

Analiza prawdopodobnych, naturalnych mieszańców pomiędzy *Phleum commutatum* i *P. pratense* (Poaceae)

ADAM KULA i ALEKSANDRA GRABOWSKA-JOACHIMIAK

KULA, A. AND GRABOWSKA-JOACHIMIAK, A. 2009. Analysis of probable natural hybrids between *Phleum commutatum* and *P. pratense* (Poaceae). *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica* 16(1): 65–77. Kraków. PL ISSN 1640-629X.

ABSTRACT: The research involved examination of 4 populations of the timothy coming from natural positions on both hemispheres of the globe, classified by the Seed Bank as the alpine timothy. Morphological and cytogenetic analyses did not confirm the systematic status attributed before. All the studied forms might be hybrids between the alpine timothy and meadow timothy; the supposition is supported by a number of similarities between the examined specimens and some experimental hybrids of the timothy recently described. This is one of the first reports regarding the possibility of the occurrence of natural interspecific hybrids within the *Phleum* section.

KEY WORDS: section *Phleum*, natural interspecific hybrids, morphology, karyotype structure, heterochromatin, DNA amount

Adam Kula, Aleksandra Grabowska-Joachimia, Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Łobzowska 24, PL-31-140 Kraków, Polska; e-mail: rrkula@cyf-kr.edu.pl, rrjoachi@cyf-kr.edu.pl

WSTĘP

W sekcji *Phleum* występują dwie wyraźne grupy gatunkowe: *Phleum alpinum* zajmująca stanowiska górskie i *P. pratense* rosnąca na terenach nizinnych. Przedstawiciele obydwu grup spotykają się na terenach podgórskich położonych na wysokości około kilkuset metrów n.p.m. Taksony w nich występujące są blisko spokrewnione i w warunkach eksperymentalnych zdolne są do wytwarzania form mieszańcowych (NORDENSKIÖLD 1945; 1957; KULA i in. 2007). Nie wiadomo jednak czy i jak często mieszańce pomiędzy górkimi i nizinnymi gatunkami tymotek z sekcji *Phleum* powstają w warunkach naturalnych. Jak dotąd oprócz sporadycznych doniesień brak wiadomości na ten temat (JOACHIMIAK & KULA 1993). Jak się wydaje istnienie takich naturalnych mieszańców może mieć istotne znaczenie w procesach mikroewolucyjnych zachodzących obrębie sekcji *Phleum*. Ostatnie doniesienia wskazują na zachodzenie w wymienionej sekcji w grupie *P. pratense* specjacji sympatrycznej, u roślin opartej w dużej mierze na procesie poliploidyacji i tworzeniu się mieszańców międzygatunkowych (PERNÝ i in. 2008). W przeszłości w sekcji *Phleum* z mieszańców międzygatunkowych powstawały nowe gatunki. Chodzi tutaj o *P. pratense* L. – autoalloheksaploida

wyposażonego w genomy pochodzące od diploidalnej tymotki kolankowatej (*P. hubbardii* D. Kováts) i prawdopodobnie tetraploidalnej tymotki alpejskiej z grupy *P. alpinum* (*P. commutatum* Gaudin) (CAI & BULLEN 1991; JOACHIMIAK & KULA 1993; JOACHIMIAK & KULA 1997). Mieszaniówce pochodzenie ma również przypuszczalnie występujący w obszarze śródziemnomorskim *P. echinatum* Host, diploidalny przedstawiciel grupy *P. alpinum*, cechujący się występowaniem znacznej ilości jądrowego DNA charakterystycznej dla tymotek tetraploidalnych. Badania cytogenetyczne *P. echinatum* wskazują na wyraźne podobieństwa struktury jego kariotypu do przedstawicieli grupy *P. pratense*, co może świadczyć o występowaniu u tego alpejskiego taksonu pewnej puli genów pochodzących od nizinnej grupy tymotek (JOACHIMIAK 2005; KULA 2005).

Celem pracy było przeprowadzenie analizy morfologicznej i cytogenetycznej prawdopodobnych, naturalnych mieszańców pomiędzy *Phleum commutatum* Gaud. i *Phleum pratense* L., otrzymanych z Banku Nasion z USA, pod kątem ich pochodzenia.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były okazy czterech populacji tymotek wyhodowane z nasion przesłanych przez Bank Nasion z USA. Analizowane rośliny pochodziły z naturalnych stanowisk z Kanady, Argentyny, Rosji i Azerbejdżanu. Materiał opisany był jako *Phleum alpinum* L. i *Phleum commutatum* Gaud. (Tab. 1). Rośliny rosły w pokoju vegetacyjnym, przy długim dniu (16 godzin dzień, 8 godzin noc) w temperaturze 16–20°C. Obserwacje morfologiczne miały na celu właściwe oznaczenie otrzymanego materiału i opierały się przede wszystkim na analizie pokroju roślin, morfologii kłoska i jęczyzka liściowego. Analizy cytologiczne przeprowadzono na 30 wyrosniętych okazach każdej z form. Chromosomy barwiono konwencjonalnie orceiną octową oraz różnicowo, metodą prążków C (C-banding) (JOUVE i in. 1980). Somatyczną liczbę chromosomów ustalano na podstawie obserwacji ponad 70 płytek metafazowych dla każdej populacji. Dane statystyczne użyteczne do analizy kariotypu po barwieniu orceiną uzyskano poprzez pomiary chromosomów w obrębie 20 najlepiej rozłożonych płytek metafazowych. Współczynnik asymetryczności kariotypu: „A” obliczano według wzorów, jakie podają WATANABE i in. (1999). Szczegóły budowy kariotypu prążkowego ustalono na podstawie analizy 10 płytek metafazowych barwionych metodą prążków C.

Pomiarów cytometrycznych ilości jądrowego DNA dokonano w jądrach młodych liści z użyciem cytometru przepływowego Partec CCA i linii *Zea mays* CEE-777 (5,43 pg/2C, LYSÁK & DOLEŽEL 1998) jako

Tabela 1 (Table 1). Pochodzenie materiału badawczego (Origin of the research material)

Numer katalogowy Banku Nasion ¹ (The Gene Bank ¹ catalogue number)	Oznaczenie Banku Nasion (The Gene Bank significations)	Miejsce pochodzenia (Place of origin)
PI 236891	<i>Phleum alpinum</i> L.	Kanada (Canada), stanowisko naturalne, brak danych o dokładnej lokalizacji (lack of data about exact location)
PI 202048	<i>Phleum commutatum</i> Gaud.	Argentyna (Argentina), stanowisko naturalne, brak danych o dokładnej lokalizacji (lack of data about exact location)
PI 619539	<i>Phleum alpinum</i> L.	Rosja (Russia), Maykop w Kraju Krasnodarskim (Krasnodar kray)
PI 230269	<i>Phleum alpinum</i> L.	Azerbejdżan (Azerbaijan), Kuhe Sahand, 3030 m n.p.m. (at 3030 m a.s.l.)

¹USDA, ARS, WRPIS, Washington State University, Regional Plant Introduction Station, Pullman, Washington

standardu, zaś próby przygotowano według opisanej wcześniej metodyki (JOACHIMIAK i in. 2001). Dla określenia ilości 2C DNA dla okazów z danego stanowiska przyjęto średnią z pomiarów 10 roślin. Pomiar cytometryczne zostały wykonane w Zakładzie Biologii Molekularnej i Cytometrii, Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.

WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza pokroju roślin, morfologii języczka liściowego i kłoska

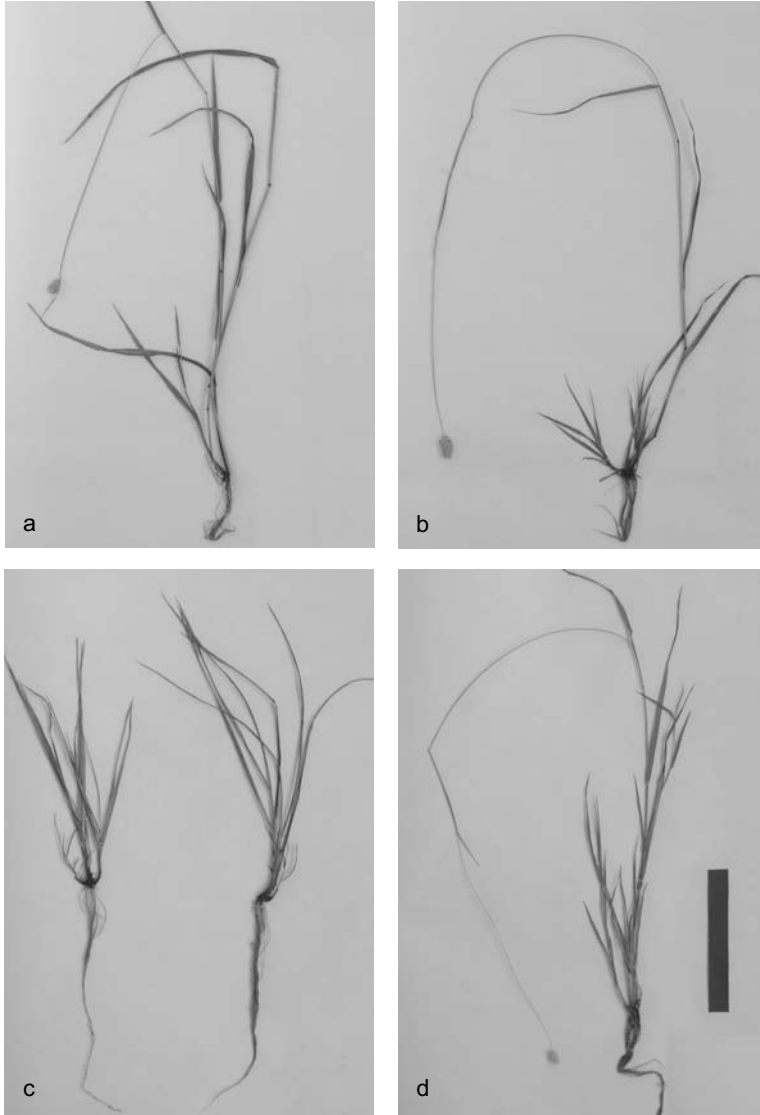
Okazy trzech badanych populacji *Phleum* (z Kanady, Argentyny i Azerbejdżanu) zakwitły i pokrojem przypominały przedstawiciela grupy *Phleum pratense*: *P. hubbardii* D. Kováts – tymotkę kolankowatą (Ryc. 1). Posiadały delikatne: proste lub łukowato wzniesione źdźbła, tworzyły luźne kępy. Osiągnęły wysokość średnio od 20 do 65 cm. Rośliny z Rosji także rosły w luźnych kępach, nie zakwitły jednak w ciągu dwóch lat prowadzenia obserwacji, były też wyraźnie mniejsze – od 10 do 25 cm. Okazy ze wszystkich stanowisk okazały się formami wieloletnimi. Brak kwitnienia roślin z populacji rosyjskiej mógłby pośrednio wskazywać na ich przynależność do grupy *P. alpinum* (tymotki z tej grupy rzadko zakwitają w warunkach sztucznych).

Phleum commutatum wykształca krótkie, tępo zakończone języczki liściowe, natomiast u *Phleum pratense* języczki są wyraźnie dłuższe i mogą być ostro zakończone (HUMPHRIES 1980; PIGNATTI 1982; CONERT 1998). Analizowane okazy tymotek z Kanady, Argentyny i Azerbejdżanu wykazywały pod względem tej cechy podobieństwo do *Phleum pratense*. Jedynie w populacji rosyjskiej zaobserwowano języczki charakterystyczne dla *Phleum commutatum* (Ryc. 2).

Kłoski *Phleum commutatum* charakteryzują się najdłuższymi w całym rodzaju *Phleum* nieowłosionymi wyrostkami ościstymi (ich długość może sięgać powyżej 2 mm) i gęstym owłosieniem plew. Przedstawiciele grupy *Phleum pratense* mają zdecydowanie krótsze wyrostki ościste i rzadziej owłosione plewy od przedstawicieli grupy *P. alpinum* (HUMPHRIES 1980; CONERT 1998; KULA 2005a). Kłoski roślin z Kanady, Argentyny i z Azerbejdżanu wykazywały cechy pośrednie między *P. commutatum* i *P. pratense*. Stosunkowo długie wyrostki ościste u okazów z Kanady, przypominały te, występujące u *Phleum commutatum* Gaud., natomiast niezbyt gęste owłosienie plew upodabniało je do *P. pratense* L. W populacji argentyńskiej i azerskiej plewy z krótkimi wyrostkami wykazywały podobieństwo do tymotki łąkowej natomiast ich gęste owłosienie, przypominało wykształcenie tej cechy u tymotki alpejskiej (Ryc. 3). W przypadku opisanych populacji nie zaobserwowano więc ani typowych kłosek *Phleum commutatum*, ani typowych kłosek *Phleum pratense*. Może to świadczyć o mieszańcowym pochodzeniu tych roślin.

Somatyczne liczby chromosomów i struktura kariotypu

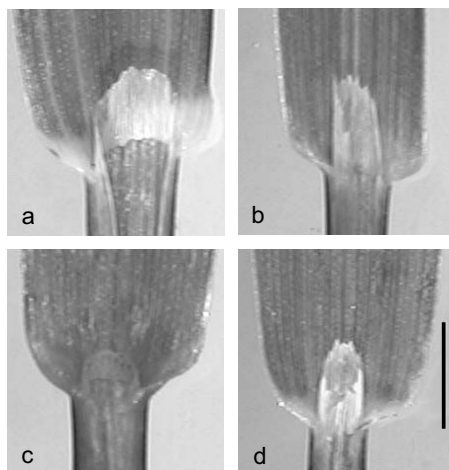
Przeprowadzone barwienia konwencjonalne z użyciem orceiny octowej umożliwiły określenie morfologii i liczby chromosomów. U badanych okazów *Phleum*, stwierdzono dwie euploidalne liczby chromosomów: tetraploidalną – $2n = 4x = 28$, u okazów pochodzących



Ryc. 1. Okazy zielnikowe badanych populacji *Phleum*. **a.** z Kanady, **b.** z Argentyny, **c.** z Rosji, **d.** z Azerbejdżanu (podziałka 10 cm)

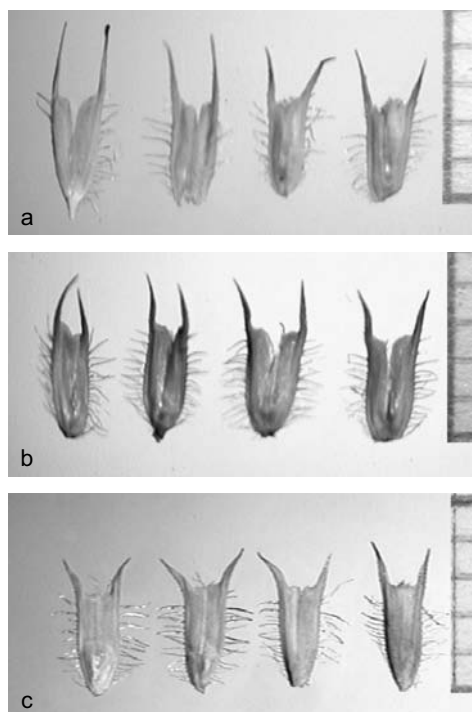
Fig. 1. Herbarial specimens of the investigated populations of *Phleum*. **a.** from Canada, **b.** from Argentina, **c.** from Russia, **d.** from Azerbaijan (scale 10 cm)

z Rosji, oraz heksaploidalną – $2n = 6x = 42$, u roślin z Kanady, Argentyny i Azerbejdżanu (Ryc. 4). Stwierdzona w populacjach: kanadyjskiej, argentyńskiej i azerskiej heksaploidalna liczba chromosomów typowa jest dla tymotki łąkowej (*P. pratense* L.), nie notowano jej dotąd u tymotki alpejskiej (*P. commutatum*) (JOACHIMIAK & KULA 1993, 1996). Natomiast tetraploidalna liczba chromosomów zaobserwowana w populacji rosyjskiej charakterystyczna jest zarówno dla tymotki alpejskiej jak i tymotki łąkowej (CENCI



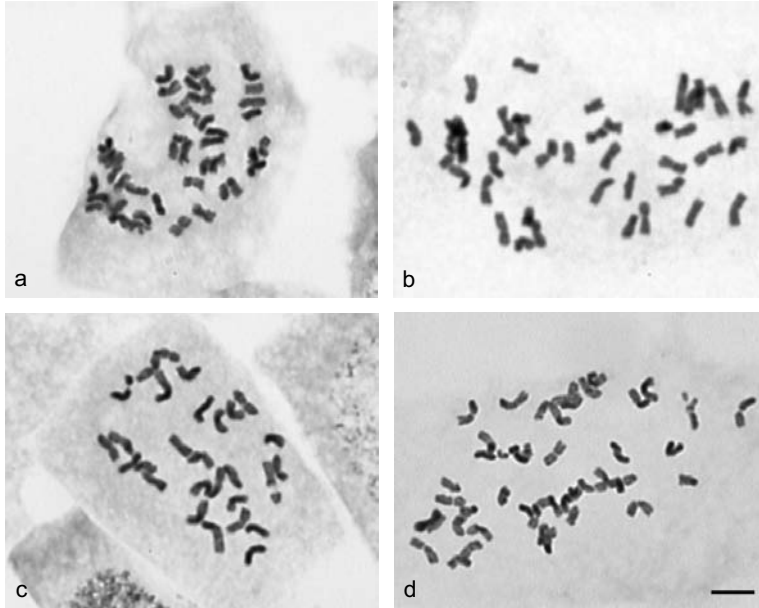
Ryc. 2. Morfologia języczków u badanych populacji *Phleum*. **a.** z Kanady, **b.** z Argentyny, **c.** z Rosji, **d.** z Azerbejdżanu (podziałka 2 mm)

Fig. 2. Morphology of ligules in the investigated populations of *Phleum*. **a.** from Canada, **b.** from Argentina, **c.** from Russia, **d.** from Azerbaijan (scale 2 mm)



Ryc. 3. Morfologia kłosków u trzech populacji *Phleum*. **a.** z Kanady, **b.** z Argentyny, **c.** z Azerbejdżanu (podziałka milimetrowa)

Fig. 3. Morphology of spikelets in three populations of *Phleum*. **a.** from Canada, **b.** from Argentina, **c.** from Azerbaijan (scale in mm)

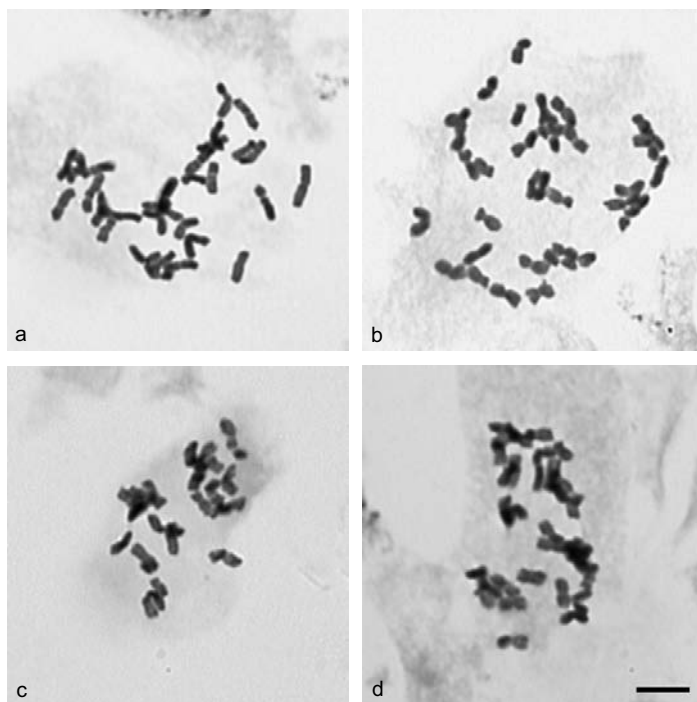


Ryc. 4. Euploidalne płytki metafazowe barwione orceiną octową u badanych cytotypów *Phleum*. **a.** z Kanady – $2n = 6x = 42$, **b.** z Argentyny – $2n = 42$, **c.** z Rosji – $2n = 4x = 28$, **d.** z Azerbejdżanu – $2n = 42$ (podziałka 5 μm)

Fig. 4. Euploid metaphase plates stained with acetic orceine in the investigated cytotypes of *Phleum*. **a.** from Canada – $2n = 6x = 42$, **b.** from Argentina – $2n = 6x = 42$, **c.** from Russia – $2n = 4x = 28$, **d.** from Azerbaijan – $2n = 6x = 42$ (scale 5 μm)

1979; CENCI i in. 1984; KULA 2005a). W badanych populacjach oprócz liczb euploidalnych zaobserwowano również aneuploidalne liczby chromosomów oraz ich znaczną zmienność. U roślin pochodzących z Kanady przeanalizowano płytki metafazowe posiadające od 22 do 55, u roślin z Argentyny: od 15 do 52, u roślin z Azerbejdżanu: od 19 do 75, natomiast u roślin z Rosji: od 21 do 56 chromosomów (Ryc. 5). Generalnie gatunki z rodzaju *Phleum* cechują się występowaniem stabilnych euploidalnych liczb chromosomów i odstępstwa od nich u wszystkich opisanych dotąd kariologicznie taksonów obserwuje się niezwykle rzadko. Zmienność liczby chromosomów zaobserwowano jednak u eksperymentalnych mieszańców pomiędzy tymotką alpejską i łąkową (KULA i in. 2007). Fakt ten przemawia za mieszańcowym pochodzeniem wszystkich czterech badanych populacji tymotek.

Analiza kariotypu po barwieniu konwencjonalnym orceiną octową posłużyła do określenia najważniejszych jego parametrów, takich jak: średnia długość kariotypu, średnia długość chromosomu, współczynnik asymetryczności kariotypu (A) oraz formuła morfologii chromosomów (Tab. 2). U heksaploidalnych okazów tymotek z Kanady, Argentyny i Azerbejdżanu zaobserwowano podobną długość kariotypu: nieco powyżej 130 μm , która sugeruje podobieństwo cytogenetyczne badanych form. Są to długości porównywalne z tymi, jakie zaobserwowano u heksaploidalnych form tymotki łąkowej z Polski i z innych krajów europejskich (KULA 2005a). Tetraploidalna populacja rosyjska charakteryzowała się znacznie krótszym kariotypem – długości około 100 μm . Zbliżone długości kariotypu zanotowano wcześniej u tetraploidalnych form tymotki łąkowej i tymotki alpejskiej (KULA



Ryc. 5. Aneuploidalne płytki metafazowe barwione orceiną octową u badanych cytotypów *Phleum*. **a.** z Kanady – $2n = 29$, **b.** z Argentyny – $2n = 34$, **c.** z Rosji – $2n = 21$, **d.** z Azerbejdżanu – $2n = 29$ (podziałka 5 μm)

Fig. 5. Aneuploid metaphase plates stained with acetic orceine in the investigated cytotypes of *Phleum*. **a.** from Canada – $2n = 29$, **b.** from Argentina – $2n = 34$, **c.** from Russia – $2n = 21$, **d.** from Azerbaijan – $2n = 29$ (scale 5 μm)

Tabela 2 (Table 2). Struktura kariotypów klasycznych u badanych populacji *Phleum* (Structure of classical karyotypes in the investigated populations of *Phleum*)

Lp. (No)	Populacja (Population)	$2n$	Stopień ploidalności (Ploidy level)	Średnia długość kariotypu (Mean karyotype length) [μm] \pm SD	Średnia długość chromosomu (Mean chromosome length) [μm] \pm SD	Współczynnik asymetryczności kariotypu (A) (Asymmetry coefficient of karyotype)	Formuła morfologii chromosomów (Formula of chromosome morphology)
1	<i>Phleum</i> sp. Kanada (Canada)	42	6x	132,63 \pm 17,37	3,18 \pm 0,68	0,11	40 m + 2 sm
2	<i>Phleum</i> sp. Argentyna (Argentina)	42	6x	130,49 \pm 23,66	3,21 \pm 0,76	0,09	40 m + 2 sm
3	<i>Phleum</i> sp. Rosja (Russia)	28	4x	98,45 \pm 21,94	3,48 \pm 1,00	0,14	24 m + 4 sm
4	<i>Phleum</i> sp. Azerbejdżan (Azerbaijan)	42	6x	137,13 \pm 13,94	3,29 \pm 0,64	0,10	40 m + 2 sm

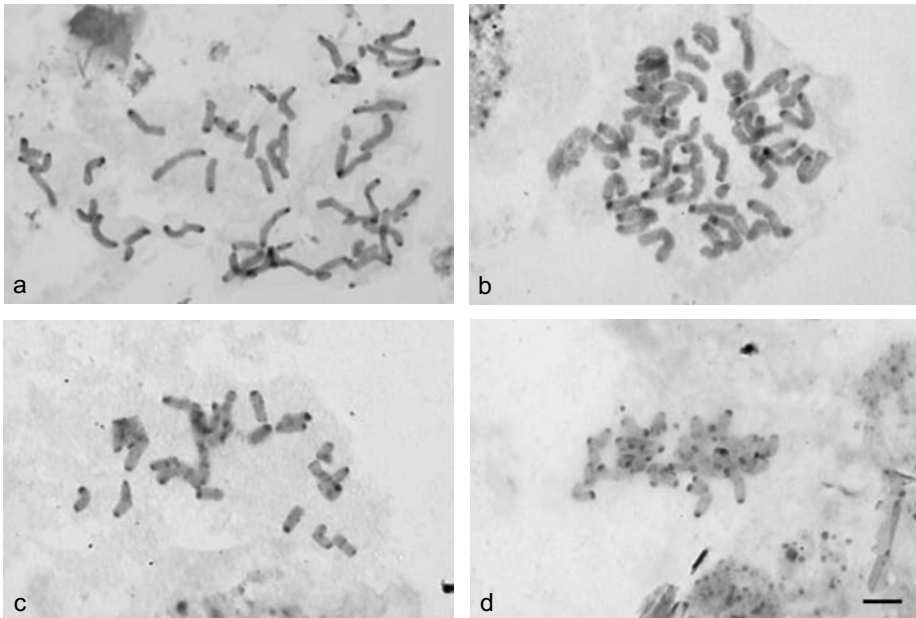
m – chromosom metacentryczny (metacentric chromosome), sm – chromosom submetacentryczny (submetacentric chromosome)

2005a). Wszystkie analizowane cytotypy *Phleum* wykazywały zbliżoną średnią długość chromosomów – około 3 μm . Chromosomy metafazowe badanych roślin były słabo zróżnicowane morfologicznie. Odnotowano chromosomy metacentryczne i nieliczne chromosomy submetacentryczne, co jest charakterystyczne dla całej sekcji *Phleum*. Z tego względu kariotypy badanych populacji są prawie symetryczne, a współczynnik asymetrii kariotypu (A) ma u wszystkich badanych form zbliżoną wartość – około 0,1 (Tab. 2).

Struktura kariotypu prążkowego

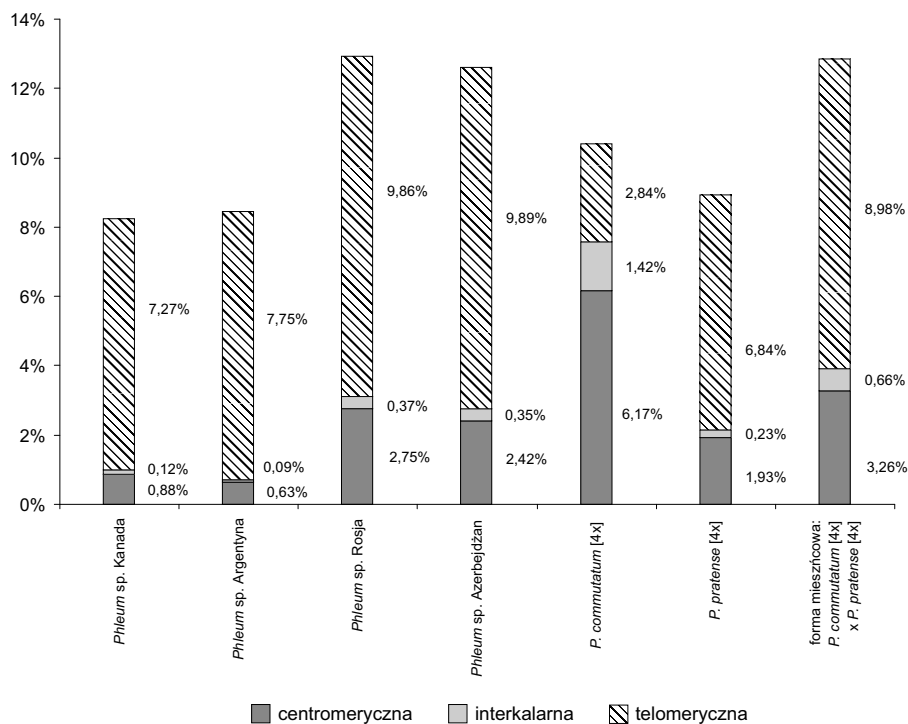
Barwienie prążkowe pozwoliło na poznanie lokalizacji i określenie typu dystrybucji heterochromatyny w chromosomach i miało kluczowe znaczenie dla określenia przynależności systematycznej badanych form oraz ich pochodzenia. Od dawna bowiem wiadomo, że dwie grupy gatunkowe występujące w sekcji *Phleum* cechują się występowaniem odmiennego typu dystrybucji heterochromatyny w kariotypie: telomerycznego – w grupie *Phleum pratense* i centromerycznego – w grupie *P. alpinum* (CAI & BULLEN 1991; JOACHIMIAK & KULA 1997; KULA 2005b).

U wszystkich badanych populacji stwierdzono telomeryczny typ dystrybucji, charakterystyczny dla grupy *Phleum pratense* (Ryc. 6). Zaobserwowano zbliżoną ilość heterochromatyny telomerycznej u okazów z Kanady i Argentyny, wynoszącą około 7%, oraz u okazów z Rosji i Azerbejdżanu – około 9%. Podobnie niemal identyczne wartości dotyczące udziału



Ryc. 6. Chromosomy metafazowe barwione metodą prążków C u badanych cytotypów *Phleum*. **a.** z Kanady, **b.** z Argentyny, **c.** z Rosji, **d.** z Azerbejdżanu (podziałka 5 μm)

Fig. 6. C-banded metaphase chromosomes in the investigated cytotypes of *Phleum*. **a.** from Canada, **b.** from Argentina, **c.** from Russia, **d.** from Azerbaijan (scale 5 μm)



Ryc. 7. Porównanie dystrybucji heterochromatyny w kariotypach badanych populacji *Phleum* oraz u *Phleum commutatum*, *P. pratense* i mieszańcowej formy między nimi. Dane dotyczące trzech ostatnich taksonów na podstawie pracy KULI i in. (2007)

Fig. 7. Comparison of heterochromatin distribution in karyotypes of the investigated populations of *Phleum* and in *Phleum commutatum*, *P. pratense* and the hybrid form between them. The data referring to the three latter taxa according to KULA *et al.* (2007)

heterochromatyny centromerycznej stwierdzono w populacji rosyjskiej i azerskiej (około 2,5%), przekraczając ponad dwukrotnie jej ilość zanotowaną u form amerykańskich. Nie jest to jednak ilość heterochromatyny centromerycznej charakterystyczna dla *Phleum commutatum* (Ryc. 7). Zbliżona jest za to do ilości tej frakcji zmierzonej u eksperymentalnych mieszańców pomiędzy *P. commutatum* i *P. pratense* (KULA i in. 2007). Mała zawartość w kariotypie heterochromatyny centromerycznej u roślin z Kanady i Argentyny (Ryc. 7) wskazuje na podobieństwo pod tym względem do heksaploidalnej tymotki łąkowej (KULA 2005a). U wszystkich czterech badanych cytotypów zaobserwowano znikome ilości heterochromatyny interkalarniej.

Analiza ilości jądrowego DNA

Uzyskane za pomocą cytometru przepływowego wyniki dotyczące ilości jądrowego DNA u okazów z Kanady i Azerbejdżanu były bardzo zbliżone i wyniosły około 8,8 pg, a występujące pomiędzy nimi różnice statystyczne okazały się nieistotne. Nieco mniejszą ilość 2C DNA zaobserwowano u okazów z Argentyny – około 8,4 pg. W tym przypadku różnica

Tabela 3 (Table 3). Analiza statystyczna ilości jądrowego DNA u badanych populacji *Phleum* (Statistical analysis of the nuclear DNA amount in the investigated populations of *Phleum*)

Lp. (No)	Populacja (Population)	Ilość jądrowego DNA (Amount of nuclear DNA)	Ilość jądrowego DNA (Amount of nuclear DNA)	Wynik testu Duncana dla 2C
		2C ± SD (pg)	1Cx ± SD (pg)	(Duncan test result for 2C) (P<0,05)
1	<i>Phleum</i> sp. Kanada (Canada)	8,783 ± 0,116	1,464±0,019	a
2	<i>Phleum</i> sp. Argentyna (Argentina)	8,421 ± 0,275	1,404±0,046	b
3	<i>Phleum</i> sp. Rosja (Russia)	6,355 ± 0,089	1,589±0,022	c
4	<i>Phleum</i> sp. Azerbejdżan (Azerbaijan)	8,760 ± 0,096	1,460±0,016	a

¹ Cx ilość DNA przypadająca na monoploidalny genom z zespołem chromosomów x (DNA content of one non-replicated monoploid genome with chromosome number x)

w ilości DNA pomiędzy populacjami: argentyńską i kanadyjską oraz argentyńską i azerską okazała się statystycznie istotna (Tab. 3). Pomimo zaobserwowanych różnic, ilość DNA zanotowana u trzech badanych heksaploidalnych populacji tymotek odpowiada prezentowanemu przez nie stopniowi ploidalności. W kilku innych populacjach heksaploidalnej tymotki łąkowej ze stanowisk w Polsce i w paru krajach europejskich zanotowano od około 9 do 9,6 pg DNA (ŚLIWIŃSKA i in. 2003; KULA 2005a). Tak więc ilość zmierzona u trzech prezentowanych w tej pracy populacjach heksaploidalnych jest podobna do wcześniej opisanych, choć minimalnie mniejsza. Zdecydowanie mniejszą ilość DNA ustalono dla populacji rosyjskiej – około 6,4 pg. Wartość ta odpowiada zaobserwowanej w tej populacji, tetraploidalnej liczbie chromosomów. Zbliżone ilości DNA, jak w populacji rosyjskiej, zmierzono u tetraploidalnych form tymotki łąkowej z Europy, oraz u tetraploidalnej tymotki alpejskiej z Europy i Ameryki Północnej, a także co znamienne, u eksperymentalnych mieszańców pomiędzy nimi (KULA 2005a; KULA i in. 2006, 2007).

Przypuszczalne drogi powstania badanych populacji

Z przeprowadzonych badań wynika, że wszystkie cztery badane populacje *Phleum* są albo cytotypami tymotki łąkowej (*P. pratense*) albo mają pochodzenie mieszańcowe. Za pochodzeniem mieszańcowym przemawia zarówno analiza cech morfologicznych jak i analiza struktury kariotypu. Dokładne ustalenie form rodzicielskich każdej populacji wydaje się jednak niemożliwe. Najprawdopodobniej populacja rosyjska powstała w wyniku przekrzyżowania tetraploidalnych cytotypów tymotki alpejskiej i łąkowej (*P. commutatum* × *P. pratense*). Obydwa wymienione cytotypy rosną w Eurazji w stanie dzikim. W warunkach eksperymentalnych łatwo się krzyżują (wystarczy swobodne przepylenie) a osobniki z pokolenia F1 są żywotne i płodne (KULA i in. 2007). Powstanie heksaploidalnych populacji z Azerbejdżanu, Kanady i Argentyny jest trudniejsze do wyjaśnienia. Formami rodzicielskimi mogły być w tym przypadku heksaploidalna tymotka łąkowa (*P. pratense*) i tetraploidalna tymotka alpejska (*P. commutatum*). Na obszarze obu Ameryk heksaploidalna

tymotka łąkowa jest jedynym przedstawicielem grupy *Phleum pratense*, obecnym tam dzięki uprawom łąkowym, natomiast tymotka alpejska rośnie na Półkuli Zachodniej na stanowiskach naturalnych (MEUSEL i in. 1965; CASLER 2001). Ze względu na nierówną liczbę chromosomów u typowanych form rodzicielskich ($2n = 42$ i $2n = 28$) powstanie mieszańcowych populacji heksaploidalnych ($2n = 42$) wymagało prawdopodobnie zajścia kilku rund krzyżowań.

WNIOSKI

(1) Okazy trzech populacji tymotek (u których udało się wyhodować kwitnące rośliny) pochodzące z naturalnych stanowisk położonych na obu półkulach, pozyskane z Banku Nasion, pokrojem przypominały *Phleum hubbardii* D. Kov. przedstawiciela grupy *P. pratense* z sekcji *Phleum*.

(2) Żaden z analizowanych okazów nie odpowiadał morfologicznie typowemu *Phleum commutatum* Gaud. czy też *P. alpinum* L., choć taka przynależność systematyczna była im przypisana.

(3) Analiza morfologii kłosa wykazała cechy pośrednie pomiędzy grupami gatunków *Phleum alpinum* i *P. pratense*.

(4) Zaobserwowano dwie euploidalne liczby chromosomów: tetraploidalną – $2n = 4x = 28$, w populacji rosyjskiej, oraz heksaploidalną – $2n = 6x = 42$, w populacji kanadyjskiej, argentyńskiej i azerskiej.

(5) W merystemie korzeniowym oprócz euploidalnych liczb chromosomów zanotowano szereg liczb aneuploidalnych. Zakres zmienności liczby chromosomów zawierał się w granicach od 19 do 75. Fakt ten świadczy o mieszańcowym pochodzeniu wszystkich badanych populacji.

(6) We wszystkich populacjach stwierdzono telomeryczny typ dystrybucji heterochromatyny charakterystyczny dla grupy gatunków *Phleum pratense*. Chociaż w kariotypie badanych okazów pochodzących z Rosji i Azerbejdżanu zaobserwowano większy niż u typowego *P. pratense* udział heterochromatyny centromerycznej, to jednak nigdy w ilości charakterystycznej dla *P. commutatum*.

(7) Zmierzona ilość jądrowego DNA u okazów pochodzących z Rosji (około 6,4 pg) jest charakterystyczna zarówno dla tetraploidalnego *Phleum commutatum*, jak i tetraploidalnego *P. pratense*. Natomiast okazy pochodzące z Azerbejdżanu, Kanady i Argentyny wykazywały zbliżoną ilość DNA (niespełna 9 pg) charakterystyczną dla heksaploidalnego *P. pratense*.

(8) Wszystkie przeprowadzone analizy wskazują, że żadna z czterech badanych populacji *Phleum* nie reprezentuje gatunku *P. commutatum* Gaud. lub *P. alpinum* L., podanego w opisie przez Bank Nasion. Badane formy są albo cytotypami (4x, 6x) tymotki łąkowej, albo co wydaje się równie prawdopodobne, mieszańcami pomiędzy tymotką alpejską i łąkową.

(9) Za słusznością wniosku o mieszańcowym pochodzeniu badanych populacji tymotek przemawiają również wyniki badań nad eksperymentalnymi mieszańcami z krzyżowań

zwrotnych, pomiędzy tymotką alpejską i łąkową. U roślin potomnych z takich krzyżówek stwierdzano zawsze telomeryczny typ dystrybucji heterochromatyny, charakterystyczny dla tymotki łąkowej, niezależnie od kierunku krzyżówki.

Podziękowania. Pragniemy podziękować Bankowi Nasion (USDA, ARS, WRPIS) z USA za przesłanie ziarniaków *Phleum* oraz pani prof. Elwirze Śliwińskiej z Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy za wykonanie pomiarów ilości jądrowego DNA.

LITERATURA

- CAI Q. & BULLEN M. R. 1991. Characterization of genomes of timothy (*Phleum pratense* L.). I. Karyotypes and C-banding patterns in cultivated timothy and two wild relatives. – *Genome* **34**: 52–58.
- CASLER M. D. 2001. Patterns of variation in a collection of timothy accessions. – *Crop Sci.* **41**: 1616–1624.
- CENCI C. A. 1979. Numero cromosomico e caratteri morfologici di alcuni ecotipi di *Phleum pratense* L. (*Gramineae*) dell'Italia centrale. – *Giorn. Bot. Ital.* **113**: 145–155.
- CENCI C. A., PEGIATI M. T. & FALISTOCCO E. 1984. *Phleum pratense* (*Gramineae*): chromosomal and biometrical analysis of Italian populations. – *Willdenowia* **14**: 343–353.
- CONERT H. J. 1998. *Phleum*. – W: Gustav Hegi Illustrierte Flora von Mitteleuropa, **I/3**, s. 190–206. Parey Buchverlag, Berlin – Hamburg.
- HUMPHRIES C. J. 1980. *Phleum* L. – W: T. G. TUTIN, V. H. HEYWOOD, N. A. BURGESS, D. M. MOORE, D. H. VALENTINE, S. M. WALTERS & D. A. WEBB (red.), *Flora Europaea* **5**. *Alismataceae* to *Orchidaceae* (*Monocotyledones*), s. 239–241. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- JOACHIMIAK A. 2005. Heterochromatin and microevolution in *Phleum*. – W: A. K. SHARMA & A. SHARMA (red.), *Plant genome. Biodiversity and Evolution*. 2B: Phanerogams, s. 89–117. Science Publishers Inc., Enfield, New Hampshire.
- JOACHIMIAK A. & KULA A. 1993. Cytotaxonomy and karyotype evolution in *Phleum* sect. *Phleum* (*Poaceae*) in Poland. – *Pl. Syst. Evol.* **188**: 11–25.
- JOACHIMIAK A. & KULA A. 1996. Karyosystematics of the *Phleum alpinum* polyploid complex (*Poaceae*). – *Pl. Syst. Evol.* **203**: 11–25.
- JOACHIMIAK A. & KULA A. 1997. Systematics and karyology of section *Phleum* in the genus *Phleum*. – *J. Appl. Genet.* **38**: 463–470.
- JOACHIMIAK A., KULA A., ŚLIWIŃSKA E. & SOBIESZCZAŃSKA A. 2001. C-banding and nuclear DNA amount in six *Bromus* species. – *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* **43**: 105–115.
- JOUBE N., DIEZ N. & RODRIGUEZ M. 1980. C-banding in 6x-*Triticale* × *Secale cereale* L. hybrid cytogenetics. – *Theor. Appl. Genetics* **57**: 75–79.
- KULA A. 2005a. Kariologia i morfologia gatunków z rodzaju *Phleum*. – *Zesz. Nauk. Akad. Roln. w Krakowie* **418** Rozprawy **304**: 1–171.
- KULA A. 2005b. Searching for a primeval *Phleum* karyotype. – W: L. FREY (red.), *Biology of grasses*, s. 197–206. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- KULA A., DUDZIAK B., ŚLIWIŃSKA E., GRABOWSKA-JOACHIMIAK A., STEWART A., GOLCZYK H. & JOACHIMIAK A. J. 2006. Cytomorphological studies on American and European *Phleum commutatum* Gaud. (*Poaceae*). – *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* **48**: 99–108.

- KULA A., STEWART A., ŚLIWIŃSKA E., PALECZNY A. & GALANT B. 2007. Analiza kariotypu mieszańców z krzyżowań zwrotnych pomiędzy [4x] *Phleum commutatum* Gaud. i [4x] *Phleum pratense* L. – Acta Agr. Silv. ser. Agr. **48**: 15–31.
- LYSÁK M. A. & DOLEŽEL J. 1998. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (*Poaceae*). – Caryologia **52**: 123–132.
- MEUSEL H., JÄGER E. & WEINERT E. 1965. Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. Veb G. Fisher Verlag, Jena.
- NORDENSKIÖLD H. 1945. Cytogenetic studies in the genus *Phleum*. – Acta Agr. Suecana **1**: 1–137.
- NORDENSKIÖLD H. 1957. Segregation ratios in progenies of hybrids between natural and synthesized *Phleum pratense*. – Hereditas **43**: 525–540.
- PERNÝ M., KOLARČIK V., MAJESKÝ L. & MÁRTONFI P. 2008. Cyto geography of the *Phleum pratense* group (*Poaceae*) in the Carpathians and Pannonia. – Bot. J. Linn. Soc. **157**: 475–485
- PIGNATTI S. 1982. Flora d'Italia **3**. s. 780. Edagricole, Bologna.
- ŚLIWIŃSKA E., KULA A., JOACHIMIAK A. & STEWART A. 2003. Genome size in the genus *Phleum*. – W: Application of Novel Cytogenetic and Molecular Techniques in Genetics and Breeding of the Grasses, International Workshop, Poznań: Polska, 1–2 kwietnia 2003.
- WATANABE K., YAHARA T., DENDA T. & KOSUGE K. 1999. Chromosomal evolution in the genus *Brachy-scome* (*Asteraceae*, *Asterae*): Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. – J. Plant. Res. **112**: 145–161.

SUMMARY

The object of the studies were four populations of the timothy, classified by the Seed Bank from the USA (USDA, ARS, WRPIS) as *Phleum commutatum* Gaud. and *P. alpinum* L. – that is the alpine timothy. The caryopses came from natural positions in Canada, Argentina, Russia and Azerbaijan. The purpose of the study was to correctly determine their systematic affiliation on the basis of morphological and cytogenetic analyses. The morphological analyses revealed that none of the populations displayed features typical of the alpine timothy. In three populations: the Canadian, Argentinean and Azerbaijani ones, the occurrence of a hexaploid number of chromosomes $2n = 6x = 42$ was found, which is typical of *P. pratense* L. – meadow timothy. Only in the plants that originated from Russia the occurrence of a tetraploid number of chromosomes was found, which is characteristic of both the alpine timothy and the tetraploid cytotype of the meadow timothy. Moreover, in all the plants analysed, instability in the chromosome number in the root meristem was found, which is unusual in timothy specimens from natural positions. This phenomenon had been described, however, in their interspecific hybrids. In plants from all the four positions, the occurrence of telomeric type of heterochromatin distribution was established, characteristic of the meadow timothy and never found in the alpine timothy, in which centromeric heterochromatin dominates. Admittedly, in the Russian and Azerbaijani populations, elevated centromeric heterochromatin content was observed, however not on a level characteristic of *P. alpinum*. The banded pattern observed in those populations closely corresponded to the one previously described in experimental, tetraploid hybrids between the meadow and alpine timothy. Measurements of the amount of nuclear DNA exhibited the presence of nearly 9 pg 2C DNA in the forms from Canada, Argentina and Azerbaijan. The amount is typical of the hexaploid meadow timothy. In the Russian form, the amount was slightly over 6 pg 2C DNA, which is a value typical of the alpine timothy, tetraploid meadow timothy and the tetraploid hybrid forms. The carried out studies suggest that the analysed plants are cytotypes of *Phleum pratense* (6x, 4x), or – what appears more likely – hybrids between *P. commutatum* and *P. pratense*.

Przyjęto do druku: 27.01.2009 r.