

WOJCIECH RYBIŃSKI**JAN BOCIANOWSKI**¹

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

¹ Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Akademia Rolnicza w Poznaniu

Zmienność cech ilościowych roślin lędwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) pokolenia M₁ uzyskanego działaniem chemomutagenów

Variability of quantitative traits in grasspea (*Lathyrus sativus* L.) M₁ progeny obtained by seed treatment with chemomutagens

Celem badań była ocena reakcji krajowych odmian na działanie dwóch chemomutagenów i określenie korzystnych kombinacji do ich użytecznego wykorzystania w mutageniezie lędwianu siewnego. Nasiona krajowych odmian lędwianu siewnego — Derek i Krab traktowano dwoma chemomutagenami — N-nitroso-N-metylomocznikiem (MNU) oraz azydkiem sodu (AS) wykorzystując w tym celu traktowania pojedyncze (wyłącznie MNU lub AS) oraz traktowania łączone — AS + MNU i MNU + AS, przy zróżnicowanych dawkach poszczególnych mutagenów. U roślin pokolenia M₁ i roślin kombinacji kontrolnej (bez traktowania mutagenami) analizowano wysokość roślin, liczbę rozgałęzień i parametry struktury plonu. Stwierdzono, że zastosowane mutageny i ich kombinacje obniżały wartości badanych cech (z wyjątkiem wysokości roślin), a uzyskane wyniki zależne były od materiału wyjściowego, analizowanej cechy, rodzaju mutagenu, ich dawek oraz zastosowanych kombinacji. Wykazano, że MNU w porównaniu z AS wywoływał wysoki poziom uszkodzeń somatycznych a szkodliwość somatyczna kombinacji łączonych (mniejsza zwłaszcza dla MNU + AS w porównaniu z S.A. + MNU) i zastosowanie dwóch mutagenów o odmiennym wpływie na rodzaj indukowanych mutacji sugeruje ich większą przydatność do indukowania mutacji u lędwianu siewnego. Ponadto odmiana Derek w porównaniu z odmianą Krab charakteryzowała się większą wrażliwością na zastosowane mutageny i ich kombinacje.

Słowa kluczowe: lędwian siewny, mutageny, pokolenie M₁, struktura plonu, uszkodzenia somatyczne

The aim of the study was to estimate susceptibility of Polish grasspea cultivars Derek and Krab to the effects of two chemomutagens, and to determine the suitable combination of mutagens to be used in grasspea mutagenesis. The grasspea seeds were treated with two chemomutagens: N-nitroso-N-methylurea (MNU) and sodium azide (SA) with either of the mutagens alone and in combinations: SA followed by MNU or MNU followed by SA, using different mutagen doses. For M₁ progeny and control (non-treated) plants the plant height, number of lateral branches and yield structure were evaluated. The results of treatment indicate that chemomutagens applied alone or in combinations caused the decrease in value of the analyzed traits except the plant height. A rate of decrease depended on the initial form used, analyzed trait, kind and dose of mutagen, and the combination applied. Plants of cv. Derek,

compared to those of cv. Krab, were found to be more susceptible to treatment with mutagens. Somatic injuries induced by MNU were more serious than those caused by SA, and the effects of treatment with the combination SA + MNU were more harmful than those caused by the combination MNU + SA. It may be concluded from the results obtained that to induce a desirable mutation in grasspea, the combination of two reagents acting in a different way in the process of mutagenesis is most effective.

Key words: grasspea, mutagens, M₁ progeny, somatic injuries, yield structure

WSTĘP

Mutacje i rekombinacje to dwa główne źródła zwiększania zakresu zmienności genetycznej. Otrzymywanie mutantów po działaniu czynników mutagenicznych przyspiesza, a nawet poszerza zmienność dając możliwość uzyskania zmian niewystępujących w przyrodzie lub pojawiających się rzadko. We wszystkich przypadkach, gdy brak naturalnej zmienności i gdy nie można spodziewać się postępu w określonych cechach na skutek rekombinacji sięgnięcie po metodę indukowania mutacji przynosi pozytywne rezultaty (Sawicka, 1993). Wg danych FAO/IAEA (Małuszyński i in., 2000) liczba odmian mutacyjnych w roku 2000 wynosiła już 2250, spośród których 552 odmiany stanowiły rośliny ozdobne a 1770 odmiany roślin uprawnych. Odmiany te zarejestrowano w 50 krajach świata, głównie w Azji (Ahloovalia i Małuszyński, 2001; Ahloovalia i in., 2004). Mimo dominującej pozycji zbóż w grupie odmian roślin uprawnych (1072 odmiany) liczba odmian mutacyjnych w grupie roślin strączkowych jest znaczna i wynosi 311 odmian z przeważającą liczbą odmian grochu. Niestety, lędwian siewny zajmuje tu marginalną pozycję a dotąd zarejestrowano tylko jedną odmianę mutacyjną Poltavskaya (Rosja), po działaniu chemomutagenu ENH. Odmiana ta wyróżnia się wysoką tolerancją na suszę.

Szczególne znaczenie indukowania mutacji występuje w hodowli gatunków odznaczających się wąskim zakresem zmienności naturalnej. Dotyczy to między innymi lędwianu siewnego. Dla szerszego wprowadzenia tego gatunku do krajowego rolnictwa, mimo niewątpliwych zalet tej rośliny (unikalna odporność na suszę, możliwość uprawy na glebach klasy V a nawet VI, odporność na choroby, wysoka zawartością białka i korzystny skład kwasów tłuszczowych zbliżony do soi), należy między innymi poprawić szereg niekorzystnych cech. Jest to jednak ograniczone wąską pulą genów reprezentowanych w Polsce przez dobrze zaadaptowane do środowiska, nieliczne populacje miejscowe na Podlasiu. Stąd poszerzenie zmienności genetycznej cech poprzez krzyżowanie a zwłaszcza mutacje (Campbell i in., 1994; Ali M. Abd i in., 2000; Waghmare i Mehra, 2000; Rybiński i Pokora, 2002; Rybiński, 2003; Rybiński i Starzycki 2004) jest niewątpliwie jednym z warunków uzyskania istotnego postępu hodowlanego.

Celem badań była ocena reakcji krajowych odmian na działanie dwóch chemomutagenów i określenie korzystnych kombinacji do ich utylitarne wykorzystania w mutagenezie lędwianu siewnego.

MATERIAŁ I METODY

Nasiona krajowych odmian lędwianu siewnego — Derek i Krab traktowano dwoma chemomutagenami — N-nitroso-N-metylomocznikiem (MNU) oraz azydkiem sodu (AS)

w dawkach: 4mM dla AS oraz 0,8; 1,0 i 1,2 mM dla MNU. Nasiona, przed traktowaniem mutagenicznym, moczoło w wodzie destylowanej przez 10 godzin, następnie umieszczano je w roztworze mutagenu w wyżej wspomnianych stężeniach przez trzy godziny. Oprócz wspomnianych powyżej traktowań pojedynczych (MNU lub AS) stosowano również traktowania łączone — MNU + AS i AS + MNU w różnych kombinacjach dawek mutagenów. W powyższych traktowaniach nasiona zanurzano najpierw w roztworze MNU na 3 godziny, a następnie również przez 3 godziny w roztworze AS. W kombinacji AS + MNU postępowano odwrotnie. Nasiona poddane traktowaniom mutagenicznym, jak i bez traktowań (kontrola) wysiewano na poletka w doświadczeniu bloków losowanych w trzech powtórzeniach w rozstawie 30 × 15 cm. Uzyskane rośliny pokolenia M_1 oraz rośliny kombinacji kontrolnej analizowano pod względem wysokości roślin, liczby rozgałęzień z rośliny, liczby strąków z rośliny, liczby nasion ze strąka pędu głównego oraz liczby i masy nasion z rośliny. Ocenę wyżej wspomnianych cech prowadzono na 15 roślinach z każdego powtórzenia. Wyniki poddano ocenie statystycznej przeprowadzając dwuczynnikową analizę wariancji (odmiany × kombinacje) w odniesieniu do poszczególnych cech.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki uzyskane z dwuczynnikowej analizy wariancji wykazały istotny (na poziomie $\alpha = 0,001$) wpływ interakcji odmiany × kombinacje na wartości wszystkich badanych cech ilościowych. Podobnie silnie istotny wpływ na wartości wszystkich sześciu cech wykazywały kombinacje mutagenów. Natomiast odmiany charakteryzowały się nieistotnym wpływem jedynie na liczbę strąków z rośliny oraz masę nasion z rośliny (tab. 1).

Wartości średnich analizowanych cech dla formy kontrolnej i kombinacji z mutagenami przedstawiono w tabeli 2. Wskazują one, że w porównaniu z kontrolą, zarówno MNU, jak i AS w traktowaniach pojedynczych, jak i łączonych (AS + MNU i MNU + AS) wpływały na obniżenie wartości badanych cech z wyjątkiem wysokości roślin. Uzyskane wyniki zależne były nie tylko od genotypu wyjściowego i rodzaju analizowanej cechy, ale również od dawek mutagenów i ich wzajemnych kombinacji. Kombinacje będące wynikiem pojedynczych traktowań — 4 mM AS oraz trzech dawek MNU wskazują, w porównaniu z kontrolą (dla obu odmian) istotnie mniejsze wartości badanych cech. Obniżenie wartości cech w porównaniu z kontrolą było mniejsze dla azydku sodu, a większe dla MNU, przy czym redukcja wartości badanych cech wzrastała w miarę stosowania wyższych dawek MNU. Niewątpliwie interesującym jest tu większa wrażliwość odmiany Derek na zastosowane mutageny. Stosując traktowania łączone również obserwowano wyłącznie obniżenie wartości cech w stosunku do kontroli, przy czym redukcje wartości cech były z reguły wyższe niż przy traktowaniach pojedynczych.

Tabela 1

Średnie kwadraty z dwuczynnikowej analizy wariancji badanych cech dla roślin pokolenia M₁ i ich form wyjściowych

Mean squares from two-way analysis of variance for analyzed traits in M₁ progeny and initial forms

Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Cechy — Traits					
		wysokość roślin plant height	liczba rozgałęzień number of branches per plant	liczba strąków z rośliny pod number per plant	liczba nasion ze strąka seed number per pod	liczba nasion z rośliny seed number per plant	masa nasion z rośliny seed weight per plant
Bloki Blocks	2	72,02	0,07	8,16	0,01	128,5	2,33
Odmiana Cultivar	1	2540,76***	18,24***	84,32	0,27***	4318,1***	0,67
Kombinacja Combination	10	322,25***	5,26***	3626,17***	4,08***	40301,2***	341,71***
Odmiana × Kombinacja Cultivar × Combination	10	180,02***	2,57***	314,45***	0,23***	4029,7***	9,41***
Błąd Residual	42	28,42	0,53	24,46	0,02	154,5	0,59

*** Istotne na poziomie p = 0,001; *** Significant at p = 0.001

Tabela 2

Średnie wartości badanych cech po działaniu chemomutagenów - MNU i AS dla roślin pokolenia M₁ i ich form wyjściowych

Mean values for the analyzed traits in M₁ progeny and initial forms after mutagenic treatment with MNU and As

Kombinacje Combinations	Cechy — Traits											
	wysokość roślin plant height (cm)		liczba rozgałęzień number of branches per plant		liczba strąków z rośliny pod number per plant		liczba nasion ze strąka pędu głównego seed number per pod of main stem		liczba nasion z rośliny seed number per plant		masa nasion z rośliny seed weight per plant (g)	
	Krab	Derek	Krab	Derek	Krab	Derek	Krab	Derek	Krab	Derek	Krab	Derek
Kontrola Control	103,5	99,6	9,2	8,2	80,9	110,7	2,89	3,91	204,8	366,2	23,87	28,83
4 mM AS	119,5	106,6	6,6	7,2	46,3	66,5	2,12	2,42	60,4	114,7	8,17	11,23
0,8 mM MNU	106,5	97,0	6,8	6,9	49,8	34,0	1,79	1,73	50,8	32,4	7,53	3,29
1,0 mM MNU	108,2	107,6	7,3	5,4	40,9	22,3	1,67	1,17	34,2	14,7	4,50	1,45
1,2 mM MNU	124,0	96,5	7,5	4,5	25,2	18,4	1,17	1,09	17,6	13,7	2,40	1,45
AS + 0,8 MNU	133,4	111,5	6,2	5,1	18,4	22,9	0,97	0,92	12,4	13,6	1,60	1,09
AS + 1,0 MNU	122,8	96,6	7,5	5,4	18,3	12,4	0,82	0,73	10,7	9,8	1,41	0,82
AS + 1,2 MNU	112,7	98,8	5,1	5,6	7,6	10,1	0,39	0,39	3,7	3,9	0,47	0,34
0,8 MNU + AS	116,9	125,9	7,4	7,9	18,5	30,5	1,16	1,39	18,8	19,2	2,62	2,05
1,0 MNU + AS	126,9	113,5	7,4	5,5	21,8	24,8	1,02	1,25	14,9	16,6	1,81	1,68
1,2 MNU + AS	118,7	103,3	7,5	5,2	21,5	21,1	0,84	1,26	14,1	15,8	1,79	1,70
NIR _{0,001}	16,39	17,72	2,19	2,21	15,64	14,49	0,37	0,38	30,37	44,91	2,70	2,36
LSD _{0,001}												

Pośród kombinacji łączonych AS + MNU silniej redukowała wartości cech aniżeli kombinacja MNU + AS. Podobny efekt „ochronnego” wpływu azydku sodu na poziom uszkodzeń somatycznych wywołanych wcześniejszym działaniem MNU obserwowano także u jęczmienia (Rybiński i Patyna, 1983). Stąd w pracach nad indukowaniem mutacji korzystniejsze jest stosowanie kombinacji MNU + AS w mniejszym stopniu redukującej płodność roślin pokolenia M_1 w porównaniu z kombinacją odwrotną. Na celowość stosowania kombinacji mutagenów w porównaniu z traktowaniami pojedynczymi wskazują badania nad lędźwianem prowadzone przez Singh i Chaturvedi (1987) oraz Kumar i Dubey (1998 a). Stosując oddzielne traktowania nasion przez promieniowanie gamma oraz EMS, jak i traktowania łączone obydwoma mutagenicznymi czynnikami oceniano kiełkowanie nasion lędźwianu, wzrost roślin, płodność oraz plon nasion a uzyskane wyniki potwierdziły efektywny wpływ traktowań łączonych na zmienność analizowanych cech (Kumar i Dubey, 1998 b).

WNIOSKI

1. W porównaniu z kontrolą MNU i AS indukowały wysoki poziom uszkodzeń somatycznych w pokoleniu M_1 wyrażonych redukcją wartości badanych cech, a MNU w tym względzie był bardziej efektywny aniżeli AS.
2. Mniejsza szkodliwość somatyczna kombinacji łączonych typu MNU + AS w porównaniu z AS + MNU i zastosowanie dwóch mutagenów o odmiennym wpływie na rodzaj indukowanych mutacji sugeruje większą przydatność kombinacji typu MNU + AS do indukowania mutacji u lędźwianu siewnego.
3. Odmiana Derek charakteryzowała się większą wrażliwością na zastosowane mutageny i ich kombinacje w porównaniu z odmianą Krab. Wynik ten dowodzi znaczenia właściwego wyboru materiału wyjściowego do traktowań mutagenicznych.

LITERATURA

- Ahloowalia B. S., Małuszyński M. 2001. Induced mutations — A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167 — 173.
- Ahloowalia B. S., Małuszyński M., Nichterlein K. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135: 187 — 204.
- Ali M. Abd El-Moneim B., Dorrestein M., Mulugeta W. 2000. Improving the nutritional quality and yield potential of grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Food. Nutri. Bull.* 21 (4): 493 — 496.
- Campbell C. G., Mehra R. J., Agrawal S. K., Chen Y. Z., El Moneim B., Khawaja H. I. T., Yadov C. R., Tay J. U., Araya W. A. 1994. Current status and future strategy in breeding grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Euphytica* 37: 167 — 175.
- Kumar S., Dubey D. K. 1998 a. Influence of separate and simultaneous application of gamma rays, DES and EMS in Khesari (*Lathyrus sativus* L.). *J. Genetics and Breeding* 52 (4): 295 — 300.
- Kumar S., Dubey D. K. 1998 b. Effect of separate and simultaneous application of gamma rays and EMS on germination, growth, fertility and yield in cultivars Nirmal and LSD-3 of Khesari (*Lathyrus sativus* L.). *J. Phytological Research* 11 (2): 165 — 170.
- Małuszyński M., Nichterlein K., Van Zanten L., Ahloowalia S. 2000. Officially released mutant varieties — the FAO/IAEA database. *Mutation Breeding* 12: 1 — 84.
- Rybiński W., Patyna H. 1983. Wpływ zróżnicowanych dawek azydku sodu i MNU na poziom uszkodzeń somatycznych i częstotliwość mutacji u jęczmienia jarego *Biul. IHAR* 27 (1): 59 — 68.

- Rybiński W., Pokora L. 2002. Wpływ światła lasera helowo-neonowego i chemomutagenu (MNU) na zmienność cech lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) w pokoleniu M₁. Acta Agrophysica 62: 127 — 134.
- Rybiński W. 2003. Mutagenesis as a tool for improvement of traits in grasspea (*Lathyrus sativus* L.). Lathyrus Lathyrism Newsletter 3: 27 — 31.
- Rybiński W., Starzycki M. 2004. Ocena zmienności genetycznej cech mutantów lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.). Zesz. Prob. Post. Nauk Roln. 497: 539 — 550.
- Sawicka E. J. 1993. Indukowane mutacje u łubinu andyjskiego (*Lupinus mutabilis* Sweet.). Prace Ogrodu Botanicznego PAN. Seria: Rozprawy i Monografie, Zesz. 3: 1 — 102.
- Singh M., Chaturvedi S. N. 1987. Effectiveness and efficiency of mutagen alone or in combination with dimethyl sulphoxide in *Lathyrus sativus*. J. of Agric. Sci. 57: 503 — 507.
- Waghmare V. N., Mehra R. B. 2000. Induced mutations in grasspea (*Lathyrus sativus* L.). Lathyrus Lathyrism Newsletter 1: 21 — 24.