

ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ-  
БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

## Хабилитационна справка за научните приноси

---

на Гл. асистент д-р Калина Монева Данова,  
Лаборатория Химия на Природните Съединения, ИОХЦФ-БАН

СОФИЯ

2019-07-31

За участие в конкурс за академичната длъжност "доцент" по професионално направление 4.2.Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“, за нуждите на лаб. “Химия на природните вещества“, Обявен в Държавен вестник: брой 43 от 31.05.2019 г.

## Съдържание

1. Въведение .....	2
1.1. Необходимост от консервация на биоразнообразието на лечебни и ароматични растения в България .....	2
1.2. Необходимост от изследване на биосинтетичния капацитет на лечебните и ароматични растения при биотехнологични условия. ....	3
1.3. Екологична роля и лечебна стойност на <i>Hippophae rhamnoides</i> L.....	5
1.4. Лечебни свойства на <i>Clinopodium vulgare</i> .....	6
1.5. Лечебни свойства и развитие на тъканни култури от видове от род <i>Hypericum</i> .....	6
1.6. Лечебни свойства, изменчивост на състава на етеричните масла и развитие на тъканни култури от <i>Artemisia alba</i> Turra. ....	8
2. Основни научни приноси на кандидатката .....	8
2.1. Резултати от работата по <i>Hippophae rhamnoides</i> – (B-Q2-1) .....	10
2.1.1. Сравнение на флавоноидното съдържание при диворастящото растение с интродуцираната му популация.....	10
2.1.2. Развитие на <i>ин vitro</i> култура .....	10
2.1.3. Ревизия на естествените популации и консервационния статус на вида в България .	10
2.2. Резултати от работата по <i>Clinopodium vulgare</i> – (B-Q3-3).....	11
2.2.1. Установяване на култура от надземни части .....	11
2.2.2. Екстракция и анализ на NO-антирадикаловата активност .....	11
2.3. Резултати от работата по видове от род <i>Hypericum</i> .....	11
2.3.1. Развитие на <i>ин vitro</i> култури от видове от род <i>Hypericum</i> .....	11
2.3.2. Оценка на NO-антирадикаловата при хиперицин продуциращите видове от род <i>Hypericum</i> species (B-Q3-3) .....	12
2.3.3. Оценка на връзката между ензимната активност и полифенолното съдържание при хиперицин непроизвеждащият <i>H. calycinum</i> (B-Q3-4).....	12
2.4. Резултати от работата по <i>Artemisia alba</i> Turra.....	13
2.4.1. Развитие на <i>ин vitro</i> култура .....	13
2.4.2. Характеристика на получения растителен материал .....	13
2.4.3. Характеристика на продукцията на вторични метаболити в <i>ин vitro</i> отгледаните растения.....	13
2.4.4. Характеристика на ендегенното съдържание на цитокинини и хлоропластната архитектура при двата морфотипа бял пелин <i>ин vitro</i> .....	14
3. Перспективи за развитието на научната тематика през следващите три години. ....	15
3.1. Работа по диференцираните <i>ин vitro</i> линии на отглежданите растения.....	15

3.2. Работа по генетично не-трансформираните коренови култури от отглежданите растения .....	16
3.3. Работа по не-диференцираните линии от отглежданите в течни среди растения .....	17
4. Библиографска справка.....	17
4.1. Литературни източници от други автори, използвани във въведението .....	17
4.2. „В“ - Научни публикации включени в хабилитационната справка .....	18
4.3. „Г“ – Научни публикации извън хабилитационната справка.....	19
4.4. Други публикации на кандидата.....	20

## 1. Въведение

### 1.1. Необходимост от консервация на биоразнообразието на лечебни и ароматични растения в България

България е разположена в югоизточна Европа, в централната част на Балканския полуостров. В страната ни присъстват три био-географски области: алпийска, черноморска и континентална. Разнообразието на релефа, геоложките дадености и специфичните микроклиматични условия предопределят богатото разнообразие на растителни видове, популации и природни хабитати, много от които с консервационна значимост. По отношение на видово биоразнообразие, България се намира на едно от първите места в Европа (CBD).

Висшите растения в България наброяват около 3900 вида (Petrova and Vladimirov, 2007).

Според последното цялостно ботаническо проучване, Червеният Списък от висши растения в българската флора наброява 801 вида (20.5 % от общата флора), от които един е изчезнал (EX), 12 – изчезнали на регионално ниво (RE), 208 – критично застрашени (CR), 297 - застрашени (EN), 204 уязвими (VU) и 79 са близки до застрашени (NT). Списъкът от другите оценени видове обхваща 96 таксона, от които при 53 липсват данни (DD) и 43 не са застрашени (LC) (Petrova and Vladimirov, 2009).

В България съществува Национална Екологична Мрежа, отговаряща за защитените местонахождения и видове с национална и европейска значимост. Там са включени защитените територии, обособени съгласно специализираното българско законодателство, както и териториите, част от европейската екологична мрежа NATURA 2000. Въпреки това, са необходими значително по-големи усилия за поставянето на растителното биоразнообразие като фактор имащ жизнено-важно

значение за устойчивото развитие на страната ни, както и като основен критерий, определящ общественото благосъстояние. В много региони в България се наблюдават необратими промени върху естествените местообитания и видовото разнообразие, чието преодоляване изисква специфични усилия. В научен план, е необходимо пренасочването на съществен потенциал към нови и актуализирани стратегии за опазване на биоразнообразието в самите естествени местонахождения (*in situ*) като оценка на екосистемните услуги, икономическите аспекти на съхранението на биоразнообразието, както и неговата роля за адаптацията към климатичните промени (CBD).

По отношение на съхранението на биоразнообразието на защитени видове извън естествените им местообитания (*ex situ*), в множество български институции са създадени и се развиват живи растителни колекции и семенни банки, както и ботанически градини (IPCC, 2007).

От решаващо значение е подкрепата и стимулирането на развитието на научния потенциал в насока към запазване на биоразнообразието на българската флора.

## **1.2. Необходимост от изследване на биосинтетичния капацитет на лечебните и ароматични растения при биотехнологични условия.**

Въпреки, че растителният метаболитен профил е генетично предопределен, неговите качествени и количествени характеристики са силно динамични и променливи в зависимост от сложните взаимодействия на растителния организъм с обкръжаващата го среда.

Също така, продукцията, натрупването и транслокацията на вторичните метаболити при растенията се предопределят и от наличието на високоспециализирани анатомични структури в техния организъм. Поради тази причина вторичният метаболизъм силно се влияе от растежа, развитието и морфогенеза на дадения растителен индивид. Поради това, контролираните условия и възможност за насочването на условията на отглеждане при растителните клетъчни и органи култури правят възможно насочването на продукцията и получаването на растителна биомаса с желани качества (Г-Book\_Ch-1, 3).

Комерсиализираният добив на растителни вторични метаболити по биотехнологичен път е все още ограничен в сравнение с широкото пазарно приложение

на растителната биотехнология в агрономическата практика и цветопроизводството. Въпреки това, редица успешни примери показват потенциала и перспективите на растителната биотехнология за широкомащабен добив на вторични метаболити (Г-Book\_Ch-3).

Първите опити за промишлено производство на вторични метаболити по биотехнологичен път е на Charles Pfizer Co Company in 1950 (Lombardino 2000; Dias et al. 2016). Били са проведени неуспешни опити върху *in vitro* култивирани тъкани от диня. Впоследствие, първият патент в областта е на Routian и Nickell, като възложител е Chas. Pfizer & Co., Inc., New York, N. Y. (Routian and Nickell 1956). Изобретението се състояло в „метод за отглеждане на растителна тъкан при потопени или аерирани условия в течна среда“ и в „получаването на полезни материали чрез този метод“. Включени са тъкани от няколко вида, описани като „тъкани от талофитни растения, според ботаническата систематика“ (включващи *Rumex acetosa* L. - лапад, жълта комунига, *Vinca* - зимзелен, *Agave toumeyana* - столетник, стъбло и листна дръжка от слънчоглед, тютюн, кактус от род *Opuntia*, татул и авокадо). Заявява се технология за продукцията на „витамины, стероли, алкалоиди от различен тип, противомикробни вещества, захари, ензими, органични киселини, ароматични материали и т.н.“.

Последващото след 1978 година развитие, води до приложимото биотехнологично производство на вторични метаболити в Германия и Япония (Loyola-Vargas and Vázquez-Flota 2006; Dias et al. 2016). Днес, броят на патентите, отнасящи се до растителни клетъчни култури достига впечатляващите 28 000. Броят на компаниите, използващи методите на растителната биотехнология за получаване на съставки за козметичната, хранителната и фармацевтичната индустрия постоянно нараства (Ochoa-Villarreal et al. 2016). Така например, паклитакселът за производството на химиотерапевтика Taxol се доставя в световен мащаб от клетъчни култури на *Taxus* sp., отглеждани в биореакторна система от немската компания Phyton, немската компания Diversa произвежда полизахариден комплекс от *Echinacea purpurea* и *E. angustifolia* за нуждите на фармацевтичната промишленост, а японската компания Nitto Denko Corp. произвежда за пазара гинзенозиди от клетъчни и коренови култури от *Panax ginseng* (Г-Book\_Ch-3 и цит. литература).

Разбирането на ролята на развитието и морфогенеза при продукцията на отделните класове вторични метаболити е ключово за оптимизацията на тяхната биотехнологична продукция. Придобитото знание и правилната интерпретация на тези фактори дава възможност биотехнологичната продукция на избрани класове вторични

метаболити да се извършва чрез научно-обоснован подход, като се използва вродения (генетично обусловен) биосинтетичен капацитет на дадения вид, без прилагането на генетични манипулации.

По-долу са описани някои характеристики на лечебните и ароматични растения, чието биотехнологично развитие е залегнало в настоящата хабилитационна справка.

### 1.3. Екологична роля и лечебна стойност на *Hippophae rhamnoides* L.

*Hippophae rhamnoides* L. (облепиха, морски зърнастиц), семейство Eleagnaceae, е бодливо, двудомно храстовидно растение, достигащо до малко дърво. Видът се среща естествено в рамките на широка територия в Европа и Азия (Roussi, 1971), основно по пясъчни морски крайбрежия, както и по протежение на долините на планински реки на височина от морското равнище до и дори над 2000 m (основно в Северен Кавказ и Палмир). Южната граница на разпространение на вида преминава през България, където той е познат от началото на 20 век, с разпространение у нас в покрайнините на Варна (B-Q2-1).

Лечебните свойства на растението са познати още от най-древни времена. Споменава се още в древногръцките трудове на Диоскорид и Теофраст. В Тибет лечебното приложение на растението започва преди повече от 1000 години, като много от откритите от тогава рецепти за неговото приложение се запазват, доразвиват се и се предават през годините.

Облепихата има изразено фито-протективен ефект за човешкото здраве. Всички части от растението се считат за богат източник на биологично-активни вещества. Установени са антиоксидантната, противоязвената и хепато-протективна активност, както и противосъсирващия ефект на маслото от плодовете му (Li and Wang, 1998; Gao et al. 2000; Suleyman et al. 2001).

Изследване върху радиопротективния ефект на растението при мишки показва, че прилагането на доза от 30 mg/kg извлек от плодовете води до 82 % преживяемост в сравнение с 0 % при облъчената контрола, като ефекта се обяснява с антирадикаловия ефект, както и ускореното делене на костномозъчните клетки и имуно-стимулиращия ефект на извлека. Продължението на това изследване показва, че концентрации от и над 120µg/ml от извлека водят до силна хроматинова компактизация при изолирани тимусни клетки, което индуцира устойчивост на клетъчното ядро спрямо радиационна доза от 1000Gy (Kumar et al. 2002 и цитирана литература).

Видът има и важна екологична роля за контрол на почвената ерозия и облагородяване на необработваеми почви. Силно-развитата коренова система на облепихата и позволява да расте успешно в бедни и необработваеми почви, тъй като видът формира симбиотични взаимоотношения с азот-фиксиращи коренови актиномицети (Akkermans et al. 1983). Средната годишна азотна фиксация при растението е от 27 до 179 kg N ha<sup>-1</sup> (Baker and Mullin 1992).

Ценните лечебни и екологични свойства на вида, както и това, че България е неговата най-южна точка на естествено разпространение в Европа, налагат предприемането на мерки за неговата популяризация и практическа употреба. Застрашеният статус на облепихата в България налага и сериозни мерки за неговата съхранение.

#### 1.4. Лечебни свойства на *Clinopodium vulgare*

*Clinopodium vulgare* L., (котешка стъпка), Lamiaceae е лечебно растение, познато на българската народна медицина за лечение на кожни раздразнения, отоци, свързани с мастит и простатит, както и възпаления, причинени от гастритни язви, диабет и онкологични заболявания. Установено е силното противовъзпалително, антирадикалово и противораково действие на водни извлекци от растението (Dzhambazov et al., 2002; Burk et al., 2009).

Видът попада под разпоредбите на Закона за лечебните растения в България (2017). В достъпната литература не се откриват сведения за биотехнологичната му разработка.

#### 1.5. Лечебни свойства и развитие на тъканни култури от видове от род *Hypericum*

Род *Hypericum* (кантарион, звъника) обхваща над 484 вида, групирани в 36 секции. Представителите на рода се срещат естествено или като интродуцирани видове по всички континенти на планетата, с изключение на Антарктика, като хабитусът им варира от дървесни до тревисти индивиди. Въз основа на богатите етноботанически данни за традиционната употреба на неговите представители, род *Hypericum* е може би най-широко изследваният растителен таксон по отношение на съдържанието на

вторични метаболити и фармакологични свойства (Г-Book\_Ch-1 и 2 и цитирана литература).

*Hypericum perforatum* L. (жълт кантарион) е най-широко използваният представител на рода. Данните за неговата употреба датират от 1 век от н.е. Той се среща естествено в Европа, Северна Африка и Азия и е натурализиран в Северна Америка.

Широкият спектър на биологичната активност на жълтия кантарион се обуславя от специфичния и сложен състав на извлека от *Herba Hyperici* и потенциалните адитивни, синергични, а понякога и антагонистични ефекти от взаимодействието между отделните му компоненти. Биологично-активните вещества, установени при вида са полифенолни съединения (флавоноиди, фенолни киселини), нафтодиантрони (хиперицин и псевдохиперицин), флороглуциноли (хиперфорин, адхиперфорин) и терпени. За тях е установена антидепресивна, противоракова, противовирусна и антибиотична активност (Г-Book\_Ch-1 и цитирана литература).

По отношение на биосинтетичния потенциал на различните представители на вида, въпреки определеното сходство на основните компоненти, се наблюдават и значителни междувидови качествени и количествени разлики, както и такива по отношение на популациите на един и същ вид, както и при индивидуалните фази на развитие на даден растителен индивид. Интересна характеристика на рода е, че видовете от еволюционно по-старите секции се характеризират с липсата на хиперицинова продукция и високо съдържание на флороглуциноли в сравнение с еволюционно по-развитите секции. Също така, хиперициновата продукция се повишава с повишаването на еволюционното развитие на „хиперицин-продуциращите“ секции (Г-Book\_Ch-2 и цитирана литература).

Фитохимичните проучвания върху видовете от рода, характерни за Балканската флора, показват техния потенциал като перспективни нови източници на биологично-активни вещества, характерни за рода (Г-Book\_Ch-2 и цитирана литература).

В българската флора са представени 22 вида от рода, от тях 5 балкански и един български ендемит (вече изчезнал). От тези видове, 16 (включително и изчезналият), принадлежат към секции, които се намират на по-високо еволюционно ниво от секция *Hypericum* (към която принадлежи и добре проучения *H. perforatum*).

През годините родът е и обект на изключителен интерес по отношение на биотехнологичната разработка с цел проучване на биосинтетичния капацитет *in vitro* (Г-Book\_Ch-2 и цитирана литература).



Интересно е да се отбележи, че с малки изключения, тези разработки са насочени основно върху *Hypericum perforatum*, както и други представители от секция *Hypericum*.

### 1.6. Лечебни свойства, изменчивост на състава на етеричните масла и развитие на тъканни култури от *Artemisia alba* Turra.

*Artemisia alba* Turra, (бял пелин), Asteraceae е ароматично растение, разпространено в Южна Европа. Въпреки, че не е толкова широко изследвано както продуциращият противомаларийния артемизинин сладък пелин (*A. annua*), видът се характеризира със спазмолитична, противомикробна и противодиабетна активност, особено по отношение на свойствата, установени за етеричното му масло (Ronse and De Pooter 1990; Stojanovic et al. 2000).

Проучванията, обаче сочат високата изменчивост на терпеноидният профил на маслата, което различни автори отдават на условията на околната среда и климата, географското разпространение и/или генетични фактори (Radulović и Blagojević 2010 и цитирана литература).

По отношение на биотехнологичната му разработка данните са оскъдни. В литературата са намерени съобщения за сравнение на състава на етеричните масла получени *екс vitro* (въвеждане на опитното поле след *ин vitro* размножаване) и *ин сито* (в условията на естествено полево култивиране) (Ronse and De Pooter 1990). Съществуват разработки и по микроразмножаването на вида с консервационна цел (Holobiuc and Blindu 2006 - 2007).

## 2. Основни научни приноси на кандидатката

Научните приноси, обобщени по-долу са публикувани в 7 работи, включени в хабилитационната справка в **списък „В“** (Хабилитационен труд – научни публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация, в които кандидата е посочен като автор за кореспонденция) по-долу; библиографията съдържа и 11 публикации от **списък „Г“** (Научна публикация в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация, извън хабилитационния труд), както и 25 публикации, включени като „други публикации на кандидата“.

Научните приноси, описани по-долу, могат да бъдат разглеждани в три основни направления:

❖ Консервационен аспект

В резултат на разработките, описани по-долу, в Лаборатория Химия на Природните Вещества, ИОХЦФ-БАН са установени и развити необходимите условия за *ин vitro* отглеждане на лечебни и ароматични растения. Това прави възможно поддържането на *ин vitro* колекция в условията на бавно-растящи стокови култури от голям брой лечебни и ароматични растения, събрани както от Българската флора, така и от други местообитания.

❖ Фундаментален аспект

Съществуването на богата колекция от лечебни и ароматични растения – продуценти на вторични метаболити от различни групи прави възможно реализирането на комплексни интердисциплинарни изследвания в рамките на ИОХЦФ-БАН.

Възможна е рационалната реализация и бързото получаване на надеждна обратна връзка от извършването на експериментите по отглеждането на растителния материал при различни условия до отчитането на промените, настъпили в техния растеж, развитие и физиологичен статус, както и прецизното проследяване на метаболитния профил на получената екстракционна растителна биомаса. Това определя и потенциала за изграждането на гъвкав и научно-обоснован подход за оптимизация на продуктивността на растенията в *ин vitro* условия, като се използва техния заложен биосинтетичен потенциал, без извършването на генетични манипулации.

❖ Приложен аспект

Възможността за повлияване на метаболитния профил на растенията чрез оптимизация на условията на отглеждане и без извършването на генетични манипулации е устойчив и надежден подход, тъй като практическото приложение на получената растителна биомаса в хранителната промишленост, козметиката или медицината не подлежи на етичните и законови ограничения, валидни при растителната биомаса, отгледана чрез прилагането на генетични манипулации.

В ИОХЦФ-БАН са получени конкретни биологични *ин vitro* системи за контролираното отглеждане на растителен материал с дефинирани свойства. Добиват се вторични метаболити, чиито фитотерапевтични свойства са познати, но източниците за тяхното получаване са нови. Това дава потенциала за мащабирането на получените процеси за на биотехнологичния добив на вторични метаболити.

## 2.1. Резултати от работата по *Hipporhae rhamnoides* – (B-Q2-1)

### 2.1.1. Сравнение на флавоноидното съдържание при диворастящото растение с интродуцираната му популация

Беше извършен колориметричен анализ на общото флавоноидно съдържание, както е описано в (B-Q2-1). Беше сравнен растителен материал от естествената и интродуцирана популации на растението. Пробите, събрани от естественото находище Паша Дере край Варна, показаха съдържание от 12.75 mg/g DW (1.28%) общо флавоноидно съдържание изразени като ( $\pm$  catechin) стандарт, докато пробите, събрани от интродуцираната популация в колекцията на Ботаническата Градина-БАН – 7.48 mg/g DW (0.75%). За сравнение, при проучвания на други автори са установени стойности за общо флавоноидно съдържание 0.83 – 2.0% (най-високото съдържание е при елитен сорт), други автору установяват стойности от 0.87mg/g DW до 38.88 mg/g DW (цитирана литература в B-Q2-1).

### 2.1.2. Развитие на *in vitro* култура

От повърхностно стерилизирани стъблени експланتي беше установена култура от надземни части на растението. За изходен материал бяха използвани връхни части от млади клонки от растението, отглеждано в Ботаническата Градина-БАН. За преодоляване на латентността на спящите пъпки беше използван бензиладенин, а за намаляване на осмотичното налягане на хранителната среда съдържанието на макро-солите беше редуцирано наполовина.

### 2.1.3. Ревизия на естествените популации и консервационния статус на вида в България

Изследването беше проведено съвместно с доц. Антоанета Петрова, Директор на Ботаническата Градина – БАН. Поради естеството на естествения хабитат беше извършена визуална инспекция и преглед на актуален снимков материал от находищата край Варна. Консервационната оценка беше извършена по методологията на IUCN (2001), приложена на местно ниво, както е описано в (B-Q2-1). Беше установено, че единствената оцеляла популация край Варна се намира в района на Паша Дере. Препоръката за промяна на защитения статус на растението от „Застрашен“ към

„Критично застрашен“ беше взета под внимание при изготвянето на следващия Червен списък на лечебните растения в България. (Petrova and Vladimirov, 2009).

## 2.2. Резултати от работата по *Clinopodium vulgare* – (B-Q3-3)

### 2.2.1. Установяване на култура от надземни части

Растителният материал беше събран от естественото му находище в Рила. Културата от надземни части беше стартирана от повърхностно стерилизирани експланتي от надземните части. За ускореното индуциране на надземни части в средата беше добавен бензиладенин, а полученият надземни части впоследствие бяха дългосрочно отглеждани в среда без добавени растежни регулатори.

### 2.2.2. Екстракция и анализ на NO-антирадикаловата активност

Метанолният извлек беше приготвен чрез ултразвукова екстракция, а активността беше оценена спрямо Вит. С като стандарт и сравнена с извлекци от други *ин vitro* култивирани растения. Активността, получена за котешката стъпка беше най-слаба в сравнение с другите изследвани растения -  $SC_{50} = 3.45$  ( $SC_{50} = 0.26$  mg/ml за Вит. С).

## 2.3. Резултати от работата по видове от род *Hypericum*

### 2.3.1. Развитие на *ин vitro* култури от видове от род *Hypericum*

Културите бяха стартирани от стерилизирани стъблени експланتي от *H. tetrapterum*, *H. rumeliacum*, *H. richeri* (хиперицин продуциращи) и *H. calycinum* (хиперицин не-продуциращ), събрани от естествените находища на растенията в България (B-Q3-3 и 4), като поради защитения статус и местонахождението на естествените находища на *H. calycinum*, в Странджа, при този вид културите бяха стартирани от надземни части на растението, отглеждано в градински условия. След индуциране на надземни части в хранителна среда, с добавяне на бензиладенин, за стоковите култури на растението бяха подбрани по експериментален път хранителни среди за дългосрочното им отглеждане в зависимост от спецификата на тяхното поведение в *ин vitro* условия. При *H. tetrapterum* и *H. calycinum* културите бяха поддържани в хранителна среда по Murashige & Skoog без добавяне на растежни

регулатори, *H. rumeliacum* беше отглеждан в хранителна среда с витамини по Gamborg, а *H. richeri* в хранителна среда с добавени бензиладенин и индолмаслена киселина (B-Q3-3).

### 2.3.2. Оценка на NO-антирадикаловата при хиперицин продуциращите видове от род *Hypericum species* (B-Q3-3)

Метанолните извлекци от *H. tetrapterum*, *H. rumeliacum* и *H. richeri*, получен чрез ултразвукова екстракция, бяха изследвани за тяхната антирадикалова активност спрямо NO-радикал спрямо Вит. С като стандарт ( $SD_{50} = 0.26 \text{ mg/ml}$ ).

Активността при *H. tetrapterum* беше по-ниска в сравнение със стандарта -  $SD_{50} = 0.97 \text{ mg/ml}$ , а двата вида, принадлежащи към еволюционно по-развитата секция *Drosocarpium* the two species, показаха значително по-висока активност -  $SD_{50} = 0.18$  и  $0.17 \text{ mg/ml}$  съответно за *H. rumeliacum* и *H. richeri*.

### 2.3.3. Оценка на връзката между ензимната активност и полифенолното съдържание при хиперицин непродуциращият *H. calycinum* (B-Q3-4).

За целите на експеримента, контролните растения бяха отглеждани в хранителна среда по Murashige & Skoog, без растежни регулатори, а за модифициране на *ин витро* морфогенеза бяха добавени растежни регулатори бензиладенин и индолмаслена киселина. Спектрофотометрично бяха отчетени следните ензимни активности: фенилаланин амоняк лиаза (PAL EC 4.3.1.24), глутатион редуктаза (GR EC 1.8.1.7), аскорбат пероксидаза (APX EC 1.11.1.11); каталаза (CAT EC 1.11.1.6) и супероксид дисмутаза (SOD, EC), не-ензимни антиоксиданти (аскорбат и дехидроаскорбат, окислен и редуциран глутатион, както и количественото съдържание на фенолни и флавоноидни съединения.

Бяха отчетени броят аксиларни разклонения, както и броят на листни двойки на формираните стъблени разклонения, с помощта на които количествено беше изразен индекса на компактност (IC) като брой листни двойки на линеен сантиметър. От обобщените данни бяха разделени групи и отчетена честотата на срещане на различните по тип разклонения. Добавянето на регулатори (PP) като цяло води до стимулиране на образуването странични разклонения при растението, но и намаляване на индекса на компактност и дължината на образуваните разклонения.

Беше установено, че добавянето на РР повишава активностите на PAL и SOD, а потиска CAT, GR и APX. РР понижават и неензимните антиоксиданти феноли и флавоноиди и съотношенията редуциран/окислен глутатион и аскорбат/дехидроаскорбат в сравнение с нетретирани контроли. Получените резултати показват връзката между стимулирането/потискането на листната маса и съдържанието на неензимни антиоксиданти и фенолни съединения при растението, както и физиологичното функциониране на ензимите CAT, GR и APX.

## **2.4. Резултати от работата по *Artemisia alba Turra***

### **2.4.1. Развитие на *in vitro* култура**

Културата от надземни части от растението беше стартирана от повърхностно стерилизирани надземни части от растителен материал, предоставен от Доц. Люба Евстатиева от ИБЕИ-БАН. За модификация на морфогенеза бяха използвани РР – бензиладенин и индолмаслена киселина (В-Q1-1).

### **2.4.2. Характеристика на получения растителен материал**

В резултат от модификациите на РР бяха получени два основни морфотипа на надземните части – контролните растения (без добавени РР), както и тези, при които индолмаслената киселина беше добавена самостоятелно се характеризираха с формиране на надземна и коренова част, а растенията с добавяне на бензиладенин и индолмаслена киселина в комбинация се характеризираха с потиснато коренообразуване и формиране на калус в основата на експланта (с рядка проява на индиректен кореногенез в средно 15 % от растенията) (В-Q1-1).

### **2.4.3. Характеристика на продукцията на вторични метаболити в *in vitro* отгледаните растения**

Сравнителният анализ на получените от надземните части етерични масла показва наличието на два основни типа масла – при растенията с развита коренова система маслата се характеризираха с повишено съотношение моно-/сескитерпени, докато потиснатото коренообразуване намалява това съотношение повече от два пъти (В-Q1-1).

Тенденциите, установени за подземните части бяха противоположни на надземните – беше наблюдавано значително доминиране на сескитерпените в кореновата тъкан (B-Q3-2).

Идентификацията на сескитерпените в кореновата тъкан показва, обаче, наличието на различни сескитерпенови компоненти в надземната и подземна част (B-Q1-2), изключвайки хипотезата за тяхната транслокация на ниво краен продукт.

Изследването на общото количество на фенолни и флавоноидни съединения показва, че потискането на коренообразуването води до значително стимулиране на полифенолните съединения в надземните части (B-Q3-1).

В заключение потискането на коренообразуването *ин vitro* повишава съдържанието на сескитерпени в етеричните масла и стимулира образуването на полифенолни съединения.

#### **2.4.4. Характеристика на ендегенното съдържание на цитокинини и хлоропластната архитектура при двата морфотипа бял пелин *ин vitro***

Като се има предвид решаващата роля на кореновата тъкан в биогенеза на ендегенните цитокинини, по-нататъчните изследвания бяха насочени към анализ на съдържанието на ендегенни цитокинини в проби от двата морфотипа, както и към охарактеризиране на хлоропластната им архитектура (B-Q1-2).

Беше установено, че потиснатото коренообразуване води до значително потискане на съдържанието на изопреноидните ендегенни биоактивни свободни бази и рибозиди, както и на техните *N*-захари. Също така при този морфотип се наблюдава и спад на отношението *транс:цис* зеатини в надземните части.

Също така беше отчетено и значително нарушение в организацията на фотосинтетичния апарат и хлоропластната архитектура при кореново-потиснатия морфотип.

Известно е, че в растителната клетка биогенеза на монотерпените, както и този на *транс*-зеатиновите цитокинини протича в значителна степен в хлоропласта, докато биогенеза на сескитерпените и *цис*-зеатиновите производни – в цитозола на клетката. Наблюдаваните закономерности дават основание да се предполага наличието на взаимовръзка между биогенеза на различните класове терпеноиди, както и биоактивните цитокинининови производни и хлоропластната архитектура в растителната клетка (B-Q1-2).

Като общо наблюдение, резултатите, получени от описания експеримент показват, че при *in vitro* условия, терпеноидният биогенез би могъл да бъде насочван чрез индуцирането на морфологични промени у отглежданите растения без извършване на генетични манипулации.

### **3. Перспективи за развитието на научната тематика през следващите три години.**

Планира се продължаване на започнатите вече разработки по научните тематики и направления, описани по-горе.

Експерименталната работа ще се провежда в рамките на текущите проекти и сътрудничества с колегите от БАН, СУ, както и по създадените вече сътрудничества с колеги от чужбина.

Ще бъдат търсени възможности за кандидатстване по национални и международни програми за финансиране на научните изследвания.

#### **3.1. Работа по диференцираните *in vitro* линии на отглежданите растения**

По отношение на културите от надземни части от *Artemisia alba* Turra (бял пелин) се предвижда допълване на изследванията по охарактеризиране на двата получени морфотипа. Ще бъде проведено по-задълбочено проучване на взаимовръзките между индивидуално охарактеризираните фенолни и флавоноидни съединения със степента на физиологична адаптация и продукция на стрес-хормони *in vitro*. Предвиждат се и по-задълбочени изследвания върху ефективността на провежданата *in vitro* фотосинтеза. Очаква се обобщението на резултатите от досегашните и плануваните изследвания да хвърли повече светлина за взаимовръзките между биогенеза на тези класове вторични метаболити, както да покаже възможните взаимоотношения с ендогенната хормонална регулация и процесите обусловени, от първичния растителен метаболизъм (каквото е фотосинтезата) в моделното растение.

В изпълнение на текущ проект ДН-09/11 (финансиран от ФНИ), се отглеждат и *in vitro* култури от надземни части на **британски оман (*Inula britannica*, Asteraceae).**



Проведени са първоначални изследвания по установяване на зависимостите между *in vitro* развитието на растението и продукцията на сескитерпенови лактони и фенолни киселини. В ход е и проучване на физиологичния статус и съдържанието на пластидни пигменти при растението *in vitro*. Очаква се извеждането на експеримента да позволи оптимизирането на *in vitro* система за продукцията на сескитерпенови лактони с изразена противоракова активност.

В Лаборатория ХПВ, ИОХЦФ-БАН се отглеждат и култури от надземни части от балканският ендемит мурсалски чай (*Sideritis scardica* Griseb., **Lamiaceae**). Сравнение на обогатени фракции от търговска проба и *in vitro* отгледаното растение показва, че фракциите, съдържащи съединения с флавоноид-дигликозидна структура показват силно изразена цитотоксичност по отношение на MCF-7 ракова клетъчна линия, докато фракциите, обогатени на фенилетаноиди не потискат деленето на клетките. Първоначалните резултати от биотехнологичната оптимизация на *in vitro* отглеждания мурсалски чай водят до получаване на системи за избирателно стимулиране на продукцията на всеки от двата класа съединения. Пълното извеждане на експериментите върху растението ще позволят задълбочаване на разбирането на факторите, свързани с техния биогенез, както и ще имат практическо приложение по получаване на растителна биомаса с фитотерапевтичен потенциал от растението.

### 3.2. Работа по генетично не-трансформираните коренови култури от отглежданите растения

В Лаборатория ХПВ, ИОХЦФ-БАН, се отглеждат генетично не-трансформирани коренови линии от **британски оман** в течни хранителни среди. Предварителните проучвания показват, че светлинното третиране оказва стимулиращ ефект върху продукцията на фенолни киселини, както и, че избора на типа ауксин, добавен в хранителната среда също повлиява тези процеси. Отгледаните в течна среда с добавени РР корени, също така имат значително по- висок биосинтетичен капацитет в сравнение с корени от цяло стерилно растение, отгледано в агарова среда.

Извеждането на планирания експеримент ще позволи по-доброто разбиране на биосинтетичните процеси, протичащи корена в рамките на цялостния растителен организъм в сравнение с тези при изолирани коренови линии, отглеждани без наличието на надземна част.

### 3.3. Работа по не-диференцираните линии от отглежданите в течни среди растения

В Лаборатория ХПВ, ИОХЦФ-БАН, се отглеждат недиференцирани линии от клетъчни агрегати в течна хранителна среда от **бял пелин**. Предварителните резултати показват, че светлинното въздействие и подбора на РР влияят върху продукцията на фенолни киселини, кумарините скополетин и фраксидин-8-глюкозид както и стрес-хормоните салицилова, абсцисиева и жасмонена киселина. Също така нивата на първоначалния стрес и липидна пероксидация от различните експланتي, от които стартира клетъчната линия оказва влияние върху фенолната продукция.

Изпълнението на плануваните експерименти ще позволи по-доброто развиване на факторите, свързани с кумариновата продукция и ще даде възможност за получаването на *ин витро* моделна система за тяхното контролирано получаване.

## 4. Библиографска справка

### 4.1. Литературни източници от други автори, използвани във

#### въведението

- Akkermans A.D.L., W. Roelofsen, J. Blom, K. Hussdanell, and R. Harkink., Can. J. Bot., 61, 1983, 2793–2800.
- Baker D. D., B. C. Mullin, In: Biological nitrogen fixation (ed. G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans), New York, Chapman & Hall, 1992, 259–292.
- Bulgarian Law for Medicinal Plants (2017) <https://lex.bg/laws/ldoc/2134916096>
- Burk, D.R., Senechal-Willis, P., Lopez, L.C., Hogue, B.G., Daskalova, S.M., 2009. Suppression of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages by aqueous extract of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **126**: 397–405
- CBD. Fourth National Report. Bulgaria. 2005-2008. Republic of Bulgaria Ministry of Environment And Water. <https://www.cbd.int/doc/world/bg/bg-nr-04-en.pdf>
- Dias MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira ICFR (2016) Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products* 82: 9–22
- Dzhambazov, B., Daskalova, S., Montevea, A., Popov, N., 2002. *In vitro* screening for antitumour activity of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae) extracts. *Biol Pharm Bull*, **25**:499-504
- Gao X., M. Ohlander, N. Jeppsson, L. Bjork, V. Trajkovski, J. Of Agric. And Food Chemistry, **48**, 2000,1485–90.
- Holobiuc I, Blindu R (2006-2007) *In vitro* culture introduction for *ex situ* conservation of some rare plant species Rom J Biol - Plant Biol 51-52: 13 - 23, Bucharest
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Fourth Assessment Report (AR4), published in 2007
- Kumar P., S. Namita and H.C. Goel, Mol Cell Biochem, **238**, 2002, 1-2, 1-9.

- Li T.S.C, L.C.H. Wang. In: Functional foods, biochemical & processing aspects (ed. G. Mazza), Technomic Publ. Co. Inc., Lancaster, PA, 1998, p. 329–56.
- Lombardino JG (2000) A brief history of Pfizer Central Research. Bull. Hist. Chem.25: 10-15.
- Loyola-Vargas, V.M., Vázquez-Flota, F. (Eds.), 2006. Plant Cell Culture Protocols, vol.318. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong SM, Jang MO, Jin YW, Lee EK, Loake GJ (2016) Plant cell culture strategies for the production of natural products. BMB Rep. 49: 149-158
- Petrova, A., Vladimirov, V. 2007. Recent (1994–2004) taxonomic studies on the Bulgarian flora. – Bocconeia, 21: 7-25.
- Petrova, A., Vladimirov, V. (eds). 2009. Red List of Bulgarian vascular plants. Phytologia Balcanica 15 (1): 63 – 94, Sofia.
- Radulović N, Blagojević P (2010) Volatile profiles of *Artemisia alba* Turra from contrasting serpentine and calcareous habitats. Natural Product Communications, 5: 1117-1122
- Ronse A, De Pooter HL. (1990) Essential oil production by Belgian *Artemisia alba* (Turra) before and after micropropagation. *Journal of Essential Oil Research*, 2, 237-242;
- Routian JB, Nickell LG (1956) US Patent 2 747 334
- Roussi A., Ann. Bot. Fenn., 8, 1971, 177–227.
- Stojanovic G, Palic R, Mitrovic J. (2000) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lobelii* All. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 621-624.
- Suleyman H., L.O. Demirezer, M.E. Buyukokuroglu, M.F. Akcay, A. Gepdiremen, Z.N. Banoglu, F. Gocer , *Phytotherapy Research*, 15, 2001, 625–7.

## 4.2. „B“ - Научни публикации включени в хабилитационната справка

### B-Q1

- 1) Danova, K.; Todorova, M.; Trendafilova, A.; Evstatieva, L. Natural Product Communications, 2012, 7, 1075 – 1076 (**Cytokinin and Auxin Effect on the Terpenoid Profile of the Essential Oil and Morphological Characteristics of Shoot Cultures of *Artemisia alba***)
- 2) Danova, K.; Motyka, V.; Todorova, M.; Trendafilova, A.; Krumova, S.; Dobrev, P.; Andreeva, T.; Oreshkova, T.; Taneva, S.; Evstatieva, L. Journal of Plant Growth Regulation. 2018, 37, 403–418 (**Effect of Cytokinin and Auxin Treatments on Morphogenesis, Terpenoid Biosynthesis, Photosystem Structural Organization, and Endogenous Isoprenoid Cytokinin Profile in *Artemisia alba* Turra In Vitro**)

### B-Q2

- 1) Petrova, A.; Danova, K.; Kapchina-Toteva, V. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 2008,61, 363–370. (**Ecological Evaluation and Conservational Value for Bulgaria of *Hippophae Rhamnoides* L. Total Flavonoids Determination and Experiments on *In Vitro* Culture Induction**)

### B-Q3

- 1) Petrova,N.; Koleva,P.; Velikova,V.; Tsonev,T.; Andreeva,T.; Taneva,S.; Krumova,S.; Danova,K. International Journal Bioautomation, 2018, 22, 73-82. (**Relations between Photosynthetic Performance and Polyphenolics Productivity of *Artemisia alba* Turra in *in vitro* Tissue Cultures**)

- 2) Krumova, S.; Motyka, V.; Dobrev, P.; Todorova, M.; Trendafilova, A.; Evstatieva, L.; Danova, K. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2013, 19, 26-30. (**Terpenoid Profile of *Artemisia alba* is Related to Endogenous Cytokinins *In Vitro***)
- 3) Mehandzhiyski, A.; Batovska, D.; Dimitrov, D.; Evstatieva, L.; Danova, K. Bulgarian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 19, 31-34. (**Nitric Oxide-Scavenging Activity of *In Vitro* Cultured Balkan Medicinal and Aromatic Plants**)
- 4) Treneva, G.; Markovska, Y.; Wolfram, E.; Danova, K. Bulgarian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 20, 46-50. (**Effect of Plant Growth Regulators on Growth Patterns and Enzymatic Antioxidant Activities in *Hypericum calycinum* Shoot Cultures**)

#### 4.3. “Г” – Научни публикации извън хабилитационната справка

##### Г-Q1

- 1) Danova, K.; Nikolova-Damianova, B.; Denev, R.; Dimitrov, D. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2012, 110, 383–393. (**Influence of vitamins on polyphenolic content, morphological development, and stress response in shoot cultures of *Hypericum* spp**)
- 2) Danova, K.; Nikolova-Damianova, B.; Denev, R.; Markovska, Y. Plant Growth Regulation. 2012, 68, 447–457. (**Impact of pre-culture on short- and long-term *in vitro* recovery of the biosynthetic potential and enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense of *Hypericum rumeliacum* Boiss. after cryostorage**)
- 3) Todorova, M.; Trendafilova, A.; Danova, K.; Simmons, L.; Wolfram, E.; Meier, B.; Riedl, R.; Evstatieva, L. Phytochemistry, 2015, 110, 140-149. (**Highly oxygenated sesquiterpenes in *Artemisia alba* Turra**)

##### Г-Q2

- 1) Todorova, M.; Trendafilova, A.; Ivanova, V.; Danova, K.; Dimitrov, D. Natural Product Research, 2017, 31, 1693-1696. (**Essential oil composition of *Inula britannica* L. from Bulgaria**)
- 2) Ivanova, V.; Trendafilova, A.; Todorova, M.; Danova, K.; Dimitrov, D. Natural Product Communications, 2017, 12, 153-154. (**Phytochemical Profile of *Inula britannica* from Bulgaria**)
- 3) Trendafilova, A.; Todorova, M.; Genova, V.; Peter, S.; Wolfram, E.; Danova, K.; Evstatieva, L. Chemistry & Biodiversity, 2018, 15. (**Phenolic Profile of *Artemisia alba* Turra**)
- 4) Aneva, I.; Zhelev P.; Kozuharova E.; Danova, K.; Nabavi S.F.; Behzad, S. DARU Journal of Pharmaceutical Science. 2019, <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00261-8>. (**Genus *Sideritis*, section *Empedoclia* in southeastern Europe and Turkey – studies in ethnopharmacology and recent progress of biological activities**)

##### Г-Q3

- 1) Todorova, M.; Trendafilova, A.; Danova, K.; Dimitrov, D. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39, 4-6. (**Phytochemical study of *Anthemis rumelica* (Velen.) Stoj. & Acht.**)

##### Г-Q4

- 1) Mártonfióvá, L.; Danova, K.; Toteva, V.K.; Čellárová, E. Thaiszia - J. Bot., 2, 2014, 24, 143-150. (**Karyotype analysis of *Hypericum rumeliacum* Boiss.**)

- 2) Amer, H.M. ; El-Gohary, A.E.; Hendawy, S.F.; Hussein, M.S., Danova, K. Bioscience Research, 2019, 6, 561-572. **(Improvement of growth parameters and essential oil productivity of *Anthriscus cerefolium* L. by planting distances and fertilization treatments)**
- 3) Danova, K.; Ionkova, I.; Vasilev, N.; Ninov, St.; Troiantcheva, B. Pharmacia, 1-2 vol. LII, 2005, 56-59. **(Influence of the composition of nutrition media on the production of aryltetralin lignans in *Linum tauricum* ssp. *tauricum* (WILLD) Petrova cellular and tissue cultures)**

Book chapters

#### **Г-Book Ch**

- 1) Danova, K. **Biotechnological utilization of the indigenous biosynthetic capacity of medicinal and aromatic plants. Experience in the genera *Hypericum*, *Pulsatilla* and essential oil bearing *Artemisia alba* characteristic for the Balkan region;** Book chapter for Series Recent Progress in Medicinal Plants; Vol.39: Biotechnology and Genetic Engineering II, 2014, 355–392 pp., Series ISBN: 0-9656038-5-7, Vol ISBN: 1-933699-99-X, Studium Press LLC, USA
- 2) Danova, K. (2015) **Potential of the Balkan Flora as a Source of Prospective *Hypericum* Genotypes for the Conventional and Biotechnological Delivery of Phytopharmaceuticals. Chapter 2 in: *Hypericum: Botanical Sources, Medical Properties and Health Effects*. Howard R. Davis (Ed), Series Plant Science Research and Practices, Nova Science Publishers, USA, ISBN: 978-1-63482-701-0, pages 19-52**
- 3) Danova, K. **Roles of Developmental Patterns and Morphogenesis in the Secondary Metabolite Production of Conventionally and Biotechnologically Cultivated Medicinal and Aromatic Plants. Chapter 1 in: *Recent Advances in Plant Research*; Editors: Beatrice Welch and Micheal Wilkerson; Series: Plant Science Research and Practices. Nova Science Publishers, USA, ISBN: 978-1-53614-170-2, 2018**

#### **4.4. Други публикации на кандидата**

1. Danova K., Y. Markovska, D. Dimitrov, V. Kapchina-Toteva (2007) In vitro culture initiation and phenol and flavonoid determination of some medicinal plants, endemic to the Balkan flora, Proceedings book of International Scientific Conference Stara Zagora, June 7-8, 2007, vol. 1 “Plant breeding”, pp 222 - 229.
2. Danova K., Damianova P., Kapchina-Toteva V. (2007) Utilization of the methods of in vitro propagation for resource purposes in medicinal plants breeding. In vitro cultivation of some *Hypericum* species. Journal of mountain agriculture 10(6): 1074-1089.
3. Danova K., Yordanova Zh., Markovska Yu, Čellarova E, Kapchina-Toteva V (2007) Propagation in vitro of *Orthosiphon stamineus*, proceedings book of International Scientific Conference Stara Zagora, JUNE 7-8, 2007, pp 406-411.
4. Gorgorov R, Danova K., Dimitrov D., Markovska Y., Kapchina-Toteva V. (2009) Micropropagation and some secondary metabolites of *Lamium album*, Proceedings Book of International Scientific Conference, Stara Zagora 5-6 June, 131-135.

5. Danova K, Kapchina-Toteva V. Cryopreservation – a new method for conservation of *Hypericum rumeliacum* Boiss. (2009) Proceedings of the International Scientific Conference (June, 2009, Stara Zagora, Bulgaria), vol. 3 “Medical Biol. Studies”, pp 90-95.
6. Danova K, Urbanová M, Skyba M, Čelárová E, Stefanova M, Koleva D, Kapchina-Toteva V (2009) Impact of cryopreservation on biochemical parameters of in vitro cultured *Hypericum rumeliacum* Boiss. (2009) Proceedings of International Symposium “New Research in Biotechnology” (19-20 Nov, Bucharest), pp 78-85.
7. Danova K, Čelárová E, Kapchina-Toteva V. (2010) Impact of growth regulators on in vitro regeneration of *Hypericum rumeliacum* Boiss., Journal of Environmental Prot and Ecol, 11: 1285-1292. **IF = 0.16**
8. Danova K., Čelárová E., Macková A., Daxnerová Z, Kapchina-Toteva V, (2010) In vitro culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 46: 422-429 **IF = 1.48**
9. Danova K (2010) Production of polyphenolic compounds in shoot cultures of *Hypericum* species characteristic for The Balkan Flora. Botanica Serbica, 34(1): 29-36.
10. Danova K, Bertoli A, Pistelli Laura, Dimitrov D, Pistelli Lu (2009) In vitro culture of Balkan endemic and rare *Pulsatilla* species for conservational purposes and secondary metabolites production. Botanica Serbica, 33(2): 157-162.
11. Dimitrova M, Dragolova D, Lyudmilov V, Danova K, Dimitrov D, Kapchina-Toteva V (2009) Micropropagation of *Leonurus cardiaca* – influence of auxins and cytokinins. General and Applied Plant Physiology, Volume 35 (3–4), pp. 146–152
12. Miladinova K., Georgieva T., Ivanova K., Geneva M., Danova K., Markovska Y. (2012) Ex vitro growth and antioxidative responses of two *Pawlownia* clones to Zn excess. Proceedings book, International conference, Ecology- interdisciplinary science and practice, Sofia 25-26 Oct. 2012, pp. 526-530.
13. Miladinova K., Georgieva T., Ivanova K., Geneva M., Danova K., Markovska Y. (2012) Cadmium and lead effects on ex vitro growth and antioxidative response of two *Paulownia* clones. Proceedings book, International conference, Ecology- interdisciplinary science and practice, Sofia 25-26 Oct. 2012, pp. 520-525.
14. Raynova Y, Markovska Y, Idakieva K, Wolfram E, Danova K. (2014) Relations between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence involved in polyphenolics production of *Artemisia alba* in vitro, proceedings book, Seminar of Ecology, Union of Scientist, Bulgaria, Sofia 24-25 April 2013, pp 134-138
15. Treneva, G.; Markovska, Y.; Wolfram, E.; Danova, K. (2014) Effect of plant growth regulators on growth patterns and enzymatic antioxidant activities in *Hypericum calycinum* shoot cultures, *Bulg J Agr Sci* (2014) 20 (1) 2014, 000–000, P-ISSN 1310-0351 – **IF = 0.3**
16. Todorova M., Trendafilova A., Krumova S., Idakieva K., Genova V., Markovska Y., Raynova Y., Evstatieva L., Wolfram E., Danova K. (2015) Interdisciplinary interaction for the biotechnological development of Balkan medicinal plant species, Proceedings book of the Seminar of Ecology 2014, 24-25 April, Union of Scientists, Bulgaria, Section Biology, pp 95-98.

17. Raynova Y, Idakieva K. Markovska Y, Wolfram-Schilling E., Danova K. (2016) Protein profiling and antioxidant enzyme activity of *Artemisia alba in vitro* cultures, Proceedings book of Seminar of Ecology with International participation, 23-24 April 2015, Sofia, Bulgaria pp160-162.
18. Krumova S., Andreeva T., Oreshkova Ts., Motyka V., Dobrev P., Todorova M., Trendafilova A., Petrova N., Taneva St., Danova K. (2016) Do endogenous cytokinins regulate terpenoid biogenesis and thylakoid morphogenesis in *Artemisia alba in vitro* model system? (2016) Proceedings book of Seminar of Ecology with International participation, 23-24 April 2015, Sofia, Bulgaria pp 163-165
19. Azaiez S., Slimene-Debez I., Limam F., Tounsi M., Hamami M., Mliki A., Bouamama B., Jebara M., Borji M., Danova K (2016) Screening of the antimicrobial activity of *in vitro* cultivated medicinal plants originating from Bulgaria and Tunisia (2016) Proceedings book of Seminar of Ecology with International participation, 23-24 April 2015, Sofia, Bulgaria pp 165-167
20. Hendawy SF, El-Gendy AG, El Gohary AE, Hussein MS, Danova K, Omer EA (2015) Evaluation of biomass formation, essential oil yield and composition of four different *Matricaria recutita* L. cultivars grown in Egypt. World Journal of Pharmaceutical Sciences, ISSN (Print): 2321-3310; ISSN (Online): 2321-3086 **IF = 0.453**
21. Koleva P., Wolfram E., Pedrussio S., Raynova Y., Evstatieva L., Danova K. (2015) In vitro culture development and polyphenolics production of *Artemisia alba* Turra. J. Bio Sci. Biotechnol. 2015, SE/ONLINE: 131-136
22. Danova K., Koleva P., Aneva I., Evstatieva L (2017) Multiplication and polyphenolics production of *Sideritis scardica* through different tissue culture approaches. Proceedings book of Seminar of Ecology with International participation, 21-22 April 2016, Sofia, Bulgaria pp 100-104
23. **Kalina Danova**, Petre I. Dobrev, **Antoaneta Trendafilova**, **Milka Todorova**, Vaclav Motyka. Modification of morphogenetic patterns in tissue cultures of *Artemisia alba turra* as a key for secondary metabolites targeting. SGEM Geo Conferences, **2018**, ISBN:978-619-7408-3, ISSN:1314-2704, DOI:<https://doi.org/10.5593/sgem2018v/6.4/s08.028>, 219-226
24. **Petya Koleva**, Elena Stoyanova, **Kalina Alipieva**, Ina Aneva, Ljuba Evstatieva, **Kalina Danova**. Cytotoxic activity of *Sideritis scardica* extracts and fractions on human breast adenocarcinoma cell line MCF7. Proceedings Book of the 10th Anniversary SEMINAR OF ECOLOGY - 2017, **ΦΑΡΑΓΟ**, **2018**, ISBN:979-853-476-132-4, 124-126
25. Kalina Danova, Vaclav Motyka, Petre Dobrev (2019) Effects of *in vitro* morphogenesis and developmental patterns of *Artemisia alba* Turra on polyphenolics production and endogenous stress hormones. Proceedings Book of the 11th SEMINAR OF ECOLOGY - 2018, Publisher: Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences, **2018**, ISBN: 978-954-9746-45-