

Kariologia i morfologia *Phleum paniculatum* (Poaceae)

ADAM KULA, ELWIRA ŚLIWIŃSKA i DOMINIKA WRÓBLEWSKA

KULA, A., ŚLIWIŃSKA, E. AND WRÓBLEWSKA, D. 2007. Karyology and morphology of *Phleum paniculatum* (Poaceae). *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica* 14(1): 149–157. Kraków. PL ISSN 1640-629X.

ABSTRACT: The authors analysed selected morphological features, the structure of conventional and banded karyotypes and the amount of nuclear DNA in *Phleum paniculatum* Huds. from the *Chilochloa* section. The examined specimens came from Afghanistan. The studied population possessed tetraploid chromosome number $2n = 28$, which had been observed in this species before. In the banded karyotype of the examined specimens the authors recorded centromeric type of heterochromatin distribution, which occurs in the *Chilochloa* section only occasionally – so far it had been established only in *Phleum arenarium* L. Proportional contribution of heterochromatin to karyotype structure proved to be lower, as compared to karyotypes of other so far described species from the *Phleum* genus.

KEY WORDS: *Phleum paniculatum*, karyotype structure, heterochromatin, DNA amount, morphology

Adam Kula, Dominika Wróblewska, Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza w Krakowie, ul. Łobzowska 24, PL-31-140 Kraków, Polska; e-mail: rrkula@cyf-kr.edu.pl; titina@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 paniculatum Huds. jest jednym z kilku przedstawicieli sekcji *Chilochloa* (HUMPHRIES 1980). Jest to gatunek jednoroczny o szerokim rozprzestrzenieniu. Jego siedliska rozpościerają się od Europy poprzez Bliski Wschód, Afganistan, Kaszmir, dawne republiki poradzieckie z Azji Środkowej (Kirgistan, Uzbekistan, Kazachstan, Turkmenistan, Tadżykistan), Chiny aż do Wysp Japońskich (LU & PHILLIPS 2006). W Europie znane są jego stanowiska w obszarze śródziemnomorskim, na Bałkanach, w Alpach (Szwajcaria, południowe Niemcy), gdzie rośnie w niższych położeniach górskich. Jako gatunek zawleczony notowany był także w Czechach (PIGNATTI 1982; CONERT 1998; HÖCHTL & EISELE 2001; PYŠEK i in. 20002). W Chinach spotyka się go na wyższych wysokościach nawet do 1800 m n.p.m. Generalnie *P. paniculatum* preferuje stanowiska na zboczach gór, brzegach rzek, a także na brzegach pól i poboczach dróg.

Phleum paniculatum osiąga wysokość pędów od zaledwie kilku do około 40 cm. Tworzy klapowane wiechy kłosokształtne o żółtozielonkawej barwie. Najbardziej charakterystyczny dla tego gatunku jest klinowaty kształt kłosek oraz ich niezbyt gęste ustawienie (w wieszce oglądanej pod światło wyraźnie widać oś kwiatostanu) (LU & PHILLIPS 2006). Pomimo że takson ten został opisany już w XVIII w. (Linneusz opisuje go pod nazwą *Chilochloa annua*) pozostaje jednym z najśląbiej poznanych gatunków z rodzaju *Phleum* (cyt. za CONERT 1998). Znanych jest wiele nazw synonimicznych tego gatunku, z których wymienić należy choćby *Phleum japonicum* Franchet & Savatier, w niektórych zestawieniach systematycznych wymieniane jako osobny takson sekcji *Chilochloa*.

Wiadomości na temat cytogenetyki *Phleum paniculatum* są nad wyraz skąpe. Znana jest jedynie somatyczna liczba chromosomów $2n = 4x = 28$ (ALBERS 1998). Brak natomiast informacji na temat struktury kariotypu czy ilości jądrowego DNA.

Celem prezentowanej pracy było przedstawienie podstawowych danych cytogenetycznych oraz opis wybranych cech morfologicznych użytecznych w rozpoznawaniu tego taksonu.

MATERIAŁ I METODY

Okazy *Phleum paniculatum* wyhodowane zostały z nasion figurujących pod numerem katalogowym PI 211069, przesłanych przez Bank Nasion (USDA, ARS, WRPIS) z USA. Materiał pochodził z naturalnego stanowiska w Afganistanie. Bliższe dane na temat miejsca pochodzenia nie były podane. Rośliny rosły w pokoju wegetacyjnym, przy długim dniu (16 godzin dzień, 8 godzin noc) w temperaturze 16–20°C.

Analizy cytologiczne przeprowadzono na 30 wyrośniętych egzemplarzach. Chromosomy barwiono konwencjonalnie orceiną octową oraz różnicowo, metodą prążków C (JOUVE i in. 1980). Analizę kariotypu konwencjonalnego 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 *Phleum pratense* ze stanowiska w Kostrzu pod Krakowem (8,92 pg/2C, ŚLIWIŃSKA i in. 2003) jako standardu wewnętrznego, zaś próby przygotowano według opisanej wcześniej metodyki (JOACHIMIAK i in. 2001). Dla określania ilości 2C DNA przyjęto średnią z pomiarów 10 roślin. Pomiar cytometryczny zostały wykonane w Zakładzie Biologii Molekularnej i Cytometrii, Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.

WYNIKI I DYSKUSJA

Morfologia roślin

Analiza morfologiczna przeprowadzona została w celu potwierdzenia prawidłowości oznaczenia materiału dokonanego przez Bank Nasion, zwłaszcza że przedmiotem badań był słabo poznany gatunek, nie występujący w naszym kraju, z którym dotąd nie mieliśmy styczności. Oznaczenia dokonano na kwitnących okazach w oparciu o klucze zamieszczone we Florze Europy, Florze Europy Środkowej, Florze Włoch i Florze Chin (HUMPHRIES

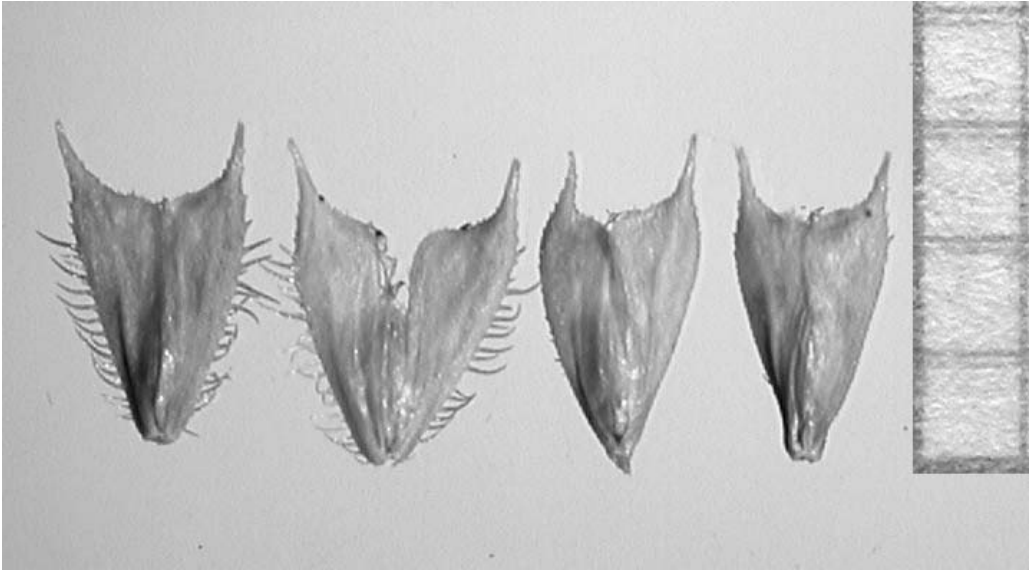


Ryc. 1. Okazy zielnikowe *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$) z Afganistanu z powiększoną klapowaną wiechą kłosokształtną. Podziałka centymetrowa

Fig. 1. Herbarial specimens of *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$) from Afghanistan with a magnified free panicle. Scale in cm

1980; CONERT 1998; PIGNATTI 1982; LU & PHILLIPS 2006). Badane rośliny w pełni odpowiadały opisom *Phleum paniculatum* Huds. zawartym w wymienionych publikacjach. Udało się także ustalić kilka charakterystycznych cech dotyczących głównie budowy kwiatostanu, odróżniających ten gatunek od pozostałych taksonów z sekcji *Chilochloa*. Maksymalną wysokość pędów rośliny osiągnęły po wykłoszeniu, po czterech miesiącach wegetacji. W ciągu kolejnego miesiąca zawiązały ziarniaki i obumarły. Cały cykl życiowy zamknął się zatem w przeciągu pięciu miesięcy.

Rośliny wykształciły wyprostowane pędy i miały wysmukły pokrój. Wysokość źdźbeł u poszczególnych okazów wahała się w granicach od 6 do 21 cm, średnio wyniosła około 12 cm. Liść flagowy miał średnio około 5 cm długości i 0,4 cm szerokości. Wąskocyli-dryczne wiechy kłosokształtne miały średnie wymiary: 1,5 cm długości i 0,4 cm szerokości. Wiechy były wyraźnie klapowane i posiadały luźno rozmieszczone kłoski, dlatego zarówno oś kwiatostanu, jak i gałązki wiechy pierwszego rzędu były dobrze widoczne (Ryc. 1). Budowa kłosek odpowiadała opisom systematycznym dla omawianego gatunku. Posiadały one charakterystyczny klinowaty kształt wynikający z budowy plew: silnie zwężonych



Ryc. 2. Morfologia kłosków u *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$). Z boku podziałka milimetrowa

Fig. 2. Morphology of spikelets in *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$). Scale in mm

u dołu i znacznie rozszerzonych w górnej części (Ryc. 2). W obrębie jednego kwiatostanu jedne kłoski miały brzegi plew owłosione inne nieowłosione. Kłoski z plewami o brzegach owłosionych rozmieszczone były na gałązkach wewnątrz wiechy.

Somatyczne liczby chromosomów i struktura kariotypu

U badanych okazów *Phleum paniculatum* stwierdzono występowanie tetraploidalnej liczby chromosomów $2n = 4x = 28$. Zanotowano także występowanie od 1 do 2 B-chromosomów. Chromosomy u tego gatunku są niewielkie, o średniej długości około 3 μm . Kariotyp jest lekko asymetryczny ze względu na występowanie w nim obok przeważającej liczby chromosomów metacentrycznych, także kilku chromosomów submetacentrycznych (Tab. 1). Wyliczona wartość współczynnika asymetrii kariotypu ($A = 0,19$) przyjmuje największą wartość spośród innych zbadanych pod tym względem gatunków tymotek z sekcji *Chilochloa*, posiadających kariotypy prawie idealnie symetryczne (KULA 2005).

Struktura kariotypu prążkowego

Chromosomy barwione metodą prążków C reprezentują wyraźnie centromerowy typ dystrybucji heterochromatyny, sporadycznie spotykany w sekcji *Chilochloa* (Ryc. 3). Do tej pory stwierdzono go jedynie u *Phleum arenarium* L. (KULA & KUTYNA 2005). Charakterystyczna dla struktury kariotypu prążkowego *P. paniculatum* jest także wyjątkowo mała ogólna zawartość heterochromatyny (3,65%). W jądrach interfazowych, barwionych metodą prążków C, u innych gatunków tymotek z tej sekcji, o znacznie większej zawarto-

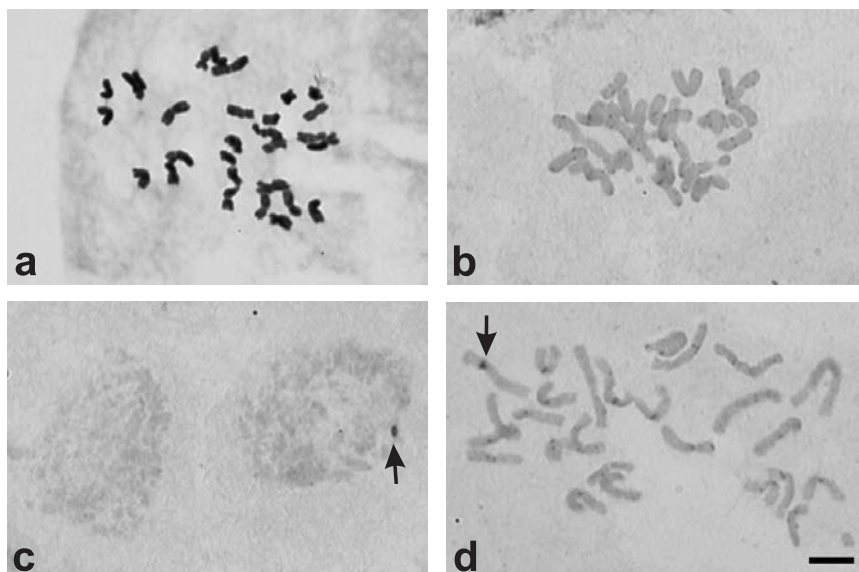
Tabela 1 (Table 1). Struktura kariotypu oraz ilość jądrowego DNA (Karyotype structure and nuclear DNA amount) u (of) *Phleum paniculatum* Huds.

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)	Ilość jądrowego DNA (Amount of nuclear DNA)	
						2C \pm SD (pg)	1Cx \pm SD (pg)
28	4x	85,57 \pm 7,31	3,00 \pm 0,76	0,19	20m + 4 sm	5,748 \pm 0,067	1,437 \pm 0,017

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

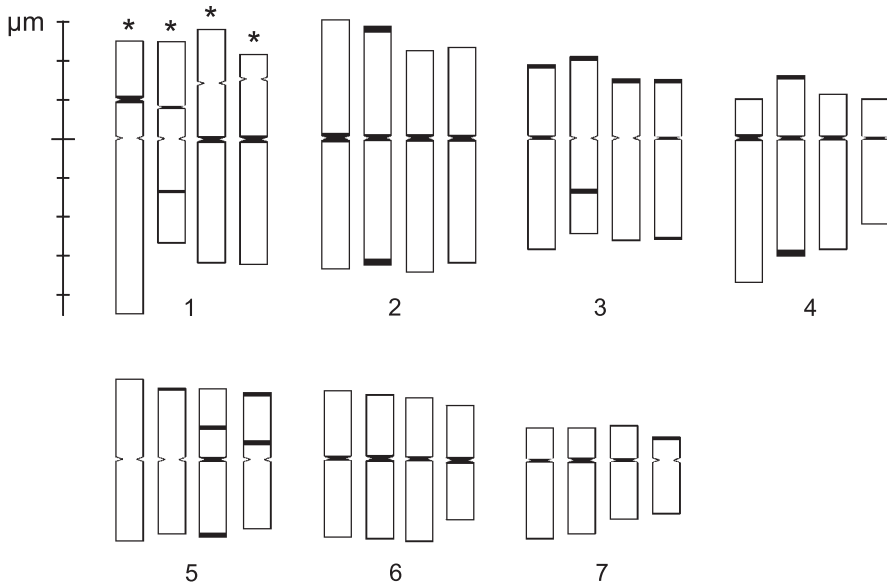
m – chromosom metacentryczny (metacentric chromosome), sm – chromosom submetacentryczny (submetacentric chromosome)

ści heterochromatyny, takich jak *P. hirsutum* i *P. montanum*, widoczne są wyraźne bloki heterochromatyny. Natomiast w większości jąder interfazowych u *P. paniculatum* trudno wyróżnić takie struktury. Jednak u około 20% jąder pojawia się pojedynczy dobrze widoczny segment heterochromatynowy, który prawdopodobnie odpowiada interkalarnemu prążkowi heterochromatynowemu występującemu wokół organizatorów jąderka niektórych chromosomów satelitarnych (Ryc. 3c, d).



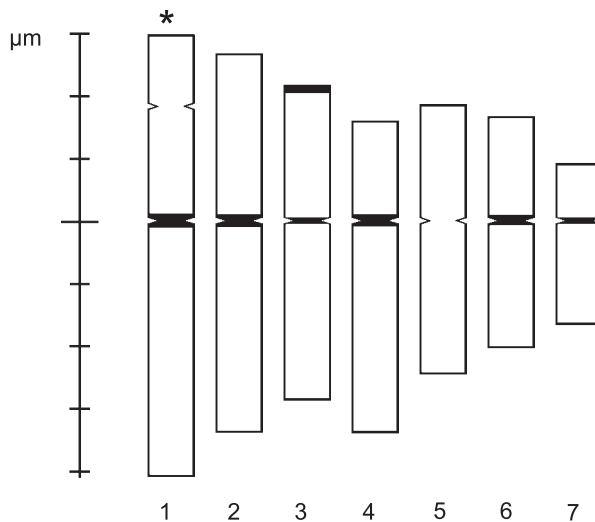
Ryc. 3. Płytki metafazowe i jądra komórkowe *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$). **a.** barwione konwencjonalnie orceiną otową, **b, c, d.** barwione metodą prążków C. Strzałka wskazuje segment heterochromatynowy w jednym z jąder komórkowych (**c**) i w organizatorze jąderka jednego z chromosomów SAT (**d**). Skala 5 μm

Fig. 3. Metaphase plates and cell nuclei of *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$). **a.** stained in acetic orcein, **b, c, d.** C-banded. The arrow shows the heterochromatin segment in one of cell nuclei (**c**) and in the nucleolar organizer in one of SAT chromosome (**d**). Scale 5 μm



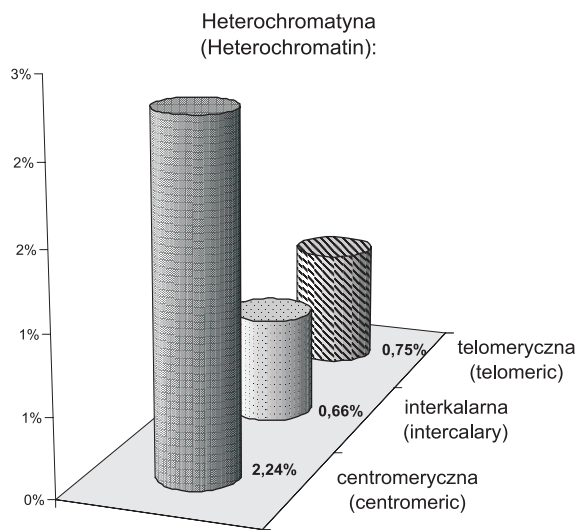
Ryc. 4. *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$) – karyotyp prążkowy jednego z analizowanych okazów. Karyotyp podzielono na 7 grup, o możliwie zbliżonej morfologii chromosomów i podobnym wzorze prążkowym. * zaznaczono chromosomy SAT

Fig. 4. *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$) – C-banded karyotype of one of the analysed specimens. The karyotype is divided into 7 groups, with relatively similar morphology of chromosomes and similar band pattern. * marks SAT chromosomes



Ryc. 5. *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$) – karyotyp prążkowy. * chromosomy SAT; uwzględniono tylko prążki stałe (o frekwencji co najmniej 50%).

Fig. 5. *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$) – C-banded karyotype. * SAT chromosomes; only permanent bands (with frequency at least 50%) are considered



Ryc. 6. Zawartość poszczególnych rodzajów heterochromatyny w kariotypie *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$). Uwzględniono heterochromatynowe prążki stałe i polimorficzne

Fig. 6. Content of particular kinds of heterochromatin in the karyotype of *Phleum paniculatum* Huds. ($2n = 28$). Permanent and polymorphic heterochromatin bands are considered

Pomimo niewielkiej zawartości heterochromatyny w kariotypie, a więc i ograniczonej liczby punktów różniących strukturę chromosomów bez trudu daje się zestawić kariogramy prążkowe dla poszczególnych osobników. Na podstawie podobieństw w morfologii i wzorze prążkowym, można w nich wyróżnić siedem grup po cztery chromosomy (Ryc. 4). Taka struktura kariotypu wskazuje na autopolioidalne pochodzenie tego taksonu. Kariotyp zbiorczy, uwzględniający obecność jedynie tzw. stałych prążków heterochromatynowych (o frekwencji co najmniej 50%), wykazuje obecność prążków centromerowych w większości chromosomów (Ryc. 5). Przewagę heterochromatyny centromerowej nad pozostałymi frakcjami heterochromatyny w budowie kariotypu dobrze ilustruje zestawienie uwzględniające także obecność prążków polimorficznych (Ryc. 6).

Struktura kariotypu prążkowego *Phleum paniculatum* wykazuje największe podobieństwo do wspomnianego już *P. arenarium*. Podobieństwo we wzorze prążkowym pomiędzy wymienionymi gatunkami nie musi pokrywać się z ich bliskim pokrewieństwem. Niepublikowane dane Stewarta i współpracowników dotyczące analiz molekularnych cpDNA oraz sekwencji ITS wykazują odrębność *P. paniculatum* od pozostałych gatunków sekcji *Chilochloa*.

Analiza ilości jądrowego DNA

U badanych okazów stwierdzono obecność 5,7 pg DNA (Tab. 1). Podobne ilości jądrowego DNA (około 6 pg) zanotowano także u tetraploidalnych gatunków tymotek z sekcji *Phleum*, tj. u *P. pratense* [4x] i *P. commutatum* Gaud. Wyliczona szacunkowa wielkość genomu

P. paniculatum – około 1,4 pg jest zbliżona do tej, jaką zaobserwowano u innego jednorocznego przedstawiciela sekcji *Chilochloa* – *P. arenarium* L. Wielkość genomu różni wyraźnie obydwie wymienione gatunki od typowych przedstawicieli sekcji *Chilochloa*, takich jak *P. phleoides* L., *P. hirsutum* Honck. i *P. montanum* C. Koch. posiadających znacznie większe genomy – w granicach od 1,7 do 1,9 pg (ŚLIWIŃSKA i in. 2003; KULA i in. 2004).

WNIOSKI

(1) U badanej afgańskiej akcesji *Phleum paniculatum* stwierdzono obecność tetraploidalnej liczby chromosomów $2n = 4x = 28$.

(2) Zaobserwowanej liczbie chromosomów odpowiada ilość jądrowego 2C DNA – 5,7 pg zbliżona do tej, jaka występuje u tetraploidalnych taksonów *Phleum* z sekcji *Phleum*.

(3) Kariotyp prążkowy *Phleum paniculatum* cechuje się centromerycznym typem dystrybucji heterochromatyny, w sekcji *Chilochloa* stwierdzonym dotąd jedynie u innego jednorocznego taksonu – *P. arenarium*.

(4) Struktura kariotypu prążkowego wskazuje na autopoliploidalne pochodzenie *Phleum paniculatum*.

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

LITERATURA

- ALBERS F. 1998. Chromosomenatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. – W: R. WISSKIRCHEN & H. HAEUPLER, Standardliste der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands, s. 562–616. Bundesamt für Naturschutz & Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- CONERT H. J. 1998. *Phleum*. – W: Gustav Hegi, Illustrierte Flora von Mitteleuropa. 1/3, s. 190–206. Parey Buchverlag, Berlin – Hamburg.
- HÖCHTL F. & EISELE W. 2001. Wiederfund des Rispen-Lieschgras (*Phleum paniculatum*) in Baden-Württemberg (Unteres Jagsttal) – Floristische Rundbriefe **35**(1–2): 27–32.
- 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.
- JOUE N., DIEZ N. & RODRIGUEZ M. 1980. C-banding in $6x$ -*Triticale* × *Secale cereale* L. hybrid cytogenetics. – Theor. Appl. Genetics **57**: 75–79.
- KULA A. 2005. Kariologia i morfologia gatunków z rodzaju *Phleum*. – Zesz. Nauk. Akad. Roln. w Krakowie **418**: 7–171.
- KULA A. & KUTYNA D. 2005. Kariologia i morfologia *Phleum arenarium* (*Poaceae*). – Fragn. Flor. Geobot. Polonica **12**(2): 317–325
- 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.

- LU S. & PHILLIPS S. M. 2006. 94. *Phleum* L., Sp. Pl. 1: 59. 1753. – W: Flora of China, s. 367–368, www.fna.org/china/mss/volume22/FOC22_12_Aveneae.pdf
- PIGNATTI S. 1982. Flora d'Italia **3**. s. 780. Edagricole, Bologna.
- PYŠEK P., SÁDLO J. & MANDÁK B. 2002. Catalogue of alien plants of the Czech Republic. – Preslia, Praha **74**: 97–186
- 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 *Brachyscome* (*Asteraceae*, *Asterae*): Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. – J. Plant. Res. **112**: 145–161.

SUMMARY

Phleum paniculatum Huds. is a representative of the *Chilochloa* section growing in the moderate climate zone and widespread from Europe to the Japanese islands. Although in the *Phleum* genus only the bipolar *P. commutatum* Gaud. has a wider natural range, *Phleum paniculatum* had been one of the least cytogenetically examined species of the timothy. Past cytogenetic data on this species were limited to establishing tetraploid chromosome number $2n = 28$. In the present research this number was confirmed. In the studied specimens coming from Afghanistan the occurrence of single B-chromosomes was observed. Moreover, conventional and banded karyotypes were analysed. The banded karyotype structure proved to be particularly interesting because centromeric type of heterochromatin distribution was established in it. Proportional contribution of centromeric heterochromatin to the karyotype structure was almost twice as big as the total of proportional contribution of other heterochromatin fractions, i.e. telomeric and intercalary heterochromatin. Furthermore, small general content of heterochromatin in the karyotype (less than 4%) is characteristic for this species. The presented banding style as well as the genome size (about 1.4 pg) make *P. paniculatum* more similar to another representative of the *Chilochloa* section – *P. arenarium* L. The mentioned features clearly differentiate the two species from the typical representatives of the *Chilochloa* section such as *P. phleoides* L., *P. hirsutum* Honck. and *P. montanum* C. Koch., which are characterised by telomeric type of heterochromatin distribution in the karyotype and the presence of significantly larger genomes (from 1.7 to 1.9 pg).

Przyjęto do druku: 26.01.2007 r.