

# Genetyczne i rozwojowe aspekty plonowania i jakości surowca kozłka lekarskiego (zadanie 32)

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych

Instytut Nauk Ogrodniczych

(we współpracy z Katedrą Botaniki, Instytut Biologii SGGW)

## **Zespół badawczy:**

Kierownik zadania: Dr hab. Katarzyna Bączek, prof. SGGW

Prof. dr hab. Zenon Węglarz

Dr inż. Anna Pawełczak

Dr inż. Jarosław L. Przybył

Dr hab. Olga Kosakowska

Dr inż. Ewelina Pioro-Jabrucka

Mgr inż. Dominika Dmitruk (Instytut Biologii SGGW, Katedra Botaniki)

Doktorantki: mgr inż. Sylwia Koczkodaj oraz mgr Kavana Raj

Warszawa, 7 grudnia 2022r.

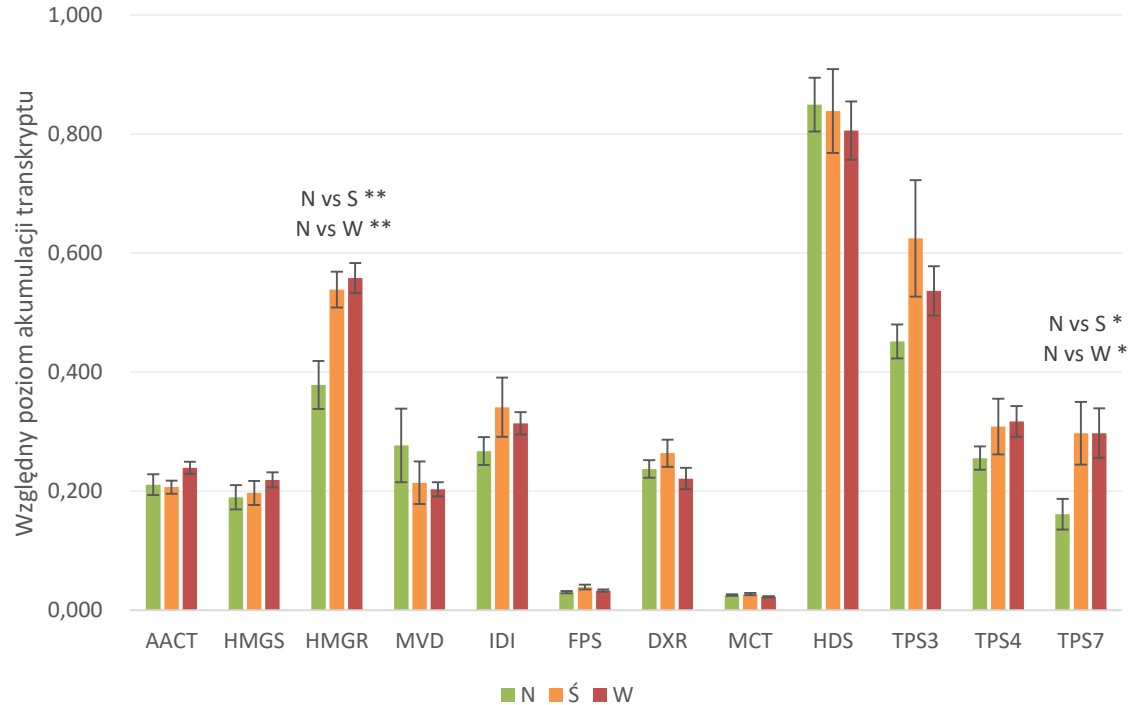
## Genetyczne i rozwojowe aspekty plonowania i jakości surowca kozłka lekarskiego (zadanie 32)

### Cele zadania:

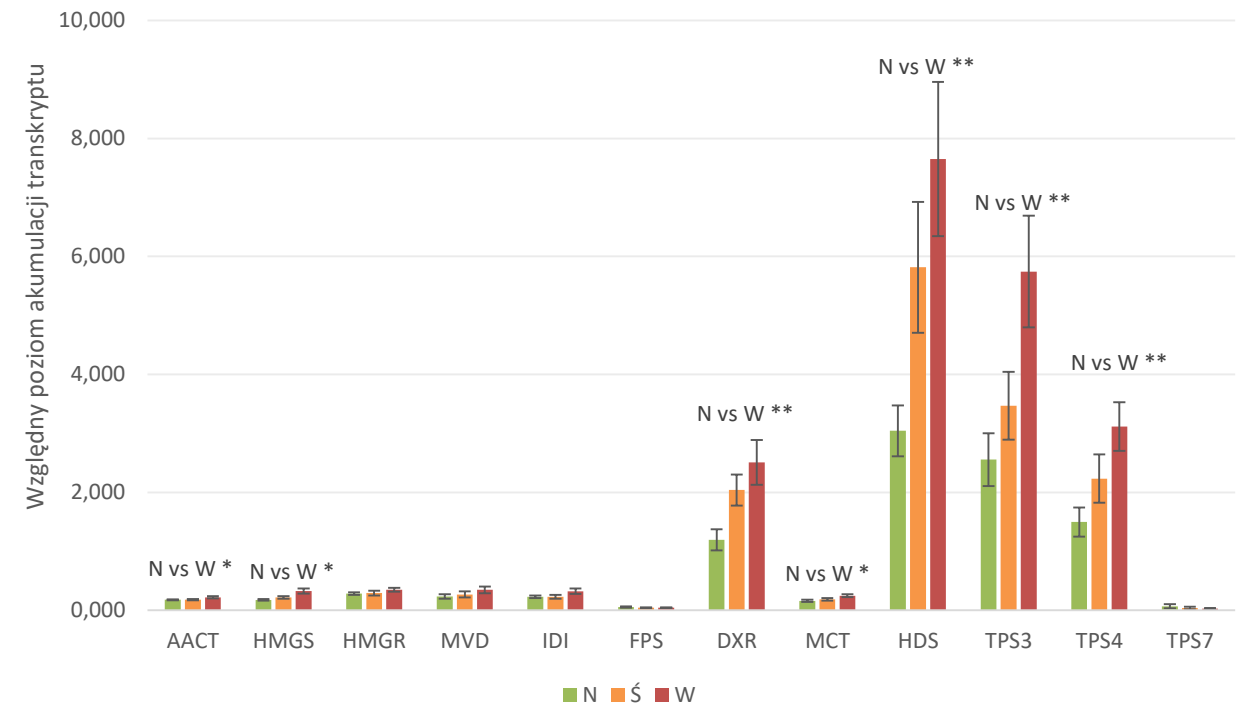
1. Opracowanie profili ekspresji genów kodujących syntazy seskwiterpenowe u kozłka lekarskiego.
2. Ocena efektywności uzyskiwania pąków przybyszowych i pachwinowych z eksplantatów kozłka w kulturach *in vitro*.
3. Określenie wpływu czynników agrotechnicznych na pośpiechowatość u kozłka.
4. Określenie dynamiki przyrostu masy organów surowcowych i gromadzenia się w nich związków czynnych w uprawie kozłka w cyku 1-letnim.
5. Określenie czynników wpływających na zawiązywanie nasion kozłka i ich parametry jakościowe.
6. Określenie zakresu różnicowania kozłka w fazie rozwoju generatywnego (określenie częstości występowania w populacji uprawnej osobników męskosterylnych).
7. Walidacja skróconej metody analizy składu chemicznego korzeni kozłka przy użyciu HPLC.

# Temat badawczy 1: Opracowanie profili ekspresji genów kodujących syntazy seskwiterpenowe dla trzech grup kozłka o różnicowanej zawartości kwasów walerenowych

## KORZENIE



## LIŚCIE



**N** – grupa roślin o niskiej zaw. kwasów, **Ś** – grupa roślin o średniej zaw. kwasów, **W** – grupa roślin o wysokiej zaw. kwasów (n = 30).

Ekspresja była normalizowana wobec 2 genów referencyjnych: aktyny i EF1.

Badano 13 genów, przy czym ze względu na zbyt dużą rozbieżność wartości amplifikacji lub brak produktu dla znacznej części badanych prób, wyniki dla genu TPS1 nie zostały uwzględnione w analizie statystycznej.

Badania wykonano w 2 powtórzeniach.

Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

Istotne różnice statystyczne zaznaczono nad odpowiednimi genami, przy czym: \* - p < 0,05; \*\* - p < 0,01.

# Temat badawczy 2. Określenie efektywności uzyskiwania pąków przybyszowych i pachwinowych z eksplantatów kozłka w kulturach *in vitro*

## Materiały i metody

### Źródło eksplantatów inicjalnych:

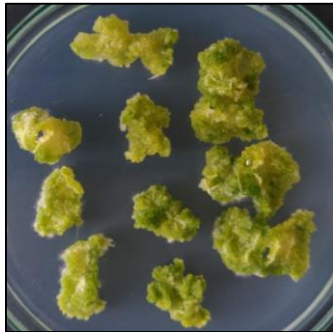
3 klony kozłka w mateczniku *in vitro*: III 16/1, III 16/5, I 42/2.

### Rodzaje eksplantatów pobieranych z roślin:

1. Fragmenty młodych liści (inicjacja kalusa),
2. Pędy (indukowanie pędów pachwinowych).

### Pożywki dla eksplantatów:

1. Inicjacja kalusa - MS z 1,0 lub 2,0 mg/L 2,4D, z dodatkiem lub bez dodatku 1,0 mg/L kinetyny;
2. Indukowanie pędów pachwinowych – MS/B5 z 1,0 lub 4,0 mg/L kinetyny z dodatkiem lub bez dodatku 0.1 mg/L NAA, kontrola bez regulatorów wzrostu;
3. Ukorzenianie pędów pachwinowych: ½ MS/B5 z 0,5 mg/L NAA lub bez auksyny.



I 42/2, kalus; 1,0 mg/L 2,4-D; 1,0 mg/L kinetyny



III 16/1, pędy pachwinowe; 4,0 mg/L kinetyny



III 16/5, ukorzenione sadzonki; 0,5 mg/L NAA

## Wyniki

### 1. Udział procentowy eksplantatów liściowych na których powstał kalus

Stężenie regulatorów wzrostu (mg/L)	Klon kozłka			średnia
	III 16/1	III 16/5	I 42/2	
1,0 2,4-D	88,8 b	5,0 d	100,0 a	<b>64,6 b</b>
1,0 2,4-D; 1,0 Kn	100,0 a	92,5 ab	100,0 a	<b>97,5 a</b>
2,0 2,4-D	100,0 a	26,3 c	100,0 a	<b>75,4 b</b>
2,0 2,4-D; 1,0 Kn	100,0 a	93,8 ab	100,0 a	<b>97,9 a</b>
<b>średnia</b>	<b>97,2 a</b>	<b>54,4 b</b>	<b>100,0 a</b>	-

### 2. Liczba indukowanych pędów pachwinowych

Stężenie regulatorów wzrostu (mg/L)	Klon kozłka			średnia
	III 16/1	III 16/5	I 42/2	
0,0	1,6 ab	1,2 b	1,2 b	<b>1,3 b</b>
1,0 Kn	2,0 ab	1,4 b	1,4 b	<b>1,6 ab</b>
1,0 Kn, 0,1 NAA	1,8 ab	1,4 b	1,6 ab	<b>1,6 ab</b>
4,0 Kn	1,8 ab	1,5 b	2,5 a	<b>1,9 a</b>
4,0 Kn, 0,1 NAA	1,8 ab	1,5 b	1,8 ab	<b>1,7 ab</b>
<b>średnia</b>	<b>1,8 a</b>	<b>1,4 b</b>	<b>1,7 ab</b>	-

### 3. Udział procentowy ukorzenionych mikrosadzonek

Stężenie NAA w pożywce (mg/l)	Klon kozłka			średnia
	III 16/1	III 16/5	I 42/2	
0,0	100,0 a	95,0 ab	100,0 a	<b>98,3 *</b>
0,5	96,3 ab	88,8 b	96,3 ab	<b>93,8</b>
<b>średnia</b>	<b>98,2 a</b>	<b>91,9 b</b>	<b>98,1 a</b>	-

# Temat badawczy 3. Określenie zakresu zróżnicowania kozłka lekarskiego w fazie rozwoju generatywnego: określenie częstości występowania w populacji uprawnej osobników męskosterylnych

## Materiały i metody

### Plantacje kozłka odmiany „Lubelski” o różnej lokalizacji:

1. Pole Doświadczalne KRWiL w Wilanowie
2. Plantacja w gminie Płońsk
3. Plantacja w miejscowości Włodawa
4. Plantacja w miejscowości Samokłęski

### Kryteria selekcji roślin męskosterylnych:

- Morfologia kwiatu – długość pręcików, barwa pylników;
- Ocena żywotności pyłku - % ziaren wybarwionych na czerwono w acetokarminie (2% karmin w 45% kwasie octowym);
- Mikroskopowa analiza mikrosporogenezy – wybrane rośliny, pylniki z pąków o długości 3,0, 1,0 i ok. 0,5 mm:

Utrwalanie pąków: etanol 98,8% i kwas octowy lodowaty (3:1)

Barwienie: 1% orceina w 45% kwasie octowym

## Wyniki

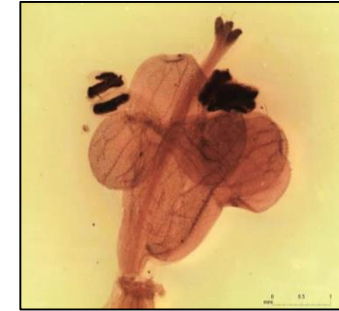
Częstość występowania roślin męskosterylnych

Plantacja kozłka 'Lubelski'	Liczba roślin			% roślin sterylnych
	Analizowanych w polu	Wyselekcjonowanych (morfologia pręcików)	Sterylnych (0-20% pyłku wybarwionego)	
Wilanów	39	1	1	2,6
Płońsk	Ok. 500	26	11	2,2
Włodawa	50	0	0	0,0
Samokłęski	50	1	1	2,0

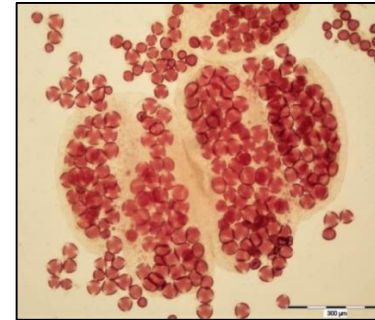
Roślina płodna (Płońsk)



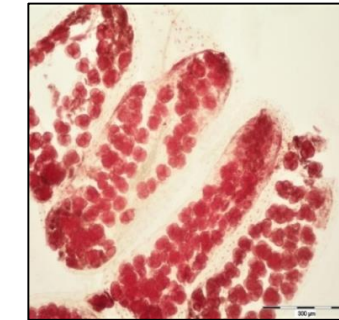
Roślina sterylna (Płońsk)



Pylniki z pąków o 3 mm długości



Młody pyłek

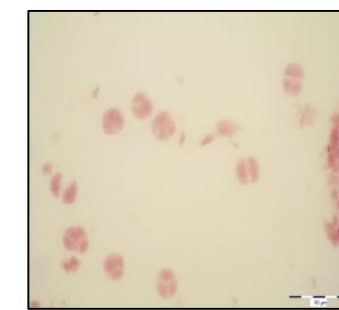


Nierozdzielone tetrazy mikrospor

Pylniki z pąków o 0,5 mm długości



Tetrazy mikrospor



Tetrazy i diady mikrospor

# Temat badawczy 4: Wstępne badania dotyczące wpływu czynników agrotechnicznych na pośpiechowość u kozłka

## Materiały i metody

### Materiał roślinny:

kozłek lekarski odmiany 'Lubelski'

### Terminy wysiewu:

marzec (1), koniec maja (2), sierpień (3)

### Terminy obserwacji:

koniec maja, początek września, koniec października

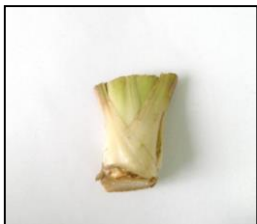
### Miejsce realizacji badań:

szklarnia i pole doświadczalne KRWiL w Wilanowie

## Wyniki

Układ liści na pędzie.

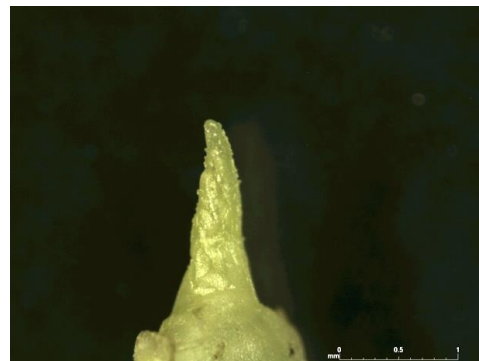
termin siewu	Termin obserwacji		
	koniec maja	początek września	koniec października
1	naprzemianległe	naprzeciwległe	naprzeciwległe
2	naprzemianległe	naprzemianległe/ naprzeciwległe	naprzeciwległe
3	-	naprzemianległe	naprzemianległe



Ułożenie liści  
naprzemianległe



Ułożenie liści  
naprzeciwległe



Merystem w fazie wegetatywnej



Początek kształtowania się merystemu  
kwiatostanowego (wrzesień)



Merystem kwiatostanowy (październik)

# Temat badawczy 5. Badania nad dynamiką przyrostu masy organów surowcowych kozłka i gromadzenia się w nich związków biologicznie czynnych (uprawa w cyklu rocznym)

## TERMINY SADZENIA ROZSADY:

koniec kwietnia

## TERMINY ZBIORU ORGANÓW PODZIEMNYCH:

wrzesień (1. termin), początek listopada (2. termin).

## ANALIZY CHEMICZNE SUROWCA:

ocena zawartości kwasów walerenowych – HPLC

ocena zawartości i składu chemicznego olejków eterycznych – GC/MS

## FRAKCJE SUROWCA:

kłącza, grube korzenie i drobne korzenie



Doświadczenie w gosp. zielarskim w okolicach Płońska

## Masa organów podziemnych (g/roślinę)

Termin zbioru	Fracje organów podziemnych			Razem
	kłącza	grube korzenie	drobne korzenie	
<b>1. termin (wrzesień)</b>				
świeża masa	62,8	83,4	87,1	233,3
sucha masa	16,2	23,6	17,8	57,6
<b>2. termin (listopad)</b>				
świeża masa	52,3	91,3	67,2	210,8
sucha masa	14,9	26,2	16,5	57,6

## Zawartość kwasów walerenowych w surowcu (mg/100 g s.m.)

Kwasy walerenowe	Fracje organów podziemnych			średnio
	kłącza	grube korzenie	drobne korzenie	
<b>1. termin (wrzesień)</b>				
1. hydroksywalerenowy	0,02	0,02	0,02	0,02
2. acetoksywalerenowy	0,07	0,13	0,08	0,09
3. walerenowy	0,31	0,24	0,26	0,27
1+2+3	0,38	0,37	0,34	0,36
<b>2. termin (listopad)</b>				
1. hydroksywalerenowy	0,04	0,04	0,03	0,04
2. acetoksywalerenowy	0,12	0,19	0,17	0,16
3. walerenowy	0,36	0,34	0,29	0,33
1+2+3	0,48	0,53	0,46	0,49

## Zawartość olejku eterycznego w surowcu (mL/100 g s.m.)

Termin zbioru	Fracje organów podziemnych			średnio
	kłącza	grube korzenie	drobne korzenie	
1. termin (wrzesień)	0,37	0,48	0,43	0,43
2. termin (listopad)	0,41	0,35	0,34	0,37
średnio	0,39	0,42	0,39	

# Temat badawczy 6: Określenie czynników wpływających na zawiązywanie nasion kozłka i ich parametry jakościowe.

**Genotypy:** 15 klonów

**Poziom rozgałęzienia pędu:**

1 – górna część nasiennika

2 – środkowa część nasiennika

3 – dolna część nasiennika

**Termin zbioru nasion:**

1 – 12 lipca

2 – 19 lipca

**Miejsce realizacji badań:**

pole doświadczalne KRWiL w Wilanowie



Wpływ genotypu na jakość materiału siewnego

Genotyp	EK (%)	ZK (%)
I 5/5.1	85,7	90,4
I 5/5.2	89,2	94,0
I 42/2.2	96,4	98,0
II 21/1.1	84,4	88,4
II 22/6.1	79,0	89,4
II 26/1.1	92,7	94,4
II 31/6.1	80,7	87,0
II 31/6.2	84,0	93,7
III 9/2.2	86,0	91,4
III 16/1.1	90,0	98,0
III 16/5.2	58,4	66,4
III 39/5.2	85,7	90,7
IV 17/3.1	64,2	74,4
IV 55/4.1	91,4	94,0
IV 55/4.2	69,4	82,2

EK – energia kiełkowania (%) – po 8 dniach

ZK – zdolność kiełkowania (%)

Wpływ osadzenia nasion na roślinie na jakość materiału siewnego

Poziom rozgałęzienia pędu	EK (%)	ZK (%)
1	78,77	87,50
2	81,22	89,11
3	80,31	89,70

Wpływ terminu zbioru nasion na jakość materiału siewnego

Termin zbioru	Udział nasion (%)	
	dojrzałych	niedojrzałych
1	70,10	29,90
2	81,12	18,88

EK (%)		ZK (%)	
nasiona dojrzałe	nasiona niedojrzałe	nasiona dojrzałe	nasiona niedojrzałe
87,7	41,1	94,5	58,4



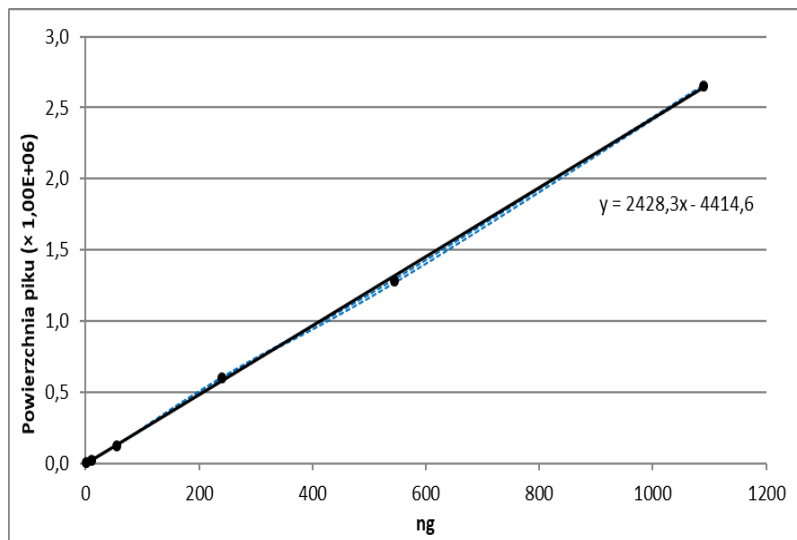
# Temat badawczy 7: Walidacja metody analizy składu chemicznego korzenia kozłka przy użyciu HPLC.

## Walidację przeprowadzono dla:

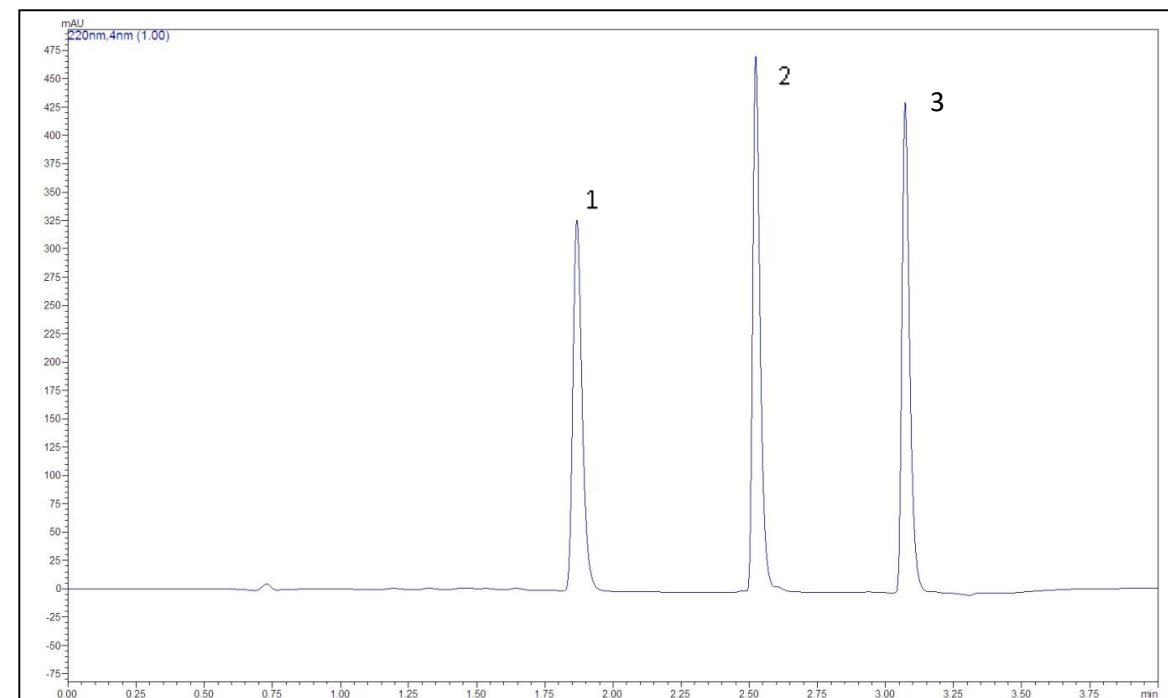
- trzech markerów (kwas hydroksywalerenowy, kwas acetoksywalerenowy i kwas walerenowy),
- w sześciu powtórzeniach
- na sześciu poziomach kalibracji krzywej wzorcowej

### Gradient opracowany dla metody

Czas (min)	Faza ruchoma A (% V/V)	Faza ruchoma B (% V/V)
0,1 – 0,5	55	45
2,0 – 2,1	10	90
2,3 – 4,0	55	45



Wykres krzywej kalibracyjnej kwasu walerenowego



Chromatogram mieszaniny wzorców:

1. kwas hydroksywalerenowy 2. kwas acetoksywalerenowy 3. kwas walerenowy