

Debreceni Egyetem
Tudományegyetemi Karok
Természettudományi és Technológiai Kar
Növényteni Tanszék



Kárpát-medencei *Crocus* fajok szövettenyésztése: Új eredmények

Szakdolgozat

Készítette:
Pabar Sándor Attila
III. éves Biológia BSc

Témavezető:
Dr. Máthé Csaba egyetemi adjunktus

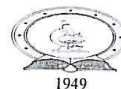
Debrecen
2014



DEBRECENI EGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS TECHNOLÓGIAI KAR

UNIVERSITY OF DEBRECEN • FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY



NYILATKOZAT

(A DE TTK hallgatóinak diplomadolgozatához/szakdolgozatához)
Alulírott KÁR PÁR-SAMPOR ATTILA (Neptun kód: CR7D13) jelen
nyilatkozat aláírásával kijelentem, hogy a

KÁR PÁR-MEDENCEI CROCUS TAJOK SZÖVEGNYELVÉSZÉSE ÚJ EREDMÉNYEK

című diplomadolgozat / szakdolgozat (felesleges törölnöd) – a továbbiakban: dolgozat –
önálló munkám, a dolgozat készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi
LXXVI. tv. szabályait, valamint az Egyetem által előírt, a dolgozat készítésére vonatkozó
szabályokat, különösen a hivatkozások és idézések tekintetében¹.

Kijelentem továbbá, hogy a dolgozat készítése során az önálló munka tekintetében a
témavezetőt nem tévesztettem meg. Meg nem engedett segítséget nem vettem igénybe, a
dolgozatot más oktatási intézményben szakdolgozatként vagy diplomamunkaként korábban
nem nyújtottam be.

Jelen dolgozat aláírásával tudomásul veszem, hogy amennyiben bizonyítható, hogy a
dolgozatot nem magam készítettem, vagy a dolgozattal kapcsolatban szerzői jogsértés ténye
merül fel, illetve a dolgozatot korábban más oktatási intézményben is benyújtottam, úgy a
Debreceni Egyetem megtagadja a dolgozat befogadását és ellenem fegyelmi eljárást indíthat.
A dolgozat befogadásának megtagadása és a fegyelmi eljárás indítása nem érinti a szerzői
jogsértés miatti egyéb (polgári jog, szabálysértési jog, büntetőjogi) jogkövetkezményeket.

Debrecen, 2014. év NOVEMBER hó 12. nap

R. S. M.
Hallgató aláírása

Alulírott témavezető kijelentem, hogy az ezúton benyújtott szakdolgozat / diplomamunka az
én szakmai irányításommal, a jelölttel folytatott rendszeres szakmai konzultáció mellett
készült, a hallgató önálló munkáját tükrözi. A dolgozatot áttekintettem, a záró- vizsgán
történő védelemre bocsátásra megfelelőnek és a könyvtár honlapjára feltölthetőnek találtam.

Debrecen, 2014. év NOVEMBER hó 12. nap

F. K. C.
(témavezető aláírása)

DE TTK, NÖVÉNYTANI TANSZÉK Tanszék

¹ 1999. évi LXXVI. tv. 34. § (1) A mű részletét – az átvéő mű jellege és célja által indokolt terjedelemben és az
eredetileg híven – a forrás, valamint az ott megjelölt szerző megnevezésével bárki idézheti.

36. § (1) Nyilvánosan tartott előadások és más hasonló művek részletei, valamint politikai beszédek
tájékoztató céljára – a cél által indokolt terjedelemben – szabadon felhasználhatók. Ilyen felhasználás esetén a
forrást – a szerző nevével együtt – fel kell tüntetni, ha csak ez lehetetlennek nem bizonyul.

Tartalomjegyzék

Rövidítések:.....	4
1. Bevezetés és célkitűzés.....	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A növényi In vitro tenyészetek és jelentőségük az alap- és az alkalmazott kutatásokban.....	5
2.2. A növényi szövettenyészetek, és felhasználásuk a konzervációbiológiában.....	5
2.3. A Crocus fajok szövettenyésztése.....	9
2.4. A Crocus sativus legfontosabb metabolitjai.....	11
3. Anyag és módszer	14
3.1. A szövettenyészetek indukciója.....	14
3.2. A Crocus magvak csíráztatása axenikus körülmények között.....	14
4. Eredmények és megbeszélésük.....	16
4.1. Stabil kallusz vonalak előállítása	16
4.2. A Crocus magvak csíráztatása axenikus körülmények között.....	20
5. Összefoglalás	24
6. Köszönetnyilvánítás	24
7. Irodalomjegyzék	25

Rövidítések:

Auxinok: IAA - indolecetsav; IBA - indolvajsav; NAA - α -naftilecetsav; 2,4-D - 2,4-diklór-fenoxiecetsav;

Citokininek: BA - benzil-amino-purin; KN - kinetin; ZN – zeatin;

Egyéb növényi hormonok: ABA - abszcizinsav; GA₃ - gibberellinsav;

A kísérletek során alkalmazott táptalaj: MS* - 0,8 % agarral, Gamborg vitaminnal (Gamborg és mtsai, 1968) és 2 % szacharózzal kiegészített Murashige - Skoog alaptáptalaj (1962);

suc - szacharóz;

1. Bevezetés és célkitűzés

A *Crocus sativus* a világ egyik legértékesebb fűszernövénye, ételek, italok ízesítésére színezésére használják a bibeszálait (Negbi, 1999). Az Ókorban is nagyra becsült fűszernövény volt. Manapság az gyógynövénykénti felhasználása egyre terjed ill. kutatják a többi *Crocus* faj esetében is. A népi orvoslásban használták nyugtatóként, terhességmegszakítóként és emésztésjavítóként, persze a túladagolására is figyelni kell, mert mérgezési tüneteket és súlyos esetben halált okozhat. Bibéjében 3 fő hatóanyag a crocin, picrocrocin és a safranal található, amelyeket daganatos betegségek kezelésére, vérnyomás csökkentésre és reuma ellen használnak (Nair és mtsai., 1991; Escribano, 1996; Abe és Saito, 2000; Magesh és mtsai, 2006) .

A *Crocus sativus* 24 kromoszómás triploid genomja miatt steril növény, csak vegetatív úton szaporodik, más fertilis *Crocus* fajok hibridizációjából ered (Negbi, 1999; Plessner és Ziv, 1999).

A sáfrányt mediterrán országokban termesztik, még ma is kézzel gyűjtik be, utána szárítják és még egyéb munkafolyamatok is kellenek nagyon kevés sáfrány begyűjtéséhez, hektáronként csak 7-11 kilogramm a hozam, ezért is olyan drága (Negbi, 1999). Emiatt nő az érdeklődés a várhatóan költséghatékonyabb *in vitro* szövettenyésztési eljárások felé, amivel mi is foglalkozunk. Már eddig is sok publikáció született a témában, úgy mint a szövettenyésztési, növényregenerálási és hatóanyag termelési technikák. Illetve ezeket kidolgozták még más *Crocus* fajokra is. A *Crocus sativus in vitro* tenyésztői is képesek hatóanyagokat és enzimeket is termelni, ezeket pedig a gyógyászatban is használják. Célkitűzéseink között szerepel, hogy több kárpát-medencei *Crocus* fajra dolgozzunk ki szövettenyésztési eljárást és

szövetbank létrehozása, mely konzervációbiológiai célokat is szolgál az alábbi fajoknál: *Crocus banaticus*, *Crocus heuffelianus*, *Crocus tommasinianus*, *Crocus scepusiensis*, *Crocus vittatus*.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A növényi *In vitro* tenyészetek és jelentőségük az alap- és az alkalmazott kutatásokban

A növényi szövettenyésztési eljárások relatíve költséghatékonyak, nagy mennyiségben állítható elő olyan növény, ami ivarosan nehezen szaporítható.

Lehetséges vele pollen inkompatibilitás megkerülése, transzgénikus növények létrehozása, vírusmentes tenyészetek és növények előállítása, szekunder metabolitok termelése, fajok, fajták konzerválása, genetikai variabilitás indukciója.

A növényi szövettenyésztési eljárásoknak különböző típusai vannak, úgymint sejtszuszpenzió, protoplaszt, kallusz tenyészetek, *in vitro* növényregenerálás, mikropropagáció. Elve, hogy az élő növényi sejtek megfelelő körülmények között dedifferenciálódnak, ezzel pedig totipotenssé válnak és sebszövetet (kalluszt) képeznek (Dudits és Heszky, 2003). Sok osztódó, differenciálatlan sejtet tartalmazó szövetből érdemes indulni, úgymint kambális merisztéma szövet és proembrió. Differenciálódott szövetből kallusz indukcióval dedifferenciálódott szövetet kell előállítani. Ezt sebzéssel és hormonokkal érjük el (Dudits és Heszky, 2003). A kimetszett növényi szövetből képződött primer kalluszt tenyészetet több passzálassal felszaporítjuk és stabilizáljuk.

Növényregenerálás során kalluszból embriogenezissel szomatikus embrió jön létre, melyből növény fejlődik, vagy organogenezissel, ahol hajtás, ill. gyökér fejlődik (Dudits és Heszky, 2003).

2.2. A növényi szövettenyészetek, és felhasználásuk a konzervációbiológiában

A konzervációbiológia vagy természetvédelmi biológia új szintetikus jellegű tudomány, mely több természet- és társadalomtudomány eredményeit és elveit használja a biológiai diverzitás fenntartása érdekében. Feladatai és témakörei közé tartozik a fajok védelme, védett területek

tervezése, élőhely-rekonstrukció, ökoszisztéma védelem, ökológiai közgazdaságtan, környezeti etika.

A növényi szövettényészetek létrehozása az *ex situ* konzervációbiológiai módszerek közé tartozik. A gazdaságilag fontos, viszont veszélyeztetett fajok konzervációbiológiai kutatásait kiemelt figyelem övezi. Szaporító képleteiket begyűjtik, mesterséges körülmények között vizsgálják a magok fertilitását, ökológiai igényeiket és morfológiájukat fokozottan tanulmányozzák. Ritka fajokra –főleg abban az esetben, ha a gyógyászati célokra használt hatóanyagok hozamnövelése a cél- mikroszaporítási eljárásokat dolgoznak ki (1. táblázat). A módszerhez a mintákat a faj vagy adott populáció egyedeiből gyűjtik be. A mintákból kiindulva az egyedeket megsokszorozzák, regenerálják, vissztelepítik az élőhelyek helyreállítása érdekében (Heywood és Iriondo, 2003).

A gyógyszerek, ételek, italok, ruházatok alapanyagául szolgáló *Agave* genusz tagjai, melyek az amerikai endemikus veszélyeztetett fajok közé tartoznak (Valenzuela-Zapata, 1997 és Garcia-Mendoza, 1992, hiv. Ramirez-Malagon és mtsai, 2008). A *Spilanthes acmella* a gyógyszeripar fontos alapanyagai között van számon tartva (Ramsewak és mtsai, 1999, hiv. Saritha és Naidu, 2008). A *Harpagophytum procumbens* más néven az ördögcsáklya, hagyományos módon nem termesztethető költséghatékonyan (Van Haelen és mtsai, 1983 és Ernst és mtsai, 1988, hiv. Kaliamoorthy és mtsai, 2008). A reuma, bőrgyógyászati panaszokra, köhögéscsillapításra használt *Saussurea lappa*, szintén veszélyeztetett növény (Handa és mtsai, 1957, hiv. Arora és Bhojwani, 1989). A kígyómarás elleni gyógyszer alapanyaga a brazíliai *Mandevilla velutina* (Biondo és mtsai., 2003). Az *Aloe polyphylla* a Lesitho hegységben fordul elő és széleskörűen használt a gyógyászatban, ill. dísznövény is (Aubrey, 2002; Chukwujechwu és mtsai, 2002, hiv. Bairu és mtsai, 2007). Himalájából származik a *Picrohiza kurooa* (Thakur és mtsai, 1989, hiv. Chandra és mtsai, 2005), melynek indáiból és gyökeréből kivonatot készítenek, amit tüdőbetegségekre, gyomorpanaszokra alkalmaznak. (Hussain, 1984; Kirtikar és Basu, 1984, hiv. Chandra és mtsai, 2005). Álmatlanság, szorongás, magas vérnyomás kezelésére használatos az indiai fokozottan veszélyeztetett *Rauvolfia serpentina* (Ghani, 1998, hiv. Ray és Bhattacharya, 2008). A *Leucojum vernum* alkaloidjait vírusos és rákos megbetegedések kezelésére, illetve ezek mellett még az acetilkolin-észteráz gátló hatása miatt az Alzheimer-kór kezelésére is használatos (Gabrielsen és mtsai 1992, Pettit és mtsai, 1995, Heinrich, 2004).

Faj	explantátum	táptalaj	hormonösszetétel	morfogén válasz	hivatkozás
<i>Agave salmiana</i>	hajtáscsúcs	MS	0.1 mg l ⁻¹ IBA 1 mg l ⁻¹ BA	hajtássokszorozódás	Ramirez-Malagon és mtsai., 2008
<i>Agave duranguensis</i>	hajtáscsúcs	MS	0.01 mg l ⁻¹ IBA 1 mg l ⁻¹ BA	hajtássokszorozódás	Ramirez-Malagon és mtsai., 2008
<i>Spilanthes acmella</i>	levél	MS	4.0 mg l ⁻¹ BA + 0.2 mg l ⁻¹ KN + 0.2 mg l ⁻¹ NAA	hajtás keletkezik	Saritha és Naidu, 2008.
<i>Spilanthes acmella</i>	levél	MS	0.3 mg l ⁻¹ BA + 0.1 mg l ⁻¹ IAA	hajtásfejlődés	Saritha és Naidu, 2008.
<i>Spilanthes acmella</i>	hajtás	MS	1.0 mg l ⁻¹ IBA	gyökérvégződés	Saritha és Naidu, 2008.
<i>Harpagophytum procumbens</i>	nódusz	MS*	0.1 mg l ⁻¹ IAA + 5.0 mg l ⁻¹ KN	hajtássokszorozódás	Kaliemoorthy és mtsai., 2008.
<i>Saussurea lappa</i>	Csíralevél	MS	1 mg l ⁻¹ BA + 1 mg l ⁻¹ GA ₃	hajtás	Arora és Bhojwani, 1989
<i>Saussurea lappa</i>	hajtás	MS	1 mg l ⁻¹ NAA	gyökérvégződés	Arora és Bhojwani, 1989
<i>Mandevilla velutina</i>	szárnódusz	MS	0.1 mg l ⁻¹ BA.	hajtás	Biondo és mtsai., 2007
<i>Mandevilla velutina</i>	hajtás	MS/2	0,5 mg l ⁻¹ NAA	gyökeresedés	Biondo R és mtsai., 2007
<i>Aloë polyphylla</i>	csíra	MS	1.0 mg l ⁻¹ BA.	kallusz	Abrie AL és mtsai., 2001
<i>Aloë polyphylla</i>	kallusz	MS	3.0 mg l ⁻¹ BA	hajtás	Chukwujekwu és mtsai., 2003
<i>Aloë polyphylla</i>	hajtás	MS	hormonmentes	gyökér	Chukwujekwu és mtsai., 2003
<i>Leucojum vernum</i>	termés	MS	4 mg l ⁻¹ 2,4-D	kallusz	Pavlov és mtsai, 2007
<i>Leucojum vernum</i>	kallusz	MS	1,5 mg l ⁻¹ NAA + 2 mg l ⁻¹ BA	hajtás	Pavlov és mtsai, 2007
<i>Picrorhiza kurroa</i>	inda	MS	-	hajtásképződés	Chandra és mtsai, 2005
<i>Picrorhiza kurroa</i>	hajtás	MS	0,23 mg l ⁻¹ BA	hajtássokszorozódás	Chandra és mtsai, 2005

Faj	explantátum	táptalaj	hormonösszetétel	morfogén válasz	hivatkozás
<i>Picrorhiza kurrooa</i>	hajtás	MS	0,1 mg l ⁻¹ IBA	gyökeresedés	Chandra és mtsai, 2005
<i>Rauvolfia serpentina</i>	rügy	MS	-	hajtásfejlődés	Ray és Bhattacharya 2008
<i>Rauvolfia serpentina</i>	hajtás	MS	2 mg l ⁻¹ IBA	gyökeresedés	Ray és Bhattacharya 2008

1. táblázat Veszélyeztetett növények *in vitro* szaporítására kidolgozott eljárások:

2.3. A *Crocus* fajok szövettenyésztése

A *Crocus sativus* csak vegetatív úton szaporodik a hagymagumóival, triploid genomja miatt (más sáfrány fajok hibridje) csak steril virágjai vannak, ivaroson képtelen szaporodni. Gomba, bakteriális és vírus fertőzésnek vannak kitéve a földben lévő hagymagumók, emiatt csökken a növekedési képességük (Darvishi et al., 2007). *In vitro* úton viszont sterilen patogénmentesen lehet a növényt tömegesen előállítani (Plessner et al., 1999). Az inokulumok amiket a mikroszaporításhoz használunk csakis axenikus körülmények között tarthatók fenn. Sokszor a kallusz stádium kihagyásával, citokinin kezeléssel történik a növény mikroszaporítása. Az explantátumok lehetnek: különböző virágrészek, nádusz szövet, csúcs- és oldalrügy, de többnyire a hagymagumóból indulunk ki. A kivett növényi rész válaszreakcióját számos változó befolyásolja, úgymint a növény életkora, explantátumként használt szerv típusa, táptalaj összetétele, a begyűjtés ideje, a használt hormonok és azok aránya. Folyékony és agarral szilárdított táptalajt egyaránt alkalmaznak kallusz nevelésre és növényregenerálásra. Többször is beszámoltak különböző kutatások, hogy jobb növekedés érhető el, ha felére csökkentjük a táptalaj különböző ásványi összetevőinek a koncentrációját (Karamian & Ebrahimzadeh, 2001; Raja et al., 2007). A leggyakrabban használt táptalajok az MS (Murashige és Skoog, 1962), LS (Linsmaier és Skoog, 1965), N6 (Nitsch és Nitsch, 1969, hiv. Dodds és Roberts, 1985), W (White 1963, hiv. Dodds és Roberts, 1985) és a B5 (Gamborg és mtsai, 1968) voltak.

A szövettenyésztés különböző szakaszaiban és az elérendő válaszreakcióhoz különböző táptalajok hatásosak. A sáfrány *in vitro* kultúrákban leggyakrabban használt hormonok a citokininek: KN, BA, ZN, az auxinok: NAA, IAA, IBA és a 2,4-D, a GA3, az abszcizinsav, és az etilén voltak (Plessner et al., 1999). A sejtosztódásban szerepet játszó auxinok egy része szintetikus, másik fele pedig magában a szövetben termelődött. A koncentrációjától függ, hogy adott szövetben milyen válaszreakciót vált ki, a citokininnel együtt szükségesek a tenyészetek fenntartásában és fejlődésében. A citokininek aktiválják a sejtosztódást és a gibberellinnel és auxinnal ellentétben növelik az osztódószövetek működési idejét, ez pedig a sejtöregedést gátolja. A citokinin-auxin arány különböző választ vált ki a tenyészetekből: a magas citokinin - auxin arány a hajtásképződést segíti elő, fordítva pedig a kallusz és gyökérképződést vált ki. A citokininből, csakúgy mint az auxinból kis mennyiség szükséges a serkentéshez, nagy koncentráció esetén viszont pont az ellenkezőjét éri el és gátlást okoz (Plessner et al., 1999). Mára a GA3 gibberellinen kívül körülbelül még 50

gibberellin hatású vegyületről tudunk, ezek szerepe a sejtosztódás fokozásában és a fitohormonok és a jarovizáció hatását helyettesíti. A fitohormonok együtt, interakciók révén fejtik hatásukat, emiatt különböző stádiumokban (kalluszindukáláshoz, fenntartáshoz, organogenezishez) különböző hormonok és különböző arányok és koncentrációk bizonyulnak eredményesnek (Plessner et al., 1999).

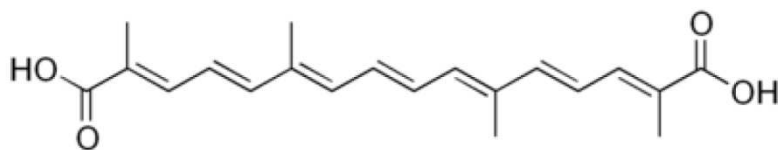
Az első *Crocus* mikroszaporítási kísérlet során *C. sativus* hagymagumóból kalluszt indukáltak, ezután sikerült a teljes növény regenerálása. A kísérlet során használt hormonok: auxinok az IAA és a 2,4-D voltak (Ding et al., 1979, cit. Ascough et al., 2009). Citokininnek (KN vagy ZN, 3-12 mg/l) és 2,4-D (1 mg/l). A táptalajra rátett explantátumokon először hajtásfejlődést figyeltek meg, míg az etilén (0,98 g/l) hatására hagymagumó növekedést és képzést váltott ki (Plessner et al., 1990, cit. Ascough et al., 2009). A *Crocus sativus* szövettenyésztés egyik oka a költséghatékonyság, emiatt a safranál, crocin, picrocrocín kivonás olcsóbb, mint hagyományos kézi termesztés esetén, viszont jelenleg a szövettenyésztetekben lévő növényi részek (főként a bibe- és bibeszálszerű struktúrákat használják erre a célra) hatóanyag tartalma jóval elmarad a hagyományosan termelt növények bibeszálaihoz képest, csupán tizede (Sarma et al., 1991). A crocin kihozatal növelésére azonban kidolgoztak egy olyan eljárást, aminek első lépéseként a kalluszokat gyors osztódásra bírták NAA (0,2 mg/l) és BA (1 mg/l) jelenlétében. Második lépésben IAA-t (0,2 mg/l) és BA-t (1 mg/l) tartalmazó táptalajon tenyésztették tovább, amely fokozta a crocin termelést (Chen et al., 2003).

C. cancellatus hajtásmerisztémáiból LS táptalajon ami KN-t (4 mg/l) és 2,4-D-t (1 mg/l) tartalmazott, embriogén kallusz képződött, ezekből pedig protoplasztokat izoláltak. Legjobban azok növekedtek, amiket Ca-alginát gyöngybe ágyaztak, 4-5 héttel később mikrokallusz képződést tapasztaltak. A sejt kultúrák 2 mg/l KN-t, 1 mg/l 2,4-D és 100 mg/l aszkorbinsavat tartalmazó MS táptalajon fejlődtek. Később megfigyelték, hogy a mikrokalluszokat tartalmazó Ca-alginát gyöngyökön 0,2 mg/l KN és 0,1 mg/l 2,4-D jelenlétében, feles erősségű MS táptalajon történő inkubálást követően embriogén kalluszok jelentek meg, majd 25 mg/l GA3 hozzáadását követően elkezdtek csírázni. A teljes növény regenerálása 1 mg/l BA-t és 1 mg/l NAA-t tartalmazó feles erősségű MS táptalajon volt megfigyelhető (Karamian & Ebrahimzadeh, 2001). LS táptalajon, ami 4 mg/l NAA-t és 4 mg/l BA-t vagy 4 mg/l kinetint és 1 mg/l 2,4-D-et tartalmazott. *C. sativus*, *C. cancellatus*, *C. michelsonii* és a *C. caspius* hajtásmerisztémákat tenyésztettek. A szomatikus embriogenezis ezeknél a fajoknál különböző időben történt meg. Az 1 mg/l abszcizinsavat tartalmazó, feles erősségű MS táptalajra helyezve őket a szomatikus embriók fejlődésének különböző szakaszait lehetett megfigyelni.

Az embriókat MS táptalajon, 25mg/l GA3 jelenlétében csíráztatták. A teljes növény regenerálása érdekében a kicsírázott embriókat 1 mg/l NAA és 1 mg/l BA jelenlétében szintén feles erősségű MS táptalajra helyezték. A kísérletet 16/8 órás fényperiódusok mellett és 20 °C-on végezték (Karamian, 2004).

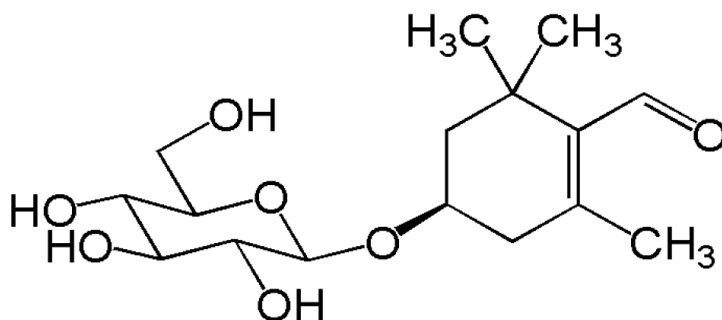
2.4. A *Crocus sativus* legfontosabb metabolitjai

A *Crocus sativus* főként tanulmányozott metabolitja a crocin, picrocrocin és a safranal. A picrocrocinból kettő picrocrocin molekula mellett keletkezik a crocin, ami zsírban és vízben egyaránt oldódó karotinoid vegyület, ami a színért felelős, emellett depresszió-, rákellenes és antioxidáns hatású (Gonda et al., 2012).



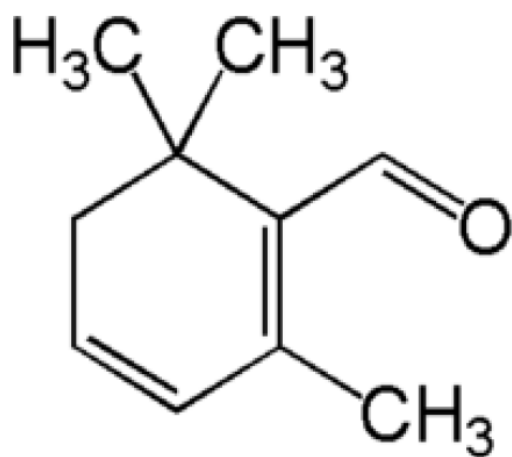
1. ábra Crocin szerkezeti képlete

A picrocrocinból keletkezik a picrocrocin, ez felel a sáfrány jellegzetesen keserű ízéért. Egyéb összetevők (pl: flavinok), amik csak alacsonyabb arányban találhatóak többnyire a picrocrocinhoz kapcsoltnak jelen. A picrocrocin anyagcsere során alakul át safranallá, ami a sáfrány jellegzetes illatát okozza (Gonda et al., 2012).



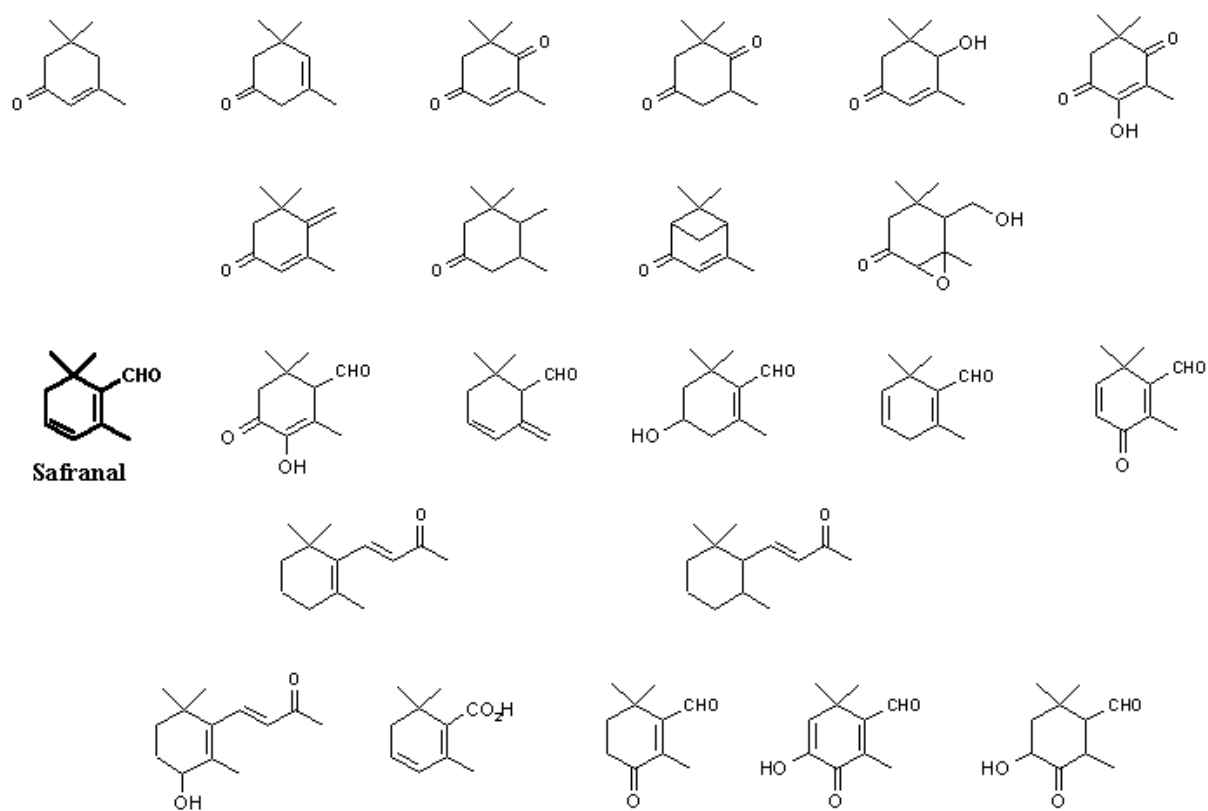
2. ábra Picrocrocin szerkezeti képlete

A picrocrocin hidrolíziséből safranal és glükóz keletkezik. A sáfrány jellegzetes illatát okozza és a picrocrocin mellett befolyásolja az ízt is. Hatásai közé tartozik a görcsoldó-, antioxidáns hatás, illetve GABA receptor stimuláló.



3. ábra Safranal szerkezeti képlete

A safranal kutatása további illékony komponensek megtalálására vezetett.



4. ábra A *Crocus sativus* további megismert illékony komponensei

További említésre méltó komponens a riboflavin, azaz a B2 vitamin, mely a szervezet energiatermeléséhez esszenciális anyag. Vízben oldódó vegyület, könnyen felszívódik. A vérképzésben, légzési folyamatokban, antitesttermelésben, növekedésben és szaporodásban, a zsírok, szénhidrátok és fehérjék lebontásában vesz részt és tölt be, elengedhetetlen feladatkört. Ezeken kívül az egészséges bőr, haj és köröm megőrzésében és a pajzsmirigy szabályozásában is fontos.

3. Anyag és módszer

3.1. A szövettenyészetek indukciója

A *Crocus sativus* és *C. cancellatus* mikroszaporításra kidolgozott szakirodalom felhasználásával (Plessner és Ziv, 1999; Bhagyalakshmi és mtsai, 1999; Raya és Hassan, 2001; Yohong és mtsai 2002; Chen és mtsai 2003a; Darvishi és mtsai, 2006) 2007-ben indította a tenyészeteket Demeter Zita. A szövettenyészetek indítása többlépcsős folyamat. Először növényi részek (explantátumok) felületét sterilizzük az alábbi módon. Az explantátumot izoláljuk a növényből és megmossuk. A további lépéseket steril fülke alatt végezzük. Az explantátumokat 70%-os alkoholba mártjuk kb. fél percre utána 3-szor 10 percre 20%-os Domestos-ban fertőtleníttük, figyelve arra, hogy ne legyenek buborékok a felületén, mert ott túlélhetnek a mikrobák. Majd 3-szor 5 percig steril desztillált vízzel öblítjük le róla a fertőtlenítő oldatot. A lefertőtlenített explantátumot feldaraboljuk, felületi sérüléseket okozunk rajta a kallusz képződéshez és táptalajra helyezzük őket, főként hagymagumókból érdemes a tenyészeteket indítani. A használt táptalaj Murashige és Skoog alaptáptalaj (1962) ami ki lett egészítve 0,8% Difco-agarral, Gamborg vitaminnal (Gamborg és mtsai, 1968) és 2% szacharózzal és auxint és citokininint adtunk hozzá különböző arányban. Erre a célra a magas auxin/ alacsony citokinin koncentrációjú táptalajt találtuk a legalkalmasabbnak. A tenyészeteket 14/10 óra fény/sötét és 22+–2°C/18+–2°C fény- és hőmérséklet-perióduson neveltük hőlég-sterilizett petricsészékben. Fényen történő nevelés esetén, a fényerő 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ volt. De később lesötétített polcokra raktuk, mert jobb növekedést tapasztaltunk.

3.2. A *Crocus* magvak csíráztatása axenikus körülmények között

A magvakat axenikus környezetben neveltük és a belőlük fejlődött csírákat explantátumként alkalmaztuk kalluszindukcióhoz. A következő fajok magjait használtuk fel: *C. banaticus*, *C. heuffelianus*, és *C. scepusiensis*. A magvak 2007 júniusában kerültek begyűjtésre. Egy részük 1 hónapig 4°C-on pihent, a magok másik felét szobahőmérsékleten pihentettük. 21 napot követően felületi sterilizésen estek át sterilfülke alatt.

A sterilizálás a következő módon zajlott. A magvakat 30 percre domestos 10%-os oldatába helyeztük, majd 3-szor 10 percig steril desztillált vízzel mostuk le róla a fertőtlenítőszer.

A felületi sterilizálás után, a hűtött és kontroll magvak felét MS* táptalajra helyeztük, a másik részüket pedig 12 órára $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ($1,5 \text{ }\mu\text{M}$) GA_3 -t tartalmazó folyékony MS*-ban áztattuk, ami után szintén szilárd MS* táptalajra helyeztük őket. A táptalajra helyezett magvakat 15°C -on, sötétben, hőlégtér-sterilizált petricsészékben tároltuk. Két hét után mind a 4 csoport felét $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ($2,2 \text{ }\mu\text{M}$) BA és $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ($2,5 \text{ }\mu\text{M}$) NAA hormon-összetételű MS* táptalajra helyeztük. Fél év után az MS*-n hagyott magvakat 25 mg l^{-1} ($72,5 \text{ }\mu\text{M}$) GA_3 tartalmú MS*-ra (Raya és mtsai, 2001) ültettük át.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1. Stabil kallusz vonalak előállítása

Több fajnál is sikerült stabil kallusz vonalakat létrehozni a fenti protokollok és szakirodalom alapján.

Crocus banaticus, aminek származási helyei Szováta (Románia, Maros megye) és Várasfenes (Románia, Bihar megye). Többszöri átoltással sikerült őket stabilizálni. MS* táptalajon neveltük őket, az alább felsorolt auxin, citokinin hormonokat adva hozzájuk.

-10mg/l NAA, 1mg/l BA

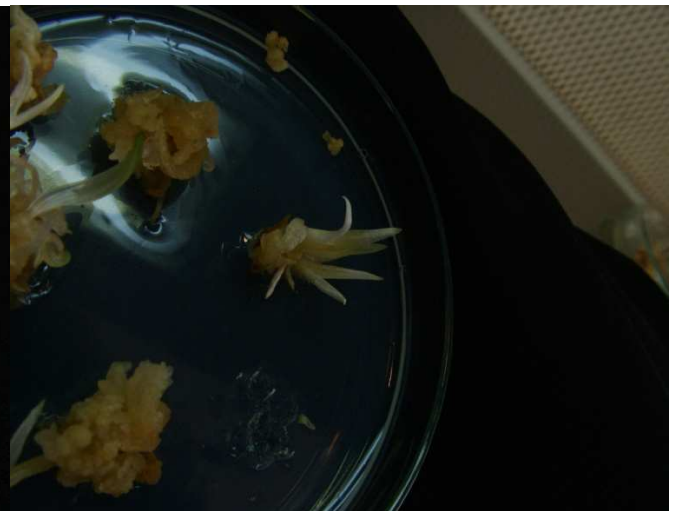
-5mg/l NAA, 5mg/l BA

-5mg/l NAA, 1mg/l BA

-1mg/l IBA, 5%cukor



5. ábra *Crocus banaticus* (Várasfenes) 10mg/l NAA, 1mg/l BA, MS* táptalaj



6. ábra *Crocus banaticus* (Szováta) 5mg/l NAA, 5mg/l BA, MS* táptalaj



7. ábra *Crocus banaticus* (Várasfenes) 5mg/l NAA, 1mg/l BA, MS* táptalaj



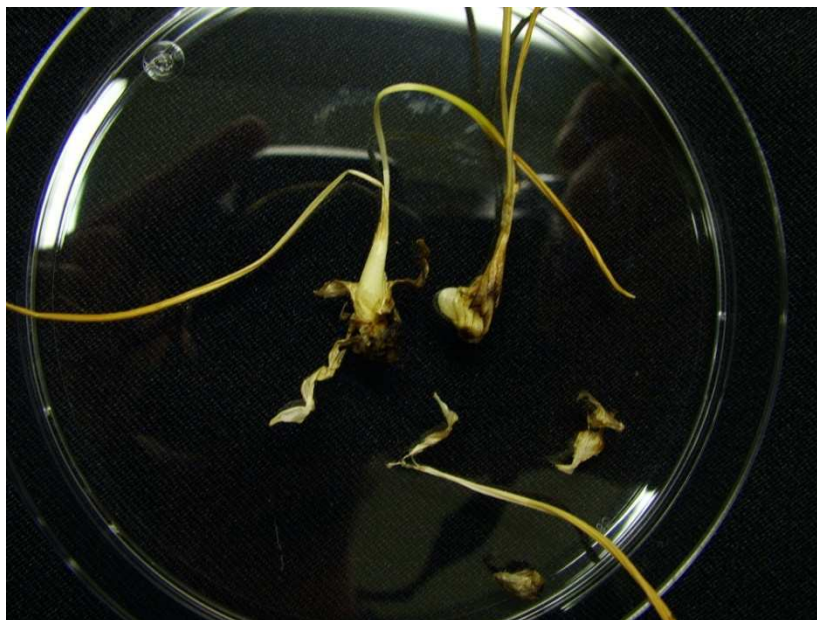
8. ábra *Crocus banaticus* (Szováta) 1mg/l IBA, MS* 5%-os cukortartalmú táptalaj

A szovátai *C. banaticus* tenyészetek embriogének voltak, szomatikus embriók keletkezését és fejlődését mutattuk ki (9. ábra).



9. ábra *Crocus banaticus* (Szováta) 5mg/l NAA, 5mg/l BA, MS* táptalaj

Crocus heuffelianus Származási helyei Ukrajna Pósháza és Románia Radnalajosfalva. 10mg/l NAA, 1mg/l BA –t tartalmazó MS*, és 1mg/l IBA, 5% suc-t tartalmazó MS* neveljük őket, kalluszt és hagymagumót hoztak létre. A *C. heuffelianus* kalluszok embriogének voltak (Demeter és mtsai, 2010).



10. ábra *Crocus heuffelianus* (származási hely: Radnalajosfalva), 1mg/l IBA, 5% suc. Az embriogén kalluszokból regenerált növényeken fejlődő hagymagumókat látjuk.

Crocus tommasianus származási helye Gyulaj, a Mecsek környékén. Lassan növekvő, fehér kalluszokat produkált, 10mg/l NAA 1mg/l BA és 5mg/l NAA 1mg/l BA tartalmú táptalajon neveltük őket.



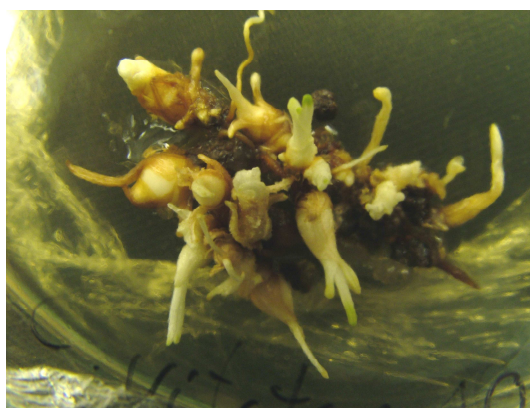
11. ábra *Crocus tommasianus*
10mg/l NAA, 1mg/l BA, MS*
táptalaj



12. ábra *Crocus tommasianus* 5mg/l
NAA, 1mg/l BA, MS* táptalaj

A *C. tommasianus* kalluszokon organogenezist detektáltunk.

Crocus vittatus-t 1mg/l IBA és 5% suc.-on tartva teljes növényeket, rajtuk hagymagumókat produkál. Mivel a kallusz stádium megkerülésével sikerült növényeket regenerálni, ezt mikroszaporításnak tekinthetjük.



13. ábra. *C. vittatus*,
mikroszaporított növénykék,
hagymagumókkal

A *Crocus sativus*-t számos táptalajon sikerült eredményesen fenntartani. A legtöbb tenyészet jól fejlődő kallusz tenyészetet produkált. 1mg/l IBA, 5% szacharózon erőteljes növekedés volt jellemző, gyökerek, hagymagumók, valamint hajtások is keletkeztek.

-10mg/l NAA, 1mg/l BA

-5mg/l NAA, 1mg/l BA

-4mg/l NAA, 1mg/l BA

-2mg/l NAA, 0.5mg/l BA

-2mg/l IAA, 0.5mg/l BA

-2mg/l IBA, 0.5mg/l BA

-1mg/l IBA

-0.05mg/l IBA, 0.5mg/l BA

-0.5mg/l IBA, 0.05mg/l BA

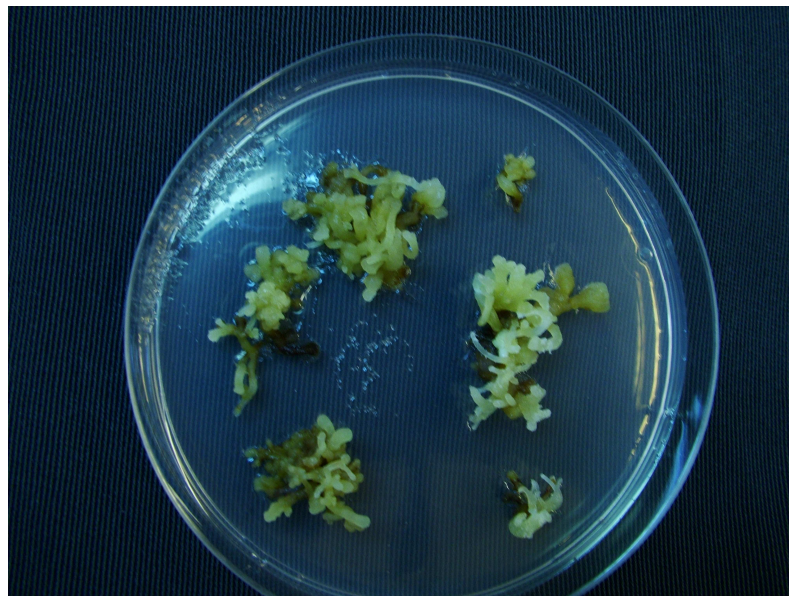
-1mg/l IBA, 5%cukor



14. ábra *Crocus sativus* 1mg/l IBA, 5% suc.

A *C. sativus* kalluszok embriogének voltak minden táptalajon (Székely, 2013).

Crocus scepusiensis Vernárról származik. Organogenezis figyelhető meg rajta, mely bibeszerű struktúrákat hozott létre.



15. ábra *Crocus scepusiensis* 2 mg/l NAA 4 mg/l BA MS*. Bibeszerű struktúrák.

-5mg/l NAA, 5mg/l BA

-5mg/l NAA, 1mg/l BA

-4mg/l NAA, 2mg/l BA

-2mg/l NAA, 4mg/l BA

-2mg/l NAA, 2mg/l BA

Hormon összetételű MS* táptalajon neveltük.

4.2. A *Crocus* magvak csíráztatása axenikus körülmények között

Csupán a magvak tizedét sikerült mesterséges körülmények között kicsíráztatni. Ebből a *Crocus heuffelianus* produkálta a háromnegyedét, a maradékot pedig a *Crocus scepusiensis*. A kísérlet elkezdése után 2 hónap múlva jelent meg az első csíranövény, ami nem fejlődött tovább és elhalt, ez *Crocus heuffelianus* volt. Ezután félévvel szintén a *C. heuffelianus* esetében csírázott a második mag, ennek a csíranövénynek is megállt a fejlődése, ezért gibberellinsavat tartalmazó alaptáptalajra helyeztük, de így is elhalt a növény.

A harmadik a *Crocus heuffelianus*-tól, a negyedik pedig a *Crocus scepusiensis*-től származó csírázó mag, egy év után történt meg. Ezek szintén megálltak a növekedésben és fejlődésben, ezért szűrásokkal megsebeztek őket és 10mg/l NAA és 1mg/l BA tartalmú MS* táptalajra

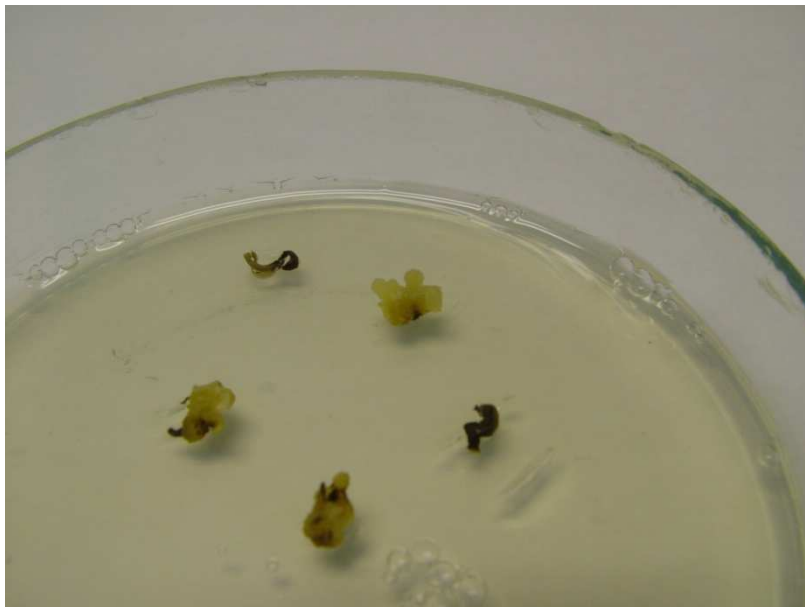
helyeztük őket. 2 és fél hónap után relatíve gyorsan növvő, élénksárga első generáció kalluszok képződtek, ezekből pedig életképes 2. és 3. generációs kalluszokat képeztünk. A magokra alkalmazott kezelést és ezek eredményét a 2. táblázat foglalja magába.

Faj	Származási hely	Mag hidegkezelés	Mag GA3 kezelés	Csírázás MS*-on
<i>Crocus heuffelianus</i>	Ukrajna: Pósaháza	-	-	-
			+	-
		+	-	-
			+	+
	Ukrajna: Sarján	-	+	-
		+	+	-
<i>Crocus banaticus</i>	Románia : Városfenes: Fenesi-völgy	-	-	-
			+	-
		+	-	-
			+	-
<i>Crocus scepusiensis</i>	Sl:Krivá	-	-	-
			+	-
		+	-	-
			+	-

2. táblázat. Magok csíráztatása, első kísérletsorozat.

Faj	Származási hely	Mag hidegkezelés	Mag GA3 kezelés	Csírázás 0,5mg/l NAA-on 0,5 mg/l BA
<i>Crocus heuffelianus</i>	Ukrajna: Pósháza	-	-	-
			+	-
		+	-	+
			+	+
	Ukrajna: Sarján	-	+	-
		+	+	-
<i>Crocus banaticus</i>	Románia: Városfenes: Fenesi-völgy	-	-	-
			+	-
		+	-	-
			+	-
<i>Crocus scepusiensis</i>	Sl:Krivá	-	-	-
			+	-
		+	-	-
			+	+

3. táblázat. Magok csíráztatása, második kísérletsorozat.



16. ábra *Crocus heuffelianus* 2.generációs kallusz 10 mg /l NAA, 1 mg/ l BA tartalmú MS* táptalajon.

Az első kísérletsorozatban a táptalajok nem tartalmaztak hormonokat, míg a másodikban 0,5mg/l NAA-t és 0,5 BA-t tartalmaztak a jobb csírázás segítése érdekében. Csak a *Crocus heuffelianus* és a *Crocus scepusiensis* csírázott a kísérletben szereplő fajok közül. Minden csírázott mag hidegkezelésben részesült. A csírázás 2 hónap és 1 év között valósult meg. A *Crocus heuffelianus* magok mind hormonmentes MS*-en, mind a hormont tartalmazó táptalajon csíráztak, de a GA3 jelenlétének nem volt hatása a hormonkezelt táptalajok esetében. A *Crocus scepusiensis* hormont tartalmazó talajon kezdett el csírázni és a csírázott magok hideg- és GA3 kezelésben is részesültek. Összességében a magok jobb csírázást mutattak hormont tartalmazó MS*-on, GA3 kezelés után.

5. Összefoglalás

A *Crocus banaticus*, *Crocus heuffelianus*, *Crocus tommasinianus*, *Crocus scepusiensis*, *Crocus vittatus* és a *Crocus sativus* fajokból sikeresen indítottunk és stabil kallusztényészeteket hoztunk létre. Ezáltal több kárpát-medencei faj van az *in vitro* gyűjteményünkben, amelyeket megőrizhetünk és későbbi kísérletekhez felhasználhatunk. Eltérő auxin-citokinin arányokat használva sikerült kalluszképzést indukálni, és a hormonarányon változtatva, differenciálódásra készíteni az explantátumként használt növényi részeket.

Crocus heuffelianus és *Crocus scepusiensis* magokat csíráztattunk auxin és citokinin hormonokat tartalmazó, illetve azoktól mentes MS* táptalajon. A magokat előzőleg hideggel és GA3-mal kezeltük. A kicsírázott magokból pedig stabil kalluszvonalakat hoztunk létre.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni Témavezetőmnek Dr. Máthé Csabának a segítséget és a szakmai tanácsokat a munkám során. A laboratóriumi munkámban rengeteg segítséget nyújtott és biztosították a jó hangulatot Resetár Anna, Riba Milán, Garda Tamás, Kovács István. Továbbá hálával tartozom a Növényteni Tanszék összes dolgozójának, köztük Dr. Vasas Gábor tanszékvezetőmnek.

Külön köszönet Családom és barátaimnak, a rengeteg támogatásért, tanácsért és, hogy amikor kellett a fejemre koppintottak.

7. Irodalomjegyzék

Abe K, Saito H (2000) Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation PHYTOTHERAPY RESEARCH 14: 149-152

Abrie AL, van Staden J (2001) Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. PLANT GROWTH REGULATION 33: 19-23

Arora R, Bhojwani SS (1989) *In vitro* -propagation and low-temperature storage of *Saussurea-lappa clarke,c.b.* - an endangered, medicinal plant PLANT CELL REPORTS 8: 44-47

Bairu MW, Stirk WA, Dolezal K , Van Staden J (2007) Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE 90: 15-23

Barabás S (2001) Taxonómiai vizsgálatok a *Crocus vernus* (Iridaceae) fajcsoport Kárpát-medencei fajain. PhD (doktori) értekezés. mscr. Pécsi Tudományegyetem, Pécs

Bhagyalakshmi N (1999) Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE 58: 205-211

Biondo R, Pereira AMS, Marcussi S, Pereira PS, Franca SC, Soares AM (2003) Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. BIOCHIMIE 85: 1017-1025

Biondo R , Souza AV, Bertoni BW , Soares AM , Franca SC , Soares Pereira AM (2007) Micropropagation, seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* Woodson. SCIENTIA AGRICOLA 64: 263-268

Chandra B, Plani LMS and Nandi SK (2006) Propagation and conservation of *Picrorhiza kurroo* Royle ex Benth.: an endangered Himalayan medicinal herb of high commercial value BIODIVERSITY AND CONSERVATION 15:2325–2338

Chen S, Zhao B, Wang X, Yuan X, Wang Y (2003a) Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare earth elements. BIOTECHNOLOGY LETTERS 26: 27-30

Chen S, Wang X, Zhao B, Yuan X, Wang Y (2003b) Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. BIOTECHNOLOGY LETTERS 25: 1235-1238

Chukwujekwu JC, Fennell CW, van Staden J (2003) Optimisation of the tissue culture protocol for the endangered *Aloe polyphylla*. SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY 68: 424-429

Darvishi E, Zarghami R, Mishani CA, Omid M, Sarkhosh A (2006) *In vitro* Production of Pathogen-free Plantlets via Meristem Culture in saffron (*Crocus sativus* L.). BIOTECHNOLOGY 5: 292-295, 2006

Demeter, Z., et al, (2010) Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*. PLANT CELL TISS ORG CULT 100:349–353

Dodds JH, Roberts LW (1985) Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press

Dudits, D, Heszky, L (2003) Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest.

Escribano J, Gonzalo-Luis A, Coca-Prados M (1996) Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. CANCER LETTERS 100: 23-30

Gabrielsen B., Monath TP, Huggins JW, Kefauver DF, Pettit GR, Groszek G, Hollingshead M, Kirsi JJ, Shannon WM, Schubert EM, DaRe J, Ugarkar B, Ussery MA, Phelan MJ (1992) Antiviral (RNA) Activity of Selected Amaryllidaceae Isoquinoline Constituents and Synthesis of Related Substances JOURNAL OF NATURAL PRODUCTION 55: 1569–1581.

Gamborg, OL, Miller, RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 50: 151-158.

Gonda S., Péter Parizsa., Gyula Surányi., Gyöngyi Gyémánt., Gábor Vasas (2012) : Quantification of main bioactive metabolites from saffron (*Crocus sativus*) stigmas by a micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) method

Heinrich M és Teoh HL (2004) Galanthamine from Snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local caucasian knowledge ETHNOPHARMACOL 92: 147–162

Heywood VH, Iriondo JM (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives BIOLOGICAL CONSERVATION 113: 321–335

Kaliamoorthy S, Naidoo G, Achar, P (2008) Micropropagation of *Harpagophytum procumbens*. BIOLOGIA PLANTARUM 52: 191-194

Karamian R, Ebrahimzadeh H (2001) Plantlet regeneration from protoplast-derived embryogenic calli of *Crocus cancellatus*. PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE 65: 115-121

Karamian R (2004) Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus*. PROCEEDINGS OF THE 1ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SAFFRON BIOLOGY AND BIOTECHNOLGY Book Series: ACTA HORTICULTURAE Issue: 650, pp: 253-259

Karamian R (2007) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Protoplast Culture of *Crocus pallasii* Subsp. *hausknechtii*. PAKISTAN JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES 10: 659-663

- Magesh V, Singh JPV, Selvendiran K, Ekambaram G, Sakthisekaran D (2006) Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY* 287: 127-135
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 15: 473-497
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 18: 100-127
- Nair Sc, B, Panikkar Kr (1991) Antitumor-activity of Saffron (*Crocus sativus*). *CANCER LETTERS* 57: 109-114
- Negbi M (1999) Saffron cultivation: past, present and future prospects in Negbi M (szerk), *SAFFRON CROCUS SATIVUS L.* Harwood Academic Publishers OPA (Overseas Publishers Association) N.V.-pp. 1-17
- Pavlov A, Berkov S, Courot E, Gocheva T, Tuneva D, Pandova B, Georgiev M, Georgiev V, Yanev S, Burrus M, Ilieva M (2007) Galanthamine production by *Leucojum aestivum* *in vitro* systems *PROCESS BIOCHEMISTRY* 42: 734–739
- Pettit GR, Pettit GR, Groszek G, Backhaus RA, Doubek DL and Barr J és mtsai (1995) Antineoplastic agents, 301. An investigation of the Amaryllidaceae genus *Hymenocallis* *NATURAL PRODUCTS* 58: 756–759
- Plessner O, Ziv M (1999) *In vitro* propagation and secondary metabolite production in *Crocus sativus* L., in Negbi M (szerk.), *SAFFRON CROCUS SATIVUS L.* Harwood Academic Publishers OPA (Overseas Publishers Association) N.V.-pp. 137-148
- Ramirez-Malagon R., Borodanenko A , Perez-Moreno L , Salas-Araiza MD, Nunez-Paleniuss HG, Ochoa-Alejo N (2008) *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE* 94: 201-207
- Ray A, Bhattacharya S (2008) Storage and plant regeneration from encapsulated shoot tips of *Rauvolfia serpentina* — An effective way of conservation and mass propagation *SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY* 74: 776–779
- Saritha KV, Naidu CV (2008) Direct shoot regeneration from leaf explants of *Spilanthes acmella*. *BIOLOGIA PLANTARUM* 52: 334-338
- Simon T (2003) A magyarországi edényes flóra határozója. NEMZETI TANKÖNYVKIADÓ, Budapest
- Székely V (2013) *Crocus sativus* szövettenyésztése és hatóanyagainak vizsgálata. DE TTK