

XXXII. OTDK Biológia Szekció

# **Kárpát-medencei *Crocus* fajok szövettényésztése és szekunder metabolit termelő képességük vizsgálata.**

Debreceni Egyetem  
Természettudományi és Technológiai Kar  
Növényteni Tanszék



Készítették:  
Pabar Sándor Attila  
III. évf. Biológia BSc  
Freytag Csongor  
III. évf. Biológia BSc

Témavezető:  
Dr. Máthé Csaba egyetemi docens

Debrecen  
2014.

TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....                                                                    | 3  |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....                                                                        | 4  |
| 2.1. A növényi <i>in vitro</i> tenyészetek és jelentőségük az alap- és az alkalmazott kutatásokban | 4  |
| 2.2. A növényi szövettényészetek, és felhasználásuk a konzervációbiológiában .....                 | 4  |
| 2.3. A <i>Crocus</i> fajok szövettényésztése.....                                                  | 7  |
| 2.4. A <i>Crocus sativus</i> legfontosabb metabolitjai.....                                        | 9  |
| 2.5. <i>Crocus sativus</i> antioxidáns és polifenol tartalma.....                                  | 10 |
| 3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....                                                                           | 11 |
| 3.1. A szövettényészetek indukciója .....                                                          | 11 |
| 3.2. A <i>Crocus</i> magvak csíráztatása axenikus körülmények között .....                         | 12 |
| 3.3. Metabolitok kimutatása .....                                                                  | 12 |
| 3.3.4.1. Peroxidáz és kataláz gélek mosása és a festés folyamata .....                             | 15 |
| 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.....                                                                | 16 |
| 4.1. Stabil kallusz vonalak előállítása .....                                                      | 16 |
| 4.2. A <i>Crocus</i> magvak csíráztatása axenikus körülmények között .....                         | 21 |
| 4.3. Összes polifenol- tartalom mérése .....                                                       | 22 |
| 4.4. Szabadgyök semlegesítő kapacitás.....                                                         | 22 |
| 4.5. Enzimaktivitás mérések.....                                                                   | 24 |
| 5. ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                             | 27 |
| 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....                                                                        | 27 |
| 7. IRODALOMJEGYZÉK.....                                                                            | 28 |

#### Rövidítések:

##### Auxinok:

IAA - indolecetsav;

IBA - indolvajsav;

NAA -  $\alpha$ -naftilecetsav;

2,4-D - 2,4-diklór-fenoxiecetsav;

ABTS - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil;

DPPH - 2,2'-azino- di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav;

SDS - nátrium-lauril-szulfát; PMSF fenil-metil-szulfonil -fluorid; PVP - polivinil-pirrolidon;

GAE - galluszsav ekvivalencia; EtOH - etanol; suc - szacharóz;

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

##### Citokininek:

BA - benzil-amino-purin;

KN - kinetin;

ZN – zeatin;

##### Egyéb növényi hormonok:

ABA - abszcizinsav;

GA3 - gibberellinsav;

## 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. drogja *Croci stigma*, a szárított bibeszál. A népi orvoslásban is használták, mint sedatívum, abortívum és mint emésztésjavító, erős hatása miatt, persze a túladagolására is figyelni kellett, mert mérgezési tüneteket és súlyos esetben halált okozhat; halálos adagja kb.~20g. Bibéjében 3 fő hatóanyag a crocin, picrocrocin és a safranal található, amelyeket daganatos betegségek kezelésére, vérnyomás csökkentésre és reuma ellen használnak, ezért kedvelt kutatási témának számítanak (Nair et al., 1991; Escribano, 1996; Abe et Saito, 2000; Magesh et al., 2006).

A *Crocus sativus* 24 kromoszómás triploid genomja miatt steril növény, csak vegetatív úton szaporodik, más fertilis *Crocus* fajok hibridizációjából ered:

*Crocus sativus* = *C. pallassii* x *C. orsinii* (Negbi, 1999; Plessner et Ziv, 1999). A sáfrányt a Mediterráneumban a 11. sz.-tól, 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* szövettenyésztéses 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*. Mivel a *Crocus*ok másodlagos metabolit termelése jelentős, így célkitűzésünk volt a védett fajok szövettenyésztéseinek polifenol tartalmának és antioxidáns enzim kapacitásának vizsgálata. Az antioxidáns kapacitással kapcsolatos eredményeink előzetes vizsgálatok, amelyek nem terjedtek ki minden szövettenyésztetre, és további megerősítésre szorulnak.

## **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 ivarosán 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 sejtszuspenzió, 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 et Heszky, 2003). Sok osztódó, differenciálatlan sejtet tartalmazó szövetből érdemes indulni, úgymint kambialis merisztéma szövet és proembrió. Differenciálódott szövetből kallusz indukcióval dedifferenciálódott szövetet kell előállítani. Ezt sebzéssel és hormonokkal érjük el (Dudits et Heszky, 2003). A kimetszett növényi szövetből képződött primer kallusztenyészetet több passzálassal felszaporítjuk és stabilizáljuk.

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

### **2.2. A növényi szövettenyészetek, és felhasználásuk a konzervációbiológiában**

A konzervációbiológia 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 szövettenyészetek 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, visszatelepítik az élőhelyek helyreállítása érdekében (Heywood et Iriondo, 2003). Példaként említhetjük a gyógyszerek, ételek, italok, ruházatok alapanyagául szolgáló *Agave* genusz tagjait, melyek az amerikai endemikus veszélyeztetett fajok közé tartoznak (Valenzuela-Zapata, 1997; Garcia-Mendoza, 1992, cit. Ramirez-Malagon et al., 2008). A *Spilanthes acmella* a gyógyszeripar fontos alapanyagai között van számon tartva (Ramsewak et al., 1999, cit. Saritha et Naidu, 2008). A *Harpagophytum procumbens* más néven az ördögcsáklya, hagyományos módon nem termesztethető költséghatékonyan (Van Haelen et al., 1983; cit. Kaliamoorthy et al., 2008). A reuma, bőrgyógyászati panaszokra, köhögéscsillapításra használt *Saussurea lappa*, szintén veszélyeztetett növény (cit. Arora et Bhojwani, 1989). A kígyómarás elleni gyógyszer alapanyaga a braziliai *Mandevilla velutina* (Biondo et al., 2003). Az *Aloe polyphylla* a Lesotho-i hegységekben (Dél-Afrika) fordul elő és széleskörűen használt a gyógyászatban, ill. dísznövény is (Aubrey, 2002; Chukwujechwu et al., 2002, cit. Bairu et al., 2007). Himalájából származik a *Picrorhiza kurroa* (Thakur et al., 1989, cit. Chandra et al., 2005), melynek indáiból és gyökeréből kivonatot készítenek, amit tüdőbetegségekre, gyomorpanaszokra alkalmaznak. (Hussain, 1984; Kirtikar et Basu, 1984, cit. Chandra et al., 2005). Álmatlanság, szorongás, magas vérnyomás kezelésére használatos az indiai fokozottan veszélyeztetett *Rauvolfia serpentina* (Ghani, 1998., Ray et 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 et al., 1992; Pettit et al., 1995; Heinrich, 2004).

| Faj                             | explantátum | táptalaj | hormonösszetétel                                                                   | morfogén válasz     | hivatkozás                   |
|---------------------------------|-------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| <i>Agave salmiana</i>           | hajtáscsúcs | MS       | 0.1 mg l <sup>-1</sup> IBA1 mg l <sup>-1</sup> BA                                  | hajtássokszorozódás | Ramirez-Malagon et al., 2008 |
| <i>Agave duranguensis</i>       | hajtáscsúcs | MS       | 0.01 mg l <sup>-1</sup> IBA1 mg l <sup>-1</sup> BA                                 | hajtássokszorozódás | Ramirez-Malagon et al., 2008 |
| <i>Spilanthus acmella</i>       | levél       | MS       | 4.0 mg l <sup>-1</sup> BA + 0.2 mg l <sup>-1</sup> KN + 0.2 mg l <sup>-1</sup> NAA | hajtás keletkezik   | Saritha et Naidu, 2008.      |
| <i>Spilanthus acmella</i>       | levél       | MS       | 0.3 mg l <sup>-1</sup> BA + 0.1 mg l <sup>-1</sup> IAA                             | hajtásfejlődés      | Saritha et Naidu, 2008.      |
| <i>Spilanthus acmella</i>       | hajtás      | MS       | 1.0 mg l <sup>-1</sup> IBA                                                         | gyökérképződés      | Saritha et Naidu, 2008.      |
| <i>Harpagophytum procumbens</i> | nódusz      | MS*      | 0.1 mg l <sup>-1</sup> IAA+ 5.0 mg l <sup>-1</sup> KN                              | hajtássokszorozódás | Kaliemoorthy et al., 2008.   |
| <i>Saussurea lappa</i>          | Csíralevél  | MS       | 1 mg l <sup>-1</sup> BA + 1 mg l <sup>-1</sup> GA3                                 | hajtás              | Arora et Bhojwani, 1989      |
| <i>Saussurea lappa</i>          | hajtás      | MS       | 1 mg l <sup>-1</sup> NAA                                                           | gyökérképződés      | Arora et Bhojwani, 1989      |
| <i>Mandevilla velutina</i>      | szárnódusz  | MS       | 0.1 mg l <sup>-1</sup> BA.                                                         | hajtás              | Biondo et al., 2007          |
| <i>Mandevilla velutina</i>      | hajtás      | MS/2     | 0,5 mg l <sup>-1</sup> NAA                                                         | gyökeresedés        | Biondo et al., 2007          |
| <i>Aloë polyphylla</i>          | csíra       | MS       | 1.0 mg l <sup>-1</sup> BA.                                                         | kallusz             | Abrie AL et al., 2001        |
| <i>Aloë polyphylla</i>          | kallusz     | MS       | 3.0 mg l <sup>-1</sup> BA                                                          | hajtás              | Chukwujekwu et al., 2003     |
| <i>Aloë polyphylla</i>          | hajtás      | MS       | hormonmentes                                                                       | gyökér              | Chukwujekwu et al., 2003     |
| <i>Leucojum vernum</i>          | termés      | MS       | 4 mg l <sup>-1</sup> 2,4-D                                                         | kallusz             | Pavlov et al., 2007          |
| <i>Leucojum vernum</i>          | kallusz     | MS       | 1,5 mg l <sup>-1</sup> NAA + 2 mg l <sup>-1</sup> BA                               | hajtás              | Pavlov et al., 2007          |
| <i>Picrorhiza kurroa</i>        | inda        | MS       | -                                                                                  | hajtásképződés      | Chandra et al., 2005         |
| <i>Picrorhiza kurroa</i>        | hajtás      | MS       | 0,23 mg l <sup>-1</sup> BA                                                         | hajtássokszorozódás | Chandra et al., 2005         |
| <i>Picrorhiza kurroa</i>        | hajtás      | MS       | 0,1 mg l <sup>-1</sup> IBA                                                         | gyökeresedés        | Chandra et al., 2005         |
| <i>Rauvolfia serpentina</i>     | rügy        | MS       | -                                                                                  | hajtásfejlődés      | Ray et Bhattacharya 2008     |
| <i>Rauvolfia serpentina</i>     | hajtás      | MS       | 2 mg l <sup>-1</sup> IBA                                                           | gyökeresedés        | Ray et Bhattacharya 2008     |

1. Táblázat

### 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, nódusz szövet, csúcs- és oldalrügy, de többnyire a hagymagumból 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 et Ebrahimzadeh, 2001; Raja et al., 2007). A leggyakrabban használt táptalajok az MS (Murashige et Skoog, 1962), LS (Linsmaier et Skoog, 1965), N6 (Nitsch et Nitsch, 1969, cit. Dodds et Roberts, 1985), W (White 1963, cit. Dodds et Roberts, 1985) és a B5 (Gamborg et al., 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 az ellenkezőjét érzük el és gátlást okoznak (Plessner et al., 1999).

Mára a GA3 gibberellinen kívül körülbelül még 50 gibberellin hatású vegyületről tudunk, ezek szerepe a sejtosztódás fokozása és a többi fitohormon, valamint a jarovizáció hatását helyettesítik. A fitohormonok együtt, interakciók révén fejtik hatásukat, emiatt különböző stádiumokban (kallusz indukáláshoz, fenntartáshoz, organogenezishez) különböző hormonok és különböző arányok és koncentrációk bizonyulnak eredményesnek (Plessner et al., 1999).

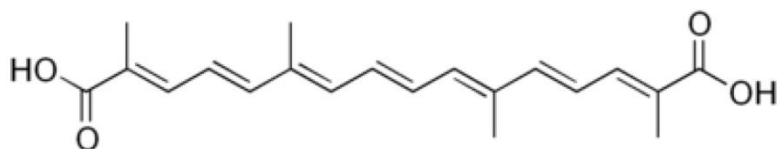
Az első *Crocus* mikroszaporítási kísérlet során *C. sativus* hagymagumóból kalluszt indukáltak, ezután sikerült a teljes növény regenerálása. A kísérlet során használt hormonok: auxinok az IAA és a 2,4-D (cit. Ascough et al., 2009), citokininek a KN vagy ZN ( $3-12 \text{ mg l}^{-1}$ ) voltak. A táptalajra rátett explantátumokon először hajtásfejlődést figyeltek meg, míg az etilén ( $0,98 \text{ g/l}$ ) hatására hagymagumó növekedést és képzést figyeltek meg (Plessner et al., 1990, cit. Ascough et al., 2009). A *Crocus sativus* szövettenyésztés egyik oka a költséghatékonyság, emiatt a safranal, crocin, picrocrocín kivonás olcsóbb, mint hagyományos kézi termesztés esetén, viszont jelenleg a szövettenyészetekben 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 ( $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ ) és BA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) jelenlétében. Második lépésben IAA-t ( $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ ) és BA-t ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) tartalmazó táptalajon tenyésztették tovább, amely fokozta a crocin termelést (Chen et al., 2003).

*C. cancellatus* hajtásmerisztémáiból LS táptalajon ami KN-t ( $4 \text{ mg l}^{-1}$ ) és 2,4-D-t ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) 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  $2 \text{ mg l}^{-1}$  KN-t,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D és  $100 \text{ mg l}^{-1}$  aszkorbinsavat tartalmazó MS táptalajon fejlődtek. Később megfigyelték, hogy a mikrokalluszokat tartalmazó Ca-alginát gyöngyökön  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  KN és  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D jelenlétében, feles erősségű MS táptalajon történő inkubálást követően embriogén kalluszok jelentek meg, majd  $25 \text{ mg l}^{-1}$  GA3 hozzáadását követően elkezdtek csírázni. A teljes növény regenerálása  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA-t és  $1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA-t tartalmazó feles erősségű MS táptalajon volt megfigyelhető (Karamian et Ebrahimzadeh, 2001). LS táptalajon, ami  $4 \text{ mg l}^{-1}$  NAA-t és  $4 \text{ mg l}^{-1}$  BA-t vagy  $4 \text{ mg l}^{-1}$  kinetint és  $1 \text{ mg l}^{-1}$  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.

Az  $1\text{ mg l}^{-1}$  abszcizinsavat tartalmazó, feles erősségű MS táptalajra helyezve őket a szomatikus embriók fejlődésének különböző szakaszait lehetett megfigyelni. Az embriókat MS táptalajon,  $25\text{ mg l}^{-1}$  GA3 jelenlétében csíráztatták. A teljes növény regenerálása érdekében a kicsírázott embriókat  $1\text{ mg l}^{-1}$  NAA és  $1\text{ mg l}^{-1}$  BA jelenlétében szintén feles erősségű MS táptalajra helyezték. A kísérletet 16/8 órás fényperiódusok mellett és  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végezték (Karamian, 2004).

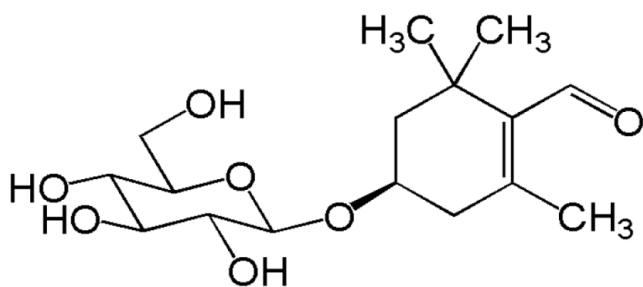
## 2.4. A *Crocus sativus* legfontosabb metabolitjai

A *Crocus sativus* leginkább tanulmányozott metabolitja a crocin (1. ábra), picrocrocin (2. ábra) és a safranal (3. ábra). A protocrocinból, két picrocrocin molekula mellett keletkezik a crocin, ami zsírban és vízben egyaránt oldódó karotinoid vegyület, ami a drog színért felelős, emellett depresszió-, rákellenes és antioxidáns hatású (Gonda et al., 2012).

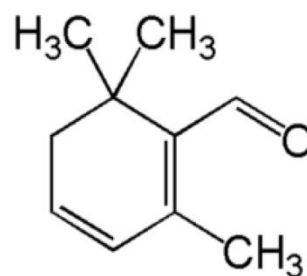


1. ábra Crocin szerkezeti képlete

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



2. ábra Picrocrocin szerkezeti képlete



3. ábra Safranal 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.

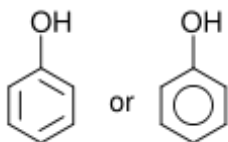
## 2.5. *Crocus sativus* antioxidáns és polifenol tartalma

Az élőlények biokémiai folyamatai során lezajló oxidációs folyamatok során káros szabad gyökök szabadulnak fel pl.: szinglet oxigén,  $H_2O_2$ - ezek termelődése stressz hatására fokozódhat, a szabadgyökök elsősorban a biológiai membránokat károsítják. Az antioxidánsok olyan molekulák melyek képesek csökkenteni vagy akár meggátolni a szubsztrát oxidációját. Többféle szerkezetű és funkciójú anyag tartozik ide úgy, mint aminosavak, zsírsavak, proteinek/enzimek, növényi metabolitok és ásványi anyagok pl fém ionok amelyek kelátokat képeznek (Matkowski, 2008.).

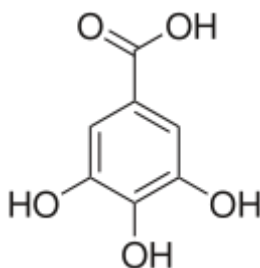
A növények oxidatív stressz tűrésében elsősorban az enzimek: kataláz, peroxidáz és szuperoxid-dizmutáz valamint szekunder metabolitok, mint polifenolok: flavonoidok, karotinoidok játszanak jelentős szerepet. Ilyen természetes antioxidáns az aszkorbinsav (5. ábra) vagy a galluszsav (6. ábra), de úgyszintén megfigyelték a crocin antioxidáns hatását is (Gonda et al., 2012).

A polifenolok olyan szerves vegyületek melyek általában a növényi szekunder metabolizmus során keletkeznek és közös jellemzőjük a nagyszámú fenol gyűrű (4. ábra) és különböző egyéb csoportok pl.: glikozidok. (Matkowski, 2008). A kataláz és a peroxidáz enzimaktivitás vizsgálat gélelektroforézissel történik (Sharifi et Ebrahimzadeh, 2009), a polifenolok és egyéb vegyületek „gyökfogó” képességét összpolicenol méréssel, ill. ABTS/DPPH szabadgyök gátlásának vizsgálatával állapítjuk meg. (Matkowski, 2008).

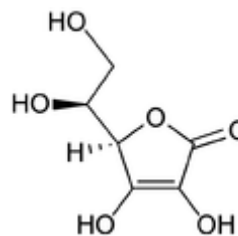
Az antioxidánsoknak épp úgy, mint a polifenoloknak hasznos élettani hatásai vannak, így nagy szerephez jutnak az élelmiszer és gyógyszerkutatásokban, számos tanulmány foglalkozik hatásmechanizmusukkal és előállításukkal, melyre olcsó alternatívát jelentenek a növényi szövettenyészetek (Matkowski, 2008).



4. ábra fenol gyűrű



6. ábra Galluszsav



5. ábra L-aszkorbinsav

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. A szövettenyészetek indukciója

A *Crocus sativus* és *C. cancellatus* mikroszaporításra kidolgozott szakirodalom felhasználásával (Plessner et Ziv, 1999; Bhagyalakshmi et al., 1999; Raya et Hassan, 2001;;cit. Chen et al.2003a; Darvishiet al., 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 etanolba mártjuk kb. fél percre utána 3-szor 10 percre 20%-os Domestos-ban fertőtlenítjük, 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 (Gamborget al, 1968) és 2% szacharózzal és auxint és citokinint 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±20C/18±20C fény- és hőmérséklet-perióduson neveltük hőlég-sterilezett 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 40°C-on pihent, a magok másik felét szobahőmérsékleten pihentettük. 21 napot követően felületi sterilizésen estek át sterilfülke alatt.

A sterilizés 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 fertőtlenítőszert.

A felületi sterilizés után, a hűtött és kontroll magvak felét MS\* táptalajra helyeztük, a másik részüket pedig 12 órára 0,5 mg l<sup>-1</sup> (1,5 µM) GA3 –t tartalmazó folyékony MS\*-ban áztattuk, ami után szintén szilárd MS\* táptalajra helyeztük őket. A táptalajra helyezett magvakat 15°C-on, sötétben, hőlég-sterilizált petricsészékben tároltuk. Két hét után mind a 4 csoport felét 0,5 mg l<sup>-1</sup> (2,2 µM) BA és 0,5 mg l<sup>-1</sup> (2,5 µM) NAA hormon-összetételű MS\* táptalajra helyeztük. Fél év után az MS\*-n hagyott magvakat 25 mg l<sup>-1</sup> (72,5 µM) GA3 tartalmú MS\*-ra (Ray et al., 2001) ültettük át.

### 3.3. Metabolitok kimutatása

#### 3.3.1. Összes polifenol- tartalom mérése

Mintaelőkészítés: 25 mg száraz (liofilizált) kalluszt, növényi részt dörzsmozsárban porítunk, majd 1ml 30%-os metanolban extraháljuk 70°C-on. Ezt 15 perc melegítés és 1 perc Vortex követi. A mintát szobahőmérsékletre hűtjük.

Ezt követően a mintákat 3percig 13.000 rpm-en centrifugáljuk. A felülúszóból kb. 700µl lepipetázunk, ebből mérjük ki a szükséges mennyiségeket a további kísérletekhez. A minta fagyasztoóban 1-2 hétig tárolható

Reagensek:

30%-os metanol (metanol + bidesztillált tvíz)

Folin- Ciocalteu elegy (8x-ára hígítva)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oldat (7,42g 100ml ioncserélt vízben való feloldása)

Galluszsav oldat (5,1 mg 10ml-es 30%-os metanolban hígítva, majd ezt 10x-ére hígítani 30%-os metanollal) ezeket a reagenseket frissen állítjuk össze, de szükség esetén egy hétig 4 °C- on lehet tárolni.

Az összes polifenol-tartalom meghatározáshoz a kalibráló oldatsor összeállítása a következő képen történt: 1250 µl-hoz F.-C. oldathoz adjuk, a 250 µl MeOH :H<sub>2</sub>O-ból és galluszsav- vagy mintaoldatból készített változó térfogat arányú mintákat. Ezt kiegészítjük 1000 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>oldattal, hogy a következő galluszsav végkoncentrációkat kapjuk *C<sub>gal</sub>* 0; 6; 12; 18; 24; 30 µM GA, ami 0, 1,02; 2,04; 3,06; 4,08; 5,1 µg/ml mennyiségű GA-t jelent.

Összeállítási rend összes polifenol- tartalom meghatározásához, reagens sor saját méréseinkre igazítva (2. táblázat).

| Sorozat | F-C elegy (µl) | MeOH (µl) | Galluszsav (µl) | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> oldat (µl) |
|---------|----------------|-----------|-----------------|--------------------------------------------|
| 1.      | 312,5          | 62,5      | -               | 250                                        |
| 2.      | 312,5          | 50        | 12,5            | 250                                        |
| 3.      | 312,5          | 37,5      | 25              | 250                                        |
| 4.      | 312,5          | 25        | 37,5            | 250                                        |
| 5.      | 312,5          | 12,5      | 50              | 250                                        |
| 6.      | 312,5          | -         | 62,5            | 250                                        |

2. Táblázat

Összeállítási rend összes polifenol- tartalom meghatározásához, minta sor. (3.táblázat)

| Minta | F-C elegy (µl) | MeOH (µl) | Minta (µl) | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> oldat (µl) |
|-------|----------------|-----------|------------|--------------------------------------------|
| 1.-6. | 312,5          | 50        | 12,5       | 250                                        |

3. Táblázat

Mérés fotométerrel, 720nm-en, a vak az a reagens, amelyikben nem található galluszsav (Miliauskas et al. 2004).

### 3.3.2.DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) módszer

0,01 g DPPH-t oldunk 25 ml spektroszkópiás (HPLC) MeOH-ban, ebből hígítunk, hogy az abszorbancia  $0,900 \pm 0,015$  legyen. A DPPH gyökképzés gátlását 515 nm-en detektáltuk MeOH-lal szemben. 6 perces méréseket végeztünk. Annyi mintát adagoltunk a 2,5 ml DPPH oldathoz, hogy a gátlási % értéke 20-80 % között alakuljon.

Gátlási % =  $(A_0 - A_\infty) / A_0$

A<sub>0</sub>: DPPH oldat abszorbancia értéke (A 0-t minden minta előtt mérni kell, mert változhat).

A<sub>∞</sub>: a mintát tartalmazó DPPH oldat abszorbancia értéke a 6. perc végén legalább 5 pontra illesztjük az egyenest, abból 50%-os gátlási értéket számolunk. 3 párhuzamos mérést végzünk (Katalinic, 2006; Miliauskas, 2004).

### 3.3.3. ABTS (2,2'-azino- di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav) módszer

K-perszulfátból 16,5 mg-ot oldunk 25 ml bidesztillált vízben. Az oldat 2,6 ml-jében oldunk 1 ABTS tablettát, vagy 2,6 ml bidesztillált vízben oldunk 10 mg ABTS-t ehhez 1,72 mg K-perszulfátot adunk.

Spektroszkópiás EtOH-val hígítjuk, hogy az abszorbancia 0,7 körül legyen, 734 nm-en detektálunk etanollal szemben.

6 perces méréseket végzünk. Annyi mintát adagolunk a 2,5 ml DPPH oldathoz, hogy a gátlási % értéke 20-80 % között alakuljon.

Gátlási % =  $(A_0 - A_\infty) / A_0$

A<sub>0</sub>: DPPH oldat abszorbancia értéke (A<sub>0</sub>-t minden minta előtt mérni kell, mert változhat).

A<sub>∞</sub>: a mintát tartalmazó DPPH oldat abszorbancia értéke a 6. perc végén; legalább 5 pontra illesztjük az egyenest, abból 50%-os gátlási értéket számolunk. 3 párhuzamos mérést végzünk (Katalinic, 2006; Miliauskas, 2004).

### 3.3.4.Mintaelőkészítés natív poliakrilamid gélelektroforézishez

Lemérjük a kallusz/növény/minta nedves tömegét Analitikai mérlegen kimérjük a PVP-t és hozzáadjuk a proteáz kivonó puffert (Sclereth et al., 2000), benne a PMSF-el. (phenylmethylsulfonyl fluoride: szerin proteáz inhibitor, a szerin proteázok fehérje hasító képességgel rendelkeznek). A polivinil-pirrolidon: mesterségesen előállított anyag, amelyet a szervezet nem vesz fel. A fehér por vízben és etanolban oldódik. A vegyület kémiai szerkezetéből adódóan a polivinil-pirrolidon más molekulákat szorosan magához köt; ezért elsősorban aromák és vitaminok hordozó anyagként alkalmazzák. Esetünkben a kataláz és a peroxidáz aktivitásokat potenciálisan gátló fenolokat köti meg

Jégben tartott eppendorf csövet használunk a továbbiakban. Dörzsölés kvarchomokkal és üvegbottal, ezután Vortex 1 perc (rázatás, sejtek, hogy felnyíljanak)

Folyékony nitrogénben fagyasztás majd centrifugálás 12.000 rpm 10 min. Lepipettázuk egy tiszta eppendorfba a felülúszót. -20 °C- on 1 hétig eláll és újrahasználható

A peroxidáz és kataláz gél összetétele és futtatása 25-30 mA, hűtőben ca. 8°C-on.

A szeparáló gél 7,5 % poliakrilamidot tartalmazott, az SDS-t kihagytuk a gélkészítésnél, hogy a kataláz és peroxidáz aktivitásokat a natív gélen vizsgálhassuk.

### 3.3.4.1. Peroxidáz és kataláz gélek mosása és a festés folyamata

A katalázok és a peroxidázok (Harris et Hopkinson, 1976) natív gélen történő kimutatását a 4. táblázat foglalja össze. Az első lépés minden esetben bidesztillált vizes mosás, ezt követi a festés (4. táblázat)

|          | Guajakol festés                                  | Pirogallol festés                                            | Kataláz festés                                                     |
|----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1. lépés | Bidesztillált víz mosás<br>(15 perc)             | 50 mM-os $K_2HPO_4/KH_2PO_4$<br>puffer pH 7.5 (1 óra )       | 50ml bidesztillált víz +50<br>$\mu$ l $H_2O_2$ 30%15 perc<br>mosás |
| 2. lépés | 50 ml 0,1 M Na-acetát<br>puffer pH 5,1 (15 perc) | 50 mM-os $K_2HPO_4/KH_2PO_4$<br>puffer pH 7.5 49ml (15 perc) | 0,25 g $K_3FeCN_6$ +25 ml<br>víz 15 perc kevergetés                |
| 3. lépés | 50 $\mu$ l + $H_2O_2$ 30%<br>(0,03%)             | 25 $\mu$ l + $H_2O_2$ 30%                                    | 0,415 g $FeCl_3$ + 6 $H_2O$<br>+12,5 ml víz 15 perc<br>kevergetés  |
|          | majd + 10 $\mu$ l guajakol<br>oldat              | majd + 1ml vízben feloldva<br>0.126 g pirogallol             |                                                                    |

4. Táblázat

## 4. Eredmények és megbeszélésük

### 4.1. Stabil kallusz vonalak előállítása

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

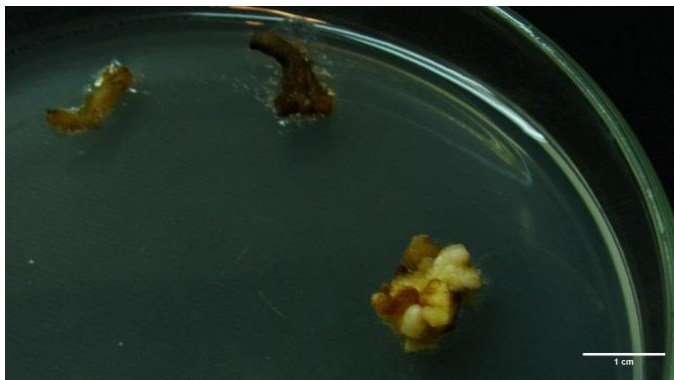
*Crocus banaticus*, aminek származási helyei Szováta (Románia, Maros megye) és Várasfenes (Románia, Bihar megye) (7.-12. ábrák). Többszöri átoltással sikerült őket stabilizálni. MS\* táptalajon neveltük őket, az alább felsorolt auxin, citokinin hormonokat adva hozzájuk..

-10mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA

-5mg l<sup>-1</sup> NAA, 5mg l<sup>-1</sup> BA

-5mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA

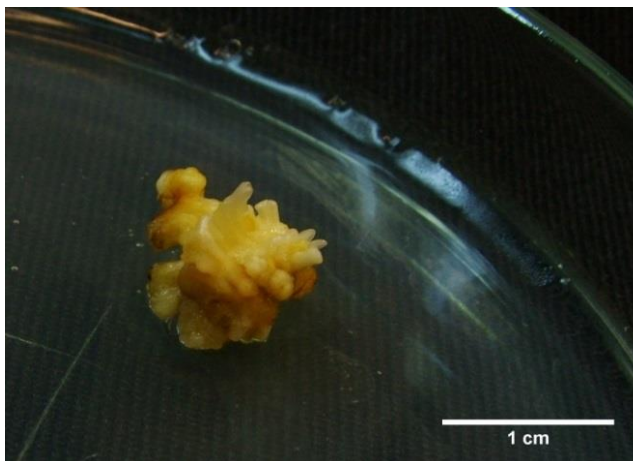
-1mg l<sup>-1</sup> IBA, 5%cukor



7. ábra *Crocus banaticus* (Várasfenes)  
10mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA, MS\* táptalaj



8. ábra *Crocus banaticus* (Szováta) 5mg  
l<sup>-1</sup> NAA, 5mg l<sup>-1</sup> BA, MS\* táptalaj



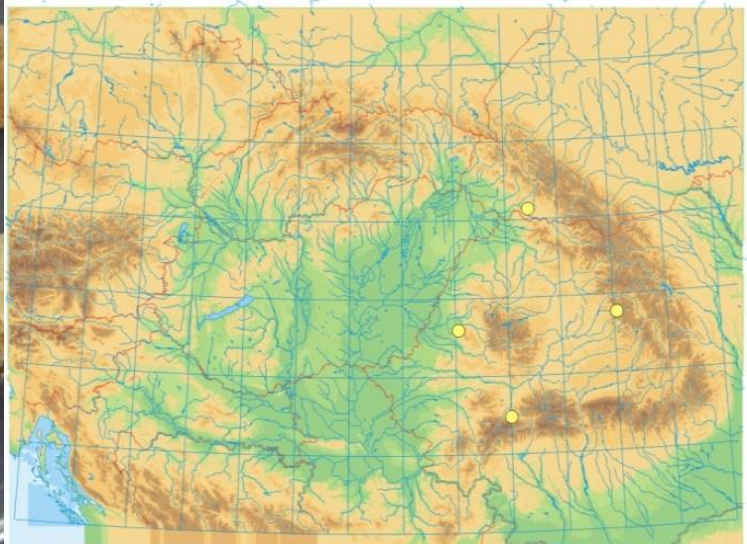
9. ábra *Crocus banaticus* (Várasfenes)  
5mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA, MS\* táptalaj



10. ábra *Crocus banaticus* (Szováta)  
1mg l<sup>-1</sup> IBA, MS\* 5%-os szacharóz



11. ábra *Crocus banaticus* (Szováta) 5mg l<sup>-1</sup> NAA, 5mg l<sup>-1</sup> BA, MS\* táptalaj



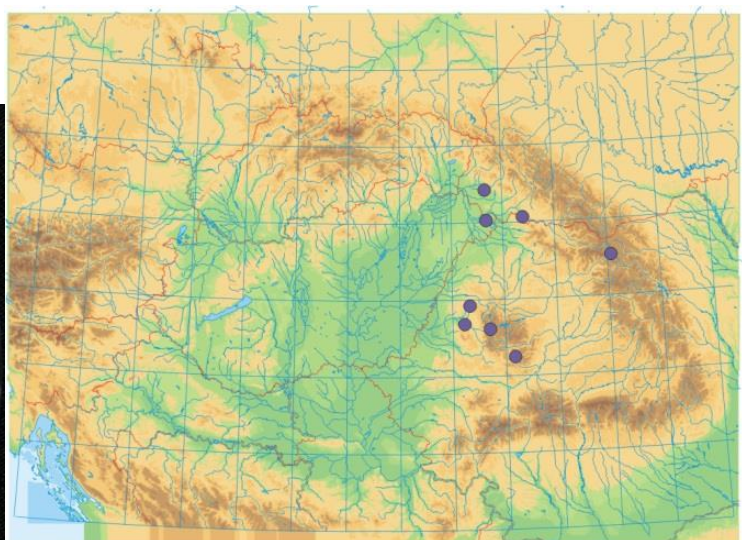
12. ábra *C. banaticus* előfordulása

A szováti *C. banaticus* tenyészetek embriogének voltak, szomatikus embriók keletkezését és fejlődését mutattuk ki (11. ábra).

*Crocus heuffelianus* Származási helyei Ukrajna (Pósaháza) és Románia (Radnalajosfalva). 10mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA –t tartalmazó MS\*, és 1mg l<sup>-1</sup> IBA, 5% suc-t tartalmazó MS\*táptalajon neveljük őket, kalluszt és hagymagumót hoztak létre (13.-14. ábrák). A *C. heuffelianus* kalluszok embriogének voltak (Demeter et al., 2010).



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

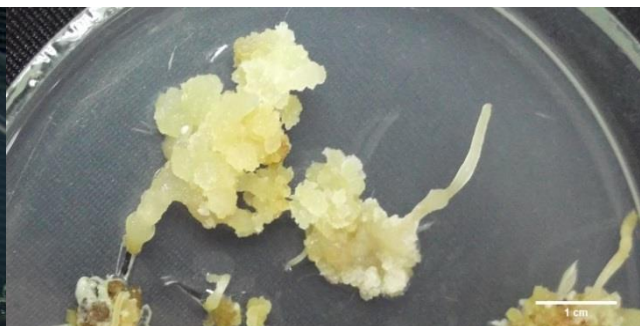


14. ábra *C. heuffelianus* előfordulása

*Crocus tommasinianus* származási helye Gyulaj, a Mecsek környékén. Lassan növekvő, fehér kalluszokat produkált, 10mg l<sup>-1</sup> NAA 1mg l<sup>-1</sup> BA és 5mg l<sup>-1</sup> NAA 1mg l<sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajon neveltük őket (15.-17. ábrák).

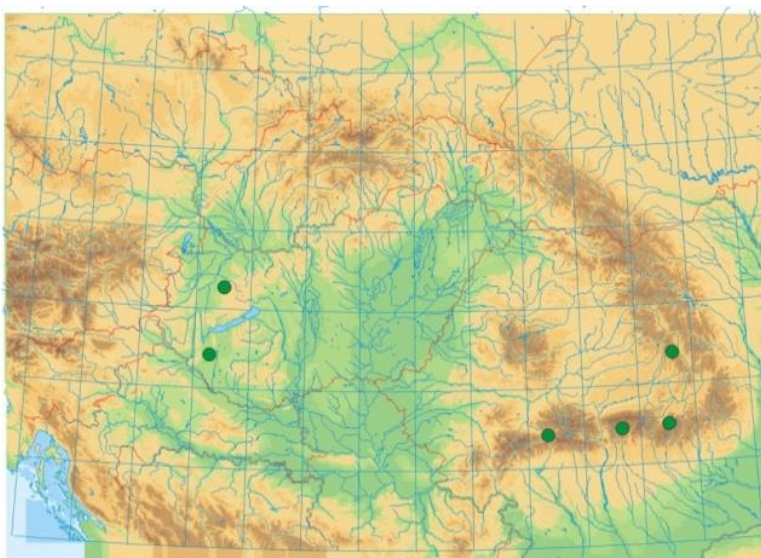


15. ábra *Crocus tommasinianus* 10mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA, MS\* táptalaj



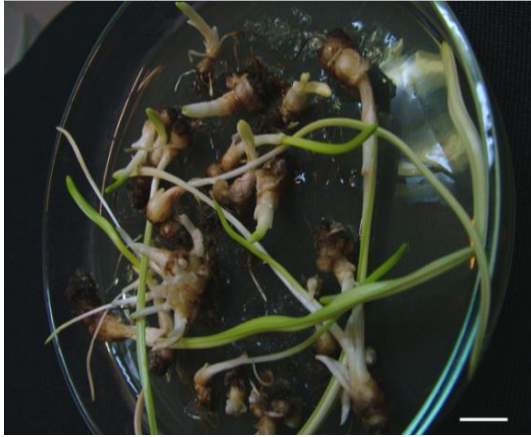
16. ábra *Crocus tommasinianus* 5mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA, MS\* táptalaj

A *C. tommasinianus* kalluszokon organogenezist detektáltunk.

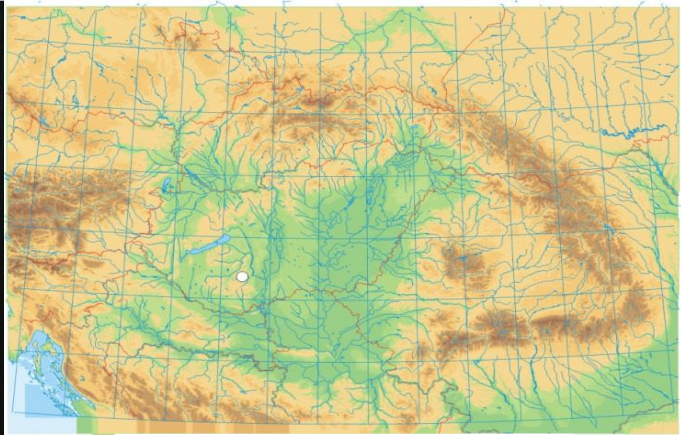


17. ábra *C. tommasinianus* előfordulása

A *Crocus vittatus*-t  $1\text{mg l}^{-1}$  IBA és 5% suc.-on tartva teljes növényeket, rajtuk hagymagumókat produkál. Mivel a kallusz stádium megkerülésével sikerült növényeket regenerálni, ezt mikroszaporításnak tekinthetjük. Származási helye Hargitai Havasok, Erdély, Románia (18.-19. ábrák).



18. ábra. *C. vittatus* hajtásmultiplikáció, 5% szacharóz és  $1\text{mg l}^{-1}$  IBA tartalmú MS\* táptalajon.  
Skála: 10 mm



19. ábra *C. vittatus* előfordulása

A *Crocus sativus*-t számos táptalajon sikerült eredményesen fenntartani (20. ábra). A legtöbb tenyészet jól fejlődő kallusz tenyészetet produkált.  $1\text{mg l}^{-1}$  IBA, 5% szacharózon erőteljes növekedés volt jellemző, gyökerek, hagymagumók, valamint hajtások is keletkeztek.

- $10\text{mg l}^{-1}$  NAA,  $1\text{mg l}^{-1}$  BA
- $5\text{mg l}^{-1}$  NAA,  $1\text{mg l}^{-1}$  BA
- $4\text{mg l}^{-1}$  NAA,  $1\text{mg l}^{-1}$  BA
- $2\text{mg l}^{-1}$  NAA,  $0.5\text{mg l}^{-1}$  BA
- $2\text{mg l}^{-1}$  IAA,  $0.5\text{mg l}^{-1}$  BA
- $2\text{mg l}^{-1}$  IBA,  $0.5\text{mg l}^{-1}$  BA
- $1\text{mg l}^{-1}$  IBA
- $0.05\text{mg l}^{-1}$  IBA,  $0.5\text{mg l}^{-1}$  BA
- $0.5\text{mg l}^{-1}$  IBA,  $0.05\text{mg l}^{-1}$  BA
- $1\text{mg l}^{-1}$  IBA, 5% cukor

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

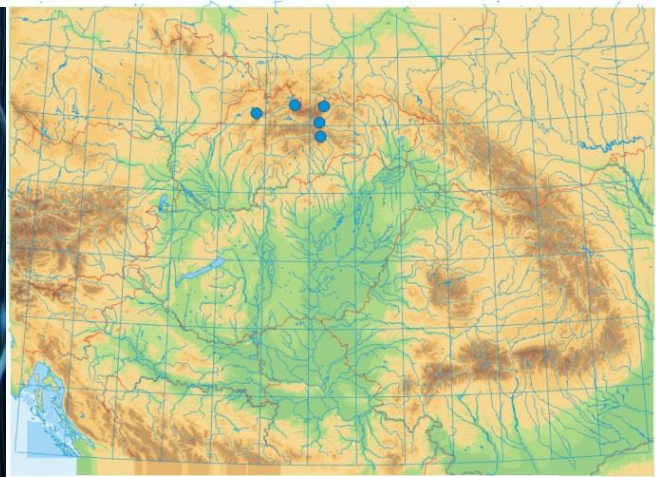


20. ábra *Crocus sativus*  $1\text{mg l}^{-1}$  IBA, 5%

*Crocus scepusiensis* Vernárról (Északi-Kárpátok, Szlovákia) származik (21.-22. ábrák). Organogenezis figyelhető meg rajta, bibeszerű struktúrák kialakulását is megfigyeltük. A többi *Crocus* fajtól eltérően, ahol hagymagumó explantátumokból nyertünk kallusokat, itt axenikus magokból nevelt csíranövényekből indultunk ki.



21. ábra *Crocus scepusiensis* 2 mg l<sup>-1</sup>  
NAA 4 mg l<sup>-1</sup> BA MS\*.  
Bibeszerű stuktúrák.



22. ábra *C. scepusiensis* előfordulása

-5mg l<sup>-1</sup> NAA, 5mg l<sup>-1</sup> BA; -4mg l<sup>-1</sup> NAA, 2mg l<sup>-1</sup> BA  
-5mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA; -2mg l<sup>-1</sup> NAA, 4mg l<sup>-1</sup> BA  
-2mg l<sup>-1</sup> NAA, 2mg l<sup>-1</sup> BA

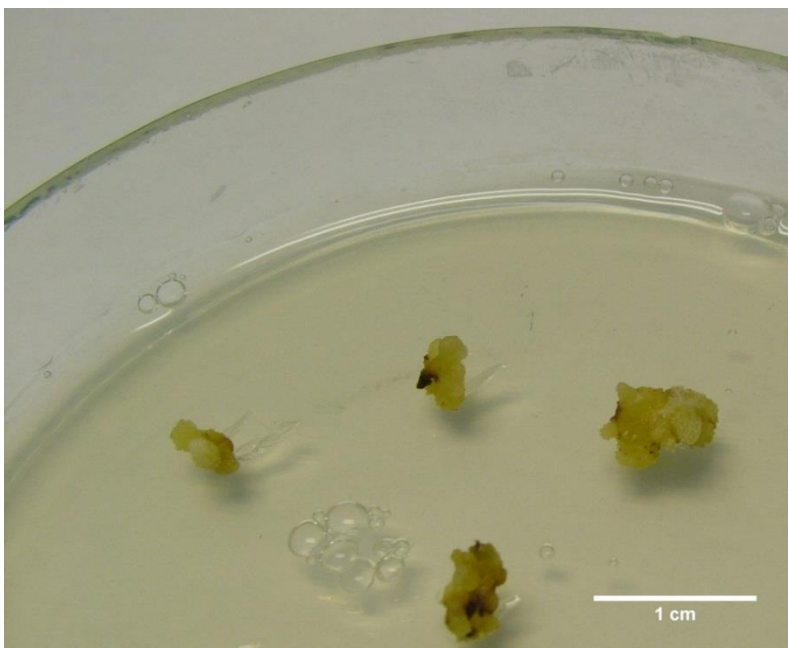
hormon összetételű MS\* táptalajon neveltük.

Itt szeretnénk megjegyezni, hogy a jelen vizsgálatban szereplő kárpát-medencei vadon élő *Crocus* fajok szövettenyésztését, tudomásunk szerint, először kutatócsoportunknak sikerült megvalósítani. A *C. sativus* szövettenyészetek előállításáról számos kutatócsoport számolt be (1. Irodalmi áttekintés, 2.3. alfejezet, ahol ezt példákkal is illusztráltuk), részben ezen tanulmányok alapján terveztük meg azokat a táptalajokat, amelyeken a többi *Crocus* faj/ genotípus sikeres szövettenyésztését is megvalósítottuk.

## 4.2. A *Crocus* magvak csíráztatása axenikus körülmények között

Csupán a magvak tizedét sikerült mesterséges körülmények között kicsíráztatni. A kísérlet elkezdése az első és második csiranövény a *Crocus heuffelianus* volt, de ezek elhaltak. 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  $10\text{mg l}^{-1}$  NAA és  $1\text{mg l}^{-1}$  BA tartalmú MS\* táptalajra helyezték őket. 2 és fél hónap után relatíve gyorsan növő, élénksárga első generációs kalluszok képződtek, ezekből pedig életképes 2. és 3. generációs kalluszokat képeztünk. (23. ábra)



**23. ábra *Crocus heuffelianus* 2.generációs kallusz  $10\text{mg l}^{-1}$  NAA,  $1\text{mg l}^{-1}$  BA tartalmú MS\* táptalajon.**

Az első kísérletsorozatban a táptalajok nem tartalmaztak hormonokat, míg a másodikban  $0,5\text{mg l}^{-1}$  NAA-t és  $0,5\text{BA}$ -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.

### 4.3. Összes polifenol- tartalom mérése

Néhány sáfrány minta össz-polifenol tartalma. A növényi hormonokhoz rendelt számok a mg l<sup>-1</sup>-ben kifejezett koncentrációkat jelentik. Valamint az (±) átlag szórás értékeket ábrázoltuk. GAE: galluszsav-egyenérték (5. táblázat.)

| Minta                                                  | összfenol tartalom (GAE, mg g <sup>-1</sup> száraz tömeg) |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1. <i>Crocus sativus</i><br>kallusz, 10NAA + 1BA       | 9,96 ± 1,5                                                |
| 2. <i>Crocus scepusiensis</i><br>kallusz, 2NAA + 0,5BA | 10,56 ± 2,11                                              |
| 3. <i>Crocus banaticus</i><br>kallusz, 5NAA + 5BA      | 14,9 ± 2,81                                               |
| 4. <i>Crocus banaticus</i><br>hajtás, eredeti növény   | 25,0 ± 1,64                                               |

5. Táblázat

A vizsgált mintákban az össz-polifenol tartalom mérések során eltérést tapasztaltunk a szövettenyészetek és az eredeti a növényi minták között.

GAE (polifenol tartalom) ha magasabb, mint 12-20 mg g<sup>-1</sup> akkor magas szintűnek mondható. (Miliauskas et al. 2004; Daniels et al. 2011). A szövettenyészetekben alacsonyabb össz-polifenol tartalom mutatható ki az eredeti növényhez viszonyítva, de ahhoz elég

magas, hogy érdemes legyen a tenyészetek további vizsgálata, az optimális polifenol termelés kidolgozása.

### 4.4. Szabadgyök semlegesítő kapacitás

Az antioxidáns kapacitás meghatározására előzetes méréseket végeztünk ABTS-el és DPPH-val. Ha az ABTS\* kation gátlási százaléka magasabb, mint 60 % akkor beszélhetünk egy relatív magas gyökfogó kapacitásról.(Miliauskas et al. 2004).

Magas antioxidáns kapacitást detektáltunk a következő tenyészetekben, ABTS kation gátlást mérve: *Crocus sativus* (10 mg l<sup>-1</sup> NAA/1 mg l<sup>-1</sup> BA) kallusz tenyészetekből 71,18%-os gátlást, *C. banaticus* Sovata 5 mg l<sup>-1</sup> NAA/5 mg l<sup>-1</sup> BA- 60,05%-os gátlást és *C. sativus* kallusz- és gyökér tenyészetből 91,14% gátlást, valamint natív növényekben *C. banaticus* Sovata hajtásból 86,33%- os gátlást mutattunk ki (6.táblázat).

| Fajok                                                  | Táptalajok                                         | $A_{\infty}$ | ABTS gátlási % |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------|----------------|
| 1. <i>C. scepusiensis</i>                              | 2 mg l <sup>-1</sup> NAA/0,5 mg l <sup>-1</sup> BA | 0,620        | 16,89%         |
| 2. <i>C. scepusiensis</i>                              | 2 mg l <sup>-1</sup> NAA/0,5 mg l <sup>-1</sup> BA | 0,538        | 27,79%         |
| 3. <i>C. scepusiensis</i>                              | 2 mg l <sup>-1</sup> NAA/0,5 mg l <sup>-1</sup> BA | 0,464        | 37,80%         |
| 4. <i>C. sativus</i>                                   | 10 mg l <sup>-1</sup> NAA/1 mg l <sup>-1</sup> BA  | 0,215        | 71,18%         |
| 5. <i>C. sativus</i>                                   | 10 mg l <sup>-1</sup> NAA/1 mg l <sup>-1</sup> BA  | 0,463        | 37,93%         |
| 6. <i>C. sativus</i>                                   | 10 mg l <sup>-1</sup> NAA/1 mg l <sup>-1</sup> BA  | 0,347        | 53,49%         |
| 7. <i>C. banaticus</i> Sovata                          | 5 mg l <sup>-1</sup> NAA/5 mg l <sup>-1</sup> BA   | 0,544        | 27,01%         |
| 8. <i>C. banaticus</i> Sovata                          | 5 mg l <sup>-1</sup> NAA/5 mg l <sup>-1</sup> BA   | 0,369        | 50,54%         |
| 9. <i>C. banaticus</i> Sovata                          | 5 mg l <sup>-1</sup> NAA/5 mg l <sup>-1</sup> BA   | 0,298        | 60,05%         |
| 10. <i>C. sativus</i> hagymagumó                       | eredeti növény                                     | 0,260        | 60,05%         |
| 11. <i>C. sativus</i> kallus gyökér                    | 1 mg l <sup>-1</sup> IBA/5% suc.                   | 0,64         | 91,14%         |
| 12. <i>C. heuffelianus</i> Pósháza<br>hagymagumó+levél | eredeti növény                                     | 0,350        | 53,08%         |
| 13. <i>C. sativus</i> hajtás                           | eredeti növény                                     | 0,333        | 55,36%         |
| 14. <i>C. banaticus</i> Sovata virág                   | eredeti növény                                     | 0,337        | 54,83%         |
| 15. <i>C. banaticus</i> Sovata hajtás                  | eredeti növény                                     | 0,102        | 86,33%         |
| 16. <i>C. banaticus</i> Sovata hagymagumó              | eredeti növény                                     | 0,501        | 32,84%         |
| 17. <i>C. heuffelianus</i> Pósháza kallusz             | 10 mg l <sup>-1</sup> NAA/1 mg l <sup>-1</sup> BA  | 0,425        | 43,03%         |

#### 6. Táblázat ABTS mérések és eredmények

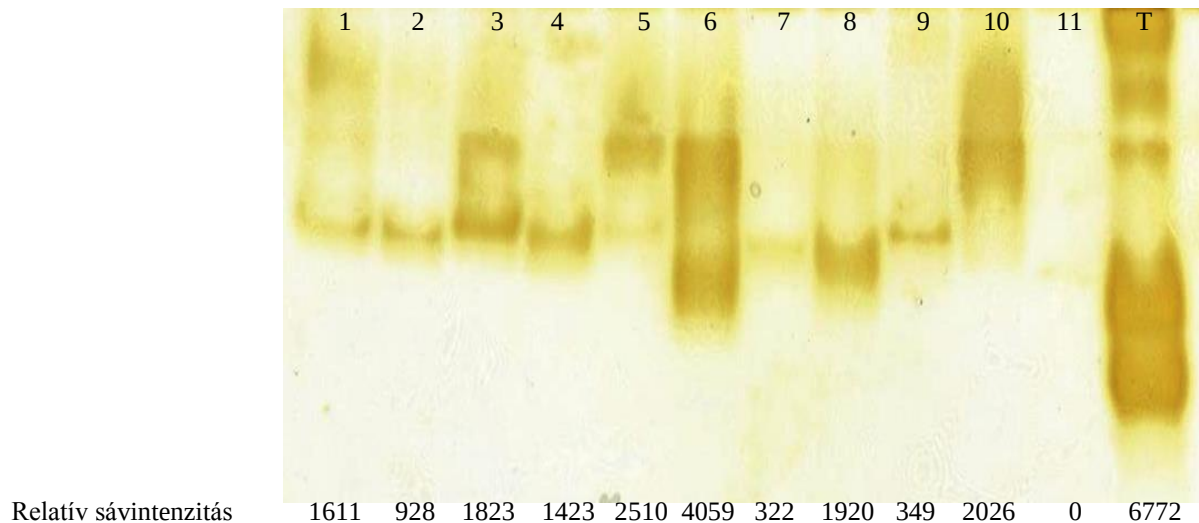
A méréseket elvégeztük DPPH-val is (7. táblázat) de az itt kapott értékek nem érték el az etalonként megnevezett 60% os gátlási értéket, ennek oka a DPPH eltérő szerkezetében rejlik. (Miliauskas et al. 2004)

| Fajok                                               | Táptalajok                                         | A <sub>∞</sub> | DPPH gátlási % |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------|----------------|
|                                                     | vak                                                | 0,861          |                |
| 1. <i>C. scepusiensis</i>                           | 2 mg l <sup>-1</sup> NAA/0,5 mg l <sup>-1</sup> BA | 0,838          | 4,88%          |
| 2. <i>C. scepusiensis</i>                           | 2 mg l <sup>-1</sup> NAA/0,5 mg l <sup>-1</sup> BA | 0,828          | 6,02%          |
| 3. <i>C. scepusiensis</i>                           | 2 mg l <sup>-1</sup> NAA/0,5 mg l <sup>-1</sup> BA | 0,807          | 8,40%          |
| 4. <i>C. sativus</i>                                | 10 mg l <sup>-1</sup> NAA/1 mg l <sup>-1</sup> BA  | 0,705          | 19,98%         |
| 5. <i>C. sativus</i>                                | 10 mg l <sup>-1</sup> NAA/1 mg l <sup>-1</sup> BA  | 0,83           | 5,79%          |
| 6. <i>C. sativus</i>                                | 10 mg l <sup>-1</sup> NAA/1 mg l <sup>-1</sup> BA  | 0,801          | 9,08%          |
| 7. <i>C. banaticus</i> Sovata                       | 5 mg l <sup>-1</sup> NAA/5 mg l <sup>-1</sup> BA   | 0,832          | 5,56%          |
| 8. <i>C. banaticus</i> Sovata                       | 5 mg l <sup>-1</sup> NAA/5 mg l <sup>-1</sup> BA   | 0,785          | 10,90%         |
|                                                     | vak                                                | 0,892          |                |
| 9. <i>C. banaticus</i> Sovata                       | 5 mg l <sup>-1</sup> NAA/5 mg l <sup>-1</sup> BA   | 0,788          | 13,97%         |
| 10. <i>C. sativus</i> hagymagumó, eredeti növény    | eredeti növény                                     | 0,826          | 9,83%          |
| 11. <i>C. sativus</i> kallusz és gyökér             | 1 mg l <sup>-1</sup> IBA/5% suc.                   | 0,664          | 27,51%         |
| 12. <i>C. heuffelianus</i> Pósháza hagymagumó+levél | eredeti növény                                     | 0,596          | 34,93%         |
| 13. <i>C. sativus</i> hajtás                        | eredeti növény                                     | 0,646          | 29,48%         |
| 14. <i>C. banaticus</i> Sovata virág                | eredeti növény                                     | 0,439          | 52,62%         |
| 15. <i>C. banaticus</i> Sovata hajtás               | eredeti növény                                     | 0,728          | 20,52%         |
|                                                     | vak                                                | 0,896          |                |
| 16. <i>C. banaticus</i> Sovata agymagumó            | eredeti növény                                     | 0,883          | 4,33%          |
| 17. <i>C. heuffelianus</i> Pósháza kallusz          | 10 mg l <sup>-1</sup> NAA/1 mg l <sup>-1</sup> BA  | 0,872          | 5,53%          |

7. Táblázat DPPH mérések és eredmények

#### 4.5. Enzimaktivitás mérések

A *Crocus* minták pirogallol peroxidáz aktivitását natív poliakrilamid gélen vizsgáltuk. A minták közül kiemelkedő eredményt mutat a 6. *C. sativus* hajtás eredeti növény, de még így is



24. ábra pirogallol peroxidáz kimutatása natív gélen\*

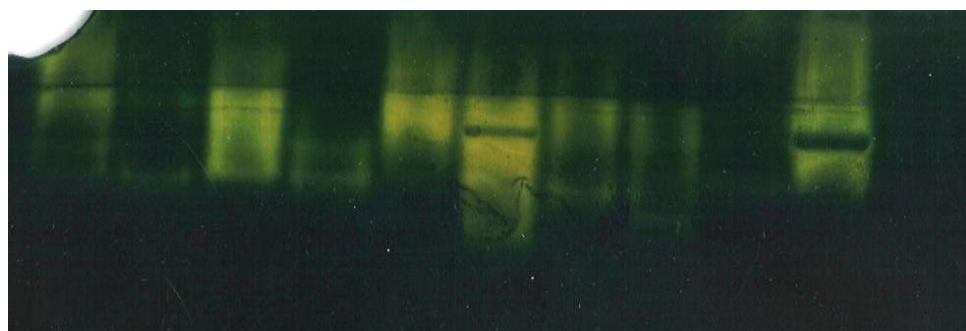
elmarad a referenciaként használt torma aktivitásához képest (24.ábra). A szövettenyészet minták közül a *C. scepusiensis* és a *C. heuffelianus*/ Pósa-háza kalluszok aktivitása, valamint a *C. sativus* szövettenyészet eredetű gyökerei számítanak kimagaslónak (24. ábra). A *C. sativus* tenyészetek szabadgyök semlegesítő kapacitása is magas volt (8. táblázat), ezért ez a kultúra fokozott jelentőségű. A *C. scepusiensis* és a *C. heuffelianus* tenyészetekben ugyanakkor alacsony ABTS\* kation és DPPH\* gátlás értékeket mértünk, tehát e minták szabad gyök semlegesítő kapacitása mérsékelt, de a peroxid-semlegesítő képességük magas.

\*Jelmagyarázat:

- 1: *C. sativus* 10 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg l<sup>-1</sup> BA
- 2: *C. sativus* 2 mg l<sup>-1</sup> IBA 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA
- 3: *C. scepusiensis* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA
- 4: *C. banaticus* Szováta 5 mg l<sup>-1</sup> NAA 5 mg l<sup>-1</sup> BA
- 5: *C. heuf.* Pósa-háza 10 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg l<sup>-1</sup> BA
- 6: *C. sativus* hajtás eredeti növény
- 7: *C. sativus* hagymagumó eredeti növény
- 8: *C. sativus* gyökér szövettenyészetből
- 9: *C. heuf.* Pósa-háza hajtás eredeti növény
- 10: *C. heuf.* Pósa-háza hagymagumó eredeti növény
- 11: *C. heuf.* Pósa-háza virág eredeti növény
- T: *Armoracia rusticana* torma gyökér

A kataláz enzimaktivitás mérés során többnyire az eredeti növények: *C. sativus* hajtás eredeti növény és *C. heuffelianus*/ Pósháza hagymagumó eredeti növények mutattak magas értékeket, de a *C. scepusiensis* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA és a *C. heuffelianus* Pósháza 10 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajokon fenntartott szövettenyészetek is biztató

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Relatív sávintenzitás 779 172 4938 563 3256 6674 1595 478 0 3658 0

**25. ábra kataláz izoenzimek kimutatása natív gélen\***

eredményeket produkált. Fontos megjegyezni, hogy ugyanezek a szövettenyészetből származó minták mutattak magas peroxidáz aktivitást is (l. fent).

\*Jelmagyarázat:

- 1: *C. sativus* 10 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg l<sup>-1</sup> BA
- 2: *C. sativus* 2 mg l<sup>-1</sup> IBA 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA
- 3: *C. scepusiensis* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA
- 4: *C. banaticus* Szováta 5 mg l<sup>-1</sup> NAA 5 mg l<sup>-1</sup> BA
- 5: *C. heuf.* Pósháza 10 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg l<sup>-1</sup> BA
- 6: *C. sativus* hajtás eredeti növény
- 7: *C. sativus* hagymagumó eredeti növény
- 8: *C. sativus* gyökér szövettenyészetből
- 9: *C. heuf.* Pósháza hajtás eredeti növény
- 10: *C. heuf.* Pósháza hagymagumó eredeti növény
- 11: *C. heuf.* Pósháza virág eredeti növény

## 5. Összefoglalás

A *Crocus banaticus*, *Crocus heuffelianus*, *Crocus tommasinianus*, *Crocus scepusiensis*, *Crocus vittatus* és a *Crocus sativus* fajokból sikeresen indítottunk és stabil kallusztenyészeteket 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. Minden, a jelen munkában szereplő kárpát-medencei vadon élő faj esetében, tudomásunk szerint kutatócsoportunknak sikerült először növényregenerálásra képes kallusztenyészeteket előállítani. Ezek a tenyészetek potenciálisan felhasználhatóak genotípus megőrzésre, amely azért is jelentős, mert e fajok védettek.

*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 stabil kallusz vonalakat hoztunk létre.

Több fajnál végeztünk előzetes méréseket antioxidáns kapacitásra, enzimaktivitásra. A szövettenyészetek, szinte mindig alulmaradtak az eredeti növényekhez képest. Ennek ellenére, a *C. sativus* és a *C. banaticus* szövettenyészetek magas szabadgyök semlegesítő kapacitást mutattak, *C. scepusiensis* és *C. heuffelianus* (Pósaháza) tenyészetek ugyanakkor magas enzimatisz antioxidáns kapacitást mutattak. A *C. sativus* szövettenyészetek gyökérképző kalluszait külön kiemeljük, hiszen ezekben a szabadgyök semlegesítő kapacitás és a peroxidáz aktivitás is magas volt. Ezeket a tenyészeteket érdemes tovább vizsgálni, az antioxidáns kapacitás optimalizálása érdekében.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnénk megköszönni Témavezetőnknek Dr. Máthé Csabának a segítséget és a szakmai tanácsokat a munkák során. A laboratóriumi munkámban rengeteg segítséget nyújtott és biztosították a jó hangulatot Resetár Anna, Riba Milán, Garda Tamás, Kovács István. Továbbá hálával tartozunk a Növénytani Tanszék összes dolgozójának, köztük Dr. Vasas Gábor tanszékvezetőnek.

## 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 A.L; van Staden J. (2001) Micropropagation of the endangered Aloe polyphylla. PLANT GROWTH REGULATION 33: 19-23

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

Thakur RS; Puri H.S; Hussain A. (1989) Major Medicinal Plants of India. CENTRAL INSTITUTE OF MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS, Lucknow India.

Bhagyalakshmi N. (1999) Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. PLANT CELL TISSUE ORGAN CULT 58 (3):205-211.

Bairu M.W; Stirr W.A; 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

Biondo R; Pereira A.M.S; Marcussi S, Pereira P.S; Franca S.C; Soares A.M; (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 A.V; Bertoni B.W; Soares A.M; Franca S.C; Soares P.A. (2007) Micropropagation, seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* Woodson. SCIENTIA AGRICOLA 64: 263-268

Chandra B; Plani L.M.S; Nandi S.K; (2006) Propagation and conservation of *Picrorhiza kurrooa* 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 J.C; Fennell C.W; 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 C.A; Omid M; Sarkhosh A. (2006) *In vitro* Production of Pathogen-free Plantlets via Meristem Culture in saffron (*Crocus sativus* L.). BIOTECHNOLOGY 5: 292-295,

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

Dodds J.H; Roberts L.W; (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

Gabrielsen B; Monath T.P; Huggins J.W; Kefauver D.F; Pettit G.R; Groszek G; Hollingshead M; Kirsi J.J; Shannon W.M; Schubert E.M; Da Re J; Ugarkar B; Ussery M.A; Phelan M.J, (1992) Antiviral (RNA) Activity of Selected Amaryllidaceae Isoquinoline Constituents and Synthesis of Related Substances JOURNAL OF NATURAL PRODUCTION 55:1569–1581.

Gamborg O.L; Miller R.A; Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 50: 151-158.

Garcia-Mendoza A. (1992). Con Sabor a Maguey. MEXICO CITY: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO.

Ghani, A. (1998). Monographs in Medical Plants of Bangladesh Chemical Constituents and Uses. 2nd Edn; ASIATIC SOCIETY OF BANGLADESH, Bangladesh, pp: 276.

Gonda S; Parizsa P; Surányi Gy; Gyémánt Gy; Vasas G. (2012) : Quantification of main bioactive metabolites from saffron (*Crocus sativus*) stigmas by a micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) method JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 66:68-74.

Glendon D; Ascough C.J; Erwin E; Johannes van Staden C. (2009) Micropropagation of iridaceae—a review PLANT CELL TISS ORGAN CULT 97:1–19

Harris H. and Hopkinson D.A. (1976) Handbook of enzym electrophoresis in Human genetics, NORTH- HOLLAD, Amsterdam

Heinrich M. and Teoh H.L. (2004) Galanthamine from Snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local caucasian knowledge ETHNOPHARMACOLOGY 92: 147–162

Heywood V.H; Iriondo J.M. (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives BIOLOGICAL CONSERVATION 113: 321–335

- Hussain A. (1984) Conservation of genetic resources of medicinal plants in India, conservation of plant Resources, BOTANICAL SURVEY OF INDIA: Howrah, India. pp. 110-117.
- 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 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
- Kirtikar K.R; Basu B. D. (1984) Indian Medicinal plants. II ed. ALLAHABAD.3:1707.
- Sarma K. S; Sharada K; Maesato K; Hara T; Sonoda Y. (1991) Chemical and sensory analysis of saffron produced through tissue cultures of *Crocus sativus* PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE 26: 11-16
- Linsmaier E.M; Skoog F.(1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. PHYSIOLOGIA PLANTARUM 18: 100-127
- Matkowski A. (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants — A review 2008 ELSEVIER INC. BIOTECHNOLOGY ADVANCES 26: 548–560

Magesh V; Singh J.P.V; 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

Miliauskas G; Venskutonis P.R; van Beek T.A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts FOOD CHEMISTRY 85 231–237

Murashige T; Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. PHYSIOLOGIA PLANTARUM 15: 473-497

Nair S.B; Panikkar K. (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.: 1-170

Nitsch J.P; Nitsch C. (1969) Haploid plant from pollen grains. SCIENCE 163: 85–87.

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 G.R; Groszek G; Backhaus R.A; Doubek D.L.and Barr J. et al. (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

Raja S; Ahamed K; Kumar V; Mukherjee K; Bandyopadhyay A; Mukherjee P; (2007) Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. JOURNAL ETHNOPHARMACOLOGY 109:41-47.

Ramirez-Malagon R; Borodanenko A; Perez-Moreno L; Salas-Araiza M.D; Nunez-Palenius H.G; 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

Re R; Pellegrini N; Proteggente A; Pannala A; Yang M. and Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE., 26, 1231-1237.

Saritha K.V; Naidu C.V; (2008) Direct shoot regeneration from leaf explants of *Spilanthes acmella*. BIOLOGIA PLANTARUM 52: 334-338

Schlereth A; Becker C; Horstmann C; Tiedemann J; Müntz K. (2000) Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryogenic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY 51: 1423–1433.

Sharifi G. and Ebrahimzadeh H. (2010) Changes of antioxidant enzym activities and isoensyme profiles during *in vitro* shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.) ACTA BIOLOGICA HUNGARICA 61 (1), pp. 73–89

Székely V. (2013) *Crocus sativus* szövettenyésztése és hatóanyagainak vizsgálata. DE TTK

Katalinic V.; Milos M; Kulisic T; Jukic M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols FOOD CHEMISTRY 94: 550–557

Valenzuela-Zapata A.G. (1997) El agave tequilero, su cultivo e industria. 2nd. ed. MONSATO. GUADALAJARA, Mexico.

Van Haelen et al., (1983) Aspects botaniques, constituon chimique et activite pharacologique d'*Harpagophytum procumbens* DC. PHYTOTERAPY 5:7-13.