

Joanna Nowakowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Mutagenеза i jej zastosowanie w badaniach nad roślinami oleistymi

Mutagenesis and its application in the oilseed crops research

Słowa kluczowe: mutagenеза, hodowla mutacyjna, rośliny oleiste

Key words: mutagenesis, mutation breeding, oilseed plants

Praca przeglądowa przedstawiająca ogólną charakterystykę mutacji i mutagenезы oraz wykorzystanie indukowanych mutacji w badaniach nad rzepakiem i innymi roślinami oleistymi (gorczyca, lnianka, len, soja). Mutacje występują w formie mutacji punktowych, chromosomowych oraz genomowych. Mutacje spontaniczne są źródłem zmienności genetycznej organizmów, jednak pojawiają się z małą częstotliwością. Z tego względu indukowanie mutacji za pomocą czynników fizycznych i chemicznych jest cennym narzędziem w hodowli roślin, ponieważ zwiększa zmienność genetyczną cech oraz pozwala na przeprowadzenie selekcji genotypów o cechach pożądanych dla celów hodowlanych. Najczęściej stosowanymi mutagenami fizycznymi są promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe. Promieniowanie jonizujące powoduje wystąpienie mutantów chlorofilowych u rzepaku ozimego, które mogą być przydatne jako markery genetyczne w hodowli rzepaku. Natomiast u lnianki i gorczycy sarepskiej mutagen ten wpływa na zmianę składu kwasów tłuszczowych w nasionach. W przypadku mutacji indukowanych chemicznie najbardziej rozpowszechnione są czynniki alkylujące. Należący do nich EMS (metanosulfonian etylu) stosowany jest do zwiększenia zmienności proporcji poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju rzepaku ozimego, gorczycy abisyńskiej i lnu. W hodowli roślin stosuje się także łączne traktowanie mutagenami fizycznymi i chemicznymi, ponieważ umożliwia to zwiększenie zmienności cech w porównaniu do traktowania wyłącznie jednym rodzajem mutagenu.

A survey work which introduces a general characteristic of mutations and mutagenesis as well as the use of induced mutations in research on oilseed rape and other oilseed crops (mustards, *Camelina sativa*, flax, soyabean). The mutations occur in the form of point, chromosomal and genomic mutations. The spontaneous mutations are the source of genetic variability of organisms, yet they appear with small frequency. Therefore the induction of mutations with the help of physical and chemical agents is a valuable tool in plant breeding, because it increases genetic variability of features and it permits to carry out the selection of genotypes with features favourable for breeding aims. The most frequently applied physical mutagens are ionizing and ultraviolet radiation. The ionizing radiation causes the appearance of chlorophyll mutants in winter oilseed rape, which could be useful as genetic markers in oilseed rape breeding. However, this mutagen causes changes in fatty acid composition in seeds of *Camelina sativa* and *Brassica juncea*. In the case of chemically induced mutations the most widespread are the alkylation agents. Belonging to this group of mutagens, EMS (ethyl methanesulphonate) is applied to increase the variability of proportions of individual fatty acids in the oil of winter oilseed rape, Ethiopian mustard and flax. Joined treatment with physical and chemical mutagens is also applied in plant breeding. This method enables the increase of variability of features comparing with the treatment with only one type of mutagen.

Ogólna charakterystyka mutacji i mutagenozy

Mutacje to stałe, dziedziczne zmiany w sekwencji zasad DNA, spowodowane błędami w replikacji DNA lub działaniem czynników fizycznych bądź chemicznych. Raz wprowadzone zmiany sekwencji DNA są powielane w czasie replikacji i przenoszone do komórek potomnych podczas podziałów komórkowych. Niosą one za sobą zmiany w sekwencji aminokwasów, wpływając w ten sposób na funkcje białka i powodując powstanie fenotypu odmiennego (mutanta) niż fenotyp charakterystyczny dla gatunku (typ dziki).

Mutacje występują w następujących formach:

- mutacje genowe (punktowe) — zmiana pojedynczej zasady w określonej sekwencji nukleotydów. Ważna jest lokalizacja mutacji w obrębie genu — tylko zmiany w rejonach kodujących mają wpływ na białko;
- mutacje chromosomowe — dotyczą zmian w strukturze chromosomów;
- mutacje genomowe — zmiana liczby całych chromosomów i genomów danego gatunku.

Mutacje genowe (punktowe) (rys. 1) — polegają na zmianie zasady typu:

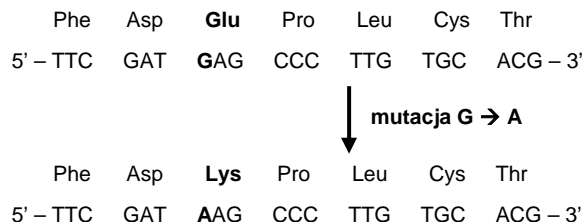
- tranzycja — puryna jest zastępowana przez purynę, a pirymidyna przez pirymidynę;
- tranwersja — puryna zostaje zastąpiona pirymidyną lub odwrotnie.

Mutacje tego typu ze względu na wywołane skutki w białku kodowanym przez gen dzielą się na kilka kategorii (Winter i in. 2000):

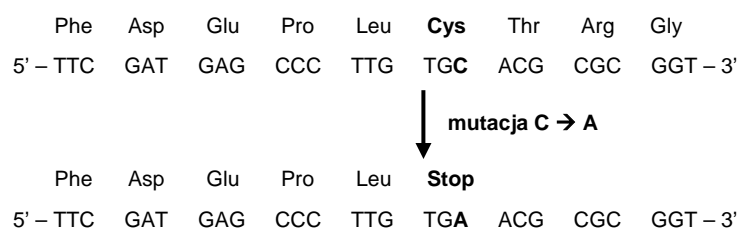
- mutacje missensowne (zmiany sensu kodonów) — dotyczą zmiany pojedynczej zasady, co powoduje zmianę kodonu i wbudowanie innego aminokwasu do białka. Występują zwykle w jednej z dwóch pierwszych zasad kodonu. Efekty mutacji missensownych są różne — od żadnego do letalnego, w zależności od położenia zmienionego aminokwasu w polipeptydzie i jego wpływu na funkcje białka (rys. 1a).
- mutacje nonsensowne (kończące łańcuch polipeptydowy) — zmieniają kodon aminokwasowy na kodon terminujący. Dochodzi do przedwczesnego zakończenia translacji i powstania krótszego białka. Mutacje te mają poważny wpływ na aktywność kodowanego białka (rys. 1b).
- mutacje powodujące przesunięcie ramki odczytu — są wynikiem insercji dodatkowych lub delecji już istniejących zasad sekwencji genu. Jeśli liczba wbudowanych lub usuniętych nukleotydów nie jest wielokrotnością trzech, ramka odczytu zostaje przesunięta, rybosom odczytuje inny kodon i zmieniona zostaje sekwencja aminokwasów kodowanego białka. Mutacje tego typu wywołują drastyczne zmiany w strukturze białka (rys. 1c).
- mutacje ciche — dotyczą trzeciej zasady kodonu i nie powodują zmiany w sekwencji aminokwasów oraz w białku i fenotypie (ze względu na degene-

rację kodu genetycznego). Mutacje ciche wykazują tendencję do akumulowania się i tworzenia polimorfizmu genetycznego, przyczyniając się do zmienności w sekwencji DNA poszczególnych gatunków (rys. 1d).

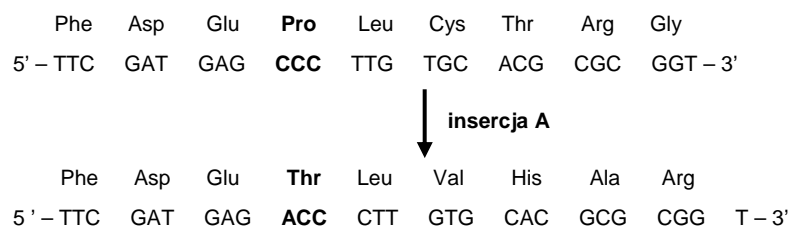
(a) mutacje missensowne (zmiany sensu kodonów)



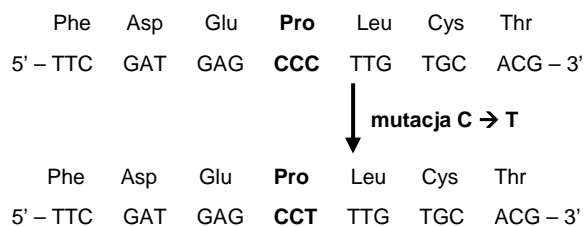
(b) mutacje nonsensowne (wystąpienie kodonu terminującego translację)



(c) mutacje powodujące przesunięcie ramki odczytu



(d) mutacje ciche



Rys. 1. Mutacje genowe

Mutacje chromosomowe (aberracje chromosomowe) — są to zmiany strukturalne dotyczące dłuższych sekwencji DNA i polegające na przerwaniu ciągłości chromosomu. Wywołują zazwyczaj całkowitą utratę aktywności biologicznej kodowanego białka.

Mutacje tego typu zachodzą:

- w obrębie chromosomów — mutacje wewnątrzchromosomowe, obejmujące jedno ramię (paracentryczne) lub oba ramiona (pericentryczne);
- między chromosomami — mutacje międzychromosomowe, które mogą być allelosomowe (dotyczą chromosomów homologicznych) lub heterochromosomowe (dotyczą chromosomów niehomologicznych) (Rieger i in. 1974).

Klasyfikując bardziej szczegółowo tego rodzaju zmiany strukturalne, Rieger i in. (1974) wyróżniają:

- delecje — utrata odcinka chromosomu oraz informacji genetycznej w nim zawartej, wielkość utraconego fragmentu może wahać się od pojedynczego nukleotydu do kilku genów;
- deficjencje — utrata końcowego odcinka chromosomu;
- duplikacje — podwojenie części chromosomu;
- inwersje — odwrócenie odcinka chromosomu i tym samym kolejności zawartych w nim genów;
- translokacje — przeniesienie fragmentu chromosomu w nowe położenie, a tym samym zmiana kolejności genów w obrębie danego zespołu chromosomów.

Delecje i inwersje są zmianami wewnątrzchromosomowymi, natomiast duplikacje i translokacje mogą być zmianami zarówno wewnątrz-, jak i międzychromosomowymi.

Mutacje genomowe — dotyczą zmiany liczby całych chromosomów, powodując powstanie komórek lub organizmów heteroploidalnych (poliploidalnych lub aneuploidalnych) w porównaniu z liczbą genomów właściwą dla danego gatunku (Rieger i in. 1974):

- poliploidy — mają trzy (triploid), cztery (tetraploid), pięć (pentaploid) lub więcej kompletnych zespołów chromosomowych;
- aneuploidy — posiadają jeden, dwa lub więcej całych chromosomów powyżej albo poniżej liczby podstawowej dla danego gatunku.

Mutacje spontaniczne pojawiają się z małą częstotliwością rzędu 10^5 do $10^8/\text{locus}$ (van Harten 1991). Są źródłem zmienności genetycznej organizmów, dostarczając materiału wyjściowego dla ewolucji, który jest następnie poddawany selekcji. Występują najczęściej w postaci mutacji punktowych, które wynikają ze zmiany jednej zasady bez udziału zewnętrznych czynników fizycznych bądź chemicznych, będąc skutkiem błędów popełnianych w czasie replikacji DNA lub samorzutnych modyfikacji chemicznych zachodzących w zasadach DNA

(np. deaminacja cytozyny do uracylu, metylacja cytozyny do 5-metylocytozyny, deaminacja 5-metylocytozyny do tyminy). Niski poziom mutacji spontanicznych wynika z obecności mechanizmów naprawczych DNA, które z wysoką efektywnością reperują większość zmian w DNA (Węgleński 1998).

Najbardziej powszechnym systemem naprawy jest naprawa przez wycinanie — mechanizm będący wieloetapowym procesem enzymatycznym. Polega na rozpoznaniu uszkodzonych nukleotydów, ich usunięciu i zastąpieniu innymi właściwymi nukleotydami. U eukariota naprawa przez wycinanie jest połączona z transkrypcją, dzięki czemu transkrybowane (genetycznie aktywne) regiony DNA są naprawiane szybciej niż DNA nie ulegający transkrypcji. Umożliwia to ograniczenie wytwarzania produktów uszkodzonych genów (Turner i in. 2000).

Częstość powstawania mutacji można jednak bardzo istotnie zwiększyć (nawet o 1000 razy) działając na komórki lub całe organizmy zewnętrznymi czynnikami fizycznymi i chemicznymi, wywołując liczne i różnorodne uszkodzenia w DNA. Takie czynniki nazywamy mutagenami (Węgleński 1998).

Najczęściej stosowanymi mutagenami fizycznymi są promieniowanie jonizujące, do którego zalicza się: promienie X, alfa, beta, gamma, protony i neutrony uwalniane przez radioaktywne izotopy pierwiastków, np.: rad, ^{60}Co , ^{32}P , ^{35}S oraz promieniowanie niejonizujące — ultrafioletowe (UV) (Rogalska i in. 1999).

Promieniowanie jonizujące o dużej energii (X, γ) ma zdolność penetrowania tkanek w głąb i wzbudzania atomów napotkanych cząsteczek, uwalniając elektrony i pozostawiając dodatkowo naładowane wolne rodniki. Rodniki reagują z innymi cząsteczkami, co prowadzi do rozchwiania równowagi energetycznej w tkance i wywołuje wtórny efekt działania promieni jonizujących, uszkadzający DNA. Efekty działania promieni jonizujących na DNA można podzielić na:

- bezpośrednio — wynikające z bezpośredniej interakcji energii promieniowania ze składnikami DNA (absorpcja promieniowania przez szkielet cukrowo-fosforanowy);
- pośrednio — polegające na reakcji z wolnymi rodnikami.

Zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio oddziaływanie promieni jonizujących na DNA prowadzi do pęknięć w jednej lub obu jego niciach, dając początek aberracjom chromosomowym (Rogalska i in. 1999).

Promieniowanie niejonizujące — ultrafioletowe (o długości fali 260 nm) ma mniejszą energię i penetruje tylko wierzchnie warstwy komórek organizmów. Promienie UV wnikając do tkanki, rozpraszają swą energię w zetknięciu się z innymi atomami, wyrzucając ich elektrony z zewnętrznych orbit na wyższy poziom energetyczny. Stan ten nazywa się wzbudzeniem. Cząsteczki, których atomy są w stanie wzbudzonym wykazują większą aktywność chemiczną i reagują z atomami cząsteczki DNA, prowadząc do powstania w niej zmian mutacyjnych (Rogalska i in. 1999).

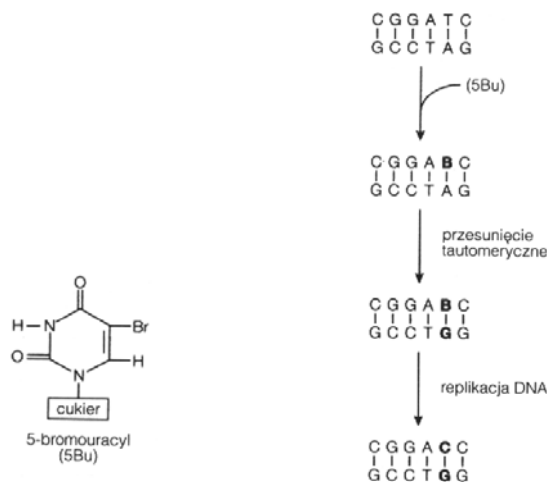
Innymi czynnikami zaliczanymi do mutagenów fizycznych są:

- ultradźwięki o różnej częstotliwości (500–2000 kHz) — prowadzą do fragmentacji DNA;
- ciepło — tworzy miejsca apurynowe, indukujące mutacje punktowe (Winter i in. 2000).

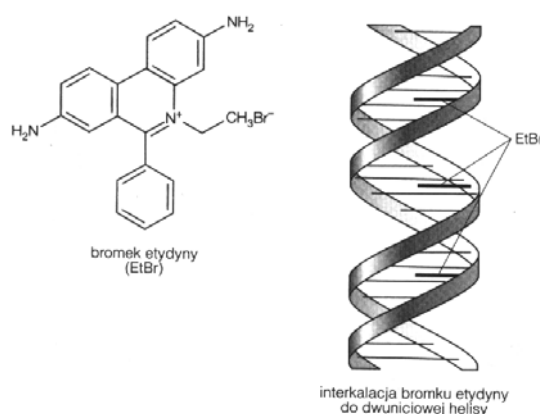
Do najczęściej stosowanych mutagenów chemicznych zalicza się czynniki alkilujące. Posiadają one jedną lub więcej grup alkilowych, które reagują z grupami fosforanowymi DNA (prowadząc do przzerwania nici DNA) oraz z zasadami purynowymi i pirymidynowymi. Alkilacja zasad azotowych zmienia ich powinowactwo do zasad, z którymi normalnie tworzą pary. Tolerowanie tych błędów przez komórkę prowadzi do mutacji. Spośród mutagenów chemicznych najsilniejsze działanie wykazują: metanosulfonian etylu (EMS), siarczan dietylowy (DES), etyloimina (EI), N-nitrozo-N-metylomoczan (NMUT), N-nitrozo-N-metylomocznik (NMU), N-nitrozo-N-etylomocznik (NEU), azydek sodu (AS) (Rogalska i in. 1999).

Inne mutageny chemiczne to:

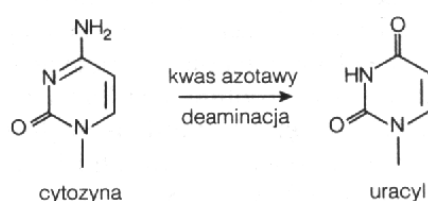
- analogi zasad — są strukturalnie podobne do zasad znajdujących się w DNA i mogą być wbudowywane przez polimerazę DNA podczas replikacji, np. 5-bromouracyl (5BU) — analog tyminy (rys. 2);
- czynniki interkalujące — płaskie cząsteczki zaburzające replikację DNA przez wślizgiwanie się pomiędzy sąsiednie pary zasad w dwuniciowej helisie i powodujące oddalanie się par zasad od siebie oraz wbudowanie dodatkowego nukleotydu, co prowadzi do przesunięcia ramki odczytu, np. barwniki akrydynowe — bromek etydyny (rys. 3);
- kwas azotawy — wywołuje deaminację cytozyny do uracylu lub adeniny do hipoksantyny (rys. 4) (Winter i in. 2000).



Rys. 2. Analogi zasad



Rys. 3. Czynniki interkalujące



Rys. 4. Kwas azotawy

Określenie „hodowla mutacyjna” powstało w latach pięćdziesiątych (Mac Key 1956) i dotyczy wypracowanych systemów postępowania na różnych etapach programów hodowlanych, wykorzystujących indukowanie mutacji (Przybyła 1997).

Ważnym narzędziem w hodowli mutacyjnej są techniki *in vitro*, umożliwiające traktowanie mutagenem dużych populacji, uzyskanie bardzo szerokiego spektrum zmienności i szybkie rozmnożenie wyselekcjonowanych genotypów w kontrolowanych warunkach wolnych od chorób (np. zastosowanie podwojonych haploidów) (Przybyła 1997). Ulepszone odmiany roślin uprawnych mogą być uzyskane bezpośrednio po traktowaniu mutagenem, jak i poprzez krzyżowanie ze zmutowanymi roślinami. Największą liczbę odmian mutantów wyhodowano u roślin zbożowych, strączkowych, oleistych, przemysłowych, warzyw, owocowych oraz leczniczych i ozdobnych (Przybyła 1997). U roślin rozmnażanych wegetatywnie, które charakteryzują się wysokim stopniem heterozygotyczności, mutageneza umożliwia wprowadzenie dodatkowej zmienności genetycznej.

Hodowla mutacyjna składa się z następujących etapów:

- wybór materiału — całe rośliny, siewki, nasiona, ziarna pyłku;
- sposób traktowania mutagenami — dobór optymalnej dawki mutagenu (przez określenie jego stężenia lub mocy promieniowania i czasu działania) oraz warunków zewnętrznych (np. temperatura, ciśnienie tlenu, wilgotność);

- kryteria wstępnej i ostatecznej selekcji (ze względu na recesywny charakter większości zmutowanych cech, selekcja prowadzona jest w drugim pokoleniu, powstałym z samozapylenia roślin poddanych działaniu mutagenów);
- tworzenie odmian;
- hodowla zachowawcza.

Najważniejsze cechy ulepszone na drodze mutagenezy u roślin rozmnażanych generatywnie to według Konzak i in. (1984): plonowanie, wczesność, odporność, architektura roślin, jakość i morfologia nasion.

Zastosowanie mutacji w hodowli rzepaku i innych roślin oleistych

Rzepak jest gatunkiem filogenetycznie młodym o stosunkowo niewielkiej zmienności genetycznej i jako allotetraploid charakteryzujący się złożonym typem determinacji genetycznej. Zmutowane cechy recesywne mogą pojawić się w dalszych pokoleniach: M_3 , M_4 , M_5 , M_6 ... M_{10} .

W przypadku rzepaku jakość oleju w nasionach uzależniona jest w dużym stopniu od składu kwasów tłuszczowych, między innymi od udziału kwasów: oleinowego ($C_{18:1}$), linolowego ($C_{18:2}$), linolenowego ($C_{18:3}$) i erukowego ($C_{22:1}$) (Krzymański, Downey 1969; Krzymański 1970, 1984, 1993 a). U rzepaku i innych roślin oleistych metanosulfonian etylu (EMS) wykorzystuje się do zwiększenia zmienności proporcji poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju (Byczyńska i in. 1996). EMS wywołuje prawdopodobnie mutacje genów determinujących aktywność systemu desaturaz kwasu oleinowego i linolowego, odpowiedzialnych za syntezę kwasów wielonienasyconych (Spasibionek i in. 2000). Indukowana mutageneza pozwala na uzyskanie różnych profili kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym, w celu wykorzystania go do celów żywieniowych lub przemysłowych. Olej odpowiadający wymaganiom żywieniowym powinien mieć zredukowaną zawartość kwasu linolenowego do poziomu poniżej 3%, by ograniczyć proces jego utleniania i jęlczenia oraz utratę smaku podczas przechowywania (Scarth i in. 1991). Zastosowanie oleju rzepakowego do produkcji biopaliwa także wymaga zmniejszenia zawartości kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego), które łatwo ulegają utlenieniu i polimeryzacji nadając olejowi charakter półśnący. Natomiast wyższa zawartość kwasu oleinowego poprawia wartość oleju rzepakowego jako surowca do produkcji oleju napędowego (Harold i in. 1995).

Działając EMS (0,5 i 1%) na nasiona rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego uzyskano linie o istotnie obniżonej zawartości kwasów wielonienasyconych, przy jednoczesnym wzroście poziomu kwasu oleinowego. Kontynuując powyższe badania w pokoleniu M_3 wśród mutantów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych uzyskano rośliny półkarłowate odporne na wyleganie (Byczyńska i in. 1997).

Stosując zmodyfikowaną metodę otrzymywania mutantów przez dwukrotne traktowanie EMS (roztworami 0,5 i 1% na nasiona rodu wyjściowego oraz 5 i 8% na nasiona pokolenia M_2), w pokoleniu M_6 wyselekcjonowano dwa mutanty o istotnie zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. Mutant M-5 charakteryzował się wzrostem zawartości kwasu oleinowego do 77,9%, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu kwasu linolowego do 8,6% i linolenowego do 7%. U mutantu M-8 zawartość kwasu linolowego wzrosła do 23,1% przy obniżeniu zawartości kwasu linolenowego do 2,5%. Materiał wyjściowy do tych badań stanowiły nasiona rodu rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego o składzie kwasów tłuszczowych w oleju: oleinowego 64,1%, linolowego 18,2% i linolenowego 10,4% (Spasibionek i in. 2000). Traktując EMS nasiona rzepaku ozimego odmiany Wotan wyprowadzono również mutanty o podwojonej ilości kwasu palmitynowego w oleju (z 4,5 do 9,2%). Towarzyszyła temu redukcja zawartości kwasu oleinowego (z 61,6 do 44,2%) oraz wzrost zawartości kwasu linolowego i linolenowego. Stwierdzono, że dziedziczenie zmienionego profilu kwasów tłuszczowych z podwyższonym poziomem kwasu palmitynowego ma charakter oligogeniczny, związany z mutacją przynajmniej czterech genów (Schnurbusch i in. 2000).

Wpływ EMS na skład kwasów tłuszczowych badano także u gorczycy abisyńskiej, która średnio zawiera 35–45% kwasu erukowego w oleju. W pokoleniu M_4 uzyskano rośliny o obniżonym poziomie kwasu erukowego (7,3%) (Velasco i in. 1995). Dla celów przemysłowych również z gorczycy abisyńskiej wyprowadzono mutanty charakteryzujące się wysoką zawartością kwasu erukowego, w pokoleniu M_5 nastąpiło utrwalenie mutacji na poziomie 50–60% zawartości kwasu erukowego (Velasco i in. 1998). Działając mutagenem EMS (o stężeniu od 0 do 0,5%) na kulturę mikrospor gorczycy, wyselekcjonowano podwojone haploidy wykazujące wysoką (53,6%) lub niską (17,1%) zawartość kwasu erukowego. Wzrost zmienności kwasu erukowego był związany z poszerzeniem zakresu zmienności dla kwasów: palmitynowego, oleinowego i linolowego (Barro i in. 2001).

Badano także wpływ EMS na wczesność kwitnienia u rzepaku jarego (Thurling i Depittayan 1992). W pokoleniu M_3 wyselekcjonowano rośliny kwitnące krócej niż 100 dni od siewu. Stwierdzono, że EMS prawdopodobnie wywołuje zmianę w locus genu odpowiedzialnego za kwitnienie, indukując powstanie recesywnej postaci genu, która wpływa na krótszy okres kwitnienia. W pokoleniu M_1 obserwowano również rośliny z zaburzeniami chlorofilowymi, nienormalnym rozwojem liści i kwiatów, większą liczbą rozgałęzień oraz karłowatym typie wzrostu.

Także nasiona lnu poddano działaniu 0,5% roztworu EMS, w celu określenia wpływu mutagenu na poszerzenie zmienności składu kwasów tłuszczowych w oleju i wyselekcjonowania mutantów o zredukowanej zawartości kwasu linolenowego. W pokoleniu M_5 uzyskano mutantu o obniżonym poziomie tego kwasu z 55,4 do 38,9%. Redukcji kwasu linolenowego towarzyszył wzrost zawartości kwasów linolowego i oleinowego (Nichterlein i in. 1988).

W doświadczeniach z NMU (N-nitrozo-N-metylomocznikiem) i AS (azydkiem sodu) uzyskano poszerzenie zmienności morfologicznej u rzepaku ozimego odmiany Skrzyszowicki. Otrzymano mutanty wcześniej dojrzewające, karłowe, o zmienionej barwie i wielkości płatków korony, zwiększonej liczbie rozgałęzień na pędzie głównym, sterylne i częściowo sterylne (Adamska i in. 1995). Morfologiczne mutanty po zadziałaniu NMU uzyskano także u soi (Sodkiewicz 1999, 2000).

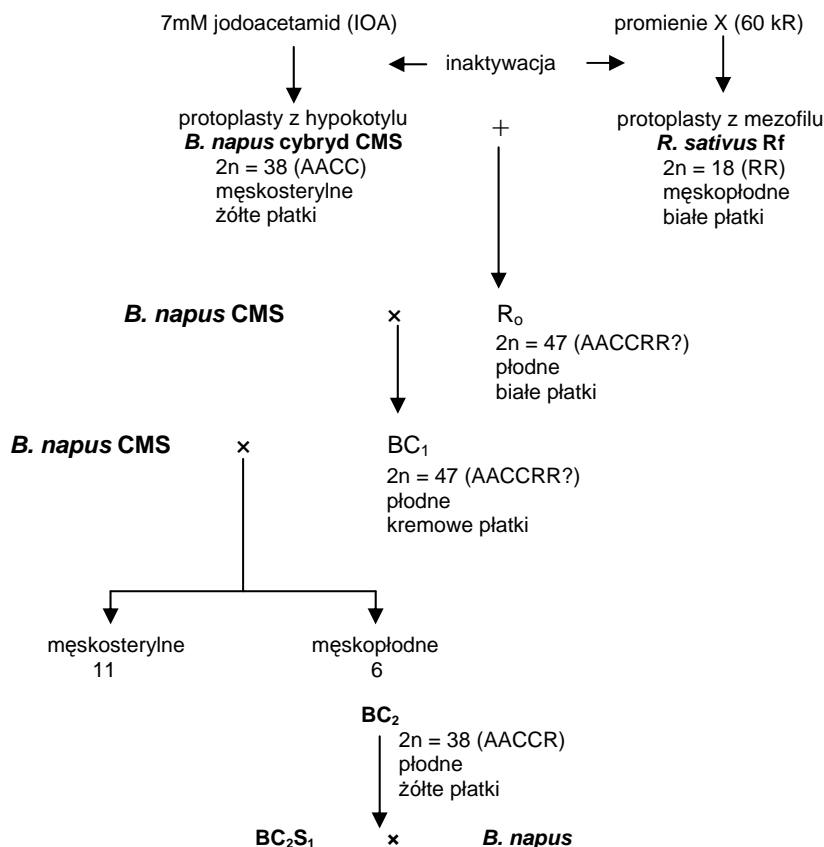
W przypadku mutagenyzy indukowanej fizycznie najbardziej rozpowszechnione jest wykorzystanie promieni jonizujących. Rzepak jest gatunkiem charakteryzującym się wysoką radioodpornością i stosowane dla niego dawki promieniowania wywołujące mutacje są dla innych gatunków letalne (Wilczkowska 1970).

Działając na rzepak ozimy (Janpol) promieniami gamma o dawce 1000 Gy otrzymano w pokoleniu γ_{1-7} mutantu chlorofilowego typu *virescens*, który charakteryzuje się jasnozieloną barwą liści, zmieniającą się w ciemnozieloną. Wykazano recesywny charakter mutacji chlorofilowej, która jest regulowana genem lub genami jądrowymi. Mutacja tego typu może być przydatna jako marker genetyczny w hodowli rzepaku ozimego. Badania miały charakter wstępny i nie uwzględniały wpływu temperatury i światła na ekspresję zmutowanych genów (Łuczkiwicz 1998).

Promienie X wykorzystano w doświadczeniu fuzji protoplastów rzodkwi (*Raphanus sativus*) odmiany Kosena posiadającej w swoim genotypie gen restorer i męskosterylnych (CMS) cybrydów rzepaku. Protoplasty rzodkwi były traktowane promieniami X (dawka 60 kR), które pełniły rolę czynnika wpływającego na ukierunkowaną fuzję protoplastów oraz powodującego fragmentację chromosomów, aby ograniczyć ilość jądrowego DNA wprowadzanego do biorcy, gdyż nadmiar informacji genetycznej pochodzącej od rzodkwi wprowadzonej do genotypu rzepaku obniża żeńską płodność rzepaku. Protoplasty roślin męskosterylnych były inaktywowane poprzez traktowanie 7 mM jodoacetamidem. Z produktów fuzji zregenerowano 300 roślin, spośród których 6 było męskopłodnych. Rośliny te posiadały segment DNA od rzodkwi zawierającej gen restorer (rys. 5) (Sakai i in. 1996).

Także ultradźwięki mogą fragmentować cząsteczki DNA, a podczas reperacji dochodzi do rozluźnienia sprzężeń między cechami. Zastosowanie ultradźwięków zwiększa częstotliwość mutacji pod wpływem promieni gamma (Krzymański i in. 2000).

Określano wpływ różnych dawek prędkich neutronów (0,30–0,50 KGy) i promieni gamma (1,0–1,4 KGy) na zmienność zawartości kwasów tłuszczowych u gorczycy sarepskiej. Stwierdzono, że wszystkie dawki obydwu typów promieniowania wywoływały szeroki zakres zmian zarówno w kierunku wzrostu, jak i spadku poziomu poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju. Promienie gamma indukowały większą zmienność dla kwasów: oleinowego, linolowego i erukowego, natomiast prędkie neutrony były bardziej efektywne w indukcji zmienności zawartości kwasu linolenowego (Iftikhar Ali i in. 1999).



Rys. 5. Wykorzystanie promieni X oraz jodoacetamidu w procesie fuzji protoplastów rzodkwi i rzepaku z systemem CMS (wg Sakai i in. 1996)

Działanie promieni jonizujących badano także u soi (Rawlings i in. 1958) i lnianki (Łuczkiwicz i Szewczyk 1997) stwierdzając znaczne zwiększenie zmienności cech morfologicznych oraz wzrost plonu. W przypadku lnianki wyselekcjonowano również mutanty o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych w nasionach. Znalezione rośliny o dużej zawartości kwasu linolowego (24,6%) i genotypy o niskim (30,8%) i wysokim (48,0%) poziomie kwasu linolenowego.

Inną możliwością zastosowania mutagenezy w hodowli jest łączne traktowanie mutagenami chemicznymi i fizycznymi, co umożliwia zwiększenie zmienności cech w porównaniu do traktowania wyłącznie jednym rodzajem mutagenu.

Przykładem wykorzystania takiej metodyki może być połączenie wpływu siarczany dietylowego (DES) z prędkimi neutronami w celu uzyskania mutacji chlorofilowych u rzepaku, które byłyby markerem w produkcji mieszańców F_1

w systemie CMS *pol* (Zhao i in. 2000). W wyniku doświadczeń wyprowadzono rośliny posiadające zmutowany układ genów determinujących wystąpienie mutacji chlorofilowych (homozygota recesywna) i poprzez krzyżowanie cechą tę wprowadzono do roślin męskoniepłodnych CMS *pol* i ich linii dopełniających. W układzie heterozygotycznym brak jest przebarwień chlorofilowych, co umożliwia łatwe odróżnienie mieszańca od samopyłu (homozygoty) już w fazie siewek.

Zastosowanie mutagenyzy w hodowli rzepaku i innych roślin oleistych dowodzi, że jest ona cennym narzędziem umożliwiającym zwiększenie zmienności istniejących cech i tworzenie nowej zmienności. Zmutowane geny mogą także determinować cechy markerowe wykorzystywane w selekcji.

Literatura

- Adamska E., Jeżowski S., Olejniczak J., Rybiński W. 1995. Wpływ mutagenów chemicznych na zmienność indukowaną u rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste*, XVI (1): 57-62.
- Barro F., Fernandez-Escobar J., De La Vega M., Martin A. 2001. Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. *Plant Breeding*, 120: 262-264.
- Byczyńska B., Krzymański J., Spasibionek S. 1996. Zmniejszenie zawartości kwasów wielonienasyconych w oleju rzepakowym w wyniku mutagenyzy chemicznej. *Rośliny Oleiste*, XVII (1): 127-135.
- Byczyńska B., Spasibionek S., Krzymański J. 1997. Karłowe mutanty rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. *Rośliny Oleiste*, XVIII (1): 63-67.
- Harold S., Lal K., Lawate S. 1995. Varieties of rapeseed oil and derived products for use in fuels and lubricants. *Proceeding of the 9th International Rapeseed Congress*, vol. 4: 1341-1344.
- van Harten A.M. 1991. Mutation breeding. *Internat. Agric. Centre, Wageningen, The Netherlands* 85 pp.
- Ifitikhar Ali, Anwar Shah S., Ahmad Shah S.J., Mumatz Ahmad, Kafyat-ur-Rehman. 1999. Direction and magnitude of variability in fatty acid composition of fast neutron and gamma radiation induced *Brassica juncea*. *Cruciferae Newsletter* 21: 93-94.
- Konzak C.F., Kleinhofs A., Ullrich S.E. 1984. Induced mutations in seed – propagated crops. *Plant Breeding Rev.*, 2: 13-72.
- Krzymański J., Downey K.R. 1969. Inheritance of fatty acid composition in winter forms of rapeseed, *Brassica napus*. *Can. J. Plant Sci.*, 49: 313-319.
- Krzymański J. 1970. Genetyczne możliwości ulepszania składu chemicznego nasion rzepaku ozimego. *Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 14 (2): 95-133.
- Krzymański J. 1984. Hodowlane możliwości ulepszania zawartości oleju i białka w nasionach rzepaku. *Wyniki badań nad rzepakiem ozimym 1983, IHAR Radzików*, 104-111.
- Krzymański J. 1993. Osiągnięcia i nowe perspektywy prac badawczych nad roślinami oleistymi w Polsce. *Postępy Nauk Rolniczych*, 5/245: 7-14.
- Krzymański J., Piętka T., Matuszczak M., Michalski K. 2000. Próba użycia ultradźwięków do łamania sprzężeń cech u rzepaku. *Rośliny Oleiste*, XXI (2): 599-602.
- Łuczkiwicz T., Szewczyk D. 1997. Zmienność wybranych cech roślin *Camelina sativa* L. w pokoleniach γ_{1-3} . *Rośliny Oleiste*, XVIII (1): 83-90.

- Luczkiewicz T. 1998. Mutacje typu *Virescens* u rzepaku ozimego *Brassica napus* L. Rośliny Oleiste, XIX (2): 621-625.
- Mac Key J. 1956. Mutation breeding in Europe. Genetics in plant breeding, Brookhaven Symposia in Biology, No 9, New York: 141-156.
- Nichterlein K., Marquard R., Friedt W. 1988. Breeding for modified fatty acid composition by induced mutations in linseed (*Linum usitatissimum* L.). Plant Breeding, 101: 190-199.
- Przybyła A. 1997. Możliwości wykorzystania mutagenezy w tworzeniu nowych odmian roślin uprawnych. Hodowla Roślin, Materiały z I Krajowej Konferencji, Poznań, 19–20 listopada: 87-90.
- Rawlings J.O., Hanway D.G., Gardner C.O. 1958. Variation in quantitative characters of soybeans after seed irradiation. Agronomy Journal, 50: 524-528.
- Rieger R., Michaelis A., Green M.M. 1974. Słownik terminów genetycznych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- Rogalska S., Małuszyńska J., Olszewska M.J. 1999. Podstawy cytogenetyki roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Sakai T., Liu H.J., Iwabuchi M., Kochno-Murase J., Imamura J. 1996. Introduction of a gene from fertility restored radish (*Raphanus sativus*) into *Brassica napus* by fusion of X – irradiated protoplasts from a radish restorer line and iodacetoamide – treated protoplasts from a cytoplasmic male – sterile cybrid of *B. napus*. Theor. Appl. Genet., 93: 373-379.
- Scarth R., McVetty P.B.E., Rimmer S.R. 1991. Breeding for special oil quality in canola/rapeseed. Rapeseed in a Changing World, Rapeseed Congress GCIRC, Saskatoon, Saskatchewan, 7–9 July, vol. 1: 143-152.
- Schnurbusch T., Möllers C., Becker H.C. 2000. A mutant of *Brassica napus* with increased palmitic acid content. Plant Breeding, 119: 141-144.
- Sodkiewicz T. 1999. Porównanie wrażliwości wybranych odmian soi na działanie N-nitrozo-N-metylomocznika (MNUA) w oparciu o badania pokolenia M₂. Rośliny Oleiste, XX (2): 623-630.
- Sodkiewicz T. 2000. Zmienność u soi (*Glycine max* L. Merrill) indukowana mutagenem chemicznym. Rośliny Oleiste, XXI (2): 539-546.
- Spasibonek S., Byczyńska B., Krzymański J. 2000. Mutanty rzepaku ozimego podwójnie ulepszonych o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. Rośliny Oleiste, XXI (3): 715-724.
- Turner P.C., McLennon A.G., Bates A.D., White M.R.H. 2000. Krótkie wykłady – Biologia molekularna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Thurling N., Depittayanan V. 1992. EMS induction of early flowering mutants in spring rape (*Brassica napus*). Plant Breeding, 108: 177-184.
- Velasco L., Fernandez-Martinez J.M., de Haro A. 1995. Isolation of induced mutants in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* Braun) with low levels of erucic acid. Plant Breeding, 114: 454-456.
- Velasco L., Fernandez-Martinez J.M., de Haro A. 1998. Increasing erucic acid content in Ethiopian mustard through mutation breeding. Plant Breeding, 117: 85-87.
- Węgleński P. 1998. Genetyka molekularna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Wilczkowska J. 1970. Wyniki badań nad działaniem promieni jonizujących gamma na niektóre gatunki, odmiany i mieszańce roślin oleistych. Biuletyn IHAR 1–2 (94–95): 55-68.
- Winter P.C., Hickey G.I., Fletcher H.L. 2000. Krótkie wykłady – Genetyka. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Zhao Y., Wang M.L., Zhang Y.Z., Du L.F., Pan T. 2000. A chlorophyll – reduced seedling mutant in oilseed rape, *Brassica napus*, for utilization in F₁ hybrid production. Plant Breeding, 119: 131-135.