

Pochodzenie spontanicznie rozprzestrzeniającego się gatunku *Bromus carinatus* (Poaceae) na siedliskach ruderalnych i segetalnych w Polsce

AGNIESZKA SUTKOWSKA i ANDRZEJ PASIERBIŃSKI

SUTKOWSKA, A. AND PASIERBIŃSKI, A. 2009. The origin of spontaneously spreading species *Bromus carinatus* (Poaceae) on ruderal and segetal sites in Poland. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica* 16(2): 281–295. Kraków. PL ISSN 1640-629X.

ABSTRACT: Molecular analysis of *Bromus carinatus* – an alien species in Polish flora, collected in ruderal and segetal sites in Poland, cv. ‘Broma’, and material from USDA Pullma collection was carried out using ISSR-PCR. We showed that most accessions from different sites shared the same band pattern with *B. carinatus* cv. ‘Broma’. It suggests that *B. carinatus* cv. ‘Broma’ is spreading in Poland. Some rare individuals, present in investigated populations, probably originated from seeds that were brought accidentally from habitats of *B. carinatus* in other parts of Europe were detected.

KEY WORDS: *Bromus carinatus*, DNA analysis, ISSR, ruderal plant, origin, Poland

Agnieszka Sutkowska, Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Łobzowska 24, PL-31-140 Kraków, Polska; e-mail: asutkowska@ar.krakow.pl
Andrzej Pasierbiński, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Botaniki Systematycznej, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28. PL-40-032 Katowice, Polska; e-mail: apasierb@us.edu.pl

WSTĘP

Bromus L. jest dobrze zdefiniowaną naturalną grupą jednorocznych, dwuletnich i wieloletnich traw o szerokim zasięgu geograficznym (SMITH 1970; AINOUCHE i in.1999). W jej obrębie daje się zaobserwować pewien stopień heterogenności, którego rezultatem jest wiele nieścisłości związanych szczególnie z nomenklaturą oraz rangą niższych jednostek taksonomicznych (SMITH 1970).

W obrębie tego rodzaju wyróżniane są grupy, podrodzaje, sekcje i podsekcje. SMITH w swej pracy z 1970 r. podjął próbę zdefiniowania rodzaju *Bromus* wraz z jego podziałem i przeglądem dostępnych nazw, które nagromadziły się przez stulecia. Prowadząc porównawcze badania serologiczne oraz analizy cech morfologicznych organów rozmnażania, zaproponował podział rodzaju *Bromus* na sześć jednostek taksonomicznych w randze sekcji: *Bromus*, *Genea*, *Pnigma*, *Ceratochloa*, *Nevskiella* i *Neobromus*. Z kolei STEBBINS (1981), zgadzając się z ogólnymi tezami SMITHA, zaproponował podział tego rodzaju na siedem grup w randze podrodzaju. Są to odpowiednio: *Bromus*, *Stenobromus*, *Festucaria*, *Ceratochloa*, *Neobromus*, *Nevskiella* i *Boissiera*. W niniejszej pracy przyjęto właśnie ten

podział. STEBBINS (1981) dokonując podziału rodzaju *Bromus* uwzględnił dane cytogenetyczne oraz fitogeograficzne zwracając szczególną uwagę na rozmieszczenie poliploidów. W tym ostatnim ujęciu poszczególne podrodzaje wykazują charakterystyczny obszar rozmieszczenia geograficznego, np. podrodzaje *Bromus* i *Stenobromus* są charakterystyczne dla Eurazji, *Ceratochloa* naturalnie występuje w Nowym Świecie, a *Festucaria*, w zależności od rodzaju genomu w Eurazji i Ameryce.

Podrodzaj *Ceratochloa* reprezentowany jest przez hekso- i oktoploidy. Diplo- i tetraploidy prawdopodobnie wyginęły (STEBBINS 1981; ARMSTRONG 1991). Najbardziej rozpowszechnioną i najlepiej poznaną grupą oktoploidów, występującą w Ameryce jest tak zwany kompleks *Bromus carinatus* ($2n = 56$), w obrębie którego trudne jest ustalenie granic gatunków (MASSA i in. 2001). STEBBINS (1981) sugeruje uznanie ich za jeden gatunek bez względu na istnienie lub brak barier sterility, które dzielą wiele z nich.

Bromus carinatus Hook & Arm. (stokłosa spłaszczona) jest rośliną roczną lub wieloletnią, kwitnącą od czerwca do września. Jej źdźbło, dorastające do ok. 120 cm wysokości, zwieńczone jest rozpięchłą wiechą z silnie bocznie spłaszczonymi kłoskami na zwieszonych gałązkach. Kłoski zawierają różną liczbę kwiatów (zwykle ponad 7), a plewki dolne zakończone są charakterystyczną ością długości 5–12 mm. Obecność ości jest jedną z istotniejszych cech morfologicznych, pozwalających na odróżnienie stokłosa spłaszczonej od innych, podobnych do niej i czasem z nią mylonych gatunków, np. *B. uniolooides* (MIREK 1984). Ekspansję ułatwia jej wiele cech, wśród których wymienia się: odporność na niskie temperatury, szybki wzrost stymulowany przez koszenie, szybkie dojrzewanie do rozrodu, rozmnażanie wegetatywne i generatywne (STUBBENDIEK i in. 1992). Zapylenie kwiatów zachodzi na drodze autogamii (klejstogamii lub chasmogamii).

Z natury gatunek ten występuje w zachodniej części Ameryki Północnej i sięga na południe po wysokie Andy w Kolumbii. Spotykany jest w szerokim gradencie wysokości – od terenów niżowych po piętro subalpejskie. Prześwietlone lasy i zarośla, stopy, łąki i nieużytki to siedliska chętnie zajmowane przez *Bromus carinatus*, a w niektórych z nich dominuje. W Europie stanowiska *B. carinatus* znane są od początku XX w. ze Szwecji, Belgii, Holandii i Niemiec (PALLAS 1994; BORKOWSKY & HARTWIG 1997).

Pierwsze doniesienia o występowaniu *Bromus carinatus* na siedliskach synantropijnych w Polsce pochodzą z 1911 r. (TOKARSKA-GUZIŁ 2005) oraz z lat 70. i 80. XX w. (MIREK 1984). Jest szeroko rozpowszechniony na niżu (RUTKOWSKI 2002), gdzie zajmuje siedliska dobrze nasłonecznione, świeże, słabo kwaśne do słabo zasadowych, a w górach sięga jedynie regła dolnego (MIREK & PIĘKOŚ-MIRKOWA 2002). Najczęściej spotykany jest na terenach synantropijnych (przydroża, tereny wydeptywane, siedliska ruderalne w pobliżu obszarów zurbanizowanych, uprawy rolne, tereny kolejowe) (JACKOWIAK 1993; KOMPALA & WOŹNIAK 2001; MISIEWICZ 2001; WOŁKOWYCKI 2001; PAWLAK 2003; PASIERBIŃSKI i in. 2005; WITOSŁAWSKI 2005; WRZESIEŃ 2005). Sporadycznie odnotowywano jego udział w strukturze zbiorowisk półnaturalnych z klasy *Molinio-Arrhenatheretea* (KOMPALA & WOŹNIAK 2001; BUDYŚ & DOBRZYŃSKA 2004) oraz w śródpolnych wyspach leśnych (BUDYŚ & DOBRZYŃSKA 2004).

Cechy biologiczne *Bromus carinatus* wzbudziły zainteresowanie polskich hodowców, których prace zaowocowały rejestracją w 1973 r. odmiany 'Una' na liście roślin uprawnych

COBORU (Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych). Niestety, od początku podawano mylnie jej przynależność gatunkową: *Bromus unioloides* (stokłosa uniolowata). 'Una' została wyprowadzona z nielicznych genotypów wyselekcjonowanych z materiałów kolekcyjnych pochodzących z Kanady, odznaczających się dużą zimoodpornością (FALKOWSKI 1982). Materiały te zostały opisane jako *Bromus unioloides* fo. *aristatus*. W toku dalszych zabiegów hodowlanych na bazie cv. 'Una' wyprowadzono nową odmianę zarejestrowaną w 1988 r. na liście COBORU pod nazwą 'Broma'. Właściwości rolniczo-użytkowe tej odmiany podaje OPIS ODMIAN COBORU (1988).

Historię rozprzestrzeniania się *Bromus carinatus* w Polsce oraz jego status we florze polskiej obrazuje przedstawione poniższe zestawienie dat:

1911 – pierwsze doniesienie (TOKARSKA-GUZIĆ 2005)

1963 – początek prac aklimatyzacyjno-hodowlanych nad *Bromus carinatus* błędnie oznaczonym, jako *B. unioloides* fo. *aristatus* (MIREK 1984, za SULINOWSKI 1972)

1973 – wpisanie odmiany 'Una' na listę COBORU

1974 – początek uprawy na nasiona w Wielkopolsce (MIREK 1984, za FALKOWSKI i in. 1979)

1981 – opis stanowiska w Słownikach (MIREK 1984)

1986 – status efemerofita (ROSTAŃSKI & SOWA 1986–1987)

1988 – wpisanie odmiany 'Broma' na LISTĘ ODMIAN COBORU

1998 – status kenofita (agriofera) (ZAJĄC i in. 1998)

Powyższe dane skłoniły autorów do podjęcia badań, których celem było określenie pochodzenia *Bromus carinatus* występującego na siedliskach synantropijnych na terenie Polski. W tym celu przeprowadzono analizy molekularne metodą ISSR (Inter-Simple Sequence Reapt) materiału zebranego w terenie.

MATERIAŁ I METODY

W sezonie wegetacyjnym w 2007 r. dokonano w terenie poboru 51 prób w postaci nasion lub całych okazów *Bromus carinatus*. Próby pobrano z 23 stanowisk rozsianych na obszarze całej Polski (Ryc. 1, Tab. 1). Kryterium doboru stanowisk było ich wzajemne oddalenie od siebie oraz różnorodność siedlisk, na jakich występuje badany gatunek. Były to wyłącznie siedliska synantropijne, głównie ruderalne i dwa segetalne.

Mapa rozmieszczenia populacji, w których pobierano materiał do badań, została wygenerowana w systemie informacji geograficznej GRASS 6.4.0.

Materiał do badań molekularnych stanowiły zebrane w terenie okazy *Bromus carinatus* lub otrzymane w szklarni Katedry Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie z nasion zgromadzonych w trakcie badań terenowych (Tab. 1). Kontrolną próbę stanowiło 12 okazów odmiany hodowlanej 'Broma' uzyskanych z nasion pochodzących z Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o. oraz 27 okazów *B. carinatus* otrzymanych z nasion sprowadzonych z kolekcji USDA Plant Introduction Station, Pullman, USA (Tab. 2).

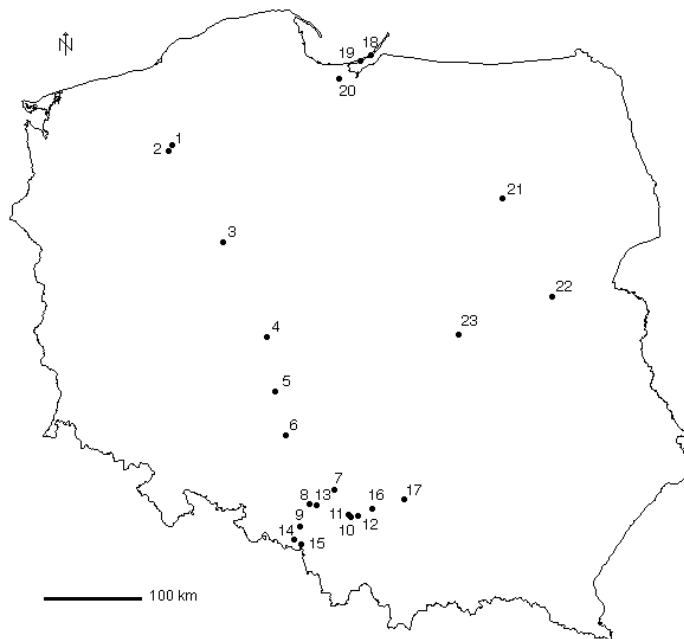
Badania molekularne

W badaniach wykorzystano technikę ISSR-PCR, która pozwala na analizę polimorfizmu długości odcinków unikatowego DNA oddzielających bloki sekwencji mikrosatelitarnych jądrowego DNA

Tabela 1. Wykaz stanowiska *Bromus carinatus* na terenie Polski, z których pochodził materiał do badań
Table 1. Stands of *Bromus carinatus* in Poland indicated origin of plant material included in the study

Numer stanowiska (Locality no.)	Liczba osobników (Number of specimens)	Stanowisko (Locality)	Współrzędne geograficzne (Coordinates)			Siedlisko (Habitat)		Opis siedliska (Habitat description)
			Szer. (Lat.)	Dł. (Lon)	Ruderalne (Ruderal)	Segetalne (Segetal)		
1	3	Borne Sulinowo (woj. zachodniopomorskie)	53°34.938024' N	16°32.298209' E	+		przydroże (roadside)	
2	1	Borne Sulinowo (woj. zachodniopomorskie)	53°31.815374' N	16°29.527725' E	+		przydroże (roadside)	
3	2	Miłosławice (woj. wielkopolskie)	52°42.634400' N	17°21.580616' E		+	zachwaszczona uprawa jęczmienia (weedy barley crop)	
4	1	Jastrzębniki (woj. wielkopolskie)	51°50.899909' N	18°1.664380' E	+		nieużytek przy drodze asfaltowej (wasteland near road)	
5	3	Lubczyna (woj. łódzkie)	51°20.713641' N	18°9.398019' E	+		obrzeże trawnika osiedlowego (edge of an urban lawn)	
6	1	Ciarka (woj. opolskie)	50°56.744545' N	18°19.117454' E		+	obrzeże drogi polnej przy uprawie zbożowej (roadside near a cereal crop)	
7	1	Tapkowice (woj. śląskie)	50°26.918278' N	19°0.910529' E	+		przydroże (roadside)	
8	13	Gliwice – Łabędy (woj. śląskie)	50°19.100658' N	18°40.018281' E	+		obrzeże trawnika osiedlowego (edge of an urban lawn)	
9	1	Rybnik (woj. śląskie)	50°7.263868' N	18°31.980737' E	+		przydroże (roadside)	
10	4	Jaworzno (woj. śląskie)	50°12.499507' N	19°15.898392' E	+		obrzeże trawnika osiedlowego (edge of an urban lawn)	
11	1	Jaworzno (woj. śląskie)	50°13.633226' N	19°13.941825' E	+		trawnik miejski (urban lawn)	
12	1	Jaworzno-Ciężkowice (woj. śląskie)	50°12.903629' N	19°21.822249' E	+		przydroże (roadside)	
13	3	Zabrze (woj. śląskie)	50°18.391735' N	18°47.039652' E	+		trawnik miejski (urban lawn)	

14	2	Wodzisław Śląski (woj. śląskie)	50°0.175494' N	18°27.595974' E	+	przydroże (roadside)
15	2	Jastrzębie Zdrój (woj. śląskie)	49°57.431740' N	18°33.896096' E	+	trawnik miejski (urban lawn)
16	1	Olkusz (woj. małopolskie)	50°16.865924' N	19°33.575288' E	+	przydroże na obrzeżach miasta (roadside in suburbs)
17	2	Miechów (woj. małopolskie)	50°21.322664' N	20°1.486990' E	+	siedlisko ruderalne przy ulicy (ruderal habitat near road)
18	1	Piaski (woj. pomorskie)	54°25.916952' N	19°36.043601' E	+	przydroże (roadside)
19	1	Krynica Morska (woj. pomorskie)	54°22.808434' N	19°26.490605' E	+	przydroże (roadside)
20	2	Nowy Dwór Gdański (woj. pomorskie)	54°12.549658' N	19°6.748351' E	+	trawnik miejski (urban lawn)
21	2	Ostrołęka (woj. Mazowieckie)	53°5.387968' N	21°34.996818' E	+	siedlisko ruderalne na obrzeżach osiedla (ruderal habitat in suburbs)
22	2	Siedlce (woj. mazowieckie)	52°10.727969' N	22°16.256341' E	+	siedlisko ruderalne na ostedlu (urban ruderal habitat)
23	1	Grójec (woj. mazowieckie)	51°51.866550' N	20°51.545238' E	+	obrzeże trawnika osiedlowego (edge of an urban lawn)



Ryc. 1. Stanowiska *Bromus carinatus* na terenie Polski, z których pochodził materiał do badań

Fig. 1. Stands of *Bromus carinatus* in Poland indicated origin of plant material included in the study

Tabela. 2. Lista próbek nasion *Bromus carinatus* sprowadzonych z kolekcji USDA Plant Introduction Station, Pullman, USA z numerem katalogowym i pochodzeniem nasion

Table 2. List of seed samples of *Bromus carinatus* from USDA Plant Introduction Station, Pullman, USA including accession numbers, and origin of plant material

Oznaczenia populacji (Population annotation)	Numer katalogowy (Accession number)	Pochodzenie nasion (Origin of seeds)	Liczba osobników (No. of individuals)	Uwagi (Remarks)
A	PI 278697	Iowa, USA	4	Forma hodowlana (Cultivar) (SCS PMC-5857)
B	PI 232202	California, USA	5	Forma naturalna w USA (Native in USA)
C	PI 469231		5	Forma hodowlana (Cultivar) (CUCAMONGA)
D	PI 232205	Oregon, USA	2	Forma naturalna w USA (Native in USA)
E	PI 232203	California, USA	3	Forma naturalna w USA (Native in USA)
F	PI 232201	California, USA	2	Forma naturalna w USA (Native in USA)
G	PI 232204	California, USA	6	Forma naturalna w USA (Native in USA)

(STEPANSKY i in. 1999; AWASTHI i in. 2004; RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK 2004). Metoda ta jest wykorzystywana w badaniach filogenetycznych, zarówno roślin dzikich, jak i uprawnych (RAINA i in. 2001; GALVAN i in. 2003; SUTKOWSKA & MITKA 2005). Przydatna jest również w badaniach o charakterze populacyjnym (CAMACHO & LISTON 2001).

Izolacja DNA

Do izolacji DNA wykorzystano w pełni rozwinięte blaszki liściowe. W przypadku roślin przywiezionych z terenu szczególną uwagę zwracano na to, by liście były zdrowe, bez śladów żerowania owadów minujących, pleśni i innych widocznych patogenów mogących być przyczyną zanieczyszczenia obcym DNA. Etapem bezpośrednio poprzedzającym ekstrakcję było rozgniatanie materiału w 2,5M roztworze octanu sodu. Zabieg ten miał na celu zapobieżenie utlenianiu składników soku komórkowego. Następnie dwukrotnie przepłukiwano jałową solą fizjologiczną w celu usunięcia octanu sodu wraz z częścią substancji uwolnionych z komórek, które mogłyby utrudnić lub wręcz uniemożliwić izolację DNA. Z tak przygotowanych próbek izolowano DNA z wykorzystaniem DNA-zol Reagent (Invitrogen) opierając się na metodyce podanej przez producenta.

Próbki DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu z niskotopliwej agarozy (LMP – low melting point – Invitrogen) z dodatkiem bromku etydyny. Rozdział prowadzono w buforze TAE przy napięciu 15V przez 3–4 godz. Po elektroforezie z żelu wycinano bloczki zawierające oczyszczony DNA. Analiza intensywności smug w żelu pozwoliła na orientacyjne określenie ilości oraz stopnia degradacji DNA (SUTKOWSKA 2001).

Amplifikacja DNA z użyciem starterów ISSR

W reakcji PCR użyto odczynników firmy Fermentas. Sekwencje starterów zaczerpnięto z pracy STEPANSKY i in. (1999). Amplifikacje przeprowadzono w 25 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej około 100 ng badanego DNA, bufor do polimerazy, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP, 0,25 mM startera i 1,4 jednostki Taq polimerazy.

Reakcję prowadzono z wykorzystaniem aparatu 2720 Thermal Cycler firmy Applied Biosystems. Temperatura annealingu dla starterów ISSR2 i ISSR4 wynosiła 44°C, a dla starterów ISSR1 i ISSR3 – 47°C.

Jako optymalne ustalono następujące warunki reakcji PCR: – wstępna denaturacja: 94°C – 5 min., następnie 35 cykli: denaturacja 94°C – 30 sek., annealing 44°C (47°C) – 30 sek., polimeryzacja 72°C – 30 sek.; dodatkowa polimeryzacja: 72°C – 7 min.

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR oraz archiwizacja żeli

Rozdziały elektroforetyczne przeprowadzono w 2,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Obrazy rozdziałów elektroforetycznych archiwizowano w komputerze wykorzystując czytnik do żeli Imagemaster VDS firmy Pharmacia – Amersham oraz oryginalny program komputerowy Liscap Capture ver. 1,0.

Analiza wzorów prążkowych

Do analizy wzorów prążkowych wykorzystano program komputerowy GeleScan ver. 1.45 firmy „Kucharzyk Techniki Elektroforetyczne”. Dzięki możliwości wyznaczenia krzywej kalibracyjnej na podstawie wzoru prążkowego markera długości fragmentów DNA (GeneRuler 100bp – Fermentas), możliwe było określenie masy cząsteczkowej uzyskanych produktów amplifikacji.

WYNIKI

Wyniki badań terenowych

91,3% stanowisk *Bromus carinatus*, z których pobierano próby, zlokalizowanych było na typowych siedliskach ruderalnych, związanych najczęściej z terenami zurbanizowanymi. Pozostałe 8,7% to stanowiska na siedliskach segetalnych, w tym odnotowano jedno stanowisko w uprawie jęczmienia, zachwaszczonej przez badany gatunek. W trakcie badań terenowych nie stwierdzono ani jednego stanowiska *B. carinatus* na siedliskach półnaturalnych z klasy *Molinio-Arrhenatheretea*, mimo że te ostatnie również były objęte poszukiwaniami.

Wyniki badań molekularnych

Analizie molekularnej poddano 51 okazów *Bromus carinatus* pochodzących z badanych populacji na terenie Polski (Tab. 1), 12 okazów odmiany hodowlanej 'Broma' i 27 okazów materiału sprowadzonego z kolekcji w USDA, Pullman, USA (Tab. 2).

Analizie komputerowej poddano produkty PCR o długości od 120pz do 1300pz. Pozwoliła ona na określenie wzorów prążkowych charakterystycznych dla okazów: cv. 'Broma', materiału pochodzącego z kolekcji w Pullman oraz materiału zebranego w terenie. Możliwe było również ustalenie produktów markerowych dla *Bromus carinatus*. Za produkty

Tabela 3. Produkty PCR uzyskane ze starterem ISSR4
Table 3. PCR products amplified with primer ISSR4

Długość produktów PCR (Length of PCR products)	Materiał pochodzące z kolekcji USDA Pullman, USA (Material from USDA Pullman, USA)							Osobniki o odmiennych genotypach (Individuals with different genotypes)					'Broma'	Pozostałe osobniki (Rest of individuals)
	A	B	C	D	E	F	G	1a	10a	10b	23	BR	TER	
Bp														
580									+	+				
540		+	+	+	+	+	+							
500	+	+		+		+	+				+			
450			+	+	+						+	+	+	
420								+						
400	+	+	+	+	+	+	+							
370								+	+	+	+	+	+	
330	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
290								+						
260	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
220									+	+				

Bp – długość fragmentów DNA (length of PCR products), A – G – materiał z kolekcji USDA Pullman (material from USDA Pullman), 1a – Borne Sulinowo, 10a, 10b – Jaworzno, 23 – Grójec – osobniki o odmiennych genotypach (individuals with different genotypes), BR – cv. 'Broma', TER – pozostałe osobniki z badanych populacji (rest of individuals from analysed populations)

Tabela 4. Produkty PCR uzyskane ze starterem ISSR7
Table 4. PCR products amplified with primer ISSR 7

Długość produktów PCR (Length of PCR products)	Materiał pochodzące z kolekcji USDA Pulman, USA (Material from USDA Pulman)													Pozostałe osobniki (Rest of individuals)			
	A	B	C	G	D	E	F	Ia	5c	10a	10b	17a	22b		23	BR	TER
Bp																	
790						+											+
740																	
720			+														
700				+													
630					+												
600		+															
580	+		+													+	
550		+															
520		+															
500																	
470	+						+										
430		+		+													
410								+									
380																	
360		+															
340																	
320	+																
260																	
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
240	+																
200																	

Bp – długość fragmentów DNA (length of PCR products), A – G – materiał z kolekcji USDA Pullman (material from USDA Pullman), Ia – Borne Sulino, 5c – Lubczyzna, 10a, 10b – Jaworzno, 17a – Miechów, 22b – Siedlce, 23 – Grójec – osobniki o odmiennych genotypach (individuals with different genotypes), BR – cv. 'Broma', TER – pozostałe osobniki z badanych populacji (rest of individuals from analysed populations)

markerowe dla gatunku uznano tylko te, które występowały u 100% badanych okazów: ISSR3 – 200 pz, ISSR4 – 260 pz i 330 pz, ISSR6 – 200 pz oraz ISSR7 – 260 pz. Ponadto starter ISSR4 generował produkty specyficzne dla materiału pochodzącego z kolekcji w Pullman (400 pz) oraz dla odmiany 'Broma' i materiału z badanych stanowisk (370 pz) (Tab. 3).

Wszystkie przebadane okazy cv. 'Broma' posiadały ten sam wzór prążkowy, co świadczy o braku zmienności na poziomie molekularnym w tej grupie roślin. Niski polimorfizm obserwowano również w przypadku materiału pochodzącego z kolekcji w Pullman. 44 okazy pochodzące z 20 badanych populacji wykazywały brak polimorfizmu, a uzyskane wzory prążkowe były identyczne z wzorami odmiany 'Broma'.

Siedem okazów zebranych w terenie oprócz markerów specyficznych dla *Bromus carinatus* posiadało produkty PCR odmienne zarówno od cv. 'Broma', jak i materiału pochodzącego z kolekcji w Pullman. Okazy te pochodziły z sześciu stanowisk (1, 5, 10, 17, 22 i 23) (Tab. 1). Na pierwszych pięciu rosły w sąsiedztwie okazów zidentyfikowanych jako odmiana 'Broma', a w jednym (trzydziestym) zebrano tylko jeden okaz. Okazy 1a, 10a, 10b i 23 jako odmienne zostały zidentyfikowane w przypadku wszystkich zastosowanych w analizie starterów (Tab. 3), a okazy 5c, 17a, i 22b przy użyciu startera ISSR07 (Tab. 4).

DYSKUSJA

Bromus carinatus jako gatunek samopylny, o kwiatach często klejstogamicznych jest bardzo dogodnym obiektem do prowadzenia badań nad introdukcją obcych elementów do flory naszego kraju. U roślin o takim typie rozmnażania obserwuje się bardzo niski stopień polimorfizmu na poziomie DNA. Mała zmienność genetyczna ułatwia identyfikację markerów molekularnych specyficznych dla gatunku, populacji, czy odmian hodowlanych. Dzięki temu w przeprowadzonych badaniach możliwe było określenie, czy dany okaz reprezentuje odmianę 'Broma', czy też nie.

Podjęcie badania przyjęto hipotezę roboczą zakładającą, że część spotykanych na siedliskach synantropijnych okazów *Bromus carinatus* reprezentuje odmianę 'Broma', a część stanowi materiał zawleczony z naturalnych stanowisk w Ameryce Północnej lub naturalizowanych w innych krajach Europy.

Przeprowadzone badania molekularne potwierdziły przyjętą hipotezę roboczą. Wśród przebadanych okazów większość stanowiła 'Broma'. Wynik ten potwierdza przewidywania MIRKA (1984), że zwiększający się obszar uprawy *Bromus carinatus* w latach 80. sprawi, że stanie się on częstym gatunkiem synantropijnym w całej Polsce. Ucieczki gatunków z upraw są zjawiskiem często spotykanym i obserwowanym również w przypadku *B. carinatus*, w niektórych rejonach Ameryki Północnej czy Wielkiej Brytanii (MIREK 1984). Gatunkom takim w naszej florze nadawany jest status ergazjofigitów. Są to taksowy obce, uprawiane współcześnie i przejściowo dziczejące. W Polsce w przypadku traw są to najczęściej pospolicie uprawiane i hodowane gatunki zbóż lub traw ozdobnych (w sumie 12 taksonów) (KORNIK 2002). Ergazjofigity można spotkać na wysypiskach śmieci,

przydrożach, w okolicach ogródków działowych lub w łąkach innych roślin uprawnych. Gatunki takie z reguły są krótkotrwałym elementem naszej flory.

Trwale zadomowienie się *Bromus carinatus* w Polsce nastąpiło dość szybko. Gatunek ten, w 1986 r. uznawany jeszcze za efemerofitę (ROSTAŃSKI & SOWA 1986–1987), dzięki zdolności do produkcji dużej liczby płodnych nasion oraz wyraźnej tendencji do rozprzestrzeniania się w siedliskach synantropijnych, wkrótce zyskał status kenofity (ZAJĄC i in. 1998). Przyczyny takiego stanu rzeczy można upatrywać w tym, że większość uprawianych u nas gatunków (odmian) wywodzi się z klimatu wyraźnie różniącego się od klimatu Polski (najczęściej znacznie cieplejszego), podczas gdy *B. carinatus* wywodzi się z warunków klimatycznych zbliżonych do panujących w naszym kraju.

Na uwagę zasługuje również fakt, że w Polsce *Bromus carinatus* zajmuje siedliska ruderalne, dalece różne od tych, w jakich występuje w swej ojczyźnie. Jako wysoce prawdopodobne można rozpatrywać co najmniej dwie tego przyczyny: 1) *B. carinatus* przegrywa konkurencję z lepiej przystosowanymi rodzimymi gatunkami traw łąkowych, 2) gatunek ten został zawleczony przez człowieka, występuje więc w siedliskach związanych z człowiekiem, o czym świadczy jego szczególnie ekspansywny rozwój na terenach silnie zurbanizowanych.

W przebadanym materiale, oprócz okazów z wzorami charakterystycznymi dla odmiany 'Broma', zidentyfikowano również okazy o odmiennych wzorach prążkowych. Oznacza to, że niezależnie od ucieczki odmiany hodowlanej z upraw, do naszego kraju zostały zawleczone odmienne genotypy *Bromus carinatus*. Okazy takie występowały na trawnikach miejskich i przydrożach, co również sugeruje udział człowieka w transporcie nasion na teren Polski. Co prawda, okazy te miały inne wzory prążkowe niż materiał pochodzący z kolekcji w Pullman, ale przecież kolekcje dysponują jedynie materiałem z wybranych obszarów zasięgu, a więc tylko wycinkiem zmienności genetycznej danego taksonu. Prawdopodobnie w tym przypadku nasiona zostały zawleczone z części zasięgu, z której nie dysponujemy materiałem porównawczym. Znamienne jest również to, że w siedliskach związanych z uprawami (obrzeża pól, polne drogi) nie stwierdzono okazów innych niż odmiany 'Broma'.

Najbardziej jednak zaskakującym był wynik świadczący o tym, że rosnące obok siebie, na trawnikach miejskich okazy *Bromus carinatus* miały odmienne genotypy: jedne były przedstawicielami cv. 'Broma', a inne miały wyraźnie odmienne wzory prążkowe DNA. Obserwacja ta skłania do stwierdzenia, że materiał zawleczony do Polski współwystępuje na siedliskach synantropijnych z cv. 'Broma', a *B. carinatus* bez względu na źródło pochodzenia wybiera w naszym kraju takie same siedliska. Fakt, że większość okazów pochodzących z prób pobranych w terenie to 'Broma', dobitnie świadczy o tym jak duże znaczenie w szybkim rozprzestrzenianiu się *B. carinatus* na terenie całego kraju miało wprowadzenie tego gatunku do uprawy. Znaczna liczba stanowisk badanego gatunku oraz przypuszczalny czas udomowienia potwierdza jego dużą ekspansywność, na którą zwracali uwagę STEBBINS (1947), HUBBARD (1972), a także autor pierwszego notowania stanowiska *B. carinatus* w Polsce (MIREK 1984).

Zgodnie z kryteriami, proponowanymi przez niektórych autorów (PYŠEK 1995; RICHARDSON i in. 2000), stokłosa spłaszczona mieści się w szerokiej definicji gatunku

inwazyjnego, w przeciwieństwie do zawężonej definicji zaproponowanej przez KORNASIA i MEDWECKĄ-KORNAŚ (2002), według której inwazją jest „spektakularna forma masowej ekspansji nowego przybysza, który pojawia się nagle i tak obficie, że może powodować poważne zakłócenia ekologiczne i dotkliwe straty gospodarcze”. Jednym z kryteriów inwazyjności gatunku jest również jego zdolność do wkraczania na siedliska półnaturalne i naturalne. W literaturze można znaleźć doniesienia o występowaniu *Bromus carinatus* na siedliskach półnaturalnych (KOMPALA & WOŹNIAK 2001; BUDYŚ & DOBRZYŃSKA 2004), choć to zjawisko należy raczej do rzadkości, a większość jego stanowisk odnotowano na siedliskach synantropijnych (JACKOWIAK 1993; KOMPALA & WOŹNIAK 2001; WOŁKOWYCKI 2001; MISIEWICZ 2001; PAWLAK 2003; PASIERBIŃSKI i in. 2005; WITOSŁAWSKI 2005; WRZESIEŃ 2005; PASIERBIŃSKI & BŁOŃSKA 2007). Wydaje się więc, że gatunek ten pozostaje w stadium epekofita, choć według danych literaturowych w Polsce ma status agriofita (ZAJĄC i in. 1998) lub hemiagriofita (KORNIAK 2002).

Analiza materiałów źródłowych, wyniki przeprowadzonych badań terenowych oraz molekularnych skłaniają do sformułowania wstępnych wniosków:

(1) Analiza ISSR-PCR pozwoliła na określenie wzorów prążkowych charakterystycznych dla *Bromus carinatus* oraz specyficznych dla odmiany ‘Broma’ i materiału pochodzącego z kolekcji w Pullman.

(2) W materiale pochodzącym z badanych populacji zidentyfikowano okazy, których wzory prążkowe potwierdzały ich przynależność gatunkową, a jednocześnie świadczyły o ich odmienności w stosunku do odmiany ‘Broma’ i materiału z kolekcji USDA, Pulman, USA.

(3) Wyniki przeprowadzonych badań molekularnych wskazują na więcej niż jedno źródło pochodzenia dzikich populacji *Bromus carinatus*.

(4) Większość notowań *Bromus carinatus* na terenie Polski pochodzi z siedlisk synantropijnych, co sugeruje iż badany gatunek powinien posiadać status epekofita.

(5) Aktualna wiedza o rozmieszczeniu, spektrum siedliskowym i ekspansywności badanego gatunku w Polsce jest niekompletna i wymaga uzupełnienia.

LITERATURA

- AINOUCHE M. L., BAYER R. J., GOURRET J. P., DEFONTAINE A. & MISSET M. T. 1999. The allotetraploid invasive weed *Bromus hordeaceus* L. (*Poaceae*): genetic diversity, origin and molecular evolution. – *Folia Geobot.* **34**: 405–419.
- ARMSTRONG K. C. 1991. Chromosome evolution of *Bromus*. – W: T. TSUCHIYA & P. K. GUPTA (red.), Chromosome engineering in plants: Genetics, breeding, evolution, Part B, s. 363–377. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- AWASTHI A. K., NAGARAJA G. M., NAIK G. V., KANGINAKUDRU S., THANGAVELU K. & NAGARAJU J. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. – *BCM Genetics* **5**: 1.
- BORKOWSKY O. & HARTWIG U. 1997. Vorkommen und Vergesellschaftung von *Bromus carinatus* Hooker & Arnott bei Gifhotrn – SO-Niedersachsen. *Braunschw. Naturkd. Seher.* **5**(2): 467–477.
- BUDYŚ A. & DOBRZYŃSKA A. 2004. *Bromus carinatus* Hook. & Arn. na Pobrzeżu Kaszubskim. – *Acta Bot. Cassub.* **4**: 207–211.

- CAMACHO F. J. & LISTON A. 2001. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (*Ophioglossaceae*) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). – *Am. J. Bot.* **88**: 1065–1070.
- FALKOWSKI M. (red.) 1982. *Trawy polskie*. s. 565. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- GALVAN M. Z., BORNET B., BALLATI P. A. & BRANCHARD M. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). – *Euphytica* **132**: 297–301.
- HUBBARD C. E. 1972. *Grasses*. s. 462. The Chaucer Press, Bunnary, Suffolk.
- JACKOWIAK B. 1993. Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Poznaniu. – *Pr. Zakł. Takson. Rośl. Univ. A. Mickiewicza w Poznaniu*. s. 409. Wyd. Bogucki, Poznań.
- KOMPAŁA A. & WOŹNIAK G. 2001. The role of grasses in chosen anthropogenic plant communities in the Upper Silesia Industrial District. – W: L. FREY (red.), *Studies on grasses in Poland*, s. 329–351. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- KORNAŚ J. & MEDWECKA-KORNAŚ A. 2002. *Geografia roślin*. s. 634. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- KORNIAK T. 2002. *Trawy synantropijne*. – W: L. FREY (red.), *Polska księga traw*, s. 277–300. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, Kraków.
- LISTA ODMIAN ROŚLIN Rolniczych COBORU. 1988. s. 1. Wyd. Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych, Słupia Wielka.
- MASSA A. N., LARSON S. R., JENSEN K. B. & HOLE D. J. 2001. AFLP variation in *Bromus* section *Ceratochloa* germplasm of Patagonia. – *Crop Sci.* **41**: 1609–1616.
- MIREK Z. 1984. *Bromus carinatus* Hook. et Arn. – nowy gatunek synantropijny we florze Polski. – *Fragm. Flor. Geobot.* **28**(2): 97–105.
- MIREK Z. & PIĘKOŚ- MIRKOWA H. 2002. *Trawy gór.* – W: L. FREY (red.), *Polska księga traw*, s. 143–166. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, Kraków.
- MISIEWICZ J. 2001. Adventive grass species in the synanthropic flora of the Polish seaports. – W: L. FREY (red.), *Studies on grasses in Poland*, s. 251–256. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- OPIS ODMIAN ROŚLIN Rolniczych COBORU. 1988. s.1. Wyd. Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych, Słupia Wielka.
- PALLAS J. 1994. *Bromus carinatus* Hooker & Arnott in Deutschland. – *Flor. Rundbr.* **27**: 84–89.
- PASIERBIŃSKI A. & BŁOŃSKA A. 2007. Ecological and phytosociological occurrence of *Bromus carinatus* Hook. & Arn. in the city of Katowice (Silesian Upland). – W: S. WIKI & G. WOŹNIAK (red.), *Threats and protection of vegetation in the Upper Silesia and adjacent areas (southern Macroregion)*, s. 105–115, Katowice.
- PASIERBIŃSKI A., WOŹNIAK G. & TOKARSKA-GUZIŁ B. 2005. *Bromus carinatus* in synanthropic communities in the central part of Silesia Upland (S Poland). – W: L. FREY (red.), *Biology of grasses*, s. 335–342. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- PAWLAK G. 2003. Grasses in ruderal vegetation of the Wielkopolska region. – W: L. FREY (red.), *Problems of grass biology*, s. 471–493. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- PYŠEK P. 1995. On the terminology used in plant invasion studies. – W: P. PYŠEK, K. PRACH, M. REJMÁNEK & M. WADE (red.), *Plant invasions – General aspects and special problems*, s. 77–81. Academic Publishing, Amsterdam.

- RAINA S. N., RANI V., KOJIMA T., OGIHARA Y., SINGH K. P. & DEVARUMATH R. M. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. – *Genome* **44**: 763–772.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA M. & BOLIBOK H. 2004. Characteristics and comparison of three classes of micro-satellite-based markers and their application in plants. – *Cell. Mol. Biol. Lett.* **9**: 221–238.
- RICHARDSON D. M., PYŠEK P., REJMÁNEK M., BARBOUR G., PANETTA F. D. & WEST C. J. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concept and definitions. *Diversity and Distribution*. – Blackwell Science Ltd. **6**: 93–107.
- ROSTAŃSKI K. & SOWA R. 1986–1987. Alfabetyczny wykaz efemerofitów Polski. – *Fragm. Flor. Geobot.* **31–32**(1–2): 151–205.
- RUTKOWSKI L. 2002. Trawy niżu. – W: L. FREY (red.), *Polska księga traw*, s. 167–185. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, Kraków.
- SMITH P. M. 1970. Taxonomy and nomenclature of the Brome-grasses (*Bromus* L. s. l.). – *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* **30**: 361–376.
- STEBBINS G. L. 1947. The origin of the complex of *Bromus carinatus* and its phytogeographic implications. – *Contr. Gray. Herb.* **165**: 42–55.
- STEBBINS G. L. 1981. Chromosomes and evolution in the genus *Bromus* (*Gramineae*). – *Bot. Jahrb. Syst.* **102**: 359–379.
- STEPANSKY A., KOVALSKI I. & PERL-TREVES R. 1999. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. – *Plant Syst. Evol.* **271**: 313–332.
- STUBBENDIECK J., HATCH S. & BUTTERFIELD C. 1992. *North American range plants*. 4th ed. s. 493. University of Nebraska Press, Lincoln.
- SUTKOWSKA A. 2001. Molecular analysis of ancient DNA isolated from Aset-iri-Khet-es tissues. – W: K. BABRAJ & H. SZYMAŃSKA (red.), *Results of interdisciplinary examination of the Egyptian mammy of Aset-iri-Khet-es from Archeological Museum in Cracow*, s. 111–116. Wyd. PAU, Kraków.
- SUTKOWSKA A. & MITKA J. 2005. Molecular PCR-ISSR analysis in *Bromus* subgenus *Festucaria* – preliminary results. – W: L. FREY (red.), *Biology of grasses*, s. 207–216. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- TOKARSKA-GUZIŁ B. 2005. The establishment and spread of alien plant species (kenophytes) in the flora of Poland. s. 192. Wyd. Uniwersytet Śląski, Katowice.
- WITOSŁAWSKI P. 2005. Distribution of grasses in condition of urban pressure in the territory of Łódź. – W: L. FREY (red.), *Biology of grasses*, s. 159–170. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- WÓLKOWYCKI D. 2001. Alien grass species in the North Podlasie Lowland (north-eastern Poland). – W: L. FREY (red.), *Studies on grasses in Poland*, s. 234–249. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- WRZESIEŃ M. 2005. Alien species of grasses in the flora of the railway areas of central-eastern Poland. – W: L. FREY (red.), *Biology of grasses*, s. 139–150. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- ZAJĄC A., ZAJĄC M. & TOKARSKA-GUZIŁ B. 1998. Kenophytes in the flora of Poland: list, status and origin. – *Phytocoenosis* **10** (N.S) Supp. *Cartogr. Geobot.* **9**: 107–116.

SUMMARY

Bromus carinatus is an alien species in Polish flora. It comes from North America and it was recorded in Europe since the beginning of 20th century. It is a autogamous plant with cleistogamic flowers and it shows, therefore, low level of genetic variation. Mainly because of these features it is a convenient model in research on spread of introduced taxa in Europe.

We undertook a research on 51 accessions of *Bromus carinatus* collected in 23 ruderal and segetal sites in Poland, 12 accessions of cultivated *B. carinatus* cv. 'Broma' as well as 27 accessions obtained from USDA. Molecular analysis was carried out using ISSR-PCR and amplification products were separated on agarose gels. We showed that 44 accessions from different sites shared the same band pattern with *B. carinatus* cv. 'Broma', while 7 accessions had different electrophoretic profiles. Therefore, we suggest that apart from *B. carinatus* cv. 'Broma' there are some rare individuals, present in investigated populations, originating from seeds that were brought accidentally from habitats of *B. carinatus* in other parts of Europe.

Przyjęto do druku: 17.04.2009 r.