

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

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 inż. Elżbieta Różańska (Instytut Biologii SGGW, Katedra Botaniki)
Doktorantki: mgr inż. Dominika Dmitruk oraz mgr inż. Sylwia Koczkodaj

Warszawa, 10 grudnia 2021r.

Materiały i metody

BADANIA GENETYCZNE

- materiał badawczy:

wiosna - badania metodyczne (3 rośliny - 9 prób; liście oraz korzenie: młode i stare);

jesień - zweryfikowanie rezultatów uzyskanych w badaniach metodycznych na obiektach z plantacji produkcyjnych (3 rośliny)

jesień - zabezpieczenie materiału roślinnego pobranego z plantacji produkcyjnych kozłka do badań genetycznych (133 próby)

- badania metodyczne:

izolacja RNA – ustalenie metody; synteza cDNA – ustalenie metody

zaprojektowanie starterów do genów kodujących syntazy terpenowe i inne enzymy biosyntezy terpenoidów oraz do genów referencyjnych

test specyficzności 37 par starterów; test starterów do genów referencyjnych; test starterów do genów badanych

BADANIA CHEMICZNE

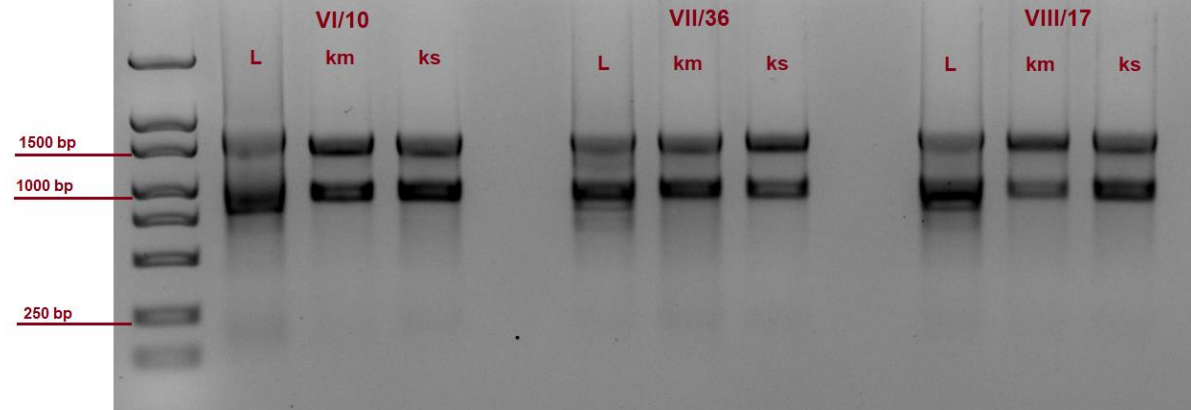
- zgromadzenie materiału genetycznego pochodzącego z plantacji produkcyjnych kozłka (5 rejonów uprawy /populacja VI-X/; 103 obiekty)
- analizy chemiczne organów podziemnych kozłka (103 obiekty) na zawartość kwasów walerenowych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)



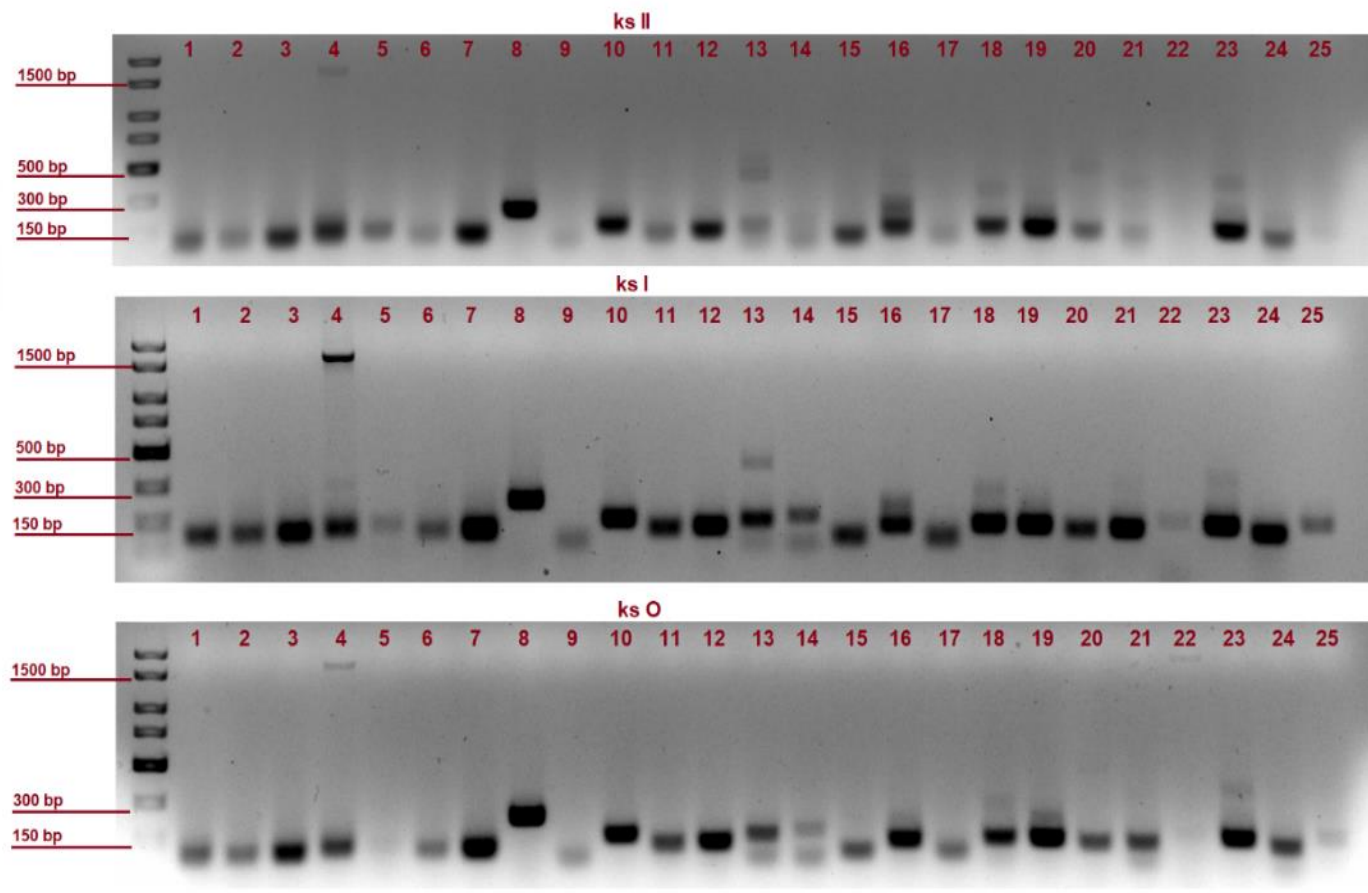
Temat badawczy 1: Poszukiwanie genów markerowych syntezy kwasu walerenowego: identyfikacja obiektów o zróżnicowanej zawartości kwasu walerenowego oraz przygotowanie i zabezpieczenie materiału roślinnego do badań genetycznych

Wyniki

- izolacja RNA: PVPP skutecznie eliminuje związki fenolowe z próbek, poprawia jakość i stężenie RNA – odczyty spektrofotometryczne; integralność RNA poprawna - wyraźne prążki reprezentujące podjednostki rybosomowe: 28S i 18S. (przykład: Ryc. 1)
- testy starterów (PCR): na podstawie obrazu rozdziału elektroforetycznego produktów PCR określono poprawność działania starterów (obecność lub brak produktu, obecność wielu produktów) (przykładowe zdjęcie: Ryc. 2)
- Testy qPCR: przeanalizowano wykresy amplifikacji oraz krzywej topnienia dla każdej z testowanych par starterów. Przy ocenie brano pod uwagę czy wykazały zbyt dużą rozbieżność wartości amplifikacji, brak produktów, kilka produktów o różnych temperaturach topnienia lub produkt w kontroli negatywnej.
- Wybrano startery: Act, EF1, AACT, HMGS, HMGR, MVD, IDI, FPS, DXR, MCT, HDS, nTPS1, nTPS3, nTPS4, nTPS7 (15 par).



Ryc. 1. Integralność RNA prób testowych. L – liście, km – młode korzenie, ks- stare korzenie; II, I, O – odpowiednio próba: II 22/6, I 42/2/2A, O-2. Wzorzec Perfect Plus 1 kb (EURx).



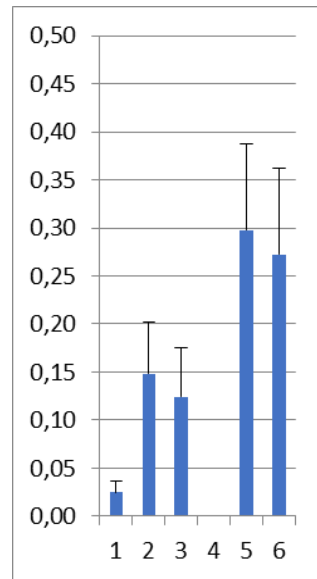
Ryc. 2. Wynik elektroforetycznego rozdziału produktów PCR dla korzeni. L – liście, km – młode korzenie, ks – stare korzenie; II, I, O – odpowiednio próba: II 22/6, I 42/2/2A, O-2; 1 – TPS1, 2 – TPS2, 3 – TPS3, 4 – TPS4, 5 – TPS5, 6 – TPS6, 7 – TPS7, 8 – Act, 9 – 18SrRNA, 10 – AACT, 11 – HMGS, 12 – HMGR, 13 – MK, 14 – PMK, 15 – MVD, 16 – IDI, 17 – FPS, 18 – DXS, 19 – DXR, 20 – MCT, 21 – CMK, 22 – MDS, 23 – HDS, 24 – HDR, 25 – GPS. Wzorzec Perfect Plus 2 kb (EURx).

Temat badawczy 1: Poszukiwanie genów markerowych syntezy kwasu walerenowego: identyfikacja obiektów o zróżnicowanej zawartości kwasu walerenowego oraz przygotowanie i zabezpieczenie materiału roślinnego do badań genetycznych

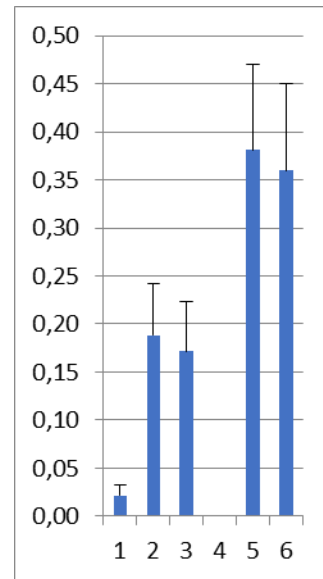
Wyniki

Średnia zawartość kwasów walerenowych (%) w badanych populacjach uprawnych

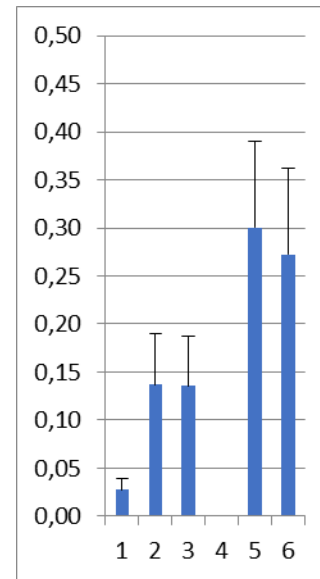
POPULACJA VI



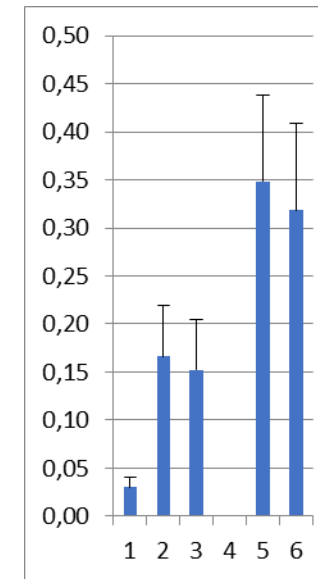
POPULACJA VII



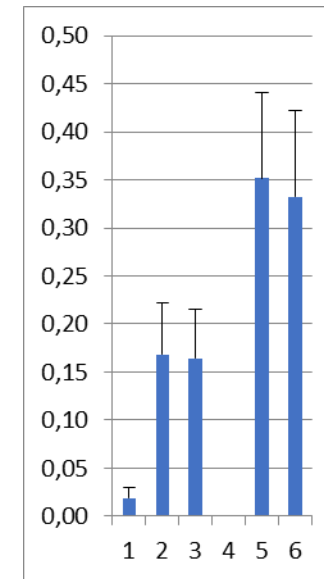
POPULACJA VIII



POPULACJA IX



POPULACJA X



1. Kwas hydroksywalerenowy
2. Kwas acetoksywalerenowy
3. Kwas walerenowy

5. suma kwasów walerenowych (1+2+3)
6. suma kwasów hydroksy walerenowego i walerenowego (2+3)

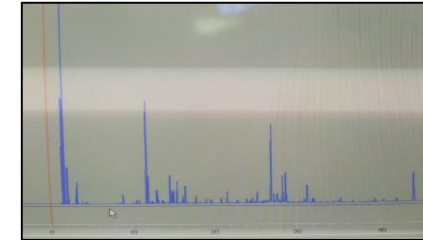
VI populacja Kujawy (liczba roślin:16),
VII populacja Płońsk (liczba roślin: 37),
VIII populacja Włodawa (liczba roślin: 19),
IX populacja Lubelszczyzna (liczba roślin: 21).
X populacja SGGW (liczba roślin: 10)
Łącznie: 103 obiekty

Materiały i metody

Materiał roślinny:

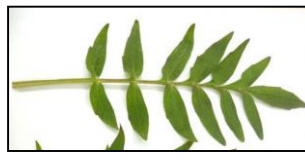
Liczba badanych roślin: 50

Liczba plantacji na których wykonywano obserwacje: 4



Badane cechy:

- podatność populacji na pośpiechowość (oceniono 50 roślin na każdej plantacji);
- zróżnicowanie morfologiczne organów podziemnych;
- zróżnicowanie chemiczne organów podziemnych (zawartość kwasów walerenowych – HPLC-DAD i olejku eterycznego wg FP IX – GC/MS);
- bujność części nadziemnej;
- zabarwienie antocyjanowe liści;
- szerokość odcinków pierzastosiecznych liści;
- ząbkowanie brzegów blaszki liściowej;



Wyniki

Zróżnicowanie organów podziemnych kozłka lekarskiego

Populacja	Świeża masa organów podziemnych (g)	Świeża masa kłączy (g)	Świeża masa korzeni (g)	Ocena chemiczna (kwasy walerenowe – suma, %)
Płońsk	330 - 925	155 - 385	175 - 480	0,22 – 0,41
Włodawa	970 - 2740	440 - 1140	530 - 1600	0,19 – 0,39
Lubelszczyzna	800 - 2640	295 - 1150	505 - 1490	0,19 – 0,43
SGGW	880 - 2140	385 - 515	470 - 725	0,23 – 0,41

Zawartość i skład chemiczny olejku eterycznego z organów podziemnych kozłka lekarskiego (%)

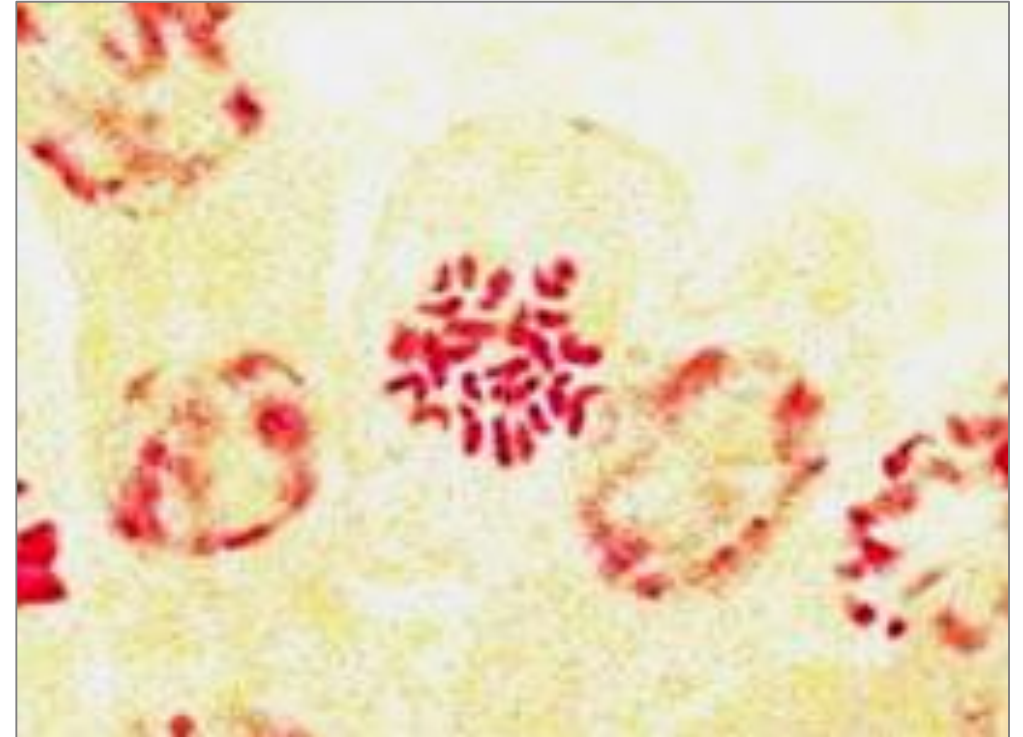
RT*	Związek chemiczny	populacja			
		Płońsk	Włodawa	Lubelszczyzna	SGGW
1,55	alfa-pinen	2,52	2,42	7,33	5,16
1,76	kamfen	2,80	5,17	8,36	6,26
11,78	octan bornylu	11,22	10,14	28,41	23,97
11,95	beta-kariofilen	1,49	2,53	1,19	1,70
14,59	kw. izowalerenowy	55,52	51,53	10,11	3,74
26,88	spatulenol	4,36	20,22	5,24	10,03
43,65	kw. walerenowy	0,52	1,25	0,98	1,34
	Zawartość olejku (%)	0,60	0,31	0,25	0,13

*czas retencji

Charakterystyka badanych populacji pod względem liczby chromosomów

Materiały i metody

- **Wierzchołki wzrostu korzeni siewek:**
 1. odmiany 'Lubelski' zbiór nasion 2020
 2. populacji SGGW, zbiór nasion 2019
- **Skracanie chromosomów:**
0,002 M roztwór 8-hydroksychinoliny , 3 h, 16°C.
- **Utrwalenie materiału:**
mieszanina absolutnego alkoholu etylowego i kwasu octowego lodowatego (3:1), 24 h.
- **Przechowywanie materiału:** 70% etanol, 4°C
- **Dokumentacja fotograficzna:**
mikroskop Olympus BX41, program QuickPhotoPro



Wyniki

Liczba chromosomów

Populacja	Liczba siewek		
	analizowanych	tetraploidalnych (4x=28)	o innej liczbie chromosomów
'Lubelski'	31	30	1 (miksoploidalna)
Populacja SGGW	28	28	0

Materiały i metody

Źródła eksplantatów inicjalnych:

1. wyselekcjonowane rośliny (klony) kozłka
2. nasiona odmiany 'Lubelski' (zbiór 2021)

Rodzaje eksplantatów pobieranych z roślin:

- wierzchołki pędów
- młode liście

Terminy pobierania eksplantatów z roślin:

1. wiosna – pierwsza połowa maja
2. jesień – pierwsza połowa września

Pożywka dla eksplantatów:

- wierzchołków pędów i liści - MS/B5 z 0,1 lub 0,5 mg/l BA
- nasion – ½ MS/B5 bez regulatorów wzrostu



Pąk kwiatostanowy - maj



Pąk wegetatywny - wrzesień

Metody zastosowane do odkażania eksplantatów inicjalnych

Rodzaj substancji odkażającej	Wierzchołki pędów		Nasiona	
	Stężenie substancji odkażającej	Czas ekspozycji	Stężenie substancji odkażającej	Czas ekspozycji
'Domestos'	10%	20 minut	10%	30 minut
PPM™	5%	3 godziny	2,5%	12 godzin
Sublimat	0,2%	2 minuty	0,2%	5 minut

Wyniki

Wpływ metody odkażania na % żywotnych i czystych mikrobiologicznie eksplantatów inicjalnych

Substancja odkażająca	Wierzchołki pędów		Wycinki liści		Nasiona
	maj	wrzesień	maj	wrzesień	
PPM	45,7 c	62,5 a	88,1 a	30,6 c	56,2 a
Sublimat	95,1 a	68,8 a	85,6 a	98,1 a	38,7 b
'Domestos'	59,4 b	64,4 a	83,8 a	81,9 b	50,5 a

Z odkażonych eksplantatów uzyskano:

- wierzchołki pędów pobieranych w maju - liczne pędy przybyszowe/eksplantat
- pąki pobierane we wrześniu - jeden pęd/eksplantat
- wycinki liści w obu terminach – w zastosowanych warunkach nie otrzymano organogenezy pędów
- nasiona - rozwijające się siewki

Wpływ metody odkażania i zawartości BA w pożywce na liczbę pędów przybyszowych powstałych z pąków kwiatostanowych

Substancja odkażająca	Stężenie BA w pożywce (mg/l)		Średnia dla metody odkażania
	0,1	0,5	
PPM	15,9 b	22,3 a	19,1 a
Sublimat	5,7 c	6,5 c	6,1 c
Domestos'	10,7 bc	9,4 c	10,1 b
Średnia dla stężenia BA	10,8 a	12,8 a	-



Pąk kwiatostanowy (maj) PPM, 0,1 mg/l BA



Pąk wegetatywny (wrzesień) PPM, 0,1 mg/l BA

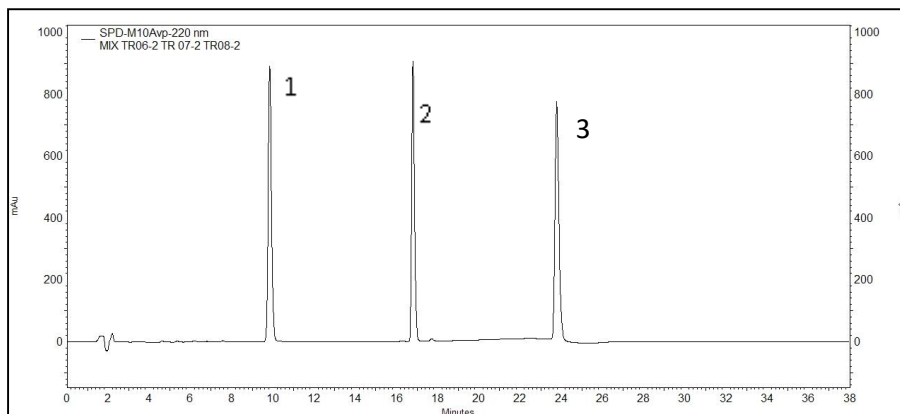
Materiały i metody

Optymalizacja analiz chemicznych:

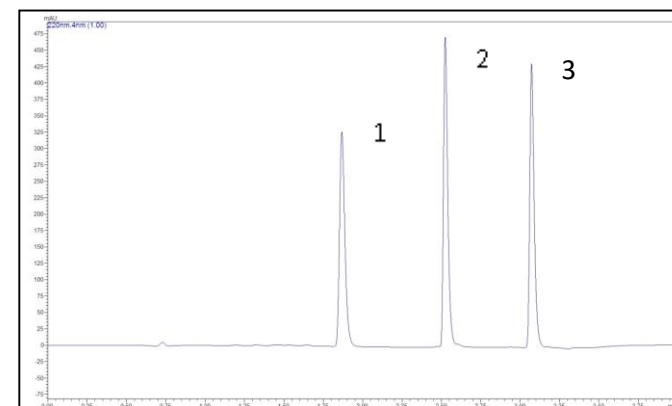
- typ kolumny do HPLC: 2 rodzaje
- warunki przepływu: 2 gradienty

Optymalizacja warunków ekstrakcji:

- rodzaj rozpuszczalnika: 2 (metanol, etanol)
- metoda ekstrakcji: 4 (2-stopniowa pod chłodnicą zwrotną; 1-stopniowa pod chłodnicą zwrotną; 2-stopniowa wspomagana ultradźwiękami; 1-stopniowa wspomagana ultradźwiękami)
- czas ekstrakcji: 5, tj.: 2-stopniowa (30 + 15 min.; 15 + 15 min.); 1-stopniowa (45 min.; 30 min.; 10 min)

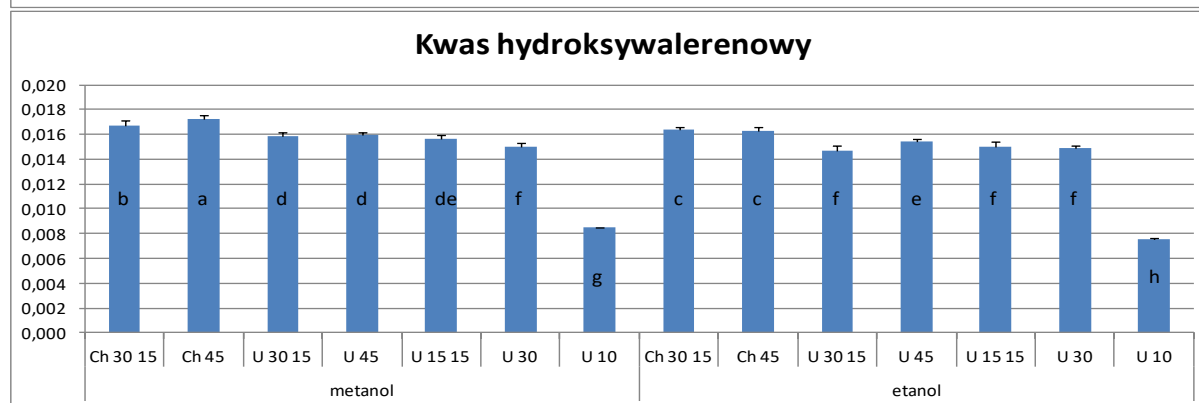
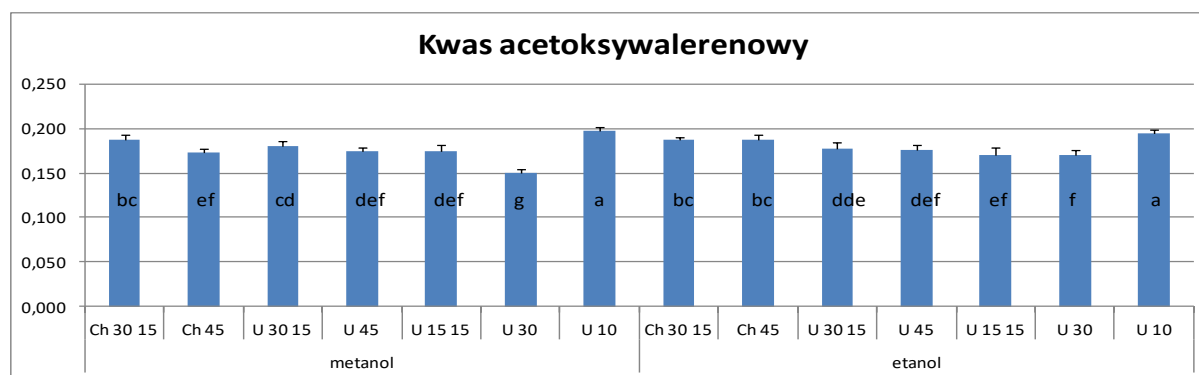
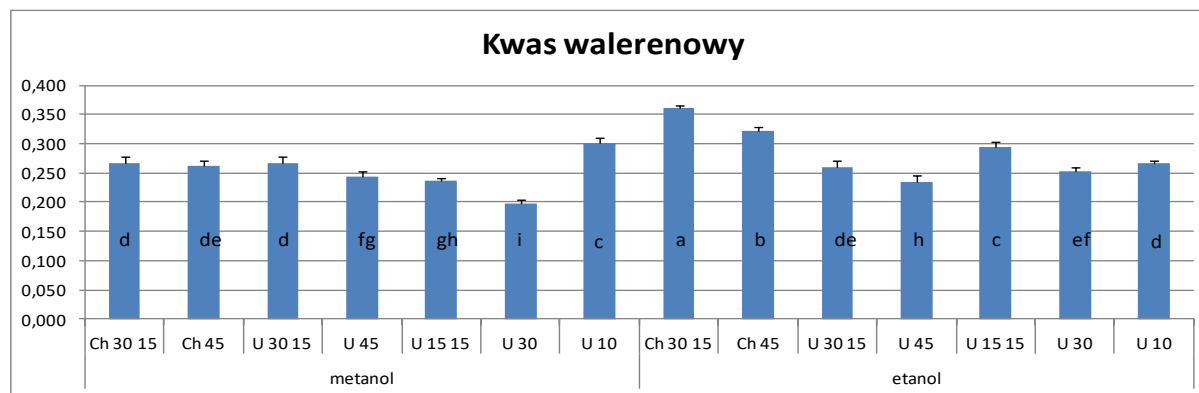


Chromatogram mieszaniny wzorców otrzymany za pomocą metody wg. Farmakopei Europejskiej (monograph 04/2017:0453):
1. kwas hydroksywalerenowy 2. kwas acetoksywalerenowy 3. kwas walerenowy



Chromatogram mieszaniny wzorców otrzymany za pomocą metody opracowanej w temacie badawczym 4:
1. kwas hydroksywalerenowy 2. kwas acetoksywalerenowy 3. kwas walerenowy

Wyniki



Kombinacje zastosowane do optymalizacji warunków ekstrakcji

kombinacja	symbol
metanol, pod chłodnicą zwrotną dwustopniowa 30 min + 15 minut	metanol Ch 30 15
metanol, pod chłodnicą zwrotną jednostopniowa 45 min	metanol Ch 45
metanol, wspomagana ultradźwiękami dwustopniowa 30 min + 15 minut	metanol U 30 15
metanol, wspomagana ultradźwiękami jednostopniowa 45 min	metanol U 45
metanol, wspomagana ultradźwiękami dwustopniowa 15 min + 15 minut	metanol U 15 15
metanol, wspomagana ultradźwiękami jednostopniowa 30 min	metanol U 30
metanol, wspomagana ultradźwiękami jednostopniowa 10 min	metanol U 10
etanol, pod chłodnicą zwrotną dwustopniowa 30 min + 15 minut	etanol Ch 30 15
etanol, pod chłodnicą zwrotną jednostopniowa 45 min	etanol Ch 45
etanol, wspomagana ultradźwiękami dwustopniowa 30 min + 15 minut	etanol U 30 15
etanol, wspomagana ultradźwiękami jednostopniowa 45 min	etanol U 45
etanol, wspomagana ultradźwiękami dwustopniowa 15 min + 15 minut	etanol U 15 15
etanol, wspomagana ultradźwiękami jednostopniowa 30 min	etanol U 30
etanol, wspomagana ultradźwiękami jednostopniowa 10 min	etanol U 10

Przy jednostopniowej ekstrakcji metanolowej wspomaganej ultradźwiękami, trwającej 10 min., zawartość sumy związków markerowych w wyciągu z korzeni kozłka tj. kwasu walerenowego i acetoksywalerenowego jest wyższa niż przy ekstrakcji metodą farmakopealną.

Wyniki te stanowią przesłankę do wykorzystania tej skróconej metody jako optymalnej i oszczędnej przy analizach przesiewowych do zastosowania w projektowanych badaniach.