



Списание за наука

„Ново знание“

ISSN 2367-4598 (Online)

Академично издателство „Талант“

Висше училище по агробизнес и развитие на  
регионите - Пловдив

New Knowledge

Journal of Science

ISSN 2367-4598 (Online)

Academic Publishing House „Talent“

University of Agribusiness and Rural Development -  
Bulgaria

<http://science.uard.bg>

## OPPORTUNITIES FOR *IN VITRO* INTRODUCTION AND STORAGE OF *ASCLEPIAS TUBEROSA* L.

Stanislava Stateva

*Institute of Plant Genetic Resources “Konstantin Malkov”, Sadovo, Bulgaria*

**Abstract:** Bulgaria is renowned for its wealth of wildlife medicinal plants. Intensive collection of medicinal plants in recent years has to be addressed to preserve them. The plant species *Asclepias tuberosa* L., commonly referred to as butterfly, is a perennial species found on rocky forests. In order to avoid the disappearance of the species and the search for an accelerated propagation rate, it requires its research *in vitro*. When introducing seeds under controlled conditions, the effectiveness of different sterilizing solutions is tested. A method of shooting with ethyl alcohol and bleach at different concentration and exposure was applied.

**Keywords:** *Asclepias tuberosa* L., medical appearance, sterilization, *in vitro*.

## ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА *IN VITRO* ВЪВЕЖДАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКИЯ ВИД *ASCLEPIAS* *TUBEROSA* L.

Станислава Статева

*Институт по растителни генетични ресурси „Константин Малков“ – Садово*

**Резюме:** България е прочута с богатството си от диворастящи лечебни растения. Интензивното им събиране през последните години налага да се обърне внимание за запазването им. Растителният вид *Asclepias tuberosa* L., обикновено наричан пеперуда, е многогодишен вид, срещащ се по скалисти гори. За да се избегне изчезването на вида и търсене на ускорени темпове на размножаване, се налага проучването му в *in vitro* условия. При въвеждане на семена в контролирани условия се

изпита ефективността на различни стерилизиращи разтвори. Прилагана е методика за стрелизация с етилов алкохол и белина в различна концентрация и експозиция.

**Ключови думи:** *Asclepias tuberosa* L., медицински вид, стерилизация, *in vitro*.

## ВЪВЕДЕНИЕ

България е прочута с богатството си от диворастящи лечебни растения. Интензивното им събиране през последните години се налага да се обърне внимание за запазването им. Растителният вид *Asclepias tuberosa* L., обикновено наричан пеперуда или млечица, е многогодишен вид, срещащ се по скалисти гори (Астанджиев 1980, Георгиев, 1982, Кънчев 2009). Произходът на вида е от Северна Америка (American gardner 1997, Davis 1993, Miller 2003). В нашата страна поради студоустойчивостта си вирее много добре. Използва се в медицината като противовъзпалително, спазмолитично, естрогенно и отхрачващо действие (Warashina, 2009). Силно медоносно растение е и се използва като паша за пчели. Веднъж засаден на дадено място, не може да се мести. Размножава се предимно със семена (Ploegestra, 2015, Raynal, 1986). Нерегламентираното събиране на вида *Asclepias tuberosa* L. и податливостта му към гниене водят до намаляване на тази билка. Налага се проучването му в контролирани условия, за да се избегне изчезването на вида, и търсенето на ускорени темпове на размножаване. Прилагането на методите на тъканните култури дава възможност за получаване на голям брой идентични генетични копия.

Максималната производителност на вида *Asclepias tuberosa* L. се постига чрез определяне на оптимални условия на хранителната среда (Stimart, 1985, Zimmerman, 1986, Wyatt, 2004, Rajech, 2010).

От направената литературна справка се наблюдава че, въпреки големия интерес към вида *Asclepias tuberosa* L., развитието му в контролирани условия в нашата страна все още не е извършено.

Целта на настоящото проучване е проучване на възможността за въвеждане *in vitro* на вида *Asclepias tuberosa* L., както и изискванията му към хранителна среда за максимално размножаване на вида.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В експериментите за въвеждане на *in vitro* култури са използвани семената от вида *Asclepias tuberosa* L. Получени са в резултат от сътрудничество с Университета в Генуа (Giardini Botanici Hanbury).

При въвеждане на семена в контролирани условия се изпита ефективността на различни стерилизиращи разтвори. Прилагана е методика за стерилизация с етилов алкохол и белина в различна концентрация и експозиция:

1. 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH за 5 мин.;
2. 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH за 1 мин.; 40% белина (съдържаща 5% активен хлор) за 5 мин.;
3. 60% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH за 1 мин.; 30% белина (съдържаща 5% активен хлор) за 10 мин.;
4. 50% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH за 3 мин.; 20% белина (съдържаща 5% активен хлор) за 15 мин.

След стерилизация на семената са пренесени за развитие в хранителна среда Murashige-Skoog (1962). Като въглехидратен източник е използвана захароза (30 g/l), а за втвърдител - агар (7,0 g/l) с рН на средата 5,6. Регулирането ѝ е извършено с 1N КОН преди автоклавиране. Стерилизацията се извършва за 30 min при 120°C и налягане 0,9 atm. Отглеждането на експлантите в етапите на изпитване се осъществи в камера с денонощни колебания на температурата 22±6°C и на влажност 25-60%. Фотопериод: 16 часа тъмнина и 8 часа светлина с осветление 3000 lx.

## РЕЗУЛТАТИ

Обеззаразяването на изходния материал на вида *Asclepias tuberosa* L. за микроразмножаване *in vitro* е от важно значение за предстоящото проучване. Използвайки различни варианти на стерилизация на вида е с цел максимално запазване жизнеността на изходните експланти. Влиянието на вариантите на стерилизиращия агент върху броя на получените стерилни култури е проследено при развитие на семената върху основна хранителната среда Murashige & Skoog (1962) без добавени растежни регулатори.

От извършения експеримент с експланти от вида *Asclepias tuberosa* L. с различни концентрации на стерилизиращия агент в първите пет дни от залагане на опита се наблюдава 20% на замърсяване на всичките варианти. Причината да се получат тези идентични резултати най-вероятно се дължи на необходимостта от по-висока концентрация и експозиция на стерилизиращия агент. На десетия ден от залагане на опита се наблюдават разграничащи се резултати спрямо първото отчитане. Най-висок процент замърсени семена има във втория вариант – 37% с 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH за 1 мин. и 40% белина за 5 мин. Високият процент замърсени семена най-вероятно се дължи на ниската експозиция на стерилизиращия агент.

Усилията, които се положиха при въвеждане в *in vitro* условия на вида *Asclepias tuberosa* L., не доведоха до положителен резултат във вариант трети - 60% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH за 1 мин. и 30% белина за 10 мин. На 15-ия ден от залагане на опита се наблюдава пълно замърсяване на семената. То може да се дължи на ендегенна зараза, в която участват по-голям брой микроорганизми, а това от своя страна води до по-големи трудности при избора на детергент и при определянето на продължителността на използването му.

На 30-я ден от залаган най-висок процент получена чиста култура от вида *Asclepias tuberosa* L. се отчита в четвърти вариант от залагане на опита (снимка 1). В този вариант процентът на стерилизиращите агенти е нисък, но експозицията е най-висока от четирите заложи на опита.



Снимка 1. Получена чиста култура на вида *Asclepias tuberosa* L.

## ИЗВОДИ

В резултат на експериментите за въвеждане в *in vitro* култура на семена от вида *Asclepias tuberosa* L. се получи стабилно размножаваща се култура във вариант четвърти с участието на 50% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH за 3 мин. и 20% белина (съдържаща 5% активен хлор) за 15 мин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Астанджиев, Н., Перспективни лекарствени растения, 1980.
2. Георгиев, Г., Т. Костова, Отглеждане на лекарствени растения, Земиздат 1982.
3. Кънчев, Цв., Размножаване и събиране на билки, 2009.
4. American Gardener, 75 great plants for American gardens. 1997, Vol. 76 Issue 3, 26 Color Photographs.
5. Davis, Rosalie H., Butterfly weed., Horticulture. 1993, Vol. 71, Issue 7, p. 88. 3 Color Photographs.
6. Miller, Carol Bishop, Wildflower Advocates, Horticulture. 2003, Vol. 100 Issue 5, p. 24-76.
7. Ploegstra, Jeffrey, de Ruyter, Brittany, Jelsma, Tony Population Genetic Structure of *Asclepias Tuberosa* In Northwest Iowa: A Comparison Within and Between Remnant Prairies and Commercially Available Seed. Journal of the Iowa Academy of Science. 2015, Vol. 122 Issue 1-4, p. 1-6.
8. Stimart Denis, Commercial micropogation of florist flower crops., Tissue culture as a plant production system for horticultural crops, Conference on tissue culture a plant production system for horticultural crops., Betsville, 1985, 301-315.
9. Rajech Auropa, Medical plant biotechnology, 2010.
10. Raynal, Dudley J., Klemow, Kenneth M., Demography of the polycarpic herbaceous perennial *Asclepias tuberosa*(butterflyweed) in a chronically unproductive site, American Midland Naturalist. 1986, Vol. 115 Issue 2, p. 374.
11. Wyatt, Robert, The reproductive biology of *Asclepias tuberosa*, Factor determining fruit set, New Phytologist, 2004, Vol. 88, Issue 2, p. 375-385.
12. Warashina, Tsutomu. Noro, Tadataka, 8,14-Secopregnane glycosides from the aerial parts of *Asclepias tuberosa*, Phytochemistry. 2009, Vol. 70 Issue 10, p1294-1304. 11 p.
13. Zimmerman, R. H. et al. (eds), Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops. 0 1986. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 302.