
A jőféle sáfrány rokonsági körének molekuláris biológiai megközelítése

Zubor Ákos¹ – Surányi Gyula² – Győri Zoltán¹ –
Borbély György² – Prokisch József¹

¹Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
Mezőgazdaságtudományi Kar,

Élelmiszertudományi és Minőségbiztosítási Tanszék, Debrecen

²Debreceni Egyetem,

Természettudományi Kar,

Növénytan Tanszék, Debrecen

a.zubor@freemail.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A jőféle sáfrány (*Crocus sativus* L.) egy steril, triploid növény, magot nem terem és csak emberi kultúrákban létezik. A jőféle sáfrány eredete még mindig nem tisztázott, feltételezhetően autoploiploid mutáns vagy hibrid. A jelenlegi rendszertani publikációk és a korábbiak többsége is a *C. cartwrightianus*, egy vadon élő faj leszármazottjának tartják. A sáfrány sterilitása miatt ésszerűnek tűnt a rokonsági viszonyokat vizsgáló klasszikus taxonómiai tanulmányokat molekuláris biológiai módszerekkel is kiegészíteni. A DNS polimorfizmuson alapuló AFLP módszer megerősítette a feltételezett szoros kapcsolatot ezen fajok között.

Kulcsszavak: *Crocus sativus*, Iridaceae, AFLP, DNS alapú taxonómia

SUMMARY

The hay saffron (*Crocus sativus* L.) is a sterile triploid plant, known in human culture only, with no fertile seeds produced. The origin of saffron is still a mist, however it is assumed to be an autoploiploid mutant or a hybrid. The recent classification and most of the former taxonomic publications define *C. sativus* to be derived from *C. cartwrightianus*, a wild species. Because of the sterility of hay saffron it seemed to be reasonable to apply molecular biological methods to complete classical taxonomic studies in examining its relations. The DNA polymorphism based AFLP method has confirmed the close relationship between these species.

Keywords: *Crocus sativus*, Iridaceae, AFLP, DNA-based taxonomy

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A jőféle sáfrány (*Crocus sativus* L.) szolgáltatja a világon a legdrágább fűszert. A növény sterilis, triploid és csak emberi kultúrákban található. Ezek a tulajdonságok teszik ezt a kisméretű geofitont a rendszertani kutatások különösen érdekes tárgyává. A legújabb rendszertani publikáció (Mathew, 1999) és a korábbi osztályozó munkák (Mathew, 1980; Mathew, 1982) a *C. sativus*-t és a *C. cartwrightianus*-t egymás mellé sorolják. A *C. sativus*-t akár úgy, mint a *C. cartwrightianus* alfaját, akár, mint változatát, esetleg mutáns származékát. Néhány kertészeti kézikönyv még össze is keveri a kettőt (RHS, 1997). Akármennyire is hasonlítanak egymásra, mégis szükség van bizonyítékokra ezt a szoros kapcsolatot

illetően és hogy a sáfrány eredetét kiderítsük. Keresztezési kísérletekből tudjuk azonban, hogy a *C. sativus* (mely önsteril) csak a *C. thomasiival* volt képes magot produkálni, a *C. cartwrightianus*-szal nem (Grilli, 2003; Chichiricò, 1989). Jelen munka a DNS polimorfizmuson alapuló Amplified Fragment Length Polymorphism (felelőssített fragment hossz polimorfizmus) (Vos et al., 1995) módszerrel igyekszik hozzájárulni a sáfrány eredetének kiderítéséhez.

A *C. sativus* rendszertani helyzete a *Crocus* nemzetségen belül igen figyelemre méltó. Nem csak a saját sorozatának típus faja, hanem a szekció és a subgenus is róla kapta a nevét.

Jelen tanulmány célja, hogy a rendelkezésre álló fajokat az AFLP módszer segítségével összehasonlítsa és hogy egy százalékos hasonlósági rendszert állítson fel közöttük.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A *C. sativus* és rokonsági körének, valamint néhány további faj összehasonlításához az AFLP módszer egy módosított változatát teljes genomális DNS mintákon alkalmaztuk.

A DNS minták

A következő DNS mintákat a Royal Botanic Gardens, Kew Jodrell Laboratory DNS bankjától vásároltuk (London, Nagy Britannia):

1. *C. sativus*
2. *C. cartwrightianus*
3. *C. oreoreticus*
4. *C. hadriaticus*
5. *C. pallasii* ssp *pallasii*
6. *C. thomasi*

A következő DNS minták egyéb gyűjtemények növényeiből származnak:

7. *C. nudiflorus*
8. *C. boryi*
9. *C. goulimy*
10. *C. clusii*
11. *C. reticulatus*

Ezekből a mintákból mi végeztük a DNS kivonást Zenogene növényi DNS tisztító kit segítségével (ZenonBio Kft., Szeged). Minden DNS mintát -18°C-on tároltuk felhasználásig.

AFLP

A módszerhez EcoRI és TruII (MseI-nek megfelelő) restriktions endonukleáz enzimeket, Y⁺/TangoTM puffert, T4 ligázt, Ligation Buffer-t és PCR Mastermixet (Fermentas, Litvánia) használtunk. Az EcoRI és TruII primereket a Bio Science Kft-nél (Budapest) szintetizáltattuk.

Az enzimátikus emésztést ~10 µl teljes térfogattal végeztük. 2 µl teljes genomális DNS-t, 1 µl (10U) EcoRI enzimmal, 2 µl Y⁺/TangoTM pufferrel, 5 µl vízben emésztettünk egy órán keresztül, 37°C-on, majd 1 µl (1U) TruII enzimet adtunk hozzá és 65 °C-on 20 percig inkubáltuk.

A ligálást 20 µl teljes térfogatban végeztük. 5 µl kettősen emésztett DNS-hez 1-1 µl (10 pmol) EcoRI és 1-1 µl (100 pmol) TruII adapter alsó és felső szálat, 1 µl T4 ligázt, 2 µl ligációs puffert és 8 µl vizet adtunk. Az elegyet 20°C-on 2 órán át inkubáltuk.

A módszert úgy egyszerűsítettük, hogy csak két AFLP primert használtunk három-három bővített bázissal és nem alkalmaztunk előzetes amplifikációt. A PCR reakciókat 25 µl teljes térfogatban végeztük a következő összeállításban: 2 µl ligált DNS templát, 2,5 µl (10 pmol/µl) EcoRI, 2,5 µl (100 pmol/µl) TruII primer, 12,5 µl PCR Mastermix és 5,5 µl H₂O. A termociklusokat a következőképpen állítottuk be: először egy 2 perces danaturáló lépés 94 °C-on, majd 94 °C 30 s., 65 °C 30 s. (ciklusonként 0,7 °C-os csökkenéssel), 72 °C 1 percig 12 cikluson keresztül, majd 94 °C 30 s., 56 °C 30 s., 72 °C 1 percig 23 cikluson keresztül, végül 72 °C 2 percig.

Gél analízis

A rendelkezésünkre álló rövid (20 cm) gélfuttató berendezés miatt egy módosított, 5-18% gradiens, akrilamid gélt használtunk a PCR termékek szeparálásához. Ehhez 1% TBE futtató puffert, 20 mA áramerősséget alkalmaztunk körülbelül 3 órán keresztül. Molekula tömeg markerként egy 100 bp DNA Ladder-t használtunk (Fermentas Co.) 1000-80 bp tartománnyal.

Az AFLP DNS mintázatokat Sammons-féle ezüsfestési eljárással jelenítettük meg (Sammons et al., 1981). A géleket Gene Genius Bio Imaging System és Gene Snap programok segítségével digitalizáltuk. A DNS vonalak pozícióját GeneTools programmal határoztuk meg.

Statisztikai elemzés

Az akrilamid gélen látható DNS vonal minták egyedi genetikai polimorfizmust, hasonlóságot, különbségeket mutat az adott minták között. Ezeket a mintákat statisztikailag a Jaccard Index segítségével analizáltuk, mely annak „becsült valószínűsége, hogy két objektum megegyezik egy, legalább az egyiküket jellemző változóban” (Podani, 1997). A Jaccard Index értékeit az SPSS programmal állapítottuk meg és rendeztük hasonlósági mátrixba, egyszerű kapcsolat klaszter módszert alkalmazva.

EREDMÉNYEK

Két külön gél eredményeit ismertetjük. Az elsőt kizárólag az RBG, Kew Jodrell laboratóriumának (Anglia) DNS Bankjából származó mintái alkotják, mivel ezeknél nem volt kétséges a fajok meghatározása. A második gélen az előző hat minta mellett más eredetű minták is szerepeltek. Minden kísérletet háromszori ismétlésben végeztünk.

Az AFLP módszerrel minden teljes genomális DNS-ből 18-26 polimorfikus DNS vonalat sikerült előállítani (1.a., 2.a. ábra). A vonalak túlnyomó többsége az összes mintában megtalálható. Minden mintában volt egyedi, csak rá jellemző vonal. Voltak kettő vagy több mintára jellemző megkülönböztető, de számukra közös vonalak is (1.b. ábra). Az első gélen a statisztikai elemzés eredményeként létrejövő, Jaccard indexekből álló táblázatból kiderült, hogy a *C. sativus*hoz leginkább a *C. cartwrightianus* 85%-ban hasonlított, míg a *C. thomasii* 75%-ban. Egyéb fajok között a hasonlóság 52% és 68% között változott, amely érték relatíve magas, mivel a fajok közti hasonlóság ritkán haladja meg az 50%-ot (1. táblázat). Ez a tény a *Crocus* csoportban lévő fajok relatív közelségéből adódhat. A második gélen a statisztikai analízis eltérő eredményt adott. A *C. sativus* hasonlóságának lehetősége egyaránt kb. 62% volt mind a *C. cartwrightianus*hoz, mind a *C. thomasii*hoz. Ebben az esetben a hasonlóságok értékei 25% és 62% között voltak találhatóak (2. táblázat). Mindkét esetben a hasonlósági értékek a *C. sativus*, *C. cartwrightianus* és a *C. thomasii* között voltak a legmagasabbak. Az összes eredményt egyszerű kapcsoltságon alapuló kladogramokon ábrázoltuk (1.c., 2.b. ábra).

1.a. ábra: Hat *Crocus* DNS minta AFLP mintázata

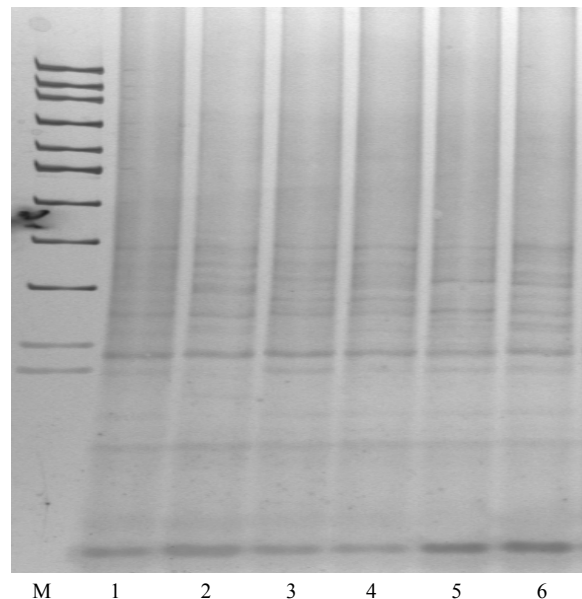


Figure 1.a: AFLP pattern of six *Crocus* DNA samples

M: molecular size marker, 1. *C. sativus*, 2. *C. cartwrightianus*, 3. *C. oreocreticus*, 4. *C. hadriaticus*, 5. *C. pallasii* ssp *pallasii*, 6. *C. thomasii*

2.a. ábra: Tizenegy *Crocus* DNS minta AFLP mintázata

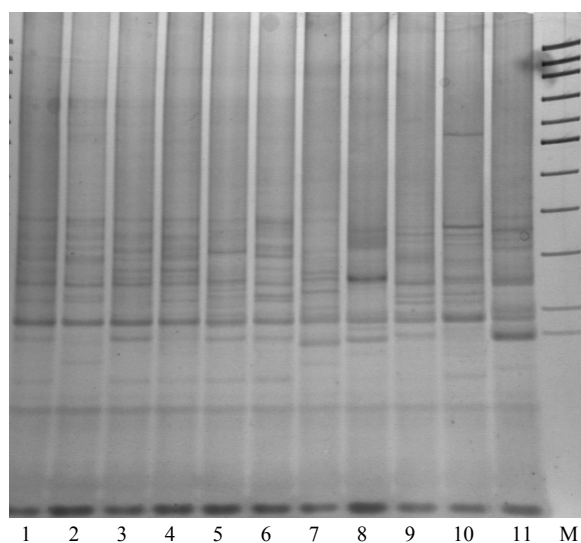
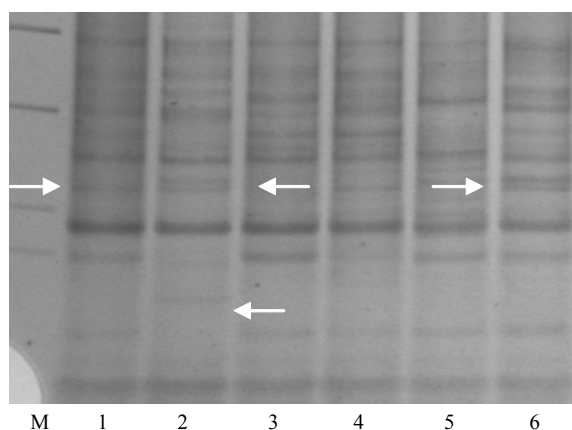


Figure 2.a: AFLP pattern of eleven *Crocus* DNA samples
M: molecular size marker, 1. *C. sativus*, 2. *C. cartwrightianus*, 3. *C. oreoreticus*, 4. *C. hadriaticus*, 5. *C. pallasii ssp pallasii*, 6. *C. thomasii*, 7. *C. nudiflorus*, 8. *C. boryi*, 9. *C. goulimyi*, 10. *C. clusii*, 11. *C. reticulatus*

1.b. ábra: Hat *Crocus* DNS minta kinagyított mintázata



(A fajok nevét lásd az 1.a. ábrán.) Az alsó nyíl egy fajra jellemző vonalat jelöl, a felsők az 1, 2 és 6 mintákra jellemző egyedi vonalakat jelölnek.

Figure 1.b: Enlarged AFLP pattern of six *Crocus* DNA samples
(For samples name see Fig. 1.a.) Lower arrow indicates unique band, specific for sample 2. Upper arrows indicate specific double bands for samples 1, 2 and 6.

1. táblázat

Az I gél Jaccard indexeinek hasonlósági mátrixa

	<i>C. sativus</i>	<i>C. cartwrightianus</i>	<i>C. oreoreticus</i>	<i>C. hadriaticus</i>	<i>C. pall. ssp. Pall.</i>	<i>C. thomasii</i>
<i>C. sativus</i>	1,000	0,850	0,682	0,652	0,609	0,750
<i>C. cartwrightianus</i>	0,850	1,000	0,583	0,560	0,520	0,714
<i>C. oreoreticus</i>	0,682	0,853	1,000	0,773	0,652	0,565
<i>C. hadriaticus</i>	0,652	0,560	0,773	1,000	0,560	0,609
<i>C. pall. ssp. pall.</i>	0,609	0,520	0,652	0,560	1,000	0,565
<i>C. thomasii</i>	0,750	0,714	0,565	0,609	0,565	1,000

Table 1: Proximity matrix of Jaccard indices of Gel I samples

2. táblázat

A II gél Jaccard indexeinek hasonlósági mátrixa

	<i>C. sativus</i> K.	<i>C. cartwrightianus</i> K.	<i>C. oreoreticus</i> K.	<i>C. hadriaticus</i> K.	<i>C. pall. ssp. pall.</i> K.	<i>C. thomasii</i> K.	<i>C. nudiflorus</i>	<i>C. boryi</i>	<i>C. goulimyi</i>	<i>C. clusii</i>	<i>C. reticulatus</i>
<i>C. sativus</i> Kew	1,000	0,619	0,611	0,591	0,476	0,619	0,333	0,455	0,429	0,545	0,333
<i>C. cartwrightianus</i> K.	0,619	1,000	0,476	0,423	0,375	0,565	0,360	0,308	0,333	0,500	0,250
<i>C. oreoreticus</i> K.	0,611	0,476	1,000	0,600	0,556	0,550	0,526	0,381	0,421	0,550	0,563
<i>C. hadriaticus</i> K.	0,591	0,423	0,600	1,000	0,619	0,542	0,522	0,400	0,500	0,480	0,409
<i>C. pall. ssp. pall.</i> K.	0,476	0,375	0,556	0,619	1,000	0,435	0,476	0,292	0,611	0,375	0,421
<i>C. thomasii</i> K.	0,619	0,565	0,550	0,542	0,435	1,000	0,308	0,478	0,455	0,565	0,429
<i>C. nudiflorus</i>	0,333	0,360	0,526	0,522	0,476	0,308	1,000	0,280	0,250	0,478	0,400
<i>C. boryi</i>	0,455	0,308	0,381	0,400	0,292	0,478	0,280	1,000	0,304	0,478	0,474
<i>C. goulimyi</i>	0,429	0,333	0,421	0,500	0,611	0,455	0,250	0,304	1,000	0,280	0,300
<i>C. clusii</i>	0,545	0,500	0,550	0,480	0,375	0,565	0,478	0,478	0,280	1,000	0,429
<i>C. reticulatus</i>	0,333	0,250	0,563	0,409	0,421	0,429	0,400	0,474	0,300	0,429	1,000

Table 2: Proximity matrix of Jaccard indices of Gel II samples

1.c. ábra: Az I gél Jaccard indexeinek dendrogrammja egyszerű kapcsolat módszer klaszterrel

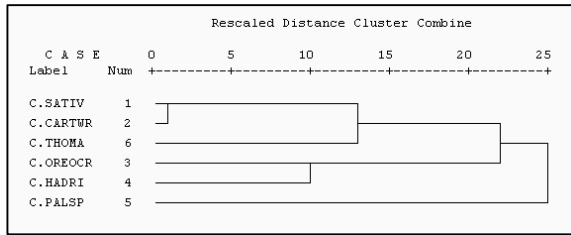


Figure 1.c: Dendrogram of Jaccard indices of Gel I samples using single linkage clusters

2.b. ábra: A II gél Jaccard indexeinek dendrogrammja egyszerű kapcsolat módszer klaszterrel

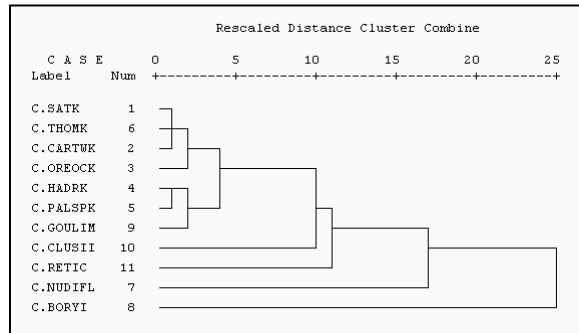


Figure 2.b: Dendrogram of Jaccard indices of Gel II samples using single linkage clusters

ÖSSZEZÉS

A *C. sativus* egy steril triploid növény, mely a sáfrány fűszert adja, eredete még mindig nem teljesen tisztázott. A legtöbb klasszikus rendszertani tanulmány, beleértve anatómiai, florosztikai és reprodukció biológiai munkákat is egyetért abban, hogy a *C. sativus*-ra legjobban a *C. cartwrightianus* hasonlít (Mathew, 1982; Mathew, 1999; Grilli, 1999). Ezen művek mellett a DNS polimorfizmuson alapuló AFLP módszer további eredményekkel járult hozzá, hogy megerősítsük azt a tényt, miszerint a *C. sativus*-hoz legközelebb genetikailag is a *C. cartwrightianus* áll.

Mindazonáltal figyelembe kell vennünk a *C. thomasii* jelentős hasonlóságát mind a *C. sativus*-hoz, mind a *C. cartwrightianus*-hoz. Hasonló eredményre jutott Grilli és Brandizzi (1998) flow cytometry, kvantitatív és kvalitatív DNS analízissel, valamint statisztikai DNS bázispár becsléssel. Chichiriccò (1989) magképződésről számolt be *C. sativus* és *C.*

thomasii keresztezéséből, mely igen erős kapcsolatot feltételez a két faj között.

Az AFLP módszer bevezetése a *C. sativus* taxonómiai kutatásába százalékos hasonlósági értékeket állapított meg az egyes fajok között. A *Crocus* sorozat rendelkezésünkre álló hat faja közül a *C. cartwrightianus* és a *C. thomasii* mutatta a legnagyobb hasonlóságot a *C. sativus*-hoz és egymáshoz is, mintegy 70% feletti értékben. A jövőben szeretnénk kibővíteni kutatásunkat egyéb *Crocus* fajokkal is, hogy további bizonyítékokkal járuljunk hozzá a fűszersáfrány eredetének kutatásához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők ezúton szeretnének köszönetet mondani Priszter Szaniszlónak.

A munkát az OTKA T042534 és a Bolyai János Alapítvány támogatta.

IRODALOM

- Chichiriccò, G. (1989): Fertilization of *Crocus sativus* L. ovules and development of seed after stigmatic pollination with *C. thomasii* Ten. pollen. *Giornale Botanico Italiano*, 123. 31-37.
- Grilli Caiola, M.-Brandizzi, F. (1998): Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (*Iridaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 211. 149-154.
- Grilli, M. (1999): Reproduction Biology of Saffron and its Allies. In: Negbi, M.: Saffron *Crocus sativus* L. Harwood Academic Publishers, 31-35.
- Grilli, M. (2003): Saffron reproductive biology. Oral presentation at 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, UCLM, Albacete, Spain
- Mathew, B. (1980): *Crocus* L. In: Tutin, T. G.-Heywood, V. H.-Burges, N. A.-Moore, D. M.-Valentine, D. H.-Walters, S. M.-Webb, D. A.: *Flora Europaea*, 5. 92-99.
- Mathew, B. (1982): *The Crocus*. A Revision of the Genus *Crocus* (*Iridaceae*). B. T. Batsford Ltd., London
- Mathew, B. (1999): Botany, Taxonomy and Cytology of *C. sativus* L. and its Allies. In: Negbi, M.: Saffron *Crocus sativus* L. Harwood Academic Publishers, 19-30.
- Podani J. (1997): Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeldarás rejtelmeibe. Scientia Kiadó, Budapest
- RHS (1997): *Bulbs*. Dorling Kindersley Ltd., London, Magyar kiadás: Panemex Kft. és Grafo Kft., Budapest (1998), 128.
- Sammons, D. W.-Adams, L. P.-Nishazawa, E. E. (1981): Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2. 135-41.
- Vos, P.-Hogers, R.-Bleeker, M.-Reijans, M.-van de Lee, Th.-Hornes, M.-Frijters, A.-Pot, J.-Peleman, J.-Kuiper, M.-Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23. 21. 4407-4414.