



ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ „ГОРСКО СТОПАНСТВО“
Катедра „Дендрология“



Ели Антоан Ел Хури

**ОПАЗВАНЕ НА ЕСТЕСТВЕНАТА ПИРАМИДАЛНА ОРХИДЕЯ
ANACAMPTIS PYRAMIDALIS (L.) RICH. В ЛИВАН ЧРЕЗ
ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАВАНЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „доктор“

Област на висшето образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина

Професионално направление: 6.5. Горско стопанство

Научна специалност: „Горски култури, селекция и семепроизводство“

Научен ръководител: проф. д-р Петър Желев

Научен консултант: проф. д-р Юсеф Сасин

Рецензенти: доц. д-р Виолета Георгиева Димитрова

доц. д-р Мира Любчева Георгиева

София, 2026 г.

Дисертационният труд съдържа 110 страници текст, а в списъка на литературата са включени 222 заглавия.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе от 13.00 ч. на 03.02.2026 г. в зала „Акад. Мако Даков“ на Лесотехническия университет, бул. „Климент Охридски“ 10, на открито заседание на научно жури, утвърдено със заповед № ЗПС-666/24.1.2025 г. в състав:

Председател: доц. д-р Виолета Георгиева Димитрова – вътрешен член

Членове: проф. д-р Петър Желев Стоянов – вътрешен член
проф. д-р Юсеф Сасин – външен член
доц. д-р Мира Любчева Георгиева – външен член
доц. д-р Александър Недялков Делков – външен член

Дисертационният труд е разработен в рамките на задочна докторантура към катедра „Дендрология“ на факултет „Горско стопанство“ (ФГС) на ЛТУ.

Материалите по защитата са достъпни на сайта на ЛТУ (www.ltu.bg) и в Деканата на ФГС на ЛТУ, бул. Климент Охридски 10.

УВОД

Средиземноморският регион е една от зоните с най-високо биоразнообразие. Ливан, като част от тази зона, представлява оптимален пример за такова биоразнообразие, разпространено по цялата му територия. Поради географското си положение и високата вариабилност на абиотичните условия, той се характеризира с голямо ландшафтно и флористично разнообразие.

Дивите орхидеи са част от това богатство, като са установени най-малко 87 вида, сред които и такива, ендемични за източната средиземноморска зона. В Ливан те се срещат в планинските райони на височина между 400 и 2000 м, с период на цъфтеж през пролетта – от март до юли. Ливанските гори обаче са подложени на фрагментация както поради антропогенни, така и поради природни причини, особено поради високата им чувствителност към климатичните промени. Пример за такива промени е намаляването на водните ресурси в полусухите райони на Средиземноморието.

Един от застрашените видове от сем. Orchidaceae в региона е пирамидалната орхидея (*Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich.). Той се събира масово от естествените местообитания, което води до риск от изчезването на вида в природата. Освен това останалата популация на тази орхидея в диво състояние не е достатъчна, за да отговори на потребителското търсене на салеп, което налага внос на салеп на прах от Турция. Макар хората да събират това цвете и за декоративни цели поради високо ценената му красива външност, то не е култивирано и не се произвежда търговски като декоративно растение.

Пирамидалната орхидея е едно от основните богатства на естественото биоразнообразие на Ливан, където е широко разпространена. Тя се събира и за лечебни цели. Въпреки че този вид се среща с висока плътност, неговото масово и нерегламентирано събиране може да доведе до спад на популацията през следващите години.

Много проучвания препоръчват ефективното култивиране на ендемични растителни видове, застрашени от изчезване, чрез методи за вегетативно размножаване. Това от една страна може да намали натиска върху естествените популации, а от друга – да бъде част от стратегия за *ex situ* опазване. Култивирането и размножаването на пирамидалната орхидея с цел бъдещо търговско производство може да

бъде начин за ограничаване на нейното нерегламентирано събиране от природата в Ливан и за задоволяване на пазарното търсене на са-леп на прах, като същевременно се намали необходимостта от внос. Размножаването ѝ би позволило и използването ѝ като декоративно растение – национален символ на ливанското биоразнообразие.

В Ливан възможностите за размножаване на този вид все още не са били изследвани. Поради това основната цел на настоящото изследване е да се предложи бъдеща стратегия за опазване на *Anacamptis pyramidalis*, чрез изучаване на нейния растеж и поведение посредством два основни метода (*in vitro* и *in vivo*), както и чрез определяне на геномната последователност на този вид

1. ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ПРЕГЛЕД

Целевият вид – *Anacamptis pyramidalis*

Видът представлява многогодишно тревисто растение с грудко-во коренище, високо 20 – 30 см, рядко до 50 – 60 см. Листата му са линейни, широки до 1 см, заострени на върха. Цветовете му са по-светло или по-тъмно розови, рядко бели, събрани в много характерно пирамидално съцветие. Плодовете са разпукливи кутийки. Цъфтежът е през периода април – юни, като след това надземната част изсъхва, а в почвата остават грудките, от които следващата пролет надземната част се развива отново. Размножава се със семена по вегетативен начин, чрез образуване на дъщерни грудки. Видът е разпространен в цяла Европа, в Северна Африка и в Западна Азия. Расте по поляни, в храсталаци, по скалисти склонове, даже в маслинови градини, от морското равнище докъм 1700 м н.в. в Средиземноморския регион. Среща се предимно на алкални почви и шисти, но може да расте и на силикатни. Светлолюбив вид, който, поради краткия си вегетационен период не страда от продължителните летни засушавания, характерни за Средиземноморието. В това отношение видът е подпомаган от микоризата.

Опазване на дивите орхидеи

Установено е, че сем. Orchidaceae съдържа най-висок дял застрашени родове и видове от всички растителни семейства (Pillon and Chase, 2007). Уязвимостта и ограниченото разпространения могат да причинят значително намаляване на техните ареали и даже изчезване

(Swarts and Dixon, 2009b). В момента, основните заплахи за видовете са две: разрушаване на естествените им местообитания и събирането им с търговска цел (Hagsater and Dumont, 1996).

Подходи и методи за опазване

Подходът за опазване на „пандите на растителния свят“ (Wood, 1989) изисква сложна интеграция между съхраняването на естествените местообитания (*in situ* опазване) и разработването и прилагането на методологии за *ex situ* опазване (Popova et al., 2016). Тази стратегия подчертава взаимодействието между опазването на земи, биологичното управление, *ex situ* изследванията, размножаването и (ре)интродукцията, както и възстановяването на местообитанията (Swarts and Dixon, 2009), с участието както на държавния и частния сектор, така и на научноизследователски институции, неправителствени организации, местни производители, както и чрез международно сътрудничество (Pant, 2013). Въпреки това, в сравнение с големия брой видове орхидеи, познанията за мащабните закономерности и механизмите за контрол на видовото богатство при орхидеите са ограничени (Chapman and Wang, 2002; Chen et al., 2009).

***In situ* опазване**

Целевите видове могат да бъдат съхранени заедно с първоначалното им местообитание и генетично разнообразие чрез *in situ* опазване (Ellstrand and Elam, 1993; Heywood and Dulloo, 2005). Според Swarts и Dixon (2009b) защитата на орхидеите изисква разбиране на специфичните особености на местообитанието, които правят тази екосистема уникална, особено разпределението на микоризните ендوفити и опрашители. Китай е добър пример за прилагане на *in situ* опазване на орхидеи, където голям брой видове са били застрашени, което е довело до създаването на природни резервати (Heywood and Dulloo, 2005). През 2012 г. в Китай са били установени повече от 2600 природни резервата, включително 363 национални природни резервата (NNRs) (Zhao et al., 2013). Сред тях „Природният резерват за орхидеи Ячанг“ е специално създаден за опазване на орхидеи (He et al., 2007).

Въпреки това, опазването на местообитанията като метод за съхранение може да не бъде жизнеспособно в резултат на модификации на местообитанията, дължащи се на неблагоприятни промени в компонентите на околната среда, като миграция или липса на

опрашители или гъбни популации (Swarts, 2008), или поради загуба на екологични функции вследствие на промени в хидрологичните и почвените характеристики, инвазивни видове, вредители и болести, както и различни смущения (Ramsay and Dixon, 2003).

***Ex situ* опазване**

Ex situ опазването е много важен аспект от съхраняването на орхидеи и може да включва размножаване и съхранение на семена в банки (Cribb et al., 2003). Също така, трансплантирането в полеви генни банки е друг метод за опазване: видове, произхождащи от деградирани зони, се преместват в райони, които представят същите характеристики (климатични условия и други) като първоначалните зони (IOPR, 2010).

Банки на семена и криоконсервация

Съхраняването на семена в генни банки е ефективна и жизнеспособна *ex situ* опция за опазване на орхидеи (Stanwood, 1985; Pritchard et al., 1999). Една от характеристиките на орхидеите, която предоставя изключителни възможности за опазване, са техните прахообразни семена. Една плодна кутийка може да произведе десетки хиляди до милиони семена (Arditti and Ghani, 2000). Според Hay et al. (2010) жизнеността на семената на орхидеите е по-кратка в сравнение с тази на други висши растения. Съществуват няколко примера за съхранение на семена, като например CBNM (Conservatoire Botanique National Méditerranéen), който съхранява семена на орхидеи, като 13 вида се опазват чрез криоконсервация (IOPR, 2010).

Температурата на съхранение е важен фактор, влияещ върху жизнеността на семената. Някои семена на орхидеи губят своята кълняемост при стайна температура (20 – 40°C) след дни или седмици (Koopowitz and Thornhill, 1994). По-ниските температури между –20 и 4°C обикновено удължават живота на семената (Pritchard and Dickie, 2003). Семената на орхидеите могат да останат жизнеспособни в продължение на десетилетия при условия на обикновено охлаждане (5°C) и замразяване (–20°C) (Hosomi et al., 2012). Обратно, при други видове орхидеи съхранението при ниски температури може да бъде относително неефективно.

Криоконсервацията или съхранението при ултраниски температури (–70 до –196°C) е изследвана и прилагана при няколко вида орхидеи с добри резултати по отношение на жизнеността на семената

(Merritt et al., 2014). В повечето световни криогенни банки материалът се съхранява в течен азот (LN, -196°C) или в парна фаза (-150°C до -185°C) (Walters et al., 2004). По този начин всички метаболитни активности в живите клетки се спират и генетичният материал може да се поддържа без замърсяване и соматонални вариации за теоретично неограничен период от време (Harding, 2004; Benson, 2008; Benelli et al., 2013; Wang et al., 2014).

Различни видове орхидеи са били съхранявани до 12 месеца при -70 и -196°C , като например *Dactylorhiza* spp., *D. anosmum* и *Paphiopedilum rothschildianum* (Pritchard et al., 1999). Освен това е установено, че кълняемостта на 12 епифитни и наземни вида е била най-висока след съхранение при -70°C (Huehne and Bhiniya, 2012). В някои случаи съхранението при ултраниски температури дори подобрява кълняемостта. Например, кълняемостта на семената на наземната орхидея *Orchis morio* се е увеличила след изсушаване до 5–11% съдържание на влага и потапяне за 15 минути в течен азот, като кълняемостта на още осем вида също е била запазена (Pritchard, 1984).

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основните цели на настоящото изследване бяха да се проведе експеримент за вегетативно размножаване на *Anacamptis pyramidalis* от луковици с цел разработване на бъдеща стратегия за опазване на този вид чрез изследване на неговия растеж и поведение посредством два основни метода (*in vivo* и *in vitro*), както и да се установи геномната последователност на *Anacamptis pyramidalis* в два различни локуса.

Този експериментален опит има за цел да отговори на следните въпроси:

- Какви са оптималните *in vivo* условия за растеж на *Anacamptis pyramidalis*?
- Би ли бил методът за *in vitro* размножаване ефективен подход за бъдещото опазване на този вид?
- Съществува ли връзка между последователностите, получени от *Anacamptis pyramidalis* от Ливан, и други налични последователности, извлечени от GenBank?

Освен това чрез настоящото изследване бяха постигнати и няколко допълнителни цели:

- Да се установи геномната последователност на *Anacamptis pyramidalis*;
- Да се сравнят получените последователности с други налични последователности, извлечени от GenBank;
- Да се изследва поведението на *Anacamptis pyramidalis* при експериментални условия (*ex situ*) и да се сравни с естественото му поведение в природата;
- Да се сравни вегетативният растеж на орхидейни растения, отглеждани в различни комбинации от почвени субстрати;
- Да се оцени ефектът на микоризата върху растежа на растенията;
- Да се оцени ефектът от отделянето на майчината луковица върху растежа на растенията;
- Да се сравни и оцени влиянието на различните изследвани фактори (почвени субстрати, отделяне на майчината луковица и микориза) върху растежа на растенията с цел определяне на оптималните *in vivo* условия за растеж;
- Да се оцени ефективността на *in vitro* метода като начин за размножаване на този вид.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. ОБЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

Избраният обект на изследване е Wedeh el Karem – Mount Lebanon (географски координати 33°57'05.8" N 35°45'09.6" E) при надморска височина 1140 m. Популацията на *Anacamptis pyramidalis* е с висока численост и гъстота и не е известна на жителите на най-близките села, поради което е добре запазена. Материалът за изследването на размножаването е събран през май-юни на първата година от експериментите. Самите експерименти са проведени в продължение на три години, от 2017 до 2020 г. Допълнително за филогенетичния анализ е събран материал от пет популации от ареала на вида – от Иран (2), Турция, Испания и Дания.

3.2. МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

3.2.1. Филогенетичен анализ

Екстракцията на ДНК е направена по метода на Doyle and Doyle (1987) от свежа листна тъкан, с приложение на СТАВ (Cetyltrimethylammonium-bromide) протокол. Епруветките с екстрахираната ДНК са съхранявани при -20°C до анализа.

Полимеразната верижна реакция (PCR) е приложена за амплификация на два региона: ITS регион и регион от митохондриалния геном. Реакционната смес от 25 μl съдържа 1 μl от екстракта на целевата ДНК (40 ng μl^{-1}), 2 mM MgCl_2 , 2.5 μl от 10x PCR buffer, 1.5 μl от всеки праймер (концентрация 10 μM), 2.5 μl от 10 mM нуклеотидна смес (dNTPs), 0.3 μl от 5U Taq ДНК-полимераза, допълнени до 25 μl с дейонизирана и свободна от нуклеаза вода.

Олигонуклеотидите (праймерите), използвани за амплификация на целевите региони от ДНК, са посочени в Табл. 1.

Таблица 1. Праймери, приложени за PCR

Целеви регион	Нуклеотидна последователност на праймерите
ITS4/ITS5	F ITS5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') R ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3')
MitoMJD5/Mito23rev	F MitoMJD5 (5'-GGCACTAAGAGCCGATGAAGG-3') R Mito23rev (5'- TTCGCCTTTCCCTCACGGTACT-3')

Легенда: F – forward primer; R – reverse primer

Полимеразната верижна реакция (PCR) е осъществена с апарат ESCO Swift Maxi Thermal Cycler при един и същ режим за двата маркера:

- Стъпка 1 – първоначална денатурация на ДНК – 2 минути при 95°C ;
- Стъпка 2 – денатурация на ДНК при 95°C за 30 sec;
- Стъпка 3 – прикрепване на праймерите и присъединяване (annealing) на нуклеотиди при 52°C за 30 sec. Тази температура, наречена annealing temperature (Ta) е еднаква и за двата маркера;
- Стъпка 4 – удължаване при 72°C за 30 sec;

- Стъпки от 2 до 4 образуват един цикъл, който се повтаря 35 пъти, след което се преминава към
- Стъпка 5 – финална полимеризация при 72°C за 10 min.

Продуктите от PCR са пречистени с помощта на кит QIAquick® PCR Purification Kit (Cat. No. 28106).

Качеството на продуктите от реакцията е проверено чрез електрофореза в 1% агарозен гел при постоянно напрежение от 80 V и оцветяването е направено с етидиев бромид.

Последователността на нуклеотидите в целевите региони е определена (секвенирана) от Macrogen Inc., (Korea). Резултатите са редактирани с помощта на софтуера MEGAX (Kumar et al., 2018).

Резултатите са сравнени с други публикувани секвенции в базите данни и е приложен BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) анализ.

3.2.2. Размножаване *In vivo*

Общо 140 индивиди са събрани от естественото находище през годините на експерименти, като пробите включват както надземни, така и подземни части (корени и грудки). За размножаване са приложени различни варианти. Използвани са 4 различни субстрата: почва от естественото находище (наричана по-нататък само „почва“), използвана като контрол, стърготини от борова кора (наричана по-нататък „бор“), бор + торф и торф + пясък. В тези субстрати са засадени дъщерни грудки с и без приложение на микориза (наречени съответно M:Yes и M:No). За всеки вариант са засадени по 10 дъщерни грудки в саксии с диаметър 15 cm. Микоризата е любезно предоставена от Националния изследователски център на Египет и е приложена в доза 5 g на 140 саксии. Саксиите са поставени при контролирана температура от 5°C през ноември, декември и януари, 10°C през февруари, 15°C през март и април и накрая 25°C през май. Саксиите са редовно поливани през вегетационния период. Влиянието на всички посочени фактор е анализирано както поотделно, така и в комбинация.

Статистическият анализ е извършен със софтуера STATISTICA v.12. Приложен е пълен рандомизиран факториален дизайн. Всяка комбинация от фактори е представена от 10 повторения с по 10 растения. Дисперсионен анализ (Factorial ANOVA) е приложен за оценка на въздействието на различните фактори при $\alpha = 0.05$.

3.2.3. *In vitro* размножаване

За целта са събрани индивиди от естественото находище на *Anacamptis pyramidalis* във фаза на цъфтеж. След отстраняване на надземната част и внимателно измиване на подземните части, са изолирани дъщерните грудки и са индивидуално съхранени в хладилник при 5°C.

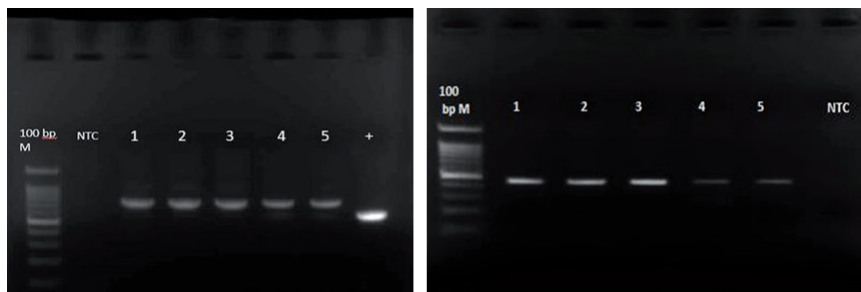
Грудките са сортирани в три групи в зависимост от размерите им. Първата група са за прорастване на тъмно, втората – за прорастване в субстрат пясък и торф (1:1) и третата група е разделена на две подгрупи, които са заложени съответно с течна и твърда среда на Murashige & Skoog (1962).

Друг експеримент за *in vitro* размножаване се състои от семена, събрани от плодните кутийки и заложени за кълнене в течна среда на Murashige & Skoog (1962).

4. РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО

4.1. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН ДНК АНАЛИЗ И BLAST АНАЛИЗ

Електрофоретичният анализ показва, че продуктите от РС реакцията са с добро качество (Фиг. 1). Фрагментите на ITS4/ITS5 са с дължина около 700 bp (базови двойки), докато тези на маркера MitoMJD5/Mito23 – с дължина около 350 bp за всички изследвани проби.

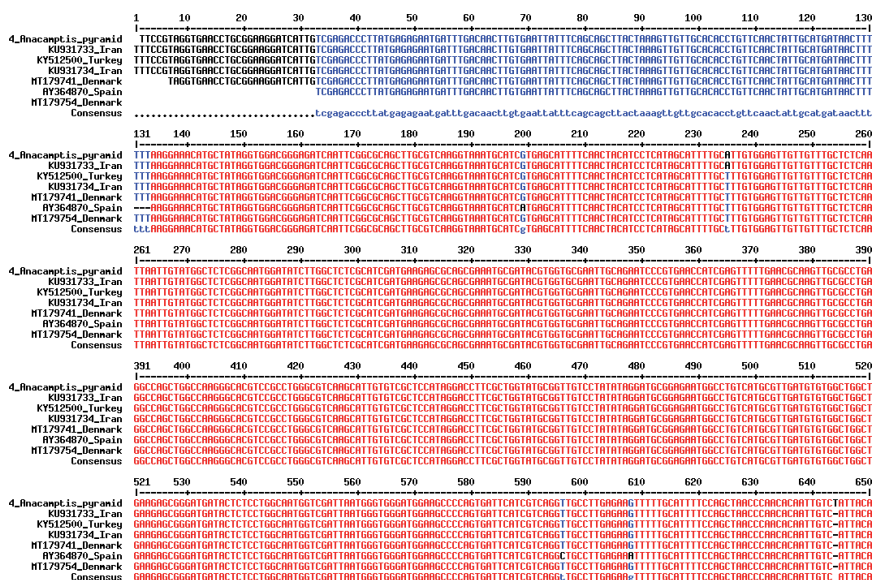


Фиг. 1. Електрофореграми на PCR продуктите на двата генетични маркера: ITS4/ITS5 и MitoMJD5/Mito23

Нуклеотидна последователност на частичен пластиден геном на *Anacamptis pyramidalis*:

CCGATGAAGGGCGTAGCAAGCGACGAAATGCTTCGGGGAGTTGAAAAATAAGCATAG
ATCCGGAGATTCCCGAATAGGTC AACCTTTCGAACTGCTGCTGAATCCATGGGCAGG
CAAGAGACAACCTGGCGAAGTGA AACATCTTAGTAGCCAGAGGAAAAAGAAAGCAA
AGCGATTCCCGTAAGGAGGATAACAACACTAGGGTCGTGAGTATTGGGGAAGAGGT
GGAGTGTTCACATAGAGCAGTAGAGTCTCTGTAGTCGTAATCATCAGTCCCTCTTCGA
TGTGGGA----

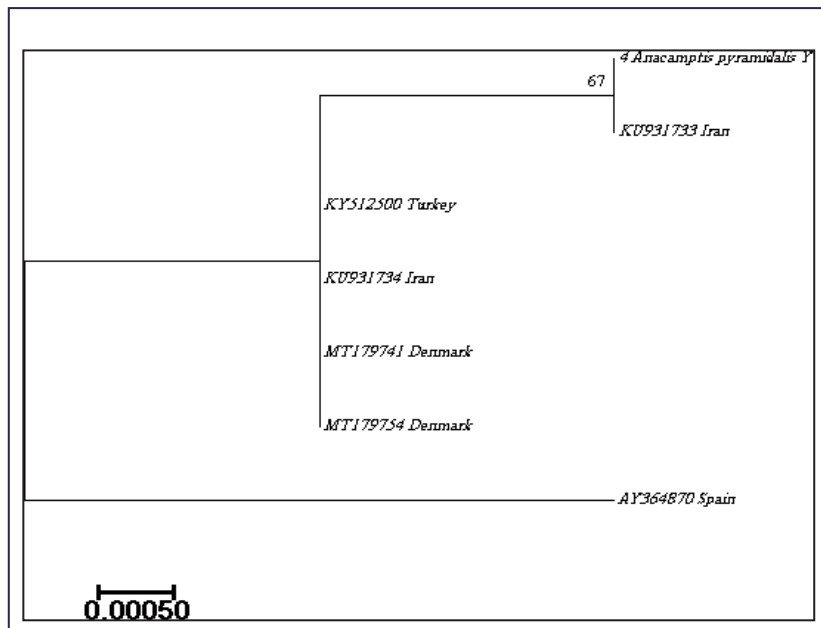
GGAGTAGCATGGCGCGGTTGAGTCAACCCTAGAATCAGCAGGCTCCACGACAC



Фиг. 2. Нуклеотидна последователност на ITS региона в пробите

Последователността на нуклеотидите в пробите от различни региони на естествения ареал на вида показва сравнително консервативен геном в изследвания маркер. Забелязват се няколко полиморфизма на единични нуклеотиди (SNPs), но те са в много малко места и не променят общото заключение, че консенсусната последователност е съставена лесно.

Филогенетичният анализ (Фиг. 3) показва, че най-диференциран от останалите е произходът от Испания, докато другите произходи не показват определена тенденция на групиране – Турция, Иран и Дания с в една група.



Фиг. 3. Молекулярно филогенетичен анализ

4.2. *IN VIVO* РАЗМНОЖАВАНЕ

Поникваемостта на заложените грудки е представен в Табл. 2. Вижда се, че тя варира в границите от 60 до 90% за различните типове третириания, но през втората година като цяло е по-висока ($p = 0.009$, тест на Стюдент). Между отделните комбинации от третириания разликите в повечето случаи не са статистически достоверни.

Таблица 2. Поникваемост на грудките при различни растежни условия

Режим на въздействие			Поникване, %	
			Първа година	Втора година
Естествена почва	DB	M:No	60	80
	DB + MB	M:No	80	90
Бор	DB	M:Yes	70	70
		M:No	70	70
	DB + MB	M:Yes	70	80
		M:No	70	80
Бор – торф	DB	M:Yes	70	80
		M:No	60	80
	DB + MB	M:Yes	80	90
		M:No	80	90
Торф – пясък	DB	M:Yes	60	70
		M:No	60	60
	DB + MB	M:Yes	70	80
		M:No	70	70
Поникваемост (всички субстрати)	DB		64	73

Легенда: MB – майчини грудки; DB – дъщерни грудки; M:Yes – с приложение на микориза; M:No – без приложение на микориза.

Резултатите за различните признаци са коментирани общо, тъй като с изключение на признака дължина на лабелума, няма достоверни разлики между двете години на изследване, както се вижда от Табл. 3, която представя резултатите от факторния дисперсионен анализ.

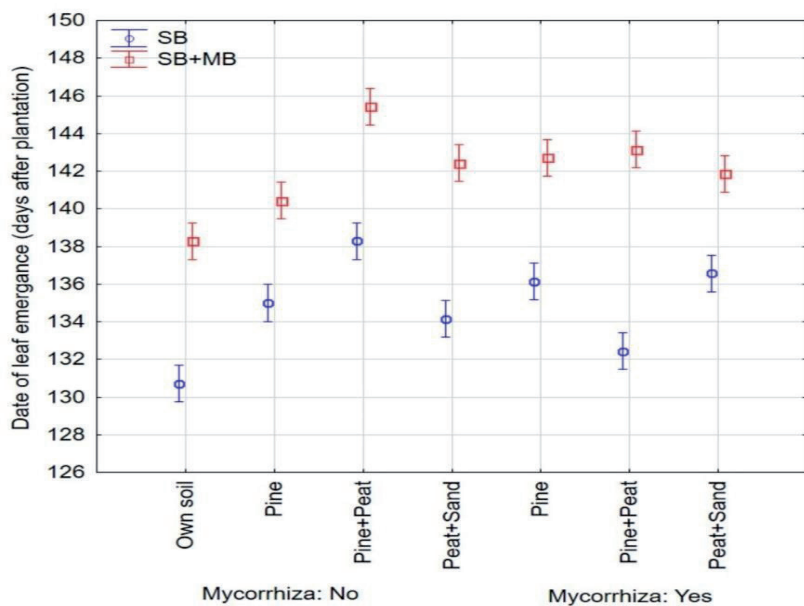
Появяване на първия лист

Въпреки прилагането на микориза и отделянето на майчините грудки, датата на поникване варира значително при всички типове почви. Най-ранно поникване е отчетено при варианта със собствена почва/SB + MB/M:No (131 дни след засаждането), а най-късно – при варианта борова почва + торф/SB + MB/M:No (145 дни след засаждането). Датата на поникване е била по-ранна при различни субстрати, включващи дъщерни грудки, в сравнение с тези, включващи дъщерни и майчини грудки, въпреки прилагането на микориза (Фиг. 4).

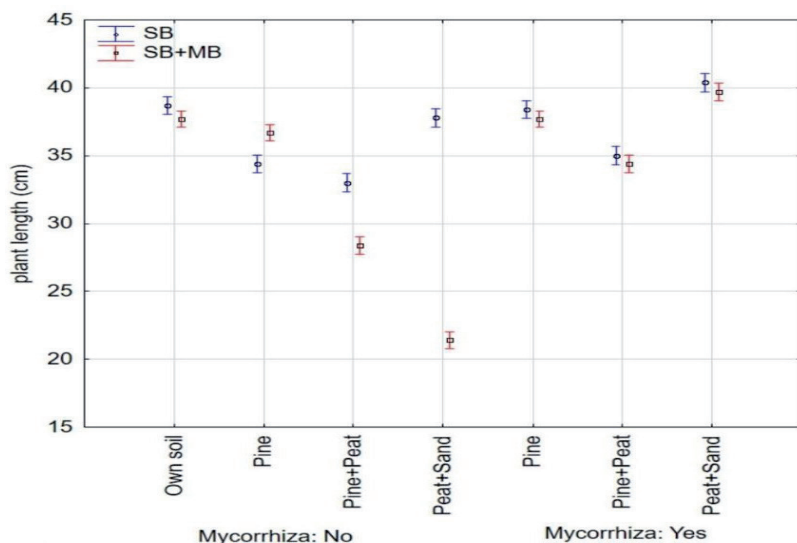
Таблица 3. Резултати от факторния дисперсионен анализ (factor ANOVA) показващ влиянието на различните фактори върху изследваните признаци. Представени са *p*-стойностите (*p*-values), като тези, отразяващи статистически достоверно влияние на фактора, са подчернени (Bold).

Източници на вариране (фактори)	ПРИЗНАЦИ											
	DF	L (cm)	LLL (cm)	WLL (cm)	LSL (cm)	WSL (cm)	DSL (cm)	LSPL (cm)	lab (cm)	pet (cm)	LB (cm)	WB (cm)
Intercept	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Year	1	0.346	0.688	0.932	0.571	0.781	0.941	0.205	0.025	0.818	0.317	0.979
Soil type	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
Type of bulb	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000
Mycorrhiza	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Year*Soil type	2	0.968	0.459	0.712	0.439	0.993	0.122	0.693	0.133	0.578	0.150	0.205
Year*Type of Bulb	1	0.419	0.212	0.631	0.634	0.831	0.697	0.730	0.9234	0.364	1.000	0.303
Soil type*Type of Bulb	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.006	0.018	0.276	0.000	0.000	0.003
Year*Mycorrhiza	1	0.081	0.851	0.357	0.049	0.661	0.710	0.144	0.764	0.281	0.768	0.202
Soil type*Mycorrhiza	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.414	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
Type of bulb*Mycorrhiza	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.785	0.001	0.348	0.895	0.016	0.000	0.885
Year*Soil type*Type of bulb	2	0.646	0.767	0.838	0.096	0.530	0.862	0.407	0.675601	0.528	0.581	0.763
Year*Soil type*Mycorrhiza	2	0.495	0.706	0.788	0.824	0.988	0.269	0.826	0.605197	0.632	0.374	0.915
Year*Type of bulb*Mycorrhiza	1	0.281	0.247	0.891	0.407	0.688	0.311	0.635	0.895186	0.952	0.477	0.726
Soil type*Type of mycorrhiza	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.549	0.000	0.275905	0.000	0.000	0.140
Year*Soil type*Type of mycorrhiza	2	0.914	0.844485	0.914	0.724	0.7918	0.868	0.507	0.672122	0.666	0.990	0.747

Легенда: DF – степени на свобода, L – височина (дължина) на растението, LLL – дължина на най-долния лист, WLL – ширина на най-долния лист, WSL – дължина на долната част на лист, DSL – дължина на долната част на лист, LSPL – дължина на страничните частелчета, lab – дължина на лабелума, pet – дължина на венчелистчета, LB – дължина на грудките, WB – ширина на грудките.



Фиг. 4. Средна дата (ден от началото на засаждането) на появата на първия лист при различни комбинации на факторите.



Фиг. 5. Средни стойности на височината на растенията при различни режими на отглеждане (1 година)

Дължина (височина) на растенията

Микоризата оказва положителен ефект върху дължината на растенията при всички типове субстрати. Особено силно е изразено това влияние при субстрат торф + пясък, където увеличението при използване на майчини луковици е двойно. Резултатите през втората година на експерименти не се отличават съществено. Разделянето на майчините грудки оказва положително влияние върху дължината.

Дължина на най-дългия лист

Прилагането на микориза повлиява значимо върху дължината на най-дългия лист при всички почвени типове (субстрати) (Фиг. 6). Например, в субстрата торф + пясък дължината на най-дългия лист при вариантите DB и DB + MB се увеличи съответно от 15.2 cm и 6.7 cm до 20.3 cm и 18.8 cm след прилагане на микориза. Освен това, дължината на най-дългия лист нарасна значително след отделянето на майчината грудка при всички типове почви. Комбинацията от микоризна апликация и отделяне на майчината грудка увеличи дължината на най-дългия лист във всички почвени субстрати.

Широчина на най-дългия лист

Този показател варира значително при всички типове почвени субстрати след приложение на микориза (Фиг. 7). В субстрата бор + торф ширината на най-дългия лист при вариантите DB и DB + MB се увеличи от 1.2 cm до съответно 1.5 cm след прилагане на микориза. Отделянето на майчината грудка довежда до значително увеличаване на ширината на най-дългия лист при всички типове почвени субстрати, с изключение на субстрата борова кора + торф. Ширината на най-дългия лист е статистически най-висока при варианта торф + пясък / MY:Yes /.

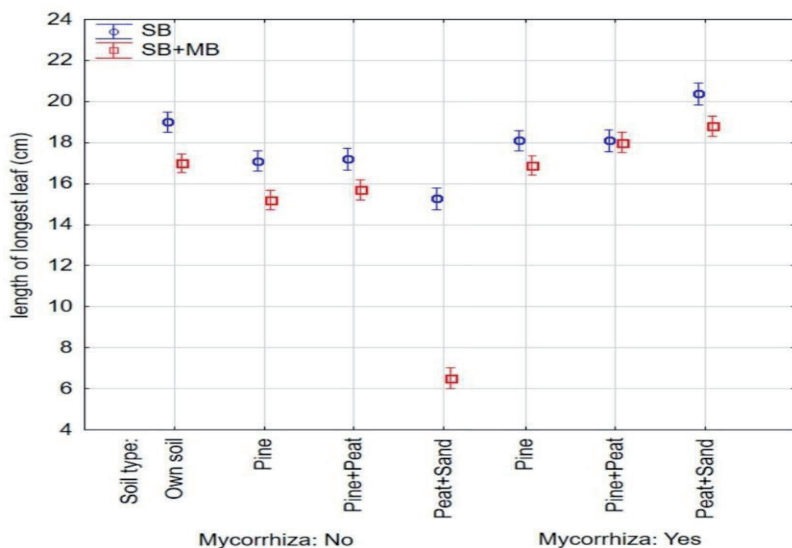
Дължина на най-късия лист

Резултатите показват, че микоризната апликация значително увеличава дължината на най-късия лист при всички субстрати (Фиг. 8). В субстрата борова кора дължината на най-късия лист при двата варианта грудки е увеличена до 14 cm след добавяне на микориза. Отделянето на майчината грудка довежда до значително подобрене на този показател при всички типове субстрати без микоризна апликация; най-голяма дължина е отчетена в субстрата естествена почва –

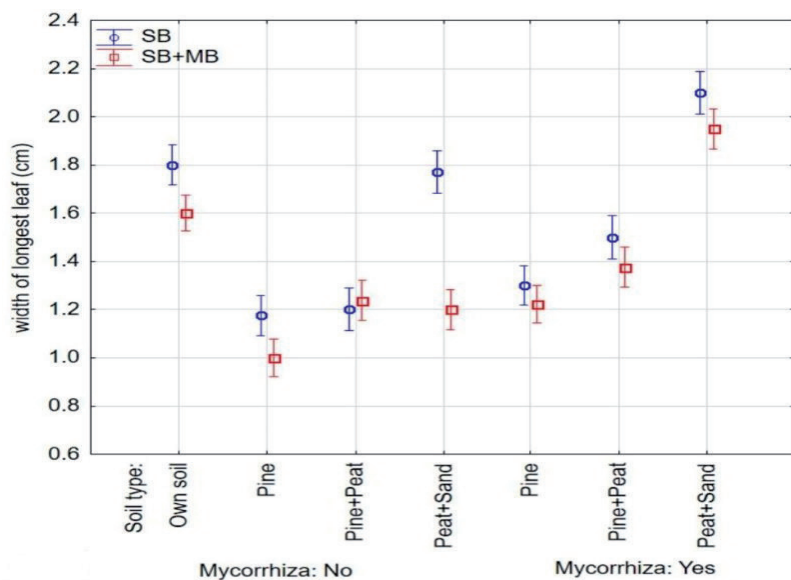
16.8 cm, следвана от субстрата бор + торф – 14.8 cm. Въпреки това, наличието на микориза ограничава ефекта от отделянето на грудката при повечето варианти.

Широчина на най-късия лист

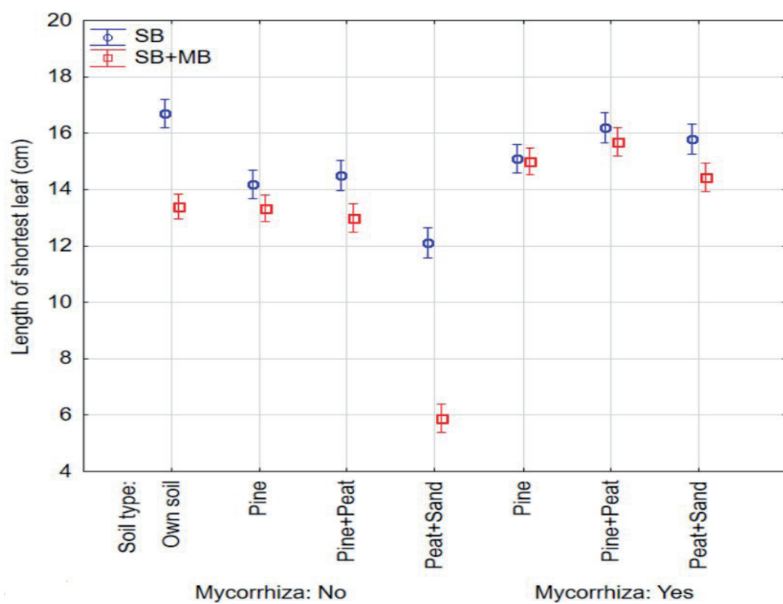
Широчината на най-късия лист варира значително между всички типове почвени субстрати (Фиг. 9). Тя е статистически най-висока в субстрата стествена почва (1.4 cm), когато не е прилагана микориза и майчината грудка не е отделена, и най-ниска в субстрата торф + пясък (0.5 cm). Освен това, отделянето на майчината грудка довежда до значително увеличаване на ширината на най-късия лист при всички типове субстрати, с изключение на субстрата бор + торф, където е отчетено слабо увеличение на този показател.



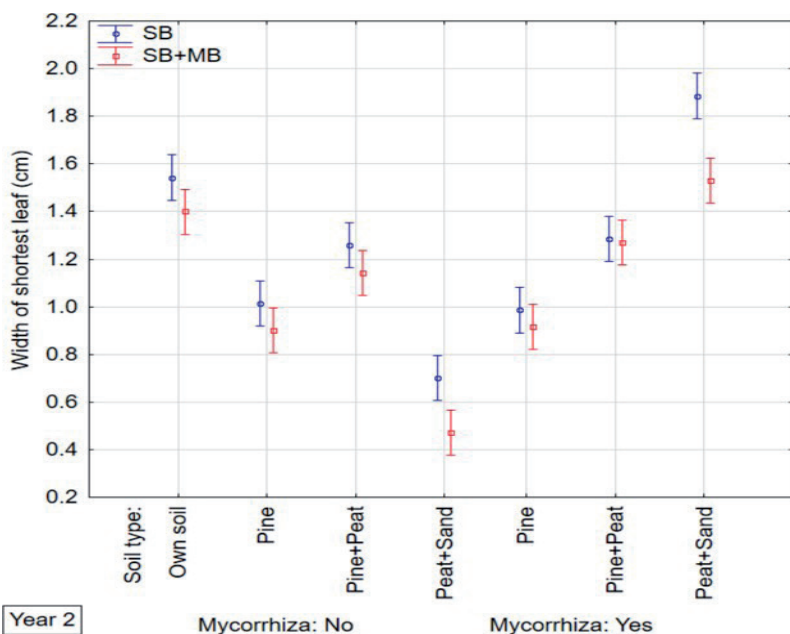
Фиг. 6. Дължина на най-дългия лист при различни режими на отглеждане (1 година)



Фиг. 7. Средна широчина на най-дългия лист



Фиг. 8. Дължина на най-късия лист



Фиг. 9. Широчина на най-късия лист

Дължина на дорзалните и странични чашелистчета

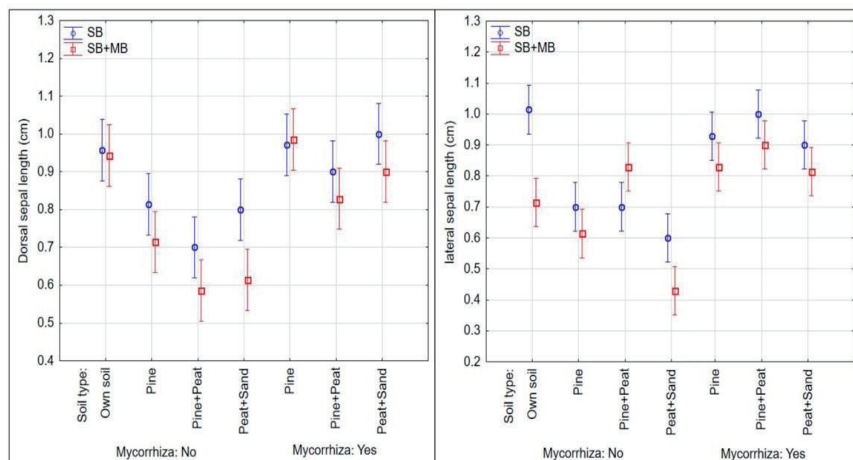
Дължината на дорзалния чашелистчета варираше между всички типове почвени субстрати (Фиг. 10). Въпреки това, без микориза (M:No) и без отделяне на майчината грудка (DB + MB), тя е статистически най-висока в субстрата естествена почва (0.95 cm). Освен това, добавянето на микориза довежда до значително увеличаване на дължината на чашелистчетата при всички типове почви. Микоризната апликация ограничава ефекта от отделянето на майчината грудка върху този показател, като не е установена значима разлика между DB и DB + MB при всички почвени субстрати.

През първата експериментална година отделянето на майчината грудка подобрява дължината на латералното чашелистче в субстратите естествена почва и торф + пясък само при отсъствие на микориза. Микоризната апликация доведе до значително увеличаване на този показател при почти всички субстрати.

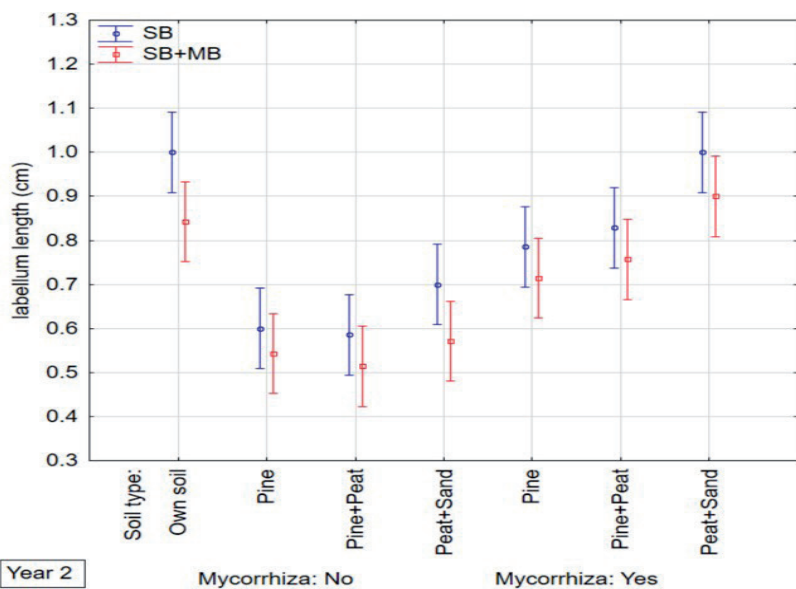
Дължина на лабелума

Тъй като при този показател има достоверна разлика между двете години на експеримент, коментарът касае и двете години (Фиг. 11). Най-голяма дължина на лабелума е установена при варианта естествена почва /DB/ M:No (1.1 cm). Микоризната апликация оказва положителен ефект върху дължината на лабелума при всички субстрати, с изключение на варианта борова кора. Отделянето на майчината грудка (DB) подобрява този показател независимо от приложението на микориза. Това е ясно изразено в субстрата естествена почва, където отделянето на луковицата оказва по-силен ефект върху дължината на лабелума, като стойностите са по-високи в сравнение с тези, отчетени през втората експериментална година.

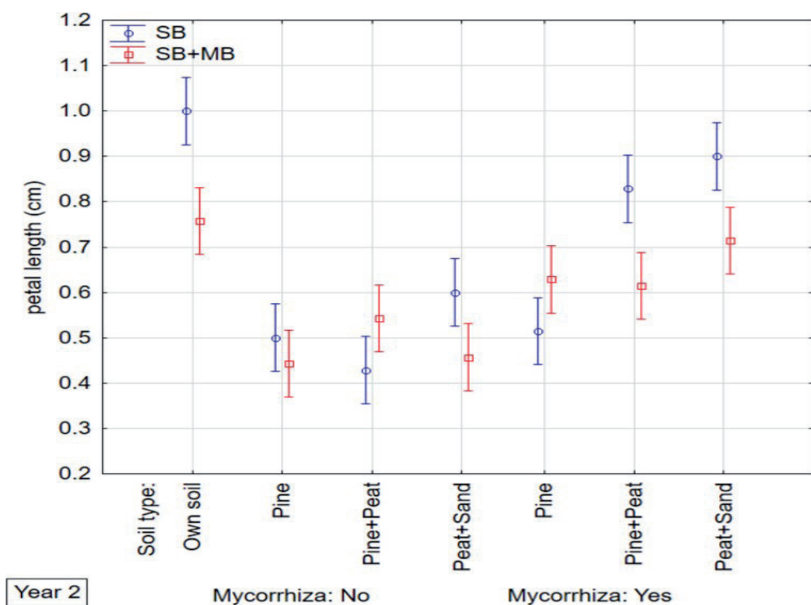
През втората експериментална година всички варианти показват сходна дължина на лабелума, като отделянето на майчината грудка няма статистически значим ефект върху този показател. Отчетено е слабо увеличение при всички субстрати, като най-голям ефект е наблюдаван при субстрата естествена почва. От друга страна, приложението на микориза довежда до значително увеличаване на дължината на лабелума при всички субстрати.



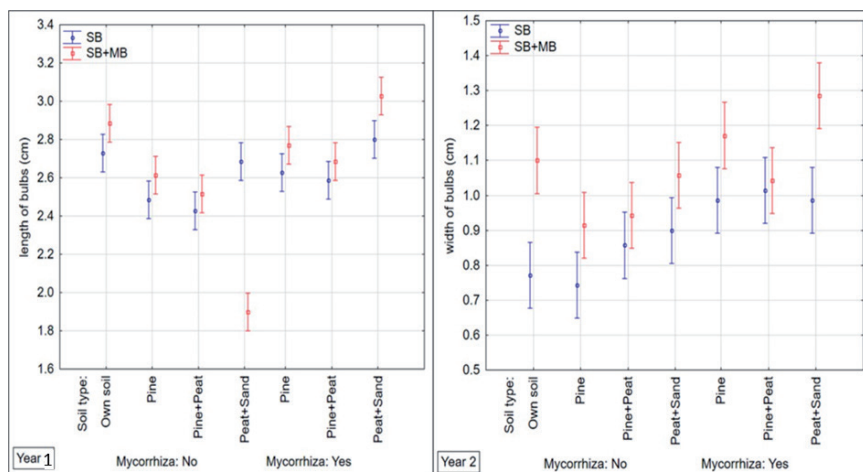
Фиг. 10. Дължина на дорзалното и страничното чашелистчета



Фиг. 11. Средна дължина на лабелума



Фиг. 12. Средна дължина на венчелистчетата



Фиг. 13. Средни размери на грудките в зависимост от факторите на субстрата

Дължина на венчелистчето

Дължината на венчелистчето варира между всички типове почви, като е статистически най-висока в субстрата естествена почва (0.9 cm), без приложение на микориза и без отделяне на майчината грудка (Фиг. 12). Резултатите показват, че приложението на микориза значително увеличава дължината на венчелистчето в субстратите бор, бор + торф и торф + пясък. Отделянето на майчината луковича доведе до значително увеличаване на дължината на венчелистчето в субстрата торф + пясък както при наличие, така и при отсъствие на микориза, както и в субстрата бор + торф без микориза. Отделянето на майчината грудка не подобрява дължината на венчелистчето в субстрата естествена почва, където е отчетено само слабо увеличение на този показател при варианта DB.

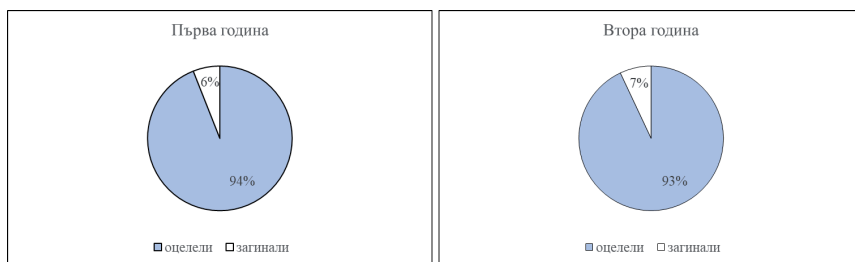
Размери на грудките

Отделянето на майчините грудки има отрицателен ефект върху двата размера на грудката (дължина и ширина) при всички типове почви, с изключение на субстрата торф + пясък, където дължината се увеличава значително от 1.9 cm при DB+MB до 2.7 cm при DB (Фиг. 13). При отсъствие на микориза и без отделяне на майчината грудка най-голямата дължина (3 cm) и ширина (1.12 cm) са отчетени

в субстрата естествена почва при варианта DB+MB. В допълнение, микоризната апликация довежда For both experimental years (first and second), the mortality level was assessed in order to precise the supposed reasons and factors that might have led to the death

Оцеляемост

През първата година от експеримента оцеляемостта е 94%, като са загинали 6 от 97 индивида, а през втората година – 93% (загинали 8 от 109 индивида) (Фиг. 14). Загубите са се случили предимно на ранните етапи на развитие. Причините за загиването не са установени, но вероятно са свързани със състоянието на растенията преди засаждането им. Все пак, посочената оцеляемост от над 90% може да бъде оценена като висока и достатъчна за практическо приложение.



Фиг. 14. Оцеляемост през първата (а) и втората (б) година

4.3. *IN VITRO* РАЗМНОЖАВАНЕ

След 3 месеца култивиране в течна и твърда хранителна среда при различни позиции на пъпките и различни експериментални условия не е получен нито един летораст. Част от грудките са показали симптоми на контаминация (заразяване с патогени) и са отстранени, за да се избегнат сериозни повреди в останалите експерименти. Въпреки, че останалите грудки не показват признаци на контаминация, не са наблюдавани признаци на прорастване.

Липсата на отговор от засадения материал може да се дължи на няколко фактора:

- Хранителната среда на Murashige & Skoog (MS), използвана в този експеримент, може да не е особено подходяща за процеса на прорастване. В бъдеще могат да бъдат изпробвани други среди с цел да се оцени тяхната роля в индуцирането на прорастване.

– Ефектът от студеното съхранение преди микроклониране вероятно е неефективен по отношение жизнеспособността на грудките; ниската температура би могла да повлияе върху способността за покълване на луковичите чрез необратимо деактивиране и разрушаване на част от ензимната активност.

4.4. Дискусия

В настоящото изследване обект на внимание беше луковичната орхидея *Anacamptis pyramidalis*. Поведението и начинът на растеж на този див вид орхидея бяха оценени при различни експериментални и контролирани климатични условия (температура и влажност), сходни с тези в естественото ѝ местообитание. Беше изследвано влиянието на различни субстрати (собствена почва – контрол, борова кора, борова кора + пясък 1/1 и торф + пясък 1/1), добавянето на микориза и отделянето на майчината луковича върху параметрите на растежа (дата и скорост на поникване, дължина и ширина на най-дългия лист, дължина и ширина на най-късия лист, височина на растението, дължина и ширина на луковичата, дължина на страничния и гръбния чашелист, дължина на лабелума, дължина на венчелистчетата и накрая – нивото на смъртност). Всички тези фактори бяха изследвани поотделно и в комбинация в продължение на две последователни години.

Първоначално беше постигната успешна трансплантация на *Anacamptis pyramidalis* след появата на една луковича над почвената повърхност. Процентът на поникване се увеличи с 10%, когато майчината луковича беше запазена. За разлика от това, при отделяне на майчината луковича се наблюдаваше по-ранно поникване с 3 до 8 дни при всички субстрати. Освен това положителният ефект от отделянето на майчината луковича и добавянето на микориза беше отчетлив за всички изследвани параметри през двете експериментални години при всички субстрати, с изключение на собствената почва (без добавена микориза). Комбинацията от тези фактори подобри растежа, особено при субстрата торф + пясък, в сравнение с контрола (собствена почва).

Растежът на луковичата (дължина и ширина) беше свързан единствено с типа субстрат, без влияние от микоризата и отделянето на луковичата. Контролният вариант (собствена почва) даде най-

голям размер на луковиците в сравнение с останалите субстрати и през двете години на експеримента. Накрая, нивото на смъртност не беше свързано с нито един от изследваните фактори и най-вероятно се дължи на патогенни или вътрешни генетични фактори в дъщерната луковица.

Отделянето на майчината луковица доведе до по-ранна поява на листа при всички типове почви. Наблюдаваната по-ранна поява при дъщерната луковица (SB) в сравнение с варианта с майчина луковица (SB + MB) може да се обясни със стадия на покой и зрелостта на луковицата към момента на засаждане. Изглежда, че отделянето на майчината луковица е предизвикало по-ранно прекъсване на покоя при дъщерната луковица, което е довело до по-ранно поникване. Освен това, когато луковиците бяха засадени в собствена почва, наличието на специфични микроорганизми, необходими за естественото поникване, които липсват в другите субстрати, вероятно е допринесло за по-бързото им поникване.

От друга страна, наличието на майчина луковица повлия положително процента на поникване през двете години. Този резултат е съпоставим със състоянието на пирамидалната орхидея в природата, където майчината луковица винаги е свързана с дъщерната и стимулира нейното поникване по време на естествения растежен цикъл. Тази разлика може да се дължи на зрелостта и състоянието на събраните луковици. През първата година (2017) събирането е извършено през май–юни, докато през втората година (2019) – три седмици по-късно, в края на юни, което вероятно е довело до по-висок процент на поникване. Според Brundrett (2014) пирамидалната орхидея пониква в началото на есента, поради което луковиците, събрани през втората година, вероятно са били по-зрели и по-близо до естествения си период на поникване.

Добавянето на микориза увеличи височината на растенията, както и дължината и ширината на най-дългия лист през двете години на опитите при всички субстрати, с изключение на собствената почва, където микориза не беше прилагана. Също така, отделянето на майчината луковица увеличи тези параметри при всички типове почви, с изключение на боровия субстрат за височината на растенията и дължината на най-дългия лист, както и при боров + торф за ширината на най-дългия лист. Адаптацията на хранителния метаболизъм на

орхидеите към микоризната симбиоза се обяснява с намаляване на азотния метаболизъм, което може да се счита за адаптация към паразитния начин на живот по време на развитието на орхидеите (Press et al., 1986). Освен това, фосфатните и азотните потоци са напълно повлияни в по-късните етапи от жизнения цикъл (Alexander and Hadley, 1984; Alexander et al., 1984). В резултат на това ефектът на хранителните вещества върху растежа на орхидеите може да се прояви чрез симбиотичната асоциация, като повлиява растежа на симбиотичните гъби или взаимодействието между гъбите и орхидеите (Dijk and Eck, 1995). Следователно както добавянето на микориза, така и отделянето на майчината луковица подобриха растежа, особено при субстрата торф + пясък, който е по-беден на неорганични хранителни елементи (N, P, K) в сравнение с боровите субстрати, тъй като микоризата има благоприятен ефект, свързан с намалената наличност на неорганични хранителни вещества (Dhillon and Friesse, 1994).

Отделянето на майчината луковица увеличи дължината и ширината на най-късия лист при всички типове почви, с изключение на торф + пясък. Субстратът собствена почва доведе до по-голямо удължаване на най-късия лист в сравнение с другите почви, дори когато те бяха по-богати на органична материя. Това може да се обясни с по-високото рН на собствената почва (7,57) в сравнение с боровата (5,96) и борово-торфената (5,77). Всъщност *Anacamptis pyramidalis* предпочита почви с рН около 7,01 (Tsiftsis et al., 2008) и се среща основно в алкални почви (Heinsoo, 2012).

Микоризната апликация увеличи дължината на всички параметри на цвета, включително гръбния и страничния чашелист, венчелистчетата и лабелума, с изключение на дължината на страничния чашелист при варианта SB + MB в субстрат бор + торф. Освен това най-големите стойности на всички цветни параметри бяха наблюдавани в собствената почва (контрол), когато микориза не беше прилагана. Това е логично, тъй като собствената почва представлява естествения субстрат на пирамидалната орхидея и осигурява най-добър растеж поради адаптацията на луковицата към този тип почва в природата.

Наблюденията върху дължината и ширината на луковиците могат да се свържат с текстурата на субстрата. Дължината на луковиците беше значително по-голяма в собствената почва при варианта

SB + MB без микориза. Отделянето на майчината луковица оказва отрицателно влияние върху двете измерения на луковиците (дължина и ширина), с изключение на субстрата торф + пясък, където дължината на луковиците се увеличи. Освен това микоризната апликация увеличи дължината и ширината на луковиците само при торф + пясък в SB + MB и ширината при боровия субстрат в SB и SB + MB. Например боровият субстрат може да е причинил физически стрес и натиск върху луковицата, водещи до по-малки размери, докато добавянето на торф към боровата кора е позволило по-добър растеж поради полеката текстура и по-ниското механично напрежение. Микоризната апликация не оказва съществено влияние върху размерите на луковиците, като вероятно е повлияла повече върху развитието на кореновата система. Според Dhillon and Fries (1994) гъбите формират допълнителна коренова система чрез мрежата от хифи, увеличавайки обема на водата и наличните хранителни вещества в почвата. Подобни резултати са докладвани от Dubova (2019) при бакла, както и от Heydarian et al. (2018) при пшеница под никелов стрес. Положителният ефект на VAM се свързва и с почвените и климатичните условия (Loit et al., 2018).

По отношение на ДНК анализа, най-същественият резултат от това изследване е потвърждението, че всички разглеждани родове принадлежат към семейство Orchidaceae. Ливанската проба 4_Anacamptis_pyramidalis_Y показва 100% сходство с KU931733_Iran, вероятно поради сходни екологични и климатични условия. Подобни резултати са докладвани от Aceto et al. (1998), които установяват, че някои цветни признаци съответстват на молекулярните данни, но повечето са силно хомопластични и неподходящи за филогенетични реконструкции. Според Pan et al. (2012) Orchidaceae се характеризира с изключително разнообразие на цветната морфология и богат видови състав, което я прави най-голямото семейство покритосеменни растения. Освен това двата вида са по-близки помежду си поради общите си цветни характеристики. Микроморфологичният анализ показва наличие на нетипични власинки по лабелума, които вероятно привличат опрашителите при този безшпорест таксон. Тези синапоморфни белези, като характерната форма на власинките, също подсказват по-близка връзка между тези два рода в рамките на Orchidoideae (Şenel et al., 2018). Необходими са допълнителни молекулярни изследвания за

изясняване на различията между отделните генотипове на орхидеите.

Освен това настоящото изследване предостави референтна последователност на *Anacamptis pyramidalis*, която може да се използва за идентификация на видове от Orchidaceae. То показва също, че геномна ДНК с достатъчно качество може да бъде изолирана и секвенирана от хлоропластния (митохондриалния) геном. Наличието на последователности от хлоропластния геном ще подпомогне развитието на генетичното инженерство, включително хлоропластната трансформация. Информацията за пълната последователност на хлоропластния геном е важна не само за таксономичната класификация, но и за подобряване на културните растения.

Относно опитите за микропропагация, след три месеца култивиране в течна и твърда среда с различни позиции на пъпките и при различни експериментални условия не беше получен нито един връх на летораст. Някои луковици показаха симптоми на контаминация и бяха елиминирани, за да се избегне увреждане на останалите експерименти. Въпреки че останалите луковици не показаха признаци на замърсяване, не се наблюдаваше покълване.

Липсата на отговор на посадъчния материал може да се дължи на няколко фактора:

- MS средата, използвана в експеримента, може да не е била подходяща за индукция на покълване; в бъдеще могат да се изпробват други среди.
- Студеното съхранение преди микропропагацията може да е повлияло отрицателно върху жизнеспособността на луковиците, като ниските температури са довели до необратима деактивация и разрушаване на някои ензимни активности.

Съществуват малко успешни приложения на *in vitro* размножаването при *Anacamptis pyramidalis*. Çiğ и Yilmaz (2018) съобщават за значителни трудности и почти нулев успех, докато Ostojić et al. (2022) установяват, че кинетинът стимулира образуването на листа, а 6-бензиладенинът – формирането на корени.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ПРЕПОРЪКИ

Дивите орхидеи се срещат в природата по целия свят – във всички типове екосистеми и климат, върху различни видове почви и на всякаква надморска височина. Средиземноморският регион се характеризира с голямо разнообразие от диви орхидеи по отношение на видове и популации. В Ливан това богатство се среща на различни надморски височини, с предпочитание към алкални почви. Пирамидалната орхидея (*Anacamptis pyramidalis*) е сред няколкото вида диви орхидеи, разпространени в ливанската природа и екосистеми. Поради красивия си цвят този вид често се събира от естествените му местообитания. В наши дни концепцията за опазване на биологичното разнообразие е ограничена и съществуват само няколко примера за опазване на диви цветя както на държавно, така и на частно ниво. Поведението и начинът на растеж на този див вид орхидея бяха оценени при различни експериментални и контролирани климатични условия (температура и влажност), сходни с тези в естествената му среда.

Резултатите, получени в хода на настоящата дисертационна работа, позволяват да се направят следните по-общи заключения:

1. ДНК баркодирането може успешно да се използва за идентификация на различни акцесии на вида. Както ядрените, така и цитоплазмените маркери се доказаха като подходящи за тази цел.

2. Комбинираният BLAST и филогенетичен анализ разкри най-близки родствени връзки между акцесиите от Ливан и Иран, както и тяхното разграничаване от акцесиите от западния Средиземноморски регион (Испания). Северна Европа показва по-ниско разнообразие и междинно положение.

3. Изследването предостави референтна последователност на *Anacamptis pyramidalis*, която може да се използва за идентификация на видове от семейство Orchidaceae. То също така показва, че геномна ДНК с достатъчно качество може да бъде изолирана и секвенирана от хлоропласти (митохондриален геном).

4. Фенологичните фази, като поникването на листата, варираха значително в зависимост от типа почвен субстрат за отглеждане.

5. Морфометричните признаци се различаваха съществено между различните варианти на третиране, което позволи идентифицирането и подбора на най-добрите варианти. Тенденциите и зависимостите не се различаваха между двете години на изследването.

6. Прилагането на отделяне на майчината луковица, различни субст-

рати – основно торф + пясък – и микориза, в комбинация, осигури подходящи условия за растеж, които превъзхождаха тези в естествената среда.

7. И през двете години на експериментите бяха отчетени високи нива на преживяемост – над 90 %.

8. *In vitro* култивирането не беше успешно на настоящия етап от изследването и изисква допълнителни проучвания.

9. Трансплантацията се счита за прост и евтин метод за опазване на дивата природа в сравнение с други методи за съхранение (напр. криоконсервация). Нейното прилагане е важно за защита и съхранение на различни диви видове, които могат да бъдат застрашени в деградиращи екосистеми или изложени на риск от изчезване, чрез различни вегетативни органи като ризоми, луковици и столони.

10. Различните подходи следва да се разглеждат съвместно за по-ефективно решаване на систематичните проблеми при големи групи като орхидеите, характеризиращи се с голямо разнообразие на цветовете, способност за хибридизация и широко географско разпространение.

Заключенията и резултатите от настоящото изследване предполагат няколко препоръки за бъдеща работа, свързана с размножаването като инструмент за опазване на *Anacamptis pyramidalis* и други видове орхидеи със сходни жизнени характеристики:

1. Препоръчва се използването на по-вариабилни генетични маркери, като полиморфизъм на дължината на амплифицираните фрагменти (AFLP), които показват висока степен на хомология и могат да бъдат използвани за филогенетични анализи.

2. Препоръчва се по-нататъшно изследване и оценка на морфологичните признаци за кладистични анализи, които могат да дадат представа за конвергентната и паралелната еволюция на цветните характеристики при орхидеите.

3. Препоръчва се в бъдещи изследвания да се проучат опити за повторно въвеждане в природата на орхидейни растения, размножени *ex situ*.

4. Препоръчва се в бъдещи изследвания да се проучи микропропагацията на *Anacamptis pyramidalis* от семена или върхови леторасты в различни хранителни среди, тъй като този метод е високоефективен, особено при диви орхидеи, след установяване на културен протокол за всички етапи на микропропагация.

5. Въпреки това са необходими допълнителни изследвания с цел точно определяне на оптималните типове субстрати, подходящите микоризни типове и родове, както и най-ефективния начин на тяхното приложение.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ

С дисертационния труд са постигнати следните по-важни приноси:

А. Научни

1. Доказано е успешното приложение на ДНК-баркодинг метода за успешна идентификация на вида *Anacamptis pyramidalis*.
2. Установена е последователността на нуклеотидите в два региона от генома на вида на базата на два типа маркери.
3. Установени са филогенетичните връзки на популациите от Ливан с такива от други части на естествения ареал на вида.
4. Установени са възможностите за приложение на комбиниран подход за вегетативно размножаване на вида

Б. Приложни

1. Установени са оптималните растежни условия за *Anacamptis pyramidalis*, подобни на тези в естествената му среда
2. Установено е влиянието на различните растежни субстрати и приложението на микоризата за размножаването на вида и са препоръчани най-подходящите от тях.
3. Установено е влиянието на различните режими на третиране върху морфологични и морфометрични признаци на вида.
4. Установено е, че *in vitro* размножаването е трудно и за успешното му приложение са необходими допълнителни проучвания
5. Установено е, че постигнатите резултати могат да се използват не само за целите на опазването на вида, но също и за неговото масово размножаване

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

- Khoury E., Sajyan T.K., Zhelev P., Sassine Y.N., 2018. Investigating the effect of substrate, mycorrhizal application and bulb separation on the growth of the wild orchid *Anacamptis pyramidalis*. AGROFOR International Journal, 3 (3): 5-13.
- Khoury E., 2023. Ex-situ propagation of *Anacamptis pyramidalis* (L.) from an agroecological perspective. International Journal of Advanced and Applied Sciences, 10(6): 201-212. (Impact Factor 0.69).