

WOJCIECH RYBIŃSKI

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Analiza cech ilościowych u mutantów jęczmienia jarego uzyskanych przy wykorzystaniu metody *H. bulbosum*

The analysis of quantitative traits for spring barley mutants obtained with use of the *Hordeum bulbosum* method

Donorem mutacji były rośliny pokolenia M_1 uzyskane z dwu- i sześciorzędowej odmiany jęczmienia jarego a środkiem mutagennym którym traktowano ziarniaki był N-nitroso-N-metylomocznik (MNU). Rośliny M_1 krzyżowano z *Hordeum bulbosum*, a po 14 dniach niedojrzałe zarodki hodowano w kulturze *in vitro* doprowadzając do uzyskania roślin DH. Pośród uzyskanych roślin wybierano zmutowane formy które po rozmnożeniu były przedmiotem doświadczeń polowych i opracowań statystycznych. Przeprowadzona analiza statystyczna w okresie trzech kolejnych lat wykazała, że dla cech struktury plonu pod względem wartości średnich, wartości skrajnych i współczynnika zmienności zmutowane linie DH znacznie różniły od wartości uzyskanych dla form wyjściowych. Analizując wartości kontrastu między mutantami dwurzędowymi i dwurzędową odmianą Maresi najwyższe, statystycznie istotne wartości kontrastu uzyskano dla półkarłowatych mutantów M53 i M50. Mutanty te ponadto charakteryzowały się poprawioną odpornością na wyleganie i zbliżonym do formy wyjściowej terminem dojrzewania. Pośród mutantów sześciorzędowych najbardziej od odmiany Klimek pod względem badanych cech różniły się mutanty o skróconej długości źdźbła: M62 i M63.

Słowa kluczowe: *Hordeum bulbosum*, jęczmień jary, laser, linie DH, mutanty, N-nitroso-N-metylomocznik, parametry plonowania, zmienność cech

Seed of two barley cultivars: Maresi (two-rowed) and Klimek (six-rowed) was subjected to mutagenic treatment with N-nitroso-N-methylurea (MNU). The M_1 plants were crossed with *Hordeum bulbosum* and after 14 days the unripened embryos were cultured *in vitro* until DH plants were obtained. Among the plants mutant genotypes were selected, propagated and used in field experiments during three years. The statistical parameters (means, extremes, coefficients of variation) for the yield structure components showed significantly higher variability among the DH mutants as compared to their initial forms. In the group of two-rowed barleys, the highest significance contrasts between Maresi and its mutants were recorded for the semi-dwarf mutants M53 and M50. These forms were additionally more resistant to lodging and their ripening time was similar to the cultivar Maresi. Among the six-rowed forms, the most significant differences with the cultivar Klimek were found for the short-straw mutants M62 and M63.

Key words: DH lines, *Hordeum bulbosum*, laser, mutants, N-nitroso-N-methylurea, variability of traits, yield structure

WSTĘP

W celu zwiększenia częstotliwości mutacji punktowych środki mutagenne mogą być stosowane w różnych fazach kultur *in vitro* lub wykorzystuje się rośliny jako donora mutacji. Jedną z metod uzyskiwania mutantów DH jest wykorzystywanie roślin M_1 jako donora mutacji. Stosując chemomutageny: N-nitroso-N-metylomocznik (MNU) i azydek sodu (NaN_3) oraz wzajemne kombinacje obu mutagenów donorem mutacji w kulturach pylnikowych były rośliny uzyskane z mutagennego traktowania ziarniaków (Szarejko i in., 1991). Wysoką częstotliwość mutantów DH w metodzie pylnikowej obserwował Umba Di-Umba i wsp. (1991) gdzie także donorem mutacji były rośliny M_1 . Autorzy wskazują ponadto, że uzyskiwanie roślin DH z zmutowanych gamet może nie tylko skrócić cykl hodowlany jęczmienia, ale pozwala także pomóc w przezwyciężeniu występowania efektu chimeryzmu który zwykle powstaje jeśli mutagenne traktowanie prowadzone jest na wielokomórkowych strukturach w kulturze *in vitro*.

Oprócz metody pylnikowej, u jęczmienia linie DH uzyskiwać można stosując tzw. metodę bulbosową (Adamski i in., 1995; Surma, 1997). Tę właśnie metodę wykorzystano do generowania zmienności mutacyjnej w systemie DH. Podobnie jak w wyżej przedstawionych badaniach, donorem mutacji były rośliny M_1 (mutagenne traktowanie ziarniaków) krzyżowane dalej z *Hordeum bulbosum*.

Jednym z negatywnych efektów traktowań mutagennych jest wystąpienie u roślin pokolenia M_1 uszkodzeń somatycznych (Rybiński, 2001) redukujących między innymi płodność roślin, a w następstwie tego liczbę uzyskiwanych ziarniaków. W celu zminimalizowania wystąpienia tego efektu i uzyskania możliwie dużej liczby zarodków po krzyżowaniach z *Hordeum bulbosum*, ziarniaki przed traktowaniem mutagenem (MNU) dodatkowo naświetlano biostymulującą dawką światła lasera. Okazuje się, że światło lasera helowo-neonowego przy krótkich czasach ekspozycji ma właściwości biostymulujące (Rybiński i Pokora, 2002), co obecnie z powodzeniem wykorzystuje się dla podniesienia plonowania takich roślin, jak łubin (Podleśny, 1997), bobik (Podleśny, 1997), pszenica (Drozd i in., 1999), kukurydza (Gieroba i in., 1995) i jęczmień (Rybiński i in., 1993).

Celem pracy była analiza zmienności cech ilościowych dotyczących cech struktury plonu u dwu- i wielorzędowych mutantów DH jęczmienia jarego.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem wyjściowym do badań była dwu- i sześciorzędowa odmiana jęczmienia jarego — Maresi i Klimek. Przed traktowaniem mutagennym, ziarniaki poddawano naświetlaniu światłem lasera przez okres 30 minut. Do naświetlania wybrano laser helowo-neonowy o długości fali 632 nm i mocy 24 mW przygotowany do pracy przez Centrum Techniki Laserowej w Warszawie. Po zakończeniu naświetlania ziarniaki przez okres 3 godzin traktowano wodnym roztworem mutagenu N-nitroso-N-metylomocznika (MNU) w stężeniu 0,9 mM. Ziarniaki nie poddawane działaniu lasera i MNU stanowiły kombinację kontrolną.

Uzyskane z ziarniaków w warunkach szklarniowych rośliny M_1 krzyżowano z *Hordeum bulbosum* a otrzymane niedojrzałe zarodki hodowano dalej w kulturze *in vitro* aż do uzyskania roślin haploidalnych, a następnie form DH (Surma, 1997). Po ich rozmnożeniu wybierano zmutowane genotypy dwu- i sześciorzędowe, które były obiektem doświadczeń polowych założonych metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach. Doświadczenia prowadzono latach 1998–2000.

Po zbiorze roślin analizowano ich zmienność genetyczną pod względem wysokości roślin oraz cech struktury plonu — długości kłosa, liczby i masy ziaren z kłosa oraz masy 1000 ziaren. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie określając wartości średnich, wartości skrajne, współczynnik zmienności oraz wartości kontrastu w porównaniach mutantów z ich formami wyjściowymi.

WYNIKI

Wartości średnich dla badanych cech w za okres trzech kolejnych lat dla mutantów DH oraz odmian Maresi i Klimek przedstawia tabela 1. Uzyskane wyniki wskazują na znaczne różnice w zmienności cech między mutantami i odmianami wyjściowymi. Dotyczy to w szczególności wysokości roślin u form dwurzędowych gdzie większość mutantów charakteryzuje się redukcją długości źdźbła. Najsilniejszą redukcję obserwowano u półkarłowych mutantów M53 i M50. O ile pośród mutantów dwurzędowych część mutantów charakteryzuje się poprawionymi wartościami cech struktury plonu w porównaniu z odmianą Maresi, to mutanty wielorzędowe wyraźnie ustępują w tym względzie wielorzędowej odmianie Klimek. Jedynie mutant M65 pod względem badanych cech przewyższa swą formę wyjściową.

Mimo że wartości średnich dla mutantów łącznie i ich form wyjściowych w poszczególnych latach są zbliżone (tab. 2), wartości skrajne wskazują na znaczne zróżnicowanie mutantów w porównaniu do materiału wyjściowego. Potwierdzają to wartości współczynnika zmienności które są wyższe dla mutantów aniżeli odmian. Niezależnie od roku badań najwyższe wartości współczynnika zmienności u mutantów uzyskano dla masy ziaren z kłosa, a najmniejsze dla długości kłosa. Na szczególną uwagę zasługują niskie wartości średnich dla trzeciego roku badań co związane było z wystąpieniem silnej suszy wiosennej. Wpłynęło to na wyraźne obniżenie liczby i masy ziaren z kłosa a zwłaszcza masy 1000 ziaren.

Porównując wartości kontrastu dla cech między grupami mutantów a ich formami wyjściowymi w poszczególnych latach (tab. 3) wykazano, że pod względem badanych cech struktury plonu mutanty dwurzędowe nie różniły się istotnie od formy wyjściowej. We wszystkich latach i dla każdej z cech uzyskano statystycznie nieistotne wartości kontrastu mimo, że w niektórych latach i dla pewnych cech mutanty przewyższały formę wyjściową. W porównaniach grup mutantów sześciorzędowych z odmianą Klimek istotne wartości kontrastu, we wszystkich latach, uzyskano dla wysokości roślin oraz masy ziaren z kłosa. Porównując mutanty sześcio- i dwurzędowe (M6–M2) dla wszystkich cech i lat uzyskano istotne wartości kontrastu.

Wartości kontrastu dla cech w porównaniach między mutantami a formami wyjściowymi w badanych latach łącznie przedstawiono w tabeli 4. Pośród mutantów dwurzędowych najwięcej istotnych wartości kontrastu w porównaniu z formą wyjściową Maresi obserwowano dla cechy wysokości roślin. Z reguły były to ujemne wartości kontrastu wskazujące, że mutagen efektywnie wpływał na skrócenie długości źdźbła. Umożliwiło to wybór dwóch mutantów półkarłowych — M53 i M50 o poprawionej odporności na wyleganie. Dodatkowo, istotne wartości kontrastu uzyskano jedynie dla mutantu M47, a zwłaszcza M56. Mniejszą liczbę ujemnych, istotnych wartości kontrastu obserwowano dla długości kłosa oraz liczby i masy ziaren z kłosa.

Tabela 1

Wysokość roślin i wartości cech struktury plonu dla wybranych mutantów oraz odmian wyjściowych w trzyletnim okresie badań

The plant height and values of yield structure characters for mutants and initial forms in the three years period

Odmiany i mutanty Cultivars and mutants	Wysokość roślin Plant height (cm)	Długość kłosa /cm/ Spike length (cm)	Liczba ziaren z kłosa No. of grains per spike	Masa ziaren z kłosa Grain weight per spike (g)	Masa 1000 ziaren Weight of 1000 grains (g)
Maresi	60,7	9,0	23,9	1,05	43,6
M38	56,3	9,1	24,6	1,11	46,4
M39	51,2	8,8	23,5	1,01	43,8
M40	61,1	9,0	22,5	1,07	47,1
M41	53,4	8,5	24,6	1,06	43,0
M42	48,2	8,7	22,3	1,07	49,3
M43	53,9	9,2	24,8	1,00	40,1
M44	61,7	9,3	21,8	0,89	45,3
M45	51,7	8,6	22,8	1,04	44,4
M46	58,7	9,4	24,0	1,23	51,0
M47	69,4	9,2	23,7	1,20	50,5
M48	57,7	8,7	23,8	1,15	45,6
M49	61,5	8,0	18,4	1,04	56,8
M50	42,4	8,9	23,4	1,10	47,6
M51	49,4	8,6	23,8	0,91	41,5
M52	54,3	8,8	23,6	0,77	32,6
M53	33,1	7,1	16,6	0,50	29,7
M54	54,6	8,8	24,5	1,11	44,3
M55	53,5	8,6	23,7	0,92	39,0
M56	79,1	9,5	22,6	1,10	48,1
M57	55,3	8,4	21,9	1,00	46,6
M58	57,2	8,4	23,3	1,00	44,8
Klimek	53,5	6,7	44,4	1,85	41,5
M59	55,6	6,3	41,5	1,44	35,4
M60	57,5	6,3	42,7	1,47	35,3
M61	55,4	6,1	40,2	1,52	38,6
M62	41,1	6,4	36,5	1,40	36,2
M63	44,1	5,4	35,7	1,41	39,8
M64	50,3	6,3	44,5	1,76	39,7
M65	51,2	7,1	45,7	1,83	41,0
M66	58,6	6,7	43,7	1,50	35,3
M67	53,0	6,5	42,2	1,65	37,9

Tabela 2

Wartości średnich, skrajnych i współczynnika zmienności dla grup mutantów dwurzędowych (M2) i sześciorzędowych (M6) oraz odmian wyjściowych

The values of means, extreme values and coefficients of variation for the two- and six-rowed (M2, M6) mutants and their initial forms

Mutanty i odmiany Mutants and varieties	Średnia Mean			Wartości skrajne Extreme values			Współczynnik zmienności Coefficient of variation		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
wysokość roślin plant height (cm)									
M2	54,4	60,1	51,9	28,0–80,0	33,0–88,0	32,0–75,0	17,75	17,93	15,66
M6	49,8	57,1	48,8	37,0–57,0	43,0–70,0	37,0–57,0	11,72	12,39	11,23
Maresi	57,0	66,3	58,6	54,0–59,0	64,0–68,0	58,0–63,0	4,64	3,14	0,98
Klimek	51,3	56,0	53,3	48,0–55,0	53,0–59,0	52,0–56,0	6,84	5,36	2,86
długość kłosa spike length (cm)									
M2	7,84	9,19	9,24	5,6–9,5	6,8–11,5	7,5–11,4	9,51	9,35	7,56
M6	5,38	7,15	6,54	3,6–7,0	5,6–8,5	5,1–8,2	15,53	10,62	12,65
Maresi	7,40	9,23	10,3	7,2–7,6	9,1–9,5	9,5–11,1	2,70	1,65	7,77
Klimek	5,36	7,30	7,36	5,1–5,7	7,1–7,6	6,9–9,7	5,69	3,62	5,65
liczba ziaren w kłosie number of grains per spike									
M2	21,89	23,84	22,92	13,4–26,1	13,0–28,4	15,5–29,7	11,12	12,96	10,65
M6	35,75	45,78	42,82	20,8–43,3	38,6–59,0	32,8–54,6	16,38	12,35	12,82
Maresi	23,00	25,13	23,7	22,2–24,8	24,9–25,7	22,7–25,0	5,05	0,83	4,92
Klimek	38,00	48,53	46,8	36,9–39,0	48,1–49,2	44,4–48,4	2,77	0,93	4,60
masa ziaren w kłosie weight of grains per spike (g)									
M2	1,16	1,18	0,73	0,45–1,90	0,33–1,73	0,34–09,5	18,68	21,8	16,67
M6	1,54	1,96	1,15	0,97–1,87	1,33–2,60	0,86–1,63	15,67	18,79	18,01
Maresi	1,15	1,21	0,78	1,10–1,23	1,17–1,29	0,75–0,83	5,90	5,29	5,59
Klimek	1,86	2,21	1,48	1,80–1,90	2,08–2,35	1,45–1,54	2,96	6,12	3,33
masa 1000 ziaren weight of 1000 grains (g)									
M2	52,2	49,6	32,5	33,7–69,9	25,8–64,6	19,9–42,7	13,37	15,69	13,63
M6	43,8	42,0	27,4	39,4–49,2	34,5–49,3	23,8–31,2	7,20	9,33	7,06
Maresi	50,3	489	31,6	49,5–50,7	46,7–51,2	29,0–33,3	1,38	4,60	7,24
Klimek	47,7	45,4	31,4	47,2–48,5	43,2–48,2	30,0–33,8	1,43	5,62	6,55

Tabela 3

Kontrasty dla porównań odmian wyjściowych z grupami mutantów dwurzędowych (M2) i sześciorzędowych (M6) w poszczególnych latach
Contrasts for comparison between initial cultivars and groups of two- (M2) and six-rowed (M6) barley DH mutants in the years of study

Kontrast Contrast	Wysokość roślin Plant height			Długość kłosa Spike length			Liczba ziaren z kłosa No. of grains per spike			Masa ziaren z kłosa Grain weight per spike			Masa 1000 ziaren Weight of 1000 grains		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
	Ocena* F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F	Ocena F
Maresi–M2	2,60	6,22	6,77	-0,44	0,44	1,05	1,06	1,28	0,80	-0,003	0,035	0,050	-1,89	-0,66	-0,64
	0,39	2,25	2,67	1,09	0,01	6,11	0,25	0,36	0,14	0,0	0,09	0,21	0,52	0,07	0,06
Klimek–M6	1,48	-1,07	4,55	-0,01	0,14	0,82	2,24	2,75	4,04	0,32	0,24	0,32	3,90	3,32-	4,15
	4,13	4,27	4,20	0,00	0,11	0,44	1,03	1,54	3,32	7,99	4,50	8,23	2,10	1,53	2,36
M6–M2	-4,54	-3,03	-3,11	-2,46	-2,04	-2,69	13,86	21,92	19,9	0,38	0,78	0,42	-8,36	-7,49	-5,00
	7,93	3,54	3,71	218,6	150,29	262,91	273,0	684,21	563,32	80,25	334,1	98,94	65,57	54,28	24,81

* — Ocena

* — Estimation

Wartości krytyczne $F_{0,05} = 3,86$; $F_{0,01} = 6,70$ Critical values: $F_{0,05} = 3.86$; $F_{0,01} = 6.70$

Tabela 4

Kontrasty dla porównań między mutantami DH a ich odmianami wyjściowymi dla badanych lat łącznie
Contrasts for comparison between DH mutants and the initial varieties for all the years together

Kontrast Contrast	Wysokość roślin (cm) Plant height		Długość kłosa (cm) Spike length		Liczba ziaren z kłosa No. of grains per spike		Masa ziaren z kłosa (g) Grain weight per spike		Masa 1000 ziaren (g) Weight of 1000 grains	
	ocena estimation	F	ocena estimation	F	ocena estimation	F	ocena estimation	F	ocena estimation	F
M38-Maresi	-4,33	10,37	0,18	0,60	0,65	0,28	0,09	2,08	2,76	6,53
M39-Maresi	-9,44	50,90	-0,10	0,17	-0,47	0,15	0,03	0,27	0,20	0,03
M40-Maresi	0,44	0,11	0,03	0,02	-1,49	1,44	0,02	0,12	3,51	10,51
M41-Maresi	-7,00	28,01	-0,47	3,83	0,66	0,29	0,02	0,11	-0,67	0,39
M42-Maresi	-12,44	88,52	-0,25	1,10	-1,61	1,68	0,02	0,19	5,68	27,60
M43-Maresi	-6,77	26,26	0,21	0,75	0,84	0,46	0,05	0,63	-3,46	10,25
M44-Maresi	1,11	0,71	0,29	1,40	-2,13	2,95	-0,06	1,17	1,75	2,63
M45-Maresi	-8,88	45,16	-0,34	1,99	-1,13	0,83	-0,01	0,03	0,80	0,55
M46-Maresi	-1,88	2,04	0,42	2,99	0,09	0,01	0,18	8,76	7,46	47,54
M47-Maresi	8,77	44,04	0,20	0,67	-0,24	0,04	0,15	6,98	6,90	40,60
M48-Maresi	-2,88	4,77	-0,22	0,83	-0,11	0,01	0,10	3,06	2,05	3,60
M49-Maresi	0,88	0,45	-0,93	14,62	-5,46	19,37	-0,06	0,01	13,23	149,33
M50-Maresi	-18,22	189,9	-0,02	0,01	-0,55	0,20	0,05	0,69	4,06	14,10
M51-Maresi	-11,22	72,00	-0,41	2,94	-0,08	0,01	-0,13	4,61	-2,05	3,60
M52-Maresi	-6,33	22,90	-0,16	0,47	-0,30	0,06	-0,27	20,19	-10,94	102,14
M53-Maresi	-27,55	434,01	-1,82	55,72	-7,27	34,33	-0,54	77,53	-13,84	163,44
M54-Maresi	-6,00	20,58	-0,16	0,47	0,55	0,20	0,06	0,95	0,72	0,44
M55-Maresi	-7,11	28,90	-0,37	2,39	-0,23	0,04	-0,12	4,01	-4,52	17,44
M56-Maresi	18,44	194,45	-0,55	5,18	-1,28	1,08	0,05	0,75	4,53	17,2
M57-Maresi	-5,33	16,25	-0,57	5,60	-2,00	2,59	-0,04	0,50	3,04	7,90
M58-Maresi	-3,44	6,67	-0,58	5,82	-0,55	0,20	-0,03	0,60	1,25	1,34
M59-Klimek	2,11	2,55	-0,41	2,84	-2,92	5,54	-0,41	44,81	-6,14	32,19
M60-Klimek	4,00	9,15	-0,32	1,74	-1,74	1,97	-0,38	38,53	-6,15	32,31
M61-Klimek	1,88	2,04	-0,57	5,60	-4,24	11,68	-0,32	27,76	-2,86	7,01
M62-Klimek	-12,44	88,52	-0,28	1,40	-7,91	40,57	-0,45	53,67	-5,30	23,95
M63-Klimek	-9,44	50,98	-1,13	28,85	-8,72	49,32	-0,43	50,54	-1,70	2,45
M64-Klimek	-3,22	5,93	-0,34	1,99	0,08	0,01	-0,08	2,03	-1,77	2,69
M65-Klimek	-2,33	3,11	0,48	4,01	1,26	1,04	-0,02	0,12	-0,53	0,24
M66-Klimek	5,11	14,93	0,03	0,02	-0,70	0,32	-0,34	31,90	-6,15	32,31
M67-Klimek	-0,55	0,18	-0,12	0,25	-2,23	3,93	-0,20	10,78	-3,55	10,78

Wartości krytyczne: $F_{0,05} = 3,86$, $F_{0,01} = 6,70$

Critical values: $F_{0,05} = 3.86$, $F_{0,01} = 6.70$

Znaczne zróżnicowanie między mutantami a formą wyjściową uzyskano dla masy 1000 ziaren. Mutanty M49 oraz M46 i M42 wyróżniały się istotnie wyższą wartością tej cechy. Pośród mutantów sześciorzędowych obserwowano przede wszystkim ujemne wartości kontrastu wskazujące na obniżenie wysokości roślin oraz parametrów plonowania mutantów DH w porównaniu z odmianą wyjściową Klimek. Jedynie mutant M65 plonował na poziomie swej odmiany wyjściowej.

DYSKUSJA

Zmienność samoklonalna powstająca w kulturze *in vitro* jest niewątpliwie istotnym źródłem oczekiwanej zmienności, lecz częstotliwość genetycznie stabilnych mutantów w wielu wypadkach jest niezadawalająca. Coraz częściej do generowania zmienności genetycznej cech w systemie *in vitro* stosuje się mutagenne traktowania z wykorzystaniem różnych źródeł promieniowania czy chemomutageny (Chen, 1986; Beversdorf i Kott, 1987; Zapata i Aldemita, 1989; Swanson i in., 1989; Umba Di-Umba i in., 1991; Laib i in., 1996). W prowadzonych badaniach do generowania zmienności genetycznej w systemie DH wybrano N-Nitroso-N-metylomocznik (MNU), który okazał się efektywnym mutagenem w indukowaniu mutantów DH u jęczmienia jarego. Mutagen ten jak również azydek sodu okazały się wysoce efektywne w otrzymywaniu mutantów DH jęczmienia przez innych autorów (Umba Di-Umba, 1991; Laib i in., 1996). Ponadto wskazują oni także na celowość stosowania kombinacji łączonych MNU z azydkiem sodu.

Zastosowana dawka MNU (0,9 mM) umożliwiła uzyskanie mutantów DH, aczkolwiek dawka ta w klasycznej metodzie indukowania mutacji jest stosunkowo niska (Rybiński i in., 1993). Problem określenia dawki optymalnej w systemie DH jest bardziej złożony aniżeli w metodzie klasycznej. W przypadku metody bulbosowej zwiększenie dawki mutagenu w celu zwiększenia częstotliwości mutacji może poprzez wystąpienie szkodliwości somatycznej drastycznie zaburzyć płodność roślin M_1 a ich dalsze krzyżowanie z *Hordeum bulbosum* przełoży się na niską liczbę zawiązywanych ziaren lub wręcz uniemożliwi ich uzyskanie. Zastosowanie naświetlania ziarniaków biostymulującą dawką lasera przed traktowaniem mutagennym może wpływać „ochronnie” na wysoki poziom uszkodzeń somatycznych i umożliwić stosowanie wyższych dawek mutagenu. Wskazują na to wyniki liczby uzyskanych ziarniaków i haploidów na 100 zapylnych kwiatków które w traktowaniach z MNU nie były niższe aniżeli w kombinacji kontrolnej (Rybiński, 1998). Traktując kłosa jęczmienia przed kulturą *in vitro* promieniami gamma obserwowano drastyczne zmniejszenie się liczby reagujących pylników, a następnie wyraźne zmniejszenie ilości zielonych roślin, nawet wtedy kiedy dawki promieniowania były bardzo niskie. Wskazuje to na dużą wrażliwość pylników na promieniowanie co znacznie ograniczało efektywność zastosowanej metody (Laib i in., 1996). Autorzy ci wykazali ponadto, że stosując mutagenne traktowanie ziarniaków zamiast kłosów jako donora mutacji w metodzie pylnikowej, umożliwiło nie tylko zwiększenie dawki promieniowania, ale uzyskanie także podobnej liczby zielonych roślin jak w kontroli i wyższą częstotliwość mutantów DH. Stosując metodę bulbosową, podobnie jak ww. autorzy donorem mutacji były rośliny M_1 z dodatkowym biostymulującym działaniem naświetlania laserem.

Innym istotnym zagadnieniem indukowania mutacji w systemie DH jest termin wyboru mutantów. W metodzie klasycznej genotypy jęczmienia w stosunku do zmutowanych genów recesywnych ujawniają się w pokoleniu M_2 . W systemie DH recesywne allele indukowane przez mutagen przed jak i podczas stadium haploidalnego mogą być homozygotami w stanie diploidalnym i manifestować swój fenotypowy charakter. Pozwala to na szybką selekcję zmienionych genotypów, bez obserwowania zaburzeń powodowanych przez stan heterozygotyczny.

Stosując rośliny M_1 jako donora mutacji i prowadzenia dalej hodowli pylników z mikrosporami w kulturze *in vitro*, uzyskano czyste zmutowane linie z częstotliwością 25% a spektrum mutacji obejmowało zmutowane siewki *viridis*, mutanty *eceriferum*, mutanty o obniżonej aktywności esteraz a zwłaszcza formy karłowe i półkarłowe jęczmienia (Laib i in., 1996). W przeprowadzonych badaniach z wykorzystaniem metody bulbosowej uzyskano również szerokie spektrum mutacji pośród których zdecydowanie przeważały mutanty o skróconej długości źdźbła i poprawionej odporności na wyleganie. Wysoką skuteczność MNU w indukowaniu karłowych i półkarłowych mutantów DH jęczmienia obserwował Umba Di-Umba i wsp. (1991). O ile uzyskiwanie mutantów o zmienionym fenotypie nie stanowi większych problemów to poprawienie ich struktury plonowania jest zagadnieniem o wiele bardziej skomplikowanym (Rybiński i in., 2000). Mimo że mutanty generalnie pod względem cech struktury plonu ustępowały swym formom wyjściowym, uzyskana zmienność pozwoliła uzyskać mutanty DH o skróconej długości źdźbła i poprawionej odporności na wyleganie przy zachowaniu plonowania na poziomie swych form wyjściowych. Część wybranych mutantów stanowić może interesujący materiał wyjściowy dla potrzeb hodowli jęczmienia.

WNIOSKI

1. Recesywne allele indukowane przez związki mutagenne przed, jak i podczas stadium haploidyacji mogą być homozygotami w stanie diploidalnym i manifestować swój fenotypowy charakter. Pozwala to na szybką selekcję zmutowanych genotypów, którą prowadzono bezpośrednio po uzyskaniu roślin DH.
2. Stosując dwu- i sześciorzędowe rośliny M_1 jako donora mutacji w metodzie bulbosowej uzyskano mutanty DH charakteryzujące się w porównaniu z formami wyjściowymi poszerzoną zmiennością genetyczną cechy wysokości roślin i parametrów struktury plonu.
3. W porównaniach kontrastu dla cechy wysokości roślin między mutantami DH a ich formami wyjściowymi uzyskano głównie ujemne, istotne wartości kontrastu wskazujące na wysoką efektywność MNU w indukowaniu mutantów o skróconej długości źdźbła. Uzyskana zmienność pozwoliła na wybór form karłowych i półkarłowych.
4. Mimo że pod względem cech struktury plonu mutanty DH generalnie ustępowały swym formom wyjściowym, uzyskana zmienność umożliwiła wybór mutantów plonujących co najmniej na poziomie odmian wyjściowych.

LITERATURA

- Adamski T., Surma M., Jeżowski S. 1995. Badania nad introdukcją cytoplazmy *Hordeum bulbosum* do wybranych genotypów jęczmienia uprawnego (*H. vulgare* L.). Hod. Rośl. Aklim. 39: 103 — 110.
- Beversdorf D., Kott L. S. 1987. An *in vitro* mutagenesis/selection system for *Brassica napus*. Iowa State J. Res. 61: 435 — 443.
- Chen Y. 1986. "The inheritance of rice pollen plant and its application 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.
- Gieroba J., Koper R., Matyka S. 1995. The influence of pre-sowing laser biostimulation of maize seed on the crop and nutritive value of the corn. 45th Australian Cereal Chemistry Conference 3: 30 — 35.
- 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 przedśiewnego traktowania nasion światłem laserowym na kształtowanie cech morfologicznych i plonowanie łubinu białego. Łubin we współczesnym rolnictwie, Materiały Konferencyjne, Olsztyn-Kortowo: 87 — 92.
- Podleśny J. 1997. Wpływ przedśiewnego traktowania nasion światłem laserowym na kształtowanie się cech morfologicznych i plonowanie bobiku. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 446: 435 — 439.
- Rybiński W., Patyna H., Przewoźny T. 1993. Mutagenic effect of laser and chemical mutagen in barley (*Hordeum vulgare* L.) Genet. Pol. 34: 337 — 343.
- Rybiński W. 1998. Wykorzystanie światła lasera w badaniach nad roślinami wyższymi. Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin. (red. F. Dubert, M. Rapacz), 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. 2001. Influence of laser beams combined with chemomutagen (MNU) on the variability of traits and mutation frequency in spring barley. Int. Agrophysics 15: 115 — 119.
- 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.
- 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 MNH 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.