

1_Flax Improvement by Biotechnology Means

M. Evtimova, M. Vlahova & A. Atanassov

Резюме

Настоящата статия е кратък обзор на публикации, засягащи развитието и оптимизирането на техниките за тъканни култури (регенерация чрез органогенез, соматичен ембриогенез, антерни култури) и разработване на ефективни протоколи за генен пренос като инструмент за подобряване на лена. Очертани са различни фактори, влияещи върху процесите на *in vitro* регенерация и трансформация. Обсъждат се перспективите в областта на усъвършенстването на лена чрез биотехнологични подходи.

Abstract

The present paper is a short review of publications revealing development and optimization in tissue culture techniques (regeneration via organogenesis, somatic embryogenesis, anther cultures) and elaboration of efficient protocols for gene transfer as a tool for flax improvement. Different factors affecting the processes of *in vitro* regeneration and transformation are outlined. Perspectives in the area of biotechnological improvement of flax are discussed.

2_Reducing methyl eugenol content in *Rosa damascena* Mill rose oil by changing the traditional rose flower harvesting practices

Krasimir Rusanov, Natasha Kovacheva, Mila Rusanova, Ivan Atanassov

Резюме

Метил евгенолът (МЕ) е естествено срещащо се канцерогенно съединение, което се намира в редица етерични масла включително розово масло, дестилирано от цветовете на *Rosa damascena* Mill. В настоящото изследване ние оценяваме ефекта от практиките за събиране на розов цвят върху съдържанието на МЕ в произведеното розово масло. Получените резултати показват близо два пъти намаление на съдържанието на МЕ в розовото масло, дестилирано от венчелистчетата на напълно разцъфнали цветове. В същото време, GC/MS анализът на розови масла, дестилирани от етапи 3 и 4 на розови цветни пъпки (цветни пъпки преди отваряне на венчелистчетата) показва повече от 5 пъти намаляване на МЕ и запазване на относителното съдържание на основните съединения на розовото масло. Освен това, сравнителното изследване на добива на розов цвят и съдържанието на розово масло в цветните пъпки и напълно разцъфнали цветове показва, че събирането на розови цветни пъпки води до повече от три пъти увеличение на образуваните цветни пъпки от изследваните розови растения и повече от два пъти увеличение на добива на розов цвят и розово масло за едни и същи площи с розови насаждения. Общите резултати от това проучване ни позволяват да предложим промяна в традиционното събиране на цветя от рози към събиране на цветни пъпки от рози на етапи 3 и 4 по време на целия период на цъфтеж.

Abstract

Methyl eugenol (ME) is a naturally occurring carcinogenic compound found in a number of essential oils including rose oil distilled from *Rosa damascena* Mill flowers. In the current study, we evaluate the effect of flower harvesting practices on the ME content in the produced rose oil. The obtained results show nearly twice reduction in ME content in the rose oil distilled from petals of full-blown flowers. At the same time, GC/MS analysis of rose oils distilled from stages 3 and 4 rose flower buds (flower buds prior opening of petals) showed more than 5 times ME reduction and preservation of the relative content of the major rose oil compounds. Moreover, the comparative study of rose flower yield and rose oil content of rose buds and full-blown flowers showed that harvesting of rose flower buds results in above three times increase in the formed flower buds from the studied rose plants and more than twice increase in the rose flower and rose oil yields for the same rose plantation areas. The overall results from this study allow us to propose a change in the traditional full-blown rose flower harvesting to harvesting of rose flower buds at stages 3 and 4 during the entire flowering period.

3_Microwave plasma torch generated in argon for small berries surface treatment

Bogdanov T, Tsonev I, Marinova P, Benova E, Rusanov K, Rusanova M, Atanassov I, Kozáková Z, Krčma F.

Резюме

Търсенето на качество на храните и продължителна свежест без използването на вредни химикали се превърна в основна тема през последното десетилетие. Новите технологии използват UV светлина, силно електрическо поле, озон и други реактивни агенти за обеззаразяване на хранителни повърхности. Нискотемпературната неравновесна (студена) плазма работеща при атмосферно налягане съчетава ефективно всички качества, споменати по-горе и по този начин, благодарение на тяхното синергично въздействие, могат да се получат обещаващи резултати при обеззаразяване на повърхността на плодовете. Настоящият документ се фокусира върху приложимостта на наскоро разработената плазмена горелка с микровълнова повърхностна вълна за третиране на избрани малки плодове. Оптична емисионна спектроскопия бе използвана за определяне на плазмени активни частици (радикали, UV светлина) и параметри на плазмата по време на обработката на плодовете. Изображенията от инфрачервена камера потвърждават ниското и напълно приложимо нагряване на третираната повърхност, което гарантира липса на промени в качеството на плодовете. Подробното проучване показва, че ефективността на микробното обеззаразяване на избрани плодове, естествено замърсени с микроорганизми е силно зависима от формата на повърхността на плода. Обеззаразяването на грапавата повърхност на ягодите изглежда неефективно при настоящата конфигурация, но за гладките плодове бяха получени обещаващи резултати. И накрая, измерванията на антиоксидантната активност не показват промени, дължащи се на плазмено третиране. Резултатите потвърждават, че продължителният разряд на MW повърхностна вълна е приложим за обеззаразяване на повърхността на плодовете.

Abstract

Demand for food quality and extended freshness without the use of harmful chemicals has become a major topic over the last decade. New technologies are using UV light, strong electric field, ozone and other reactive agents to decontaminate food surfaces. The low-power non-equilibrium (cold) atmospheric pressure operating plasmas effectively combines all the qualities mentioned above and thus, due to their synergetic influence, promising results in fruit surface decontamination can be obtained. The present paper focuses on the applicability of the recently developed microwave surface wave sustained plasma torch for the treatment of selected small fruit. Optical emission spectroscopy is used for the determination of plasma active particles (radicals, UV light) and plasma parameters during the fruit treatment. The infrared camera images confirm low and fully applicable heating of the treated surface that ensures no fruit quality changes. The detailed study shows that the efficiency of the microbial decontamination of selected fruits naturally contaminated by microorganisms is strongly dependent on the fruit surface shape. The decontamination of the rough strawberry surface seems inefficient using the current configuration, but for smooth berries promising results were obtained. Finally, antioxidant activity measurements demonstrate no

changes due to plasma treatment. The results confirm that the MW surface wave sustained discharge is applicable to fruit surface decontamination.

4_Genetic control of flower petal number in *Rosa x damascena* Mill f. *trigintipetala*

Rusanov K, Kovacheva N, Rusanova M, Linde M, Debener T, Atanassov I

Резюме

Изследвахме признака за брой на венчелистчетата в популация, получена след самоопрашване на *R. x damascena* f. *trigintipetala* посредством анализ на молекулни маркери, които преди това са били картирани близо до основния доминантен локус Blfo/d6, определящ този признак при други видове рози, включително *R. multiflora* и *R. hybrida*. Резултатите показаха, че един и същи генетичен механизъм, който определя признака за брой на венчелистчетата в *R. multiflora* и *R. hybrida*, също контролира признака и при *R. x damascena* f. *trigintipetala* и е свързан с доминантния ефект на алел с едно копие в тетраплоидния геном на този вид. Ние също така анализирахме експресията на няколко цветни хомеотични гена, включително *R. x damascena* APETALA1/FUL-like (палео AP1 тип), *R. x damascena* euAPETALA 3 (euAP3 линия) и *R. x damascena* AGAMOUS в цветни пъпки на ранен етап, съответстващи на растения с кичести и прости цветове. Получените резултати показаха, че само *R. x damascena* AGAMOUS се експресира в различна степен между пробите от кичести и прости цветове, като относителната му експресия е с 3,5 пъти повишена регулация в прости цветове. Освен това клонирахме и секвенирахме четирите геномни клона на *R. x damascena* AGAMOUS и проучихме потенциалния адитивен ефект на този ген чрез анализиране на сегрегацията на четирите му алела в популацията на самоопрашена *R. x damascena*. Анализът на дисперсията на данните за броя на венчелистчетата и сегрегацията на алелите не показва статистически значим ефект на която и да е алелна конфигурация на гена AGAMOUS върху признака за броя на венчелистчетата при *R. x damascena* f. *trigintipetala*.

Abstract

We studied the petal number trait in a population obtained after self-pollination of *R. x damascena* f. *trigintipetala* following analysis of molecular markers which have previously been mapped near the major dominant locus Blfo/d6 determining this trait in other rose species including *R. multiflora* and *R. hybrida*. The results showed that the same genetic mechanism, which determines the petal number trait in *R. multiflora* and *R. hybrida* also controls the trait in *R. x damascena* f. *trigintipetala* and is related to the dominant effect of a single copy allele in the tetraploid genome of this species. We also analyzed the expression of several flower homeotic genes including *R. x damascena* APETALA1/FUL-like (paleo AP1 type), *R. x damascena* euAPETALA 3 (euAP3 line) and *R. x damascena* AGAMOUS in early stage flower buds corresponding to plants with double and simple flowers. The obtained results showed that only *R. x damascena* AGAMOUS was differentially expressed between the samples of double and simple flowers, its relative expression being upregulated 3.5-fold in simple flowers. We further cloned and sequenced the four genomic clones of *R. x damascena* AGAMOUS and studied the potential additive effect of this gene by analysing the segregation of its four alleles in the population of self-pollinated *R. x damascena*. Analysis of variance of the data for petal number and allele segregation did not show a statistically significant effect of any allele configuration of the AGAMOUS gene on the petal number trait in *R. x damascena* f. *trigintipetala*.

5_Genetic and flower volatile diversity in two natural populations of *Hyssopus officinalis* L. in Bulgaria

Zagorcheva T, Rusanov K, Rusanova M, Aneva I, Stancheva I, Atanassov I.

Резюме

Анализирано бе генетичното разнообразие и разнообразието от летливи съединения в цветовете на 59 растения от две естествени популации на *Hyssopus officinalis* L., разположени на разстояние 73 km една от друга в типични за този вид райони на отглеждане в България. Анализът с 10 комбинации от праймери за свързани с последователността амплифицирани полиморфизми (SRAP) показва общо 1045 пика, от които 88,7% бяха полиморфни. Анализът на главните координати (PCoA) и груповият метод на непретеглената двойка със средно аритметично (UPGMA) показаха ясно групиране на пробите, въз основа на техния произход от популации. Въпреки това, анализът на генетичната диференциация показва, че двете популации (Годеч и Извор) са генетично сходни, което се вижда от ниските стойности на F_{st} и G_{st} , както и от ниската стойност за генетична дистанция по N_{ei} и високия генен поток (N_m). Анализ с газова хроматография-маспектрометрия (GC-MS) на екстракти от цветовете на същите отделни растения, които бяха използвани в анализа на генетично разнообразие, доведе до идентифицирането на общо 32 съединения. Анализът на основните компоненти (PCA), базиран на съдържанието на съединенията, показва наличие на два основни клъстера от проби, които не съответстват на техния произход по популации. Задълбоченият анализ на съдържанието на съединенията показва голямо вариране между двата идентифицирани клъстера, включително пълно присъствие/отсъствие на основни съединения и съществуването на два различни хемотипа, съответстващи на идентифицираните клъстери. Нашите резултати показват, че бъдещите усилия за създаване на колекции от генетични ресурси, както и преходът към полско отглеждане на този вид в България трябва да вземат предвид наличието на двата идентифицирани хемотипа в естествените популации и факторите (както генетични, така и епигенетични), които определят тяхното съществуване.

Abstract

The genetic and flower volatile diversity of 59 plants from two natural populations of *Hyssopus officinalis* L. situated 73 km away from each other in typical growing regions for this species in Bulgaria were analysed. Analysis with 10 sequence related amplified polymorphism (SRAP) primer combinations scored a total of 1045 peaks of which 88.7% were polymorphic. Principal Coordinate Analysis (PCoA) and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering revealed clear grouping of samples based on their population origin. However, analysis of the genetic differentiation revealed that the two populations (Godech and Izvor) are genetically similar as shown by the low F_{st} and G_{st} values as well as by the low N_{ei} 's genetic distance and high gene flow (N_m). Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis of flower extracts from the same individual plants that were used in the genetic diversity analysis identified 32 compounds. Principal Component Analysis (PCA) based on compound abundances revealed two major clusters of samples which did not correspond to their population origin. In depth analysis of the compound abundances showed large variation between the two identified clusters including complete presence/absence of major compounds and the existence of two distinct chemotypes corresponding to the identified

clusters. Our results indicate that future efforts towards development of genetic resource collections as well as transition towards field cultivation of this species in Bulgaria should take into account the presence of the two identified chemotypes in natural populations and the factors (both genetic and epigenetic) which determine their existence.

6_DNA marker tightly linked to the double flower locus in *Rosa* × *damascena* Mill. f. *trigintipetala* suitable for marker assisted breeding

Rusanov K, Rusanova M, Kovacheva N, Atanassov I.

Резюме

Настоящото изследване съобщава за разработването на ДНК маркер, тясно свързан с фенотипа за кичест цвят (DF) при *R. × damascena*, подходящ за провеждане на маркерно подпомагана селекция. Разработването на този маркер се основава на предходно идентифициране на геномна област, свързана с фенотипа DF при *R. × damascena* и скорошни изследвания, демонстриращи участието на гена AP2/TOE във формирането на DF при няколко вида от семейство *Rosaceae*. Ние идентифицирахме полиморфна област, наречена RdDF намираща се преди гена AP2/TOE при *R. × damascena* и използвахме данните за последователността за дизайн на PCR праймери. Анализът на сегрегирането на четирите алела на RdDF в популация от 104 растения, получени след самоопрашване на *R. × damascena*, показва, че един от алелите (RdDF-B, 203 бд) е тясно свързан с фенотипа DF. Анализът на сегрегирането на два SSR маркера, разположени на разстояние приблизително 1578 кб и 1129 кб от двете страни на RdDF, показва, че отдалечаването от разработения RdDF маркер води до наблюдаване появата на рекомбинантни растения с прости цветове, подкрепяйки по този начин асоциирането на RdDF с фенотипа DF. Обсъжда се приложението на разработения RdDF маркер за маркерно подпомагана селекция (MAS) и селекционни програми, включващи *R. × damascena*, както и по-нататъшно изследване на молекулната основа на образуването на DF при този вид.

Abstract

The present study reports the development of a DNA marker tightly linked to the double flower (DF) phenotype in *R. × damascena*, suitable for marker assisted breeding. The development of this marker is based on previous identification of genome region associated with the DF phenotype in *R. × damascena* and recent studies demonstrating involvement of the AP2/TOE gene in the formation of DF in several species from the Rosaceae family. We identified a polymorphic region named RdDF upstream of the AP2/TOE gene in *R. × damascena* and used the sequence data for designing PCR primers. Segregation analysis of the four alleles of RdDF in a population of 104 plants obtained after self-pollination of *R. × damascena* showed that one of the alleles (RdDF-B, 203 bp) is tightly linked to the DF phenotype. Analysis of the segregation of two SSR markers located at a distance of approximately 1578 kb and 1129 kb on both sides of RdDF, showed that walking away from the developed RdDF marker results in the observation of simple flower recombinant plants, supporting association of RdDF with the DF phenotype. The application of the developed RdDF marker for marker assisted selection (MAS) and breeding programmes involving *R. × damascena*, as well as further study of the molecular base of DF formation in this species are discussed.

7_GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT OF CALENDULA OFFICINALIS WILDING PLANTS LOCALLY GROWN IN BULGARIA, USING SRAP MARKERS

Tzvetelina Zagorcheva, Mila Rusanova, Krasimir Rusanov, Ivan Atanassov

Резюме

Невенът (*Calendula officinalis* L.) е добре познато градинско растение, отглеждано и за медицински цели. У нас *C. officinalis* е едногодишно растение, което често се самозасява и по този начин напуска пределите на градините. Настоящото изследване описва оценка на генетичното разнообразие на диворастящи растения *C. officinalis*, произхождащи от района на Розовата долина, България, с помощта на SRAP (sequence-related amplified polymorphism) маркери. Анализът на данните с помощта на софтуера Structure не показва съществуването на ясна генетична структура в рамките на този набор от анализирани диви растения. Беше извършен допълнителен сравнителен SRAP анализ на малки групи растения *C. officinalis*, произхождащи от семена на диви растения и семена, получени от различни европейски доставчици на семена. Получените резултати показват, че генетичното разнообразие на тестваните диви растения до голяма степен наподобява нивото на генетично разнообразие на групите растения, получени от наличните в търговската мрежа семена на *C. officinalis*. Обсъжда се възможността за използване на диворастящи растения от *C. officinalis* за селекция на линии и сортове, добре адаптирани към местните условия и подходящи за органично отглеждане и производство на биоактивни екстракти и съединения.

Abstract

The pot marigold (*Calendula officinalis* L.) is a well-known garden plant cultivated also for medicinal purposes. In Bulgaria, *C. officinalis* is an annual plant, often self-seeding and generating garden escapees. The present study describes assessment of the genetic diversity of wilding *C. officinalis* plants originating from the region of the Rose Valley, Bulgaria, using SRAP (sequence-related amplified polymorphism) markers. Analysis of the data using the Structure software did not support the existence of a clear genetic structure within this set of analyzed wilding plants. Further comparative SRAP analysis of small sets of *C. officinalis* plants originating from seeds of wilding plants and seeds derived from various European seed suppliers was carried out. The results suggest that the genetic diversity of the tested wilding plants largely resembles the range of genetic diversity of the plant sets derived from commercially available *C. officinalis* seeds. The possibility of using wilding *C. officinalis* plants for selection of breeding lines and varieties, well adapted to the local conditions and suitable for organic growing and production of bioactive extracts and compounds is discussed.

8_High cross-pollination rate of Greek oregano (*O. vulgare* ssp. *hirtum*) with Common oregano (*O. vulgare* ssp. *vulgare*) under open field conditions as revealed by microsatellite marker analysis

Alekseeva M, Rusanova M, Georgieva L, Rusanov K, Atanassov I

Резюме

Изследвахме начина на опрашване при белия риган (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) при контролирани условия и при опрашване на открито. Когато се отглеждат на закрито без присъствието на насекоми, растенията бял риган не развиват никакви семена, което показва ниско ниво на спонтанно самоопрашване. Прилагането на ръчно самоопрашване при същите условия доведе до формирането само на 16 семена, от които само 5 успяха да покълнат. В същото време, клонално размножено растение бял риган от същия генотип формира богат набор от над 300 семена в условия на открито, когато цветовете бяха посещавани от насекоми в район, където не бяха наблюдавани други видове *Origanum*. Анализът с SSR маркери показва, че над 70% от семената вероятно са резултат от самоопрашване, което показва, че извършването от насекоми опрашване е от съществено значение за развитието на семена. Освен това анализирахме кръстосаното опрашване на бял риган с обикновен риган (*O. vulgare* ssp. *vulgare*) в условия на открито, където двата подвида се отглеждат в непосредствена близост. Използвайки SSR маркери, анализирахме 83 растения, получени от семена на три вегетативно размножени майчини растения бял риган. Изненадващо, резултатите показаха, че всички анализирани семеначета са получени в резултат от кръстосано опрашване на бял риган с обикновен риган, което показва, че кръстосаното опрашване между двата подвида може напълно да задмине самоопрашването или кръстосаното опрашване между растенията бял риган. Обсъжда се възможното въздействие на наблюдаваната висока степен на кръстосано опрашване върху генетичния произход на семената на избрани линии и сортове бял риган, както и върху генетичното разнообразие и структурата на естествените популации.

Abstract

We studied the mode of pollination in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) under both controlled and open pollination conditions. When grown indoors without the presence of insects, Greek oregano plants did not develop any seeds, indicating a low level of spontaneous self-pollination. Applying manual self-pollination under the same conditions resulted in only 16 seeds, of which only 5 were able to germinate. At the same time, a clonally propagated Greek oregano plant of the same genotype produced a rich set of over 300 seeds in open field conditions when the flowers were visited by insects in an area where no other *Origanum* species were observed. Analysis with SSR markers showed that over 70% of the seeds likely resulted from self-pollination, indicating that insect-mediated pollination is essential for the seed development. We further analyzed the cross-pollination of Greek oregano with Common oregano (*O. vulgare* ssp. *vulgare*) in open field conditions where the two subspecies were grown in close proximity. Applying SSR markers, we analyzed 83 plants obtained from seeds of three vegetatively propagated Greek oregano mother plants. Surprisingly, the results showed that all analyzed seedlings resulted from cross-pollination of Greek oregano with Common oregano, indicating that cross-pollination between the two subspecies can completely take over the self-pollination or cross-pollination between the Greek oregano plants.

The possible impact of the observed high cross-pollination rate on the genetic origin of seeds of selected Greek oregano lines and varieties, as well as on the genetic diversity and structure of natural populations, is discussed.

9_ Identification of QTL controlling the ratio of linalool to linalyl acetate in the flowers of *Lavandula angustifolia* Mill var. *Hemus*

Rusanov K, Vassileva P, Rusanova M, Atanassov I

Резюме

Съдържанието на линалил ацетат и съотношението на линалол към линалил ацетат (съотношение L/LA) са едни от важните параметри, определящи качеството на лавандуловото масло. Характеризирането на сегрегираща популация, получена от самоопрашена *Lavandula angustifolia* var. *Hemus* доведе до идентифицирането на единичен QTL (L/LA-QTL), контролиращ съотношението L/LA и разположен на хромозома 8 в референтния геном на лавандула. Анализът на данните за L/LA показва, че растенията, хомозиготни за един от алелите на L/LA-QTL, имат значително по-високо съдържание на линалол, по-ниско съдържание на линалил ацетат и по-високо съотношение L/LA, отколкото растенията, които са хетерозиготни или хомозиготни за другия алел. Не се наблюдава значителна разлика за сумата на съдържанието на линалол и линалил ацетат сред тези три групи растения, което предполага, че идентифицираният L/LA-QTL е свързан с ензимно превръщане на линалол в линалил ацетат. BLAST търсене показва наличието в областта на L/LA-QTL на последователност от гена *LiAAT4* за монотерпенова ацетилтрансфераза, считан за кандидат ген за L/LA-QTL локуса. Анализ на последователността на *LiAAT4* гена на var. *Hemus* показва наличието на два алела, различаващи се в два нуклеотида и предполагаеми аминокиселинни замествания. Сравнението на алелните конфигурации на SSR, SRAP и *LiAAT4* локусите и съотношението L/LA на растенията, показващи рекомбинация в L/LA-QTL региона, осигури допълнителна подкрепа, че *LiAAT4* е кандидат ген, лежащ в основата на идентифицирания L/LA-QTL и контролиращ съотношението L/LA. Обсъжда се приложението на молекулни маркери за идентифицирания L/LA-QTL.

Abstract

The content of linalyl acetate and the ratio of linalool to linalyl acetate (L/LA ratio) are one of the important parameters determining the quality of the lavender oil. The characterization of a segregating population derived from a self-pollinated *Lavandula angustifolia* var. *Hemus* resulted in the identification of a single QTL (L/LA-QTL) controlling the L/LA ratio and located on chromosome 8 of the lavender reference genome. The L/LA data analysis demonstrated that plants homozygous for one of the L/LA-QTL alleles had significantly higher linalool content, lower linalyl acetate content and higher L/LA ratio, than the plants which were either heterozygous or homozygous for the other allele. No significant difference was observed for the sum of linalool and linalyl acetate content among these three groups of plants, suggesting that the identified L/LA-QTL is related to an enzyme conversion of linalool to linalyl acetate. The BLAST search revealed the presence in the L/LA-QTL region of a sequence of the *LiAAT4* gene of monoterpene acetyltransferase, considered as a candidate gene for the L/LA-QTL locus. Sequence analysis of the *LiAAT4* gene of var. *Hemus* revealed the presence of two alleles differing in two nucleotides and predicted amino acid substitutions. The comparison of the allele configurations of SSR, SRAP and *LiAAT4* loci and the L/LA ratio of plants showing recombination in the L/LA-QTL region provided further support that *LiAAT4* is a candidate gene underlying the identified L/LA-QTL and controlling the L/LA ratio. The application of molecular markers for the identified L/LA-QTL is discussed.

10_Plant extracts and Trichoderma spp: possibilities for implementation in agriculture as biopesticides

Aneta Lyubenova, Mila Rusanova, Milena Nikolova & Slavtcho B. Slavov

Резюме

Прекомерната употреба на агрохимикали и развитието на резистентност към пестицидите при растителните патогени е основно предизвикателство в конвенционалното земеделие. Използването на биопестициди на базата на естествени вещества е признато за ефективна алтернатива на конвенционалните пестициди. Освен полезните микроорганизми, някои видове растения могат да бъдат източник на микробиологично активни съединения. Сред най-обещаващите са видовете *Origanum vulgare ssp. hirtum*, *Centaurea finazzi*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia spp*, *Thymus pulegioides*, *Tanacetum parthenium*, *Clinopodium vulgare*, *Salvia sclarea*, *Lavandula officinalis* и *Mentha piperita*. Нишковидните гъби от род *Trichoderma* са едни от най-изследваните агенти за биоконтрол поради техния многостранен начин на действие. Те използват няколко различни стратегии за борба с растителните патогени, като директен микопаразитизъм, производство на ензими и антибиотични вещества, конкуренция и способност за предизвикване на резистентност в растенията към различни видове стрес. Рентабилното отглеждане и масово производство на гъбна биомаса и формулировки на базата на *Trichoderma sp.* ще дадат възможност за оползотворяване на налични на местно ниво евтини материали, като различни отпадъци и странични продукти от земеделието. Със или без минимални корекции на състава, тези материали могат да се използват като растежен субстрат за производство на биомаса, съдържаща ефективни пропагули. Настоящият обзор очертава двата основни метода за масово производство на *Trichoderma spp.* - ферментация в твърда и течна среда. Очертани са възможностите за разработване на нови продукти за биоиндустрията.

Abstract

The overuse of agrochemicals and development of pesticide resistance in plant pathogens is a main challenge in conventional agriculture. The use of biopesticides based on natural substances is recognized as an effective alternative of conventional pesticides. Besides the beneficial microorganisms, some plant species can be a source of microbiologically active compounds. Among the most promising are *Origanum vulgare ssp. hirtum*, *Centaurea finazzi*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia spp*, *Thymus pulegioides*, *Tanacetum parthenium*, *Clinopodium vulgare*, *Salvia sclarea*, *Lavandula officinalis* and *Mentha piperita*. The filamentous fungi from genus *Trichoderma* are some of the most studied biocontrol agents because of their versatile mode of action. They employ several different strategies to combat plant pathogens, like direct mycoparasitism, production of enzymes and antibiotic substances, competition, and ability to induce resistance in plants to a variety of stresses. Cost-effective cultivation and mass production of *Trichoderma sp.* biomass and formulations will allow utilization of locally available low-cost materials, such as different wastes and by-products that could be used as a growth substrate for production of adequate biomass containing effective propagules with or without minimal

adjustments to the composition of cultivation media. This review outlines the two major mass production methods - solid and liquid state fermentation of *Trichoderma* spp. The possibilities for development of novel products for the bioindustry are highlighted.

11_ Traditional *Rosa damascena* flower harvesting practices evaluated through GC/MS metabolite profiling of flower volatiles

Krasimir Rusanov, Natasha Kovacheva, Mila Rusanova, Ivan Atanassov

Резюме

Промишленото отглеждане на *Rosa damascena* и производството на розово масло е вековна индустрия, основана на традиционно ръчно бране на розовият цвят. В настоящото изследване традиционните практики за прибиране на реколтата от рози бяха оценени чрез GC/MS анализ на натрупването на летливите съединения в цветовете на *R. damascena* в осем различни стадия на развитие, цветни пъпки със спряно развитие и цветове, събрани в шест отделни часа през деня, свързани с розобера. Натрупването на 80 от 100 летливи съединения беше значително повлияно от етапа на развитие на цветята, докато 62 от 103 съединения бяха значително повлияни от дневния период на събиране на цветовете. Анализът на главните компоненти показва тясно групиране на етапите на развитие на цвета и дневните периоди, предпочитани за прибиране на реколтата и производство на розово масло с високо качество и количество. Взети заедно, получените резултати предоставят допълнителна подкрепа на прилаганите в момента традиционни практики за събиране на розов цвят. Обсъждат се възможните приложения за по-прецизно събиране на цвета с цел фини промени в състава на розовото масло и намаляване нивата на нежеланото съединение метил евгенол.

Abstract

Industrial cultivation of *Rosa damascena* and rose oil production is a centuries-old industry based on well-established traditional hand-picking of rose flowers. Here the traditional rose harvesting practices were evaluated through GC/MS analysis of the volatile compounds accumulation in *R. damascena* flowers at eight different developmental stages, flower buds with arrested development and flowers collected at six daytime points related to flower picking. The accumulation of 80 out of 100 volatile compounds was significantly influenced by the stage of flower development while 62 out of 103 compounds were significantly influenced by the daytime period of flower collection. Principal component analysis showed close clustering of the flower developmental stages and daytime periods preferable for flower harvesting and production of high quality and quantity of rose oil. Taken together the obtained results provide further support to the currently applied traditional rose flower harvesting practices. The possible applications of more precise flower harvesting for fine modulation of rose oil composition and reduction levels of the unwanted compound methyl eugenol are discussed.

12_Low variability of flower volatiles of *Rosa damascena* Mill. plants from rose plantations along the Rose Valley, Bulgaria

Krasimir Rusanov, Natasha Kovacheva, Mila Rusanova, Ivan Atanassov

Резюме

Известно е, че съставът на летливите съединения в розовото етерично масло, получено от розовия цвят, се влияе от редица фактори, включително от района на отглеждане на маслодайната роза. Вариациите в състава на летливите съединения в цвета на растения от *Rosa damascena*, растящи в 11 различни насаждения по протежение на известната Розова долина в България, са изследвани чрез GC/MS метаболитно профилиране. Статистическият анализ ANOVA показва, че само 14 от общо 90 идентифицирани съединения са значително повлияни от географското местоположение на изследваните розови плантации. Анализът чрез йерархично клъстериране, базиран на подгрупата от тези 14 съединения, не разкри ясна връзка между нивата на летливите съединения в розовия цвят и географското местоположение на изследваните розови насаждения. Резултатите от проучването предполагат ниска вариабилност в натрупването на летливи съединения в розовия цвят и повишена пластичност на традиционния генотип на *R. damascena*, промишлено култивиран в Розовата долина.

Abstract

The composition of volatile compounds in the rose essential oils obtained from the rose flowers has been known to be affected by a number of factors including the region of rose growing. The variations of the flower volatile composition of *Rosa damascena* plants growing in 11 different rose plantations along the famous Rose Valley in Bulgaria were studied following GC/MS metabolite profiling. ANOVA statistical test revealed that only 14 of a total of 90 identified compounds were significantly influenced by the geographic location of the sampled rose plantation. The hierarchical clustering analysis based on the subset of these 14 compounds revealed no clear correlation between the levels of rose flower volatiles and geographic location of the studied rose plantations. The results from the study suggest low variability of rose flower volatiles accumulation and elevated plasticity of the common *R. damascena* genotype industrially cultivated in the Rose Valley.

13_Flower phenotype variation, essential oil variation and genetic diversity among *Rosa alba* L. accessions used for rose oil production in Bulgaria

Krasimir Rusanova, Natasha Kovacheva, Mila Rusanova, Ivan Atanassov

Резюме

Биометричният анализ на цветове на 38 представителя на *Rosa alba* L. от колекцията от генетични ресурси на Института по розата, етерични и медицински култури (ИРЕМК), България, разкри съществуването на две отделни феногрупи (PG: 1 и PG: 2), които се различават значително по теглото на цвета, броя на венчелистчета и броя на прашниците. GC/MS анализът на пробите от розово масло, дестилирани от анализирания образци, идентифицира общо 25 съединения, от които 18 съединения бяха открити във всички проби. PCA анализът, базиран на GC/MS данни на проби от розово масло, не показва ясно групиране на розовите масла, получени от двете феногрупи. Въпреки че анализът на t-теста показва статистически значима вариация в количеството на 6 съединения при $P < 0,05$ и 4 съединения при $P < 0,01$ между двете идентифицирани феногрупи, нивото на вариране на тези съединения сред растенията от PG: 1 до голяма степен се припокриват с тези на растенията от PG : 2. Микросателитен анализ в 9 SSR локуса на изследваните 38 растения, както и представители на *R. alba Maxima* и *R. Alba Semiplena* разкрива техния клонов произход от общ прародител. Изборът на малка подгрупа растения от PG: 1, представляващи цялостното разнообразие на състава на розовите масла, дестилирани от изследваните образци, е предложена за промишлено производство на качествен посадъчен материал. Допълнително се обсъжда необходимостта от разширяване на фонда от генетични ресурси на *R. alba*, използвани за промишлено отглеждане и производство на розово масло.

Abstract

Flower biometric analysis of 38 *Rosa alba* L. accessions from the genetic resources collection of the Institute of Roses, Essential and Medical Cultures (IREMC), Bulgaria, revealed the existence of two distinct flower phenogroups (PG: 1 and PG: 2), which differ significantly in flower weight, number of flower petals and number of anthers. GC/MS analysis of rose oil samples distilled from the analyzed accessions identified a total of 25 compounds of which 18 compounds were detected in all samples. PCA analysis based on GC/MS data of rose oil samples did not show clear clustering of the rose oils obtained from the two flower phenogroups. Although t-test analysis showed statistically significant variation of the abundances of 6 compounds at $P < 0.05$ and 4 compounds at $P < 0.01$ between the two identified phenogroups, the ranges of variation of these compounds among the PG: 1 plants largely overlapped those of the PG: 2 plants. Microsatellite analysis at 9 SSR loci of the studied 38 accessions as well as *R. alba Maxima* and *R. alba Semiplena* accessions revealed their clonal origin from a common ancestor. The selection of a small subset of PG: 1 accessions representing the overall diversity of the composition of rose oils distilled from the studied accessions is proposed for industrial production of quality planting material. The necessity

to enlarge the *R. alba* genetic resources pool used for industrial cultivation and rose oil production is further discussed.

14_Genetic and flower volatile diversity in natural populations of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) lets. in Bulgaria: toward the development of a core collection

Alekseeva M, Zagorcheva T, Rusanova M, Rusanov K, Atanassov I.

Резюме

Изследвахме генетичното разнообразие и разнообразието от летливи съединения в цветовете на растения от естествените популации на *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) lets. в България с помощта на маркери за прости повторени последователности (SSR) и свързани с последователността амплифицирани полиморфизми (SRAP) и анализ с газова хроматография/маспектрометрия (GC/MS) на летливи съединения в цветовете от отделни растения. В това изследване са включени два района характерни за вида - Кресненското дефиле и Източните Родопи, включващи осем популации и 239 индивидуални растения. Анализ с 11 SSR маркера и осем SRAP праймерни комбинации показва, че SRAP маркерите са значително по-информативни от SSR маркерите като в допълнение бяха използвани за анализ на генетичното разнообразие. Резултатите показаха ниско до средно ниво на генетична диференциация между популациите със стойности на индекса на фиксация (F_{st}), вариращи между 0,0047 и 0,11. Идентифицирани бяха общо 10 генетични групи. В резултат на анализът на разнообразието от летливи съединения в цветовете бяха идентифицирани общо 63 съединения, като по-голямата част от растенията принадлежаха към карвакроловия хемотип и само едно растение към тимоловия хемотип. Наблюдавани бяха големи вариации при отделните съединения във всеки регион, както и в популациите. Йерархичното клъстериране показва ясно групиране въз основа на двата различни региона. В допълнение, в резултат на задълбочен анализ бяха идентифицирани шест основни и 23 минорни метаболитни клъстера. Цялостният набор от данни и клъстерният анализ бяха използвани допълнително за разработването и тестването на проста и ясна стратегия за подбор на отделни растения за създаване на базова (кор) колекция, представляваща използваните в изследването естествени популации на този вид в България. Предложената стратегия включва прецизно генетично групиране на тестваните растения, последвано от избор на минимален набор от всеки генетичен клъстер, представляващ различните метаболитни клъстери. Избраният базор (кор) набор бе допълнително сравнен с базовия (кор) набор, извлечен от софтуера PowerCore. Сравнението на генетичната и метаболитната принадлежност на членовете на двата набора показва, че докладваният подход е избрал представители от всеки генетичен клъстер и минорен метаболитен клъстер, докато някои метаболитни клъстери не са били представени в набора избран от PowerCore. Обсъждат се осъществимостта и ефективността на прилагане на посочената стратегия за разработване на базова (кор) колекция представляваща, както генетичното, така и метаболитното разнообразие в естествените популации на ароматни и лечебни растения в посока следващи стъпки включващи отбор и селекция.

Abstract

We studied the genetic and flower volatile diversity in natural populations of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) lets. in Bulgaria using simple sequence repeat (SSR) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

analysis of flower volatiles from individual plants. Two regions, including the Kresna Gorge and Eastern Rhodopes, typical for the species comprising eight populations and 239 individual plants were included in this study. An analysis with 11 SSR markers and eight SRAP primer combinations showed that SRAP markers were substantially more informative than the SSR markers and were further used for genetic diversity analysis. The results showed low-range to mid-range genetic differentiation between the populations with pairwise fixation index (F_{st}) values ranging between 0.0047 and 0.11. A total of 10 genetic clusters were identified. An analysis of the flower volatile diversity identified a total of 63 compounds with the vast majority of plants belonging to the carvacrol chemotype and just a single plant to the thymol chemotype. Large deviations were observed for individual compounds within each region as well as within the populations. Hierarchical clustering showed a clear sample grouping based on the two different regions. In addition, an in-depth analysis identified six major and 23 minor metabolite clusters. The overall data set and cluster analysis were further used for the development and testing of a simple and straightforward strategy for the selection of individual plants for the development of a core collection representing the sampled natural populations for this species in Bulgaria. The proposed strategy involves precise genetic clustering of the tested plants followed by the selection of a minimal set from each genetic cluster representing the different metabolite clusters. The selected core set was further compared with a core set extracted by the PowerCore software. A comparison of the genetic and metabolic affiliation of the members of both sets showed that the reported approach selected representatives from each genetic cluster and minor metabolic cluster, whereas some metabolic clusters were unrepresented in the PowerCore set. The feasibility and efficiency of applying the pointed strategy for the development of a core collection representing both the genetic and metabolite diversity of natural populations in aromatic and medicinal plants toward subsequent steps of selection and breeding are discussed.

15_Indigenous yeasts from rose oil distillation wastewater and their capacity for biotransformation of phenolics

Rusanova M, Rusanov K, Butterweck V, Atanassov I.

Резюме

Изследвани бяха аборигенни дрожди, свързани със спонтанната ферментация на богати на феноли отпадни води от дестилация на розово масло (RODW), генерирани след промишлената дестилация на розово масло. Анализът на ITS-rDNA последователността на пробите, събрани от RODW, ферментирала при полустерилни условия, лагуна за депониране на отпадъци и ендофитни дрожди, изолирани от промишлено култивирана *Rosa damascena*, предполага, че спонтанната RODW ферментация е предизвикана от дрожди от род *Cyberlindnera*, открити също като ендофити в цветовете от роза. Филогенетичният анализ, базиран на нуклеотидните последователности на фактора на удължаване на трансляцията (TEF1 α) и гените за 18S- и 26S-rRNA, допълнително потвърди таксономичната принадлежност на RODW изолатите от дрожди към рода *Cyberlindnera*. Ферментационният капацитет на RODW за избран набор от изолати от аборигенни дрожди беше изследван и сравнен с този на промишлени щамове дрожди. Изолатите от аборигенни дрожди демонстрираха много висока скорост на растеж, което води до почти двойно намаляване на фенолното съдържание във ферментиралата RODW. Ферментацията на аборигенните дрожди промени състава на фенолните съединения на RODW. Нивата на някои фенолни гликозиди намаляват чрез изчерпването и ферментацията на тяхните захарни остатъци. Следователно, относителното количество на съответните агликони и други фенолни съединения се увеличава. Обсъжда се капацитетът на аборигенните дрожди за биотрансформация на фенолите в RODW.

Abstract

The indigenous yeasts associated with the spontaneous fermentation of phenolic-rich rose oil distillation wastewater (RODW) generated after the industrial distillation of rose oil were studied. The ITS-rDNA sequence analysis of the samples collected from RODW fermented at semi-sterile conditions, a waste deposition lagoon and endophytic yeasts isolated from industrially cultivated *Rosa damascena* suggests that the spontaneous RODW fermentation is caused by yeasts from the genus *Cyberlindnera* found also as endophytes in the rose flowers. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of the translation elongation factor (TEF1 α) and 18S- and 26S- rRNA genes further confirmed the taxonomic affiliation of the RODW yeast isolates with the genus *Cyberlindnera*. The RODW fermentation capacity of a selected set of indigenous yeast isolates was studied and compared with those of common yeast strains. The indigenous yeast isolates demonstrated a superior growth rate, resulting in a nearly double reduction in the phenolic content in the fermented RODW. The indigenous yeasts' fermentation changed the RODW phenolics' composition. The levels of some particular phenolic glycosides decreased through the depletion and fermentation of their sugar moiety. Hence, the relative abundance of the corresponding aglycons and other phenolic compounds increased. The capacity for the biotransformation of RODW phenolics by indigenous yeasts is discussed.

16_A Set of highly polymorphic microsatellite markers for genetic diversity studies in the genus *Origanum*

Alekseeva M, Rusanova M, Rusanov K, Atanassov I.

Резюме

Настоящото изследване съобщава за разработването на набор от 20 високо полиморфни геномни SSR маркера, които могат да се използват както за идентификация на сортове, така и за изследвания на генетично разнообразие при няколко вида *Origanum*, включително някои от най-популярните като бял риган (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), обикновен риган (*O. vulgare* L. ssp. *vulgare*) и сладка майорана (*O. majorana* L.). Анализът на полиморфното информационно съдържание (PIC) показва средна стойност на PIC от 0,75 с минимум 0,41 и максимум 0,89, където 17 от маркерите показват PIC стойности над 0,73. Сравнителният анализ на генетичното разнообразие на осем естествени популации на бял риган в България показва, че шест от геномните SSR маркери разкриват в значително по-висока степен генетично разнообразие в популациите, в сравнение с 12 EST SSR маркера, използвани в наше предишно проучване. Ние също сравнихме ефективността на същите шест геномни SSR маркера с резултатите от осем SRAP праймерни комбинации, които показаха, че SRAP маркерите улавят по-точно генетичната структура в естествените популации. Разработените силно полиморфни геномни SSR маркери могат да бъдат успешно приложени за оценка на генетичното разнообразие в род *Origanum*, въз основа на очакваната и наблюдавана хетерозиготност в популациите, както и за лесно идентифициране на селекционни линии и сортове въз основа на уникални SSR профили.

Abstract

This study reports the development of a set of 20 highly polymorphic genomic SSR markers which can be used for both cultivar identification and genetic diversity studies in several *Origanum* species, including some of the most popular ones like Greek oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), common oregano (*O. vulgare* L. ssp. *vulgare*), and sweet marjoram (*O. majorana* L.). Analysis of the polymorphic information content (PIC) showed an average PIC value of 0.75 with a minimum of 0.41 and a maximum of 0.89, where 17 of the markers showed PIC values above 0.73. Comparative analysis of the genetic diversity of eight natural populations of Greek oregano in Bulgaria showed that six of the genomic SSR markers revealed significantly higher portions of genetic diversity in the populations, compared to 12 EST SSR markers used in our previous study. We also compared the performance of the same six genomic SSR markers with the results for eight SRAP primer combinations, which showed that SRAP markers captured more precisely the genetic structure in natural populations. The developed highly polymorphic genomic SSR markers can be successfully applied to evaluation of the genetic diversity in the genus *Origanum*, based on the expected and observed heterozygosity in the populations as well as for easy identification of breeding lines and cultivars based on unique SSR fingerprints.

17_Genetic diversity and population structure of Bulgarian autochthonous sheep breeds revealed by microsatellite analysis

Mihailova Y, Rusanov K, Rusanova M, Vassileva P, Atanassov I, Nikolov V, Todorovska E.G.

Резюме

Това изследване се опитва да даде по-задълбочен поглед върху настоящия генетичен статус на 12 български автохтонни породи овце с помощта на микросателитни (SSR) маркери. Общо 600 индивида от 50 стада бяха анализирани с помощта на панел от 13 SSR маркера. Общо 228 алела бяха открити в изследваните микросателитни локуси. Средният брой на алелите, ефективният брой на алелите и стойностите на полиморфно информационно съдържание (PIC) на локус бяха съответно 17,54, 5,250 и 0,799. Очакваната хетерозиготност (H_e) за всички породи варираше от 0,70 до 0,82. Хетерозиготният дефицит в рамките на популацията (F_{is}) варираше от -0,03 до 0,1, отразявайки значителни нива за 10 от 12-те породи. Средната генетична диференциация (F_{st}) бе 0,046, демонстрирайки ниска дискриминация между породите. Генетичната дистанция, анализът на главните координати и анализът на структурата показаха, че две от изследваните породи – Местна Старозагорска /SZ/ и Местна Карнобатска /МК/ са най-различни сред популации овце. Подходът на байесовото групиране предполага лоша диференциация на породите за останалите 10 породи овце. Резултатите говорят за това, че в България трябва да се прилагат подходящи стратегии за управление и специфични политики за селекция, за да се избегне смесването на породи и да се намали ерозията на чистотата на породата, наблюдавана при някои породи.

Abstract

This study attempts to provide a deeper insight into the current genetic status of 12 Bulgarian autochthonous sheep breeds using microsatellite (SSR) markers. A total of 600 individuals from 50 flocks were analyzed using a panel of 13 SSR markers. In total, 228 alleles were found in the studied microsatellite loci. The mean number of alleles, the effective number of alleles, and the polymorphic information content (PIC) values per locus were 17.54, 5.250, and 0.799, respectively. The expected heterozygosity (H_e) for all breeds ranged from 0.70 to 0.82. The within-population heterozygote deficit (F_{is}) varied from -0.03 to 0.1, reflecting significant levels for 10 of the 12 breeds. The average genetic differentiation (F_{st}) was 0.046, revealing a low discrimination between the breeds. The genetic distance, principal coordinate analysis, and the structure analysis showed that two of the studied breeds—Local Stara Zagora/SZ/ and Local Karnobat/MK/—were the most distinct sheep populations. The Bayesian clustering approach suggested poor breed differentiation for the remaining 10 sheep breeds. The results suggest that proper management strategies and specific breeding policies need to be implemented in Bulgaria to avoid the intermixing of breeds and to reduce the erosion of breed purity observed in some breeds.

18_Uncovering the Interrelation between Metabolite Profiles and Bioactivity of In Vitro- and Wild-Grown Catmint (*Nepeta nuda* L.)

Anna Zaharieva, Krasimir Rusanov, Mila Rusanova, Momchil Paunov, Zhenya Yordanova, Desislava Mantovska, Ivanka Tsacheva, Detelina Petrova, Kiril Mishev, Petre I. Dobrev, Jozef Lacek, Roberta Filepová, Grigor Zehirov, Valya Vassileva, Danijela Mišić, Václav Motyka, Ganka Chaneva and Miroslava Zhiponova

Резюме

Nepeta nuda L. е лечебно растение, обогатено с вторични метаболити, служещи за привличане на опрашители и възпиране на тревопасни животни. Фенолите и иридоидите на *N. nuda* са обстойно изследвани поради тяхното благоприятно въздействие върху човешкото здраве. В настоящата статия се изследват химичните профили на *in vitro* прорастъци и диворастящи растения *N. nuda* (цветове и листа) чрез метаболомен анализ, използващ газова хроматография и маспектрометрия (GC–MS). Първоначално изследвахме разликите в състава на летливите съединения в култивирани *in vitro* прорастъци, сравнявайки ги с цветове и листа от растения, растящи в естествена среда. Характерният иридоид 4а-,7-,7а-непеталактон е силно представен в прорастъците на *in vitro* растения и в цвета на растения от природни популации, докато повечето от монотерпените са в големи количества в листата на диворастящи растения. Известните *in vitro* биологични активности, включващи антиоксидантна, антивирусна, антибактериална, заедно с новооценените противовъзпалителни ефекти, показват последователни асоциации с общото съдържание на феноли, редуциращи захари и идентифицираните метаболитни профили в полярни (органични киселини, аминокиселини, алкохоли, захари, феноли) и неполярни (мастни киселини, алкани, стероли) фракции. Фитохормоналните нива също бяха количествено определени, за да се направи извод за регулаторните пътища, управляващи синтеза на биоактивните растителни метаболити. Общият набор от данни очертава съединения с потенциал да допринесат за биоактивността на *N. nuda*.

Abstract

Nepeta nuda L. is a medicinal plant enriched with secondary metabolites serving to attract pollinators and deter herbivores. Phenolics and iridoids of *N. nuda* have been extensively investigated because of their beneficial impacts on human health. This study explores the chemical profiles of *in vitro* shoots and wild-grown *N. nuda* plants (flowers and leaves) through metabolomic analysis utilizing gas chromatography and mass spectrometry (GC–MS). Initially, we examined the differences in the volatiles' composition in *in vitro*-cultivated shoots comparing them with flowers and leaves from plants growing in natural environment. The characteristic iridoid 4a-,7-,7a-nepetalactone was highly represented in shoots of *in vitro* plants and in flowers of plants from nature populations, whereas most of the monoterpenes were abundant in leaves of wild-grown plants. The known *in vitro* biological activities encompassing antioxidant, antiviral, antibacterial potentials alongside the newly assessed anti-inflammatory effects exhibited consistent associations with the

total content of phenolics, reducing sugars, and the identified metabolic profiles in polar (organic acids, amino acids, alcohols, sugars, phenolics) and non-polar (fatty acids, alkanes, sterols) fractions. Phytohormonal levels were also quantified to infer the regulatory pathways governing phytochemical production. The overall dataset highlighted compounds with the potential to contribute to *N. nuda* bioactivity.

19_Assessment of genetic diversity and differentiation of *Pinus nigra* populations in protected forested areas in Bulgaria, Greece and Cyprus using SRAP markers.

Tzvetelina Zagorcheva, Krasimir Rusanov, Eirini Bosmali, Andreas Savvides, Panagiotis Madesis, Vasileios Fotopoulos, Mila Rusanova, Filip Ustabashiev, Ivan Atanassov

Резюме

Целта на настоящото изследване е да се оцени генетичното разнообразие и генетична диференциация на популации на Европейски черен бор (*Pinus nigra* Arnold) разположени в защитени залесени зони на три балкански държави - България, Гърция и Кипър. С помощта на три SRAP праймерни двойки са анализирани са общо 175 проби ДНК от растения *P. nigra*, събрани от осем популации в трите държави. Анализът на данните показва високата разделителна способност на използваните SRAP маркери, което доведе до идентифициране на средно 215 ± 67 полиморфни локуса на SRAP праймерна двойка. Резултатите от AMOVA анализа показват, че 82% от наблюдаваното вариране е в рамките на популациите, докато 18% е между популациите. Цялостният анализ на структурата на популациите показва ниска генетична диференциация ($F_{st} \leq 0.01$) в рамките на популациите във всяка от двете държави България и Кипър и умерена ($0.15 \leq F_{st} \leq 0.17$) диференциация между държавите. Противоположно на това, анализът показва високо ниво и комплексна диференциация ($0.06 \leq F_{st} \leq 0.20$) между трите популации от Гърция, разположени в относителна близост до района на Национален Парк Пиндос. Анализът на популационната структура показва още, че една от Пиндос популациите е свързана ($F_{st} \leq 0.01$) с клъстера от български популации, разкривайки умерена ($F_{st} \leq 0.11$) до висока ($F_{st} \leq 0.20$) генетична диференциация с другите анализирани популации на Пиндос. Обсъдена е възможността за по-нататъшно използване SRAP маркерите за анализ на генетичното разнообразие между популации на черния бор и идентифициране на местни популации, отклоняващи се от цялостния филогеографски модел на диференциация в изследвания регион.

Abstract

The aim of present study is to evaluate the genetic diversity and differentiation of *Pinus nigra* Arnold, the European black pine, populations located in protected forested areas in three Balkan countries Bulgaria, Greece and Cyprus. Totally 175 DNA samples from *P. nigra* plants, collected from eight populations of these countries were analyzed using three SRAP primer pairs. The data analysis demonstrated the high-resolution power of the applied SRAP markers resulting in the identification of an average of 215 ± 67 polymorphic loci per SRAP primer pair. The results from AMOVA analysis showed that 82% of the observed variation was intra-population, while 18% was among the populations. The overall analysis of population structure suggests low ($F_{st} \leq 0.01$) intra-country differentiation for the populations from Bulgaria and Cyprus, and moderate ($0.15 \leq F_{st} \leq 0.17$) inter-country differentiation. On the contrary, the analysis demonstrates high level and complex differentiation ($0.06 \leq F_{st} \leq 0.20$) among the three populations from Greece, relatively closely located in the area of the Pindos National Park. Analysis of the population structure also revealed

that one of the Pindos populations affiliates ($F_{st} \leq 0.01$) to the cluster of Bulgarian populations showing moderate ($F_{st} \leq 0.11$) to high ($F_{st} \leq 0.20$) genetic differentiation with the other analyzed Pindos populations. The further use of SRAP markers for mapping the genetic diversity among *P. nigra* populations and identification of local populations diverted from the overall phylogeography driven pattern of differentiation of the populations in the studied region are discussed.