

WOJCIECH RYBIŃSKI
KAROLINA KRYSZKOWIAK
ANETTA KUCZYŃSKA
MICHAŁ RĘBARZ

Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

Zróznicowanie nagoziarnistych mutantów jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) na poziomie fenotypowym i molekularnym

Variability of hull-less barley mutants (*Hordeum vulgare* L.) at the phenotypic and molecular levels

Celem pracy było określenie zmienności genetycznej cech u uzyskanych mutantów w porównaniu do ich formy wyjściowej zarówno na poziomie fenotypowym jak i molekularnym. Materiał wyjściowy do badań stanowiły nagoziarniste mutanty jęczmienia jarego uzyskane na drodze sztucznego indukowania mutacji wykorzystując w tym celu ziarniaki nieoplewionej formy 1N/86. Czynnikiem mutagenicznym były chemomutageny a analizę cech fenotypowych i plonotwórczych u uzyskanych mutantów prowadzono na podstawie doświadczenia polowego. Zróznicowanie genetyczne mutantów w porównaniu z ich formą wyjściową opracowano przy wykorzystaniu wielocechowych metod statystycznych oraz metod molekularnych. (reakcja RAPD-PCR). Analiza statystyczna wyników z doświadczenia polowego wykazała, że w porównaniu z formą wyjściową mutanty charakteryzowały się szerokim spektrum zmienności badanych cech. W badaniach molekularnych, na podstawie wartości podobieństwa genetycznego wyodrębniono mutanty o największym jak i najmniejszym podobieństwie genetycznym w porównaniu z ich formą wyjściową. Obliczone współczynniki podobieństwa genetycznego według Nei'a posłużyły do hierarchicznego pogrupowania badanych obiektów. Wyniki pogrupowania przedstawiono w formie dendrogramu. W oparciu o wartości obliczonego dystansu fenotypowego (odległości Mahalanobisa) i genetycznego określono ich korelację a także wyróżniono mutanty o najmniejszym podobieństwie do swej formy wyjściowej na obu badanych poziomach zmienności.

Słowa kluczowe: jęczmień nieoplewiony, mutanty, zmienność genetyczna cech, podobieństwo genetyczne, RAPD

The aim of the study was estimation of genetic variability in hull-less barley mutants as compared to their initial form at the phenotypic and molecular levels. Material for the performed studies constituted hull-less barley mutants obtained as a result of mutagenic treatment of grain of hull-less spring barley line — 1N/86. Two chemomutagens were the mutagenic agents. The phenotypic as well as yield structure traits of the mutants were analyzed on the ground of performed field trial. Genetic variations of the mutants, in comparison to their initial line, were elaborated with the use of multivariate

statistics methods and the RAPD molecular method. Statistical analysis of the obtained results indicated that the mutants were characterized by broad spectrum of variation, as compared to the initial line. On ground of the molecular study, the calculated genetic similarity coefficients allowed to select the mutants with the greatest and smallest genetic similarity to the initial line. Genetic similarity was estimated according to the formula given by Nei and the results were used for hierarchical grouping of the analyzed mutants. A result of the grouping was presented on the dendrogram. With the use of calculated phenotypic and genetic distances their correlation coefficient was estimated. As final results, the mutants were chosen with the lowest similarity to the initial line, on the both analyzed levels (phenotypic and molecular).

Key words: hull-less barley, genetic variation, genetic similarity, mutants, RAPD

WSTĘP

Głównym celem hodowli roślin jest wprowadzenie do produkcji nowych odmian dających korzystne efekty gospodarcze, jak wyższa plenność, mniejsza kosztocłonność uprawy, lepsze parametry technologiczne i niezawodność (Czembor, 1989, 1997). Pośród oplewionych gatunków zbóż uprawianych w Polsce coraz większego znaczenia gospodarczego nabierają ich formy nagoziarniste. W krajowym Rejestrze pośród 37 odmian jęczmienia jarego uprawianych na powierzchni ok. miliona ha, znajdowała się jedna odmiana nieoplewiona. W roku 1999 zespół Prof. Czembora z IHAR Radzików zarejestrował nową polską odmianę nagoziarnistą Rastik o dobrej plenności i wysokich wartościach żywieniowych. Wśród 25 odmian owsa uprawianych na powierzchni około 550 tys. ha są dwie odmiany nieoplewione Akt i Polar (Kolasińska i Boros, 2003). Nowe odmiany nagoziarniste poprzez uzyskanie redukcji włókna, wysokiej zawartości białka o korzystnym składzie aminokwasowym, a w przypadku owsa o zwiększonej ilości wartościowego tłuszczu, znajdują zastosowanie w żywieniu zwierząt monogastrycznych oraz przemyśle spożywczym.

Oplewienie ziarniaków to około 10%–13% suchej masy ziarniaka (Bhatty i in., 1975). Ponieważ głównymi komponentami łuski są celuloza, hemiceluloza, ligniny i pektyny (Bhatty, 1993) odmiany nagoziarniste charakteryzują się redukcją zawartości włókna i wzrostem zawartości skrobi (Yang i in., 1997), co w zwiększa strawność i wartość pozyskiwanej energii u zwierząt monogastrycznych (Beames i in., 1996). Jęczmień nagoziarnisty jest też coraz szerzej wykorzystywany w przemyśle spożywczym (Bhatty, 1996; Bhatty i Rosnagel, 1998), zwłaszcza w produkcji kaszy (Bhatty, 1997).

Brak oplewienia jest uwarunkowany pojedynczym recesywnym genem *nud* (inne symbole genu *k*, *n*, *s* lub *h*) zlokalizowanym blisko centromeru na długim ramieniu chromosomu 1 (7H), (Górny 2004). Ekspresja tego genu uniemożliwia trwałe przyleganie plewki do ziarniaka redukując tym samym zawartość trudno rozpuszczalnego włókna (Xue i in., 1997).

Nagość ziarna jest cechą bardzo stabilną — warunki środowiska mają tu znikomy wpływ na jego ekspresję (Górny, 2004). Znacznej zmienności podlega jednak plonowanie form nieoplewionych a z reguły ich plon jest zwykle o 15–35% niższy od plonu odmian oplewionych, przy słabszym krzewieniu produktywnym i wyższej o 20–25% masie 1000 ziaren (Dziamba i Rachoń, 1988, Paris, 1999). Ponadto według Kolasińskiej i Boros (2003)

odmiany nieoplewione wnoszą niepożądane problemy związane z wartością siewną ziaren. Wspomniani autorzy sugerują, że budowa nasienia, brak plewek sprawia, że ziarniaki nagie są bardziej narażone na uszkodzenia (np. w czasie zbioru, czyszczenia) niż oplewione.

Mimo niewątpliwych zalet jęczmienia nagoziarnistego jego szersze wprowadzenie do uprawy ogranicza niższa zdolność plonowania (obniżenie parametrów struktury plonu) w porównaniu z formami oplewionymi (Bhatty, 1986), a także obserwowana negatywna korelacja między zawartością białka a plonem ziarna. Jednym z warunków zmiany tej sytuacji jest poszerzenie zmienności genetycznej cech u form nieoplewionych, wykorzystując w tym celu nie tylko efekty rekombinacji, ale także indukowane mutacje.

Efektywną metodą poszerzenia zmienności genetycznej cech u roślin uprawnych okazuje się indukowanie mutacji (Rybiński i in., 1993; Akhuary i in., 1996; Arumugan i in., 1997). Z uwagi na zalety jęczmienia nieoplewionego w porównaniu z formami oplewionymi podjęto prace nad uzyskaniem mutantów nagoziarnistych jęczmienia jarego. Celem pracy było określenie zmienności genetycznej cech u uzyskanych mutantów w porównaniu do ich formy wyjściowej zarówno na poziomie fenotypowym jak i molekularnym.

MATERIAŁ I METODY

Materiał wyjściowy do indukowania mutacji stanowiły ziarniaki nagoziarnistego rodzaju hodowlanego 1N/86. W wyniku traktowania ziarniaków chemomutagenami — N-nitroso-N-metylomocznika (MNU) oraz azydku sodu (NaN_3) uzyskano pokolenie M_1 , którego ziarniaki posłużyły do uzyskania pokolenia M_2 gdzie prowadzono wybór mutantów. W pokoleniu M_3 potomstwo każdego z mutantów wysiewano wraz z formą wyjściową w doświadczeniu polowym w celu potwierdzenia czy wybrane w pokoleniu M_2 i zmienione w stosunku do kontroli rośliny utrzymują swą zmienność o charakterze mutacji. Po kolejnych rozmnożeniach wybrano 30 zmutowanych form, które pod względem ich morfotypu i zdolności plonowania istotnie różniły się od swej formy wyjściowej 1N/86. Materiał ten oraz odmiana wyjściowa stanowiły obiekty do doświadczeń polowych prowadzonych na Polu Doświadczalnym IGR PAN w Cerekwicy. Doświadczenia zakładano metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach. Wysiew prowadzono umieszczając ziarniaki na poletku o długości i szerokości metra w rozstawie 15×5 cm. W okresie wegetacji prowadzono obserwacje wzrostu i rozwoju roślin a po ich zbiorze (po 15 roślin z każdego poletka i powtórzenia) oceniano wysokość roślin, długość kłosa, liczbę kłosów z rośliny, liczbę i masę ziaren z rośliny, masę 1000 ziaren. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie określając wartości średnich, współczynniki zmienności i odchylenie standardowe. Ocenę i wyniki testowania porównań średnich dla każdej z badanych cech między formą wyjściową a mutantami przedstawiono w formie kontrastu (Caliński i in., 1976; Ceranka i in., 1977). Podobieństwo poszczególnych mutantów w stosunku do ich formy wyjściowej pod względem wszystkich badanych cech łącznie wyrażono wartościami odległości Mahalanobisa. Rozkład średnich dla badanych cech mutantów i formy wyjściowej przedstawiono w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych. Zawartość białka w ziarniakach oznaczano metodą Kjeldahla.

Uzyskane z doświadczenia polowego ziarniaki wysiewano w szklarni do doniczek. DNA mutantów i ich formy wyjściowej 1N/86 ekstrahowano z liści 3–4 tygodniowych siewek przez 15 minut w temperaturze 95°C z wyciętych korkoborem krążków liści o powierzchni 2 mm², umieszczając je w buforze TPS. Reakcję RAPD-PCR prowadzono dla dziewięciu 10 nukleotydowych starterów, wybranych wcześniej spośród 300 o losowej sekwencji. Reakcję prowadzono według protokołu: 5 min w 95°C, 45 cykli — 1 min w 94°C, 2 min w 36°C, 2 min w 72°C, 10 min w 72°C (Kuczyńska i in., 2001). Każdą reakcję przeprowadzono oddzielnie dla czterech losowo wybranych siewek mutantu i ich formy wyjściowej. Elektroforezę fragmentów prowadzono przez 2,5 godziny pod napięciem 100 V w 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny w stężeniu 0,5 mg/L (Kuczyńska i in., 2003).

Współczynniki podobieństwa genetycznego analizowanych mutantów określono korzystając ze wzoru według Nei'a i Li, (1979). Wyliczone współczynniki umożliwiły hierarchiczne grupowanie obiektów metodą średnich połączeń, a wyniki przedstawiono w formie dendrogramu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Według Campbell i wsp. (1994) indukowane mutacje i hodowla mutacyjna może być wartościowym uzupełnieniem konwencjonalnych metod hodowli i zostać wykorzystana do tworzenia dodatkowej zmienności genetycznej. Wyniki przedstawione w tabeli 1 wskazują, że mutanty w porównaniu z ich formą wyjściową charakteryzowały się poszerzeniem zmienności analizowanych cech. Pośród 30 mutantów 25 z nich wyróżniało się obniżeniem wysokości roślin w porównaniu z formą wyjściową (ujemne wartości kontrastu). Największą redukcją wysokości przekraczającą 15 cm charakteryzowały się mutanty M 62, M 46, M 2 i M 120. Wskazuje to na wysoką efektywność zastosowanych mutagenów w indukowaniu redukcji długości źdźbła. Potwierdzają to badania Scholza (1965) i Rybińskiego (1981), którzy po działaniu mutagenów z wysoką częstotliwością selekcjonowali krótkosłome mutanty jęczmienia. W wielu wypadkach redukcji długości źdźbła towarzyszyło skrócenie długości kłosa (u 17 mutantów). Analizując elementy struktury plonowania (liczba kłosów z rośliny, liczba i masa ziarniaków z rośliny i masa 1000 ziarniaków) dla przeważającej liczby mutantów uzyskano ujemne wartości kontrastu. Wskazuje to na obniżenie cech struktury plonu mutantów w porównaniu z ich formą wyjściową. Mutanty z reguły charakteryzowały się gorszym rozkrzewieniem produkcyjnym (mniejsza liczba kłosów z rośliny), co wpływało na redukcję liczby ziarniaków z rośliny. Według Noworolnika i Leszczyńskiej (2004) jedyna krajowa, wysokowartościowa nieoplewiona odmiana Rastik w porównaniu z odmianami oplewionymi odznaczała się w doświadczeniu mikropoletkowym większym wypadaniem roślin i słabszym rozkrzewieniem produkcyjnym a odmiany oplewione plonowały istotnie wyżej dzięki większej liczbie kłosów (o 20%) na jednostce powierzchni. Również dla większości mutantów niższa była masa ziarniaków z rośliny i masa 1000 ziarniaków, co mogło mieć związek z obserwowaną redukcją długości kłosa. Pośród analizowanych

mutantów tylko dwa z nich (M 13 i M 17) charakteryzowały się nieznacznie wyższymi w porównaniu z ich formą wyjściową wartościami cech struktury plonu.

Tabela 1

Ocena różnic fenotypowych między mutantami jęczmienia jarego a ich formą wyjściową 1N86
The estimation of phenotypic differences between mutants and their initial form 1N86

Mutanty Mutants	Ocena kontrastu dla cech — Contrast estimation for traits						Wartości statystyki F dla cech łącznie Statistic value F for traits jointly
	wysokość roślin (cm) plant height (cm)	długość kłosa (cm) spike length (cm)	liczba kłosów z rośliny spikes number per plant	liczba ziaren z rośliny grains number per plant	masa ziaren z rośliny(g) grain weight per plant (g)	masa 1000 ziaren (g) weight of 1000 grains (g)	
M2-1N/86	-17,06**	-1,26	-0,13	-11,02	-1,40	-6,53	12,83**
M6-1N/86	-13,36**	0,06	-1,40**	-40,05**	-2,26**	0,80	8,41**
M13-1N/86	-0,33	0,53	0,26	1,10	0,32	1,33	0,33
M16-1N/86	-5,80**	-1,03	-1,20*	-29,41*	-2,40**	-5,50*	4,03**
M22-1N/86	-8,20**	0,60	-3,26**	-96,00**	-3,51**	-2,00	11,77**
M26-1N/86	1,60	0,76	-1,13*	-12,11	-0,80	-0,90	1,56
M28-1N/86	-10,40**	-0,03	-1,13*	-60,52**	-4,29**	-13,8**	12,40**
M32-1N/86	-8,80**	0,20	-2,53**	-72,84**	-4,18**	-5,23*	9,91**
M35-1N/86	-9,53**	0,16	-1,46**	-37,60*	-2,42**	-2,20	5,42**
M46-1N/86	-16,7**	-0,63	0,06	-5,66	-1,26	-6,43*	12,18**
M52-1N/86	-11,0**	-0,30	-1,46**	-37,43*	-3,63**	-10,03**	11,17**
M 53-1N/86	-1,93	0,76	-0,40	-5,30	-1,60	-10,13**	4,19**
M58-1N/86	0,40	-2,40*	-1,73**	-22,1	-3,72**	-18,13**	19,00**
M62-1N/86	-15,80**	0,00	-3,53**	-74,52**	-6,11**	-20,33**	33,28**
M74-1N/86	-5,86**	-0,06	-2,20**	-42,64**	-4,03**	-13,80**	13,20**
M75-1N/86	-8,40**	-0,76	-1,26**	-14,02	-2,75**	-12,10**	12,24**
M81-1N/86	-7,73**	-0,06	-2,53**	-51,83**	-4,36**	-14,16**	14,72**
M82-1N/86	-3,80	-0,03	-0,40	-26,85	-1,13	-3,86	2,49*
M84-1N/86	-11,20**	0,96	0,23	11,19	-0,68	-6,56*	7,34**
M102-1N/86	3,40	2,66**	-2,60**	-22,03	-2,51**	-9,23**	14,51**
M103-1N/86	6,26**	1,33	1,33**	74,96**	2,45**	-9,13**	10,87**
M104-1N/86	-3,20	0,66	-1,40**	-14,31	-2,74**	-13,83**	11,34**
M105-1N/86	-0,73	1,90*	-1,20*	-3,32	-1,92*	-11,43**	9,62**
M117-1N/86	-1,66	-0,60	1,06*	14,84	0,97	0,26	1,34
M120-1N/86	-18,00**	-0,70	-1,60**	-60,85**	-4,87**	-13,43**	20,82**
M121-1N/86	-5,06*	-1,13	-1,20*	-17,74	-1,74*	-5,33*	3,97**
M127-1N/86	-5,86**	-1,10	-0,86	-25,31	-2,88**	-10,73**	6,69**
M139-1N/86	-7,73**	-1,26	-0,06	-14,40	-0,94	-0,73	2,85*
M141-1N/86	-5,46**	-0,56	0,13	-12,23	-0,39	-8,53**	4,71**
M142-1N/86	-9,00**	-0,16	0,40	32,1*	0,86	-5,83*	5,27**
Forma wyjściowa 1N/86	76,9	9,5	8,0	157,5	9,36	55,8	—
Initial form 1N/86							
Wartości krytyczne Critical values							F _{0,05} = 2,26 F _{0,01} = 3,14

*Istotne przy $\alpha = 0,05$, Significant at $\alpha = 0,05$

** Istotne przy $\alpha = 0,01$, Significant at $\alpha = 0,01$

Na możliwość uzyskania form nieoplewionych o korzystnych parametrach plonowania wskazują prace kilku autorów (Vaidya i Mahabalan, 1989; Eslick i in., 1990; El Sayed i in., 2004), gdzie formy nagoziarniste plonowały co najmniej na poziomie form

oplewionych. Niektóre charakteryzowały się o 12% wyższym indeksem plonowania (Nagy, 2003), a także wykazywały wyższą tolerancję na stresowe czynniki środowiska (Thair i Shevstov 1994) i lepszą wartość żywieniową ziarniaków (Bhatty 1986). W porównaniu z jęczmieniem oplewionym jęczmień nagoziarnisty z reguły charakteryzuje się niższym plonem ziarna (Harlan i in., 1940; Mc Guire i Hockett, 1981; Noworolnik i Leszczyńska, 2004) nawet o 15–35% (Dziamba i Rachoń, 1988) przy redukcji rozkrzewienia produkcyjnego (Paris, 1999), co obserwowano w prezentowanej pracy. Inni autorzy upatrują przyczyn obniżenia plonu ziaren w zaburzeniu kłoszenia (Choo i in., 2001), wpływie genu nagoziarnistości na redukcję masy pojedynczego ziarniaka wyrażonego redukcją jego długości do szerokości o około 14% (Nam i Lee, 1990) przy widocznym skróceniu długości członów osadki kłosowej, czemu towarzyszyło skrócenie długości źdźbła (Takahashi i in., 1961). Ten ostatni efekt również obserwowano u analizowanych w pracy mutantów. Cecha nagości ziarna jęczmienia kontrolowana jest przez recesywne allele *nud* na chromosomie 7H, przy czym gen ten wpływa na inne cechy a jego efekt nie został jeszcze w pełni poznany (Choo i in., 2001). Według wspomnianych wyżej autorów gen *nud* może wykazywać pleiotropowy efekt w odniesieniu do plonowania lub może być sprzężony z QTL dotyczącymi plonu ziarna.

Charakterystykę statystyczną mutantów przedstawiono w tabeli 2. Najwyższą wartość odchylenia standardowego uzyskano dla liczby ziaren z rośliny a współczynnika zmienności dla liczby i masy ziaren rośliny. Najmniejszej zmienności podlegała cecha długości kłosa.

Tabela 2

Charakterystyka zmienności cech mutantów nagoziarnistych jęczmienia jarego
Characteristics of variation of hull-less barley mutants

Cechy Traits	Charakterystyka zmiennych — Characteristics of variables							
	średnia mean	min. min.	maks. max	wariancja variance	odchylenie standardowe standard deviation	współczynnik zmienności coefficient of variation	przedział ufności confidence interval	
Wysokość rośliny Plant height (cm)	70,44	57,00	83,40	0,4063	6,37	9,05	69,13	71,76
Długość kłosa Spike length (cm)	9,48	7,11	12,40	0,1877	1,37	14,45	9,20	9,76
Liczba kłosów z rośliny Spikes number per plant	6,92	4,20	9,60	0,1609	1,26	18,14	6,73	7,25
Liczba ziaren z rośliny Grains number per plant	137,99	70,6	263,2	0,1202	34,68	25,13	130,84	145,13
Masa ziaren z rośliny Grain weight per plant (g)	7,26	2,84	13,24	0,4533	2,12	29,33	6,82	7,69
Masa 1000 ziaren Weight of 1000 grains (g)	52,13	33,10	64,30	0,3865	6,21	11,92	50,85	53,41

W porównaniu z innymi zbożami ziarniaki jęczmienia podobnie jak pszenicy zawierają średnio od 11%–12% białka, czyli więcej niż kukurydza (9,5%) i ryż (7,5%) (Lockhart i Hurt, 1986). Jęczmiona nieoplewione w porównaniu z oplewionymi mają zwykle większą ogólną zawartość białka przy jego korzystniejszym składzie aminokwasowym

(Helm i in., 2004). Mimo zbliżonej średniej zawartości białka mutantów (16,98%) w porównaniu z ich formą wyjściową (16,85%) mutanty charakteryzowały się poszerzeniem zmienności tej cechy a jej zakres wynosił od 11,7% u M 52 do 22,82% u mutantu M 102 (tab. 3).

Tabela 3

Zawartość białka w ziarniakach nieoplewionych mutantów jęczmienia jarego i ich formy wyjściowej 1N/86 (kontrola)
Protein content in grain of hull-less spring barley mutants and their initial form 1N/86 (control)

Mutanty i ich forma wyjściowa Mutants and initial form	Zawartość białka w procentach suchej masy Protein content in per cent of dry matter
M 2	18,32
M 6	18,41
M 13	15,83
M 16	14,75
M 22	16,33
M 26	18,84
M 32	20,18
M 35	17,73
M 46	15,63
M 52	11,70
M 53	16,38
M 58	19,20
M 62	19,29
M 73	19,18
M 74	18,76
M 75	16,64
M 81	15,80
M 82	15,47
M 102	22,81
M 103	18,20
M 104	19,93
M 105	18,51
M 120	15,73
M 121	12,37
M 127	17,15
M 139	14,45
M 141	12,34
M 142	15,71
1N/86 – kontrola (control)	16,85

U nagoziarnistych linii jęczmienia zawartość białka wynosiła od 13–14% (Abdel-Fattach i El Sayed 2005) oraz 12,55–16,17%, przy zawartości białka u form oplewionych od 11,14 do 12,53% (Helm i in., 2004). Białko charakteryzuje się wysoką zawartością lizyny (Shewry 1993), a jego zawartość oraz zawartość włókna pokarmowego obniżała się wraz ze wzrostem plonu ziarna, wskazując na negatywną korelację między tymi cechami (Trop i in., 1981). Dla oceny podobieństwa mutantów pod względem badanych cech łącznie wyliczono odległości Mahalanobisa (tab. 4) Najbardziej podobnymi okazały się pary mutantów: M 46 — M 2 oraz M 16 — M 121, a najbardziej zróżnicowanymi: M 103 — M 62 oraz M 117 — M 62.

Tabela 4

Ocena podobieństwa między mutantami pod względem analizowanych cech określona na podstawie odległości Mahalanobisa

Estimation of similarity between the mutants for the analyzed traits calculated on the basis of Mahalanobis distance

Porównywane obiekty Compared objects	Najkrótsze odległości shortest distances	Porównywane obiekty Compared objects	Najdłuższe odległości longest distances
M13 – M84	3,130	M58 – M2	10,314
M82 – M139	3,101	M58 – M6	10,205
M139 – M35	3,093	M62 – M16	8,109
M35 – M6	2,000	M74 – M13	8,505
M35 – M16	2,294	M82 – M62	10,920
M16 – M121	0,955	M82 – M58	9,891
M16 – M127	2,010	M84 – M62	8,889
M127 – M52	2,457	M102 – M2	11,286
M52 – M28	2,814	M102 – M46	11,034
M28-M120	3,406	M102 – M6	9,833
M52 – M75	2,314	M102 – M82	9,185
M75 – M74	2,437	M103 – M62	13,787
M74 – M81	1,126	M103 – M46	11,074
M81 – M62	4,377	M103 – M32	10,602
M74 – M104	2,171	M103 – M28	10,578
M104 – M58	3,611	M103 – M81	9,325
M104 – M105	1,775	M117 – M62	13,295
M105 – M102	3,201	M117 – M58	10,754
M105 – M103	5,751	M117 – M102	10,205
M127 – M53	2,579	M117 – M81	9,583
M53 – M141	2,433	M120 – M103	12,869
M141 – M142	2,217	M120 – M102	10,694
M142 – M84	2,192	M120 – M117	10,031
M84 – M46	3,244	M120 – M13	9,946
M46 – M2	0,838	M120 – M58	9,241
M35 – M32	2,714	M139 – M62	10,625
M32 – M22	2,853	M139 – M102	9,659
M13 – M117	1,834	M139 – M58	9,624

W porównaniach mutantów z ich formą wyjściową (tab. 5) najmniejszym stopniem podobieństwa charakteryzowały się mutanty M 62, M 120, M 58 oraz M 81. Rozmieszczenie mutantów w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych pod względem kompleksu badanych cech przedstawiono na rysunku 1.

Metodę RAPD-PCR opracowaną przez dwie niezależne grupy badaczy (Williams i in., 1990; Welsh i McClelland, 1990) wykorzystano do oceny zmienności genetycznej mutantów na poziomie molekularnym. Jest to najprostsza w wykonaniu technika pozwalająca na szybkie wykrycie różnic w sekwencji DNA na obszarze całego genomu wykorzystując polimorfizm losowo amplifikowanych fragmentów DNA (Barua in., 1993; Hang i in., 2000; Kuczyńska i in., 2001). Stosując dziewięć starterów uzyskano 55 zamplifikowanych fragmentów DNA, z których 49,1% wykazywało polimorfizm. Średnia liczba zamplifikowanych fragmentów wynosiła więc 6,1, natomiast średnio 3,0 fragmenty na starter były polimorficzne. Otrzymana liczba fragmentów polimorficznych była niższa aniżeli uzyskana u odmian jęczmienia ozimego (66,8%) przy wykorzystaniu 24 starterów (Kuczyńska i in., 2003), lecz wyższa niż u łubinu gdzie przy wykorzystaniu 30 starterów liczba fragmentów polimorficznych wynosiła 39,7% (Przyborowski i Weeden, 2001).

Analizując paszowe i browarne odmiany jęczmienia jarego także przy zastosowaniu metody RAPD i 24 starterów uzyskano 149 zamplifikowanych produktów, z których 45% było polimorficzne (Kuczyńska i in., 2001).

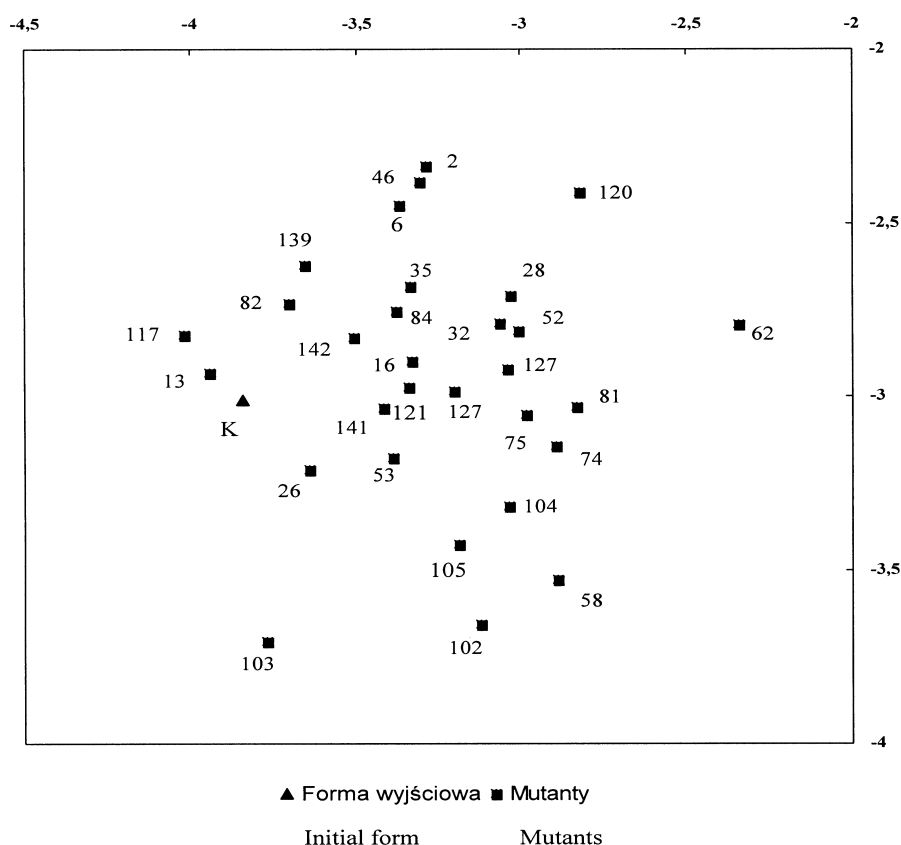
Tabela 5

Odległości Mahalanobisa oraz współczynnik podobieństwa genetycznego między mutantami a ich formą wyjściową 1N/86
The values of Mahalanobis distance and coefficient of genetic similarity between the initial form 1N/86 and the mutants

Rodzaj porównań Pair compared	Odległości Mahalanobisa Mahalanobis distance	Współczynnik podobieństwa genetycznego Coefficient of genetic similarity
1N/86-M62	12,033	0,816
1N/86-M120	9,518	0,868
1N/86-M58	8,092	0,929
1N/86-M81	8,003	0,875
1N/86-M102	7,945	0,894
1N/86-M74	7,578	0,920
1N/86-M105	7,482	0,860
1N/86-M2	7,471	0,805
1N/86-M28	7,344	0,907
1N/86-M75	7,298	0,916
1N/86-M 46	7,279	0,905
1N/86-M22	7,156	0,916
1N/86-M104	7,024	0,892
1N/86-M52	6,972	0,857
1N/86-M103	6,875	0,920
1N/86-M32	6,560	0,941
1N/86-M6	6,050	0,907
1N/86-M84	5,652	0,851
1N/86-M127	5,396	0,945
1N/86-M35	4,850	0,907
1N/86-M142	4,786	0,914
1N/86-M141	4,524	0,918
1N/86-M 53	4,271	0,867
1N/86-M16	4,198	0,902
1N/86-M121	4,154	0,905
1N/86-M139	3,524	0,911
1N/86-M82	3,292	0,907
1N/86-M26	2,605	0,860
1N/86-M117	2,415	0,948
1N/86-M13	1,191	0,867
Współczynnik korelacji Coefficient of correlation		-0,303
istotny dla poziomu P = 0,1; significant at level P = 0.1		

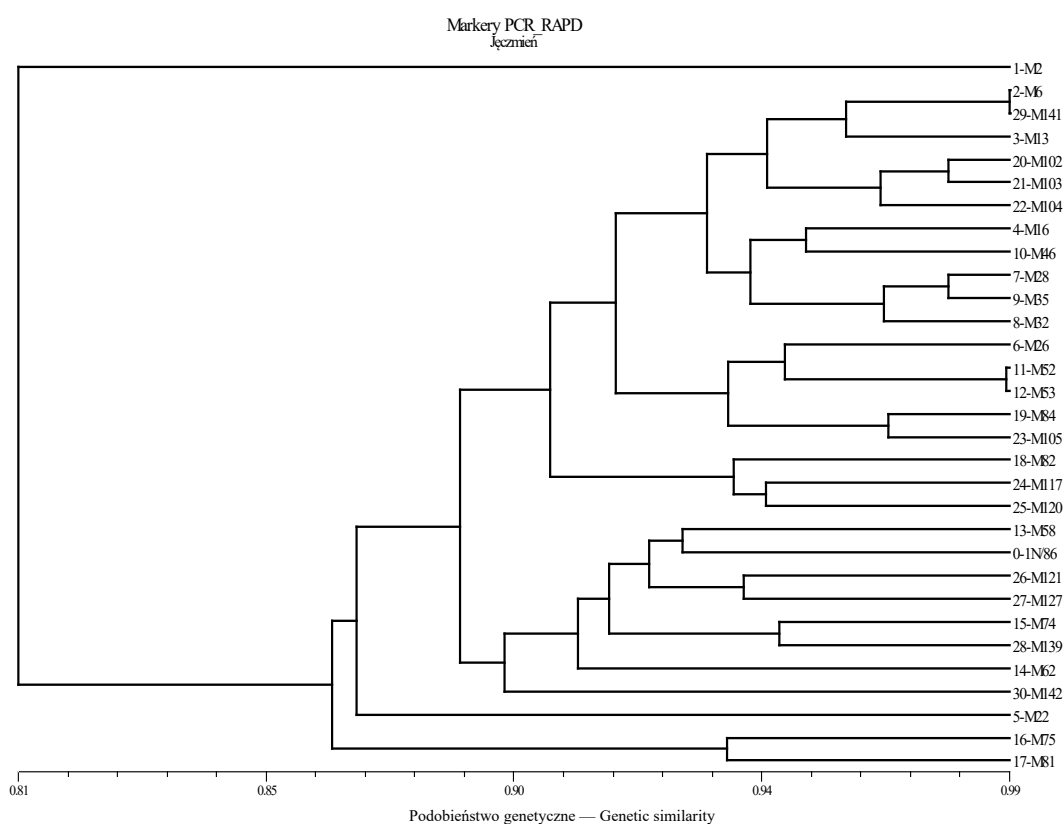
Uzyskane wyniki reakcji RPD-PCR dla każdego z czterech powtórzeń danego mutantu były identyczne jak i dla każdego z użytych starterów. Współczynniki podobieństwa genetycznego według Nei'a dla poszczególnych mutantów i formy wyjściowej przedstawiono w tabeli 5. Otrzymane wartości współczynnika dla par: mutant — forma wyjściowa były podobne, co niewątpliwie wynika z faktu, że mutanty mają ten sam rodowód, a różnice wynikać mogą tylko z efektu działania mutagenu. Największym podobieństwem pod względem genetycznym w porównaniu z formą wyjściową charakteryzowały się mutanty M 32 i M 127. Najmniej podobnymi były M 2, M 62, M 84

i M 81, przy czym różnica między największą a najmniejszą wartością współczynnika podobieństwa genetycznego jest niewielka. W badaniach nad podobieństwem genetycznym sześciu nieoplewionych i browarnych odmian jęczmienia stosowano pięć starterów uzyskując 34 fragmenty RAPD, a zakres współczynnika podobieństwa genetycznego wynosił od 0,53 do 0,85 (Kroth i in., 2005). Wykorzystując pięć starterów u nagoziarnistych odmian jęczmienia Giza 130 i Giza 131 uzyskano polimorficzne fragmenty w metodzie RAPD a otrzymane wyniki wykazały znaczne różnice genetyczne między analizowanymi odmianami (El-Sayed i in., 2004). Z kolei w badaniach odmian browarnych, lecz oplewionych wartość współczynnika była zróżnicowana w obrębie par odmian i wynosiła od 0,38 do 0,89 (Kuczyńska i in., 2001).



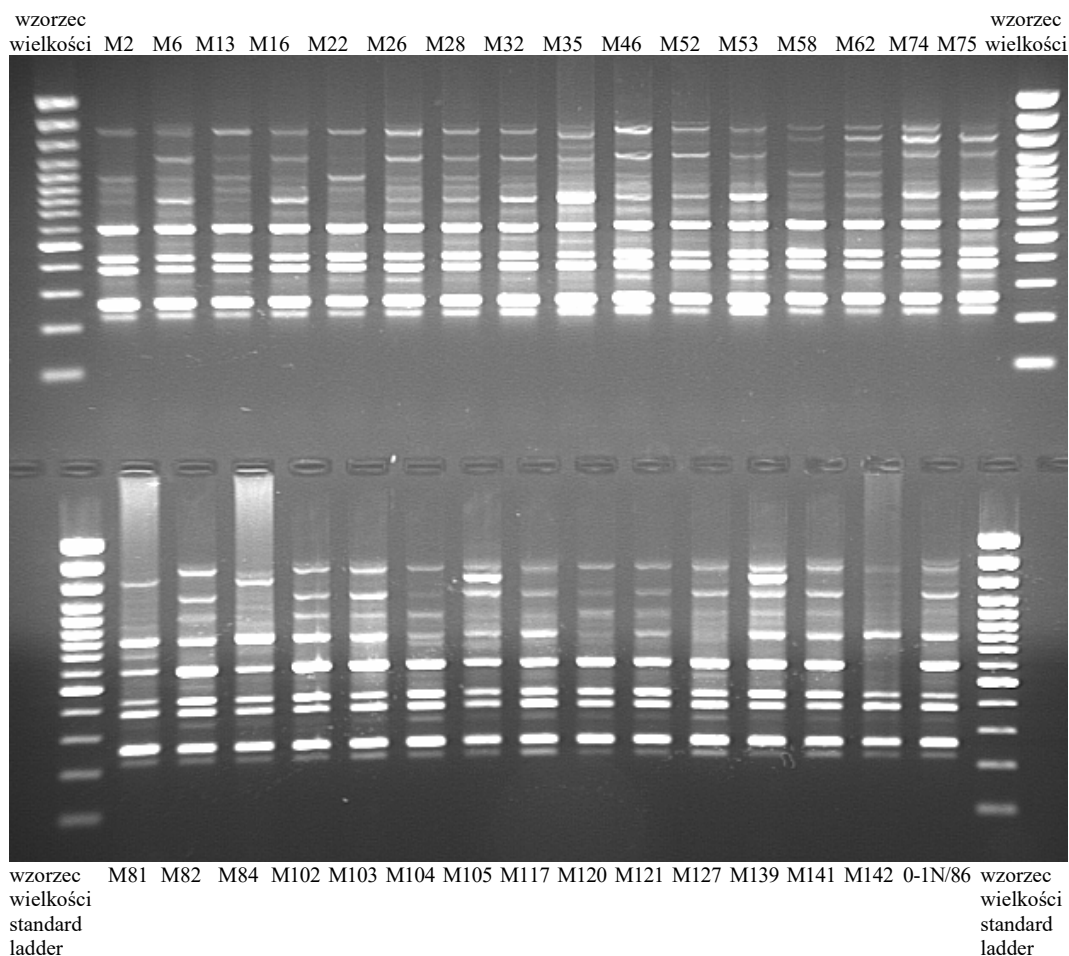
Rys. 1. Rozmieszczenie mutantów i ich formy wyjściowej 1N/86 w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych pod względem badanych cech
Fig. 1. Distribution of mutants and their initial form – 1N/86 in the space of two first canonical variables for the analyzed traits

Przedstawione w tabeli 5 wartości odległości Mahalanobisa oraz wartości współczynnika podobieństwa genetycznego pozwoliły na ocenę uzyskanej zmienności zarówno na poziomie fenotypowym jak i molekularnym. Współczynnik korelacji dla wartości na obu poziomach zmienności był stosunkowo niski i wynosił $-0,303$ wskazując, że obserwowana zmienność na poziomie fenotypowym w ograniczonym stopniu znajduje odzwierciedlenie w zmianach w DNA. Mimo słabej korelacji wyróżnić można mutanty, które na obu poziomach wykazują niski stopień podobieństwa do ich formy wyjściowej (M 2, M 62, M 81 i M 120). Nie można jednak wykluczyć, że szerszy wybór analizowanych cech mutantów ocenianych na poziomie fenotypowym i trafniejszy dobór starterów mógłby wpłynąć na wzrost wartości współczynnika korelacji. W badaniach Kuczyńskiej i in. (2004) nad jęczmieniem jarym z wykorzystaniem metody RAPD wykazano również niską, lecz statystycznie istotną korelację między dystansem fenotypowym (odległości Mahalanobisa) a dystansem genetycznym.



Rys. 2. Hierarchiczne grupowanie mutantów na podstawie podobieństwa genetycznego
Fig. 2. Hierarchical grouping of mutants on the basis of genetic similarity

Prezentowany dendrogram (rys. 2) wykonany na podstawie współczynników podobieństwa genetycznego nie pozwala na wyróżnienie wyraźnych skupień mutantów. Może to wskazywać na mało zróżnicowaną pulę genów mutantów w odniesieniu do zmian wywołanych działaniem mutagenów. Nie można jednak wykluczyć, że uzyskana liczba polimorficznych fragmentów DNA okazuje się niewystarczająca do wykazania różnic między mutantami oraz między mutantami a ich formą wyjściową na poziomie molekularnym. Na rysunku 3 przedstawiono przykładowy faliogram obrazujący rozdział zamplifikowanych fragmentów DNA badanych obiektów, otrzymany w wyniku zastosowania startera 1 (5'-GTGCCTAACG-3').



Rys. 3. Wyniki rozdziału fragmentów RAPD dla analizowanych mutantów jęczmienia jarego uzyskanych z zastosowaniem startera 1 (5'-GTGCCTAACG-3')

Fig. 3. Results of RAPD analysis for the studied barley mutants with the primer 1 (5'-GTGCCTAACG-3')

WNIOSKI

1. Mutageneza okazała się efektywną metodą zwiększenia zmienności genetycznej cech u jęczmienia nagoziarnistego 1N/86.
2. Większość mutantów w porównaniu z ich formą wyjściową charakteryzowała się obniżoną wysokością roślin, krótszym kłosem, niższymi parametrami struktury plonu a zwłaszcza obniżoną masą 1000 ziaren. Kilka mutantów pod względem cech struktury plonu nie odbiegało istotnie od formy wyjściowej.
3. Zastosowane chemomutageny wywołały poszerzenie zakresu zmienności zawartości białka w ziarniakach mutantów w porównaniu z ich formą wyjściową. Mimo zbliżonej średniej zawartości białka u odmiany wyjściowej i mutantów (16,85 i 16,98%) zakres zmienności tej cechy dla mutantów wynosił od 11,7 do 22,8%.
4. Uzyskany polimorfizm fragmentów DNA nie pozwolił na wyodrębnienie zdecydowanych grup mutantów różniących się znacząco na poziomie molekularnym a zróżnicowanie współczynników podobieństwa między poszczególnymi mutantami a ich formą wyjściową było niewielkie. Stosunkowo niski współczynnik korelacji między zmiennością na poziomie fenotypowym (odległości Mahalanobisa) i molekularnym (współczynniki podobieństwa genetycznego) wynoszący -0,303 wskazuje na słaby związek między zmiennością obserwowaną na poziomie fenotypowym i molekularnym.

LITERATURA

- Abdel-Fattach, El-Sayed A. A. 2005. Improvement of food hull-less barley in Egypt. International Workshop on Food Barley Improvement, 14–17 January 2002, Hammamet, Tunisia. Proceedings: 7 — 12.
- Akhuary S.B., Sinha A.N., Sinha A. K. 1996. The effectiveness and efficiency of chemical mutagens on biological parameters in hull-less variety of *Hordeum vulgare* (L.) Karan. Neo Botanica 4 (1): 1 — 5.
- Arumugan S., Reddy V. R. K., Asir R., Viswanathan P., Dhamodaran S. 1997. Induced mutagenesis in barley. Advances in Plant Science 10 (1): 103 — 106.
- Barua U. M., Chalmers K. J., Hackett C. A., Thomas W. T. B., Powell W., Waugh R. 1993. Identification of RAPD markers linked to the *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. Heredity 71: 177 — 184.
- Beames R. M., Helm J. H., Eggum B.O., Boisen S., Bach Knudsen K. E., Swift M. L. 1996. A comparison of methods for measuring the nutritive value for pigs of a range of hulled and hullless barley cultivars. Anim. Feed Sci. Technol. 62: 189 — 201.
- Bhatty R. S., Brdhal J. D., Christison G. I. 1975. Chemical composition and digestible energy of barley. Can. J. Anim. Sci., 55: 759 — 764.
- Bhatty R. S. 1986. The potential of hull-less barley — review. Cereal Chem., 63: 97 — 103.
- Bhatty R. S. 1993. Nonmalting uses of barley. In: A. MacGregor and R.S.Bhatty (ed), Barley: Chemistry and Technology. AACC: 355 — 417.
- Bhatty R. S. 1996. Nonwheat grains and products — production of food malt from hull-less barley. Cereal Chemistry 73 (1): 75 — 80.
- Bhatty R.S. 1997. Milling of regular and waxy starch hull-less barleys for the production of bran and flour. Cereal Chemistry 74 (6): 693 — 699.
- Bhatty R. S., Rossnagel B. G. 1998. Comparison of pearled and unpearled Canadian and Japanese barleys. Cereal Chemistry 75 (1): 15 — 21.
- Caliński T., Dyczkowska A., Kaczmarek Z. 1976. Algorytmy Biometrii i Statystyki, Zeszyt 5: 77 — 113.

- Campbell S. G., Mehra R. B., Agrawal S.K., Chen Y. Z., Abd El Moneim A.M., 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.
- Ceranka B., Chudzik H., Czajka S., Kaczmarek Z. 1987. Wielozmienna analiza wariancji dla doświadczeń wieloczynnikowych. *Algorytmy Biometrii i Statystyki. Zesz.* 6: 51 — 60
- Choo T. W., Ho K. H., Martin R. A. 2001. Genetic analysis of hullless x covered cross of barley using doubled-haploids lines. *Crop Sci.* 41: 1021 — 1026.
- Czembor H. J. 1989. Stan i perspektywy hodowli w Polsce. *Biul. IHAR 171-172*: 5 — 14.
- Czembor H. J. 1997. Hodowla jęczmienia w Polsce i Europie. *Agrotechnika i Wykorzystanie Jęczmienia, Seminarium Naukowe. Puławy, 23–24 października 1997*: 41 — 48.
- Dziamba S., Rachoń L. 1988. Zróżnicowanie elementów struktury plonu nagoziarnistych i oplewionych odmian jęczmienia jarego uprawianych w siewie czystym i mieszanym. *Biul. IHAR 167*: 79 — 85.
- El-Sayed A. A., El-Enein R. A., El-Gamal A. S. 2004. Two new hull-less barley varieties for rainfed in Egypt. New directions for a diverse plant. 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 26 Sep. – 1 Oct. 2004. Ed. — Fischer T., Proceedings: 28
- Eslick R. F., Blake T., Stallknecht G. 1990. Registration of Wanubet a hullless waxy barley germplasm. *Crop Science* 30 (6): 1371.
- Górny A. 2004. *Zarys Genetyki Zbóż (Zarys Genetyki Jęczmienia)*, IGR PAN, Poznań. Tom 1: 15 — 142.
- Hang A., Burton C. S., Hoffman D. L., Jones B. L. 2000. Random amplified polymorphic primer-generated embryo DNA polymorphism among 16 North American malting barley cultivars. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58 (4): 147 — 151.
- Harlan H. V., Martini M. L., Stevens H. 1940. A study on methods in barley breeding. USDA Washington DC, Technical Bull. 720.
- Helm C. V., De Francisco Gaziola S A., Fornazier R. F., Pompeu G. B., Azevedo R. A. 2004. Hull-less barley varieties: storage proteins and amino acid distribution in relation to nutritional quality. *Food Biotechnology* 18 (3): 327 — 341.
- Kolasińska K., Boros L. 2003. Wartość siewna oplewionych i nieoplewionych nasion jęczmienia jarego. *Hod. Rośl.Nasien.* 1/2003: 14 — 15.
- Kroth M. A., Ramella M. S., Tagliari C., De Francisco A., Arisi A. C. M. 2005. Genetic similarity of Brazilian hull-less and malting barley varieties evaluated by RAPD markers. *Sci. Agric.* 62 (1): 36 — 39.
- Kuczyńska A., Milczarski P., Surma M., Masojć P., Adamski T. 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Appl. Genet.* 42 (1): 43 — 48.
- Kuczyńska A., Bocianowski J., Masojć P., Surma M., Adamski T. 2003. Zastosowanie markerów RAPD do określenia podobieństwa genetycznego odmian jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.). *Biul. IHAR 226/227* (1): 81 — 85.
- Kuczyńska A., Bocianowski J., Surma M., Kaczmarek Z., Adamski T. 2004. Relationship between phenotypic and genetic distances in a set of barley breeding lines. 9th International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic, 20-26 June, Proc., 33.
- Lockhart H.N., Hurt D.H. 1986. Nutrition of oats. In: Webster (ed.). *Oats: chemistry and technology*. St. Paul, AACC: 73 — 130.
- McGuire C.F., Hockett. 1981. Effect of awn length and naked caryopsis of malting quality of Betzes barley. *Crop Sci.* 21: 18 — 21.
- Nagy J.G. 2003. Economic returns to feed barley yield-increasing and disease resistance research at the Alberta Field Crop Development Centre. *Canadian J. of Agricultural Economics* 51(30): 281 — 298.
- Nam I.H., Lee E.S. 1990. Effect of waxy hullless genes on endosperm quality, yield and its related traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Upland and Industrial Crops* 32(2): 1 — 12.
- 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.
- Noworolnik K., Leszczyńska D. 2004. Reakcja nagoziarnistego jęczmienia jarego na gęstość siewu w porównaniu z jęczmieniem oplewionym. *Biul. IHAR 233*: 99 — 105.
- Paris R. L. 1999. Development of hullless varieties as an improved feed crop. *Barley Newsl.*, 43: 30.

- Przyborowski J.A., Weeden N.F. 2001. RAPD-based assessment of genetic similarity and distance between Lupinus in section Albus. *J. Appl. Genet.* 42 (4): 55 — 61.
- 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., Patyna H., Przewoźny T. 1993. Mutagenic effect of laser and chemical mutagens in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genetica Polonica* 34 (4): 337 — 343.
- Scholz F. 1965. Experiments on the use of induced mutants to hybridization breeding in barley. *Induction of Mutations and the Mutation Process*, Praha: 73 — 79.
- Shewry P.R. 1993. Barley seeds proteins. In: MacGregor and Bhatti, *Barley: Chemistry and technology*. St. Paul, AACC: 1 — 5.
- Takahashi R.H., Inamura H., Matsumoto T. 1961. Effect of genes for covered and naked kernels on some agronomic characters in barley. I. Comparison of two covered and their naked mutants. *Ber. Ohara Inst. Landwirtschaft. Biol., Okayama Univ.* 11: 385 — 392.
- Thair M., Shevtsov V. 1994. New hull-less barley germplasm for high — altitude areas. *Rachis* 13(1/2): 43 — 46.
- Trop J., Doll H., Haahr V. 1981. Genotypic and environmental influence upon the nutritional composition of barley grain. *Euphytica* 30 (30): 719 — 728.
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213 — 7218.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 — 6535.
- Vaidya S. M., Mahabalan M. 1989. Karan 3 and Karan 16 — two high yielding hull-less barley varieties. *Indian Farming* 39 (7): 37 — 38.
- Xue Q., Wang L., Newman R. K., Newman C. W., Graham H. 1997. Influence of hullless, waxy starch and short-awn genes on the composition of barleys. *J. of Cereal Sci.* 26(2): 251 — 257.
- Yang W. Z., Beauchemin B. I., Farr B. I., Rode L. M. 1997. Comparison of barley, hull-less barley, and corn in the concentrate of dairy cow. *J. Dairy Sci.* 80: 2885 — 2895.