

АГРАРЕН УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

ПЕРВИН ШЕНГЮН ХАЛКОГЛУ-ХРИСТОВА

**„*In vitro* култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.,
като технологични матрици за получаване на
биологично активни вещества”**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИЯ

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН "ДОКТОР"

**Научна специалност: Селекция и семепроизводство на културните
растения (Растителни Биотехнологии)**

Научни ръководители:

Доц. д-р Светла Янчева

Чл.-кор. проф. д.т.н. Атанас Павлов

Пловдив, 2021г.

Дисертационният труд е написан на 118 страници и съдържа 16 таблици и 31 фигури. Използвани са 191 литературни източника, 3 от които на кирилица и 191 на латиница.

Изследванията са извършени през периода 2016-2019 г. в Лабораторията по растителни биотехнологии на Аграрен университет - Пловдив; Лабораторията по растителни биотехнологии към Института по Овощарство - Пловдив; Лабораторията за анализи на катедра аналитична химия на Университета по хранителни технологии - Пловдив; Лабораторията по приложни биотехнологии, филиал на БАН - Пловдив.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на катедра "Лозарство и Овощарство" на Аграрен университет-Пловдив.

БЛАГОДАРЯ

на научните си ръководители: Доц. д-р Светла Янчева и Чл.-кор. проф. д.т.н. Атанас Павлов, на колегите от Лабораторията по приложни биотехнологии, филиал на БАН - Пловдив, на гл. ас. д-р Радка Вранчева, на колегите от Лабораторията по растителни биотехнологии към Института по Овощарство - Пловдив.

Благодаря на всички останали за оказаната помощ и съвети при реализирането на настоящия дисертационен труд.

І.УВОД

От векове растенията са прилагани като лекарства и традиционен източник на много химични продукти и вторични метаболити, използвани във фармацевтичната промишленост, козметиката, като хранителни добавки и под формата на биопестициди, ароматични компоненти, багрила, подобрители, оцветители и други. Понастоящем около 80% от всички съществуващи лекарства са получени директно или индиректно от растения. През последните десетилетия повечето фитопрепарати на база вторични метаболити на растения се получават чрез клетъчни култури

Една от най-големите групи биологично активни вторични метаболити са полифенолите. Растителните храни са богати източници на феноли, молекули които могат да действат като антиоксиданти за предотвратяване на сърдечни заболявания, намаляване на възпалението, честотата на ракови заболявания и диабет, както и намаляване степента на мутагенеза в човешките клетки. Флавоноидите, другата най-разпространена група в растителните тъкани, са често отговорни заедно с каротеноидите и хлорофилите за техните сини, лилави, жълти, оранжеви и червени цветове. Семейството флавоноиди включва флавони, флавоноли, изо-флавоноли, антоцианини, антоцианидини, проантоцианидини и катехини.

Fabiana imbricata Ruiz et Pav. е ценно лечебно растения, което е малко известно в Европа. Съществуват редица проблеми при конвенционалното му размножаване и отглеждане. Биотехнологиите предоставят нови възможности за размножаване и проучване на растението. Разработването на подходящи техники за клетъчно и тъканно култивиране дават възможност за по-масовото му размножаване и разпространение като декоративно растение, както и използването му с цел получаване на биологично активни вещества.

Изложената до тук информация определя значимостта на темата като докторска разработка и ни мотивира да проведем проучвания в това направление.

Положени са усилия в изследователската работа с цел да се обогатят и разширят научните изследвания. Постигнатите от нас резултати биха могли да представляват интерес в научен и приложен аспект, за решение на някои проблеми в размножаването на растителния вид *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., чрез *in vitro* култури и оценка на потенциала им за получаване на биологични вещества.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА.

Целта на настоящия дисертационен труд е оценка на потенциала на *in vitro* култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. в качеството им на технологични матрици за получаване на биологични вещества.

За осъществяване на посочената цел са формирани следните задачи:

1. Получаване на растителен материал и въвеждане в *in vitro* култура.
2. Оптимизиране на системата за микроразмножаване на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.
 - 2.1. Създаване на оптимизирана хранителна среда за мултипликация
 - 2.2. Адаптация и аклиматизация на регенерантите.
 - 2.3. Влияние на светлинния източник върху растежа и развитието на растенията в етап на мултипликация.
 - 2.4. Проучване ефективността на биореакторна система с временно потапяне (TIS), тип RITA® в етап на мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.
3. Получаване на растителни *in vitro* системи от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. с различна степен на диференциация.
4. Анализ на антиоксидантната активност на различни екстракти от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.
5. Анализ за определяне на полифенолния профил на различни екстракти от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Лечебното растение *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. е разпространено в региона на Андите, предпочита сухи планински склонове, каменисти и песъкливи почви (Hoffmann et al., 1992 cited in Ratsch, 1998) и от векове се използва в етнофармакологията.

Експерименталната работа е проведена с растения от вида *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., закупени от разсадник *Paddock Plants* (Англия). Проучено е развитието на растенията през следните етапи: 1. Въвеждане в *in vitro* култура; 2. Мултипликация; 3. Вкореняване; 4. Адаптация на *in vitro* растенията към условия *ex vitro*.

Експериментите са извършени в Лабораторията по растителни биотехнологии към АУ-Пловдив, Лабораторията по растителни биотехнологии към Институт по Овощарство-Пловдив, Лаборатория по аналитична химия към УХТ-Пловдив и Лабораторията по приложни биотехнологии, филиал на БАН - Пловдив.

1. Оптимизиране на хранителната среда за мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

Експериментът е изведен в Лабораторията по растителни биотехнологии към АУ-Пловдив. За оптимизирането на хранителната среда за мултипликация е проведен експеримент за установяване ефекта на различни концентрации на растежни регулатори (Таблица 1). Използвана е основна среда MS (*Duchefa*), допълнена със захароза (30 g/l), Merk агар (6 g/l) и рН=5.8 преди автоклавиране.

Таблица 1. Растежни регулатори (mg/l), използвани в хранителните среди за култивиране на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. *in vitro*.

Варианти	A0	A1	A25	A3	A33
PGR					
BAP	-	0.1	0.25	0.5	0.5
IBA	-	0.01	0.01	0.01	0.01
* Хранителна среда A ₃₃ съдържа активен въглен 3 g/l					

Всеки вариант на хранителна среда е заложен в 5 повторения (култивационен съд), съдържащи 5 експланта. Отчетени са следните показатели: средна височина на растението (cm), среден брой разклонения, средна дължина на корените (cm) и среден брой корени, съответно на 14, 21 и 28 ден.

1.1. Адаптация на получените регенеранти.

Адаптирането и аклиматизирането на получените растения е извършено в растежна камера с постепенно намаляване на атмосферна влажност, температура 22 ± 1 °C и 16/8 h фотопериод. Като субстрат е използвана смес от торф-перлит (3:1) с добавяне на пясък (50%). Преживяемостта на растенията (%), размножавани върху среди A0 и A33, е отчетен на 7, 14, 21 и 28 ден. Получените резултати са обработени по стандартни биометрични методи и се основават на 3 независими експеримента с 4 седмични пасажи.

2. Влияние на светлинния източник върху растежа и развитието на растенията в етап на мултипликация.

Експериментът е изведен в Лабораторията по растителни биотехнологии към Института по Овощарство - Пловдив. Изпитани са 4 варианта LED светлини (осигурени от Philips Green Power LED research module): бяла (LW), червена (LR), синя (LB), LMix (Red:Blue:DeepBlue:White = 1:1:1:1) и контрола - бяла флуоресцентна светлина (FW), осигурена от лампи (ORSAM, 40 W). Експлантите са заложени в стъклени култивационни съдове (180 ml) на среда A33. За всеки вариант на светлина са заложени 5 бурканчета с по 5 експланта, при условия на култивиране - температура 24°C и фотопериод 16/8 часа. Отчетени са: средна височина на растение (cm), среден брой разклонения, коефициент на мултипликация (бр), среден брой корени и средна дължина на корените (cm) на 14, 21 и 28 ден от залагането. Представените резултатите са обработени по стандартни биометрични методи и се основават на 3 независими експеримента с 4 седмични пасажи.

3. Проучване ефективността на биореакторна система с временно потапяне (TIS), тип RITA® в етап на мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

В експеримента са използвани експлантите с размер 2 cm, от добре развити растения, получени *in vitro* на безхормонална среда MS. Етапът на мултипликация е осъществен чрез сравняване между двете системи: твърда среда A33 в стъклени съдове и течна среда със същия състав (без агар) в TIS биореактор при залагане на 120 експланта във вариант. Проведеният опит се състои от 24 повторения за стъклените съдове с по 5 експланта на твърда среда и 6 биореактора по 20 експланта. Биореакторите са автоклавираны, свързани със стерилни PTFE филтри, запълнени с 200 ml течна среда и залагане на експлантите в стерилни условия. Времето за потапяне на експлантите в култивационната среда е 15 минути на 8 часа. Култивирането е осъществено в растежна камера с температура 24±1°C, интензитет на светлината 3000 lx (бяла флуоресцентна светлина) и 16/8h фотопериод. Анализът на данните се основава на 2 независими експеримента с продължителност на пасажа от четири седмици. Отчетени са следните показатели: среден брой леторасти на растение, средна височина на растението, коефициент мултипликация, среден брой корени и средна дължина на корените.

4. Индуциране на калусна култура на твърда хранителна среда.

Експериментът е изведен в Лабораторията по растителни биотехнологии на Аграрен университет - Пловдив.

Изходните експланти са подготвени чрез сегментиране на листна и стъблена маса от 28-дневни *in vitro* растения *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav..

За индуциране на първичен калус, експлантите са поставени на две хранителни среди, съставени на база MS, обогатена със захароза (30 g/l), Merk агар (6 g/l) и добавка на 2,4-D в концентрация, съответно 0,2 mg/l (MSD) и 4 mg/l (D) (Denchev, et al., 1990) при pH=5.7. Експериментът е заложен в 5 повторения на петриеви блюда с диаметър 90 mm съдържащи 30 ml хранителна среда, в термостатна камера при фотопериод 16h светло/ 8h тъмно и температура 24±1 °C.

Отчетен е ефекта на концентрацията на 2,4-D върху степента на дедиференциация, типа, морфологията и динамиката в развитието на индуцираните калуси.

4.1. Ефект от светлинния източник върху растежа и развитието на калусни линии *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

Калусните култури са пасирани на хранителни среди съставени на база MS, с добавка на захароза (20 g/l) и Merk агар (6 g/l), при pH=5,7 и различни концентрации на регулатори на растежа (Таблица 2). Проучени са три калусни линии, заложен на различните хранителни среди (MSD, D, A).

Таблица 2. Растежни регулатори (mg/l), използвани в хранителните среди за култивиране на недиференцираните *in vitro* системи *Fabiana imbricata*.

PGR Варианти	2,4-D	Kinetin	NAA
MSD	0.2	-	-
D	4.0	-	-
A*	0.25	0.25	0.25
* Вариант А има удвоено съдържание на витамини MS			

Ефектът на светлината е отчетен при експозиция на калусните култури на осветление, осигурено от флуоресцентни лампи с бяла (L) и червена (R) светлина, и на тъмно (D). Във всеки вариант на светлината са заложен по 3 петриеви блюда с 10 калуса на трите хранителни среди. Продължителността на експеримента е 90 дни, 3 субкултури в термостатна камера с температура 24°C, фотопериод 16/8 часа.

Допълнително е проучено влиянието на светлинния режим върху синтеза на вторични метаболити. За целите на експеримента е отчитана грам свежа биомаса на 0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден от залагането. От всички варианти на база установени различия на културите са събрани по 10 проби за вариант от 3 независими субкултури за анализиране на метаболитния състав.

4.2. Получаване на растителни клетъчни и суспензионни култури.

Експериментите имат за цел получаване на бързорастяща хомогенна суспензионна култура. Използвана е течна хранителна среда съставена на база MS, с добавка на захароза (20 g/l), растежен регулатор 0,2 mg/l 2,4-D (MSD) при pH=5,7.

За индукция е използван калус, получен от бързорастяща калусна култура на хранителна среда MSD, растящ на светло и на тъмно. В стерилни условия е претеглен 3 g калус, който е трансфериран в 30 ml течна хранителна среда в култивационни съдове с обем 200 ml. Експериментът е заложен в три повторения. Култивирането е осъществено върху ротационна клатачка при 110 rpm на тъмно и температура 24°C с период на субкултивиране 10 дни.

Отчетено е нарастването на клетъчната маса и необходимостта от разреждане със свежа хранителна среда.

4.3. Изпитване ефективността на хранителната среда и установяване динамиката на растеж на растителната биомасата на варианти суспензионна култура.

Подготвителен етап – извършен с цел набавяне на необходимите количества суспензионна култура чрез поставяне на 30 ml инокулум в 30 ml хранителна среда в култивационни съдове с обем 200 ml. Експериментът е заложен с 3 варианта хранителна среда MSD, D и A (Таблица 2), при pH=5,7, всеки от които в 3 повторения.

Залагане на експеримент: За установяване ефективността на изпитваните среди и динамиката на растеж на варианти суспензионна култура се осъществява посевка в стерилни условия за всеки вариант. В колба от 2 литра се смесват до хомогенизиране 880 ml течна хранителна среда и 220 ml инокулум (8-дневна култура на съответната суспензия). Всеки вариант е заложен в 3 независими повторения с по 10 образци, като 100 ml от хомогенизираната суспензия са пасирани в 10 броя стерилни ерленмаерови колби с обем 500 ml. Култивирането е извършено в растежна камера на ротационна клатачка (100 rpm) и температура 25°C на тъмно. Събирането и отчитането на пробите

е проведено на: 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11 ден от началото на култивирането. Събрана е биомаса за извеждане на фитохимични анализи.

4.4. Дигитална холографска микроскопия за характеризиране на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. на варианти суспензионна култура.

Експериментът е изведен с Дигитален холографски микроскоп (DHM), разработен в АУ - Пловдив. Източникът на светлина е диоден лазер (Lasiris) с дължина на вълната 673.2 nm и изход 7 mW. Лазерното лъчение се фокусира върху отвор, след което интензивността се контролира от поляризатор. След отвора сферичната вълна минава през обекта; дифракцията от обекта и недифракционната вълна и се изобразява като холограма, която се записва на CCD сензор. Интензивността и фазата се реконструират числено. Използва се USAF Test Target 1951 за калибриране на холографския микроскоп.

Пробите за изследване са приготвени като от 3-те варианта суспензия, култивирани на среди MSD, D и A са взети по 5 ml; оставени са 5 минути в епруветки за утаяване на по-големите клъстери; от горния слой (1 cm), съдържащ растителни клетки се вземат с пипета 0,5 ml; пробата се полага върху микроскопско стъкло и се поставя покривно стъкло. Оптималното разстояние между лазерния източник и обекта е 30 cm за записване на холограми на клетъчни и суспензионни култури от *Fabiana imbricata* Ruiz & Pav. Разстоянието от обекта до CCD камерата е 5 cm.

Екстракция на полифеноли

Подготовката на екстрактите е извършена в Лабораторията за анализи на катедра аналитична химия на Университета по хранителни технологии - Пловдив.

Леофилизираните проби от растения *in vitro*, растения *in vivo*, калусни и суспензионни култури (100 mg) се екстрахират трикратно с 5 mL 70% етанол на обратен хладник при температура 75°C. Получените екстракти се филтруват през филтърна хартия и се обединяват (по метод на изтощаването). След изпаряване до сухо на ротационен вакуумизпарител (120 mBar при 60 °C) сухите екстракти се съхраняват на тъмно при температура 4 °C и се разтварят в подходящ разтворител преди започване на работа.

5. Методи за анализ при проучване метаболитния профил на култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

За да се анализира метаболитния профил на култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav е събран растителен материал (надземна маса) от *in vivo* растения получени от

разсадник *Paddock Plants* (Англия), *in vitro* и *ex vitro* растения, калус от селектирани култури и клетъчна маса от суспензионна култура.

5.1 Спектрофотометрично определяне съдържанието на общи феноли, общи флавоноиди и антиоксидантна активност.

Спектрофотометричните анализи на екстрактите е извършена в Лабораторията за анализи на катедра аналитична химия на Университета по хранителни технологии - Пловдив.

5.1.1. Съдържание на общи феноли и общи флавоноиди.

Количеството на общите феноли е определено чрез спектрофотометричния метод на Folin-Ciocalteu (*Stintzing et al., 2005*), модифициран по следния начин: Към 1 mL реактив на Folin-Ciocalteu (Sigma), разреден пет пъти с дестилирана вода се добавят 0.2 mL от анализирания екстракт и 0.8 mL 7.5% Na₂CO₃ (Sigma). Получената смес се оставя на тъмно при стайна температура за 20 min за протичане на реакцията. След изтичане на реакционното време светлината абсорбция на пробата се измерва при 765 nm срещу контролна проба, приготвена по същият начин, съдържаща съответния екстрагент вместо екстракт. Получените резултати са представени като mg еквиваленти галова киселина (GAE) за g сухо тегло (DW), спрямо стандартна права, построена с различни концентрации на галова киселина (Sigma), линейна в диапазон 0.02 - 0.10 mg/mL галова киселина.

Спектрофотометричното определяне на общите флавоноиди е извършено по метод на *Kivrak et al., (2009)*: към анализирания екстракт (1.0 mL) се добавя 0.1 mL 10 % алуминиев нитрат (Sigma), 0.1 mL 1M калиев ацетат (Sigma) и 3.8 mL вода. След изтичане на реакционното време (40 min, стайна температура) светлинната абсорбцията на пробата се измерва при 415 nm срещу контролна проба, съдържаща 0.1 mL вода, вместо алуминиев нитрат. Получените резултати са представени като mg еквиваленти кверцетин (QE) за g сухо тегло (DW), според стандартна права, линейна в концентрационен диапазон 10-100 µg/mL кверцетин.

5.2.2. Определяне на антиоксидантна активност

5.2.2.1. DPPH метод

За определяне антиоксидантната активност посредством DPPH метода чрез улавяне на радикала (*Kivrak et al., 2009*). Анализираният екстракт (0.15 mL) се смесва с прясно приготвен разтвор на DPPH (0.1 mM в метанол) (Sigma) (2.85 mL). Реакционната

смес се инкубира на тъмно при 37 °C за 15 min. След изтичане на реакционното време се измерва абсорбцията на пробите при 517 nm срещу контролна проба, етанол.

5.2.2.2. ABTS метод

Определяне антиоксидантната активност е посредством ABTS метода, описан от *Thaipong et al.*, (2006) с малки изменения. ABTS радикала се генерира чрез смесване на равни количества 7.0 mM воден разтвор на 2, 2'-azinobis(3)-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) и 2.45 mM воден разтвор на K₂S₂O₈. Реакционната смес престоява на тъмно за 16 h при стайна температура. Преди анализ 2 mL от ABTS радикала се разтварят в метанол в съотношение 1:30 до получаване на крайна абсорбция 1,0÷1,1 при 734 nm. Изследваният екстракт (0,15 mL) се смесва в епруетка с 2,85 mL прясно приготвен разтвор на ABTS радикала. Приготвя се и контролна проба, която съдържа 0,15 mL етанол вместо екстракт. Реакционната смес се инкубира на тъмно за 15 min при 37 °C, след което светлинната абсорбцията на контролата и пробите се отчита спектрофотометрично срещу етанол при дължина на вълната 734 nm.

5.2.2.3. FRAP метод

За определяне антиоксидантната активност посредством FRAP метода (*Benzie and Strain*, 1996) и модифициран както следва: FRAP реагента се приготвя чрез смесването на предварително приготвени 0,3 M ацетатен буфер с pH 3,6, 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ, Fluka) в 40 mM HCl и 20 mM FeCl₃.6H₂O в съотношение 10:1:1. Изследваният екстракт (0,1 mL) се добавя към 3 ml FRAP реагент. Приготвя се и контролна проба с 0,1 mL етанол вместо екстракт. Реакционната смес се инкубира за 10 min при 37 °C, след което абсорбцията на пробите се измерва спектрофотометрично срещу контролната проба при дължина на вълната 593 nm.

5.2.2.4. CUPRAC метод

Методът е описан от *Apak et al.*, (2006) с изменения. Реакцията се инициира чрез смесване на 1.0 mL 10 mM CuCl₂.2H₂O (Sigma), 1.0 mL 7.5 mM Neocuproine в метанол (Sigma), 1.0 mL 0.1 M амониено-ацетатен буфер с pH 7.0, 0.1 mL от анализираният екстракт и 1.0 mL дестилирана H₂O. Приготвя се и контролна проба, която съдържа 0.1 mL етанол вместо екстракт. Реакционната смес се инкубира за 20 min при 50 °C. След охлаждане на сместа абсорбцията на пробите се отчита при 450 nm срещу контролната проба.

Светлинната абсорбция е измерена чрез спектрофотометър (Shimadzu UV/VIS mini 1240, Japan). Антиоксидантната активност и при четирите използвани метода е

изразена като mM Trolox еквиваленти (TE) за g сухо тегло (DW) чрез предварително построена стандартна права с различни концентрации (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5 mM) на стандарта Тролокс (Fluka), разтворен в метанол (Sigma).

5.3. HPLC анализ за определяне на полифенолни съединения.

HPLC анализите са извършени в Лабораторията по приложни биотехнологии, филиал на БАН - Пловдив. Количественото определяне на полифенолни съединения е осъществено чрез използване на HPLC система Waters. За анализа на фенолните киселини е използвано градиентно елуиране с разтвор А (1% оцетна киселина, v/v) (Sigma) и разтвор Б (Метанол) (Merck). Детекцията на фенолните киселини е извършена при две дължини на вълната $\lambda=280$ и 360 nm, температура на колоната 28°C и обем на инжектираната проба $20\ \mu\text{L}$. Стандартните прави показват линейност в интервала от $20\text{--}100\ \mu\text{g/mL}$ с коефициенти на корелация над 0,998. За определяне на флавоноидите е използвано градиентно елуиране с разтвор А (% оцетна киселина, v/v) (Sigma) и разтвор Б (Метанол) (Merck). Детекцията на флавоноидите е извършена при дължина на вълната $\lambda=380$ nm, температура на колоната 28°C и обем на инжектираната проба $20\ \mu\text{L}$. Определено е количеството на флавоноидите, чрез предварително изготвени стандартни прави с различни концентрации на стандартни разтвори. Стандартните прави показват линейност между $20\text{--}100\ \mu\text{g/mL}$ с коефициенти на корелация над 0,998.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

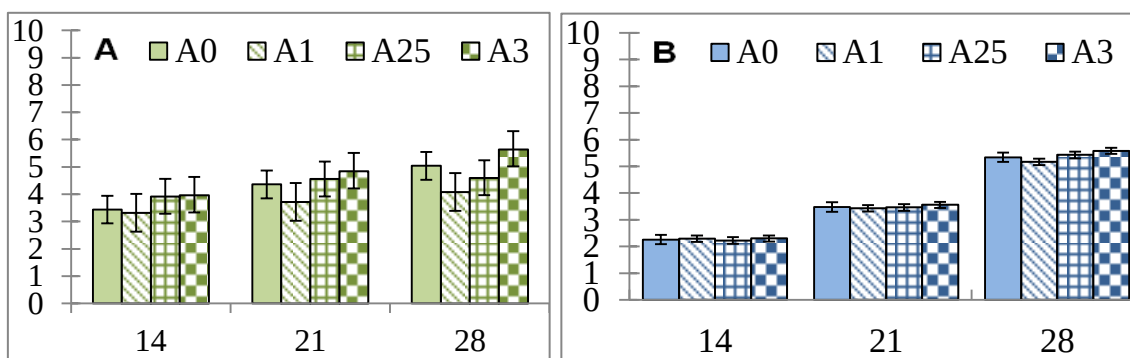
Въвеждане в *in vitro* култура.

Като изходни експланти за въвеждане в *in vitro* култура са използвани микро резници с размер 1.5-2 cm от невдървесинените части на растения, оглеждани в саксии в лабораторията. В резултат на приложената процедура за стерилизация 82% от заложените изходни експланти показаха добро развитие и растеж без наличие на контаминанти. Получените растения *in vitro* бяха пасирани още веднъж на безхормонална среда (A0) и използвани в следващите експерименти за създаване на оптимизирана система за микроразмножаване.

1. Оптимизиране на хранителната среда за мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

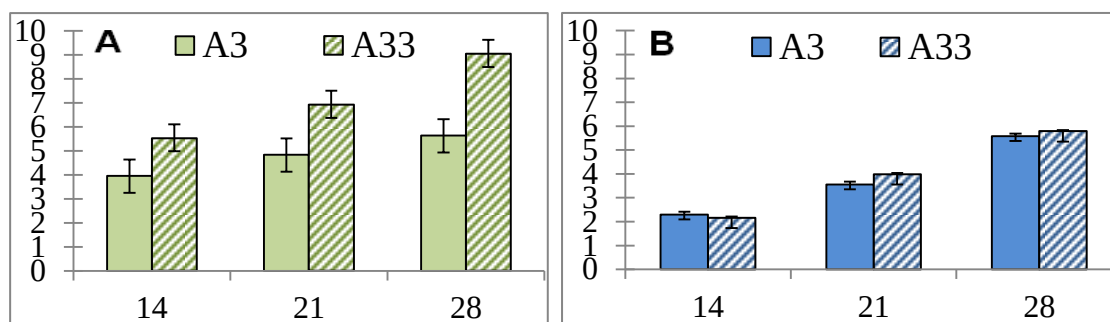
Резултатите, отчетени на ден 28 показват, че стойността на пролиферацията във вариант A0 е 5.04 ± 0.68 в сравнение с вариант A3 - 5.64 ± 0.70 . Експлантите, култивирани върху среди A1 и A25, обогатени с растежни регулатори (BAP, IBA), показват по-ниска пролиферация от тези, отгледани върху среда без растежен регулатор (A0). Сравнявайки ефективността на изследваните среди за мултипликация, A3 демонстрира най-висока пролиферационна способност, но концентрацията на прилаганите растежни регулатори (0.5 mg/l BAP и 0.01 mg/l IBA) води до поява на летораста със симптоми на хиперхидратация (витрификация).

Анализът на данните за показателя средна височина на растението показва, че на ден 14 растенията са нараснали до 2,2 cm, достигайки над 5 cm на ден 28 (Фигура 1B). При всички варианти са установени сходни стойности за средната височина на растението.



Фигура 1. Ефект на растежните регулатори при *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., в етап на мултипликация, среден брой летораста от екплант (A) и средна височина на растение (B) на ден 14, 21 и 28, ($\pm$ SE).

По-нататъшното оптимизиране на хранителната среда за пролиферация беше насочено към преодоляване на физиологичното явление витрификация чрез използване на среда A33. Тя има същия състав като A3 (Таблица 1), но с добавка на 0.3% активен въглен (AC). Установено бе, че приложението на активен въглен положително повлиява растежа и развитието на растенията, което води до почти двукратно по-висока пролиферация и липса на симптоми на хиперхидратация. Култивирането на експлантите върху среда A33 се характеризира с образуване на 9.04 ± 0.54 летораста на екплант в сравнение с A3 (5.64 ± 0.70) на ден 28 (Фигура 2A). Резултатите за средна височина на растението показат сходни стойности за двата варианта отново (фигура 2B).



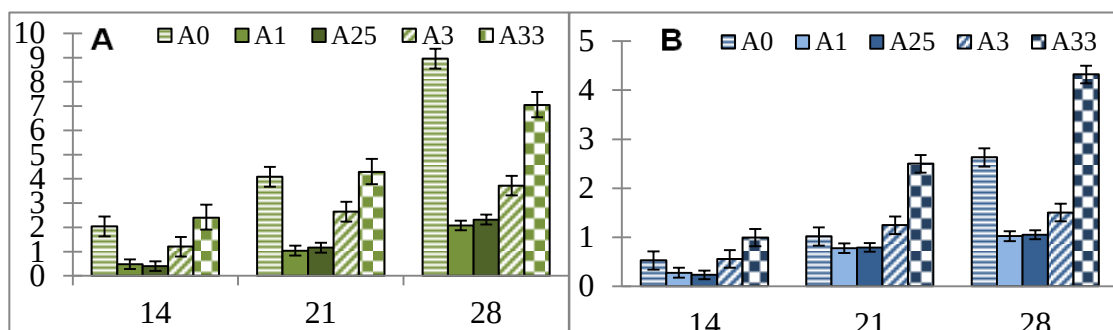
Фигура 2. Ефект на активния въглен (AC) в етап мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., (A) Среден брой леторасти на експлант и (B) средна височина на растение, отчетени на ден 14, 21, и 28, ($\pm$ SE).

Концентрацията на растежните регулатори в хранителната среда е от съществено значение за морфогенезата и развитието на растенията. Растенията от *Fabiana imbricata*, култивирани на A0, се характеризират с компактен добре оформен храст, тъмнозелени листа, къси и компактни корени. На среда A1 индуцираните леторасти са с различна дължина, светлозелени стъбла и образуват по-малко корени. Експлантите, култивирани на среди A25 и A3, демонстрират висока пролиферация, но се получават растения със съкратени междувъзлия и видими симптоми на витрификация. Растежът и развитието на растенията на A33 са повлияни от добавянето на активен въглен и се характеризират с образуването на симетрично оформени храсти и удължени корени в сравнение с тези в контролния вариант A0 (3).



Фигура 3. Развитие на растенията върху културална среда A0 и A33.

По време на етапа мултипликация, всички експланти (100%), култивирани на различни пролиферационни среди, формират корени без да е необходим допълнителен етап за вкореняване. Резултатите, отчетени на ден 14, 21 и 28, показват, че среди A0 и A33 предизвикват образуването на по-висок среден брой корени и средна дължина на корена (Фигура 4). В края на културата най-високи стойности за среден брой корени (8.96 и 7.04) са установени съответно за варианти A0 и A33 (Фигура 4А). Данните, получени за индикатора средна дължина на корена (Фигура 4Б), показват, че култивирането на среда A0 води до образуване на къси и дебели корени в сравнение с вариант A33, където се развиват сравнително по-тънки, дълги и нежни корени (Фигура 3).



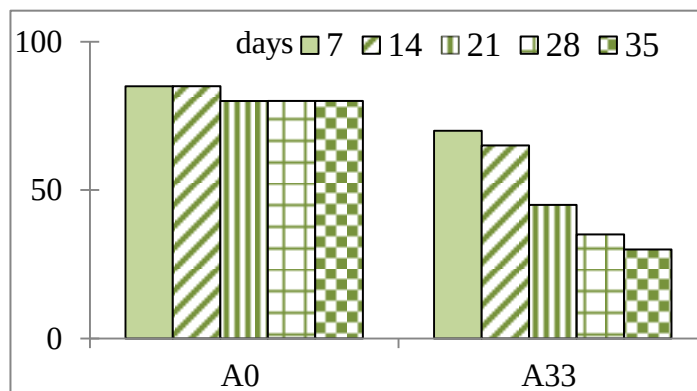
Фигура 4. Вкореняване, среден брой корени (А), и средна дължина на корен (В) от растения, култивирани върху различни хранителни среди за размножаване на ден 14, 21 и 28, ($\pm$ SE).

Три инициращи среди, тествани от *Schmeda-Hirschmann et al.*, (2004) в експеримент с *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., също водят до ризогенеза. Образуването на корени от единични издънки се наблюдава предимно след един месец в присъствието на IAA, IBA или NAA, използвани самостоятелно или в комбинации при концентрация от 0,25 до 1,0 mg l⁻¹. При тези условия, вкореняване е установено при 41,2 до 64,7% от експлантите, с най-висок среден брой от 5,6 корени на експлант (*Schmeda-Hirschmann et al.*, 2004).

1.1. Адаптация на получените регенеранти.

Резултатите, представени на Фигура 5, показват влиянието на култивационната среда върху адаптацията на растенията *ex vitro*, отчетено като процент на преживяемост. Следвайки процедурата по аклиматизация, растенията, отглеждани върху среда A0, показват 80% преживяемост. За сравнение, процентът жизнени растения, произхождащи от вариант A33, намалява от 70% на ден 7 до 30% на ден 35

(Фигури 5 и 6). Тези резултати дават основание да предположим, че трансферът на растенията на среда без растежни регулатори в последната субкултура преди адаптацията води до закаляване на растенията и може да бъде полезна предпоставка за повишаване на преживяемостта.



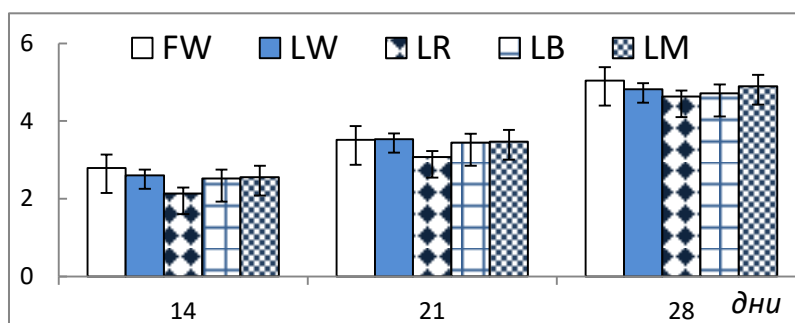
Фигура 5. Влияние на средата за вкореняване върху адаптацията и преживяемостта на растенията.



Фигура 6. Преживяемост на растенията след 35 дни адаптация.

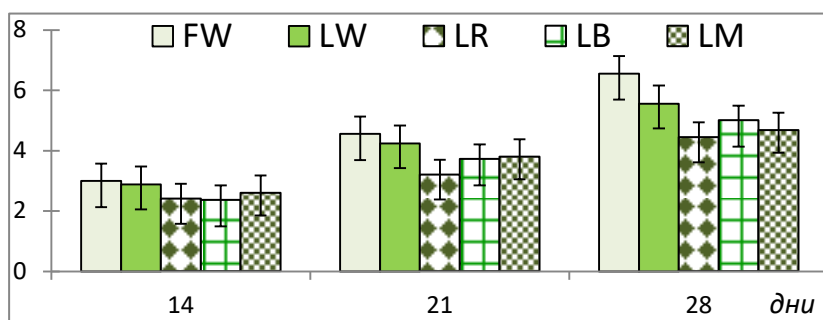
2. Влияние на светлинния източник върху растежа и развитието на растенията в етап на мултипликация.

Резултатите показват, че LED източниците с различен спектър оказват специфично влияние върху растежа и развитието на *in vitro* култивираните растения *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. По показателя средна височина на растенията (Фигура 7) не се установяват големи различия в стойностите на вариантите култивирани в условия на LED светлини спрямо контролата, отчетени на 28 ден от залагане на експеримента.



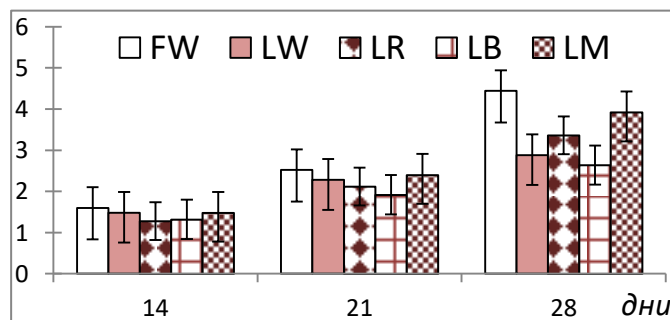
Фигура 7. Средна височина на растение (cm), отчетена на 14, 21 и 28 ден ($\pm$ SE).

Висока стойност за среден брой разклонения е установена в контролния вариант FW с 6.56 ± 0.86 , следван от вариант LW 5.56 ± 0.82 (Фигура 8). Вариант LR е с най-ниска (4.44 ± 0.82) стойност, в сравнение с останалите варианти, отчетени на 28 ден.



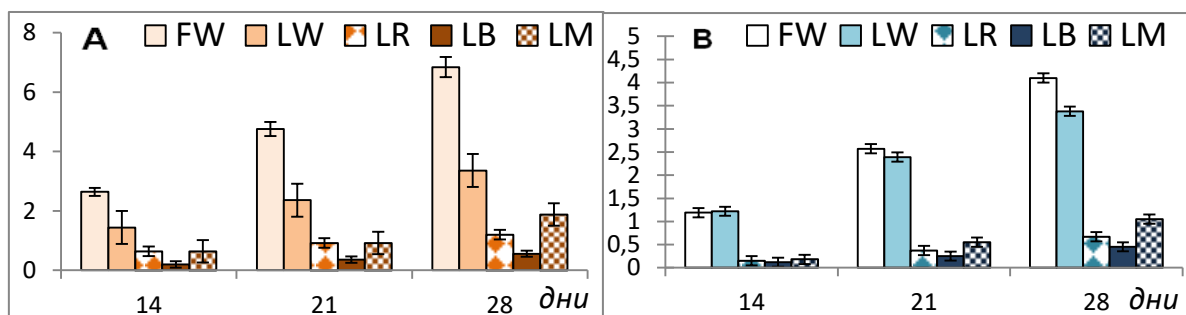
Фигура 8. Среден брой разклонения на растение, отчетени на 14, 21 и 28 ден ($\pm$ SE).

При отчетения коефициент на мултипликация се наблюдава същата тенденция - висока стойност при FL (4.44 ± 0.76), в сравнение с останалите варианти при LED светлини: LM(3.92 ± 0.70), LR (3.36 ± 0.86), LW (2.88 ± 0.72), LB (2.64 ± 0.86), отчетени на 28 ден, (Фигура 9).



Фигура 9. Коефициент на мултипликация, отчетени на 14, 21 и 28 ден ($\pm$ SE).

По отношение на вкореняването е установена висока стойност за показателя среден брой корени (Фигура 10А) при контролата FW (6.84 ± 0.80). Почти на половина по-малко корени са отчетени във вариант LW (3.36 ± 0.64) останалите варианти LR, LB и LM са със значително ниски стойности. При показателя средна дължина на корените (Фигура 10Б) се наблюдава същата тенденция – стойностите при вариантите с LED светлини са по-ниски. Влиянието качеството на светлината върху вкореняването варира при растителните видовете. Авторы съобщават, че най-ниската стойност за средна дължина на корен е получена от третиране с червена светлина, като към хранителната среда е добавен растежният регулатор IAA. *Nacheva et al. (2020)* докладват за потенциала на светодиодите като ефективна осветителна система за бързо *in vitro* микроразмножаване на малини (*Rubus idaeus* L.). Комбинацията от синя, червена, бледо червена и бяла светлина (1: 1: 1: 1) стимулира растежа и натрупването на биомаса и интензивността фотосинтезата. Също така се съобщава в проучвания на *Wang et al. (2011)* и *Poudel et al. (2008)*, че светлинните спектри не са ефективни за повлияване дължината на корена.



Фигура 10. Среден брой корени (А) и средна дължина на корен, cm (В), отчетени на 14, 21 и 28 ден ($\pm$ SE).

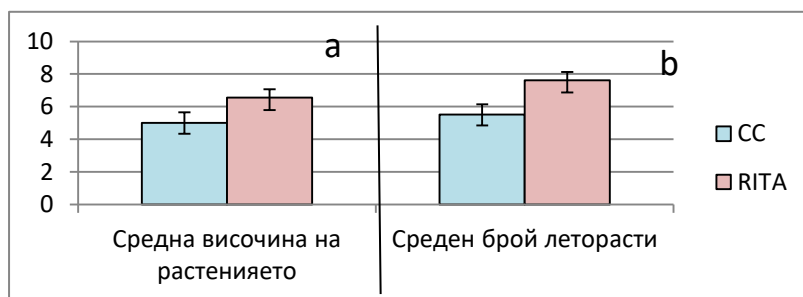
Флуоресцентните лампи, основният светлинен източник, който обикновено се използва за култура *in vitro*, имат фиксирани емисионни спектри, съставени от много ленти в диапазона на дължината на вълната от 320 до 800 nm, без възможност за различни параметри на осветяване, като спектрални и времеви характеристики (*Kurilcik et al., 2008*). Светлинните диодни (LED) осветителни системи имат няколко уникални предимства, включително способността да се контролира спектралния състав, дълготрайност, дълъг експлоатационен живот, специфичност на дължината на вълната, относително хладни излъчващи повърхности, и фотонен изход, който е линеен с

електрически входен ток (Li et al., 2010). Dimitrova и съавтори (2021) докладват за крушови фиданки в *in vitro* условия, отгледани под бяла LED светлина с високи резултати на стойности на свежа (FW) и суха (DW) биомаса, независимо от приложените цитокинини. Както и че за по-доброто развитие на растенията, отглеждани под смесена LED светлина по отношение размера на листата и фотосинтетичните показатели показаха е необходимо да се оптимизират *in vitro* условия за отглеждане на крушовата подложка OHF 333 чрез подходящо комбиниране на светлината режим и цитокинин в хранителната среда.

Изведеният експеримент обаче доказва, че при микроразмножаването на растителния вид *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav, бялата флуоресцентна светлина е подходяща от LED осветителните системи, независимо от техните предимства.

3. Проучване ефективността на биореакторна система с временно потапяне (TIS), тип RITA® в етап на мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

С провеждането на този експеримент се цели установяване ефективността и възможността за оптимизиране на стандартния протокол за размножаване на *in vitro* култури на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., използвайки система с временно разбъркване, тип RITA® в сравнение с конвенционалното размножаване *in vitro*. Ефективността на двете системи за мултипликация се оценяват въз основа на отчетените данни за показателите средна височина на растение, среден брой леторасти, коефициент мултипликация, среден брой корени и средна дължина на корен на 28 ден от залагането.



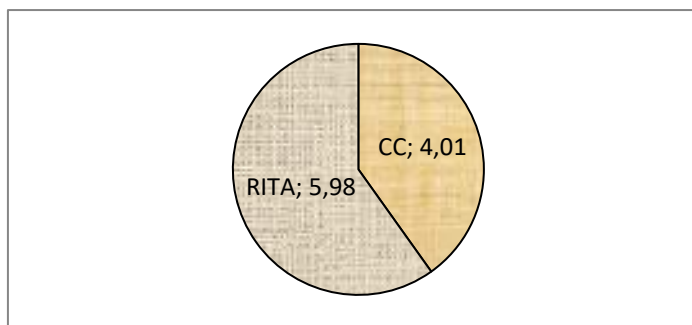
Фигура 11. Ефект от култивирането на две *in vitro* системи в етап на мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., със средна височина на растение (a, cm), среден брой леторасти (b), отчетени на 28 ден ($\pm$ SE).

Резултатите по показателя средна височина на растение показват по-висока стойност при екплантите, култивирани в TIS биореакторната култура (RITA) - 6.55 ± 0.66 в сравнение с конвенционална *in vitro* култура (CC) - 5.00 ± 0.60 , отчетени на 28 ден от залагане (Фигура 11a). За показателя среден брой леторасти (Фигура 11b) също е отчетена по-висока стойност (7.62 ± 0.76) за TIS биореакторната култура (RITA) в сравнение с конвенционална *in vitro* култура, където резултатът е по-нисък (5.51 ± 0.81).

Schmeda-Hirschmann et al., (2004) използват биореакторна система с временно потапяне (TIS) за разработването на бърза *in vitro* система за размножаване на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., водеща до образуването на издънки, калуси, корени, клетъчни суспензии и растения. В това изследване те съобщават, че издънките, получени от възловите срезове се умножават чрез разклоняване и достигат средна дължина на летораст до 5 cm.

Отчетените от нас стойности на показателите от изведения експеримент с *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. са в съответствие с установеното от други автори, които докладват, че степента на мултипликация на издънки и дължината на леторастите са с значително по-добри при култури в TIS, отколкото при твърди и течни среди за ананас (*Ananas comosus* L. Merr) (*Escalona et al.*, 1999), както и при вида *Siraitia grosvenorii* (*Yan et al.*, 2010). По-високата стойност на коефициента на мултипликация при ябълковата подложка M26 е установен при култивиране в TIS в сравнение с твърда среда (*Zhu et al.* 2005). *Damiano et al.* (2005) сравняват TIS култура и твърда среда при ябълка (Jork 9), праскова (cv. Yumyeong), череша (cv. Biggareau Burlat) и слива (cv. Adara) и не установяват разлика в мултипликацията между двете системи за размножаване.

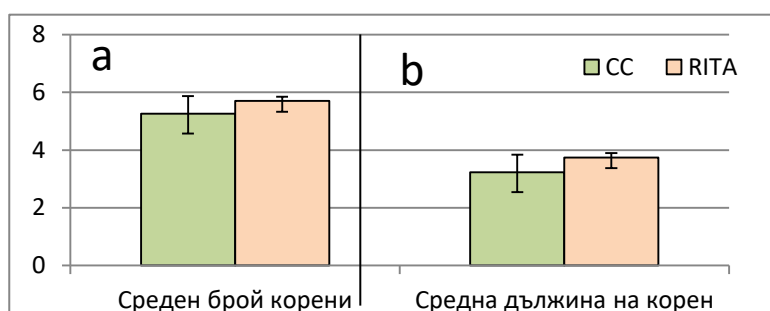
При отчетения коефициент на мултипликация се наблюдава същата тенденция характерна за горните два показатели, а именно по-висока стойност за TIS биореакторната култура 5.98 ± 0.63 в сравнение с конвенционална култура 4.01 ± 0.51 (Фигура 12).



Фигура 12. Коефициент на мултипликация, отчетени на 28 ден ($\pm$ SE).

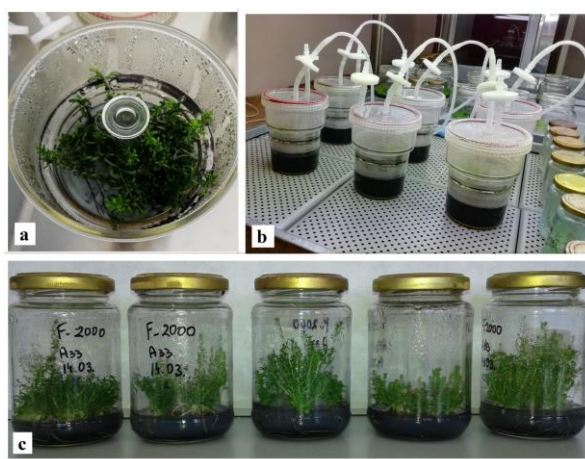
Silva et al. (2007) и *Scheidt et al.* (2009) съобщават, че временното потапяне води до степен на размножаване до три пъти по-висока в сравнение с конвенционалната система за микроразмножаване на ананас. Така също *Piatczak et al.* (2014) отчитат, че при лечебното растение *Rehmannia* във временно потапяща система, се формират 21 издънки на експлант за 60 дни, което е три пъти повече от конвенционалния протокол.

Всички експлант (100%), и при двете изпитвани системи на култивиране, формират корени в етапа на мултипликация. Стойностите, отчетени за показателя среден брой корени (Фигура 13a) са 5.70 ± 0.69 за TIS биореакторната култура и 5.26 ± 0.51 за конвенционалната *in vitro* култура. Подобна тенденция е установена и за показателя средна дължина на корена, съответно 3.74 ± 0.37 за TIS биореакторната култура и 3.23 ± 0.15 за конвенционална култура, (Фигура 13b).



Фигура 13. Среден брой корени (a) и средна дължина на корен (b, cm), отчетени на 28 ден ($\pm$ SE).

Фигура 14. Общ изглед на експеримента: система с временно потапяне, тип RITA® (a, b), в сравнение с конвенционална система (c) в етап на мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. на 28 ден.



Получените резултати могат да се обяснят с това, че културалната среда в стъклени буркани или биореактори без принудителна вентилация се характеризира с висока относителна влажност и натрупване на газове, вредни за растежа поради лош газообмен (Георгиев и др. 2014). Подобреният газообмен при принудителна вентилация намалява натрупването на газове и относителната влажност в контейнерите на култивиране, също така минимизира разликата между газообразната среда *in vitro* и *ex vitro* (Roels et al. 2006).

В сравнение с конвенционалната система за микроразмножаване, системата на временно потапяне (тип RITA®) е по-ефективна поради отчетените по-високи стойности на показателите, характеризиращи растежа. Въпреки високата инвестиция за оборудване на биореакторна система, предимство е, че тя осигурява автоматизиране на процеса, минимално пространство и производство на големи количества биомаса (Фигура 14).

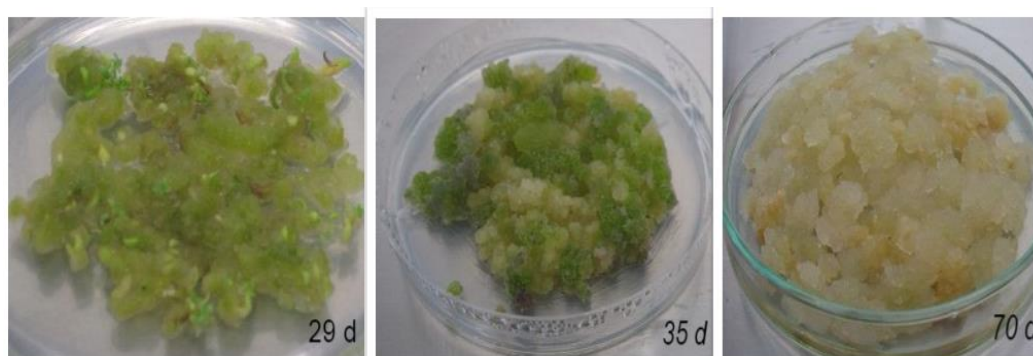
В заключение беше установено, че при разработването на ефективна система за микроразмножаване на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. съществено значение имат следните фактори:

- оптимална концентрация (0.5 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) на растежните регулатори
- добавяне на активен въглен като антиоксидант в хранителната среда
- култивиране на бяла флуоресцентна светлина
- трансфер на безхормонална среда в последния пасаж преди адаптиране на растенията *ex vitro*.
- използване на биореакторна система с временно потапяне.

4. Индуриране на калусна култура на твърда хранителна среда.

Процесът на калусогенез на среда MSD (0,2 mg/l 2,4-D) започва на ден 18 от началото на експеримента. Калусната маса се характеризира с бързо нарастване и към 29 ден от култивирането обхваща почти цялата повърхност на експлантите. Получената калусна маса (Фигура 15) се характеризира с бърз растеж, мека и ронлива консистенция, и относително хомогенна структура. Първичният калус е с бледо зелен цвят, след което в следващите пасажии преминава към млечно-бял.

Калусите получени на среда MSD са използвани в следващите експерименти за изпитване ефекта от светлинния източник, получаване на бързорасяща калусна култура, индуциране на суспензионна култура, събиране на проби и анализиране на метаболитния профил.



Фигура 15. Степени на дедиференциация и растеж на калус на среда MSD.

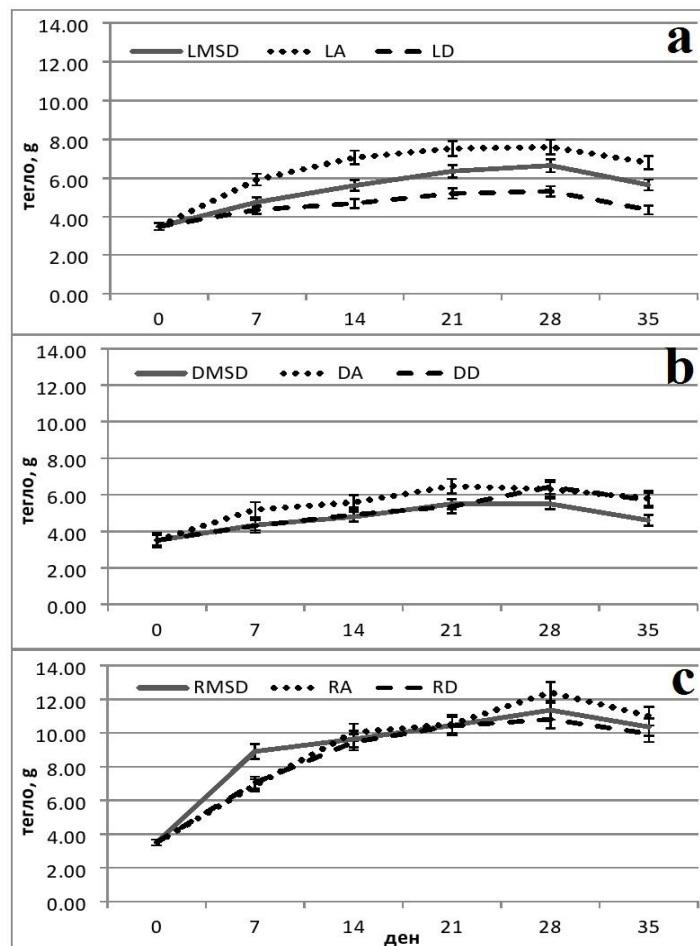
4.1. Ефект от светлинния източник върху растежа и развитието на калусни линии *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

Целта на експеримента бе да се установи влиянието на светлинния източник върху растежа и развитието на получените калусни линии (MSD, D и A) култивирани на варианти хранителна среда. Schmeda-Hirschmann и съавтори (2004) докладват за получена калусна култура върху хранителна среда А и съответно включена в експеримента. За целите на експеримента е отчитена грам свежа биомаса на 0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден от залагането. От всички варианти на база установени различия на културите са събрани по 10 проби за вариант от 3 независими субкултури за анализиране на метаболитния състав.

Характеристика на калусните култури

Всички калусни култури се характеризират с добър темп на растеж и хомогенна структура (Фигура 16). Установено бе, че при култивиране на червена флуоресцентна светлина с фотопериод 16/8 часа калусните култури достигат своя максимален растеж: RMSD (11.35 ± 0.85), RD (10.80 ± 0.53), като с най-високо продуцираща биомаса е култура RA (12.40 ± 0.82) представен в g свежа биомаса на 28 ден. Вариантите в условия на бяла флуоресцентна светлина с фотопериод 16/8, са със средни стойности LMSD (6.65 ± 0.17), LD (5.32 ± 0.30), LA (7.60 ± 0.20), а с най-ниско тегло са калусите култивирани на тъмно: DMSD (5.58 ± 0.7), DD (6.43 ± 0.22) и DA (6.30 ± 0.42). От литературни източници е доказано, че светлинния източник указва влияние за растежа и развитието на растителните култури, съответно регулира и вторичният им метаболизъм. Светлината активно участва в метаболитните процеси на растения, а културата *in vitro* е средство за производство на биологично активни съединения (Sa'ez et al. 2013). Въпреки това растенията имат различни реакции на растеж и производство на желаните метаболити, когато са изложени на различни условия на култивиране в *in vitro* култура. Флуоресцентните лампи са основен източник на светлина, които се използва при *in vitro* култивирането. Те са с фиксирани емисионни спектри и биват съставени от много ленти в диапазон дължина на вълната от 320 до 800 nm, (Kurilc'ik et al. 2008 г.). Alvarenga и съавтори (2015) докладват, че качеството и количеството на светлината регулира вторичния метаболизъм на бял равнец (*Achillea millefolium* L.), броя, съдържанието и профила на летливи съставки.

В резултат на този експеримент беше събран материал за изследване и установяване влиянието на светлинния режим върху синтеза на вторични метаболити. Резултати от направените фитохимични анализи са представени в раздел 4.



Фигура 16. Ефект от светлинния източник върху растежа и развитието на калусни линии *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. култивирани на варианти хранителна среда: а- бяла светлина; в- тъмно; с- червена светлина, $\pm$ SE.

4.2. Получаване на растителни клетъчни суспензионни култури.

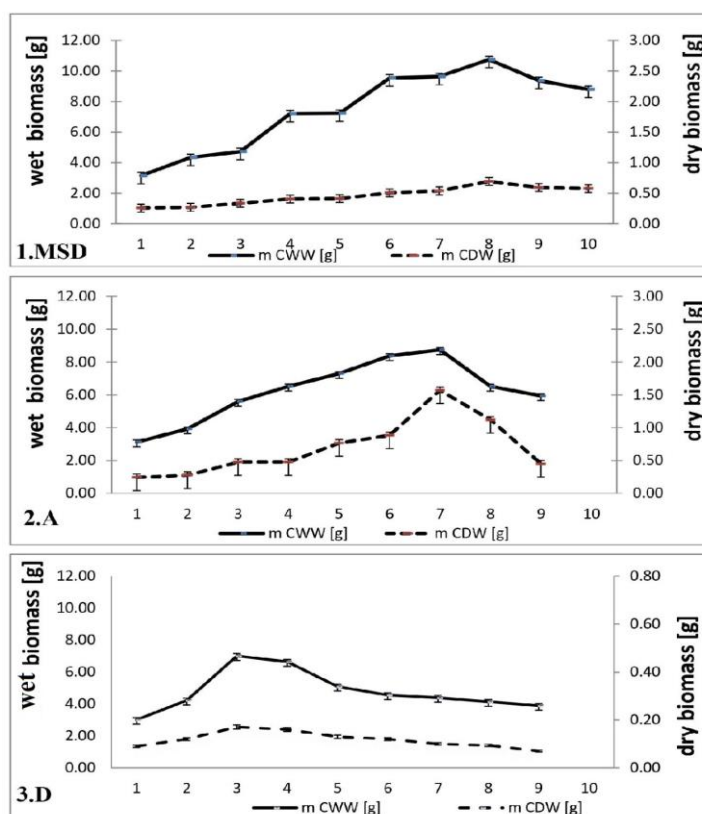
Експериментите от следващата група имат за цел получаване на бързорастяща хомогенна суспензионна култура, посредством която се набавя растителна биомаса за целеви фитохимични анализи на съдържащи се биологично активни съставки от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

Поличената суспензионна култура е субкултивирана в продължение на 9 месеца в процеса на експеримента бяха налични 20 повторения, които показват хомогенност и задоволително бърз темп на растеж.

4.3. Изпитване ефективността и установяване динамиката на растеж на варианти хранителна среда за получаването на високопродуктивна суспензионна култура.

След едномесечно субкултивиране на вариантите беше получено достатъчно количество суспензионна култура, необходима за стартиране на същинския експеримент.

Вариантни MSD и A се характеризират с маскимум нарастване на клетъчната маса около 8 ден от култивирането в сравнение с вариант D, при който увеличената биомаса е на 3-4 ден и следва понижение. Отчита се и малко вариране на масата мокра/суха биомаса в следващите отчитания (Фигура 17). Варианти MSD и A увеличават до 3 пъти клетъчната маса, което ги прави по-ефективни суспензионни култури за целите на експеримента в сравнение с вариант D (4,0 mg/l 2,4- D).



Фигура 17. Динамика на растеж на суспензиона култура (MSD; A; D), $\pm$ SE.

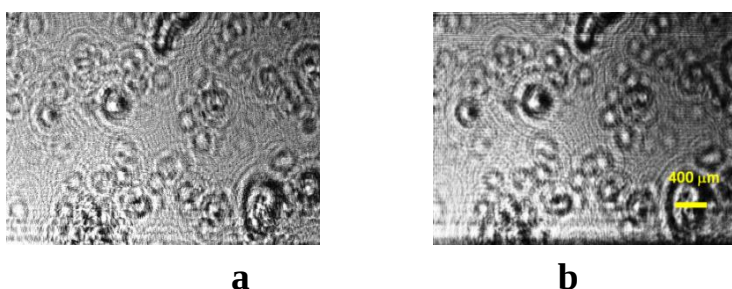
В сходен експеримент обаче, *Schmeda-Hirschmann et al. (2004)* докладват, че само когато концентрацията на 2,4-D е увеличена до 5 mg /l суспензионна култура от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. удвоява биомасата си за една седмица. По отношение цвета на суспензионните култури отделните варианти също се разграничават. Вариант MSD е с млечнобял цвят, а при варианти D и A се наблюдава един тон по-тъмен цвят.

4.4. Дигитална холографска микроскопия за характеризиране на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. на варианти суспензионна култура.

DHM е приложена за визуализиране на клетъчни суспензии (MSD, A и D) на *Fabiana imbricata* Ruiz & Pav. Цифровата реконструкция на записаните холограми се извършва с помощта на софтуера “HoloVision 2.2. По размери растителните клетки варират от 10-100 μm .

Във всички суспензии се наблюдават клетъчни агрегати с размери между 120 и 180 μm . Големите клетъчни агрегати (140-180 μm) са характерни за суспензия А. Клетъчните агрегати в суспензия D имат размери 120-150 μm (Фигура18). Тъй като клетъчните стени на растенията имат естествена склонност да се придържат, получаването на хомогенни клетъчни линии, които се състоят само от единични клетки, е трудно. Известен напредък е постигнат при избора на клетъчни суспензии с повишена клетъчна сегрегация в културите със среда MSD.

Пропорцията и размерът на клетъчните агрегати са зависими от генотипа и се влияят както от регулаторите на растежа, така и от някои съставки на хранителната среда.



Фигура 18. Изображения на клетъчна суспензионна култура D: а) цифрова холограма; б) числово реконструирана интензивност на фронта на вълната на а).

С този експеримент за първи път е приложена дигитална холографска микроскопия (DHМ) за измерване размера на клетъчните кълстери в суспензионните култури. Хистологичните изследвания на суспензионни култури са бавен и сложен процес, а прилагането на DHМ позволява оценката на тяхното развитие в динамика.

Настоящото разследване показва, че DHM може да осигури ефикасен морфологичен анализ на клетките без предварително проучване за клетъчно делене и миграция .

5. Фитохимична характеристика на култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

5.1. Спектрофотометрично определяне съдържанието на общи феноли, общи флавоноиди и антиоксидантна активност.

При проведения литературен преглед на достъпната литература, не се открива информация за проучване съдържанието на общи феноли, общи флавоноиди и антиоксидантна активност на *in vitro* култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. В този смисъл настоящето изследване представя за пръв път анализ на общи фенолни съединения и антиоксидантната активност и има оригинален принос.

Отчетените резултати при екстрактите от варианти калусни култури варират между 4.17 ± 0.11 mgGAE/g DW (DD) и 7.00 ± 0.11 mgGAE/g DW (LMSD) (Таблица 3). Наблюдава се по-високо съдържание на общи феноли в анализирания екстракт от биомаса на растителни клетъчни суспензии. По-високите резултати вероятно се дължат на факта, че при дълбочино култивиране, културите повишават биосинтеза на фенолни съединения.

Получените стойности за общи феноли в анализирания проби от растителни клетъчни суспензии варират от 5.48 ± 0.07 mgGAE/g DW (MSD REP2.9) до 20.72 ± 0.13 mgGAE/g DW (A9) (Таблица 4). При изследваните екстракти от растения *in vitro* и *in vivo* са получени стойности както следва - 11.34 ± 0.11 mgGAE/g DW (биомаса от растение *in vitro*) и 24.46 ± 0.11 mgGAE/g DW (биомаса от растение *in vivo*). Прави впечатление че стойностите на екстрактите от биомасата на анализирания растения са близки или на половина, с отчетените стойности с растителни клетъчни суспензии. Известно е, че антиоксидантната способност на растителните екстракти се дължи основно на присъствието на фенолни киселини и флавоноиди в тях (Jaberian et al., 2013). Антиоксидантната активност на екстрактите, получени от изследваните *in vitro* култури на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. е анализирана по четири широко използвани спектрофотометрични метода. Резултатите са представени като милимолове тролокс еквивалент/грам суха маса (mMTE/g DW). За определяне антиоксидантната активност на изследваните екстракти обикнсе използват няколко метода, резултатите от които дават по-пълна информация за това, как реагират компонентите на екстракта с моделните *in vitro* системи.

В настоящето проучване, антиоксидантната активност на водно-етанолните екстракти, получени от *in vitro* култури на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. е определена, чрез анализиране способността им да улавят свободните DPPH и ABTS радикали или чрез способността им да редуцират метални йони при FRAP и CUPRAC методите и резултатите са представени на таблица 3 и 4.

6.2.2. Определяне на антиоксидантна активност

6.2.2.2. DPPH метод

Активността на изследваните екстракти от калусни култури, измерена по DPPH метода варира между 10.49 ± 0.20 mMTE/g DW за RMSD и 41.08 ± 0.53 mMTE/g DW за DA. Резултатите от екстрактите, получени от растителни клетъчни суспензии, проявяват по-висока антиоксидантна активност в сравнение с калусите, като получените стойности са между 4.49 ± 0.13 mMTE/g DW за MSD REP2.7 и 70.91 ± 0.27 mMTE/g DW за A9 (Таблица 3 и 4).

При екстрактите от растения *in vitro* и *in vivo* стойностите варирират в следните граници: 43.96 ± 0.17 mgGAE/g DW (растение в *in vitro*) и 97.95 ± 0.56 mgGAE/g DW (растение *in vivo*). Тук се наблюдава почти на половина по-висока стойност за показателя отчетен при растение *in vivo* в сравнение с растение в *in vitro*, което може да се обясни с факта, че растенията в природни условия имат стресови фактори и това им позволява да синтезират и натрупват повече метаболити с цел защита в околната среда.

4.1.1.2. ABTS метод

При направения анализ с този метод най-ниските резултати са отчетени при RMSD (34.46 ± 0.53 mMTE/g DW), а най-високи за LMSD (77.63 ± 1.12 mMTE/g DW) на екстрактите от калусна култура. Стойностите получени от суспензионни култури варира в големи граници от 35.28 ± 0.85 mMTE/g DW (MSD REP 2.7) до 167.03 ± 0.54 mMTE/g DW (A9). Трябва да се отбележи, че калусните култури се характеризират с приблизителна антиоксидантна способност, спрямо ABTS радикала с анализа направен на растение в *in vitro* култура - 86.68 ± 0.74 mgGAE/g DW, а резултата получен от растение *in vivo* е 145.38 ± 0.74 mgGAE/g DW.

4.1.1.3. FRAP метод

Най-ниска антиоксидантна активност по FRAP метода е отчетена за екстракта на суспензионна култура MSD REP 2.7 - 114.15 ± 0.84 mgGAE/g DW и най-висока за A9 - 664.03 ± 1.42 mgGAE/g DW (Таблица 4). При калусните култури получените резултати са между 136.71 ± 2.01 mgGAE/g DW за RMSD и 361.59 ± 1.75 mgGAE/g DW за RA. По

посочения метод са отчетени наполовина по-ниски стойности 349.27 ± 2.46 mgGAE/g DW за растение *in vitro* в сравнение с 694.83 ± 5.51 mgGAE/g DW за растение *in vivo* (Таблица 3).

4.1.1.4. CUPRAC метод

Резултатите получени при използване на CUPRAC метода са в границите от 40.53 ± 0.68 mMTE/g DW за екстракта на калусна култура RMSD до 179.97 ± 1.15 mMTE/g DW за калусна култура RA. При растителните клетъчни суспензии, най-висока антиоксидантна активност е отчетена за екстракта вариант A9 (274.59 ± 1.42 mMTE/g DW), а за най-ниска MSD2.9 (59.05 ± 0.82 mMTE/g DW).

Данните получени от екстрактите за проба *in vitro plant* е 252.90 ± 1.88 mMTE/g DW, доближаваща се до стойността на проба *in vivo plant* 335.98 ± 0.79 mMTE/g DW (Таблица 3 и 4).

В достъпната литература не са открити данни на проведен спектрофотометричен анализ за антиоксидантната активност на *in vitro* или *in vivo* култури на изследваното от нас растение *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav.

Безспорно, получените от нас резултати за съдържание на общи феноли в изследваните *in vitro* системи и тяхната антиоксидантна способност, показват голямо разнообразие.

В заключение можем да кажем, че получената калусна култура RA, *in vitro* растения и суспензионна култура A са с по-висока антиоксидантна способност от останалите *in vitro* култури, доближаваща се до тази на взетата проба от растение *in vivo*.

Таблица3. Спектрофотометрично определяне съдържанието на общи феноли, общи флавоноиди и антиоксидантна активност на калусни култури, *In vitro* и *In vivo* растения от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., mg GAE/g DW.

	Общи феноли	Общи флавоноиди	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC
LMSD	7.00 ± 0.11	2.34 ± 0.05	33.61 ± 1.75	77.63 ± 1.12	217.74 ± 1.05	77.75 ± 1.74
DMSD	4.34 ± 0.03	0.62 ± 0.04	15.93 ± 0.96	53.45 ± 0.40	173.14 ± 0.38	84.93 ± 2.06
RMSD	6.59 ± 0.05	0.67 ± 0.02	10.49 ± 0.20	34.46 ± 0.53	136.71 ± 2.01	40.53 ± 0.68
LA	4.45 ± 0.03	1.70 ± 0.01	22.06 ± 0.28	53.34 ± 0.56	190.20 ± 0.63	74.34 ± 0.47
DA	5.16 ± 0.05	1.43 ± 0.05	41.08 ± 0.53	53.85 ± 0.52	232.98 ± 2.02	66.32 ± 0.45
RA	15.08 ± 0.18	1.81 ± 0.03	31.43 ± 0.18	77.85 ± 0.45	361.59 ± 1.75	179.97 ± 1.15
LD	6.95 ± 0.03	1.75 ± 0.02	33.24 ± 0.25	66.04 ± 0.21	278.15 ± 0.54	88.09 ± 0.82
DD	4.17 ± 0.11	1.22 ± 0.02	18.02 ± 0.15	49.30 ± 0.56	184.85 ± 0.66	53.90 ± 0.66
RD	4.91 ± 0.02	1.15 ± 0.02	17.40 ± 0.09	55.38 ± 0.11	165.55 ± 0.92	81.51 ± 0.88
<i>in vitro</i> plant	11.34 ± 0.11	2.42 ± 0.04	43.96 ± 0.17	83.68 ± 0.61	349.27 ± 2.46	252.90 ± 1.88
<i>in vivo</i> plant	24.46 ± 0.52	4.76 ± 0.09	97.95 ± 0.56	145.38 ± 0.74	694.83 ± 5.51	335.98 ± 0.79
Легенда: L-бяла светлина, D-на тъмно, R-червена светлина, MSD, D, A-хранителни среди						

Таблица 4. Спектрофотометрично определяне съдържанието на общи феноли, общи флавоноиди и антиоксидантна активност на клетъчни суспензии от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., mg GAE/g DW.

	Общи феноли	Общи флавоноиди	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC
D2	6.38 ± 0.09	1.01 ± 0.03	9.70 ± 0.33	68.61 ± 0.39	165.42 ± 0.81	77.12 ± 0.81
D3	7.51 ± 0.05	1.06 ± 0.06	14.36 ± 0.19	79.27 ± 0.61	220.45 ± 0.77	89.62 ± 0.77
D4	7.76 ± 0.25	0.88 ± 0.10	11.68 ± 0.49	90.15 ± 0.81	209.03 ± 0.32	102.19 ± 1.39
D5	7.58 ± 0.15	1.03 ± 0.06	12.65 ± 0.24	85.87 ± 0.69	231.28 ± 0.83	106.87 ± 0.83
D6	8.04 ± 0.08	0.87 ± 0.06	11.70 ± 0.26	75.58 ± 0.56	247.02 ± 0.90	92.77 ± 0.90
A5	14.67 ± 0.15	2.29 ± 0.02	67.72 ± 0.13	121.15 ± 0.51	451.72 ± 1.36	148.22 ± 1.57
A6	16.97 ± 0.14	1.44 ± 0.02	49.57 ± 0.71	146.23 ± 0.84	575.14 ± 1.46	178.57 ± 0.84
A7	15.54 ± 0.37	1.27 ± 0.04	49.38 ± 0.48	121.97 ± 0.53	471.05 ± 1.40	175.80 ± 1.21
A8	13.86 ± 0.09	1.62 ± 0.01	39.38 ± 0.66	104.56 ± 0.78	244.99 ± 0.78	146.40 ± 1.34
A9	20.72 ± 0.13	1.47 ± 0.04	70.91 ± 0.27	164.03 ± 0.54	664.03 ± 1.42	274.59 ± 1.42
MSD REP 2.7	5.49 ± 0.05	1.38 ± 0.02	4.49 ± 0.13	35.28 ± 0.85	114.15 ± 0.84	67.28 ± 0.80
MSD REP 2.8	6.31 ± 0.05	1.38 ± 0.04	8.79 ± 0.18	42.11 ± 0.27	137.65 ± 0.40	88.36 ± 0.80
MSD REP 2.9	5.48 ± 0.07	1.98 ± 0.03	16.41 ± 0.46	47.67 ± 0.11	137.86 ± 0.62	59.05 ± 0.82
MSD REP 2.10	5.67 ± 0.08	1.47 ± 0.02	13.27 ± 0.33	45.76 ± 0.30	140.03 ± 0.85	64.66 ± 0.87
Легенда: MSD, D, A-хранителна среда; REP- повторение; 2,3,4,5,6,7,8,9,10-ден взета проба с висока биомаса						

4.2. HPLC анализ за определяне на полифенолни съединения.

Проведен е анализ на биосинтетичния потенциал на растения *in vitro*, *in vivo*, калуси, получени от тях растителни клетъчни суспензии от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. с цел търсене на високо продуктивна с биологично активни съставки продуцираща *in vitro* система. В достъпната литература е открита информация за фенолни съставки на *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., които са анализирани за първи път, чрез HPLC-DAD-ESI-MS, като са идентифицирани 10 съединения, 9 от тях се характеризират на основата на UVспектър и MS фрагментационни модели. Съединенията включват деривати на п-хидроксиацетофенон, скополетин, рутин, хлорогенова киселина и три глюкозида на кверцетина (Cristina et al., 2012). И други автори докладват, че *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., съдържа редица вторични метаболити, мажоритарните от които са рутин, скополетин, кумарин, олеанолова киселина, както и някои сескитерпени (Brown, 1994a; Razmilic et al., 1994) като и D-manno- heptulose, perseitol и D-glycero-D-manno-octulose (Richtmeyer, 1970).

Олеаноловата киселина е основната тритерпенова киселина съдържаща се в надземните части на *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. Проучвания показват, че тритерпеновата олеанолова киселина (ОА) има гастрозащитен ефект при плъхове и мишки с много ниска токсичност (Astudillo et al., 2002).

Хлорогенната киселина е един от основните компоненти на полярните екстракти на *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. Биологичните активности, докладвани за скополетин включват противовъзпалителен ефект (Muschietti et al., 2001), инхибиране на моноаминооксидазата (Yun et al., 2001) и индуцируема азот-оксидна синтетаза (Kang et al., 1999; Kim et al., 1999), хепатопротективен ефект (Kang et al., 1998).

Посредством HPLC анализ е определен полифенолният профил. Полифенолните съединения притежават висока биологична активност и намират широко приложение в фармацевтичната и козметичната промишленост. Освен това, интерес за нас бе да установим влиянието на клетъчната диференциация в условията на култивиране на различните *in vitro* култури, върху биосинтеза на изследваните полифенолни съединения. Интерес представляват калусните култури, характеризиращи се с мека и ронлива консистенция, хомогенна структура и сравнително бързорастящи култури. На тази база са избрани анализирани калусни култури (MSD, D, A) култивирани на светло (фотопериод 16/8), на тъмно и червена светлина. Впечатление

прави голямото разнообразие в количествата на синтезираните фенолни киселини във водно-етанолните екстракти на изследваните *in vitro* култури.

От вариантите култивирани на светло се отличава калусна култура LD с високо съдържание на протокатехинова киселина (342.47 ± 24.17 mg/g DW), ванилова киселина (941.89 ± 51.2 mg/g DW) и кафеена киселина (903.54 ± 42.3 mg/g DW) в сравнение с останалите два варианта LMSD, LA където са в по-ниски количества.

Калусна култура DA синтезира в най-високи количества протокатехинова киселин (1114.43 ± 52.4 mg/g DW) и хлорогенова киселина (772.59 ± 23.7 mg/g DW) и култура DMSD кафеена киселина (1043.72 ± 77.6 mg/g DW).

Прави впечатление, че единствено калус RA синтезира галова киселина (27.08 ± 0.29 mg/g DW) и ферулова киселина (63.25 ± 11.09 mg/g DW), високо количество салицилова киселина (3320.94 ± 102.8 mg/g DW) и розмаринова киселина (26.64 ± 0.34 mg/g DW). В таблица 5 са показани всички останали калусни култури и синтеза на анализираниите фенолни киселини е в малки количества или има следи в сравнение с горе посочените.

Таблица 5. Количество синтезирани фенолни киселини в калусни култури от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., изразено в mg/g DW.

	Галова киселина	Протока- техинова киселина	Хлорогенова киселина	Ванилова киселина	Кафеена киселина	Сирингинова киселина	p-Кумарова киселина	Ферулова киселина	Салицилова киселина	Розмари- нова киселина
LMSD	nf	72.35±3.02	259.4±22.15	nf	636.14±25.17	nf	trace	trace	344.89±36.15	13.9±0.10
LA	nf	trace	219.97±31.2	nf	561.16±28.9	nf	trace	trace	318.79±27.3	11.2±0.12
LD	nf	342.47± 24.17	281±17.2	941.89±51.2	903.54±42.3	nf	trace	trace	305.67±41.2	23.53±0.21
DMSD	nf	375.52±22.3	724.75±34.4	nf	1043.72±77.6	251.67±16.7	trace	trace	264.05±29.4	trace
DA	nf	1114.43± 52.4	772.59±23.7	348.36±27.4	619.57±26.5	nf	trace	trace	347.24±42.5	trace
DD	nf	361.08±23.7	643.72±22.6	275.66±17.6	908.82±18.4	nf	40.51±1.6	trace	283.31±27.8	nf
RMSD	nf	nf	198.33±13.2	nf	506,1±34.7	219.06±18.4	trace	trace	235.93±22.7	19.1±0.29
RA	27.08± 0.29	nf	186.65±16.5	294.09±16.7	585.08±22.6	239.57±21.5	512.4±18.7	63.25±11.09	3320.94± 102.8	26.64± 0.34
RD	nf	nf	nf	nf	702.29±31.4	217.29±18.6	trace	trace	308.64±32.2	nf
Забележка: nf– не е установен; trace– следи, L-бяла светлина, D-на тъмно, R-червена светлина, MSD, D, A-хранителни среди										

В таблица 6 са представени резултатите от анализа на растение *in vitro* което синтезира почти един път повече хлорогенова киселина (2821.57±94.3 mg/g DW) в сравнение с пробата взета от растение *in vivo* (1552.33±66.7 mg/g DW). Хлорогенната киселина (3-О-кофеоилквинова киселина) е съставна част от инфузията на суровия наркотик (*Quispe et al.*, 2012).

Таблица 6. Количество синтезирани фенолни киселини в *in vitro* и *in vivo* растение от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., изразено в mg/g DW.

	Галова киселина	Протока- техинова киселина	Хлоро- генова киселина	Ванилова киселина	Кафеена киселина	Сиринги- нова киселина	p-Кумарова киселина	Ферулова киселина	Салицилова киселина	Розмаринова киселина
in vitro plant	nf	324.15± 21.6	2821.57± 94.3	nf	nf	575.39± 42.16	trace	trace	228.48±32.4	trace
in vivo plant	nf	trace	1552.33± 66.7	388.5± 32.3	661.78± 37.14	6080.16± 106.7	351.74± 37.8	trace	257.2±24.7	153.67±13.4
Забележка: nf– не е установен; trace– следи										

При растителните клетъчни суспензии се отличава клетъчна суспензия А с най- високи концентрации на синтезирани фенолни киселини в сравнение с останалите две клетъчни суспензии в които са с по-ниски концентрации. Клетъчните суспензии се характеризират (D, А и MSD) с високи стойности на фенолните съединения около дните, в които достигат максимално продуцирана биомаса (таблица 7). При всички суспензии е установено следи от p-кумарова киселина.

Таблица 7. Количество синтезирани фенолни киселини в растителни клетъчни суспензии от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., изразено в mg/g DW.

	Галова киселина	Протокате- хинова киселина	Хлорогенова киселина	Ванилова киселина	Кафеена киселина	Сиринги- нова киселина	р- Кумарова киселина	Ферулова киселина	Салици- лова киселина	Розмари- нова киселина
D2	78.43±19.5	nf	212.16±19.2	331.32± 29.7	588.79±22.4	275.58±22.6	trace	trace	222.04± 19.8	14.47±0.0 7
D3	861.06±87.3	116.08±86.1	318.13±33.5	411.92±34.7	641.28±37.6	296.19±37.0	trace	trace	380.95±29.8	35.34±0.10
D4	999.36±91. 5	131.49±62. 6	388.55±29.6	475.04± 45.2	647.82±61.4	329.26±26.8	trace	trace	496.75± 36.5	40.23±0.0 9
D5	1056.17± 98.2	151.6±33.7	381.22±24.3	507.09± 43.1	905.36±74.2	328.1±31.4	trace	trace	510.79± 37.1	38.77±0.1 6
D6	913.66±68. 9	145.67±77. 5	333.67±23.8	472.66± 27.3	690.79±44.2	353.72±26.7	trace	trace	484.56± 25.6	34.98±0.0 5
A5	688.28±82. 3	371.25±55. 1	393.91±31.5	479.69± 39.1	603.46±39.5	328.8±15.6	trace	trace	437.74± 46.9	18.78±0.0 7
A6	806.11±96. 8	499±22.3	509.92±41.6	568.54± 34.5	648.52±36.7	347.68±24.6	trace	8.27±0.13	480.73± 36.7	22.43±0.1 1
A7	1405.84± 101.4	536.1±21.5	462.29±37.1	555.83± 30.9	653.32±57.2	438.41±36.8	trace	15.82± 0.32	604.98± 29.3	22.73±0.1 2
A8	2202.75± 126.4	731.58±56. 4	414.06±22.2	498.69± 29.3	698.39±44.3	491.65±24.5	trace	145.55± 21.5	663.73± 56.7	26.78±0.1 5
A9	891.17±79. 8	544.62±55. 2	364.53±25.5	466.88± 37.2	695.68±36.7	870.56±34.9	trace	140.05± 21.9	814.47± 34.5	43.56±0.1 9
MSD	nf	nf	239.66±19.7	nf	nf	nf	trace	trace	414.93±44.	nf
MSD	27.62±0,17	nf	392.5±37.6	nf	nf	nf	trace	trace	510.95±49.	nf
MSD	nf	nf	243.55±28.7	nf	nf	nf	trace	trace	485.67±46.	nf
MSD	nf	nf	264.99±34.1	nf	nf	nf	trace	trace	474.92±37.	nf

Забележка: nf– не е установен; trace– следи MSD, D, A-хранителна среда; REP- повторение; 2,3,4,5,6,7,8,9,10-ден взета проба с висока биомаса

Способността на калусните култури да синтезират флавоноиди (Таблица 8) е сравнително по-малка от към разнообразие, но количествено в близки граници като синтеза на фенолни киселини. В калусите култивирани на тъмно и на червена светлина се синтезира (-)-Епикатехин като най-високо количество е отчетен при калусна култура на червена светлина RA (1358.67 ± 96.3 mg/g DW). Епикатехинът има редица ползи при човека, а именно стимулира растежа на мускулните влакна, регулира нивата на кръвната захар, понижава нивата на холестерола до естествените за организма и подобрява мозъчното и сърдечно здраве. RD синтезира значително количество кверцетин (3057.8 ± 159.8 mg/g DW), в сравнение с останалите калусни култури.

Флавонолите каемпферол, кверцетин и рутин са идентифицирани от надземните части на растението от *Hörhammer et al.*, (1973). В инфузията на въздушните части *Quispe et al.*, (2012) идентифицира рутин, кверцетин-О-рамноза-дихексозид и кверцетин-дирамханозид хексозид.

Трябва да отбележим, че калусните култури отглеждани на тъмно и червена светлина синтезират (-)-Епикатехин, а тези които са при фотопериод 16/8h светло/тъмно синтезират рутин във високи нива, в сравнение с клетъчните суспензии, които са култивирани на тъмно. Според *Ionkova* и съавтори (2009) високите концентрации на ауксина 2,4-D водят до синтеза на флавоноиди в *in vitro* култури от *Astragalus missouriensis* Nutt., докато увеличаването на цитокините (в случая кинетин), води до повишаване добивите на рутин и хиперозид. Получените от нас резултати, не показват такава зависимост. Най-вероятно светлината влияе по-силно върху биосинтеза на някои биологично активни съставки и степента на диференциация на получените от нас *in vitro* култури.

Таблица 8. Количество синтезирани флавоноиди в калусни култури от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., изразено в mg/g DW.

	(+)-Катехин	(-)-Епикатехин	Хесперидин	Рутин	Кверцетин	Каемферол
L MSD	<i>nf</i>	<i>nf</i>	<i>trace</i>	109.12±15.6	141.52±19.7	<i>trace</i>
L A	<i>nf</i>	<i>nf</i>	<i>trace</i>	514.35±19.7	549.51±26.7	<i>trace</i>
L D	<i>nf</i>	<i>nf</i>	<i>trace</i>	523.53±21.1	198.7±16.5	<i>trace</i>
D MSD	<i>nf</i>	1009.59±69.0	<i>trace</i>	93.78±0.94	397.28±28.9	<i>trace</i>
D A	<i>nf</i>	876.9±29.5	<i>nf</i>	168.19±12.8	<i>trace</i>	<i>trace</i>
D D	465.06±57.5	1161.52±96.3	<i>trace</i>	345.37±31.0	<i>trace</i>	<i>trace</i>
R MSD	<i>nf</i>	874.1±29.4	<i>trace</i>	71.33±0.11	<i>trace</i>	<i>trace</i>
R A	<i>nf</i>	1358.67±89.5	<i>trace</i>	157.63±0.82	71.98±19.1	<i>trace</i>
R D	376.1±29.4	928.73±59.5	<i>nf</i>	191.78±21.5	3057.8±159.8	<i>trace</i>
Забележка: <i>nf</i> – не е установен; <i>trace</i> – следи, L-бяла светлина, D-на тъмно, R-червена светлина, MSD, D, A-хранителни среди						

При суспензионните култури (Таблица 9) се установява предимно присъствие на (+)-Катехин при суспензия D5 (1214.37±105.0), (-)-Епикатехин при A8 (1888.68±124.1), Рутин при MSD пер 2.8 (573.89±42.3) и Кверцетин при D2 (1872.14±137.9) в по-високи количества в сравнение с калусните култури.

Автори докладват, че основните съединения в инфузията са метаболити с няколко доказани биологични ефекти. Хлорогенна киселина (Naveed et al., 2018), рутин (Hosseinzadeh and Nassiri-Asl, 2014), кверцетин (Carvalho et al., 2017), скополетин (Benoit et al., 2012; Ferreira et al., 2017) и олеанолова киселина (Pollier and Goossens, 2012; Yin, 2012) са съединения с нарастващ интерес както за насърчаване на здравето, така и за техните потенциални терапевтични приложения (Schmeda-Hirschmann and Theoduloz, 2019).

**Таблица 9. Количество синтезирани флавоноиди в суспензионни култури
от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., изразено mg/g DW.**

	(+) Катехин	(-) Епикатехин	Хеспери- дин	Рутин	Кверцетин	Каемферол
D2	nf	nf	<i>trace</i>	167.51±27.1	1872.14±137.9	<i>trace</i>
D3	878.46± 19.5	1126.34±6.7	<i>trace</i>	239.56±23.7	<i>trace</i>	<i>trace</i>
D4	1117.57± 91.5	1181.41±84.1	<i>trace</i>	273.89±64.2	<i>trace</i>	<i>trace</i>
D5	1214.37± 105.0	1242.18±57.7	<i>trace</i>	269.16±23.7	<i>trace</i>	<i>trace</i>
D6	1189.73± 99.2	1150.6±46.7	<i>trace</i>	268.63±36.7	<i>trace</i>	<i>trace</i>
A5	968.26± 62.5	1254.26±79.1	<i>trace</i>	208.07±29.7	<i>trace</i>	<i>trace</i>
A6	1071.48± 49.7	1464.47±95.4	<i>trace</i>	224.46±26.7	<i>trace</i>	<i>trace</i>
A7	1103.58± 82.4	1556.42±92.7	<i>trace</i>	245.19±34.1	<i>trace</i>	<i>trace</i>
A8	1165.27± 52.4	1888.68± 124.1	<i>trace</i>	317.99±37.4	<i>trace</i>	<i>trace</i>
A9	1093.8± 63.4	1339.54±87.2	<i>trace</i>	241.09±31.6	<i>trace</i>	<i>trace</i>
MSD rep 2.7	nf	1026.75±72.3	<i>trace</i>	482.24±85.2	364,82	<i>trace</i>
MSD rep 2.8	nf	1032.63±73.4	<i>trace</i>	573.89±42.3	1356,27	<i>trace</i>
MSD rep 2.9	nf	1041.98±67.5	<i>trace</i>	373.96±33.1	<i>trace</i>	673.16±42.2
MSD rep 2.10	nf	nf	<i>trace</i>	337.55±23.0	<i>trace</i>	635.81±36.5

Забележка: nf– не е установен; trace– следи MSD, D, A-хранителна среда; REP-повторение; 2,3,4,5,6,7,8,9,10-ден взета проба с висока биомаса

Таблица 10 показва количествата синтезирани флавоноиди в двата анализирани растителни екстракта (*in vitro* plant и *in vivo* plant). С по-високи количества рутин и кверцетин са синтерзирани в *in vivo* растение. Необработената растителна дрога съдържа между вторичните си метаболити рутин и кумарин, скополетин, както и олеанова киселина и някои сесквитерпени докладват (*Schmeda-Hirschmann and Papastergiou, 1994*).

Съобщено е, че рутинът предотвратява рефлуксия езофагит и стомашната секреция при плъхове чрез инхибиране на секрецията на стомашна киселина, окислителния стрес, производството на възпалителни цитокини и мобилизацията на вътреклетъчния калций в PMNs при плъхове (*Shin et al., 2002*).

Таблица 10. Количество синтезирани флавоноиди в *in vitro* и *in vivo* растение от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., изразено mg/g DW.

	(+) Катехин	(-) Епикатехин	Хесперидин	Рутин	Кверцетин	Каемферол
<i>in vitro</i> plant	<i>nf</i>	996.31±57.3	<i>trace</i>	534.84±75.6	557.88±61.3	<i>trace</i>
<i>in vivo</i> plant	627.16±47.3	<i>nf</i>	2029.76±173.4	31243,35±303.5	984.08±57.6	<i>trace</i>
забележка: <i>nf</i> – не е установен; <i>trace</i> – следи						

Резултатите от HPLC анализа показват разнообразие при отчетените количества от фенолни съединения в калусните, суспензионните и растителни култури от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. Някои съединения на първичния и вторичния метаболизъм са зависими от степента на клетъчна диференциация, което води до използването на тъканни култури, като източник на вторични метаболити (*Rodríguez-Sahagún et al., 2012*).

Може да кажем, че освен степента на диференциация, съставът на хранителната среда и условията на култивиране също предопределят метаболитния профил на

анализитарине *in vitro* системи. Важно е да се отбележи, че доминантни фенолни съединения при;

- калусните култури от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., са протокатехинова, хлорогенова, кафеена и салицилова киселина, (-)епикатехин, кверцетин
- суспензионните култури - най-високи количества са отчетени за галова и кафеена киселина, епикатехин.
- растения *in vitro plant* доминира хлорогеновата киселина, *in vivo plant* доминира сирингинова киселина и рутин.

На база синтезираните количества фенолни съединения в анализираните растителни *in vitro* култури, дават основание да бъдат използвани в качеството си на технологична матрица за добив на ценни фенолни киселини и флавоноиди с възможност за приложение във фармацевтичната и козметична промишленост.

Заклучение:

На база изведените от нас експерименти и установени резултати може да се обобщи, че е създаден растител материал *in vitro* от изходни растения *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., който е подходящ за получаване на култури с различна степен на диференциация и използването им като потенциални биологични матрици на фенолни съставки.

Разработена е система за мултипликация и успешна адаптация, посредством оптимизиране на хранителна среда и условия на култивиране. Установено е, че светлинния източник от бяла флуоресцентна светлина е най-подходящ за мултипликация на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., в сравнение с LED източниците на светлина. Проведеният експеримент с автоматизирана система за временно потапяне (тип RITA®) показва по-голяма ефективност поради отчетените по-високи стойности на показателите, характеризиращи растежа в сравнение с конвенционалната *in vitro* система. Основното предимство на биореакторната система е, че тя осигурява автоматизиране на процеса, минимално пространство и производство на големи количества биомаса, независимо от високата стойност на инвестицията за оборудване.

От индуцираните калусни култури на база бързорастяща, мека, ронлива консистенция и хомогенна структура са избрани 3 калусни линии подходящи за целите на дисертационния труд. Получени са три суспензионни култури (MSD, D и A), най-продуктивна от които е суспензия А.

За първи път е проведен експеримент с дигитална холографска микроскопия (DHM) за измерване размера на клетъчните клъстери в суспензионните култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., който доказва, че може успешно да се използва за: броене на клетки, измерване на размера на клетките и клетъчните клъстери, анализ на жизнеспособността на клетъчни култури и др.

Посредством HPLC анализи е определен полифенолният профил на *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. в растения *in vitro*, *in vivo*, калуси, получени от тях растителни клетъчни суспензии, от които се установява, че са продуценти на следните вещества:

- калусните култури - протокатехинова, хлорогенова, кафеена и салицилова киселина, (-)епикатехин, кверцетин.
- суспензионните култури - най-високи количества са отчетени за галова и кафеена киселина, епикатехин.
- при *in vitro plant* доминира хлорогеновата киселина, докато при *in vivo plant* доминират сиригинова киселина и рутин.

За първи път е проведен спектрофотометричен анализ за антиоксидантната активност на *in vitro* и *in vivo* култури от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. Безспорно, получените резултати за съдържание на общи феноли в изследваните *in vitro* системи и тяхната антиоксидантна способност, показват голямо разнообразие. В зависимост от използвания модифициран метод на Folin-Ciocalteu - най-много общи феноли съдържа калусна култура RA (15.08 ± 0.18), суспензионна култура A6 (16.97 ± 0.14) в сравнение с растителните проби *in vitro plant* (11.34 ± 0.11) и *in vivo plant* (24.46 ± 0.52). За общи флавоноиди калусна култура на бяла светлина LMSD (2.34 ± 0.05) е почти колкото пробата от *in vitro plant* (2.42 ± 0.04) и суспензионна култура A5 (2.29 ± 0.02) които са наполовина от стойността на екстракт от *in vivo plant* (4.76 ± 0.09).

Целеви метаболити са галова, протокатехинова, хлорогенова, ванилова, сиригинова, кафеена, салицилова и розмаринова киселина. *in vitro* културите с различна степен на диференциация, които показват по-висока антиоксидантна способност, доближаваща се до тази на проба от растение *in vivo* са:

- получената калусна култура LD за Ванилова киселина (941.89 ± 51.2), DMSD за кафеена киселина (1043.72 ± 77.6), DA за Протокатехинова киселина (1114.43 ± 52.4), RA за Галова киселина (27.08 ± 0.29), Ферулова киселина

(63.25±11.09), и най-висок синтез на Салицилова киселина (3320.94±102.8), Розмаринова киселина (26.64±0.34), (-)-Епикатехин.

- суспензионна култура А - в най-голямо количество синтезира Галова киселина от всички анализирани култури и наполовина от останалите фенолни киселини и флавоноиди.
- *in vitro* растенията представляват интерес като продуценти на Хлорогенова киселина, Сирингинова киселина, Рутин, Кверцетин.

V. ИЗВОДИ

1. Растителният материал *in vitro*, получен от изходни растения *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., е подходящ за използване като продуцент на биологично активни вещества.
2. Разработена е оптимизирана хранителна среда за микроразмножаване на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., в която балансът на растежни регулатори осигурява висок процент на мултипликация.
3. Добавянето на активен въглен (АС) в хранителната среда оказва стимулиращ ефект върху пролиферацията на леторасты и води до преодоляване на негативни физиологични състояния като хиперхидрация и малформации на леторасты и корени.
4. Използването на хранителна среда без растежни регулатори в последната субкултура е удачен подход за закаляване на регенерантите и осигурява висока преживяемост на растенията при адаптацията *ex vitro*.
5. Светлината е важен фактор за растежа и развитието на растенията *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., като бялата флуоресцентна светлина е най-подходяща за етап мултипликация в сравнение с LED източниците.
6. Индуцирани са калусни култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., които се различават по морфология и растежни характеристики. На база бързорастяща, мека, ронлива консистенция и хомогенна структура са избрани 3 калусни линии, подходящи за целите на дисертационния труд.
7. Селектираните три калусни култури MSD, D и А подходящи за индуциране на растителни клетъчни суспензии.
8. За първи път е изведен експеримент с дигитална холографска микроскопия (DHМ), който е лесно приложим за определяне броя и размера на клетки и

клетъчните клъстери в суспензионните култури *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

9. Суспензионните култури са подходящи за получаване на целеви метаболити поради това, че достигат максимум на нарастване на биомаса за кратък период на култивиране (8-10 дни) в сравнение с калусните култури и *in vitro* растения (28 дни).
10. Посредством HPLC анализи е определен полифенолният профил на растения *in vivo* и *in vitro*, калуси и получени от тях растителни клетъчни суспензии от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav.
11. За първи път е проведен спектрофотометричен анализ на *in vivo* и *in vitro* култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., чрез които е доказана висока антиоксидантна активност на анализираните екстракти. С най-висока антиоксидантна активност е отчетено за калусна култура RA култивирана на червена светлина, *In vitro* растения и суспензионна култура А доближаващи се до растение *In vivo*.
12. Светлинният режим, спектър и фотопериод в комбинация с избрана хранителна среда оказват съществен ефект върху производството на вторични метаболити от недиферинцирани *in vitro* системи и промяната на тези параметри може да се използва за моделиране синтеза на целеви биологично активни вещества:
* калусни култури - D на бяла светлина - Ванилова киселина (941.89 ± 51.2); D на червена светлина - Кверцетин (3057.8 ± 159.8); MSD на тъмно - Кафеена киселина (1043.72 ± 77.6); А на тъмно - Протока-техинова киселина (1114.43 ± 52.4), Хлорогенова киселина (772.59 ± 23.7); А на червена светлина - Салицилова киселина (3320.94 ± 102.8) и Розмаринова киселина (26.64 ± 0.34), (-)-Епикатехин (1358.67 ± 89.5); А на бяла светлина - Рутин (514.35 ± 19.7),
13. Чрез HPLC анализи е доказано разнообразието на синтезираните полифенолни съединения в проучваните *in vitro* системи с различна степен на диференциация:
* *in vitro* plant - Хлорогенова киселина (2821.57 ± 94.3)
* *in vivo* plant - Сирингинова киселина (6080.16 ± 106.7)

*суспензионни култури А8 - Сирингинова киселина (870.56 ± 34.9), Розмаринова киселина (43.56 ± 0.19), (+)-Катехин (1165.27 ± 52.4), (-)-Епикатехин (1888.68 ± 124.1); D2 - Кверцетин (1872.14 ± 137.9); MSD rep 2.10 - Каемферол (673.16 ± 42.2).

14. От направения HPLC анализ се установява синтез на Галова киселина (27.08 ± 0.29) и Ферулова киселина (63.25 ± 11.09) единствено при калус RA (на червена светлина) и суспензионна култура А8 - Галова киселина (2202.75 ± 126.4) на 8 ден от култивирането.
15. В зависимост от степента на диференциация на растителните *in vitro* култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. е определен техният потенциал като технологични матрици за получаване на целеви метаболити.

VI. ЛИТЕРАТУРА

1. Alvarenga I.C. A., Pacheco F. V., Silva S. T., Bertolucci S. K. V., Pinto J.E. B. P., 2015. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2015) 122:299–308 DOI 10.1007/s11240-015-0766-7
2. Astudillo L., Rodríguez J., and Schmeda-Hirschmann G. (2002), Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 583-588.
3. Apak, R., Güçlü, K., Özyürec, M., Karademir, S.E., Erçag, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5–6):292–304.
4. Benzie, I. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1):70–76.
5. Benoit, G., Sanni, G.J., Brimer, L, A., 2012. Review Scopoletin - a coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 47-56.
6. Brown, G.D., 1994a. The sesquiterpenes of *Fabiana imbricata*. *Phytochemistry* 35, 425-433.
7. Carvalho, D., Paulino, M., Polticelli, F., Arredondo, F., Williams, R.J., Abin-Carriquiry, J.A., 2017. Structural evidence of quercetin multi-target bioactivity: a reverse virtual screening strategy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 106, 393-403.

8. Cristina Quispe & Ezequiel Viveros-Valdez & Guillermo Schmeda-Hirschmann (2012),. Phenolic Constituents of the Chilean Herbal Tea *Fabiana imbricata* R. et P. *Plant Foods Hum Nutr* (2012) 67:242–246
9. Denchev Plamen, Margarita Velcheva, Rumiana Dragijska, Alexander Kuklin & Atanas Atanassov, 1990. Somatic Embryogenesis in *Medicago*, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 4:5-6, 66-70, DOI: 10.1080/13102818.1990.10818624
10. Damiano, C., S. R. La Starza, S. Monticelli, A. Gentile, E. Caboni and A. Frattarelli, 2005. Propagation of *Prunus* and *Malus* by temporary immersion. In: A. K. Hvorslev-Eide and W. Preil (Ed.). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation.*, pp. 243-251.
11. Dimitrova N., Nacheva L., Kyoseva Y., Berova M., 2021. Preliminary Study on the Effect of LED Light and Cytokinin on the Growth of Pear Plants In Vitro. *Proceedings of the 5th Balkan Scientific Conference on Biology Plovdiv, Bulgaria* 15-16 April pp. 1-8
12. Escalona et al., 1999
13. Ferreira, I.C.F.R., Natalia Martins, N., Lillian Barros, L., 2017. Phenolic compounds and its bioavailability: in vitro bioactive compounds or health promoters? *Adv. Food Nutr. Res.* 82, 1-44.
14. Georgiev, V., A. Schumann, A. Pavlov and T. Bley, 2014. Temporary immersion systems in plant Biotechnology. *Eng. Life Sci.*, 14: 607–621.
15. Horhammer, L., Wagner, H., Wilkomirsky, M.T., Iyengar, M.A., 1973. Flavonoide in ei- nigen Chilenische Heilpflanzen. *Phytochemistry* 12, 2068-2069.
16. Hosseinzadeh, H., Nassiri-Asl, M., 2014. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J. Endocrinol. Investig.* 37, 783-788.
17. Jaberian, H., Piri, K., Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chemistry*, 136(1):237–244.
18. Kang T. H., Pae H. O., Jeong S. J., Yoo J. C., Choi B. M., Jun C. D., Chung H. T., Miyamoto T., Higuchi R., and Kim Y. C. (1999), Scopoletin: an inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from *Artemisia feddei*. *Planta Med.* 65, 400-403.

19. Kang S. Y., Sung S. H., Park J. H., and Kim Y. C. (1998),. Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum lyratum*. *Arch. Pharm. Res.* 21, 718-722
20. Kim, S. R., Hwang, S. Y., Jang, Y. P., Park, M. J., Markelonis, G. J., Oh, T. H., Kim, Y. C. (1999). Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and antiamnesic activities. *Planta Medica*, 65(3):218–221.
21. Kurilcik A, MR. Canova, S. Dapkuniene, S. Zilinskaite, G. Kurilcik, G .Tamulaitis, P. Duchovskis, A. Žukauskas, 2008. In vitro culture of *Chrysanthemum* plantlets using light emitting diodes. *Cent Eur J Biol* (3):161–167.
22. Kivrak, I., Duru, M. E., Öztürk, M., Mercan, N., Harmandar, M. and Topçu, G. (2009). Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*, 116, 470-479.
23. **Liu et al., 2008**
24. Muschietti L., Gorzalczany S., Ferraro G., Acevedo C., and Martino V. (2001), Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta Med.* 67, 743-744.
25. Nacheva L., Dimitrova N., Koleva-Valkova L., Tarakanov I., Vassilev A., 2020. Effect of led lighting on the growth of raspberry (*rubus idaeus* l.) *Plants in vitro*. 75 years of Agricultural University – Plovdiv JUBILEE SCIENTIFIC INTERNATIONAL CONFERENCE Plovdiv 26-28
26. Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A.A., Khan, G.J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., Fangi, X.F., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., XiaoHui, Z., 2018. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* 97, 67-74.
27. Poudel PR, I. Kataoka, R. Mochioka, 2008. Effect of red and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of rapes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92:147-153.
28. Piątczak, E.; Grzegorzczak-Karolak, I.; Wysokińska, H. Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch.: production of phenolics and flavonoids and evaluation of antioxidant activity. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.36, n.7, p.1693-1702, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1544-6>
29. Pollier, J., Goossens, A., 2012. Oleanolic acid. *Phytochemistry* 77, 10-15.

30. Quispe, C., Viveros Valdez, E., Schmeda-Hirschmann, G., 2012. Phenolic constituents of the Chilean herbal tea *Fabiana imbricata* R. et P. Plant Foods Hum. Nutr. 67, 242-246.
31. Razmilic, I., Schmeda-Hirschmann, G., Dutra-Behrens, M., Reyes, S., Lopez, I., Theoduloz, C., 1994. Rutin and scopoletin content and micropropagation of *Fabiana imbricata*. Planta Med. 60, 140-142.
32. Richtmeyer, N.K., 1970. The isolation of D-manno-heptulose, perseitol, D-glycero-D-manno-octulose, and other compounds from pichi tops (*Fabiana imbricata* Ruiz & Pav.). Carbohydr. Res. 12, 233-239.
33. Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodriguez R, Debergh P. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (Musa AAB) shoot proliferation and quality. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2006;84:155–163. doi: 10.1007/s11240-005-9013-y.
34. Rodríguez-Sahagún, A., Del Toro-Sánchez, C. L., Gutierrez-Lomelí, M., Castellanos-Hernández, O. A. (2012). Plant cell and tissue culture as a source of secondary metabolites. *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*, 3–20.
35. Sa´ez PL, Bravo L, Latsague MI, Toneatti MJ, Sa´nchez-Olate M, Rí´os DG (2013) Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. Plant Sci 201:12–24. doi:10.1016/j.plantsci.2012.11.008
36. Scheidt, G.N.; Arakaki, A.H.; Chimilovski, J.S.; Portella, A.C.F.; Spier, M.R.; Woiciechowski, A.L.; Biasi, L.A.; Soccol, C.R., 2009. Utilization of the bioreactor of immersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.52, p.37-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000700005> [Links]
37. Schmeda-Hirschmann, G., Papastergiou, F., 1994. Sesquiterpenes from *Fabiana imbricata*. Phytochemistry 36, 1439-1442.
38. Schmeda-Hirschmann, G, M. Jordan, A. Gerth, D, Wilken , E. Hormazabal and A.A Tapia, 2004. Secondary metabolite content in *Fabiana imbricata* plants and in vitro cultures, Zeitschrift für Naturforschung C., 59(1-2): 48-54.
39. Schmeda-Hirschmann G. and Theoduloz C.,2019. *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. (Solanaceae), a review of an important Patagonian medicinal plant. Journal of Ethnopharmacology 228 (2019) 49-39

40. Shin Y. K., Sohn U. D., Choi M. S., Kum C., Sim S. S., and Lee M. Y. (2002), Effects of rutin and harmaline on rat reflux oesophagitis. *Auton. Autacoid Pharma* col. 22, 47-55.
41. Silva, A.B.; Pasqual, M.; Teixeira, J.B.; Araujo, A.G., 2007. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.9, p.1257-1260,. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000900006>
42. Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W. G., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. and Felker, P. (2005). Colour, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442-451
43. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:669–675.
44. Wang Z, G. Li, S. He, A. Jaime, T .Silva, M Tanaka, 2011. Effect of cold cathode fluorescent lamps on growth of *Gerbera jamesonii* plantlets in vitro. *Scientia Horticulturae* 130: 482-484.
45. Yan, H., C. Liang and Y. Li, 2010. Improved growth and quality of *Siraitia grosvenorii* plantlets using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 103: 131–135.
46. Yin, M.-C., 2012. Anti-glycative potential of triterpenes: a mini-review. *BioMedicine* 2, 2-9.
47. Yun B. S., Lee I. K., Ryoo I. J., and Yoo I. D. (2001), Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarino-lignans from *Hibiscus syriacus*. *J. Nat. Prod.* **64**, 1238-1240.
48. Zhu, L. H., X. Y. Li and M. Welander, 2005. Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 81: 313–318.

VII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Halkoglu P. S., Yancheva S. D., Pavlov A. I. and Mihaylova E. M., 2019. Digital Holographic Microscopy for Characterization Of *Fabiana Imbricata* Ruiz & Pav. Cell Suspension Cultures. Special Issue of the 8th International Advances in Applied Physics and Materials Science Congress (APMAS 2018) ACTA PHYSICA POLONICA A; Vol.135, 1132-1135. <http://przyrbwn.icm.edu.pl/APP/PDF/135/app135z5p76.pdf>
2. Halkoglu P., Yancheva S. and Pavlov A., 2019. *FABIANA IMBRICATA* RUIZ ET PAV. MICROPROPAGATION. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 25 (5), 1001–1006
3. Halkoglu, P.; Yancheva, S., 2019. Effect of the light source on *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. micropropagation. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, Vol. 22, No.1, pp.337-347.

VIII. УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. 5th INTERM 2018 - International Congress on Microscopy & Spectroscopy, Oludeniz, Турция
2. 22^{ра} научна конференция с международно участие „ЕкоМаунтин 2019“

SUMMARY OF THE PHD THESIS

“*IN VITRO* CULTURES OF *FABIANA IMBRICATA* RUIZ. ET PAV., AS TECHNOLOGICAL MATRICES FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES”

Author: Pervin Shengun Halkoglu-Hristova

Supervisors: Assoc. Prof. PhD. Svetla Yancheva

Corresponding Member Prof. DSc. Atanas Pavlov

The aim of the thesis was to evaluate the potential of *in vitro* cultures of *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. as technological matrices for the production of bioactive substances. As result of the study *in vitro* plant material from *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. was established and used for obtaining cultures with different degree of differentiation. Subsequently they were evaluated as potential biological matrices for phenolic compounds production.

A system for multiplication and successful adaptation has been developed through optimization of the nutrient medium and cultivation conditions. The addition of activated charcoal (AC) to the nutrient medium had a stimulating effect on shoot proliferation and leaded to overcoming negative physiological disorders such as hyperhydration and malformations of shoots and roots. The white fluorescent light was found to be most suitable for the multiplication of *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., compared to LED light sources. The experiment conducted with an automated temporary immersion system (type RITA®) showed better efficiency due to the reported higher values of the indicators characterizing the growth, compared to the conventional *in vitro* system. Induced callus cultures from *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., differ in morphology and growth characteristics. On the basis of fast-growing, soft, crumbly consistency and homogeneous structure, three callus lines suitable for the purposes of the dissertation were selected. The selected callus cultures MSD, D and A were used to induce plant cell suspensions.

For the first time, an experiment with digital holographic microscopy (DHM) was performed. DHM which is easily applicable for determining the number and size of cells and cell clusters in suspension cultures of *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. Studying the suspension cultures growth dynamic it was established that they reached a maximum increase

in biomass for a shorter cultivation period (8-10 days) compared to callus cultures and *in vitro* plants, presenting useful source for the production of target metabolites.

For the first time, spectrophotometric analysis of extracts of *in vivo* and *in vitro* cultures of *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., was performed, which demonstrated high antioxidant activity. The highest antioxidant activity was reported for callus culture RA cultivated in red light, *in vitro* plants and suspension culture A, that was comparable with the *in vivo* plants.

The light regime, spectrum and photoperiod in combination with selected nutrient medium had a significant effect on the production of secondary metabolites from undifferentiated *in vitro* systems and the variation of these parameters can be used for manipulating the synthesis of target biologically active substances: callus culture: D of light - Vanilla acid (941.89 ± 51.2); callus culture D at red light - Quercetin (3057.8 ± 159.8); callus culture MSD in the dark - Caffeic acid (1043.72 ± 77.6); callus culture A at red light - Salicylic acid (3320.94 ± 102.8) and Rosemary acid (26.64 ± 0.34), (-) - Epicatechin (1358.67 ± 89.5); callus culture A to light - Rutin (514.35 ± 19.7) callus culture A in the dark - Protocatechuic acid (1114.43 ± 52.4), chlorogenic acid (772.59 ± 23.7).

The diversity of the synthesized polyphenolic compounds in the studied *in vitro* systems with different degree of differentiation was proved by HPLC analyzes: *in vitro* plant - Chlorogenic acid (2821.57 ± 94.3); *in vivo* plant - Syringic acid (6080.16 ± 106.7); suspension cultures A8 - Syringic acid (870.56 ± 34.9), Rosemary acid (43.56 ± 0.19), (+) - Catechin (1165.27 ± 52.4), (-) - Epicatechin (1888.68 ± 124.1); suspension cultures D2 - Quercetin (1872.14 ± 137.9); suspension cultures MSD rep 2.10 - Kaempferol (673.16 ± 42.2). The *in vitro* cultures of *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. with different degree of differentiation has been determined as a prospective technological matrices for obtaining target metabolites.