

УДК 581.1

М. Т. ПЕТРОСЯН, Н. Ж. СААКЯН, Ю. Г. ПОПОВ

ВВЕДЕНИЕ ШАФРАНА ПОСЕВНОГО (*CROCUS SATIVUS* L.) В ИЗОЛИРОВАННУЮ КУЛЬТУРУ

Получена изолированная культура шафрана посевного (*Crocus sativus* L.), разработаны условия как для стабильного роста каллуса, так и для индукции органогенеза и клонального микроразмножения.

Введение. Шафран посевной (*Crocus sativus* L.) – многолетнее клубне-луковичное растение из семейства касатиковых (*Iridaceae*), принадлежащее к группе эфемероидных геофитов. Большую часть жизни проводит под землей и только осенью дает цветonoсный побег, а затем листья и корни, которые к апрелю высыхают [1]. Еще с начала третьего тысячелетия до н.э. шафран использовался в быту различных народов как краситель, пряность и в народной медицине [1, 2]. В рыльцах этого растения содержится большое количество различных веществ (кроцин, кроцетин, мангикроцин, кампестерин, стигмастерин, β -ситостерин, урсоловая, олеиновая, пальмитиновая, пальмитолеиновая, олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты, фитоен, фитофлюен, β -каротин, ликопин, зеаксантин, пикрокроцин и сафраналь), многие из которых имеют большое фармакологическое значение [3, 4]. Наиболее выраженной являются антиопухолевая и антиоксидантная активности шафрана, обусловленные содержанием полиненасыщенного дитерпена кроцина, который ответственен также и за оранжевый цвет рыльцев [1, 2, 4].

Из-за триплоидной природы этого растения и практического отсутствия полового размножения селекционные работы с ним не ведутся. Вегетативное же размножение клубнелуковицами происходит очень медленно, что в значительной степени препятствует расширению площадей возделывания этой ценной культуры [1, 4]. Кроме того, многолетнее бесполое размножение приводит к снижению устойчивости шафрана к различным фитопатогенам, что является причиной высокой зараженности посадочного материала. Поэтому проведение опытов по культивированию шафрана в условиях *in vitro* очень важно как с практической, так и теоретической точек зрения.

Начиная с начала 80-х годов проводятся работы по введению в изолированную культуру различных видов рода *Crocus* с использованием клубнелуковиц и генеративных органов [4]. Но различные виды и даже сорта одной и той же культуры требуют особых условий выращивания, и поэтому необходима разработка индивидуальных подходов к их культивированию [3].

Целью настоящей работы было получение изолированной культуры *C. sativus* и исследование условий для ее клонального микроразмножения.

Методы исследования. В работе использовались клубнелуковицы шафрана, растущего на высоте около 1000 м над уровнем моря (северо-восточный Иран). Стерилизация материала проводилась традиционными стерилизующими реагентами фунгицидного и бактерицидного действия (бенлат и диоцид).

Для введения в культуру *in vitro* были использованы питательные среды на основе минеральных солей среды Мурасиге-Скуга [5] с различными составами и концентрацией фитогормонов (см. табл.). Влияние концентрации сахарозы (от 20 до 60 г/л) на размер клубнелуковичек изучалось на питательной среде № 5. По мере роста эксплантов 1–2 раза в 2 месяца проводилась их пересадка на свежую питательную среду, а калусную ткань пересаживали на 20-й день культивирования.

Для анатомических исследований материал окрашивался светло-розовым водным раствором сафранина, излишки красителя удалялись помещением материала в 40%-й глицерин. Микроскопирование проводилось с помощью микроскопа OLYMPUS CH-2.

Содержание фитогормонов в питательных средах

№ питательной среды	Концентрация фитогормонов, мг/л				
	ИУК	НУК	кинетин	БАП	ГК
1	0,0	0,2	3,0	1,0	0,0
2	0,5	0,0	1,0	0,0	0,2
3	0,5	10,0	0,0	1,0	0,0
4	0,0	0,2	3,0	2,0	0,0
5	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0

Примечание: ИУК – индолил-3-уксусная кислота; НУК – α -нафтилуксусная кислота; БАП – бензиламинопури; ГК – гибберелловая кислота.

Результаты и обсуждение. Для получения изолированной культуры использовались клубнелуковицы двух типов: находящиеся в начальной стадии периода покоя, сразу после их образования; прошедшие полный период покоя. Работа проводилась как в направлении индукции прорастания клубнелуковиц и получения проростков, так и пролиферации каллуса у эксплантов клубнелуковиц и индукции морфогенеза.



Рис. 1. Рост проростков клубнелуковицы шафрана посевного на среде № 2.



Рис. 2. Образование калусной ткани шафрана посевного на среде № 3.

После поверхностной стерилизации клубнелуковицы *C. sativus* помещались на питательные среды с различным набором гормональных факторов

(см. табл.). На средах № 1 и № 4, содержащих повышенное количество цитокининов, наблюдалось пробуждение как верхушечной, так и боковых почек и развитие побегов у клубнелуковиц, прошедших стадию покоя. Однако только небольшая часть образовавшихся растений формировала клубнелуковицы.

На питательной среде № 2 которая в отличие от других содержала ГК, прорастали клубнелуковицы, находящиеся в начальной стадии покоя. Здесь спустя 1–1,5 месяца культивирования у клубнелуковиц прорастали верхушечная и боковые почки (рис. 1) и образовывались целые растения.

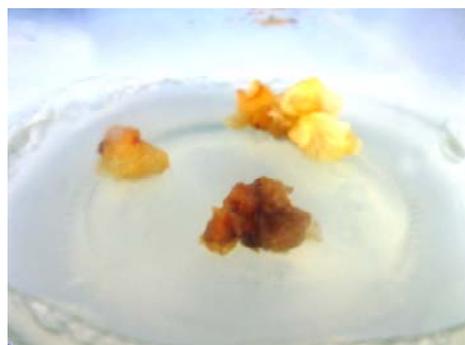


Рис. 3. Каллусная ткань *C. sativus*.

На питательной среде № 3 с повышенным содержанием ауксинов происходило разрыхление клубнелуковицы и образование каллусной ткани (рис. 2). Для дальнейшего роста каллусной ткани ее необходимо было перенести на среду с повышенным содержанием цитокининов и низким – ауксинов, т.е. на среды № 1 и № 4 (рис. 3).

Период роста каллусной ткани составлял 20 дней, после чего требовалась ее пересадка на свежую питательную среду. При длительном культивировании каллусной ткани (до 15–20 пассажей) на ее поверхности появлялись беловатые бугристые новообразования. Анатомические исследования этих бугорков показали, что здесь наблюдается образование эмбриоидов (зародышеподобных структур из соматических клеток каллуса) биполярной природы. В толще каллуса встречались многочисленные гидроциты (рис. 4, а).

В дальнейшем часть эмбриоидов по мере развития превращалась в клубнелуковицы, а некоторые эмбриоиды давали начало побегам (рис. 4, б и с).

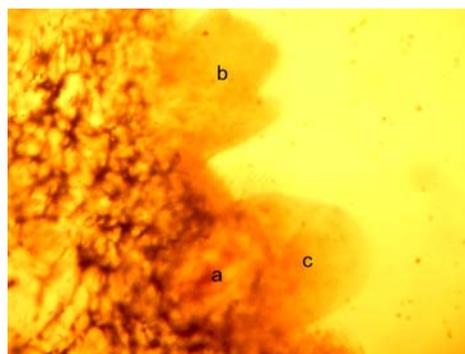


Рис. 4. Вторично дифференцированная каллусная ткань *C. sativus*: а) гидроциты; б, с) новообразованные почки.



Рис. 5. Дочерние клубнелуковички *C. sativus* на среде № 5.

Для дальнейшего роста и развития микроклубнелуковиц их необходимо было перенести на обедненную среду № 5, содержащую только НУК в концентрации 0,1 мг/л. На этой среде у микроклубнелуковиц-регенерантов пробуждались не только центральная, но и боковые почки, образуя проростки (рис. 5).

В процессе культивирования в условиях *in vitro* основания этих проростков утолщались, образуя микроклубнелуковички-регенеранты второго порядка. В результате каждая исходная микроклубнелуковица давала от 5 до 7 дочерних микроклубнелуковиц, причем этот процесс может повторяться 2–3 раза в год.

В большинстве питательных сред, используемых для роста изолированных тканей, источником углерода является сахароза, обычно в концентрации 20–40 г/л [5]. Но для некоторых тканей концентрация сахарозы может варьировать от 40 до 80 г/л [1, 6]. Нами изучалась зависимость роста побегов и образования микроклубнелуковичек шафрана посевного от концентрации сахарозы в среде. Оказалось, что на среде № 5 при содержании сахарозы 40–60 г/л образовавшиеся клубнелуковички были более крупного размера, чем на среде с 20–30 г/л сахарозы.

Таким образом, нами разработан метод клонального микроразмножения *C. sativus* с получением эмбриоидов из каллусной ткани и последующим формированием из них микроклубнелуковичек, при этом каждый этап развития последних находится под строгим гормональным контролем.

Кафедра микробиологии и биотехнологии
растений и микроорганизмов

Поступила 07.10.2010

ЛИТЕРАТУРА

1. Милыева Э.Л., Азизбекова Н.Ш., Комарова Э.Н., Ахундова Д.Д. Физиология растений. М.: Наука, 1995, т. 42, № 1, с. 127–134.
2. Dalby A. Dangerous Tastes: The story of Species. 2002. <http://books.google.com>
3. Papandreou M.A., Kanakis C.D., Polissiou M.G., Efthimiopoulos S., Cordopatis P., Margaritis M., Lamari F.N. J. Agric Food Chem., 2006, v. 54, № 23, p. 8762–8767.
4. Чуб В.В., Власова Т.А., Бутенко Р.Г. Физиология растений. М.: Наука, 1994, т. 41, № 6, с. 815–820.
5. Murashige T., Skoog F. Physiol. Plantarum, 1962, v. 15, p. 473–497.
6. Попов Ю.Г., Петросян М.Т., Цовян Ж.В. Доклады и тезисы 3-ей Международной конференции «Современные проблемы беспочвенного культивирования растений». Ер.: Гитутюн, 1999, с. 95.

Մ. Թ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Ն. Ժ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Կ. Գ. ՊՈՊՈՎ

ՑԱՆԹՍԱՅԻՆ ԶԱՖՐԱՆԻ (*CROCUS SATIVUS L.*) ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՅԻ
ՍՏԱՑՈՒՄԸ

Ամփոփում

Ստացվել է ցանքային զաֆրանի (*Crocus sativus L.*) մեկուսացված կուլտուրան, մշակվել են կալուսի կայուն աճի, օրգանոգենեզի խթանման և միկրոբազմացման պայմանները:

M. T. PETROSYAN, N. Zh. SAHAKYAN, Yu. G. POPOV

INTRODUCTION OF SAFFRON (*C. SATIVUS L.*) IN ISOLATED CULTURE

Summary

Isolated culture of saffron (*Crocus sativus L.*) was obtained. The conditions of callus stable growth, micro-propagation and organogenesis were developed.