БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ

„СТЕФАН АНГЕЛОВ“

Автореферат

На дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен **"Доктор"**

Област на висше образование: **5.11 Биотехнологии**

Научна специалност: **Технология на биологично – активните вещества, ИМикБ - БАН**

инж. ГЕРГАНА СПАСОВА КРЪСТЕВА

тема

Растителни биоинженерни системи от *Gardenia jasminoides* Ellis за получаване на активни ингредиенти

Научен ръководител: Доц. д-р Васил Георгиев Георгиев

Научно жури:

. проф. д-р Людмила Владимирова Кабаиванова

доц. д-р Галина Динкова Стоянчева

проф. дн. Калоян Кирилов Петров

доц. д-р Даша Спасова Михайлова

доц. д-р Радка Запрянова Врончева

Пловдив, 2025

Дисертационния труд е написан в 176 страници. Онагледен е с 35 фигури и 33 таблици. Цитирани са 257 литературни източника. Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита от национален научен семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии“ при Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, чието заседание се състоя на ..... година.

Автореферата е написан в 80 страници и е онагледен с 29 фигури и 26 таблици. Номерацията на фигурите и таблиците не съответства на тази в дисертационния труд.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № I-122/28.09.23 година, на директора на ИМикБ-БАН, проф. д-р. Пенка Петрова, дн.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на . ..... 2025 год., от ..... часа в залата на Институт по Микробиология„Стефан Ангелов”, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов”, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София, както и са публикувани съгласно ЗРАСРБ на адрес www.microbio.bas.bg.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На български

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

НОК- 1-нафтилоцетна киселина

БАП - 6-бензиламинопурин

ВЕТХ – Високо ефективна течна хроматография

ГАЕ – галова киселина еквивалент

СБ – суха биомаса

АСБ – акумулирана суха биомаса

ИРСБ – индекс на растеж на суха биомаса

На английски

B5 - 3-[(2,4-дихидрокси-3,3-диметилбутаноил)амино]пропанова киселина

Na - брой алели

Ne - ефективни брой алели

He - очаквана хетерозиготност

PIC - съдържание на полиморфна информация

Ho - наблюдавана хетерозиготност

DPPH -2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl- 2,2-дифенил-пикрилхидразил

CUPRAC - Cupric reducing antioxidant capacity - Мед редуцираща антиоксидантна активност

FRAP - Ferric ion reducing antioxidant power -Желязо редуцираща антиоксидантна активност

TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity - Тролокс еквивалент антиоксидантна активност

SSRs - Simple sequence repeats - Маркери анализиращи прости повторения на последователността на ДНК

WP – Woody plant medium

MS - Murashige and Skoog medium

Съдържание

ВЪВЕДЕНИЕ

Растителните клетъчни култури се приемат като най-обещаващата технология за устойчиво производство на растителна биомаса. Извличането на ценни метаболити при най-ниско екологично въздействие е приоритет на съвременната наука. В последните години много растителни видове биват култивирани *инвитро* с търговски цели. Най-често за нуждите на фармацията, но все повече приложение намират в хранителната и козметичната промишлености.

Gardenia jasminoides Ellis е растителен вид с голяма икономическа стойност - не само в медицината и хранителната промишленост, но и като декоративно растение. Именно затова има редица изследвания изучаващи възможностите за микро- размножаване на растителния вид. Растението е богато на иридоидни гликозиди, флавоноиди, шафранови гликозиди, фенолни киселини. Важно е да се отбележи че липсват данни в литературата за подробно изучаване на химичния състав на различните части на растението.

Когато култивираме растителни *инвитро* култури с цел извличане на ценни ингредиенти е важно да сме запознати с генетичната им стабилност. Възникването на сомоклонална вариабилност по време на *инвитро* култивиране на растението, предизвиква голям интерес през последните години. Смята се, че това има пряко влияние върху продуцирането на вторични метеболити. Няма подробни проучвания за влиянието на състава на хранителната среда, продължителността на култивиране, светлината и използваните растежни регулатори, и тяхното влияние върху генетичната стабилност на *инвитро* културите. До момента в световната база данни няма публикувана информация за причините, които индуцират сомаклонална вариабилност и факторите, които влияят върху нея, в диференцирани и дедиференцирани *инвитро* култури от жасминова гардения.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Настоящата дисертация има за цел да се проучат ефектите от продължителността на култивиране и съдържанието на основни хранителни компоненти. върху биосинтеза на фенолни съединения и сомоклоналната вариабилност на диференцирани и дедиференцирани *инвитро* системи от растението жазминова гардения (*Gardenia jasminoides* Ellis).

ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Получаване на диференцирани и дедиференцирани *инвитро* култури

2. Сравняване на фитохимичния профил на растението жасминова гардения с поручените от нея *инвитро* системи

3. Проследяване динамиката на развитие на клетъчна суспензионна култура и проръстачна култура от жасминова гардения

4. Оптимизиране на условията на растеж и развитие на клетъчна суспензионна култура и прорастъчна култура от жасминова гардения

5. Проследяване на генетичната стабилност на *инвитро* системите. получени от жасминова гардения. Анализиране на причините за настъпилите промени при продължително култивиране и при промяна в концентрацията на основни компоненти на хранителната среда.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Растителен материал

За целите на настоящата работа е използвано развито растение *Gardenia jasminoides* Ellis със сертифициран произход, закупено от Hot Plant Company, Jackdaws Field Nursery, West Sussex, UK (https://www.hotplantco.co.uk).

1.1 Получаване на прорастъчна култура

За получаване на *инвитро* системите, като експланти са използвани нодални сегменти, съдържащи един листен възел с две листа. Експлантите са стерилизирани чрез повърхностна обработка със 70% етанол за 30 секунди, последвано от същинска стерилизация в 4% калциев хипохлорид за 30 минути. Стерилните експланти се измиват трикратно със стерилна дестилирана вода, подсушават се на стерилна филтърна хартия и се посяват върху стерилна среда за иницииране на инвитро растения. Средата представлява агаризирана (с 5% агар-агар) MS хранителна среда с добавени 30 g/L захароза и 4.0 mg/L 6-бензиламинопурин (БАП) Култивира се при 26°C и фоторежим светло 16 часа и тъмно 8 часа до формирането на здрави *инвитро* растения.

1.2 Получаване на калусна култура

За получаване на калусна култура, като експланти са използвани развити листа. Експлантите са стерилизирани чрез повърхностна обработка със 70% етанол за 10 секунди, последвано от същинска стерилизация в 4% калциев хипохлорид за 15 минути. Стерилните експланти се измиват трикратно със стерилна дестилирана вода, подсушават се на стерилна филтърна хартия, нарязват се на сегменти от по 1 cm и се посяват върху стерилна среда за иницииране на калус. Средата представлява агаризирана (с 5% агар-агар) 1/2MS хранителна среда с добавени 30 g/L захароза, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина (НОК) и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин (БАП). Култивира се при 26°C, на тъмно, до формирането на хомогенна калусна маса. Полученията калус се отделя за самостоятелно развитие и се поддържа при същите условия с режим на субкултивиране от 30 дни.

1.3 Получаване на клетъчна суспензия

За получаване на клетъчна суспензия, рохкави участъци от калусната култура се посяват върху стерилна течна среда за иницииране на клетъчна суспензия. Средата представлява течна 1/2MS хранителна среда с добавени 30 g/L захароза, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина (НОК) и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин (БАП). Култивира се в Ерленмаерови колби с обем от 2 литра, върху ротационна клатачка, при 115 оборота за минута, при 26°C, на тъмно, до формирането на хомогенна клетъчна суспензия. Полученииия суспензия се поддържа при същите условия с режим на субкултивиране от 7 дни.

2. Методи за изолиране и анализ

2.1 Анализ на първични и вторични метаболити на *инвитро* култури от гардения

2.1.1 Газова хроматография

Газова хроматография за идентифициране на метаболитния профил на листа от *Gardenia jasminoides* Ellis и *инвитро* култури в различна степен на диференциация

Екстракцията на биомасата за газовия анализ е направена по методика описана от Николова и колектив (Nikolova и др. 2019). Получените екстракции и фракции се силитират съгласно Берков и колектив (Berkov, 2018).

2.1.2 BETX анализ за идентифициране на вторични метаболити

Приблизително 500 мг проба (калусна суспензия, прорастъчна култура или калус) са използвани за трикратна метанолна екстракция (3 x 10ml 70 % метанол) в ултразвукова вана за 30 мин. След филтрация метанола се изпарява (45°C, под вакум) и водната фракция се довежда до обем от 50 мл с дестилирана вода. От така полуения екстракт 20 мл се използват за концентриране на пробата чрез Strata C18-E (55um, 70A, 500mg/l mL) SPE (Phenomenex Inc., USA) следвайки методиката на производителя. Полярната фракция е премахната с 20ml дестилирана вода и фенолната фракция е елуирана с 2ml метанол. Така

получената фракция се използва за BETX анализ и анализ на антиоксидантна активност.

Получените екстракти се анализират чрез високо ефективна течна хроматография както е описано от Младенова и колектив (Mladenova et. al.,2021).

3. Антиоксидантна активност

Антиоксидантната активност на метанолните екстракти се анализира като се използват Тролокс еквивалент антиоксидантна активност (TEAC), 1.1-дифенил-пикрилхидразил (DPPH), Желязо редуираща антиоксидантна активност (FRAP), Мед-редуцираща антиоксидантна активност (CUPRAC), Метод за определяве на общо полифенолно съдържание (Folin-Ciocalteu) (Georgiev, V. и др., 2019) като са направени модификации описани подробно от Кръстева и колектив (Krasteva, G., 2022).

4. Определяне на динамиката на растеж и развитие

4.1 Динамика на растеж и развитие на клетъчни суспензионни култури

За провеждане на експеримента се изпозва свежа посевна от клетъчна суспензионна култура от гардения. Използват се ерленмайерови колби с обем 2 литра съдържащи свежа посевна върху ротационна клатачка , при 115 оборота за минута, при 26°C, на тъмно, в продължение на 21 дни. Използва се хранителна среда MS (Murashiga and skoog) с растежни регулатори 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин, 30g/L захароза. След това се събира свежа биомаса, изсушава се и се екстрахира за определяне на акумулирана суха биомаса, провеждане на BETX анализ, анализ на антиоксидантната активност и определяне на сомаклонална вариабилност.

4.2 Динамика на растеж и развитие на прорастъчни култури

За провеждането на експеримента се използват биореактори с временно разбъркване тип RITA, съдържащи 200ml течна хранителна среда (Murashiga and skoog) с растежни регулатори 2.0mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-

бензиламинопурин, 30g/L захароза. Използва се 10g. свеж инокулат. Експеримента е с продължение 35 дни.

4.3 Определяне на акумулирана суха биомаса (АСБ)

Съдържанието на сухо вещество в биомасата е опеделено по директен метод, като прилизително 1g. (T1) от събраната свежа биомаса се изсушава при 50 ± 2°C, за да се получи постоянно тегло (T2). Пробите се темперират в ексикатор след сушенето и се претеглят. След което резултатите се изчислват по уравнението

Тегло (g) = [(T1 – T2)/T1]

Тегло (%) = [(T1 – T2)/T1] * 100

4.4 Индекс на растеж на суха биомаса (ИРСБ)

ИРСБ = АСБ/суха биомаса

4.5 Усвояването на нитратни, амониеви и фосфатни йони

Нитратните, амониевите и фосфатните йони са определени чрез химични тестови комбинации (MERCK, Германия, кат. № 1.14773.0001, 1.14752.0001, 1.14842.0001). Усвояването е изразено като степен на усвояване, използвайки уравнението: Степен на усвояване = (Крайна концентрация / Начална концентрация) × 100.

5. Оптимизиране на режима на аерация за култивиране на прорастъчни култури от жасминова гардения

За избиране на пододящ режим на аерация на прорастъчна култура е проведен експеримент с 10g свеж инокулат култивиран в биореактор с временно разбъркване, съдържащ 200ml течна хранителна среда MS (Murashiga and skoog) с растежни регулатори 2.0mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин и 30g/L захароза. Експеримента е с продължителност 30 дни. Проследено е акумулирането на свежа биомаса, фитохимичен профил и

антиоксидантна активност при 3 режима на работа – 15мин. аерация/4 часа покой, 15мин. аерация/8 часа покой, 15мин. аерация/12 часа покой.

6. Селектиране на подходяща хранителна среда за култивиране на суспензионна клетъчна култура от жасминова гардения.

За провеждане на експеримента се изпозва свежа посевна от клетъчна суспензионна култура от гардения. Използват се ерленмайерови колби с обем 2 литра съдържащи 30% свежа посевна върху ротационна клатачка , при 115 оборота за минута, при 26°C, на тъмно, в продължение на 21 дни. Използват се три вида хранителна среда MS (Murashiga and skoog), WP (Woody plant) и B5 с растежни регулатори 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин, 30g/L захароза, След това се събира свежа биомаса, изсушава се и се екстрахира за определяне на акумулирана свежа биомаса, провеждане на BETX анализ, анализ на антиоксидантната активност.

7. Двуфакторна оптимизация

7.1 Оптимизация на клетъчни суспензионни култури

За провеждането на експеримента с трикратно повторение е използвана свежа посевна култивиран върху хранителна среда Woody plant с растежни регулатори 2mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин.

Култивира се в ерленмаерови колби с обем от 2 литра съдържащи 30% свежа посевна върху ротационна клатачка, при 115 оборота за минута, при 26°C, на тъмно, в продължение на 12 дни. След това се събира свежа биомаса, изсушава се и се екстрахира за провеждане на BETX анализ, анализ на антиоксидантната активност, и определяне на сомаклонална вариабилност.

7.2 Оптимизация на прорастъчни култури

За провеждането на експеримента се използват биореактори с временно разбъркване, съдържащи 200ml течна хранителна среда (Murashiga and skoog) с различна концентарция на соли и захароза.

Използва се 10g свеж инокулат за стартиране на експеримента. Продължителността на експеримента е 30 дни. След последния ден се събираме свежа биомаса, изсушава се и се използва за нуждите на определяне на фитоимичен профил, антиоксидантна активност и определяне на сомаклонална варибаилност.

8.Анализиране на сомаклонална вариабилност

8.1 Екстракция на ДНК

За екстракцията на ДНК се използва 100 mg свежа биомаса. Използва се кит DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen, cat# 69204) стриктно следвайки посочената методика. Количествено и качествено ДНК се определя като се измерва спектрофотометрично 9Biochrom WPA Biowave DNA, използвайки BioDrop 125 CUVETTE) измервайки съотношението 260/280 и 260/230 и следваща проверка на изолираното ДНК на 1% гел електрофореза. Финалната концентрация на ДНК е 15 ng/μL.

8.2 SSR анализ

За целта на настоящата дисертация след литературна справка за работа са избрани 11 SSR маркера (Xu, Y.-Qидр., 2015 и Denk, S-y, 2015) представени в таблица 1.

Таблица 1. Използвани SSR маркери (Xu, Y.-Q. и др. 2015; Deng, S.-Y.; и др. 2015)

Локус	F Праймер	R Праймер	Генетична банка
eGJ010	F: GAGGTGTTTGCCATCCTGGA	R: TGTTCCTCCATTTGCTGCCA	KM279434
eGJ118	F: CAACACCTTTGCTCGACTGC	R: GTCAGCACTCCACAGCATCT	KM279449

eGJ144	F: TGAGCTGATGCACTCACAGA	R: CCTGGACCTGGAGAAAGACG	KM279455
GJ04	F: GTCCAACTATCCATAAACAT	R: AGAAGAAAGAAGGAAACAGA	JQ750623
GJ08	F: GGAGCTGAGACTAAAGTAAG	R: ATCCAGAATCTAAAGCAGT	JQ750627
GJ09	F: CGGACCCAGTTCGAGAAGC	R: ATCCATCGCCTGAGCAACC	JQ750628
GJ10	F: TCACCTTTATCACTACCAT	R: GTTGACAAGTGTTGAGAATA	JQ750629
GJ16	F: ATGGAATATCATTTGAGCT	R: GTAGACGATGTCAGAAACC	JQ750635
GJ17	F: GAGATTGGAAATATGAACAC	R: CAACTCTAGGAACAAGGTA	JQ750636
GJ02	F: GGCTCTACAATCTGATTATCTT	R: ACCTCTAGCAATTCTCCAT	JQ750621
GJ03	F: CCTTTCTACCTCCTCCATA	R: ATCTGACAAGTTCCACCAA	JQ750622

9.Статистически анализ

За всички експерименти се използват три независими биологични проби (n=3). Всички спектрофотометрични експерименти се правят с 8 технически повторения. Резултатите са представени като средна стойност (n=3) и средно отклонение (±ДС). Корелационния анализ е направен като е използван корелационен метод (pearson correlation method). Данните са нормализирани като се използва фактор = 1 и log 10 трансформация. Статистическите тестове са представени като са използвани Metaboanalyst 5.0 и MiniTab 17 Statistical Software (Minitab INC, State College, PA, USA). Броя на алелите за локус (Na), ефективния брой на алелите (Ne), хетерозиготност (Ho), очакваната хетерозиготност (He), и информацията за полиморфното съдържание (PIC) са изчислени с помоща на Cervus 3.0.7 software package.

III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Получаване на *инвитро* системи

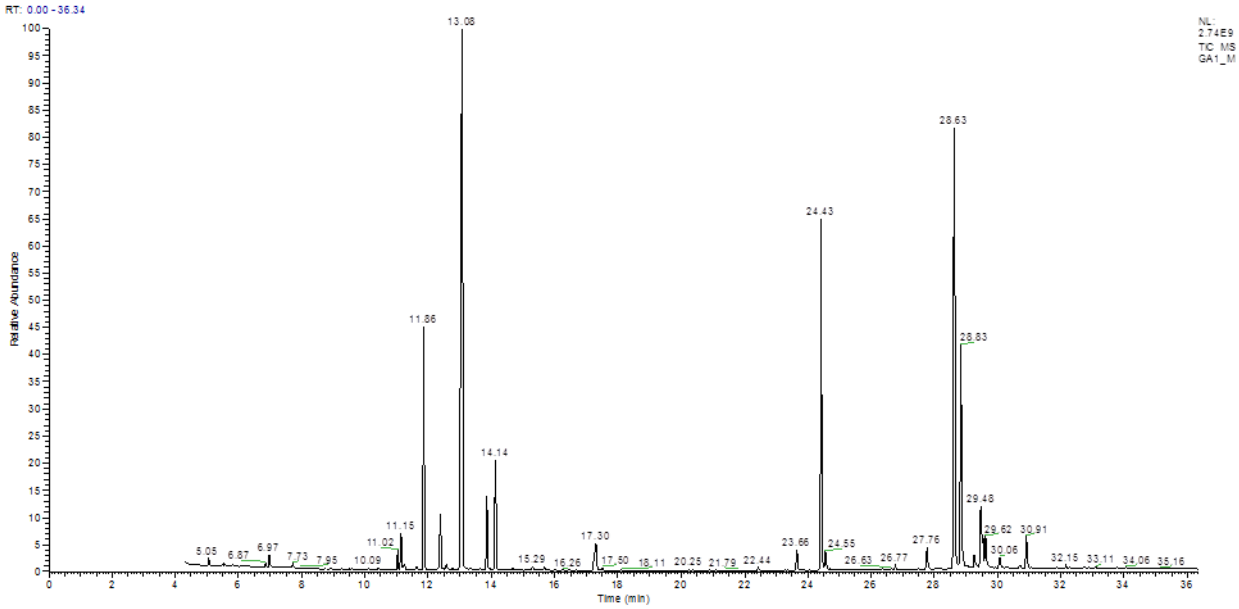
За получаването на *инвитро* системи са използвани стерилизирани експланти от изходно растение *Gardenia jasminoides* Ellis, подготвени както е описано в материали и методи.

Фигура 1. Изходно растение *Gardenia jasminoides* Ellis

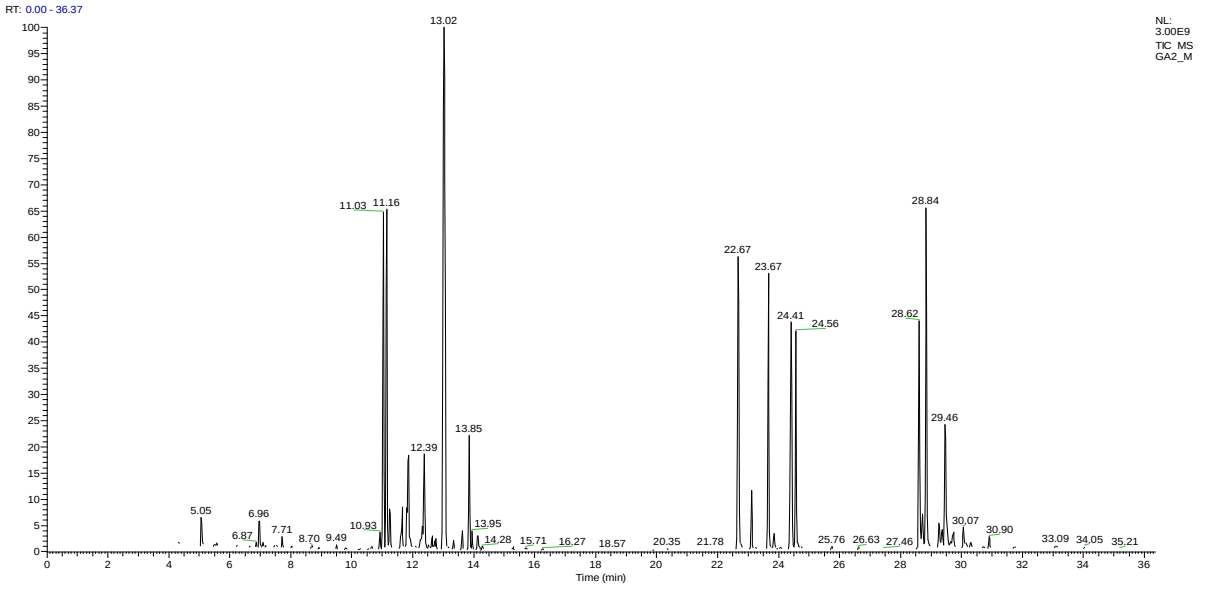
2. Сравняване на продуцираните първични и вторични метаболити, антиоксидантната активност и сомоклоналната вариабилност на листа от гардения и получените от тях *инвитро* системи.

2.1 Фитохимично профилиране с ГХ/МС на биомаса от *инвитро* системи и листа от *Gardenia jasminoides* Ellis

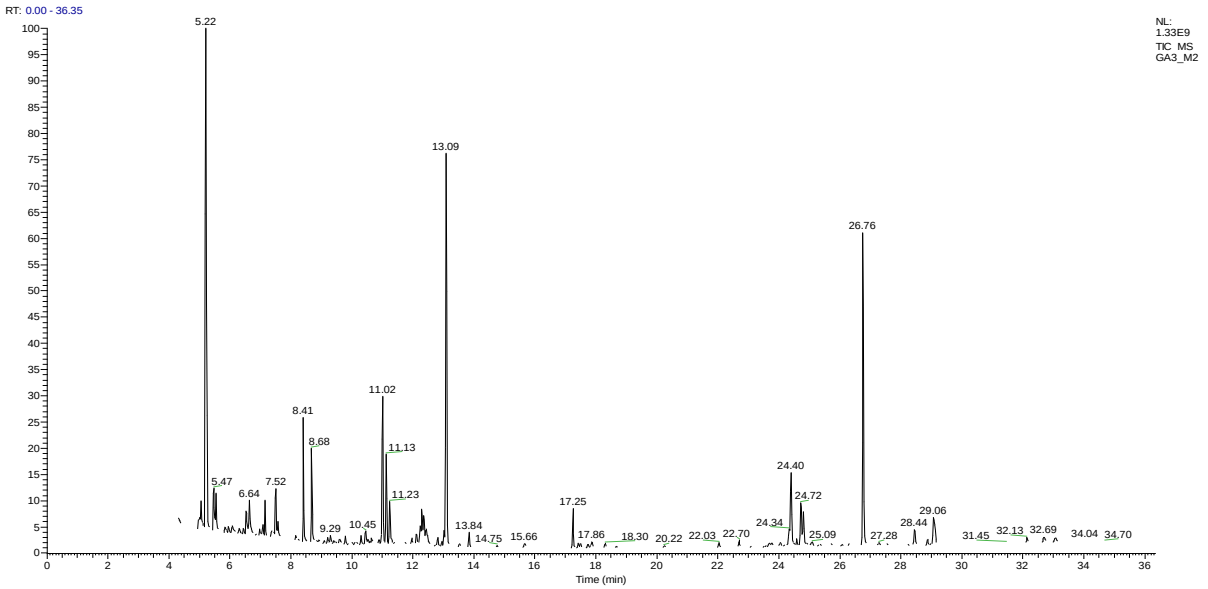
Проведен е анализ чрез ГХ/МС с цел да се покажат и първичните метаболити на изследваните *инвитро* системи и изходно растение гардения.



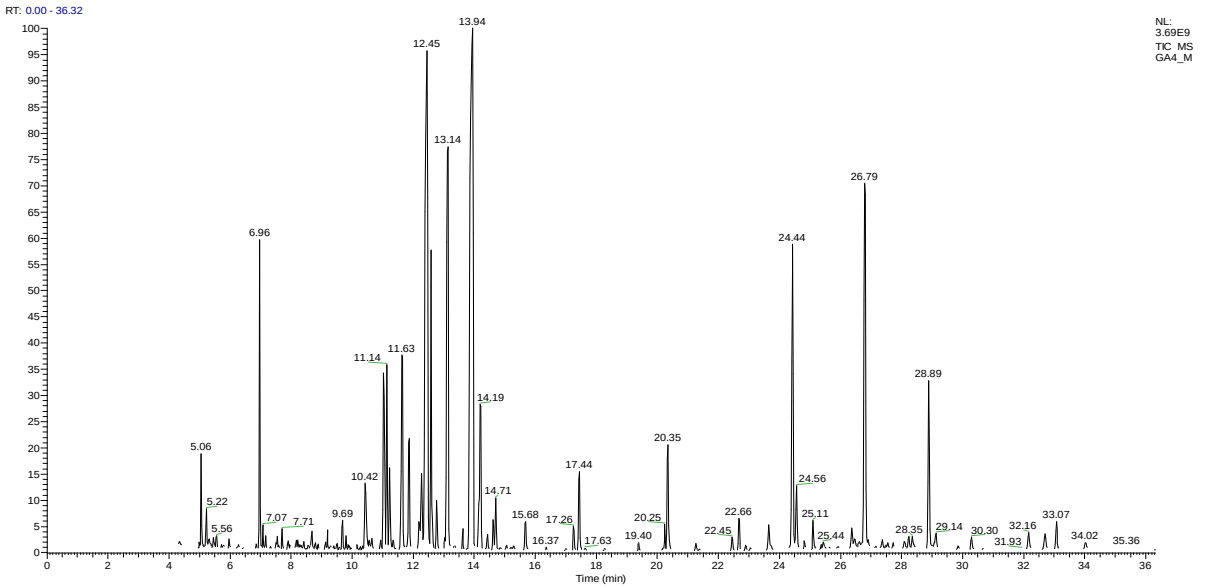
Фигура 2. Хроматограма на екстракт от *Gardenia jasminoides* Ellis



Фигура 3. Хроматограма на екстракт от *инвитро* растение *Gardenia jasminoides* Ellis



Фигура 4. Хроматограма на екстракт от калус

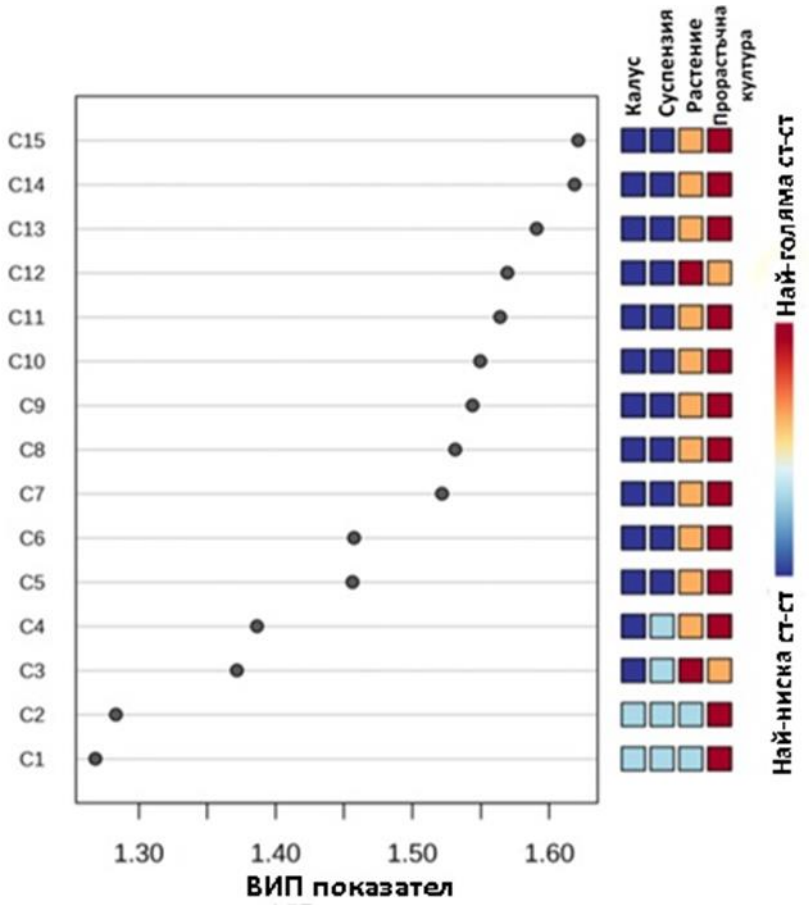


Фигура 5. Хроматограма на екстракт от клетъчна суспензия

Общо 67 метаболита са идентифицирани в растението и получените култури и съответно 41 и 34 метаболита в култури от калус и клетъчна суспензия (Фигура 6). Направеният принципен анализ на компонентите показва, че четирите

основни компонента имат собствени стойности, по-големи от единица, обяснявайки 97,6% от вариацията в данните.

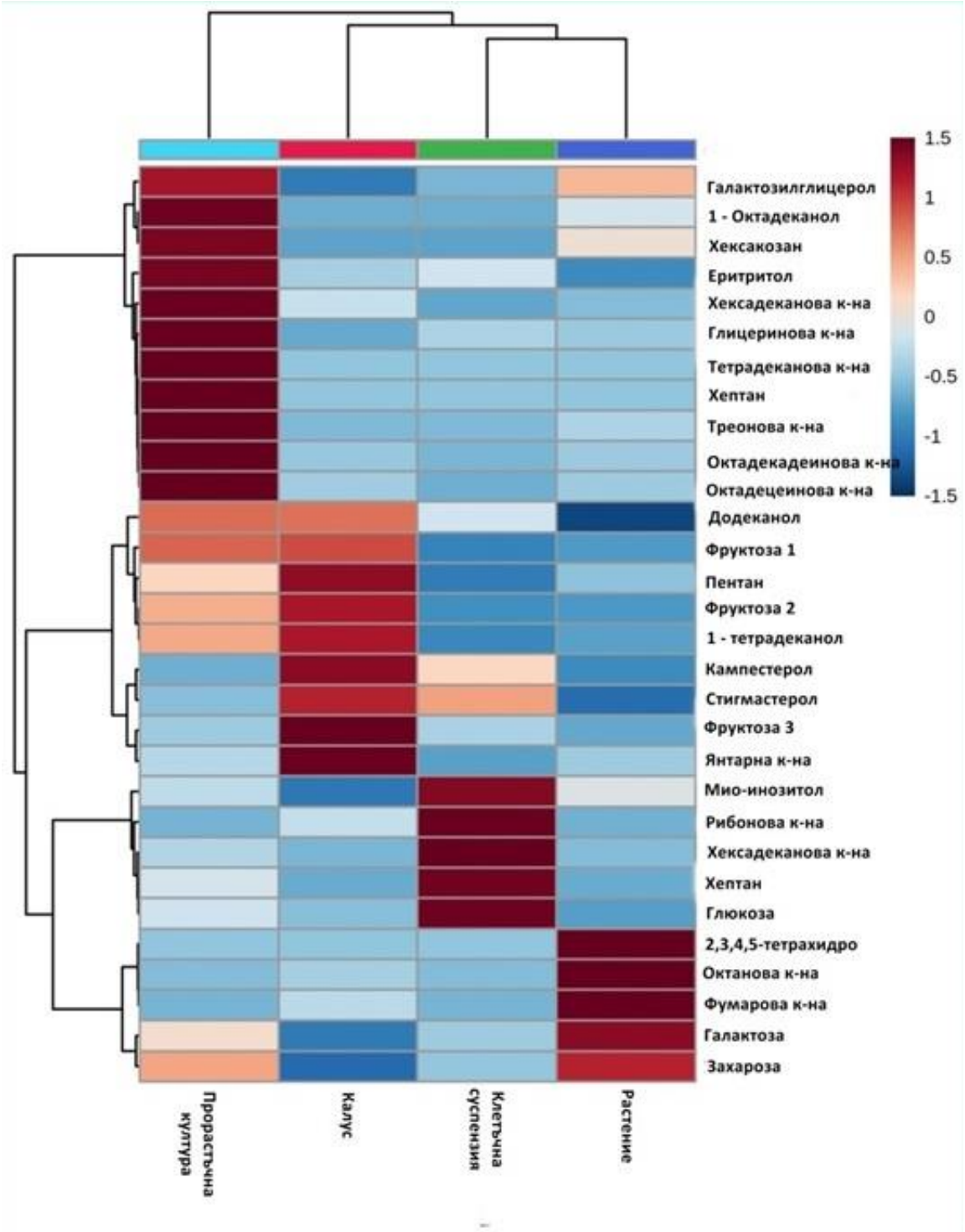
Частичен дискриминантен анализ (PLS-DA) е използван за идентифициране на съединения, които биха могли да разграничат получените *инвитро* култури (прорастъчни култури, калус и клетъчна суспензия). Интересното е, че въглеводородите и мастните алкохоли като тетракозан, хексакозан; и 1-октадеканол присъстват в най-високи концентрации впрорастъчна култура, по-ниски в растението и напълно липсват в калуса и клетъчните суспензии.



Фигура 6. Графика на резултатите с променлива в проекцията (ВИП) (измерване в PLS-DA), показващ най-открояващите се съединения в низходящ ред на важност: C1—Хептан, разклонен; C2—тетрадеканова киселина (метилов естер C14:0); C3-захароза; C4—галактозилглицерол; C5-1-хексакозанол; C6-2-хидрокситрикозанова киселина; C7-арабитол; C8-арабитол; C9—Ейкозанова киселина (метилов естер, арахидова киселина, C20:0); C10-2-хидрокси-хексакозанова киселина; C11-октадекан, 2-метил;

За по-добро визуализиране на разликите, наблюдавани в моделите на метаболитите на изследваните проби, относителните концентрации на 30 най-съществено различни метаболита, идентифицирани в листата на растението Gardenia, прорастъчна култура, калус и клетъчни суспензионни култури (определени чрез обработка на ГХ/МС данните с ANOVA , t-тест) резултатите са картографирани в карта. Групирането на групите показва ясно разликата между прорастъчната култура и другите проби (калус, клетъчна суспензия и листа от растения). Най-много метаболити, открити в издънките, са мастни киселини,

въглеводороди и мастни алкохоли. Калусната култура е богата на фитостероли и захариди. Клетъчната суспензия е богата на захари и захарни киселини, докато в листата на растението преобладават захари, мастни и органични киселини (Фигура 7).



Фигура 7. Йерархично групирана карта на 30 най-значими (Т-тест/ANOVA, n = 3) метаболита, открити в листата на *G. jasminoides* Ellis (синьо) и *инвитро* отгледани прорастъчна култура (светлосини), калус (червен) и клетъчна суспензия (зелен) култури, идентифицирани и количествено определени чрез ГХ/МС. Групирането е извършено чрез използване на метода на Ward с евклидово разстояние. Всяка колона в анализа на Heatmap представлява проба (растение, прорастъчна култура, калус и клетъчни суспензии) и всеки ред показва метаболитни концентрации на

техните най-високи и най-ниски стойности (вариращи от +1,5 до −1,5), кодирани в червени и сини цветове с различни интензитети.

2.2. Количествено определяне на фенолни съединения в листата на гардения и *инвитро* култури чрез ВЕТХ

Анализирано е фенолното съдържание (девет фенолни киселини и шест флавоноида) на листата на растенията *G. jasminoides* Ellis и *инвитро* култивирани прорастъчни култури, калус и клетъчни суспензионни култури. Резултатите са представени в таблица 2. Пробите от диференцирани тъкани (растителни листа и прорастъчни култури) натрупаха феноли в по-високи концентрации от тези, открити в недиференцирани тъкани (калус и клетъчна суспензия). Има обаче някои интересни разлики. Анализите на данните показват, че културите от прорастъчни култури натрупват хлорогенова киселина, кверцетин, кемпферол и рутин в значително по-високи ($p < 0,01$) количества в сравнение с листата на растенията. Освен това културите от прорастъчни култури са единствените които натрупват протокатехуинова и р-кумарова киселина. Рутинът е един от основните флавоноиди, докладвани в растителни екстракти от гардения (предимно в плодове) (Chen, L., 2020; Yin, F., 2018; Saravanakumar, K., 2021; Wang, L., 2016) и в това проучване е показано, че се натрупва в по-големи количества в диференцирана, отколкото в недиференцирана гардения *инвитро* култура.

Важно е да се отбележи, че недиференцираните калусни и клетъчни суспензионни култури са единствените *инвитро* системи, които продуцират (+)-катехин, а също така натрупват ванилова киселина за разлика от листа на растенията.

Таблица 2. Количествено определяне на фенолни съединения в листата на гардения и инвитро култури чрез ВЕТХ

	Растение µg/g	Прорастъна култура µg/g	Калус µg/g	Клетъчна суспензия µg/g
Протокатехинова киселина	Няма	8.65±0,41[а]	Няма	Няма
(+)-Катехин	Няма	Няма	24.24±0.99 [б]	47.13±3,4[а]
Хлорогенова киселина	173.02±9.6 [б]	411,00±6,97[а]	10.21±0,77[в]	12.08±0.27[в]
Ванилова киселина	ND [в]	375.02±19.34 [а]	16.21±1.03 [б]	17.47±0,38 [б]
Кафеена киселина	84.34±9.16 [а]	97.57 ± 7.12[а]	28.32±0,95[б]	Няма
Сирингова киселина	84.68±1.34[а]	26.85±1.58[б]	16.98±0[в]	14.02±2,96[в]
(-)-Епикатехин	386.83±10.9[а]	177.86±4.53[б]	48.44±1.84[в]	53.31±2.86[в]
р-Кумарова киселина	Няма	15.15±2,66[а]	Няма	Няма
Ферулова киселина	83.38±9.93[а]	32.64±3.28[б]	21.76±2.4[б,в]	13,46±1,32[в]
Силицилова киселина	1344.97±100.11[а]	1262.82±193.99[а]	10.67±3.37[б]	9.78±0,09[б]
Рутин	40,75±1.5[а]	50.35±9.59[а]	3.18±0.40[б]	3.06±0,07[б]
Хисперидин	309.32±13.40[а]	233.42±10,64[б]	Няма	Няма
Размаринова киселина	1636.22±135.45[а]	419.72±101.73[б]	31.27±6.50[в]	32.30±1.98[в]
Кварцетин	39.33±2.45[б]	284.28±22.85[а]	0.12±0.02[в]	Няма
Каемферол	4.15±1.63[б]	286.05±24.56[а]	Няма	Няма

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$)

2.3 Антиоксидантна активност на фенолни екстракти на листа на гардения и *инвитро* култури

Анализирани са антиоксидантни активности на метанолови екстракти от листа, прорастъчни култури, калус и клетъчни суспензионни култури на *G. jasminoides,* като използвахме четири надеждни инвитро анализа. Резултатите са представени

в таблица 3. Екстрактът от листата на растението показва най-високо общо фенолно съдържание (4,05 ± 0,36 mg ГАЕ/g СБ), следван от екстрактите от прорастъчни култури, клетъчна суспензия и калусни култури. Антиоксидантният потенциал на екстрактите от недиференцирани *инвитро* култури (калус и клетъчна суспензия) е значително по-нисък ($p < 0,01$) в сравнение с листата на растенията и диференцираните издънки.

Таблица 3. Антиоксидантна активност на фенолни екстракти на листа на гардения и ин витро култури

	Растение	**Клетъчна суспензионна култура**	**Калус**	**Прорастъчна култура**
Cu-(II)-редуцираща активност, μM TE/g суха биомаса	394.74 ± 39.39[а]	53.45 ± 8.41[в]	49.56 ± 8.50[в]	281.28 ± 17.34[б]
Fe-(III)-редуцираща активност, μM TE/g суха биомаса	251.68 ± 16.45[а]	10.59 ± 0.50[б]	5.47 ± 0.65[в]	234.56 ± 15.59[а]
DPPH-радикал улавяща активност, μM TE/g суха биомаса	368.41 ± 41.77[б]	18.29 ± 2.69[в]	8.73 ± 1.50[в]	647.21 ± 33.29[а]
ABTS радикал улавяща активност, μM TE/g суха биомаса	2162.79 ± 62.62[а]	23.57 ± 2.09[в]	12.50 ± 1.72[в]	1394.90 ± 15.00[б]
Общи полифеноли, μM ГАЕ/g суха биомаса	4.05 ± 0.36[а]	0.27 ± 0.01[в]	0.18 ± 0.02[в]	3.03 ± 0.20[б]

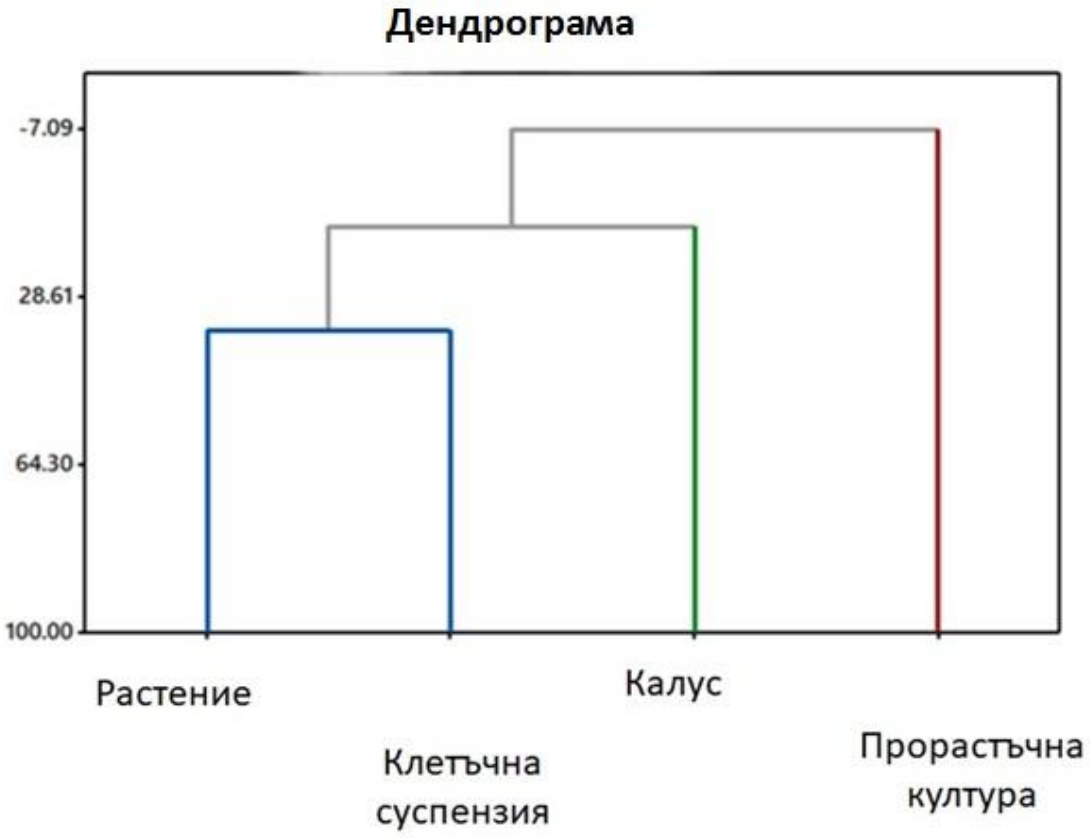
- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$)

2.4 Сомаклонална вариабилност в гардения и получените *инвитро* култури

Данните показват, че всички SSRs, с изключение на GJ08, имат повече от три алела и могат да се използват за оценка на генетичното разнообразие в изследваните системи гардения. Броят на откритите алели (Na) варира от 2 до 6 със средно 5.636 ± 2.157 алели на локус, докато ефективният брой алели (Ne) варира от 1 до 4 със средно 3.0 ± 1.095. Тези стойности са значително по-високи от докладваните за микроклони на Gardenia somaclones (средно Na = 1,85, средно

Ne = 1,85) (Ebrahim, M.A., 2022), което показва, че диференцираните и недиференцирани култури гардения *инвитро*, използвани в това проучване, имат много по-високи генетични вариации. Това се потвърждава и от високите стойности на наблюдаваната хетерозиготност (Ho = 1) и очакваната хетерозиготност (He = 0.972 ± 0.051), което е ясно доказателство за висока генетична вариабилност сред изследваните системи.

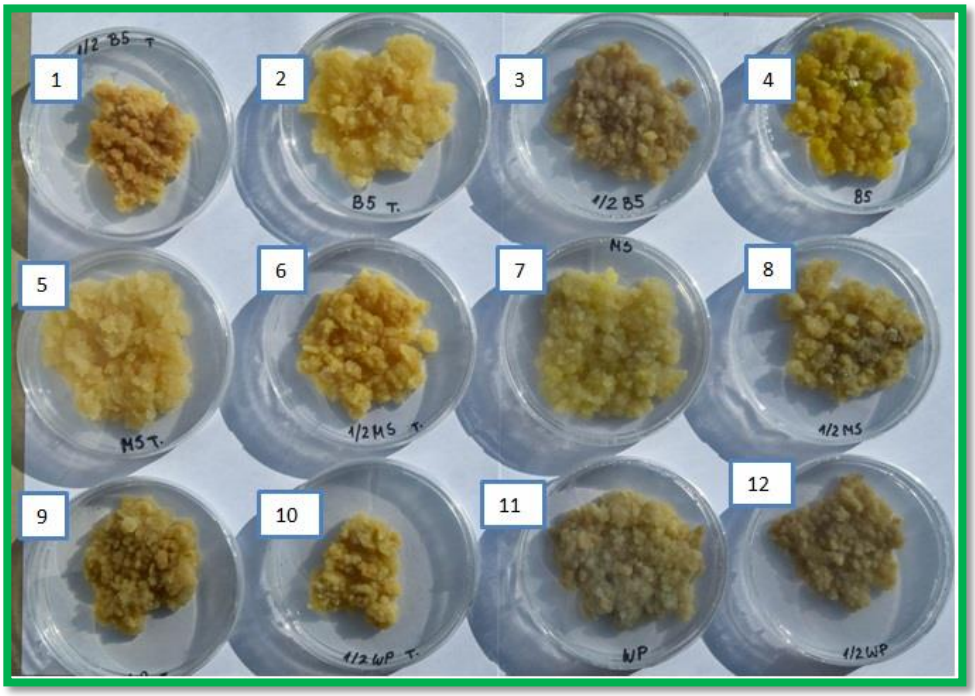
Проведен е клъстерен анализ (Фигупа 8) на SSR данните с цел да бъдат групирани растението гардения и получените *инвитро* култури в клъстери чрез използване на коефициенти на подобие на евклидово разстояние. Най-високото генетично сходство (35.47) е установено между растението и клетъчната суспензионна култура, докато приликите между растението и калуса (13.53) и растението и прорастъчната култура (−7.09) са значително по-ниски. Анализирайки данните, може да се предположи, че значителните разлики, наблюдавани в метаболитния профил на диференцираната прорастъчна култура, корелират с наблюдаваното високо генетично разстояние в сравнение с растението Gardenia и недиференцирани *инвитро* култури (калус и клетъчни суспензии). Това е интересно наблюдение, тъй като обикновено се постулира, че диференцираните инвитро култури показват по-малка генетична променливост от недиференцираните (Steingroewer, J., 2013).



Фигура 8. Клъстерен анализ на SSR данните за определяне на генетично сходство между изходното растение и получените *инвитро* култури

3. Калусна култура от гардения, развиваща се върху различни хранителни среди

За да се проследят промените в продуцирането на суха биомаса, фитохимичния профил, антиоксидантната активност и генетична стабилност в получената *инвитро* калусна култура е осъществено култивиране на различни хранителни среди и различни режими на светлина (Фигура 9).



Фигура 9. Калусни култури от жасминова гардения врху различни хранителни среди и режим на светлина 1- ½ B5 на тъмно; 2 - B5 на тъмно; 3 - ½ B5 светло (16/8); 4- B5 светло (16/8); 5 - MS на тъмно; 6 - ½ MS на тъмно ; 7 - MS светло (16/8); 8 - MS светло (16/8); 9 – WP на тъмно; 10 – ½ WP на тъмно; 11 – WP светло (16/8); 12 – ½ WP светло (16/8)

Оптималният интензитет на светлината и селективната дължина на вълната повишават производството на диосгенин в калусните култури на Dioscorea deltoidea (Ahmad, N. и др, 2016). Въпреки това, физиологичните и морфологични реакции на растенията към качеството на светлината са значително разнообразни в зависимост от растителния вид (Ahmad, N. и др, 2016). Тария и екипът й (Tariq, U., и др. 2014), съобщават за значителна вариация както в морфогенните, така и в биохимичните процеси в калусните култури на *Artemisia*

absinthium, подложени на различни монохроматични светлини. Добре известен факт е, че светлината играе ключова роля в първичния и вторичния метаболизъм и различните процеси на развитие на растенията (Ahmad, N. и др, 2016). За първи път обаче, в настоящата работа, се проследява ефекта на светлината при продуцирането на вторични метаболити от калусна култура от гардения и се доказва нейното ключово влияние.

3.1 Анализиране на промените при синтеза на вторични метаболити

Последните години се правят различни проучвания за доказване на биологичния потенциал на растението и възможността му за продуциране на активни метаболити. До момента няма налични данни как влияе светлината и композицията на хранителната среда върху продуцирането на метаболити при калусна култура от жасминова гардения.

В настоящата работа се анализира как се променя фитохимичния профил на калусните култури при различни режими на светлината – на светло и на тъмно, и различна база хранителната среда (Murashiga and skoog, Woody plant, B5). Резултатите от направения експеримент са представени последователно в таблица 4, таблица 5, таблица 6 и таблица 7, и ни показват, че има значителни разлики в продуцирането на вторични метаболити при култивиране на културите на цяла база хранителна среда и на ½ от базата хранителна среда, култивирани на светло и на тъмно.

Таблица4. HPLC количествено определяне на фенолни съединения на калус култивиран на ½ MS, ½WP, ½B5 хранителна среда с режим на светлина 16/8

	1/2 MS - 16/8	1/2 WP - 16/8	1/2 B5 - 16/8
Хлорогенова киселина, µg/g	11,33 ± 3,07^{в}	61,24 ± 14,04^{а}	25,25 ± 2,25^{б}
Кафеена киселина, µg/g	3,05 ± 1,01^{б}	2,90 ± 0,7^{б}	21,91 ± 0,01^{а}
Ферулова киселина, µg/g	6,68 ± 1,95^{а}	5,07 ± 0,1^{а}	4,37 ± 0,11^{а}
Рутин, µg/g	Няма	13,74 ± 8,43^{а}	Няма
Раозмаринова киселина, µg/g	77,22 ± 6,15^{а}	55,69 ± 6,13^{б}	34,81 ± 2,69^{в}
Кварцетин, µg/g	1,12 ± 0,07^{в}	14,34 ± 0,45^{а}	9,52 ± 1,75^{б}
камферол, µg/g	Няма	1,22 ± 0,31^{а}	1,44 ± 0,05^{а}

Катехин, µg/g	Няма	36,98 ± 3,87[а]	27,85 ± 15,97[а]
Ванилова киселина, µg/g	71,02 ± 1,71[а]	58,56 ± 10,58[б]	Няма
Сирингова киселина, µg/g	Няма	24,03 ± 6,49[а]	7,94 ± 0,31[б]
Епикатехин, µg/g	Няма	98,47 ± 6,87[а]	71,92 ± 36,25[б]
п-Кумарова киселина, µg/g	Няма	14,80 ± 1,35[а]	4,03 ± 3,77[а]
Салицилова киселина, µg/g	12,91 ± 6,58[б]	25,44 ± 5,43[а]	Няма
Хисперидин, µg/g	3,11 ± 1,2[б]	11,41 ± 0,02[а]	Няма

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

Таблица5. HPLC количествено определяне на фенолни съединения на калус култивиран на MS, WP, B5 хранителна среда с режим на светлина 16/8

	MS - 16/8	**WP - 16/8**	**B5 - 16/8**
Хлорогенова киселина, µg/g	32,97 ± 2,35[б]	172,02 ± 8,19[а]	3,23 ± 9,57[в]
Кафеена киселина, µg/g	1,37 ± 0[б]	15,71 ± 0,75[а]	6,12 ± 3,55[б]
Ферулова киселина, µg/g	7,17 ± 0,8[б]	9,30 ± 3,01[а]	5,22 ± 0,22[б]
Рутин, µg/g	Няма	6,46 ± 0,55[а]	Няма
Раозмаринова киселина, µg/g	29,44 ± 1,24[в]	217,29 ± 5,51[а]	89,19 ± 4,18[б]
Кварцетин, µg/g	2,28 ± 0,023[б]	20,53 ± 4,12[а]	7,42 ± 0,52[б]
камферол, µg/g	3,95 ± 0,18[б]	11,96 ± 0,92[а]	10,84 ± 6,81[а]
Катехин, µg/g	Няма	37,67 ± 12,15[а]	Няма
Ванилова киселина, µg/g	22,14 ± 0,6[в]	139,61 ± 3,92[а]	44,99 ± 6,16[б]
Сирингова киселина, µg/g	12,81 ± 0,89[б]	57,57 ± 3,68[а]	11,65 ± 0,5[б]
Епикатехин, µg/g	41,53 ± 4,96[б]	101,61 ± 24,60[а]	22,13 ± 4,08[в]
п-Кумарова киселина, µg/g	Няма	25,53 ± 2,18[а]	5,71 ± 7,31[б]
Салицилова киселина, µg/g	25,91 ± 0,9[б]	45,20 ± 2,62[а]	19,22 ± 4,41[б]
Хисперидин, µg/g	4,09 ± 0,14[б]	23,77 ± 0,05[а]	Няма

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

Сравнявайки резултатите от получените метаболити на калусните култури култивирани на тъмно ще забележим, че по – високи стойности имаме на културите които се култивират на хранителна среда WP (Таблица 6 и Таблица 7). Стойността на хлорогеновата киселина на калусна култура култивирана на тъмно е 18,68 ± 2,19 µg/g (Таблица 7) за сравненине на същата хранителна среда

WP, но култивиран на светло, калуса продуцира 172,02 ± 8,19 µg/g хлорогенова киселина (Таблица 11).

Статистически неразличими са резултатите получени за концентрацията на хлорогенова киселина съответно 2,10 ± 1,37 µg/g култивирани на ½ MS на тъмно и 2,86 ± 0,21 µg/g култивирани на ½ B5 на тъмно (Таблица 6), в сравнение със същите хранителни среди но култивирани на светло калуса продуцира съответно 11,33 ± 3,07 µg/g и 25,25 ±2,25 µg/g хлорогенова киселина (Таблица 4). Най-висока концентрация на хлорогеновата киселина от калусните култури култивирани на тъмно се открива при хранителна среда WP 18,68 ±2,9 µg/g, докато при ½ WP на тъмно се откриват само 5,41 ± 0,9 µg/g хлорогенова киселина (Таблица 6 и Таблица 7). За сравнение на същите хранителни среди но на светло калуса продуцира съответно 172,02 ± 8,19 µg/g и 61,24 ± 14,04 µg/g (Таблица 4 и Таблица 5).

От резултатите се вижда, че светлината е основен физически фактор, който в контролирана среда играе пряко роля върху продуцирането на вторични метаболити, както от растението така и от калусните култури получени от него.

Тенденцията за по – голям брой метаболити продуцирани от калусни култури култивирани на светло, спрямо тези култивирани на тъмно се забелязва и при хранителна среда B5.

Таблица 6. HPLC количествено определяне на фенолни съединения на калус култивиран на 1/2 MS, 1/2WP, 1/2B5 хранителна среда на тъмно

	1/2 MS тъмно	**1/2WP тъмно**	**1/2 B5 тъмно**
Хлорогенова киселина, µg/g	2,10 ± 1,37[б]	5,41 ± 0,91[а]	2,86 ± 2,21[б]
Кафеена киселина, µg/g	2,88 ± 0,9[б]	8,63 ± 7,44[а]	1,34 ± 0,08[б]
Ферулова киселина, µg/g	5,60 ± 0,2[а]	4,72 ± 0,09[а]	5,72 ± 3,15[а]
Рутин, µg/g	Няма	2,85 ± 0,18[а]	Няма
Раозмаринова киселина, µg/g	5,87 ± 0,44[а]	4,86 ± 0,37[а]	Няма
Кварцетин, µg/g	Няма	4,48 ± 2,41[а]	1,72 ± 21[б]
камферол, µg/g	0,94 ± 0,08[в]	Няма	1,29 ± 0,5[б]
Катехин, µg/g	Няма	Няма	7,88[б]
Ванилова киселина, µg/g	27,97 ± 0,49[а]	Няма	18,36 ± 9,73[б]
Сирингова киселина, µg/g	Няма	21,02 ± 0,16[а]	Няма
Епикатехин, µg/g	Няма	15,27 ± 2,08[а]	Няма

п-Кумарова киселина, µg/g	2,68 ± 0,03^{б}	15,19 ± 7,15^{а}	Няма
Салицилова киселина, µg/g	19,13 ± 0,33^{б}	27,50 ± 0,12^{а}	15,59 ± 4,3^{б}
Хисперидин, µg/g	14,67 ± 2,98^{а}	0,55 ± 0,21^{б}	Няма

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

Таблица 7. HPLC количествено определяне на фенолни съединения на калус култивиран на MS, WP, B5 хранителна среда на тъмно

	MS тъмно	**WP тъмно**	**B5 тъмно**
Хлорогенова киселина, µg/g	5,36 ± 0,05^{в}	18,68 ± 2,19^{а}	15,99 ± 5,19^{б}
Кафеена киселина, µg/g	Няма	2,33 ± 0,3^{а}	3,70 ± 2,35^{а}
Ферулова киселина, µg/g	3,44 ± 0,13^{б}	16,85 ± 2,19^{а}	6,10 ± 0,43^{б}
Рутин, µg/g	Няма	0,93 ± 0,03^{а}	Няма
Раозмаринова киселина, µg/g	12,84 ± 0,12^{б}	15,81 ± 6,18^{а}	6,99 ± 0,63^{в}
Кварцетин, µg/g	19,47 ± 10^{а}	14,36 ± 9,66^{b}	Няма
камферол, µg/g	0,50 ± 0,08^{б}	Няма	14,80 ± 0,16^{а}
Катехин, µg/g	Няма	12,65 ± 0,47^{а}	1,59 ± 0,84^{а}
Ванилова киселина, µg/g	5,51 ± 0,38^{а}	Няма	Няма
Сирингова киселина, µg/g	Няма	22,21 ± 2,68^{а}	Няма
Епикатехин, µg/g	Няма	21,72 ± 5,31^{а}	Няма
п-Кумарова киселина, µg/g	2,38 ± 0,04^{б}	25,07 ± 4,41^{а}	Няма
Салицилова киселина, µg/g	14,53 ± 1,42^{б}	27,75 ± 1,20^{а}	17,76 ± 2,60^{б}
Хисперидин, µg/g	Няма	7,72 ± 3,46^{а}	2,45 ± 2,05^{б}

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

3.2 Антиоксидантната активност

След проследяване на промените във фитохимичния профил на културите е проследена и антиоксидантната активност по 4 метода – Таблица 8, Таблица 9, Таблица 10, Таблица 11.

Показаните резултати в таблиците потвърждават тенденцията от анализирането на фитохимичния профил, и тук се наблюдава най – висока антиоксидантна активност на културите култивирани на хранителна среда WP на светло, спрямо тези на тъмно.

Таблица 8. Антиоксидантна активност на калусни култури култивирани на хранителни среди MS, 1/2MS, WP, 1/2WP, B5, 1/2B5 съответно на режим на светлина 16/8 и на тъмно по метода DPPH

	DPPH, µM TE/g СБ		DPPH, µM TE/g СБ
1/2 MS 16/8	7,22 ± 3,89[а]	**MS 16/8**	5,02 ± 0,3[б]
1/2 WP 16/8	3,82 ± 0,8[б]	**WP 16/8**	5,86 ± 0,8[а]
1/2 B5 16/8	4,50 ± 0,31[а]	**B5 16/8**	3,57 ± 0,04[а]
1/2 MS на тъмно	4,06 ± 1,3[а]	**MS на тъмно**	2,93 ± 0,07[б]
1/2 WP на тъмно	3,62 ± 1,4[а]	**WP на тъмно**	3,71 ± 0,44[а]
1/2 B5 на тъмно	3,85 ± 0,3[а]	**B5 на тъмно**	3,51 ± 0,2[а]

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

Радикал улавящата активност на калусната култура към ABTS радикала е с най-голям потенциал при развитие на културата върху хранителна среда WP на светло (Таблица 9).

Таблица 9. Антиоксидантна активност на калусни култури култивирани на хранителни среди MS, 1/2MS, WP, 1/2WP, B5, 1/2B5 съответно на режим на светлина 16/8 и на тъмно по метода TEAC

	TEAC, µM TE/g СБ		TEAC, µM TE/g СБ
1/2 MS 16/8	1,21 ± 0,5[а]	**MS 16/8**	0,24 ± 0,02[б]
1/2 WP 16/8	3,95 ± 1,74[б]	**WP 16/8**	6,08 ± 0,59[а]
1/2 B5 16/8	4,79 ± 0,44[а]	**B5 16/8**	1,69 ± 0,44[б]
1/2 MS на тъмно	0,29 ± 0,03[б]	**MS на тъмно**	0,99 ± 0,02[а]
1/2 WP на тъмно	1,76 ± 0,3[а]	**WP на тъмно**	1,05 ± 0,39[б]
1/2 B5 на тъмно	4,44 ± 0,15[а]	**B5 на тъмно**	0,64 ± 0,33[б]

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

Потенциала за намаляване на медните йони е най-висок при културите култивирани на ½ WP на светло. Забелязва се че при този метод за анализиране на антиоксидантната активност получените резултати за калусните култури култивирани върху хранителна среда B5 (Таблица 10).

Таблица 10. Антиоксидантна активност на калусни култури култивирани на хранителни среди MS, 1/2MS, WP, 1/2WP, B5, 1/2B5 съответно на режим на светлина 16/8 и на тъмно по метода CUPRAC

	CUPRAC, μM TE/g СБ		CUPRAC, μM TE/g СБ
1/2 MS 16/8	30,24 ± 1,88[а]	**MS 16/8**	23,30 ± 2,9[б]
1/2 WP 16/8	43,73 ± 3,25[а]	**WP 16/8**	22,30 ± 7,4[б]
1/2 B5 16/8	10,20 ± 1,55[а]	**B5 16/8**	9,83 ± 0,78[а]
1/2 MS на тъмно	15,52 ±1,77[а]	**MS на тъмно**	14,77 ± 1,06[а]
1/2 WP на тъмно	16,32 ± 2,24[б]	**WP на тъмно**	22,30 ± 7,46[а]
1/2 B5 на тъмно	22,59 ± 8,08[а]	**B5 на тъмно**	16,76 ± 1,22[б]

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

Изследването на антиоксидантната активност чрез метод за проследяване на намаляването на железните йони показва че най-добра активност имат калусните култури култивирани на WP 16/8 (Таблица 11).

Таблица 11. Антиоксидантна активност на калусни култури култивирани на хранителни среди MS, 1/2MS, WP, 1/2WP, B5, 1/2B5 съответно на режим на светлина 16/8 и на тъмно по метода FRAP

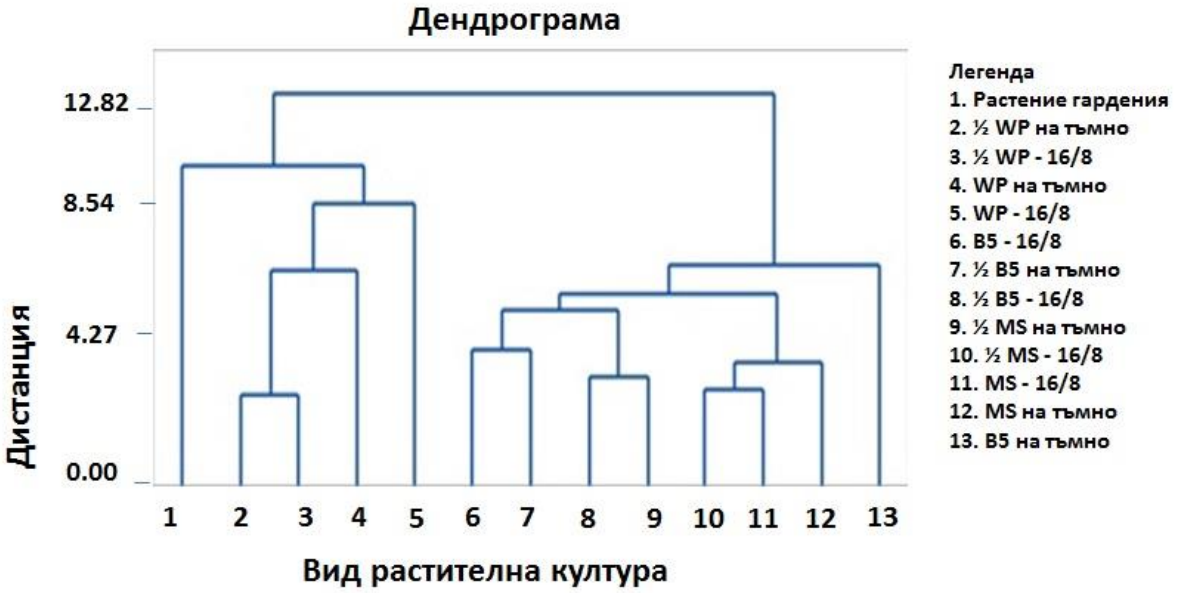
	FRAP, μM TE/g СБ		FRAP, μM TE/g СБ
1/2 MS 16/8	1,85 ± 0,33[б]	**MS 16/8**	10,74 ± 0,3[а]
1/2 WP 16/8	8,40 ± 0,64[б]	**WP 16/8**	12,17 ± 0,96[а]
1/2 B5 16/8	5,96 ± 0,3[а]	**B5 16/8**	4,15 ± 0,5[б]
1/2 MS на тъмно	2,20 ± 0,4[а]	**MS на тъмно**	1,27 ± 0,15[б]
1/2 WP на тъмно	6,05 ± 0,09[а]	**WP на тъмно**	5,81 ± 0,4[а]
1/2 B5 на тъмно	4,41 ± 0,33[а]	**B5 на тъмно**	2,35 ± 0,34[б]

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

3.3 Анализиране на промените в генетичната стабилност на калусните култури спрямо растението от което са получени

Проведен е клъстерен анализ (Фигура 10), с цел да бъдат групирани калусните култури култивирани на различни хранителни среди и развиващи се съответно

на режим на светлината 16/8 и на тъмно, спрямо растението от което са получени. На фигурата се виждат обособени два голяма клъстера, в единия са групирани растението гардения, заедно с калусните култури култивирани съответно на ½ WP на тъмно, ½ WP на светло, WP на тъмно и WP на светло. Най-малка е генетичната изменчивост в този клъстер между растението и калуса култивиран на ½ WP на тъмно и ½ WP на светло (3,02), а най-голяма е най-голяма е между растението и калуса култивиран на хранителна среда WP на светло (8,54). Най-голямата е възникналата разлика между растението гардения и калусната култура култивирана на хранителна среда B5 на тъмно (12,82).



Фигура 10. Клъстерен анализ на калусните култури култивирани на различни хранителни среди и развиващи се съответно на режим на светлината 16/8 и на тъмно, спрямо растението от което са получени.

Поради хетерогенната популация от типични дедиференцирани клетки, които съдържат калусите, изборът на високопродуктивна клетъчна линия е съществена стъпка за създаването на печеливши производствени платформи за натурални продукти. Тъй като натрупването на търсените метаболити в растенията е специфично за генотипа, изборът на подходящи видове и впоследствие части от растението за генериране на калус е от решаващо значение (Murthy HN, и др.

2014). Освен това разликите в плоидията са свързани с промени в генната експресия, като цяло по-високата плоидност изглежда води до занижаване на действието та голям брой гени (Baebler Š., и др., 2005). Промените на културата, произтичащи от тези генетични промени, обикновено налагат периодичен скрининг, за да се поддържат желаните характеристики на дадената система на културата (Baebler Š., и др., 2005). В този контекст, прилагането на избираем маркер в растителни клетки в култура, е използвано за заобикаляне на този проблем, поддържайки високоефективни клетки за повече от 12 месеца (Raven N., и др., 2015). Следователно, важна е както оптимизацията на условията на култувиране на културите, възникващите от това промени така и е важно да се проследят генетичните промени по време на култивирането и до каква степен получените инвитро култури се различават от изходното растение, и на какво се дължат тези промени.

Информация за такъв тип анализи върху растение гардения и получени от нея *инвитро* култури не се откриват в базата данни.

4. Селектиране на подходяща хранителна среда за клетъчна суспензионна култура и прорастъчна култура от *Gardenia jasminoides* Ellis. Динамика. Оптимизация

4.1 Селектиране на подходяща хранителна среда за клетъчна суспензионна култура и прорастъчна култура от *Gardenia jasminoides* Ellis

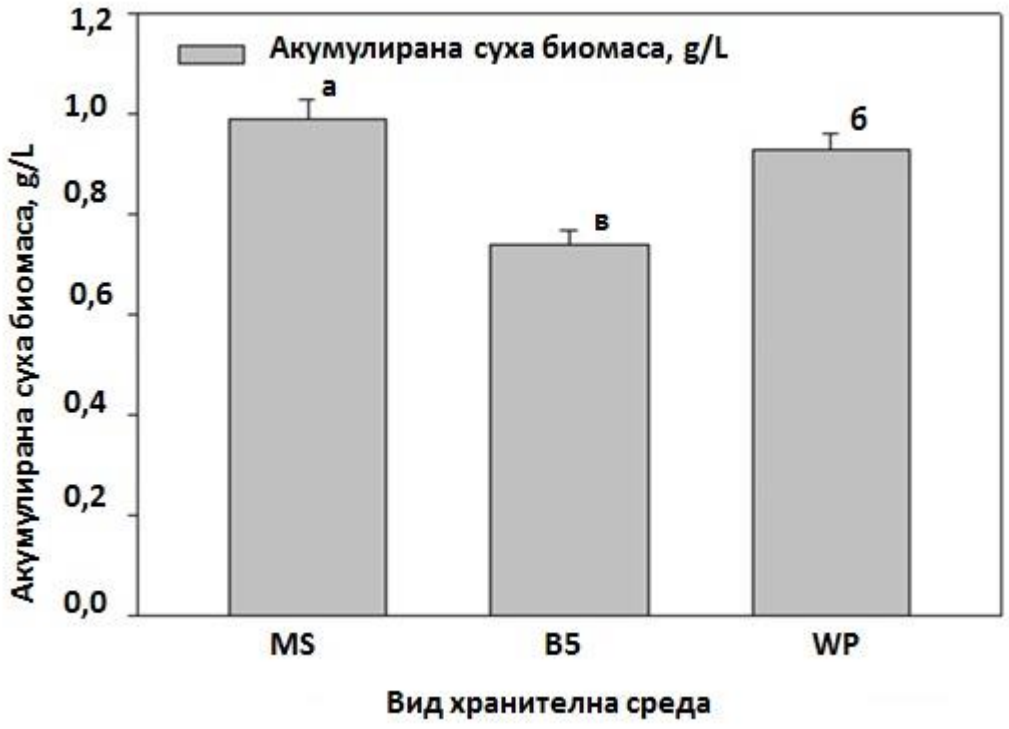
Оптимизирането на системите за производство на базата на растения изискват повече внимание и гъвкавост в процеса. В този контекст се появяват обещаващи нови стратегии, които имат добро приложение в бъдеще. Например, наблюдение на клетъчната биомаса по време на култивиране може да бъде важна стъпка за максимизиране на добива и качеството на продукта, като същевременно се подобряват хранителните вещества в културата (Holland T.,2013). Също така, параметрите на културата, включително нивата на фитохормони и компоненти в средата, могат да бъдат оптимизирани по-бързо чрез използване на статистически подход за проектиране на експерименти (Vasilev N., 2013). Следователно, стратегиите за експериментален дизайн, в комбинация с

мониторинг на линията, може да са много полезни по време на ранните стъпки в скрининга и оптимизирането, за установяване на високопроизводителни клетъчни линии.

В настоящата работа се прави оптимизиране на процеса за работа както на клетъчни суспензионни култури (получени от калусната култура), така и на прорастъчните култури. Проследяват се възникналите промени в сомоклоналната вариабилност на културите по време на динамиката на растеж, както и по време на оптимизацията. Целта е да се установи дали продължителността на култивиране оказва по-голямо влияние върху генетичните вариации, или промяната в концентрацията на основни хранителни компоненти като захароза и соли.

4.1.1 Акумулиране на суха биомаса

На фигура 11, ясно се вижда, че статистически неразличими по отношение на растежа са резултатите получени при култивирането върху хранителни среди MS ((2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин) и WP (2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин), съответно 0,98 ± 0,01 g/L и 0,85 ± 0,2 g/L. а най-ниска е акумулираната суха биомаса при култивирането върху хранителна среда B5 (2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин) 0,74 ± 0,02 g/L (Фигура 11).



Фигура 11. Акумулирана суха биомаса

4.1.2 Определяне на вторични метаболити синтезирани при култивиране на различна хранителна среда

Анализирайки получените резултати представени на таблица 12, най-високи концентрации на анализираните метаболити се откриват при клетъчната суспензионна култура култивирана на хранителна среда WP 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин. Направения статистическия анализ показва че има значителни разлики при продуцирането на метаболити като катехин (34,44 ± 2,46 µg/g) , хлорогенова киселина (20,26 ± 3,68 µg/g), епикатехин (84,44 ±7,06 µg/g), ферулова (27,72 ± 2,28 µg/g), салицилова (22,72 ± 0,79 µg/g) и рутин (45,90 ± 0,26 µg/g) на хранителна среда WP 2NAA 0.5 BAP спрямо същите метаболити на хранителна среда MS 2 NAA 0.5 BAP.

Прави впечаление, че въпреки по - ниския резултат за акумулиране на суха биомаса при хранителни среди WP 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин и B5 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-

бензиламинопурин, една част от метаболитите като катехин, хлорогенова киселина, сирингова киселина и розмаринова киселина са статистически неразличими при сравнение.

Като цяло растежът на растителните клетки и производството на вторични метаболити често са обратно пропорционални. По този начин производството на метаболитите обикновено се случва в късната стационарна фаза и е свързано с инхибиране на растежа и производството на ензими за вторичен метаболизъм (Bhojwani SS., и др. 2013). Това би могло да обясни по-слабия растеж на хранителна среда B5, но акумулирането на вторични метаболити да е в близки концентрации с тези при култивиране на хранителна среда WP където растежа и продуцираната суха биомаса е по-добър.

Таблица 12. Полифенолно съдържание на клетъчна суспензионна култура култивирана на различна хранителна среда

	MS, µg/g	**WP, µg/g**	**B5, µg/g**
(+)-Катехин	16,54 ± 1,47^{б}	34,44 ± 2,46^{а}	34,08 ± 0,78^{а}
Хлорогенова киселина	9,89 ± 0,91^{б}	20,26 ± 3,68^{а}	16,34 ± 3,49^{а}
Ванилова киселиа	Няма	19,76 ± 2,16^{а}	Няма
Кафеена киселина	13,43± 0,01^{б}	13,32 ± 6,88^{б}	27,78 ± 9,14^{а}
Сирингова киселина	21,68 ± 5,93^{а}	18,82 ± 4,56^{б}	18,89± 0,9^{б}
(-)-Епикатехин	51,56 ± 13,31^{б}	84,44 ± 7,06^{а}	68,32 ± 13,67^{б}
Ферулова киселина	11,45± 0,65^{б}	27,72 ± 2.28^{а}	13,16 ± 2,01^{б}
Салицилова киселина	11,43 ± 1,9^{б}	22,72 ± 0,79^{а}	13,93 ± 1,19^{б}
Рутин	Няма	45,90 ± 0,26^{а}	Няма
Розмаринова киселина	Няма	43,45± 0,35^{а}	46,94 ± 0,12^{а}
Кварцетин	54,28 ±0,6^{а}	39,29 ± 0,23^{а}	Няма

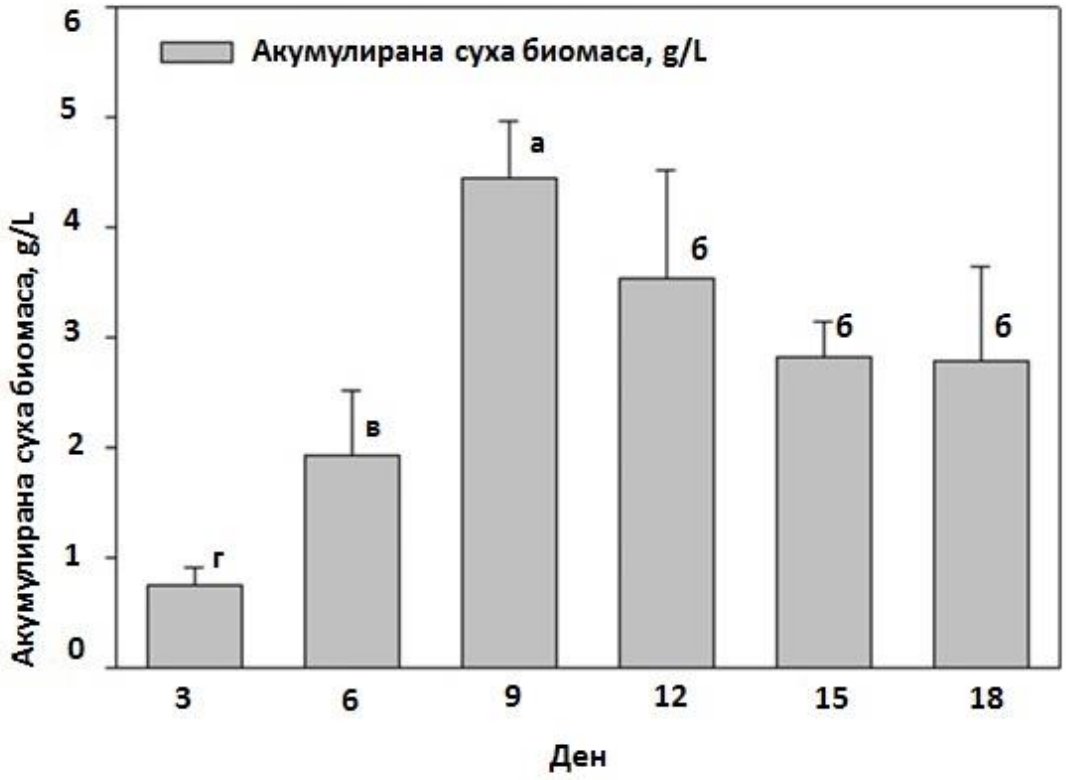
- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

В настоящата работа имаме за цел да намерим оптималните условия за култивиране на суспензионната култура, както по отношение на продуциране на суха биомаса, така и по отношение на полифенолното съдържание, затова за следващия етап от експеримента, а именно проследяване на динамиката на растеж на културата избираме да работим с хранителна среда WP.

4.2 Динамиката на развитие

4.2.1 Акумулирана суха биомаса и вторични метаболити

Анализирайки фигура 12 изобразяваща акумулирането на суха биомаса по дни от развитие на клетъчната суспензионна култура, ясно се вижда, че до 9 ден от развитието на културата продуцираната суха биомаса нараства и достига своя максимум от 4,44 ± 0,1 g/L. След този ден започва да намалява, като през 15 и 18 ден получените резултати са най-ниски статистически неразличими съответно 2,85 ± 0,02 g/L и 2,81 ± 0,1 g/L, или два пъти по малко отколкото през 9-тия ден от култивирането.



Фигура 12. Акумулирането на суха биомаса

По отношение на акумулирането на полифенолни съединения, данните в таблица 13 показват, че най-високи концентрации на анализираните метаболити се достигат през 9тия ден от култивирането. По – ниски са концентрациите на метаболитите през 12 и 15 ден от култивирането, спрямо 9 ден, но в същото време са статистически неразличими помежду си. Това би могло да се обясни с започващите процеси на стареене на клетките в клетъчната суспензионна култура, и по – ниския потенциал за продуциране на полифенолни съединения.

Таблица 13. Полифенолното съдържание на динамика на развитие на клетъчна суспензионна култура

	Ден 3, µg/g	**Ден 6, µg/g**	**Ден 9, µg/g**	**Ден 12, µg/g**	**Ден15, µg/g**	**Ден 18, µg/g**
Хлорогенова киселина	$32{,}03 \pm 0^{в}$	Няма	$56{,}41 \pm 0^{а}$	$42{,}86 \pm 0^{б}$	$37{,}67 \pm 0^{в}$	Няма
Кафеена киселина	$6{,}42 \pm 2{,}23^{а}$	$4{,}94 \pm 3{,}26^{б}$	$2{,}45 \pm 0{,}15^{в}$	$7{,}12 \pm 6{,}33^{а}$	$2{,}81 \pm 1{,}04^{в}$	$2{,}16 \pm 0{,}16^{в}$

Ферулова киселина	13,47 ± 6,1^{б}	16,61 ± 5,72^{б}	29,11 ± 4,51^{а}	5,88 ±0,09^{в}	5,83 ± 0,28^{в}	6,69 ± 2,73^{в}
Розмаринова киселина	14,26,86 ± 4,4^{в}	28,96 ± 6,99^{б}	36,51 ± 5,81^{а}	26,17 ± 30,17^{б}	21,14 ± 60,66^{б}	13,75 ± 17,83^{в}
Кварцетин	20,06 ± 8,69^{б}	18,49 ± 5,34^{б}	34,78 ± 4,37^{а}	25,01 ±2,84^{б}	11,46 ± 6,01^{в}	5,26 ± 1,7^{с}
Камферол	4,42 ± 0,22^{c}	7,28 ± 2,42^{b}	7,40 ± 0,64^{b}	10,29 ± 5^{а}	13,78 ± 0^{а}	8,34 ±1,04^{в}
Галова киселина	4,52 ± 1,02^{б}	8,77 ± 0^{а}	10,79 ±0^{а}	11,69 ± 1^{а}	7,44 ± 0^{б}	Няма
Протокатехинова киселина	34,64 ± 0^{б}	45,82 ± 0^{а}	46,43 ± 0^{а}	44,78 ± 0,11^{а}	40,29 ± 2^{а}	Няма
Катехин	10,08 ± 0^{в}	21,73 ± 8,63^{б}	39,93 ± 4,59^{а}	15,87 ± 5,65^{б}	13,46 ± 8,46^{б}	11,74 ± 0^{в}
Салицилова киселина	39,57 ± 0^{в}	82,51 ± 8,41^{а}	89,62 ± 6,09^{а}	77,25 ± 5,69^{б}	57,77 ± 10,34^{б}	42,38 ± 38,53^{в}
Рутин	2,75 ± 0^{б}	Няма	Няма	0,18 ± 0^{в}	11,41 ± 0,05^{а}	1,93 ± 1^{б}
Хисперидин	40,91 ± 0^{в}	72,43 ± 66,4^{а}	82,24 ± 4,20^{а}	62,64 ±18,17^{б}	42,84 ± 37,91^{в}	39,98 ± 18,59^{в}
Епикатехин	44,71 ± 17,13^{в}	50,40 ± 8,33^{б}	64,86 ± 15,88^{а}	55,88 ± 6^{б}	22,92 ± 2,42^{г}	39,08 ± 1^{в}
Сирингова киселина	Няма	20,55 ± 2,88^{в}	37,69 ± 0,10^{а}	23,15 ± 2,56^{в}	30,15 ± 17,35^{б}	28,23 ± 0,97^{в}
Ванилова киселина	32,25 ± 0^{в}	44,26 ± 5,09^{в}	74,78 ± 93,47^{а}	59,46 ±2^{б}	59,83 ± 0^{б}	45,71 ± 0^{в}
п-Кумарова кислена	3,26 ± 00^{в}	26,19 ± 8,64^{а}	27,99 ± 11,30^{а}	28,49 ±9,04^{а}	22,94 ± 5,76^{а}	10,90 ± 7,96^{б}

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

4.2.2 Антиоксидантната активност

Анализа на антиоксидантната активност по 4 метода (Таблица 14) показва, че през първите дни от култивирането се забелязва нарастване на антиоксидантния потенциал, който през последните дни значително намалява. Експеримента показва че статистически неразличими са резултатите между 9-ти и 12-ти ден от култивирането при 3 от методите – CUPRAC (ден 9 - 55,19 ± 7,16 µM TE/g и ден

12 - 50,6 ± 5,27 µM TE/g) , FRAP (ден 9 - 10,50 ± 0,45 µM TE/g и ден 12 - 9,56 ± 0,48 µM TE/g) и DPPH (ден 9 - 6,17 ± 0,6 µM TE/g и ден 12 - 5,64 ± 0,41 µM TE/g).

Проведения корелационен анализ между акумулирането на общи полифеноли и DPPH (r=0.955), CUPRAC (r=0.850), FRAP (r=0.844), TEAC (r=0.744) показва най-висока степен на корелация при 9 ден от култивирането.

Таблица 14. Антиоксидантна активност на динамика на развитие на клетъчна суспензионна култура

	Ден 3	**Ден 6**	**Ден 9**	**Ден 12**	**Ден 15**	**Ден 18**	**Ден 21**
Cu-(II)-редуцираща активност, µM TE/g суха биомаса	46,60 ± 5,79^{б}	51,39 ± 6,71^{а}	55,19 ± 7,16^{а}	50,6 ± 5,27^{а}	58,65 ± 6,32^{а}	41,73 ± 5,49^{б}	37,65 ± 4,48^{в}
Fe-(III)-редуцираща активност, µM TE/g суха биомаса	4,84 ± 1,69^{в}	11,89 ± 1,4^{а}	10,50 ± 0,45^{а}	9,56 ± 0,48^{а}	11,74 ± 0,77^{а}	8,07 ± 1,02^{б}	5,01 ± 0,49^{в}
DPPH-радикал улавяща активност, µM TE/g суха биомаса	4,08 ± 0,63^{б}	5,30 ± 0,9^{б}	6,17 ± 0,6^{а}	5,64 ± 0,41^{а}	7,02 ± 0,52^{а}	3,28 ± 0,56^{в}	2,08 ± 0,83^{в}
ABTS радикал улавяща активност, µM TE/g суха биомаса	9,40 ± 3,18^{в}	19,89 ± 4,01^{а}	18,86 ± 2,69^{а}	15,85 ± 3,73^{б}	27,91 ± 2,63^{а}	10,47 ± 2,63^{б}	9,31 ± 1,34^{в}
Общи полифеноли, µM GAE/g суха биомаса	2,37 ± 0,24^{б}	2,26 ± 0,69^{б}	7,80 ± 0,2^{а}	7,58 ± 0,15^{а}	7,9 ± 0,2^{а}	1,55 ± 0,31^{в}	1,49 ± 0,54^{в}

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

4.2.3 Усвояване на амониеви, нитратни и фосфатни йони

Изследването на амониевите, нитратните и фосфатните йони е важен показател за развитието на културата през определените дни от култивирането. Усвояването им от хранителната среда е важен показател за растежа и продуцирането на полифенолни съединния. Графиките показват че през първите дни от култивирането най-интензивно се усвояват и амониевите и нитратните и

фосфатните йони, което асоциира с момента на продуциране на полифенолните съединения от таблицата и антиоксидантната активност. Вижда се че до 9-тия ден те са усвоени от културата, т.е тяхната концентрации в хранителната среда е определяща за продуцирането на метаболитите и началния етап от този процес.

4.3 Двуфакторна оптимизация на клетъчна суспензионна култура

За целите на настоящия експеримент е осъществено култивиране на клетъчна суспензионна култура на хранителна среда WP, но с различна комбинация от концентрация на захароза и соли на хранителна среда в продължение на 9 дни.

Използвани са следните варианти на комбинации:

1 – 15 g/L захароза, ½ WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

2 - 45 g/L захароза, ½ WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

3 - 15 g/L захароза, 1.5 WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

4 - 45 g/L захароза, 1.5 WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

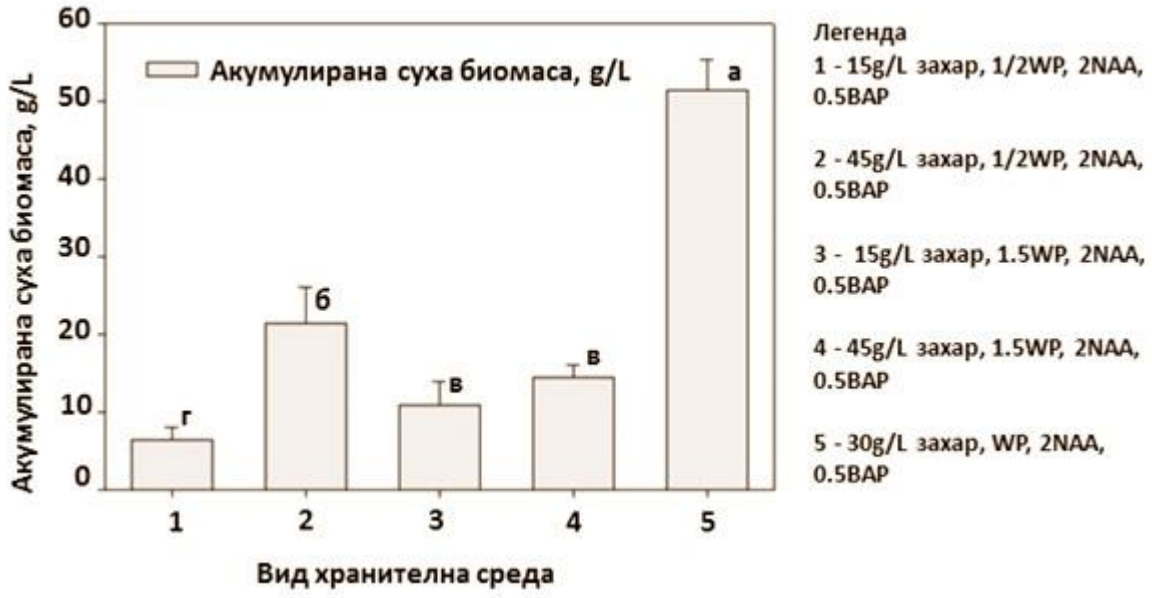
5 - 30 g/L захароза, WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

4.3.1 Акумулирана суха биомаса и вторични метаболити

При култивиране на клетъчна суспензионна култура на хранителни среди с различно съдържание на захароза и соли на среда

От фигура 13 представяща резултатите за акумулиране на суха биомаса, може да се види ясно, че максимален добив от 52,02 ± 1,03 g/L се получава при култиваране на хранителна среда обогатена с 30 g/L захароза, WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин. Най- нисък е добива от 7,05 ± 0,02 g/L при култивирането на хранителна среда обогатена с 15 g/L

захароза, ½ WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин.



Фигура 13. Проследяване на акумулираната суха биомаса при култивиране на клетъчна суспензионна култура на хранителни среди с различно съдържание на захароза и соли на среда

Като следващ важен етап от експеримента е проследяването на акумулирането на полифенолни съединения от суспензионната култура култивирана върху избраните хранителни среди.

Данните от таблица 15 показват, че хлорогенова киселина се открива в най-висока концентрация в хранителна среда номер 5 (30g/L захароза, WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин) 48,15 ± 2,78µg/g, и в най – ниска концентрация в хранителна среда номер 1 (15g/L захароза, 1/2WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин) 10,28 ± 1,27

μg/g, докато в културите култивирани на другите хранителни среди не се открива изобщо.

Таблица 15. Проследяване на акумулирането на полифенолни съединения от суспензионната култура култивирана върху избраните хранителни среди.

	15g/L захароза, 1/2WP, 2NAA, 0.5BAP	45g/L захароза, 1/2WP, 2NAA, 0.5BAP	15g/L захароза, 1.5WP, 2NAA, 0.5BAP	45g/L захароза, 1.5WP, 2NAA, 0.5BAP	30g/L захароза, WP, 2NAA, 0.5BAP
Хлорогенова киселина, μg/g	10,28 ± 1,27^{б}	Няма	Няма	Няма	48,15 ± 2,78^{а}
Кафеена киселина, μg/g	Няма	Няма	15,75 ± 0,83^{б}	21,73 ± 1,77^{а}	23,44 ± 0,99^{а}
Ферулова киселина, μg/g	11,90 ± 2,34^{б}	9,97 ± 2,98^{б}	11,27 ± 2,16^{б}	12,24 ± 2,19^{б}	15,34 ± 1,95^{а}
Розмаринова киселина, μg/g	25,43 ± 1,38^{в}	34,31 ± 6,20^{б}	20,66 ± 2,32^{в}	39,13 ± 2,67^{б}	96,19 ± 0,76^{а}
Кварцетин, μg/g	28,03 ± 2,98^{в}	75,07 ± 3,27^{б}	21,60 ± 17,34^{в}	71,30 ± 5,36^{б}	148,26 ± 4,97^{а}
Каемферол, μg/g	32,46 ± 3,98^{б}	15,49 ± 4,24^{в}	7,82 ± 5,02^{в}	39,43 ± 4,00^{б}	60,37 ± 1,34^{а}
Галова киселина, μg/g	10,63 ± 4,74^{в}	8,96 ± 1,95^{в}	10,17 ± 4,31^{в}	13,22 ± 2,78^{б}	16,95 ± 5,51^{а}
Протокатехинова киселина, μg/g	33,74 ± 4,43^{б,в}	46,48 ± 0,79^{б}	25,27 ± 7,25^{в}	41,32 ± 3,34^{б}	52,76 ± 12,91^{а}
Катехин, μg/g	Няма	Няма	10,14 ± 2,33^{б}	32,55 ± 7,23^{а}	34,99 ± 13,48^{а}
Салицилова киселина, μg/g	32,34 ± 4,58^{б}	47,73 ± 3,44^{б}	13,06 ± 3,08^{в}	45,92 ± 4,01^{б}	72,23 ± 3,60^{а}
Рутин, μg/g	27,08 ± 0,63^{в}	26,76 ± 1,73^{в}	24,81 ± 8,27^{в}	35,62 ± 6,86^{б}	49,14 ± 7,48^{а}
Хисперидин, μg/g	24,99 ± 0^{в}	27,60 ± 1,07^{в}	43,55 ± 3,897^{б}	74,71 ± 4,76^{а}	50,36 ± 0,28^{б}
Епикатехин, μg/g	29,78 ± 0^{в}	47,10 ± 4,51^{б}	45,43 ± 5,48^{б}	48,97 ± 8,29^{а}	51,01 ± 3,86^{а}
Сирингова киселина, μg/g	6,03 ± 3,47^{в}	25,44 ± 6,53^{а}	8,92 ± 1,31^{в}	10,35 ± 0,3^{б}	10,65 ± 2,2^{б}
Ванилова киселина, μg/g	95,24 ± 8,27^{б}	89,63 ± 2,39^{б}	45,90 ± 10,7^{в}	99,62 ± 8,48^{б}	298,20 ± 0,2^{а}
p-Комарова киселина, μg/g	8,85 ± 0,006^{в}	16,24 ± 1,87^{б}	11,46 ± 3,92^{в}	22,69 ± 0,03^{а}	15,31 ± 5,60^{б}

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

4.3.2 Антиоксидантна активност

Проведения анализ за антиоксидантна активност (Таблица 16) показва, че най-висок антиоксидантен потенциал имат културите култивирани на хранителна

среда номер 5 - 30g/L захароза, WP, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин (Таблица 22).

Нй-добър потенциал за редуциране на медните йони имакултурата култивирана на хранителна среда 5, или 45,48 ± 1,14 μM TE/g, и най-нисък на хранителна среда 1 – 7,30 ±0 ,48 μM TE/g. Статистически неразличими са данните са редуциране на железните йони при хранителна среда 4 и 5 съответно 9,82 ± 1,26 μM TE/g и 11,58 ± 2,40 μM TE/g, както и по отношение на потенциала за улавяне на ABTS радикал съответно 1,59 ± 0,41 μM TE/g и 2,20 ± 1,57 μM TE/g. С най-голям потенциал срещу DPPH радикала е културата култивирана на хранителна среда номер 5 - 26,58 ± 2,14 μM TE/g и с най-нисъкна хранителна среда 1 съответно 8,99 ± 1,89 μM TE/g.

Резултатите за общо полифенолно съдържание показват статистимески неразличими резултати за културите култивирани на ханителна среда 4 и 5, както се забеляза и от резултатите от проведения BEXT анализ съответно 1,81 ± 0,48 μM GAE/g и 2,01 ± 0,42 μM GAE/g

Таблица 16. Проследяване на антиоксидантната активност на клетъчна суспензионната култура култивирана върху избраните хранителни среди.

	15g/L захар, 1/2WP, 2NAA, 0.5BAP	**45g/L захар, 1/2WP, 2NAA, 0.5BAP**	**15g/L захар, 1.5WP, 2NAA, 0.5BAP**	**45g/L захар, 1.5WP, 2NAA, 0.5BAP**	**30g/L захар, WP, 2NAA, 0.5BAP**
Cu-(II)-редуцираща активност, μM TE/g суха биомаса	7,30 ± 0,48[в]	11,30 ± 0,56[в]	10,25 ± 0,54[в]	21,20 ±1,25[б]	45,48 ± 1,14[а]
Fe-(III)-редуцираща активност, μM TE/g суха биомаса	3,08 ± 1,89[б]	4,65 ± 1,92[б]	3,49 ± 1,03[б]	9,82 ± 1,26[а]	11,58 ± 2,40[а]
DPPH-радикал улавяща активност, μM TE/g суха биомаса	8,99 ± 1,89[в]	11,65 ± 1,83[б,в]	17,19 ± 3,17[б]	11,49 ± 1,08[б]	26,58 ± 2,14[а]
ABTS радикал улавяща активност, μM TE/g суха	3,62 ± 0,45[а]	3,32 ± 1,06[а]	2,08 ± 0,42[б]	1,59 ± 0,41[б]	2,20 ± 1,57[б]

биомаса					
Общи полифеноли, µM GAE/g суха биомаса	1,33 ± 0,17[б]	1,74 ± 0,14[а]	1,04 ± 0,007[б]	1,85 ± 0,48[а]	2,01 ± 0,42[а]

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

4.3.3 Оптимизационен плот и уравнение

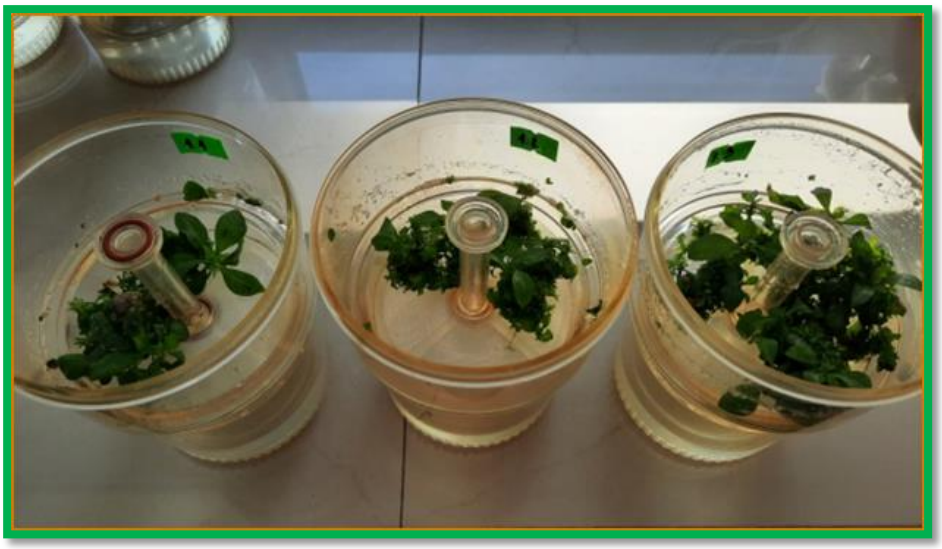
Извършена е оптимизация на клетъчната суспензионна култура по два основни параметъра концентрация на соли и захароза в хранителната среда като се използва програмен продукт (MINITAB 10.0). Резултата от проведения анализ затвърждава данните от експеримента за проследяване на полифенолното съдържание и антиоксидантната активност, като оптимална среда за развитие на културата е избрана WP, обогатена с 30g/L захароза, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин .

5. Оптимизиране на режим за култивиране на прорастъчна култура. Динамика. Оптимизация

5.1 Оптимизиране на режим за култивиране на прорастъчна култура.

На практика мащабирането на процеса за продукция на активни инградиенти от калусни и суспензионни култури е трудоемък и изпълнен с редица предизвикателства. Ето защо един по оптимален вариант за размножаване на ин витро култура и продукция на вторични метаболити за различни цели на козметиката, медицината и хранителната индустрия е мащабирането на процесите чрез използването на биоректорна система. В случая сме избрали да работим с биореакторна система с временно разбъркване /тип RITA/ (Фиг.14, Фиг.15, Фиг. 16).

През 2021 година Agustine Christela Melviana и неговия екип (Melviana A. C., и др. 2021) изследват влиянието на различни периоди на разбъркване на ин витро култура от *S. rebaudiana*, култивирана в биореактори с временно разбъркване и доказват че различните режими на разбъркване и аерация са критичен момент, който значително повлиява растежа на културата. С експеримента доказват че продуцирането на вторични метаболити е с по-висока концентрация при 15 мин разбъркване на всеки 6 часа, отколкото при 15 мин разбъркване на 3 часа и освен това скоростта на усвояване на веществата пряко се повлиява от различните периоди на култивиране (Melviana A. C., и др. 2021).



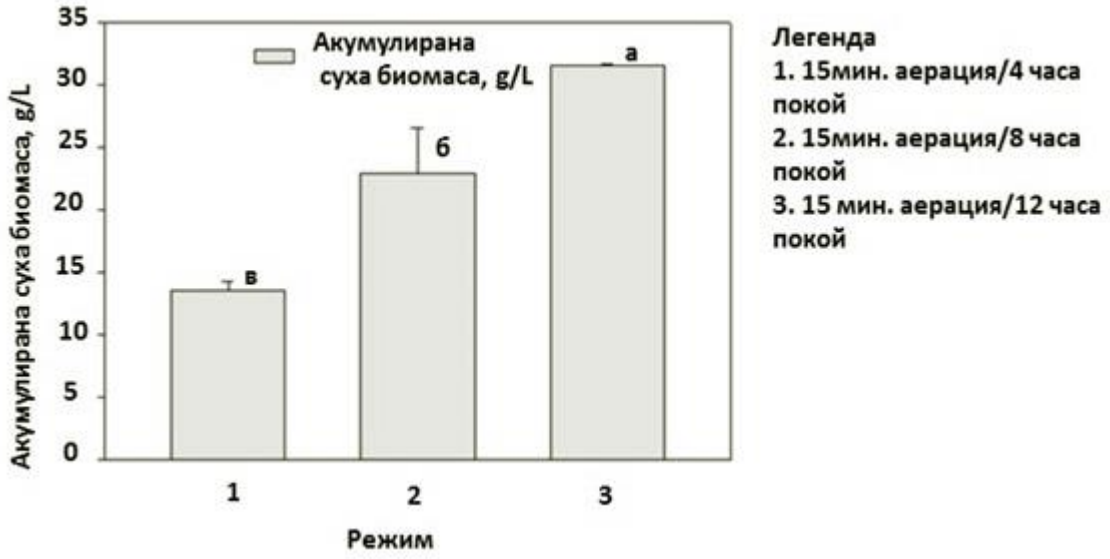
Фигура 14. Режим 1 - 15 мин аерация/4 часа покой

Фигура 15. Режим 2 - 15 мин аерация/8 часа покой

Фигура 16 Режим 3 – 15 мин аерация/12 часа покой

5.1.1 Акумулирана суха биомаса при избор на режим на култивиране

Изложената фигура 21 ни показва че най-голямо количество акумулирана суха биомаса е получена при култивирането на режим с 15 мин аерация и 12 часа покой съответно 32,02 ± 1,03 g/L и най-малко при култивирането на 15 мин аерация с 4 часа покой 14,02 ± 2,13 g/L (Фигура17).



Фигура 17 Проследяване на акумулирането на суха биомаса

В литературата се намират редица доказателства за това как режима на аерация влияе върху продуцирането на биомаса и растежа на културата. Например, за да се увеличи скоростта на растеж на *Charybdis numidica*, честотата на потапяне е удвоена от 5 минути/24 часа на 5 минути/12 часа. Оказва се обаче, че издънките стават много чувствителни към продължителния контакт с хранителната среда, което води до напълно хиперхидратирани издънки (Wawrosch, C., 2005). Изследван е ефектът на система с временно разъркване при две, четири и шест потапяния на ден върху производството на биомаса от *Cymbopogon citratus*. Максималните стойности на добива 66,2 g са получени при третиране на четири и шест потапяния на ден, докато стойностите на суха биомаса (6,4 g) са по-големи при честотата на четири потапяния на ден (Quiala, E., 2006). Значителни и отличителни разлики са регистрирани от Ahmadian и неговия екип (Ahmadian, M., 2017) *инвитро* размножаване на *Dianthus caryophyllus* с помощта на система

за временно разбъркване. Въпреки че увеличаването на времето на потапяне предизвиква най-голям брой нови издънки, се наблюдава най-висок процент на хиперхидратност. Тъй като хиперхидратацията е забележителен признак за неефективност на тези системи, най-желателното е четири потапяния от 2 минути/ден.

5.1.2 Синтез на вторични метаболити при култивиране на различни режими

От резултатите представени в таблица 17 се вижда, че при акумулирането на по-голямата част от полифенолните съединения, няма съществени разлики в тяхната концентрация при култивиране върху различни режими. Различните режими на култивиране оказват влияние върху някои от продуцираните метаболити като например най-висока концентрация на рутин е достигната при режим 3 (891,67 ± 122,29 µg/g) и най-ниска при режим 2 (126,85 ±0 µg/g).

През 2015 от екип учени (Ivanov. I., 2011), установяват че биосинтеза на алкалоиди от *L. Aestivum* значително се повлиява от режима на култивиране на прорастъчната култура. За да се оптимизират условията на продукция на вторичните метаболити и да се постигне оптимален добив на биомаса е важна не само хранителната среда, но и оптималния режим на аерация на културата в биореактора.

Таблица 17. Проследяване в акумулирането на полифеноли при култивиране на различни режими

	4 часа покой, 15мин аерация(Режим 1)	**8 часа покой, 15мин аерация(Режим 2)**	**12 часа покой, 15мин аерация(Режим 3)**
Хлорогенова киселина, µg/g	123,83±18,93*[а]	158,84±15,34[а]	164,82±32,36[а]
Кафеена киселина, µg/g	23,13±5,9[а]	18,83±6,68[а]	26,90±6,80[а]
Ферулова киселина, µg/g	103,06±10,97[а]	55,56±3,16[а]	39,47±4,51[а]
Салицилова киселина, µg/g	313,62±38,17[а]	284,49±17,04[а]	327,86±18,12[а]
Рутин, µg/g	519,65±11,11[б]	126,85±0[в]	891,67±122,29[а]
Хисперидин, µg/g	126,72±0[б]	132,94±6,07[а]	130,90±10,55[а,]
Розмаринова киселина, µg/g	355,24±38,25[б]	558,48±2,69[а]	559,19±19,85[а]

Кварцетин, µg/g	204,48±16,63[a]	306,46±77,25[a]	60,10±13,91[a]
Каемферол, µg/g	22,84±2,28[a]	37,47±8,61[a]	11,09±2,71[a]

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

5.1.3 Антиоксидантна активност

Резултатите в таблица 18 ясно показват, че измерването на антиоксидантната активност на метанолните екстракти от прорастъчна култура на жасминова гардения, няма големи разлики при различните режими на култивиране. Обаче при проведен статистически анализ корелацията е най-висока при режим 3 (15мин. аерация/12 часа покой) между метода за определяне на общи полифеноли и другите методи и е респективно при CUPRAC (r = 0.816), FRAP (r=0.823), DPPH (r=0.754), ABTS (r=0.743). Докато при режим 1 (15мин. аерация/4 часа покой) CUPRAC (r = 0.516), FRAP (r=0.497), DPPH (r=0.456), ABTS (r=0.323) и режим 2 (15мин. аерация/8 часа покой) CUPRAC (r = 0.421), FRAP (r=0.396), DPPH (r=0.322), ABTS (r=0.318) корелацията е ниска.

На базата на получените резултати за продуциране на суха биомаса, акумулиране на полифенолни съединения и антиоксидантна активност за следващата част от експериментите, а именно определяне на динамиката на развитие на културата и оптимизация на хранителната среда избираме да работим с режим 3 (15 мин. аерация и 12 часа покой).

Таблица 18. Проследяване на антиоксидантната активност при култивиране на различни режими

	4 часа покой, 15мин аерация	**8 часа покой, 15мин аерация**	**12 часа покой, 15мин аерация**
Cu-(II)-редуцираща активност, µM TE/g суха биомаса	39,66±5,8*[a]	37,60±5,71[a]	48,60±9,56[a]
Fe-(III)-редуцираща активност, µM TE/g суха биомаса	14,10±0,5[a]	13,23±1,49[a]	14,14±0,56[a]

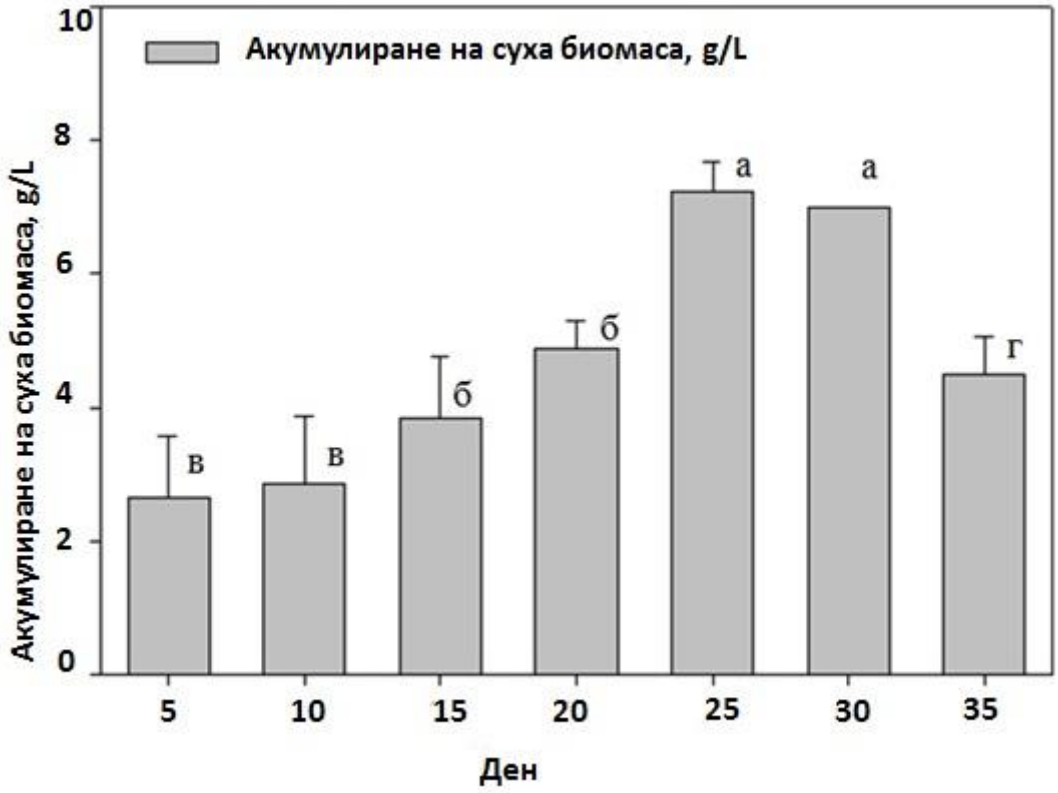
DPPH-радикал улавяща активност, µM TE/g суха биомаса	18,45±1,91[б]	21,32±1,14[б]	28,32±6,56[а]
ABTS радикал улавяща активност, µM TE/g суха биомаса	10,73±6,26[а]	12,47±1,7[а]	11,73±3,90[а]
Общи полифеноли, µM ГАЕ/g суха биомаса	2,25±0,19[а]	2,28±0,57[а]	2,32±0,52[а]

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

5.2 Динамиката на прорастъчна култура

5.2.1 Определяне на акумулирането на суха биомаса

Нарастване на количеството акумулирана суха биомасата се наблюдава през първите дни, като между 5 и 10 ден разликата в добива е статистически неразлима, а максималния добив се достига през 25 ден, съответно количеството е 7,88 ± 0,22 g/L и през 30 ден където добива е 7,79 ± 0,01 g/L. Проведения статистически анализ показва, че разликата между 25 и 30 ден е незначителна. Статистически различими обаче са стойностите при акумулиране на суха биомаса между 30 и 35 ден, където количеството продуцирана биомаса е 4,78 ±0,85, или продукцията на суха биомаса значително намалява след 30тия ден (фигура 18).



Фигура 18. Акумулиране на суха биомаса

5.2.2 Анализиране на измененията в усвояването на амониеви, нитратни и фосфатни йони

През първите дни от култувирането прорастъчната култура интензивно усвоява хранителни вещества, което обяснява и нарастването на продуцирането на суха биомаса през тези дни.

5.2.3 Синтез на вторични метаболити

Проведения статистически анализ за определяне на статистически различимите резултати от добива на полифенолни съединения показва че до 30 ден наблюдаваме нарастване на продуцираните метаболити, след което продуцирането им рязко намалява. Концентрациите на метаболитите през 35 ден са близки до тези през първите дни от култивирането и статистически значително по-ниски от тези през 30 ден (Таблица 19).

Таблица 19. Проследяване на промените в акумулирането на вторични метаболити

	Ден 5, µg/g	Ден 10, µg/g	Ден 15, µg/g	Ден 20, µg/g	Ден 25, µg/g	Ден 30, µg/g	Ден 35, µg/g
Хлорогенова киселина	257,67 ± 48,52^{в}	442,29 ± 20,08^{б}	400,25 ± 10,26^{б}	379,22 ± 33,65^{б}	399,28 ± 12,65^{б}	482,65 ± 4,69^{а}	266,15 ± 7,04^{в}
Кафеена киселна	94,54 ± 21,79^{б}	77,50 ± 55,47^{б}	123,71 ± 54,96^{а}	94,61 ± 6,71^{б}	95,81 ± 2,36^{б}	126,85 ± 59,89^{а}	36,91 ± 12,62^{в}
Ферулова киселина	62,84 ± 8,81^{б}	123,25 ± 55,30^{а}	103,40 ± 0,1^{а}	99,65 ± 30,93^{а}	67,42 ± 0,71^{б}	61,10 ± 2^{б}	122,55 ± 18,61^{а}
Рутин	126,60 ± 52,54^{в}	269,59 ± 20,39^{б}	361,15 ± 141,18^{б}	332, ± 15,47^{б}	222,19 ± 27,49^{б}	528,82 ± 191,00^{а}	154,29 ± 3,68^{в}
Роамаринова киселина	23,15 ±0^{в}	697,99 ± 302,08^{б}	1108,51 ± 174,05^{а}	1044,78 ± 8,69^{а}	612,35 ± 137,96^{б}	1182,64 ± 401,82^{а}	670,27 ± 169,01^{б}
Кварцетин	232,99 ± 5,76^{б}	289,38 ± 61,43^{б}	276,57 ± 11,35^{б}	482,67 ± 23,52^{а}	330,81 ± 3,44^{а}	493,81 ± 26,8^{а}	109,43 ± 116,00^{в}
Камферол	Няма	42,40 ± 2,3^{в}	66,13 ± 1,56^{б}	158,07 ± 14,01^{а}	116,14 ± 16,42^{а}	63,31 ± 8,22^{б}	144,68 ± 3,87^{а}
Салицилова киселина	254,129 ± 37,87^{б}	263,95 ± 3,24^{б}	286,71 ± 20,72^{б}	516,80 ± 22,53^{б}	296,32 ± 20,22^{б}	660,99 ± 3^{а}	210,99 ± 15,73^{б}
Хисперидин	ND^{в}	4,75 ± 1,54^{в}	4,59 ± 0,69^{в}	13,97 ± 11,02^{б}	24,54 ± 3,9^{б}	33,74 ± 21,81^{а}	6,87 ± 0,7^{в}

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

5.2.4 Антиоксидантната активност

Антиоксидантния потенциал на анализираните култури показва че статистически различими са резултатите между 30 ден и първите дни на култивиране и тези от 35 ден, като тогава са значително по-ниски. Проведения корелационен анализ между акумулирането на общи полифеноли и DPPH

(r=0.905), CUPRAC (r=0.899), FRAP (r=0.856), TEAC (r=0.844) показва най-висока степен на корелация при 30 ден от култивирането (Таблица 20).

Таблица 20. Проследяване на промените в антиоксидантната активност

	Ден 5	**Ден 10**	**Ден 15**	**Ден 20**	**Ден 25**	**Ден 30**	**Ден 35**
Cu-(II)-редуцираща активност, µM TE/g суха биомаса	21,82 ± 3,29^{г}	55,26 ± 3,88^{б}	48,98 ± 4,08^{в}	69,41 ± 11,22^{а}	33,51 ± 7,50^{г}	41,91 ± 4,73^{в}	45,81 ± 0,84^{в}
Fe-(III)-редуцираща активност, µM TE/g суха биомаса	15,94 ± 4,69^{в}	23,49 ± 4,85^{б}	25,8 ± 4,11^{б}	27,93 ± 2,77^{б}	37,69 ± 2,87^{а}	38,59 ± 2,42^{а}	21,25 ± 0,77^{б}
DPPH-радикал улавяща активност, µM TE/g суха биомаса	19,85 ± 4,75^{в}	17,21 ± 1,9^{в}	23,06 ± 2,86^{б}	26,47 ± 3,59^{а}	25,97 ± 3,24^{б}	30,31 ± 3,33^{а}	16,27 ± 1,08^{в}
ABTS радикал улавяща активност, µM TE/g суха биомаса	5,60 ± 2,69^{в}	12,51 ± 0,46^{б}	15,85 ± 1,14^{б}	17,93 ± 0,79^{а}	15,62 ± 0,79^{б}	14,37 ± 1,54^{б}	10,51 ± 0,72^{в}
Общи полифеноли, µM ГАЕ/g суха биомаса	4,65 ± 0,4^{а}	3,44 ± 0,65^{б}	4,14 ± 0,57^{а}	3,98 ± 0,39^{б}	3,52 ± 0,34^{б}	5,52 ± 0,59^{а}	3,10 ± 0,39^{б}

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

5.3 Двуфакторна оптимизация

За целите на настоящия експеримент е осъществено култивиране на клетъчна суспензионна култура на хранителна среда WP, но с различна комбинация от концентрация на захар и соли на хранителна среда в продължение на 30 дни.

Съдържанието на хранителния разтвор, използван при система с временно разбъркване, играе ключова роля в растежа на растенията. Трябва също така да се отбележи, че в някои случаи течната култура в система с временно разбъркване може да допринесе за използването на по-малък брой минерални соли в сравнение с конвенционалната култура в полутвърда среда. Използването на течна среда, в допълнение към намаляването на производствените разходи чрез елиминиране на желиращия агент (Jova, M.C.. 2008) допринася за по-ефективно използване на културалната среда, тъй като експлантите са в пряк контакт с течната среда по време на периода на култивиране и може да абсорбира хранителните вещества по-ефективно (Watt, P., 2012).

Използвани са следните варианти на комбинации

1 – 15 g/L захароза, ½ MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

2 - 45 g/L захароза, ½ MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

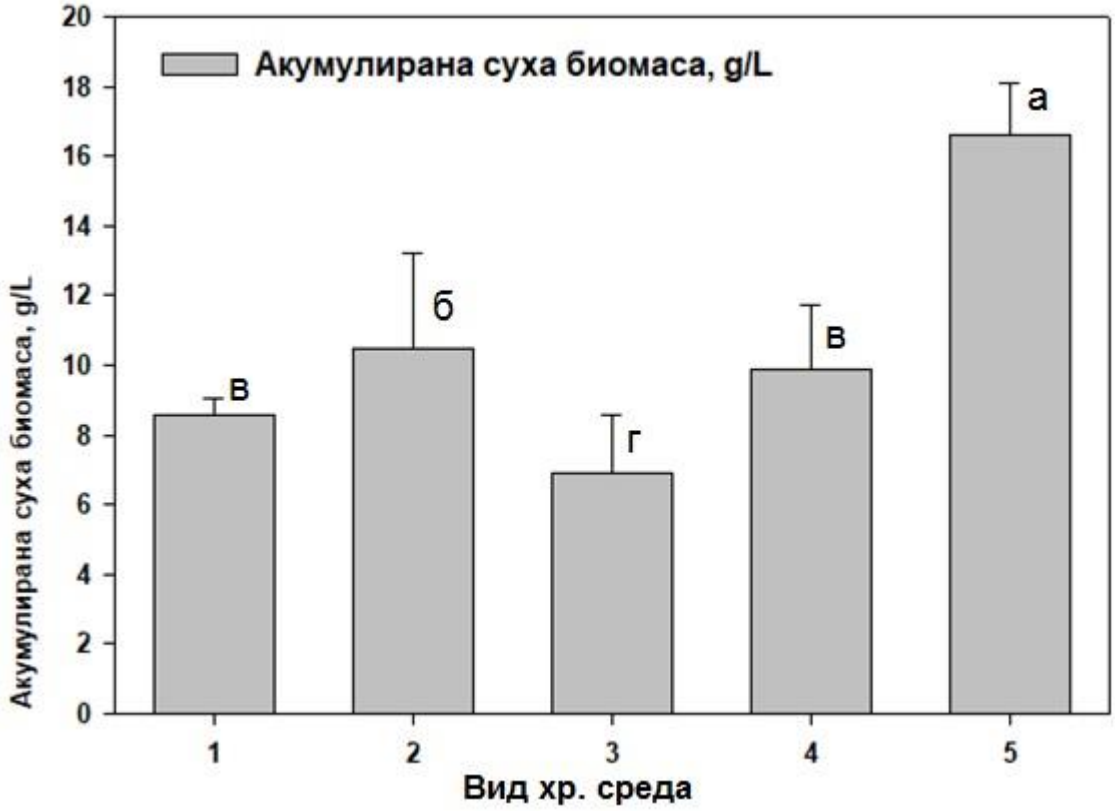
3 - 15 g/L захароза, 1.5 MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

4 - 45 g/L захароза, 1.5 MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

5 - 30 g/L захароза, MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин

5.3.1 Акумулиране на суха биомаса и синтез на вторични метаболити

Максимален добив на суха биомаса е достигнат при култивиране на хранителна среда 30 g/L захароза, MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин съответно 17,05 ± 1,22 g/L суха биомаса, и най-нисък е добива при култивирането на хранителна среда номер 5 (15 g/L захароза, 1.5 MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин) 7,55 ± 0,69 g/L суха биомаса (Фигура 19).



Фигура 19. Акумулиране на суха биомаса

Ефектът на компонентите, присъстващи в течната културална среда, е от голямо значение на развитие на културата в системата система с временно разбъркване, както е демонстрирано от Benelli и De Carlo (Benelli, C., 2018) за микроразмножаване на маслинови дървета с помощта на PlantForm с цикъл от 8 min/16 h.

Някои автори са наблюдавали ефекта на различните концентрации на захароза в субстрата на културата върху производството на биомаса. По-специално при растителни култури *Curcuma zedoaria*, *Zingiber zerumbet*, *Gynura procumbens* и

Bletilla striata се доказва, че по-висока концентрация на захар подобрява ефективността на експлантите (Zhang, B., 2018; Stanly, C., 2010; Manuhara, Y.S.W.p 2017).

Проведения анализ за полифенолно съдържание ясно показва статистическите разлики при култивирането върху хранителни среди с различна концентрация на захар и соли (Таблица 21). Забелязва се, че най-висок добив на хлорогенова киселина, рутин, кварцетин, хисперидин и салицилова киселина се открива при култивиране на хранителна среда номер 5 (30 g/L захароза, MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин) или съответно 645,41 ± 56,66 µg/g, 19,86 ± 0,05 µg/g, 22,44 ± 3,37 µg/g, 252,62 ± 11,87 µg/g, 450 ± 15,97 µg/g. Най-ниски и статистически различими от култивирането на другите хранителни среди са концентрациите на метаболитите при хранителна среда номер 1 (15 g/L захароза, ½ MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин).

Таблица 21. Проследяване при акумулиране на полифенолни съединения

	15g/L захар, 1/2MS, 4BAP	**45g/L захар, 1/2MS, 4BAP**	**15g/L захар, 1.5MS, 4BAP**	**45g/L захар, 1.5MS, 4BAP**	**30g/L захар, MS, 4BAP**
Хлорогенова киселина, µg/g	Няма	28,30 ± 0,05^{в}	12,13 ± 1,49^{в}	288,78 ± 41,18^{б}	645,41 ± 56,66^{а}
Кафеена киселина, µg/g	26,16 ± 1,24^{в}	46,34 ± 5,22^{б}	14,40 ± 2,82^{в}	22,41 ± 0,2^{в}	67,49 ± 18,76^{а}
Ферулова киселина, µg/g	5,93 ± 0,28^{а}	8,01 ± 2,25^{а}	8,70 ± 1,45^{а}	8,95 ± 0,64^{а}	10,89 ± 0,22^{а}
Рутин, µg/g	4,84 ± 0,9^{б}	Няма	2,18 ± 0,19^{б}	8,86 ± 0,24^{б}	19,86 ± 0,05^{а}
Розмаринова киселина, µg/g	188,77 ± 8,07^{в}	263,03 ± 13,52^{б}	360,39 ± 7,3^{а}	314,74 ± 12,89^{а}	365,05 ± 29,03^{а}
Кварцетин, µg/g	13,90 ± 0,8^{а}	5,25 ± 0,09^{в}	1,86 ± 0,19^{в}	14,39 ± 0,09^{б}	22,44 ± 3,37^{а}

Каемферол, µg/g	1,44 ± 0,006[в]	24,41490912[б]	33,25 ± 5,87[а]	33,15 ± 0,88[а]	29,78 ± 0,74[а]
Салицилова киселина, µg/g	48,29 ± 5,57[в]	114,81 ± 13,89[б]	90,12 ± 4,72[б]	83,88 ± 9,81[б]	252,62 ± 11,87[а]
Хисперидин, µg/g	6,20 ± 0,9[в]	24,78 ± 2,72[б]	33,12 ± 7,65[б]	18,21 ± 4,13[в]	450,40 ± 15,97[а]

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

В литературата се откриват различни примери за това как модифицирана хранителна среда с по-малко или повече от съответните компоненти може да влияе върху окумулирането на фенолни съединения. Например, съдържанието на общи фенолни съединения, както и фенилетаноидни гликозиди вербаскозид и изовербаскозид, се повишават в издънките на *Castilleja tenuiflora*, изложени на модифицирана културална среда B5, съдържаща по-малко количества азот, използвайки система с временно разбъркване при 5 min/24 h (Medina-Pérez, V., 2015).

Също така комбинацията от елиситор (Chitoplant®) и биореактор с два съда и система с временно разбъркване, като надеждна алтернатива за генетичната модификация, увеличава производството на карденолиди 2,2 пъти в издънките на *Digitalis lanata* (Pérez-Alonso, N., 2012) и значително подобрява съдържанието на галантамин в листата и луковиците на *Leucojum aestivum* (Schumann, A., 2013) и стимулира производството на тапсигаргин и нортрилоболид in vitro издънки на *Thapsia garganica* (López, C.Q., 2018). Освен това, предизвикването индуцира производството и натрупването на фенилпропаноидни метаболити както в акумулираната биомаса, така и в културална среда на *Aristotelia chilensis* (Trentini, G.E., 2021)

Тъй като концентрацията и типът на компонентите често се считат за решаващ фактор за натрупването на вторични метаболити, Langhansova и нейния екип (Langhansova, L.. 2012) установяват, че среда, съдържаща бензо[b]селененил оцетна киселина и кинетин, е най-подходяща за широкомащабно производство

на сапонин в Panax ginseng, култивиран в биореактор RITA® система с временно разбъркване.

5.3.2 Антиоксидантната активност

Статистическия анализ ясно показва най-висока антиоксидантна активност при културите култивирани на хранителна среда номер 5 - 15 g/L захароза, ½ MS, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин (Таблица 22).

Таблица 22. Проследяване на промените в антиоксидантната активност

	15g/L захароза, 1/2MS, 4BAP	**45g/L захароза, 1/2MS, 4BAP**	**15g/L захароза, 1.5MS, 4BAP**	**45g/L захароза, 1.5MS 4BAP**	**30g/L захароза, MS, 4BAP**
Cu-(II)-редуцираща активност, µM TE/g суха биомаса	27.50± 8.02 в	44.67 ± 3.14 в	34.99± 3.50 в	55.05± 2.33 б	48.72± 4.38 а
Fe-(III)-редуцираща активност, µM TE/g суха биомаса	15.41± 1.52 б	17.17± 2.51 б	19.90± 1.47 б	22.30± 0.95 а	26.00± 3.85 а
DPPH-радикал улавяща активност, µM TE/g суха биомаса	12.30 ±1.11 в	20.22± 1.31 б	19.10 ±1.59 б	25.27± 1.59 б	25.01± 2.27 а
ABTS радикал улавяща активност, µM TE/g суха биомаса	2.73± 0.4 в	5.71± 0.56 а	4.24± 0.99 в	5.55± 0.98 б	4.69± 0.89 б
Общи полифеноли, µM ГАЕ/g суха биомаса	1.41± 0.25 б	2.80± 0.16 а	2.46± 0.05 б	2.87± 0.14 а	4.88± 0.09 а

- Данните са представени ±SD и брой повторения = 3. Стойностите които нямат еднаква буква, показват съществени разлики в концентрациите ($p<0.05$, ANOVA Tukey pairwise comperision of means)

5.3.3 Оптимизационен плот и уравнение

Извършена е оптимизация на клетъчната суспензионна култура по два основни параметъра - концентрация на соли и захароза в хранителната среда, като се използва програмен продукт (MINITAB 10.0). Резултата от проведения анализ затвърждава данните от експеримента за проследяване на полифенолното съдържание и антиоксидантната активност, като оптимална среда за развитие на културата е избрана MS, обогатена с 30g/L захар, 2.0 mg/L 1-нафтилоцетна киселина и 0.5 mg/L 6-бензиламинопурин.

6. Проследяване на генетичната стабилност

Резултатите от молекулярното изследване показват, че израните маркери са адекватни и подходящи за целите на дисертацията, като могат да се използват за проследяване на настъпващите генетични промени при *инвитро* култури от гардения.

В литературата не се намират достатъчно налични данни по отношение на изследване на връзката между продължителността на култивиране на *инвитро* култура получена от жасминова гардения, промените в състава на хранителната среда и сомоклоналната вариабилност.

Изказват се предположения до каква степен условията на култивиране *инвитро* влияят на генетичната стабилност, и как това влияее на променливостта в броя и структурата на хромозомите (Moradi, Z., и др., 2017).
Колкото по-дълго една култура се поддържа *инвитро*, толкова по-голяма е възможността за възникване на сомаклоналната вариация (Kuznetsova et al. 2006; Gao et al. 2010; Farahani et al. 2011; Jevremović et al. 2012; Sun et al. 2013).
Освен това техниките за размножаване на тъканни култури по време на микроразмножаване може да повлияе на нейната генетична стабилност.

Clarindo et al. (2012) стига до извода, че е необходимо суспензии от агрегатни клетки от кафе да се субкултивират не повече от 4 месеца тъй като е забелязана нестабилност на плоидността при дългосрочно *инвитро* култивиране.

Не само броят на субкултурите, но и продължителността също допринася за повишаване на скоростта на сомаклоналните вариации, особено при клетъчни суспензии и калусни култури (Bairu et al. 2006; Sun et al. 2013). Проучванията показват, че сомаклоналната вариация е по-очевидна при растения, регенерирани от дългосрочно култивирани *инвитро* култури (Etienne and Bertrand 2003).

6.1 Генетична стабилност при продължително култивиране на клетъчна суспензионна култура

Данните показват (Таблица 23 и Фигура 20), че всички използвани SSRs, имат повече от три алела и могат да се използват за оценка на настъпващите генетични промени при проследяване на динамиката на развитието на клетъчната суспензионна култура. Най-високо съдържание на полиморфна информация ни дава използването на маркери GJ04, GJ08, GJ09, GJ17, GJ03 съответно PIC=0.914, PIC=0.910, PIC=0.911, PIC=0.901, PIC=0.947. Броят на откритите алели Na варира от 2 до 22 със средно 13 ± 1.73, а броят на ефективните алели Ne варира от 1 до 14 със средно 8.16 ± 0.70, като посочените стойности потвърждават възникналите генетични вариации при култивирането на клетъчната суспензионна култура. Това твърдение се потвърждава още веднъж и от стойностите на очаквана и наблюдавана хетерозиготност съответно He = 0.98 ± 0.000 и Ho = 1 ± 0.

Таблица 23. Генетична стабилност при продължително култивиране на клетъчна суспензионна култура

SSR Locus	Na	Ne	Ho	He	PIC
eGJ010	2	1	1	1	0,375
eGJ118	0	0	0	0	0

eGJ144	0	0	0	0	0
GJ04	15	9	1	0,974	0,914
GJ08	12	6	1	1	0,91
GJ09	15	12	1	0,957	0,911
GJ10	0	0	0	0	0
GJ16	9	6	1	0,955	0,862
GJ17	12	7	1	0,978	0,901
GJ02	0	0	0	0	0
GJ03	22	14	1	0,984	0,947
Average	**13**	**8,166667**	**1**	**0,982167**	**0,826333**
SD	**1,732051**	**0,707107**	**0**	**0,00021**	**0,002082**

Фигура 20. Проследяване на генетичната изменчивост

6.2 Генетична стабилност при промяна в концентрацията на компонентите на хранителната среда на клетъчна суспенионна култура

Данните показват (Таблица 24), че от всички използвани SSRs, само 2 от тях, а именно GJ08 и GJ03 и могат да се използват за оценка на настъпващите генетични промени при оптимизация на развитието на клетъчната суспензионна култура. Най-високо съдържание на полиморфна информация ни дава използването на GJ08 съответно PIC=0.926, и GJ03 PIC=0,891.

Таблица 24. Генетична стабилност при промяна в концентрацията на компонентите на хранителната среда на клетъчна суспензионна култура

SSR Locus	Na	Ne	Ho	He	PIC
eGJ010	0	0	0	0	0
eGJ118	0	0	0	0	0
eGJ144	0	0	0	0	0
GJ04	0	0	0	0	0
GJ08	17	10	1	0,979	0,926
GJ09	0	0	0	0	0
GJ10	0	0	0	0	0
GJ16	0	0	0	0	0
GJ17	0	0	0	0	0
GJ02	0	0	0	0	0
GJ03	11	12	1	0,938	0,891
Average	**14**	**11**	**1**	**0,9585**	**0,9085**
SD	**4,242641**	**1,414214**	**0**	**0,028991**	**0,024749**

6.3 Генетичната изменчивост при продължително култивиране на прорастъчна култура

Броят на откритите алели Na варира от 4 до 22 със средно 16 ± 2.31, а броят на ефективните алели Ne варира от 2 до 16 със средно 10.66 ± 2.30, като посочените стойности потвърждават възникналите генетични вариации при култивирането на проастъчна култура. Това твърдение се потвърждава още веднъж и от стойностите на очаквана и наблюдавана хетерозиготност съответно He = 0.97 ± 0.010 и Ho = 0,91 ± 0.02 (Таблица 25)

Таблица 25. Генетична стабилност при продължително култувиране на прорастъчна култура

SSR Locus	Na	Ne	Ho	He	PIC
eGJ010	0	0	0	0	0
eGJ118	0	0	0	0	0
eGJ144	4	2	1	1	0,703
GJ04	4	2	1	1	0,703
GJ08	15	10	1	0,958	0,904
GJ09	11	6	1	0,985	0,895
GJ10	0	0	0	0	0
GJ16	11	6	1	0,985	0,895
GJ17	4	2	1	1	0,703

GJ02	4	2	1	1	0,703
GJ03	22	16	1	0,978	0,945
Average	**16**	**10,66667**	**1**	**0,973667**	**0,914667**
SD	**2,309401**	**2,309401**	**0**	**0,012767**	**0,02388**

Фигура 21. Проследяване на генетичната изменчивост

6.4 Генетична стабилност при промяна в концентрацията на компонентите на хранителната среда на прорастъчна култура

Най-високо съдържание на полиморфна информация ни дава използването на GJ08 съответно PIC=0.931, и GJ03 PIC=0,942. Броят на откритите алели Na варира от 17 до 20 със средно 18.5 ± 2.12, а броят на ефективните алели Ne варира от 10 до 12 със средно 11 ± 1,41, като посочените стойности потвърждават възникналите генетични вариации при култивирането на клетъчната суспензионна култура (Таблица 26).

Това твърдение се потвърждава още веднъж и от стойностите на очаквана и наблюдавана хетерозиготност съответно He = 0.98 ± 0.001 и Ho = 0,93 ± 0,007.

Съответно промяната на хранителната среда както при суспензионните култури така и при прорастъчните култури, оказва минимално влияние върху генетичната стабилност.

Таблица 26. Генетична стабилност при промяна в концентрацията на компонентите на хранителната среда на прорастъчна култура

SSR Locus	Na	Ne	Ho	He	PIC
eGJ010	0	0	0	0	0
eGJ118	0	0	0	0	0
eGJ144	0	0	0	0	0
GJ04	0	0	0	0	0
GJ08	17	10	1	0,984	0,931
GJ09	0	0	0	0	0
GJ10	0	0	0	0	0
GJ16	0	0	0	0	0
GJ17	0	0	0	0	0
GJ02	0	0	0	0	0
GJ03	20	12	1	0,986	0,942
Average	**18,5**	**11**	**1**	**0,985**	**0,9365**
SD	**2,12132**	**1,414214**	**0**	**0,001414**	**0,007778**

Вижда се, че култивирането на растителни тъкани *инвитро* води до увеличаване на генетичната вариабилност. Както се вижда от получените резултатите нивото на генетична изменчивост на култивираните растителни клетки, зависи от продължителността на тяхното култивиране *инвитро*.

Млади клетъчни култури в първите месеци на култивиране се характеризират с увеличаване на хетерогенността (Armstrong, C.L. and Phillips, R.L 1988; Fras, A. and Maluszynska, J., 2003).

Както се забелязва при направените анализи чрез използването на SSR маркери, най-големи промени в генетичната стабилност при суспензионни и прорастъчни

култури от жасминова гардения, се наблюдават при проследяване на продължителността на култивирането на културите. При някои култури дългосрочно култивираните клетки обикновено са характеризиращи се със стабилизиране на генома, придружено чрез поддържане на постоянно ниво на плоидност и намаляване на степента на мутация (Cote, F.X., 2001; Kuznetsova, O.I., и др., 2006). Едно от обясненията е фактът, че продължителното култивиране е резултат от дълга поредица от митози, по време на които множество мутации се появяват спонтанно и неконтролирано, и колкото по-голям е броят на субкултурите, толкова повече тези мутации могат да засегнат по-голямо количество генетичен материал (Nwauzoma, A.B., 2013). Ефектът от дългосрочното инвитро култивирането върху *A. thaliana* не е довело до стабилност на генома при проучвания проведени до момента.

Съответно, еднозначно заключение за всички типове *инвитро* култури или растения, дали самоклоналната вариация се променя в зависимост от периода на култивиране не може да се направи, защото всяко растение има различен характер по отношение на генетичната стабилност култивирано в различните *инвитро* системи за различен период от време.

IV. ИЗВОДИ

1. Установени са динамиките на растеж и развитие на изследваните инвитро култури и е оптимизирана хранителна среда за култивиране на диференцирани (прорастъчни) и дедиференцирани (клетъчна суспензия), *инвитро* култури от *Gardenia jasminoides* Ellis

2. Прорастъчната култура акумулира фенолни съединения в концентрации по-големи или близки до тези на изходното растение, докато при калуса и суспензионната култура концентрациите на фенолните съединения са по - ниски. Антиоксидантния потенциал на недеференцираните инвитро култури (калус и клетъчна суспензия) е по - нисък от този на диференцираната култура и листата от гардения.

3. Установено е, че генетичната изменчивост е в най – силна зависимост от възрастта на културата и възниква с най – висок интензитет в експоненциалната фаза наразвитие. Промените в състава на хранителната среда указват минимално влияние върху измененията в генетичната стабилност на културата.

4. В зависимост от степента на диференциация на културата, изследванията показват, че клетъчната суспензия има най – висока генетична стабилност и близост да тази на изходното растение. Най – висока генетична вариабилност се наблюдава в диференцираната прорастъчна култура.

5. Относно първичните метаболити, най-голямо е генетичното сходство между растението и клетъчната култура, а при биосинтеза на фенолните съединения диференцираната прорастъчна култура продуцира повече фенолни съединения и дори превъзхожда изходното растение.

7. Установено е, че диференцираната прорастъчна култура притежава най – висок потенциал за разработване на биотехнологичен метод за производство на фенолни съединения от *G. jasminoides* Ellis с висок антиоксидантен потенциал. Поради високия риск от генетична изменчивост най-рационално е културата да се поддържа посредством криопрезервация или субкултивиране в по - кратки периоди.

V. ПРИНОСИ

1. Получени са диференцирани (прорастъчни) и дедиференцирани (калус и клетъчна суспензия) инвитро култури от *Gardenia jasminoides* Ellis

2. Изследвани са за първи път разликите в метаболитния профил и антиоксидантната активност на получените *инвитро* системи и *Gardenia jasminoides* Ellis.

3. Изследвана е за първи път генетичната стабилност на диференцирана и дедиференцирана култура по време на изследване на динамиката на развитие както и при промяната на основни компоненти от хранителната среда.

4. Изследвана е за първи път генетичната стабилност на диференцирани и дедиференцирани *инвитро* системи срямо тази на изходното растение.

5. Установени са за първи път връзките на промени в метаболитния профил и генетичната изменчивост по време на култивирането на диференцирани и дедиференцирани *инвитро* култури от гардения.

VI. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Krasteva Gergana, Vasil Georgiev, and Atanas Pavlov; Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods; *Engineering in Life Sciences* 21, no. 3-4 (2021): 68-76. (**IF 2020 – 2.678**), **Q2**

2. Krasteva, Gergana, et al. "Metabolite Profiling of Gardenia jasminoides Ellis In Vitro Cultures with Different Levels of Differentiation." *Molecules* 27.24 (2022): 8906. **(IF 2022 – 4.600)**

3 Krasteva, Gergana. "Effect of basal medium on growth and polyphenols accumulation by Gardenia jasminoides Ellis cell suspension." *BIO Web of Conferences*. Vol. 45. EDP Sciences, 2022.

4 Krasteva, Gergana. "Cultivation of Gardenia jasminoides shoots in temporary immersion systems and optimization of the immersion periods." *BIO Web of Conferences*. Vol. 58. EDP Sciences, 2023.

Цитирания на публикациите свързани с дисертационния труд /без автоцитирания/ - 136

ДОКЛАДВАНЕ ПРЕД НАУЧНИ МЕРОПРИЯТИЯ В СТРАНАТА И ЧУЖБИНА

1 .Докладване пред научно мероприятие в чужбина – European federation of biotechnology 2021

2. Докладване пред научно мероприятие в страната –

68-МА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ – „ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И ТЕХНОЛОГИИ - 2021”

69-ТА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ – „ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И ТЕХНОЛОГИИ - 2022”