

Проект ДН06/7-2016 г. Фитохимично и молекулярно-
генетично характеризиране на лечебни растения от
семейство *Lamiaceae* с високо съдържание на биологично
активни вещества

Бенефициент: ИФРГ-БАН

Партньор - АБИ-ССА



Членове на научния колектив

Базова организация - ИФРГ-БАН	Партньорска организация - АБИ-ССА
Проф. д-р Ира Станчева-ръководител	Проф. дн Иван Атанасов
Доц. д-р Мария Генева	Доц. д-р Красимир Русанов
Доц. д-р Ели Зайова	Доц. д-р Цветанка Хвърлева
Доц. д-р Румяна Василевска-Иванова	Мила Русанова
Гл.ас. д-р Мариета Христозкова	Цветелина Загорчева
Гл.ас. д-р Мария Петрова	Румяна Велчева
Мадлен Бойчинова	
Марияна Сичанова	
Жанет Минчева	

Hyssopus officinalis L. (исоп) и *Origanum heracleoticum* (бял гръцки риган) са лечебни и ароматни растения от семейство *Lamiaceae* (устоцветни), които са използвани широко в медицината, фитотерапията и хранителната индустрия като източник на биологично активни субстанции в това число и етерични масла.

Тези видове са избрани не само поради тяхното икономическо значение като източници на ценни метаболити - етерични масла и антиоксиданти, но също така и поради тяхното успешно *in vitro* култивиране. Напоследък има данни за прилагане на молекулярни маркери за характеризиране на генетични ресурси от тези медицински растения.

Основната цел на настоящия проект е подбор на висококачествени растения от природни популации на исоп и риган, чрез характеризиране с фитохимични и молекулярни маркери и тяхното *in vitro* размножаване и адаптиране в естествени условия.





a



b

c



d

Коренообразуване при *H. officinalis* на $\frac{1}{2}$ MS среда с добавяне на: a) 0.1 mg l^{-1} IBA, b) 0.1 mg l^{-1} NAA c) 0.1 mg l^{-1} IAA, d) *Ex vitro* адаптирано растение.



Вкоренени растения от *Origanum heracleoticum*

Микроразмножаването е една от техниките, която може да бъде прилагана за широко мащабно размножаване на растенията, за сравнително кратко време. Различни фактори като качество на експланта, комбинирането и концентрацията на растежни регулатори повлияват ефективността на този процес.



Начален растителен материал

За *in vitro* култивиране бяха използвани връхчета на стъблата от жизнени растения с дължина 2-3 cm.

Стерилизиране

Експлантите бяха стерилизирани с 0.04% разтвор на живачен двухлорид за 20 минути и обилно изплакнати с дестилирана вода – до 3 пъти.

Варианти:

- MS
- MS + 0.1 mg L⁻¹ ИМК
- ½ MS
- ½ MS + 0.1 mg L⁻¹ ИМК

Влияние на ИМК (индолил-3 –маслена киселина) добавена към пълна и ½ среда на Murashige and Skoog (MS) среда върху микроразмножаването и вкореняването на *Hyssopus officinalis*

Хранителна среда	Брой разклонения растение ⁻¹	Височина на стъблата, cm	Вкореняване %	Брой корени растение ⁻¹	Дължина на корените cm
MS	0	1.2±0.04	15	1.1±0.07	0.9±0.12
MS + 0.1 mg L ⁻¹ ИМК	0.8±0.05	1.3±0.06	50	1.7±0.06	1.2±0.04
½ MS	1.6±0.07	1.8±0.09	55	1.3±0.04	1.1±0.03
½ MS + 0.1 mg L ⁻¹ ИМК	2.4±0.15	2.1±0.12	70	2.1±0.14	1.6±0.08



Протоколът за микроразмножаване позволява значително намаляване на трудовите дейности, разходите за растежните регулатори и времето за производство на растения *in vitro*.

Влияние на ИМК (индолил-3 –маслена киселина) на пълна и ½ среда на Murashige and Skoog (MS) върху микроразмножаването и вкореняването на *Oreganum heracleoticum*

Хранителна среда	Брой разклонения растение ⁻¹	Височина на стъблата cm	Вкореня ване %	Брой корени растение ⁻¹	Дължина на корените cm
MS	1.0±0.08	0.9±0.07	0	0	0
MS + 0.1 mg L ⁻¹ ИМК	1.4±0.12	1.7±0.15	65	2.2±0.18	1.5±0.15
½ MS	1.5±0.14	2.4±0.21	40	0.9±0.08	2.4±0.21
½ MS + 0.1 mg L ⁻¹ ИМК	3.3±0.31	2.9±0.23	80	5.4±0.47	2.8±0.25



Ex vitro аклиматизация



Най-висок процент от оцелели растения (85%) беше отчетен при адаптиране на растенията на смес от почва, пясък и перлит в съотношение (2:1:1 v/v/v).¹

Определената най-добра хранителна среда – $\frac{1}{2}$ MS, с добавена $0,1 \text{ mg B}^{-1}$ IBA, може да се приложи както за инициране на развитие на надземни части, така и за ин витро вкореняване. Той осигурява образуване на надземни части, ускорен растеж на микропрорастъците и индукция на корени за период от четири седмици.



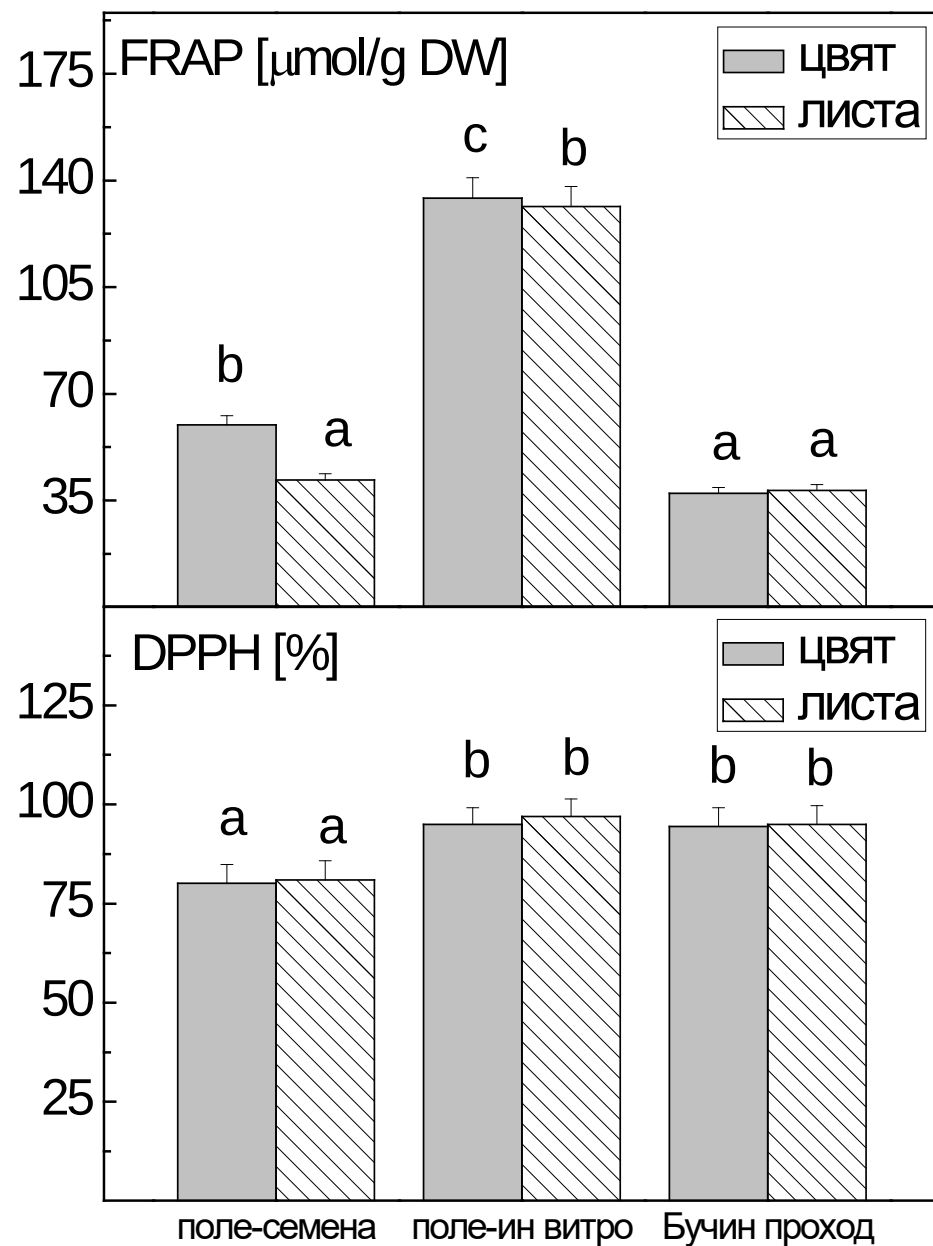
След успешна адаптация растенията бяха засадени на открито в полски условия. Растенията бяха генетически хомогенни без фенотипни различия между тях.



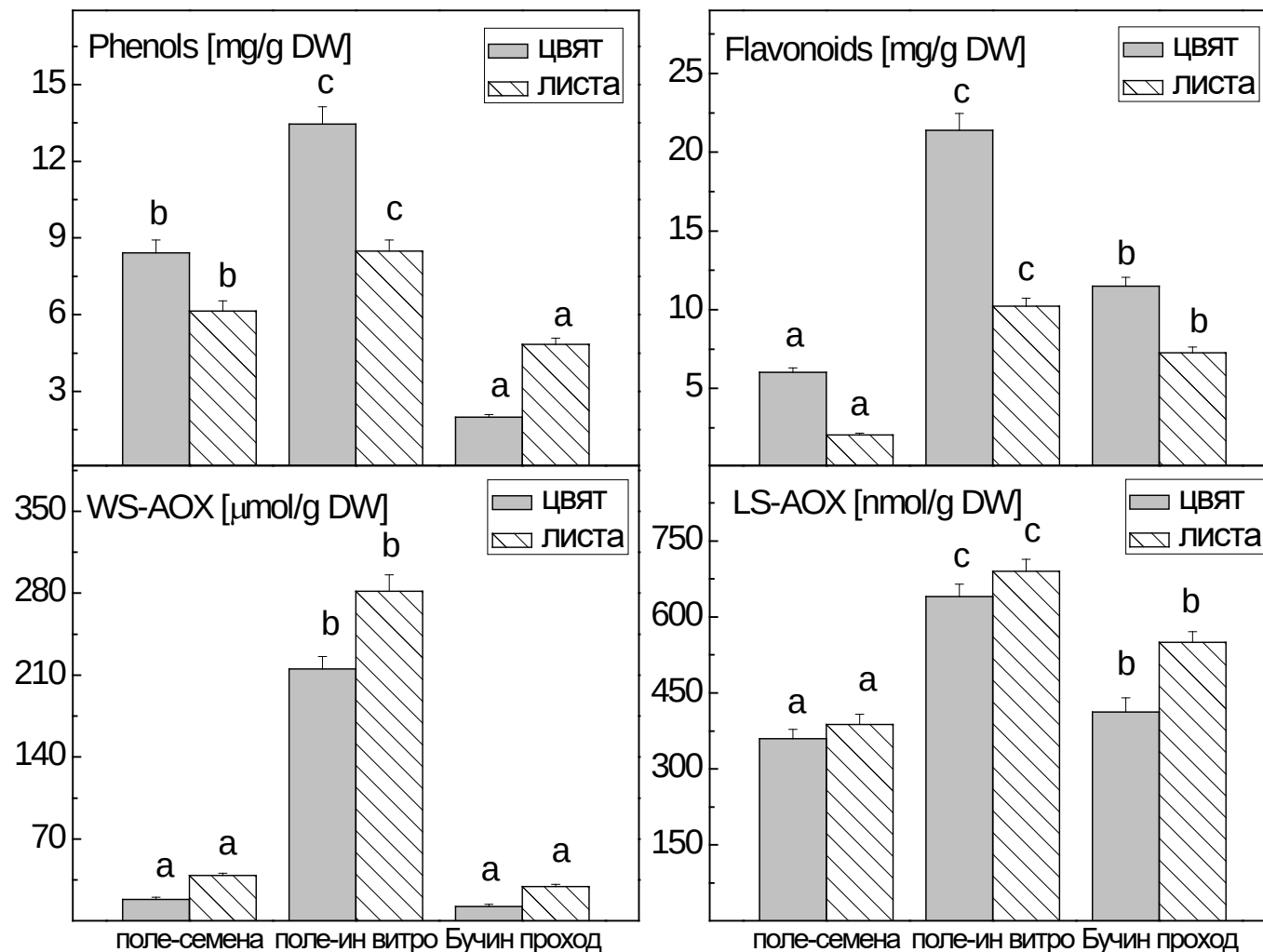
Hyssopus officinalis в естествени местообитания – с. Извор,
община Радомир - Конявска планина



Origanum heracleoticum в естествени местообитания – с. Брезница,
община Кресна



Антиоксидантен потенциал на метанолови екстракти на растения исоп, размножени от семена, in vitro размножени растения и растения от естествени местообитания, измерени по методите FRAP и DPPH•.

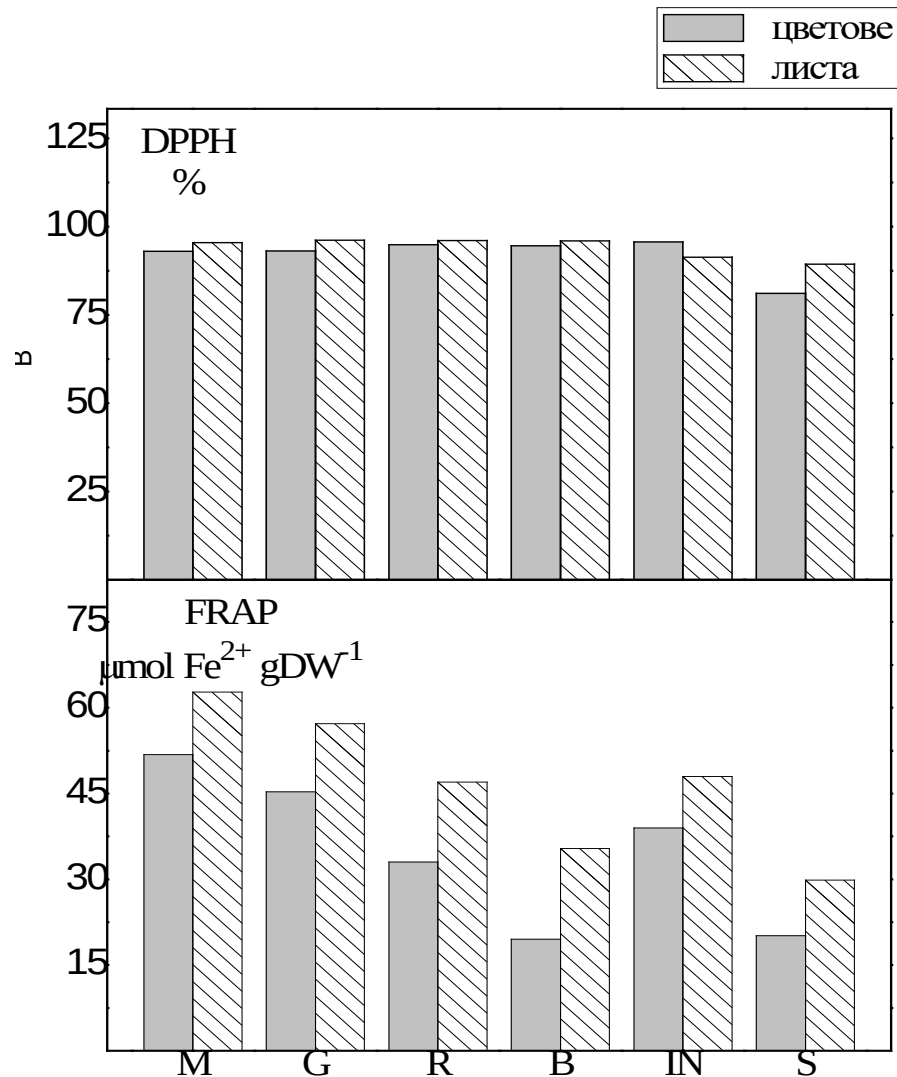


Съдържание на общи феноли и флавоноиди, водно- и мастноразтворими антиоксидантни метаболити, изразени като еквиваленти на аскорбат и α -токоферол съответно в растения, отгледани от семена, in vitro размножени растения и исоп от естествени местгообитания. Данните са представени като средни стойности от 3 повторения

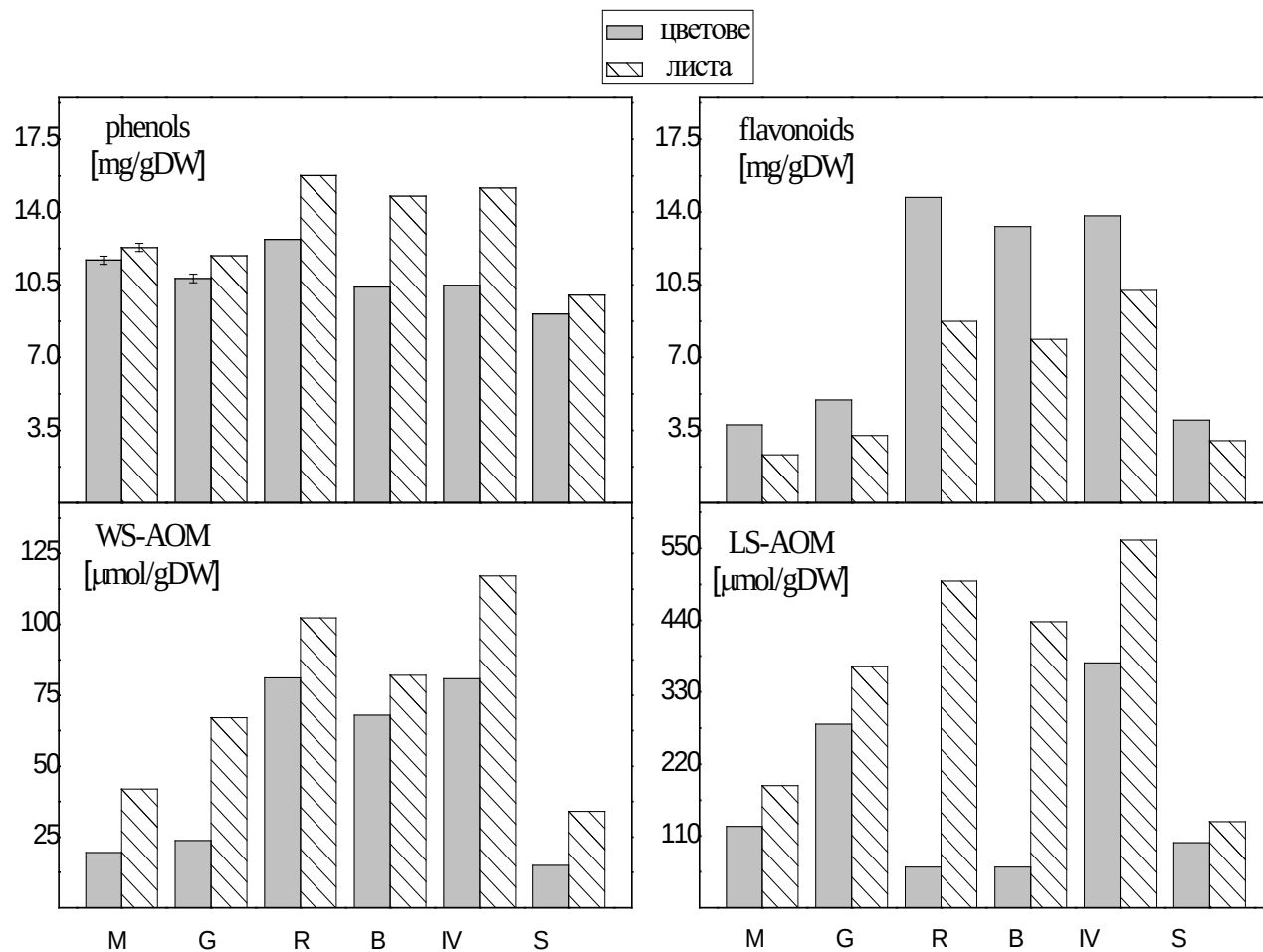
	В растения от семена	В <i>in vitro</i> размножени растения	В растения от естествени местообитания
β -binen	2-3	2-3	4-5
sabinen	17-18	10-11	9-10
β -myrcen	1-2	1-2	следи
linalool	2-3	1 - 2	следи
pinocamphen	до 1%	1 - 2	62-64
pinocamphon	54-56	70-71	следи
myrtenol	до 1%	1 - 2	следи
α -caryophylen	до 1%	до 1%	следи
β -caryophylen	следи	следи	следи
germacren-D	1-2	1-2	1-2
caryophylenoxid	1-2	1-2	следи
germacren-D-11-ol	1-2	2-3	следи

Съдържание на етерични масла (%) в надземните части на растения, отгледани от семена, *in vitro* размножени растения, както и исоп от естествени местообитания.





Антиоксидантен потенциал на метанолови екстракти на бял риган, *in vitro* размножени растения и растения от естествени местообитания, измерени по методите FRAP и DPPH[•]. Данните са представени като средни стойности от 3 повторения за вариант $\pm$ стандартната грешка. Различните букви показват значими различия според теста на Фишер за най-малките доказани разлики при ниво на значимост 0.05 % след прилагане на ANOVA.



Съдържание на общи феноли и флавоноиди, водно- и мастноразтворими антиоксидантни метаболити, изразени като еквивалети на аскорбат и α -токоферол съответно в растения, *in vitro* размножени растения и бял риган от естествени местгообитания. Данните са представени като средни стойности от 3 повторения

Съдържание на етерични масла (%) в надземните части на растения, отгледани от семена, in vitro размножени растения, както и бял риган от естествени местообитания.

	In vitro	с. Гугутка Източни Родопи	гр. Маджарово Източни Родопи	Рафтинг база р. Струма	с. Горна Брезница община Кресна
beta-Pinene	1.6434	0.1616	0.1989	0.3997	0.3529
alfa-Terpinene	2.5555	0.1868	0.1552	0.5668	0.5192
p-Cymene	5.9637	1.3020	0.9380	5.1586	6.6583
beta-Z-Ocimene	1.6083	1.1850	0.9708	0.3202	0.0412
gamma-Terpinene	9.5932	1.2541	1.3153	2.5599	2.1098
cis-Sabinene hydrate	0.6119	0.1182	0.1482	0.3574	0.0090
Linalool	0.7007	0.8164	0.7813	0.2976	0.4287
Borneol	0.9093	0.5588	0.4994	0.5445	1.1737
Carvacrol methyl ether	1.4018	1.2385	1.1245	0.5121	1.0951
Carvacrol	58.0673	51.9793	56.3586	76.0449	73.5792
beta- Caryophyllene <E>	4.2735	9.9204	8.1752	2.1439	2.2047
alfa-Humulene	0.9362	0.1150	0.1260	0.3281	0.3530
beta-Bisabolene	3.9415	3.7021	3.0230	2.3086	3.6841
Caryophyllene oxide	0.8669	1.6212	1.3342	1.9063	1.1252

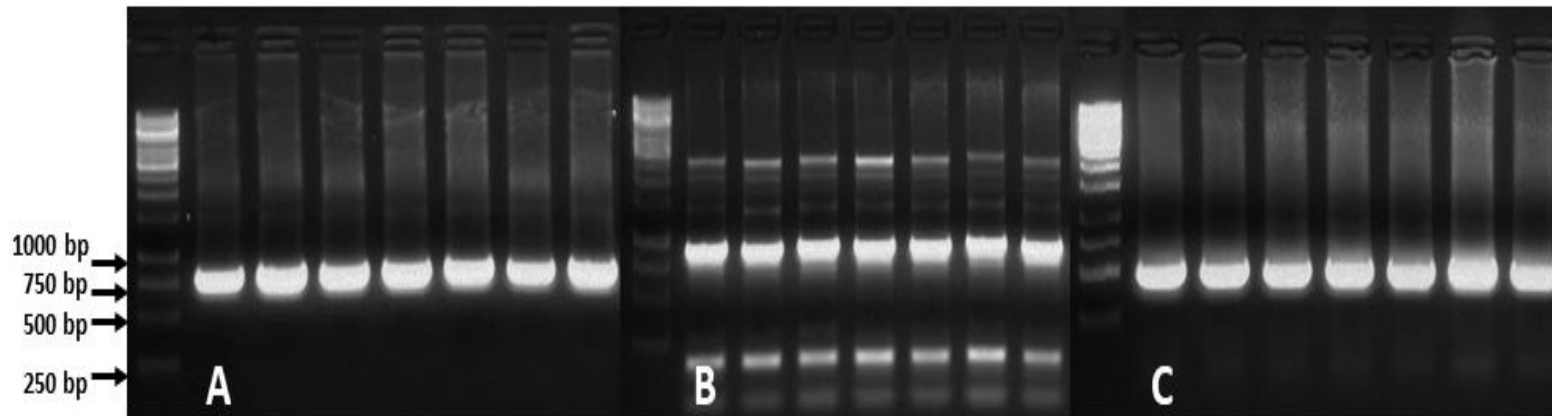


Молекулярно-генетични изследвания

- ДНК баркодиране на 61 растения от две популации (Годеч и Извор - 150 км една от друга) чрез сравняване на нуклеотидни последователности на ITS, trnH-psbA и matK участъци
- Оценка на генетичното разнообразие в изследваните популации *H. officinalis* чрез анализ със SSR и SRAP и маркери
- Анализ със SRAP маркери на *H. officinalis* - обект на продължително и многократно *in vitro* размножаване

ДНК баркодиране за потвърждаване на видовата принадлежност на изследваните растения

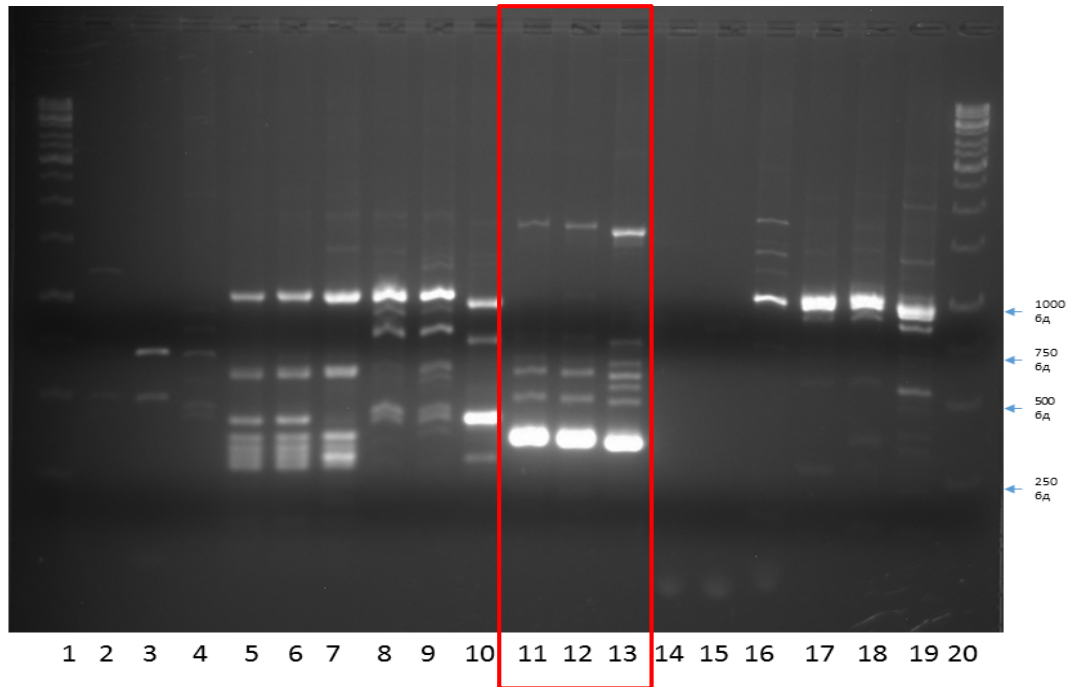
Геномна ДНК от проби, взети от 61 растения, принадлежащи на две естествени популации *H. officinalis* бе използвана за амплифициране на кодиращия участък *matK* и не кодиращия интергенен спейсер *trnH-psbA* от хлоропластния геном, както и интергенния транскрибируем спейсер *ITS* на рибозомалните гени в ядрения геном. Получените PCR продукти бяха секвенирани като анализа на секвенциите потвърди принадлежността на растенията към вида *Hyssopus officinalis*



PCR амплификация на геномна ДНК с праймери за *matK* (A), *trnH-psbA* (B) и *ITS* (C) участъци от хлоропластния и ядрения и геном на *H. officinalis*.

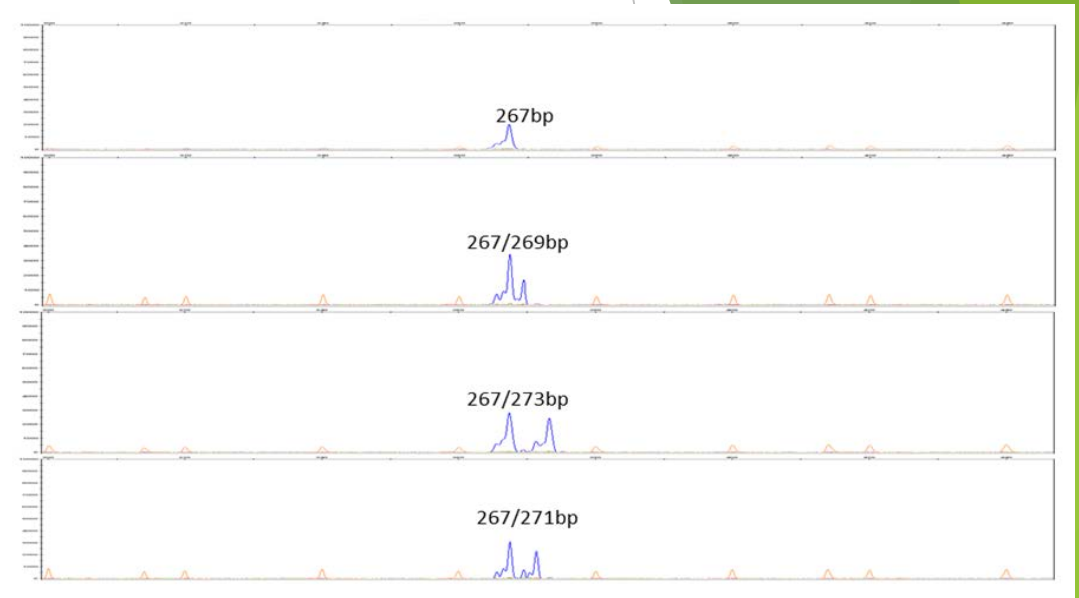
Оценка на генетичното разнообразие в изследваните популации *H. officinalis* чрез анализ със SSR маркери

От използваните 6 SSR маркера от род *Salvia* само един (LAB026) показва добър амплификационен профил



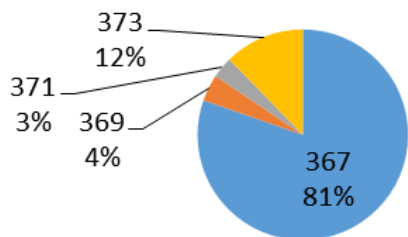
Стартове 11-13 показват успешна амплификация с праймерни двойки за локус LAB026

Общо за двете популации (61 растения) бяха установени 4 алела за локус LAB026 с дължина 267 бд / 269 бд / 271 бд / 273 бд, като в популация Годеч наблюдаваните алели са 4, а в популация Извор отсъства алел с дължина 269 бд. Съответно броят на установените ефективни алели за този локус е по-голям при популация Годеч (1,82), в сравнение с популация Извор (1,26)



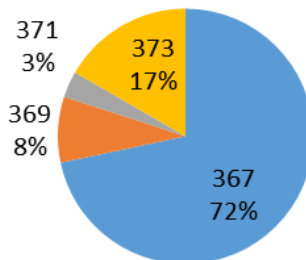
Фрагментен анализ на исоп с автоматичен капиларен секвенатор, локус LAB026. Дължина на установените алели в бд-267бд, 269 бд, 271 бд и 273бд.

A Allele Frequency at pr26 for Pop1+Pop2 (n=61)



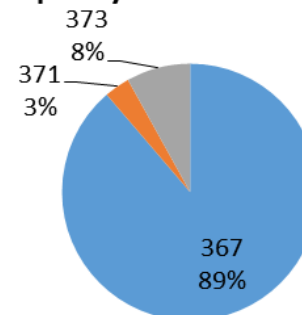
Allele	Pop1+Pop2
367 bp	0.803
369 bp	0.041
371 bp	0.033
373 bp	0.123

B Allele Frequency at Locus1 for Pop1 (n=30)



Allele	Pop1
367 bp	0.717
369 bp	0.083
371 bp	0.033
373 bp	0.167

C Allele Frequency at Locus1 for Pop1 (n=31)



Allele	Pop1
367 bp	0.887
371 bp	0.032
373 bp	0.081

Схема на процентно разпределение на честотата на алелите за микросателитен локус LAB026 за двете популации (A), за популация Годеч (B) и за популация Извор (C).

Стойността на генетичното разнообразие (очаквана хетерозиготност) в популация Годеч (0,451) е два пъти по-висока от тази на популация Извор (0,206). Установената хетерозиготност (броя на действителните хетерозиготни индивиди) е три пъти по-висока в популация Годеч (0,467) спрямо тази на популация Извор (0,167).

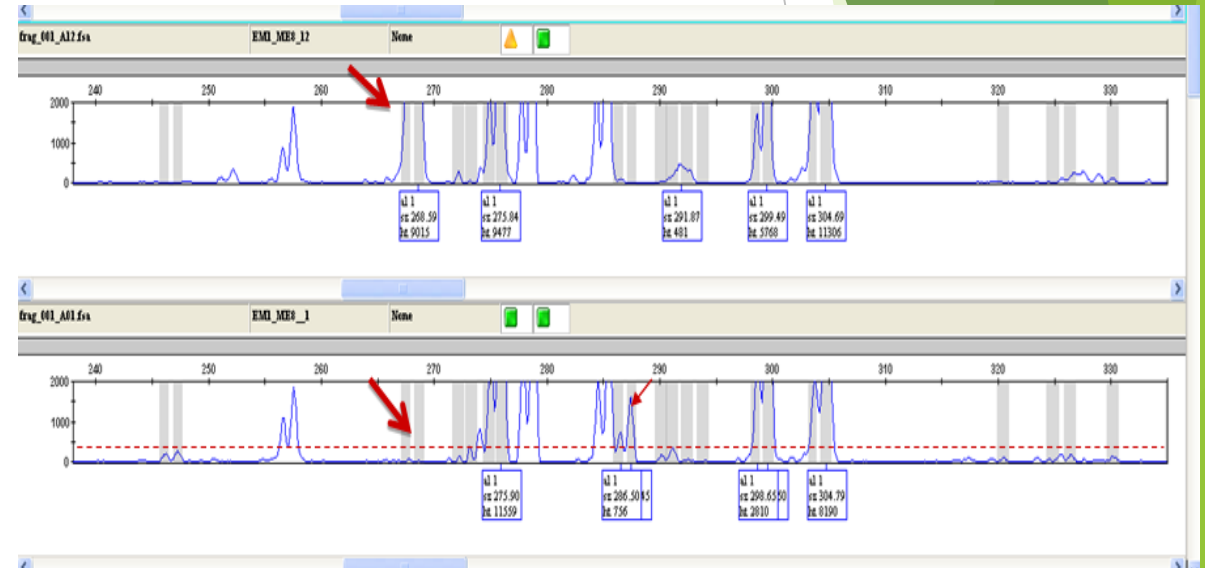
Установеното генетично разнообразие със SSR маркер LAB 026 при исоп е достатъчно високо, за да бъдат разграничени двете популации.

SSR маркери от род *Salvia* могат да бъдат използвани за анализ на генетичното разнообразие при исоп. Необходимо е изпитването на допълнителни SSR маркери от род *Salvia* за установяване на ефективността им за амплифициране на съответните микросателитни локуси в род *Hyssopus*.

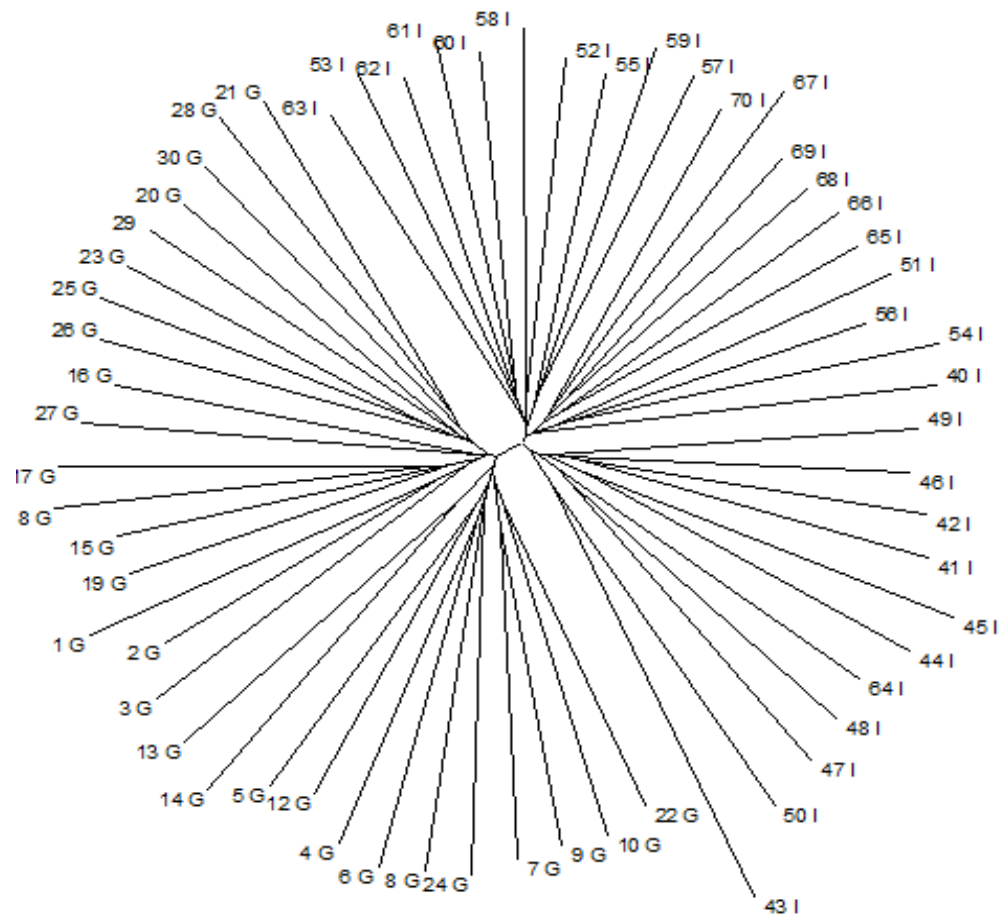
Оценка на генетичното разнообразие в изследваните популации *H. officinalis* чрез анализ със SRAP маркери

SRAP маркери – 8 праймерни двойки генерираха 1049 фрагмента. 949 показват полиморфизъм между изследваните 60 растения

	Общ брой фрагменти	Брой полиморфни фрагменти	PPF, %	APFG%
EM1_ME2	162	152	93.8	23.3 ± 5.0
EM2_ME3	147	134	91.2	21.5 ± 6.0
EM3_ME1	67	58	86.6	9.6 ± 2.8
EM4_ME1	143	127	88.8	20.0 ± 3.9
EM5_ME4	188	162	86.2	27.2 ± 4.8
EM6_ME6	167	154	92.2	19.1 ± 4.0
EM10_ME1	88	81	92.0	19.9 ± 4.7
EM10_ME10	87	81	93.1	10 ± 2.1
общо	1049	949		
средно		118	90.5	18.7 ± 4.2



Електрофореграма на получените SRAP фрагменти, изследвани с ABI 3130 Genetic Analyzer и показани в GeneMapper v4.0. Стрелката показва полиморфен пик, който присъства или отсъства в определена проба.



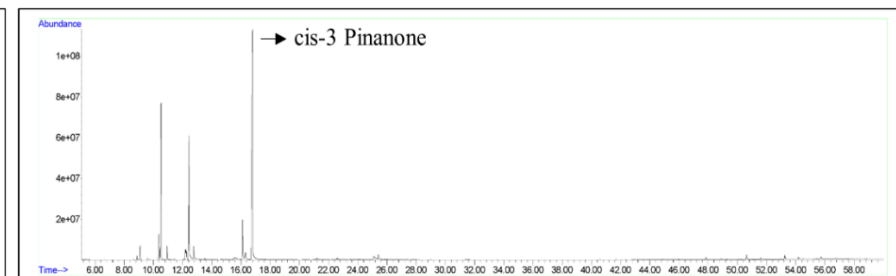
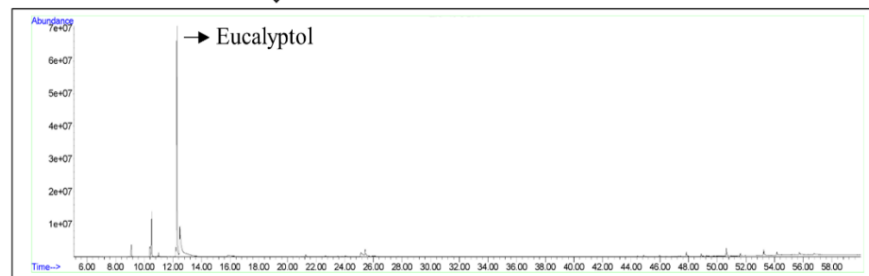
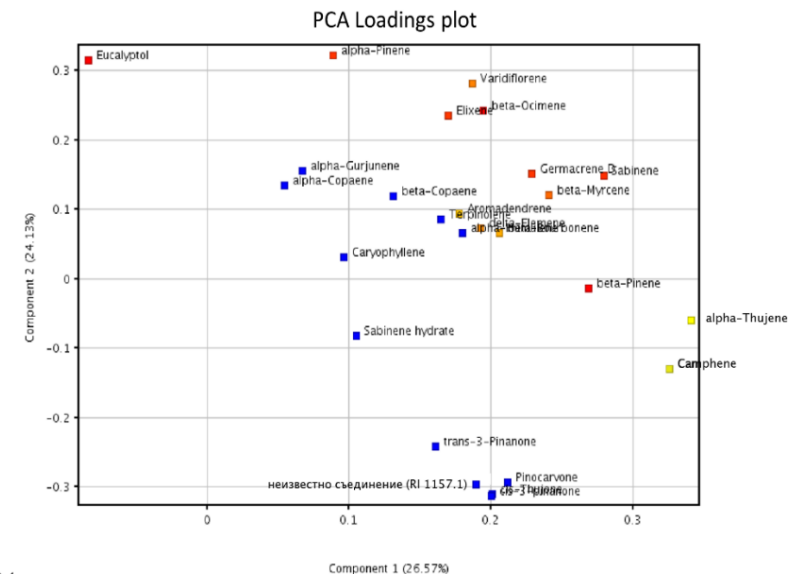
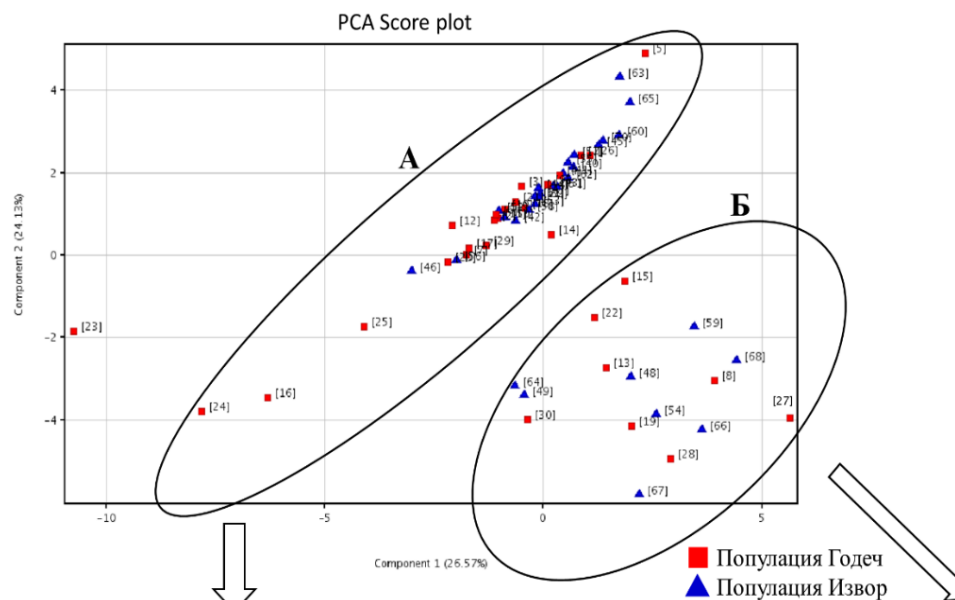
Построената дендрограма с използване на данните от анализа със SRAP маркери показва формирането на два ясно отделени клъстера отговарящи на двете отделни популации „G“ – Годеч и „I“ - Извор

Анализ със SRAP маркери на *H. officinalis* - обект на продължително и многократно *in vitro* размножаване

Брой полиморфни фрагменти, получени след PCR амплификация с 20 SRAP праймерни двойки на геномна ДНК от 3 линии исоп (А, В и С) размножавани *in vitro*. С „1“, „2“ и „3“ са означават 3 последователни пасажа на съответните линии. PF-брой полиморфни фрагменти. Наблюдаваният значително по-малък брой полиморфни фрагменти се дължи на клоновия произход на растенията.

Праймерна двойка	PF Линия А, пасажи 1, 2 и 3	Праймерна двойка	PF Линия В, пасажи 1, 2 и 3	Праймерна двойка	PF Линия С, пасажи 1, 2 и 3
EM0_ME0	20	EM0_ME0	39	EM0_ME0	12
EM0_ME1	13	EM0_ME1	19	EM0_ME1	14
EM1_ME0	24	EM1_ME0	13	EM1_ME0	17
EM1_ME1	20	EM1_ME1	17	EM1_ME1	4
EM1_ME2	25	EM1_ME2	19	EM1_ME2	15
EM2_ME0	7	EM2_ME0	9	EM2_ME0	12
EM2_ME7	11	EM2_ME7	6	EM2_ME7	8
EM3_ME0	13	EM3_ME0	10	EM3_ME0	14
EM3_ME3	21	EM3_ME3	16	EM3_ME3	10
EM4_ME1	15	EM4_ME1	24	EM4_ME1	11
EM4_ME3	15	EM4_ME3	27	EM4_ME3	16
EM5_ME3	11	EM5_ME3	44	EM5_ME3	14
EM5_ME4	20	EM5_ME4	41	EM5_ME4	26
EM6_ME0	11	EM6_ME0	28	EM6_ME0	16
EM6_ME6	11	EM6_ME6	32	EM6_ME6	14
EM7_ME0	8	EM7_ME0	25	EM7_ME0	26
EM8_ME2	16	EM8_ME2	28	EM8_ME2	6
EM8_ME7	33	EM8_ME7	46	EM8_ME7	12
EM9_ME0	11	EM9_ME0	12	EM9_ME0	19
EM9_ME2	31	EM9_ME2	28	EM9_ME2	13
average	16.8	average	24.15	average	13.95

GC/MS анализ на екстракти от единични растения



- Единадесет от 42 идентифицирани съединения варират статистически значимо между растенията от група А и група Б при $p < 0.01$. От тях 5 съединения са открити само в растения от група Б, включително cis-3-Pinanone, trans-3-Pinanone, Pinocarvone, cis-Thujone и Sabinene hydrate.
- Резултатите показват относително високо ниво на вариации, както в състава на летливи съединения, така и в техните относителни количества сред пробите от цветове, събрани от отделни растения в двете популации.
- PCA анализът на получените данни от GC/MS показва формирането на два основни клъстера, включващи растения от двете проучвани популации.

БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО!

