

## UDZIAŁ HETEROCHROMATYNY W BUDOWIE KARIOTYPU SZEŚCIU LINII *Phleum* Z KOLEKCJI Z NOWEJ ZELANDII

*Adam Kula*<sup>1</sup>, *Andrzej Joachimiak*<sup>2</sup>, *Joanna Kłós*<sup>1</sup>, *Alan Stewart*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa,  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

<sup>2</sup> Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

<sup>3</sup> Stacja Pyne Gould Guinness Ltd, Christchurch, Nowa Zelandia

### Wstęp

Zagadnienie ewolucyjnych związków pomiędzy różnymi cytotypami tymotki łąkowej (*Phleum pratense* s.l.) i innych spokrewnionych z nią gatunków przewija się w badaniach cytogenetycznych od ponad siedemdziesięciu lat. Klasyczne już dziś prace GREGOR'A i SANSOME'A [1930], MÜNTZING'A [1935, 1938], MÜNTZING'A i PRAKKEN'A [1940] oraz NORDENSKIÖLD [1937, 1941, 1945, 1949, 1953, 1957, 1960] opierały się na konwencjonalnym barwieniu chromosomów i analizie przebiegu mejozy u mieszańców. Wyniki tych prac nie były jednoznaczne, ponieważ wskazywały albo na auto-, albo na allopoliploidalne pochodzenie heksaploidalnego *P. pratense*. Według zwolenników pierwszego poglądu rodzicem tymotki łąkowej miała być diploidalna tymotka kolankowa – *P. nodosum* L. ( $2n = 14$ ), według drugiego zaś *P. nodosum* L. i diploidalna tymotka alpejska – *P. rhaeticum* (= *P. alpinum* L.). Obydwa wymienione gatunki wraz z *P. pratense* L. zaliczono do sekcji *Phleum*.

Nowe spojrzenie na pochodzenie heksaploidalnego taksonu *Phleum* przyniosły dopiero lata dziewięćdziesiąte, kiedy to w badaniach cytogenetycznych nad tym rodzajem zastosowano prążkowe barwienie chromosomów. Publikacje CAFA i BULLEN'A [1991] oraz autorów [JOACHIMIAK, KULA 1993, 1996, 1997], w których zastosowano metodę prążków C, wskazywały na allopoliploidalne pochodzenie tego gatunku. Hipotezę tę potwierdziły również badania molekularne CAFA i BULLEN'A [1994] nad genomowo-specyficznymi sekwencjami DNA u heksaploidalnego *P. pratense* oraz jego domniemyanych diploidalnych rodziców: *P. nodosum* i *P. rhaeticum*. Z przytoczonych badań prążkowych i molekularnych wynika, iż w kariotypie (AAAABB) heksaploidalnej tymotki łąkowej znaleźć można cztery genomy (A) pochodzące od *P. nodosum* i dwa (B) pochodzące od *P. rhaeticum*.

Wydaje się, że przytoczone wyniki rozstrzygają problem powstania formy heksaploidalnej, nie odpowiadają jednak na pytanie, jakie były etapy pośrednie na tej drodze? Najbardziej prawdopodobne wydaje się, że powstała ona poprzez skrzyżowanie jakiejś hipotetycznej formy tetraploidalnej z diploidalną i podwojenie liczby chromosomów u tak powstałego (triploidalnego) mieszańca. Pod uwagę

wchodzą tu jednak dwie możliwości: krzyżowanie pomiędzy autotetraploidalną formą *P. nodosum* (AAAA) a *P. rhaeticum* (BB), lub pomiędzy allotetraploidem (AABB) a *P. nodosum* (AA). Kluczowe znaczenie dla rozstrzygnięcia tego problemu może mieć zbadanie, czy naturalnie występujące w przyrodzie tetraploidy są auto- czy allopoliploidami? Zagadnienie to nie doczekało się do tej pory rozwiązania, ponieważ znalezienie naturalnie występujących tetraploidów o morfologii zbliżonej do *P. pratense* było niezwykle trudne. Dopiero w [1984] roku CENCI i in. podali, że różne naturalne cytotypy *P. pratense* s.l. (*P. nodosum*,  $2n = 2x$  i *P. pratense*,  $2n = 4x-8x$ ), w tym i cytotypy tetraploidalne ( $2n = 4x$ ) znaleźć można w europejskim obszarze Morza Śródziemnego, gdzie występuje także drugi z domniemanych rodziców heksaploidalnego *P. pratense*, *P. rhaeticum*. Pojawiła się więc możliwość zbadania tetraploidalnych form, i to pochodzących z obszaru, na którym mogło właśnie dojść do powstania heksaploidalnej tymotki. Innym interesującym zagadnieniem, związanym z formami *Phleum* z tego terenu jest pochodzenie form oktoploidalnych, co do których nie mamy, jak do tej pory, żadnych informacji.

W prezentowanej pracy przedstawiamy ogólną charakterystykę klasyczną i prążkową (C-banding) chromosomów różnych cytotypów ( $2n = 2x-8x$ ) *P. pratense* s.l., pochodzących z obszaru Morza Śródziemnego i hodowanych przez jednego z autorów (A. Steward) w stacji Pyne Gould Guinness Ltd w Nowej Zelandii. Badania te stanowią wstęp do naświetlenia wymienionych wyżej zagadnień ewolucyjnych, dotyczących przedstawicieli sekcji *Phleum* w rodzaju *Phleum*. Ich rozwiązanie może okazać się pomocne w pracach hodowlanych, prowadzonych nad różnymi cytotypami tymotki w różnych ośrodkach na świecie.

## Materiał i metody

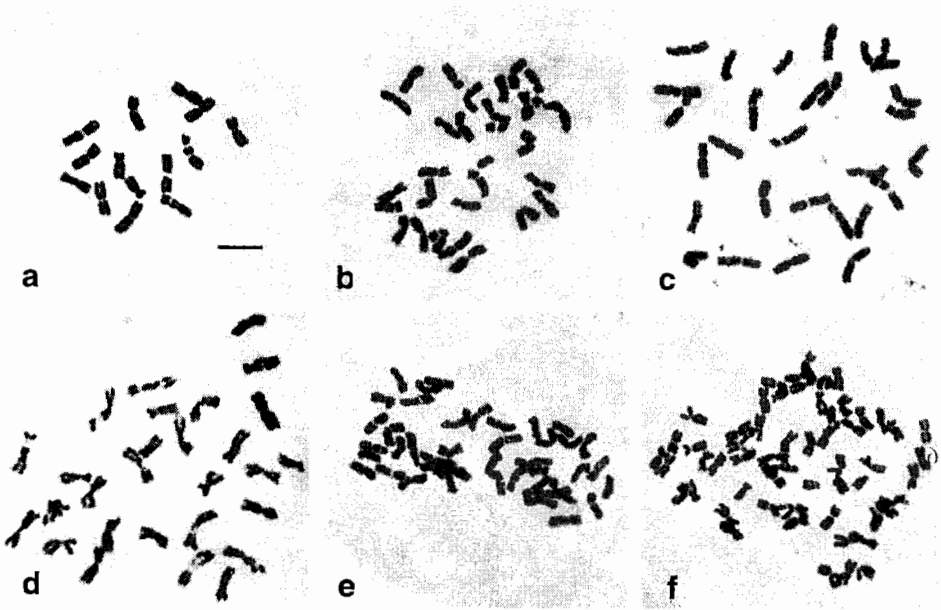
Badania kariotypu przeprowadzono na czterech cytotypach tymotki łąkowej *Phleum pratense*: diploid ( $2n = 14$ : linia nr 43968) pochodził z Portugalii, trzy tetraploidy ( $2n = 28$ : F488, 58702 i H677) wywodziły się kolejno z Hiszpanii, Francji i Włoch, heksaploid ( $2n = 42$ : PG438) oraz oktoploid ( $2n = 56$ : 20633) pochodziły z Włoch. Formy te poddane zostały programowi hodowlanemu w stacji hodowlanej Pyne Gould Guinness Ltd na Nowej Zelandii, mającemu na celu wyprowadzenie nowych odmian komercyjnych. Kwestia możliwości ich morfologicznego rozróżniania stanowi przedmiot osobnej pracy publikowanej w tym zeszycie [JOACHIMIĄK i in. 2002].

Konwencjonalne barwienia chromosomów przeprowadzono z użyciem orceiny octowej. Prążkowe barwienia chromosomów metodą prążków C wykonano według metodyki JOUVE i in. [1980], z kilkoma modyfikacjami. Archiwizację płytek metafazowych przeprowadzono wykorzystując system analizy obrazu Lucia G połączony poprzez kamerę CCD (Panasonic) z mikroskopem Eclipse E800 (Nikon). Pomiary chromosomów i ilości heterochromatyny wykonano w programie CytoPlane wersja 1.2.

Określenia somatycznej liczby chromosomów u każdej z badanych linii dokonano w oparciu o analizę 10 płytek metafazowych, pochodzących z różnych roślin. Taka sama liczba płytek metafazowych barwionych różnicowo metodą prążków C pozwoliła na przedstawienie rozkładu i ilości heterochromatyny w budowie ich kariotypu.

## Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania kariologiczne potwierdziły sugerowane dla poszczególnych linii w „Materiałach i metodach” stopnie ploidalności (rys. 1). Wszystkie badane rośliny w obrębie linii były euploidami o stałej somatycznej liczbie chromosomów ( $2n = 2x$ ,  $2n = 4x$ ,  $2n = 6x$  lub  $2n = 8x$ ), chociaż w komórkach korzeni tetraploidów i oktoploidów obserwowano sporadycznie także niższe (najczęściej diploidalne) liczby chromosomów.

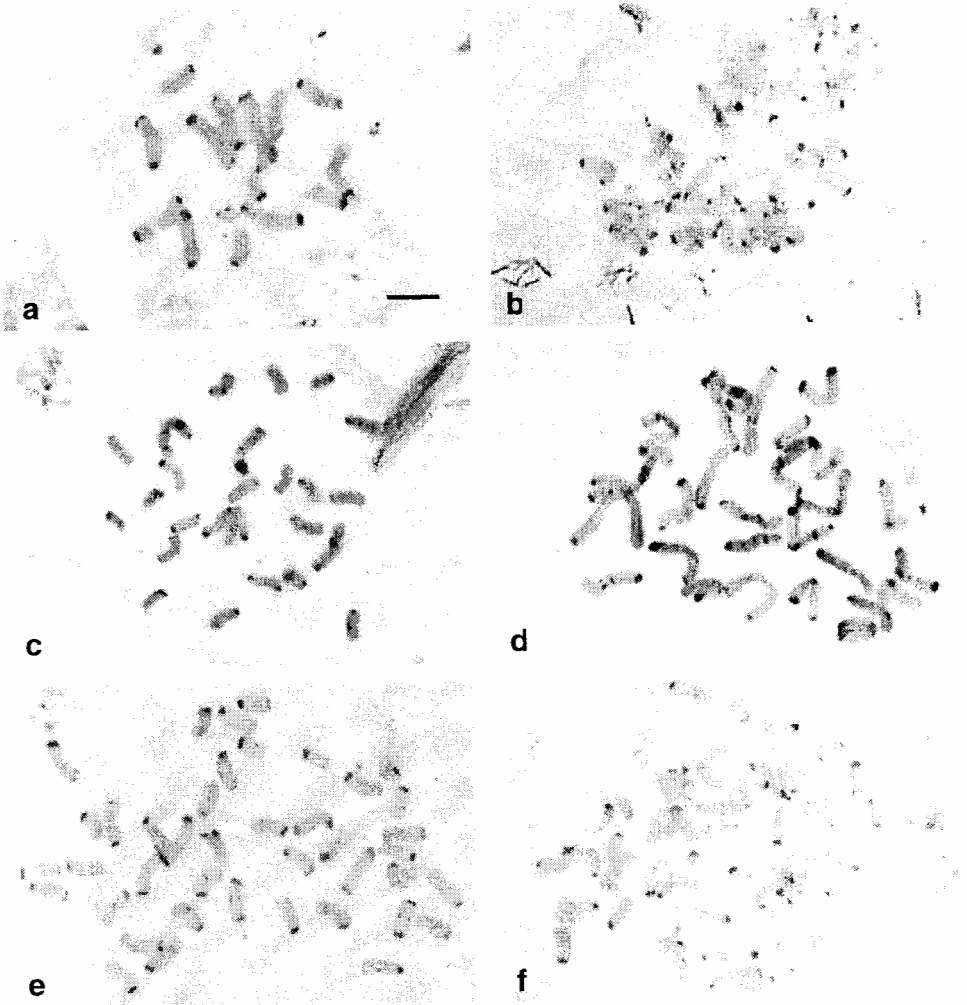


Rys. 1. Barwione orceiną chromosomy metafazowe sześciu linii tymotki łąkowej – *Phleum pratense* s.l.: a) diploid 43968 –  $2n = 14$ , b) tetraploid F488 –  $2n = 28$ , c) tetraploid 58702, d) tetraploid H677, e) heksaploid PG438 –  $2n = 42$ , d) oktoploid 20633 –  $2n = 56$   
Podziałka:  $5 \mu\text{m}$

Fig. 1. Orcein-stained metaphase chromosomes of six lines of timothy – *Phleum pratense* s.l.: a) diploid 43968 –  $2n = 14$ , b) tetraploid F488 –  $2n = 28$ , c) tetraploid 58702, d) tetraploid H677, e) hexaploid PG438 –  $2n = 42$ , d) octoploid 20633 –  $2n = 56$   
Scale:  $5 \mu\text{m}$

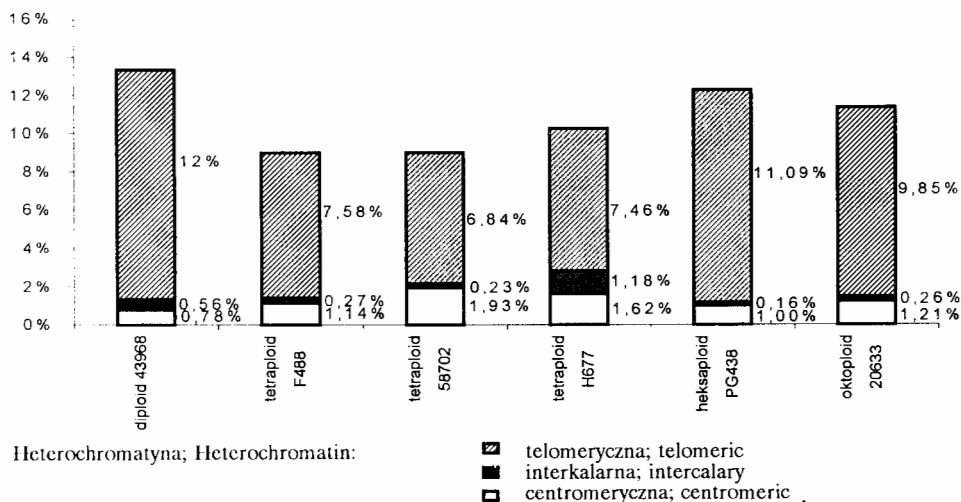
Prążkowe badania kariotypu wykazały telomeryczny typ dystrybucji heterochromatyny u wszystkich wymienionych cytotypów, z nieznacznym udziałem heterochromatyny centromerowej i interkalarnej (rys. 2). Procentowy udział poszczególnych rodzajów heterochromatyny w budowie kariotypu jest zbliżony (rys. 3). Wskazuje to na bliskie pokrewieństwo wszystkich badanych poliploidów i na znaczący udział genomów (A) typu *nodosum* (dla których taka dystrybucja heterochromatyny jest charakterystyczna) w ich kariotypie. Obserwacja budowy plew

(rys. 4) również potwierdza bliskie pokrewieństwo badanych form. Przedstawione wstępne wyniki prążkowej analizy kariotypu nie umożliwiają rozstrzygnięcia, jaki jest udział poszczególnych genomów (A i B) w budowie kariotypu tetra- i oktoploidów. Uzyskane dane wskazują jednak, że badana linia oktoploidalna (20633) jest najbardziej ze wszystkich zbliżona do linii heksaploidalnej (PG438).



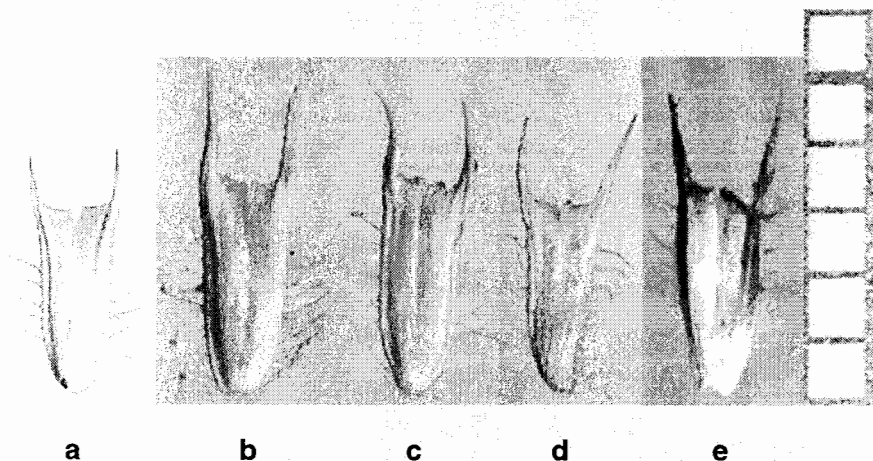
Rys. 2. Barwione metodą prążków C chromosomy metafazowe sześciu linii tymotki łąkowej – *Phleum pratense* s.l.: a) diploid 43968 –  $2n = 14$ , b) tetraploid F488 –  $2n = 28$ , c) tetraploid 58702, d) tetraploid H677, e) heksaploid PG438 –  $2n = 42$ , d) oktoploid 20633 –  $2n = 56$   
Podziałka:  $5 \mu\text{m}$

Fig. 2. C-banded metaphase chromosomes of six lines of timothy – *Phleum pratense* s.l.: a) diploid 43968 –  $2n = 14$ , b) tetraploid F488 –  $2n = 28$ , c) tetraploid 58702, d) tetraploid H677, e) hexaploid PG438 –  $2n = 42$ , d) octoploid 20633 –  $2n = 56$   
Scale:  $5 \mu\text{m}$



Rys. 3. Zawartość poszczególnych rodzajów heterochromatyny w kariotypie sześciu linii tymotki łąkowej – *Phleum pratense* s.l. Obok słupków podano procentowy udział każdego z rodzajów heterochromatyny w budowie kariotypu

Fig. 3. The contents of particular kinds of heterochromatin in the karyotype of six timothy – *Phleum pratense* s.l. lines. Next to the barbs there is proportional participation of each kind of heterochromatin in the karyotype construction



Rys. 4. Morfologia plew u pięciu linii tymotki łąkowej – *Phleum pratense* s.l.: a) diploid 43968, b) tetraploid F488, c) tetraploid 58702, d) tetraploid H677, e) heksaploid PG438  
Podziałka: 6 mm

Fig. 4. Morphology of glumes in five lines of timothy – *Phleum pratense* s.l.: a) diploid 43968, b) tetraploid F488 c) tetraploid 58702, d) tetraploid H677, e) hexaploid PG438  
Scale: 6 mm

Wstępne pomiary zawartości jądrowego DNA oraz badania molekularne z zastosowaniem techniki ISSR (ang. inter simple sequence repeat; Joachimiak i in., dane niepublikowane) [IDZIK 2002] wskazują, że badane przez nas linie tetraploidalne są autopoliploidalne (struktura genomowa: AAAA). Weryfikacja uzyskanych wyników możliwa będzie jednak dopiero po wykonaniu szczegółowej analizy kariotypu i dokładnych badań molekularnych.

## Wnioski

Prezentowane badania wskazują na bardzo bliskie pokrewieństwo wszystkich czterech ( $2n = 2x, 4x, 6x, 8x$ ) badanych cytotypów *P. pratense* s.l. oraz na duży udział diploidalnego *P. nodosum* w ich powstaniu. Ze wstępnych obserwacji wynika, że badane tetraploidy mogą mieć pochodzenie autotetraploidalne. Sugeruje to, że najpospolitsza i najszerzej uprawiana, heksaploidalna (AAAABB) forma tymotki łąkowej powstała ze skrzyżowania pochodzącego od *P. nodosum* autotetraploida (AAAA) z diploidalnym *P. rhaeticum* (BB) i podwojenia jego chromosomów. Udział genomów A (*nodosum*) i B (*rhaeticum*) w budowie kariotypu oktoploidów nie został ustalony.

## 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.
- CAI Q., BULLEN M.R. 1994. *Analysis of genome-specific sequences in Phleum species: identification and use for study of genomic relationships.* Theor. Appl. Genet. 88: 831–837.
- CASLER M.D. 2001. *Patterns of variation in a collection of timothy accessions.* Crop Sci. 41: 1616–1624.
- CENCI C.A., PEGIATI M.T., FALISTOCCO E. 1984. *Phleum pratense (Gramineae): chromosomal and biometrical analysis of Italian populations.* Willdenowia 14: 343–353.
- GREGOR J. W., SANSOME F. 1930. *Experiments on the genetics wild populations. II. Phleum pratense L. and the P. pratense L. x P. alpinum L.* J. Genet. 22: 373–387.
- IDZIK I. 2002. *Wykrywanie markerów molekularnych DNA u wybranych gatunków rodzaju Phleum.* Praca magisterska wykonana w Zespole Cytogenetyki Katedry Hodowli Roślin i Nasiennictwa AR w Krakowie.
- JOACHIMIAK A., KULA A. 1993. *Cytotaxonomy and karyotype evolution in Phleum sect. Phleum (Poaceae) in Poland.* Pl. Syst. Evol. 188: 17–30.
- JOACHIMIAK A., KULA A. 1996. *Karyosystematics of the Phleum alpinum polyploid complex. (Poaceae).* Pl. Sys. Evol. 203: 11–25.
- JOACHIMIAK A., KULA A. 1997. *Systematics and karyology of the section Phleum in the genus Phleum.* J. Appl. Genet. 38(4): 463–470.

- JOACHIMIAK A., KŁOS J., KULA A., STEWART A. 2002. Długość aparatów szparkowych u czterech cytotypów *Phleum* z kolekcji nowozelandzkiej. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 488: 267–272.
- JOUVE N., DIEZ N., RODRIGUEZ M. 1980. C-banding in 6x-Triticale x *Secale cereale* L. hybrid cytogenetics. Theor. Appl. Genetics 57: 75–79.
- MÜNTZING A. 1935. Cytogenetic studies on hybrids between two *Phleum* species. Hereditas 20: 103–136.
- MÜNTZING A. 1938. Note on heteroploid twin plants from eleven genera. Hereditas 24: 487–491.
- MÜNTZING A., PRAKKEN R. 1940. The mode of chromosome pairing in *Phleum* twins with 63 chromosomes and its cytogenetic consequences. Hereditas 26: 463–501.
- NORDENSKIÖLD H. 1937. Intra – and interspecific hybrids of *Phleum pratense* and *P. alpinum*. Hereditas 23: 304–316.
- NORDENSKIÖLD H. 1941. Cytological studies in triploid *Phleum*. Bot. Not.: 12–32.
- NORDENSKIÖLD H. 1945. Cytogenetic studies in the genus *Phleum*. Acta Agr. Suecana 1: 1–137.
- NORDENSKIÖLD H. 1949. Synthesis of *Phleum pratense* L. from *P. nodosum* L. Hereditas 35: 190–202.
- NORDENSKIÖLD H. 1953. A genetical study of the mode of segregation in hexaploid *Phleum pratense*. Hereditas 39: 469–488.
- NORDENSKIÖLD H. 1957. Segregation ratios in progenies of hybrids between natural and synthesized *Phleum pratense*. Hereditas 43: 525–540.
- NORDENSKIÖLD H. 1960. The mode of segregation in a family of hexaploid *Phleum pratense*. Hereditas 46: 504–510.

**Słowa kluczowe:** *Phleum pratense*, poliploidalność, cytotypy, heterochromatyna

### Streszczenie

W prezentowanej pracy zbadano udział różnych rodzajów heterochromatyny w kariotypie czterech cytotypów *Phleum pratense* s.l. tworzących szereg poliploidalny od di- do oktoploidalnego. Badane cytotypy pochodzą z obszaru Morza Śródziemnego i od kilku lat hodowane są przez jednego z autorów (A. Stewart) w stacji hodowlanej Pyne Gould Guinness Ltd w Nowej Zelandii.

U wszystkich badanych cytotypów stwierdzono ten sam telomeryczny typ dystrybucji heterochromatyny z niewielkim udziałem heterochromatyny centromerowej i interkalarniej. Prezentowane wyniki oraz dane niepublikowane (badania cytofotometryczne, badania DNA metodą ISSR) wskazują na bliskie pokrewieństwo wszystkich analizowanych form oraz na to, iż formy tetraploidalne są autopoliploidalne.

## HETEROCHROMATIN IN KARYOTYPE OF SIX *Phleum* LINES FROM NEW ZEALAND'S COLLECTION

Adam Kula<sup>1</sup>, Andrzej Joachimiak<sup>2</sup>, Joanna Kłos<sup>1</sup>, Alan Stewart<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Cytogenetics Group in the Department of Plant Breeding and Seed Science,  
Agricultural University, Kraków

<sup>2</sup> Department of Plant Cytology and Embryology, Institute of Botany,  
Jagiellonian University, Kraków

<sup>3</sup> Pyne Gould Guinness Ltd, P. O. Box 3100, Christchurch 8015, New Zealand

Key words: *Phleum pratense*, ploidy level, cytotypes, heterochromatin

### Summary

Contribution of different kinds of heterochromatin was examined in the karyotype of four cytotypes of *Phleum pratense* s.l. (from di- to octoploid). The investigated cytotypes originated from the Mediterranean area and they have been bred for several years by one of the authors (A. Stewart) at the Breeding Station Pyne Gould Guinness in New Zealand.

The same telomeric type of heterochromatin distribution was found in all the investigated cytotypes. Additionally, small amount of centromeric and intercalary heterochromatin was detected. The presented results and unpublished data (cytophotometric DNA measurements and ISSR studies) indicate close affinity among all the examined forms and show that tetraploidal forms are autopolyploids.

Dr Adam Kula  
Zespół Cytogenetyki  
Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja  
ul. Łobzowska 24  
31-140 KRAKÓW  
e-mail: rrkula@cyf-kr.edu.pl