

WOJCIECH RYBIŃSKI**TADEUSZ ADAMSKI****MARIA SURMA**

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Zmienność dwu- i sześciorzędowych linii DH jęczmienia jarego pod względem cech struktury plonu

The variability of two- and six-rowed DH lines of spring barley for yield structure parameters

Obiektem badań były dwu- i sześciorzędowe linie DH jęczmienia jarego uzyskane w metodzie bulbosowej z mieszańców pokolenia F₂ z wykorzystaniem traktowania ziarniaków światłem lasera i chemomutagenu — MNU. Linie DH bez powyższych traktowań stanowiły kombinację kontrolną. Analiza struktury plonu uzyskanych linii z doświadczeń polowych przeprowadzonych w trzech kolejnych latach wskazuje na szerszy zakres wartości skrajnych, wyższy współczynnik zmienności oraz istotnie wyższą wariancję w grupie linii DH z traktowaniem niż bez. Wskazuje to na większą zmienność genetyczną badanych cech dla linii DH uzyskanych z traktowań mutagennych i światłem lasera oraz wystąpienie dodatkowej zmienności, której źródłem był zastosowany mutagen.

Słowa kluczowe: chemomutagen, jęczmień jary, laser, linie DH, struktura plonu, zmienność genetyczna

The object for the performed studies constituted two- and six- rowed DH lines of barley obtained from F₂ progeny with the use of *Hordeum bulbosum* method. Before haploid productions the grains were treated with laser light and chemomutagen — MNU. The lines obtained without treatment constituted the control combination. The analysis of yield structure parameters from three years field trails indicated that extreme values, coefficient of variability and variance were higher for the DH lines derived from the mutagenic treatment. It indicates on broader genetic variability of traits in DH lines with the treatment and appearance of additional variability as result of chemomutagen activity.

Key words: chemomutagen, DH lines, genetic variability, laser, spring barley, yield structure

WSTĘP

W wyniku krzyżowania niektórych gatunków w rozwijającym się zarodku następuje eliminacja chromosomów jednej z form rodzicielskich. Szczególnie interesujące są te kombinacje, w których eliminacja chromosomów jednej z form jest całkowita, ponieważ

daje to możliwość uzyskania form haploidalnych tego gatunku, którego chromosomy nie są eliminowane (Surma, 1997).

Prowadząc prace hodowlane szczególne znaczenie mają te kombinacje krzyżowań *Hordeum bulbosum* z innymi gatunkami, gdzie dochodzi do eliminacji gatunku dzikiego. Krzyżowanie *H. vulgare* z *H. bulbosum* umożliwiło uzyskanie stosunkowo wysokiej częstotliwości występowania haploidów jęczmienia (Kasha i Kao, 1970), co z powodzeniem wykorzystuje się do dzisiaj w praktyce do uzyskiwania dihaploidalnych linii jęczmienia.

Jednym z najczęściej wykorzystywanych materiałów wyjściowych do uzyskiwania linii DH w metodzie bulbosowej są mieszańce jęczmienia, głównie z uwagi na fakt, że w krótkim czasie z dowolnej formy heterozygotycznej uzyskiwać można formę całkowicie homozygotyczną. Oprócz utrwalenia efektu rekombinacji w systemie DH, interesujące jest włącznie w proces haploidyacji zmienności mutacyjnej. Coraz częściej do generowania zmienności genetycznej w systemie DH stosuje się traktowania mutagenne z wykorzystaniem różnych źródeł promieniowania lub chemomutagenów (Chen, 1986; Beversdorf i Kott, 1987; Zapata i Aldemita, 1989; Swanson i in., 1989; Umba Di-Umba i in., 1991; Laib i in., 1996).

Donorem mutacji mogą być naświetlane promieniami gamma pylniki i mikrospory (Szarejko i in., 1991; Laib i in., 1996). Jako bardzo efektywnego donora mutacji w tej metodzie wykorzystywać można również rośliny M_1 , gdzie mutagennemu traktowaniu poddaje się ziarniaki (Umba Di-Umba i in., 1991). W zastosowanej przez nas metodzie bulbosowej donorem mutacji były rośliny pokolenia M_1 . Koncepcja dodatkowego naświetlania ziarniaków światłem lasera miała na celu zwiększenie liczby osadzanych ziarniaków po krzyżowaniu z *H. bulbosum* oraz wzrost liczby uzyskiwanych haploidów. Obecnie biostymulujące właściwości lasera z powodzeniem wykorzystuje się do przedsiwiewnego traktowania nasion (Podleśny, 1997; Drozd i in., 1999) oraz w kulturach *in vitro* (Rybiński, 1998; Rybiński i in., 2001).

Z uwagi na fakt, że materiałem wyjściowym do traktowania mutagenem były mieszańce jęczmienia pokolenia F_2 , można oczekiwać, że u uzyskanych linii DH zmienności rekombinacyjnej towarzyszyć może zmienność mutacyjna. Celem badań było określenie zmienności genetycznej cech struktury plonu u linii DH uzyskanych z traktowań mutagenem w porównaniu z liniami otrzymanymi bez wykorzystania mutagenu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał wyjściowy do uzyskanych linii DH jęczmienia stanowiły mieszańce F_2 otrzymane z krzyżowania dwurzędowej odmiany Maresi z odmianą sześciorzędową Klimek. Nasiona mieszańców przed krzyżowaniem z *Hordeum bulbosum* traktowano biostymulującą dawką światła lasera helowo-neonowego oraz mutagenem N-nitroso-N-metylomocznikiem (MNU) w stężeniu 0,9 mM przez 3 godziny. Uzyskane niedojrzałe zarodki hodowano dalej w kulturze *in vitro* aż do uzyskania roślin haploidalnych. Linie DH pochodzące z kombinacji bez traktowania stanowiły formę kontrolną.

Po rozmnożeniu uzyskanych dwu- i sześciorzędowych linii DH, w roku 1998 wysiewano je w doświadczeniu polowym założonym metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach. Doświadczenia kontynuowano w dwu kolejnych latach. Analizowano wysokość roślin oraz cechy struktury plonu w odniesieniu do długości kłosa, liczby i masy ziaren w kłosie oraz masy 1000 ziaren. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie dla każdego roku badań i łącznie za okres trzech kolejnych lat określając średnie, wartości skrajne oraz wartości współczynnika zmienności. Porównanie między grupami linii DH dwu- i sześciorzędowych oraz liniami a formami rodzicielskimi prowadzono poprzez ocenę i testowanie kontrastów (Caliński i Kaczmarek, 1973).

WYNIKI

Wartości średnie, wartości skrajne oraz wielkość współczynnika zmienności podano w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka statystyczna dwu- i sześciorzędowych linii DH jęczmienia jarego
Statistical characteristics of two- and six- rowed barley DH lines

Linie DH Lines	Średnia Mean			Wartości skrajne Extreme values			Współczynnik zmienności Coefficient of variation		
	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
wysokość roślin (cm) — plant height									
K2	53,6	58,9	51,2	44,0–77,0	49,0–81,0	42,0–74,0	10,9	9,7	10,7
K6	50,2	55,6	48,2	39,0–61,0	42,0–55,0	41,0–55,0	10,4	9,5	7,3
M2	54,4	60,1	51,9	28,0–80,0	33,0–88,0	32,0–75,0	17,7	17,9	15,6
M6	49,8	57,1	48,8	37,0–57,0	43,0–70,0	37,0–57,0	11,7	12,4	11,2
długość kłosa (cm) — spike length									
K2	7,5	9,3	8,8	6,4–8,9	8,1–10,8	7,1–10,9	5,9	7,0	8,4
K6	5,6	6,9	7,0	4,6–6,9	6,0–8,6	5,3–9,5	10,5	10,1	14,2
M2	7,9	9,2	9,2	5,6–9,5	6,8–11,5	7,5–11,4	9,5	9,3	7,5
M6	5,4	7,2	6,6	3,6–7,0	5,6–8,5	5,1–8,2	15,5	10,6	12,7
liczba ziaren z kłosa — grain number per spike									
K2	1,4	24,3	21,6	15,8–23,6	21,1–27,6	17,8–24,9	6,1	6,3	6,6
K6	35,7	42,3	45,3	26,6–45,0	30,2–53,0	34,4–59,8	14,6	14,7	13,9
M2	22,0	23,9	22,9	13,4–26,1	13,0–28,4	15,5–29,7	11,1	13,0	10,6
M6	35,8	45,8	42,8	20,8–43,3	38,6–59,0	32,8–54,6	16,4	12,4	12,8
masa ziaren z kłosa (g) — grain weight per spike									
K2	1,13	1,23	0,71	0,91–1,87	0,89–1,48	0,58–0,85	10,4	10,9	9,2
K6	1,35	1,56	1,06	1,04–1,68	1,21–2,07	0,80–1,48	12,3	15,8	15,9
M2	1,16	1,18	0,73	0,45–1,90	0,33–1,73	0,34–0,95	18,7	21,8	16,7
M6	1,54	1,96	1,15	0,97–1,87	1,33–2,60	0,86–1,63	15,7	18,8	18,0
masa 1000 ziaren (g) — weight of 1000 grains									
K2	51,6	50,8	33,2	46,2–56,5	42,1–59,6	28,9–37,4	4,7	7,6	6,3
K6	38,3	36,4	23,9	32,0–43,3	27,2–48,7	21,0–27,5	6,8	13,5	6,1
M2	52,2	49,6	32,5	33,7–59,9	25,8–64,6	19,9–42,7	13,4	15,7	13,6
M6	43,8	42,0	27,4	39,4–49,2	34,5–49,3	23,8–31,2	7,2	9,3	7,1

1*–3 — Lata badań; years of study

K2 i K6 — Linie 2- i 6-rzędowe kontrolne; 2- and 6-rowed control lines

M2 i M6 — Linie 2- i 6-rzędowe z traktowaniem mutagennym; 2- and 6-rowed lines with mutagenic treatment

Mimo obserwowanych różnic w wartościach badanych cech między latami badań, średnie wartości w grupach dwu- oraz sześciorzędowych linii DH z traktowaniem i bez traktowania (K2–M2 i K6–M6) w poszczególnych latach są zbliżone. Zaobserwować można jednak, że wartości średnich dla grup linii DH z traktowaniem są w większości wypadków wyższe aniżeli dla grup bez traktowania. Najniższe wartości średnich obserwowano dla trzeciego roku badań. Mimo że wartości średnich w poszczególnych latach w porównaniu grup linii DH z traktowaniem i bez były zbliżone, wartości skrajne wskazują na wystąpienie szerszej zmienności genetycznej dla grup DH z traktowaniem mutagenem. Na szczególną uwagę zasługuje grupa linii dwurzędowych z traktowaniem w odniesieniu do wysokości roślin. Oprócz wartości skrajnych, większą zmienność genetyczną cech w grupach linii z traktowaniem potwierdziła wartość współczynnika zmienności. Największą jego wartość dla linii dwurzędowych z traktowaniem (niezależnie od roku badań) uzyskano pod względem wysokości roślin i masy ziaren z kłosa.

Ocenę i wyniki testowania kontrastów między grupami linii DH dwu i sześciorzędowymi oraz liniami i formami rodzicielskimi dla badanych cech i lat łącznie przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Ocena i wyniki testowania kontrastów między grupami dwu- i sześciorzędowych linii DH jęczmienia oraz liniami a formami rodzicielskimi
Estimation and testing results of contrasts in comparison between two- and six rowed barley DH lines and their initial forms

Kontrast Contrast	Wysokość roślin (cm) Plant height		Długość kłosa (cm) Spike length		Liczba ziaren z kłosa No. of grains/spike		Masa ziaren z kłosa (g) Grains weight/spike		Masa 1000 ziaren (g) Weight of 1000 grains	
	ocena	F	ocena	F	ocena	F	ocena	F	ocena	F
K–M	-0,84	13,68	-0,16	14,42	-0,02	0,01	-0,06	27,88	-1,35	51,70
K2–K6	3,27	99,45	2,07	1097,20	-18,33	3533,07	-0,29	379,07	12,36	2113,23
M2–M6	3,54	91,5	2,39	1217,7	-18,56	2814,71	-0,53	943,00	6,95	520,25
K2–M2	-0,85	9,58	-0,22	20,12	-0,40	2,38	0,06	0,28	0,56	6,70
K6–M6	-0,56	1,90	0,16	4,57	-0,63	2,66	-0,22	141,3	-4,83	205,0
K2–Maresi	-6,05	40,34	-0,44	6,44	-1,45	2,64	-0,02	0,20	1,64	4,41
K6–Klimek	-2,22	5,21	-0,15	0,74	-3,64	15,90	-0,52	133,9	-8,63	117,4
M2–Maresi	-5,20	29,52	-0,21	1,51	-1,05	1,38	-0,03	0,36	1,07	1,87
M6–Klimek	-1,65	2,82	-0,31	3,04	-3,03	10,60	-0,29	41,67	-3,79	22,15
Maresi–Klimek	7,11	28,90	2,30	88,77	-20,52	273,00	-0,80	169,7	2,07	3,92

Wartości krytyczne $F_{0,05} = 3,86$; $F_{0,01} = 6,70$; critical values $F_{0,05} = 3,86$; $F_{0,01} = 6,70$

K i M — linie kontrolne i z traktowaniem MNU, control lines and those with MNU treatment

K2 i K6 — linie DH kontrolne 2- i 6-rzędowe, control DH lines 2- and 6-rowed

M2 i M6 — linie DH 2- i 6-rzędowe z traktowaniem MNU, 2- and 6-rowed DH lines with MNU treatment

Maresi i Klimek — 2- i 6-rzędowe formy wyjściowe, 2- and 6-rowed initial forms

Porównując linie dwurzędowe bez traktowania i z traktowaniem (K2–M2) istotną wartość kontrastu uzyskano dla wysokości roślin, długości kłosa oraz masy 1000 ziaren. W podobnych porównaniach, ale między formami sześciorzędowymi (K6–M6), istotną wartość kontrastu obserwowano dla długości kłosa, masy ziaren z kłosa oraz masy 1000 ziaren. Dla porównań między liniami dwurzędowymi (K2–M2) dla wysokości roślin i długości kłosa wartość kontrastu była ujemna i statystycznie istotna. Dodatnią i istotną

wartość kontrastu obserwowano dla masy 1000 ziaren. Pośród istotnych wartości kontrastu w porównaniach linii sześciorzędowych (K6–M6) ujemne wartości uzyskano dla masy ziaren z kłosa oraz masy 1000 ziaren.

Porównanie wariancji badanych cech w obrębie grup dwu- i sześciorzędowych pochodzących z traktowań i bez przedstawiono w tabeli 3. W porównaniach grup linii dwurzędowych, z wyjątkiem długości kłosa w trzecim roku badań linii uzyskanych po traktowaniu mutagenem była istotnie wyższa od wariancji linii otrzymanych bez traktowania. Tak jednoznacznej tendencji nie obserwowano w porównaniach grup linii sześciorzędowych.

Tabela 3

Porównanie wariancji badanych cech w obrębie grup dwu- i sześciorzędowych linii DH jęczmienia uzyskanych po traktowaniu mutagenem i bez traktowania
Comparison of variance of the analyzed traits for two- and six rowed DH lines obtained after mutagenic treatment and without treatment

Cechy Traits	Statystyka F F-statistic					
	M2–K2			M6–K6		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000
Wysokość roślin Plant height	2,69	3,52	2,19	1,26	1,89	2,38
Długość kłosa Spike length	2,80	1,77	0,88	2,03	1,12	0,68
Liczba ziaren z kłosa Grain number per spike	3,40	4,05	2,92	1,24	0,82	0,75
Masa ziaren z kłosa Grain weight per spike	3,32	3,61	3,36	2,08	2,21	2,08
Masa 1000 ziaren Weight of 1000 grains	8,16	4,04	4,40	1,45	1,02	1,85
Wartości krytyczne Critical values	$F_{0,05}$	1,49			1,83	
	$F_{0,01}$	1,74			2,33	

K2 i K6 — dwu- i sześciorzędowe kontrolne linie DH, two- and six-rowed control DH lines

M2 i M6 — dwu- i sześciorzędowe linie DH uzyskane z traktowania mutagenem, two- and six-rowed DH lines obtained after mutagenic treatment

DYSKUSJA

Podstawową korzyścią wynikającą z stosowania mutagenezy w systemie DH jest możliwość uzyskania zarówno dominujących jak i recesywnych mutacji już w pierwszym pokoleniu po traktowaniu mutagenem, z pominięciem negatywnego zjawiska chimeryzmu. Mimo tej niewątpliwej zalety, pewną trudność w porównaniu z klasyczną metodą uzyskiwania mutantów stanowi jej pracochłonność wynikająca z konieczności dysponowania znaczną liczebnością linii dihaploidalnych. Stąd niewątpliwie istotna jest możliwość wysoka efektywność zastosowanej metody haploidyacji. Dla przykładu w metodzie pylnikowej pylniki mogą być tak bardzo wrażliwe na promieniowanie gamma, że nawet niska dawka promieni silnie redukowała liczbę reagujących pylników i otrzymanych zielonych roślin (Laib i in., 1996). Jeśli donorem mutacji, jak w zastosowanej przez nas metodzie bulbosowej, jest roślina M_1 uzyskana z mutagennego traktowania ziarniaków,

plodność rośliny jest silnie redukowana przez występowanie uszkodzeń somatycznych wywołanych działaniem mutagenu. Krzyżowanie tego rodzaju roślin z *H. bulbosum* może rzutować na niską liczbę uzyskiwanych zarodków w stosunku do liczby zapylonych kwiatków. W celu zminimalizowania tego efektu (Rybiński, 1998) wykorzystaliśmy biostymulujące właściwości światła lasera helowo-neonowego naświetlając ziarniki przed traktowaniem mutagenem. Obecnie, w praktyce wykorzystuje się tę specyficzną właściwość światła lasera do przedświecowej biostymulacji nasion u różnych gatunków roślin (Koper, 1993; Koper, 1997). Wykorzystanie światła lasera umożliwiło wzrost efektywności metody bulbosowej, wyrażonej liczbą uzyskanych linii DH (Rybiński, 1998).

Z uwagi na fakt, że materiałem wyjściowym do indukowania mutacji w systemie DH były mieszańce jęczmienia w pokoleniu F₂, zmienności rekombinacyjnej może towarzyszyć zmienność mutacyjna. Jeśli uzyskano ten efekt, to zmienność genetyczna cech w liniach DH otrzymanych z traktowań mutagennych winna być większa aniżeli w liniach bez traktowania. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała szerszy zakres wartości skrajnych i wyższą wartość współczynnika zmienności dla linii DH uzyskanych przy działaniu mutagenu. Ponadto dla porównań grup linii DH z traktowaniem mutagenem i bez, dla większości cech w latach wariancja była istotnie wyższa. Wskazuje to na wystąpienie obok zmienności rekombinacyjnej, dodatkowej zmienności, której źródłem mógł być zastosowany mutagen. Połączenie obu rodzajów zmienności i uzyskanie form homozygotycznych jest podstawową zaletą zastosowanego systemu DH.

Otrzymane wyniki, zwłaszcza wartości skrajne, wskazują na wyraźne obniżenie wysokości roślin DH, pochodzących z traktowań mutagenem. Jak wskazują dane literaturowe (Rybiński, 1981; Rybiński i in., 2000) chemomutagen MNU z wysoką częstotliwością indukuje formy karłowe i półkarłowe. Pośród mutantów DH uzyskanych w metodzie pylnikowej jęczmienia, w spektrum mutacji również obserwowano znaczną ilość form o skróconej długości źdźbła (Umba Di-Umba i in., 1991; Laib i in., 1996).

WNIOSKI

1. Wartości skrajne dla badanych cech niezależnie od roku badań, wskazują na poszerzenie zmienności genetycznej cech struktury plonu w liniach DH, pochodzących z traktowania mutagenem i możliwość wyboru form DH przewyższających pod tym względem linie kontrolne.
2. Linie DH pochodzące z traktowań z mutagenem w porównaniu z liniami kontrolnymi charakteryzowały się wyraźnie skróconą długością źdźbła, co umożliwiło wybór form karłowych i półkarłowych.
3. Wyższe wartości współczynnika zmienności a zwłaszcza wariancja dla badanych cech w grupie linii DH pochodzących z traktowań mutagenem wskazują, że obok zmienności rekombinacyjnej wystąpiła dodatkowa zmienność mogąca wynikać z działania chemomutagenu.

LITERATURA

- Beversdorf D., Kott L. S. 1987. An *in vitro* mutagenesis/selection system for *Brassica napus*. Iowa State J. Res. 61: 435 — 443.
- Caliński T., Kaczmarek Z. 1973. Metody kompleksowej analizy doświadczenia wielocechowego. Trzecie Colloquium z Agrio-Biometrii, Warszawa, PAN: 256 — 320.
- Chen Y. 1986. The inheritance of rice pollen plant and its applications in crop improvement. Haploids of higher plants *in vitro*. China Academic Publishers, Beijing: 118 — 136.
- Drozd D., Szajsner H., Laszkiewicz E. 1999. Wykorzystanie biostymulacji laserowej w uprawie pszenicy jarej. Biul. IHAR 211: 85 — 90.
- Kasha K. J., Kao K. N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225: 874 — 876.
- Koper R. 1993. Pre-sowing laser biostimulation of seeds of cultivated plants and its results in agrotechnics. Proc. ICPP AM 5, Bonn 1993: 65.
- Koper R. 1997. Stymulacja laserowa nasion pomidorów. Owoce, Warzywa, Kwiaty 21: 16.
- Laib Y., Szarejko I., Polok K., Małuszyński M. 1996. Barley anther culture for doubled haploid mutant production. Mut. Breed. Newsletter 42: 13 — 15.
- Podleśny J. 1997. Wpływ przedsewnego traktowania nasion światłem laserowym na kształtowanie się cech morfologicznych i plonowanie bobiku. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 446: 435 — 439.
- Rybiński W. 1981. Short-strow forms of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) obtained as results of MNUA — induced mutations. Genet. Pol. 22: 271 — 278.
- Rybiński W. 1998. Wykorzystanie światła lasera w badaniach nad roślinami wyższymi. Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin. F. Dubert, M. Rapacz (red.), Kraków: 169 — 179.
- Rybiński W., Jeżowski S., Krajewski P. 2000. Analiza cech ilościowych warunkujących odporność na wyleganie i parametrów struktury plonu u mutantów jęczmienia jarego. Biul. IHAR 216: 229 — 235.
- Rybiński W., Surma M., Adamski T. 2001. Wykorzystanie światła lasera do uzyskiwania haploidów jęczmienia metodą *H. bulbosum*. Biotechnologia 1 (52): 143 — 147.
- Surma M. 1997. Wykorzystanie zjawiska eliminacji chromosomów w hodowli jęczmienia. Seminaria Wydziału Rolniczego, AR Poznań 3: 156 — 174.
- Swanson E. B., Herrgesell M. J., Arnoldo M., Sippell D. W., Wong R. S. C. 1989. Microspore mutagenesis and selection. Theor. Appl. Genet. 78: 525 — 530.
- Szarejko I., Małuszyński M., Polok K., Kiljan A. 1991. Doubled haploids in the mutation breeding of selected crops. Plant mutation breeding for crop improvement. Proceedings of a Symposium, Vienna 1990, IAEA: 355 — 378.
- Umba Di-Umba, Małuszyński M., Szarejko I., Zbieszczek J. 1991. High frequency of barley DH-mutants from M₁ after mutagenic treatment with MNU and sodium azide. Mut. Breed. Newsletter 38: 8 — 9.
- Zapata F. J., Aldemita R. R. 1989. Induced of salt tolerance in high-yielding rice varieties through mutagenesis and anther culture. Current options for cereal improvement. Małuszyński M. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 193 — 202.