

# **Analiza zmienności genetycznej i doskonalenie genotypów maku lekarskiego o zróżnicowanej zawartości alkaloidów dla potrzeb farmaceutycznych**

**Kierownik tematu: prof. dr hab. Iwona Bartkowiak – Broda**

**Wykonawcy: mgr inż. Magdalena Walkowiak  
dr Marek Wójtowicz  
dr Krzysztof Michalski  
mgr Maria Ogrodowczyk**

**Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych,  
Oddział IHAR – PIB Poznań**

**SPRAWOZDANIE O STANIE REALIZACJI ZADANIA 8.3**

**09.01.2014 r.**

---

**Celem pracy było uzyskanie form maku o zróżnicowanej zawartości alkaloidów, głównie tebainy i morfiny oraz rozszerzenie uprawy tej rośliny**

# **Poszerzanie zmienności w zakresie zawartości alkaloidów w makowinach na drodze mutagenezy**



## Charakterystyka odmian i linii maku będących obiektami badań w procesie mutagenезy chemicznej (EMS)

Odmiana/linia	Kwiaty		Kształt makówek	Zawartość morfiny w makowinach (%)
	barwa	brzegi płatków korony		
<b>Lazur</b>	białe z fioletowym oczkiem	całobrzegie	kuliste	0,8-1,1
<b>102/4i/09</b>	białe z fioletowym oczkiem	całobrzegie	kuliste	0,4-1,1
<b>130/2i/09</b>	białe z fioletowym oczkiem	całobrzegie	kuliste	0,3-1,1
<b>138/2i/10</b>	białe z fioletowym oczkiem, jasnoróżowe z fioletowym oczkiem	całobrzegie	kuliste i lekko wydłużone	0,1-0,9
<b>3/1i + 4/1i/10</b>	białe z fioletowym oczkiem	lekko strzępiaste	kuliste i lekko wydłużone	0,2
<b>Rubin</b>	ciemnoróżowe z fioletowym oczkiem	całobrzegie	kuliste i lekko wydłużone	0,007

## Warunki prowadzenia mutagenезы

Rok	Sposób działania	Wstępne moczenie nasion w wodzie destylowanej [temp./czas]	Stężenie mutagenu [%]	Ekspozycja [temp./czas]	Czas wymywania mutagenu pod bieżącą wodą
kontrola		Moczenie nasion w wodzie destylowanej			
2011	I	20°C/12 h	0,6	4 h	2 h
	II		0,8	3 h	4 h
	III		0,6	25 min UD/4 h	2 h
	IV		0,8	25 min UD/3 h	2 h
2012	V		0,8 po I sposobie działania w 2011	5 min UD/4 h	2 h
	VI		0,8 po I sposobie działania w 2011	4 h	2 h
	VII		1,0 po I sposobie działania w 2011	4 h	1 h
	VIII		1,2 po I sposobie działania w 2011	4 h	1 h
	IX		1,0 po II sposobie działania w 2011	4 h	1 h
	X		1,2 po II sposobie działania w 2011	4 h	1 h



# Zmiany zawartości alkaloidów w makowinach pokolenia M<sub>3</sub> po zastosowaniu w 2011 i 2012 roku mutagenyzy chemicznej

Linia/ odmiana	Kontrola/stężenie środka mutagennego	Kodeina			Morfina			Tebaina			Papaweryna		
		średni a	odchyl · stan.	współ. zm.	średni a	odchyl · stan.	współ. zm.	średni a	odchyl · stan.	współ. zm.	średnia	odchyl · stan..	współ. zm.
<b>Lazur</b>	kontrola	<b>0,013</b>	0,028	215,4	<b>1,117</b>	0,172	15,4	<b>0,058</b>	0,064	110,3	<b>0,036</b>	0,003	8,3
	0,8% (0,6% w 2011)	<b>0,001</b>	0,006	600,0	<b>1,094</b>	0,241	22,0	<b>0,042</b>	0,090	214,3	<b>0,053</b>	0,016	30,8
	1% (0,6% w 2011)	<b>0,012</b>	0,023	191,7	<b>1,042</b>	0,312	29,9	<b>0,026</b>	0,028	107,5	<b>0,056</b>	0,018	32,1
	1,2% (0,6% w 2011)	<b>0,018</b>	0,021	116,7	<b>1,207</b>	0,223	18,5	<b>0,019</b>	0,017	89,5	<b>0,040</b>	0,019	47,5
	1% (0,8% w 2011)	<b>0,027</b>	0,042	155,6	<b>0,944</b>	0,269	28,5	<b>0,035</b>	0,034	97,1	<b>0,051</b>	0,024	47,1
	1,2% (0,8% w 2011)	<b>0</b>	0	0	<b>1,124</b>	0,230	20,4	<b>0,034</b>	0,056	164,7	<b>0,050</b>	0,012	24,0
<b>Linia 102/4i/09</b>	kontrola	<b>0</b>	0	0	<b>1,022</b>	0,443	43,3	<b>0,004</b>	0,009	225,0	<b>0,045</b>	0,006	13,3
	1% (0,6% w 2011)	<b>0,024</b>	0,031	129,2	<b>0,984</b>	0,212	21,5	<b>0,025</b>	0,025	100,0	<b>0,042</b>	0,014	58,3
	1,2% (0,8% w 2011)	<b>0,006</b>	0,013	216,7	<b>1,032</b>	0,231	22,4	<b>0,013</b>	0,021	161,5	<b>0,041</b>	0,040	97,6
<b>Linia 130/2i/09</b>	kontrola	<b>0</b>	0	0	<b>1,151</b>	0,106	9,2	<b>0,034</b>	0,007	20,6	<b>0,036</b>	0,013	36,1
	1% (0,6% w 2011)	<b>0,016</b>	0,033	206,3	<b>1,005</b>	0,210	20,9	<b>0,027</b>	0,025	92,6	<b>0,030</b>	0,011	36,7
	1,2% (0,8% w 2011)	<b>0,028</b>	0,057	203,6	<b>0,839</b>	0,338	40,3	<b>0,010</b>	0,015	150,0	<b>0,036</b>	0,013	36,1
<b>Linia 138/2i/10</b>	kontrola	<b>0</b>	0	0	<b>0,753</b>	0,048	6,4	<b>0,002</b>	0,003	150,0	<b>0,016</b>	0,003	18,8
	1% (0,6% w 2011)	<b>0,016</b>	0,018	112,5	<b>0,782</b>	0,232	29,7	<b>0,001</b>	0,003	300,0	<b>0,038</b>	0,012	31,6
	1,2% (0,8% w 2011)	<b>0,005</b>	0,008	100,0	<b>0,753</b>	0,278	36,9	<b>0,001</b>	0,002	200,0	<b>0,034</b>	0,014	41,2
<b>Lazur UD+EMS</b>	kontrola	<b>0,029</b>	0,021	72,4	<b>0,942</b>	0,150	15,9	<b>0,002</b>	0,004	200,0	<b>0,037</b>	0,010	27,0
	0,8%	<b>0,013</b>	0,009	69,2	<b>0,939</b>	0,192	20,4	<b>0</b>	0	0	<b>0,041</b>	0,007	17,1
	1% (0,6% w 2011)	<b>0,028</b>	0,033	117,9	<b>1,033</b>	0,249	24,1	<b>0,010</b>	0,013	130,0	<b>0,024</b>	0,014	25,0
	1,2% (0,8% w 2011)	<b>0,038</b>	0,053	139,5	<b>1,017</b>	0,214	21,0	<b>0,025</b>	0,035	140,0	<b>0,037</b>	0,002	5,4

- Analizując zawartości poszczególnych alkaloidów stwierdzono, że zawartość morfiny u odmiany Lazur i badanych linii była na poziomie charakterystycznym dla genotypów wysokomorfinowego maku.
- W przypadku odmiany Lazur na nasiona, której działano ultradźwiękami i EMS 1 i 1,2% w 2011 roku zaobserwowano wzrost zawartości morfiny. Na podstawie obliczonych współczynników zmienności stwierdzono niewielkie różnice w zawartości morfiny w liniach kontrolnych, natomiast wysoki współczynnik zmienności w kombinacjach stężeń EMS świadczą o zróżnicowaniu zawartości morfiny w analizowanych makowinach.
- Zawartość kodeiny wyraźnie wzrosła w makowinach linii 102/4i/09, 130/2i/09 i 138/2i/10 po zastosowaniu mutagenu, natomiast w grupach kontrolnych zawartość tego alkaloidu była na zerowym poziomie.
- Zastosowanie mutagenezy chemicznej wpłynęło na zróżnicowanie zawartości tebainy i papaweryny w makowinach. Wyraźny wzrost zawartości tebainy w makowinach pokolenia M<sub>3</sub> odnotowano w mutantach linii 102/4i/09 i odmiany Lazur po zastosowaniu UD + EMS.

## Zmiany zawartości alkaloidów w makowinach pokolenia M<sub>2</sub> po zastosowaniu w 2012 roku mutagenazy chemicznej

Linia/ odmiana	Kontrola/ stężenie mutagenu	Kodeina			Morfina			Tebaina			Papaweryna		
		Średnia	odchyl. stan.	współ. zm.	Średnia	odchyl. stan.	współ. zm.	Średnia	odchyl. stan.	współ. zm.	Średnia	odchyl. stan.	współ. zm.
<b>Linia 3/1i+ 4/1i/10</b>	kontrola	<b>0</b>	0	0	<b>0,065</b>	0,028	43,1	<b>0</b>	0	0	<b>0,036</b>	0,011	30,5
	0,8%	<b>0,017</b>	0,022	129,4	<b>0,593</b>	0,500	84,3	<b>0,009</b>	0,016	177,8	<b>0,033</b>	0,007	21,2
	1%	<b>0</b>	0	0	<b>0,132</b>	0,126	95,4	<b>0,024</b>	0,034	141,7	<b>0,033</b>	0,005	15,2
	1,2%	<b>0</b>	0	0	<b>0,057</b>	0,017	29,8	<b>0</b>	0	0	<b>0,056</b>	0,016	28,6
<b>Rubin</b>	kontrola	<b>0</b>	0	0	<b>0,096</b>	0,017	17,7	<b>0</b>	0	0	<b>0,038</b>	0	0
	0,8%	<b>0</b>	0	0	<b>0,929</b>	0,177	19,1	<b>0,010</b>	0,009	90,0	<b>0,020</b>	0,008	40,0
	1%	<b>0,057</b>	0,015	26,3	<b>0,683</b>	0,424	36,2	<b>0,020</b>	0,003	15,0	<b>0,042</b>	0,004	9,5
	1,2%	<b>0,048</b>	0,031	64,6	<b>0,954</b>	0,170	17,8	<b>0,009</b>	0,007	77,8	<b>0,039</b>	0,008	20,5



- Dla niskomorfinowej linii 3/1i+4/1i/10 i odmiany Rubin po zastosowaniu chemicznego czynnika mutagennego uzyskano wzrost zawartości morfiny w pokoleniu  $M_2$  do poziomu typowego dla wysokomorfinowych form maku. We wcześniejszym pokoleniu morfina pozostawała na poziomie niskomorfinowych genotypów maku.

# Zmiany zawartości alkaloidów w makowinach pokolenia M<sub>1</sub> po zastosowaniu w 2013 roku mutagenazy chemicznej

Linia/ odmiana	Kontrola/ stężenie środka mutagennego	Kodeina			Morfina			Tebaina			Papaweryna		
		średnia	odchyl. stan.	współ. zm.	średnia	odchyl. stan.	współ. zm.	średnia	odchyl. stan.	współ. zm.	średnia	odchyl. stan..	współ. zm.
<b>Lazur</b>	kontrola	<b>0,017</b>	0,037	217,6	<b>1,054</b>	0,117	11,1	<b>0,094</b>	0,161	171,3	<b>0,024</b>	0,005	20,8
	1,4%	<b>0</b>	0	0	<b>0,906</b>	0,087	9,6	<b>0,033</b>	0,023	69,7	<b>0,030</b>	0,005	16,7
	1,6%	<b>0,088</b>	0,022	25,0	<b>1,325</b>	0,246	18,6	<b>0,015</b>	0,019	126,7	<b>0,016</b>	0,019	100,0
<b>Linia 102/4i/09</b>	kontrola	<b>0,043</b>	0,015	34,9	<b>1,238</b>	0,104	8,4	<b>0,033</b>	0,039	118,2	<b>0,031</b>	0,016	51,6
	1,4%	<b>0,036</b>	0,027	75,0	<b>1,240</b>	0,415	33,4	<b>0,027</b>	0,041	151,8	<b>0,025</b>	0,018	72,0
	1,6%	<b>0,053</b>	0,037	69,8	<b>1,029</b>	0,339	32,9	<b>0,021</b>	0,002	9,5	<b>0,035</b>	0,008	22,8
<b>Linia 130/2i/09</b>	kontrola	<b>0,056</b>	0,027	48,2	<b>0,768</b>	0,169	22,0	<b>0,039</b>	0,040	102,6	<b>0,035</b>	0,008	22,8
	1,4%	<b>0,026</b>	0,027	3,8	<b>0,863</b>	0,297	34,	<b>0,036</b>	0,024	66,7	<b>0,042</b>	0,010	23,8
	1,6%	<b>0</b>	0	0	<b>1,064</b>	0,091	8,5	<b>0</b>	0	0	<b>0,059</b>	0,016	27,1
<b>Linia 138/2i/10</b>	kontrola	<b>0</b>	0	0	<b>0,953</b>	0,123	12,9	<b>0,007</b>	0,012	171,4	<b>0,057</b>	0,014	24,5
	1,4%	<b>0</b>	0	0	<b>0,980</b>	0,297	30,3	<b>0,005</b>	0,006	120,0	<b>0,063</b>	0,014	22,3
	1,6%	<b>0,024</b>	0,033	137,5	<b>1,043</b>	0,179	17,1	<b>0,043</b>	0,070	162,8	<b>0,050</b>	0,017	34,0
<b>Lazur UD+EMS</b>	kontrola	<b>0,013</b>	0,010	76,3	<b>0,902</b>	0,136	15,0	<b>0</b>	0	0	<b>0,047</b>	0,023	49,4
	1,4%	<b>0,028</b>	0,010	35,1	<b>1,011</b>	0,112	11,1	<b>0</b>	0	0	<b>0,077</b>	0,019	24,7
	1,6%	<b>0,048</b>	0,017	36,3	<b>1,169</b>	0,177	15,1	<b>0,004</b>	0,008	200,0	<b>0,047</b>	0,014	29,8
<b>Linia 3/1i + 4/1i/10</b>	kontrola	<b>0</b>	0	0	<b>0,120</b>	0,013	10,8	<b>0,005</b>	0,009	180,0	<b>0,073</b>	0,002	4,6
	1,4%	<b>0,003</b>	0,004	133,0	<b>0,586</b>	0,481	82,1	<b>0,043</b>	0,040	93,0	<b>0,056</b>	0,016	28,6
	1,6%	<b>0,012</b>	0,020	166,6	<b>0,471</b>	0,453	96,2	<b>0,013</b>	0,019	146,2	<b>0,065</b>	0,018	27,7
<b>Rubin</b>	kontrola	<b>0,003</b>	0,003	100,0	<b>0,085</b>	0,006	7,1	<b>0,003</b>	0,003	100,0	<b>0,088</b>	0,018	20,5
	1,4%	<b>0,004</b>	0,007	175,0	<b>0,456</b>	0,319	69,9	<b>0,013</b>	0,007	58,6	<b>0,051</b>	0,035	68,6

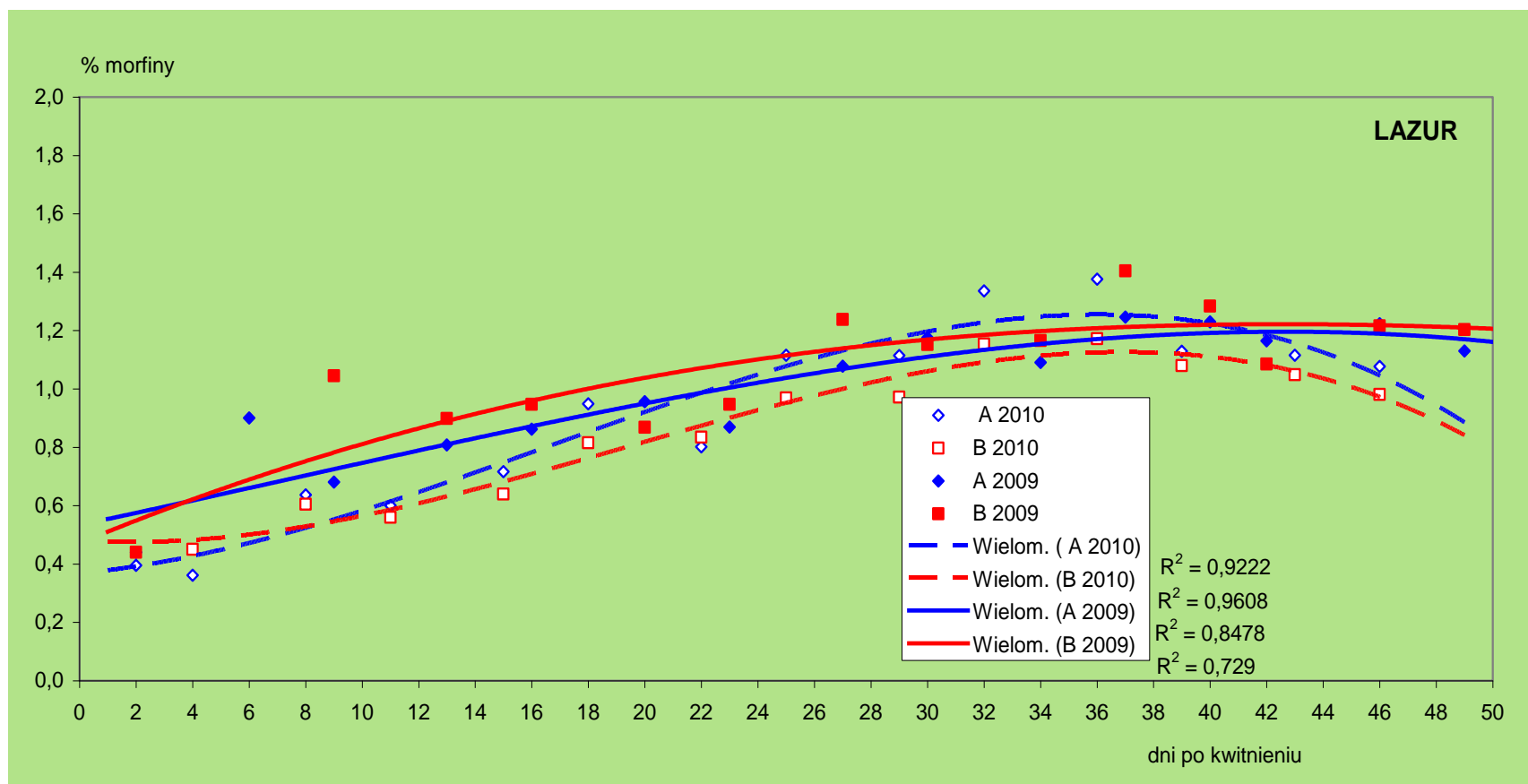
- Zastosowanie zaostorzonych warunków indukowania mutagenyzy wpłynęło na  
zwiększenie zróżnicowania zawartości alkaloidów w makowinach. Wyrażny wzrost  
zawartości morfiny i tebainy wystąpił w niskomorfninowych genotypach  
maku: linia  
3/1i+4/1i/10 i odmiana Rubin.
- Wystąpienie większej ilości zmian mutacyjnych w badanym materiale  
pokolenia M<sub>1</sub>  
wymaga prowadzenia dalszej selekcji mutantów w celu znalezienia  
materiałów o  
korzystnym składzie alkaloidów.
- Zastosowanie 1,6% EMS na nasiona odmiany Rubin okazało się dawką  
letalną.

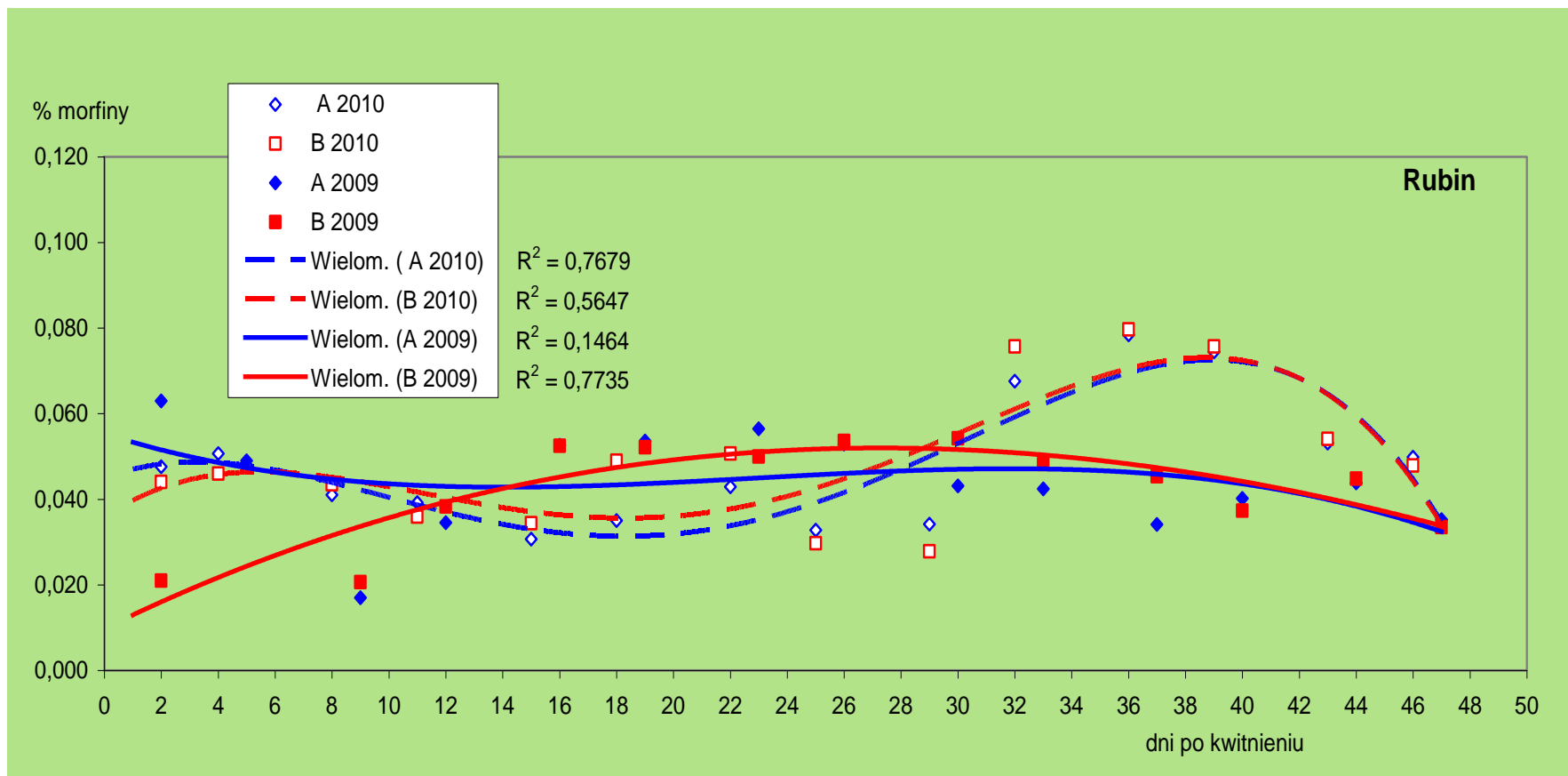
# **Badania nad akumulacją morfiny w makowinach w trakcie wegetacji roślin**



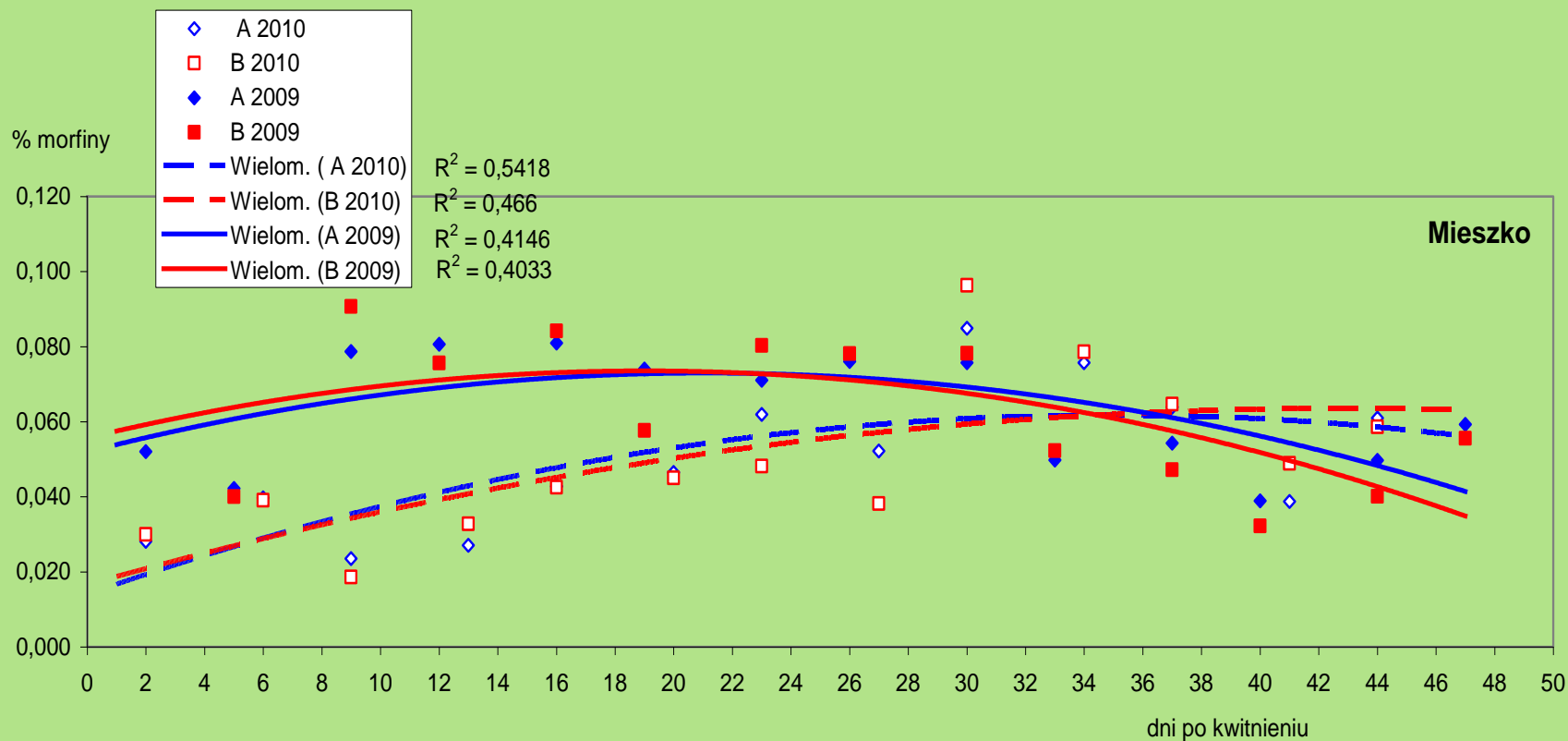


## Zmiany zawartości morfiny w trakcie dojrzewania makówek odmian Lazurowy, Rubin i Mieszko w dwóch latach badań, dla makówki A i makówki B



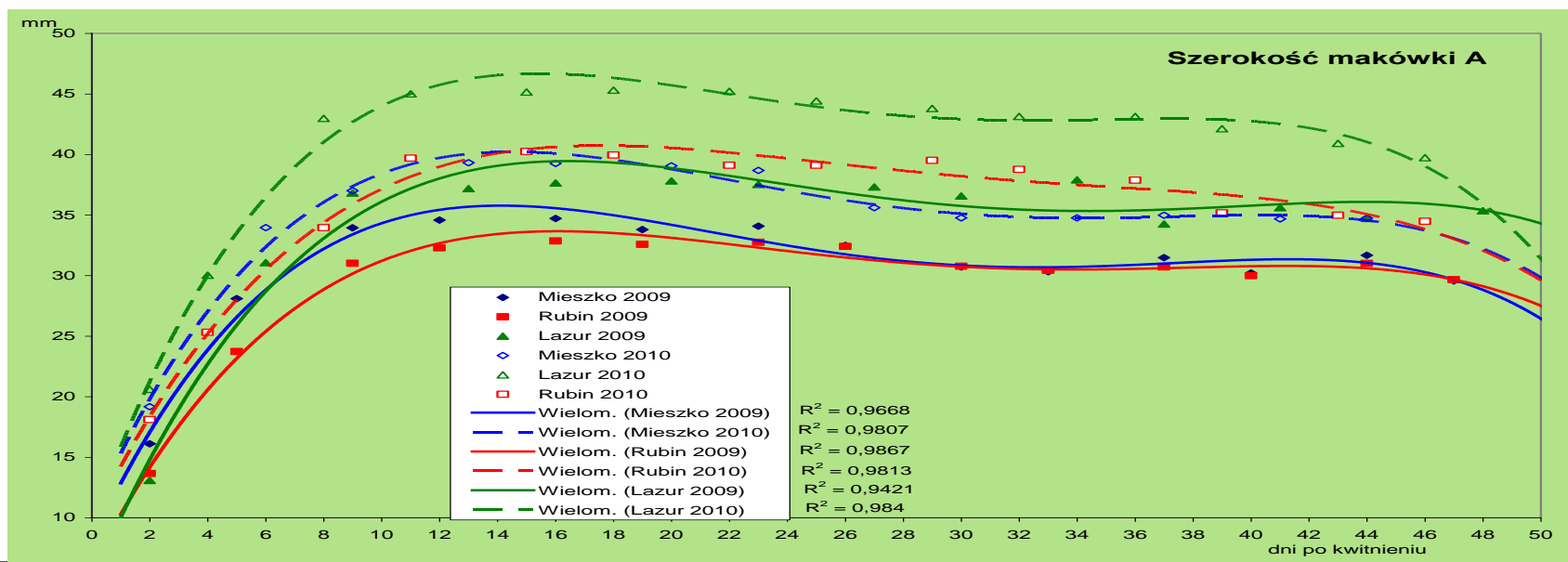
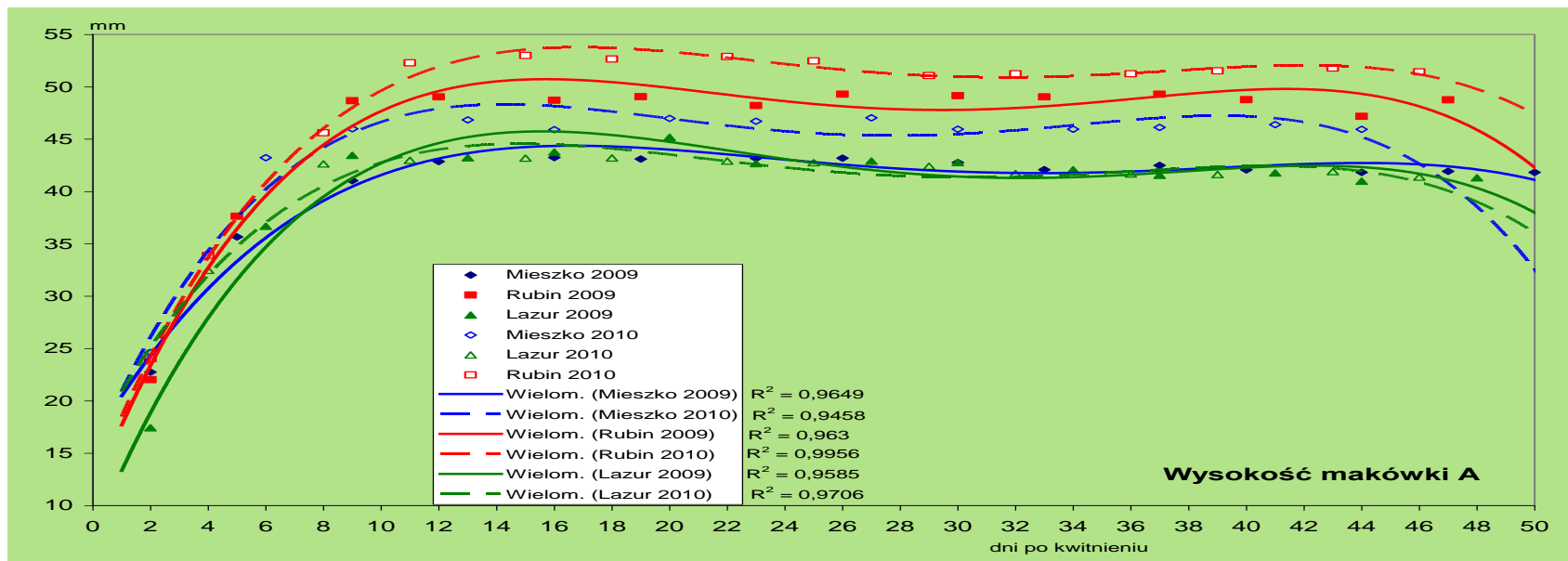




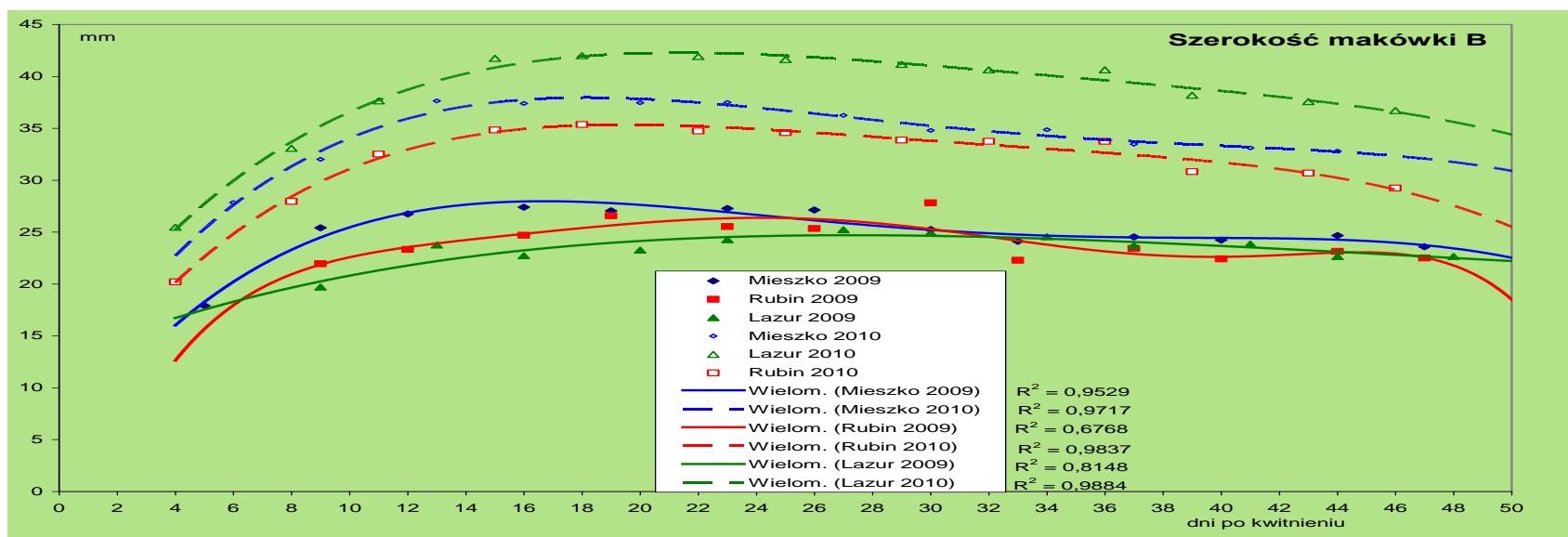
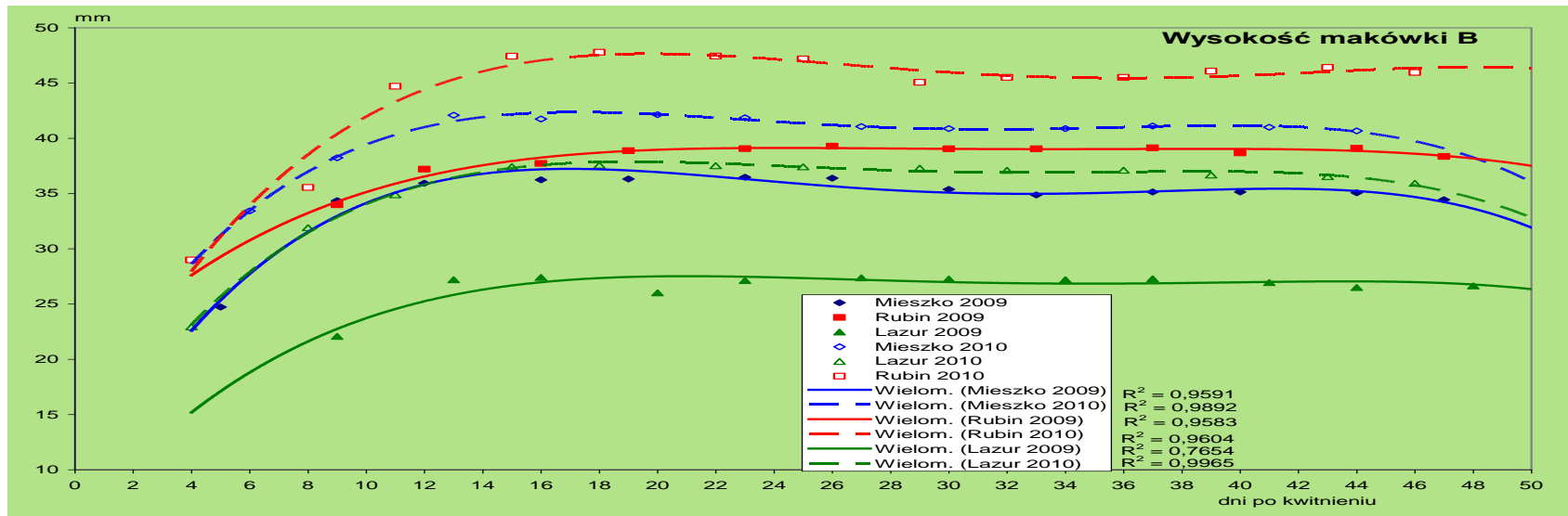


- Analizy pokazały, że zakres zmienności zawartości morfiny w ciągu całego okresu wegetacji był typowy zarówno dla odmian niskomorfinowych jak i wysokomorfinowych.
- Stwierdzono, że badanie zawartości morfiny bez względu na okres wegetacji, w którym została pobrana próba i położenie makówki na roślinie (pęd główny lub boczny) pozwala na jednoznaczne określenie czy jest to odmiana wysokomorfinowa czy niskomorfinowa.

# Zmiany kształtu makówki A odmian Lazur, Rubin i Mieszko w trakcie dojrzewania w dwóch latach badań



## Zmiany kształtu makówki B odmian Lazurowy, Rubin i Mieszko w trakcie dojrzewania w dwóch latach badań



## Różnice w kształcie makówek i współczynniki kształtu makówek trzech badanych odmian maku



Współczynnik kształtu:

124,3

138,2

92,95

- Stwierdzono, że warunki środowiska mają istotny wpływ na zmiany cech fenotypowych maku oleistego po kwitnieniu roślin, a współczynnik kształtu makówek może być wykorzystany do opisu odmian.



# Poszukiwanie źródeł zmienności



## Charakterystyka odmian maku otrzymanych z kolekcji z Węgier na podstawie obserwacji własnych

Odmiana	Typ odmiany	Kwiaty		Kształt makówek	Plon nasion (dt/ha)	Plon makowin (dt/ha)
		barwa	brzegi płatków korony			
<b>Afganistan</b>	średnio wczesna	białe i jasnoróżowe z fioletowym oczkiem	całobrzegie	kuliste	2,11	2,39
<b>Dubnik</b>	średnio wczesna	białe z fioletowym oczkiem	całobrzegie	kuliste i lekko wydłużone	2,55	3,03
<b>G-O5</b>	wczesna	fioletowe z ciemnofioletowym oczkiem	strzępiaste	kuliste	1,70	2,52
<b>Lomadon</b>	średnio wczesna	białe i lekko różowe z fioletowym oczkiem	całobrzegie	kuliste	2,78	2,64
<b>Thailande 7411</b>	średnio wczesna	białe i ciemnoróżowe lekko różowym oczkiem	całobrzegie	kuliste	2,02	2,02

cd. tabeli

Odmiana	Zawartość alkaloidów (%)			
	Kodeina	Morfina	Tebaina	Papaweryna
<b>Afganistan</b>	0,020	1,145	0,109	0,096
<b>Dubnik</b>	0,096	0,871	0,224	0,055
<b>G - 05</b>	0	0,266	0,018	0,300
<b>Lomadon</b>	0,002	0,893	0,012	0,090
<b>Thailande 7411</b>	0,042	1,049	0,022	0,157





**Dubnik**



**Lomadon**



**G-05**

- Odmiany: Afganistan, Dubnik, Lomadon i Thailande 7411 można zaszeregować do grupy odmian wysokomorfinowych, natomiast odmianę G-O5 do grupy średniomorfinowych.



# Prace nad agrotechniką maku



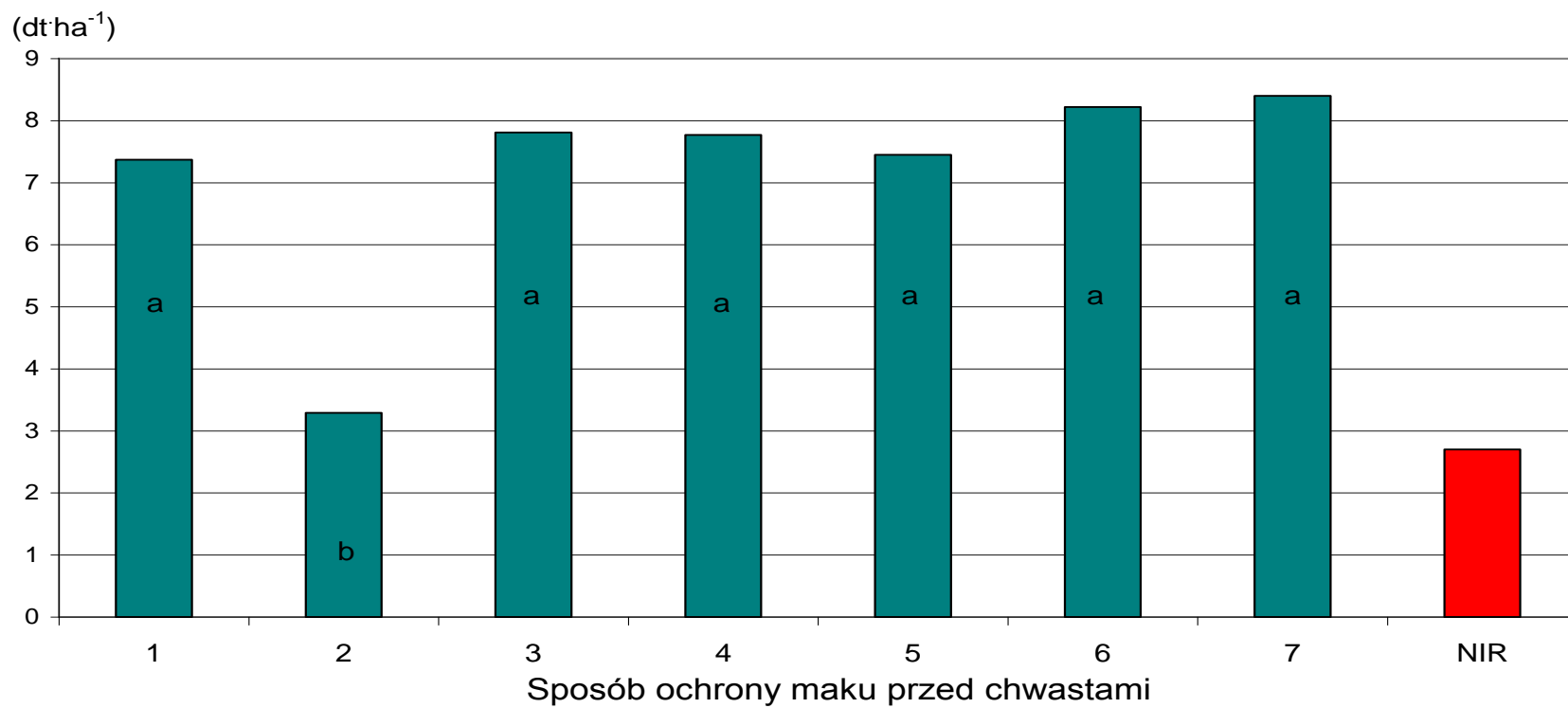




## Sposoby pielęgnacji maku

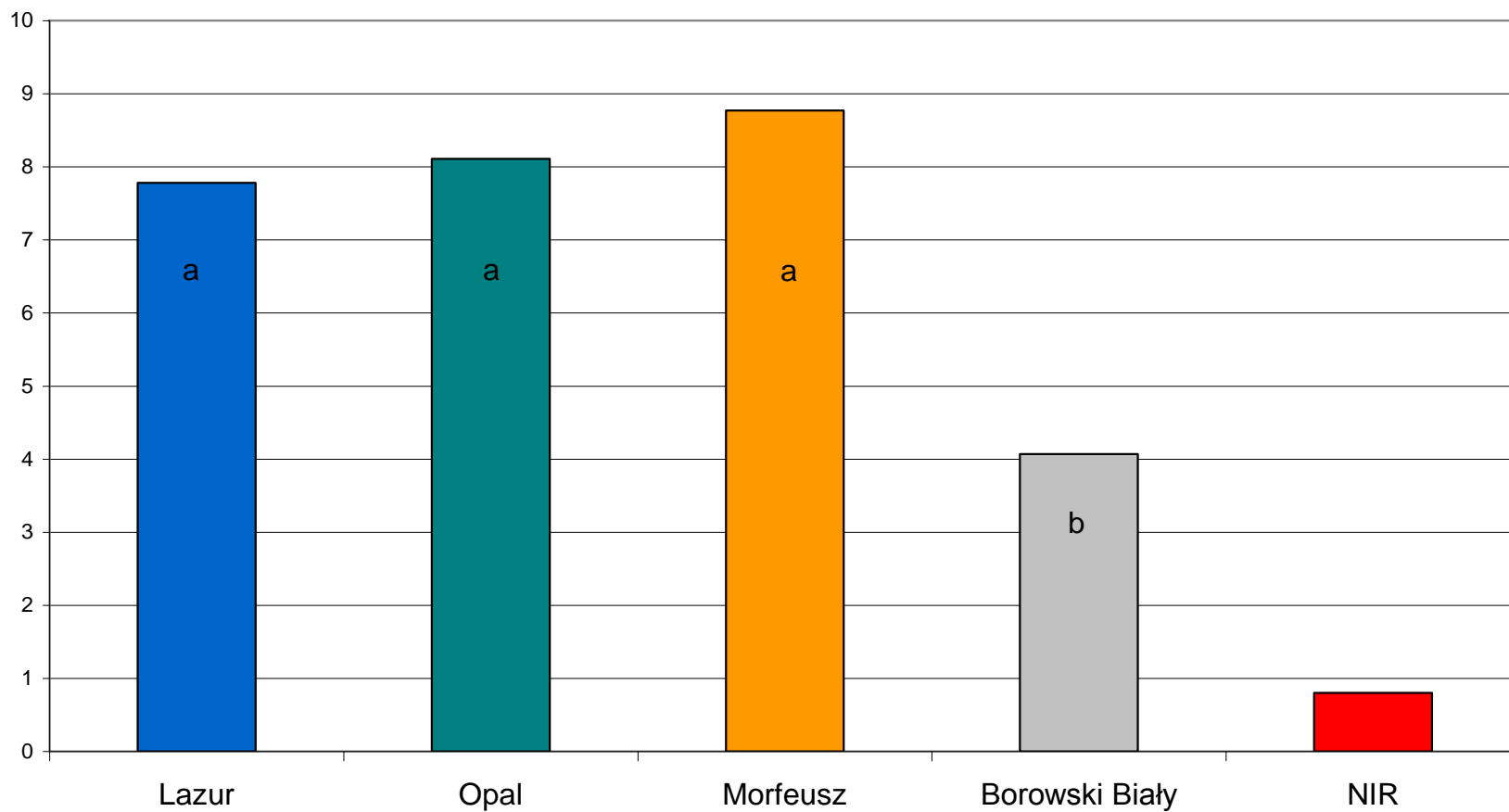
Obiekt	Herbicydy stosowane przed wschodami	Dawka l·ha <sup>-1</sup>	Herbicydy stosowane po wschodach (4-6 liści)	Dawka l·ha <sup>-1</sup>
1	Nietraktowany		Laudis 44 OD	2,0
2	Lentipur Flo 500 SC	1,0		
3	Lentipur Flo 500 SC	1,0	Callisto 100 SC + Starane 250 EC + Fusilade Forte	0,5+ 0,15+ 1,0
4	Lentipur Flo 500 SC	1,0	Laudis 44 OD + Starane 250 EC + Fusilade Forte	1,5 + 0,15+ 1,0
5	Lentipur Flo 500 SC	1,0	Laudis 44 OD + Starane 250 EC + Fusilade Forte	1,8+ 0,15+ 1,0
6	Callisto 100 SC	0,5	Laudis 44 OD + Starane 250 EC + Fusilade Forte	2,0+ 0,15+ 1,0
7	Kontrola – pielęgnacja ręczna			

### Wpływ sposobu ochrony przed chwastami na plon nasion



## Plon nasion odmian maku

(dt·ha<sup>-1</sup>)



- Strategia ochrony maku za pomocą herbicydów sprowadza się zatem do uprawiania maku w wąskiej rozstawie (około 15 cm), dwukrotnego stosowania zabiegów chemicznych (przed i po wschodach) oraz doborze właściwego herbicydu skutecznie zwalczającego najgroźniejsze chwasty maku. Przeprowadzone badania wykazały, że przed wschodami można stosować herbicyd Lentipur Flo™ 500 SC w dawce  $1,0 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$  lub Callisto™ 100 SC w dawce  $0,5 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$ , natomiast powschodowo najskuteczniejszy, a zarazem najmniej fitotoksyczny okazał się herbicyd Laudis™ 44 OD ( $2,0 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$ ). Przeprowadzone doświadczenia wskazują na dobrą skuteczność ochrony maku za pomocą herbicydów.
- Plony zależały także od odmiany maku. Wyżej i wierniej plonowały odmiany wysokomorfinowe: Opal, Lazur i Morfeusz, które były bardziej odporne na stresy abiotyczne: nadmiar i niedobór opadów w okresie początkowego rozwoju maku.
- Większa wrażliwość maku niskomorfinowego na stres abiotyczny mająca odzwierciedlenie w plonach skłania do podjęcia działań nad przywróceniem do uprawy w Polsce odmian wysokomorfinowych.
- Wprowadzenie herbicydów do technologii uprawy maku oraz przywrócenie do uprawy stabilniej i wyżej plonujących odmian wysokomorfinowych jest obecnie niezbędnym warunkiem, który musi być spełniony w celu zwiększenia powierzchni uprawy maku w naszym kraju.

## **Wymierne rezultaty realizacji zadań**

- Uzyskano nowe źródła zmienności pod względem zawartości tebainy i innych alkaloidów; materiały te zostaną wykorzystane do dalszych badań i prac hodowlanych w ramach badań statutowych.
- Opracowano agrotechnikę maku uwzględniającą zastosowanie herbicydów w procesie uprawy, co zmniejszy pracochłonność, a także koszt uprawy maku.
- Stwierdzono, że wprowadzenie herbicydów do technologii uprawy maku oraz przywrócenie do uprawy stabilniej i wyżej plonujących odmian wysokomorfinowych jest obecnie niezbędnym warunkiem, który musi być spełniony dla zwiększenia powierzchni uprawy maku w naszym kraju, co wymaga podjęcia prac legislacyjnych.
- Zbadano proces akumulacji morfiny w makowinach odmian wysoko- i niskomorfinowych, co przyczyniło się do efektywniejszej współpracy z policją i sądami.
- Opublikowano 7 prac i zaprezentowano 4 postery.



