за Турция, също е установено високо количество на общи фенолни съединения в метанолови екстракти – 83 mg GAE/g extract (Bahadori et al., 2019).

4. Сравнителна биологична активност на екстракти, изолирани от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* по време на процеса на *ex situ* съхранение.

Изследвания през последните години показват, че екстракти от ранилист притежават различни фармакологични ефекти като противовъзпалително, антитоксично, антибактериално, антиоксидантно, хепатопротективно, цитотоксично, антипролиферативно действие и притежават потенциал да стимулират зарастването на рани (*Pirbalouti et al., 2011; Ma et al., 2012; Paun et al., 2018; Guo et al., 2018; Tomou et al., 2020*). Сравнителното изследване на биологичната активност на метанолови екстракти, изолирани от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* по време на тяхното *ex situ* съхранение е от съществено значение за разкриване на техния фармакологичен потенциал.

4.1 Антиоксидантна и радикал улавяща активност на екстракти изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*

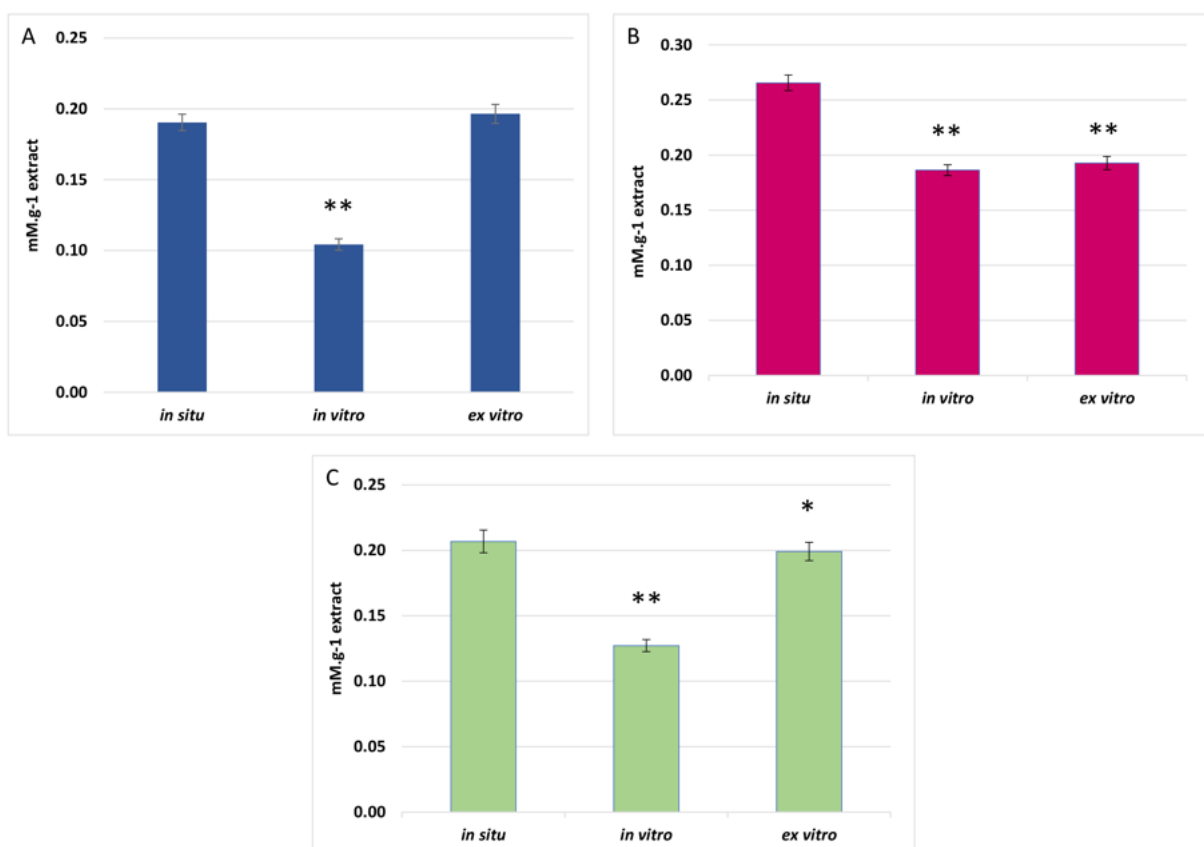
Фенолите са известни като основни антиоксидантни молекули поради техните структурни характеристики и химично поведение. Въз основа на способността да отдават водород, те могат действат като „чистачи“ на свободните радикали и следователно да проявят защитен ефект срещу активни кислородни форми (*Cotelle, 2001*). Проследена е активността на метаноловите екстракти, изолирани от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* да обезвреждат активни форми на кислорода чрез прилагане на методи, измерващи тоталната антиоксидантна активност и анализи, демонстриращи радикал-улавящата способност на екстрактите спрямо свободните радикали DPPH, ABTS и FRAP.

При *S. thracica* е установена положителна корелация между съдържанието на феноли и тоталната антиоксидантна активност (ТАА), като най-висока ТАА е установена при *in situ* диворастящите и *ex vitro* адаптираните растения (0.190 ± 0.005 и 0.197 ± 0.006 mM α -токоферол/g екстракт, съответно). Приблизително двойно по-ниска ТАА е наблюдавана при *in vitro* култивираните растения *S. thracica* (0.104 ± 0.004 mM α -токоферол/g екстракт; Фиг. 8). Подобна зависимост се наблюдаваше и по отношение на желязоредуциращата способност на екстрактите (FRAP). Най-висока е активността на *in situ* диворастящите и *ex vitro* адаптираните растения (2.23 ± 0.05 и 2.07 ± 0.07 mM Fe^{2+} , съответно; Фиг. 11) и три пъти по-ниска активност е отчетена за *in vitro* култивираните *S. thracica* (0.598 ± 0.020 mM Fe^{2+} ; Фиг. 11).

Максимумът на инхибиране на DPPH свободния радикал е 76% и 74% при концентрация 80 $\mu\text{g/ml}$ за *in situ* диворастящите и *ex vitro* адаптирани *S. thracica* и 64% за *in vitro* култивираните растения при най-високата тествана концентрация - 150 $\mu\text{g/ml}$ (Фиг. 9). Най-

ниските концентрации, при които се наблюдава 50% инхибиране (IC_{50}) на DPPH свободния радикал са 8.9 $\mu\text{g/ml}$ за *in situ* диворастящите, 24.4 $\mu\text{g/ml}$ за *ex vitro* адаптираните и 96.3 $\mu\text{g/ml}$ за *in vitro* култивираните растения.

При ABTS радикал-улавящата способност се запазва тенденцията, наблюдавана при по-горе описаните антиоксиданти анализи. При *S. thracica* най-високата ABTS радикал-улавяща способност е установена при *in situ* диворастящите и *ex vitro* адаптираните растения (1.02 ± 0.02 и 0.91 ± 0.03 mg TE mg/екстракт, съответно) и пет пъти по-ниска активност е отчетена за *in vitro* култивираните растения (0.18 ± 0.02 mg TE mg/екстракт; Фиг. 10).



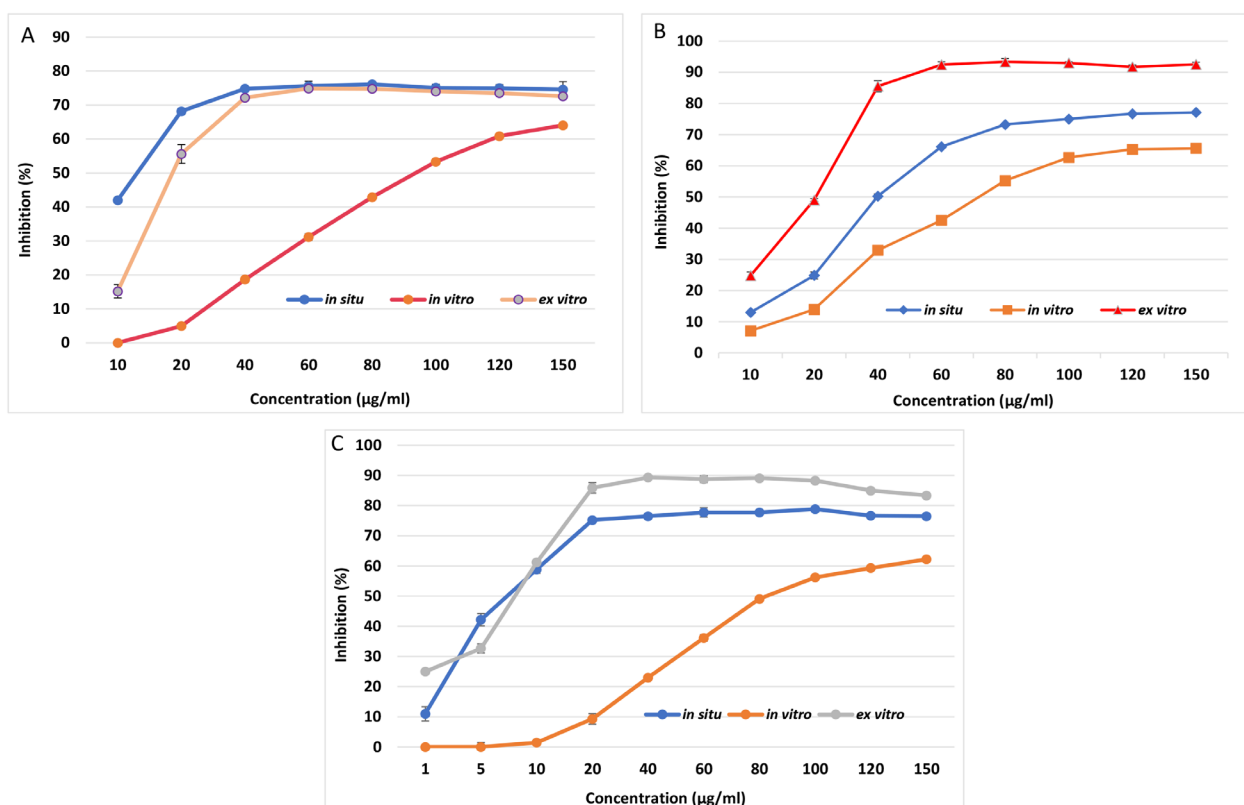
Фигура 8. Тотална антиоксидантна активност (mM.g^{-1} екстракт) на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения A - *S. thracica*; B - *S. bulgarica*; C - *S. scardica* показано е стандартно отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - ** $p \leq 0.001$

При *S. scardica* е установена сходна на тракийския ранилист ТАА, като най-висока активност е установена също при *in situ* диворастящите и *ex vitro* адаптираните растения (0.197 ± 0.006 mM и 0.200 ± 0.007 mM α -токоферол/g екстракт, съответно, Фиг. 8). Получените резултати напълно корелират с установеното в тези варианти количество феноли и флавоноиди, както и с идентифицираните съединения вербаскозид и хлорогенова киселина.

За разлика от *S. thracica*, метаноловите екстракти от *S. scardica* проявяват по-висока DPPH радикал-улавящата способност, като максимумът на инхибиране на радикала достигна почти 90% и 77% при концентрация 60 $\mu\text{g/ml}$ за екстракта от *ex vitro* адаптираните растения и *in situ* диворастящите растения и 62 % за *in vitro* култивирани *S. scardica* при концентрация 150 $\mu\text{g/ml}$ (Фиг. 9). Най-ниските концентрации, при които се наблюдава 50% инхибиране на радикала бяха 8.1 и 8.5 $\mu\text{g/ml}$ за екстрактите от *ex vitro* адаптираните и *in situ* диворастящите растения, съответно (Таблица 7).

По отношение на желязоредуциращата способност, отново най-висока активност се наблюдава при *ex vitro* адаптираните и *in situ* диворастящите растения ($3.3 \pm 0.01 \text{ mM Fe}^{2+}$ и $3.0 \pm 0.05 \text{ mM Fe}^{2+}$, съответно, Фиг.11), като от трите изследвани ендемитни вида, *S. scardica* се отличава с най-висока активност.

Подобна зависимост е установена и спрямо ABTS свободния радикал, където най-висока активност също прояви екстрактът от *ex vitro* адаптираните растения, следван от *in situ* диворастящите *S. scardica* ($1.21 \pm 0.080 \text{ mg TE}$ и $1.056 \pm 0.029 \text{ mg TE g/екстракт}$, съответно, Фиг. 10).



Фигура 9. DPPH – радикал-улавяща способност на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения – A – *S. thracica*, B – *S. bulgarica*, C – *S. scardica*; представено е стандартното отклонение ($\pm SD$)

Таблица 7. Минимална инхибираща концентрация – IC₅₀ (µg/ml) на DPPH свободния радикал от метанолови екстракти от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*

	IC ₅₀ <i>in situ</i>	IC ₅₀ <i>in vitro</i>	IC ₅₀ <i>ex vitro</i>
<i>S. thracica</i>	8.9	96.3	24.4
<i>S. bulgarica</i>	40	73	21
<i>S. scardica</i>	8.5	81	8.1

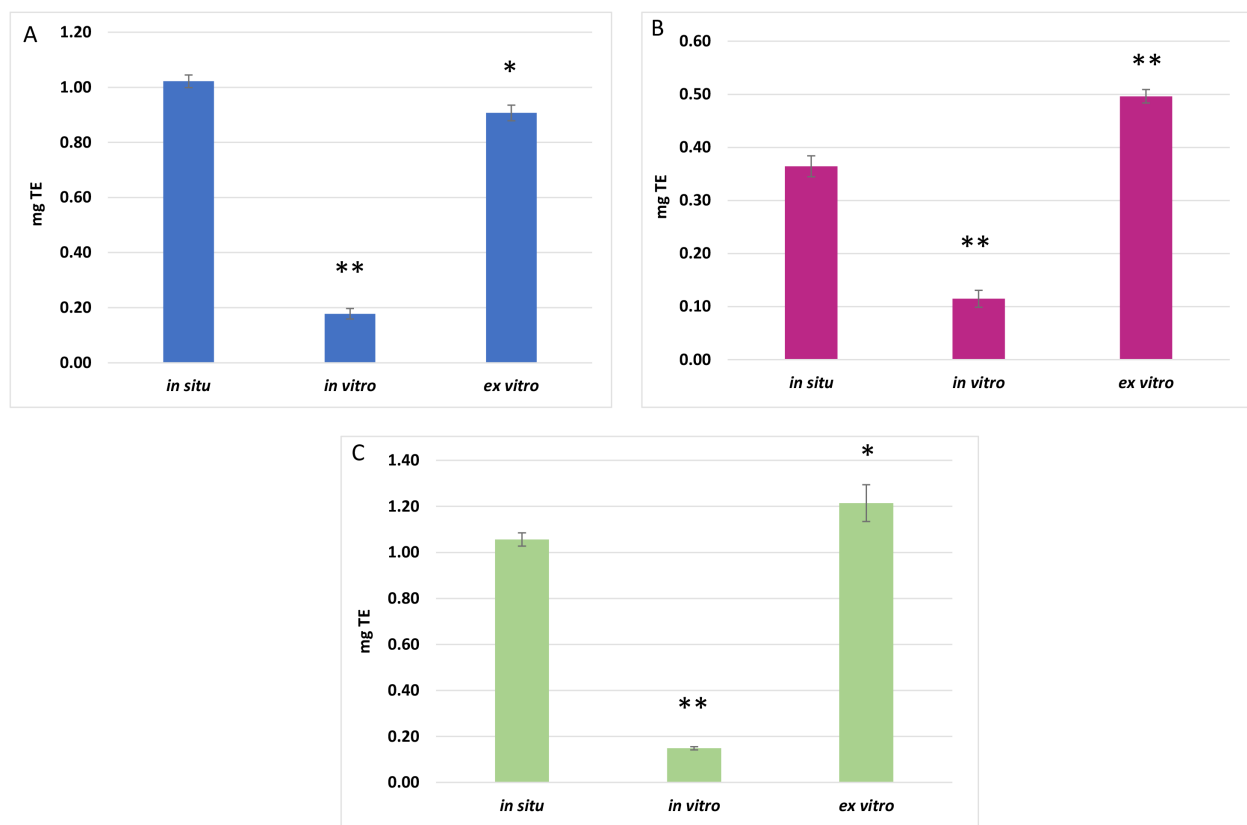
Високата антиоксидантна активност и радикал-улавяща способност на екстрактите от *ex vitro* адаптираните растения *S. thracica* и *S. scardica* напълно корелира с високото съдържанието на фенолни съединения, отчетено при тези варианти (Фиг. 6 и 7). Много е вероятно високият антиоксидантен потенциал на *in situ* диворастящите и *ex vitro* адаптираните растения *S. thracica* и *S. scardica* да се дължи на основните идентифицирани съединения в тези екстракти, а именно вербаскозид и хлорогенова киселина (Таблица 5). Съобщено е, че фенолетаноидните гликозиди и фенолните киселини са мощни антиоксиданти, като могат да обезвредят свободните кислородни форми директно или да разкъсат веригата на пероксидните радикали (Sliumpaite et al., 2013; Tomou et al., 2020). Установено е, че основните съединения, отговорни за високата радикал-улавяща способност на метанолови екстракти от *S. officinalis* са вербаскозид и хлорогенова киселина, съставляващи близо 69% от тоталната антиоксидантна активност на екстракта (Sliumpaite et al., 2013).

За други растителни видове също е демонстрирано, че именно вербаскозидът и хлорогеновата киселина са отговорни за антиоксидантната активност и радикал-улавяща способност на груби полярни екстракти. Lu (2007) сравнява DPPH радикал-улавящата способност на етанолов екстракт от *Flos lonicerae* и изолирана от него хлорогенова киселина. Установява, че изолираната и пречистена хлорогенова киселина успява да обезвреди DPPH свободния радикал до 80% за 20 секунди, докато грубият екстракт само 15% при същите условия. В подобно изследване Luhata et al. (2022) изолират вербаскозид от *Odontonema strictum* и установяват висока DPPH радикал-улавяща способност, с IC₅₀ = 0.09 ± 0.03 µg/ml.

При проучване на метанолови екстракти, получени от надземните части на четири представители на род *Stachys* (*S. alpina* subsp. *dinarica*, *S. anisochila*, *S. beckeana* и *S. plumose*) е установена висока корелация между съдържанието на общи феноли, ТАА и DPPH радикал-улавяща способност (Kukic et al., 2006).

При *in situ* диворастящите *S. bulgarica* се наблюдава по-висока ТАА (0.266 ± 0.007 mM α-токоферол g/екстракт) в сравнение с тази, установена при *S. thracica* и *S. scardica*. При *ex vitro* адаптираните растения обаче се наблюдава понижаване на антиоксидантната активност

спрямо *in situ* диворастящите растения и почти няма разлика между *ex vitro* и *in vitro* вариантите (0.196 ± 0.006 и 0.186 ± 0.005 mM α -токоферол g/екстракт), което корелира с резултатите получени за съдържанието на тотални феноли и флавоноиди при тези варианти на *S. bulgarica* (Фиг. 6 и 7).



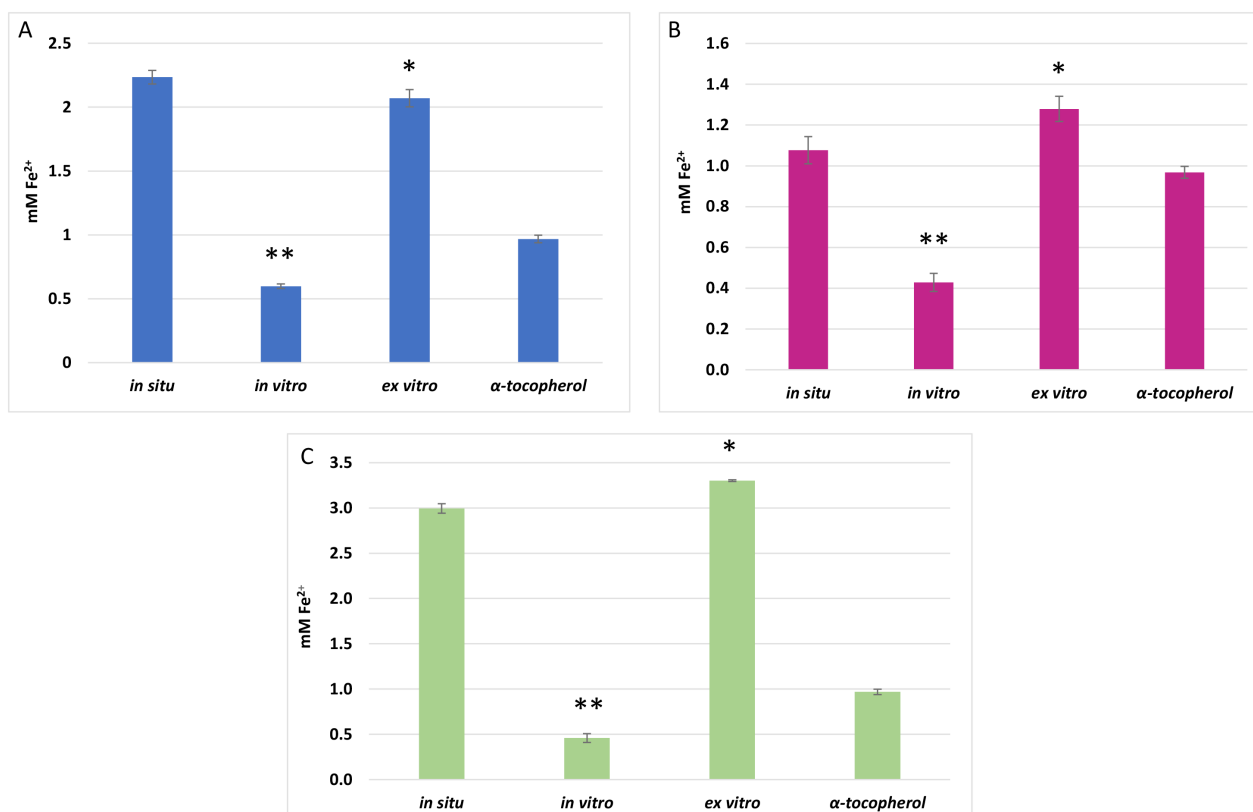
Фиг. 10. ABTS радикал-улавяща способност на метанолови от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения (mg TE); A – *S. thracica*, B – *S. bulgarica*, C – *S. scardica*; представено е стандартно отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$

По отношение на DPPH радикал-улавящата способност, най-високият максимум на инхибиране е близо 92 % при концентрация 60 $\mu\text{g/ml}$ за екстракта от *ex vitro* адаптираните растения, 77% и 65% при концентрация 150 $\mu\text{g/ml}$ за *in situ* диворастящите и *in vitro* култивираните растения, съответно. За разлика от другите два изследвани представителя на род *Stachys*, при *S. bulgarica* се наблюдават по-високи минимални инхибиращи концентрации – 21 $\mu\text{g/ml}$ за *ex vitro* адаптираните, 40 $\mu\text{g/ml}$ *in situ* и 73 $\mu\text{g/ml}$ *in vitro* култивираните растения (Таблица 7).

Същата зависимост се наблюдаваше и при желязоредаващата способност, която е най-висока при екстрактите от *ex vitro* адаптираните и *in situ* диворастящите растения *S. bulgarica* (1.28 ± 0.062 и 1.07 ± 0.066 mM Fe^{2+} , съответно, Фиг. 8). В сравнение със *S. thracica* и *S.*

scardica, *S. bulgarica* проявява по-ниска активност спрямо желязосъдържащият радикал, но въпреки това тя превъзхожда активността на референтното съединение α -токоферол (Фиг.8).

Спрямо ABTS свободния радикал най-висока активност е установена в екстракта от *ex vitro* адаптираните растения *S. bulgarica*, следвани от *in situ* диворастящите (0.5 ± 0.013 и 0.36 ± 0.020 mg TE g/екстракт, съответно, Фиг. 10), но в сравнение с другите два изследвани вида, тя е два пъти по-ниска.



Фиг. 11. Желязоредуцираща способност на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения (mM Fe^{2+}); A – *S. thracica*, B – *S. bulgarica*, C – *S. scardica*; представено е стандартно отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$

При всички изследвани варианти на *S. thracica*, *S. scardica* и *S. bulgarica* се наблюдава обща закономерност за висока антиоксидантна активност при *in situ* диворастящите растения, понижаване при *in vitro* култивиранияте варианти и възстановяване на активността при *ex vitro* адаптираните растения, което е в пълна корелация с резултатите, получени за общото количество на тоталните феноли и флавоноиди.

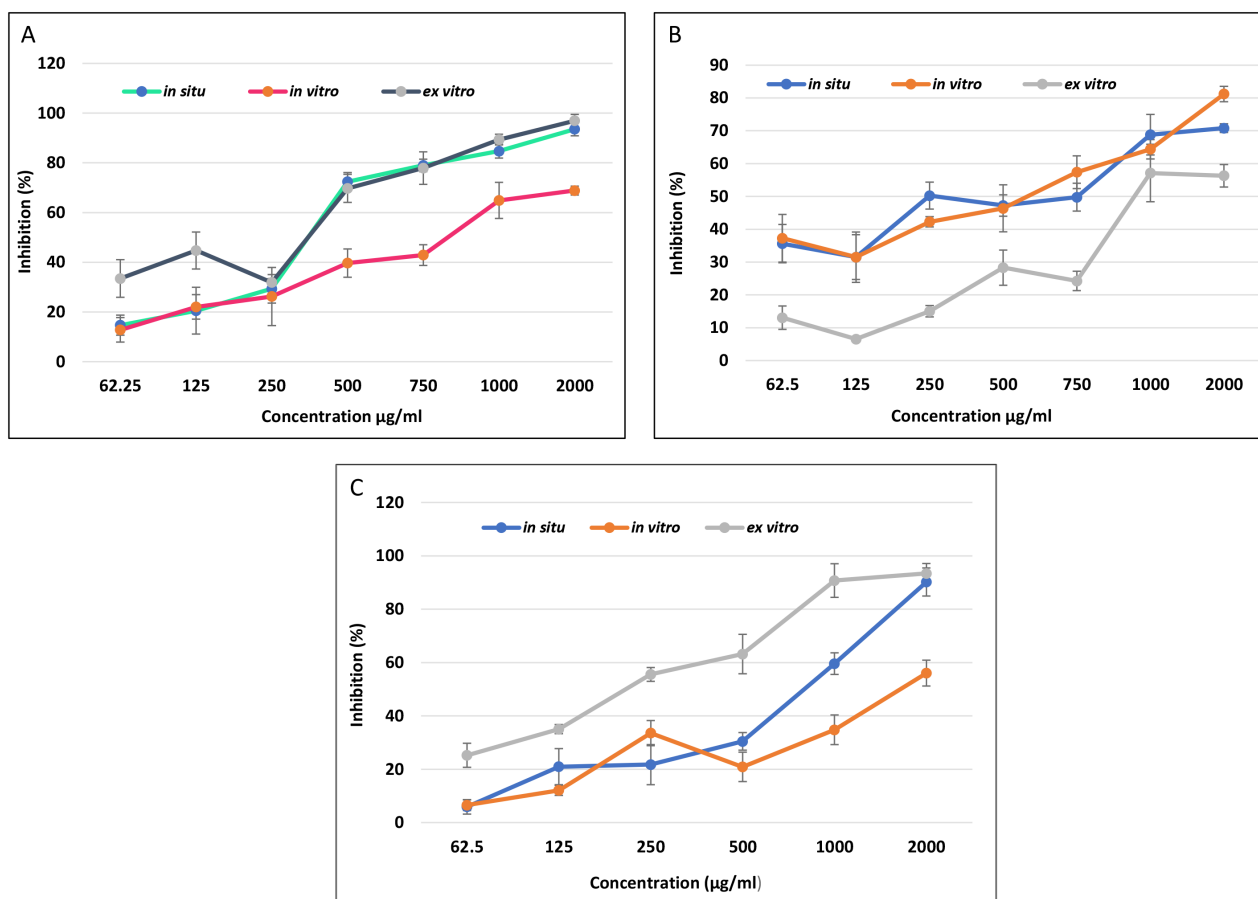
4.2 Противовъзпалителна активност на екстракти изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*

Противовъзпалителната активност е изследвана чрез проследяване на ефекта на метаноловите екстракти, изолирани от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* върху хемолитичната активност на комплемента по класическия път (СР). Системата на комплемента е вроден ефекторен механизъм, способен да инициира локално възпаление в местата на натрупване на лиганди за неговата класическа разпознаваща молекула C1q, обикновено имунни комплекси, както и да увеличава значително текущия възпалителен отговор чрез генериране на множество провъзпалителни медиатори в каскаден режим. Следователно, инхибирането на активирането на комплемента би довело до дълбок противовъзпалителен ефект.

След третиране на еритроцитната суспензия с метаноловите екстракти, изолирани от изследваните видове ранилист - *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* се наблюдава дозово зависимо инхибиране на системата на комплемента. Екстрактите от *in situ* и *ex vitro* адаптираните растения от *S. scardica* и *S. thracica* показват сходна степен на инхибиране, достигаща максимално до 93% и 97%, при концентрация от 2000 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, докато тези от *in vitro* култивирани растения достигат максимум 56% и 69% съответно (Фиг. 12). Най-ниските концентрации на екстрактите от *S. thracica*, при които се наблюдава 50 % инхибиране (IC_{50}) на хемолизата, са 351.7 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ за *in situ*, 358.5 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ за *ex vitro* адаптирани и 872 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ за *in vitro* култивирани растения. При *S. scardica* най-ниската IC_{50} концентрация е установена при *ex vitro* адаптираните растения - 227 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, последвани от *in situ* - 840 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ и *in vitro* растенията - 1785 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ (Таблица 8). Екстрактите от *in situ* и *ex vitro* аклиматизираните растения имат не само сходни тенденции на инхибиране на СР, но също така и сравнима противовъзпалителна ефективност. Екстрактите от *in vitro* култивирани растения притежават значително по-ниска противовъзпалителна активност, което е индикация, че асептичната среда и условията на култивиране значително намаляват концентрацията на фенолни съединения, а оттам и на свързаната с тях противовъзпалителна активност на *in vitro* култивирани растения *S. thracica* и *S. scardica*, докато при *ex vitro* условия биосинтетичният капацитет се възстановява и това води до повишаване и на биологичната активност на растенията.

Наблюдава се съвсем различна тенденция относно инхибиращата активност на екстрактите, изолирани от различните варианти на *S. bulgarica*. Изненадващо, най-висок процент на инхибиране на системата на комплемента е установен при екстракта от *in vitro* култивирани растения – 81%, следван от *in situ* *S. bulgarica* – 70% при концентрация от 2000 $\mu\text{g/ml}^{-1}$. При *ex vitro* адаптираните растения инхибирането е 57%. Най-ниската IC_{50} концентрация е установена при *in vitro* култивирани растения - 600 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, последвани от *in situ* - 750 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ и *ex vitro* адаптираните растенията - 950 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ (Таблица 8). Предполагаме,

че най-вероятно високата противовъзпалителна активност на *in vitro* култивираните *S. bulgarica* се дължи на наличието и на трите идентифицирани иридоида в екстрактите от този вариант – алобетоникозид, харпагид и ацетилхарпагид. Докладвано е, че харпагид в концентрация 1 mg/ml има потенциал да инхибира активирането на системата на комплемента (Frezza et al., 2020).



Фиг. 12. Инхибиране на системата на комплемента от метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения; A - *S. thracica*; B – *S. bulgarica*; C – *S. bulgarica*; показано е стандартно отклонение ($\pm SD$)

Таблица 8. Минимална инхибираща концентрация IC_{50} ($\mu g/ml$) на метанолови екстракти от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* спрямо системата на комплемента

	IC_{50} <i>in situ</i>	IC_{50} <i>in vitro</i>	IC_{50} <i>ex vitro</i>
<i>S. thracica</i>	351.7	872	358.5
<i>S. bulgarica</i>	750	600	950
<i>S. scardica</i>	840	1785	227

През последните години, се наблюдава засилен интерес към проучването и разработването на препарати, инхибиращи системата на комплемента. Oliveira et al., (2021) проследяват инхибиращия ефект на полярни и неполярни екстракти, получени от *Euphorbia*

umbellata, като тяхната инхибираща активност върху класическия път на комплемента е в порядъка на 28-33 % при най-високата тествана концентрация – 416.5 µg/ml. Установено е също така, че етанолови екстракти от *Ligustrum vulgare* и *Phillyrea latifolia*, съдържащи флавоноидите апигенин и лутеолин проявяват значителна инхибираща активност спрямо класическия път на активиране на комплемента (Pieroni et al., 2000). Установено е, че някои иродиди от *Morinda morindoides* също притежават потенциал да инхибират класическия път на комплемента (Cimanga et al., 2003). Съобщено е, че някои фенолни киселини като розмариновата киселина инхибира както класическия, така и алтернативния път на комплемента (Kulkarni et al., 2005).

Противовъзпалителният потенциал на екстракти, изолирани от различни представители на род *Stachys* е демонстриран в различни *in vitro* моделни системи. Maleki-Dizaji et al., (2008) установяват висока противовъзпалителна активност на водно-алкохолни екстракти от *S. schtschegleevii* и асоциират тази потенциал със съдържанието на фенилетаноидните гликозиди – вербаскозид и бетониозид Ф и флавоноиди. Съобщено е, че екстракт от *S. officinalis*, богат на полифеноли, инхибира ензимите липооксигеназа и циклооксигеназа-2 с IC₅₀ – 1.22 µg/ml⁻¹ и 10.1 µg/ml⁻¹ съответно (Paun et al., 2019). Haznagy-Radnai et al. (2012) също съобщават за висока противовъзпалителна активност на водни екстракти от *S. alpina*, *S. germanica*, *S. officinalis* и *S. recta* при карагенан-индуциран оток на лапата при плъхове. Екстрактите показват по-голяма ефективност в сравнение с положителната контрола диклофенак-Na.

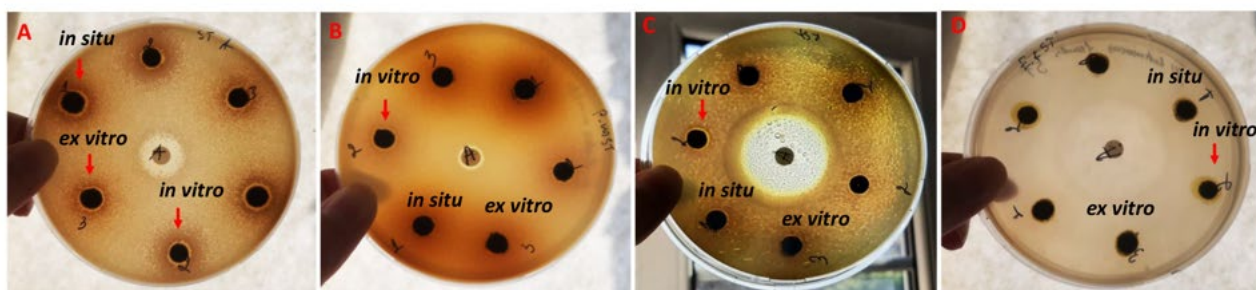
4.3 Антимикробна активност на екстракти изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*

Поради прекомерната и често неправилна употреба на антибиотични препарати, през последните години се наблюдава резистентност при повечето бактериални щамове, предизвикващи инфекции при хората. Антибиотичната резистентност е глобален проблем, чието разрешаване налага все по-засиленото разработване на алтернативни антибиотични продукти (Ventola, 2015). Използването на растения от род *Stachys* за лечение на различни инфекциозни заболявания, включително и за лечението на рани е индикация, че синтезираните от тези видове метаболити действително проявяват антимикробна активност и през последните години научната литература се обогати с доказателства за това (Dehkordy et al., 2016; Ozdemir et al., 2017; Cuce et al., 2017; Shakeri et al., 2019; Aybey, 2020).

Антимикробната активност на метаноловите екстракти, изолирани от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* е тествана срещу бактериални щамове, типични причинители както на вътрешни инфекции, така и на външни и предоставя информация за потенциалната употреба

на ранилистите при инфекциозни заболявания. Метаноловите екстракти от трите изследвани представителя на род *Stachys* са тествани за антимикробна активност срещу седем Грам „-“ бактерии – *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus hauseri*, *Enterobacter cloacea*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, три Грам „+“ бактерии – *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Enterococcus faecalis* и дрождевия щам *Candida albicans*.

Екстрактите от *S. thracica* проявяват активност предимно срещу Грам „-“ бактерии. Най-добре изразена антибактериална активност срещу тест микроорганизмите *A. calcoaceticus*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *E. faecalis* е установена при третиране с екстракти, изолирани от *in vitro* култивирани растения (Фиг. 13).



Фиг. 13. Антимикробна активност на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*. А – *A. calcoaceticus*, В – *P. mirabilis*, С – *K. pneumoniae*, D – *E. faecalis*. Зоните на инхибиране са означени със стрелка.

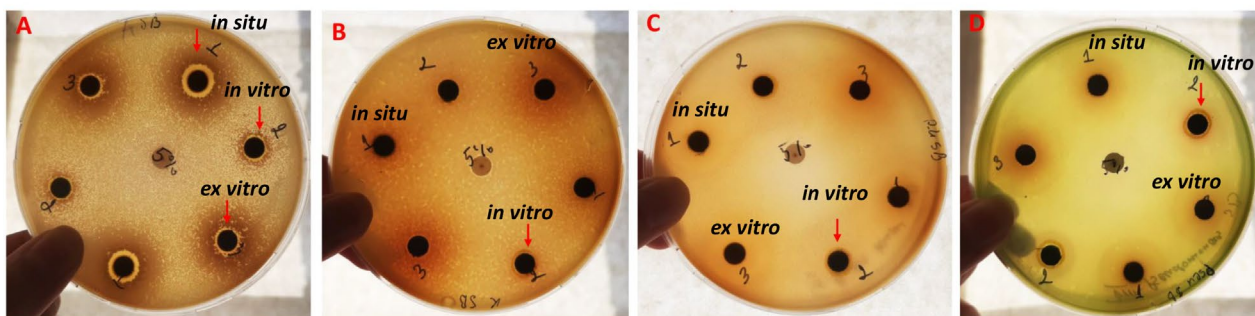
От всички тествани щамове най-чувствителен е *A. calcoaceticus*, срещу който и трите типа екстракта от *S. thracica* показват зона на инхибиране при диск-дифузионния метод, както и еднакви минимални инхибиращи концентрации (МИК) в порядъка на 8 mg/ml (Фиг. 13, Таблица 9). Спрямо *P. mirabilis* и *P. aeruginosa* са отчетени бактериостатични зони при третиране с екстрактите от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, но не е отчетена МИК. Най-ниска минимална инхибираща концентрация от 4 mg/ml е отчетени срещу *K. pneumoniae* и *E. faecalis* при екстракта от *in vitro* култивирани растения.

Таблица 9. Антимикробна активност на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*; ДД – диск-дифузионен метод, МИК – минимална инхибираща концентрация, “*” – бактериостатична зона

Тест микроорганизми	<i>Stachys thracica</i> метанолови екстракти					
	<i>In situ</i>		<i>In vitro</i>		<i>Ex vitro</i>	
	ДД	МИК	ДД	МИК	ДД	МИК
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	9	8	8	8	7.5	8

<i>Proteus mirabilis</i>	6*	-	8*	-	8*	8
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	7	16	9	4	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15*	-	12*	-	10*	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	9*	4	-	-

A. calcoaceticus е почвена бактерия, но често е асоциирана с инфекции в болничните заведения, поради способността ѝ да формира комплекс с патогена *Acinetobacter baumannii* (Mancilla-Rojano et al., 2020). Alpay et al. (2017) съобщават за активност на етанолов екстракт от *S. annua subsp. annua* срещу *A. baumannii*, като измерената зона на инхибиране е 9 mm.



Фиг. 14. Антимикробна активност на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. bulgarica*. A – *A. calcoaceticus*, B – *K. pneumoniae*, C – *P. hauseri*, D – *P. aeruginosa*. Зоните на инхибиране са означени със стрелка.

Екстрактите от *S. bulgarica* проявяват активност към *A. calcoaceticus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *P. hauseri* (Фиг. 14). Нито един от екстрактите не притежава активност срещу *E. faecalis*. Спрямо *P. aeruginosa* и *P. hauseri* са установени бактериостатични зони при третиране с екстрактите от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. bulgarica*, но само при екстракта от *in vitro* култивираните растения е отчетена и минимална инхибираща концентрация в порядъка на 16 mg/ml. Съобщено е, че метанолов екстракт от *in vitro* култивирани растения *S. annua* също проявява активност срещу *P. aeruginosa* (Cuce et al., 2017). Най-ниска минимална инхибираща концентрация от 2 mg/ml е отчетени срещу *K. pneumoniae* при екстракта от *in vitro* култивирани растения и 2 mg/ml срещу *P. hauseri* при третиране с екстракта, изолиран от *ex vitro* адаптираните растения (Таблица 10).

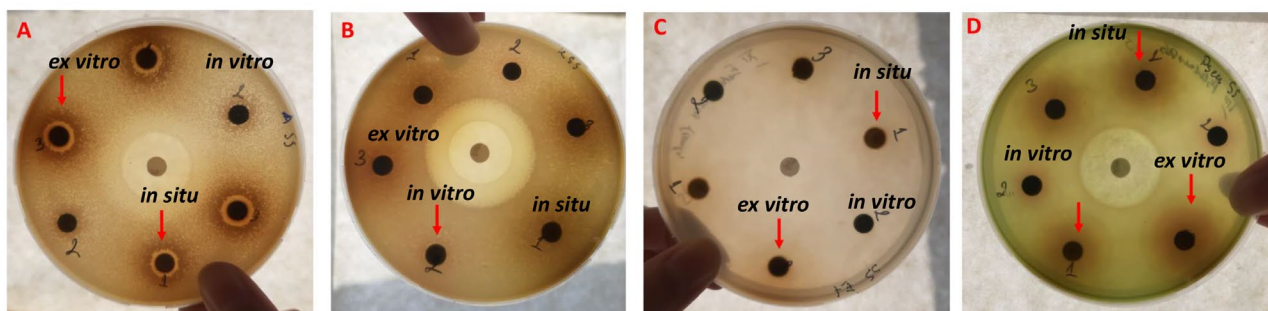
От получените резултати прави впечатление, че метаноловите екстракти, изолирани от *in vitro* култивирани *S. bulgarica* притежават по-добре изразена антимикробна активност в сравнение с всички изследвани екстракти, изолирани от различните варианти на *S. thracica* и *S. scardica*. Предполагаме, че най-вероятно това се дължи на наличието на иридоиди като

харпагид, алобетоникозид и ацетилхарпагид само в този екстракт. Съобщено е, че харпагидът притежава добре изразена антибактериална активност спрямо *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* с МИК 0.25 mM (Frezza et al., 2020).

Таблица 10. Антимикробна активност на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения *S. bulgarica*; ДД – зона на инхибиране, измерена по диск-дифузионния метод, МИК – минимална инхибираща концентрация, “*” – бактериостатична зона

Тест микроорганизми	<i>Stachys bulgarica</i> метанолови екстракти					
	<i>In situ</i>		<i>In vitro</i>		<i>Ex vitro</i>	
	ДД	МИК	ДД	МИК	ДД	МИК
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	11	8	8	-	8	8
<i>Proteus mirabilis</i>	8*	-	7*	-	-	-
<i>Proteus hauseri</i>	10*	4	7*	8	15*	2
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	-	-	8	2	7.5	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20*	-	15*	16	20*	-
<i>Staphylococcus aureus</i>			8*	32		

Метаноловите екстракти от *S. scardica* проявяват значително по-ниска антимикробна активност в сравнение с екстрактите, изолирани от *S. thracica* и *S. bulgarica*. Екстрактът от *in situ* *S. scardica* проявява активност спрямо *A. calcoaceticus* и *E. faecalis* със зони на инхибиране 10 mm и 8 mm и МИК 16 и 32 mg/ml съответно. Спрямо *P. aeruginosa* е установена бактериостатична зона, но не беше отчетена МИК (Таблица 11). С най-ниска ефективност се оказва екстрактът от *in vitro* култивирани растения, при който зона на инхибиране и МИК са отчетени само срещу *K. pneumoniae* – 7 mm и 32 mg/ml съответно (Фиг. 15, таблица 11). Подобно на *S. bulgarica* и при *S. scardica* е установена слаба активност срещу *S. aureus*, отчетена при екстракта от *ex vitro* адаптирани растения с бактериостатична зона на инхибиране – 7 mm и МИК - 32 mg/ml (Таблица 11).



Фигура 15. Антимикробна активност на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения *S. scardica*. A – *A. calcoaceticus*, B – *K. pneumoniae*, C – *E. faecalis*, D – *P. aeruginosa*. Зоните на инхибиране са означени със стрелка.

През последните години се обръща голямо внимание на антимикробната активност на екстракти, изолирани от различни представители на род *Stachys*, като е изследвана активността както на екстракти, съдържащи фенолетаноидни гликозиди, така и на етерични масла. *Shakeri et al.* (2019) съобщават за висока активност на метанолов екстракт от *S. parviflora* срещу *Bacillus cereus*, с МИК – 0.12 mg/ml. Установена е висока активност на метанолов екстракт, изолиран от *S. cretica* L. subsp. *smyrnaea* срещу *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* и *Yersinia enterocolitica* (Aybey, 2020). *Cuce et al.* (2017) изследват активността на полярен и неполярен екстракт, получени от диворастящи и *in vitro* култивирани растения *S. annua* и установяват висока активност на метаноловия екстракт от *in vitro* култивираните растения срещу *P. aeruginosa*, с МИК – 6.35 mg/ml. Наблюдавана е и инхибираща активност на водно-алкохолни екстракти от *S. lavandulifolia* срещу *S. aureus* и *E. faecalis* (Dehkordy et al., 2016).

Таблица 11. Антимикробна активност на метанолови екстракти от *in situ*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения *S. scardica*; ДД – зона на инхибиране, измерена по диск-дифузионния метод, МИК – минимална инхибираща концентрация, “*” – бактериостатична зона

Тест микроорганизми	<i>Stachys scardica</i> метанолови екстракти					
	<i>In situ</i>		<i>In vitro</i>		<i>Ex vitro</i>	
	ДД	МИК	ДД	МИК	ДД	МИК
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	10	16	-	-	10	16
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	-	-	7.5	16	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	32	-	-	8	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16*	-	9*	-	20*	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	7*	32

Най-вероятно установената антибактериална активност при изследваните представители от род *Stachys* се дължи на наличието на вербаскозид в изолираните екстракти. Съобщено е, че вербаскозидът притежава активност срещу *P. mirabilis* и *S. aureus* при концентрации 64 µg/ml и 128 µg/ml съответно (Didry et al., 1999). По-късно тези резултати се потвърждават и от Souza et al., (2010), които установяват активност на този вторичен метаболит срещу *S. aureus* и *S. epidermitis* при концентрации 63 µg/ml и 32 µg/ml съответно. Подобни резултати са докладвани и от Agampodi et al. (2021), които съобщават, че вербаскозидът притежава потенциал да инхибира растежа на *S. aureus*, *S. epidermitis*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* и *A. baumannii* в концентрации 9.77 µg/ml, 9.77 µg/ml, 1250 µg/ml, 312.5 µg/ml и 1250 µg/ml съответно.

5. Корелационен анализ

Чрез прилагане на корелационен анализ може да се установи взаимовръзката между изследваните параметри – количество на вторични метаболити и биологична активност. Статистическият показател, който е използван за определяне на степента на корелация е коефициентът на обикновена линейна корелация на Пирсън (r).

Таблица 12. Корелационен коефициент между тоталното съдържание на феноли, флавоноиди и биологичната активност на вида *S. thracica*

<i>S. thracica</i>	ТАА	АВТС	FRAP	DPPH	Инхибиране на комплекента
Феноли	0.992	0.998	1.000	0.998	0.983
Флавоноиди	0.904	0.810	0.831	0.877	0.926

r – коефициент на Пирсън; $r \leq 0.1$ – липсва зависимост, $r > 0.3$ – има умерена корелация, $r > 0.8$ – има много силна корелация

При *S. thracica* се наблюдава висока степен на корелация между количеството на основните вторични метаболити – феноли и флавоноиди и изследваната антиоксидантна и противовъзпалителна активност (Таблица 12). Високата степен на корелация е знак за силна взаимовръзка между изследваните параметри, което означава, че именно фенолите и флавоноидите, като преобладаващи вторични метаболити в метаноловите екстракти от *S. thracica* са отговорни както за антиоксидантната, така и за противовъзпалителната активност. Получените резултати от ЯМР-метаболитното профилиране потвърждава наличието на фенолни съединения като вербаскозид, левкосептозид А и хлорогенова киселина с доказана антиоксидантна и противовъзпалителна активност.

Таблица 13. Корелационен коефициент между тоталното съдържание на феноли, флавоноиди и биологичната активност на вида *S. scardica*

<i>S. scardica</i>	ТАА	АВТС	FRAP	DPPH	Инхибиране на комплекента
Феноли	0.997	0.956	0.968	0.856	0.973
Флавоноиди	0.842	0.938	0.923	0.994	0.914

r – коефициент на Пирсън; $r \leq 0.1$ – липсва зависимост, $r > 0.3$ – има умерена корелация, $r > 0.8$ – има много силна корелация

Резултатите от корелационния анализ на *S. scardica* наподобяват тези при тракийския ранилист. И при този представител се наблюдава силна корелация между количеството на

тоталните феноли и флавоноиди и антиоксидантната и противовъзпалителната активност (Таблица 13). Получената взаимовръзка най-вероятно се дължи на установените вторични метаболити с фенолна природа (вербаскозид, левкосептозид А и хлорогенова киселина).

Таблица 14. Корелационен коефициент между тоталното съдържание на феноли, флавоноиди и биологичната активност на вида *S. bulgarica*

<i>S. bulgarica</i>	ТАА	АВГS	FRAP	DPPH	Инхибиране на комплементa
Феноли	0.872	0.694	0.798	0.446	-0.551
Флавоноиди	0.998	0.316	0.461	0.017	-0.138

r – коефициент на Пирсън; $r \leq 0.1$ – липсва зависимост, $r > 0.3$ – има умерена корелация, $r > 0.8$

– има много силна корелация

При *S. bulgarica* се наблюдава силна корелация само между съдържанието на тотални феноли, флавоноиди и тоталната антиоксидантна активност, но при радикал-улавящата активност тя е умерена, като между DPPH и флавоноидите не се наблюдава зависимост. Между противовъзпалителната активност и съдържанието на феноли и флавоноиди корелационният коефициент е отрицателен, което е индикация за обратна зависимост между параметрите. Ниските стойности на коефициента на Пирсън са показател за умерена обратна зависимост, което означава, че фенолите и флавоноидите вероятно имат слабо отношение към биологичната активност на метаноловите екстракти от *S. bulgarica*. При този представител от род *Stachys* преобладаващите вторични метаболити са иридоите – алобетоникозид, харпагид и ацетилхарпагид и най-вероятно те са отговорни за проявената противовъзпалителната активност на изолираните от него екстракти.

VI. ИЗВОДИ

Въз основа на проведените изследвания се оформят следните изводи:

1. Балканският ендемитен вид *S. thracica* е въведен в *in vitro* условия чрез стерилизация на семената в етанол и микроразмножаване на регенерантите върху MS хранителна среда без добавени растежни регулатори. Растенията се отличават с висок размножителен коефициент (11.14 ± 0.73) и силно коренообразуване.
2. Заstraшените от изчезване ендемитни видове *S. bulgarica* и *S. scardica* са въведени в *in vitro* култура чрез стерилизация на семената в етанол и *in vitro* култивиране на регенерантите върху среда, съдържаща 1.0 mg/L BA и 1.5 mg/L BA съответно и последващо прехвърляне на микрорастенията върху основна MS хранителна среда без добавени растежни регулатори за индуциране на коренообразуване. Растенията от двата вида притежават висок размножителен коефициент (8 ± 0.71 и 22.6 ± 2.47 съответно).
3. Постигната е тристепенна *ex vitro* адаптация на *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* (растежна камера, оранжерия и опитно поле) с висока степен на преживяемост - 83%, 96%, и 92% съответно. И трите растителни вида се характеризират със запазена генетична стабилност в процеса на *ex situ* съхранение.
4. В метаболитните профили на *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* са идентифицирани общо 18 първични и вторични метаболити, имащи отношение към адаптацията на растенията към променящите се условия на заобикалящата ги среда.
5. В *S. thracica* преобладават фенилетаноидни гликозиди (вербаскозид, левкосептозид А), фенолни киселини (хлорогенова киселина) и алкалоиди (тригонелин), докато при *S. bulgarica* доминират вторичните метаболити от групата на иридоидите (алобетоникозид, харпагид и ацетилхарпагид). В профила на *S. scardica* са еднакво застъпени всички по-горе описани метаболити, с изключение на харпагида, спадащ към групата на иридоидите.
6. Асептичните условия на култивиране и миксотрофното хранене значително намаляват количеството на тоталните феноли и флавоноиди, а оттам и асоциираната с тях биологична активност и при трите изследвани представителя от род *Stachys*. При адаптиране на растенията в *ex vitro* условия биосинтетичният потенциал и свързаната с него биологична активност се възстановяват.

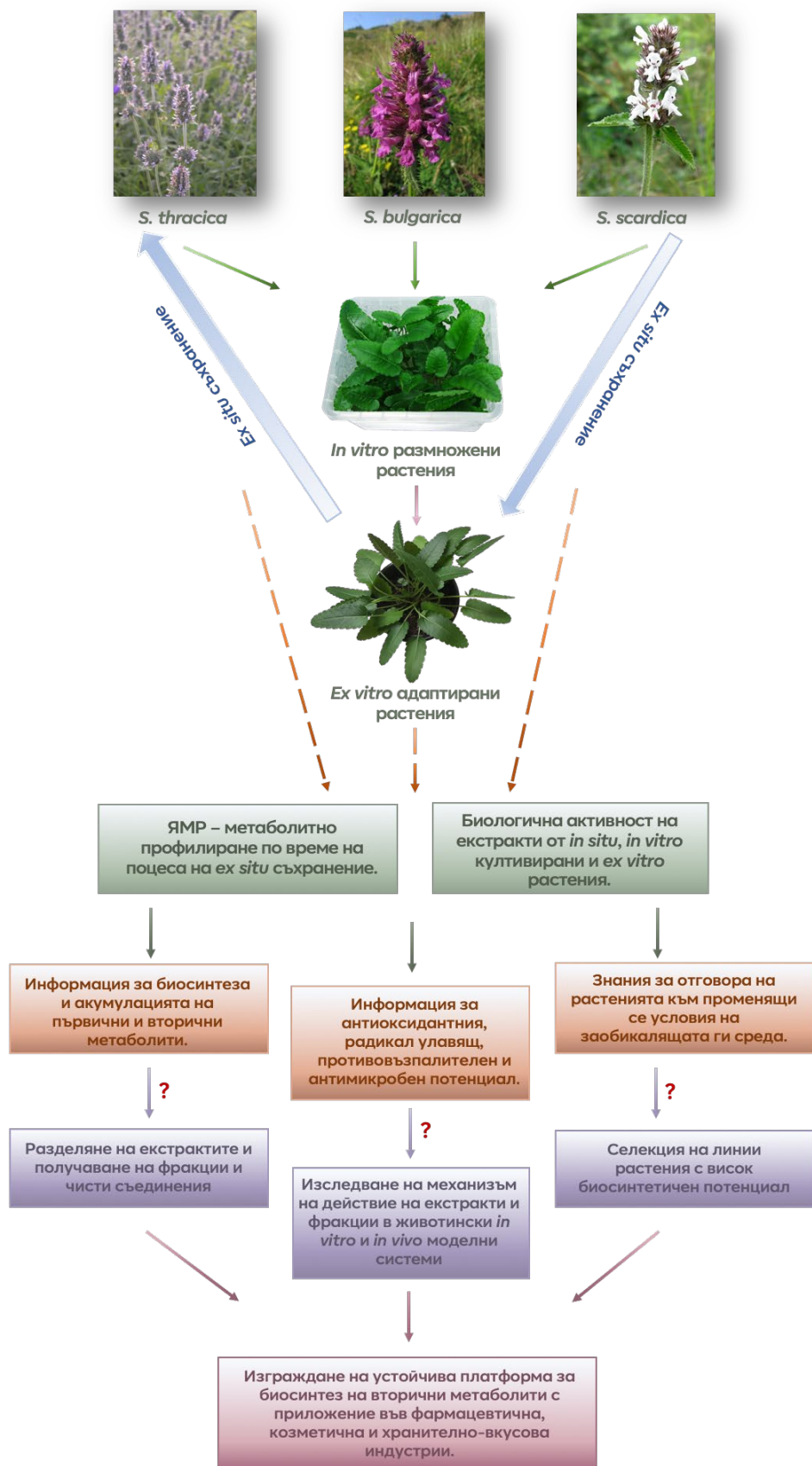
7. Най-висока антиоксидантна и радикал улавяща активност е установена при *in situ* и *ex vitro* адаптираните растения *S. scardica* > *S. thracica* > *S. bulgarica*, което е в пълна корелация с отчетената при тези варианти висока концентрация на общи феноли и флавоноиди.
8. Екстрактите от *in situ* и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica* и *S. scardica* притежават висока инхибираща активност спрямо системата на комплемента с максимум на потискане от 95% при концентрация 2 mg/ml, докато при *S. bulgarica*, *in vitro* култивираните растения притежават най-висок противовъзпалителен потенциал и 80% инхибиране на комплемента при концентрация 2 mg/ml. Резултатите корелират с биологичната активност на идентифицираните групи вторични метаболити при трите изследвани представителя от род *Stachys*.
9. Метаноловите екстракти от *S. bulgarica* > *S. thracica* > *S. scardica* притежават умерена активност спрямо Грам “-”, бактерии, като най-чувствителни на третиране са *A. calcoaceticus* и *K. pneumoniae*.
10. Успешното индуциране на *in vitro* и *ex vitro* култури е алтернативен биотехнологичен подход за съхранение на ендемитните видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* и ефективен инструмент за по-добро управление и „експлоатация“ на вторичния метаболизъм на растенията от род *Stachys* в бъдеще с цел създаване на т.нар. “растителни клетъчни/тъканни фабрики“ за биосинтез на фармацевтично значими метаболити и нутрицевтици.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прилагането на биотехнологичен подход за индуциране на *in vitro* и *ex vitro* култури от *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* позволи оптимизирането на протоколи за *ex situ* съхранението на тези застрашени от изчезване балкански ендемитни видове (Фиг. 16). Благодарение на създадените моделни системи се постигна сравнително ЯМР – метаболитно профилиране и изследване на биологичния потенциал на метанолови екстракти, изолирани от *in situ* диворастящи, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от трите ендемитни вида. Най-вероятно първични метаболити, като органични киселини и непротеинови аминокиселини, участват във фин синхрон с вторични метаболити при регулацията на отговора за адаптиране на растенията към променящите се условия на заобикалящата ги среда.

В метаболитните профили на трите изследвани растителни вида се установи различен качествен състав и доминиращи различни групи вторични метаболити. В *S. thracica* преобладават фенилетаноидни гликозиди, фенолни киселини и алкалоиди, докато при *S. bulgarica* застъпени са метаболити от групата на иридоидите. В профила на *S. scardica*, в зависимост от условията на култивиране, са идентифицирани всички описани по-горе групи вторични метаболити. И при трите ендемитни вида се забелязва тенденция за намаляване на количеството на фенолните съединения и флавоноидите, а оттам и на антиоксидантния, радикал улавящ, антибактериален и противовъзпалителен потенциал при култивирането им в асептична среда. Въпреки това, биосинтетичният потенциал и свързаната с него биологична активност се възстановяват след адаптиране на растенията в *ex vitro* условия.

Проведените от нас изследвания дават нова информация за представителите от род *Stachys* и биосинтеза на биологично активни метаболити при променящи се условия на заобикалящата ги среда. Последващи проучвания, свързани с разкриване на механизма на действие на изолирани екстракти и/или фракции в животински *in vitro* и *in vivo* моделни системи, биха допринесли за цялостното охарактеризиране на биологичния потенциал на тези видове и изграждане на иновативна и устойчива платформа за биосинтез на фармацевтично значими метаболити чрез селекция на *in vitro* култивирани/*ex vitro* адаптирани линии с висок биосинтетичен потенциал.



Фиг. 16. Схематичен модел на *ex situ* съхранение и сравнително изследване на балканските ендемитни видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*.

VIII. Справка за приносите на дисертацията

Приноси с оригинален характер

1. За първи път е постигнато *ex situ* съхранение и запазена генетична идентичност на балканските ендемитни видове *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*, чрез индуциране на *in vitro* стъблени култури и *ex vitro* адаптиране в условия на растежна камера, оранжерия и опитно поле.
2. Оригинални са сведенията за ЯМР – метаболитно профилиране на *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*. Показано е, че условията на култивиране значително повлияват качествения и количествен състав на вторичните метаболити, а оттам и на асоциираната с тях биологична активност.
3. Получена е нова информация за антиоксидантната, радикал улавящата, противовъзпалителната и антимикробната активности на метанолови екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica* и е установена корелация с биологичната активност на идентифицираните групи вторични метаболити при трите изследвани представителя от род *Stachys*.
4. За първи път е проследена инхибиращата активност спрямо системата на комплемента на метанолови екстракти, изолирани от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани *S. thracica*, *S. bulgarica* и *S. scardica*.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е наличието на фенилетаноидни гликозиди, фенолни киселини, иридоиди и алкалоиди при представители от род *Stachys*.
2. Получена е потвърдителна информация за стимулиращия ефект на растежния регулатор бензиладенин (БА) при *in vitro* мултипликация на растения.

IX. Научни публикации, участия в научни форуми и проекти, свързани с дисертационния труд

Публикации в научни списания

1. **Mantovska, D.I.**, Zhiponova, M.K., Georgiev, M.I., Alipieva, K., Tsacheva, I., Simova, S. and Yordanova, Z.P., 2022. Biological Activity and NMR-Fingerprinting of Balkan Endemic Species *Stachys thracica* Davidov. *Metabolites*, 12(3), p.251 **IF: 4.9**
2. **Mantovska, D.**, Petrova, D., Yocheva, L. and Yordanova, Z., 2022. Comparative determination of antimicrobial activity of the Balkan endemic species *Stachys thracica* Davidov during the process of ex situ conservation. *BioRisk*, 17, pp.357-365 **SJR=0.17**

Участия в научни конференции

1. **Mantovska D.**, Yordanova Zh. (2018) Доклад на тема: *Ex situ* conservation and comparative determination of radical scavenging activity of the Balkan endemic species *Stachys thracica* Davidov - "International Scientific Conference "Kliment's Days" – 8th November 2018, Sofia, Bulgaria
2. **Mantovska D.**, Rogova M., Yordanova Zh. (2019) Постер: "Ex situ conservation of endemic species from genus *Stachys*" - 8th International Symposium of Ecologists of Montenegro – 2-6 October 2019, Budva, Montenegro
3. **Mantovska D.**, Rogova M., Yordanova Zh. (2019) Постер: „Ex situ conservation of the Bulgarian endemic plant *Stachys bulgarica* Degen & Neic.“ - Jubilee Scientific conference “Current achievements and trends in ornamental and medicinal plant research”, 40th Anniversary of Institute of Ornamental and Medicinal Plants – 9th May 2019, Sofia, Bulgaria
4. **Mantovska D.**, Yordanova Zh. (2020) Постер: „Comparative determination of radical scavenging activity of the Bulgarian endemic plant *Stachys bulgarica* Degen & Neič during the process of ex situ conservation“– Plant Biology Europe – 28 June – 01 July 2021, Turin, Italy, (Online)
5. **Mantovska D.**, Zhiponova M., Petrova D., Georgiev M., Alipieva K., Tsacheva I., Yocheva L., Simova S., Yordanova Zh.* (2021) Доклад на тема: „Biological activity and NMR-fingerprinting of Balkan endemic species *Stachys thracica* Davidov“– 5th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food – 25 – 30 August, Nanchang, China,

(Online)

6. **Mantovska D.**, Petrova D., Yocheva L., Yordanova Zh. (2021) Постер: „Comparative determination of antimicrobial activity of the Balkan endemic species *Stachys thracica* Davidov during the process of *ex situ* conservation“– International seminar of Ecology – 29-30 September 2021, Sofia, Bulgaria, (Online) **Трета награда за най-добре представен постер**
7. **Mantovska D.**, Bonchev G., Zhiponova M., Yordanova Zh. (2021) Постер: “Taxonomic studies via DNA barcoding of Balkan endemic *Stachys* species”–International conference on Botany and Mycology – 25-26 October 2021, Sofia, Bulgaria, (Online)
8. **Mantovska D.**, Alipieva K., Simova S., Yordanova Zh. (2021) Постер: “NMR fingerprinting of Balkan endemic species from genus *Stachys*” - Scientific Conference “Kliment Days” – 5th November, 2021, Sofia, Bulgaria

Участия в проекти свързани с темата на дисертационния труд

1. “Метаболитно профилиране на екстракти от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от род *Stachys*“, Член, СУ, Номер на договора: 80-10- 38/22.03.2021
2. “Антимикробна активност на екстракти получени от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от ендемитни видове от род *Stachys*“, Член, СУ, Номер на договора: 80-10-4/18.03.2020
3. “Сравнително определяне на състава на етеричното масло в *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения от балканския ендемитен вид *Stachys thracica* DAVIDOV”, Член, СУ, Номер на договора: 80-10-196/16.04.2019
4. “Биотехнологичен подход за *ex situ* съхранение на застрашени видове от род *Stachys*“, Член, СУ, Номер на договора: 80-10-197/26.04.2018

Благодарности

Изказвам искрените си благодарности на научния си ръководител доц. д-р Жения Йорданова за вдъхновението, усилията, споделените знания и конструктивната критика, без които този дисертационен труд нямаше да се реализира. Благодаря на колегите от Катедра Биохимия към Биологическия факултет, Центъра по Фитохимия към БАН и Агробиоинститут за участието при осъществяването на голяма част от експерименталната работа, както и за възможността да почерпя от техния професионален опит. Сърдечни благодарности на доц. д-р Мирослава Жипонова за винаги оказваната помощ и плодотворните дискусии. Благодаря на гл. ас. Детелина Петрова за оказаното съдействие и внимание при извършаването на антимикробната активност. Големи благодарности на всички от екипа на Катедра Физиология на растенията за подкрепата, споделения опит, готовността им да им да помогнат, винаги когато имах нужда, както и приятелската работна атмосфера.

Благодаря и на всички мои близки и приятели, които проявиха търпение към мен през този не лек, но плодотворен и полезен за моето личностно и професионално развитие период.