

ТЕХНОЛОГІЯ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ

Д. С. Загородня, І. Б. Петенко, Ю. І. Тепла, Р. О. Петріна

Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології
romanna.o.petrina@lpnu.uaКУЛЬТИВУВАННЯ *CROCUS SATIVUS* В УМОВАХ *IN VITRO*<https://doi.org/10.23939/ctas2023.01.093>

Зазначено, що *Crocus sativus* (шафран) містить біологічно активні речовини та застосовується в харчовій та косметичні промисловостях. Із збереженням рослинного різноманіття в природі використано біотехнологічний метод культури тканин та введено рослину в умови *in vitro*. Досліджено вплив складу середовища на ріст біомаси та одержання бульбоцибулин. Найкращі результати отримано за використання регуляторів росту бензиламінопурину (БАП) та нафтилоцтової кислоти (НОК) у кількості – 20 мкмоль/л БАП + 15 мкмоль/л НОК. Час культивування був 12 тижнів. Після пересаджування в горщики із глинистим ґрунтом проростали та зацвітали бульбоцибулини масою 2,5 г. Використання біотехнологічного методу культури тканин є економічно, екологічно вигідним та перспективним.

Ключові слова: *Crocus sativus*; приймочки; шафран; біологічно активні речовини; культивування; фітогормони.

Вступ

Crocus sativus (шафран) належить до родини Півникових (*Iridaceae*). Це лікарська, пряна та декоративна рослина, яка використовується в харчових продуктах як барвник та ароматизатор, а також у косметичних препаратах для очищення та зволоження. Приймочка маточки крокусу містить багато біологічно активних речовин (БАР), а саме флавоноїди, амінокислоти, вітаміни (рибофлавін і тіамін), антоціани, білки, амінокислоти, мінеральні речовини, крохмаль, камедкроцетин, кроцин, пікрокроцин, сафранал [1–3]. Колір шафрану пов'язаний з наявністю кроцину, фармакологічні властивості – пов'язані з кроцетином. У літературі описано ряд біологічних активностей *Crocus sativus*, а саме нейропротекторна, протикашльова, гіполіпідемічна, протисудомна, антидепресантна, анксиолітична, серцево-судинна, захисна, протипухлинна і антиоксидантна [4, 5].

Рід *Crocus* поширений від Середземномор'я на Заході до Кашміру на Сході і Південному-заході Азії. *Crocus sativus* у дикому стані не трапляється. Вважають, що культивування шафрану розпочалось у 3000–2300 роках до нашої

ери. Нині час вид *Crocus sativus* культивують у Франції, Нідерландах, Іспанії, Італії, Ізраїлі, Швейцарії, Індії, Пакистані, Ірані, Єгипті, Китаї, Японії, ОАЕ та Австралії. Найбільше рослина культивується в Ірані [1, 3]. В Україні *Crocus sativus* росте на території біосферних заповідників “Карпатський” та “Медобори”, природних заповідників “Горгани”, “Синеvir”, “Вижницький”, “Подільські Бескиди”, “Подільські Товтри”, “Сколівські Бескиди”.

Європейська комісія у грудні 2019 року у Брюсселі презентувала Зелену угоду (The European green deal) [6], де багато уваги приділяється вирішенню проблем із кліматом та довкіллям. Однією з цілей стратегії Зеленої угоди є захист довкілля, збереження біорізноманіття та здоров'я людини. Оскільки використання рослини пов'язане із БАР, які містяться у ній та використовуються для харчових, косметичних чи гігієнічних засобів, зменшуються її популяції. Біотехнологічний метод культури тканин дозволяє зберегти рослину й отримати високоякісні та рідкісні вторинні метаболіти [7–9]. Метод культури тканин має ряд переваг, порівняно із вирощуванням лі-

карських рослин на полях, теплицях, завдяки можливості створити стерильні та контрольовані умови, регулювати процеси розвитку, такі як органогенез та продукування тканин із високим вмістом БАР [7, 10]. Використовуючи метод культури тканин, можна отримати калусну біомасу в необмеженій кількості й використовувати її як екологічно чисту сировину.

Застосування методу культури тканин нині дозволяє отримувати біомасу рослини, не зважаючи на пору року, клімат, не потребує великих площ для вирощування та зберігає біорізноманіття рослин. Оскільки є потреба в біомасі рослин для використання у харчовій, косметичній та фармацевтичній промисловостях, застосування біотехнологічного методу є економічно й екологічно вигідним.

Метою статті є введення в умови *in vitro* рослини *Crocus sativus* та дослідження впливу складу середовища на ріст бульбоцибулин.

Матеріали та методи досліджень

Експериментальні роботи з культивування рослини проводили за класичними методиками. Усі роботи з ізолюваними тканинами та органами виконували у ламінарному боксі. Перед початком роботи ламінарний бокс опромінювали бактерицидними ультрафіолетовими лампами протягом 50 хв. Для стерилізації внутрішньої поверхні ламінарного боксу і супутнього обладнання використовували 70 % етанол. Живильні середовища та дистильовану воду стерилізували в автоклаві за тиску 1 атм. і температури 120 °С протягом 20 хв. Лабораторний посуд стерилізували у сушильній шафі за температури 220 °С протягом 3 год. Як об'єкт дослідження використано пиляки *Crocus sativus*, проведено поверхневу стерилізацію експлантів в асептичних умовах, згідно з загальноприйнятими рекомендаціями, які попередньо занурювали у 70 % етанол на 3 хв, а потім обробляли 30 % H₂O₂, час експозиції – 20 хв. Після обробки стерилізуючими розчинами буль-

боцибулини промивали стерильною дистильованою водою тричі по 5 хв.

Стерилізовані бульбоцибулини розрізали гострим скальпелем на скибочки та культивували на середовищі МС із різними концентраціями ауксинів і цитокінінів. Далі експланти культивували в чашках Петрі на агаризованому живильному середовищі Мурасиге Скуга (МС) за 16-годинного фотоперіоду і температури +24°С. Для дослідження умов розмноження використовували агаризоване середовище МС, доповнене екзогенними регуляторами росту.

Розчини індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК), нафтилоцтової кислоти (НОК) і 2,4-дихлорфеноксоцтової (2,4-Д) готували так: 10 мг речовини розчиняли в невеликій кількості етанолу та додавали дистильованої води до 10 мл. Розчини кінетину (Кн), бензиламінопурину (БАП) готували тає: 10 мг речовини розчиняли у невеликій кількості 1 % оцтової кислоти та додавали дистильованої води до 10 мл. Розчин тидіазурону (ТДЗ) готували так: 10 мг речовини розчиняли у невеликій кількості 1 % гідроксиду натрію та додавали дистильованої води до 10 мл.

Результати дослідження та обговорення

Crocus sativus містить вісім триплетів хромосом, тому через генотипну особливість не здатна до статевого розмноження. Рослина розмножується тільки за допомогою бульбоцибулин. Використовуючи метод культури тканин з експлантів, індукували нові рослини. Використано модифіковане середовище МС із концентрацією сахарози – 40 г/л, що підвищує осмотичний тиск й пригнічує вакуолізацію та звуження цитоплазми. Також збільшена концентрація сахарози позитивно впливає на ріст бульбоцибулин. Додано в середовище регулятори росту – 20 мкмоль ТДЗ та 10 мкмоль ІОК. Найбільша кількість бульбоцибулин на цьому середовищі становила 70 одиниць. Час культивування нових бульбоцибулин – 12 тижнів (табл. 1).

Таблиця 1

Результати одержання бульбоцибулин на середовищі МС із ТДЗ та ІОК (10 мкмоль), концентрація сахарози – 4 %

ТДЗ, мкмоль	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	25	30
Кількість бульбоцибулин, шт	4	10	16,5	21,9	28	33,7	45,7	59,5	70	61	50,5

Культивування *Crocus sativus* в умовах *in vitro*

Булбоцибулини перенесено на нові середовища того ж складу для проростання. Також у дослідженні використано модифіковане середовище МС із концентрацією сахарози – 3 %, та з різними комбінаціями регуляторів росту. Експерименти проведено без і з активованим вугіллям. Для кращого ризогенезу в середовище МС дода-

вали 0,5 мг/л активованого вугілля. Максимальний показник проростання (90 %) був на середовищі МС із 20 мкмоль/л БАП + 15 мкмоль/л НОК без використання активованого вугілля. На середовищі МС із активованим вугіллям найкращий результат (80 %) із 5 мкмоль/л БАП + 3 мкмоль НОК (табл. 2).

Таблиця 2

Результати досліджень проростання бульбоцибулин на середовищі МС з БАП+НОК

БАП, мкмоль/л	НОК, мкмоль/л	Активоване вугілля., мг/л	Схожість, %
10	15	–	70
12,5	15	–	70
15	15	–	75
17,5	15	–	75
20	15	–	90
25	15	–	65
30	15	–	60
1,5	1	0,5	–
2,5	1	0,5	–
5	1	0,5	65
1,5	2	0,5	–
2,5	2	0,5	–
5	2	0,5	65
1,5	3	0,5	–
2,5	3	0,5	75
5	3	0,5	80
1,5	4	0,5	–
2,5	4	0,5	–
5	4	0,5	–

Таблиця 3

Результати досліджень проростання бульбоцибулин на середовищі МС з ІОК+ТДЗ та з 2,4–Д+Кн

ІОК, мкмоль/л	ТДЗ, мкмоль/л	2,4–Д, мкмоль/л	Кн, мкмоль/л	Схожість, %
2,5	15	–	–	–
5	15	–	–	–
7,5	15	–	–	–
10	15	–	–	–
12,5	15	–	–	70
15	15	–	–	70
17,5	15	–	–	75
–	–	2,5	2	–
–	–	5	2	–
–	–	7,5	2	–
–	–	10	2	60
–	–	12,5	2	60
–	–	15	2	55
–	–	17,5	2	65
–	–	20	2	70
–	–	30	2	60

Також проведено дослідження проростання бульбоцибулин на середовищах МС з ІОК+ТДЗ та 2,4-Д+Кн (табл. 3).

При використанні середовища МС із ТДЗ + ІОК та сахарози – 30 г/л, відбувалось збільшення розміру бульбоцибулин. Максимально отримана вага бульбоцибулин становила 2,5 г, кількість – 60 % від загальної кількості бульбоцибулин на середовищі МС із 15 мкмоль ТДЗ та 12,5 мкмоль ІОК. Більш одноманітні бульбоцибулини з кількістю 70 %, вагою 1,5–2,0 г були вирощені на середовищі МС із 15 мкмоль ТДЗ та 7,5 мкмоль ІОК. Час культивування 8 тижнів (табл. 4).

При культивуванні верхівкових бруньок, отриманих із польових бульбоцибулин, які активно росли, отримано максимальну вагу бульбо-

цибулини на середовищі МС із 15 мкмоль НОК + 20 мкмоль БАП (табл 5.). Концентрація сахарози – 3 %. Час культивування – 12 тижнів.

Регеновані плоди *in vitro* були також субкультивовані на середовищі МС, доповненому ТДЗ (2,5–30 мкмоль/л), ІОК (10 мкмоль/л) та 4 % сахарози, і оцінені на збільшення розміру плодів. Окрім того, верхівкові вегетативні бруньки з активних бульбоцибулин (отриманих із поля) також культивували на середовищі МС, доповненому різною концентрацією БАП (5–30 мкмоль/л) за різних джерел вуглецю (сахароза та харчовий цукор), щоб відзначити найефективніші комбінації для виробництва бульбоцибулин більшого розміру. Концентрація НОК (15 мкмоль/л) залишалася однаковою в усіх цих обробках.

Таблиця 4

Результати досліджень збільшення бульбоцибулин на середовищі МС з ТДЗ+ІОК

ІОК, мкмоль/л	ТДЗ, мкмоль/л	Мін. вага бульбоцибули- ни, г	Схожість, %
1,5	15	1,5	50
2,5	15	1,5	50
5	15	1,5	55
7,5	15	1,5	70
10	15	2,5	60
12,5	15	2,0	55
17,5	15	2,0	60
20	15	1,5	30
25	15	1,5	30
30	15	1,5	30

Таблиця 5

Результати досліджень росту активних верхівкових бруньок на середовищі МС із НОК (15 мкмоль/л) + БАП

НОК (15 мкмоль/л)+ + БАП, мкмоль/л	Харчовий цукор, г/л	Сахароза, г/л	Мін. вага бульбоци- булини, г	Схожість, %
5	–	30	1,5	80
10	–	30	1,5	70
15	–	30	2,0	60
20	–	30	2,5	50
25	–	30	2,0	45
30	–	30	1,5	50
5	30	–	–	–
10	30	–	–	–
15	30	–	1,5	45
20	30	–	1,5	40
25	30	–	–	–
30	30	–	–	–

Вирощені плоди *in vitro* були розділені на три групи з мінімальною вагою 2,5 г, 2,0 г і 1,5 г. Ці плоди виймали, і після висихання в тіні (7 днів) у добре провітрюваному приміщенні з кімнатною температурою (25 °C) пересаджували в

невеликі горщики з глинистим ґрунтом. Ці горщики утримували в тепличних умовах для проростання та цвітіння за температури 20±3 °C, вологості 60–70 % і регулярно контролювали до 6 тижнів (табл. 6).

Таблиця 6

Результати досліджень росту бульбоцибулин *ex vitro*

Мін. вага бульбоцибулини, г	Час проростання, %	Час цвітіння, %
1,5	25	25
2,0	40	19
2,5	25	0

Найкращий результат росту спостерігався в бульбоцибулин масою 2,5 г (табл. 6). Результати були представлені як середнє значення.

Висновки

Результати досліджень показали, що *Crocus sativus* культивується в умовах *in vitro*. Залежно від природи фітогормонів, їх концентрації та співвідношення, отримано різні результати схожості. Найкраща схожість (90 %) отримана за використання 20 мкмоль/л БАП + 15 мкмоль/л НОК протягом 12 тижнів. У горщиках із глинистим ґрунтом проростали та зацвітали бульбоцибулини масою 2,5 г.

Crocus sativus як важлива культура комерційного значення є дорогою через обмежене отримання. Мікророзмноження шафрану є перспективним, але у тих випадках, коли ми зможемо стимулювати одержання квітів у комерційних масштабах.

Результати дослідження підтверджують одержання бульбоцибулин в умовах *in vitro*, подальший вегетативний ріст і цвітіння в теплиці. Це відкриває можливості одержання рослини в умовах *in vitro*, комерційне виробництво приймочок маточок шафрану, визначення біологічно активних речовин, а саме кроцину, сафраналу і пікрокроцину. Біотехнологічний метод є економічно та екологічно вигідним.

References

1. Mykhailenko, O. O. (2019). Investigation of the biological active compounds of *crocus sativus* stigmas

(saffron) from Ukraine. *Farmatsevtichnyi zhurnal*, 6(6), 70–76. DOI:10.32352/0367-3057.6.19.08.

2. Nassiri-Asl, M., Hosseinzadeh, H. (2015). Neuropharmacology Effects of Saffron (*Crocus sativus*) and Its Active Constituents. *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*, Т. 6, 6, 29–39. DOI:10.1016/B978-0-12-411462-3.00003-5.

3. Pandita, D. (2021). Saffron (*Crocus sativus* L.): phytochemistry, therapeutic significance and omics-based biology. In book: *Medicinal and Aromatic Plants: Expanding their Horizons through Omics*, Т. 6, 6. С. 325–396. DOI:10.1016/B978-0-12-819590-1.00014-8.

4 Abdullaev, F. (2007). Biological Properties and Medicinal Use of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Horticulturae*, 739 (739), 739. DOI:10.17660/ActaHortic.2007.739.44.

5. Karaoğlu, C., Parmaksız, I., Sarihan, O. E., Arslan, N. (2007). In Vitro Micropropagation of Saffron. *Acta Horticulturae*, 739 (1), 723–727. DOI:10.17660/ActaHortic.2007.739.28.

6. Communication from the commission to the european parliament, the european council, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions. (2019). In *The European Green Deal*. Brussels, 24.

7. Cardoso, J. C. (2019). Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37 (2), 124–132. DOI: 10.1590/S0102-053620190201.

8. Raina, R., Chand, R., Sharma, Y. P. (2011). Conservation strategies of some important medicinal plants. *International Journal Medical Arom. Plants*, 1 (3), 2249–4340.

9. Suberlyak, S. A., Zahorodnya, D. S., Hubriy, Z. V., Havrylyak, V. V., Petrina, R. O. (2020). Tkanynni kultury likarskykh roslyn Karpat dlya zberezhennya bioriznomanitya. *Biologichni doslidzhennya – 2020: zbirnyk*

Д. Б. Загородня, І. Б. Петенко, Ю. І. Тепла, Р. О. Петріна

materialy KHI Vseukrayinskoyi naukovo-praktychnoyi konferentsiyi (21–23 bereznya 2020 r., Zhytomyr), 358–360.

10. Kunakh, V. A. (2005). Biotekhnolohiya likarskykh roslyn. Henetychni ta fizioloho-biokhimichni osnovy. Kyiv: Lohos, 730.

D. S. Zahorodnia, I. B. Petenko, Yu. I. Tepla, R. O. Petrina

Lviv Polytechnic National University,

Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

CULTIVATION FOR *CROCUS SATIVA* IN VITRO

Crocus sativus (saffron) contains biologically active substances and is used in the food and cosmetic industries. With the preservation of plant diversity in nature, the biotechnological method of tissue culture was used and the plant was introduced into in vitro conditions. The influence of the composition of the nutrient medium on the growth of biomass and production was studied. The best results were obtained with the use of growth regulators benzylaminopurine (BAP) and naphthylacetic acid (NOK) in the amount of 20 $\mu\text{mol/l}$ BAP + 15 $\mu\text{mol/l}$ NOK. Cultivation time was 12 weeks. After transplanting into pots with clay soil, bulbs weighing 2.5 g sprouted and bloomed. The use of the biotechnological method of tissue culture is economically, ecologically beneficial and promising.

Key words: *Crocus sativus*; saffron; biologically active substances; cultivation; phytohormones.