

## Struktura kariotypu *Phleum montanum* (Poaceae)

ADAM KULA, ELWIRA ŚLIWIŃSKA i JOANNA LEDOWSKA

KULA, A., ŚLIWIŃSKA, E. AND LEDOWSKA, J. 2007. Karyotype structure of *Phleum montanum* (Poaceae). *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica* 14(1): 139–147. Kraków. PL ISSN 1640-629X.

ABSTRACT: The paper presents cytogenetic analysis of three Asian populations of *P. montanum* C. Koch. One of them (from the south of Russia) turned out to be diploid ( $2n = 14$ ), whereas in the two other populations (from Afghanistan and Turkey) hexaploid chromosome number ( $2n = 42$ ) was established. All the studied cytotypes were characterised by the occurrence of the same telomeric type of heterochromatin distribution as well as minimal representation of the other fractions of heterochromatin in the karyotype structure. The size of the genome in the studied cytotypes was also similar. As far as C-banded karyotype structure and genome size are concerned, the studied cytotypes bear close similarity to another representative of the *Chilochloa* section – *P. hirsutum* Honck.

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

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

Elwira Śliwińska, Zakład Biologii Molekularnej i Cytometrii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, al. Kaliskiego 7, PL-85-796 Bydgoszcz, Polska; e-mail: elwira@utp.edu.pl

### WSTĘP

*Phleum montanum* C. Koch jest przedstawicielem sekcji *Chilochloa* (HUMPHRIES 1980). Występuje na górskich stanowiskach w centralnej i wschodniej części obszaru śródziemnomorskiego, na Bałkanach, w Południowych Karpatach (Transylwania) oraz w zachodniej części Azji (Bliski Wschód, Afganistan, południowa Rosja) (RECHINGER 1963; HUMPHRIES 1980; CLAYTON i in. 2002). Morfologicznie wykazuje cechy pośrednie pomiędzy dwoma typowymi przedstawicielami tej sekcji, tj. *P. phleoides* L. i *P. hirsutum* Honck. (HUMPHRIES 1980). Jest to jednak gatunek bardzo zmienny zarówno pod względem cech morfologicznych, jak i cytogenetycznych. Okazy tego taksonu z Półwyspu Apenińskiego i Sycylii opisywano jako *P. abiguum* Ten., natomiast okazy z terenu Grecji opisywano jako *P. serulatum* Boiss (PIGNATTI 1982).

Dane cytogenetyczne ograniczają się do nielicznych doniesień na temat liczb chromosomów. U *Phleum montanum* opisano bowiem występowanie di-, tetra- i heksaploidów:

$2n = 14$ ,  $2n = 28$  i  $2n = 42$ , przy czym typowy ma być cytotyp heksaploidalny (NATH & Nielsen 1963; KOŽUHAROV & PETROVA 1991; KULA 2005c). Ze względu na dużą zmienność i niejednoznaczne nazewnictwo nie wiadomo czy w przypadku *P. montanum*, *P. abiguum* i *P. serrulatum* mamy do czynienia z tym samym gatunkiem, w obrębie którego występuje kilka różniących się stopniem ploidalności cytotypów, podobnie jak w przypadku *P. pratense* ( $2n = 28, 42, 56$ ), czy też są to odrębne taksony. Analiza struktury kariotypu i wielkości genomu może okazać się pomocna w udzieleniu odpowiedzi na tak postawione pytanie. Do tej pory poznano jedynie strukturę kariotypu po konwencjonalnym barwieniu chromosomów oraz wielkość genomu u diploidalnej formy *P. montanum* (*P. serrulatum*?) z Grecji (KULA 2005c; ŚLIWIŃSKA i in. 2003; KULA i in. 2004).

### MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były egzemplarze *Phleum montanum* wyhodowane z nasion przesłanych przez Bank Nasion z USA. Analizowane rośliny pochodziły z naturalnych stanowisk z trzech krajów: Rosji, Afganistanu i Turcji (Tab. 1). Rośliny rosły w pokoju wegetacyjnym, przy długim dniu (16 godzin dzień, 8 godzin noc) w temperaturze 16–20°C. Ostateczną wysokość pędów, średnio zaledwie około 10 cm, rośliny osiągnęły po trzech miesiącach. Egzemplarze z poszczególnych stanowisk były pod tym względem wyrównane, pomimo stwierdzonych potem różnic w stopniu ploidalności. W przeciągu kilku miesięcy trwania badań nie otrzymano kwitnących okazów, nie można więc było ich powtórnie oznaczyć. Jednak charakterystyczny niski wzrost analizowanych okazów (*P. montanum* jest prawdopodobnie pod względem wysokości pędów jednym z najmniejszych wieloletnich gatunków tymotek) oraz ich porównanie z okazami zielnikowymi *P. montanum* z Grecji, którymi dysponowali autorzy powodowały, że oznaczenie gatunkowe Banku Nasion nie budziło wątpliwości.

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

Lp. (No)	Takson (Taxon)	Miejsce pochodzenia (Place of origin)	Numer katalogowy Banku Nasion <sup>1</sup> (The Gene Bank <sup>1</sup> catalogue number)
1.	<i>Phleum montanum</i> C. Koch	Rosja (Russia), Karaczajewsko-Czerkieska R. A. (Karachay-Cherkess Republic), 8 km na zachód od Teberdy (8 km. west of Teberda), 1800 m.n.p.m. (at 1800 m above sea level)	PI 632531
2.	<i>Phleum montanum</i> C. Koch	Afganistan (Afghanistan), stanowisko naturalne, brak danych o dokładnej lokalizacji (lack of data about exact location)	PI 223283
3.	<i>Phleum montanum</i> C. Koch	Turcja (Turkey), stanowisko naturalne, brak danych o dokładnej lokalizacji (lack of data about exact location)	PI 204475

<sup>1</sup> USDA, ARS, WRPIS, Washington State University, Regional Plant Introduction Station, Pullman, Washington

Analizy cytologiczne przeprowadzono na 30 wyrośniętych egzemplarzach każdej z form. Chromosomy barwiono konwencjonalnie orceiną octową oraz różnicowo, metodą prążków C (JOUVE i in. 1980). Analizę kariotypu u danej formy przedstawiano na podstawie pomiarów 20 płytek metafazowych barwionych

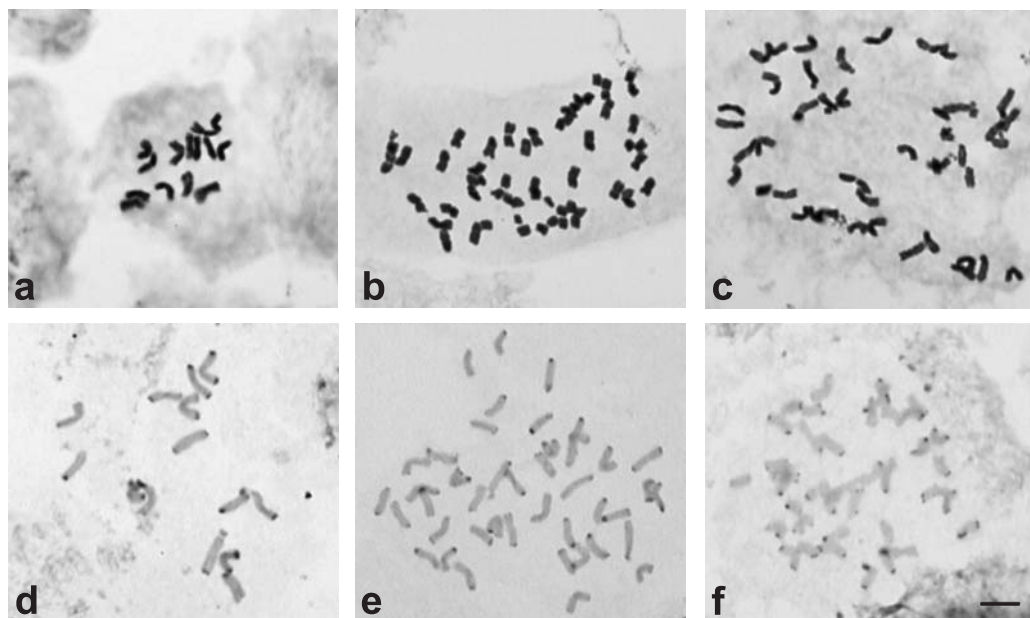
konwencjonalnie. Współczynnik asymetryczności kariotypu: „A” obliczano według wzorów, jakie podają WATANABE i in. (1999). Szczegóły budowy kariotypu prążkowego ustalono na podstawie 10 płytek metafazowych barwionych metodą prążków C.

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 and DOLEŽEL 1998) jako standardu, zaś próby przygotowano według opisaney wcześniej metodyki (JOACHIMIAK i in. 2001). Dla określania ilości 2C DNA dla okazów z danego stanowiska przyjęto średnią z pomiarów 10 roślin. Pomiaru cytometryczne zostały wykonane w Zakładzie Biologii Molekularnej i Cytometrii, Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.

## WYNIKI I DYSKUSJA

### Somatyczne liczby chromosomów i struktura kariotypu

Badany materiał okazał się zróżnicowany pod względem somatycznej liczby chromosomów. U okazów pochodzących z Rosji stwierdzono diploidalną liczbę chromosomów  $2n = 14$ , natomiast u okazów z Afganistanu i Turcji zaobserwowano heksaploidalną liczbę chromosomów  $2n = 42$  (Ryc. 1a, b, c). U wszystkich cytotypów stwierdzano także występowanie pojedynczych B-chromosomów. W przypadku analizy kariotypu, po barwieniu chromosomów orceiną octową, ograniczono się do przedstawienia kilku najważniejszych



**Ryc. 1.** Płytki metafazowe *Phleum montanum* C. Koch barwione konwencjonalnie orceiną octową i metodą prążków C. **a, d.** z Rosji, **b, e.** z Afganistanu, **c, f.** z Turcji (skala 5  $\mu$ m)

**Fig. 1.** Metaphase plates of *Phleum montanum* C. Koch stained with acetic orceine and C-banded. **a, d.** from Russia, **b, e.** from Afghanistan, **c, f.** from Turkey (scale 5  $\mu$ m)

**Tabela 2 (Table 2).** Struktura kariotypu trzech populacji (Karyotype structure of three populations of) *Phleum montanum* C. Koch

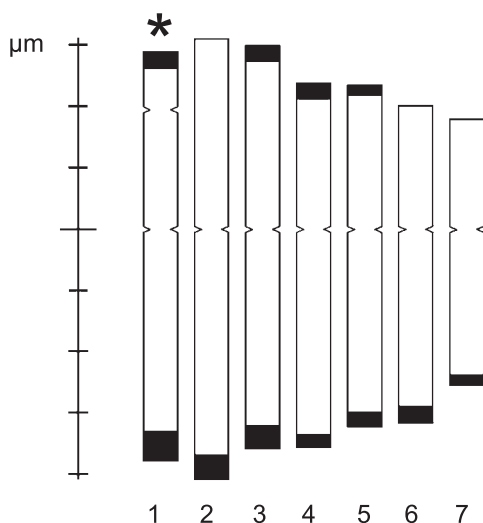
Lp. (No)	Populacja (Population)	2n	Stopień ploidalności (Ploidy level)	Średnia długość kariotypu (Mean karyotype length) [ $\mu\text{m}$ ] $\pm$ SD	Średnia długość chromosomu (Mean chromosome length) [ $\mu\text{m}$ ] $\pm$ SD	Współczynnik asymetryczności kariotypu (A) (Asymmetry coefficient of karyotype)	Formuła morfologii chromosomów (Formula of chromosome morphology)
1	<i>Phleum montanum</i> Rosja (Russia)	14	2x	49,02 $\pm$ 10,50	3,68 $\pm$ 0,93	0,15	12m + 2 sm
2	<i>Phleum montanum</i> Afganistan (Afghanistan)	42	6x	117,99 $\pm$ 2,81	2,81 $\pm$ 0,69	0,15	38m + 6 sm
3	<i>Phleum montanum</i> Turcja (Turkey)	42	6x	114,22 $\pm$ 6,30	2,72 $\pm$ 0,80	0,16	36 m + 8 sm

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

parametrów (Tab. 2). Okazało się, że badane cytotypy wykazują duże podobieństwo pod względem współczynnika asymetrii kariotypu, natomiast w dwóch populacjach heksaploidalnych występuje zbliżona średnia długość chromosomu.

### Struktura kariotypu prążkowego

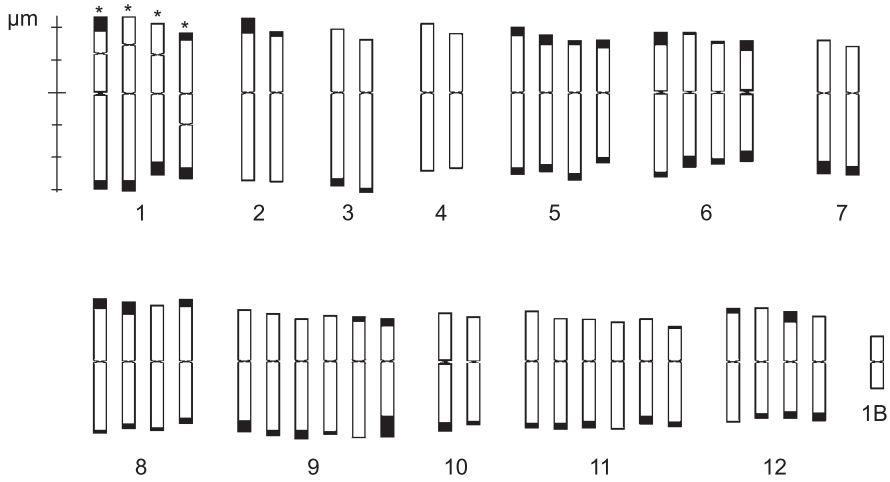
U wszystkich cytotypów stwierdzono występowanie identycznego, telomerycznego typu dystrybucji heterochromatyny (Ryc. 1d, e, f; 2; 3). Podobieństwo w stylu prążkowym uwidacznia się jeszcze wyraźniej przy dokładniejszej analizie udziału poszczególnych frakcji heterochromatyny w budowie kariotypu. U cytotypu diploidalnego z Rosji (Ryc. 2) procentowy udział heterochromatyny w kariotypie wynosi około 8% natomiast u cytotypu heksaploidalnego z Afganistanu i Turcji udział ten jest podobny i wynosi odpowiednio około 7 oraz 9%.



**Ryc. 2.** *Phleum montanum* C. Koch – kariotyp prążkowy diploidalnych okazów z Rosji. \* zaznaczono chromosomy SAT; uwzględniono tylko prążki stałe (o frekwencji co najmniej 50%)

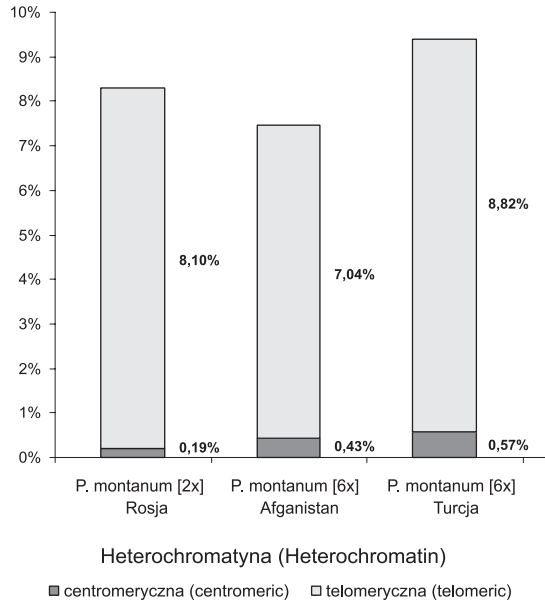
**Fig. 2.** *Phleum montanum* C. Koch – C-banded karyotype of the diploid specimens from Russia. \* marks SAT chromosomes; only permanent bands (with frequency at least 50%) are considered

U analizowanych cytotypów główną frakcją heterochromatyny jest heterochromatyna telomerowa. Heterochromatyna centromerowa występuje w niewielkiej ilości – poniżej 0,6% natomiast obecność heterochromatyny interkalarniej jest tak niska, że została pominięta w zestawieniach (Ryc. 4). Analiza poszczególnych heksaploidów wykazała słabe zróżnicowanie kariotypu. Znotowano w nim obok par chromosomów obecność większych grup liczących zwykle 4 lub 6 chromosomów (Ryc. 3). Taka frekwencja chromosomów w grupach sugeruje, że z jednakowym prawdopodobieństwem możemy wnioskować o allo- lub autopoliploidalnym pochodzeniu obydwu form heksaploidalnych.



**Ryc. 3.** *Phleum montanum* C. Koch – karyotyp prążkowy jednego z analizowanych heksaploidalnych okazów z Afganistanu. Karyotyp podzielono na 12 grup, o możliwie zbliżonej morfologii chromosomów i podobnym wzorze prążkowym. \* zaznaczono chromosomy SAT; literą B zaznaczono pojedynczy B-chromosom

**Fig. 3.** *Phleum montanum* C. Koch – C-banded karyotype of one of the analysed hexaploid specimens from Afghanistan. The karyotype is divided into 12 groups, with relatively similar morphology of chromosomes and band pattern. \* marks SAT chromosomes; letter B marks a single B-chromosome



**Ryc. 4.** Zawartość poszczególnych rodzajów heterochromatyny w karyotypach trzech populacji *Phleum montanum* C. Koch. Uwzględniono heterochromatynowe prążki stałe i polimorficzne

**Fig. 4.** Content of particular kinds of heterochromatin in karyotypes of three populations of *Phleum montanum* C. Koch. Polymorphic and permanent heterochromatin bands are considered

Telomerowy typ dystrybucji heterochromatyny stwierdzony u badanych cytotypów *P. montanum* występuje również u typowych przedstawicieli sekcji *Chilochloa*, tj. u *Phleum phleoides* i *P. hirsutum*. Największe podobieństwa w udziale poszczególnych frakcji heterochromatyny w budowie kariotypu łączą opisywane cytotypy *P. montanum* z *P. hirsutum* (KULA 2005a,b).

### Analiza ilości jądrowego DNA

U diploidalnego cytotypu *Phleum montanum* z Rosji stwierdzono około 3,9 pg DNA, natomiast u dwóch form heksaploidalnych z Afganistanu i Turcji zanotowano zbliżoną ilość około 11 pg DNA (Tab. 3). Wyliczone szacunkowe wielkości genomu wynoszą u tych form

**Tabela 3 (Table 3).** Analiza statystyczna ilości jądrowego DNA trzech populacji (Statistical analysis of the nuclear DNA amount in three populations of ) *Phleum montanum* C. Koch

Lp. (No)	Populacja (Population)	Ilość jądrowego DNA (Amount of nuclear DNA)		Wynik testu RIR Turkeya dla 1Cx (RIR Turkey's test result for 1Cx) (P<0,05)		
		2C ± SD (pg)	1Cx ± SD (pg)	1	2	3
1.	<i>Phleum montanum</i> [2x] Rosja (Russia)	3,923 ± 0,098	1,961 ± 0,049		*	*
2.	<i>Phleum montanum</i> [6x] Afganistan (Afghanistan)	11,024 ± 0,339	1,837 ± 0,056	*		—
3.	<i>Phleum montanum</i> [6x] Turcja (Turkey)	11,292 ± 0,107	1,882 ± 0,018	*	—	

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

\* różnica statystycznie istotna (statistically significant difference)

— różnica statystycznie nieistotna (statistically insignificant difference)

w przybliżeniu 1,9 pg dla cytotypu diploidalnego i 1,8 pg dla cytotypu heksaploidalnego. Pomędzy analizowanymi formami heksaploidalnymi nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w wielkości genomu (Tab. 3). Wielkość genomu u badanych form *P. montanum* są zbliżone do opisanych wcześniej u dwóch typowych dla sekcji *Chilochloa* gatunków: *P. phleoides* i *P. hirsutum* (ŚLIWIŃSKA i in. 2003). Jednocześnie genom badanych form *P. montanum* z Azji jest wyraźnie większy od opisanego wcześniej u diploidalnego *P. montanum* (*P. serrulatum*?) z terenu Grecji, którego wielkość oszacowano na 1,4 pg (KULA i in. 2004; KULA 2005b).

Zmierzona u trzech azjatyckich akcesji *Phleum montanum* ilość jądrowego DNA wskazuje na ich pokrewieństwo, widoczne także na poziomie struktury kariotypu prążkowego. Również nieco mniejsza wielkość genomu cytotypu heksaploidalnego w porównaniu z diploidalnym nie jest zaskakująca. Stopniowe zmniejszenie wielkości genomu na kolejnych stopniach ploidalności stwierdzono u wielu gatunków roślin, w tym u różnych cytotypów *P. pratense* (OHRI 1998; BENNETZEN 2002; JOACHIMIAK 2005).

## WNIOSKI

U badanych azjatyckich populacji *Phleum montanum* stwierdzono obecność diploidalnej i heksaploidalnej liczby chromosomów. Zaobserwowanym liczbom chromosomów odpowiada poziom jądrowego DNA zmierzony w tych populacjach.

Struktura kariotypu prążkowego diploidalnego cytotypu z Rosji oraz cytotypu heksaploidalnego z Afganistanu i Turcji wykazuje znaczne podobieństwo. Zbliżona jest także wielkość genomu stwierdzona u tych cytotypów w granicach od 1,8 do 1,9 pg DNA. Jednocześnie wielkość genomu omawianych cytotypów azjatyckich jest o około 0,5 pg większa niż u opisanego wcześniej diploidalnego cytotypu pochodzącego z Grecji. Przepuszczalnie przebadane di- i heksaploidalne azjatyckie cytotypy są ze sobą spokrewnione i przynajmniej pod względem wielkości genomu różnią się od diploidalnego cytotypu greckiego.

Dopiero szerzej zakrojone badania cytotaksonomiczne mogą dać odpowiedź na pytanie czy podział tego taksonu na trzy gatunki: *Phleum montanum*, *P. serrulatum* i *P. ambiguum* ma swoje uzasadnienie.

**Podziękowania.** Pragniemy podziękować Bankowi Nasion (USDA, ARS, WRPIS) z USA za przysłanie ziarniaków *Phleum montanum* do badań.

## LITERATURA

- BENNETZEN J. L. 2002. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. – *Genetica* **115**: 29–36.
- CLAYTON W. D., HARMAN K. T. & WILLIAMSON H. 2002. World Grass Species: Descriptions, Identification, and Information Retrieval. <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>.
- 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., 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.
- 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.
- JOUBE N., DIEZ N. & RODRIGUEZ M. 1980. C-banding in 6x-*Triticale* x *Secale cereale* L. hybrid cytogenetics. – *Theor. Appl. Genetics* **57**: 75–79.
- KOŽUHAROV S. I. & PETROVA A. V. 1991. Chromosome numbers of Bulgarian angiosperms. – *Fitologija* **39**: 72–77.
- KULA A. 2005a. Struktura kariotypu *Phleum hirsutum* (*Poaceae*). – *Fragm. Flor. Geobot. Polonica* **12** (1): 135–142.
- KULA A. 2005b. Searching for a primeval *Phleum* karyotype. – W: L. FREY (red.), *Biology of grasses*, s. 197–206. W. Szafer Institute of Botany, Academy of Sciences, Kraków.
- KULA A. 2005c. Kariologia i morfologia gatunków z rodzaju *Phleum*. – *Zesz. Nauk. Akad. Roln. w Krakowie* **418**: 7–171.



- KULA A., ŚLIWIŃSKA E., ŻUREK G. & JOACHIMIAK A. 2004. 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.
- LYSÁK M. A. & DOLEŽEL J. 1998. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (*Poaceae*). – *Caryologia* **52**: 123–132.
- NATH J. & NIELSEN E. L. 1963. Cytology of *Phleum* sp. affin. *P. montanum* C. Koch. – *Euphytica* **12**(2): 161–166.
- OHRI D. 1998. Genome size variation and plant systematics. – *Ann. Bot.* **82**: 75–83.
- PIGNATTI S. 1982. Flora d'Italia **3**. s. 780. Edagricole, Bologna.
- RECHINGER K. H. (red.) 1963. Flora iranica. Austria, Graz.
- 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 *Brachycome* (*Asteraceae*, *Asterae*): Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. – *J. Plant. Res.* **112**: 145–161.

#### SUMMARY

*Phleum montanum* is a representative of the *Chilochloa* section, which grows in montane localities in the Mediterranean region, in the Balkans and western Asia. Morphologically, it shows features intermediate between two species typical of this section: *P. phleoides* and *P. hirsutum*. So far, cytogenetic data on this taxon have been restricted to scarce information on the chromosome number in it.

In the present research the occurrence of diploid (southern Russia) and hexaploid (Afghanistan and Turkey) chromosome numbers in *Phleum montanum* was confirmed. For the specimens from these populations, conventional and C-banded karyotype structure was presented. The C-banded karyotype structure in diploid and hexaploid specimens turned out to be similar – it is characterized by telomeric type of heterochromatin distribution. In the karyotype of *P. montanum* telomeric heterochromatin definitely dominates other heterochromatin fractions. Apart from telomeric heterochromatin only insignificant amount of centromeric heterochromatin was found (below 1%). Moreover, for the mentioned populations the amount of nuclear DNA was measured. In the diploid specimens it was approximately 3.6 pg and in the hexaploid ones – about 11 pg 2C DNA. The calculated genome sizes in all the three forms were similar: 1.9 pg in the diploid form and 1.8 pg in both hexaploid forms.

*Przyjęto do druku: 29.01.2007 r.*