

MARCELINA KRUPA-MALKIEWICZZakład Hodowli Roślin Ogrodniczych
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wpływ mutagenów chemicznych na cechy morfologiczne u petunii (*Petunia* × *atkinsiana* D. Don)

Influence of chemical mutagens on morphological traits in petunia (*Petunia* × *atkinsiana* D. Don)

W pracy określono zmiany fenotypowe i genotypowe w pokoleniu M_1 i M_2 petunii (*Petunia atkinsiana* D. Don) odmiany Flash Red, wywołane azydkiem sodu (AS), siarczanem etylowo-metylowym (EMS), siarczanem metylowo-metylowym (MMS) i siarczanem dietylowym (DES), w stężeniach: 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 mM. Do oceny zmian genotypowych na poziomie DNA wykorzystano technikę ISSR-PCR. Otrzymane w pokoleniach M_1 i M_2 u petunii zmiany to: nieregularne białe przebarwienia na płatkach korony, ciemniejsze żyłkowania, zmiany koloru kwiatów z czerwonego na różowy, jaśniejsze przebarwienia na liściach, zmiana pokroju rośliny (kształt rozety). Częstotliwość zmian zależała od zastosowanego mutagenu i jego stężenia w roztworze. W pokoleniu M_1 największą częstotliwość zmian otrzymano stosując do indukowania mutacji EMS i MMS o stężeniu 1,5 i 2,0 mM, w pokoleniu M_2 — MMS, o stężeniu 2,0 mM.

Słowa kluczowe: petunia, mutacje, mutageny chemiczne, DNA, ISSR-PCR

The objective of the presented study was to induce mutation in petunia (*Petunia atkinsiana* D. Don) Flash Red using sodium azide (AS), ethyl methane-sulfonate (EMS), methyl methane-sulfonate (MMS) and diethyl sulphate (DES) of different concentrations 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mM. Genetic variation of petunia was investigated with the ISSR-PCR method. The morphological changes, observed in mutants in the M_1 and M_2 generations, referred principally to: lack of pigments in flowers and leaves, darkened midribs, colour of flowers, plant habit (shape of rosette). Frequency of new phenotypes in the progeny populations depended on the mutagen used and its dose. In the M_1 generation the most effective were EMS and MMS with doses 1.5 and 2.0 mM, M_2 — 2.0 mM MMS proved to be most efficient.

Key words: petunia, mutation, chemical mutagens, DNA, ISSR-PCR

WSTĘP

Wielkość efektu mutagenicznego zależy od właściwości fizycznych i chemicznych stosowanego mutagenu, jego stężenia w roztworze, czasu działania, genotypu rośliny i użytego do badań materiału wyjściowego (nasiona, cebulki, zarodki, tkanki, pyłek itp.).

Wszystkie te czynniki trzeba dla każdego gatunku a nawet odmiany dobrać każdorazowo na drodze eksperymentu (Briggs, 1968; Privalov i in., 1991; Przybyła, 1992; Muszyński i in., 1997; Rybiński 2001.). Niektórzy autorzy (Szarejko i in., 1978; Przybyła, 1992; Adamska i in., 1995; Berenschot i in., 2008) wielkość dawki stosowanego mutagenu uzależniają od ilości obserwowanych w badanej próbie uszkodzeń. Dawka optymalna czynnika mutagennego powinna więc zapewnić dużą frekwencję zaindukowanych mutacji, a także dostatecznie liczną populację pokolenia M_1 (Muszyński i in., 1997).

Spśród obecnie stosowanych mutagenów chemicznych na uwagę zasługuje azydek sodu (Adamska i in., 1995; Malepszy i in., 1989; Olejniczak i in., 1981; Rybiński, 2001; Szarejko i in., 1978). Mutagen ten nie powoduje powstawania niekorzystnych dla hodowców chimer. Dużym powodzeniem cieszą się również EMS i DES (Bhagwat i in., 1998; Nelshoppen i in., 1990; Latado i in., 2004). Ich zaletą jest duża skuteczność w uzyskaniu mutacji genowych i niska częstotliwość aberracji chromosomowych.

Celem pracy było określenie wpływu mutagenów chemicznych na cechy morfologiczne oraz częstotliwość występowania mutacji u petunii odmiany Flash Red wywołanych azydkiem sodu (AS), siarczanem dietylowym (DES), siarczanem etyloowo-etylowym (EMS) i siarczanem etyloowo-metylowym (MMS).

MATERIAŁ I METODY

Do chemicznej mutageny petunii (*Petunia × atkinsiana* D. Don) odmiany Flash Red wykorzystano azydek sodu (AS), siarczan etyloowo-metylowy (EMS), siarczan metyloowo-metylowy (MMS) i siarczan dietylowy (DES) w stężeniach 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 mM przygotowanych w roztworze buforu fosforowego o pH 4.

Indukowanie mutacji

Nasiona petunii (po 150 nasion na każde stężenie) moczono w roztworach poszczególnych mutagenów przez 1 h. Rośliny wyrosłe z nasion moczonych w wodzie stanowiły w doświadczeniu kontrolę. Po 1 h działania mutagenu nasiona płukano, dezynfekowano przez 15 min w 10% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), wysiewano do doniczek i umieszczano w pokoju wzrostowym w temperaturze $\pm 23^\circ\text{C}$ i oświetleniu 16 h ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Dziewięciodniowe siewki przeniesiono do szklarni i pozostawiono tam do momentu zawiązania kwiatów. Zebrane z roślin M_1 nasiona wysiano w celu otrzymania pokolenia M_2 . Dla roślin kontrolnych i pokolenia M_1 , M_2 określono długość korzeni, wysokość roślin, liczbę zawiązanych na roślinie pąków i kwiatów oraz ich barwę i zmiany w budowie.

Analiza zmian na poziomie DNA

Z roślin o innym, niż kontrola fenotypie, izolowano DNA (Genomic DNA Prep Plus, A&A Biotechnology). Amplifikację DNA prowadzono metodą ISSR-PCR (Ziętkiewicz i in., 1994). W badaniach wykorzystano ogółem 37 starterów ISSR. Produkty ISSR-PCR (Mastercykler 5333 — Eppendorf) rozdzielano w 2% żelu agarozowym, przy stałym napięciu prądu 100V, uwidaczniawo w obecności bromku etydydy i dokumentowano (aparatur Polaroid DS — 34). Uzyskane obrazy analizowano używając programu komputerowego „Diversity one 1.3” (Pharmacia LKB). Widoczne na zdjęciach produkty

reakcji ISSR-PCR opracowano w układzie binarnym 0–1. Określono liczbę i długości produktów specyficznych, mono- i polimorficznych różnicujących genotypy badanych roślin petunii. W oparciu o wyliczony współczynnik dystansu genetycznego Nei i Li (1979) metodą UPGMA (unweighted pair group method) wykreślono drzewo podobieństwa filogenetycznego (Treecon Van de Peer i in., 1994; Phyltool). Prawdopodobieństwo prawdziwych powiązań filogenetycznych między badanymi obiektami przedstawionymi topologią drzewa przetestowano metodą bootstrap (Treecon). Uwzględniono w niej próbkowanie na poziomie 1000 losowań, co zdaniem Felsensteina (1985) pozwala na potwierdzenie monofiletyzmu drzewa z prawdopodobieństwem rzędu 99%.

WYNIKI I DYSKUSJA

Stosowane w pracy mutageny miały ujemny wpływ na zdolność kiełkowania nasion petunii (tab. 1). Najniższą zdolnością kiełkowania (16%) charakteryzowały się nasiona moczone w 1,0 mM roztworze AS, najwyższą — w 1,5 mM EMS (66%). Otrzymane wyniki badań są zgodne z wynikami innych autorów (Adamska i in., 1995; Rzepka-Plevneš i in., 2004).

Tabela 1

Procent skielkowanych nasion petunii w zależności od rodzaju i stężenia zastosowanego w doświadczeniu mutagenu
Percentage of seeds germination depending on mutagen and its dose

Mutagen Mutagen	Stężenie (mM) Concentration	Procent skielkowanych nasion (%) Germination (%)
Kontrola — Control	-	100
AS	0,5	23
	1,0	16
	1,5	46
	2,0	16
Średnia —mean	25,25	
DES	0,5	31
	1,0	39
	1,5	36
	2,0	18
Średnia —mean	31	
EMS	0,5	26
	1,0	29
	1,5	66
	2,0	52
Średnia —mean	43,25	
MMS	0,5	47
	1,0	46
	1,5	61
	2,0	50
Średnia —mean	51	

W pokoleniu M₁ i M₂ petunii obserwowano następujące zmiany fenotypowe (oznaczone na rysunku 1 strzałkami): nieregularne przebarwienia kwiatów (w pokoleniu M₁ — 73% mutantów z obserwowaną zmianą, M₂ — 66%) w postaci drobnych, białych plamek i

kresek na płatkach, rozjaśnioną barwę kwiatów na brzegach i na całych płatkach korony występujące w postaci różowych lub białych przebarwień, zmianę koloru kwiatu — z czerwonego na różowy. Przebarwienia chlorofilowe na liściach. Podobne do otrzymanych w niniejszej pracy zmiany w fenotypie roślin otrzymali u petunii Rzepka-Plevneš i wsp. (1998, 2004), u chryzantemy — Mandal i wsp. (2000) oraz Latado i wsp. (2004) i u tilandsji — Koh i wsp. (2001).

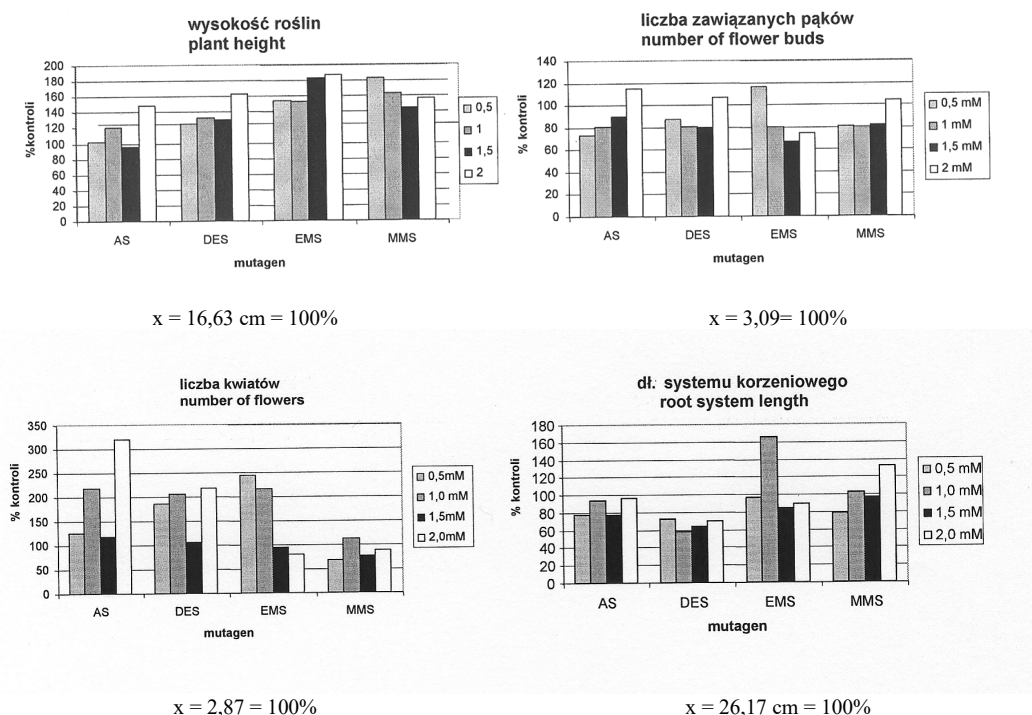


Rys. 1. Rośliny petunii a) kontrolne, b) pokolenia M_1 i c, d) pokolenia M_2 z widocznymi zmianami
Fig. 1. Petunia flowers with phenotype variations a) control, b) M_1 generation and c, d) M_2 generation

Częstotliwość wszystkich obserwowanych zmian fenotypowych w pokoleniu M_1 i M_2 petunii była najwyższa po zastosowaniu do indukowania mutacji EMS (M_1 — 22,2%, M_2 — 31,5%) i MMS (M_1 — 47,4%, M_2 — 61,1%), najniższa — AS (M_1 — 5,2%, M_2 — 11,1%) i DES (M_1 — 5,5%, M_2 — 15,8%) i była zbliżona do wyników badań otrzymanych przez innych autorów (Mandal i in., 2000; Latado i in., 2004; Koh i in., 2001).

Otrzymane wyniki wykazały, że stosowane w doświadczeniu mutageny wpływały stymulująco na takie cechy jak: wysokość, liczba kwiatów i długość korzeni (rys. 2, 3). Rośliny wyższe od kontroli obserwowano po zastosowaniu do indukowania mutacji w

pokoleniu M₁ — 1,5 i 2,0 mM EMS (180 i 190% kontroli), w M₂ — 0,5 mM AS, DES i EMS (120–130% kontroli).

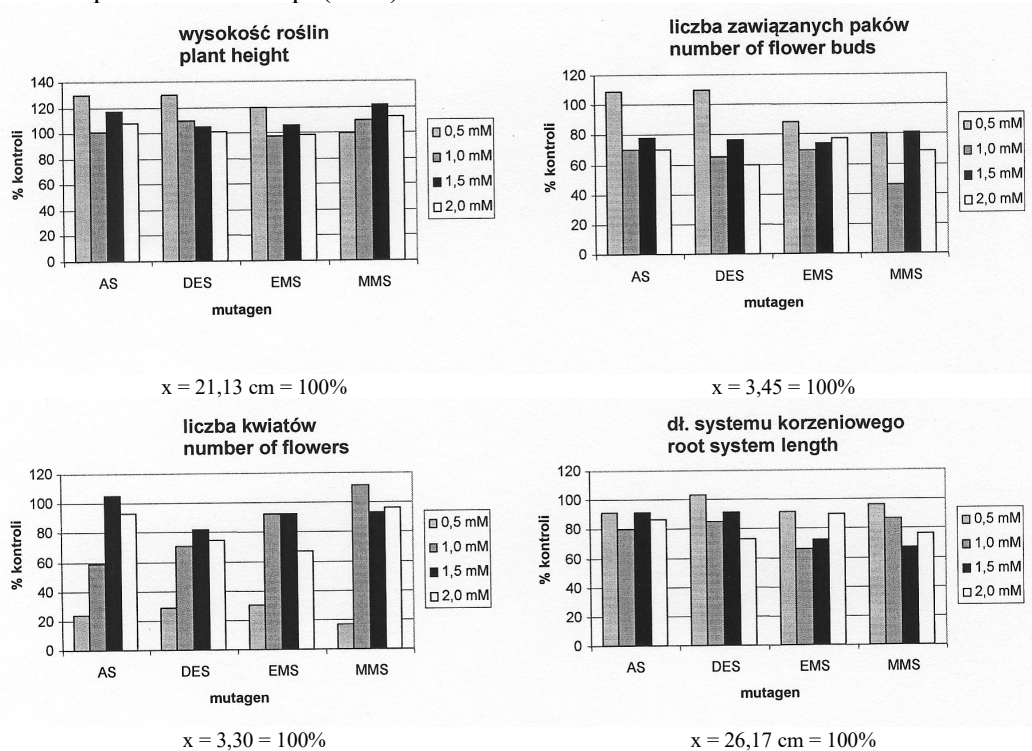


Rys. 2. Wysokość roślin, liczba zawiązanych pąków kwiatowych, liczba kwiatów i długość systemu korzeniowego petunii pokolenia M₁ w zależności od zastosowanego mutagenu wyrażona % kontroli (x)
Fig. 2. Plant height, number of flower buds, number of flowers and root system length of petunia in the M₁ depending on the mutagen, expressed as percentage of the control (x)

Liczbę zawiązanych pąków kwiatowych na poziomie kontroli charakteryzowały się tylko rośliny pokolenia M₁ z kombinacji 2,0 mM AS i DES (107 i 116% kontroli), M₂ – 0,5 mM AS i DES (110% kontroli). Najwięcej kwiatów w stosunku do kontroli obserwowano u petunii M₁ po zastosowaniu 2,0 mM roztworu AS (320% kontroli), M₂ – 1,5 mM AS i 1,0 mM MMS (105 i 111% kontroli). Najdłuższym systemem korzeniowym charakteryzowały się petunie pokolenia M₁, u których zastosowano 1,0 mM EMS (170% kontroli) i 2,0 mM MMS (130% kontroli).

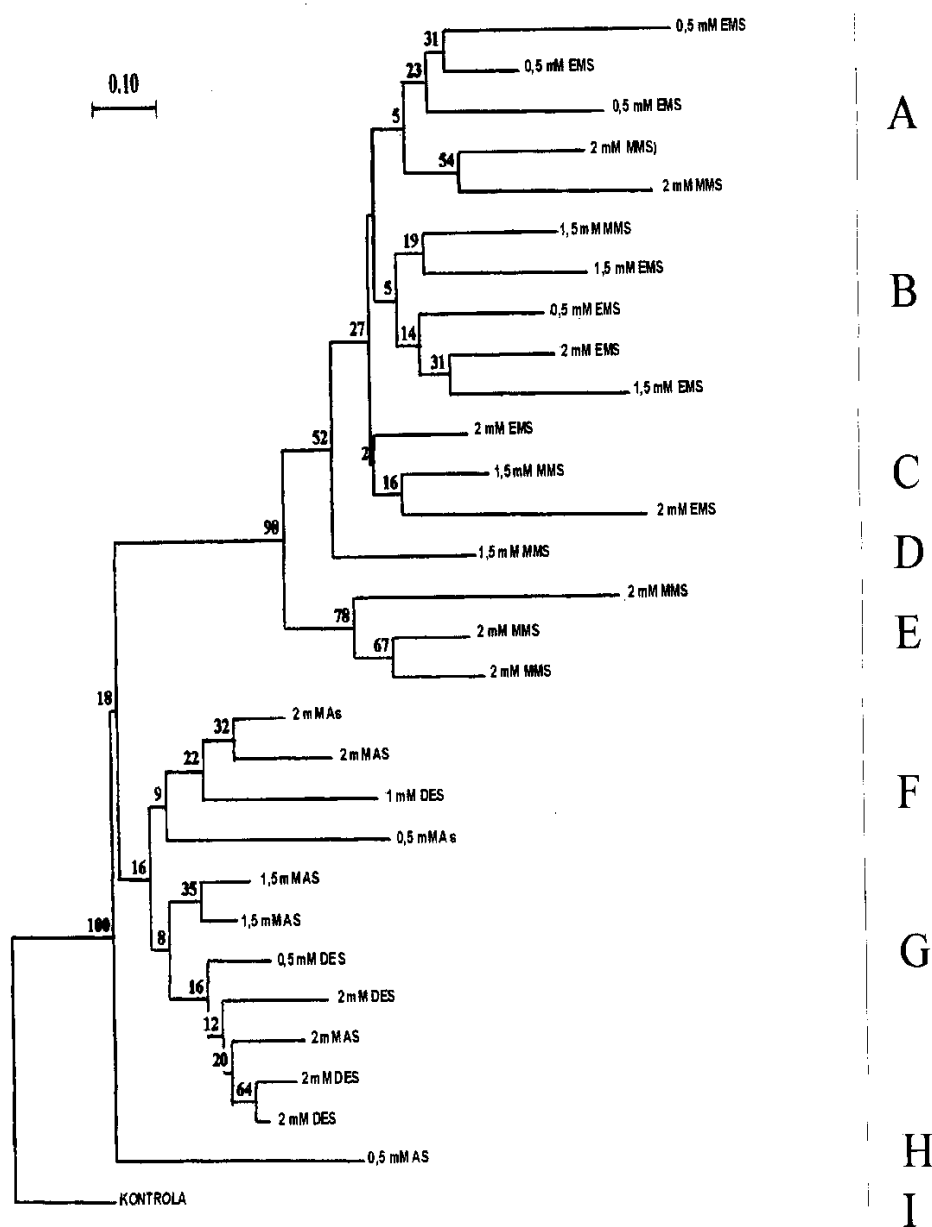
Do oceny podobieństwa genetycznego między otrzymanymi mutantami wybrano 30 roślin petunii pokolenia M₁ i 13 — pokolenia M₂. Spośród 37 zastosowanych w doświadczeniu starterów ISSR widoczne na żelach produkty amplifikacji generowało 8 z nich w przypadku pokolenia M₁ (nr startera 801, 809, 810, 812, 829, 836, 818, 840) i 18 - pokolenia M₂ (nr startera 808, 804, 822, 819, 847, 807, 821, 841, 840, 839, 816, 809, 820, 818, 812, 801, 802, 805). Ogółem dla badanych genotypów petunii M₁ otrzymano 913 produktów ISSR, dla M₂ — 854. Długość otrzymanych fragmentów ISSR mieściła się w

granicach od 204 do 3866 pz (dla M₁) i 203 do 2000 pz (dla M₂). W wyniku przeprowadzonych reakcji ISSR-PCR amplifikowano wiele polimorficznych *loci*, różnicujących genotyp mutanta od genotypu rośliny kontrolnej. Częstotliwość występowania produktów polimorficznych w pokoleniu M₁ wynosiła 96,7% (883), M₂ — 68,3% (583). Produktów specyficznych genotypowo, których nie stwierdzono u roślin kontrolnych było w M₁ — 0,44% (4), w M₂ — 1,4% (12). Ogółem w prowadzonych reakcjach ISSR-PCR jeden starter amplifikował średnio 4 (M₁) i 7 (M₂) *loci*. Podobne wyniki badań, prowadzonych za pomocą opisywanej metody, otrzymali Nagaoka i Ogihara (1997), Kochieva i wsp. (2002) oraz Rzepka-Plevneš i wsp. (2006).

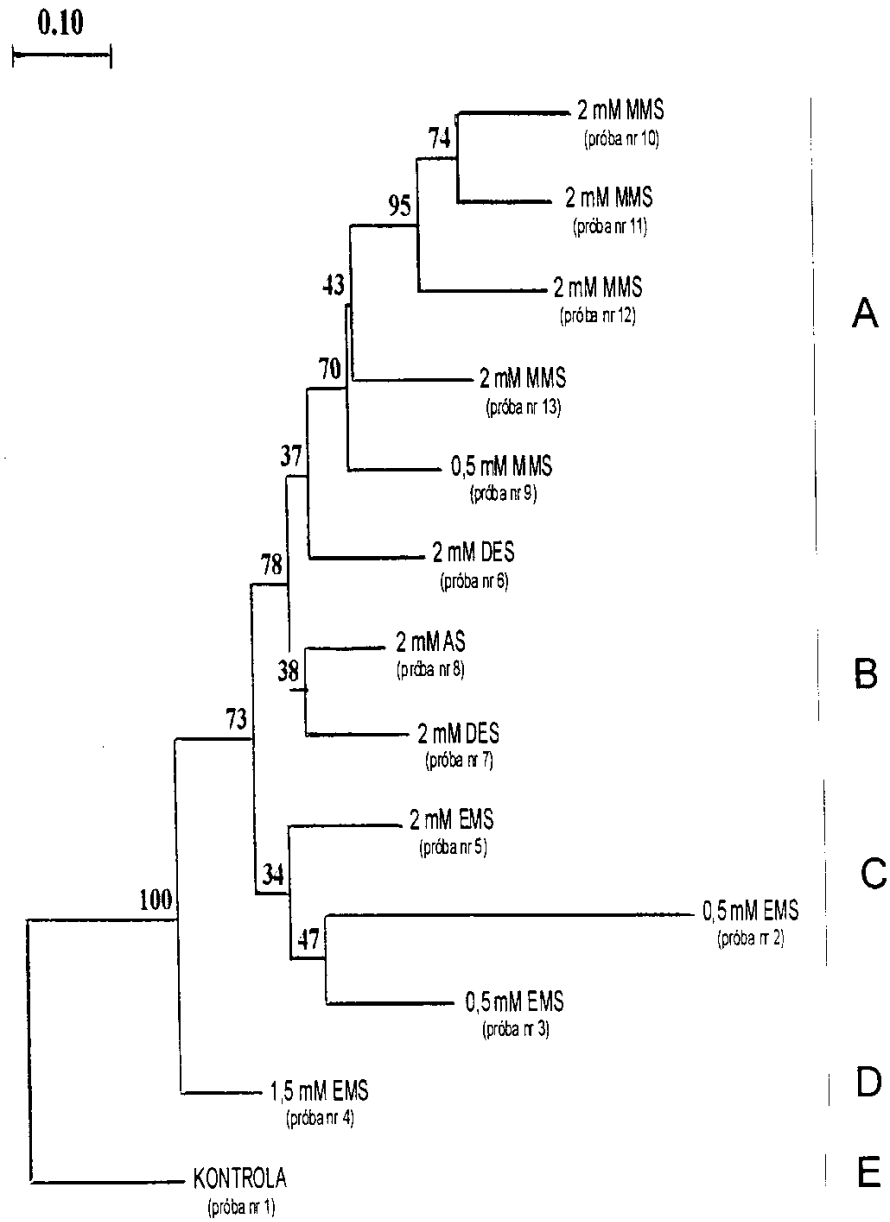


Rys. 3. Wysokość roślin, liczba zawiązanych pąków kwiatowych, liczba kwiatów i długość systemu korzeniowego petunii pokolenia M₂ w zależności od zastosowanego mutagenu wyrażona % kontroli (x)
Fig. 3. Plant height, number of flower buds, number of flowers, root system length of petunia in the M₂ generation depending on the mutagen, expressed as percentage of the control (x)

Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdziły duży zakres zmienności w obrębie badanych sekwencji, który przejawiał się amplifikowaniem *loci* polimorficznych. Na podstawie obliczonych współczynników podobieństwa genetycznego i analizy skupień UPGMA wykreślono drzewo podobieństwa filogenetycznego, na którym rośliny kontrolne dla obu badanych pokoleń mutantów stanowiły odrębną grupę (rys. 4, 5). Rośliny pokolenia M₁ były podobne do kontrolnych od 32,9 do 94,3%, pokolenia M₂ — od 38,7 do 80,3%.



Rys. 4. Drzewo podobieństwa filogenetycznego utworzone dla mutantów pokolenia M_1 petunii i badania kontrolnego. Liczby wskazują 1000-krotne „próbkiwanie” metodą bootstrap, wyrażone w procentach
 Fig. 4. UPGMA dendrogram representing genetic relationships among mutants and control in the M_1 generation of petunia. The numbers at the forks indicate 1000 bootstrap replications expressed in per-cents



Rys. 5. Drzewo podobieństwa filogenetycznego utworzone dla mutantów pokolenia M₂ petunii i badania kontrolnego. Liczby wskazują 1000 krotne „próbkowanie” metodą bootstrap, wyrażone w procentach
Fig. 5. UPGMA dendrogram representing genetic relationships among mutants and control in the M₂ generation of petunia. The numbers at the forks indicate 1000 bootstrap replications expressed in per-cents

Procent podobieństwa filogenetycznego był podstawą do podzielenia badanych roślin na 9 (M_1) i 5 (M_2) grup filogenetycznych oznaczonych na rysunku 4 i 5 literami A-I. Otrzymane wyniki badań znajdują potwierdzenie w wynikach innych autorów (Rzepka-Plevneš i in., 2004, 2006, 2007; Smolik i in., 2006).

Niektóre ze zmian fenotypowych (nieregularne przebarwienia kwiatów, rozjaśniona barwa na brzegach i na całych płatkach korony) w pokoleniu M_1 powtórzyły się w pokoleniu M_2 , co świadczy o utrwaleniu nowych cech.

WNIOSKI

1. Spośród zastosowanych w doświadczeniu mutagenów chemicznych (AS, DES, EMS, MMS) najwyższą częstotliwość zmian fenotypowych w pokoleniu M_1 otrzymano przy użyciu do indukowania mutacji 1,5 mM roztworu EMS i 2,0mM MMS (odpowiednio: 31,5–47,4%), w pokoleniu M_2 — MMS (61,1%) o stężeniach 0,5 i 2,0 mM.
2. Wszystkie biorące udział w doświadczeniu mutageny, niezależnie od zastosowanej dawki (0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 mM) wpływały stymulująco na rozwój pędów, korzeni i liczbę zawiązanych kwiatów oraz ujemnie na liczbę zawiązanych pąków kwiatowych.
3. Analiza polimorfizmu DNA, przeprowadzona techniką ISSR-PCR, wskazała na istotne różnice w obrębie sekwencji mikrosatelitarnych między mutantami petunii a roślinami kontrolnymi.

LITERATURA

- Adamska E., Jeżowski S., Olejniczak J., Rybiński W. 1995. Wpływ mutagenów chemicznych na zmienność indukowaną u rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste*. XVI: 57 — 62.
- Berenschot A. S., Zucchi M. I., Tulmann-Neto A., Quecini V. 2008. Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. *Braz. J. Plant Physiol.* 20 (2): 16 — 27.
- Bhagwat B., Duncan E. J. 1998. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa spp.*, AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. *Sci. Hort.* 73: 11 — 22.
- Briggs R. W. 1968. Effects of post-treatment hydration and dehydration of ethyl methanesulphonate — treated maize seeds. *Mutation in plant breeding II*. 47 — 55.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783 — 791.
- Kochieva E. Z., Ryzhova N. N., Kharapalova I. A., Pukhalskiy V. A. 2002. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Rus. J. Genet.*, 38, 8: 958 — 966.
- Koh Y. C., Davies F. T. 2001. Mutagenesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). *Sci. Hort.* 87: 225 — 240.
- Latado R. R., Adames A. H., Neto A. T. 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 77: 103 — 106.
- Malepszy S., Niemirowicz – Szczyt K., Przybecki Z. 1989. *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1989. 282.
- Mandal A. K. A., Chakrabarty D., Datta S. K. 2000. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 60: 33 — 38.
- Muszyński S., Stankiewicz D. 1997. Optymalizacja dawek mutagenów w hodowli bobiku (*Vicia faba minor*). *Hod. Rośl. Nas. Biul. Branż.* 2: 5 — 9.

- Nagaoka T., Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 597 — 602.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269 — 5273.
- Nelshoppen J. M., Widholm J. M. 1990. Mutagenesis techniques in plant tissue cultures. In: *Methods in molecular biology*, vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture. Ed by J. W. Pollard, J. M. Walker. The Humana Press: 413 — 441.
- Olejniczak J., Singh C., Hoppe P. 1981. Mutageniczne działanie azydku sodu (SA) i propane sultone (PS) u jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare*). Mutageneza roślin wyższych. Uniw. Śląski Katowice. Mat. IV Ogólnopol. Konf. Mut., Mieszkowice 23-25 X.1978, pod red. M. Małuszyńskiego: 176 — 178.
- Privalov G., Yakovleva I. 1991. Dominant mutation in plants induced by ionizing radiation and chemical mutagens. Plant mutation breeding for crop improvement: proc. of an international symposium org. by IAEA and FAO of the United Nations held in Vienna, 18-22 June 1990. IAEA.-Vienna, vol. 2: 407 — 410.
- Przybyła A. 1992. Mutation breeding of alstroemeria in Poland. *Acta Hort.* 325: 561 — 565.
- Rybiński W. 2001. Mutants of grasspea (*Lathyrus sativus* L.) obtained after use of chemomutagens. *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 2: 41.
- Rzepka-Plevneš D., Misiak K., Skrzypiec K. 1998. Wpływ azydku sodu na zmiany fenotypowe petunii (*Petunia x hybrida*). *Zesz. Nauk. Akad. Rol. im. H. Kołłątaja w Krakowie.* 33: 769 — 772.
- Rzepka-Plevneš D., Smolik M., Chochłowska A., Krupa – Małkiewicz M. 2004. Molekularna charakterystyka wybranych grup roślin pokolenia M₁ petunii (*Petunia x hybrida*) przy użyciu markerów molekularnych. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agric.* 242 (98): 157 — 160.
- Rzepka-Plevneš D., Smolik M., Tańska K. 2006. Genetic similarity of chosen *Syringa* species determined by the ISSR-PCR technique. *Dendrobiology* 56: 61 — 67.
- Rzepka-Plevneš D., Smolik M., Drzewiecka K. 2007. Genetic variation of some botanical and cultivar varieties of *Acer* sp. *JFAE* 5(3&4): 481 — 485.
- Smolik M., Zieliński J., Rzepka-Plevneš D., Adamska K. 2006. Polymorphism of microsatellite sequences in morphologically and phenologically different genotypes of *Lonicera periclymenum*. *JFAE* 4(2): 226 — 233.
- Szarejko I., Rurańska B. 1978. Mutageniczny efekt azydku sodu u jęczmienia (*Hordeum vulgare*) odmiany Aramir. Mutageneza roślin wyższych: materiały III Ogólnopolskiej Konferencji Mutacyjnej, Kalatówki 9–11 grudnia 1976, 112 — 116.
- van de Peer Y., de Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl. Biosc.* 10 (5): 569 — 570.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase Chain Reaction amplification. *Genetics* 20: 176 — 183.