

WYKORZYSTANIE WIELOWYMIAROWEJ METODYKI OCENY CECH  
ILOŚCIOWYCH MUTANTÓW ŁĘDŹWIANU SIEWNEGO  
(*LATHYRUS SATIVUS* L.) UZYSKANYCH DZIAŁANIEM  
CHEMOMUTAGENÓW I ŚWIATŁA LASERA HELOWO-NEONOWEGO

*Jan Bocianowski<sup>1</sup>, Wojciech Rybiński<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Akademia Rolnicza  
ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań  
e-mail: jboc@au.poznan.pl

<sup>2</sup>Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

**Streszczenie.** Łędwian siewny jest jednym z najstarszych gatunków uprawnych i był znany już 8000 lat przed Chrystusem. Historia uprawy łędwianu siewnego w Polsce nie jest dokładnie znana i według niektórych autorów przyjmuje się, że gatunek ten dotarł w rejon Podlasia w XVII wieku wraz z osadnictwem tatarskim, towarzysząc soczewicy jako chwast. Mimo niekwestionowanych zalet łędwian siewny charakteryzuje się także mniej pożądanymi cechami. Jednym z warunków szerszego wprowadzenia łędwianu do krajowego rolnictwa jest genetyczne ulepszenie niekorzystnych cech. Oprócz efektów rekombinacji taką możliwość oferuje indukowanie mutacji jako wartościowe uzupełnienie klasycznej metody hodowli roślin. Właśnie mutageneza może być wykorzystana przez hodowców roślin do tworzenia dodatkowej zmienności genetycznej wprowadzanej do nowych odmian łędwianu siewnego dla specyficznych celów użytkowych czy odmian o specyficznej zdolności adaptacyjnej. W pracy przedstawiono wyniki wielozmiennych badań nad oceną zmienności genetycznej cech ilościowych mutantów łędwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.). Materiał do badań stanowiło 20 mutantów i dwie odmiany wyjściowe: Derek i Krab. Mutanty uzyskano działaniem na nasiona odmian Derek i Krab światła lasera helowo-neonowego w kombinacji z dwoma chemomutagenami, a mianowicie MNU (N-nitroso-N-metylomocznik) i azydkiem sodu ( $\text{NaN}_3$ ). Obserwacje dotyczyły ośmiu cech ilościowych (wysokość rośliny, wysokość osadzania najniższego strąka, liczba rozgałęzień z rośliny, liczba strąków z rośliny, długość strąka, liczba nasion z rośliny, masa nasion z rośliny, masa 1000 nasion). Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą metod wielowymiarowych. Analiza zmiennych kanonicznych okazała się skutecznym narzędziem do czytelnej oceny różnicowania genetycznego mutantów łędwianu.

**Słowa kluczowe:** łędwian siewny, laser helowo-neonowy, analiza zmiennych kanonicznych

## WSTĘP

Lędzwan siewny (*Lathyrus sativus* L.) charakteryzuje się dużą odpornością na suszę oraz przymrozki, choroby grzybowe i szkodniki oraz rzadko spotykaną wśród roślin strączkowych tolerancją na rodzaj gleb. Lędzwan siewny uprawiany na nasiona dobre warunki wzrostu i rozwoju znajduje na glebach lekkich i średnich, o odczynie obojętnym lub lekko zasadowym [3, 9].

Potencjał plonowania lędzwanu jest bardzo szeroki i wynosi od 15-50 dt·ha<sup>-1</sup>. W praktyce jednak, w słabszych i średnich warunkach glebowo-klimatycznych, przeważnie zbiera się z 1 ha 15-30 dt nasion. Jednym z najważniejszych czynników wysokiego plonowania lędzwanu jest wczesny termin siewu, tj. już w momencie obeschnięcia gleby do stanu umożliwiającego wykonanie pierwszych niezbędnych uprawek.

Nasiona lędzwanu siewnego mogą być wykorzystywane do konsumpcji, na paszę lub do produkcji kazeiny. O wartości żywieniowej tej rośliny decyduje stosunkowo duża zawartość w nasionach białka (28-32%) oraz obecność wielu cennych pierwiastków mineralnych: cynku, miedzi, sodu, magnezu i wapnia [8].

Celem tej pracy jest wielo cechowa charakterystyka zmienności genetycznej ośmiu cech ilościowych dwu odmian lędzwanu siewnego (drobnonasienna Derek i średnionasienna Krab) oraz dwudziestu wybranych mutantów. Zastosowano metodę analizy zmiennych kanonicznych [1,5,12,13], opartą na modelu wielowymiarowej analizy wariancji dla obserwacji cech w dwuletnim doświadczeniu polowym, zaplanowanym w układzie bloków losowanych.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły dwie krajowe odmiany lędzwanu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) Derek i Krab oraz 20 wybranych mutantów lędzwanu siewnego uzyskanych w wyniku traktowania nasion odmian wyjściowych światłem lasera helowo-neonowego o długości fali 632 nm i chemomutagenami (N-nitroso-N-metylomocznik oraz azydek sodu). Doświadczenie przeprowadzone było w latach 2002 i 2003 na polu doświadczalnym Instytutu Genetyki Roślin PAN w Cerekwicy w układzie bloków losowanych w trzech powtórzeniach. Nasiona wysiewano na poletka w rozstawie 15 × 30 cm. Materiał badawczy analizowany był pod względem ośmiu cech ilościowych: wysokości roślin (cm), wysokości osadzania najniższego strąka (cm), liczby rozgałęzień z rośliny (szt.), liczby strąków z rośliny (szt.), długości strąka (cm), liczby nasion z rośliny (szt.), masy nasion z rośliny (g) i masy 1000 nasion (g).

Uzyskane wyniki analizowano statystycznie za pomocą metod wielowymiarowych [2]. Metody wielowymiarowe wybrano ze względu na fakt, iż obserwowane w doświadczeniach cechy są ze sobą w znacznym stopniu skorelowane.

Przeprowadzona dwuczynnikowa wielozmienna analiza wariancji, z obiektami, latami jako czynnikami, umożliwiła weryfikację hipotez wielowymiarowych o braku różnic pomiędzy obiektami, pomiędzy latami oraz hipotezy o braku interakcji obiekty  $\times$  lata [2,6]. Graficzne rozmieszczenie odmian Krab i Derek oraz mutantów lędźwianu na płaszczyźnie ze względu na wszystkie cechy łącznie możliwe było w wyniku zastosowania analizy zmiennych kanonicznych [4,10]. Analiza zmiennych kanonicznych umożliwia transformację obserwacji wielowymiarowych w przestrzeń dwuwymiarową.

### WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzona dwuczynnikowa wielocechowa analiza wariancji, której wyniki przedstawiono w tabeli 1, pozwoliła odrzucić testowane hipotezy dotyczące braku różnic między obiektami (odmiany Derek i Krab oraz mutanty lędźwianu), między latami oraz hipotezę o braku interakcji obiekty  $\times$  lata. Istotne zróżnicowanie genotypów lędźwianu siewnego po działaniu środków mutagenicznych obserwowali między innymi Nerkar [7] oraz Singh i Chaturvedi [11]. Wybór wielowymiarowych metod analizy statystycznej wyników doświadczenia uzasadniony był faktem, że obserwowane w doświadczeniu cechy są ze sobą skorelowane, a więc analizowanie ich tylko oddzielnie, niezależnie jedna po drugiej jest niewskazane.

**Tabela 1.** Wartości statystyki  $F$  w wielozmiennej dwuczynnikowej analizie wariancji  
**Table 1.**  $F$ -statistics values in two-factor multivariate analysis of variance

Źródło zmienności Source of variation	Statystyka $F$ dla ośmiu cech łącznie F-statistics for eight traits jointly	Wartość krytyczna na poziomie $\alpha = 0,001$ Critical value at $\alpha = 0.001$ level
Obiekty – Objects	12,05	1,440
Lata – Years	2149,91	3,699
Obiekty $\times$ Lata Objects $\times$ Years	8,26	1,440

Wyniki analizy korelacji w poszczególnych latach (2002 i 2003) oraz dla obu lat łącznie przeprowadzono w celu oceny współzależności badanych cech i przedstawiono w tabeli 2. Wskazują one na silny związek pomiędzy liczbą strąków z rośliny a liczbą nasion z rośliny, liczbą strąków z rośliny a masą nasion z rośliny, liczbą nasion z rośliny a masą nasion z rośliny, liczbą nasion z rośliny a masą 1000 nasion w doświadczeniach prowadzonych w 2002 roku, 2003 roku, jak i w przypadku analizy dla obu lat łącznie. Ponadto obserwowano istotny statystycznie związek siedmiu par cech w 2002 roku i dla obu lat łącznie.

**Tabela 2.** Współczynniki korelacji dla ośmiu cech roślin łądzwianu siewnego

**Table 2.** Correlation coefficients of eight traits of grasspea

Parametry Parameters	Lata Years	Wysokość rośliny Plant height	Wysokość osadzenia najniższego strąka Height of the lowest pod	Liczba rozgałęzień z rośliny Number of branches per plant	Liczba strąków z rośliny Number of pods per plant	Długość strąka Pod length	Liczba nasion z rośliny Number of seeds per plant	Masa nasion z rośliny Weight of seeds per plant
Wysokość osadzenia najniższego strąka Height of the lowest pod	2002	0,535*						
	2003	0,316						
	2002 i 2003	0,548**						
Liczba rozgałęzień z rośliny Number of branches per plant	2002	0,700***	0,545**					
	2003	0,000	-0,156					
	2002 i 2003	0,590**	0,435*					
Liczba strąków z rośliny Number of pods per plant	2002	0,255	-0,214	0,294				
	2003	0,629**	-0,058	0,368				
	2002 i 2003	0,314	-0,137	0,379				
Długość strąka Pod length	2002	0,274	0,168	0,376	0,036			
	2003	-0,204	0,145	-0,065	-0,273			
	2002 i 2003	0,084	0,159	0,145	-0,182			

Liczba nasion	2002	0,077	-0,172	-0,056	0,589**	0,097		
z rośliny	2003	0,410	-0,046	0,102	0,836***	0,015		
Number of seeds	2002 i 2003	0,096	-0,132	-0,048	0,694**	-0,007		
per plant								
Masa nasion	2002	0,350	0,166	0,524*	0,460*	0,758***	0,444*	
z rośliny	2003	0,495*	0,018	0,220	0,664**	0,352	0,704***	
Weight of seeds	2002 i 2003	0,414	0,271	0,517*	0,446*	0,595**	0,444*	
per plant								
Masa 1000 nasion	2002	0,259	0,334	0,531*	-0,153	0,668**	-0,493*	0,537**
1000-grain weight	2003	-0,080	0,029	0,061	-0,449*	0,392	-0,595**	0,131
	2002 i 2003	0,212	0,409	0,423*	-0,420	0,556**	-0,633***	0,381

\* istotne na poziomie  $\alpha = 0,05$ ; significant at  $\alpha = 0.05$

\*\* istotne na poziomie  $\alpha = 0,01$ ; significant at  $\alpha = 0.01$

\*\*\* istotne na poziomie  $\alpha = 0,001$ ; significant at  $\alpha = 0.001$

Szczegółowa analiza pozwoliła zaobserwować kształtowanie się wartości średnich odmian i mutantów dla poszczególnych obserwowanych cech w kolejnych latach badań (tab. 3). Na szczególną uwagę zasługuje wystąpienie statystycznie istotnego przewyższenia obu odmian przez ich mutanty pod względem masy 1000 nasion w 2002 roku. Wystąpienie efektów transgresji dla masy 1000 nasion w sprzyjających warunkach środowiskowych, jakie wystąpiły w 2002 roku, są obiecującą prognozą na uzyskanie korzystnych genotypów na drodze mutagenезy. W kolejnym roku badań jedynie mutanty odmiany Derek statystycznie istotnie przewyższały formę wyjściową pod względem masy 1000 nasion.

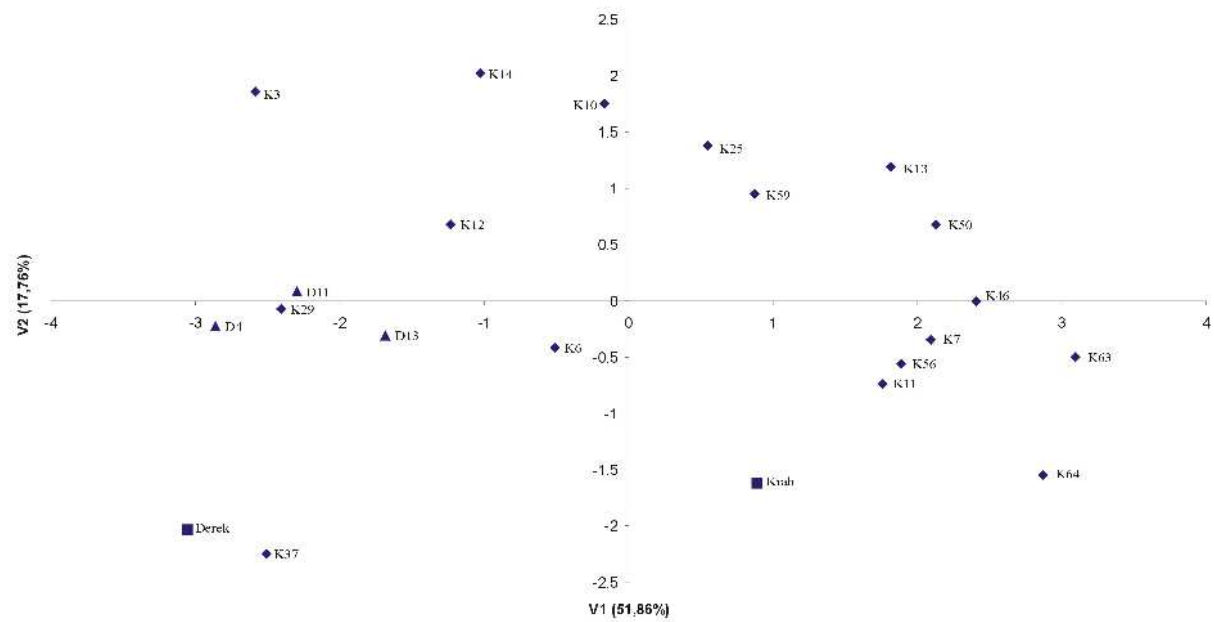
Położenie mutantów lędźwianu oraz form wyjściowych w układzie dwu pierwszych zmiennych kanonicznych dla obu lat łącznie przedstawiono na rysunku 1. Wskazuje on na zgrupowanie mutantów będących wynikiem traktowania nasion odmiany Derek, jednakże znacznie oddalonych od formy wyjściowej. Spośród mutantów uzyskanych z odmiany Krab, te oznaczone symbolami K3 i K14 są najbardziej oddalone od formy wyjściowej, co świadczy o ich znacznym zróżnicowaniu genetycznym pod względem kompleksu badanych cech i przydatności jako materiału wyjściowego do krzyżowań. Zauważyć należy, iż procent zmienności wyjaśnianej przez dwie pierwsze zmienne kanoniczne wynosi 69,62%.

Odrzucenie hipotezy o braku interakcji obiekty  $\times$  lata jest skutkiem wystąpienia w 2003 roku silnego stresu abiotycznego wywołanego długotrwałą suszą w pierwszych miesiącach wegetacji. W związku ze znacznym zróżnicowaniem obu lat badań ze względu na występujące warunki atmosferyczne analizę zmiennych kanonicznych przeprowadzono niezależnie dla 2002 oraz 2003 roku. Na rysunkach 2 i 3 przedstawiono położenie mutantów i form wyjściowych lędźwianu w układzie dwu pierwszych zmiennych kanonicznych w roku, odpowiednio, 2002 i 2003. Procent zmienności wyjaśnianej przez dwie pierwsze zmienne kanoniczne jest w obu latach podobny (62,27% w 2002 r. oraz 62,12% w 2003 r.), jednakże dla poszczególnych zmiennych kanonicznych rozkłada się różnie (patrz odpowiednie rysunki 2 i 3). Rozkład mutantów oraz odmian Derek i Krab w poszczególnych latach również jest różny, jednakże mutanty otrzymane z odmiany Derek zarówno w 2002, jak i 2003 r. skupione są w pobliżu formy wyjściowej. W 2002 roku mutanty K3 oraz K37 charakteryzowały się największym zróżnicowaniem w stosunku do formy wyjściowej Krab mierzonej odległością Mahalanobisa, natomiast w kolejnym 2003 roku były to mutanty K3 i K14. Ze względu na różne rozmieszczenie odmian i ich mutantów w latach 2002 i 2003 spowodowane długotrwałą suszą w 2003 roku wyciąganie wniosków genetyczno-hodowlanych wymaga kontynuowania badań w kolejnych latach oraz być może innych miejscowościach.

**Tabela 3.** Wartości średnie w latach dla cech lędźwianu siewnego

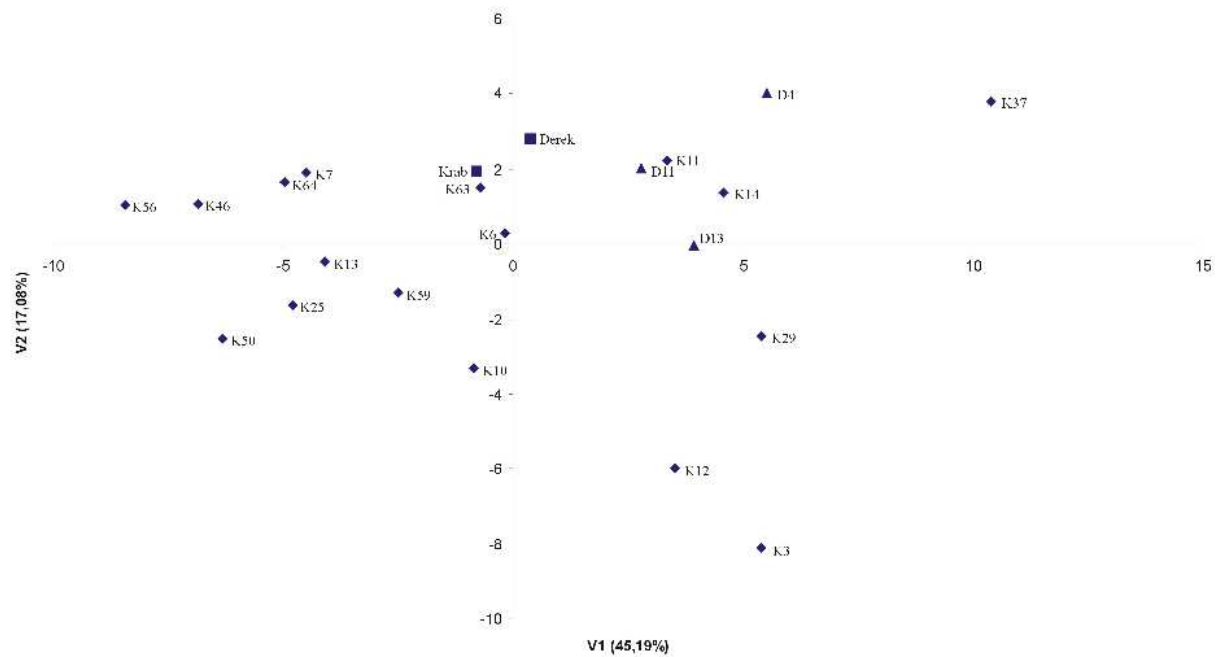
**Table 3.** Averages from years for grass pea traits

Obiekty Objects	Wysokość roślin Plant height (cm)		Wysokość osadzenia najniższego strąka Height of the lowest pod (cm)		Liczba rozgałęzień z rośliny Number of branches per plant		Liczba strąków z rośliny Number of pods per plant		Długość strąka Pod length (cm)		Liczba nasion z rośliny Number of seeds per plant		Masa nasion z rośliny Weight of seeds per plant (g)		Masa 1000 nasion 1000-grain weight	
	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003
Krab	83,9	34,1	20,1	10,0	13,9	10,91	96,3	49,7	3,90	4,03	329,9	128,0	51,1	25,6	154,4	199,8
Mutanty odmiany Krab Mutants of Krab cv.	83,2	32,0	18,7	11,6	13,2	8,57	86,7	43,4	3,55	3,89	228,8	115,6	36,2	20,0	161,1	175,4
Derek	92,5	33,3	20,6	11,1	12,7	7,80	99,7	59,9	3,33	3,83	342,4	200,9	34,5	24,9	100,9	123,7
Mutanty odmiany Derek Mutants of Derek cv.	73,8	32,4	18,8	11,5	11,1	8,33	85,9	55,8	3,31	3,85	236,4	171,1	27,1	24,4	115,1	144,4
NIR, LSD, $\alpha=0,001$	3,92	3,96	1,43	1,43	2,57	1,49	12,47	8,52	0,17	0,17	40,7	30,0	6,5	5,1	30,80	39,66

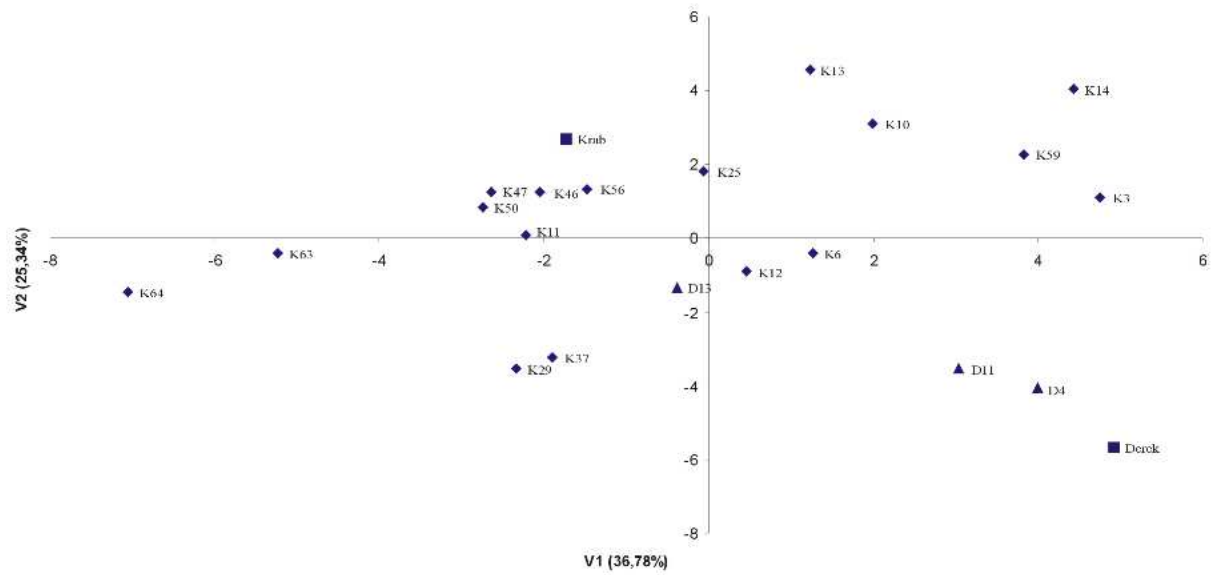


**Rys. 1.** Położenie mutantów lędźwianu oraz odmian Derek i Krab w układzie dwu pierwszych zmiennych kanonicznych dla obu lat łącznie  
**Fig. 1.** Distribution of grasspea mutants and cultivars Derek and Krab in the space of two canonical variates for both years jointly





**Rys. 2.** Położenie mutantów łądźwianu oraz odmian Derek i Krab w układzie dwu pierwszych zmiennych kanonicznych dla 2002 roku  
**Fig. 2.** Distribution of grasspea mutants and cultivars Derek and Krab in the space of two canonical variates for 2002



**Rys. 3.** Położenie mutantów lędźwianu oraz odmian Derek i Krab w układzie dwu pierwszych zmiennych kanonicznych dla 2003 roku  
**Fig. 3.** Distribution of grasspea mutants and cultivars Derek and Krab in the space of two canonical variates for 2003

## WNIOSKI

1. Naświetlanie nasion światłem lasera helowo-neonowego przed zastosowaniem chemomutagenów, okazało się efektywnym postępowaniem metodycznym umożliwiającym zwiększenie zakresu zmienności genetycznej cech struktury plonu u uzyskanych mutantów w porównaniu z ich odmianami wyjściowymi – Derek i Krab.

2. Występuje ujemna zależność pomiędzy masą 1000 nasion a liczbą nasion z rośliny oraz dodatnia zależność pomiędzy liczbą strąków z rośliny a liczbą nasion z rośliny i masą nasion z rośliny oraz pomiędzy liczbą nasion z rośliny a masą nasion z rośliny w poszczególnych latach, a także dla obu lat łącznie.

3. Zastosowanie wielozmiennych metod statystycznych umożliwiło odrzucenie hipotez o braku różnic między obiektami, między latami oraz hipotezy o braku interakcji obiekty  $\times$  lata dla wszystkich ośmiu cech ilościowych łącznie.

4. Na podstawie analizy zmiennych kanonicznych wyróżniono mutanty najbardziej oddalone przestrzennie od swych odmian wyjściowych. Są to genotypy charakteryzujące się największym zróżnicowaniem genetycznym pod względem badanych cech łącznie i mogą stanowić wartościowy materiał wyjściowy do krzyżowań w pracach hodowlanych nad lędźwianem siewnym.

## PIŚMIENNICTWO

1. **Adujna W., Labuschagne M.T.:** Cluster and canonical variate analyses in multilocation trials of linseed. *J. Agric. Sci.*, 140, 297-304, 2003.
2. **Caliński T., Kaczmarek Z.:** Metody kompleksowej analizy doświadczenia wielocechowego. Trzecie Colloquium Metodologiczne z Agro-Biometrii, PAN i PTB, Warszawa, 258-320, 1973.
3. **Campbell C.G., Mehra R.J., Agrawal S.K., Chen Y.Z., El Moneim B., Khawaja H.I.T., Yadov C.R., Tay J.U., Araya W.A.:** Current status and future strategy in breeding grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Euphytica*, 37, 167-175, 1994.
4. **Camussi A., Ottaviano E., Caliński T., Kaczmarek Z.:** Genetic distance based on quantitative traits. *Genetics*, 111, 945-962, 1985.
5. **Górczyński J., Mądry W.:** A study of genetic divergence of plants by multivariate methods. *Genetica Polonica*, 29, 341-352, 1988.
6. **Krzyżko M.:** Wielowymiarowa analiza statystyczna. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 2000.
7. **Nerkar Y.S.:** Mutation studies in *Lathyrus sativus*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 36(2), 223-229, 1976.
8. **Pisulewska E., Hanczakowski P., Szymczyk B., Dziamba S.:** Porównanie składu chemicznego oraz wartości biologicznej nasion trzech form lędźwianu siewnego, zróżnicowanych pod względem masy tysiąca nasion. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 446, 349-353, 1997.
9. **Przybylska J.:** Lędźwian siewny (*Lathyrus sativus* L.) jako potencjalna wartościowa roślina strączkowa. *Post. Nauk Roln.*, 1/99, 33-43, 1999.

10. **Rancher A.C.:** Interpretation of canonical discriminant functions, canonical variates, and principal components. *Am. Stat.*, 46, 217-225, 1992.
11. **Singh M., Chaturvedi S.N.:** Effectiveness and efficiency of mutagen alone or in combination with dimethyl sulphoxide in *Lathyrus sativus*. *J. of Agric. Sci.*, 57, 503-507, 1987.
12. **Vaylay R., van Santen E.:** Application of canonical discriminant analysis for the assessment of genetic variation in tall fescue. *Crop Science*, 42, 534-539, 2002.
13. **Yeater K.M., Bollero G.A., Bullock D.G., Rayburn A.L., Rodriguez-Zas S.:** Assessment of genetic variation in hairy vetch using canonical discriminant analysis. *Crop Science*, 44, 185-189, 2004.

USE OF MULTIVARIATE METHOD FOR ESTIMATION  
OF QUANTITATIVE TRAITS IN GRASSPEA MUTANTS (*LATHYRUS  
SATIVUS* L.) OBTAINED AFTER TREATMENT OF SEEDS  
WITH CHEMOMUTAGENS AND HELIUM-NEON LASER LIGHT

*Jan Bocianowski<sup>1</sup>, Wojciech Rybiński<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Mathematical and Statistical Methods, Agricultural University  
ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań  
e-mail: jboc@au.poznan.pl

<sup>2</sup>Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

**Abstract.** Grasspea is one of the oldest cultivated species and was known as far back as 8000 years before Christ. The history of grasspea cultivation in Poland is not known. According to literature, grasspea first appeared in Poland (in the region of Podlasie) accompanying lentil as a weed as far back as 17<sup>th</sup> century, together with Tatar settlements. One of the conditions for a broader introduction of the species in Polish agriculture is genetic improvement of a number of undesirable characters. Apart from the unquestionable advantages, grasspea is also characterized by a number of less favourable characters which will be improved. Apart from effects of recombination, such a possibility is offered by mutation induction through the introduction of additional variability of features, represented by mutants. Mutagenesis in particular can be a valuable supplement to the conventional plant breeding method. It can be used to create additional genetic variability that may be utilized by the plant breeder in the development of new cultivars for specific purposes or with specific adaptabilities. The paper presents a multivariate approach to the estimation of genetic variability for quantitative traits of grasspea mutants (*Lathyrus sativus* L.). Material for the study involved 20 mutants and two cultivars: Derek and Krab. The mutants were obtained with the use of helium-neon laser light in combination with two chemomutagens: MNU (N-nitroso-N-methylurea) and sodium azide (NaN<sub>3</sub>). Plant height, height of the lowest pod, number of branches per plant, number of pods per plant, pod length, number of seeds per plant, weight of seeds per plant and 1000-seed weight were observed and analysed. The multivariate two-factor analysis of variance and related multivariate methods were applied. Canonical variate analysis was a useful statistical tool for clear identification of multivariate genetic variation of grasspea mutants.

**Keywords:** grasspea, helium-neon laser, canonical variate analysis