

# 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 Styczyńska oraz mgr Kavana Raj

Warszawa, 27 listopada 2023r.

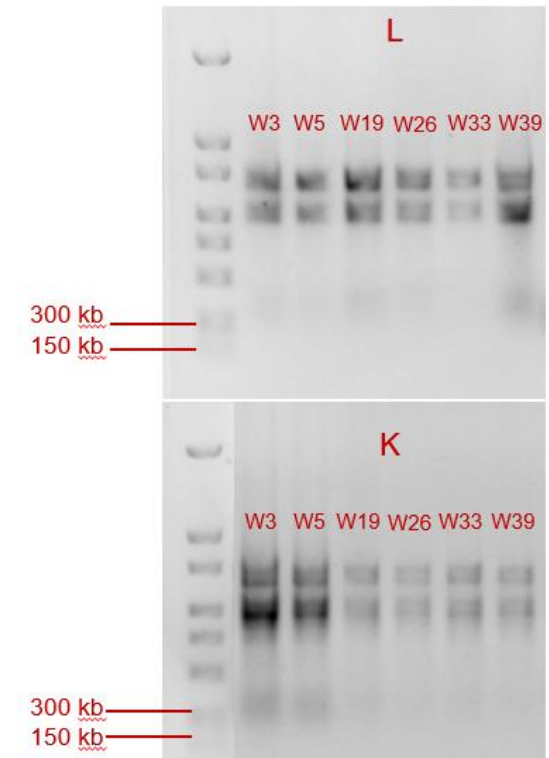
## Genetyczne i rozwojowe aspekty plonowania i jakości surowca kozłka lekarskiego (zadanie 32)

### Cele zadania:

1. Określenie ekspresji genów kodujących syntazy seskwiterpenowe u siewek kozłka.
2. Określenie warunków adaptacji *ex vitro* mikrosadzonek uzyskanych z zastosowaniem technik *in vitro* oraz porównanie rozwoju roślin uzyskanych z mikrorozmnażania i z rozsady.
3. Określenie zakresu zróżnicowania kozłka lekarskiego w fazie rozwoju generatywnego.
4. Określenie wpływu terminu zakładania plantacji na tworzenie się pośpiechów oraz na masę i jakość korzeni.
5. Określenie dynamiki przyrostu masy organów surowcowych i gromadzenia się w nich związków czynnych w uprawie kozłka w cyku 1-rocznym i 1,5 rocznym (ozimym).
6. Określenie czynników pozbiornych wpływających na parametry jakościowe nasion kozłka.

## Temat badawczy 1: Określenie ekspresji genów kodujących syntazy seskwiterpenowe u siewek kozłka

- z 10- tygodniowych siewek kozłka (100 szt.) pozyskane zostały próby liści i korzeni do analiz genetycznych.
- izolacja RNA: RNA izolowano z wykorzystaniem zestawu do izolacji RNA: Gene Matrix Universal RNA Purification Kit firmy EURx (zgodnie z załączoną instrukcją) po uprzednim utarciu materiału w ciekłym azocie z dodatkiem poliwinylpolipirolidonu (PVPP) w stosunku masowym 1:1. Dodatkowo w trakcie procedury izolacji wykonano krok z użyciem DNazy I w celu usunięcia pozostałości DNA w próbkach.
- Synteza cDNA: Na matrycy wyizolowanego RNA przeprowadzono syntezę cDNA z użyciem zestawu do odwrotnej transkrypcji: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™)
- badane geny wytypowane zostały do badań na podstawie prac metodycznych przeprowadzonych w ramach niniejszego zadania w 2021r. i zweryfikowane w trakcie badań w 2022 : AACT, HMGS, HMGR, MVD, IDI, FPS, DXR, MCT, HDS, TPS3, TPS4, TPS7, Act oraz EF1.



**Integralność RNA wybranych prób po ucieraniu z PVPP.** L – liście, K – korzenie. Wzorzec Perfect Plus 2 kb (EURx).

## Temat badawczy 2. Określenie warunków adaptacji *ex vitro* mikrosadzonek kozłka lekarskiego uzyskanych z zastosowaniem technik *in vitro*;

### MATERIAŁ BADAWCZY

Klony uzyskane z mikrorozmnażania: I 42/2, III 16/1, III 16/5, populacja ‚Lubelski‘ uzyskana z nasion

### ADAPTACJA EX VITRO

Podłoże torfowe z piaskiem, lub z perlitem (3:1)

### TERMIN WYSADZENIA W POLE

połowa lipca

### TERMINY OBSERWACJI

Koniec lipca (1. termin), koniec października (2. termin)

### ZAKRES OBSERWACJI ROZWOJU ROŚLIN

- świeża masa roślin i organów surowcowych,
- długość pędów i korzeni,
- liczba pędów/roślinę,
- liczba korzeni przybyszowych/roślinę,
- grubość korzeni przybyszowych,
- morfologia stożków wzrostu pędów.



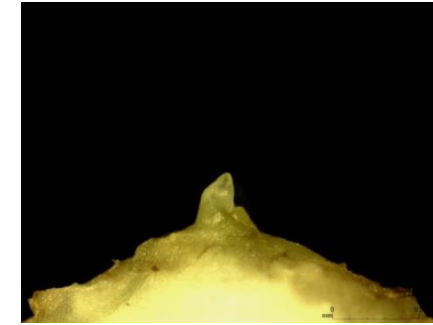
Rośliny z klonu I 42/2 w 2. terminie obserwacji

### Efektywność aklimatyzacji *ex vitro*

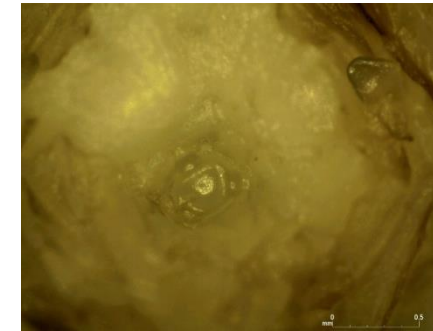
Klon	Podłoże		Średnia
	torf + piasek	torf + perlit	
I 42/2	96,7	96,7	<b>96,7 a</b>
III 16/1	100,0	100,0	<b>100,0 a</b>
III 16/5	93,3	100,0	<b>96,7 a</b>
<b>średnia</b>	<b>96,7 a</b>	<b>98,9 a</b>	-

### Zróżnicowanie świeżej masy i cech morfologicznych

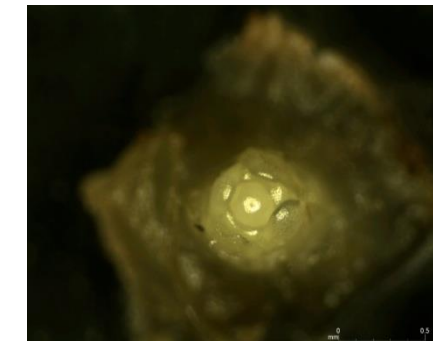
Klon/ populacja kozłka	Świeża masa (g)		Długość (cm)		Liczba		Grubość korzenia (mm)
	Cała roślina	Kłocze z korzeniami	Pędu	Korzeni	Pędów/ roślinę	Korzeni /roślinę	
1. termin obserwacji (25. 07. 23)							
‚Lubelski‘	6,06 a	3,16 a	26,5 bc	23,9 ab	1,0 a	15,6 b	2,48 a
I 42/2	7,95 a	5,05 a	21,8 c	16,4 b	1,4 a	25,2 a	2,26 ab
III 16/1	7,23 a	4,24 a	28,4 c	30,9 a	1,0 a	18,4 ab	2,20 ab
III 16/5	7,88 a	3,77 a	32,6 a	22,5 ab	1,0 a	19,4 ab	2,06 b
<b>Średnia</b>	<b>7,28</b>	<b>4,55</b>	<b>27,3</b>	<b>23,4</b>	<b>1,1</b>	<b>19,7</b>	<b>2,25</b>
2. termin obserwacji (22. 10. 23)							
‚Lubelski‘	310,78 b	120,17 b	53,4 a	17,6 b	3,4 a	98,2 c	3,04 a
I 42.2	654,62 a	265,99 a	51,6 a	21,4 a	4,0 a	210,6 a	3,14 a
III 16.1	222,22 b	109,69 b	48,0 a	21,8 a	4,0 a	145,8 bc	2,48 a
III 16.5	247,04 b	127,80 b	44,7 a	18,3 ab	3,8 a	152,2 b	3,04 a
<b>Średnia</b>	<b>358,67</b>	<b>155,91</b>	<b>49,4</b>	<b>18,8</b>	<b>3,8</b>	<b>151,7</b>	<b>2,93</b>



Merystem wegetatywny,  
‚Lubelski‘, koniec lipca



Merystem generatywny,  
‚Lubelski‘, koniec października



Merystem generatywny,  
klon I42/2, koniec  
października

### Temat badawczy 3. Określenie zakresu różnicowania kozłka lekarskiego w fazie rozwoju generatywnego

Ocena wpływu zagęszczenia roślin w uprawie polowej na budowę pędów kwiatostanowych oraz jakość uzyskanych nasion.

#### Materiały i metody

- Termin założenia doświadczenia polowego: V.2022r. (plantacje nasienne kozłka prowadzone są w systemie 2-letnim; nasiona zbierane są w drugim roku uprawy)
- Zastosowana rozstawa: 50 x 50 cm; 50 x 25 cm; 25 x 25 cm.
- Termin wykonania obserwacji: VI-VII.2023
- Oceniane cechy: budowa nasienników, masa nasion z rośliny oraz ich wartość siewna, tj. masa 1000 nasion, zdolność kiełkowania i dynamika kiełkowania.
- Ocena wartości siewnej nasion została przeprowadzona zgodnie z przepisami ISTA.

#### Wyniki

Badane parametry	Rozstawa roślin					
	50×50 cm		50×25 cm		25×25 cm	
	kontrola**	4 pędy	kontrola**	4 pędy	kontrola**	4 pędy
długość pędów (cm)	226,5	231,0	220,0	224,5	225,8	221,7
długość odcinka pędu z wierzchołkami (cm)	100,6	139,4	87,1	93,3	75,8	86,7
liczba pędów na roślinie (szt.)	13,2	4	12,1	4	8,20	4
liczba wierzchołków I rzędu na pędzie (szt./pęd)	10,7	12,2	9,6	12,6	12,5	11,0
grubość pędu (cm)	1,4	1,7	1,5	1,5	1,4	1,4
masa nasion z rośliny (g)	37,58	28,70	26,07	22,54	20,41	11,32
masa 1000 nasion (g)	0,7683	0,8128	0,7345	0,7593	0,7153	0,7420
zdolność kiełkowania (%)	85,5	91,5	82,0	87,9	80,7	86,5
energia kiełkowania (% (%, liczona po 7 dniach testu)	78,8	84,3	71,5	78,8	72,6	74,0
wilgotność nasion (%)	8,72	8,94	8,76	8,75	8,76	8,74

# Temat badawczy 4. Wpływ terminu zakładania plantacji na tworzenie się pośpiechów oraz masę i jakość korzeni kozłka

## MATERIAŁ BADAWCZY

rośliny z populacji uprawnej 'Lubelski' otrzymane w roku 2022 z 3 terminów siewu nasion:

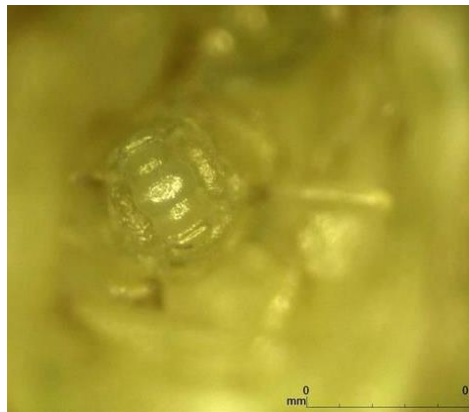
I termin – 21 marca

II termin – 16 maja,

III termin – 18 lipca.

## ZAKRES BADAŃ W TRAKCIE WEGETACJI ROŚLIN

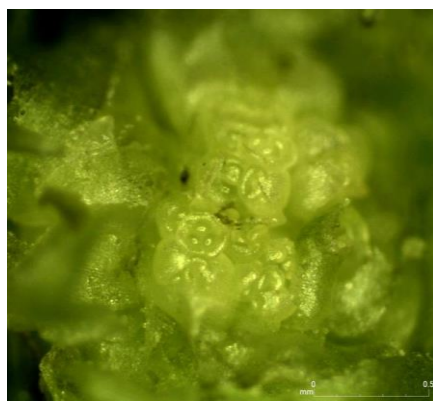
- Analiza różnicowania się merystemu pędu: 22 marca (1. termin), 20 kwietnia (2. termin);
- Liczba i długość pędów generatywnych (1 czerwca)
- Intensywność odrastania pośpiechów w okresie od 14 czerwca do 5 lipca:
  - liczba pośpiechów
  - długość pośpiechów



Merystemy kwiatostanowe roślin z I terminu wysiewu nasion na etapie różnicowania rozgałęzień I i II rzędu (22 marca)



Młody kwiatostan rośliny z I terminu wysiewu (20 kwietnia)



Merystemy kwiatowe w kwiatostanie rośliny z I terminu wysiewu



Rośliny z I terminu wysiewu na początku kwitnienia

## Liczba i długość odrastających pośpiechów

Termin siewu	Liczba pędów (pośpiechów)/roślinę		Długość pędów (pośpiechów) (cm)	
	odziomkowyc h	kątowych	odziomkowych	kątowych
<b>Observacje 14 czerwca</b>				
I	0,8 a	10,3 a	1,8 a	3,2 a
II	2,2 a	8,0 ab	2,7 a	3,1 a
III	0,5 a	2,3 b	1,7 a	3,3 a
<b>średnia</b>	<b>1,2</b>	<b>6,9</b>	<b>2,1</b>	<b>3,2</b>
<b>Observacje 23 czerwca</b>				
I	3,5 a	10,5 a	15,3 a	14,0 a
II	2,7 a	8,5 a	16,5 a	13,9 a
III	0,5 a	2,3 b	9,0 a	8,0 a
<b>średnia</b>	<b>2,2</b>	<b>7,1</b>	<b>13,6</b>	<b>12,0</b>
<b>Observacje 5 lipca</b>				
I	3,5 a	14,3 a	42,7 a	38,5 a
II	4,0 a	10,3 a	42,0 a	39,3 a
III	0,5 a	2,5 b	18,8 a	25,0 a
<b>średnia</b>	<b>2,7</b>	<b>9,0</b>	<b>34,5</b>	<b>34,3</b>

# Temat badawczy 5. Badania nad dynamiką przyrostu masy organów surowcowych kozłka i gromadzenia się w nich związków biologicznie czynnych (uprawa w cyklu 1-rocznym i 1,5-rocznym)

## TERMINY SADZENIA ROZSADY:

Uprawa 1-rocza: koniec kwietnia 2022

Uprawa 1,5-rocza: druga połowa sierpnia 2022

## TERMINY ZBIORU ORGANÓW PODZIEMNYCH:

Uprawa 1-rocza: wrzesień 2022 (1. termin), początek listopada 2022r. (2. termin), styczeń 2023r (3. termin).

Uprawa 1,5-rocza: wrzesień 2023 (1. termin), początek listopada 2023r. (2. termin).

## ANALIZY CHEMICZNE SUROWCA:

ocena zawartości kwasów walerenowych – HPLC

ocena zawartości i składu olejków eterycznych – GC/MS

## FRAKCJE SUROWCA:

kłącza, grube korzenie i drobne korzenie

## Uprawa w cyklu 1-rocznym: masa organów podziemnych (g/roślinę)

Termin zbioru	Fracje organów podziemnych			Razem
	kłącza	grube korzenie	drobne korzenie	
<b>1. termin (wrzesień 2022)</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 2022)</b>				
świeża masa	52,3	91,3	67,2	210,8
sucha masa	14,9	26,2	16,5	57,6
<b>3. termin (styczeń 2023)</b>				
świeża masa	37,1	69,2	43,4	149,7
sucha masa	6,2	12,3	5,7	24,2

## Uprawa w cyklu 1,5-rocznym: masa organów podziemnych (g/roślinę)

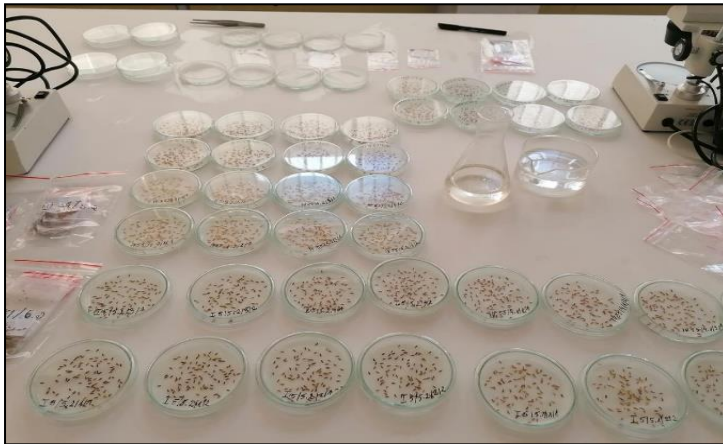
Termin zbioru	Fracje organów podziemnych			Razem
	kłącza	grube korzenie	drobne korzenie	
<b>1. termin (wrzesień 2023)</b>				
świeża masa	110,0	127,0	125,0	362,0
sucha masa	27,7	28,3	23,3	79,3
<b>2. termin (listopad 2023)</b>				
świeża masa	108,1	155,4	143,1	406,6
sucha masa	29,2	42,7	32,4	104,3



Doświadczenie w gosp. zielarskim w okolicach Płońska

## Temat badawczy 6: Określenie czynników pozbiornych wpływających na parametry jakościowe nasion kozłka.

- Materiał badawczy: nasiona kozłka lekarskiego zebrane w 2022r.
- Zastosowane opakowania: worki papierowe, woreczki strunowe i szklane słoje
- Temperatura przechowywania:
- 21°C, 10°C, 4°C, -20°C
- Czas przechowywania: 3 i 10 m-cy
- Ocena wartości siewnej (ISTA): masa 1000 nasion, zdolność kiełkowania i energia kiełkowania



### Zdolność kiełkowania nasion po trzech miesiącach przechowywania (%)

Sposób przechowywania	Temperatura przechowywania				Średnia dla opakowania
	21°C	10°C	4 °C	-20°C	
szczerlnie zamykany szklany słoik	91,3	90,3	89,8	90,3	90,4a
worek foliowy ze strunowym zamykaniem	90,0	91,3	89,3	88,7	89,8a
worek papierowy jednowarstwowy	88,5	87,0	87,5	86,7	87,4a
Średnia dla temperatury	88,9a	89,5a	88,9a	88,6a	

### Energia kiełkowania nasion po trzech miesiącach przechowywania (%)

Sposób przechowywania	Temperatura przechowywania				Średnia dla opakowania
	21°C	10°C	4 °C	-20°C	
szczerlnie zamykany szklany słoik	85,8	83,5	82,3	78,5	82,5a
worek foliowy ze strunowym zamykaniem	83,0	83,3	82,3	72,3	80,2a
worek papierowy jednowarstwowy	84,0	79,5	77,5	70,7	77,9a
Średnia dla temperatury	84,3a	82,1a	80,7a	73,8a	