



ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ

МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА

25 години

ВИСШЕ УЧИЛИЩЕ ПО АГРОБИЗНЕС И РАЗВИТИЕ НА РЕГИОНИТЕ
Юбилейна международна научна конференция БЪЛГАРИЯ НА РЕГИОНИТЕ

Перспективи за устойчиво регионално развитие

27-28 октомври 2017 г., Пловдив, България



25 years

UNIVERSITY OF AGRIBUSINESS AND RURAL DEVELOPMENT
Jubilee International Scientific Conference BULGARIA OF REGIONS

Sustainable Regional Development Perspectives

27-28 October 2017, Plovdiv, Bulgaria

<http://regions.uard.bg>

Adaptation of the Species *Atropa belladonna* L. Grown *in vitro* to the Environment

Stanislava Stateva, Gergana Desheva

Institute of Plant Genetic Resources - Sadovo, Bulgaria

Abstract: The purpose of this study is to adapt the species *Atropa belladonna* L. to the environment. The species is cultured *in vitro* on Quorin & Lepoivre (1977), with 0.2, 0.5 and 1.0 mg / l IBA and IAA added. The control variant is with explants developed in Quorin & Lepoivre (1977) without added plant hormones. Adaptation of the resulting regenerators with a very well formed root system is carried out in 6x6 cm plastic pots. A suitable substrate (soil: peat: sand 1: 1: 1) has been identified for successful rooting of the species *Atropa belladonna* L. in the adaptation process, which ensures their conservation and return to natural habitats. A high correlation dependence between the height and number of leaves of *A. belladonna* L. plants has been established as a result of which 62.7% of the leaf count variation is dependent on the height factor.

Keywords: *Atropa belladonna* L., biotechnology; *in vitro*, medicinal plants, plant propagation, conservation.

Приспособяване на вида *Atropa belladonna* L. отглеждан в *in vitro* условия към околната среда

Станислава Статева, Гергана Дешева

Институт по растителни генетични ресурси - Садово

Резюме: Целта на настоящото изследване е да се адаптира видът *Atropa belladonna* L. към околната среда. Видът е отглеждан в *in vitro* условия върху хранителна среда Quorin & Leroivre (1977), с добавен 0.2, 0.5 и 1.0 mg/l IBA и IAA. Контролният вариант е с експланти, развиващи се в среда Quorin & Leroivre (1977) без добавени растителни хормони. Адаптирането на получените регенеранти с много добре формирана коренова система се извършва в пластмасови саксийки с големина 6x6 cm. Установен е подходящ субстрат (почва: торф: пясък 1:1:1) за успешно вкореняване на видовете *Atropa belladonna* L. в процеса на адаптация, което гарантира запазването и връщането им в естествените местонаходища. Установена е висока корелационна зависимост между височината и броя на листата на растенията от вида *A. belladonna* L., вследствие на което 62.7% от изменението на броя на листата зависи от фактора височина.

Ключови думи: *Atropa belladonna* L., биотехнология, *in vitro*, медицински растения, размножаване, съхранение.

Увод

Видът *Atropa belladonna* L. е разпространен в буковите гори и сечищата на Стара планина, Рила, Родопите, Люлин, Пирин и Странджа при надморска височина от 400 до 1650 m (Стоянов, 1965,1973; Велчев, 1984; Димитрова, 1987; Йорданов, 1983; Genova et. al., 1996, 1997; Воденичаров, 2001; Канисков 2001; Атанасова и др., 2004).

Поради наличието на атропин и скополамин билката е силно отровна. Използват се корените, листата и стръкове. Алкалоидите, съдържащи се в нея, действат болкоуспокояващо при спазми на гладката мускулатура на стомашно-чревния тракт (остър гастрит, язва на стомаха). Всички органи на растението съдържат алкалоидите: атропин, хиосциамин, беладонин, скополамин, азотметил-пиридин, азотметил-пиридин, пиридин, тетраметилдиаминобутан.

В България е създаден сорт *Атропа* 1029 с добив от сухи листа до 170%, по-висок от стандартната популация, на суха надземна част с 115% и на корени с 137%. Има голямо съдържание на алкалоиди – до 218%, повече спрямо изходната популация. При него съдържанието на алкалоиди в надземната част е от 0.5 до 1.0% и тя се използва цялата за производство на лекарства (Атанасова и др., 2004).

В диворастящата беладона се съдържат по-малко алкалоиди, отколкото в култивираната (Leete, 1990; Sporer et al., 1993; Oksman-Caldentey, 1996; Grit et al., 2003). Около 1.35% от алкалоидите се синтезират в корените, от 0.3 до 1.2% – в листата, 0.3 до 0.6% – в стъблата, 0.7% – в цветовете и 0.7% – в зрелите

плодове. Растението е токсично поради съдържащите се в него атропин и скополамин (Янкулов, 1996; Schneider et al., 1999; Гусев, 2003, Caksen et al., 2003; Joshi et al., 2003).

Ежегодно намалява числеността на естествени находища на беладона в страната ни. Причината за това е замърсяването на околната среда и безконтролното събиране на билката (Кънчев, 2009). Налага се да се вземат спешни мерки, за да се запази медицинският вид в естествената му среда.

Използването на биотехнологичните методи е един от начините за размножаване и съхранението на *Atropa belladonna* L. (Benjamin et al. 1987).

Процесът на адаптация на растенията е много деликатен и от него зависи успехът на клоналното микроразмножение. За да могат микрорастенията да се адаптират към околната среда, е необходимо да им се осигури висока въздушна влажност, подходяща температура и стерилен субстрат (Sutter et al., 1992).

Изучаване на реакцията при медицинския вид *Atropa belladonna* L., развиващ се в *in vitro* условия, към околната среда са проследили Димитрова и др. (1996, 2001).

Целта на настоящото изследване е да се адаптира видът *Atropa belladonna* L., отглеждан в *in vitro* условия към околната среда.

Материал и методи

Растителен материал от вида *Atropa belladonna* L. е предоставен след проведени експедиции в местността Беглика в Родопите и в Стара планина.

За адаптация са използвани 30-дневни експланти, развиващи се в хранителна среда Quorin & Lepoivre (1977), с добавен 0.2, 0.5 и 1.0 mg/l IBA и IAA (всеки вариант обхваща по 10 бр. експланти). Контролният вариант е в хранителна среда Quorin & Lepoivre (1977), без добавяне на хормон (10 бр. експланти).

Адаптирането на получените растения се извърши в пластмасови саксийки с големина 6x6 cm. Използван е субстрат в съотношение почва: торф: пясък 1:1:1. Субстратът е автоклавиран за 1 час при 120 °C. Осигурена е висока въздушната влажност през първите 20 дни чрез поддържане на растенията в малка полиетиленова оранжерия. След адаптацията на микрорастенията оранжерията е отваряна всеки ден за 10 min, а след 20-я ден е извършено постепенно пълно отваряне на полиетилена, за да се осигури закаляване на растенията. След 40-я ден растенията са прехвърлени в по-големи саксии.

Опитно поле с размер 100 m² е създадено в ИРГР „К. Малков“, гр. Садово. Основната обработка на почвата включваше: дълбока оран на 26–30 cm, брануване и последващо култивиране до степен рохкавост. Изнасянето на адаптираните растения при полски условия се извърши през месец май на предварително оформената площ (Петков, 2002).

Видът *A. belladonna* L. е засят при междуредово разстояние 70 cm, а вътре в реда – 40 cm.

Грижите за насажденията по време на вегетацията се свеждаше до поддържане на рохкава, добре овлажнена и изчистина от плевели почва. Борбата с плевели се извършваше ръчно на всеки 3 седмици. Напоиването беше гравитачно на всеки 7 дни.

Наблюденията върху растежа и развитието на растенията се извършваше всеки месец. Отчетени бяха следните показатели:

- Брой на преживяли растения;
- Височина и брой стъбла на растенията (cm);
- Дължина и дебелина на стъблото (cm);
- Брой и големина на листа (cm).

Резултати и обсъждане

За адаптация са използвани 30-дневни експлантати, заложили в началото на месец март, от варианти с участието на ауксина IBA и IAA и контролния вариант (70 броя) в хранителна среда Quogin & Lepoivre (1977). Отглеждани са в полиетиленова оранжерия в продължение на 20 дни с цел да си осигури максимално адаптиране на микрорастенията.

През първите 10 дни голяма част от растенията загинаха. Причината е стресът, на който са подложени, причинен от високите дневни и ниските нощни температури. След 40-я ден от адаптирането оцелелите растения са прехвърлени в по-големи саксии със средно пропусклива почва с 7.5 рН. След 54-я ден от адаптацията процес е наблюдавано поява на кафяви листни петна, обхващащи всички растения. Това наложи третиране на растенията с 0.5% разтвор на пероцин на всеки 10 дни в продължение на един месец. Като резултат не бяха отчетени загинали растения в резултат на заболяването.

В проучването на Димитрова (2001) се посочва, че беладоната показва голяма приспособяемост към разнообразните почвено-климатични условия, но през първата година тя изисква достатъчна влажност, за да може растението добре да се развие, което налага от 1 до 2 пъти седмично поливане.

От адаптираните растения на беладоната са прихванати 32 броя, които са изнесени на полето. Най-голям брой адаптирани растения има от хранителна среда Quogin & Lepoivre (1977), с участие на 0.2 mg/l IBA. Тези растения се характеризират съответно с най-добре развити коренова система и листа (табл. 1). Изваждането на адаптираните растения се осъществи в началото на месец май, когато опасността от слани е отминала. В края на същия месец започна цъфтежа, а по-късно и плододаването, което продължи до месец септември (фиг. 1). Процентът на преживяемост на растенията е 45%.

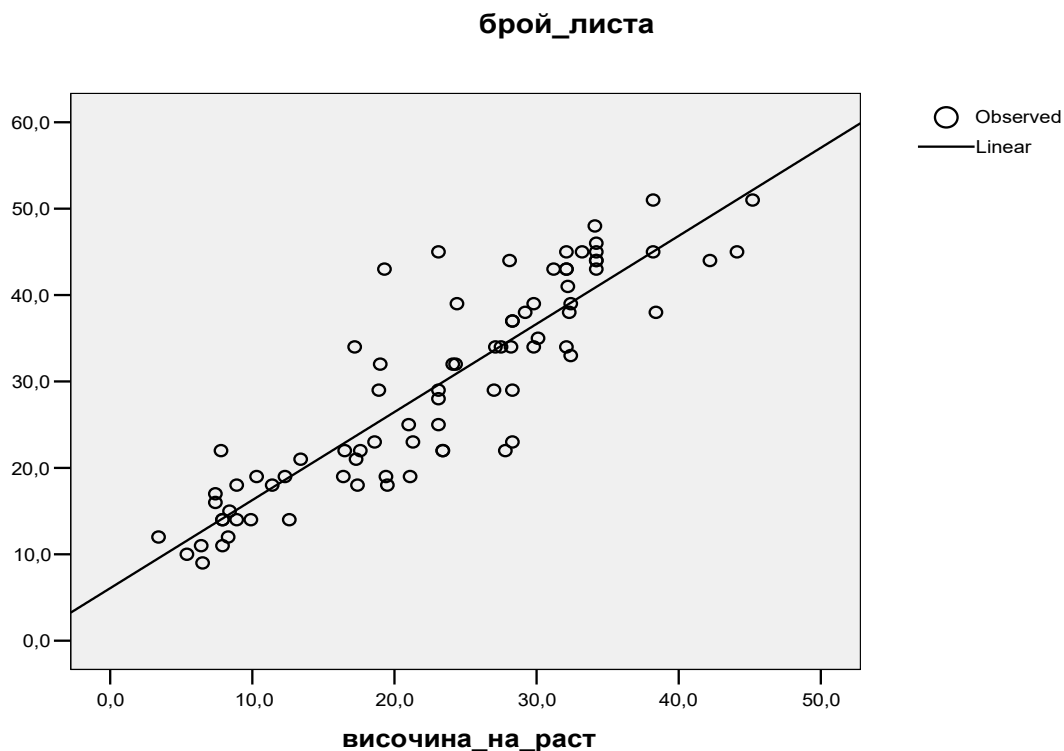
*Таблица 1. Адаптирани растения от *Atropa belladonna* L*

Хран. среда	0.2 mg/l IBA	0.5 mg/l IBA	1.0 mg/l IBA	0.2 mg/l IAA	0.5 mg/l IAA	1.0 mg/l IAA	Контрола (без хормони)
Бр. адаптирани	8	6	3	7	4	2	2
Брой корени min/max	4-16	8-10	3-4	7-9	3-5	3-4	3-5
Дължина на корена (cm) min/max	0.7-12.3	0.4-9.1	0.9-11.0	0.8-10.4	1.2-9.5	0.8-7.5	1.1-10.8
Височина на стъблото (cm) min/max	2.3-3.1	1.5-2.7	1.4-2.0	1.5-2.5	1.7-2.1	1.4-1.9	1.4-2.2
Брой листа min/max	4-8	3-6	4-7	5-7	6-9	5-8	7-9



Фиг. 1. Адаптация на вида *A. belladonna* L. в саксии и на полето

За да се установи до каква степен височината на вида влияе върху броя на листата, е извършен регресионен анализ. Установена е положителна регресионна зависимост между двете променливи – височина и брой листа, както и висока корелационна зависимост между тях. Вследствие на това 62.7% от изменението на броя на листата зависи от фактора височина. Останалите 37.3% от изменението се дължат на факторите на околната среда. Получената корелационна зависимост е представена графично на фигура 2.



Фиг.2. Корелационна зависимост между височината на растенията и броя листа при *A. belladonna* L.

Изводи

Установен е подходящ субстрат (почва: торф: пясък 1:1:1) за успешно вкореняване на видовете *Atropa belladonna* L. в процеса на адаптация, което гарантира запазването и връщането им в естествените местонаходища.

След приключване на адаптационния процес на беладоната към променливите условия на околната среда се наблюдава максимално развитие на вида.

Установена е висока корелационна зависимост между височината и броя на листата на растенията от вида *A. belladonna* L., в следствие на което 62.7% от изменението на броя на листата зависи от фактора височина.

Литература

1. Атанасова, М., Н. Недков (2004). Етерично маслени и лекарствени култури, София, 287.
2. Велчев, В. (1984). Червената книга на Н.Р.Б., том 1, Растения.
3. Воденичаров, Д., Ат. Петров (2001). Отровни растения и отравяния с тях, Пенсофт.
4. Гусев, Чавдар (2003). Оценка на запасите от лечебни растения и диворастящи плодове, с. 68.
5. Димитрова, Л. (1987). Речник на названията на лечебните растения, Медицина и физкултура, София.
6. Димитрова, Д., К. Върбанова, Л. Евстатиева (1996). Възможности за *in vitro* размножаване на *Atropa belladonna*. Сб. науч. докл., Втора Балканска научна конференция по проучване, опазване и използване на горските ресурси, т.1, София, с.385-388.
7. Димитрова, Д., К. Върбанова, К. Кожухарова (2001). Опити за адаптиране на вида лудо биле (*Atropa belladonna* L.). Научни трудове АУ, Пловдив, т.XLVI, кн. 1, с. 103-106.
8. Йорданов, Д. (1983). Флора на Н.Р.България, том I-IX.
9. Канисков, Васил. (2001). Лечебни растения в България, 149.
10. Кънчев, Цвятко (2009). Размножаване и събиране на билки, 84.
11. Петков, Тодор (2002). Култивиране на лечебни билки, 39.
12. Стоянов, Н., Б.Савчев (1965). Изследване върху запасите от лудо биле в Станджа.
13. Стоянов, Н. (1973). Нашите лекарствени растения, Т1, Наука и изкуство, с. 166.
14. Янкулов, Й. Г., Г.Делчев (1996). Резултати от проучването на белладона, произхождаща от различни райони на страната. Растениевъдни науки, 10.
15. Benjamin B.D., P.Roja, M.R. Heble, M.S. Chadha (1987). Multiple shoot cultures of *Atropa belladonna*: effect of physicochemical factors on growth and alkaloid formation. *J Plant Nutr.* 129: 129–35
16. Caksen H., D. Odabas, S.Akbayram (2003), Deadly nightshade (*Atropa belladonna*) intoxication: An analysis of 49 children. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:665–668

17. Genova E., Y. Veleva, D. Boteva (1996), Distribution and resources characterization *Atropa belladonna* L. in Bulgaria In: Proc. Second Balkan Conference on study, Conservation and Utilisation of Forest Resources, 305 June, Sofia, Ed. G. Tsankov, vol. 1, PSSA Sofia, 347-379
18. Genova E., G. Komitska, Y. Beeva (1997), Study on the germination of *Atropa belladonna* L. Seeds, *Plant Physiol*, 23, 61-63
19. Grit Rothe, A. Hashiya, Y. Yamada, T. Hashimoto (2003), Birgit Drager, Alkaloids in plants and root cultures of *Atropa belladonna* overexpressing putrescine N-metiltransferase, *Journal of experimental Botany*, Vol 5, No 30, pp2065-2070, September 1
20. Leete E. (1990), Recent Development in the Biosynthesis of the tropane alkaloids, *Planta Medica* 56,339-359
21. Joshi P., A. C. Wicks, S. K. Munshi (2003), Recurrent autumnal psychosis. *Postgrad Med J* 2003;79: 239–240.
22. Oksman-Caldentey, R. Hiltunen (1996), Transgenic crops for improved pharmaceutical products, *Feile Crop Research* 57-69
23. Sporer, F., M. Sauerwein, M. Wink (1993), Diurnal and developmental variation of alkaloid accumulation in *Atropa belladonna*. *Acta Hort. (ISHS)* 331:381-386
24. Schneider F, P. Lutun, P. Kintz (1999), Plasma and urine concentrations of atropine after the ingestion of cooked deadly nightshade berries. *J Toxicol Clin Toxicol*
25. Sutter. E. G., K. Shackel, J.C. Diaz (1992), Acclimatization of tissue cultured plants, *Acta Hort. (ISHS 314)*, 2 International Symposium on propagation of ornamental plants