

KATARZYNA PANKIEWICZ
WOJCIECH RYBIŃSKI
ZYGMUNT KACZMAREK
Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

Ocena zmienności fenotypowej i molekularnej okrągłonasiennej formy lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.)

Estimation of variability on phenotypic and molecular level of spherical-seeded form of grasspea (*Lathyrus sativus* L.)

Obiekty badawcze stanowiły: mutant o okrągłych nasionach, odmiany Derek i Krab, jako potencjalny materiał z którego wywodzi się wyselekcjonowana okrągłonasienne forma oraz o obiekt kolekcyjny z Włoch (typowy przedstawiciel lędźwianów Południowej Europy). Zmienność cech na poziomie fenotypowym oceniano w oparciu o wyniki dwuletnich doświadczeń polowych w latach 2008 i 2009 założonych w czterech zróżnicowanych glebowo miejscowościach wykorzystując w tym celu wielocechową analizę statystyczną. Zmienność genetyczną wyrażoną stopniem podobieństwa genetycznego oceniano za pomocą markerów ISSR. Ponadto, oceniano skład chemiczny nasion w odniesieniu do zawartości białka, tłuszczu, profilu kwasów tłuszczowych oraz neurotoksyny — β -ODAP. Wykazano, że kulista forma lędźwianu pod względem takich cech jak: liczba rozgałęzień i strąków z rośliny, długość strąka, masa nasion ze strąka, liczba nasion z rośliny, a zwłaszcza masa 1000 nasion różni się istotnie od odmian Derek i Krab, a wszystkie trzy formy reprezentują inny morfotyp i poziom cech plonotwórczych w porównaniu z obiektem z Włoch. Ponadto, kulista forma charakteryzowała się wyższą niż u pozostałych form zawartością białka i tłuszczu, z dominującą zawartością kwasu oleinowego w profilu kwasów tłuszczowych. Wszystkie rodzime formy lędźwianu charakteryzowały się zbliżoną zawartością w nasionach neurotoksyny — β -ODAP z wyraźnie wyższą jej zawartością u formy z Włoch. Wykreślony dendrogram na podstawie wyników analizy ISSR wskazuje, że krajowe formy charakteryzują się znacznym podobieństwem genetycznym i wyraźną odrębnością od włoskiej formy. Wyniki na poziomie fenotypowym uzyskane z doświadczeń polowych wskazują ponadto, że spontaniczna mutacja kształtu nasion powstała z dużym prawdopodobieństwem w obrębie materiału populacyjnego z którego pochodzi odmiana Derek, aczkolwiek na poziomie molekularnym mutant wykazywał bliższe podobieństwo do odmiany Krab.

Słowa kluczowe: doświadczenia polowe, *Lathyrus sativus*, markery ISSR, mutant okrągłonasienny, skład chemiczny nasion, struktura plonowania

A mutant with spherical seeds was investigated together with two Polish cultivars: Derek and Krab (most probable ancestors of the mutant) as well as an Italian grasspee line, typical for South-Western Europe (Mediterranean Basin region). Variation of traits on phenotypic level was estimated basing on results obtained from field trials conducted in four locations in 2008 and 2009. The multivariate analysis

method was used. Genetic variation, expressed by degree of genetic similarity, was established with the use of ISSR markers. Moreover, content of protein, fat, fatty acid composition and neurotoxin content (β -ODAP) in seeds was estimated. The obtained results indicated, that the spherical-seeded mutant, as compared to the cultivars Derek and Krab, was significantly different in the following traits: number of branches and pods per plant, pod length, weight of seeds per pod, seeds number per plant, as well as weight of 1000 seeds. Moreover, all three Polish forms represented different morphotype and yield structure parameters than the Italian line. The seeds of spherical-seeded mutant showed higher content of protein and fat as compared to another analyzed forms, with domination of oleic acid in fatty acids composition. All Polish accessions were similar in neurotoxin content in seeds, markedly lower in comparison to the Italian line. Results of hierarchical grouping (after use of the ISSR method) were presented on the dendrogram which indicated that the cultivars and spherical-seeded mutant showed high level of genetic similarity and markedly differed from the Italian line. The results obtained on the phenotypic level from field trials, estimated with use of multivariate statistics, indicated the population from which the cultivar Derek was derived as the most probable ancestor of the spherical seed mutant, however on the molecular level the mutant showed closer genetic similarity to the cultivar Krab.

Key words: chemical composition of seeds, field trials, ISSR markers, *Lathyrus sativus*, spherical-seeded mutant, yield-contributing traits

WSTĘP

Biorąc pod uwagę zachodzące zmiany klimatyczne i priorytetowe znaczenie w tym kontekście odporności roślin na stresy abiotyczne, w ostatnim czasie coraz większego znaczenia nabierają prace badawcze nad niedocenianymi i marginalnymi gatunkami roślin. W obrębie rodzaju *Lathyrus* należy do nich niewątpliwie łądzwian siewny. Rodzaj *Lathyrus* należy do plemienia *Vicieae*, do którego należą tak ważne gatunki roślin strączkowych cywilizacji śródziemnomorskiej jak: bobik (*Vicia faba* L.), groch siewny (*Pisum sativum* L.) czy soczewica (*Lens culinaris* L.). Według Allkin i in. (1983) do rodzaju *Lathyrus* zalicza się 187 gatunków obecnych zarówno na terenie Starego – jak i Nowego Świata. Najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem użytkowym z rodzaju *Lathyrus* jest łądzwian siewny (*Lathyrus sativus* L.), który był już uprawiany na Bałkanach około 8000 lat przed Chrystusem. Również wykopaliska archeologiczne prowadzone w Turcji i Iraku wskazują, że gatunek ten był od dawna uprawiany w tych krajach.

Według Milczaka i in. (1997, 2001) łądzwian siewny trafił na ziemie polskie na Podlasiu wraz z osadnictwem tatarskim w XVII wieku. Prawdopodobnie w początkowym okresie towarzyszył on soczewicy jako chwast i stopniowo w miarę wypierania soczewicy na obszary o mniej korzystnych warunkach klimatyczno-glebowych na znaczeniu zyskiwać zaczęła uprawa łądzwianu siewnego. Pierwszym obiektem badań rozpoznawczych w Polsce w 1991 roku była populacja miejscowa łądzwianu ze wsi Derewiczna oznaczona symbolem DER. Populacja ta, jak również inne genotypy, posłużyły w 1992 roku do oceny ich plonowania (Milczak i in., 1997). Równoległe z rozwijającymi się badaniami prowadzono hodowlę twórczą łądzwianu we współpracy z AR Lublin - "Spójnia" Nochowo. Współpraca ta zaowocowała wpisaniem w roku 1998 do Rejestru Oryginalnych Odmian Roślin Warzywnych dwóch odmian łądzwianu Derek i Krab.

W Polsce mamy przewagę gleb lżejszych i piaszczystych, stanowiących 60% wszystkich gruntów ornych. Na glebach tych tradycyjnie uprawia się żyto, ziemniaki, czasem seradellę, łubin czy owies, a nie wysokobiałkowe rośliny strączkowe jak groch czy

bobik wymagające znacznie lepszych stanowisk. Lędzwan siewny ma małe wymagania siedliskowe i dlatego może być konkurencyjny (alternatywny) do wyżej wymienionych gatunków. Według danych literaturowych spośród wszystkich gatunków roślin strączkowych lędzwan charakteryzuje się wyjątkową tolerancją na stresy abiotyczne (Campbell i in., 1994). Gatunek ten w warunkach krajowych jest w zasadzie wolny od chorób i szkodników typowych dla innych roślin strączkowych, a według opinii licznych autorów jego największą zaletą jest unikalna tolerancja na suszę i możliwość uprawy na glebach lekkich, nawet V i VI klasy (Dziamba, 1997). Jest to szczególnie istotne z uwagi na cykliczne okresy suszy obserwowane w ostatnich latach wskutek globalnych zmian klimatycznych. Stąd lędzwan siewny został uznany za gatunek proekologiczny i modelową roślinę dla potrzeb zrównoważonego rolnictwa (Vaz Patto i in., 2006). Ponadto, w podsumowaniu wyników zawartości białka ocenianego w pracach dziesięciu różnych autorów, jego średnia zawartość wynosiła 29,6% w zakresie od 26,3 do 34,3% (Hanbury i in., 2000).

W roku 1992 w populacji lędzwanu siewnego z Podlasia (z której wywodzą się odmiany Derek i Krab), Profesor Milczak (UP Lublin) zaobserwował wśród zebranych z tych roślin nasion niewielką liczbę całkowicie okrągłych, przy kanciasto-toporkowatych nasionach typowych dla wszystkich populacji z Podlasia, a także innych form lędzwanu. Nasiona tej formy Profesor Milczak przekazał do kolekcji marginalnych roślin strączkowych IGR PAN, umożliwiając badania nad tą formą na poziomie fenotypowym i molekularnym. Jest to główny cel prezentowanej pracy, a obiekty badawcze poszerzono o odmiany Derek i Krab, oraz o obiekt kolekcyjny z Włoch, jako typowego przedstawiciela lędzwanów Południowej Europy.

MATERIAŁ I METODY

W roku 1992 w populacji lędzwanu siewnego z Podlasia (z której wywodzą się odmiany Derek i Krab), Profesor Milczak (UP Lublin) stwierdził po zbiorze roślin obecność niewielkiej liczby całkowicie okrągłych nasion, przy kanciasto-toporkowatych nasionach typowych dla wszystkich populacji z Podlasia a także innych form lędzwanu. Nasiona tej formy Profesor Milczak przekazał do kolekcji marginalnych roślin strączkowych IGR PAN, umożliwiając badania nad nią na poziomie fenotypowym i molekularnym. Materiał do badań stanowiła okrągłonasienna forma (prawdopodobnie mutant spontaniczny) lędzwanu siewnego, dwie krajowe odmiany: Derek i Krab oraz włoska linia S 79 (LAT 4064/1) uzyskana z Banku Genów w Gatersleben (Niemcy). Nasiona wyżej wymienionych obiektów w latach 2008 i 2009 posłużyły do założenia doświadczeń polowych. Mimo, że średnia opadów w obydwu latach (dane ZD Przybroda, UP Poznań) w okresie wegetacji od marca do końca sierpnia była zbliżona (odpowiednio; 457,4 i 431,4 mm) to istotne różnice obserwowano w poszczególnych miesiącach (tab. 1).

Tabela 1

**Poziom opadów i średnie temperatury w okresie doświadczeń polowych w roku 2008 i 2009
w porównaniu z rokiem 2010**
**Level of rainfall (mm) and air temperature during field trials period of 2008–2009 in comparison
to 2010**

Miesiąc Month	Opady (mm) — Rainfall (mm)						Temperatura (°C) Temperature (°C)		
	2008		2009		2010		2008	2009	2010
	suma total	dekady decade	suma total	dekady decade	suma total	dekady decade			
Marzec March	57,4	2,0	54,2	9,8	46,6	10,6	3,5	5,5	4,1
		12,5		15,0		4,4			
		42,9		29,4		31,6			
Kwiecień April	112,4	18,0	19,6	0,2	19,4	1,4	7,9	11,7	9,1
		38,2		4		2,8			
		56,2		15,4		15,2			
Maj May	16,8	1,0	85,4	12,4	70,6	34,4	13,7	12,5	12,5
		6,0		12,8		32,4			
		9,8		60,2		3,8			
Czerwiec June	30,4	14,0	160	61,8	33,4	2,2	17,3	14,6	18,0
		6,6		24,8		20,0			
		9,8		73,4		11,2			
Lipiec July	124,0	23,0	79,4	33,4	86,0	10,0	19,0	18,5	22,0
		38,8		34		1,8			
		62,2		12		74,2			
Sierpień August	116,4	10,4	32,8	15,2	153,6	51,4	17,6	18,8	18,5
		83,8		17,6		43,8			
		22,2		0		58,4			
Suma III – VIII Total III - VIII	457,4	—	431,4	—	409,6	—	—	—	—

W przeciwieństwie do roku 2009, rok 2008 charakteryzował się silnym niedoborem wody w maju i czerwcu (16,8 i 30,4 mm) i bardzo wysokim poziomem opadów w lipcu i sierpniu (124 i 116,4 mm). Doświadczenia polowe zakładano metodą kompletnych bloków losowanych w trzech powtórzeniach i czterech lokalizacjach: Przybroda — ZD Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (gleba klasy IIIa), Przebędowo — HR Smolice (IVa) oraz Cerekwica — Pole Doświadczalne IGR PAN (dwie lokalizacje: IIIb i IVb). Rozstawa między rzędami wynosiła 60 cm a w rzędzie nasiona umieszczano co 30 cm. W okresie wegetacji prowadzono opis cech botanicznych, a po indywidualnym zbiorze roślin na 15 losowo wybranych roślinach w każdym powtórzeniu oceniano: wysokość roślin, wysokość osadzenia pierwszego od podstawy rośliny strąka, liczbę rozgałęzień z rośliny, ogólną liczbę strąków z rośliny, liczbę strąków z nasionami, długość i szerokość strąka, liczbę i masę nasion ze strąka, liczbę nasion z rośliny oraz wartość MTN. Uzyskane nasiona wykorzystano do oceny zawartości białka, tłuszczu oraz analizy składu kwasów tłuszczowych i β -ODAP. Zawartość białka oznaczano metodą Kjeldahla. Procentową zawartość tłuszczu w nasionach określano metodą wagową przez ekstrakcję tłuszczu w aparacie Soxhleta, a zawartość kwasów tłuszczowych przy wykorzystaniu chromatografu (Hewlett Packard, Gas Chromatograph 5890) i kolumny kapilarnej (30 m, RTX-225).

Zawartość neurotoksyny β -ODAP określana była według metody opracowanej przez Rao (1978) i Briggs i in. (1983) z modyfikacjami autorskimi (Pankiewicz i Rybiński, 2008).

Wyniki uzyskane z doświadczeń polowych, jak i z laboratoryjnej oceny nasion, opracowano statystycznie wykorzystując w tym celu wielocechową metodę analizy statystycznej. Ocenę i wyniki testowania porównań średnich między obiektami przedstawiono w formie kontrastu (Caliński i in., 1976, Ceranka i in., 1997). Podobieństwo między analizowanymi formami pod względem wszystkich badanych cech wyrażono odległościami Mahalanobisa. Zastosowano analizę zmiennych kanonicznych (Camussi i in., 1985; Rencher, 1992). Umożliwiła ona zobrazowanie odległości wielocechowych obiektów z metryką odległości Mahalanobisa w formie graficznej i w ten sposób ułatwić grupowanie i ich wielocechową charakterystykę.

Ocenę podobieństwa genetycznego ocenianych form prowadzono z użyciem 22 wcześniej wyselekcjonowanych markerów ISSR. Dla każdej z odmian/form badano po sześć roślin. DNA wyizolowano z 15 dniowych siewek rosnących w szklarni metodą CTAB (Murray i Thompson, 1980). Reakcje przeprowadzono według następującego schematu: 94°C przez 3 min, 40 cykli: 94°C — 60s, 50°C — 60s i 72°C — 120s, a następnie 72°C przez 8 min. Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydydy w stężeniu 0,5 mg/L przy napięciu 110 V przez 100 minut. Obecność prążka oznaczono symbolem 1, a jego brak 0. Wyniki analizowane były przy użyciu programu UVIMAP w funkcji Nei i Li (1979):

$$GS_{ij} = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}$$

gdzie N_{ij} oznacza liczbę prążków występujących w obu genotypach, natomiast N_i oraz N_j oznaczają liczbę prążków charakterystycznych dla danego genotypu. Wartość GS_{ij} oznacza indeks podobieństwa pomiędzy dwoma badanymi genotypami. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie dendrogramu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Lędźwian siewny jest uprawiany zarówno na terenie Starego, jak i Nowego Świata. Jego uprawa koncentruje się przede wszystkim w Bangladeszu, Chinach, Indiach, Nepalu i Pakistanie i w mniejszym zakresie w wielu krajach Europy, środkowego wschodu, północnej Afryce, a także Ameryce Południowej: w Chile i Brazylii. Zmienność cech fenotypowych wiąże się z geograficznym pochodzeniem lędźwianów. Według Smartt (1984) biało kwitnące rośliny są typowe dla regionu Śródziemnomorskiego, a niebiesko kwitnące przeważają w miarę przesuwania się w kierunku południowo-wschodniej Azji, co dotyczy także Nepalu, Bangladeszu i Pakistanu, przy czym rzadziej rośliny charakteryzowały się kwiatem czerwonym, a w Bangladeszu kwiatem różowym. Krajowe formy lędźwianu (podobnie jak większość form w krajach ościennych) charakteryzują się białą barwą kwiatów (Rybiński i in., 2008) i tą barwą odznaczały się krajowe obiekty kolekcyjne analizowane w prezentowanej pracy. Na znaczną korelację między barwą kwiatu, a barwą okrywy nasiennej wskazuje Desphande i Campbell (1992) stwierdzając, że biało-kwitnące

rośliny wytwarzały jasne nasiona, a barwnie kwitnące, nasiona ciemne. Linie lędźwianu o białych czy kremowych nasionach najczęściej znajdowano pośród form europejskich a linie wytwarzające nasiona barwne są raczej typowe dla materiałów z Etiopii czy subkontynentu indyjskiego, o niższej MTN. Kształt nasion może być kanciasty, toporkowaty, romboidalny czy romboidalno-trójkątny z tym, że niektóre duże nasiona z Włoch bywają mniej lub bardziej romboidalnie spłaszczone (Rybiński i in., 2008; Grela i in., 2010). Stąd ewenementem w skali światowej jest okrągłonasienny (kulisty) spontaniczny mutant o jednolicie jasnej barwie okrywy nasiennej znaleziony przez Prof. Milczaka w materiałach populacyjnych pochodzących z Podlasia, a będący głównym obiektem prezentowanych badań.

W tabeli 2 przedstawiono wartości średnich dla cech ocenianych na podstawie doświadczeń polowych jak i składu chemicznego nasion.

Tabela 2

Wartości średnich dla cech z doświadczeń polowych oraz analiz składu chemicznego nasion
Means for traits from field trials and analyzes of chemical composition of seeds

Cechy Traits	Obiekty — Objects			
	Derek	Krab	Mutant	S 79
Wysokość roślin (cm) — Plant height	53,97	64,71	67,7	61,56
Wysokość osadzenia najniższego strąka (cm) — Height of the lowest pod	14,95	17,68	15,59	14,04
Liczba rozgałęzień z rośliny — No. of branches/plant	7,49	8,86	6,37	7,77
Ogólna liczba strąków z rośliny — No. of all pods/plant	71,36	78,47	56,45	58,96
Liczba strąków z rośliny z nasionami — No. of pods with seeds/plant	62,46	73,66	50,53	52,84
Długość strąka (cm) — Pod length	3,39	3,55	2,92	3,74
Szerokość strąka (cm) — Pod width	1,07	1,14	1,10	1,37
Liczba nasion ze strąka — No. of seeds/pod	3,43	3,04	3,00	1,86
Masa nasion ze strąka (g) — Weight of seeds/pod	0,41	0,54	0,26	0,61
Liczba nasion z rośliny — No. of seeds/plant	169,4	184,95	137,19	85,77
MTN (g) — Weight of 1000 seeds	133,39	179,09	86,07	330,02
Zawartość białka (%) — Protein content	25,6	25,4	28,6	27,0
Zawartość tłuszczu (%) — Fat content	0,8	0,9	1,05	0,86
Kwas palmitynowy (%) — Palmitic acid	7,56	7,77	7,51	7,07
Kwas stearynowy (%) — Stearic acid	4,47	4,25	4,11	5,02
Kwas oleinowy (%) — Oleic acid	28,07	27,9	33,35	30,93
Kwas linolowy (%) — Linolic acid	48,23	48,71	44,93	47,57
Kwas linolenowy (%) — Linolenic acid	9,51	9,32	9,0	9,16
Zawartość neurotoksyn β -ODAP (%) — Content of neurotoxin β -ODAP	1,09	1,01	1,02	1,52

W porównaniu z pozostałymi obiektami mutant okrągłonasienny charakteryzował się dłuższymi pędami, niższą liczbą rozgałęzień z rośliny, strąków z rośliny, krótszym strąkiem, niższą masą nasion ze strąka, a przede wszystkim silną redukcją masy pojedynczego nasiona, co znalazło odzwierciedlenie w bardzo niskiej wartości MTN, nie przekraczającej 90 g. Odmiana Derek najbardziej różniła się od odmiany Krab pod względem wysokości roślin, powiązaną z tą cechą wysokością osadzenia najniższego strąka, wyższą liczbą nasion ze strąka przy niższej masie jak i niższą liczbą nasion z rośliny i wartością MTN. Na tle krajowych odmian włoska forma S 79 wyróżniała się między innymi dłuższym i szerszym strąkiem, co skutkowało bardziej eliptycznym kształtem strąka, niższą liczbą nasion w strąku przy ich wyższej masie, a przede wszystkim wysoką

masą pojedynczego nasiona co rzutowało na wysoką wartość MTN, powyżej 300 g. Pod względem składu chemicznego nasion, mutant w porównaniu z pozostałymi obiektami, charakteryzował się najwyższą zawartością białka i tłuszczu, a w profilu kwasów tłuszczowych wysoką zawartością kwasu oleinowego, zwłaszcza w odniesieniu do obydwu odmian. Na uwagę zasługuje wyrównana i niższa zawartość antyżywnieniowego związku neurotoksyny (β -ODAP) u form krajowych w porównaniu z włoską formą S 79.

Dla porównania mutantu z pozostałymi obiektami kolekcyjnymi pod względem każdej z cech wyliczono wartości kontrastu (tab. 3).

Tabela 3

Ocena wartości kontrastu dla cech w porównaniach mutantu z pozostałymi obiektami
Contrast estimation for the traits in comparisons between mutants and remaining accessions

Cechy Traits	Rodzaj kontrastu Kind of contrast		
	mutant — Derek	mutant — Krab	mutant — S 79
Wysokość roślin (cm) — Plant height	13,72**	2,98	6,14
Wysokość osadzenia najniższego strąka — High of the lowest pod (cm)	0,63	-2,09**	1,54**
Liczba rozgałęzień z rośliny — No of branches/plant	-1,12**	-2,49**	-1,39**
Ogólna liczba strąków z rośliny — No. of all pods/plant	-14,91**	-22,01**	-2,5*
Liczba strąków z rośliny z nasionami — No. of pods with seeds/plant	-12,12**	-23,32**	-2,5**
Długość strąka (cm) — Pod length	-0,47**	-0,63**	-0,81**
Szerokość strąka (cm) — Pod width	0,03	-0,04	-0,27**
Liczba nasion ze strąka — No. of seeds/pod	-0,43**	-0,039	1,13**
Masa nasion ze strąka (g) — Weight of seeds/pod	-0,14**	-0,27**	-0,35**
Liczba nasion z rośliny — No. of seeds/plant	-32,21**	-47,75**	51,41**
MTN (g) — Weight of 1000 seeds	-47,31**	-93,01**	-243,94**
Zawartość białka (%) — Protein content	2,94**	3,11**	1,51*
Zawartość tłuszczu (%) — Fat content	0,25	0,15	0,19
Kwas palmitynowy (%) — Palmitic acid	-0,05	-0,26	0,44
Kwas stearynowy (%) — Stearic acid	-0,36	-0,14	-0,91*
Kwas oleinowy (%) — Oleic acid	5,28	5,45	2,41
Kwas linolowy (%) — Linolic acid	-3,3	-3,78	-2,64
Kwas linolenowy (%) — Linolenic acid (%)	-0,51	-0,33	-0,16
Zawartość neurotoksyn β -ODAP (%) — Content of neurotoxin — β -ODAP	-0,07	0,014	-0,48*

*Istotność na poziomie $\alpha = 0,05$; Significant at $\alpha = 0,05$

**Istotność na poziomie $\alpha = 0,01$; Significant at $\alpha = 0,01$

Pod względem cech fenotypowych i struktury plonowania mutant różnił się istotnie od odmian: Derek, Krab i formy S 79 pod względem odpowiednio: dziewięciu, ośmiu i dziesięciu cech, a składu chemicznego nasion: jednej, jednej i trzech cech. Większa część kontrastów w odniesieniu do cech struktury plonowania przyjmowała wartości ujemne, wskazujące na niższe wartości cechy u mutantu w porównaniu z odmianami i formą S 79. Pod względem wysokości roślin mutant przewyższał pozostałe formy (tab. 2), aczkolwiek istotną i dodatnią wartość kontrastu uzyskano w porównaniu mutantu z odmianą Derek (tab. 3). W zależności od odmiany i warunków środowiskowych rośliny mogą osiągać różną wysokość. W badaniach nad europejskimi materiałami kolekcyjnymi w warunkach umiarkowanego stresu wodnego zakres wysokości roślin wynosił od 37,2 cm do 63,6 cm (Rybiński i in., 2008). W roku o normalnej wielkości opadów wysokość roślin wynosiła od 67,8 do 94,3 cm, a w bardziej suchym roku 2003 zakres zmienności tej cechy wynosił

zaledwie od 25,6 do 42,7 cm (Kozak i in., 2008). Analizując 1187 form z Indii wysokość roślin wynosiła od 15 do 68 cm (Pandey i in., 1995), w warunkach Kanady od 24 do 172 cm (Campbell, 1997) a w pracach Dziamby (1997) od 60 do 120 cm. Ujemną i istotną wartość kontrastu między mutantem, a każdym z pozostałych obiektów uzyskano dla liczby rozgałęzień z rośliny. Jest ona niższa dla mutantu przy bardziej półwyprostowanym pokroju roślin w porównaniu z rozpostartym, typowym dla pozostałych obiektów. Według Mehry i in. (1995) formy kolekcyjne z Francji wykształcały średnio 5,2 rozgałęzień z rośliny, z Bangladeszu 5,7; z Cypru 5,5 a Etiopii, Afganistanu i Niemiec po 5,0. Mniejsza krzewistość mutantu wyrażona liczbą rozgałęzień miała wpływ na obniżenie liczby strąków z rośliny w porównaniu z pozostałymi obiektami i redukcję liczby nasion z rośliny (ujemne i istotne wartości kontrastu). W porównaniu z odmianami, a zwłaszcza formą S 79 mutant charakteryzował się istotnie krótszym strąkiem, niższą liczbą nasion w strąku niż odmiany, ale istotnie wyższą wartością tej ostatniej cechy w odniesieniu do wielkonasiennej włoskiej formy S 79. Masa nasion ze strąka u mutantu była istotnie niższa aniżeli u pozostałych obiektów. Krajowe odmiany charakteryzują się strąkiem podłużnym o długości do 4 cm, a niektóre wielkonasienne formy z Włoch czy Hiszpanii strąkiem szerszym i bardziej eliptycznym (Rybiński i in., 2008). Długość strąka może wahać się w granicach od 1,7 do 5,6 cm w warunkach Kanady (Campbell i in., 1997) i od 3,6 do 4,0 cm oraz od 2,9 do 3,1 cm odpowiednio w Indiach i Syrii (Mehra i in., 1995). Według Yadov (1995) drobnonasienne linie z w Południowo-Wschodniej Azji wiążą z reguły więcej nasion w strąku (od 2 do 5), aniżeli linie o większych nasionach u form kanadyjskich, od 1 do 4 (Campbell, 1997). Największe zróżnicowanie mutantu w porównaniu z pozostałymi obiektami dotyczyło wartości MTN. MTN dla mutantu nie przekraczała 90 g przy wartościach 133; 179 i 330 g odpowiednia dla odmian Derek i Krab oraz włoskiej formy S 79 (tab. 2). Wartość kontrastu dla MTN w porównaniach mutantu była statystycznie istotna (tab. 3). Według Dziamby (1997) wartości graniczne masy 1000 nasion dla ich podziału na drobnonasienne, średnio nasienne i grubonasienne wynoszą odpowiednio: 50-150 g; 150-250 g i powyżej 250 g. Pośród krajowych odmian Derek i Krab pierwsza z nich to forma drobnonasienna o masie 1000 nasion nie przekraczającej 130g, a druga średnio nasienna o masie w granicach do 200 g (Milczak i in., 1997). Zbliżone wartości MTN dla obu odmian uzyskano w prezentowanej pracy, zaliczając z kolei włoską linię S 79 do form grubonasiennych. Wysoką masę 1000 nasion uzyskano dla S 79, co potwierdza doniesienia Hammer i in. (1989) o obecności w południowych Włoszech linii o wyjątkowo dużych nasionach. W Australii pośród 451 form kolekcyjnych MTN wynosiła od 190 do 220 g (Hanbury i in., 1995), w Bangladeszu od 29,5 do 67,6 g (Sarvar i in., 1995), a w Kanadzie pośród 732 form od 56 do 288 g (Campbell, 1997). Formy drobnonasienne z reguły pochodziły z Azji południowo-wschodniej, a grubonasienne z terenów Morza Śródziemnego. U lokalnych linii z Hiszpanii zakres zmienności MTN wynosił od 138 do 368 g (De La Rossa i Martin, 2001).

Nasiona lędźwianu charakteryzują się wysoką zawartością białka, wynoszącą od 18,2 do 36% (Williams i in., 1994). Według Hanbury i in. (2000) od 26 do 34,3%, przy zawartości białka u grochu i bobiku wynoszącej 23 i 24 % (Pettersson i in., 1997) i niższej zawartości u lędźwianu aniżeli u łubinu (32%), a zwłaszcza soi — 42% (Ravindran i Blair,

1992). W prezentowanej pacy najwyższą zawartością białka (28,6%) charakteryzował się okrągłonasienny mutant (tab. 2). W porównaniach mutantu z pozostałymi obiektami uzyskane wartości kontrastu były istotne (tab. 3), wyższe w porównaniach z odmianami aniżeli z formą S 79. Również pod względem zawartości tłuszczu (1,05%) mutant przewyższał pozostałe obiekty aczkolwiek uzyskane różnice były statystycznie nieistotne. Nasiona lędźwianu, podobnie jak inne gatunki roślin strączkowych zawierają niewiele tłuszczu na poziomie około 0,6% (Duke, 1981; Williams i in., 1994). Według Hanbury i in. (2000) profil kwasów tłuszczowych lędźwianu jest podobny do nasion innych roślin strączkowych, u których najwięcej jest kwasu linolowego, a następnie kwasu oleinowego. Również w prezentowanej pracy w profilu kwasów tłuszczowych stwierdzono dominującą zawartość obydwu wyżej wspomnianych kwasów (tab. 2). Z wyjątkiem nieco wyższej zawartości u mutantu kwasu oleinowego i niższej kwasu linolowego (wartości statystycznie nieistotne) nie obserwowano istotnych różnic między badanymi obiektami pod względem składu kwasów tłuszczowych (tab. 3). Według Greli i Winiarskiej (1997) znaczny udział w tłuszczu kwasu linolowego, oleinowego oraz palmitynowego i linolenowego wskazuje, że tłuszcz nasion lędźwianu jest wysoce dietetyczny, zbliżony składem i przydatnością do oleju sojowego.

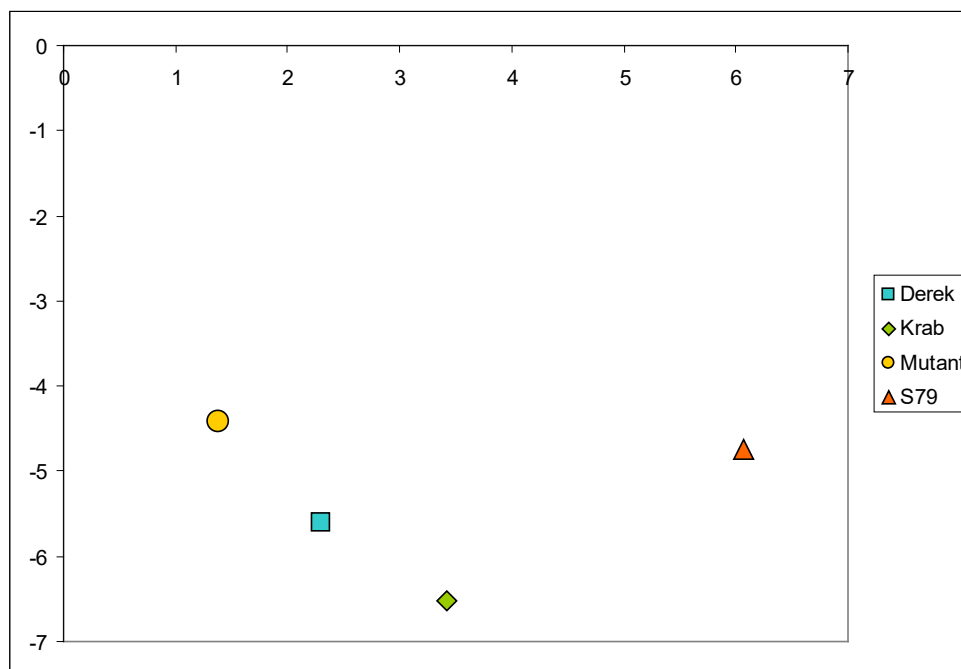
Z wyjątkiem neurotoksyn (β -ODAP) nasiona lędźwianu siewnego charakteryzują się korzystnym składem chemicznym (Grela i Winiarska, 1997) i są wykorzystywane do spożycia, a także w żywieniu zwierząt (Smulikowska i in., 2008). Rodzime odmiany i mutant charakteryzują się prawie identyczną zawartością β -ODAP, niższą aniżeli włoska linia S 79 (tab. 2). Wskazuje to na bezpieczniejsze spożywanie i skarmianie nasion krajowych form. Jak dotąd nie zidentyfikowano linii całkowicie wolnych od β -ODAP, aczkolwiek uzyskano już formy o niskiej, lub jego wręcz śladowej zawartości (Jeswani i in., 1970; Kaul i in., 1985; Campbell, 1987). W efekcie indukowania mutacji uzyskano także mutanty o obniżonej zawartości β -ODAP w porównaniu z wyjściową, krajową odmianą Krab (Rybiński i Grela, 2007).

W tabeli 4 przedstawiono porównanie między poszczególnymi obiektami kolekcyjnymi pod względem badanych cech łącznie, dla składu chemicznego nasion i cech fenotypowych. Największe podobieństwo wyrażone odległościami Mahalanobisa uzyskano w porównaniach odmian Derek i Krab i to zarówno dla cech fenotypowych jak i składu chemicznego nasion potwierdzające ich pochodzenie ze wspólnej populacji z Podlasia, na co wskazuje Milczak i in. (1997). Z kolei mutant pod względem cech fenotypowych jest znacznie bardziej zbliżony do odmiany Derek aniżeli Krab. Sugeruje to, że spontaniczna mutacja kształtu nasion (obydwie formy w przeciwieństwie do odmiany Krab należą do form drobnonasiennych) zaszła prawdopodobnie w populacji z której wywodzi się odmiana Derek. Najmniejszym podobieństwem charakteryzowały się poszczególne formy krajowe w porównaniu z włoską formą S 79, przy czym najbardziej od S 79 różni się okrągłonasienny mutant, a w następnej kolejności odmiana Derek oraz Krab.

Porównanie podobieństwa analizowanych obiektów pod względem cech fenotypowych i składu chemicznego nasion wyrażone odległościami Mahalanobisa
Comparison of similarity of the analyzed accessions for phenotypic traits and chemical composition of seeds expressed in Mahalanobis distances

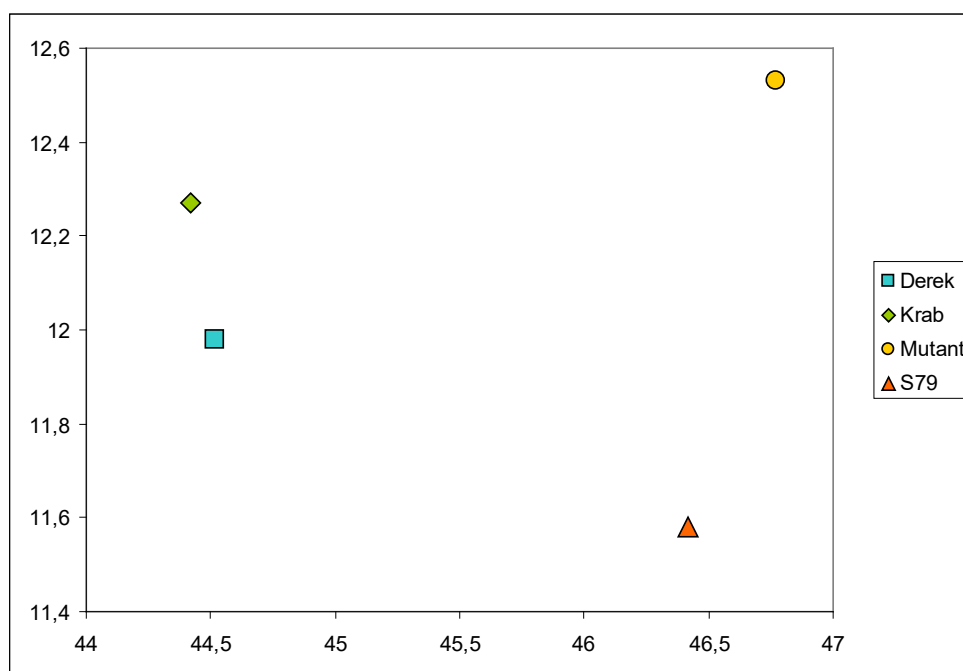
Porównywane obiekty Compared accessions	Odległości Mahalanobisa — Mahalanobis distances	
	cechy fenotypowe phenotypic traits	skład chemiczny nasion chemical composition of seeds
Mutant — Derek	12,51	6,94
Mutant — Krab	23,60	7,09
Mutant — S 79	37,62	3,03
Derek — S 79	30,92	5,85
Krab — S 79	25,58	6,36
Derek — Krab	12,07	1,03

Pod względem składu chemicznego nasion najbardziej podobne były odmiany Derek i Krab, a najmniej obydwie odmiany w porównaniu z mutantem i formą S 79. Niewątpliwie interesujące jest bliższe podobieństwo mutantu z formą S 79, aniżeli z każdą z odmian. Graficznym wyrazem wyżej obserwowanych i omówionych różnic jest położenie obiektów na płaszczyźnie w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych prezentowanych na rysunkach 1 i 2.



Rys. 1. Rozkład badanych obiektów pod względem cech fenotypowych w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych

Fig. 1. Distribution of analyzed accessions for phenotypic traits in two first canonical variables



Rys. 2. Rozkład badanych obiektów pod względem składu chemicznego nasion w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych

Fig. 2. Distribution of analyzed accessions for chemical composition of seeds in two first canonical variables

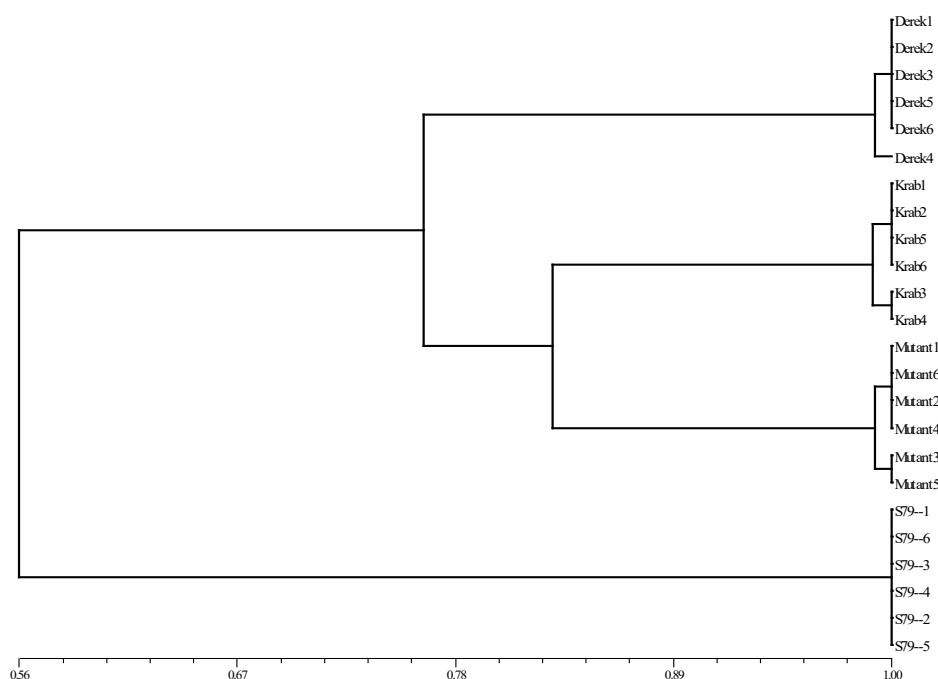
Podobieństwo badanych form kolekcyjnych na poziomie molekularnym analizowano przy wykorzystaniu markerów ISSR. Uzyskane wartości współczynników podobieństwa genetycznego (tab. 5) umożliwiły hierarchiczne grupowanie obiektów wyrażone graficznie w formie dendrogramu (rys. 3).

Tabela 5

Współczynniki podobieństwa genetycznego materiałów kolekcyjnych lędźwianu siewnego
Genetic similarity coefficients of grass pea accessions

Derek	0,99–1,00	—	—	—
Krab	0,76–0,77	0,99–1,00	—	—
Mutant	0,76–0,77	0,82–0,83	0,99–1,00	—
S 79	0,53	0,59–0,60	0,55–0,56	1,00
	Derek	Krab	Mutant	S 79

Analizując wartości współczynników podobieństwa genetycznego, najwyższe wartości (0,82–0,83), a za tym i największe podobieństwo uzyskano w porównaniach mutantu z odmianą Krab, a na niższym ale identycznym poziomie (0,76–0,77) w porównaniach mutantu z odmianą Derek oraz między odmianami Derek i Krab. Potwierdza to wcześniejszy wniosek o pochodzeniu krajowych form ze wspólnej populacji z Podlasia.



Rys. 3. Hierarchiczne grupowanie obiektów na podstawie podobieństwa genetycznego
Fig. 3 Hierarchical grouping of accessions on the basis of genetic similarity

W porównaniach mutantu z odmianami większym podobieństwem genetycznym charakteryzuje się mutant w porównaniu z odmianą Krab aniżeli Derek. Mimo, że obserwacje na poziomie fenotypowym sugerują bliższe podobieństwo mutantu do odmiany Derek (potwierdza to również ustna informacja Prof. Milczaka), a na molekularnym do odmiany Krab, nie ulega wątpliwości że mutant pochodzi z populacji z Podlasia z której drogą selekcji wyprowadzono obydwie krajowe odmiany. Najmniejsze podobieństwo genetyczne wykazano w porównaniach krajowych obiektów kolekcyjnych z włoską formą S 79 (odpowiednio 0,53; 0,55–0,56 i 0,59–0,60 w porównaniach z: Derkiem, mutantem i Krabem) wskazując na odmienność krajowej populacji reprezentującej formy z Europy środkowej i wschodniej z grubonasiennymi formami strefy śródziemnomorskiej, które bliżej charakteryzuje Tavoletti i Capitani (2000).

WNIOSKI

1. Wyniki potwierdzają odrębność mutantu od badanych obiektów pod względem analizowanych cech ilościowych.
2. Wyliczone odległości Mahalanobisa dla cech ocenianych w doświadczeniu polowym wskazują na największe podobieństwo mutantu do odmiany Derek, mniejsze do odmiany Krab a najmniejsze do formy S 79.

3. Współczynniki podobieństwa genetycznego wskazują większe podobieństwo mutantu do odmiany Krab i jednocześnie wysoką odrębność krajowych form od obiektu z Włoch.
4. Mimo, że wyniki badań podobieństwa mutantu do odmian na poziomie fenotypowym i molekularnym pozostają ze sobą w sprzeczności, nie ulega wątpliwości, że spontaniczny mutant okragłonienny pochodzi z populacji lędzwanu z Podlasia z której drogą selekcji wprowadzono odmiany Derek i Krab.

LITERATURA

- Allkin R., MacFarlane T. D., White F. A., Bisby F. A., Adey M. E. 1983. Names and synonyms of species and subspecies in *Viciae*. Issue 2, *Viciae* database project publication No. 2, Southampton, UK.
- Briggs C. J., Parenno N., Campbell C. G. 1983. Photochemical assessment of *Lathyrus* species for the neurotoxin agent, β — N — oxalyl — l — α . β — diamino propionic acid. *Planta Med.* 47: 188 — 190.
- Caliński T., Dyczkowska A., Kaczmarek Z. 1976. Hypothesis testing in multivariable analysis of variance and covariance. *Algorytmy Biometrii i Statystyki. Zeszyt 5*: 77 — 113.
- Campbell, C. G. 1987. Registration of low neurotoxin content *Lathyrus* germplasm LS8246. *Crop Sci.* 27: 821
- Campbell C. G., Mehra R. B., Agrawal S. K., Chen Y. Z., Abd El Moneim A., 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* 73: 167 — 175.
- Campbell, C. G., 1997. Grass pea. *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 18. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Camussi A., Ottaviano E., Caliński T., Kaczmarek Z. 1985. Genetic distance based on quantitative traits. *Genetics* 111: 945 — 962.
- Ceranka B., Chudzik H., Czajka S., Kaczmarek Z. 1997. Wielozmienna analiza wariancji dla doświadczeń wieloczynnikowych. *Algorytmy Biometrii i Statystyki. Zeszyt 6*: 51 — 60.
- De La Rossa L., Martin I. 2001. Morphological characterisation of Spanish genetic resources of *Lathyrus sativus* L. *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 2: 31–34.
- Desphande S. S., Campbell C. G. 1992. Genotype variation in BOAA, condensed tannins, phenolics and enzyme inhibitors in grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Can. J. Plant Sci.* 72: 1037 — 1047.
- Duke J. A. 1981. *Handbook of Legumes of World Economic Importance*. Plenum Press, New York.
- Dziamba S. 1997. *Biologia i agrotechnika lędzwanu siewnego. Międzynarodowe Sympozjum Naukowe „Lędzwan siewny — agrotechnika i wykorzystanie w żywieniu zwierząt i ludzi”*, Radom, 9–10 czerwca 1997: 27 — 33.
- Grela E., Winiarska A. 1997. Skład chemiczny i wartość pokarmowa nasion lędzwanu siewnego (*Lathyrus sativus* L.). *Międzynarodowe Sympozjum Naukowe „Lędzwan siewny — agrotechnika i wykorzystanie w żywieniu zwierząt i ludzi”*, Radom, 9–10 czerwca 1997: 49 — 58.
- Grela E., Rybiński W., Klebaniuk R., Matras J. 2010. Morphological characteristics of some accessions in grass pea (*Lathyrus sativus* L.) grown in Europe and nutritional traits their seeds. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57 (5): 693 — 701.
- Hammer K., Laghetti G., Perrino P. 1989. Collection of plant genetic resources in South Italy, 1988. *Kulturpflanzen* 37: 401 — 414.
- Hanbury C. D., Sarker A., Siddique K. H. M., Perry M. W. 1995. Evaluation of *Lathyrus* germplasm in a Mediterranean type environment in South-Western Australia. *Co-operative Research Center for Legumes in Mediterranean Agriculture, Occasional Paper*: 8.
- Hanbury C. D., White C.L., Mullan B.P., Siddique K. H. M. 2000. A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed. *Anim. Feed Sci. Tech.* 87: 1 — 27.

- Jeswani L. M., Lal B. M., Shiv Prakash S. 1970. Study on the development of low neurotoxin (β -N-Oxalylamino alanine) lines in *Lathyrus sativus* (Khesari). *Current Science* 22: 518.
- Kaul A. K., Islam M. Q., Hamid S. 1985. In: A. K. Kaul & D. Combes (Eds.), *Lathyrus and lathyrism*, proceedings at Colloque Lathyrus. Third World Medical Research Foundation, New York: 234 pp.
- Kozak M., Bocianowski J., Rybiński W. 2008. Selection of promising genotypes based on path and cluster analyses. *J. Agric. Sci.*, 146: 85 — 92.
- Mehra R. B., Raju D.B., Himabindu K. 1995. Evaluation and utilization of *Lathyrus sativus* collection in India. In: *Lathyrus Genetic Resources in Asia*. Proc. Reg. Workshop, December 27–29, Raipur, India.
- Milczak M., Pędziński M., Mnichowska H., Szwed-Urbaś K. 1997. Hodowla twórcza lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) — podsumowanie pierwszego etapu. Międzynarodowe Sympozjum Naukowe „Lędźwian siewny – agrotechnika i wykorzystanie w żywieniu zwierząt i ludzi”, Radom, 9-10 czerwca 1997: 13 — 22.
- Milczak M., Pędziński M., Mnichowska H., Szwed-Urbaś K., Rybiński W. 2001. Creative breeding of grass pea (*Lathyrus sativus*) in Poland. *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 2: 85 — 88.
- Murray M. G., Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321 — 4325.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USA* 76: 5269 — 5273.
- Pandey R. L., Agrawal S. K., Chitale M. W., Sharma R. N., Kashyap O. P., Geda A. K., Chandrakar H. K., Agrawal K. K. 1995. Catalogue of grasspea (*L. sativus* L.) germplasm. Gandhi Agric. Univ. Press, Raipur, India.
- Pankiewicz K., Rybiński W. 2008. Ocena zróżnicowania genetycznego i zawartości neurotoksyny β -ODAP w wybranych gatunkach z rodzaju *Lathyrus*. *Biul. IHAR* 250: 287 — 295.
- Peterson D. S., Sipsas S., Mackintosh J. B. 1997. The chemical composition and nutritive value of Australian pulses. Grains Research and Development Corporation, Canberra.
- Rao S. L. N. 1978. A sensitive and specific colorimetric method for determination of α,β -diaminopropionic acid and *Lathyrus sativus* neurotoxin. *Anal. Biochem.* 86: 386 — 395.
- Ravindran V., Blair R. 1992. Feed resources for poultry production in Asia and the Pacific. II. Plant protein sources. *World Poultry Sci. J.* 48: 205 — 231.
- Rencher A. C. 1992. Interpretation of canonical discriminant functions, canonical variants, and principal components. *Am. Stat.* 46: 217 — 225.
- Rybiński W., Grela E. R. 2007. Zróżnicowanie genetyczne cech i składu chemicznego nasion mutantów lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.). *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 517: 613 — 627.
- Rybinski W., Szot B., Rusinek R. 2008. Estimation of morphological traits and mechanical properties of grasspea seeds (*Lathyrus sativus* L.) originating from EU countries. *International Agrophysics* 22 (3): 261 — 275.
- Sarwar C. D. M., Sarkar A., Murshed A. N. M. M., Malik M. A., 1995. Variation in natural population of grass pea. In: *Lathyrus sativus and Human Lathyrism. Progress and Prospects*. Proc. 2nd Int. Colloq. Lathyrus Lathyrism, 10–12 December 1993, Dhaka, Bangladesh.
- Smartt J. 1984. Evolution of Grain Legumes. I. Mediterranean Pulses. *Experimental Agriculture* 20: 275 — 296.
- Smulikowska S., Rybiński W., Czerwiński J., Taciak M., Mieczkowska A. 2008. Evaluation of selected mutant of grasspea (*Lathyrus sativus* L.) var. Krab as an ingredient in broiler chicken diet. *J. Animal Feed Sci.* 17: 75 — 87.
- Tavoletti S., Capitani E. 2000. Field evaluation of grass pea population collected in the Marche region (Italy). *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 1: 17 — 20.
- Williams P.C., Bhatta R. S., Deshpande S. S., Hussein L. A., Savage G. P. 1994. Improving nutritional quality of cool season food legumes. In: Muehlbauer F.J. and Kaiser W.J. (eds), *Exfuture panding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 113 — 129.

- Vaz Patta M. C., Skiba B., Pang E.C.K., Ochart S. J., Lambein F., Rubiales D. 2006. *Lathyrus* improvement for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical breeding to marker assisted selection. *Euphytica* 147: 133 — 147.
- Yadov C. R. 1995. Genetic evaluation and varietal improvement of grasspea in Nepal. In: *Lathyrus Genetic Resources in Asia*. Proc. Reg. Workshop, December 27–29, Raipur, India.