



Биолог. журн. Армении, 4 (69), 2017

КАРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИКОРАСТУЩЕГО ГРАНАТА АРМЕНИИ (*PUNICA GRANATUM* L.)

Н.П. СТЕПАНЯН-ГАНДИЛЯН

Институт ботаники имени А. Тахтаджяна НАН РА
ninastep.gandi@gmail.com

Представлены результаты кариологического исследования, проведенного на материале дикорастущего граната (*Punica granatum* L.), произрастающего на территории Армении. Данные о числе хромосом *P. granatum*, приводимые в литературе, весьма противоречивы ($2n = 2x = 16$ или 18). Полиплоидия отмечена лишь в культуре ткани у культивируемых. Нашими исследованиями метафазных пластинок в меристеме корешков *P. granatum* отмечается наличие в наборе пары сравнительно крупных метацентрических хромосом. Очевидно, плечи этих метацентриков исследователи часто принимали за отдельные хромосомы и вследствие этого полагали, что число хромосом в наборе 18 . Однако тот факт, что при изучении мейоза в МІ всегда отчетливо просматриваются 8 бивалентов, определенно свидетельствует о присутствии в кариотипе граната не 9 -ти, а 8 -ми пар хромосом. Таким образом, у *P. granatum* основное число $x = 8$, $2n = 16$. Также отмечено наличие крупных хромосом в покое ядре, указывающее на присутствие в хромосомах крупных гетерохроматинных сегментов. Число их у разных образцов варьирует от 2 до $10-12$.

Дикорастущий гранатник – *Punica granatum* – число хромосом – хромосомы

Ամփոփված են Հայաստանում աճող վայրի խնձեղի (*Punica granatum* L., *Punicaceae*) կարիոլոգիական ուսումնասիրության արդյունքները: *P. granatum*-ի բրոմոսոմային թվին վերաբերող գրականության մեջ անկա տվյալները բավականին հակասական են ($2n = 2x = 16$ կամ 18): Մշակովի խնձեղի մոտ նշվում են նաև պոլիպլոիդ ձևեր: Մեր կողմից կատարված *P. granatum*-ի մետաֆազային թիթեղների ուսումնասիրման արդյունքում դիտարկվել են համեմատաբար խոշոր, մյուս բրոմոսոմներից իրենց չափերով զգալիորեն տարբերվող, մետացենտրիկ բրոմոսոմներ: Հավանաբար, այդ բրոմոսոմների թվերը հետազոտողները համարում էին առանձին բրոմոսոմներ և այդ պատճառով կարծում, որ բրոմոսոմների թիվը 18 է: Սակայն այն փաստը, որ մեյոզի ժամանակ միշտ պարզ երևում են 8 բիվալենտներ, ստույգ կերպով վկայում է խնձեղի կարիոտիպում ոչ թե 9 , այլ 8 բրոմոսոմների գոյգերի առկայության մասին: Այսպիսով, *P. granatum*-ի բրոմոսոմների թիվը կազմում է $x = 8$, $2n = 16$: Ինտերֆազային կորիզում դիտարկվել են խոշոր բրոմոկենտրոններ, որը վկայում է զանգվածեղ հետերոբրոմատիկային հատվածների առկայության մասին: Դրանց թիվը տարբեր նմուշների մոտ տատանվում է 2 -ից մինչև $10-12$ -ը:

Վայրած խոռ – *Punica granatum* – բրոմոսոմային թիվ – բրոմոկենտրոններ

The results of the karyological study of the wild pomegranate (*Punica granatum* L., *Punicaceae*) growing on the territory of Armenia are reported. The data on chromosome number at *P. granatum* in literature is rather contradictory ($2n = 2x = 16$ or 18). The polyploidy forms are reported only at the cultivated *P. granatum*. By our investigation of the metaphase chromosomes, implemented on the meristematic tissue of the pomegranate's roots, the presence of the pair of large metacentric chromosomes, was revealed that much differ in size from others.

Obviously, the arms of those metacentric chromosomes were accepted by some researchers as the separate chromosomes, and consequently the number of chromosomes was reported to be 18 .

However the fact, that during study of the meiosis 8 bivalents are always visible, it definitely testifies to the existence in the karyotype of the 8, and not of the 9 pairs of chromosomes. Thus the basic chromosome number at the *P. granatum* is $x = 8$, $2n = 16$. In the interphase nucleuses the occurrence of the large chromocenters was visible, which indicates the presence of the heterochromatic regions in the chromosomes of *P. granatum*. The number of the chromocenters at the different specimen was varied from 2 to 10-12.

Wild pomegranate – Punica granatum – chromosome number – chromocenters

Данные о кариотипе *P. granatum* немногочисленны и касаются в основном числа хромосом. Несмотря на то что число хромосом у граната невелико, приводимая в литературе информация о них весьма противоречива. Это объясняется очень малыми размерами хромосом (0,5 – 1,0 мкм), существенно затрудняющими их исследование.

Первые известные нам данные о числе хромосом у *P. granatum* приводятся в работе Morinaga et al. [14], где при исследовании мейотического деления на материале культурного граната в метафазе I (M1) указывается 8 бивалентов, то есть $2n = 16$. Однако в следующей по времени работе Костова и др. [1], изучивших 18 культиваров и 2 образца дикорастущего граната (Азербайджан), для всех изученных образцов указывается $2n = 18$. Исследуя кариотип культиваров и диких форм граната, Поволочко [2] подчеркивает их маленькие размеры и приводит разделение хромосом по группам, отмечая метацентрические (M) и субметацентрические (SM) хромосомы, их варьирование не только по соотношению плеч, но и по размеру. Проведя кариологическое исследование культиваров граната из Средней Азии, Прусс [3] приводит $2n = 18$, отмечая при этом, что ввиду очень маленьких размеров хромосом морфологические различия выявить не удалось.

Последующие исследователи, за исключением работы Raman et al. [16], свои наблюдения проводили на культиварах, изучая метафазы первого мейотического деления (M1) и отмечая образование 8 бивалентов, то есть, у *P. granatum* $2n = 16$. В ряде работ [6, 7, 11, 12, 20] указывается на присутствие в кариотипе граната В-хромосом (до 7 В-хромосом). Полиплоидия отмечается лишь в культуре ткани у возделываемых форм *P. granatum* [10, 17 и др.]. У культиваров в M1 наблюдается появление мультивалентов, что говорит о наличии структурных перестроек хромосом.

Нами было проведено исследование хромосомного набора образцов *P. granatum*, собранных в местах их естественного произрастания на территории Армении.

Материал и методика. Семенной материал для кариологического изучения дикорастущего граната (*P. granatum*) был собран в 2006 – 2010 гг. из 4 популяций, произрастающих на территории юго-восточной Армении: Мегринский район, окр. с. Шванидзор, скалистые склоны, в шибляке среди зарослей *Paliurus spina-christi*, N 38°55' – 38°56', E 046°21' – 046°22', h 625 – 814 м над ур. м.; Мегринский район, окрестности с. Нрнадзор (прежнее название Ньюади), сухие каменистые склоны, N 38°55', E 046°26', h 783 – 816 м над ур. м.; Кафанский район, окр. с. Неркин Анд, Шикахохский заповедник, хорошо освещенное редколесье, N 39°01' – 39°02', E 046°29', h 950 – 966 м над ур. м.; Горисский район, окрестности села Воротан, сухие склоны, N 39°26', E 046°23' – 046°24', h 749 – 830 м над ур. м.

С целью исследования метафазных пластинок проводилась фиксация меристематической ткани *P. granatum*. Для этого черенки, полученные из семян дикорастущего *P. granatum*, помещались в воду для укоренения. После прорастания корешков, их кончики обрабатывались колхицином (0,2 %-ный, в течение 2 ч при комнатной температуре) с последующей фиксацией в смеси спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Затем проводился горячий гидролиз в 1 N HCl 15 мин при 60-62°C, гидролиз в 1 N HCl 15 мин при 60-62°C, материал окрашивался раствором Шиффа. После промывки в теплой воде кончики корешков

раздавливались в 45 %-ной уксусной кислоте и после просмотра и отбраковки, проведя через бутиловый спирт и ксилол, препараты заключались в бальзам.

Исследования метафазных пластинок проводились на микроскопе Laboval-4 при увеличении $\times 10$, $\times 100$. Микрофотографии осуществлялись фотоаппаратом Canon Digital Ixus 40.

Результаты и обсуждение. В приведенной таблице (табл. 1) обобщены известные нам данные по числам хромосом *P. granatum*.

Таблица 1. Числа хромосом *P. granatum* на основании литературных данных

Гаплоидное число хромосом (n)	Диплоидное число хромосом (2n)	Авторы
8	–	Morinaga T. et al., 1929 [14]
–	18	Костов Д. и соавт., 1935 [1]
–	16	Yasui K., 1936 [28]
–	16	Поволочко П. А., 1937 [2]
–	18	Прусс А. Г., 1938 [3]
–	16	Delay C., 1947 [5]
–	16	Tjio J. H., 1948 [25]
–	16	Thombre M. V., 1959 [24]
–	16	Miège J., 1960 [13]
8	16	Sharma A., 1970 [18]
–	18	Raman V. et al., 1971 [16]
–	16 + 4B	Mehra P., 1972 [11]
8 + 1 – 3B	–	Mehra P., 1976 [12]
8 + 0 – 7B	–	Gill B. et al., 1981 [6]
–	16 + 0 – 4B	Gill B. et al., 1984 [7]
–	16	Jadka K., Mehra P., 1986 [10]
8	–	Tobe M. et al., 1986 [26]
–	16	Xu H.-Y. et al., 1992 [28]
8	–	Shedai M., 2005 [19]
8	–	Shedai M. et al., 2005 [22]
–	16	Shedai, Nooenohammadi, 2005 [23]
–	16 + 3B	Shedai M., 2007 [20]
–	16	Shedai M. et al., 2008 [21]
–	16	Neveen A., Mona H., 2013 [15]

Как видно из табл.1, большинство исследователей приводят диплоидное число хромосом ($2n$, $2x$). Число хромосом колеблется от 16 до 18: $2n = 2x = 16$ или 18. Полиплоидия отмечается лишь в культуре ткани у возделываемых форм *P. granatum* [10, 17 и др.].

Данные, полученные нами при изучении метафазных пластинок *P. granatum*, подтверждают данные Поволочко [2] относительно наличия в наборе пары сравнительно крупных метацентрических хромосом, значительно отличающихся от остальных (рис. 1 а, б).

Ввиду очень мелких размеров хромосом и связанных с этим затруднений при их изучении, плечи этих метацентриков исследователи, очевидно, часто принимали за отдельные хромосомы. Вследствие этого, некоторые авторы полагали, что число хромосом в наборе не 16, а 18. Следует отметить, что, согласно литературным данным, при изучении мейоза в МІ всегда отчетливо просматриваются 8 бивалентов, несмотря на их незначительную величину. Этот факт определенно свидетельствует о присутствии в кариотипе граната не 9-ти, а 8-ми пар хромосом.

Таким образом, основное число хромосом у дикорастущего *P. granatum*, установленное на образцах из Армении, $x = 8$, $2n = 16$. Это число – базовое основное число хромосом в семействе Lythraceae, которое является родственным Puniceae

[8, 9]. В семействе Lythgaceae, согласно данным указанных авторов, кроме базового основного числа $x = 8$, имеются вторичные основные числа, как $x = 15, 16, 24, 28, 32$. Изменение хромосомного числа на основе возникновения вторичных основных чисел отмечено для травянистых многолетников, у которых интенсивный процесс видообразования сопровождался полиплоидизацией. Что касается древесных родов, то, как отмечают авторы [8, 9], у них видообразование не сопровождается изменением числа хромосом. Приводимые данные справедливы и в отношении *P. granatum*.

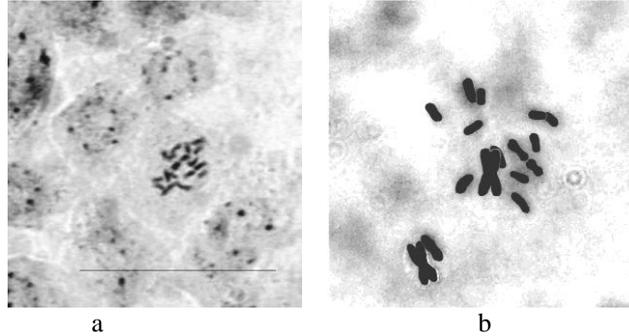


Рис. 1. Метацентрические хромосомы на метафазных пластинках *P. granatum*
 а. метафазная пластинка в меристеме корешка граната (масштабная линейка = 10 μ m).
 б. метафазная пластинка *P. granatum*, реконструкция.

В ходе кариологического изучения меристемы корешков граната также нами было обнаружено наличие крупных хромоцентров в покоем ядре (рис. 2а, б). Наличие хромоцентров указывает на присутствие в хромосомах крупных гетерохроматиновых сегментов. Число их у разных образцов варьирует от 2 до 10-12 [4]. Варьирование числа хромоцентров происходит за счет слияния гетеропикнотических участков хромосом с образованием сложных хромоцентров.

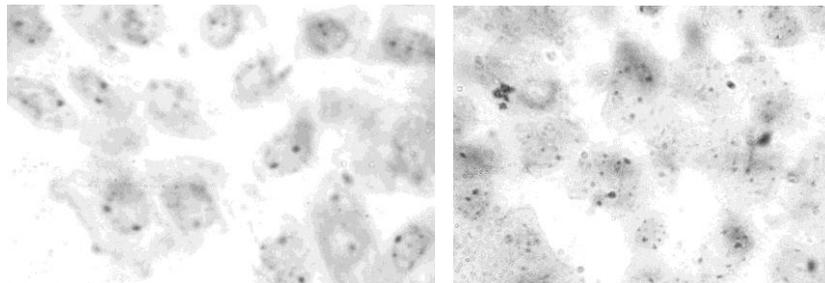


Рис. 2. Сложные хромоцентры, образовавшиеся в результате слияния гетеропикнотических участков хромосом.

Исследованиями метафазных пластинок в меристеме корешков дикорастущего граната, произрастающего на территории Армении, было выявлено, что диплоидное число хромосом у *P. granatum* $2n = 16$, а основное число $x = 8$. В кариотипе *P. granatum* отмечено наличие пары крупных метацентрических хромосом, значительно превышающих по величине остальные. Также обнаружено большое число (2-12) хромоцентров в покоем ядре.

Работа проведена под руководством и при содействии докт. биол. наук Э.А. Назаровой, за что автор выражает свою искреннюю благодарность

ЛИТЕРАТУРА

1. Костов Д., Догаджина Н., Тихонова А. Число хромосом у некоторых представителей покрытосемянных растений. ДАН СССР. 3 (8), 9 (69). с. 401-404, 1935.
2. Поволочко П.А. Морфология хромосом *Punica granatum* L. ДАН СССР, 16, 1, с. 229-231, 1937.
3. Прусс А. Цитологическое изучение граната Средней Азии. Советские субтропики. 3, с. 78, 1938.
4. Степанян Н.П. Дикорастущий гранат (*Punica granatum*) в Армении. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Ереван, 23 с., 2011.
5. Delay C. Recherches sur la structure des noyaux qі escents chez les Phanérogames. Rev. Cytol. Et Cytophysiol. Vég. 9. p. 169-222, 1947.
6. Gill B.S., Bir S.S., Singhal V.K. Cytomorphological studies in north Indian pomegranate (*Punica granatum* L.). J. Cytol. Genet., 16. p. 35-45, 1981.
7. Gill B.S., Bur S.S., Singhal V.K. Cytological studies in some western Himalayan wood species. II. Polytales. In G. S. Paliwal (ed.). The veget. Wealth of the Himalayas. Puja Publ. Dehli., p. 497-515, 1984.
8. Graham S.A., Taciana B. Cavalcanti. New chromosome counts in the Lythraceae and a review of chromosome numbers in the family. Syst. Botany, 26. 3, p. 445-458, 2001.
9. Hiroshi Tobe, Raven P., Shirley A. Graham. Chromosome counts for some Lythraceae sens. Str. (Myrtales) and the base number of the family. Taxon. 35. 1. p. 13-20, 1986.
10. Jaidka K., Mehra P.N. Morphogenesis in *Punica granatum* (Pomegranate). Canadian Journal of Botany, 64. 8. p. 1644-1653, 1986.
11. Mehra P.N. Cytogenetical evolution on hardwoods. Nucleus. Calcutta, 15. p. 64-83, 1972.
12. Mehra P.N. Cytology of Himalayan Hardwoods. Sree Saraswaty Press (Calcutta), 1976.
13. Miège J. Troisième liste de nombres chromosomiques d'Afrique Occidentale. Ann. Fac. Sci. Univ. Dakar. 5. p. 75-85, 1960.
14. Morinaga T., Fukushima E., Kano T., M43, 15, p. 589-594, 1929.
15. Neveen A., Mona H. Morphological Karyotype Analysis of Eleven Pomegranate Cultivars. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 13, 11, 1562-1567, 2013.
16. Raman V., Manimekalai G., Sree-Rangaswamy S. Chromosome behaviour at meiosis in *Punica granatum* L. 1971.
17. Shao J., Chen C., aruyama Y., Yamazaki Y. Chromosome numbers of cultivates plans. II Bot. Mag. Tokio, Deng X. In vitro introduction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75, 3. p. 241-246, 2003.
18. Sharma A.K. Annual report, 1967-1968. Res. Bull. Univ. Calcutta. 2, p. 1-50, 1970.
19. Shedai M. B-chromosome variability in Pomegranate (*Punica granatum* L.) cultiars. Caryologia. 60, 3. p. 251-256, 2005.
20. Shedai M. Cytogenetic and molecular diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. 18th ECARPIA Genetic Resources section meeting (Slovak Resp.). p. 156, 2007.
21. Shedai M., Aatefeh S., Zhra-Hawali S., Noenohammadi Z., Farahanei F., Tabatabaei-Ardokanei S.Z. RAPD and cytogenetic study of some pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. Cariologia. 61, 1, p. 68-73, 2008.
22. Shedai M., Mahood-Khandan, Nasre-Esfahani S. Cytogenetical study of some Iranian Pomegranate cultivars. Caryologia. 58, 2, p.132-139, 2005.
23. Shedai M., Noenohammadi Z. Chromosome pairing and unreduced gamete formation in nineteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. Cytologia, 70, 3, p. 257-265, 2005.
24. Thrombre M.V. Chromosome numbers on some common flowering plants. Current Sci. 28, 5, p. 206-207, 1959.
25. Tjio J.H. The somatic chromosomes of some tropical plants. Hedeartas. 34, 1-2, p. 135-146, 1948.
26. Tobe H., Raven P., Graham Sh. Chromosome counts for some Lythraceae sens. str. (Myrtles) and the base number of the family. Taxon., 35, 1, p. 13-20, 1986.
27. Xu, H.-Y., Chang M.-Y., Tian L.-C. Studies on the karyotypes of Shanghai plants I. Invest. Stud. Nat. – Shanghai. 12, p. 48-65, 1992.
28. Yasui K. Genetics and chromosome number in *Punica*. Japan J. Gen., 12, 6. p. 321-323, 1936.

Поступила 18.05.2017