

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ШАФРАНА (*CROCUS S.L.*)

Шафран (*Crocus S.L.*) как ценнейшее лекарственное растение известно с древнейших времен. В последние годы ареал выращивания шафрана в мире имеет тенденцию к увеличению, хотя в ряде Европейских стран производство его цветочной продукции снижается в связи с высокой себестоимостью и урбанизацией сельских районов. К настоящему времени потребность в шафране значительно превышает нормы его воспроизводства. Увеличивающийся в мире спрос на цветочную продукцию шафрана стимулирует исследования, связанные с его воспроизводством, в том числе, и с применением биотехнологических методов.

Биотехнология, на Первом Международном Симпозиуме по шафрану [1], была включена в список приоритетных направлений на ближайшие 100 лет. Биотехнологические исследования, направленные на разработку приемов и методов размножения *Crocus in vitro*, в настоящее время интенсивно проводятся как в направлении собственно микроклонального размножения через культуру меристем, так и путем индуцированного соматического эмбриогенеза и морфогенеза из каллусных клеток.

Перспективы биотехнологии *in vitro* вполне обоснованно рассматриваются как основа для реализации будущих достижений в молекулярно-генетическом усовершенствовании этой культуры, а также как путь получения посадочного материала, свободного от патогенов.

Хотя исследования в области клеточной биотехнологии *Crocus* уже имеют свою историю [2–4], однако до настоящего времени достигнутые результаты не дают оснований для утверждения о наличии методических основ, позволяющих эффективно и стабильно получать результаты, обеспечивающие производство посадочного материала с достаточно высоким коэффициентом размножения.

Анализ имеющейся в открытой печати информации действительно свидетельствует о том,

что одной из причин сложившегося положения в данной области является отсутствие единого выработанного подхода в исследованиях по биотехнологии *in vitro*. Весьма возможно, проблема заключается и в недостаточном учете особенностей биологии этого удивительного растения, а также малоизученностью экоформ в связи с географическим дифференцированием. Вирусологические исследования последних лет [5] в определенной степени позволили пролить свет на природу различных экоформ *Crocus*. Наличие многих вирусов в этом растении, в том числе имеющих и бессимптомную природу, рассматривается в становлении экоформ шафрана как результат коэволюции и как реальный результат возможного горизонтального переноса генов, связанных с метаболизмом.

Существование в десятках стран мира научных центров по изучению биологии *Crocus* и связанных с этой культурой исследований, в том числе, цитотоксической активности экстрактов из рылец цветков шафрана, вселяет надежду на прогресс в понимании его биологии, включая и тайну происхождения этого триплоида, неизвестного в диком состоянии, не имеющего полового размножения и культивируемого уже 5000 лет.

Первый этап в исследованиях по индукции каллусогенеза, морфогенеза, органогенеза *in vitro*, который характеризовался установлением оптимальных концентраций гормональных индукторов и их комбинаций, был успешно реализован, но, несмотря на большое количество и разнообразие вариантов сред, соотношений фитогормонов и полученных на этой основе эффектов, все это, однако, не способствовало выработке какого-либо единого методического подхода.

Последующий этап в развитии методических подходов основывался на использовании низкой положительной температуры (5 °C) для индукции органогенеза в одноэтапной схеме получения микроклубней из каллусных клеток, которая и является общепринятой в настоящее время.

Однако возможность максимального использования температурного фактора до конца не реализована. В этом аспекте классическое положение о влиянии состояния исходного экспланта на успехи в реализации морфофизиологических потенций *in vitro* относительно такого геофита как *Crocus* является наиболее иллюстративным. Наблюдения фенологического характера со стороны производителей цветочной продукции шафрана, буквально на протяжении поколений, свидетельствуют, что зимние месяцы с отрицательными температурами и относительно длительным периодом их прохождения во времени (являющиеся отклонением от нормы для данного региона) приводят к увеличению образования цветочных органов у *Crocus*. Следует отметить, что этот эффект проявляется пролонгировано во времени – осенью (сентябрь–октябрь) перед новым зимним периодом, после относительного летнего покоя, при котором отсутствуют надземные органы, и когда температура воздуха снижается с одновременным увеличением влажности почвы.

Таким образом, является очевидным, что состояние клубнелуковиц, как исходного экспланта в случае их биотехнологического использования, определяется календарно задолго до оптимального времени их использования в экспериментах.

Наши исследования показали, что, когда природные показатели окружающей среды, определяющие функционирование программы онтогенетического развития *Crocus* настолько изменяются различно по годам (например, не редки случаи, когда осенний период по температурным показателям является продолжением летнего периода), что получение стабильных результатов *in vitro* является весьма и весьма проблематичным.

При этих условиях единственным вариантом, позволяющим гарантировать постоянную вероятность реализации эффектов *in vitro*, может быть стандартное и последовательное моделирование этапов онтогенеза в искусственных условиях, при культивировании исходного материала для использования его в биотехнологических работах.

Предваряющим этапом этих работ должен являться анализ геномной активности *Crocus* (экспрессия м-РНК) на отдельных этапах онтогенетического развития и на основании полученных данных выявление стадий компетентности к гормональным факторам для индукции эмбриогенеза, морфогенеза и органогенеза *in vitro*.

Влияние температурного фактора на течение морфофизиологических процессов как

in vivo так и в дальнейшем *in vitro*, может быть связано с его влиянием на уровень свободного гиббереллина и гиббереллиноподобных веществ, когда пониженные температуры способствуют их высвобождению из связанного состояния. Компетентность к данному фитогормону характерна для *Crocus*, а факт влияния экзогенного гиббереллина на активацию запасных меристем в клубнелуковицах шафрана и увеличение количества образовавшихся цветочных побегов доказан экспериментально [6].

Еще одним существенным фактором, способным оказывать влияние на морфофизиологические процессы *in vitro* и, как следствие, на эффективность размножения в культуре, является содержание селена в клубнелуковицах *Crocus*, который, весьма возможно, вкуче с другими соединениями обеспечивает весь спектр уникальных фармакологических качеств этого растения. *Crocus*, хотя его статус как селенонакопителя не установлен, способен аккумулировать селен в своих тканях, переводя токсичный неорганический селен в органические формы, причем в отличие от многих растений-селенонакопителей, у шафрана он в основном концентрируется в рыльцах цветков, что видимо является механизмом детоксикации от всех форм селена, учитывая кратковременность и скоротечность процесса цветения.

По нашим данным, исходные растения, использованные в опытах *in vitro* при содержании селена в почве (Апшеронский п-ов, пос. Бильгях), равного 0,85 мг/кг сухого веса, были способны накапливать тотальный селен в рыльцах цветков в диапазоне, начиная от фонового содержания в почве до более чем 4-кратного его превышения.

В связи с тем, что селен и его соединения тормозят деление растительных клеток, нами было проведено предварительное культивирование клубнелуковиц *Crocus* в течение одного сезона на субстратах, исключающих наличие селена, и это дало возможность повысить компетентность исходных тканей клубнелуковиц к гормональным индукторам в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Исходным материалом в наших исследованиях явились клубнелуковицы *Crocus*, выращенные в районе поселка Бильгях Апшеронского полуострова. Для биотехнологических исследований использовались клубнелуковицы средней возрастной категории (4–5-летние), которые подвергались поверхностной стерилизации и куль-

тивировались в стерильном песчаном субстрате в течение одного сезона в оранжерейных условиях. Время использования клубнелуковиц было определено в ранее проведенных экспериментах, и оптимальным явился поздновесенний период (начало завядания и подсыхания надземных органов). Для изучения влияния гиббереллина на эмбриогенез и органогенез *Crocus* использовали подход, заключающийся в предварительной инкубации клубнелуковиц в растворах ГА₃ от 20–50 мг/л в течение 12 и 24 часов, рН растворов гиббереллина доводился до значений 5,6–5,8. В качестве исходного экспланта использовались диски из клубнелуковиц, нарезанные в поперечном направлении. Клубнелуковицы стерилизовались в 70–80 % спирте с последующей 2–3 кратной промывкой стерильной водой. Для дальнейшей стерилизации применяли раствор гипохлорита натрия с 5 % содержанием основного вещества, при различном разбавлении, с добавлением TWEEN 20 и последующей 3-кратной промывкой стерильной водой в течение 10–15 минут. Простерилизованные диски высаживались на агаровую среду М-С [7]. Варианты среды содержали БАП (6-бензиламинопурин), 2,4 Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), кинетин (6-фурфуриламинопурин), НУК (1-нафтилуксусная кислота), в различных концентрациях (мг/л) и соотношениях. агар – 0,7–0,8 %; сахароза – 30, 60, 90 г/л; рН среды – 5,6–5,8. Высаженный материал культивировался в темноте при 21 °С и относительной влажности 70–80 %.

После индукции образования каллуса на поверхности исходного экспланта, его роста и развития, на стадии формирования эмбрионных структур каллусные массы подвергали низкотемпературной инкубации (в условиях градиента температур) в течение 5 недель. В дальнейшем, экспериментальный материал вновь культивиро-

вался при температуре 21–23 °С, в темноте, до полного формирования клубнелуковиц *in vitro*.

Результаты и обсуждение

Проведенные эксперименты с использованием температурного градиента позволили выявить варианты сред, обеспечивающих наиболее эффективный органогенез. В условиях же низкотемпературной инкубации, при постоянной температуре, эти среды не демонстрировали проявление подобных эффектов органогенеза.

В зависимости от концентрационных соотношений фитогормонов и уровня начальных стадий эмбриогенеза, перед температурной инкубацией, на среде, содержащей БАП (4 мг/л) и НУК (1 мг/л) наблюдалось образование от 10 до 25 микроклубней в одной колбе (рис. 1)

Следует отметить, что в процессе температурной инкубации по использованной схеме, в ряде случаев, в зависимости от состава среды отмечалось также увеличение количества образовавшихся эмбриоидов.

Увеличение концентрации сахарозы в среде до 60–90 г/л приводило к увеличению эмбриоидов, однако довольно значительно в этом случае увеличивалась инфицированность, причем проявлялась она во времени достаточно поздно и была связана с инфицированностью внутренних тканей клубнелуковиц.

Использование гиббереллина в наших экспериментах было эффективно только в вариантах сред, в которых кроме БАП присутствовали 2,4-Д и кинетин. Для других вариантов использование гиббереллина было малоэффективным, а в ряде случаев отрицательно влияло на процессы органогенеза. Это может свидетельствовать о сложных взаимодействиях ГА₃ с другими фитогормонами и видимо может являться особенностью характерной для клубнелуковиц *in vitro*. Имеются данные, о положительном влиянии экзогенного

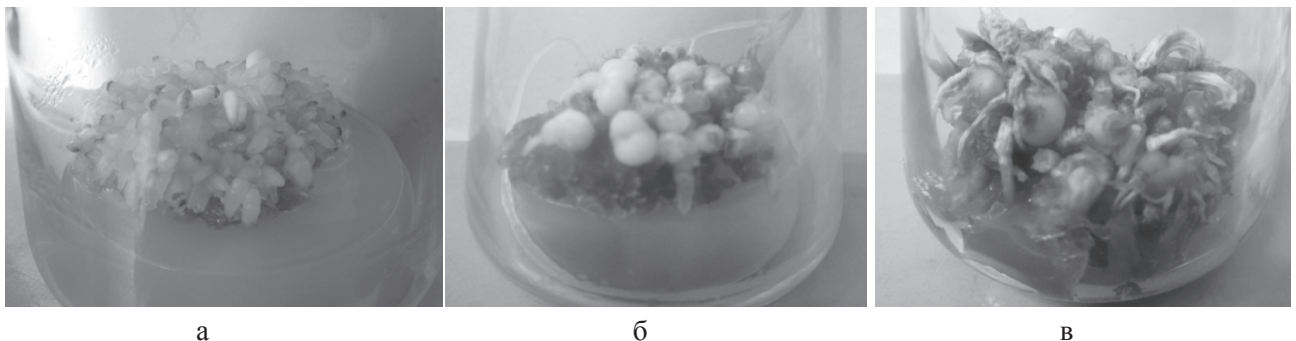


Рис. 1. Последовательные стадии эмбриогенеза (а), морфогенеза (б) и органогенеза (в) у *Crocus* в культуре *in vitro*

гиббереллина на органогенез из каллусных клеток, полученных из листовых эксплантов *Crocus*, при различном гормональном фоне [8].

Выводы

Таким образом, учет вышеперечисленных факторов, способных оказывать определенное влияние на эффективность органогенеза в условиях *in vitro*, а также использование температурного градиента, не применяемого ранее, позволил реализовать морфогенез на этапе органогенеза и *de novo* получить клубнелуковицы *in vitro*. Подобный эффект до настоящего времени документально не представлен в открытой печати. Примененный градиент температур может в перспективе дать возможность также сократить время инкуба-

ции, которое в настоящее время равно 5 неделям при стабильной температуре.

Представленные в данной публикации некоторые методические подходы в биотехнологии размножения *Crocus*, являются одним из этапов разработанной стратегии по изучению биологии апшеронской популяции шафрана, на основе молекулярно-генетических, биохимических, микробиологических, вирусологических исследований, реализация которой даст возможность для более успешных исследований в области биотехнологического размножения *Crocus* и получения посадочного материала, дающего цветочную продукцию с максимальной фармакологической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fernández J.A., Abdullaev F. Foreword and Preface [Электронный ресурс] // Online articles of I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology. – 2004. – Режим доступа: http://www.ishs.org/ishs-article/650_0.
2. Fernández J.A. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron // Recent Research in Developmental Plant Science. – 2004. – 2. – С. 127–159.
3. Kafi M., Koocheki A., Rashid M.H., Nassiri N. Saffron (*Crocus sativus*) // Production and Processing. – Enfield, NH, USA: Science Publishers. – 2006. – 244 p.
4. Fernandez J.A. Genetic resources of saffron and allies (*Crocus* spp.) // Acta Horticulturae. – 2007. – 739. – P. 167–185.
5. Grilli M., Caiola, Faoro F. Latent virus infections in *Crocus sativus* and *Crocus cartwrightianus* // Phytopathol. Mediterr. – 2011. – 50. – P. 175–182.
6. Азизбекова Н.Ш., Миляева Э.Л., Лобова Н.В. Влияние гиббереллина и кинетина на формирование цветочных органов шафрана // Физиология растений. – 1978. – 25, вып.3. – С. 603–609.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bicassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
8. Raja W., Zaffer G., Wani S.A. *In vitro* microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.) [Электронный ресурс] // Online articles of II International Symposium on Saffron Biology and Technology. – 2007. – Режим доступа: http://www.ishs.org/ishs-article/739_37.

KARAGYOZOV T.H., MAMMADOVA M.H., ASADOVA S.SH., AZIZOV I.V.

Institute of Botany of Natl. Acad. Sci. of Azerbaijan,

Azerbaijan, AZ 1073, Baku, Badamdar highway, 40, e-mail: biotexnoloqaz@mail.ru, ibrahim.azizov47@gmail.com, info@fliporamailer.com

SOME PROBLEMS AND PERSPECTIVES OF BIOTECHNOLOGICAL PROPAGATION OF SAFFRON (*CROCUS* S.L.)

Aims. To develop effective approaches for biotechnological propagation of *Crocus*. **Methods.** *In vitro* methods for the induction of morphogenesis and organogenesis of *Crocus* are used. **Results.** Factors influencing morphogenesis and organogenesis of saffron (*Crocus*) are considered. By using a temperature gradient under *in vitro* conditions was obtained *de novo* from 10 to 25 microcorms. **Conclusions.** Some issues related to biotechnology of *Crocus* were elucidate. The effect of the temperature factor and selenium on the efficiency of callus formation and morphogenesis *in vitro* are discussed. The methodical approaches to increase the efficiency of morphogenesis and organogenesis of *Crocus* in *in vitro* conditions were offered.

Keywords: saffron, *Crocus* S.L., *in vitro*, morphogenesis, temperature gradient.