

Ćwiczenie 06b: Środki mutagenne

Środki mutagenne i ich efektywność. Środki mutagenne w środowisku człowieka. Określanie dawki optymalnej. Znaczenie mutagenezy.

Kornelia Polok

1. Środki mutagenne i ich efektywność

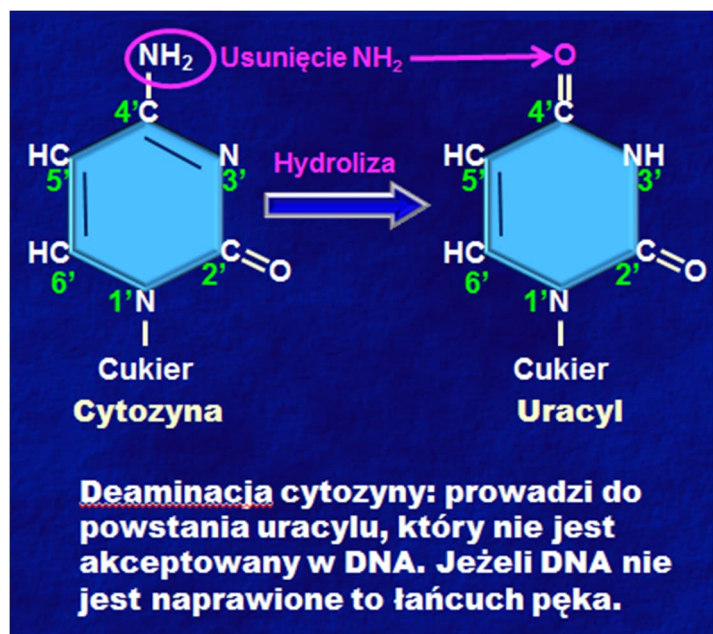
1.1. Uszkodzenia DNA

1.1.1. Definicja i przyczyny uszkodzeń DNA



Uszkodzenia DNA to **błędy**, które powstają w strukturze chemicznej DNA pod wpływem **środowiska** i procesów metabolicznych. Uszkodzenia DNA obejmują przerwanie **łańcucha** DNA, brak zasady azotowej lub jej **chemiczną zmianę**.

- Uszkodzenia struktury DNA to między innymi przerwanie pojedynczej nici pod wpływem aktywnych form tlenu, a także przerwanie podwójnej helisy.
- Zmiany chemiczne w DNA obejmują metylację zasad (alkilację), która prowadzi do powstania metyloguaniny oraz hydrolizę, która prowadzi do deaminacji (usunięcie NH_2), depuracji i depirymidyzacji.
- Zmiany sekwencji DNA to wstawienie błędnego nukleotydu podczas replikacji.



Rys. 1.1.1. Deaminacja jako uszkodzenie DNA.

1.1.2. Częstość uszkodzeń DNA

U ssaków uszkodzenia DNA powstają z częstością 10^4 - 10^6 uszkodzeń w komórce w ciągu dnia. U człowieka obserwuje się średnio 5×10^4 wszystkich uszkodzeń w komórce w ciągu dnia, czyli 2000 ~uszkodzeń w ciągu godziny.

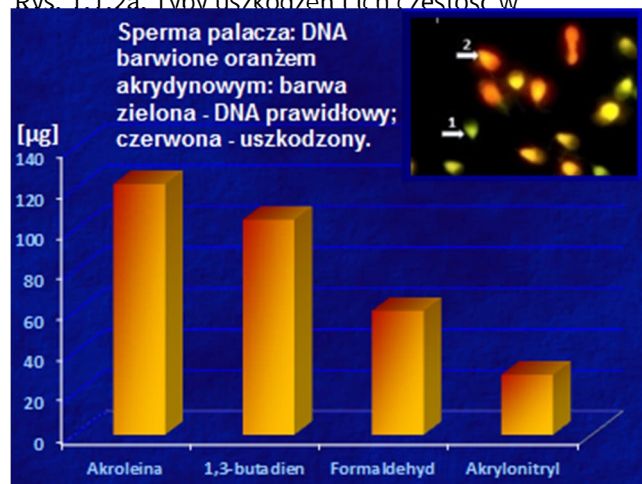
- Czynniki wywołujące uszkodzenia DNA to między innymi:
 - akroleina: przyłącza się do guanozyny w DNA tworząc 3-pierścieniowy produkt i powodując pęknięcie łańcucha;
 - 1,3-butadien: redukuje metylację DNA i histonów;
 - Formaldehyd: powoduje sieciowanie (cross-linking) w DNA;
 - Akrylonitryl: powoduje stres oksydacyjny i deaminacji.

Organizmy mają zdolność do naprawy uszkodzeń w DNA. Jeżeli nie są one naprawiane to prowadzą do mutacji.

1.2. Środki mutagenne

Typ uszkodzenia	Liczebność
Pęknięcie jednej nici DNA	50 000
Depurynacja	10 000
Alkilacja zasad	5 000
Uszkodzenie oksydacyjne	2 000
Deaminacja	600
Sieciowanie (cross-linking)	10
Pęknięcie podwójnej nici	10

Rys. 1.1.2a. Typy uszkodzeń i ich częstość w



Rys. 1.1.2b. Zawartość czynników uszkadzających DNA w papierosach.

Mutagen: czynnik, który indukuje uszkodzenia w DNA i w ten sposób przyczynia się do podniesienia częstości mutacji ponad poziom typowy dla danego organizmu.

Spektrum mutacji powstałych pod wpływem mutagenów nie różni się od mutacji spontanicznych. Głównym efektem działania mutagenu jest podniesienie częstości mutacji co najmniej o rząd wielkości.

1.2.1. Mutageny fizyczne

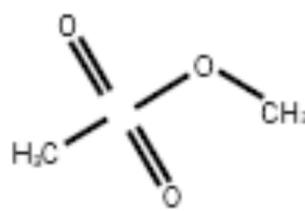
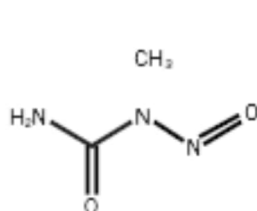
- Promieniowanie jonizujące: najczęściej wykorzystywany typ mutagenu fizycznego. Charakteryzuje się wysoką energią zdolną wybić elektron z orbity atomowej. Atomy stają się jonami. Wyróżnia się promieniowanie jonizujące korpuskularne i niekorpuskularne.

Tabela 1.2.1. Rodzaje promieniowania jonizującego wykorzystywane w mutageniezie.		
Mutagen	Częstotliwość [s^{-1}]	Energia [kJ/mol]
Korpuskularne		
Cząstki α		$4,1 \times 10^8$
Cząstki β		$1,5 \times 10^7$
Niekorpuskularne		
Promieniowanie kosmiczne	6×10^{22}	$2,4 \times 10^9$
Promieniowanie γ	3×10^{20}	$2,4 \times 10^8$
Promieniowanie X	3×10^{17}	$2,4 \times 10^5$

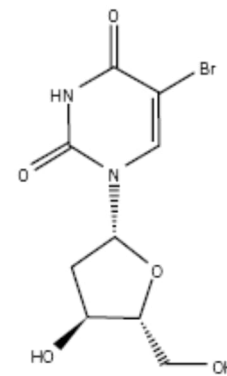
- Promieniowanie niejonizujące: UV-A, (315-400 nm). UVB (280-315 nm). Zdolność do wywoływania mutacji wynika z interakcji z DNA oraz innymi cząsteczkami biologicznymi ponieważ fale UV są preferencyjnie absorbowane przez zasady azotowe w DNA oraz aminokwasy aromatyczne.

1.2.2. Mutageny chemiczne

- Czynniki alkilujące: gaz musztardowy, EMS, MMS, EMU, MNU. Dodają grupy metylowe i etylowe do zasad azotowych. W zależności od miejsca przyłączenia dochodzi do degradacji zasady (miejsce pozbawione zasady azotowej) lub substytucji.



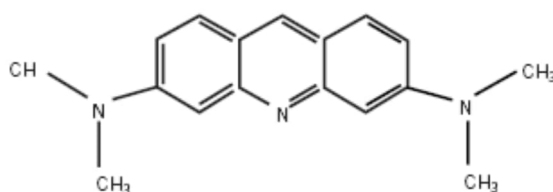
Rys. 1.2.2a. 1-metylo-1-nitrosomocznik, MNU (po lewej) i metanosulfonian metylowy, MMS (po prawej).



Rys. 1.2.2b. Bromodeoksyurydyna.

- Analogi zasad: 3 bromouracyl, 2-aminopuryna, bromodeoksyurydyna. Wstawiane są do DNA w miejsce normalnych zasad azotowych podczas replikacji (na skutek tautomerizacji). W efekcie dochodzi do substytucji, najczęściej tranzycji.

- Środki interkalujące: barwniki akrydynowe, aminoakryna,



Rys. 1.2.2c. Oranż akrydynowy.

proflawina, bromek etydy. Ulegają insercji pomiędzy zasady azotowe. Nici DNA ulegają wyprostowaniu, co jest rozpoznawane przez polimerazę DNA jako dodatkowa zasada. W efekcie dochodzi do insercji.



1.2.3. W tabeli poniżej podano nazwy mutagenów oraz grupy, do których mogą należeć. Proszę przyporządkować mutagen oznaczony cyfrą do grupy oznaczonej literą.

Skrót		Grupa	
Symbol	Nazwa mutagenu	Symbol	Nazwa grupy
1	Neutrony	A	Promieniowanie jonizujące, nie-korpuskularne, źródło aparat rentgena
2	Proflawina	B	Związki alkilujące
3	NaN ₃	C	Promieniowanie jonizujące, korpuskularne
4	Gamma	D	Analogi zasad
5	MNU	E	Środki interkalujące
6	UV-B	F	Promieniowanie jonizujące, nie-korpuskularne, źródłem są izotopy ⁶⁰ Co, ¹³⁷ Cs
7	X	G	Inne związki chemiczne
8	5-Bromouracyl	H	Promieniowanie niejonizujące

2. Środki mutagenne w środowisku człowieka

2.1. Mutageny naturalne



W środowisku naturalnym występuje wiele związków oraz czynników fizycznych, które mogą działać mutagenie. Należy do nich promieniowanie jonizujące, aminy heterocykliczne, aromatyczne związki węgla i pochodne N-nitrozyłowe. Mutagenne działanie mogą mieć mykotoksyny, które powstają na skutek złego przechowywania żywności. Szczególnie niebezpieczne jest skażenie grzybami z rodzaju *Aspergillus*, które może wystąpić w produktach rolnych źle przechowywanych lub przetworzonych. Czynnikiem ryzyka jest także otyłość, która zwiększa genotoksyczny efekt toksyn środowiskowych podczas, gdy ruch i lekkie niedożywienie działają przeciwnie.

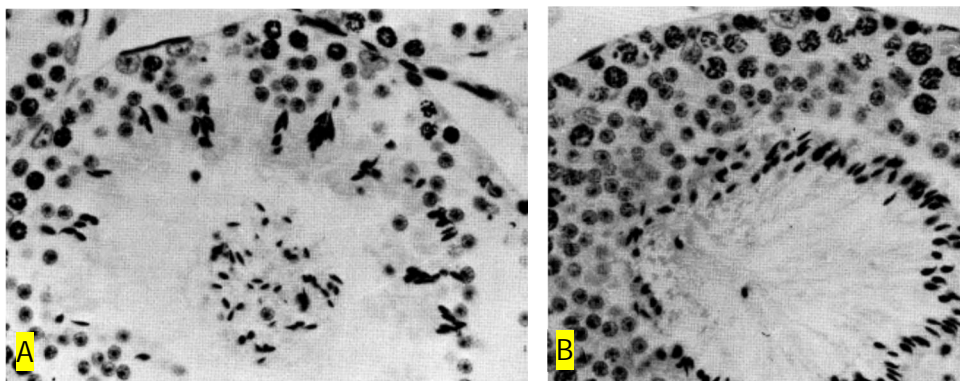
2.1.1. Przypadek DDT

Dichlorodifenylotrchloroetan: organiczny związek z grupy chlorowanych węglowodorów. Stosowany jako środek owadobójczy w latach 1940-1960. Jest to związek trwały. W Afryce stosowany do walki z malarią. Początkowo uważany był za związek bezpieczny dla środowiska. Począwszy od 1962 r. zaczęły pojawiać się informacje o negatywnym wpływie na faunę, zwłaszcza ptaki, a także faunę morską. Wykazano, że DDT powoduje anomalie w budowie jądra komórkowego, mitochondriów oraz przedwczesny rozpad lizosomów w wątrobie szczurów. Obniżoną płodność i wzrost częstości poronień zaobserwowano u myszy, ptaków drapieżnych oraz troci wędrownej.

W latach 1970 przeciętny mieszkaniec USA konsumował około 10 µg DDT dziennie. Gromadzenie się DDT wykazano w mleku matek karmiących, a także w jajnikach i jądrach. Według CDC czas połowicznego rozpadu DDT w ciele człowieka wynosi 6-10 lat. W 2005 CDC wykazało obecność

DDT w próbkach krwi prawie wszystkich Amerykanów. Zawartość ta zaczęła spadać od momentu światowego zakazu używania DDT, który wprowadzono dopiero w 2004 r.

U człowieka DDT jest antagonistą receptorów adrenergicznych. Uznaje się go również za związek potencjalnie kancerogenny. W szczególności stwierdzono wpływ DDT na raka trzustki, wątroby i piersi. Badania wykazały wpływ na przedwczesne zakończenie ciąży, obniżenie jakości plemników.



Rys. 2.1.1. Kanaliki nasienne myszy po traktowaniu DDT (A) oraz kanaliki nasienne myszy kontrolnych (B).

2.1.2. Działanie mutagenne DDT

DDT indukuje pęknięcia chromosomowe u cebuli (*Allium cepa*) oraz w liniach komórkowych ssaków. Przyjmuje się, że efekt DDT jest porównywalny z dawką promieniowania 25 radów. U myszy traktowanych DDT obserwowano istotny wzrost częstości pęknięć chromosomowych oraz uniwalentów. Stwierdzono utratę długiego ramienia chromosomu Y. Nie zaobserwowano wyższej częstości translokacji. Mutageniczny efekt obserwowano także u *Drosophila melanogaster* i *Neurospora crassa*.

2.2. Wpływ promieniowania jonizującego na człowieka

Siwert (Sv): jednostka SI określająca wpływ promieniowania na organizmy żywe. Siwert oznacza ryzyko zdrowotne, a dokładnie prawdopodobieństwa nowotworu lub zmian genetycznych spowodowanych promieniowaniem. Jeden Siwert (1 Sv) to taka dawka promieniowania, w wyniku której prawdopodobieństwo nowotworu wynosi 5%.

➡ Zamiast siwertów dawki promieniowania często podaje się w postaci ekwiwalentu bananowego (BED). Banany zawierają naturalnie występujące izotopy, zwłaszcza potas (^{40}K). BED ma głównie znaczenie edukacyjne. Radioaktywne izotopy potasu występują także w ziemniakach, ziarnach fasoli, słonecznika.



2.2.1. Wiedząc, że 98 nSv odpowiada 1 średniemu bananowi (1 BED) podaj jakiej ilości bananów odpowiadają dawki promieniowania podane w punktach A-C. Przyjmując, że 1 banana je się 2 minuty, podaj ilu minutom, godzinom i dniom odpowiadają poniższe dawki promieniowania.

- A. Paczka papierosów: 986 nSv (2 punkty)
- B. Częste loty samolotem, 1,5 mSv rocznie (2 punkty)
- C. 6 miesięcy na stacji kosmicznej: 80 mSv (2 punkty)

2.2.2. Przyjmując, że roczna dawka promieniowania naturalnego na jakie jest ekspozowany człowiek wynosi 3 mSv, podaj ilu miesiącom i dniom odpowiadają dawki podane w punktach A-C w zadaniu 2.2.1. Proszę przyjąć 1 miesiąc = 30.5 dni. (2 punkty/obliczenie)

3. Określanie dawki optymalnej

3.1. Projektowanie doświadczeń



Mutageny fizyczne i chemiczne wykorzystuje się do indukowania mutacji w hodowli roślin. Jednym z najczęściej stosowanych środków fizycznych jest promieniowanie jonizujące (gamma). Traktowanie przeprowadza się wykorzystując źródła promieniowania w specjalistycznych jednostkach (np. instytutach fizyki jądrowej), przy czym najczęściej napromieniowuje się nasiona. Podobnie można traktować komórki zwierzęce tzn. napromieniować je określoną dawką mutagenu. Natomiast traktowanie mutagenami chemicznymi przeprowadza się w laboratoriach poprzez moczenie nasion w roztworze mutagenu. Komórki zwierzęce hoduje się *in vitro* na pożywkę zawierającą mutagen, a następnie, po określonym czasie ekspozycji, przenosi się je na pożywkę bez mutagenu. Przy zachowaniu ostrożności metoda ta jest powszechnie dostępna dla hodowców oraz naukowców. Mutageny chemiczne wykazują dużą efektywność w indukowaniu mutacji punktowych dlatego są chętnie wykorzystywane w eksperymentach.

Do najczęściej stosowanych mutagenów chemicznych zalicza się:

- azydek sodu, NaN_3 , $M = 65 \text{ g/mol}$, wywołuje mutacje punktowe typu tranzycji i transwersji;
- MNU, $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$, $M = 103 \text{ g/mol}$, związek alkilujący, wywołuje mutacje punktowe.

Pokolenia:

- M_0 : pokolenie, np. rośliny przed traktowaniem mutagenem.
- M_1 : pokolenie, np. rośliny po traktowaniu mutagenem.
- M_2 : pokolenie, np. rośliny będące potomstwem M_1 otrzymanym np. przez samozapylenie.

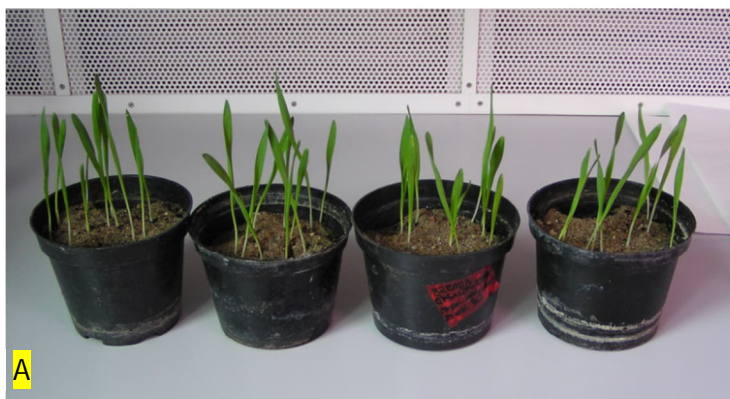
3.2. Dawka optymalna

3.2.1. Dawka optymalna to taka dawka mutagenu, która wywołuje stosunkowo wysoką częstość mutacji punktowych przy akceptowalnych efektach somatycznych.

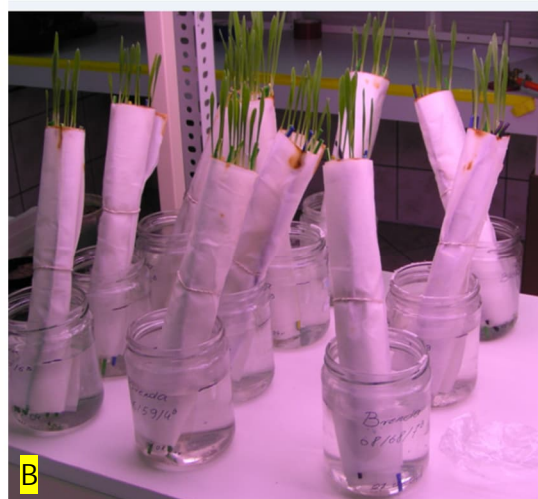
- Każdy mutagen, oprócz efektów genetycznych, wywołuje efekty somatyczne w pierwszym pokoleniu po traktowaniu mutagenem (M₁). W przypadku traktowania nasion, pierwszym pokoleniem są rośliny, które wyrosły z traktowanych nasion.
- Efekty somatyczne to opóźnienie kielkowania, późniejszy rozwój, rośliny są niższe, częściowo sterylne i dają niższy plon. Do ich oceny stosuje się proste testy laboratoryjne i polowe, np. kielkowanie w szalkach Petriego, obserwacja wzrostu w doniczkach lub na wążkach bibułowych.
- Efekty somatyczne określa się procentowo względem nietraktowanej kontroli.
- W hodowli dąży się do wybrania takich dawek, aby efekty somatyczne były jak najniższe. Za akceptowalny poziom przyjmuje się efekty na poziomie 30-40%, co oznacza, że wartości mierzonych parametrów są gorsze o 30-40% w porównaniu z kontrolą.

$$\% \text{ redukcji} = \frac{K - M_1}{K} \times 100\%$$

K: kontrola, M₁: rośliny po traktowaniu mutagenem



A



B

Rys. 3.2.1. Ocena uszkodzeń somatycznych (redukcja wzrostu siewki oraz długości korzenia w teście doniczkowym Effebrechta (A) oraz teście na wążkach Kunzla (B)).

3.2.2. Częstość mutacji punktowych oblicza się jako częstość (lub procent) pojawiania się siewek z mutacjami chlorofilowymi, do których należą:

- siewki albinotyczne,
- siewki jasnozielone (*viridis*),
- siewki żółte (*xantha*),
- inne będące połączeniem kilku typów barwnych (np. *xantho-viridis*)



3.2.3. W tabelach poniżej (tabela 3.2.3a i 3.2.3b) podano liczbę mutantów chlorofilowych w pokoleniu M_1 jęczmienia oraz średnie wartości dla cech wykazujących efekty somatyczne dla trzech dawek mutagenu. Na podstawie informacji podanych w punkcie 3.1 proszę określić, która dawka jest optymalna. Proszę uzasadnić wybór.

Tabela 3.2.3a. Mutacje chlorofilowe obserwowane w M_1 jęczmienia.

Mutacja	Kontrola	0.5 mM MNU	1 mM MNU	2 mM MNU
Albinotyczne	0	6	9	9
Viridis	0	2	5	5
Xantha	1	1	8	6
Inne	0	2	4	4
Razem				
Liczba badanych siewek	500	483	356	251
Częstość mutacji				

Tabela 3.2.3b. Efekty somatyczne obserwowane w pokoleniu M_1 jęczmienia (średnia z trzech bloków, po 3 powtórzenia każdy).

Mutacja	Kontrola (2 punkty)	0.5 mM MNU (2 punkty)	1 mM MNU (2 punkty)	2 mM MNU (2 punkty)
Długość siewki po 14 dniach	14,8	12,9	10,52	6,32
% redukcji (siewka)	0			
Długość korzenia po 14 dniach	25,9	23,1	17,6	10,95
% redukcji (korzeń)	0			
Średnia redukcja	0			

Wybrana dawka optymalna: (2 punkty)

4. Wykorzystanie mutagenyzy indukowanej

4.1. Baza danych mutantów



Proszę wejść na stronę „Mutant Variety Database” prowadzoną przez IAEA (<https://mvd.iaea.org/#!/Home>). Jeżeli adres nie uruchamia się bezpośrednio z pliku to proszę go wkopiować w przeglądarce w pasku adresów. Proszę przejść do pozycji „Search varieties” a następnie wpisać „Pisum sativum”. Otrzymane wyniki wyszukiwania można analizować on line lub pobrać w pliku Excel. Na podstawie informacji zawartych w bazie (pobrany pliku) proszę podać:

Welcome to the Joint FAO/IAEA Mutant Variety Database

Search Varieties

Most Recent Varieties

Variety Name	Latin Name
ougainvillea iangFei 1'	Bougainvillea sp.
ampai irandah	Oryza sativa L.
inar 1	Oryza sativa L.
inar 2	Oryza sativa L.
LV 20	Linum ustatissimum L.

Background

The application of mutation techniques has generated a vast amount of genetic variability and is playing a significant role in plant breeding and genetics and advanced genomics studies. The widespread use of mutation techniques in plant breeding programmes throughout the world has generated thousands of novel crop varieties in hundreds of crop species, and billions of dollars in additional revenue.

The FAO/IAEA Mutant Variety Database or MVD collects information on plant mutant varieties (cultivars) released officially or commercially worldwide. Data on the mutagen and dose used, the characters improved, and agronomic data if available are among the information provided. The purpose of the database is to demonstrate the significance of mutation breeding as an efficient tool for preserving and enhancing global food security, to serve as a platform for breeders to showcase their varieties to a global audience, and to stimulate germplasm transfer for cultivation, breeding or genomics studies.

- Liczbę wszystkich odmian mutacyjnych grochu (*Pisum sativum*) zarejestrowanych w bazie.
- Ile odmian zarejestrowały poszczególne państwa. Proszę podać liczbę i procent odmian dla danego państwa. Dane procentowe proszę przedstawić na wykresie.
- Proszę podać liczbę i procent odmian otrzymanych w wyniku działania promieniowania gamma, X, mutagenów chemicznych (niektóre mutageny są w postaci skrótów, np. EI: ethylenimine), kombinacji mutagenów fizycznych i chemicznych, spontanicznych mutacji oraz inne w przypadku braku informacji o mutagenie lub informacji niepełnej. Dane procentowe proszę przedstawić na wykresie.
- Ile odmian otrzymano w wyniku bezpośredniego namnożenia mutantu (direct use of induced mutant), ile przez krzyżowanie (crossing), ile przez inne metody? Wartości proszę podać w procentach.

Samodzielne wykonanie: 6 punktów

Termin: 26.01.2021. 23:59

e-mail: polokkornelia@gmail.com

Odpowiedzi

1. Środki mutagenne i ich efektywność

1.2. Środki mutagenne

1.2.3.

1C; 2E, 3G, 4F,

5B, 6H, 7A, 8D

2. Środki mutagenne

2.2. Wpływ promieniowania na organizm człowieka

2.2.1. Wiedząc, że 98 nSv odpowiada 1 średniemu bananowi (1 BED) podaj jakiej ilości bananów odpowiadają dawki promieniowania podane w punktach A-C. Przyjmując, że 1 banana je się 2 minuty, podaj ilu minutom, godzinom i dniom odpowiadają poniższe dawki promieniowania.

A. A: paczka papierosów: 986 nSv

1 BED = 98 nSv

$986/98 = 10$ BED

$10 \times 2 \text{ min.} = 20 \text{ min.} = 1/3 \text{ h} = 1/72 \text{ dnia}$

10 BED, 20 min. 1/3 h, 1/72 dnia

B. B: częste loty samolotem, 1.5 mSv rocznie

1 BED = 98 nSv = 98×10^{-6} mSv

B = 1,5 mSv zatem

$B = 1.5/(98 \times 10^{-6}) = 1.5/98 \times 10^6 = 0.015306 \times 10^6 = 15\,306$ BED

$15\,306 \text{ BED} \times 2 \text{ min.} = 30\,612 \text{ min.} = 510 \text{ h} = 21,3 \text{ dnia}$

B: 15 306 BED, 30 612 min. = 510 h = 21,3 dnia

C. C: 6 miesięcy na stacji kosmicznej: 80 mSv

1 BED = 98×10^{-6} mSv

C = 80 mSv zatem

$C = 80/(98 \times 10^{-6}) = 80/98 \times 10^6 = 0.816327 \times 10^6 = 816\,327$ BED

$816\,327 \times 2 \text{ min.} = 1\,632\,654 \text{ min.} = 27\,211 \text{ h} = 1\,134 \text{ dni} = 3,1 \text{ lat.}$

C = 816 327 BED, 1 632 654 min. = 27 211 h = 1 134 dni = 3,1 lat

2.2.2. Przyjmując, że roczna dawka promieniowania naturalnego na jakie jest ekspozycjonowany człowiek wynosi 3 mSv, podaj ilu miesiącom i dniom odpowiadają dawki podane w punktach A-C w zadaniu. Proszę przyjąć 1 miesiąc = 30,5 dni.

A. $3 \text{ mSv} = 12 \text{ m-cy}$

$$986 \text{ nSv} = 986 \times 10^{-6} \text{ mSv} = A$$

$$A = 986 \times 10^{-6} \times 12/3 = 986 \times 4 \times 10^{-6} = 3944 \times 10^{-6} \text{ m-cy} = 0,003944 \text{ miesiąca} = 0,12 \text{ dnia} = 2,88 \text{ h}$$

$$A = 0,003944 \text{ miesiąca} = 0,12 \text{ dnia}$$

B. $B = 1,5 \text{ mSv}$

$$12 \text{ m-cy} = 3 \text{ mSv}$$

$$B = 12 \times 1,5 \text{ mSv}/3 = 6 \text{ miesięcy} = 183 \text{ dni}$$

$$B = 6 \text{ miesięcy} = 183 \text{ dni}$$

C. $C = 80 \text{ mSv}$

$$12 \text{ m-cy} = 3 \text{ mSv}$$

$$C = 12 \times 80/3 = 320 \text{ miesięcy} = 3 \text{ 123 200 dni}$$

$$C = 320 \text{ miesięcy} = 9760 \text{ dni}$$

3. Określenie dawki optymalnej

3.2. Dawka optymalna

- Dla oceny dawki optymalnej musimy znać częstość mutacji i poziom uszkodzeń somatycznych.
- Obliczamy częstości mutacji chlorofilowych w tabeli 2.
- Następnie obliczamy redukcję długości siewki i korzenia dla każdej dawki według wzoru
- % redukcji = $(K - M_1)/K \times 100\%$ oraz wartość średnią redukcji.
- Najwięcej mutacji otrzymaliśmy dla dawki 2 mM MNU, jednakże jednocześnie poziom uszkodzeń somatycznych był wysoki i dawka ta może być zbyt wysoka i znacznie ograniczać przeżywalność roślin.
- Przyjmuje się, że poziom uszkodzeń somatycznych nie powinien przekroczyć 30-40%. Taki poziom uzyskujemy dla dawki 1 mM MNU. Jednocześnie częstość mutacji jest niewiele mniejsza od tej dla dawki 2 mM. Dla 2 mM mutacje wystąpią u 96 osobników na 1000 natomiast dla 1 mM u 73 osobników na 1000 zatem nie jest to istotna różnica. Stąd dawką optymalną jest 1 mM.

Tabela 3.2.3a. Mutacje chlorofilowe obserwowane w M₁ jęczmienia.

Mutacja	Kontrola	0.5 mM MNU	1 mM MNU	2 mM MNU
Albinotyczne	0	6	9	9
Viridis	0	2	5	5
Xantha	1	1	8	6
Inne	0	2	4	4
Razem	1	11	26	24
Liczba badanych siewek	500	483	356	251
Częstość mutacji	0,002	0,0228	0,073	0,096

Tabela 3.2.3b. Efekty somatyczne obserwowane w pokoleniu M₁ jęczmienia (średnia z trzech bloków, po 3 powtórzenia każdy).

Mutacja	Kontrola	0.5 mM MNU	1 mM MNU	2 mM MNU
Długość siewki po 14 dniach [mm]	14,8	12,9	10,52	6,32
% redukcji (siewka)	0	12,8	28,9	57,3
Długość korzenia po 14 dniach [mm]	25,9	23,1	17,6	10,95
% redukcji (korzeń)	0	10,8	32,0	57,7
Średnia redukcja	0	11,8	30,5	57,5

Wybrana dawka optymalna: 1 mM