

WOJCIECH RYBIŃSKI¹**TADEUSZ ADAMSKI**¹**MARIA SURMA**¹**JAN BOCIANOWSKI**²¹ Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu² Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Uzyskiwanie haploidów i ocena zmienności cech ilościowych linii dihaploidalnych jęczmienia jarego z wykorzystaniem metody *Hordeum bulbosum* i mutagenезы

Obtaining of haploids with use of *Hordeum bulbosum* method and mutagenesis and analysis of quantitative traits variation in spring barley DH lines

W badaniach nad wykorzystaniem mutagenезы w systemie DH, ziarniaki browarnej odmiany jęczmienia jarego Rudzik naświetlano biostymulującą dawką światła lasera a następnie poddawano działaniu chemomutagenu — N-metylo-N-nitrosomocznika (MNU). Otrzymane rośliny krzyżowano z *Hordeum bulbosum* a efektywność uzyskiwania haploidów mierzono stosunkiem liczby uzyskanych ziarniaków do liczby zapylnych kwiatów oraz liczby haploidów do liczby zapylnych kwiatów i wykładanych na pożywkę niedojrzałych zarodków. Uzyskane wyniki w porównaniu z kombinacją kontrolną (bez traktowania mutagenem) wykazały, że mutagen wpływał na obniżenie wartości wyżej wymienionych parametrów. Linie dihaploidalne (DH) uzyskane w wyniku podwajania liczby chromosomów rozmnażano, a następnie w warunkach pola doświadczalnego analizowano zmienność ich cech ilościowych, głównie plonotwórczych w porównaniu z kombinacją kontrolną. Wykorzystując wielocechową analizę statystyczną wykazano poszerzenie zakresu zmienności ocenianych cech linii DH w porównaniu z ich odmianą wyjściową Rudzik.

Słowa kluczowe: cechy ilościowe, *Hordeum bulbosum*, jęczmień jary, linie dihaploidalne, mutagen

In performed studies on the use of mutagenesis in DH system, the seeds of malting barley cultivar Rudzik were treated with laser light and chemomutagen — N-methyl-N-nitroso urea (MNU). The plants grown from the treated plants were crossed with *Hordeum bulbosum*. The effectiveness of haploid production was measured by proportion of the obtained seeds to the number of pollinated florets and number of haploids to number of pollinated florets and immature embryos transferred to *in vitro* culture. The obtained results as compared to control (non-treated seeds) indicates that the applied dose of MNU decreased the effectiveness of haploid production. In result of diploidization, a numerous DH

plants were obtained which were propagated and used for estimation of quantitative traits variability in a field trial. The use of multivariate statistical method indicates that DH lines were characterized by a broader range of traits variability in comparison with their initial cultivar Rudzik.

Key words: dihaploid lines, *Hordeum bulbosum*, mutagen, spring barley, quantitative traits

WSTĘP

Uzyskiwanie podwojonych haploidów (DH) w oparciu o dobrze poznane techniki ich generowania znalazło swe odzwierciedlenie u licznych gatunków roślin uprawnych, a zwłaszcza tytoniu, rzepaku, ziemniaków, ryżu, pszenicy i jęczmienia (Szarejko i in., 1991). Jedną z podstawowych zalet wykorzystywania podwojonych haploidów jest istotne skrócenie cyklu hodowlanego, co w przypadku jęczmienia pozwala go skrócić o 2–3 lata poprzez uzyskanie roślin całkowicie homozygotycznych z dowolnej formy heterozygotycznej. Nie oferuje tego hodowla tradycyjna, gdyż nawet po wielopokoleniowym chowie wsobnym utrzymuje się tzw. resztkowa heterozygotyczność (Surma, 1997).

Haploidy mogą być uzyskiwane zarówno z męskich, jak i żeńskich komórek gametycznych poprzez kultury pylników, izolowane mikrospory, załaznie oraz załazki. Można je również uzyskiwać poprzez krzyżowanie oddalone na drodze eliminacji chromosomów jednego z rodziców. W wyniku krzyżowania niektórych gatunków w rozwijającym się zarodku następuje eliminacja chromosomów jednej z form rodzicielskich. Znaczenie mają zwłaszcza te kombinacje krzyżowań, w których eliminacja chromosomów jednej z form jest całkowita, ponieważ daje to możliwość uzyskania form tego gatunku, którego chromosomy nie są eliminowane (Surma, 1997).

Haploidalne lub dihaploidalne formy jęczmienia (*H. vulgare*) można uzyskiwać w wyniku krzyżowań międzyrodzajowych lub międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Hordeum*. W odniesieniu do jęczmienia uprawnego (*H. vulgare*) istotne są te kombinacje krzyżowań z innymi gatunkami, w których eliminowane są chromosomy gatunku dzikiego. Kasha i Kao (1970) opisali procedurę uzyskiwania wysokiej częstości haploidów jęczmienia powstających w wyniku skrzyżowania *H. vulgare* z *H. bulbosum*, którą wykorzystano w realizacji badań w prezentowanej pracy.

W badaniach, których celem jest otrzymanie haploidalnych roślin jęczmienia uprawnego metodą *H. bulbosum* z reguły obiektem są mieszańce lub odmiany. W praktyce hodowlanej linii DH najczęściej otrzymuje się z mieszańców. W celu uzyskania innej zmienności aniżeli zmienność rekombinacyjna, coraz częściej wykorzystuje się odmiany, których ziarniaki poddaje się działaniu związków mutagennych dla uzyskania i utrwalenia zmienności mutacyjnej (Umba Di-Umba i in., 1991; Laib i in., 1996). Szybki skrining zarówno dominujących, jak i recesywnych mutacji w pierwszym pokoleniu po traktowaniu mutagennym, przy braku chimeryzmu, jest podstawową korzyścią wynikającą ze stosowania mutagenezy w systemie DH (Laib i in., 1996). Niewątpliwym problemem stosowania wyżej wspomnianej procedury może być występowanie uszkodzeń somatycznych (wywoływanych działaniem mutagenu u roślin pokolenia M_1) objawiających się między innymi obniżeniem płodności roślin, zwłaszcza przy silniejszych

dawkach mutagenu. Może to mieć negatywny wpływ na efektywność uzyskiwania haploidów metodą *H. bulbosum*. Według Rybińskiego (2003) chemomutagen — N-metylo-N-nitrozomocznik (MNU) w przeciwieństwie do azydku sodu wywołującego głównie zmiany o charakterze mikromutacji, należy do grupy „silnych” mutagenów indukujących głównie mutacje chromosomowe (makromutacje). To sprzyja, nawet w obrębie dawek optymalnych, wystąpieniu wysokiego poziomu uszkodzeń somatycznych u roślin w pokoleniu M_1 wyrażonego silnym obniżeniem wspomnianej powyżej przeżywalności i płodności roślin. Może to skutecznie uniemożliwić uzyskanie wymaganej liczby nasion dla dostatecznie liczego pokolenia M_2 , w którym w przypadku diploidalnego jęczmienia prowadzony jest wybór mutantów. Potwierdzenie, że światło lasera helowo-neonowego w krótkich czasach naświetlania nasion wpływa biostymulująco, aktywizując procesy życiowe komórki (Rybiński, 1998), jego stosowanie przed lub po traktowaniach mutagenami może ograniczać wystąpienie uszkodzeń somatycznych wywołanych działaniem mutagenu (Rybiński, 2001).

Celem badań było określenie efektywności poszczególnych etapów uzyskiwania haploidów jęczmienia oraz charakterystyka zmienności cech ilościowych u wyprowadzonych linii DH w porównaniu z ich odmianą wyjściową ocenianych na podstawie doświadczenia polowego.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach nad wykorzystaniem mutagenyzy w systemie DH materiał wyjściowy stanowiła odmiana browarna jęczmienia jarego — Rudzik. Do indukowania mutacji wybrano chemomutagen — N-metylo-N-nitrozomocznik (MNU). Ziarniaki przed traktowaniem naświetlano stymulującą dawką (30 minut) światła lasera helowo-neonowego o długości fali 632 nm i mocy 24 mW. Następnie ziarniaki wstępnie moczo w wodzie destylowanej w temperaturze 24°C przez okres 8 godzin, po czym umieszczano je w wodnym roztworze MNU o stężeniu 1,1 mM przez okres 3 godzin. Po zakończeniu traktowania ziarniaki trzykrotnie płukano w bieżącej wodzie w celu usunięcia pozostałości mutagenu z ich powierzchni. Ziarniaki nie poddawane działaniu światła lasera i mutagenu stanowiły wariant kontrolny.

Wysiew prowadzono w szklarni umieszczając ziarniaki w doniczkach z parowaną ziemią. W czasie wegetacji roślin w szklarni kłosa roślin kontrolnych oraz pokolenia M_1 kastrowano, a następnie — po 1–2 dniach zapylano słupki świeżo zebrany pyłkiem *Hordeum bulbosum*. W ciągu pierwszych trzech dni po zapyleniu kłosa traktowano roztworem GA_3 (75 ppm) w celu uniknięcia przedwczesnego zasychania kłosów. Po upływie 14–17 dni od zapylenia niedojrzałe zarodki izolowano i hodowano na pożywce B5 Gamborga (Adamski i in., 1990) zgodnie ze standardową procedurą podaną m. in. przez Devaux i in. (1990). W odniesieniu do kombinacji kontrolnych, jak i z mutagenem policzono liczbę zapyzonych kwiatów, liczbę zawiązanych ziarniaków, liczbę niedojrzałych zarodków wyłożonych na pożywkę oraz liczbę uzyskanych roślin haploidalnych, a następnie obliczono stosunek uzyskanych ziarniaków do liczby

zapylnych kwiatów oraz stosunek uzyskanych haploidów do liczby zapylnych kwiatów i liczby wyłożonych zarodków.

Podwajanie liczby chromosomów dokonywano na wszystkich młodych roślinach przed ich wysadzeniem w szklarni, stosując 0,5% roztwór kolchicyny z dodatkiem 20 ml/litr dwumetylosulfotlenku (DMSO) przez okres 10 godzin. Rośliny wysadzano do doniczek, w których rosły do pełnej dojrzałości. Uzyskane linie DH rozmnażano przez trzy kolejne lata, a uzyskane ziarniaki stanowiły materiał wyjściowy do założenia doświadczenia polowego metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach. Ziarniaki 37 linii DH i ich odmiany wyjściowej DH Rudzik wysiewano na poletka o powierzchni 1 m² w rozstawie 15 × 5 cm w warunkach Pola Doświadczalnego IGR PAN w Cerkwicy. Po zbiorze dla 10 roślin z każdego poletka wykonywano pomiary biometryczne dotyczące wysokości roślin, długości kłosa, liczby kłosów z rośliny, liczby i masy ziaren z kłosa, liczby i masy ziaren z rośliny oraz masy 1000 ziaren (MTZ).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie określając wartości minimalne, średnie, maksymalne i współczynnik zmienności (Kozak i in., 2013). Przeprowadzono analizę wariancji dla poszczególnych cech. Współzależność poszczególnych cech określono na podstawie współczynników korelacji dla wartości średnich (Kozak i in., 2010). Ocenę i wyniki testowania porównań średnich dla cech między odmianą Rudzik a poszczególnymi liniami DH przedstawiono w formie kontrastu (Caliński i in., 1976; Ceranka i in., 1997). Podobieństwo między analizowanymi liniami DH pod względem wszystkich cech łącznie wyrażono odległościami Mahalanobisa. Istotność statystyczną poszczególnych odległości Mahalanobisa weryfikowano w odniesieniu do wartości krytycznej D_{α} , zwanej „najmniejszą istotną odległością”. Przestrzenny rozkład linii DH oraz odmiany Rudzik przedstawiono w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zmienność gametoklonalna powstająca w kulturach *in vitro* może być źródłem uzyskiwania pożądanego zmienności, lecz częstotliwość pojawiania się genetycznie stabilnych mutantów jest często niezadowalająca (Szarejko i in., 1991). Stąd coraz częściej stosuje się mutagenne substancje chemiczne i promienie jonizujące (Beverdorf i Kott, 1987; Swanson i in., 1989; Zapata i Aldemita, 1989) wykorzystując fakt, że recesywne allele indukowane przez mutagen przed lub podczas stadium haploidalnego będą homozygotami w fazie diploidalnej przy jednoczesnej ekspresji fenotypowej. Stwarza to możliwość szybkiej selekcji bez zaburzeń genotypowych i fenotypowych powodowanych przez stan heterozygotyczny. Niewątpliwie winno się tu uwzględnić wpływ mutagenu na efektywność uzyskiwania haploidów. Według Surmy (1997), o efektywności metody *H. bulbosum* mierzonej liczbą uzyskanych roślin haploidalnych w stosunku do zapylnych kwiatów decydują dwa pierwsze etapy, to jest procent zawiązanych ziarniaków oraz liczba zarodków rozwijających się w warunkach kultury *in vitro*.

W tabeli 1 przedstawiono efektywność uzyskiwania haploidów w kombinacji kontrolnej i z mutagenem wyrażoną procentowym udziałem uzyskanych ziarniaków do liczby zapylnych kwiatów oraz haploidów do liczby zapylnych kwiatów i wyłożonych

zarodków. Pierwszy z prezentowanych wskaźników dotyczy procentowego udziału zawiązanych ziarniaków w stosunku do liczby zapylnych kwiatów. Wykazano, że wartości uzyskane w wariancie z mutagenem są niższe w porównaniu z wariantem kontrolnym i wynosiły odpowiednio 74,1 i 89,2%. W odniesieniu do drugiego wskaźnika określającego liczbę uzyskanych haploidów w stosunku do liczby zapylnych kwiatów jego wartość w kombinacji kontrolnej była również wyższa w wariancie kontrolnym (17,7%) w porównaniu z kombinacją z mutagenem (14,6%). Efekt redukcji efektywności uzyskiwania haploidów w kombinacji z mutagenem obserwowano również gdy porównywano liczbę uzyskanych haploidów w stosunku do liczby wyłożonych zarodków. Wartości tego wskaźnika wynosiły 26,6% w kombinacji z mutagenem i 34,9% w kombinacji kontrolnej. Oprócz stosowania mutagenu istotny wpływ na efektywność uzyskiwania haploidów w metodzie *H. bulbosum* ma genotyp (Adamski i in., 1990), na co wskazują wyniki uzyskane przez Devaux i in. (1990). Badając liczne genotypy jęczmienia pod względem efektywności metody *H. bulbosum* wyrażonej procentowym udziałem roślin haploidalnych w stosunku do zapylnych kwiatów, zakres zmienności tego wskaźnika wynosił od 1,6 do 11,4% (Devaux i in., 1990), a przy innym zestawie genotypów od 11,5 do 26,8% (Pickering i Devaux, 1992).

Tabela 1

Ocena efektywności metody bulbosowej na poszczególnych etapach uzyskiwania roślin haploidalnych w kombinacjach kontrolnych i z mutagenem
Estimation of *Hordeum bulbosum* method efficiency of production of haploids in control combinations and with mutagen

Obiekty i kombinacje Objects and combinations	Liczba zapylnych kwiatów Number of pollinated florets	Liczba uzyskanych ziarniaków Number of obtained grains	Liczba wyłożonych zarodków Number of cultured embryos	Liczba uzyskanych haploidów Number of obtained haploids	Ziarniak / 100 zapylnych kwiatów Grains /100 pollinated florets	Haploidy / 100 zapylnych kwiatów Haploids/100 pollinated florets	Haploidy / 100 wyłożonych zarodków Haploids/100 cultured embryos
Rudzik							
Kontrola Control	288	257	146	51	89,2	17,7	34,9
Mutagen	1447	1072	793	211	74,1	14,6	26,6

Reasumując wyniki prezentowane w tabeli 1 można stwierdzić, że mutagen obniżał efektywność metody *H. bulbosum* wyrażonej stosunkiem liczby haploidów do pozostałych wskaźników. Uzyskanie niższego procentu ziarniaków w stosunku do liczby zapylnych kwiatów, może mieć związek z wywoływaniem przez mutagen w pokoleniu M₁ uszkodzeń somatycznych, powszechnie występujących przy stosowaniu mutagenów (Małuszyński i in., 1978). Jednym z efektów uszkodzeniowych jest obniżanie płodności roślin, która maleje wraz ze stosowaniem silniejszych dawek mutagenów (Rybiński i in., 1993), prowadząc w skrajnych wypadkach do całkowitej bezpłodności kłosa (Rybiński i in., 2003). Stąd, istotnym jest wybór takiej dawki mutagenu, która indukuje wysoką częstotliwość mutacji przy stosunkowo niskim poziomie uszkodzeń somatycznych, mogących obniżyć efektywność uzyskiwania mutacji w systemie DH. Okazuje się, że

nawet bardzo niskie dawki promieni gamma (5–10 Gy) mogą istotnie zakłócać rozwój napromieniowanych pylników jęczmienia w kulturze *in vitro* obniżając drastycznie liczbę uzyskiwanych zielonych roślin (Laib i in., 1996.). Równie interesujący jest niższy procentowy udział haploidów w stosunku do liczby wyłożonych zarodków. Wynik ten można interpretować z jednej strony wspomnianą wyżej szkodliwością somatyczną, prowadzącą do słabszego wykształcania zarodków, ale również gorszym wzrostem i rozwojem zarodków na pożywce w wyniku mutacji wywołanych przez mutagen. Mimo, że mutagen obniżał efektywność metody *H. bulbosum* wyrażonej wyżej wspomnianymi wskaźnikami, obniżenie to było mniejsze aniżeli wynikałoby to ze stosowania silnej dawki mutagenu (1,1 mM). Efekt ten może mieć związek z naświetlaniem ziarniaków stymulującą dawką światła lasera przed działaniem mutagenu, co wykazano we wcześniejszych badaniach (Rybiński i in., 2000).

Praktyczne wykorzystanie form haploidalnych jest możliwe po podwojeniu ich liczby chromosomów i otrzymaniu tą drogą linii podwojonych haploidów (DH). Uzyskane linie charakteryzowały się szerokim zakresem zmienności cech ilościowych związanych z parametrami plonowania (tab. 2).

Tabela 2

Średnie kwadraty z analizy wariancji oraz wartości minimalne, maksymalne, średnie i współczynniki zmienności badanych cech
Mean squares from analysis of variance, minimum and maximum values, means and coefficient of variation of the investigated traits

Źródło zmienności Source of variation	Powtórzenie Replication	Średnie kwadraty Mean squares		Min-Max	Średnia Mean	Współczynnik zmienności Coefficient of variation
		linie — lines	błąd — residual			
Liczba stopni swobody Number of degrees of freedom	2	37	74			
WR	0,72	30,921***	4,596	69,4-88,4	80,09	4,53
DK	0,5693	1,3409***	0,3236	6,3-10,7	8,91	9,12
LKR	0,167	2,65**	1,224	5,6-12,8	8,82	14,66
LZK	6,08	78,122***	3,209	16,4-50,6	26,16	20,15
MZK	0,02499	0,06128***	0,01238	0,87-2,01	1,22	13,86
LZR	4382	2738,5***	987,2	96,0-337,6	193,9	20,77
MZR	0,118	3,399ns	2,778	4,91-14,05	8,59	19,95
MTZ	110,22	27,17ns	22,98	30,2-59,5	44,08	11,54

** P<0,01; *** P<0,001; ns — nieistotne; not significant

WR — Wysokość roślin, Plant height (cm); DK — Długość kłosa, Spike length (cm); LKR — Liczba kłosów z rośliny, Spike number per plant; LZK — Liczba ziaren z kłosa, Grain number per spike; MZK — Masa ziaren z kłosa, Grain weight per spike (g); LZR — Liczba ziaren z rośliny, Grain number per plant; MZR — Masa ziaren z rośliny, Grain weight per plant (g); MTZ — Masa 1000 ziaren, Weight of 1000 grains (g)

Wartości średnich kwadratów z analizy wariancji wskazują na statystycznie istotne wartości ocenianych cech z wyjątkiem masy ziaren z rośliny i masy 1000 ziaren (MTZ). O znacznym zróżnicowaniu badanych linii DH świadczą szerokie zakresy zmienności analizowanych cech. Dotyczy to w szczególności wartości maksimum dla liczby ziaren z kłosa oraz liczby i masy ziaren z rośliny, dla których współczynniki zmienności są

najwyższe. Wynika to niewątpliwie z obecności dwóch linii DH o większej rzędowości kłosa. Zarówno odmiana uprawna Rudzik jak i pozostałe linie DH są formami dwurzędowymi. Najniższe wartości współczynnika zmienności uzyskano dla wysokości roślin i długości kłosa. Współzależność między analizowanymi cechami linii DH przedstawiono w tabeli 3. Nie wykazano korelacji między wysokością roślin, a pozostałymi cechami. Najwyższe, pozytywne wartości współczynnika korelacji uzyskano dla liczby i masy ziaren z kosa, a w następnej kolejności dla par cech: masy i liczby ziaren z rośliny, liczby ziaren z kłosa i rośliny oraz liczby kłosów i masy ziaren z rośliny. Z kolei MTZ była negatywnie skorelowana z liczbą i masą ziaren z kłosa oraz liczbą ziaren z rośliny, a pozytywnie z długością kłosa. Nie wykazano natomiast korelacji MTZ z masą ziaren z rośliny. Te wysokie współczynniki korelacji wynikają z fizjologicznych zależności cech.

Tabela 3

Wartości współczynnika korelacji między obserwowanymi cechami
Coefficient of correlations among the analyzed traits

	WR	DK	LKR	LZK	MZK	LZR	MZR	MTZ
WR	1							
DK	0,0572	1						
LKR	0,0463	0,1346	1					
LZK	0,0784	-0,4102*	-0,1184	1				
MZK	0,0637	-0,207	-0,249	0,9131***	1			
LZR	0,1221	-0,276	0,5149***	0,7453***	0,5953***	1		
MZR	0,1017	-0,0004	0,7178***	0,3849*	0,3446*	0,8372***	1	
MTZ	-0,088	0,440**	-0,0182	-0,634***	-0,423**	-0,5647***	-0,0841	1

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

WR — Wysokość roślin, Plant height ; DK — Długość kłosa, Spike length ; LKR — Liczba kłosów z rośliny, Spike number per plant; LZK — Liczba ziaren z kłosa, Grain number per spike; MZK — Masa ziaren z kłosa, Grain weight per spike; LZR — Liczba ziaren z rośliny, Grain number per plant; MZR — Masa ziaren z roślin, Grain weight per plant; MTZ — Masa 1000 ziaren, Weight of 1000 grains

Zmienność linii DH w porównaniu z ich odmianą wyjściową Rudzik przedstawiono w formie kontrastu (tab. 4). Uzyskanie zarówno dodatnich jak i ujemnych wartości kontrastu wskazuje na znaczne zróżnicowanie poszczególnych linii DH w stosunku do odmiany Rudzik. Część linii pod względem wartości danej cechy przewyższała odmianę wyjściową Rudzik (ujemne wartości kontrastu), a część jej ustępowała (wartości dodatnie), przy czym tylko dla niektórych linii i cech wartość kontrastu była statystycznie istotna. Generalnie dominują dodatnie wartości kontrastu wskazując na wyższe wartości ocenianych cech ilościowych u odmiany Rudzik aniżeli linii DH. Wyjątkiem jest wysokość roślin, dla której liczba ujemnych kontrastów była wyższa niż dodatnich. Dziesięć z ocenianych linii statystycznie istotnie przewyższało wysokością odmianę Rudzik (między innymi R 69; R 66 i R 73), a tylko jedna z linii (R 20) charakteryzowała się istotnym skróceniem długości źdźbła. Na znaczną efektywność mutagenów w indukowaniu zmienności długości źdźbła wskazują dane literaturowe (Ehrenberg i in., 1961; Kirishnaswami, 1967; Kumar i in., 1967; Rybiński, 1981; Kapała i Rybiński, 1996).

Tabela 4

Ocena wartości kontrastu dla cech ilościowych w porównaniach odmiany Rudzik z liniami DH
Contrast estimation for the quantitative traits in comparisons between cv. Rudzik and DH lines

Porównywane obiekty Compared objects	Ocena kontrastu dla cech Contrast estimation for traits							
	WR	DK	LKR	LZK	MZK	LZR	MZR	MTZ
Rudzik - R2	-1	0,34	0,07	2,4	0,117	1	0,5	2,9
Rudzik - R3	2	-0,39	0,8	-0,4	-0,033	30	2,2	5,5
Rudzik - R4	-0,8	0,61	0,33	2	0,053	14	1,1	3,3
Rudzik - R6	-3,7*	0,87	-0,6	1,9	0,1	8	1	3,8
Rudzik - R9	-3,6*	1,64***	1,33	4,6**	0,18	32	1,6	2,1
Rudzik - R10	-3,9*	0,87	-0,07	4,0**	0,143	17	0,7	4,2
Rudzik - R11	-1,9	0,71	0,13	3,1*	0,087	19	1,5	4,6
Rudzik - R12	-3,2	0,34	1,53	1,3	0,04	38	2,5	6,2
Rudzik - R13	-3,4	0,17	0,8	1,6	-0,057	29	1	0
Rudzik - R14	-3,3	0,07	1,33	0,3	-0,053	7	1	7,2
Rudzik - R16	1,4	0,77	1,53	2	0,013	45	2,3	2,6
Rudzik - R18	-2	0,97*	1,13	2,2	0,057	39	1,8	1,5
Rudzik - R19	1,1	0,84	0,93	2	0,08	37	2,4	4,6
Rudzik - R20	5,6**	1,14*	1,8*	2,8	0,123	56*	2,9*	3,7
Rudzik - R21	-0,1	-0,26	1,93*	1	-0,023	48	2,1	1,2
Rudzik - R23	-4,4*	0,31	1,73	2,8	0,023	44	1,6	-1,4
Rudzik - R26	-2,8	0,94*	0,23	2,3	0,09	9	1	4,3
Rudzik - R27	-4,1*	-0,03	1,93*	0,8	-0,01	58*	2,7*	1,2
Rudzik - R28	1,6	1,57**	2*	3,6*	0,167	68*	3,2*	2,6
Rudzik - R36	0,3	0,47	0,27	3,0*	0,07	35	0,9	-2,6
Rudzik - R37	-0,6	0,64	-0,47	3,2*	0,087	3	-0,4	-0,1
Rudzik - R38	-0,8	0,41	1,13	0,8	-0,03	21	0,7	2,9
Rudzik - R39	2,1	0,27	1,27	0,3	-0,037	25	0,7	-1,4
Rudzik - R40	2,5	0,14	0,87	1	-0,01	19	0,9	1,2
Rudzik - R41	2	0,57	2,4**	6,4***	0,167	66*	3,2*	1,3
Rudzik - R42	2,3	0,21	-0,4	1,6	0,11	7	0,6	2,5
Rudzik - R47	1,2	0,34	-1,27	1,4	0,02	-15	-0,8	4
Rudzik - R65	-2,4	1,97***	1,27	-22,9***	-0,66***	-90**	-1,3	9,3*
Rudzik - R66	-6,2***	0,44	1,67	1,7	0,03	44	2,3	1,9
Rudzik - R67	5,0**	0,41	1,67	0,8	-0,047	39	1,8	0,1
Rudzik - R68	-3,3	2,71***	1,87*	-15,4***	-0,25**	-33	1,5	12,7**
Rudzik - R69	-7,8***	0,37	0,93	2,8	0,04	37	0,9	-2,1
Rudzik - R70	2,8	1,07*	2,07*	-0,2	-0,053	34	1,6	0,9
Rudzik - R71	1,4	1,94***	2,33*	4,8**	0,007	77**	2,9*	0,2
Rudzik - R73	-6,2***	0,14	1,13	2,9	0,13	38	1,9	1,8
Rudzik - R74	3,4	1,84***	-0,73	1,6	0,19*	-9	0,2	3,3
Rudzik - R75	-4,6*	0,87	-0,13	3,9*	0,133	16	0,9	2,4

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

WR — Wysokość roślin, Plant height (cm); DK — Długość kłosa, Spike length (cm); LKR — Liczba kłosów z rośliny, Spike number per plant; LZK — Liczba ziaren z kłosa, Grain number per spike; MZK — Masa ziaren z kłosa, Grain weight per spike (g); LZR — Liczba ziaren z rośliny, Grain number per plant; MZR — Masa ziaren z rośliny, Grain weight per plant (g); MTZ — Masa 1000 ziaren, Weight of 1000 grains (g)

Serię mutantów karłowych jęczmienia po traktowaniu ziarniaków MNU i azydkiem sodu uzyskał Umba Di-Umba i in. (1991). Laib i in. (1996) traktując ziarniak jęczmienia chemomutagenem i wykładając pylniki na pożywkę, uzyskali liczne mutanty typu *viridis*, *eceriferum*, mutanty półkarłowe oraz karłowe o obniżonej liczbie źdźbeł. Zastosowana w prezentowanej pracy metody *H. bulbosum* okazała się mało efektywna dla selekcji form krótkosłomych. Istotnym elementem zmienności linii DH jest natomiast uzyskanie form o

zmienionej budowie kłosa, czego przykładem są dwie linie R 65 i R 68 o odmiennej rzędowości kłosa. Linie te istotnie różniły się od dwurzędowej odmiany Rudzik, co znalazło odzwierciedlenie w istotnie wyższych wartościach liczby i masy ziaren z kłosa oraz liczby ziaren z rośliny (ujemne wartości kontrastu). Obydwie linie charakteryzowały się natomiast istotnie krótszym kłosem i niższą masą 1000 ziaren (dodatnie wartości kontrastu). Z uwagi na niską MTZ, obydwie linie nie różniły się istotnie pod względem masy ziaren z rośliny od odmiany Rudzik. Podobną tendencję pod względem struktury plonowania wykazywały wielorzędowe linie DH w badaniach Rybińskiego i in. (2008).

Tabela 5

Ocena podobieństwa między liniami DH pod względem analizowanych cech określona na podstawie odległości Mahalanobisa
Estimation of similarity among DH lines for the analyzed traits calculated on the basis of Mahalanobis distance

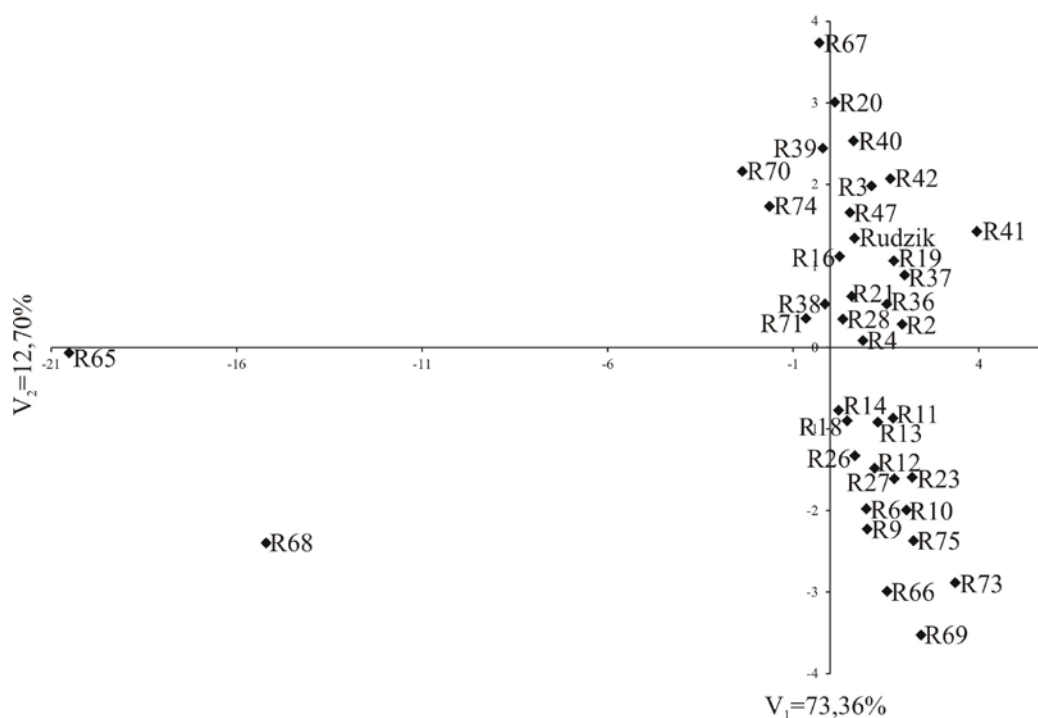
	R2	R3	R4	R6	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R16	R18	R19	R20	R21	R23	R26	R27	R28	
R2	0,00																			
R3	4,18	0,00																		
R4	1,84	3,69	0,00																	
R6	3,52	5,15	2,63	0,00																
R9	4,05	7,30	3,79	4,09	0,00															
R10	3,08	5,66	2,77	2,42	3,04	0,00														
R11	2,65	4,12	1,62	1,75	3,99	2,01	0,00													
R12	3,24	4,03	2,50	3,01	4,24	2,71	2,24	0,00												
R13	2,73	4,32	1,82	2,91	3,65	2,84	2,02	2,06	0,00											
R14	3,70	4,55	3,06	4,44	4,56	3,62	3,58	2,30	2,96	0,00										
R16	3,18	3,62	1,85	4,11	4,49	4,16	2,99	3,29	2,59	3,38	0,00									
R18	2,84	4,90	1,63	2,74	2,65	2,67	2,22	2,51	1,69	3,17	2,21	0,00								
R19	2,77	3,11	1,29	3,08	4,58	3,55	2,05	2,78	2,53	3,53	1,44	2,18	0,00							
R20	4,08	4,12	3,46	5,75	5,85	5,69	4,67	5,10	4,67	4,94	2,26	4,07	2,86	0,00						
R21	2,81	3,13	2,91	5,01	5,37	4,66	3,78	3,13	2,84	3,40	2,78	3,52	3,06	3,76	0,00					
R23	3,17	5,88	3,36	4,22	3,05	3,44	3,59	3,20	2,25	3,97	4,03	2,75	4,19	5,68	3,38	0,00				
R26	2,58	4,98	1,56	1,89	2,78	1,83	1,67	2,41	2,05	3,11	2,97	1,33	2,43	4,66	4,04	3,20	0,00			
R27	3,50	4,43	3,19	3,66	4,54	3,67	3,09	1,84	2,06	3,52	3,82	2,97	3,53	5,61	2,84	2,40	3,29	0,00		
R28	3,37	5,06	2,41	4,03	3,30	3,77	3,27	3,66	3,17	4,04	1,93	1,85	2,27	2,83	3,77	3,83	2,74	4,15	0,00	
R36	1,94	4,25	2,05	3,76	4,30	3,80	2,82	3,89	2,64	4,66	2,66	2,74	2,51	3,55	2,94	3,30	3,09	3,71	2,91	
R37	1,59	4,82	1,75	3,53	3,59	3,03	2,69	3,86	2,83	4,02	2,83	2,51	2,70	3,71	3,59	3,55	2,38	4,29	2,84	
R38	3,09	4,31	2,27	4,46	4,15	3,89	3,52	3,12	2,80	2,04	1,98	2,44	2,65	3,26	2,92	3,89	2,87	3,95	2,69	
R39	3,62	4,65	3,48	5,92	5,46	5,82	5,04	5,10	4,18	4,52	2,73	3,91	3,63	2,58	3,13	4,76	4,59	5,13	3,48	
R40	2,93	3,36	2,77	5,32	5,64	5,23	4,19	4,44	3,73	4,09	2,20	3,75	2,78	2,11	2,44	4,72	4,19	4,70	3,42	
R41	3,52	5,40	4,17	5,99	5,19	4,96	4,57	4,86	4,20	5,35	4,15	4,52	4,45	4,52	3,24	3,71	4,98	4,57	4,21	
R42	2,27	3,04	2,67	4,45	5,91	4,68	3,55	4,40	4,03	4,81	3,30	4,10	2,72	3,26	3,24	5,08	3,99	4,74	4,02	
R47	3,33	3,57	2,61	4,15	5,82	4,27	3,30	4,35	4,07	4,13	3,12	3,95	2,63	3,51	4,31	5,75	3,59	5,39	4,06	
R65	22,54	21,97	21,46	21,77	21,90	22,82	22,36	21,87	21,84	20,93	20,90	21,08	21,24	21,03	22,33	22,85	21,32	22,39	21,11	
R66	3,95	5,94	3,60	3,32	3,36	3,01	3,25	2,34	2,39	3,76	4,52	2,79	4,25	6,45	4,24	2,09	2,87	1,87	4,30	
R67	4,72	4,33	4,23	6,63	6,74	6,79	5,60	5,86	5,03	5,46	2,95	4,85	3,85	2,04	3,80	6,00	5,56	5,99	4,10	
R68	17,45	17,24	16,35	16,35	16,48	17,38	17,09	16,56	16,75	15,86	15,97	15,82	16,14	16,29	17,48	17,67	15,99	17,16	15,90	
R69	4,33	7,12	4,43	3,99	3,16	3,22	4,04	3,73	3,27	4,82	5,51	3,64	5,31	7,31	5,14	2,13	3,58	3,16	5,06	
R70	5,48	6,07	4,62	6,64	5,80	6,74	6,05	5,99	5,26	5,13	3,41	4,45	4,48	3,32	5,06	6,06	5,25	6,35	3,76	
R71	6,08	7,08	4,73	5,90	4,68	5,63	5,21	5,69	4,81	5,52	3,68	3,91	4,54	4,63	6,02	5,67	4,77	6,24	3,35	
R73	3,79	6,25	4,36	4,05	4,32	3,34	3,85	3,35	3,56	4,85	5,61	4,16	5,11	7,14	4,53	2,61	3,92	2,68	5,35	
R74	4,89	6,41	4,28	5,36	5,59	5,90	5,34	6,39	5,78	6,20	4,35	4,61	4,27	3,94	6,30	6,78	4,61	7,09	3,99	
R75	3,19	5,92	2,94	1,94	3,00	1,44	2,04	3,07	2,68	4,41	4,43	2,70	3,76	6,09	4,85	3,05	1,99	3,41	4,02	
R-K	1,97	3,63	2,24	4,31	5,08	4,59	3,63	4,00	3,18	4,07	2,80	3,28	2,75	3,40	2,62	4,05	3,44	4,02	3,58	
	R2	R3	R4	R6	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R16	R18	R19	R20	R21	R23	R26	R27	R28	

	R36	R37	R38	R39	R40	R41	R42	R47	R65	R66	R67	R68	R69	R70	R71	R73	R74	R75	R-K
R36	0,00																		
R37	1,75	0,00																	
R38	3,52	2,89	0,00																
R39	3,33	3,43	2,76	0,00															
R40	2,75	2,95	2,58	1,55	0,00														
R41	3,17	3,82	4,67	4,54	3,98	0,00													
R42	2,45	2,70	3,83	3,53	2,34	4,29	0,00												
R47	3,61	2,89	3,26	4,16	3,07	5,53	2,55	0,00											
R65	22,62	22,17	20,48	20,54	21,33	24,63	22,37	21,35	0,00										
R66	4,34	4,43	4,34	5,90	5,69	5,27	5,71	5,97	22,28	0,00									
R67	4,01	4,45	3,79	1,91	1,95	5,02	3,85	4,33	20,63	7,00	0,00								
R68	17,64	17,15	15,54	15,98	16,69	19,68	17,51	16,51	6,35	16,87	16,28	0,00							
R69	4,68	4,63	5,22	6,56	6,45	5,42	6,34	6,69	23,27	1,73	7,84	17,87	0,00						
R70	5,13	4,92	3,41	2,66	3,65	6,43	5,48	5,16	18,44	6,74	3,01	13,89	7,59	0,00					
R71	5,27	5,05	4,36	5,23	5,42	6,14	6,62	5,72	20,47	6,05	5,30	15,57	6,65	4,21	0,00				
R73	4,50	4,70	5,43	6,62	6,18	4,88	5,62	6,46	24,11	2,27	7,77	18,68	2,08	8,10	7,63	0,00			
R74	4,74	4,02	4,63	4,37	4,52	7,00	4,53	4,03	19,44	7,15	4,78	14,52	7,69	4,12	5,45	7,97	0,00		
R75	3,55	3,21	4,53	6,01	5,51	5,03	4,85	4,86	22,99	2,57	6,98	17,55	2,57	7,01	5,87	2,84	6,09	0,00	
R-K	2,20	2,39	2,91	2,30	1,83	4,37	1,98	3,20	21,28	4,85	3,37	16,47	5,49	4,36	6,05	5,17	4,33	4,59	0,00
	R36	R37	R38	R39	R40	R41	R42	R47	R65	R66	R67	R68	R69	R70	R71	R73	R74	R75	R-K

$D_{\alpha} = 8,73$

W przeciwieństwie do analizy kontrastów obejmującej porównanie każdej z linii z odmianą Rudzik dla każdej z cech, obliczone wartości odległości Mahalanobisa z podaną wartością krytyczną pozwalają na ocenę podobieństwa między poszczególnymi liniami w odniesieniu do analizowanych cech łącznie (tab. 5). Najkrótsze odległości (największy stopień podobieństwa) w zakresie od 0 do 2 uzyskano w porównaniach odmiany Rudzik (R-K) z liniami R 2 i R 42, a najdłuższe (najmniejszy stopień podobieństwa) w porównaniach odmiany Rudzik z wielorzędowymi liniami R 65 i R 68 (odpowiednio 21,3 i 16,5). Linie te różniły się też najbardziej od każdej z pozostałych. W dalszych porównaniach najmniejszym podobieństwem do odmiany Rudzik (R-K) pod względem analizowanych cech (odległości w zakresie 5–6) charakteryzowały się linie: R 9, R 69, R 71 i R 73. Do linii o największej odrębności (odległości powyżej 7) zaliczyć można między innymi linie R 67 w stosunku do linii R 69 i R 73, R 69 do R 70 i R 74 oraz R 73 w porównaniu z linią R 74.

W celu graficznego przedstawienia badanych obiektów zastosowano analizę zmiennych kanonicznych (Rencher, 1998). Umożliwia ona zobrazowanie odległości 8-cechowych z metryką odległości Mahalanobisa w formie graficznej i w ten sposób ułatwić grupowanie i charakterystykę wielocechową (rys. 1). Przestrzenne rozmieszczenie obiektów na płaszczyźnie w odniesieniu do położenia odmiany Rudzik potwierdza zróżnicowanie linii DH pod względem analizowanych cech. Skrajnym położeniem i największą odrębnością charakteryzują się linie R 65 i R 68, a w dalszej kolejności linie R 67 oraz R 66; R 73 i R 69.



Rys. 1. Rozmieszczenie linii DH i odmiany Rudzik w układzie dwu pierwszych zmiennych kanonicznych

Fig. 1. Distributions of DH lines and cv. Rudzik in the first two canonical variables

WNIOSKI

1. Zastosowany chemomutagen — MNU w porównaniu z wariantem kontrolnym wpływał na obniżenie efektywności uzyskiwania haploidów mierzonej stosunkiem liczby uzyskanych ziarniaków do liczby zapylnych kwiatów oraz liczby haploidów do zapylnych kwiatów i wykładanych na pożywkę zarodków.
2. Obniżenie efektywności otrzymywania haploidów w kombinacji z mutagenem może mieć związek z wywoływanymi przez mutagen uszkodzeniami somatycznymi jak również indukowanymi mutacjami.
3. Wartości średniego kwadratu z analizy wariancji cech ilościowych z doświadczenia polowego wskazują na istotne zróżnicowanie linii DH uzyskanych przy wykorzystaniu mutagenu w porównaniu z kontrolą (odmiana Rudzik), a zastosowanie wielocechowej metody statystycznej umożliwiło identyfikację linii DH które w efekcie stosowania mutagenu i procedury *in vitro* charakteryzowały się największą odrębnością od ich odmiany wyjściowej
4. Zróżnicowanie cech ilościowych u uzyskanych roślin DH w kombinacji z mutagenem w porównaniu z kontrolą (odmiana Rudzik) może mieć charakter zmian natury

genetycznej, będących efektem działania mutagenu. Wskazuje na to między innym uzyskanie linii DH o zmienionej w stosunku do kontroli rzędowości kłosa.

5. Zastosowanie mutagenyzy w systemie DH według metodyki w prezentowanej pracy umożliwia uzyskanie linii DH o poszerzonej zmienności genetycznej cech, które mogą zostać wykorzystane zarówno w praktyce hodowlanej, jak i badaniach podstawowych.

LITERATURA

- Adamski T., Jeżowski S., Majewska T., Surma M. 1990. Efektywność metody bulbosowej w zależności od genotypu *Hordeum vulgare* i *Hordeum bulbosum*. *Hodowla Roślin* 4/ 5: 1 — 5.
- Beversdorf W.D., Kott L.S. 1987. An in vitro mutagenesis/selection system for *Brassica napus*. *Iowa State J. Res.* 61: 435 — 443.
- Caliński T., Dyczkowska A., Kaczmarek Z. 1976. Algorytmy Biometrii i Statystyki. *Zeszyt 5*: 77 — 113.
- Ceranka B., Chudzik H., Czajka S., Kaczmarek Z. 1997. Wieloimienna analiza wariancji dla doświadczeń wieloczynnikowych. *Algorytmy Biometrii i Statystyki. Zeszyt 6*: 51 — 60.
- Devaux P., Adamski T., Surma M. 1990. Studies on low cross abilities encountered with the *Hordeum bulbosum* method for haploid production of barley, *Hordeum vulgare* L. *Plant Breeding* 104: 305 — 311.
- Ehrenberg L., Gustafsson A., Lundqvist U. 1961. Viable mutants induced in barley by ionizing radiation and chemical mutagens. *Hereditas* 47: 243 — 282.
- Kapała A., Rybiński W. 1996. Zmienność i jakość białka oraz zdolność plonowania u krótkosłomych mutantów jęczmienia jarego. *Biul. IHAR* 200: 191 — 195.
- Kasha K.J., Kao K.N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225: 874 — 876.
- Kirishnaswami R. 1967. Radiation induced dwarf mutants in barley. *Curr. Sci.* 36(12): 327 — 328.
- Kozak M., Bocianowski J., Sawkojć S., Wnuk A. 2010. Call for more graphical elements in statistical teaching and consultancy. *Biometrical Letters* 47(1): 57 — 68.
- Kozak M., Bocianowski J., Rybiński W. 2013. Note on the use of variation for data from agricultural factorial experiments. *Bulgarian J. Agric. Sci.* 19 (4): 644 — 646.
- Kumar S., Bansal H. C., Singh D., Swaminathan M. S. 1967. Pathways of height reduction in induced dwarf mutation in barley. *Z. Pflanzzüchtung* 57: 317 — 324.
- Laib Y., Szarejko I., Polok K., Małuszyński M. 1996. Barley anther culture for doubled haploid mutant production. *Mutation Breeding Newsletter* 42: 13 — 15.
- Małuszyński M., Małuszyńska J., Malepszy S. 1978. Wybrane zagadnienia mutagenyzy roślin wyższych. *Mutagenza Roślin Wyższych. Materiały III ogólnopolskiej konferencji mutacyjnej*. Uniwersytet Śląski, Katowice 1978: 15 — 30.
- Pickering R.A., Devaux P. 1992. Haploid production: Approaches and use in plant breeding. In: *Barley Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology* (P.R. Shewry ed.). C.A.B. Int. Wallingford, UK: 519 — 547.
- Rencher A.C. 1998. Interpretation of canonical discriminant functions, canonical variates, and principal components. *Am. Stat.* 46: 217 — 225.
- Rybiński W. 1981. Short-straw forms of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) obtained as a result of MNUA-induced mutations. *Genetica Polonica* 22 (3): 271 — 287.
- Rybiński W. 1998. Wykorzystanie światła lasera w badaniach nad roślinami wyższymi. *Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin* (F. Dubert, M. Rapacz – edytorzy), Kraków 1998: 169 — 178.
- Rybiński W., Patyna H., Przewoźny T. 1993. Mutagenic effect of laser and chemical mutagens in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genetica Polonica* 34 (3): 337 — 343.
- Rybiński W., Adamski T., Surma M. 2000. Wykorzystanie światła lasera i chemomutagenu w badaniach nad uzyskaniem linii podwojonych haploidów jęczmienia. *Zeszyty Probl. Post. Nauk Roln.* 473: 291 — 298.
- 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. 2003. Mutagenesis as a tool for improvement of traits in grasspea (*Lathyrus sativus* L.). Edited by Colin Hanbury, CLIMA, Australia, *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 3: 27 — 31.

- Rybiński W., Pietruszewski S., Kornarzyński K. 2003. Influence of magnetic field with chemomutagen and gamma rays on the variability of yielding parameters in barley. *Int. Agrophysics* 17: 85 — 91.
- Rybiński W., Pankiewicz K., Bocianowski J., Rębarz M. 2008. Analiza wybranych cech na poziomie fenotypowym i molekularnym u dwu- i wielorzędowych linii podwojonych haploidów jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) *Biul. IHAR* 249: 141 — 155.
- Surma M. 1997. Wykorzystanie zjawiska eliminacji chromosomów w hodowli jęczmienia. Akademia Rolnicza w Poznaniu. *Seminaria Wydziału Rolniczego, Zeszyt 3*: 157 — 174.
- Swanson E. B., Herrgesell M. J., Arnold M., Sippel D. W., Wong R. S. C. 1989. Microspore mutagenesis and selection: Canola plant with field tolerance to the imidazolinones. *Theor. Appl. Genet.* 78: 525 — 530.
- Szarejko I., Małuszyński M., Polok K., Kilian A. 1991. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. *Proceedings of a Symposium, Vienna, 18–22 June 1990*: 355 — 378.
- Umba Di-Umba, Małuszyński M., Szarejko I., Zbieszczyk J. 1991. High frequency of DH-mutants from M₁ after mutagenic treatment with MNH and sodium azide. *Mutation Breeding Newsletter* 38: 8 — 9.
- Zapata F. J., Aldemita R. R. 1989. „Induction 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.

