

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.

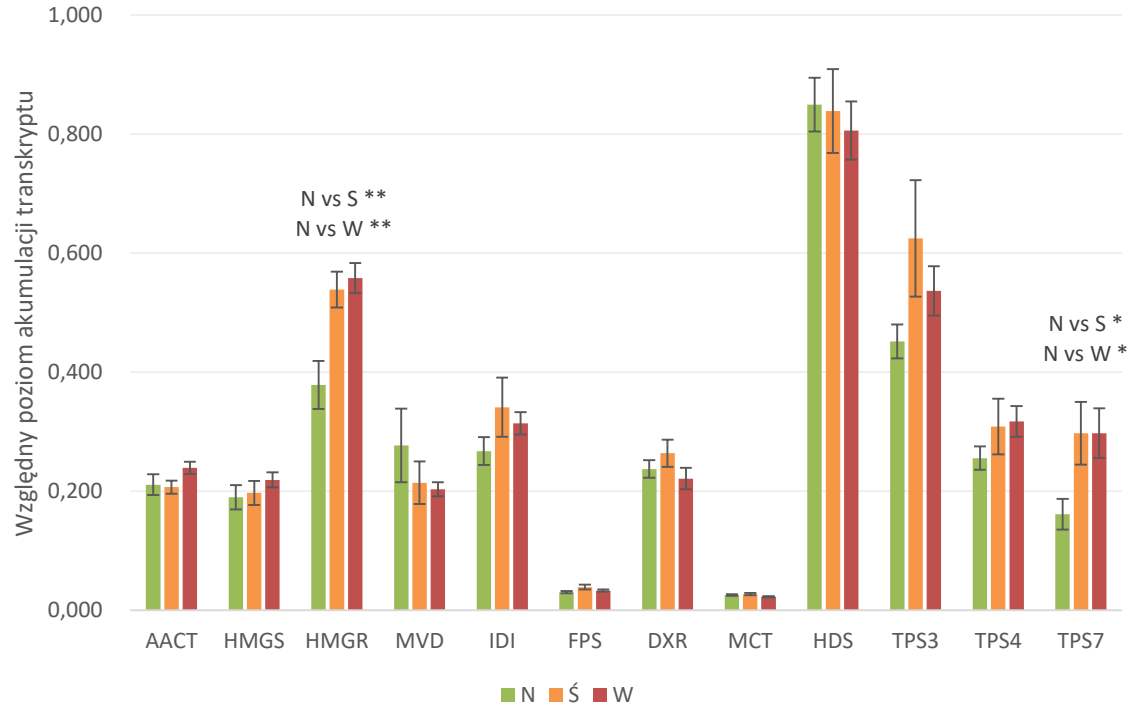
Genetyczne i rozwojowe aspekty plonowania i jakości surowca kozłka lekarskiego (zadanie 32)

Cele zadania:

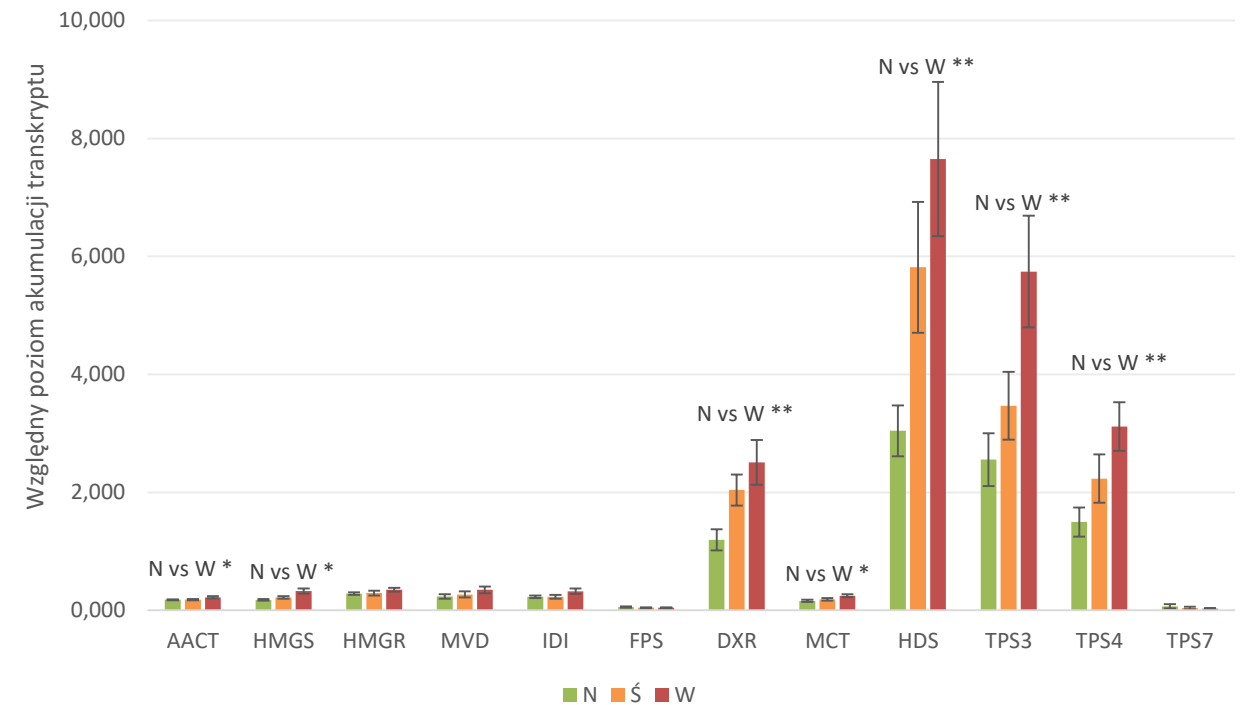
1. Opracowanie profili ekspresji genów kodujących syntazy seskwiterpenowe u kozłka lekarskiego.
2. Ocena efektywności uzyskiwania pąków przybyszowych i pachwinowych z eksplantatów kozłka w kulturach *in vitro*.
3. Określenie wpływu czynników agrotechnicznych na pośpiechowatość u kozłka.
4. Określenie 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:

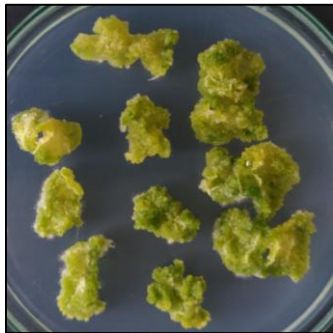
3 klony kozłka w mateczniku *in vitro*: III 16/1, III 16/5, I 42/2.

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	64,6 b
1,0 2,4-D; 1,0 Kn	100,0 a	92,5 ab	100,0 a	97,5 a
2,0 2,4-D	100,0 a	26,3 c	100,0 a	75,4 b
2,0 2,4-D; 1,0 Kn	100,0 a	93,8 ab	100,0 a	97,9 a
średnia	97,2 a	54,4 b	100,0 a	-

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	1,3 b
1,0 Kn	2,0 ab	1,4 b	1,4 b	1,6 ab
1,0 Kn, 0,1 NAA	1,8 ab	1,4 b	1,6 ab	1,6 ab
4,0 Kn	1,8 ab	1,5 b	2,5 a	1,9 a
4,0 Kn, 0,1 NAA	1,8 ab	1,5 b	1,8 ab	1,7 ab
średnia	1,8 a	1,4 b	1,7 ab	-

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	98,3 *
0,5	96,3 ab	88,8 b	96,3 ab	93,8
średnia	98,2 a	91,9 b	98,1 a	-

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

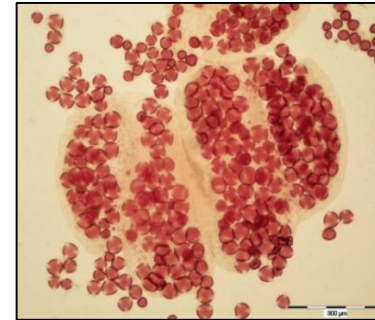
Roślina płodna (Płońsk)



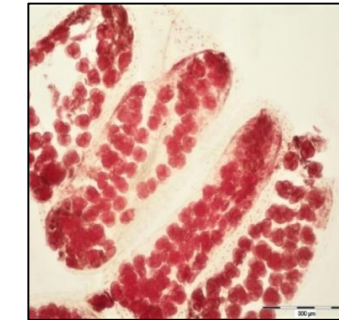
Roślina sterylna (Płońsk)



Pylniki z pąków o 3 mm długości



Młody pyłek

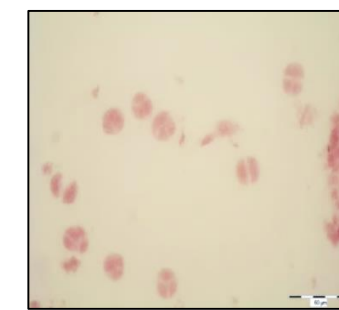


Nierozdzielone tetrazy mikrospor

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

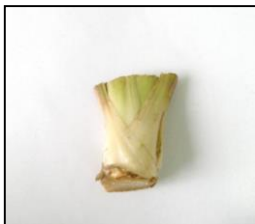
Miejsce realizacji badań:

szklarnia i pole doświadczalne KRWiL w Wilanowie

Wyniki

Układ liści na pędzie.

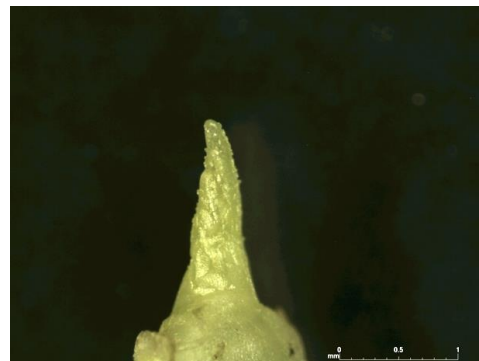
termin siewu	Termin obserwacji		
	koniec maja	początek września	koniec października
1	naprzemianległe	naprzeciwległe	naprzeciwległe
2	naprzemianległe	naprzemianległe/ naprzeciwległe	naprzeciwległe
3	-	naprzemianległe	naprzemianległe



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	
1. termin (wrzesień)				
świeża masa	62,8	83,4	87,1	233,3
sucha masa	16,2	23,6	17,8	57,6
2. termin (listopad)				
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	
1. termin (wrzesień)				
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
2. termin (listopad)				
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
	87,7	41,1
	nasiona dojrzałe	nasiona niedojrzałe
	94,5	58,4



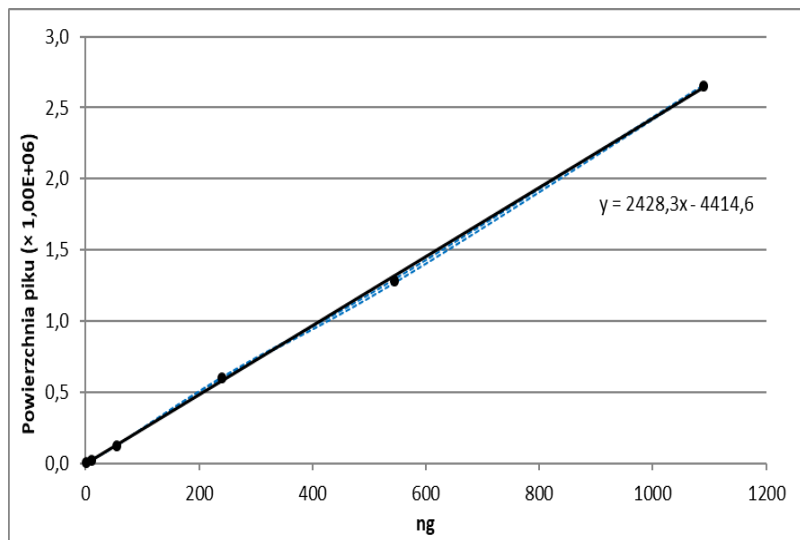
Temat badawczy 7: Walidacja metody analizy składu chemicznego korzenia kozłka przy użyciu HPLC.

Walidację przeprowadzono dla:

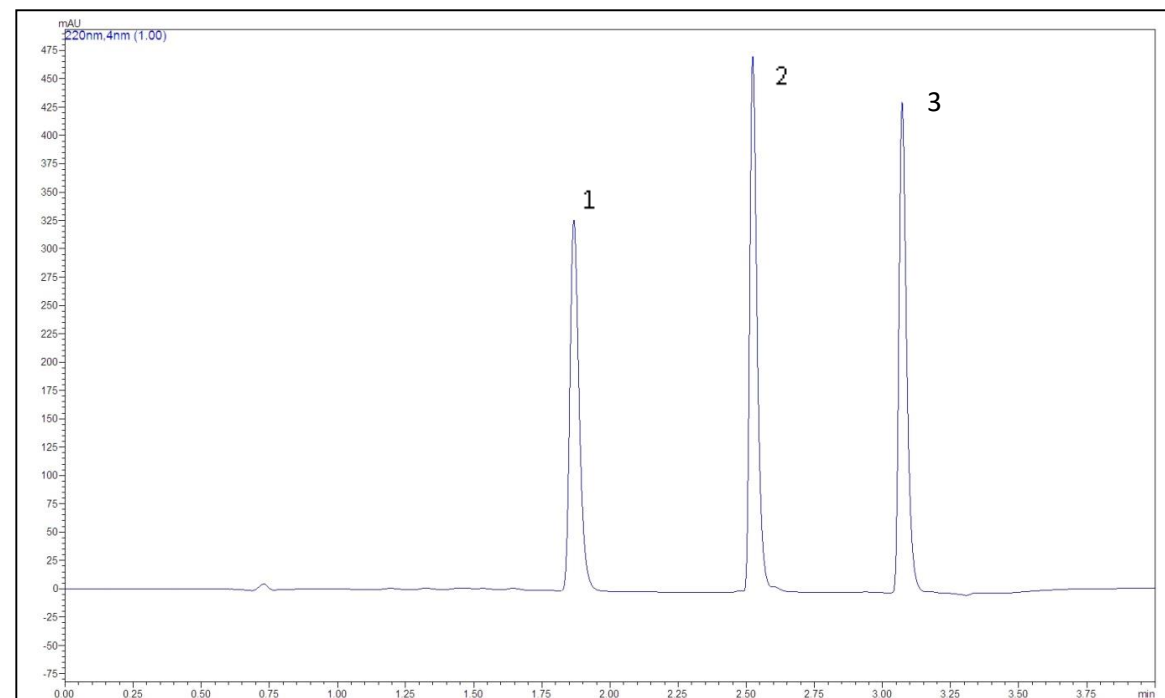
- trzech markerów (kwas hydroksywalerenowy, kwas acetoksywalerenowy i kwas walerenowy),
- w sześciu powtórzeniach
- na sześciu poziomach kalibracji krzywej wzorcowej

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