



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
Биологически факултет
Катедра “Физиология на растенията”

Мария Ангелова Рогова

***Ин vitro* размножаване на българския ендемит *Achillea thracica*:
възможност за *ex situ* опазване на рядък, застрашен и защитен вид
от българската флора.**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен
“Доктор”

Направление 4.3. Биологични науки (Физиология на растенията- *ин vitro*
култивиране на лечебни растения)

Научен ръководител:
Проф. д-р Венета Михова Капчина-Готева

София, 2017

Дисертационният труд съдържа 138 страници и е онагледен с 36 фигури и 18 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 213 литературни източника 211, от които е на латиница и 2 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и одобрен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра „Физиология на растенията” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, проведено на 24.08.2017 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2017 г. от 10:00 ч. в 326 зала на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”.

Използвани съкращения:

БАВ биологично активни вещества;
АФК активни форми на кислорода;
АЦВ ацикловир
ABTS 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid);
DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl;
HPLC високо ефективна течна хроматография;
IC50 50% инхибираща активност;
MS_{B5} хранителна среда по Murashige and Skoog с добавени витамини по Gamborg;
GS/МС газ хроматограф масспектометър;
RT време на задържане;
RI индекс на задържане (Ковач Индекс);
ТАА тотална антиоксидантна активност;
Trolox 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина;
TEAC тролокс еквивалентен антиоксидантен капацитет;
Me S соксклетен метанолов екстракт;
Ch S соксклетен хлороформен екстракт;

Увод:

Броят на лечебните растения в света намалява с всяка изминала година поради процеси като урбанизацията, неспазването на законите за събиране на диворастващи видове или слабата осведоменост на хората. Голяма част от тези растения притежават лечебни свойства, употребяват се за удовлетворяване на хранителните нужди на човечеството и са от огромно значение за развитието и живота на други организми. Тези важни аспекти обуславят нуждата от защита и съхранение на тези важни организми като ресурс, поради което различните държави и организации насочват вниманието си към разработване на различни планове и механизми за съхранението на тези ценни видове като въвеждане на законодателни уредби, за съхранение на място и разработка на планове за *ex situ* размножаване, култивиране и съхранение.

Achillea thracica Velen. е лечебно тревисто многогодишно растение, богато на моно- и сесквитерпени, фенолни киселини и флавоноиди. Наличието на тези биологично активни вещества обуславят неговите лечебни свойства като кръвоспиращо, антиоксидантно, противовъзпалително, амтимикробно и други. Растението е български ендемит и е представен само от една малочислена популация, разположена в землището на село Маноле, Пловдивско. С оглед на опазването му са предприети редица законодателни мерки за защита от изчезването на това растение, но непосредствената му близост до населената област и начинът му на разпространение налагат търсенето и разработването на алтернативни методи за опазването му.

Микроразмножаването е един от методите за съхранение на растенията в контролирани условия посредством вегетативно размножаване на места различни от техните естествени местообитания. Поради свойството тотипотентност на растителната клетка от взетата проба може да се възпроизведат огромен брой растения, клонинги на майчиното, за кратък период от време без значение от външните климатични условия.

Литературен обзор:

- 1.1. Характеристика на *Achillea thracica* Velen.**
- 1.2. Фитохимична характеристика на род *Achillea*.**
- 1.3. Фармакологична активност на екстракти от представителите на род *Achillea*.**
 - 1.3.1. Естрогенен ефект на екстракти.**
 - 1.3.2. Регенериращо действие**
 - 1.3.3. Антидиабетичен ефект**
 - 1.3.4. Действие на екстракти от растения от род *Achillea* върху храносмилателната система.**
 - 1.3.5. Противовъзпалително действие**
 - 1.3.6. Антиоксидантни свойства**
 - 1.3.7. Антимикробни свойства**

1.3.8. Хербецидни свойства

1.3.9. Противоглистно действие

1.3.10. Анксиолитично (успокояващо) действие

1.3.11. Изследвания свързани с ефекта на екстракти на представители от род *Achillea* върху някои нервнодегенеративни заболявания.

1.3.12. Имунулогични свойства на екстракти от представители на род *Achillea*.

1.4. *In vitro* размножаването като метод за *ex situ* консервация на редки и застрашени видове растения:

1.4.1. Същност на микроразмножаването

1.4.2. Избор на експлант и последваща регенерация на растения

1.4.3. Избор на хранителна среда

1.4.4. Стадии на микроразмножаване

1.4.5. Предимства и недостатъци на микроразмножаването

1.4.6. Соматонално вариране и генетична стабилност

1.5. *Ex vitro* адаптация на растения преживяли *in vitro* размножаване.

Цели и задачи

Цел на настоящият дисертационен труд е *ex situ* съхранение на българския ендемитен вид *Achillea thracica* Velen. чрез прилагане на метода на *in vitro* култивиране, анализ на някои първични и вторични метаболити и биологична активност на екстракти от растението.

За изпълнението на целта бяха поставени следните задачи:

1. Събиране на материал от естествените находища на *Achillea thracica* с последваща стерилизация и въвеждане в *in vitro* култура и адаптиране на растения към *ex vitro* условия с помощта на адаптационна камера
2. Проследяване на функционалния статус на *Achillea thracica* чрез определяне на неговата анатомична, физиологична и генетична стабилност по време на неговото *in vitro* размножаване и последваща *ex vitro* адаптация.

3. Приготвяне на ацетонови и соклетни, хексанови и метанолови екстракти от тракийски равнец.
4. Скрининг и сравняване на някои основни групи първични и вторични метаболити при *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* култивирани растения с помощта на няколко вида хроматографски методи.
5. Определяне на антиоксидантна, антивирусна и антибактериална активности на екстракти от *Achillea thracica*.

Материали и методи

1. Растителен материал
2. Получаване на *in vitro* култура от семена на *A. thracica*
3. Изсушаване на растителен материал от *A. thracica*
4. Адаптация на регенерираните *in vitro* растения *A. thracica* във фитотронна камера
5. Изолиране на ДНК за определяне на генетична стабилност на *in vitro* размножени растения тракийски равнец
6. ДНК амплификация (PCR) чрез ISSR праймери
7. Анализ и обработка на резултатите от ДНК анализа:
8. Светлинна микроскопия:
9. Определяне на количеството на пластидните пигменти
10. Анализ на фотосинтетичната активност на *A. thracica*
 - 10.1. Флуоресценция:
 - 10.2. A810-860 абсорбционни изменения.
11. Приготвяне на Соклетни екстракти от *A. thracica*
12. Приготвяне на ацетонови екстракти от *A. thracica*
13. Определяне количеството на тотални феноли
14. Определяне количеството на тоталните флавоноиди
15. Обща антиоксидантна активност
16. DPPH*
17. ABTS*

- 18. Екстракция на етерични масла чрез водно-парна дестилация чрез апарат на Клевинджър**
- 19. Обработка на Сокслетни екстракти за определяне съдържанието на вторични метаболити посредством (GC-MS) анализ**
 - 19.1. Обработка на метанолови Сокслетни екстракти (MeS) за определяне съдържанието на полярни съединения посредством (GC-MS) анализ**
 - 19.2. Обработка на метанолови Сокслетни екстракти (MeS) за определяне съдържанието на фенолни киселини посредством (GC-MS) анализ**
 - 19.3. Обработка на хлороформени Сокслетни екстракти (ChS) за определяне съдържанието на неполярни съединения посредством (GC-MS) анализ**
- 20. Газова Хроматография-Мас Спектрометрия (GC-MS)**
 - 20.1. GC-MS анализ на полярни и неполярни съединения получени съответно от MeS и ChS екстракти на тракийски равнец**
 - 20.2. GC-MS анализ на етерични масла получени посредством водно-парна дестилация на свеж растителен материал чрез апарат на Клевинджър**
 - 20.3. GC-MS анализ на екстракти получени от сух растителен материал**
- 21. Headspace GC-MS анализ (HS-GC-MS)**
- 22. Високоэффективна течна хроматография (HPLC анализ)**
- 23. Антивирусна активност на екстракти**
 - 23. 1. Материали:**
 - 23.1.1 Екстракти:**
 - 23.1.2. Хранителни среди**
 - 23.1.3. Клетъчна линия**
 - 23.1.4. Вирусни модели**
 - 23.2. Методи**
 - 23.2.1. Изследване на преживяемостта на клетките при въздействие с изследваните екстракти (определяне на цитотоксичната концентрация 50 (ЦК₅₀) и максималната нетоксична концентрация (МНК))**

23.2.2. Определяне на действие на екстрактите върху извънклетъчните вириони

23.2.3. Определяне на антивирусното действие на изследваните екстракти върху репликацията на HSV– 1 и 2 и инхибиращата концентрация 50 (ИК₅₀).

24. Изследване на антимикробна активност на екстракти от *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения тракийски равнец

25. Статистическа обработка на резултатите

Резултати и обсъждане:

1. Въвеждане в *in vitro* култура и размножаване на *Achillea thracica* Velen.

Покълването на семената е тествано на воден агар (0,7%) и на хранителна среда по Мурашиге и Скууг (MS, Murashige & Skoog, 1962) с намалена наполовина сила ($\frac{1}{2}$ MS), без растежни регулатори, на тъмно, при стайна температура (25°C).

След 8 седмично култивиране на семената е отчетен броя на заразените семена, средното време за покълване и процента на кълняемост на семената на двата вида среди- $\frac{1}{2}$ MS и WA (Табл. 4). Установено е само едно заражено семе, което говори за успешният подбор на метод за стерилизация на семената. Осемседмичното култивиране на тъмно показва, че най-високият брой идентифицирани покълнеци е отчетен на втората и третата седмица от инкубацията на семената. Най-висок процент на кълняемост е установен при семена култивирани на $\frac{1}{2}$ MS хранителна среда. След 1 седмица култивиране на покълнеците на светло (което време позволява укрепването на стъблото на младото растение и развитието на хлоропласти и съответно на фотосинтетичния апарат) те се прехвърлят на базална MS_{B5}-хранителна среда в отсъствие на растежни регулатори с добавени 3% захароза и 0,7% агар.

Таблица 4. Процент на кълняемост на семената от *A. thracica* култивирани на $\frac{1}{2}$ MS и WA

| Среда | Воден агар (WA) | $\frac{1}{2}$ MS |
|-------|-----------------|------------------|
|-------|-----------------|------------------|

| | | |
|--------------------|-----|-----|
| Покълнали растения | 37% | 51% |
|--------------------|-----|-----|

След 28-30 дневно култивиране на регенериралите растения притежават добре развити „надземни“ органи и силно развита коренова система и се прехвърлят отново на основна MS_{B5}-хранителна среда в отсъствие на растежни регулатори (Фиг. 11). Средният брой розетки, получен след едномесечно култивиране от един експлант е 2,88.

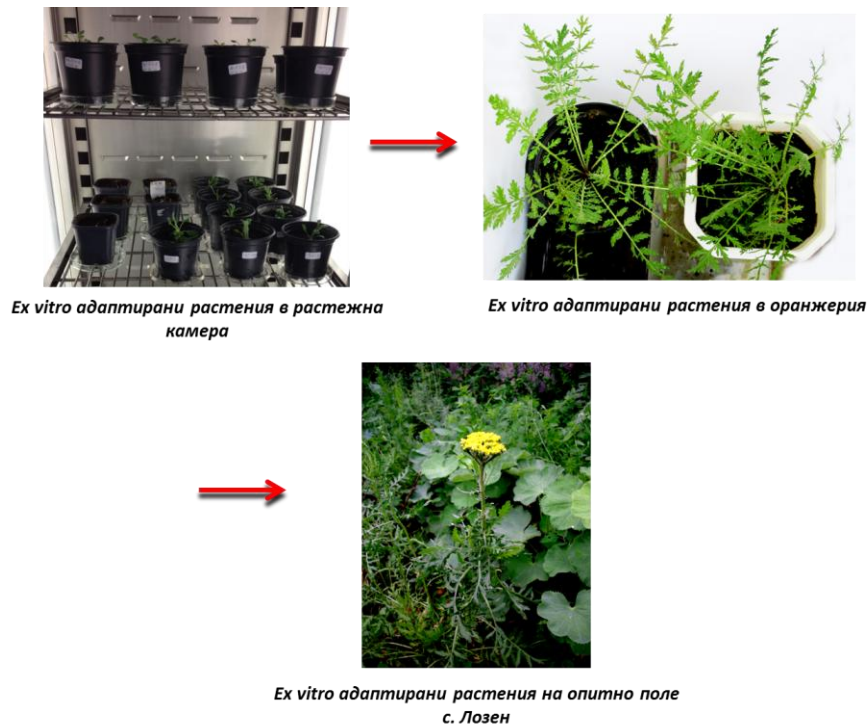
Въпреки данните, които има за микроразмножаването на изключително близкия до *Achillea thracica* вид *Achillea filipendulina* cv. 'Parker' на MS хранителна среда в присъствието на 1 mg/L IAA (индоллил-3-оцетна киселина) и 2 mg/L BA (6-бензиладенин) (Evenog & Reuveni, 2004) опитът ни показва, че MS_{B5}-хранителна среда е по-подходяща за микроразмножаването на *A. thracica* и растението няма необходимост от добавяне на растежни регулатори за развитието си. От своя страна отсъствието на фитохормони в средата намалява многократно разходите по поддържането на *in vitro* културата и понижава риска от поява на соматонално вариране.



Фиг. 11. Етапи на въвежданети в *in vitro* култура и размножаването на *A. thracica*

2. Адаптация на експлантите в *ex vitro* условия

След достигане на физиологична зрялост на растенията, беше проведен опит за *ex vitro* адаптация на регенеранти от *A. thracica* (от линии 3, 12 и 33 по 10, 10 и 8 броя растения от линия съответно) с добре развита коренова система в растежна камера. Растенията бяха засадени в отделни стерилизирани с калиев перманганат саксии с височина 7 cm и диаметър 8 cm в стерилизирана чрез автоклав почвена субстрат, съдържащ градински торф: кокосови влакна: перлит в съотношение 2:1:1. 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%. От 28 заложи растения всички бяха успешно адаптирани (Фиг. 12).



Фиг. 12. Етапи на *ex vitro* адаптация на *A. thracica*

Ex vitro регенерантите на вида, адаптирани в условия на растежна камера бяха аклиматизирани успешно и в оранжерийни условия и след това 4 броя от тях бяха засадени в ботаническата градина във Варна, а останалите на опитно поле в с. Лозен, Софийско. Половината от растенията предоставени на университетската

ботаническа градина във Варна оцеляха след втората година от засаждането им там и към момента се развиват добре. Всички растения засадени на опитното поле се развиват нормално с акумулиране на надземна биомаса.

Броят на успешно адаптираните към външни условия на средата растения често е твърде малък, поради недобре развита коренова структура (Thiart 2003) хетеротрофният начин на живот на *in vitro* растенията, слабофункционалният им устичен апарат и др. (Chandra et al. 2010), което налага подобряването на протокола по тяхната *ex vitro* адаптация. Отчетеният висок процент на адаптивност на растенията *A. thracica* говори за създаването на успешен протокол по адаптация към *ex vitro* условия.

3. Анализ на соматоналната вариация посредством ISSR маркери

Възникването на изменения в структурата на генома на растения преминали през процедура за *in vitro* размножаване е често наблюдаван процес съобщаван от редица изследователи (Bairu et al. 2011). Запазването на генетичния интегритет е от особено значение при създаването на програми за изкуствено размножаване и съхранение особено за видове застрашени от изчезване. Ето защо важен етап от разработването на методики за *in vitro* размножаване и отглеждане на растения е проучването на стабилността на растителния геном преди и след подлагане на съответните процедури. Един от начините за установяване на геномни изменения е да се сравнят генетичните профили чрез използване на молекулярни маркери на растението от което произхожда изходния материал с тези на растения преминали през цялата процедура за *in vitro* размножаване и *ex vitro* адаптация.

За да се установи приложимостта на разработената методика за *ex situ* консервация на тракийски равнец посредством микроразмножаване е сравнен генетичния профили на растението в началният етап (майчиното растение, източник на семена) с профилите на растения в края на процедурата за *in vitro* размножаване и *ex vitro* адаптация. За изследване на генетичното сходство са използвани ДНК проби изолирани от листен материал взет от съответните растителните обекти. Анализът включва генериране и сравняване на ДНК

амплификационни профили получени чрез използване на полимеразна верижна реакция (PCR) на геномна ДНК и ISSR праймери.

Концентрацията и чистотата на ДНК в пробите е от голямо значение за качеството на амплификационните профили при използване на ISSR праймери. Поради тази причина екстракцията на ДНК е проведена от еднакво количество растителен материал взет от сходни по възраст листа от всички растителни обекти, а концентрация на ДНК в пробите е измерена спектрофотометрично чрез НаноДроп и потвърдена чрез гел електрофореза. При необходимост пробите са разреждани, така че всички да съдържат еднакво количество ДНК. В PCR реакциите са използвани 25 μ g ДНК, при която концентрация са получени най-задоволителни резултати.

Първоначално са изследвани профилите на 19 ISSR праймери като са подбрани тези които се характеризират с ясно различими амплификационни фрагменти и при които се наблюдава висока повтораемост на резултатите. За генериране на амплификационни профили са използвани 6 праймери, при които са наблюдавани най-добрите резултати и ДНК от майчиното растение и три линии преминали през 12 пасажа *in vitro* - 3, 33 и 12. От всяка *in vitro* линия са анализирани по три индивидуални *in vitro* растения преминали *ex vitro* адаптация.

Таблица 5. Секвенция, общ брой фрагменти, брой на полиморфните фрагменти и температура на анилинг на използваните ISSR праймери

| Праймер | Секвенция на праймерите | Температура на анилинг (°C) | Общ брой фрагменти | Брой полиморфни фрагменти | % полиморфни фрагменти |
|---------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------|------------------------|
| ISSR 4 | AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT | 50 | 11 | 0 | 0.0 |
| ISSR 8 | AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT | 50 | 12 | 1 | 8.3 |
| ISSR 9 | AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT | 57 | 15 | 0 | 0.0 |

нея е установена само една разлика, а именно липсата на един фрагмент в амплификационния профил наблюдаван при използване на праймер ISSR15. Линията с най-голяма степен на генетична отдалеченост както от майчиното растение така и от другите две линии е линия 3, при която е наблюдаван най-силно изразен полиморфизъм под формата както на липсващи фрагменти с праймери ISSR4 и ISSR10 например, така и на наличието на фрагменти с различни дължини от тези на майчиното растение - при праймер ISSR12.

Наблюдаваните различия между линии 3 и 33 както по между им така с линия 12 и майчиното растение вероятно се дължат на разпадане на хетерозиготни алели или добавянето на нови алели при кръстосано опрашване предвид начина на полово размножаване на тракийският равнец и факта, че линиите включени в анализа произхождат от различни растения получени от семена добити от майчиното растение.

Различия в профилите на трите представители на всяка една от *in vitro* линиите водещи началото си от единично семе обаче не са наблюдавани, което води до заключението, че *in vitro* размножаването и последвалия процес на адаптация *ex vitro* не са предизвикали съществени изменения в структурата на генома на растения тракийски равнец.

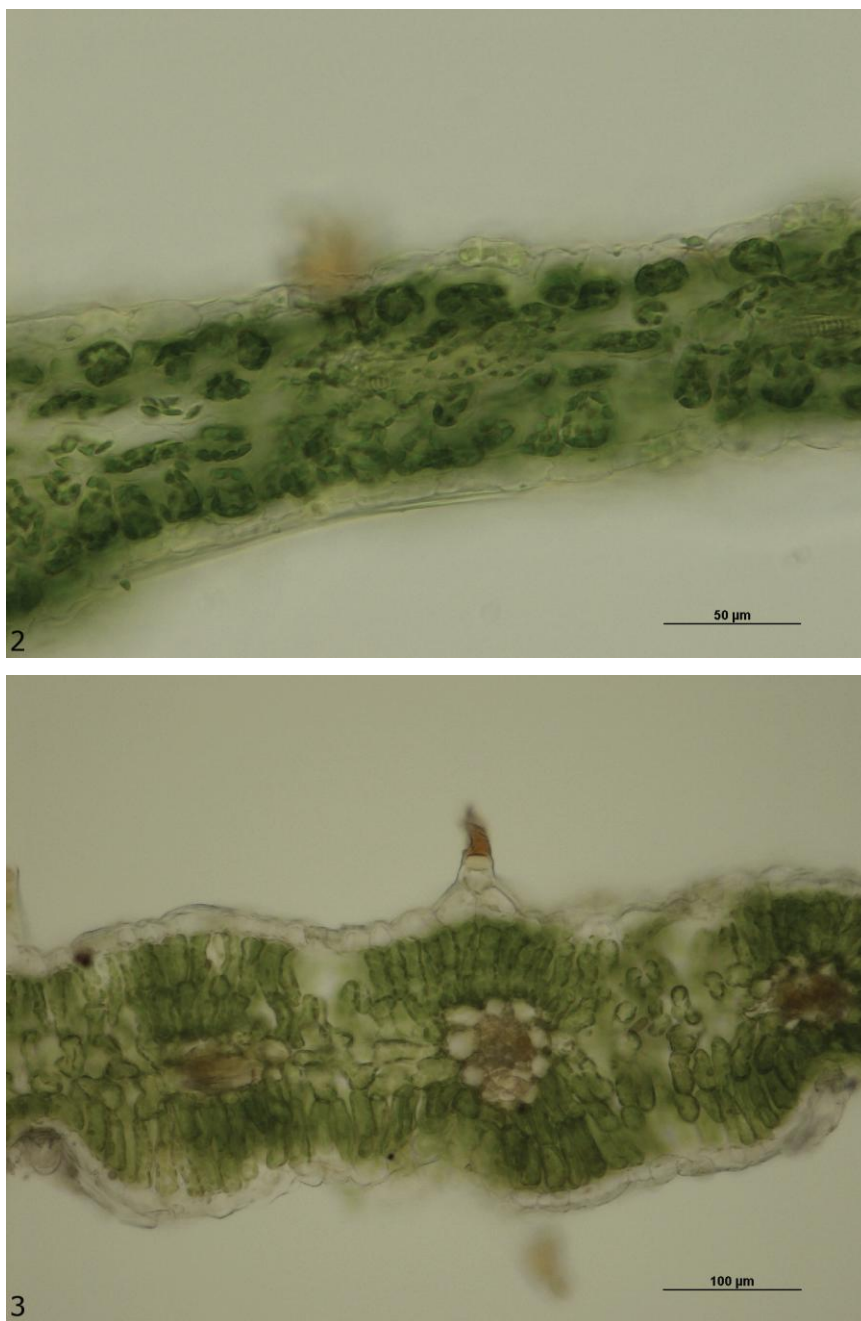
4. Сравнителен анализ на анатомичното устройство на лист на *in vivo*, *in vitro* култивитани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica*

Листът при *in vivo* е еквифациален с плоска петура. Фотосинтезиращият паренхим е структуриран от двустранно разположен двуреден палисиден паренхим и централно разположен гъбчест паренхим от 2-3 реда клетки (Фиг. 14-1). Палисидните клетки са с малък структурен контакт и с нетипично големи междуклетъчни пространства. Гъбчестите клетки са закръглени и почти плътно разположени. Епидермата е структурирана от еднородни основни клетки, равномерно разположени устица, едноклетъчни приседнали жлезисти власинки и линейни многоклетъчни покривни власинки.

In vitro култивираните растения регенерират лист с почти еднородно структуриран фотосинтезиращ паренхим (Фиг. 14-2). Фотосинтезиращите клетки са закръглени и почти плътно разположени. Микроскопски епидермалните структури не се различават от наблюдаваните при *in vivo* растенията. Дебелината на петурата при листата на *in vitro* растенията е приблизително два пъти по-малка в сравнение с тази на листата при *in vivo* растенията.

При растенията, регенерирани в *ex vitro* условия се формират листа с еквифациален анатомичен строеж, какъвто е и при *in vivo* растенията (Фиг. 14-3). Палисадният паренхим е изграден от 2 реда клетки с правилна цилиндрична форма и типичен структурен контакт. Централно разположени са почти плътно 2 реда гъбчести клетки. Епидермалните структури не се различават от наблюдаваните при другите варианти на изследване. Видимо дебелината на листната петура не се различава от тази на *in vivo* растенията.





Фиг. 14. Анатомична структура на листа на *A. thracica* растения развиващи се в условия *in vivo* (1), *in vitro* (2) и *ex vitro* (3).

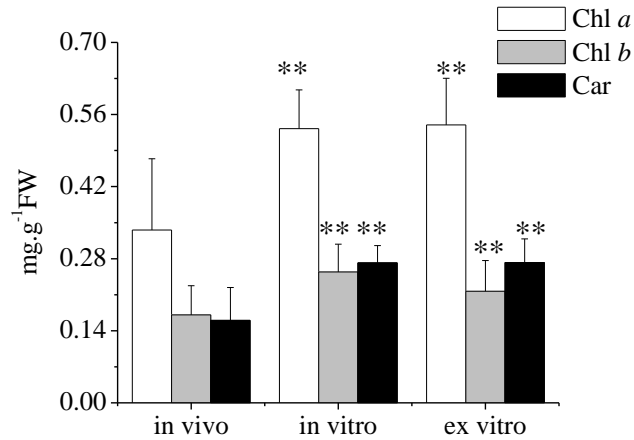
Резултатите от изследването показаха, че в *in vitro* условия регенерираните растения *A. thracica* формират добре развита коренова система и листа, които морфологично не се различават от листата на *in vivo* растенията. Това е предпоставка за установената успешна *ex vitro* адаптация на всички *in vitro*

регенеранти. Много изследвания показват, че процесът на адаптация от *in vitro* към *ex vitro* условия често е критична стъпка за оцеляване на растенията (Pospisilova et al., 1999, Apostolo et al., 2005) и дори неразрешим проблем (Hazarika, 2006). Успешната регенерация на органно ниво в *in vitro* условия (Hussain et al. 2012; Malik et al. 2005; Thiart 2003) и високата преживяемост при *ex vitro* растенията (Chandra et al. 2010) са показател за успешна *ex vitro* адаптация на *A. thracica*.

Изследвания показват, че морфолого-анатомични изменения могат да настъпят във всички органи на *in vitro* култивираните растения, но най-важни са отклоненията в хистогенезата на листа (Magyar-Tabori et al. 2010). Те могат да модифицират морфогенетичния потенциал на този орган и да повлияят върху ефективността на регенерацията. Светлинномикроскопският анализ на листен материал показва, че при *in vitro* култивиране на *A. thracica* регенерираните растения формират листа с видимо по-малка дебелина и с фотосинтезиращ паренхим без диференциация на палисаден и гъбчест. Установено е, че листата на *in vitro* растенията обикновено са с по-малки размери (Knöss, 1999), с по-тънка петура (Sáez et al., 2012) и много често организацията на асимилационния паренхим е различна от тази в естествени условия (Radi, Ali, 1999; Dousseau et al., 2008). Общеизвестно е, че успешната *in vitro* регенерация и *ex vitro* адаптация са пряко свързани с хистогенезата на фотосинтезиращите тъкани. Типично структурираният фотосинтезиращ паренхим при новообразуваните листа на *ex vitro* растенията от *A. thracica* е важен структурен маркер за висок регенерационен потенциал на култивирания вид. Установената структурна устойчивост на епидермалните структури се посочва като показател за генетична стабилност на тези белези (Zhao et al., 2006). Авторите я определят като необходимо, но не и достатъчно условие за успешна регенерация на растенията.

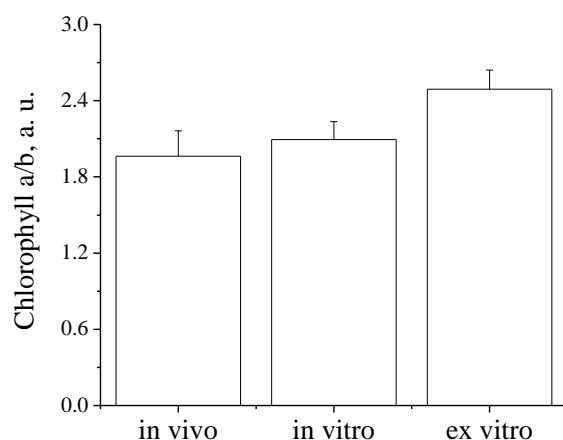
Резултатите от морфолого-анатомичното изследване на *in vitro* и *ex vitro* растения *A. thracica* показаха, че няма отклонения в органогенезата и хистогенезата на листа при адаптираните *in vitro* растения в *ex vitro* условия е реализирана в норма. Това би осигурило успешна *ex situ* консервация на изследвания вид.

5. Пигментно съдържание в листен материал от *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica*



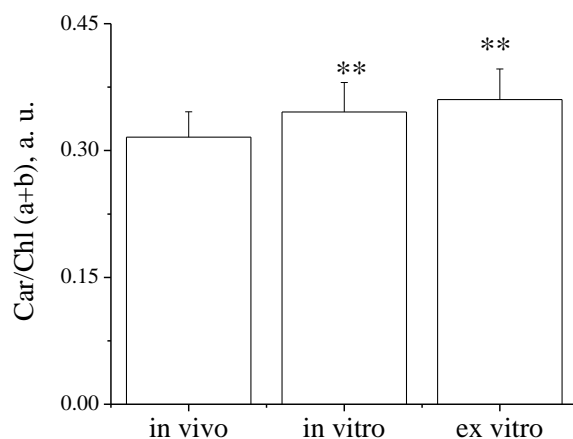
Фиг. 15. Изменения в пигментното съдържание на Chl a , b и каротеноиди в развити в условия *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения *Achillea thracica*; представено е стандартно отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - $**p \leq 0.001$.

В растения, култивирани *in vivo*, се наблюдава по-ниско съдържание на всички пигменти (Фиг. 15). Вариабилността в параметрите на околната среда води до контролирани промени в количеството на листните пигменти, най-често свързани с понижението им с цел избягване на превъзбуждането на фотосистемите и антенните комплекси и ограничение на вредните ефекти на процеси като например фотоинхибиране.



Фиг. 16. Промени в отношението Chl a/b (индекс на тилакоидно стекиране) в развити в условия *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения *Achillea thracica*.

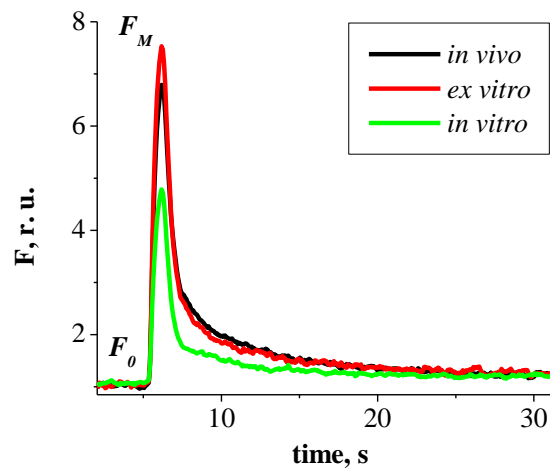
Няма статистически доказуема разлика в отношението Chl a/b в изследваните варианти (Фиг. 16). В много случаи понижението на количеството на Chl b, т. е. повишено отношение на Chl a/b се свързва с повишение на дела на стромалните тилакоиди. В изследваните варианти не се наблюдават промени в тилакоидната структура, свързани с промени в съотношението грани/стромални тилакоиди.



Фиг. 17. Изменения в отношението Car/Chl (a+b) (оксидативен индекс) в развити в условия *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения *Achillea thracica*. Представено е стандартно отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - ** $p \leq 0.001$.

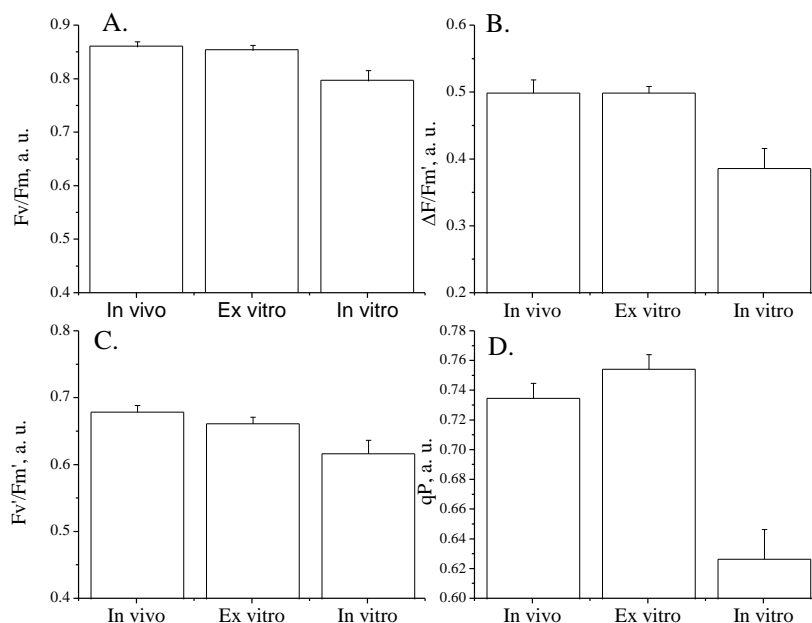
Няма статистически доказуема разлика в отношението Car/Chl ($a+b$) в изследваните варианти (Фиг. 17). Следователно няма промени във фотосинтетичния апарат свързани с фотоокислителни увреждания. Този резултат корелира с промените описани на Фиг. 15 по-горе.

6. Изменения във фотохимичната активност на PS2, оценени по промени в хлорофилната флуоресценция.



Фиг. 18. Релаксация на вариабилната флуоресценция, $F_v = (F_m - F_0)$

Ускорената релаксация на вариабилната флуоресценция, F_v , в *in vitro* растенията (Фиг. 18) показва ускорен електронен транспорт към ФС1 най-вероятно е свързано с намаление на относителния дял на Q_B нередуциращите центрове на ФС2. Натрупването на тези центрове на ФС2 се свързва с развитие на фотозащита (Lazova et al. 2011) срещу неблагоприятни условия на средата, индуциращи фотоинхибиране. В случая на растенията, култивирани в *in vitro* условия, поради развитието им в контролирани, оптимални и непроменящи се условия, не е необходимо обособяването на механизми, ограничащи фотоинхибирането, тъй като такива вредни процеси няма в конкретната контролирана среда на отглеждане.



Фиг. 19. Промени в стойностите на флуоресцентни параметри, отразяващи изменения във фотохимичната активност на ФС2 (Фиг. 19.1), както и нефотохимични параметри, свързани с развитие на фотозащитни процеси на ниво ФС2 (Фиг. 19.2).

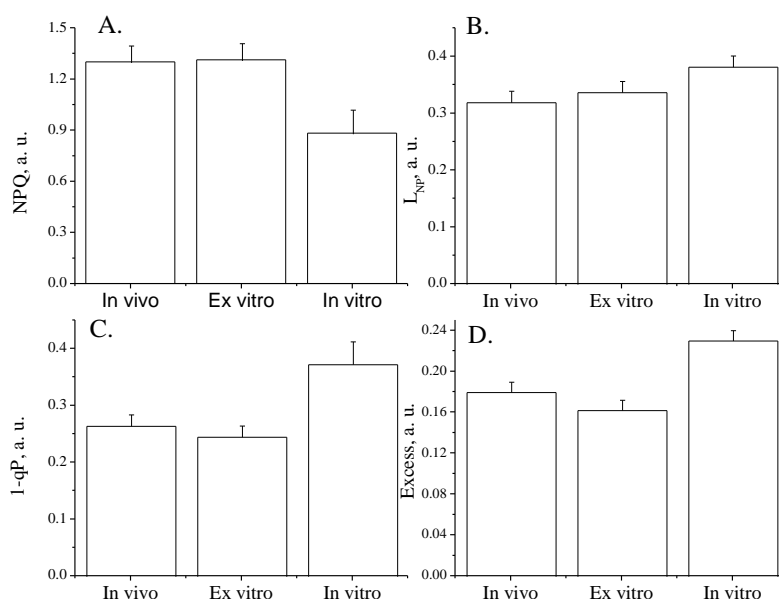
Фиг. 19.1. Фотохимични параметри

Максималният квантов добив на ФС2, $\Phi_{max} = (F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$, (Kitajima M, Butler WL, 1974) не се понижава под стойности, показващи увреждания на ниво ФС2, Фиг. 19.1.A (такива стойности са за $\Phi_{max} < 0.75$). Следователно независимо от начина на отглеждане всички варианти се характеризират с висока максимална квантова ефективност на ФС2.

Промените в интензитета на „актиничната” светлина ще водят до промени в ефективния квантов добив на ФС2, Фиг. 19.1.B, $\Phi_{PS2} = (F_m' - F)/F_m' = \Delta F/F_m'$, (Genty B, et al. 1989) в резултат на развитие на фотосинтетичен контрол описван с понятието down regulation, т.е. регулация на фотосинтетичния електронен транспорт на ниво ФС2 чрез понижена фотохимична активност с цел избягване вредното действие на повишени светлинни интензитети на възбуждащата „актинична” светлина. Такова видимо понижение се наблюдава в растения,

отгледани *in vitro*, които ще се явяват по-чувствителни към промени в светлинния интензитет и ще изискват по-ефективна *down regulation* за избягване на вредните ефекти от променящите се интензитети на актиничната светлина.

По същата причина се наблюдават и понижени стойности в потенциалният квантов добив на ФС2, Фиг. 19.1.С (квантов добив на отворени реакционни центрове на ФС2 в светоадаптирани растения, $\Phi_p = (F_m' - F_0')/F_m' = F_v'/F_m'$, (Bilger W, Björkman O, 1990).



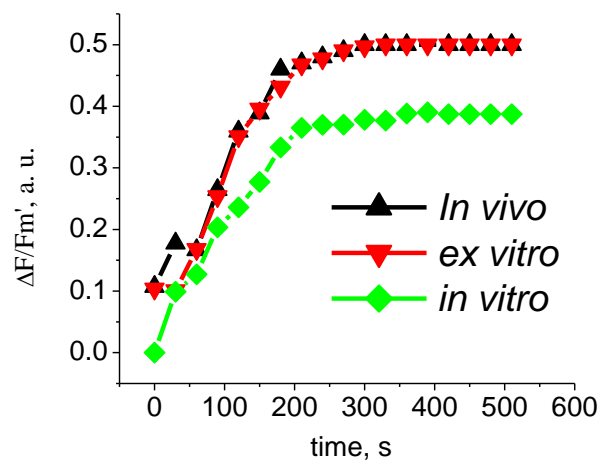
Фиг. 19.2. Нефотохимични параметри

Евентуалните увреждания на ниво ФС2 се избягват с развитие на фотозащита, базирана на т. нар. безизлъчвателна (топлинна) дисипация на излишната възбуждаща фотосинтезата енергия на светлината, оценена по параметъра NPQ, $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$, (Demmig-Adams B, 1990). Тъй като растенията *in vitro* са отгледани в оптимални условия и в условия на ниска осветеност, те не са развили ефективна защита срещу вредното действие на повишени светлинни интензитети на „актиничната” светлина (Фиг. 19.2.А). Поради това стойностите на NPQ в *in vitro* растения са понижени. По тази причина нефотохимичните загуби, L_{NPQ} , Фиг.

19.2.В (неефективността за използване на възбудната светлина на ниво реакционен център на ФС2) (Stefanov D, Terashima I., 2008) във ФС2 в *in vitro* отглежданите растения са повишени. Понижената фотозащита чрез NPQ се компенсира от понижената активност на фотосинтетичен електронен транспорт (qP, Фиг. 19.1.D), тъй като в *in vitro* растения фотосинтезата не е определящ процес за натрупването на биомаса. Тези растения имат и хетеротрофен начин на хранене.

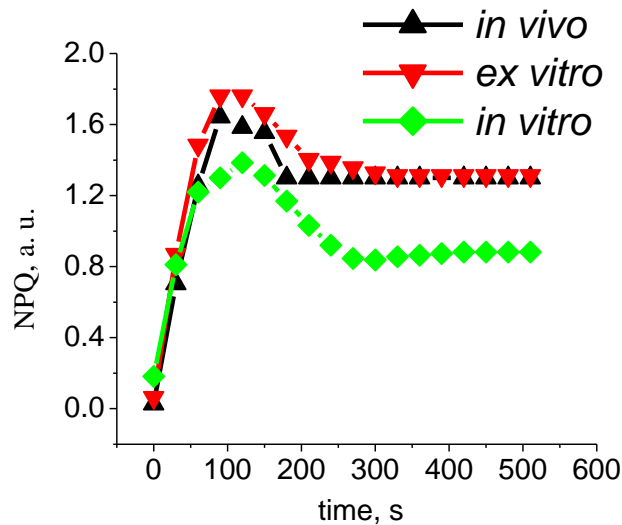
Поради понижената фотосинтетична активност евентуалните увреждания на фотосинтетичния апарат в резултат на прередуциране на преносителите на електрони в електрон-транспортната верига, Фиг. 19.2.C (повишените стойности на параметъра $1-qP$) и повишението стойностите на параметъра excess, Фиг. 19.2.D $\Phi_E = (F-F_0)/F_m' = \Delta F/F_m'$ (Weis E, Lechtenberg D, 1989), отразяващ нивото на фотоокислителни увреждания са незначителни. Растенията, развити *ex vitro*, показват сходни стойности с тези на растенията отгледани *in vivo*.

Въпреки че растенията *ex vitro* са прехвърлени от *in vitro* условия преди повече от 3 години се наблюдават извесни различия спрямо тези на отгледаните *in vivo* растения. Тези резултати са сходни с по-рано изследваните от Karchina et al. (2014) растения бяла мъртва коприва (*Lamium album*, L.), които показват подобен начин на адаптация на микроразмножените растения в условия *ex vitro*, макар че в случая на мъртвата коприва периодът на адаптация е по-кратък (1 година след прехвърляне от *in vitro* към *ex vitro* условия).



Фиг. 20. Индукционни криви на флуоресцентни параметри. Промени в ефективния квантов добив на ФС2 ($\Phi_{PS2} = (F_m - F)/F_m = \Delta F/F_m$) по време на осветяване с „актинична” светлина с интензитет $230 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD.

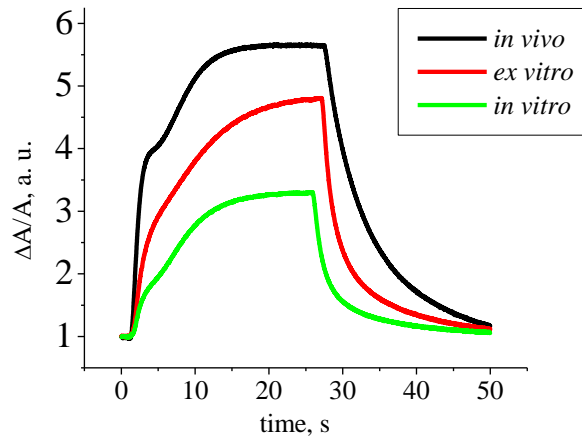
Наблюдава се забавено нарастване на ефективния квантов добив на ФС2 до стационарни стойности в *in vitro* растения, които също са и понижени спрямо тези на развиващия с в условия *in vivo* и *ex vitro* растителен материал (Фиг. 20). Промени в ефективния квантов добив на ФС2 ($\Phi_{PS2} = (F_m - F)/F_m = \Delta F/F_m$) по време на осветяване с „актинична” светлина с интензитет $230 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD.



Индукцията на NPQ показва наличие на две ясно различаващи се фази. Бързата фаза на нарастване на NPQ е резултат от бързо натрупване на протонен градиент през тилакоидната мембрана. Бавната фаза се определя от натрупване на ксантофилът зеаксантин, индуциращ повишено ниво на топлинна дисипация на излишната възбудна енергия в антената на фотосистема 2 (Gilmore et al. 1998; Govindjee 2002). Последващото понижаване на NPQ се дължи вероятно на 1) понижаване на протонния градиент поради активация на тилакоидната АТФ-аза и/или 2) поради намаление на концентрацията на аскорбат в тилакоидния лумен. Аскорбатът активира синтеза на зеаксантин и липсата му ще доведе до понижаване на топлинната дисипация в антената (Ivanov and Edwards 2000).

Забавено понижение в стойностите на NPQ след преходния му максимум около 150 s в *in vitro* растения (достигане на стационарни стойности след преходния максимум около 300 s след включване на „актиничната” светлина) спрямо това на растения отгледани *in vivo* и *ex vitro* (около 200 s след включване на „актиничната” светлина) и също понижени стационарни стойности се наблюдават в *in vitro* растенията. Причините за понижените стационарни стойности на NPQ в растенията отгледани *in vitro* са разгледани по-горе (Фиг. 19.2.).

7. Изменения във фотохимичната активност на ФС1, оценена по промени в абсорбцията, индуцирана от окисление на първичния донор на електрони във ФС1, P700 ($\Delta A_{810-860}$).



Фиг. 21. $\Delta A_{810-860}$ абсорбционни изменения

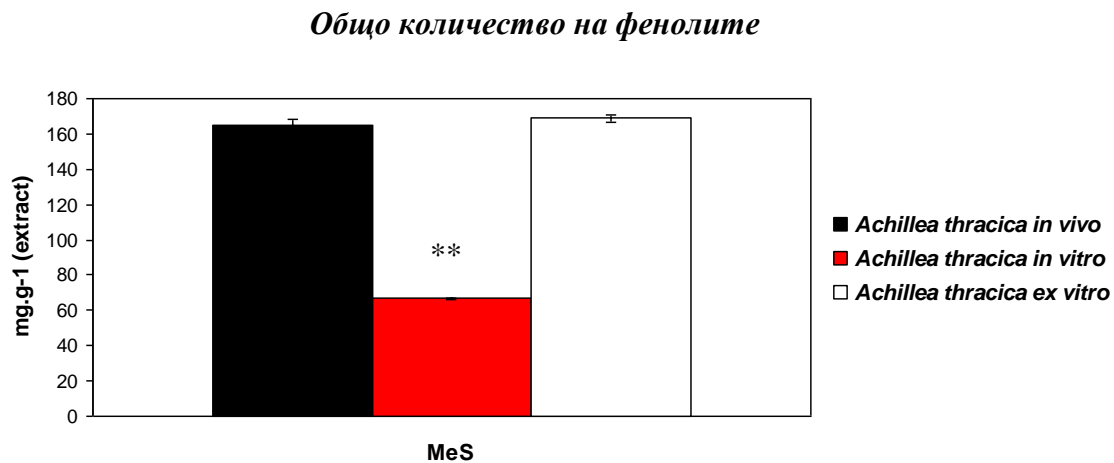
In vivo растенията се характеризират с най-високо ниво на окисление на P700. По-ниското ниво на окисление на P700 в растения адаптирани към *ex vitro* условия и още по-изразено в *in vitro* отгледани растения е в резултат от различни причини (Фиг. 21). Както показахме на Фиг. 19.1. електрон-транспортната верига в *in vitro* растенията е прередуцирана и вероятно по-високото ниво на редуциран пластохинонов пул води до по-трудно окисление на P700. Получените резултати при *ex vitro* растенията могат да се обяснят с вероятно понижено съдържание на P700 у тях.

8. Количествено определяне на вторичните метаболити – феноли и флавоноиди на MeS екстракти, изолирани от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения

8.1. Определяне количеството на тотални феноли

Фенолите са най-обширната група вторични метаболити при растенията и притежават изразени антиоксидантни свойства. Като част от вторичния метаболизъм, тези съединения се синтезират под влиянието на стресови фактори и тяхното съдържание се променя в зависимост от условията на средата.

Най-висока концентрация на феноли е отчетена при екстрактите от *ex vitro* растенията ($16,87 \pm 0,185$ mg/g extract) следвани от екстрактите от *in vivo* растенията ($16,5 \pm 0,33$ mg/g extract). При екстрактите от *in vitro* култивирани растения количеството на тоталните феноли е 2,5 пъти по-ниско в сравнение с другите две проби ($6,665 \pm 0,05$ mg/g extract). Между *in vivo* и *ex vitro* няма статистически значима разлика, както е показано и на фигурата (Фиг. 22).



Фиг. 22. Тотално фенолно съдържание на MeS екстракти, изолирани от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *A. thracica*. Представени са стандартното отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - $**p \leq 0.001$.

8.2. Определяне количеството на тотални флавоноиди

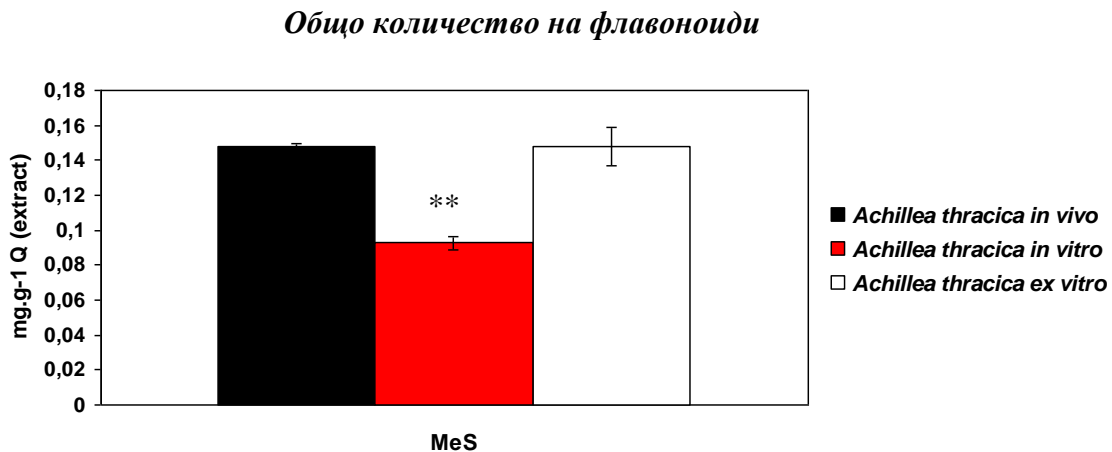
Определянето на тоталното съдържание на феноли и флавоноиди при *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения дава обща представа за това как се променя количеството им при растения с еднакъв генотип, но отглеждани в различни условия на средата.

Също както и при тоталните феноли общото съдържание на флавоноидите е най-високо и в много близки граници при екстрактите от *in vivo* отглеждани и *ex vitro* адаптирани растения ($0,01476 \pm 0,0002$ и $0,0148 \pm 0,0011$ mg/g Q (extract)), а най-ниско при *in vitro* екстрактите ($0,00927 \pm 0,0004$ mg/g Q (extract)) (Фиг. 23).

Растенията от род *Achillea* са богати на фенолни съединения като при отделните видове количеството им варира. Например при метанолови екстракти на *A. wilhemsii* е установено съдържание на тотални феноли $37,4 \pm 0,3$ mg/g extract, докато при *A. millefolium* $9,55 \pm 0,11$ mg GAE/100 g dw (Wojdyło et al. 2007, Fathi et al., 2011).

Количеството и състава на флавоноидите при отделните видове също варира. При *A. wilhemsii* е установено съдържание на флавоноидите от $2,5 \pm 0,1$ mg/g Q (Fathi et al., 2011).

Растенията от род *Achillea* имат разнообразен хабитат и са широко разпространени. Вероятно на това се дължат и вариациите в състава на вторичните метаболити.



Фиг. 23. Тотално съдържание на флавоноиди на MeS екстракти, приготвени от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *A. thracica*.

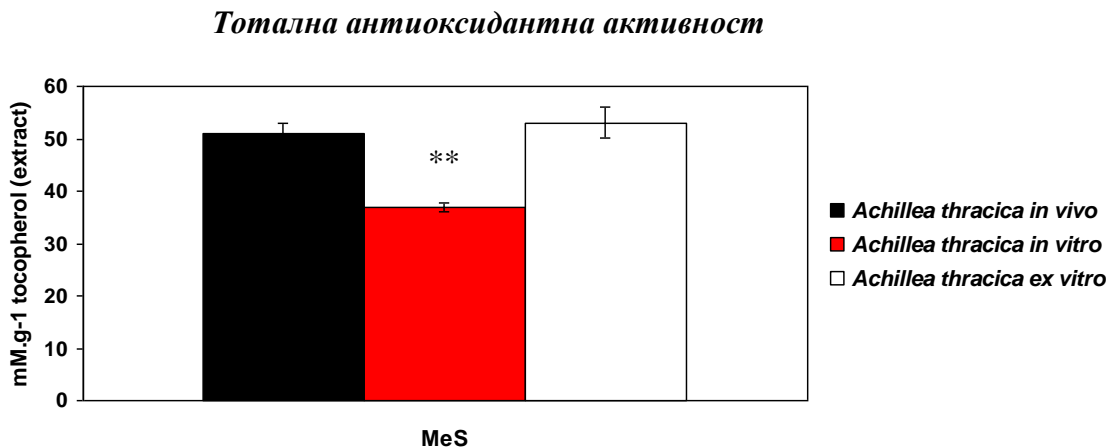
Представени са стандартното отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - $**p \leq 0.001$.

9. Определяне на антиоксидантна активност-ТАА, АВТС* и DPPH на MeS екстракти, изолирани от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения

9.1. Определяне на тотална антиоксидантна активност (ТАА) в MeS екстракти, изолирани от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения

Определянето на тоталната антиоксидантна активност на екстрактите от растението *A. thracica* дава представа за общия антиоксидантен потенциал на всички компоненти, влизащи в състава на екстракта.

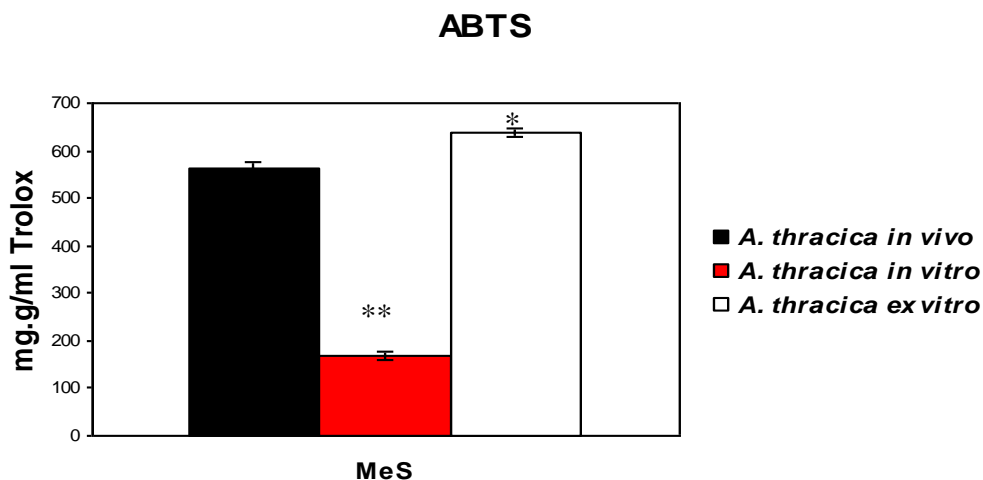
Най-висока ТАА бе установена при екстрактите от *ex vitro* растенията ($53 \pm 2,947$ mM/g α -tocopherol (extract)) следвани от екстрактите от *in vivo* растенията ($50,917 \pm 2,082$ mM/g α -tocopherol (extract)). При екстрактите от *in vitro* култивирани растения количеството на тоталната антиоксидантна активност е с 1,4 пъти по-ниско в сравнение с другите две проби ($36,917 \pm 0,804$ mM/g α -tocopherol (extract)) (Фиг. 24).



Фиг. 24. ТАА на MeS екстракти, приготвени от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *A. thracica*; представено е стандартно отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - $**p \leq 0.001$

9.2. Определяне на ABTS*-радикал улавящата способност на MeS екстракти, изолирани от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения

Определена е и антиоксидантната активност на екстрактите от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения спрямо ABTS свободния радикал. Антиоксидантната активност е сравнена с тази на тролокс. Резултатите са представени като тролокс-еквиваленти (Фиг. 25).

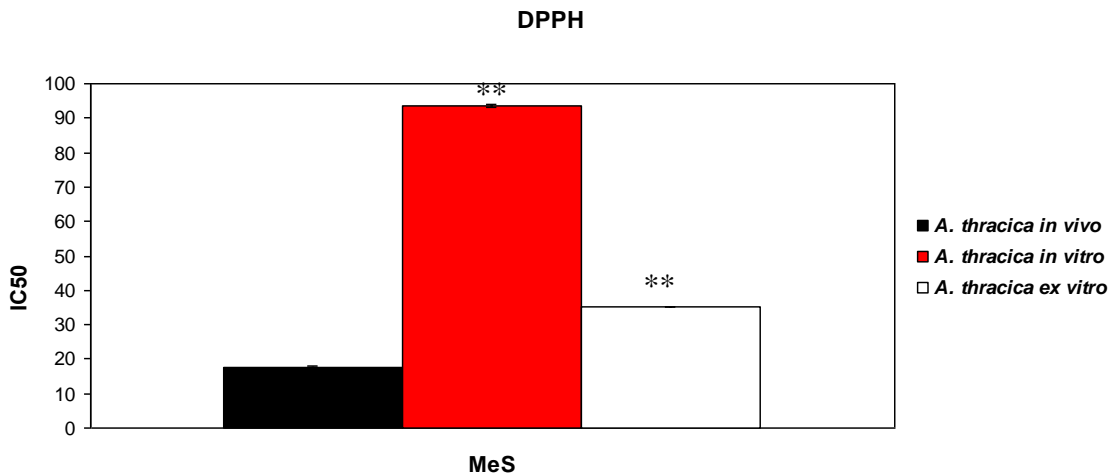


Фиг. 25. Антиоксидантна активност на екстракти от *in situ*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения (mg.g/ml TE) спрямо ABTS свободния радикал; представено е стандартно отклонение ($\pm SD$) и статистически значимите стойности - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$.

Най-висока антиоксидантна активност, изразена в тролокс-еквиваленти, спрямо ABTS свободния радикал е установена при екстрактите от *ex vitro* адаптирани растения, а най-ниска при *in vitro* култивирани растения.

9.3. Определяне на DPPH-радикал улавящата способност на MeS екстракти, изолирани от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения

Изследвана е способността на екстрактите от растението тракийски равнец да обезвреждат DPPH – свободния радикал (2,2-дифенил-2-пикризилхидразил хидрат). Установена е и минималната концентрация, при която се наблюдава 50 % инхибиране на радикала от екстракти на *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения (Фиг. 26).



Фиг. 26. Минимална инхибираща концентрация ($\mu\text{g/ml}$) на трите вида екстракта, при която се наблюдава 50 % инхибиране на DPPH – свободния радикал; представено е стандартното отклонение ($\pm\text{SD}$) и статистически значимите стойности - $**p \leq 0.001$

При два вида екстракти – *in vivo* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения беше установена сравнително висока радикал-улавяща способност спрямо DPPH – свободния радикал, като максималните стойности на инхибиране и при тях са в порядъка на 60 – 63 % при концентрации от 40 до 150 $\mu\text{g/ml}$. При *in vitro* пробите най-високи стойности на инхибиране са установени в порядъка на 30-31% при концентрации от 60 до 80 $\mu\text{g/ml}$.

Установени са ниски стойности за 50 % инхибиране на DPPH радикала при *in vivo* и *ex vitro*, като при тях стойностите са до 17,9 $\mu\text{g/ml}$ и 35,1 $\mu\text{g/ml}$ съответно (Фиг. 26). Най-висока 50 % инхибиране на DPPH радикала е отчетена при екстрактите от *in vitro* растенията.

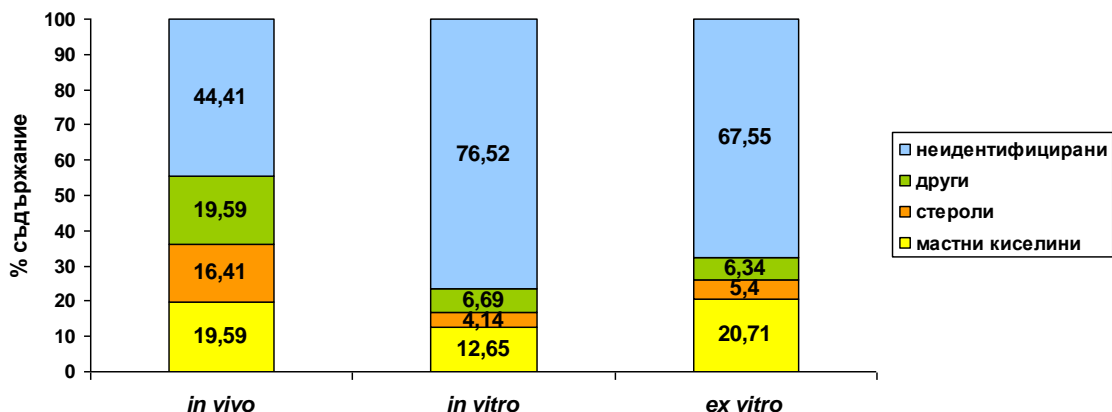
Получените резултати са в съответствие с резултатите, получени за ABTS радикал-улавящата способност и тоталната антиоксидантна активност, където екстрактите от *in vitro* култивирани растение имат най-ниски стойности, а тези от *ex vitro* адаптирани растения най-високи съответно.

10. Идентифициране на съединения с помощта на GS/MC анализ в неполярни и полярни фракции в MeS и ChS екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen.

10.1. Идентифициране на съединения с помощта на GS/MC анализ в неполярни фракции на ChS екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen.

Общото процентно съдържание на идентифицираните съединения в ChS екстракти е 55,25 % за *in vivo*, 23,48 % за *in vitro* и 32,45 % за *ex vitro* растенията (Таблица 6). В неполярните фракции бяха установени мастни киселини и стероли (общо по 35,66%, 16,79% и 26,11%, съответно при трите *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* условия на култивиране). От тях преобладават мастните киселини (наситени и ненаситени), като общото им количество е приблизително еднакво и при *in vivo* и *ex vitro* условия на култивиране (19,25% и 20,71%, съответно). При екстрактите от *in vitro* отглеждан тракийски равнец количеството им е 12,65%. При стеролите също е отчетена най-висока концентрация при *in vivo* растенията, следвани от *ex vitro* растенията (16,41 % и 5,4 %, съответно), а процентното им съдържание в *in vitro* растенията е 4,14%, което е по-ниско в сравнение с другите два варианта с над 3 пъти (Фиг. 27).

Неполярни съединения в ChS от *Achillea thracica*



Фиг. 27. Процентно съдържание на неполярни съединения в ChS на *A. thracica*.

Основните липиди идентифицирани при *in vivo* и *in vitro* екстрактите са хексадеканова киселина (палметинова киселина) (6,4 % и 2,03 %, съответно), тетракозан-1-ол (6,41 % и 2,54 %, съответно) и 1-монооктадеканойл глицерол (3,94 % и 1,56 %, съответно). С най-високо съдържание в *ex vitro* извлека бяха идентифицирани хексадеканова киселина (5,57 %), тетракозан-1-ол (5,28 %), пропиловият естер на 2,3-Оксихексадекановата киселина (3,17 %) и линоленова киселина (2,45 %) (Таблица 6).

Таблица 6. Процентно съдържание на съединенията, идентифицирани в ChS екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения тракийски равнец. RI-индекс на задържане, t-следи от съединението (<0,5%)

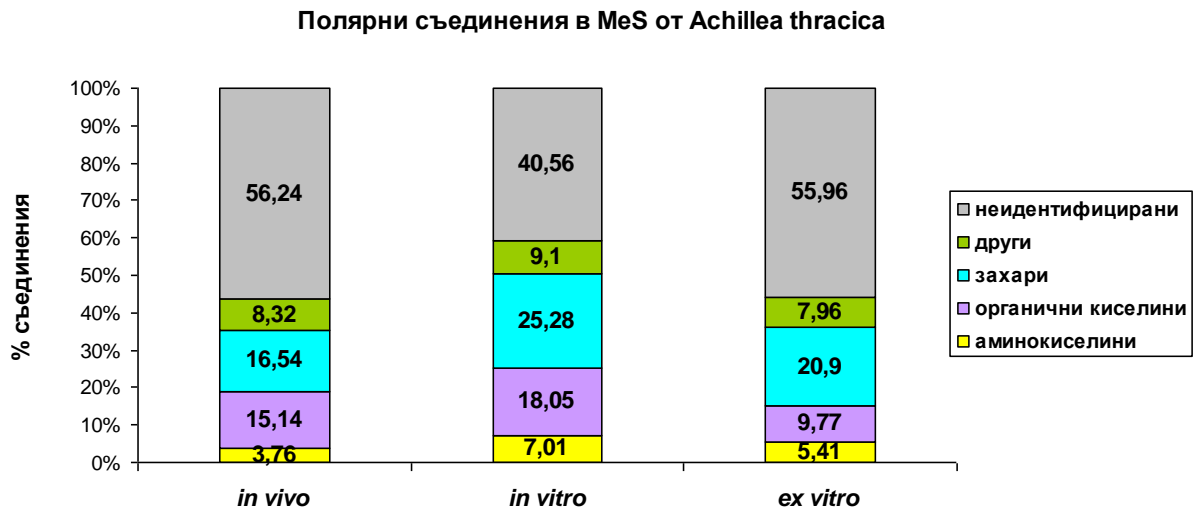
| № | RI | Наименование | <i>in vivo</i> | <i>in vitro</i> | <i>ex vitro</i> |
|----|------|---|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 1065 | <i>Acetamide</i> | - | 0,68 | - |
| 2 | 1280 | <i>Linalool TMS ether</i> | t | - | - |
| 3 | 1694 | <i>Methyl tetradecanoate</i> | t | t | t |
| 4 | 1909 | <i>Hexadecanoic acid, methyl ester</i> | 6,4 | 2,03 | 5,57 |
| 5 | 1933 | <i>Hexadecanol</i> | 2 | - | - |
| 6 | 2012 | <i>3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol</i> | 0,73 | - | - |
| 7 | 2022 | <i>Unknown terpen</i> | - | 2,1 | - |
| 8 | 2051 | <i>Unknown terpen</i> | - | 2,71 | 2,8 |
| 9 | 2075 | <i>Oleic acid</i> | 5,54 | - | 0,66 |
| 10 | 2087 | <i>Linoleic acid</i> | - | 1,08 | 1,3 |
| 11 | 2101 | <i>Linolenic acid</i> | 1,74 | t | 2,45 |

| | | | | | |
|----|------|---|------|------|------|
| 12 | 2105 | <i>Octadec-9Z-enol</i> | 2,27 | t | - |
| 13 | 2116 | <i>Unknown</i> | - | 4,48 | - |
| 14 | 2131 | <i>Unknown</i> | 1,22 | - | t |
| 15 | 2160 | <i>Phytol</i> | - | t | t |
| 16 | 2523 | <i>1-Dokosanol</i> | 1,76 | 0,86 | 0,93 |
| 17 | 2574 | <i>Hexadecanoylglycerol</i> | 5,57 | - | 1,09 |
| 18 | 2584 | <i>Hexadecanoic acid, 2,3-bis[(TMS)oxy]propyl ester</i> | - | 2,07 | 3,17 |
| 19 | 2706 | <i>Lignoceric acid</i> | 1,11 | 0,5 | 1,25 |
| 20 | 2731 | <i>Tetracosan-1-ol</i> | 6,41 | 2,54 | 5,28 |
| 21 | 2766 | <i>1-Monoctadecanoylglycerol</i> | 3,94 | 1,56 | 2,69 |
| 22 | 2922 | <i>Unknown</i> | 2,47 | - | - |
| 23 | 2927 | <i>15-Tetracosenoic acid</i> | - | - | 2,08 |
| 24 | 3216 | <i>Octacosanol</i> | 1,28 | - | 0,92 |
| 25 | 3635 | <i>β-Sitosterol</i> | 6,9 | t | - |
| 26 | 3671 | <i>Unknown sterol</i> | - | t | 1,51 |
| 27 | 3685 | <i>Unknown sterol</i> | - | 2,3 | t |

10.2. Идентифициране на съединения с помощта на GS/MC анализ в полярни фракции в MeS екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen.

В полярните фракции установихме наличието на аминокиселини, органични киселини, захари, някои етери и алкохоли (Фиг. 28). Количествено аминокиселините преобладават в *in vitro* растенията (7,01 %), намалявайки до 3,76 % в *in vivo* и 5,41 % в *ex vitro* екстрактите. Общото количество на органичните киселини е по-ниско при *in vivo* и *ex vitro* растенията (15,14 % и 9,77 %, съответно), нараствайки до 18,05 % в *in vitro* растенията. Захарите са в най-ниски количества в *in vivo* фракцията (16,54%), нараствайки в *ex vitro* и *in vitro* екстрактите (20,90 % и 25,28%, съответно) (Фиг. 28). От захарите относително в еднакви концентрации са представени моно- и дизахаридите в *in vivo* екстрактите като количествено преобладават дизахаридите (8,80%) над монозахаридите (7,74%), а тризахариди не са отчетени. Процентното съдържание на дизахаридите в *ex vitro* пробите (15,93%) също доминира над това на монозахаридите (4,92%, съответно), докато тризахаридите са представени само от рафиноза в минималната концентрация от

0,05%. При *in vitro* растенията количеството на дизахаридите (18,47%) надхвърля това на монозахаридите с почти 3 пъти (6,38%) (Таблица 7). Последното би могло да се обясни с хетеротрофният начин на хранене на микроразмножените разтения и наличието на захароза като въглероден източник в култивационната им среда.



Фиг. 28. Процентно съдържание на полярни съединения в MeS на *A. thracica*.

От аминокиселините (12, 17, 15 на брой, съответно за *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* екстрактите) в най-големи количества са идентифицирани: валин, серин, пролин, пироглутаминова киселина и аспарагин – 0,33%, 0,64%, 1,58%, 1,79% и 1,48%, съответно в *in vitro* екстракта и 0,37%, 0,13%, 3,78%, 0,4% и 0,07%, съответно за *ex vitro* екстрактите. При *in vivo* екстрактите не е отчетено наличие на серин и аспарагин, а количеството на валина, пироглутаминова киселина и пролина е съответно 0,27%, 0,72% и 2,26% (Таблица 7). От органичните киселини преобладават наситените киселини и при трите проби. В *in vivo* екстракта с най-висока концентрация са хексадекановата киселина (палметинова киселина) (3,6%), глюконовата киселина (0,58%) и сукциновата киселина (янтарна киселина) (0,55%). С най-високи концентрации при *in vitro* екстрактите са представени палметиновата киселина (5,2%), следвана от октадекановата киселина (стеаринова киселина) (0,47%) и малата (ябълчна киселина) (0,33%). При извlecите от *ex vitro* адаптирани растения с най-висока концентрация се открояват следните киселини палметиновата (2,68%), ябълчната (0,56%) и стеариновата киселина (0,53%).

Таблица 7. Полярни съединения, идентифицирани в MeS екстракти от *Achillea thracica*. RI-индекс на задържане, ОК-органична киселина, АК-аминокиселина, ФК- фенолна киселина, З-захар, Др.-други, t-следи от съединението (<0,05%)

| № | RI | Наименование | <i>in vivo</i> | <i>in vitro</i> | <i>ex vitro</i> | клас |
|----|------|------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|------|
| 1 | 1118 | <i>Ethanedioic acid</i> | 0,11 | - | - | ОК |
| 2 | 1119 | <i>β-Lactate</i> | - | t | - | ОК |
| 3 | 1136 | <i>Propanoic acid</i> | 0,1 | | t | ОК |
| 4 | 1183 | <i>Propanedioic acid</i> | - | 0,14 | t | ОК |
| 5 | 1187 | <i>Butanoic acid</i> | t | t | t | ОК |
| 6 | 1197 | <i>L-Valine</i> | 0,27 | 0,33 | 0,37 | АК |
| 7 | 1216 | <i>Urea</i> | 0,07 | 2,58 | 0,22 | Др. |
| 8 | 1255 | <i>L-Leucine</i> | t | 0,13 | 0,07 | АК |
| 9 | 1258 | <i>Glycerol ether (3TMS)</i> | 2,87 | 3,76 | 2,12 | ОК |
| 10 | 1278 | <i>L-Isoleucine</i> | 0,13 | 0,28 | 0,16 | АК |
| 11 | 1282 | <i>L-Proline</i> | 2,26 | 1,58 | 3,78 | АК |
| 12 | 1292 | <i>Glycine</i> | - | t | - | АК |
| 13 | 1294 | <i>Succinic acid</i> | 0,55 | 0,24 | 0,44 | ОК |
| 14 | 1316 | <i>Glyceric acid</i> | t | t | t | ОК |
| 15 | 1324 | <i>Pyrimidine</i> | t | - | - | Др. |
| 16 | 1344 | <i>Serine tritms</i> | | 0,64 | 0,13 | АК |
| 17 | 1348 | <i>2-Piperidinecarboxylic acid</i> | 0,08 | 0,053 | 0,22 | ОК |
| 18 | 1371 | <i>L-Threonine</i> | - | 0,21 | 0,14 | АК |
| 19 | 1464 | <i>Malic acid</i> | 0,35 | 0,33 | 0,56 | ОК |
| 20 | 1480 | <i>Meso-erythritol</i> | 0,09 | 0,07 | t | Др. |
| 21 | 1491 | <i>Methacryloyl glycine</i> | t | - | - | АК |
| 22 | 1495 | <i>L-Aspartic acid</i> | | t | - | АК |
| 23 | 1498 | <i>Pyroglutamic acid</i> | 0,72 | 1,79 | 0,4 | АК |
| 24 | 1504 | <i>Butanoic acid</i> | - | 1,23 | - | ОК |
| 25 | 1523 | <i>L-Norvaline</i> | t | t | 0,09 | АК |
| 26 | 1536 | <i>D-Erythro-Pentitol</i> | 0,053 | t | t | Др. |
| 27 | 1560 | <i>Octanoic acid</i> | 0,5 | 0,26 | 0,53 | ОК |
| 28 | 1571 | <i>Xylulose</i> | 0,07 | - | - | З |
| 29 | 1602 | <i>Glutamic acid</i> | - | 0,051 | - | АК |
| 30 | 1610 | <i>Phenylalanine</i> | 0,17 | 0,16 | 0,09 | АК |
| 31 | 1617 | <i>Arabinoic acid</i> | t | - | t | ОК |

| | | | | | | |
|----|------|---|------|-------|------|-----|
| 32 | 1652 | <i>L-Asparagine</i> | - | 1,48 | 0,07 | AK |
| 33 | 1669 | <i>Ribose</i> | 0,11 | - | - | 3 |
| 34 | 1744 | <i>Vanillic acid</i> | t | - | - | ФК |
| 35 | 1782 | <i>L-Gluconic acid</i> | 0,58 | 0,06 | 0,2 | OK |
| 36 | 1800 | <i>3,4,5-Tris-1-cyclohexanecarboxylic acid</i> | - | - | t | OK |
| 37 | 1806 | <i>Protocatechuic acid</i> | 0,27 | t | 0,12 | OK |
| 38 | 1807 | <i>Fructose 1</i> | 1 | 0,23 | 0,62 | 3 |
| 39 | 1821 | <i>Fructose 3</i> | 0,64 | 0,44 | 0,76 | 3 |
| 40 | 1828 | <i>Arabinofuranose</i> | - | - | t | 3 |
| 41 | 1852 | <i>Adenine</i> | 0,08 | t | t | Др. |
| 42 | 1862 | <i>2-Thiobarbituric acid</i> | 0,31 | 0,31 | | OK |
| 43 | 1877 | <i>Unknown sugar</i> | 0,73 | 2,29 | 1,76 | 3 |
| 44 | 1883 | <i>Ribonic acid</i> | 0,07 | 0,22 | 0,06 | OK |
| 45 | 1884 | <i>Unknown organic acid</i> | 0,13 | 0,09 | 0,12 | OK |
| 46 | 1888 | <i>Fructose 2</i> | 1,27 | 2,03 | 0,88 | 3 |
| 47 | 1898 | <i>Galactose</i> | 0,28 | 0,17 | 0,38 | 3 |
| 48 | 1904 | <i>Unknown sugar</i> | 3,64 | 0,94 | - | 3 |
| 49 | 1923 | <i>Mannose</i> | - | 0,19 | 0,44 | 3 |
| 50 | 1928 | <i>L-Tyrosine</i> | - | 0,15 | t | AK |
| 51 | 1941 | <i>Gulose</i> | - | 0,09 | t | 3 |
| 52 | 1964 | <i>Inositol</i> | 6,34 | 3,63 | 5,26 | Др. |
| 53 | 1973 | <i>β-D-Galactofuranose</i> | 0,9 | - | 0,5 | 3 |
| 54 | 2021 | <i>Palmitic acid</i> | 0,33 | 0,39 | 0,2 | OK |
| 55 | 2041 | <i>Galacturonic acid</i> | 0,13 | 0,19 | 0,07 | OK |
| 56 | 2083 | <i>β-D-Glucopyranose</i> | - | 0,19 | 0,06 | 3 |
| 57 | 2098 | <i>Myo-Inositol</i> | 1,26 | 2,4 | 0,88 | Др. |
| 58 | 2124 | <i>Caffeic acid</i> | 0,38 | 0,34 | 1,51 | ФК |
| 59 | 2194 | <i>L-Leucine-methylated</i> | - | t | - | AK |
| 60 | 2211 | <i>L-Tryptophan</i> | 0,11 | 0,11 | 0,09 | AK |
| 61 | 2218 | <i>Octadecanoic acid</i> | 0,42 | 0,47 | 0,28 | OK |
| 62 | 2382 | <i>Myristic acid</i> | 0,08 | 0,11 | t | OK |
| 63 | 2512 | <i>Unknown sugar</i> | 1,04 | 0,24 | 1,45 | 3 |
| 64 | 2542 | <i>2-Monopalmitin</i> | 0,12 | 0,17 | 0,09 | OK |
| 65 | 2571 | <i>β-D-Fructofuranosyl glucopyranoside</i> | 0,28 | 2,04 | 0,09 | 3 |
| 66 | 2576 | <i>Hexadecanoic acid</i> | 3,6 | 5,2 | 2,68 | OK |
| 67 | 2622 | <i>Unknown sugar</i> | 1,14 | | 1,78 | 3 |
| 68 | 2677 | <i>Sucrose</i> | 2,19 | 10,82 | 8,97 | 3 |
| 69 | 2701 | <i>Unknown sugar</i> | 0,08 | 0,15 | 0,08 | 3 |

| | | | | | | |
|----|------|--------------------------------|------|------|------|----|
| 70 | 2733 | <i>Unknown organic acid</i> | 0,14 | 0,2 | 0,09 | OK |
| 71 | 2767 | <i>Monoctadecanoylglycerol</i> | 4,25 | 4,45 | 1,73 | OK |
| 72 | 2877 | <i>Unknown sugar</i> | 0,45 | t | 0,21 | 3 |
| 73 | 2958 | <i>Eicosanoic acid</i> | t | t | t | OK |
| 74 | 3133 | <i>Unknown sugar</i> | 0,53 | t | - | 3 |
| 75 | 3423 | <i>Maltose</i> | 0,16 | t | - | 3 |
| 76 | 3441 | <i>Melibiose</i> | 0,75 | 0,29 | 1,5 | 3 |
| 77 | 3495 | <i>D-Turanose</i> | 0,99 | 0,51 | 1,29 | 3 |
| 78 | 3544 | <i>Unknown sugar</i> | 0,29 | 0,5 | - | 3 |
| 79 | 3951 | <i>Rafinnose</i> | - | - | t | 3 |

10.3. Идентифициране на фенолни киселини с помощта на GS/МС анализ от MeS екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen.

Анализът на метаболитното съдържание на Соксхлетни метанолови екстракти от *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* култивирани растения *Achillea thracica* показва, че по време на *in vivo* и *ex vitro* култивиране растенията натрупват високи нива на фенолни киселини като кафеена (15,47 и 42,78 %, съответно), протокатехинова (2,73 и 1,72 %, съответно) и ванилова (2,03 и 0,85 %, съответно), чието съдържание по време на *in vitro* култивиране намалява няколко пъти (Таблица 8). Гентизиновата киселина също преобладава количествено и е представена в много близки граници (1,72 %, 1,36 % и 1,11%, съответно).

Таблица 8. Процентно съдържание на фенолни киселини в MeS екстракти от *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* култивирани растения *A. thracica*.

| Фенолни киселини | RT | RI | <i>Achillea thracica in vivo</i> | <i>Achillea thracica in vitro</i> | <i>Achillea thracica ex vitro</i> |
|---------------------------------|------|------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Salicylic acid</i> | 7,7 | 1509 | 0,52 | 0,18 | 0,52 |
| <i>3(m) Hydroxybenzoic acid</i> | 8,2 | 1549 | 0,07 | - | 0,11 |
| <i>4(p) Hydroxybenzoic acid</i> | 8,87 | 1603 | 0,94 | 0,44 | 0,21 |
| <i>Benzoic acid</i> | 10,4 | 1724 | 0,49 | 0,48 | 0,58 |
| <i>Vanilic acid</i> | 10,6 | 1742 | 2,03 | 0,25 | 0,85 |
| <i>Gentisic acid</i> | 10,8 | 1759 | 1,72 | 1,36 | 1,11 |
| <i>Protocatechuic acid</i> | 11,4 | 1806 | 2,73 | 0,4 | 1,72 |
| <i>Quinic acid</i> | 12,2 | 1862 | 0,128 | - | 0,04 |
| <i>Syringic acid</i> | 12,5 | 1881 | 0,488 | 0,194 | 1,23 |

| | | | | | |
|-------------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| <i>p-Hydroxycinnamic acid</i> | 13,1 | 1919 | 0,238 | 0,359 | 0,376 |
| <i>Hydrocaffeic acid</i> | 13,2 | 1931 | 0,693 | 0,19 | - |
| <i>Gallic acid</i> | 13,5 | 1949 | 0,4 | - | 0,03 |
| <i>Ferulic acid</i> | 15,2 | 2060 | 0,293 | 0,093 | 0,78 |
| <i>Caffeic acid</i> | 16,3 | 2127 | 15,47 | 8,09 | 42,78 |
| <i>Chlorogenic acid</i> | 30,8 | 3139 | 0,11 | - | 0,08 |

11. HPLC анализ на съдържанието на феноли в екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen.

Резултатите от HPLC анализа са представени на Таблица 9. От така получената информация можем да направим следните изводи: О-метил кверцетина е 3,3 до 4,4 пъти по-малко като количество в *in vivo* пробите, отколкото в пробите *in vitro* и *ex vitro*, съответно. Обратната зависимост се наблюдава при съединенията О,О-диметил кверцетин и О,О-диметил кемферол: съединение 3 в *in vivo* пробите е в концентрация 2,1 пъти по-висока от тази в пробите *in vitro* и 1,7 пъти по-висока от тази на *ex vitro* пробите. О-метил кемферолът не е идентифицирано в *in vivo* екстрактите. В предишни изследвания на екстракти от *A. thracica* са открити следните флавоноиди: 3-О-метил кверцетин, 7-О-метил кверцетин, 3,6-О-диметил-кверцетин, 3,7-О-диметил-кверцетин и 3,7-О-диметил кемпферол, които го разграничават като компонентен състав от *A. chrysocoma* и *A. clypeolata*, изследвани в същото проучване (Kuzmanov et al., 1997).

Таблица 9. Съставът на *Achillea thracica* ацетонови екстракти представени в проценти от общата абсорбция на HPLC хроматограмите, регистрирани при 350 nm. Позицията на метиловата група не е изяснена, като тя може да бъде на 3 и/или 7 позиция.

| № | Съединения | RT | <i>In vivo</i> (%) | <i>In vitro</i> (%) | <i>Ex vitro</i> (%) |
|---|--------------------------------|--------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | <i>O</i> -methyl quercetin | 22.860 | 8.6 | 28.4 | 38.1 |
| 2 | <i>O</i> -methyl kaempferol | 24.978 | 3.6 | - | 3.0 |
| 3 | <i>O,O</i> -dimethyl quercetin | 26.907 | 63.7 | 29.7 | 38.3 |
| 4 | <i>O,O</i> -dimethylkaempferol | 28.520 | 22.2 | 13.3 | 14.7 |

12. HS-GC-MS анализ (парнофазов анализ) на екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen.

Идентификацията на летливите вещества в ацетонови екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения тракийски равнец е показана на Таблица 10. Съединенията са представени основно от три вида-разклонени ациклични монотерпени, циклични монотерпеноиди и естери на метил бутановата и метил бутеновата киселини. С най-висока концентрация в *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* извлеките са представени ацикличните монотерпени с процентно съдържание съответно-58,5 %, 58,9% и 53,7% от общото съдържание. Следващи по съдържание са цикличните монотерпени представляващи 19,5% (*in vivo*), 32,6 % (*in vitro*) и 21,5 % (*ex vitro*) от общото съдържание. С най-ниска концентрация от летливите съединения са естерите представляващи съответно 12,5% (*in vivo*), 2,5 % (*in vitro*) и 8,4 % (*ex vitro*) от общата маса.

Таблица 10. Парнофазов анализ химически състав на летливи компоненти в екстракти от тракийски равнец, където *t* е количества вещество <0,1 %, RI-индекс на задържане, E-естер, PM-разклонен ацикличен монотерпен, M- цикличен монотерпен.

| № | RI | Съединение | <i>in vivo</i> | <i>in vitro</i> | <i>ex vitro</i> | клас |
|---|-------|--|----------------|-----------------|-----------------|------|
| 1 | 848.3 | <i>Ethyl 2-methylbutyrate</i> | 6,8 | t | 0,7 | E |
| 2 | 910 | <i>Santolina triene</i> | 1.3 | 3.4 | 2.8 | PM |
| 3 | 927 | <i>Artemisiatriene</i> | 8,3 | 2,3 | 0,3 | PM |
| 4 | 1001 | <i>Yomogi alcohol</i> | 13,6 | 21,6 | 14,1 | PM |
| 5 | 1034 | <i>1,8-Cineole</i> (syn. <i>eucalyptol</i>) | 14,4 | 19,6 | 17,5 | M |
| 6 | 1038 | <i>Santolina alcohol</i> | 31,1 | 14,5 | 28,1 | PM |
| 7 | 1065 | <i>Artemisia ketone</i> | 0.7 | 1.1 | 0.1 | PM |
| 8 | 1084 | <i>Artemisia alcohol</i> | 3,5 | 16,0 | 8,3 | PM |
| 9 | 1104 | <i>Isopentyl 2-methyl butanoate</i> | 2.4 | 0.7 | 2.9 | E |

| | | | | | | |
|----------------------------|------|--|------|------|------|---|
| 10 | 1106 | <i>Isopentyl isovalerate</i> | t | t | 2.0 | E |
| 11 | 1114 | <i>3-Methyl-3-butenyl-3-methyl butanoate</i> | 0.8 | t | 0.2 | E |
| 12 | 1120 | <i>β-Thujone</i> | 0.8 | 1.2 | 3.3 | M |
| 13 | 1148 | <i>Camphor</i> | 1.0 | 0.6 | 0.4 | M |
| 14 | 1187 | <i>(3Z)-Hexenyl butanoate</i> | 0.4 | t | 0.4 | E |
| 15 | 1313 | <i>(3E)-Hexenyl tiglate</i> | 2.1 | t | 2.2 | E |
| 16 | 1382 | <i>Isobornyl acrylate</i> | 3,3 | 11,2 | t | M |
| Общо идентифицирани | | | 90.5 | 94.0 | 83.3 | |
| Ациклични монотерпени | | | 58.5 | 58.9 | 53.7 | |
| Циклични монотерпени | | | 19.5 | 32.6 | 21.2 | |
| Естери | | | 12.5 | 2.5 | 8.4 | |

Сред разклонените монотерпени, сантолина алкохолът е най-високо застъпен в *in vivo* и *ex vitro* пробите (съответно 31,1% и 28,1%), Докато йомоги алкохолът е преобладаващ в *in vitro* пробата (21.6%). Монотерпенът евкалиптол (1,8-cineole) е втори по изобилие във всички проби: 14,4% (*in vivo*), 19,6% (*in vitro*) и 17,5% (*ex vitro*). Камфорът присъства в приблизително еднакви количества във всички проби: 1.0% (*in vivo*), 0.6% (*in vitro*) и 0.4% (*ex vitro*). Изобринил акрилат е по-широко застъпен в *in vitro* пробата (11.8%), отколкото в *in vivo* (3.3%) и *ex vitro* (<0.1%). Най-забележими различия са отчетени по отношение на естерите, където количеството им в *in vitro* е от 3,4 до 5 пъти по-малко в сравнение с *ex vitro* и *in vivo* пробите, съответно.

13. GS/MS анализ на ацетонови екстракти от сух растителен материал

Резултатите от GC-MS анализа на ацетонови екстракти от сух растителен материал от *A. thracica* са представени на Таблица 11. Те показват, че количеството въглеродороди (нормални, разклонени и ненаситени) е няколко пъти по-високо в *in vivo* пробата (19,7%), отколкото в *in vitro* и *ex vitro* пробите (2,8%). Наличието на лактони и неидентифициран компонент е обърнато: 1,1 и 2,7% при *in vivo* пробата; 8,3 и 23,8% при *in vitro* и 13,9 и 41,2% при *ex vitro* пробите. α-амиринът и β-амиринът не се откриват в *in vivo* екстрактите. Тетракозанолът и

хексахидрофарзилацетонът се представят в приблизително еднакви количества във всяка една от трите проби (в диапазона от 1,6% до 2,7%).

Във всички проби общото количество на стеролите, палмитиновата киселина, метиловите ѝ естери и сескитерпена β -еудезмол са на лице (в границите от 0,4% до 4,0%).

Таблица 11. Химично съдържание (%) на *Achillea thracica* ацетонови екстракти, където RI-индекс на задържане, *t*-следи от съединението (<0,5 %).

| № | RI | Наименование на съединението | Съдържание (%) | | |
|-----|------|---|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | <i>in vivo</i> | <i>in vitro</i> | <i>ex vitro</i> |
| 1. | 1254 | <i>Unidentified</i> ¹ | 2,7 | 23,8 | 41,2 |
| 2. | 1663 | <i>β-Eudesmol</i> | 0,4 | 1,5 | 1,4 |
| 3. | 1846 | <i>Hexahydrofarnesyl acetone</i> | 2,2 | 1,6 | 1,6 |
| 4. | 1926 | <i>Methyl palmitate</i> | 3,0 | 0,7 | 1,6 |
| 5. | 1968 | <i>Palmitic acid</i> | 2,5 | 4,0 | 0,4 |
| 6. | 2696 | <i>Teracosanol</i> | 2,1 | 2,7 | 2,1 |
| 7. | 2900 | <i>Nonacosane</i> | 1,7 | 1,6 | 2,4 |
| 8. | 2956 | <i>γ-lactone</i> ² | 1,1 | 3,2 | 3,8 |
| 9. | 3001 | <i>Triacontane</i> | 3,7 | 0,3 | 0,4 |
| 10. | 3118 | <i>Branched alkane</i> | 3,7 | t | t |
| 11. | 3168 | <i>γ-lactone</i> ³ | t | 5,1 | 10,1 |
| 12. | 3210 | <i>Dotricontane</i> | 3,7 | t | t |
| 13. | 3228 | <i>Branched alkane</i> | 5,3 | 1,6 | 2,4 |
| 14. | 3314 | <i>Tritracontane</i> | 2,2 | t | t |
| 15. | 3348 | <i>Sterol</i> ⁴ | 2,4 | 1,4 | 1,1 |
| 16. | 3402 | <i>Tetracontane</i> | 1,9 | t | t |
| 17. | 3426 | <i>α-Amyrin</i> | t | 4,5 | 3,1 |
| 18. | 3428 | <i>Branched alkane</i> | 1,2 | t | t |

1 (MS, 70 eV, m/z (rel. int.): 82(100), 79(79), 67(49), 94(39), 59(25), 71(17), 43(17), 77(11), 83(9), 93(88); 2 (MS, 70 eV, m/z (rel. int.): 85(100), 97(66), 83(59), 57(57), 69(48), 54(46), 111(39), 71(32), 348(32), 84(28); 3 (MS, 70 eV, m/z (rel. int.): 85(100), 97(73), 83(64), 57(61), 69(53), 55(50), 111(44), 376(41), 71(36), 84(29); 4 (MS, 70 eV, m/z (rel. int.): 329(100), 303(85), 396(84), 213(759), 145(75), 107(71), 95(61), 255(61), 381(61), 399(59);

14. Установяване на етерично-масленият състав на маслени извлекци от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen., посредством GS/MS анализ.

Изследван е състава на етерично-маслени екстракти от свеж растителен материал на *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения тракийски равнец получени вследствие на водно-парна дестилация с апарат на Клевинджър (Таблица 12).

Таблица 12. Процентно отношение на етерични масла, изолирани от надземните части на *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen. RI, индекс на задържане отнесен към C9-C36 n-хидрокарбони на HP-5 колона; t, следи (<0.05%).

| № | RI | Наименование на съединението | <i>in vivo</i> | <i>in vitro</i> | <i>ex vitro</i> |
|----|------|------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 787 | <i>3-Methylcrotonaldehyde</i> | t | - | - |
| 2 | 791 | <i>2-Oxohexane</i> | t | - | - |
| 3 | 853 | <i>(E)-2-Hexenal</i> | 0,46 | - | - |
| 4 | 902 | <i>Santolina triene</i> | - | t | - |
| 5 | 948 | <i>Camphene</i> | t | - | t |
| 6 | 963 | <i>Benzaldehyde</i> | t | - | - |
| 7 | 999 | <i>Yomogi alcohol</i> | 3,19 | 7,06 | - |
| 8 | 1024 | <i>p-Cymene</i> | t | - | - |
| 9 | 1032 | <i>1,8-Cineole</i> | 7,46 | 35,72 | 4.52 |
| 10 | 1039 | <i>Santolina alcohol</i> | 41,16 | - | 26,38 |
| 11 | 1061 | <i>Artemisia ketone</i> | - | - | 0,48 |
| 12 | 1080 | <i>Artemisia alcohol</i> | 2,45 | 17,48 | 11,08 |
| 13 | 1100 | <i>Isopentyl 2-methylbutanoate</i> | 1,46 | - | - |
| 14 | 1106 | <i>Isopentyl isovalerate</i> | 0,26 | - | 2,23 |
| 15 | 1149 | <i>Camphor</i> | 1,08 | - | 1,15 |
| 16 | 1159 | <i>Sabina ketone</i> | t | - | - |
| 17 | 1164 | <i>Pinocarvone</i> | t | - | 0,85 |
| 18 | 1166 | <i>d-Terpineol</i> | - | - | 0,23 |
| 19 | 1174 | <i>Borneol</i> | 0,35 | - | - |
| 20 | 1187 | <i>α-Terpineol</i> | - | - | 0,16 |
| 21 | 1245 | <i>Hexenyl isovalerate</i> | - | - | 0,95 |

| | | | | | |
|-------------------------|------|---|-------|-------|-------|
| 22 | 1290 | <i>Lavandulyl acetate</i> | - | - | 0,05 |
| 23 | 1332 | <i>d-Elemene</i> | 0,23 | t | 0,63 |
| 24 | 1354 | <i>Eugenol</i> | t | - | 0,15 |
| 25 | 1376 | <i>α-Copaene</i> | t | t | - |
| 26 | 1379 | <i>Silphiperfol-6-ene</i> | - | - | 1,74 |
| 27 | 1395 | <i>Benzyl isovalerate</i> | 0,21 | - | - |
| 28 | 1419 | <i>β-Ylangene</i> | 0,46 | t | 2,22 |
| 29 | 1431 | <i>β-Copaene</i> | 0,21 | - | 1,32 |
| 30 | 1451 | <i>(Z)-Muurolo-3,5-diene</i> | - | - | 0,56 |
| 31 | 1455 | <i>(E)-β-Farnesene</i> | t | t | 0,67 |
| 32 | 1467 | <i>(Z)-Muurolo-4(14),5-diene</i> | - | - | 0,18 |
| 33 | 1484 | <i>Germacrene D</i> | 5 | 33,78 | 6,43 |
| 34 | 1497 | <i>Bicyclogermacrene</i> | 0,34 | - | - |
| 35 | 1514 | <i>γ-Cadinene</i> | t | - | t |
| 36 | 1518 | <i>δ-Cadinene</i> | 0,42 | - | 0,43 |
| 37 | 1561 | <i>(E)-Nerolidol</i> | 0,26 | - | 0,42 |
| 38 | 1579 | <i>Spathulenol</i> | 0,26 | - | 0,23 |
| 39 | 1583 | <i>Caryophyllene oxide</i> | - | - | 0,17 |
| 40 | 1652 | <i>β-Eudesmol</i> | 12,45 | 5,95 | 11,46 |
| 41 | 1655 | <i>α-Cadinol</i> | - | - | 9,37 |
| Общо идентифицирани (%) | | | 77.71 | 99.99 | 84.06 |

Добитото количество на етеричните масла от свеж растителен материал от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* е 0,2%, 0,25% и 0,22% (V / w), съответно. Маслата са с бледо жълт цвят и приятен аромат. Посредством GC-MS анализа бяха идентифицирани 30, 10 и 28 съединения, от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения, представляващи съответно 77,7%, 99,9% и 84,1% от общото количество на маслата.

С най-високи концентрации от терпените от *in vivo* пробите са санолинов алкохол (41,2%), 1,8- Цинеол (7,5%) и йомоги алкохол (3,2%), съставляващи 51,9% от общото количество на маслата. Установено е, че *in vitro* култивираните растения

натрупват главно 1,8- Цинеол (35.7%), артемизия алкохол (17.5%) и йомоги алкохол (7.1%) докато в растенията, адаптирани *ex vitro*, монотерпеновата фракция е представена главно от сантолинов алкохол (26,4%), артемизия алкохол (11,1%) и 1,8-цинеол (4,5%), представляващи 60,3% и 42% от маслото, съответно.

Сантолиновият алкохол е разклонен тирпен, типичен за семейство *Asteraceae* и докладван още и като част от масленият състав на *A. filipendulina*, *A. ligustica* и *A. ageratum* (Tuberoso et al., 2005; Sadyrbekov et al., 2006; Muselli et al., 2007). От всички изследвани варианти тракийски равнец само 1,8-цинеола, артемизия алкохол от монотерпените и гермакрен D и β -Еудезмол от сесквитерпените са в най-висока концентрация в микроразмножените растения. Евкалиптолът (1,8-cineole) е описан като най-често срещан сред монотерпените и присъствието му е отчетено при около 1/3 от представителите на рода (Nemeth, 2005).

От сесквитерпените, най-представителното съединение в *in vivo* и *ex vitro* извлеките е сесквитерпеновият алкохол β -Еудезмол в концентрации, съответно 12,6% и 11,5% от хроматограмата. Засечен във високи концентрации при *ex vitro* растенията също е α -Канинол (9,4 %). В двете групи екстракти (*in vivo* и *ex vitro*) също е отчетено наличието на (E)-неролидол (0,26% и 0,42%, съответно) и спатуленол (0,26% и 0,23%, съответно). Трицикличните въглеводороди β -иланген (2,2 %) и β -копаене (1,3 %) преобладават в *in vivo* пробите. В сесквитерпеновата фракция на *in vivo* и *ex vitro* екстрактите гермакрен D се среща в сравнително близко количество (съответно 5% и 6,4%).

Химическият анализ на етеричните масла на трите групи растения от един вид развиващи се в различни условия на култивиране показва качествени и количествени различия. Най-голямото разнообразие от съединения е отчетено при извлеките от *in vivo* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica*. По-малкото разнообразие на етерично-маслените компоненти в микроразмножените растения вероятно е вследствие на контролираните, стерилни условия на култивиране. И при трите групи растения монотерпените преобладават над сесквитерпените.

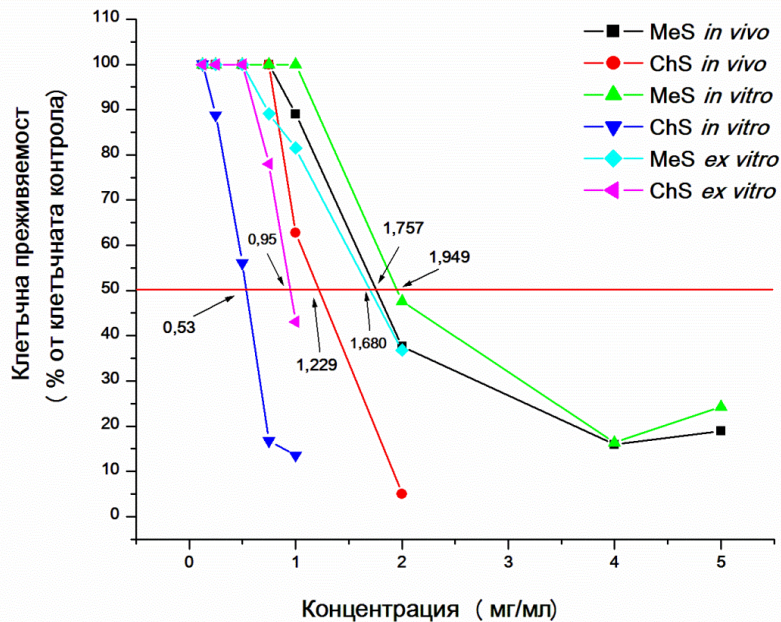
15. Изследване на антивирусната активност на MeS и ChS екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen.

15.1. Определяне на ЦК₅₀ и МНК

Съгласно целта и задачите на настоящата дисертационен труд, първоначално се определя цитотоксичността на всеки един от използваните от нас екстракти. Приложихме МТТ тест за определяне на живите и ранно апоптичните клетки (Mosmann, T., 1983).

В използваната експериментална постановка са тествани концентрации в граници от 0.125 мг/мл до 5 мг/мл на екстрактите от *Achillea thracica* Velen.

Получените стойности за всеки екстракт са представени в Таблица 13 и са изобразени графично на Фиг. 28.



Фиг. 28. Преживяемост на MDBK клетки въздействани с екстракти от *Achillea thracica* Velen.

Таблица 13. Данни за цитотоксичността (МНК и ЦК₅₀) на екстракти от *Achillea thracica* Velen.

| Екстракт | МНК (мг/мл) | ЦК ₅₀ (мг/мл) |
|-----------------------------------|-------------|--------------------------|
| Метанолов Соксклет <i>in vivo</i> | 0.75 | 1.757 |

| | | |
|--------------------------------------|-------|-------|
| Метанолов Соксклет <i>in vitro</i> | 1 | 1.949 |
| Метанолов Соксклет <i>ex vitro</i> | 0.5 | 1.680 |
| Хлороформен Соксклет <i>in vivo</i> | 0.75 | 1.229 |
| Хлороформен Соксклет <i>in vitro</i> | 0.125 | 0.53 |
| Хлороформен Соксклет <i>ex vitro</i> | 0.5 | 0.95 |

Сравняването на стойностите за ЦК₅₀ се вижда, че екстрактите получени с едно и също извличащо вещество имат приблизително близка цитотоксичност. Метаноловите соксклет извлекци са по-слабо токсични (стойностите им за ЦК₅₀ са приблизително два пъти по-високи) от хлороформените.

Ако сравним екстрактите по ЦК₅₀ получената йерархична редица би изглеждала по следния начин (от по – висока към по – ниска токсичност):
Хлороформен Соксклет *in vitro* > Хлороформен Соксклет *ex vitro* > Хлороформен Соксклет *in vivo* > Метанолов Соксклет *ex vitro* > Метанолов Соксклет *in vivo* > Метанолов Соксклет *in vitro*

Като най-токсичен може да бъде определен хлороформеният соксклет *in vitro* екстракт, а най-слабо токсичен метаноловият соксклет *in vitro* екстракт.

15.2. Действие на екстрактите върху извънклетъчните вириони

За по-пълното проучване на антихерпесния ефект на екстрактите от *Achillea thracica* Velen бе изследвано и действието им върху екстрацелуларния вирус. Екстрактите бяха приложени в концентрация отговаряща на тяхната МНК. Беше проследена промяната в инфекциозността на вируса при различна продължителност на контакт с изследвания извлек (5, 15, 30, 60, 120, 180 и 240 минути). Метаноловият Соксклет *ex vitro* екстракт от *Achillea thracica* Velen не проявява вирусоцидна активност. Останалите пет извлека проявяват като цяло слаба инактивация спрямо извънклетъчните вириони на *HSV-1*, щам *F*. Резултатите за тях са представени по долу както следва.

15.2.1. Вирусцидна активност на Хлороформен Соксклет *ex vitro* екстракт от *Achillea thracica* Velen., спрямо неразреден вирус *HSV-1*, щам *F*.

Екстрактът бе приложен в концентрация от 0,5 mg/ml, отговаряща на неговата МНК. Бе отчетена слаба инактивация на вируса, още на 5-та минута от началото на контакт. Едва на 2^{-я} час от контакта с вируса разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига ~1 lg и остава непроменена до края на експеримента.

14.2.2. Вирусцидна активност на Хлороформен Соксклет *in vitro* екстракт от *Achillea thracica* Velen., спрямо неразреден вирус *HSV-1*, щам *F*

Екстрактът бе приложен в концентрация от 0.125 мг/мл, отговаряща на неговата МНК. Бе отчетена слаба инактивация на вируса на 30-та минута от началото на контакта като при предните времеви интервали не се наблюдаваше такава. На 1^{-я} час от контакта с вируса разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига ~1 lg и остава непроменена до края на експеримента.

14.2.3. Вирусцидна активност на Хлороформен Соксклет *in vivo* екстракт от *Achillea thracica* Velen., спрямо неразреден вирус *HSV-1*, щам *F*.

Екстрактът бе приложен в концентрация от 0.75 мг/мл, отговаряща на неговата МНК. Инактивацията на екстрацелуларният вирус е слаба до 1^{-я} час от контакта с вируса, когато разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига ~1 lg и остава непроменена до края на експеримента.

14.2.4. Вирусцидна активност на Метанолов Соксклет *in vivo* екстракт от *Achillea thracica* Velen., спрямо неразреден вирус *HSV-1*, щам *F*.

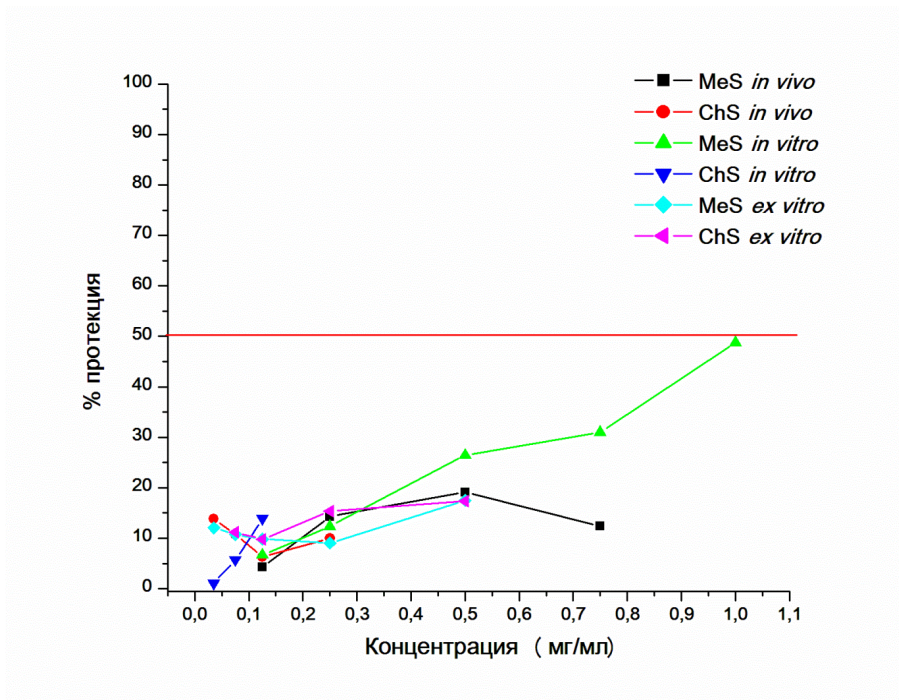
Екстрактът бе приложен в концентрация от 0,75 mg/ml, отговаряща на неговата МНК. Бе отчетена слаба инактивация на вируса на 15-та минута от началото на контакта като при предния времеви интервал не се наблюдаваше такава. На 1^{-я} час от контакта с вируса разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига ~1 lg и остава непроменена до края на експеримента.

14.2.5. Вирусоцидна активност на Метанолов Соксклет *in vitro* екстракт от *Achillea thracica* Velen., спрямо неразреден вирус *HSV-1*, щам *F*

Екстрактът бе приложен в концентрация от 1 mg/ml, отговаряща на неговата МНК. В сравнение с останалите при този екстракт се наблюдава по изразена активност спрямо извънклетъчните вириони на човешкият херпесен вирус. Още на 5^{-тата} от контакта с вируса разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига ~1 lg и остава почти непроменена до края на експеримента.

14.3. Изследване ефекта на екстракти от *Achillea thracica* Velen. върху репликацията на *HSV -1* (F).

Влиянието на растителните екстракти върху репликацията на двата типа на човешкия херпесен вирус бе определено чрез разработения от *Mosmann* МТТ тест (*Mosmann, T., 1983*) и модифициран от *Pauwels, Takeuchi, Sudo* за бърз скрининг на съединения за анти – херпесно действие (*Pauwels, R. и съавт., 1988; Takeuchi, H. и съавт., 1991; Sudo, K. и съавт., 1994*). При експериментите използвахме работна доза 100 ТКИД₅₀ (при титър на вируса 10^{-6,33} ТКИД₅₀). За референтно вещество (положителна контрола) при всеки експеримент използвахме ацикловир.



Фиг. 36. Въздействие на последователно приложен екстракти от *Achillea thracica* Velen върху репликацията на HSV-1 (F).

Таблица 17. Данни за % протекция и ИК₅₀ на екстракти от *Achillea thracica* Velen приложен последователно спрямо HSV-1 (F).

| Екстракт | % протекция на клетките в МНК | ИК ₅₀ мг/мл | ЦК ₅₀ мг/мл | Селективен индекс |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Метанолов Соксклет <i>in vivo</i> | 12,42 | н.д. | 1.757 | н.д. |
| Метанолов Соксклет <i>in vitro</i> | 48,795 | н.д. | 1.949 | н.д. |
| Метанолов Соксклет <i>ex vitro</i> | 17,48 | н.д. | 1.680 | н.д. |
| Хлороформен Соксклет <i>in vivo</i> | 10,02 | н.д. | 1.229 | н.д. |
| Хлороформен Соксклет <i>in vitro</i> | 13,895 | н.д. | 0.53 | н.д. |
| Хлороформен Соксклет <i>ex vitro</i> | 17,32 | н.д. | 0.95 | н.д. |
| АЦВ | 100 | 0.000430 | 0.218 | 452.08 |

*н.д. – няма данни

Шесте изследвани екстракта изявяват слабо антивирусно действие спрямо първият тип на човешкият херпесен вирус (Фиг. 36, табл. 17). От получените резултати става ясно, че метаноловият соксклет *in vitro* екстракт проявява най-силен протективен ефект спрямо HSV-1 (F) като осигурява ~49% протекция. Стойностите за протекцията при останалите пет извлека се движат в границите между 10 и 20 %. За съжаление отчетената активност за шестте екстракта от *Achillea thracica* Velen. е многократно по-ниска от тази установена за референтното вещество ацикловир.

13. Изследване антибактериалната активност на екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen.

Тествани са антибактериалните свойства на ацетонови екстракти от *in vivo*, *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica* Velen. в две различни концентрации- 4 mg/ml (A₄) и 40 mg/ml (A₄₀) (Таблица 18).

Таблица 18. Резултати от антибактериалната активност на екстракти от тракийски равнец, където С-бактерицидна зона ± стандартно отклонение (SD), S- бактериостатична зона ± стандартно отклонение (SD), PK-положителна контрола от антибиотик (S₁-10 µg стрептомицин; S₂-30 µg хлорамфеникол) и НК-негативна контрола от ацетон (A₀).

| | | Бактериални щамове (C±SD/S±SD) | | | | |
|-----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| Проба | Вари анти | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. typhimurium</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> |
| <i>In vivo</i> | A ₄ | -/- | -/20.0±0.5 | -/- | -/- | -/- |
| | A ₄₀ | -/- | -/18.0±0.5 | -/- | -/- | -/- |
| <i>In vitro</i> | A ₄ | 17.5±0.4/- | -/10.5±0.1 | -/- | -/- | -/- |
| | A ₄₀ | 11.5±0.2/- | -/- | -/- | 10.1±0.0/- | -/10.7±0.1 |
| <i>Ex vitro</i> | A ₄ | 17.5±0.3/- | 16.0±0.4/- | -/- | -/- | -/11.5±0.2 |
| | A ₄₀ | 17.5±0.2/- | -/11.5±0.1 | 10.0±0.0/- | 10.0±0.1/- | 11.0±0.2/- |
| PK | S ₁ | 24.0±0.5/- | 17.0±0.5/ 23.0±0.5 | 18.0±0.2/ 20.0±0.3 | 23.0±0.4/- | 23.0±0.4/- |
| | S ₂ | 17.0±0.2/- | 24.0±0.6/ 31.0±0.7 | 23.0±0.4/ 32.0±0.8 | 26.0±0.4/- | 30.0±0.6/- |
| NK | A ₀ | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- |

Сред всички тествани екстракти, тези от *ex vitro* адаптираните растения (A₄₀) разкриват най-голям антибактериален потенциал, докато извлечите добити от *in vivo* растителен материал (A₄) - са с най-нисък. Само срещу *Salmonella typhimurium* (A₄₀) *ex vitro* екстракта не показва активност. Като цяло *in vitro* и *ex vitro* пробите показват по-високи антибактериални свойства от *in vivo* образците. Единствено срещу *E. coli* екстрактите от *in vivo* култивирани растения показват слаба бактериостатична активност.

Въз основа на тестваните бактериални щамове и така получените резултати можем да твърдим, че ацетоновите екстракти от *Achillea thracica* показват по-добра антибактериална активност срещу Грам-отрицателни, отколкото срещу Грам-положителни микроорганизми.

Изводи

Въз основа на така получените данни могат да се направят следните изводи:

1. Успешно е установена система за микроразмножаване на тракийски равнец (*A. thracica*) с последващо *ex vitro* адаптиране към *ex situ* условия (на опитно поле и в ботаническа градина). При съответните етапи на култивиране в *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* условия, относителната стабилност на генома е запазена, като различията между трите тествани линии растения (3, 12 и 33) се дължат на кръстосаното опрашване на растението, а не на възникнали мутации в ДНК (не е наблюдавана разлика в профилите на тестваните клонинги, произлезли от една и съща линия-семе).
2. Растенията преминали през *ex vitro* адаптация показват възвръщане на анатомичното си устройство към първоначалната, характерна за *in vivo* растения структура на листните тъкани и стремеж към възстановяване на фотосинтетичната си активност. Не са отчетени увреди във фотосинтетичният апарат.
3. Най-голямо разнообразие и най-високи концентрации на дизахариди, аминокиселини и органични киселини са установени в екстрактите от *in vitro* култивирани растения *A. thracica*, като високите нива на тези първични метаболити може да се обясни с хетеротрофният начин на живот на микроразмножените растения и активните синтетични процеси, които протичат при тях.
4. Общите резултати от химичния анализ на вторичните метаболити на екстрактите и етерично-маслените извлеци от растения *A. thracica* отглеждани в *in vivo* и *in vitro* условия и претърпяли *ex vitro* адаптация показват, че наблюдаваните различия са главно в количествения състав на съединенията. Тъй като растенията са генетично идентични, тези разлики могат да се обяснят с различните условия на култивиране на трите тествани варианта.

5. От трите тествани варианта екстрактите от *ex vitro* аклиматизираните растения показаха най-висока антиоксидантна активност. Получените резултати могат да се обяснят с адаптирането на растенията към външните условия на средата и акомулираните вследствие на това високите концентрации на фенолни съединения (фенолни киселини, флавоноли и флавоноиди) в тези екстаракти.
6. Шесте изследвани екстракта извяват слабо антивирусно действие спрямо първият тип на човешкият херпесен вирус. От получените резултати става ясно, че метаноловите Сокслетни екстракти от *in vitro* микроразмножени растения показват най-висока антивирусна активност срещу херпес симплекс вирус 1 щам F като осигуряват ~49% протекция. Тази стойност е с над 2 пъти по-ниска от използваната положителна контрола ацикловир.
7. Екстрактите, получени от *ex vitro* адаптирани растения тракийски равнец имат най-висока антибактериална активност срещу тествани бактериални щамове, докато *in vivo* пробите показват най-слаба активност. Резултатите показват, че екстрактите от растението са с по-високи протективни свойства срещу Грам-отрицателни бактерии, като възможно обяснение за това е високото съдържание на фенолни съединения в тях.

Заклучение

Традиционната употреба на белия равнец (*A. millefolium*) и многобройните други представители на рода в народната и официална медицина привлича вниманието на редица изследователи, което спомогна при изследването на фитохимичния състав и биологична активност на българския ендемит *A. thracica*. Приложената от нас система за *ex situ* консервация чрез *in vitro* размножаване и последващата *ex vitro* адаптация на тракийски равнец позволява проследяване на промените, настъпващи в анатомичното устройство на листа, фотосинтетичната активност и състава на първичните и вторични метаболити през различните етапи на този метод за съхранение. Проведените изследвания на състава на биологично-активните вещества в растението ще позволи тяхното фракциониране и пречистване до единични продукти и тестване на по-широк спектър от активности. Освен това извършените биологични изследвания с различни екстракти извлечени

от растението, отгледано при различни условия на култивиране, разкриват потенциална антиоксидантна и антимикробна активности на изследваните екстракти. Настоящият дисертационен труд предлага разработка на система за *ex situ* съхранение на това рядко и застрашено растение, като в добавка допълва и дава актуална информация за състава на биологично активните компоненти, идентифицирани в *A. thracica*, което ще допринесе за установяването и разбирането на нейните фармацефтични действия.

Приноси

В резултат на изследването на *Achillea thracica* са получени следните оригинални резултати с приносен характер:

1. Създаден е протокол за въвеждане в *in vitro* култура, посредством семена, като е завършен пълният цикъл на микроразмножаването.
2. Създадена е и се поддържа в *in vitro* условия колекция от този застрашен вид.
3. Направен е сравнителен анализ на анатомичното устройство на листа, генетичната идентичност и фотосинтетичната активност на микроразмножени и преминали последваща аклиматизация растения.
4. Направен е сравнителен анализ на съдържанието на първични и вторични метаболити и антиоксидантната активност на *in vivo* култивирани, *in vitro* размножени и *ex vitro* адаптирани растения *Achillea thracica*.
5. Тествани са и са сравнени антивирусната и антибактериалната активности на екстракти от *in vivo* култивирани, *in vitro* размножени и *ex vitro* адаптирани растения теакийски равнец.

Списък на научните публикации и участие на научни конференции

Научни публикации:

1. M. Rogova, Ts. Ganeva, M. Stefanova, D. Koleva and V. K.-Toteva (2015) Morphoanatomical study of *in vitro* propagated and *ex vitro* adapted *Achillea thracica*

Velen. plants Bulgarian Journal of Agricultural Science, 21 (No 5) 2015, 947-950, *SJR* - 0.229

2. Zhenya P. Yordanova, Maria A. Rogova, Miroslava K. Zhiponova, Milen I. Georgiev, Veneta M. Kapchina-Toteva (2017) Comparative determination of the essential oil composition in Bulgarian endemic plant *Achillea thracica* Velen. during the process of ex situ conservation. *PHITOL* 1361, p. 1-6. Article in press *IF*: 1.353

Участия в научни конференции, на които са представени резултати от дисертационния труд:

1. M. Rogova, N. Petrova, Zh. Yordanova, M. Dimitrova, V. Kapchina-Toteva (2014). Essential oil composition of *in situ* and *in vitro* cultivated *Achillea thracica* Velen. plants. "Семинар по екология-2014" с международно участие посветен на 70 години Съюз на учените в България, 24-25 Април, 2014, ИБЕИ-БАН, София (участие с постер).

2. Yordanova Zh., Rogova M., Petrova N., Chaneva G., Dragolova D., V. Kapchina – Toteva (2014). *Ex situ* conservation and antioxidant capacity of the bulgarian endemic plant *Achillea thracica* Velen. 8-th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, May 19-22, 2014, Durres, Albania. (участие с постер).

3. M. Rogova, N. Petrova (2014), Effect Of Growth Regulators On Some Physiological Characteristics Of In Vitro Propagated *Achillea Thracica* Velen. Пета работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания”, 7-8 Април, 2014, София (доклад).

4. Mariya Rogova, Daniela Dragolova, Zhenia Yordanova, Milena Dimitrova, Desislava Mantovska, Veneta Kapchina-Toteva (2015). Initiation of in vitro culture and capacity of seed sprouting in two different mediums of *Achillea thracica* Velen. Plants. "Семинар по екология-2015" с международно участие, Април, 2015, ИБЕИ-БАН, София (участие с постер).

5. M. A. Rogova, D. T. Dragolova, M. A. Dimitrova, Zh. P. Yordanova, D. Mantovska, M. Ninov and V. M. Kapchina-Toteva (2015). Micropropagation and ex situ conservation of *Achillea thracica* Velen. Международна Научна Конференция на Съюз на учените - Стара Загора, 4-5 Юни, 2015 (участие с постер и публикация).

6. Rogova M., Yordanova, Z., Mantovska D., Kapchina-Toteva V. (2015). Comparative determination of essential oil composition in the Bulgarian endemic plant *Achillea thracica* Velen. during the process of *ex situ* conservation. International Symposium on Phytochemicals in Medicine And Food, Shanghai, China, 26-29 June, 2015. (участие с постер)
7. Mariya Angelova Rogova, Daniela Todorova Dragolova, Milena Angelova Dimitrova, Zhenia Petkova Yordanova, Desislava Ivanova Mantovska, Veneta Mihova Kapchina-Toteva (2015) GC-MS analyses of bioactive compounds of methanol extracts of *in vivo*, *in vitro* and *ex vitro* grown *Achillea thracica* Velen. plants. Second Int. Symposium on Natural Products Utilization: From plants to Pharmacy Shelf, 14-17 October, Plovdiv, Bulgaria. (участие с постер).
8. Mariya Rogova, Daniela Dragolova, Miroslava Zhiponova, Milena Dimitrova, Desislava Mantovska, Gordana Stojanović, Veneta Kapchina-Toteva (2015) Comparative analyses of flavonoid compounds of *in vivo*, *in vitro* and *ex vitro* grown *Achillea thracica* plants. Младежка конференция Климентови дни, 19-20 ноември, София, България. (участие с постер).
9. M. Rogova, Zh. Yordanova, D. Dragolova, M. Zhiponova, Ant. Pascaleva, Veneta Kapchina-Toteva (2016) Comparative analyzes of some flavonoid compounds in *in vivo* and *in vitro* cultivated *Achillea thracica* Velen. Plants. 30 септември-2 октомври 2016 XIV National Conference “Natural Sciences 2016” (NCNS 2016) Шуменски университет, Варна, България.
10. Mariya Rogova, Detelin Stefanov, Antoniya Patvanova, Veneta Kapchina-Toteva (2016) *Ex situ* conservation and biologicaly active compouds in *Achillea thracica* Velen. 17-18 ноенври 2016 Младежка конференция Климентови дни, София, България.
11. M. A. Rogova, D. T. Dragolova, M. K. Zhiponova, Zh. P. Yordanova, G. Decheva and V. M. Kapchina-Toteva (2017) Micropropagation and *ex situ* conservation of *Achillea thracica* Velen. XXVII Международна Научна Конференция на Съюз на учените - Стара Загора, 1-2 Юни, 2017 (участие с постер).

Благодаря

най-напред на дипломната ми ръководителка **Проф. д-р Венета Капчина-Тотева** за нейната подкрепа, помощ и съдействие през всеки етоп от създаването на този дисертационен труд. Изключително съм признателна на **всички останали членове от катедра "Физиология на растенията"**, към БФ на СУ "Св. Кл. Охридски", затова че ми предлагаха и оказваха помощ всеки път, когато съм имала нужда от тях. Поднасям своите най-искрени благодарности на катедри: **„Вирусология“**, **„Биофизика и радиобиология“** и **„Ботаника“** към СУ, на **АБИ**, ръководството и персонала на **УБГ Варна**, на членовете на катедра **"Химия"** и **"Ботаника"** от **Нишки Университет** в Сърбия. Най-искрено благодаря на **ас. Даниела Драголова**, **гл.ас. Милена Димитрова**, **доц. Мирослава Жипонова**, **доц. Женья Йорданова** и **доц. Ганка Чанева** за споделените съвети и напътствия при изработването и написването на настоящият труд. Сърдечно благодаря на **гл. ас. Антон Хинков** и **доц. Стоян Шишков** за помощта, която ми оказаха при определяне на антивирусната активност, на **екипа на проф. Иван Атанасов** и **гл. ас. Калоян Костов** за споделените знания и умения по идентификация на съединения посредством GC-MS анализ и за установяването на генетичната идентичност, съответно, на **доц. Марина Станилова (ИБЕИ-БАН)** за ползването на адапционната камера, на **доц. Детелин Стефанов**, за напътствията и съветите при определяне на фотосинтетичната активност и на **Проф. д-р Димитрина Колева**, **доц. Мирослава Стефанова** и **гл. ас. Цвета Ганева** за оказаната помощ по време на съвместната ни работа за сравняване анатомията на листа на тракийски равнец.

Накрая, но никога на последно място искам да благодаря на семейството ми, затова че ме създадоха човека, който съм и за тяхната всеотдайна и непрестанна обич и подкрепа по време на всеки един момент от моя живот.