

Struktura kariotypu *Phleum hirsutum* (Poaceae)

ADAM KULA

KULA, A. 2005. Karyotype structure of *Phleum hirsutum* (Poaceae). *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica* 12(1): 135–142. Kraków. PL ISSN 1640-629X.

ABSTRACT: The paper presents classical and C-banded karyotype structure of *Phleum hirsutum* Honck. Two forms of this species from the Western Tatra Mts. and in the vicinity of Kastoria in Greece were examined. Both are diploids $2n=2x=14$ with symmetrical karyotypes with telomeric type of heterochromatin distribution. The author also observed significant differences between them concerning the amount of nuclear DNA and heterochromatin content in the karyotype.

KEY WORDS: *Phleum hirsutum*, karyotype structure, heterochromatin, DNA amount

Adam Kula, Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza w Krakowie, ul. Łobzowska 24, PL-31-140 Kraków, Polska, e-mail: rrkula@cyf-kr.edu.pl

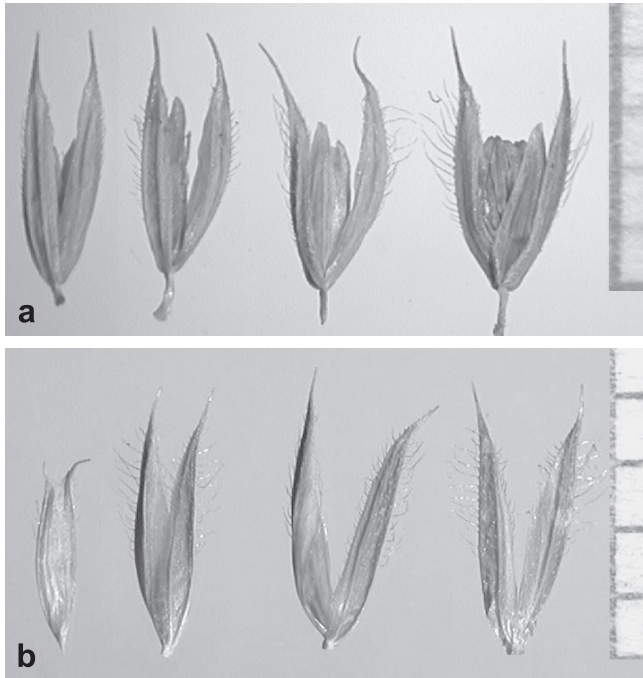
WSTĘP

Phleum hirsutum Honck. [= *P. michelii* All.] (tymotka Michela) obok *Phleum phleoides* (tymotki Boehmera) jest typowym przedstawicielem sekcji *Chilochloa*. Tworzy wieloletnie, dość okazałe kępy z pędami o wysokości od 20 do 90 cm. Czasami wytwarza krótkie podziemne rozłogi. Wykształca stosunkowo długie i szerokie, ostro zakończone liście, na brzegu i nerwach szorstkie, czasami pokryte woskowym nalotem. Na pędach generatywnych wystają charakterystyczne bladezielone wiechy kłosokształtne, choć mogą przybierać również kolor purpurowy. Wykształca plewy zaopatrzone w krótkie ości, zaś brzegi plew są miętko owłosione. Plewki: górna i dolna są jednakowej wielkości, omszone, o długości mniejszej od plew (od 2/3 do 3/4 długości plew). Tymotka Michela jest typowo alpejskim gatunkiem: zasiedla łąki, polany leśne i kamieniste zbocza, zwykle powyżej 1000 m, na glebach wapiennych. Występuje najczęściej w górach w centralnej i południowej Europie: w Alpach, Północnych Apeninach, Karpatach, na Bałkanach, ale także na Kaukazie (HUMPHRIES 1980; CONERT 1998). W Polsce spotykamy stanowiska tego gatunku w Tatrach Zachodnich, od regła dolnego do piętra alpejskiego, gdzie jest składnikiem zespołu *Festucetum carpaticae* (FALKOWSKI 1982). Jest to gatunek już stosunkowo rzadki i ustępujący (FISCHER & WIPF 2002). Może jednak dominować na zajmowanych stanowiskach. W populacjach krajowych występuje diploidalna liczba chromosomów $2n = 14$ (SKALIŃSKA i in. 1957; SKALIŃSKA & POGAN 1973), natomiast na terenie Bułgarii notuje się liczbę heksaploidalną $2n = 42$ (KOZUHAROV & PETROVA 1991).

Celem prezentowanej pracy jest przedstawienie budowy kariotypu konwencjonalnego i prążkowego tego gatunku. Dane dotyczące struktury kariotypu tymotki Michela nie były do tej pory znane.

MATERIAŁ I METODY

Okazy *Phleum hirsutum* pochodziły z dwóch stanowisk: 1. z Tatr Zachodnich – Tomanowe Rzędy, poniżej Ciemniaka na wysokości około 1900 m n.p.m., 2. z okolic Kastorii w Grecji, wyhodowane z ziarniaków uzyskanych z Banku Nasion KEW z Wielkiej Brytanii (RGB KEW nr 36418). Rośliny oznaczono według HUMPHRIESA (1980). Za przynależnością obydwu badanych form do *P. hirsutum* przemawiały wszystkie bez wyjątku obserwowane cechy morfologiczne, w tym kluczowa w rodzaju *Phleum* budowa kłosek (Fig. 1).



Ryc. 1. Morfologia kłosek w *Phleum hirsutum* Honck. **a.** z Tatr, **b.** z Grecji (skala w mm)

Fig. 1. The morphology of spikelets in *Phleum hirsutum* Honck. **a.** from Tatra Mts, **b.** from Greece (scale in mm)

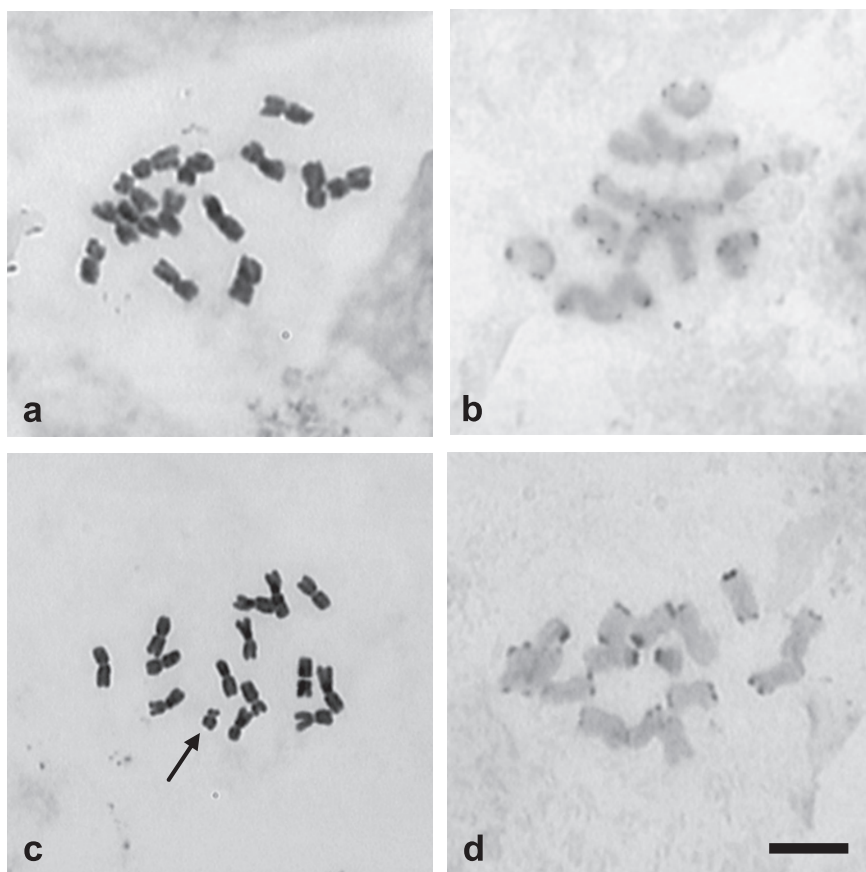
Chromosomy barwiono konwencjonalnie orceiną octową oraz różnicowo, metodą prążków C według JOUVE i in. (1980). Budowę kariotypu klasycznego i prążkowego u danej formy przedstawiano na podstawie pomiarów: 20 płytek metafazowych barwionych konwencjonalnie i 10 barwionych metodą prążków C. W kariotypach zbiorczych uwzględniono jedynie stałe prążki heterochromatynowe to znaczy takie, które występowały z frekwencją częstszą niż 50%. Pominięto natomiast prążki polimorficzne z wyjątkiem występujących w okolicach obszarów NOR. Pomiarów cytometrycznych ilości jądrowego DNA dokonano na komórkach mezofilu młodych liści z użyciem cytometru przepływowego (Partec) i linii *Zea mays*

CEE-777 (5,43 pg/2C) jako wzorca, zaś roztwory komórek przygotowano według metodyki Galbraith'a i innych (1983). Dla określania ilości 2C DNA dla okazów z danego stanowiska przyjęto średnią z pomiarów 10 roślin. Pomiar cytometryczny wykonano w Pracowni Cytometrii Przepływowej pod kierunkiem prof. Elwiry Śliwińskiej w Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy. Do analizy ilości jądrowego DNA (2C) wykorzystano dane prezentowane na dwóch konferencjach (ŚLIWIŃSKA i in. 2003; KULA i in. 2004).

WYNIKI I DYSKUSJA

Somatyczne liczby chromosomów i struktura kariotypu klasycznego

Okazy *Phleum hirsutum* z obydwu stanowisk okazały się diploidami z liczbą chromosomów $2n = 14$. U roślin pochodzących z Grecji zanotowano także występowanie B chromosomów, o długości całkowitej około 2 μm (Ryc. 2a, c).



Ryc. 2. Płytki metafazowe *Phleum hirsutum* Honck. barwione konwencjonalnie orceiną octową i metodą prążków C. **a, b.** z Tatr, **c, d.** z Grecji. B chromosom zaznaczono strzałką (skala 5 μm)

Fig. 2. Metaphase plates of *Phleum hirsutum* Honck. stained with acetic orcein and with C-banding method. **a.** from Tatra Mts, **b.** from Greece. B chromosome marked with an arrow (scale 5 μm)

Dla roślin z obydwu stanowisk sporządzono klasyczne kariotypy zbiorcze, które okazały się zbliżone pod względem struktury. Tymotka z Tatr posiada kariotyp prawie idealnie symetryczny, zawierający jedynie chromosomy metacentryczne (formuła kariotypu: 14 m). U tymotki z Macedonii zaobserwowano kariotyp nieco bardziej asymetryczny, ze względu na występowanie obok 5 par chromosomów metacentrycznych 2 par submetacentrycznych (formuła kariotypu: 10 m + 4 sm) (Tab. 1, 2).

Tabela 1 (Table 1). *Phleum hirsutum* Honck. z Tatr (from Tatra Mts) – kariotyp klasyczny (classical karyotype)

	1*	2	3	4	5	6	7
T	16,22 ± 0,90	16,47 ± 0,75	15,07 ± 0,62	14,34 ± 0,55	13,64 ± 0,47	12,78 ± 0,50	11,48 ± 0,53
L	8,88 ± 0,52	9,07 ± 0,42	8,04 ± 0,32	8,76 ± 0,37	7,43 ± 0,32	7,01 ± 0,26	6,39 ± 0,37
S	7,34 ± 0,42	7,40 ± 0,42	7,03 ± 0,33	5,58 ± 0,27	6,21 ± 0,21	5,77 ± 0,31	5,09 ± 0,26
C	1,21 ± 0,14	1,23 ± 0,22	1,14 ± 0,09	1,57 ± 0,29	1,20 ± 0,16	1,21 ± 0,25	1,26 ± 0,29

Długość chromosomów kalkulowana w procentach w stosunku do długości haploidalnego zespołu chromosomów ± SD; T – długość całkowita, L – dłuższe ramię, S – krótsze ramię, C – stosunek ramion (L/S) (The length of chromosomes calculated in % of the length of the haploid chromosome set ± SD; T – total length, L – longer arm, S – shorter arm, C – arm ratio (L/S))

* – numer chromosomu (chromosome number)

Tabela 2 (Table 2). *Phleum hirsutum* Honck. z Grecji (from Greece) – kariotyp klasyczny (classical karyotype)

	1	2	3	4	5	6	7
T	15,36 ± 0,55	18,09 ± 0,74	16,04 ± 0,77	14,67 ± 0,62	13,31 ± 0,60	12,63 ± 0,36	9,90 ± 0,60
L	8,19 ± 0,33	9,90 ± 0,43	8,53 ± 0,50	8,19 ± 0,30	8,53 ± 0,24	6,49 ± 0,19	6,48 ± 0,43
S	7,17 ± 0,26	8,19 ± 0,34	7,51 ± 0,29	6,48 ± 0,36	4,78 ± 0,39	6,14 ± 0,19	3,42 ± 0,24
C	1,14 ± 0,11	1,21 ± 0,12	1,14 ± 0,12	1,26 ± 0,15	1,79 ± 0,41	1,06 ± 0,07	1,90 ± 0,48

Długość chromosomów kalkulowana w procentach w stosunku do długości haploidalnego zespołu chromosomów ± SD; T – długość całkowita, L – dłuższe ramię, S – krótsze ramię, C – stosunek ramion (L/S) (The length of chromosomes calculated in % of the length of the haploid chromosome set ± SD; T – total length, L – longer arm, S – shorter arm, C – arm ratio (L/S))

Struktura kariotypu prążkowego

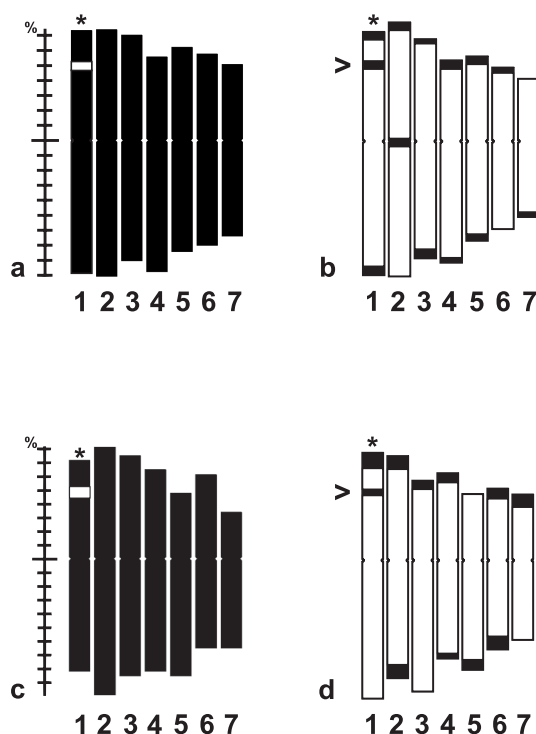
Analizowane okazy posiadają ten sam telomeryczny typ dystrybucji heterochromatyny. Różnice w ilości heterochromatyny pomiędzy nimi widoczne są już przy pobieżnej analizie barwionych różnicowo płytek metafazowych (Ryc. 2b, d). Różnice te znajdują swoje potwierdzenie w dokładnych zestawieniach ukazujących strukturę kariotypu prążkowego (Tab. 3, 4; Ryc. 3, 4).

Phleum hirsutum z Polski jest ubogiej w heterochromatynę (około 6,5% zawartości w kariotypie) i przypomina pod tym względem *P. phleoides*, natomiast tymotka z Grecji jest średnio bogata w tę frakcję (około 9,5%), co zbliża ją raczej do przedstawicieli grupy *P. pratense* z sekcji *Phleum* (KULA 2003). U roślin z Polski daje się także zauważyć większą ilość heterochromatyny centromerowej.

Tabela 3 (Table 3). *Phleum hirsutum* Honck. z Tatr (from Tatra Mts) – kariotyp prążkowy, (C-band karyotype)

	1	2	3	4	5	6	7
T	17,35 ± 0,52	18,11 ± 0,53	15,61 ± 0,37	14,42 ± 0,20	13,13 ± 0,33	11,51 ± 0,22	9,87 ± 0,27
L	9,56 ± 0,26	9,65 ± 0,25	8,36 ± 0,26	8,65 ± 0,30	7,08 ± 0,19	6,25 ± 0,18	5,39 ± 0,15
TB	0,60 ± 0,12		0,65 ± 0,29	0,35 ± 0,06	0,46 ± 0,30		0,32 ± 0,16
S	7,79 ± 0,31	7,24 ± 0,29	7,25 ± 0,13	5,77 ± 0,17	6,05 ± 0,28	5,26 ± 0,12	4,48 ± 0,15
TB	0,57 ± 0,09	0,56 ± 0,16	0,29 ± 0,10	0,60 ± 0,08	0,55 ± 0,09	0,37 ± 0,23	
IB	0,57 ± 0,06						
C	1,23 ± 0,11	1,14 ± 0,06	1,15 ± 0,08	1,50 ± 0,31	1,17 ± 0,29	1,19 ± 0,16	1,20 ± 0,11
CB		0,56 ± 0,19					

Długość chromosomów kalkulowana w procentach w stosunku do długości haploidalnego zespołu chromosomów ± SD; T – długość całkowita, L – dłuższe ramię, S – krótsze ramię, C – stosunek ramion (L/S). TB – prążek telomerowy, CB – prążek centromerowy, IB – prążek interkalarny (The length of chromosomes calculated in % of the length of the haploid chromosome set ± SD; T – total length, L – longer arm, S – shorter arm, C – arm ratio (L/S), TB – telomeric band, CB – centromeric band, IB – intercalary band)



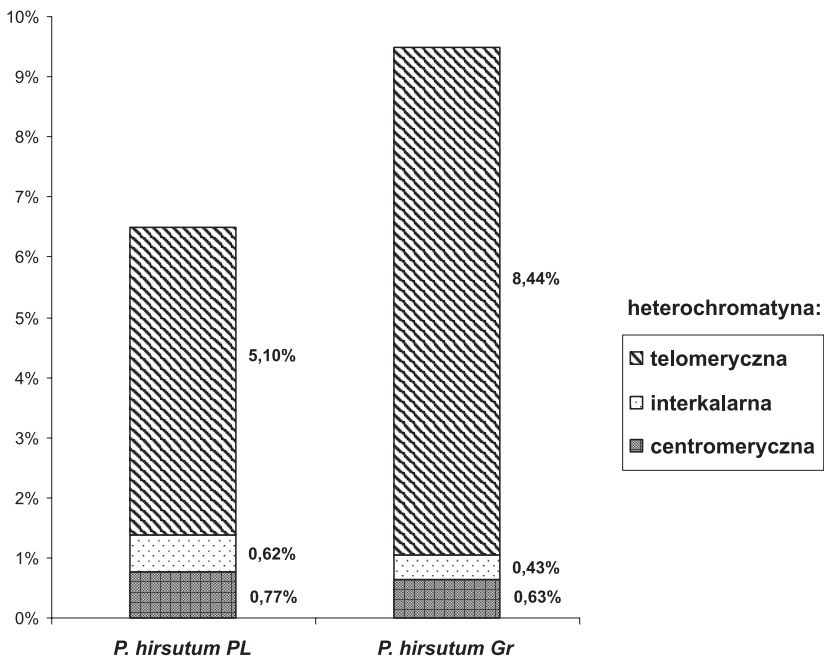
Ryc. 3. *Phleum hirsutum* Honck. – kariotyp klasyczny i prążkowy. **a, b.** tymotka z Tatr, **c, d.** tymotka z Grecji. * oznacza SAT chromosomy; > oznacza polimorficzny prążek interkalarny przy organizatorze jąderka, reszta to prążki stałe (o frekwencji co najmniej 50%)

Fig. 3. *Phleum hirsutum* Honck. – classical and C-banding karyotypes. **a, b.** from Tatra Mts, **c, d.** from Greece. * marks SAT chromosomes; > marks the polymorphic intercalary band by the nucleolar organizer, others are bands observed with higher frequency (at least 50%)

Tabela 4 (Table 4). *Phleum hirsutum* Honck. z Grecji (from Greece) – kariotyp prążkowy (C-band karyotype)

	1	2	3	4	5	6	7
T	18,26 ± 0,74	16,50 ± 0,99	15,66 ± 0,66	13,77 ± 0,39	13,06 ± 0,54	11,94 ± 0,34	10,81 ± 0,39
L	10,27 ± 0,38	8,76 ± 0,58	9,74 ± 0,65	7,31 ± 0,27	8,13 ± 0,39	6,62 ± 0,26	5,91 ± 0,27
TB		0,99 ± 0,44		0,36 ± 0,75	0,74 ± 0,43	0,47 ± 0,33	
S	7,99 ± 0,39	7,74 ± 0,43	5,92 ± 0,22	6,46 ± 0,15	4,93 ± 0,25	5,32 ± 0,11	4,90 ± 0,19
TB	1,14 ± 0,12	0,98 ± 0,25	0,64 ± 0,20	0,69 ± 0,45		0,73 ± 0,32	0,93 ± 0,24
IB	0,42 ± 0,06						
C	1,29 ± 0,12	1,13 ± 0,10	1,64 ± 0,59	1,13 ± 0,12	1,65 ± 0,36	1,24 ± 0,15	1,20 ± 0,21

Długość chromosomów kalkulowana w procentach w stosunku do długości haploidalnego zespołu chromosomów ± SD; T – długość całkowita, L – dłuższe ramię, S – krótsze ramię, C – stosunek ramion (L/S). TB – prążek telomerowy, CB – prążek centromerowy, IB – prążek interkalarny (The length of chromosomes calculated in % of the length of the haploid chromosome set ± SD; T – total length, L – longer arm, S – shorter arm, C – arm ratio (L/S), TB – telomeric band, CB – centromeric band, IB – intercalary band)



Ryc. 4. Zawartość poszczególnych rodzajów heterochromatyny w kariotypach dwóch form *Phleum hirsutum* Honck. Uwzględniono heterochromatynowe prążki stałe i polimorficzne

Fig. 4. Content of particular kinds of heterochromatin in karyotypes of two forms *Phleum hirsutum* Honck. Polymorphic heterochromatin bands and bands with higher frequency were considered

Analiza ilości jądrowego DNA

Okazy z obydwu stanowisk różnią się wyraźnie zawartością jądrowego DNA (Tab. 5). U roślin z Polski zanotowano około 0,6 pg mniej DNA niż u tych z Macedonii. Zastosowany test statystyczny wskazuje na istotność zaobserwowanej różnicy.

Tabela 5 (Table 5). Porównanie ilości jądrowego DNA u *Phleum hirsutum* Honck. z Tatr [A] i Grecji [B] (Comparison of nuclear DNA amount in *Phleum hirsutum* Honck. from the Tatra Mts [A] and Greece [B])

A DNA (2C) i (and) SD (pg)	B DNA (2C) i (and) SD (pg)	Wynik testu Studenta (Student's test result) (P = 0,05)
3.252 ± 0.020	3.850 ± 0.090	**

** różnica statystycznie istotna (statistically significant)

WNIOSKI

Struktura kariotypu *Phleum hirsutum*: symetryczność, telomeryczny typ dystrybucji heterochromatyny, jej niewielka zawartość w kariotypie oraz stosunkowo duża wielkość genomu, wskazują na pierwotne cechy tego gatunku, zbliżone do *P. phleoides* gatunku wzorcowego dla sekcji *Chilochloa* (JOACHIMIĄK 2005).

Największe podobieństwa z *P. phleoides* w budowie kariotypu wykazuje *P. hirsutum* z Tatr. Natomiast wyraźne różnice cytogenetyczne stwierdzone pomiędzy dwiema badanymi populacjami tymotki Michela wskazują na zachodzące w obrębie gatunku procesy różnicowania, czemu sprzyja zapewne geograficzne oddalenie i rozproszenie populacji.

Wydaje się, że uchwycono tylko fragment cytologicznej zmienności wewnątrzgatunkowej, skoro u *Phleum hirsutum* możliwe jest także występowanie mutacji genomowych, które doprowadziły do powstania form heksaploidalnych (KOZUHAROV & PETROVA 1991).

Podziękowania. Pragnę podziękować Pani prof. Elwirze Śliwińskiej za wykonanie pomiarów ilości jądrowego DNA oraz Bankowi Nasion KEW z Wielkiej Brytanii za przysłanie ziarniaków tymotki Michela pochodzących z Grecji.

LITERATURA

- CONERT H. J. 1998. *Phleum*. W: Gustav Hegi, Illustrierte Flora von Mitteleuropa. 1/3, s. 190–206. Parey Buchverlag, Berlin – Hamburg.
- FALKOWSKI M. 1982. Trawy polskie. s. 565. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- FISCHER M. & WIPF S. 2002. Effect of low-intensity grazing on the species-rich vegetation of traditionally mown subalpine meadows. – *Biological Conservation* **104**: 1–11
- GALBRAITH D. W., HARKINS K. R., MADDOX J. R., AYRES N. M., SHARMA D.P. & FIROOZABADY E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. – *Science* **220**: 1049–1051.

- 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 (w druku).
- JOUBE N., DIEZ N. & RODRIGUEZ M. 1980. C-banding in 6x-Triticale x *Secale cereale* L. hybrid cytogenetics. – *Theor. Appl. Genetics* 57: 75–79.
- KOZUHAROV S. I. & PETROVA A.V. 1991. Chromosome numbers of Bulgarian angiosperms. – *Fitologija* 39: 72–77.
- KULA A. 2003. Morphology and cytogenetics of *Phleum hubbardii*. – W: L. FREY (red.), *Problems of grass biology*, s. 293–306. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- KULA A., ŚLIWIŃSKA E., ŻUREK G. & JOACHIMIAK A. Struktura genomu w rodzaju *Phleum* [Genome structure in the genus *Phleum*]. – W: VI Ogólnopolskie Spotkania Naukowe. Biologia Traw. s. 27. Kraków, 18–19 listopada 2004.
- SKALIŃSKA M., BANACH-POGAN E., WCISŁO H. *et al.* 1957. Further studies in chromosome numbers of Polish Angiosperms. – *Acta Soc. Bot. Pol.* 26: 215–245.
- SKALIŃSKA M. & POGAN E. 1973. A list of chromosome numbers of Polish Angiosperms. – *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 14: 145–201.
- 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.

SUMMARY

Phleum hirsutum Honck. is a typical representative of the *Chilochloa* section. In the majority of systematic classifications it is mentioned on the second place, after the model species for the *Chilochloa* section: *P. phleoides*. *P. hirsutum* is a perennial montane species, which grows in Central and Southern Europe above 1000 m a.s.l., on limestone soil. So far, there have been no reports about the cytogenetics of this species, apart from some scarce karyological data.

This paper presents classical and C-banded karyotype structure of two diploid forms of this species from the Western Tatra Mts and Macedonia in Greece. In both of them telomeric type of heterochromatin distribution was observed, which was also recorded in *P. phleoides* and is presumably typical of the whole *Chilochloa* section. Moreover, significant differences in the heterochromatin content and amount of nuclear DNA between the two studied forms were noticed. In the Greek specimens of *Phleum hirsutum* much bigger contribution of heterochromatin in the karyotype structure was recorded (9.5%), as compared with the Polish specimens (6.5%). Similarly, in the Greek specimens the amount of nuclear DNA (3.85 pg) was bigger than in the Polish specimens (3.25 pg), and the differences proved to be statistically important. Presumably, the differences recorded in the structure and size of the genome in the examined populations were induced by the fact that they are geographically distant and also by isolation of their positions caused by progressive anthropogenic changes.

Przyjęto do druku: 18.02.2005 r.