

# ВВЕДЕНИЕ *PUNICA GRANATUM L.* В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

А. А. Сергеева

Белорусский государственный университет, г. Минск;

*cool.anna-sergeeva@yandex.by*;

науч. рук. – А.О. Логвина, канд. биол. наук, доц.

Целью исследования было получить культуру *in vitro* граната обыкновенного (*Punica granatum L.*) и изучить влияние отдельного внесения в состав среды фитогормонов ауксиновой и цитокининовой природы на проростки граната. В ходе получения асептически выращенных проростков установлено, что добавление в состав питательной среды 6-БАП в концентрации 3 мг/л стимулировало прорастание семян, в результате чего были получены асептические проростки. Проростки были сильно укороченными, формировалось несколько коротких побегов. При этом развитие корневой системы было отмечено лишь у 7% проростков. Внесение в состав среды ауксинов 2,4-Д или ИУК в концентрациях 5, 10, 15 и 20 мг/л, произведенное для изучения возможности стимуляции развития корневой системы, привело к потемнению проростков и формированию на их поверхности каллусной ткани, окрашенной в коричневый цвет, хотя объекты постоянно выращивались в условиях света. Эффект потемнения не зависел от концентрации вносимых ауксинов. На средах, дополненных цитокинином 6-БАП в концентрациях 5, 10, 15, 20 мг/л, с целью стимулирования развития побегов, также наблюдалось образование каллусной ткани в основании побегов. При этом в отличие от сред с ауксинами, каллусная ткань была ярко-зеленой. Таким образом, таких эффектов как стимуляция ризогенеза под действием экзогенных ауксинов или стимуляция роста адвентивных побегов под действием цитокинина отмечено не было. При отдельном внесении в состав среды фитогормонов ауксиновой (2,4-Д или ИУК) и цитокининовой (6-БАП) природы из проростков граната обыкновенного в обоих случаях наблюдалось образование каллусных тканей, но различающихся морфологически.

**Ключевые слова:** *Punica granatum*, гранат обыкновенный, фитогормоны, ауксины, цитокинины, органогенез, каллус.

Гранат, или гранатовое дерево (*Punica*) – это род многолетних кустарников и невысоких деревьев. Род включает в себя всего 2 вида: гранат обыкновенный (лат. *Punica granatum L.*) и гранат протопуника (лат. *Punica protopunica Balf.*). Гранат представляет собой субтропическое листопадное плодовое дерево до 5 м в высоту либо невысокий кустарник. Плод – крупная, округлой формы ягода под названием гранатина. С одного взрослого экземпляра собирают примерно 60 кг плодов. В гранате содержится ряд активных веществ, он особенно богат дубильными веществами: в коре и околоплоднике их содержится до 33%. В корнях дерева и коре присутствуют алкалоиды пельтерин и изопельтерин. В цветках найден антоциан пунцин – это пигмент ярко-алого оттенка [3].

Благодаря противовоспалительным, антисептическим и мочегонным свойствам, плоды граната используют с целью профилактики и терапии острых циститов и других воспалительных заболеваний мочеполовой системы. Полифенолы в составе нативного растения граната способны укрепить иммунную систему, благоприятны для работы ЖКТ, препятствуют различным воспалениям. Превосходные лечебные свойства граната связаны также с его антиоксидантной активностью [1; 2].

Ввиду ценного биохимического состава и широкого спектра биологических активностей актуальным видится введение граната обыкновенного в культуру *in vitro*, как с точки зрения получения каллусных и суспензионных культур в качестве альтернативного источника ценных вторичных метаболитов, так и с точки зрения разработки протокола микроклонального размножения.

Целью исследования было получить культуру *in vitro* граната обыкновенного и изучить влияние раздельного внесения в состав среды фитогормонов ауксиновой и цитокининовой природы на проростки граната.

Первым этапом работы было получить асептические растения. Источником семян служил плод (гранатина). Плод для забора семян выбирался спелый без видимых повреждений. Полученные семена подвергали стерилизации, после чего их помещали в чашки Петри для проращивания. Проращивание семян осуществлялось в чашках Петри на половинной среде Мурасиге и Скуга (МС) в условиях термостата при 24 °С в темноте (уплотнителем выступал агар-агар в концентрации 80 г/л). Было установлено, что на безгормональной среде семена прорастали с низкой эффективностью. Для стимулирования прорастания семян в состав питательной среды добавляли 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрациях 3 мг/л, что положительно сказалось на всхожести семян.

Так, были получены этиолированные проростки, которые в дальнейшем переносили в стеклянные флаконы с половинной средой МС, дополненной 3% сахарозы, и помещали их на свет.

Проростки быстро зеленели, однако не росли в высоту, на них формировалось несколько коротких побегов (рис.1).

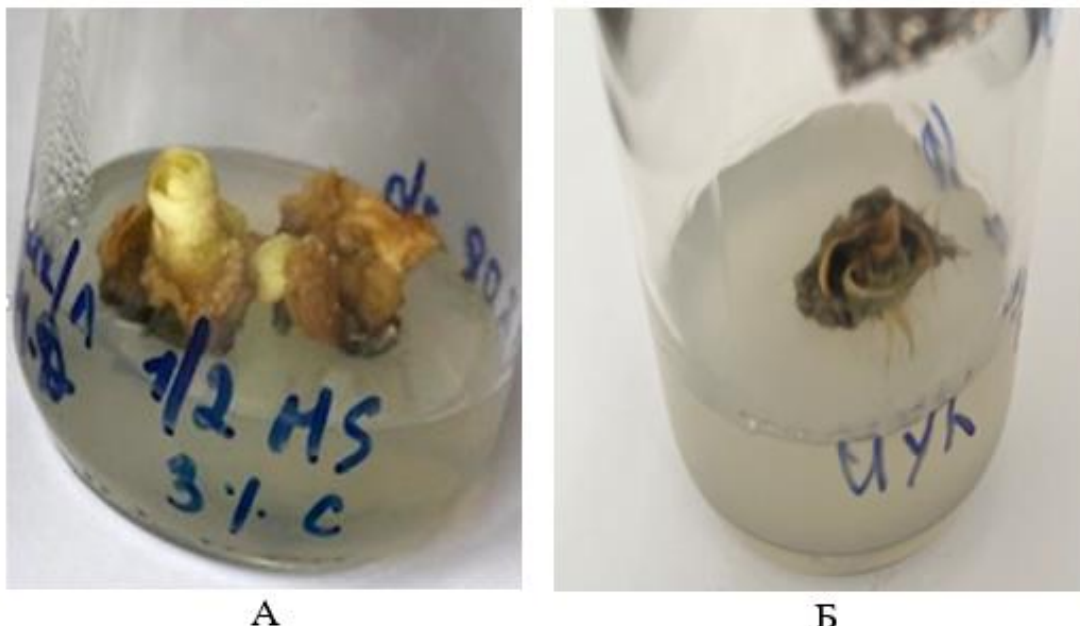


*Рис.1. Проростки граната обыкновенного через месяц выращивания на свету*

При этом развитие корневой системы было отмечено лишь у 7% проростков из их общего числа.

На следующем этапе работы для стимулирования корневого органогенеза проростки переносили на среды, дополненные ауксинами 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) или индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) в концентрациях 5, 10, 15 и 20 мг/л. С целью изучения стимулирования развития адвентивных побегов проростки пересаживали на среды, дополненные цитокинином 6-БАП в концентрациях 5, 10, 15, 20 мг/л.

Внесение в состав среды ауксинов 2,4-Д или ИУК в концентрациях 5, 10, 15 и 20 мг/л, произведенное для изучения возможности стимуляции развития корневой системы, привело к потемнению проростков и формированию на их поверхности каллусной ткани, окрашенной в коричневый цвет, хотя объекты постоянно выращивались в условиях света (рис. 2, А). Эффект потемнения не зависел от концентрации вносимых ауксинов. На непродолжительный период времени в присутствии ИУК в наиболее высокой концентрации наблюдалось появление адвентивных корней на поверхности листьев проростка, которые в дальнейшем деградировали по мере разрастания каллусной ткани (рис. 2, Б). Проростки со временем деградировали.



А

Б

Рис. 2. Проростки граната обыкновенного на питательной среде с добавлением 2,4-Д (А) и ИУК (Б)

Интересно, что проростки, выращиваемые в присутствии в цитокинина 6-БАП, также характеризовались образованием каллусной ткани в основании побегов. При этом в отличие от сред с ауксинами, каллусная ткань была ярко-зеленой, кроме этого, проростки не деградировали (рис. 3) Вопреки ожиданиям, таких эффектов как стимуляция ризогенеза под действием экзогенных ауксинов или стимуляция роста адвентивных побегов под действием цитокинина, не наблюдалось.

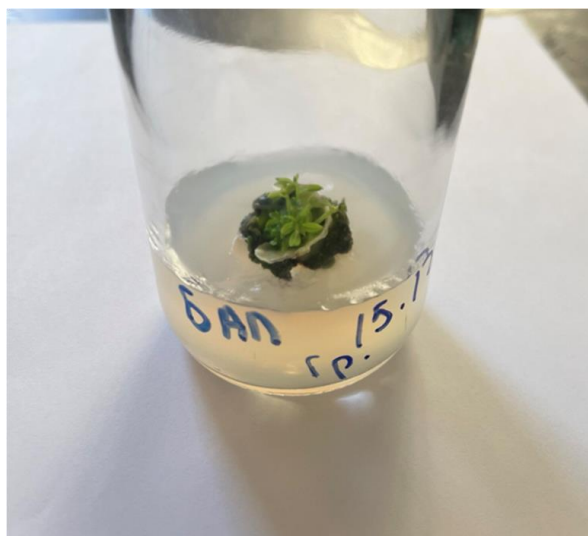


Рис. 3. Проростки граната обыкновенного на питательной среде с добавлением цитокинина 6-БАП

Таким образом, при действии фитогормонами разной природы

(ауксинами или цитокининами) были получены 2 разные каллусные линии. Можно заключить, что независимо от природы, фитогормоны стимулировали формирование каллусов, но различающихся морфологически.

Из рисунков видно, что каллус окрашенный в коричневый цвет, характеризовался наличием скоплений черных клеток, что вероятно говорит о накоплении в них фенольных соединений. Каллус, окрашенный в изумрудно-зеленый цвет также имел плотные темные очаги клеток, также, вероятно, представляющими собой вместилища фенольных соединений, однако в основной массе клетки были крупными и сильнооводненными.

Дальнейшая работа будет направлена на оптимизацию роста полученных линий каллусов и проведение их биохимического анализа, а также на изучение гормональной индукции органогенеза.

#### **Библиографические ссылки**

1. Biochemical composition and expression of anthocyanin biosynthetic genes of a yellow peeled and pinkish ariled pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivar are differentially regulated in response to agro-climatic conditions / R. Attanayake [et al.] // Agric. Food Chem. – 2018. – Vol. 66 (33). – P. 8761–8771.
2. Fabro, S. Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide / S. Fabro, R.L.Smith, R.T.Williams // Nature. – 1967. – Vol. 215. – P. 296.
3. Lansky, E.P. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of in flammation and cancer / E.P. Lansky, R.A. Newman // J. Ethnopharmacol. – 2007. – Vol. 109. – P. 177-206.