

GALA PĀRSKATS



SIA «Bulduru Dārzkopības vidusskola», APP «Dārzkopības Institūts»,
Latvijas Universitāte, SIA "L.Ē.V." /Ekstraktu rūpnīca/, SIA
"Berrypark", Z/S "Cukuriņi", Z/S "Kurmīši", Jānis Jansons

**«BIOTEHNOLOĢIJU KOMPETENCES ATTĪSTĪBA AUGSTVĒRTĪGU
DĀRZKOPĪBAS PRODUKTU IEGUVEI»**

19-00-A01612-000006

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS
Eiropas Lauksaimniecības fonds
lauku attīstībai

Atbalsta Zemkopības ministrija un Lauku atbalsta dienests

Bulduri, 2023. gada jūnijs

Informācijas sagatavotājs

Dārzkopības Institūts: Daliņa Segliņa, Līga Lepse, Gunārs Lācis,
Neda Zuļģe, Inga Moročko–Bičevska

Bulduru Dārzkopības vidusskola: Līva Purmale, Anna Korica

Latvijas Universitāte: Signe Tomsone, Madara Lazdāne

Botāniskā dārza draugu biedrība: Lauma Ķeire, Dāvis Sparinskis

Projekta koordinators un tā kontaktinformācija

Līva Purmale

Bulduru Dārzkopības vidusskola

E-pasts: лива.pурmale@bulduri.lv

Adrese: Bulduru Biotehnoloģiju centrs,
Bulduru Dārzkopības vidusskola,
Viestura iela 6, Jūrmala

Sadarbības partneri un to kontaktinformācija

Dalija Segliņa
APP "Dārzkopības institūts"
E-pasts: dalija.seglina@llu.lv
Adrese: Graudu iela 1, Ceriņi, Krimūnu pag., Dobeles novads

Natalja Mažarova
SIA "L.Ē.V" (Ekstraktu rūpnīca)
E-pasts: natalja@lev-extracts.com
Adrese: Ekstraktu rūpnīca, Glūdas pagasts, Jelgavas novads

Signe Tomsone
Latvijas Universitāte
E-pasts: signe.tomsone@lu.lv
Adrese: Raiņa bulvāris 19, Rīga

Ivars Geiba
"Kurmīši"
E-pasts: kurmisi@inbox.lv
Adrese: "Kurmīši", Ūdrīšu pagasts, Krāslavas novads

Ivs Valdzers
"Cukuriņi"
E-pasts: ivs@valdzers.lv
Adrese: "Cukuriņi", Miegūze, Laidzes pag., Talsu novads

Andis Dauga
SIA Berrypark
E-pasts: ravas@inbox.lv
Adrese: Krišjāņa Barona 19, Sabile, Talsu novads

Dāvis Sparinskis
Botāniskā dārza draugu biedrība
E-pasts: lubddb@gmail.com
Adrese: "Lazdiņas", Stopiņu pagasts, Ropažu novads

Jānis Jansons
E-pasts: wilsons73@inbox.lv
Adrese: Dārza iela 52, Krimuldas novads

Projekta īstenošanas periods

No 01.07.2019 līdz 30.06.2023

Kopējās projekta izmaksas

EUR 485710.34

Darbības un projekta kopsavilkums

Projekta mērķis

Projekta mērķis: ieviest tehnoloģijas augstvērtīgu herbālo produktu ieguvei šādām Latvijā perspektīvu augļaugu kultūrām (smiltsērķšķiem, avenēm, kazenēm, krūmcidonijām), ārstniecības augam (Saflora leizejai) un ziediem (kallām), rast risinājumus veselīga stādu materiāla ieguvei, kas perspektīvā izmantojami komercaudzēšanā, un, sadarbojoties dārzkopības nozarei, zinātnes un izglītības iestādēm, attīstīt biotehnoloģiju kompetences.

Projektā paredzēts:

1) izstrādāt tehnoloģijas augļu, ogu, to audzēšanas un pārstrādes blakusproduktu paplašinātai izmantošanai, nosakot: bioloģiski aktīvu vielu (BAV) savienojumus ar konservējošām, antioksidantu īpašībām un dabīgos pigmentus izejvielās; Latvijā audzētas leizejas BAV saturu auga daļās; izstrādāt ekstraktus, sagatavot produktu tehniskos noteikumus;

2) smiltsērķšķiem izstrādāt metodikas perspektīvu šķirņu pavairošanai *in vitro*; avenēm pielāgot esošos *in vitro* pavairošanas protokolus perspektīviem genotipiem, noteikt vīrusus, veikt vietējo šķirņu atveseļošanu *in vitro*; kallām identificēt vīrusus, veikt izmēģinājumus pavairošanai *in vitro*; izpētīt Saflora leizejas *in vitro* pavairošanas iespējas; veikt krūmcidoniju materiāla ģenētisko izpēti viendabīga stādmateriāla un jaunu izejvielu iegūšanai, kas nākotnē var kalpot kā materiāli tehniskā bāze dārzkopības speciālistu apmācībai un paplašināt zināšanu bāzi dārzkopības zinātnē un biotehnoloģijās. Projektā izstrādātās metodes un tehnoloģijas tieši vērstas uz nozares konkurētspējas paaugstināšanu, kompetences pārnei starp partneriem, perspektīvā radot iespēju produktu eksportam.

Saturs

1. aktivitāte.....	6
R.1.1 Bulduru augu biotehnoloģijas laboratorijas izveide audzēkņu apmācībai	6
R 1.2. Iegūta smiltsērķšķu <i>in vitro</i> pavairošanas sākumposma tehnoloģisko komponentu efektivitātes datu kopa.....	7
R 1.3 Izveidota atveseļota aveņu šķirņu kolekcija	11
R 1.6. Iegūta kallu <i>in vitro</i> pavairošanas sākumposmu tehnoloģisko komponentu efektivitātes datu kopa.....	51
R 1.7 Iegūta datu kopa par vīrusu spektru vietējā kallu ģenētiskajā materiālā	56
R1.8. Izstrādāts leizejas <i>in vitro</i> pavairošanas sākumposmu tehnoloģiskais koncepts	60
2. aktivitāte.....	69
R2.1. Iegūta datu kopa par smiltsērķšķu, aveņu, kazeņu (<i>Rubus</i> ģints), leizejas, krūmcidoniju izejvielu, t.sk. blakusproduktu (lapu, dzinumumu, augļu serdes) ķīmisko sastāvu.	69
R2.2. Izstrādāti trīs ekstrakti (ar konservantu/antioksidantu īpašībām) lietošanai kosmētikas ražošanā, veikta testēšana, sagatavoti ražošanas procesa apraksti un produktu tehniskie noteikumi.....	80
R2.3. Sagatavota smiltsērķšķu eļļas ražošanas tehniskie noteikumi (individuālai izejvielai veikta kvalitātes standartizācija trīs gadu periodā).	120
R2.4. Sagatavots dzintarskābes izdalīšanas procesa apraksts (TRL3).	135
R2.5. Noteikti leizejas lapu pulvera kvalitatīvie rādītāji sagatavošanas un uzglabāšanas laikā, aprakstīts ražošanas process (TRL4).	148
3. aktivitāte.....	160
R3.1. Sagatavoti un publicēti 4 populārzinātniskie raksti par projekta tēmām.....	160
R3.2. Noorganizēts gala seminārs nozarei par projekta rezultātiem	161
R3.3. Noorganizēti 3 semināri Lauku dienās Dobelē.....	162
R3.4. Sagatavoti ziņojumi par projekta rezultātiem ikgadējā Bulduru konferencē (6 gab.)	163

1. aktivitāte

R.1.1 Bulduru augu biotehnoloģijas laboratorijas izveide audzēkņu apmācībai

Bulduru Dārzkopības vidusskolā izveidota laboratorija. Laboratoriju izmanto kā materiāli tehnisko bāzi Bulduru tehnikuma Dārzkopības tehniķu 3. kursa modulim “Augu augu kultūru metožu pielietošana”. Ar laboratorijas darbību un augu audu kultūru metodēm iepazīstina arī jauniešus no citām programmām (nepilna laika klātie, pavāri, floristi, Erasmus+ apmaiņu programmās esošie jaunieši).



1.1.1. attēls. Jaunieši no Erasmus+ programmas iepazīstas ar kallu mikropavairošanu

R 1.2. Iegūta smiltsērķšķu *in vitro* pavairošanas sākumposma tehnoloģisko komponentu efektivitātes datu kopa

Ievads

Latvijā smiltsērķšķus audzē aptuveni 1000 ha platībā un katru gadu tās pieaug, vidējā raža ir 3-4 t/ha. Pēdējos gados ievērojami audzis slimību postīgums, palielinoties smiltsērķšķu stādījumu platībām un kultivēšanas ilgumam. Audzētājiem, iepērkot stādu materiālu, jābūt drošiem, ka viņi savā saimniecībā neievedīs zaru un stumbra vēžu izraisītājus, sakņu slimības un bakteriozes, kas var radīt stādījumu bojāeju un ievērojami samazināt ražu. Atveseļotu stādu izmantošana samazinās infekciju fonu veidošanos un uzkrāšanos, ilgtermiņā sekmējot veselīgu stādījumu veidošanos, kas rada priekšnoteikumu ekonomiski izdevīgas un kvalitatīvas ražas ieguvei. Viens no teorētiski iespējamiem veidiem, kā iegūt atveseļotu augu materiālu, ir to mikroklonālā pavairošana *in vitro* (George, E.F. 2008).

Pasaulē ar dažādiem panākumiem ir veikti pētījumi smiltsērķšķu *in vitro* pavairošanas tehnoloģijas izstrādei. Ir atrodams nedaudz publikāciju par to pavairošanu *in vitro*, kas liecina par zemu veiksmes procentu (Sriskandarajah S., Lundquist P. O. 2009). Šobrīd praktiski neesošo smiltsērķšķu *in vitro* pavairošanas tehnoloģisko risinājumu apstiprina arī Šreiders Kanādas “Agri-Food” izdevumā (Schroeder, W.R. 2017). Par to liecina fakts, ka joprojām produktīvi proliferācijas un rizoģenēzes etapu tehnoloģiskie risinājumi nav izstrādāti un pieejami, kā rezultātā smiltsērķšķi komerciāli *in vitro* netiek pavairoti. Viens no projekta izaicinājumiem bija atrast efektīvu smiltsērķšķu mikroklonālās pavairošanas tehnoloģisko risinājumu.

Materiāli un metodes

Projekta gaitā testēti dažādi barotņu sastāvi smiltsērķšķu iniciācijai *in vitro*. Veikti 13 iniciācijas barotņu (1.2.1. tabula) salīdzinājumi piecos eksplantu ievadīšanas periodos šādām šķirnēm: ‘Mary’, ‘Prozračnaja’ un ‘Tatjana’.

1.2.1. tabula. Smiltsērķšķu iniciācijas barotņu sastāvs

Komponents, mg l ⁻¹	Iniciācijas barotne												
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
NH ₄ SO ₄	0,0	0,0	0,0	0,0	134,0	0,0	134,0	0,0	134,0	134,0	134,0	0,0	0,0
NH ₄ NO ₃	825,0	495,0	0,0	1485,0	0,0	1650,0	0,0	28,0	0,0	0,0	0,0	1650,0	0,0
KNO ₃	950,0	570,0	741,0	1852,5	0,0	1900,0	0,0	28,0	0,0	0,0	0,0	1900,0	0,0
H ₃ BO ₃	3,1	3,1	3,1	6,2	3,1	6,2	3,1	28,0	6,2	3,1	3,1	6,2	3,1
KH ₂ PO ₄	85,0	170,0	170,0	340,0	85,0	170,0	85,0	28,0	170,0	85,0	85,0	170,3	85,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,1	0,3	0,3	0,5	0,1	0,3	0,1	28,0	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1
CaCl ₂	220,1	220,1	220,1	440,2	220,1	440,2	220,1	28,0	440,2	220,1	132,1	440,9	0,0
CoCl ₂	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
KI	0,4	0,4	0,4	0,8	0,4	0,8	0,4	28,0	0,8	0,4	0,2	0,8	0,0
CuSO ₄ ·6H ₂ O	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ZnSO ₄ ·H ₂ O	4,3	4,3	4,3	8,6	4,3	8,6	4,3	28,0	8,6	4,3	8,6	8,6	0,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185,0	185,0	185,0	370,0	185,0	370,0	185,0	28,0	370,0	185,0	370,0	370,6	0,0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	11,2	11,2	11,2	22,3	11,2	22,3	11,2	28,0	22,3	11,2	22,3	22,3	0,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	22,2	22,2	22,2	27,8	22,2	30,6	22,2	30,6	30,6	22,2	27,8	27,8	0,0
Na ₂ EDTA	29,8	29,8	29,8	37,3	29,8	41,0	29,8	41,0	41,0	29,8	37,3	37,3	0,0
smiltsērķšķu lapu tēja													1 L
myo-Inositols	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Nicotene Acid	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5	0,5	2,5	2,5
Pyridoxine HCl	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5	0,5	2,5	2,5
Thiamine HCl	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5
askorbīnskābe	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5			2,5	2,5
6-BAP				0,4	2,0	1,0	1,0	0,5	0,5		0,5	0,2	
IES	0,1	0,1	0,1							0,8	0,1		
ISS						0,1		0,1	0,1				
giberilīns				1,0	0,4		0,4						
2-iP	0,1	0,1	0,1										
glicīns				2,0								2,0	
saharoze	20,0	20,0	20,0	20,0	12,0	8,0	12,0	8,0	8,0	8,0	30,0	30,0	20,0
agars	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,5	6,0
pH	5,5- 5,7	5,5- 5,7	5,5- 5,7	5,5- 5,7	5,5- 5,8	5,5- 5,9	5,7	5,7	5,7	5,7	5,5- 5,7	5,6- 5,8	6,0

Smiltsērķšķu šķirnes kultūrā ievadītas dažādos veģetācijas perioda posmos, lai pārbaudītu eksplantu dzīvotspēju pie dažādu endogēno augu hormonu īpatsvara augā: februārī – martā (miera stadijas beigas, eksplanti ņemti no Pūres dārzkopības izmēģinājumu stacijas kolekcijas stādījuma), aprīlī – maijā (tikko sākas veģetācija, pumpuri tikko sāk vērties vaļā, eksplanti ņemti no Pūres kolekcijas stādījuma), jūnijā (izveidojušies attiecīgi 3-5 un 10-15 cm gari jaunie dzinumi, eksplanti ņemti no Pūres kolekcijas stādījuma), jūlijā (dzinumi jau nobrieduši, augu endogēno hormonu sastāvs atšķirīgs, salīdzinot ar veģetācijas sākumu).

No katra genotipa katrā barotnes variantā ievadīti 15 eksplanti, katrs 0.5 mm izmērā. Eksplanti iegūti no apikāliem vai aksilāriem pumpuriem veģetācijas perioda sākumā (martā – aprīlī). Pumpurus sterilizē un sagatavo manipulācijām sterilā vidē, izmantojot 70% spirta šķīdumu un 7% nātrija hipohlorīda šķīdumu. Pēc dezinfekcijas pumpuri skaloti destilētā ūdenī.

Audu kultūru turpmākā audzēšana un mikroaugu pavairošana veikta sekojoši:

- pēc nogriešanas meristemātisko audu eksplanti audzēti uz iniciācijas barotnes 5-6 nedēļas 25 ml tilpuma stikla mēģenēs, slēgtās ar alumīnija foliju. Audzēšanas telpā nodrošināta optimāla gaisa temperatūra, t.i., $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Gaisma nodrošināta 16 stundas, tumsa 8 stundas. Gan temperatūra, gan gaismas/tumsas periods tiek automātiski regulēti. Gaismas avots atšķirībā no iepriekšējiem gadiem nomainīts uz Philips LED lampām DR/B 159 MB, nodrošinot $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$;
- pēc 5-6 nedēļām dzīvie eksplanti ar zaļām lapiņām tiek uzskaitīti un pārstādīti uz proliferācijas barotnes 40 ml stikla mēģenēs, slēgtās ar alumīnija foliju.

Rezultāti

Diemžēl visu pārbaudīto variantu iniciācijas barotnes nedeva cerētos rezultātus – kultūrā sekmīgi ievadīto augu īpatsvars bija zem 10 procentiem. Šie augi auga un attīstījās lēni un veidoja vārgu, vāji attīstītu mikroaugu (1.2.2. attēls).



1.2.2. attēls. Smiltsērķšķu augs pirmajā proliferācijas pasāžā.

Nākamajā proliferācijas pasāžā tie arī gāja bojā, pārstājot augt un kļūstot nekrotiski.

Secinājumi

Smiltsērķšķu pavairošana *in vitro* jau rakstot projektu, tika uzskatīta par lielu izaicinājumu, jo līdz šim pasaulē nav atrastas sekmīgas to pavairošanas *in vitro* metodes. Ir dažas fragmentāras publikācijas, bet kopumā kā par tehnoloģiju informācija nav pieejama. Projekta gaitā neizdevās atrast piemērotu smiltsērķšķu mikroklonālās pavairošanas tehnoloģisko risinājumu. Tas liecina par kādu vēl neatklātu blakus faktoru, kas ietekmē augu augšanu *in vitro*. Ieteiktu turpināt darbu pie šī jautājuma risināšanas nākamajos projektos.

Literatūra

- George, E.F. 2008. Plant tissue culture procedure – background. p.1-28. In: E.F.George, M.A.Hall and G.J.De Klerk (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd edition, Vol.1, The Background. Springer, The Netherlands.
- Sriskandarajah S., Lundquist P. O. 2009. High frequency shoot organogenesis and somatic embryogenesis in juvenile and adult tissues of seabuckthorn(*Hippophae rhamnoides* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult, Published on line, 19 September 2009
- Schroeder, W.R. 2017. Seabuckthorn Propagation. Agriculture and Agri-Food Canada, Indian Head, Saskatchewan, Canada.

R 1.3 Izveidota atveseļota aveņu šķirņu kolekcija

Ievads

Avenes ir viena no nozīmīgākajām krūmogulāju sugām, ko komerciāli audzē Latvijā. Bieži stādāmais materiāls tiek ievests no ārvalstīm, bet arī Latvijā kokaudzētavas nodrošina stādāmo materiālu. Lai stādāmais materiāls būtu kvalitatīvs un atbilstu fitosanitārajām prasībām, ir nepieciešams ierīkot vīrusbrīvus mātesaugu stādījumus. Avenēm nozīmīgus bojājumus rada aveņu pundurainības vīruss (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV). RBDV augstais izplatības un diversifikācijas risks ir saistīts ar tā efektīvo transmisiju ar sēklām un ziedputekšņiem. Saistībā ar saimniekauga rezistences gēniem RBDV izdala trīs celmus: S (Skotu), RB (rezistenci pārvarošs) un B (kazeņu). Neskatoties uz vīrusa un tā saimniekaugu plašo izplatību un ekonomisko nozīmi, RBDV celmu sastopamība un ģenētiskā daudzveidība daudzās valstīs, tai skaitā Latvijā, nav zināma, kas varētu ietekmēt aveņu atveseļošanas efektivitāti *in vitro* pavairošanas un citu metožu pielietošanas laikā. Sākotnēji uzskatīja, ka RBDV izraisa šo saslimšanu, bet tagad ir noskaidrots, ka ir iesaistīts vīrusu komplekss, kurā RBDV ir kopā ar vairākiem citiem vīrusiem, kurus pārnes laputis – *Raspberry leaf mottle virus* (RLMV), *Rubus yellow net virus* (RYNV) un *Raspberry latent virus* (RpLV), un kuru iespējamās kompleksās infekcijas arī varētu ietekmēt aveņu atveseļošanas efektivitāti.

Daļai aveņu šķirņu ir problēma iegūt veselīgu stādāmo materiālu – nepieciešami genotipu specifiski *in vitro* pavairošanas protokoli un efektīva RBDV eliminācijas metode. Pasaulē aveņu atveseļošanas no RBDV efektivitāte nepārsniedz 48.6 % (Mathew et.al., 2021). Līdz šim izmēģinātie RBDV eliminācijas paņēmieni nav snieguši lielāku efektivitāti. Projektā testēta ozonēšanu metode RBDV eliminācijai, kā arī adaptēti *in vitro* pavairošanas protokoli vietējās selekcijas genotipiem.

Ozons kā dezinfekcijas līdzeklis tiek pielietots jau sen. Dezinfekcijas nolūkos to lieto spēcīgās antioksidatīvās iedarbības dēļ. Ozona ietekmē tiek sarautas oglekļa – slāpekļa saites dzīvo organismu šūnās.

Mūsdienās ozonu antibakteriālās un antivirālās ietekmes dēļ kā dezinfekcijas līdzekli galvenokārt lieto dzeramā ūdens dezinfekcijai (Hall and Sobsey, 1993), notekūdeņu smakas noņemšanai, virsmu dezinfekcijai pārtikas ražošanā un medicīnā, audumu rūpniecībā. Ir pierādīts, ka ozons ir līdzvērtīgs vai efektīvāks par hlorīdiem vīrusu un baktēriju iznīcināšanā (Khade et.al., 2011).

Zinātniskajā literatūrā ir minēts par ozona antivirālo iedarbību. Ozonu pielietojot 0.1–15.9 mg/mL koncentrācijā, panākta būtiska vīrusu daudzuma samazināšanās paraugos, lai gan ir minēts arī, ka ozons uz baktērijām iedarbojas destruktīvāk nekā uz vīrusiem. Līdz ar to ozons tiek uzskatīts par vienu no efektīvākajiem mazāk destruktīvajiem dezinfektantiem pārtikas rūpniecībā (Khade et.al., 2001; Chawla, 2006). Līdz šim nav atrastas zinātniskas publikācijas par ozonēšanas metodes pielietojumu vīrusu eliminācijā *in vitro* augiem.

Tā kā Latvijā ir izveidoti vairāki perspektīvi hibrīdi un šķirnes, tad to atveseļošana ir nozīmīgs solis kvalitatīva stādmateriāla ieguvei. Līdztekus Latvijas selekcijas materiālam nodrošinājums ar vairāku ārvalstu šķirņu kvalitatīvu stādmateriālu ir nozīmīgs Latvijas komercaudzētājiem. Izstrādājot tehnoloģiju augu atveseļošanai no RBDV, būtu iespējams to turpmāk izmantot

rutīni, kvalitatīvu stādu ieguvei. Atveseļotu mātesaugu stādījuma ierīkošana ir viens no šī projekta mērķiem un kvalitatīva stādmateriāla nodrošinājuma posmiem.

Materiāli un metodes

Šķirnes un genotipi aveņu pavairošanai *in vitro* izvēlēti pēc konsultācijas ar S.Strautiņu, kas norādīja perspektīvos genotipus iekļaušanai atveseļotu mātesaugu kolekcijā. Pētījumā iekļauti sekojoši genotipi:

2.r. 1-12-13/1

3.r. 1-12-13/2

3.r. 2-6-8/1

3.r. 2-6-8/2

4.r. 1-12-13/1

4.r. 11-25a-4/1

4.r.11-25a-4/2

P6-R3/1

B6-R9/1

‘Dita’/1

‘Dita’/2

‘Ina’/1

‘Ina’/2

‘Viktorija’ /1

‘Arbat’

‘Kaspriz Bogov’

‘Polana’

Pavairošanas protokoli

Iniciācijas posms. No katra genotipa testējamajā barotnes variantā ievadīti 15 eksplanti, 0.5 mm izmērā. Eksplanti iegūti no apikāliem vai aksilāriem pumpuriem veģetācijas perioda sākumā (martā – aprīlī). Pumpuri sterilizēti un sagatavoti manipulācijām sterilā vidē, izmantojot 70% spirta šķīdumu un 7% nātrija hipohlorīda šķīdumu. Pēc dezinfekcijas pumpuri

skaloti destilētā ūdenī. Audu kultūru turpmākā audzēšana un mikroaugu pavairošana veikta sekojoši:

- pēc nogriešanas meristemātisko audu eksplanti audzēti uz iniciācijas barotnes 5-6 nedēļas 25 ml tilpuma stikla mēģenēs, slēgtās ar alumīnija foliju. Audzēšanas telpā nodrošināta optimāla gaisa temperatūra, t.i., $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Gaisma nodrošināta 16 stundas, tumsa 8 stundas. Gan temperatūra, gan gaismas/tumsas periods tiek automātiski regulēti. Gaismas avots Philips LED lampas DR/B 159 MB, nodrošinot $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$;
- pēc 5-6 nedēļām dzīvie eksplanti ar zaļām lapiņām pārstādīti uz proliferācijas barotnes 40 ml stikla mēģenēs, slēgtās ar alumīnija foliju.

Proliferācijas posms. Turpmāk ik pēc 5-6 nedēļām, atkarībā no augu attīstības tempa, veikta sacerojušo (proliferējušo) mikroaugu (1.3.1. attēls) dalīšana un pārstādīšana jaunā barotnē (jauna pasāža) un ievietoti barotnē, kas iepildīta 25 ml mēģenē.



1.3.1. Attēls. Avenų šķirnes ‘Dita’ mikroaugu proliferācijas barotnē.

Katrā pasāžā veikta dzīvo eksplantu/mikroaugu uzskaitē un izteikta procentuāli no ievadīto augu skaita.

Proliferācijas 3.–4. pasāžā **noteikta RBDV klātbūtne mikroaugos** un inficētajiem augiem veikta apstrāde ar ozonu. Pēc ozonēšanas posma atkārtoti noteikta **RBDV klātbūtne** mikroaugos, lai noteiktu ozonēšanas efektivitāti.

Ozonēšana.

Mikroaugu ozonēšana veikta, ievadot mēģenē ozonu, kas ģenerēts ar iekārtu L-1000 Incorporate Ozonizer (“O TRĪS”). Ozons ievadīts trīs dažādos režīmos: 2 minūtes, 3 minūtes un 4 minūtes (1.3.2. attēls).



1.3.2. attēls. Avenu mikroauga ozonācijas process.

Pēc ozonēšanas mikroaugs atkrāsojas un izskatās nekrotisks (1.3.3. attēls).



1.3.3. attēls. **Ozonēts augs.**

Tas novietots audzēšanas telpā. Kad izveidojies jauns, vitāls dzinuma galiņš 0,5–1 cm garumā (aptuveni pēc 2-3 nedēļām), no šī mikroauga griezti meristemātiskie audi, ievadīti kultūrā un audzēti pēc iepriekš aprakstītās metodikas. Nākamajā pasāžā, kad mikroaugi izveidojuši pietiekamu biomasu, tiem veikta RBDV analīze.

Apsakņošana (rizoģenēze). Veselie augi pārvietoti rizoģenēzes barotnē un apsakņoti, iegūstot atveseļotus, apsakaņotus mikroaugus, kuru tālākā audzēšana notika slēgtās, kukaiņu drošās siltumnīcās līdz stādi sasniedza piemērotu izmēru stādīšanai laukā.

RNS/DNS ekstrakcija vīrusu noteikšanai

Ievāktos aveņu lapu paraugus, izmantojot miezeri un piestu, šķidrajā slāpeklī saberza smalkā pulverī, kuru tālāk izmantoja kopējās genomiskās RNS/DNS ekstrakcijai ar komerciāli pieejamu Genomic DNA Purification Kit izdalīšanas komplektu (Thermo Fisher Scientific, Lietuva). Nukleīnskābju izdalīšana veikta, vadoties pēc ražotāja ieteikumiem, veicot nelielas izmaiņas izdalīšanas protokolā. Aptuveni 100 mg sasmalcināta lapu parauga suspendēja 200 µl TE buferšķīdumā, kas sajaukts ar 0.8 µl 99% 2-merkaptotanolu (Roth, Vācija). Pirmo centrifugēšanas soli veica pie maksimālā ātruma (~14000 apgr./min) 5 min. Nukleīnskābju izgulsnēšanu veica ar ledusaukstu 96% etanolu un atstāja uz nakti -20 °C temperatūrā (nevis 10 minūtes, kā norādīts ražotāja protokolā). Izdalītās RNS kvalitāti un kvantitāti novērtēja ar spektrofotometru NanoDropR ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ASV). Izdalīto RNS uzreiz tālāk izmantoja RT-PCR veikšanai vai uzglabāja -80 °C temperatūrā.

Vīrusu diagnostika

Kā RBDV, BRNV, RLMV un RpLV diagnostikas metodi izmantoja reversās transkripcijas metodi (RT-PCR) ar One-Step RT-PCR reaģentu komplektu (Qiagen, Vācija) pēc ražotāja izstrādātā protokola. RYNV noteikšanai augos pielietoja PCR ar DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Vīrusu diagnostikas metodes validācijai izmantoja iepriekš publicētas oligonukleotīdu sekvences (1.3.1. tabula). Kā pozitīvo kontroli testa veikšanai izmantoja pozitīvos paraugus. Kā iekšējo kontroles testu, lai novērstu RT-PCR viltus negatīvu rezultātu, kas radies nukleīnskābju degradācijas vai PCR inhibitoru klātbūtnes dēļ, RT-PCR tika iekļauti arī auga Nad5 gēnu amplificējošie oligonukleotīdi. RNāzes nesaturošu ūdeni pielietoja reakcijas kvalitātes kontrolei. Visus RT-PCR soļus veica Eppendorf Mastercycler termociklerā (Eppendorf AG). RT-PCR galaproduktus noteica elektroforēzē 2% agarozes gēlā, TAE buferī, krāsojot ar etīdija bromīdu un vizualizējot UV gaismā. RT-PCR produktu garumu noteica, salīdzinot ar O'RangeRuler 100bp DNS garuma fragmenta marķieri (Thermo Fisher Scientific, Lietuva).

1.3.1.tabula. Avenu vīrusu diagnostikas metožu izstrādē izmantotie oligonukleotīdi.

Nosakāmais organisms	Oligonukleotīdu sekvences	Garums bp	Tm°C	Literatūras atsauce
BRNV	F- 5' ATG CTG AGC CAC TTG TGA 3' R- 5'CAA TGT CTT GGA AGC CAC 3'	417 bp	48	Halgren et al., 2007
	1320F- 5' GGAAACAAACCATGTCACTC 3' 1496R- 5' TAATTGAACGATTCCCCTTT 3'	179bp	49.7/45.6	Susi et al., 2018
RBDV	F- 5' TCA TTG TTG AAT TAA TAC TAA GTA TTT AAG 3' R- 5' CCC ACT AGC AGG CAA ATA GTC 3'	886 bp	50.7/54.4	Wang et al., 2008
RLMV	F- 5' GTA AGG AGA TAT GGC GGA 3' R- 5' CAG TAT GGC AGC CTC TTG 3'	514 bp	48/50.3	Tzanetakis et al., 2007
	CPhF-5' CGA AAC TTY TAC GGG GAA C 3' CPhR-5' CCT TTG AAY TCT TTA ACA TCG T 3'	452 bp	51.1/49.2	
RYNV	F- 5' TCC AAA ACC TCC CAG ACC TAA AAC 3' R- 5' ATA ATC GCA AAA GGC AAG CCAC 3'	350 bp	55.7/53	Jones et al., 2002
	6052F- 5' TCT TCC ARA GRA AGA TGG ACC 3' 6894R- 5' CCY TTK ATR TGT TCG AAC TTC 3'	842 bp	54.4/52.4	Rajamaki et al., 2019
RpLV	S8F- 5' CAC CGC CCA ACC ACA ACT 3' S8R- 5' CCT CGT GCT CGC TCT CCT TCA TA 3'	547bp	52.6/58.8	Quito-Avila et al., 2011
	F-5' CCACGCCCAACCTCCAAATA 3' R-5' ACCCGTCTCCCCATCTGC 3'	464 bp	53.8/57.6	
Auga Nad5	Nad5F- 5' GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT 3' Nad5R- 5' CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA 3'	181bp	55.3/55.7	Menzel et al., 2002

Sekvencēšana un sekvenču analīze

RT-PCR produktus attīrīja, izmantojot reaģentu komplektu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Vācija), un sekvencēja abos virzienos, izmantojot tos pašus RT-PCR diagnostikas oligonukleotīdus (Wang et al., 2008), un kā sekvences iekšējos oligonukleotīdus izmantoja oligonukleotīdus L3 un U2 (Kokko et al., 1996). Sekvencēšanu veica ar 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ASV) automatizēto ģenētisko analizatoru Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā "Silava".

Sekvenču montāžu, kvalitātes pārbaudi un izlīdzinājumus (*alignment*) veica, izmantojot datorprogrammu pakotni LASERGENE 17 (DNASTAR Inc., ASV). Katra izolāta pilna

garuma amplikona sekvenci (*contig*) samontēja no tiešās un reversās sekvences lasījuma un manuāli rediģēja programmā SeqMan Pro 17. Lai nodrošinātu kvalitāti, sekvenču galus noīsināja un pielīdzināja. Lai noteiktu iespējamās atvērtās lasīšanas rāmja (ORF) nobīdes kļūdas (stop kodoni), iegūtās nukleīnskābju sekvences izlīdzinājumus pārtranslēja aminoskābju sekvencēs.

Lai rekonstruētu filoģenētiskās sakarības starp RBDV izolātiem, pielietoja Maximum parsimony analīzi datorprogrammā PAUP (Swofford, 2002) v.4.0a169 (<http://phylosolutions.com/paup-test/>). Izlīdzinājumus pakļāva heuristiskajai (*heuristic*) meklēšanai ar nejaušas pievienošanas secību, 1000 atkārtojumos ar šādiem programmas iestatījumiem: *MultiTrees* opcija nav spēkā, *Steepest descent* metode ir spēkā un veikta koka sadalīšanas atkārtota savienošana (*tree bisection reconnection* (TBR)). Tos pašus iestatījumus izmantoja statistiskā atbalsta (*bootstrap*) analīzēs ar trim nejaušām pievienošanas sekvencēm katrā no 1000 (*bootstrap*) atkārtojumiem.

Rezultāti

Aveņu perspektīvos genotipus, kas būtu jāiekļauj atveseļotu mātesaugu kolekcijā, izvērtēja uz Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) klātbūtni mātes augos pirms pavairošanas *in vitro*. Testēti 13 aveņu genotipu mātes augi (kopā 26 augi). Diviem aveņu genotipiem ('1-12-13' un 'Ina') konstatēja RBDV (1.3.2. tabula).

1.3.2.tabula. Avenu mātesaugu pārbaude uz RBDV pirms pavairošanas *in vitro*.

Šķirne / hibrīds	RBDV
1-12-13, nr.1	-
1-12-13, nr.2	-
2-6-8, nr.1	-
2-6-8, nr.2	-
11-25 a-4, nr.1	-
11-25 a-4, nr.2	-
1-12-13, nr.1	+
1-12-13, nr.2	-
11-25 a-4, nr.1	-
11-25 a-4, nr.2	-
1-12-126, nr.1	-
1-12-126, nr.2	-
2-3-3, nr.1	-
2-3-3, nr.2	-
avene 'Viktorija' nr.1	-
avene 'Viktorija' nr.2	-
avene 'Liina' nr.1	-
avene 'Liina' nr.2	-
avene 'Dita' nr.1	-
avene 'Dita' nr.2	-
avene 'Ina' nr.1	+
avene 'Ina' nr.2	-
B6R9 nr.1	-
B6R9 nr.2	-
P6R3 nr.1	-
P6R3 nr.2	-

Projekta gaitā pielāgota avenu *in vitro* pavairošanas metodika. Augu atveseļošana un RBDV eliminācija, kombinējot mikroklonālo pavairošanu un ozonēšanu, deva apmierinošu rezultātu, lai gan ne visus genotipus izdevās atveseļot.

Ar RT-PCR analizēti 149 avenu meristēmu paraugi. RBDV netika konstatēts piecos no 22 analizētajiem avenu '3 r. 1-12-13/2' genotipa augiem, sešos no 27 analizētajiem '3 r. 2-6-8/2' genotipa augiem un vienam šķirnes 'Arbat' augam. Pārējie analizētie augi bija inficēti ar RBDV (1.3.3.tabula).

1.3.3.tabula. RT-PCR rezultāti aveņu meristēmu augiem pēc ozonēšanas.

Genotips	Paraugu skaits	Ar RBDV inficēto paraugu skaits	Negatīvo paraugu skaits
4.r.1-12-13/1	10	10	0
‘Ina’ /2	26	26	0
‘Ina’ / 1	24	24	0
3 r. 1-12-13/2	22	17	5
3 r. 1-12-13/1	19	19	0
3 r. 2-6-8/1	1	1	0
3 r. 2-6-8/2	27	21	6
‘Arbat’	20	19	1
Kopā	149	137	12

Vairumam genotipu izdevās paņemt eksplantus no vesliem augiem vai eliminēt RBDV mikroklonālās pavairošanas ceļā. Septiņiem genotipiem no visiem kultūrā ievadītajiem konstatēja RBDV infekciju. Tos ozonējot, iegūti atšķirīgi efektivitātes rādītāji (1.3.1.tabula).

1.3.1.tabula. Ozonēšanas efektivitāte pētījumā iekļautajiem aveņu genotipiem.

Genotips	Atveseļoto augu iznākums
Arbat	5%
3 r. 1-12-13/2	22%
3 r. 2-6-8/1	27.3%
4.r.1-12-13/1	0%
3r. 2-6-8/2	0%
‘Ina’ /1	0%
‘Ina’ /2	0%

Atveseļoto aveņu genotipu pārbaude ar RT-PCR un RBDV infekciju. Kopumā analizēti 333 paraugi no 12 aveņu genotipiem pavairotiem *in vitro*. No deviņiem genotipiem visi pārbaudītie augi uzrādīja negatīvu rezultātu uz RBDV klātbūtni. Šķirne ‘Arbat’ visi analizētie paraugi bija pozitīvi uz RBDV, bet genotipiem 3’.2.1-12-13/2’ un ‘3R2-6-8/1’ atsevišķi apvienotie paraugi uzrādīja negatīvu rezultātu.

1.3.4.tabula. *In vitro* pavairoto aveņu genotipu pārbaude ar RT-PCR uz RBDV infekciju.

Genotips	Analizēto paraugu skaits	Negatīvo paraugu skaits
‘Dita’	12	12
‘Kapriz Bogov’	43	43
4r. – 11 – 25A – 4/2	26	26
B6R9/1	52	52
‘Viktorija’	21	21
P6 – R3/1	19	19
‘Polana’	74	74
4r.11 – 25A – 4/1	22	22
‘Arbat’	13(39)*	0
2.1-12-13/2	15(45)*	1
3.2.1-12-13/2	17(52)*	6
3R2-6-8/1	19(56)*	10
Kopā	333	286

*apvienotie paraugi (1 paraugs/3 augi)

Tomēr, kombinējot ozonēšanu un *in vitro* pavairošanu, iegūti un pavairoti 12 Latvijas selekcijas un ārvalstu genotipi un šķirnes:

‘Dita’

‘Viktorija’

B6 R9 /1

P6-R3/1

2.r. 1-12-13/2

3.r. 2-6-8/1

3. r. 1-12-13/2

4.r. 11-25A-4/1

4.r. 11-25A-4/2

‘Kapriz Bogov’

‘Polana’

‘Arbat’

Atveseļotie augi 2023. gada pavasarī izstādīti laukā, izveidojot atveseļotu mātesaugu stādījumu.

Lai analizētu vīrusa daudzveidību un tās potenciālo ietekmi uz atveseļošanu, veikta RBDV pilna garuma vīrusa apvalka proteīnu kodējošā genoma fragmenta amplifikācija un sekvencēšana 24 izolātiem no dažādiem *Rubus* augu genotipiem. Tālāk darbā analizētas 19 pilna garuma RBDV CP kodējošās sekvenses, kas iegūtas no dažādiem aveņu genotipiem un ievākšanas vietām. Iegūtās RBDV CP gēna (RNS2) sekvenses no aveņu augiem salīdzināja ar RBDV CP sekvencēm no *Rubus* un *Vitis* ģints augiem, kas pieejamas *GenBank* datu bāzē (www.ncbi.nlm.nih.gov). Darbā analizēja RBDV RNS2 genoma reģionu no 1326 līdz 2150 nt (saskaņā ar references sekvenci NC_003740 no *GenBank*). Filoģenētiskā analīze parādīja RBDV sekvenču izolātu grupēšanos pēc to saimniekaugiem. Sekvenses DQ120126 (*Rubus multibracteatus*) un RBDV izolāti no vīnogām (EU796085, EU796085, EU796086, EU796087, EU796090, JQ928628 un JQ928629) veidoja atsevišķas filoģenētiskās līnijas ar lielu statistisko atbalstu (100 un 56). Visi aveņu izolāti veido kopīgu klāsteri, kas dalīts vairākos apakšklāstros ar augstu statistisko atbalstu, kas norāda uz atšķirīgu izolātu izcelsmi (Āzija, Austrumeiropa un Rietumeiropa). Tā kā RBDV galvenokārt izplatās ar inficētiem ziedputekšņiem, daudzi šajā pētījumā iegūtie izolāti uzrādīju augstu sekvenču identitāti un veidoja kopīgas filoģenētiskās grupas. Analizējot šo RBDV genoma daļu, netika atrastas sakarības ar vīrusa eliminācijas datiem no dažādiem aveņu genotipiem.

Tāpēc, ņemot vērā jaunākos pētījumus pasualē, pievērsta uzmanība arī citiem vīrusiem, kuri ir iesaistīti aveņu drupeno ogu un pundurainības izraisīšanā un sastopami kompleksās infekcijās ar RBDV. Projekta laikā veikta diagnostikas metožu izstrāde un adaptācija. Lai optimizētu BRNV, RLMV, RYNV un RpLV diagnostiku ar RT-PCR, sākotnēji atlasīta paraugkopa ar vīrusu infekcijas pazīmēm, kā lapu dzeltēšana, plankumainība, drupenās ogas (1.3.2. attēls).

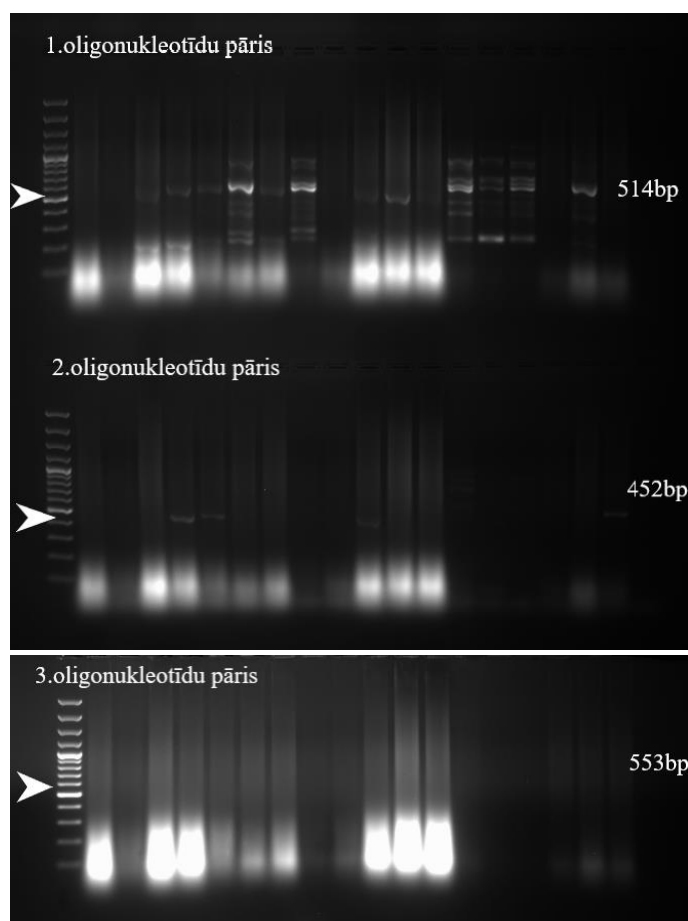


1.3.2. attēls. *Rubus idaeus* 'Ottawa'.

Atlasītie paraugi testēti ar trīs praimeru pāriem, salīdzinot iepriekš publicētus oligonukleotīdu pārus no literatūras (1.3.1. tabula) un jaunus, kas atlasīti ar *PrimerSelect* datorprogrammu (Lasergene 17). Sākotnēji piemeklēta optimālā oligonukleotīdu piesaistes temperatūra (T_a), kuru aprēķina piecus grādus zem kušanas temperatūras (T_m) (1.3.1. tabula). Tā kā darbā izmantoja Qiagen OneStep RT-PCR diagnostikas komplektu, ražotājs ir noteicis, ka minimālā T_a jābūt ne zemākai par $+50^{\circ}\text{C}$, tāpēc sākotnējai vīrusu oligonukleotīdu pārbaudei izvēlēta $+50^{\circ}\text{C}$.

RLMV oligonukleotīdu pārbaude

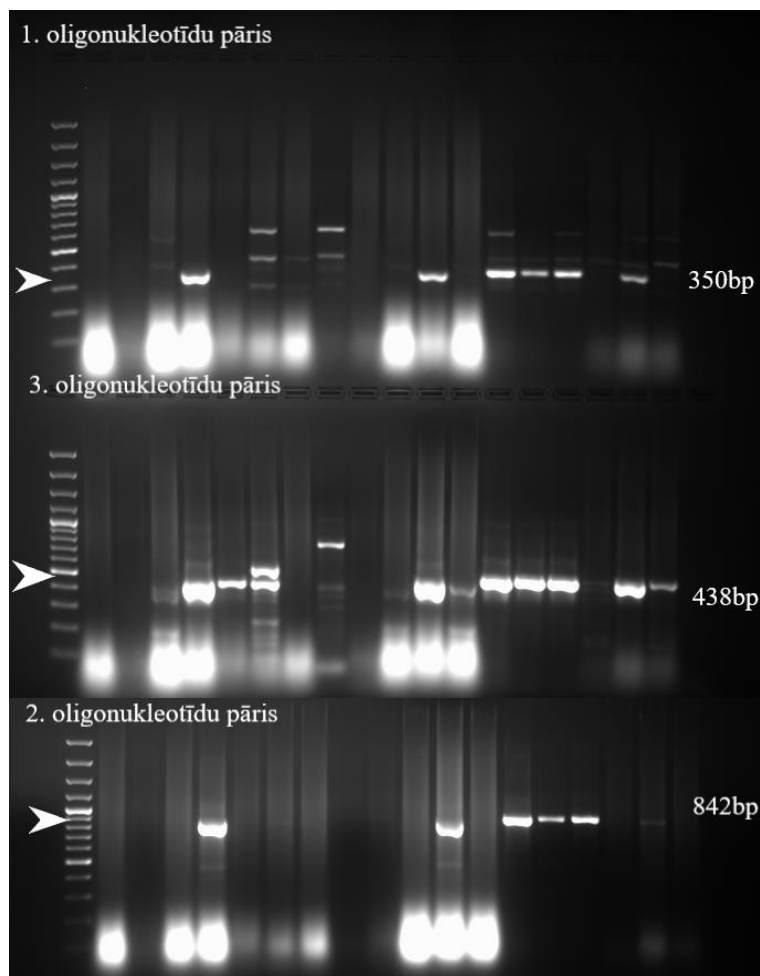
RLMV diagnostikas metodes validācijai veikta trīs oligonukleotīdu pāru pārbaude, izmantojot Qiagen OneStep RT-PCR kit. Pirmais oligonukleotīdu pāris amplificē 514 bp garu fragmentu, otrais pāris 452 bp un trešais pāris amplificē 553 bp garu fragmentu (1.3.3. attēls). Atbilstoša garuma fragmentus agarozes gēlā konstatēja, izmantojot otro oligonukleotīdu pāri. Pirmais oligonukleotīdu pāris deva daudz nespecifiska garuma amplifikācijas produktus, bet ar trešo oligonukleotīdu pāri agarozes gēlā netika konstatēti RT-PCR gala produkti.



1.3.3. attēls. RLMV oligonukleotīdu salīdzinājums, izmantojot Qiagen OneStep RT-PCR komplektu.

RYNV oligonukleotīdu pārbaude

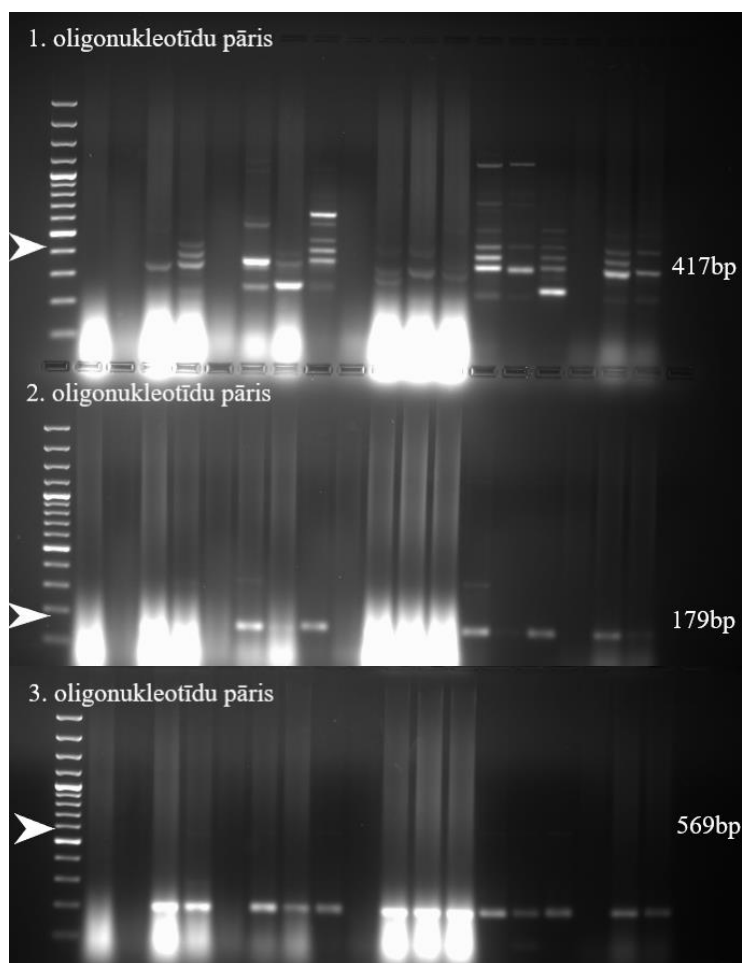
RYNV diagnostikas metodes validācijai veikta trīs oligonukleotīdu pāru pārbaude, izmantojot DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Pirmais oligonukleotīdu pāris amplificē 350 bp garu fragmentu, otrais pāris 842 bp un trešais pāris amplificē 438 bp garu fragmentu (1.3.4. attēls). Atbilstoša garuma fragmentus agarozes gēlā konstatēja visiem trīs oligonukleotīdu pāru variantiem. Pirmais un trešais oligonukleotīdu pāris deva daudz nespecifiska garuma amplifikācijas produktus, bet ar otro oligonukleotīdu pāri agarozes gēlā konstatēja atbilstoša garuma PCR gala produktus. Otro oligonukleotīdu pāri var izmantot tālākai metodes aprobācijai.



1.3.4. attēls. **RYNV oligonukleotīdu salīdzinājums, izmantojot DreamTaq Green PCR Master Mix.**

BRNV oligonukleotīdu pārbaude

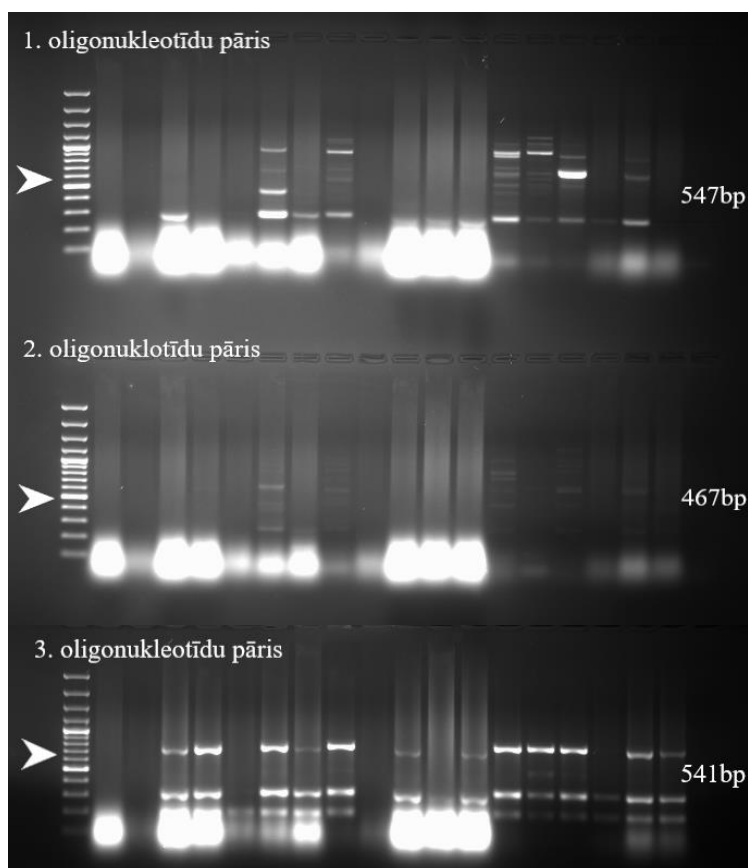
BRNV diagnostikas metodes validācijai veikta trīs oligonukleotīdu pāru pārbaude, izmantojot Qiagen OneStep RT-PCR kit. Pirmais oligonukleotīdu pāris amplificē 417 bp garu fragmentu, otrais pāris 179 bp un trešais pāris amplificē 569 bp garu fragmentu (1.3.5. attēls). Atbilstoša garuma fragmentus agarozes gēlā konstatēja tikai otrajam oligonukleotīdu pāru variantam. Pirmais oligonukleotīdu pāris deva daudz nespecifiska garuma amplifikācijas produktus, savukārt ar trešo oligonukleotīdu pāri agarozes gēlā nekonstatēja atbilstoša garuma PCR gala produktus. Otrā oligonukleotīdu pāri var izmantot tālākai metodes aprobācijai.



1.3.5. attēls. BRNV oligonukleotīdu salīdzinājums, izmantojot Qiagen OneStep RT-PCR komplektu.

RpLV oligonukleotīdu pārbaude

RpLV diagnostikas metodes validācijai veikta trīs oligonukleotīdu pāru pārbaude, izmantojot Qiagen OneStep RT-PCR kit. Pirmais oligonukleotīdu pāris amplificē 547 bp garu fragmentu, otrais pāris 467 bp un trešais pāris amplificē 541 bp garu fragmentu (1.3.6. attēls). Atbilstoša garuma fragmentus agarozes gēlā nekonstatēja nevienam no izmantotajiem oligonukleotīdu pāru variantiem. Visi RT-PCR reakcijā izmantotie oligonukleotīdu pāri deva daudz nespecifiska garuma amplifikācijas produktus.



1.3.6. attēls. RbLV oligonukleotīdu salīdzinājums, izmantojot Qiagen OneStep RT-PCR komplektu.

Secinājumi

Pētījumā izmantotajiem genotipiem atrasta piemērota *in vitro* pavairošanas metodika, kas sniedz pietiekoši augstu proliferācijas iznākumu – 3-5 augi no viena mikroauga katrā pasāžā. Izmēģinātā ozonēšanas metode deva atšķirīgus rezultātus starp genotipiem – ne visiem genotipiem izdevās iegūt pietiekoši augstu atveseļošanas efektivitāti, tomēr 42% genotipu tika atveseļoti.

Izveidots atveseļotu mātesaugu stādījums.

Veicot RBDV CP gēna sekvenču analīzi vīrusa izolātiem no dažādiem avenču genotipiem, secināts, ka RBDV Latvijā avenēs ir ģenētiski daudzveidīgs un sadalās pa dažādiem filoģenētiskajiem klāsteriem, kā arī nav atrodamas sakarības ar vīrusa ģenētisko daudzveidību un atveseļošanas efektivitāti.

Pēc literatūras analīzes datiem secināts, ka atveseļošanas efektivitāti varētu ietekmēt arī citi vīrusi, kas jaunākajos pētījumos atklāti kompleksajās infekcijās kopā ar RBDV un izraisa drupenās ogas un pundurainību. Turpmākajos pētījumos būtu jāiekļauj arī šo vīrusu testēšana mātesaugos pirms ievadīšanas *in vitro* un apstrādes ar ozonu. Pētījumā veikta šo vīrusu

diagnostikas metožu izstrāde un aprobācija, rezultātā iegūstot pielāgotus diagnostikas protokolus BRNV, RYNV un RLMV vīrusu testēšanai avenēs.

Literatūra

- Chawla A. S., 2006. Application of ozonated water technology for improving quality and safety of peeled shrimp meat. Thesis in Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 2006.
- Hall R. M. and M. D. Sobsey, 1993. Inactivation of Hepatitis A Virus and MS2 by Ozone and Ozone-Hydrogen Peroxide in Buffered Water. *Water Science & Technology*. Vol 27 (3-4) 371–378
- Khade M.A., A.E. Yousef, J.G. K Im (2011) Microbiological Aspects of Ozone. Applications in Food: A Review; *Journal of food science*. Vol. 66, (9), 1242-1252.
- Mathew, L., Tiffin, H., Erridge, Z. et al. Efficiency of eradication of Raspberry bushy dwarf virus from infected raspberry (*Rubus idaeus*) by in vitro chemotherapy, thermotherapy and cryotherapy and their combinations. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 144, 133–141 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01829-y>
- Halgren A., Tzanetakis I.E., Martin R.R. (2007). Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*, 97(1): 44-50. DOI: 10.1094/PHYTO-97-0044.
- Susi, H., Rajamäki, M.L., Artola, K., Jayaraj-Mallika, F.R. and Valkonen, J.P.T. (2018), Molecular detection and characterisation of black raspberry necrosis virus and raspberry bushy dwarf virus isolates in wild raspberries. *Ann Appl Biol*, 173: 97-111. DOI: 10.1111/aab.12438
- Quito-Avila, D. F., Jelkmann, W., Tzanetakis, I. E., Keller, K., & Martin, R. R. (2011). Complete sequence and genetic characterization of Raspberry latent virus, a novel member of the family Reoviridae. *Virus Research*, 155(2), 397-405. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.11.008
- Wang, Q., Cuellar, W. J., Rajamäki, M. L., Hirata, Y., & Valkonen, J. P. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular plant pathology*, 9(2), 237–250. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x
- Jones, A.T., McGavin, W.J., Geering, A.D.W. And Lockhart, B.E.L. (2002), Identification of Rubus yellow net virus as a distinct badnavirus and its detection by PCR in Rubus species and in aphids. *Annals of Applied Biology*, 141: 1-10. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2002.tb00189.x

- Rajamäki M-L, Lemmetty A, Laamanen J, Roininen E, Vishwakarma A, Streng J, et al. (2019) Small-RNA analysis of pre-basic mother plants and conserved accessions of plant genetic resources for the presence of viruses. PLoS ONE 14(8): e0220621. DOI: 10.1371/journal.pone.0220621.
- Tzanetakis, I. E., Halgren, A., Mosier, N., & Martin, R. R. (2007). Identification and characterization of Raspberry mottle virus, a novel member of the Closteroviridae. Virus research, 127(1), 26–33. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.03.010.
- Menzel, W; Jelkmann, W; Maiss, E (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99: 81-92. DOI: 10.1016/s0166-0934(01)00381-0

R1.4 Iegūta datu kopa par krūmcidoniju šķirņu ģenētiskās viendabības vērtējumu

Ievads

Pārsvārā *Chaenomeles* ģints augi ir pazīstami ar savu dekoratīvo vērtību, bet introdukcija Baltijā vērsta uz tādu šķirņu izveidi, kuru augļus varētu izmantot pārtikā (Rumpunen et al., 2000). *Chaenomeles* augļi ir vērtīgi ar augstu organisko skābju, C vitamīna, fenola savienojumu saturu un to antioksidanta īpašībām (Hellína et al., 2003; Urbanavičiūte et al., 2020). Turklāt sēklas var izmantot eļļas ražošanā (Granados et al., 2003), kā nepiesātināto un piesātināto taukskābju, kā arī α -tokoferola, fitosterīnu un β -karotīna (Górnaś et al., 2013) avotu. Lai nodrošinātu regulāru *Chaenomeles* ražu un augstas kvalitātes augļus, ir nepieciešams izstrādāt efektīvas selekcijas programmas jaunu šķirņu izstrādei. To var panākt, pielietojot molekulārās metodes. Molekulārie marķieri izmantoti augu selekcijā, lai novērtētu ģenētisko daudzveidību, veiktu ģenētisko kartēšanu, hibrīdu un šķirņu identifikāciju (Amiteye et al., 2021), tādējādi paātrinot tradicionālo selekcijas procesu. Krūmcidonijas ir salīdzinoši jauna kultūraugu suga, maz pētīta ģenētiski, sevišķi pielietojot molekulāros marķierus. Viens no pirmajiem pētījumiem veikts, lai izpētītu Nejausi Amplificētā Polimorfā DNS (RAPD) marķieru izmantošanas iespējas *Chaenomeles sp.* paraugu ģenētiskās dažādības izpētei un sugu diferenciācijai (Bartish et al., 1999a; Rumpunen et al., 2003). RAPD marķieri izvēlēti, jo to pielietošanai nav nepieciešamas zināšanas par attiecīgā organisma genoma sekvenci un metodika ir universāla dažādiem dzīvajiem organismiem. *Chaenomeles sp.* gadījumā arī vēlākos pētījumos pielietoti tieši RAPD marķieri, kombinējot tos ar hloroplastu DNS Restrikcijas Fragmentu Garuma Polimorfisma (RFLP) analīzi (Bartish et al., 2000) un izozīmu marķieriem (Bartish et al., 1999a). Diemžēl iepriekš minētā RAPD marķieru sistēmas priekšrocība ir arī tās galvenais trūkums – lietošanas metodikai jābūt ļoti precīzai, lai nodrošinātu rezultātu stabilitāti un atkārtojamību starp eksperimentiem, laboratorijām, ko daudzo ietekmējošo faktoru dēļ ir grūti nodrošināt. Šī problēma krūmcidonijām identificēta jau iepriekš veiktajos pētījumos DI, pielietojot RAPD marķieru kopu, kuru rezultāti bija neviennozīmīgi interpretējami. Veicot atkārtotu augu materiāla analīzi, izmantojot identisku metodiku, konstatētas nobīdes amplifikācijas rezultātos, kas neļāva iegūt viennozīmīgu un nepārprotamu ģenētiskās radniecības vērtējumu, skaidrot hibrīdā materiāla izcelsmi.

Līdzīgi kā RAPD marķieri, Amplifikācijas Fragmentu garuma Polimorfisma (AFLP) marķieri tiek izmantoti, lai raksturotu dažādas šķirnes, galvenokārt tās, kuras kultivē Austrumāzijā (Kaneko et al., 2000; Zang et al., 2009; He et al., 2014); tomēr ir maz publicētu datu par Eiropas un Baltijas šķirņu analīzi molekulārā līmenī. Iepriekšējie pētījumi par *Chaenomeles* koncentrējās uz RAPD un AFLP marķieru izmantošanu; tomēr pēdējos gados SSR marķieri ir kļuvuši par iecienītāku izvēli eksperimentos to augstās reproducējamības un polimorfisma, kā arī relatīvās lietošanas vienkāršības dēļ, salīdzinot ar diviem iepriekš minētajiem marķieru veidiem (Dar et al., 2019). Līdz šim ir veikts viens pētījums, lai izstrādātu Vienkāršo Sekvenču Atkārtojumu jeb mikrosatelītu (SSR) marķierus, kā rezultātā ir iegūti 10 marķieri, kas var atšķirt dažādas *Chaenomeles* sugas (Shao et al., 2021). Tā kā *de novo* marķieru izstrāde ir dārga un laikietilpīga, molekulāro marķieru pārņemšana starp radniecīgām sugām tiek izmantota kā alternatīva pieeja – pētījums par *Chaenomeles* sugu hloroplastu genomu ir atklājis ļoti polimorfus reģionus, atkārtotas sekvences un SSR, kas ir potenciālie mērķa molekulārie marķieri (Sun et al., 2020). Vairāki pētnieki ir ziņojuši par veiksmīgu *Malus* (ābeļu) SSR marķieru pārņemšanu uz *Pyrus* (Yamamoto et al., 2001), *Cydonia* (Yamamoto et al., 2004; Khoramdel Azad et al., 2013) un *Chaenomeles* (Vanwynsberghe et al., 2009; Zhang et al., 2016). Selekcijas materiāla identifikācija un ģenētiskā novērtēšana ir viens no projekta mērķiem. DI esošā krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) kolekcija ietver vairāku selekcijas

programmu hibrīdo augu materiālu, Latvijā veidotās un pavairotās šķirnes. Līdz šim to savstarpējā radniecība, ģenētiskā dažādība nav analizēta.

Tādēļ nolemts projekta mērķu sasniegšanai adaptēt molekulāro marķieru metodiku, kas nodrošinātu stabilus un viennozīmīgus rezultātus. Pētījumā iekļauti SSR (mikrosatelītu) molekulārie marķieri, kas balstās uz PCR, tiem ir laba atkārtotamība un stabilitāte starp eksperimentiem un laboratorijām, tie ir koddominanti un informatīvi. SSR marķieri ir sekvenču specifiski, tomēr daudzos gadījumos novērota sekmīga marķieru pārnese starp radniecīgām sugām. To pierāda arī sekmīga to pašu SSR marķieru izmantošana ābelēm (*Malus*) un bumbierēm (*Pyrus*). Tāpēc adaptācijai izvēlēti taksonomiski *Chaenomeles sp.* radniecīgajām ābelēm un bumbierēm izstrādātie SSR marķieri, kas plaši pieejami un aprakstīti (Liebhard et al., 2002; Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Celton et al., 2009). Metodikas izstrādes mērķis ir ieviest uz molekulārajiem marķieriem balstītu atlasī krūmcidoniju selekcijā, hibrīdā materiāla izpētei, sugu identifikācijai, viendabīga stādmateriāla pavairošanas kontrolei, lai nodrošinātu krūmcidoniju ģenētisko stabilitāti un viendabību kvalitatīva stādmateriāla nodrošināšanai.

Materiāli un metodes

Augu materiāls

Krūmcidoniju (*C. japonica*) ģenētiskās izpētes nolūkam vasaras sākumā ievākti 53 lapu paraugi un novietoti glabāšanā -80 °C (1.4.1. tabula). Augu materiāls metodikas izstrādei izvēlēts ar mērķi nodrošināt pēc iespējas lielāku pieejamo ģenētisko daudzveidību. Tāpēc pētījumā iekļautas sekojošas DI kolekcijā pieejamais krūmcidoniju genotipu kopas:

- selekcijas materiāls – hibrīdi, kas izveidoti Latvijā dažādos laika periodos un dažādu selekcijas aktivitāšu ietvaros,
- Latvijā izveidotās šķirnes,
- šķirņu paraugi, kuru pavairošanā pielietotas dažādas metodes, to stabilitātes un pavairošanas metožu novērtēšanai.

1.4.1. tabula. **Krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) selekcijas materiāls molekulāro marķieru adaptācijai un genotipēšanai**

Nr.p.k.	Parauga nosaukums	DNS numurs	Koncentrācijas	Tīrība
1	C16	cd 062	103.48	1.70
2	C19	cd 063	67.57	1.87
3	C20	cd 064	104.37	1.55
4	C27	cd 065	50.28	1.99
5	C12	cd 066	96.50	1.98
6	Ada	cd 067	134.64	2.04
7	Alfa	cd 068	32.95	2.26
8	C26	cd 069	72.47	2.03
9	4-22	cd 070	61.94	1.68
10	7-25	cd 071	94.00	2.05
11	4-6	cd 072	35.40	1.84
12	9-11	cd 073	55.11	1.96
13	17-20	cd 074	81.67	1.90
14	9-44	cd 075	139.74	1.79

Nr.p.k.	Parauga nosaukums	DNS numurs	Koncentrācijas	Tīrība
15	19-94	cd 076	37.00	1.77
16	19-4	cd 077	77.08	2.02
17	8-139	cd 078	142.75	1.98
18	10-17	cd 079	77.04	2.07
19	19-94	cd 080	101.44	2.02
20	11-45	cd 081	124.25	1.82
21	C13	cd 082	95.88	2.06
22	C10	cd 083	123.76	1.86
23	Agra	cd 084	92.26	1.41
24	Anta	cd 085	71.48	2.00
25	Tīca 45	cd 086	105.03	2.07
26	Abava	cd 087	126.77	2.04
27	Rasa (tipiska)	cd 088	20.09	2.49
28	R.Indrāna 1	cd 089	40.03	1.50
29	R.Indrāna 2	cd 090	28.88	1.85
30	R.Indrāna 4	cd 091	33.15	1.62
31	Arta	cd 092	68.24	1.83
32	Dobeles 2-29	cd 093	84.71	1.95
33	R.Indrāna 3	cd 094	90.51	1.84
34	Rondo (merist.)	cd 095	78.55	1.87
35	Rasa (merist.)	cd 096	77.31	1.90
36	Darius (merist.)	cd 097	151.63	1.99
37	Rondo (vecā)	cd 098	57.06	1.83
38	Darius (vecā)	cd 099	62.18	2.02
39	Rasa (vecā)	cd 100	42.16	1.74
40	Rondo (spraudēņi)	cd 101	144.62	1.94
41	Darius (spraudēņi)	cd 102	222.66	1.97
42	Rasa (spraudēņi)	cd 103	75.57	1.65
43	SR1-3	cd 104	113.67	1.96
44	SR1-4a	cd 105	75.63	1.85
45	SR2-0	cd 106	49.75	2.02
46	SR1-2	cd 107	40.68	1.67
47	SR1-1a	cd 108	65.32	1.83
48	SR1-5a	cd 109	48.61	1.82
49	SR1-5	cd 110	79.60	1.90
50	SR1-6	cd 111	36.82	1.82
51	SR1-4	cd 112	94.22	1.95
52	SR2-9	cd 113	21.78	1.67
53	SR1-1	cd 114	51.30	1.62

Nukleīnskābju izdalīšana

Ievāktajiem paraugiem veikta DNS izdalīšana, sasmalcinot šķidrā slāpekļā un izmantojot Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification Kit (#K0512) reaģentu komplektu, veikta izdalītās DNS koncentrācijas un kvalitātes pārbaude, izmantojot NanoDrop ND-1000 iekārtu (mērījumu rezultāti pieejami 1.4.1. tabulā).

Molekulāro marķieru metodes izstrāde

Molekulāro marķieru metodikas izstrādei atlasīti *Malus* un *Pyrus* pielietotie mikrosatelītu SSR marķieri, kas reprezentē visas genoma saistības grupas, ir kartēti kādā no šiem kultūraugiem. Veicot literatūras analīzi, atlasīti 112 potenciālie marķieri (1.4.2. tabula).

PCR metodikas adaptācijai, izmantotas divas amplifikācijas programmas:

- Cidonijas SSR 56 (DreamTaq) (marķieriem: GD12, GD15, CH01H01, CH01F02, CH02C06, CH01F03, CH01H10, CH02A08, CH01B12, GD142, CH02D11, CH01f03, CH03d10, CH01h02, CH01f03b, CH03a09, CH04f06

T, °C	Laiks	Cikli
95	3 min	1
95	30 s	35
56	30 s	
72	1min	
72	10 min	1

- Cidonijas SSR 54 (DreamTaq) (marķieriem: CH01a09, CH01B12, CH01c06, CH01d03, CH01D08, CH01d09, CH01E12, CH01E12, CH01F02, CH01f02, CH01f07a, CH01f09, CH01f12, CH01h01, CH01H10, CH02a03, CH02b03b, CH02b10, CH02b11, CH02B12, CH02c02a, CH02c02b, CH02C09, CH02C09, CH02C11, CH02c11, CH02D12, CH02D12, CH02F06, CH02g01, CH02g09, CH02h11a, CH03a02, CH03a08, CH03b06, CH03b10, CH03c02, CH03d01, CH03d08, CH03d11, CH03d12, CH03e03, CH03g06, CH04a12, CH04c06, CH04c06, CH04d02, CH04e02, CH04e03, CH04e05, CH04g04, CH04g07, CH04g09, CH04h02, CH05a02, CH05a03, CH05a04, CH05a05, CH05c06, CH05c07, CH05d02, CH05d03, CH05d04, CH05d08, CH05d11, CH05e03, CH05e06, CH05f04, CH05f06, CH05g01, CH05g03, CH05g07, CH05g08, CH05g11, CH05h05, CH-Vf1, GD103, GD147, GD162):

T, °C	Laiks	Cikli
95	3 min	1
95	30 s	35
54	30 s	
72	1min	
72	10 min	1

1.4.2. tabula. Molekulāro marķieru metodikas izstrādei atlasītie *Malus* un *Pyrus* pielietotie praimeru pāri

Nr.p.k	Praimera nosaukums	Praimera kods	F	F Tm	R	R Tm
1	GD12	1	TTGAGGTGTTTCTCCCATTGGA	53	CTAACGAAGCCGCCATTTCTTT	56
2	GD15	2	CGAAAGTGAGCAACGAACTCC	55	ACTCCATCATCGGGTGGTG	52
3	GD96	3	CGGCGGAAAGCAATCACCT	55	GCCAGCCCTCTATGGTTCCAGA	58
4	GD100	4	CGGCGGAAAGCAATCACCT	55	TGCGGACAAAGGAAAAAAAAAAGTG	55
5	GD103	5	CGGCGAGAAAAAAAAACAATG	51	GGATAACCGTCCCCCTCTTC	52
6	CH01H01	6	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC	53	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	50
7	CH01F02	7	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	53	CTGGTTTGTTTTCTCCAGC	51
8	CH02C06	8	TGACGAAATCCACTACTAATGCA	53	GATTGCGCGCTTTTAAACAT	52
9	CH01H10	9	TGCAAAGATTGTTTGTGCAC	54	AGGAGGGATTGTTTGTGCAC	51
10	CH01E12	10	AAACTGAAGCCATGAGGGC	52	TTCCAATTCACATGAGGCTG	51
11	CH02D12	11	AACCAGATTTGCTTGCCATC	51	GCTGGTGGTAAACGTGGTG	52
12	CH01B12	12	CGCATGCTGACATGTTGAAT	52	CGGTGAGCCCTCTTATGTGA	54
13	GD142	14	GGCACCCAAGCCCCTAA	51	GGAACCTACGACAGCAAAGTTACA	56
14	GD147	15	TCCCGCCATTTCTCTGC	51	AAACTGAAGCCATGAGGGC	53
15	GD162	16	GAGGCAAGTGACAAAGAAAGATG	54	AAAATGTAACAACCCGTCCAAGTG	54
16	CH02d08	18	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	52	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	57
17	CH02C09	19	TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC	52.3	AGAAGCAGCAGAGGAGGATG	53.8
18	CH04C07	20	GGCCTTCCATGTCTCAGAAG	53.8	CCTCATGCCCTCCACTAACA	53.8
19	CH02c11	21	TGAAGGCAATCACTCTGTGC	51.8	TTCCGAGAATCCTCTTCGAC	51.8
20	CH01f03	22	GAGAAGCAAATGCAAAACCC	49.7	CTCCCCGGCTCCTATTCTAC	55.9
21	CH03d07	23	CAAATCAATGCAAACTGTCA	46.5	GGCTTCTGGCCATGATTTTA	49.7
22	CH02b10	25	CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	51	CAAGTGGCTTCGGATAGTTG	52
23	CH02c02a	27	CTTCAAGTTCAGCATCAAGACAA	51.7	TAGGGCACACTTGCTGGTC	53.2

Nr.p.k	Praimera nosaukums	Praimera kods	F	F Tm	R	R Tm
24	CH-Vf1	29	ATCACCACCAGCAGCAAAG	51.1	CATACAAATCAAAGCACAACCC	51.1
25	CH05e03	30	CGAATATTTTCTACTCTGACTGGG	53.5	CAAGTTGTTGTACTGCTCCGAC	54.8
26	CH02f06	32	CCCTCTTCAGACCTGCATATG	52	ACTGTTTCCAAGCGATCAGG	53
27	CH02b07	33	CCAGACAAGTCATCACAACACTC	55.3	ATGTCGATGTCGCTCTGTTG	51.8
29	CH03d01	38	CGCACCACAAATCCAACTC	51.1	AGAGTCAGAAGCACAGCCTC	53.8
30	CH-Vf2	41	TTTGTTTTTCGAGCAGGAGC	49.7	TTTCACATTCCGGAGCATGAG	49.7
31	CH04e05	71	AGGCTAACAGAAATGTGGTTTG	51.1	ATGGCTCCTATTGCCATCAT	49.7
32	CH03g12	72	GCGCTGAAAAAGGTCAGTTT	49.7	CAAGGATGCGCATGTATTTG	49.7
33	CH03g07	73	AATAAGCATTCAAAGCAATCCG	49.2	TTTTTCCAAATCGAGTTTCGTT	47.4
34	CH02b11	74	ACCTTACCTGGTAGAGAGAGA	52.4	CACAACGCAGTTCGATCACT	51.8
35	CH03d10	79	CTCCCTTACCAAAAACACCAAA	51.1	GTGATTAAGAGAGTGATCGGGG	54.8
36	CH01h01	80	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC	53.8	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	51.8
37	CH05g08	81	CCAAGACCAAGGCAACATTT	49.7	CCCTTCACCTCATTCTCACC	53.8
38	CH01d03	88	CCACTTGGCAATGACTCCTC	53.8	ACCTTACCGCCAATGTGAAG	51.8
39	CH01h02	89	AGAGCTTCGAGCTTCGTTTG	55	ATCTTTTGGTGCTCCACAC	51
40	CH01f12	90	CTCCTCCAAGCTTCAACCAC	53.8	GCAAAAACCACAGGCATAAC	49.7
41	CH01c06	91	TTCCCCATCATCGATCTCTC	51.8	AAACTGAAGCCATGAGGGC	51.1
42	CH01g05	92	CATCAGTCTCTTGCACTGGAAA	53	GACAGAGTAAGCTAGGGCTAGGG	58.8
43	CH01f09	93	ATGTACATCAAAGTGTGGATTG	49	GGCGCTTCCAACACATC	50
44	CH01a09	94	GATGTGGTTCCAGAAGCTAC	51.8	CACATGCATGAAAAGCATAT	45.6
45	CH01d09	95	GCCATCTGAACAGAATGTGC	51.8	CCCTTCATTACATTTCCAG	49.7
46	CH01f07a	96	CCCTACACAGTTTCTCAACCC	54.4	CGTTTTTGGAGCGTAGGAAC	51.8
47	CH01f02	97	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	52.4	CTGGTTTGTTCCTCCAGC	51.8
48	CH01f03b	98	GAGAAGCAAATGCAAAACCC	49.7	CTCCCCGGCTCCTATTCTAC	55.9
49	CH02h11a	99	CGTGGCATGCTTATCATTTG	49.7	CTGTTTGAACCGCTTCCTTC	51.8
50	CH02c02b	100	TGCATGCATGGAAACGAC	48	TGGAAAAAGTCACACTGCTCC	52.4

Nr.p.k	Praimera nosaukums	Praimera kods	F	F Tm	R	R Tm
51	CH02g09	101	TCAGACAGAAGAGGAACTGTATTTG	54.4	CAAACAAACCAGTACCGCAA	49.7
52	CH02b03b	102	ATAAGGATACAAAAACCTACACAG	52	GACATGTTTGGTTGAAAACCTG	49
53	CH02g01	103	GATGACGTCGGCAGGTAAAG	53.8	CAACCAACAGCTCTGCAATC	51.8
54	CH02a03	104	AGAAGTTTTACGGGTGCC	51.1	TGGAGACATGCAGAATGGAG	51.8
55	CH03d08	105	CATCAGTCTCTTGCACTGGAAA	53	TAGGGCTAGGGAGAGATGATGA	54.8
56	CH03a09	106	GCCAGGTGTGACTCCTTCTC	55.9	CTGCAGCTGCTGAAACTGG	53.2
57	CH03b10	107	CCCTCCAAAATATCTCCTCCTC	54.8	CGTTGTCTGCTCATCATACTC	54.8
58	CH03d02	108	AAACTTTCACTTTACCCACG	50.5	ACTACATTTTTAGATTTGTGCGTC	50.6
59	CH03a08	109	TTGGTTTGCTAGGAAAAGAAGG	51.1	AAGTTTATCGGGCCTACACG	51.8
60	CH03b06	110	GCATCCTTGAATGAGGTTCACT	53	CCAATCACCAAATCAATGTCAC	51.1
61	CH03e03	111	GCACATTCTGCCTTATCTTGG	52.4	AAAACCCACAAATAGCGCC	48.9
62	CH03c02	112	TCACTATTTACGGGATCAAGCA	51.1	GTGCAGAGTCTTTGACAAGGC	54.4
63	CH03g06	113	ATCCCACAGCTTCTGTTTTTG	50.5	TCACAGAGAATCACAAGGTGGA	53
64	CH03a02	114	TTGTGGACGTTCTGTGTTGG	51.8	CAAGTTCAACAGCTCAAGATGA	51.1
65	CH03d11	115	ACCCACAGAAACCTTCTCC	53.8	CAACTGCAAGAATCGCAGAG	51.8
66	CH03d12	116	GCCCAGAAGCAATAAGTAAACC	53	ATTGCTCCATGCATAAAGGG	49.7
67	CH04g04	117	AGTGGCTGATGAGGATGAGG	53.8	GCTAGTTGCACCAAGTTCACA	52.4
68	CH04g09	118	TTGTCGCACAAGCCAGTTTA	49.7	GAAGACTCATGGGTGCCATT	51.8
69	CH04g07	119	CCCTAACCTCAATCCCCAAT	51.8	ATGAGGCAGGTGAAGAAGGA	51.8
70	CH04e03	120	TTGAAGATGTTTGGCTGTGC	49.7	TGCATGTCTGTCTCCTCCAT	51.8
71	CH04c06	121	GCTGCTGCTGCTTCTAGGTT	53.8	GCTTGGAAAAGGTCACCTGC	51.8
72	CH04f06	122	GGCTCAGAGTACTTGCAGAGG	56.3	ATCCTTAAGCGCTCTCCACA	51.8
73	CH04a12	123	CAGCCTGCAACTGCACTTAT	51.8	ATCCATGGTCCCATAAACCA	49.7
74	CH04h02	124	GGAAGCTGCATGATGAGACC	53.8	CTCAAGGATTTTCATGCCAC	51.8
75	CH04c06	125	GCTGCTGCTGCTTCTAGGTT	53.8	GCTTGGAAAAGGTCACCTGC	51.8
76	CH04d02	126	CGTACGCTGCTTCTTTTGCT	51.8	CTATCCACCACCCGTCAACT	53.8

Nr.p.k	Praimera nosaukums	Praimera kods	F	F Tm	R	R Tm
77	CH04e02	127	GGCGATGACTACCAGGAAAA	51.8	ATGTAGCCAAGCCAGCGTAT	51.8
78	CH04f10	128	GTAATGGAAATACAGTTTCACAA	48.1	TTAAATGCTTGGTGTGTTTTC	49.2
79	CH05h05	129	ACATGTCACTCCTACGCGG	53.2	GTGCAGTGATTAGCATTGCTGT	53
80	CH05g03	130	GCTTTGAATGGATACAGGAACC	53	CCTGTCTCATGGCATTGTTG	51.8
81	CH05c06	131	ATTGGAACCTCTCCGTATTGTGC	53	ATCAACAGTAGTGGTAGCCGGT	54.8
82	CH05d03	132	TACCTGAAAGAGGAAGCCCT	51.8	TCATTCTTCTCACATCCACT	50.5
83	CH05a02	133	GTTGCAAGAGTTGCATGTTAGC	53	TTTTGACCCCATAAAACCCAC	50.5
84	CH05f04	134	GATGATGGTGCTCTCGGTTATT	53	TTATGTTGGGTAATGTCTTCCG	51.5
85	CH05e06	135	ACACGCACAGAGACAGAGACAT	54.8	GTTGAATAGCATCCCAAATGGT	51.5
86	CH05d08	136	TCATGGATGGGAAAAAGAGG	49.7	TGATTGCCACATGTCAGTGTT	50.5
87	CH05d02	137	AAACTCCCTCACCTCACATCAC	54.8	AATAGTCCAATGGTGTGGATGG	53
88	CH05f06	138	TTAGATCCGGTCACTCTCCACT	54.8	TGGAGGAAGACGAAGAAGAAAG	53
89	CH05a04	139	GAAGCGAATTTTGCACGAAT	47.7	GCTTTTGTTTCATTGAATCCCC	51.5
90	CH05a03	140	CGGCTGAGCATGGTTACTTC	53.8	TGATCGTTGTGAAAGCTCCA	49.7
91	CH05g01	141	TTTCATTCAACTTCACCTCTC	48.5	CTCCTTTCCGATTCTTCTATTTC	52.3
92	CH05g11	142	GCAAACCAACCTCTGGTGAT	51.8	AAACTGTTCCAACGACGCTA	49.7
93	CH05g07	143	CCCAAGCAATATAGTGAATCTCAA	52.3	TTCATCTCCTGCTGCAAATAAC	51.1
95	CH05a05	145	TGTATCAGTGGTTTGCATGAAC	51.1	GCAACTCCCAACTCTTCTTTCT	53
96	CH05c07	146	TGATGCATTAGGGCTTGTAATT	51.1	GGGATGCATTGCTAAATAGGAT	51.1
97	CH05d04	147	ACTTGTGAGCCGTGAGAGGT	53.8	TCCGAAGGTATGCTTCGATT	49.7
98	CH05d11	148	CACAACCTGATATCCGGGAC	53.8	GAGAAGGTCGTACATTCTCTCAA	53
99	CH01B12	4	CGCATGCTGACATGTTGAAT	49.7	CGGTGAGCCCTCTATGTGA	53.2
100	CH01D08	5	CTCCGCCGCTATAACACTTC	53.8	TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG	53
101	CH01E12	6	AAACTGAAGCCATGAGGGC	51.1	TTCCAATTCACATGAGGCTG	49.7
102	CH01F02	7	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	52.4	CTGGTTTGTTCCTCCAGC	51.8
103	CH01F03	8	GAGAAGCAAATGCAAAACCC	49.7	CTCCCCGGCTCCTATTCTAC	55.9

Nr.p.k	Praimeras nosaukums	Praimeras kods	F	F Tm	R	R Tm
104	CH01H10	9	TGCAAAGATAGGTAGATATATGCGA	52.8	AGGAGGGATTGTTTGTGCAC	51.8
105	CH02A08	10	GAGGAGCTGAAGCAGCAGAG	55.9	ATGCCAACAAAAGCATAGCC	49.7
106	CH02B12	11	GGCAGGCTTTACGATTATGC	52	CCCACTAAAAGTTCACAGGC	50
107	CH02C09	12	TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC	52.3	AGAAGCAGCAGAGGATG	47.1
108	CH02C11	13	TGAAGGCAATCACTCTGTGC	51.8	TTCCGAGAATCCTCTTCGAC	51.8
109	CH02D08	14	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	51.8	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	57.4
110	CH02D11	15	AGCGTCCAGAGCAACAGC	55	AACAAAAGCAGATCCGTTGC	52
111	CH02D12	16	AACCAGATTTGCTTGCCATC	49.7	GCTGGTGGTAAACGTGGTG	53.2
112	CH02F06	17	CCCTCTTCAGACCTGCATATG	54.4	ACTGTTTCCAAGCGATCAGG	51.8

Amplifikācijas apstākļu adaptācijas un eksperimentu rezultātā izstrādāta optimālā PCR metodika marķieru pielietošanai krūmcidonijās:

Reaģenta nosaukums:	Thermo Scientific™ DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (#K1081)
Reakcijas tilpums:	25 µL
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	12.5
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
Template DNA	1
Water, nuclease-free	10.5

Iegūtie amplifikācijas produkti identificēti un analizēti, izmantojot ģenētisko analizatoru Applied Biosystems ABI PRISM 3100-Avant un GeneMapper® Software v4.0 (Applied Biosystems) genotipēšanai.

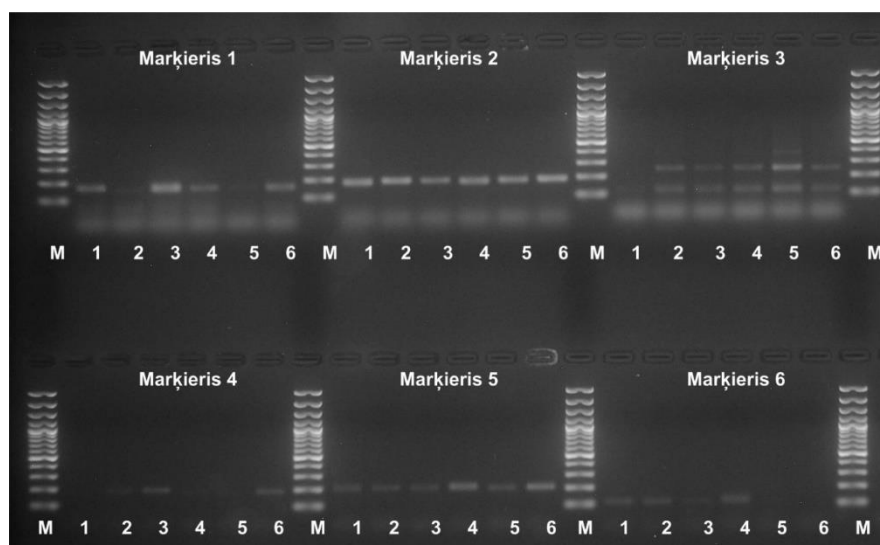
Statistiskā analīze

Iegūtie amplifikācijas fragmentu dati apkopoti, izmantojot MS Excel programmu, tālākai datu analīzei pielietota GenAEx v6.5 ģenētisko datu analīzes programma (Peakall, Smouse, 2006).

Rezultāti

Metodikas izstrāde ģenētiskajai analīzei

No 112 potenciālajiem *Malus* un *Pyrus* izstrādātajiem molekulārajiem marķieriem, pēc PCR metodikas precizēšanas un pilnveidošanas 40 uzrādīja sekmīgu un stabilu amplifikāciju *Chaenomeles* paraugos (CH01a09, CH01d03, CH01d09, CH01F02, CH01F03, CH01f03b, CH01f09, CH01f12, CH01g05, CH01h02, CH02a03, CH02b11, CH02c02b, CH02D12, CH02g01, CH03a09, CH03b06, CH03b10, CH03d01, CH03d02, CH03d10, CH03g06, CH03g07, CH03g12, CH04d02, CH04e02, CH04f06, CH04g07, CH05a02_a, CH05a02_b, CH05c06, CH05d03, CH05d04, CH05e03, CH05g01, CH05g03, CH05g07, CH05g11, CH05h05 un CH-Vf1) (piemērus skat. 1.4.1. attēlā).



1.4.1. attēls **Molekulāro marķieru adaptācija dažādu *Chaenomeles* sugu paraugiem.**

Veicot sākotnējo marķieru datu analīzi, no tālākās pielietošanas izslēgti vēl 15 marķieri, jo tie:

- bija monomorfi testētajā augu materiālā (CH01f09, CH02d12, CH03a09),
- amplificēja vairāk nekā vienu lokusu (CH01f12, CH03g07),
- bija monomorfi vai nenodrošināja amplifikāciju vismaz divām no trim paraugu (sugu) grupām (CH01d03, CH02b11, CH03d02, CH01f03, CH04d02, CH04e02, CH05g03, CH05a02_a, CH05a02_b, CH05d04).

Rezultātā atlasīta 25 SSR molekulāro marķieru grupa, kas *Chaenomeles* augos nodrošināja stabilu un atkārtojamu amplifikāciju visās sugu grupās, bija polimorfi, reprezentēja vienu genoma lokusu (CH01a09, CH01d03, CH01d09, CH01F02, CH01f03b, CH01g05, CH01h02, CH02a03, CH02c02b, CH02g01, CH03b06, CH03b10, CH03d01, CH03d10, CH03g06, CH04f06, CH04g07, CH05a02_a, CH05c06, CH05d03, CH05e03, CH05g07, CH05g11, CH05h05, CH-Vf1) (1.4.3. tabula).

1.4.3. tabula. Molekulāro marķieru kopa pielietojumam krūmcidoniju selekcijas materiāla genotipēšanai

Marķieris	Organisms	Fragmentu garums, bp	Kartēts	Saistības grupa	Reference
CH01a09	<i>Malus × domestica</i>	198-384	<i>Malus, Pyrus</i>	14	Liebhard et al. 2002
CH01d03	<i>Malus × domestica</i>	136-160	<i>Malus, Pyrus</i>	4,12	Liebhard et al. 2002
CH01d09	<i>Malus × domestica</i>	134-172	<i>Malus, Pyrus</i>	12	Liebhard et al. 2002
CH01F02	<i>Malus × domestica</i>	174-206	<i>Malus, Pyrus</i>	12	Liebhard et al. 2002
CH01f03b	<i>Malus × domestica</i>	139-183	<i>Malus, Pyrus</i>	9	Liebhard et al. 2002
CH01g05	<i>Malus × domestica</i>	140-188	<i>Malus, Pyrus</i>	14	Liebhard et al. 2002
CH01h02	<i>Malus × domestica</i>	236-256	<i>Malus, Pyrus</i>	9	Liebhard et al. 2002
CH02a03	<i>Malus × domestica</i>	144-170	<i>Malus, Pyrus</i>	16	Liebhard et al. 2002
CH02c02b	<i>Malus × domestica</i>	78-126	<i>Malus, Pyrus</i>	4	Liebhard et al. 2002
CH02g01	<i>Malus × domestica</i>	198-238	<i>Malus, Pyrus</i>	13	Liebhard et al. 2002
CH03b06	<i>Malus × domestica</i>	111-131	<i>Malus, Pyrus</i>	15	Liebhard et al. 2002
CH03b10	<i>Malus × domestica</i>	99-121	<i>Malus</i>	15	Liebhard et al. 2002
CH03d01	<i>Malus × domestica</i>	95-115	<i>Malus</i>	2	Liebhard et al. 2002
CH03d10	<i>Malus × domestica</i>	166-182	<i>Malus, Pyrus</i>	2	Liebhard et al. 2002
CH03g06	<i>Malus × domestica</i>	139-171	<i>Malus, Pyrus</i>	14	Liebhard et al. 2002
CH04f06	<i>Malus × domestica</i>	159-179	<i>Malus, Pyrus</i>	14	Liebhard et al. 2002
CH04g07	<i>Malus × domestica</i>	149-211	<i>Malus, Pyrus</i>	11	Liebhard et al. 2002
CH05a02	<i>Malus × domestica</i>	111-135	<i>Malus, Pyrus</i>	8, 15	Liebhard et al. 2002
CH05c06	<i>Malus × domestica</i>	104-126	<i>Malus, Pyrus</i>	13, 16	Liebhard et al. 2002
CH05d03	<i>Malus × domestica</i>	152-187	<i>Malus, Pyrus</i>	14	Liebhard et al. 2002
CH05e03	<i>Malus × domestica</i>	158-190	<i>Malus</i>	2	Liebhard et al. 2002
CH05g07	<i>Malus × domestica</i>	149-197	<i>Malus, Pyrus</i>	12, 14	Liebhard et al. 2002
CH05g11	<i>Malus × domestica</i>	201-255	<i>Malus, Pyrus</i>	14	Liebhard et al. 2002
CH05h05	<i>Malus × domestica</i>	168-184	<i>Malus, Pyrus</i>	13, 16	Liebhard et al. 2002
CH-Vf1	<i>Malus × domestica</i>	129-173	<i>Malus, Pyrus</i>	1	Vinatzer et al. 2004

Analizēto SSR marķieru piemērotības pārbaude krūmcidoniju paraugu ģenētiskās daudzveidības analīzē veikta, izmantojot genotipēšanas datu Principiālo koordinātu analīzi. Analīze uzrādīja ģenētiski atšķirīga materiāla (radīts dažādās selekcijas aktivitātēs, dažāda materiāla izcelsme) grupēšanos, norādot uz atlasīto marķieru izšķirtspēju. Atlasītā marķieru kopa ir pietiekoša, lai nodrošinātu krūmcidoniju selekcijas materiāla analīzi. Marķieru atlasē ņemts vērā hibrīdā materiāla šaurais ģenētiskais pamats (hibrīdu populācijas iegūtas, krustojot divus vecākaugus vai veicot pašapputi). Tāpēc kopā iekļauts pietiekami liels marķieru skaits, kas nodrošinātu iespējami vienmērīgu genoma pārklājumu.

Izvēlēta marķieru kopa pārbaudīta 71 *Chaenomeles* paraugā, kas iekļauj dažādu sugu pārstāvjus (53 *C. japonica*, 8 *C. × superba*, *C. speciosa*, *C. × californica* un 10 *C. cathayensis*). Atlasītā marķieru kopa nodrošināja visu genotipu izšķiršanu, augstu polimorfismu. Šī pētījuma rezultātā identificētas 4 līdz 16 alēles (vidēji 9,72) un novērotā heterozigotāte bija no 0,493 līdz 0,972 (vidēji 0,558, 1.4.4. tabula). Šie rezultāti apstiprina izvēlēto marķieru kopu piemērotību

Chaenomeles augu materiāla ģenētiskai izpētei.

1.4.4. tabula. **Molekulāro marķieru raksturojums, adaptējot pielietojumam krūmcidoniju selekcijas materiālu genotipēšanai**

Marķieris	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
CH01a09	9.000	3.999	1.715	0.493	0.750	0.755	0.343
CH01d03	7.000	1.616	0.775	0.127	0.381	0.384	0.668
CH03d01	7.000	3.594	1.501	0.535	0.722	0.727	0.258
CH05e03	13.000	6.170	2.038	0.662	0.838	0.844	0.210
CH-Vf1	16.000	7.303	2.259	0.714	0.863	0.869	0.172
CH01d09	12.000	3.684	1.728	0.565	0.729	0.734	0.224
CH03d10	7.000	2.921	1.412	0.577	0.658	0.662	0.122
CH01f03b	11.000	4.303	1.695	0.676	0.768	0.773	0.119
CH04f06	11.000	3.920	1.716	0.620	0.745	0.750	0.168
CH01F02	11.000	4.726	1.837	0.544	0.788	0.794	0.310
CH01h02	6.000	3.253	1.364	0.174	0.693	0.698	0.749
CH01g05	11.000	6.174	2.024	0.775	0.838	0.844	0.076
CH02c02b	11.000	4.026	1.672	0.563	0.752	0.757	0.250
CH02g01	10.000	3.983	1.634	0.603	0.749	0.754	0.195
CH02a03	4.000	2.142	0.922	0.493	0.533	0.537	0.075
CH03b10	6.000	1.892	1.011	0.479	0.471	0.475	-0.016
CH03b06	12.000	5.189	1.890	0.704	0.807	0.813	0.128
CH03g06	13.000	5.656	2.042	0.353	0.823	0.829	0.571
CH04g07	10.000	4.771	1.802	0.231	0.790	0.797	0.708
CH05h05	6.000	3.345	1.461	0.646	0.701	0.706	0.078
CH05c06	11.000	6.387	2.010	0.588	0.843	0.850	0.303
CH05d03	7.000	3.304	1.395	0.426	0.697	0.703	0.388
CH05a02_a	5.000	3.915	1.450	0.714	0.745	0.750	0.041
CH05g11	11.000	2.774	1.310	0.972	0.640	0.644	-0.520
CH05g07	16.000	7.248	2.216	0.727	0.862	0.869	0.156
Vidēji:	9.720	4.252	1.635	0.558	0.727	0.733	0.231

Na – alēļu skaits, Ne – efektīvo alēļu skaits, I – Shannon informācijas indekss, Ho – novērotā heterozigotāte, He – sagaidāmā heterozigotāte, uHe – objektīvā sagaidāmā heterozigotāte, F – Fixation indekss

Krūmcidoniju šķirņu ģenētiskās viendabības un ģenētiskās stabilitātes vērtējums

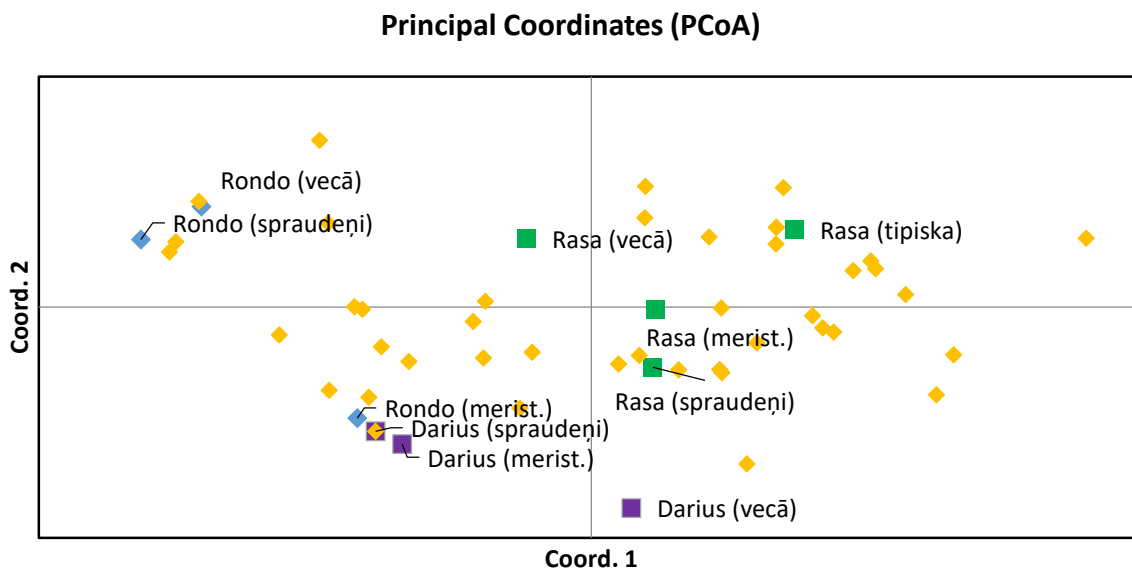
Izstrādātā SSR marķieru metodika pielietota ģenētisko analīžu veikšanai, lai noskaidrotu DI kolekcijā esošā selekcijas materiāla ģenētisko daudzveidību (nozīmīgs parametrs tālākai selekcijai), esošo genotipu radniecību (nozīmīgs raksturojums tālākai selekcijai, potenciālo vecākaugu atlasei), kā arī jaunizveidoto šķirņu ģenētisko viendabību. Marķieru amplifikācijas datu kopa vienas sugas (*C. japonica*) paraugos norādīja uz augstu ģenētisko daudzveidību, marķieru izšķirtspēju (1.4.5. tabula). Testētajā augu materiālā konstatētas 2 līdz 10 alēles (vidēji 6,52) un heterozigotāti no 0,019 līdz 1,000 (vidēji 0,623). Selekcijas materiāla vērtēšana veikta, izmantojot genotipēšanas datu Principiālo koordinātu analīzi (1.4.3. attēls). Analīze uzrādīja ģenētiski atšķirīga materiāla (radīts dažādās selekcijas aktivitātēs, dažāda materiāla izcelsme) grupēšanos, norādot uz atlasīto marķieru izšķirtspēju. Analīzes rezultātā iespējams

identificēt divas genotipu grupas, kas pārstāv dažādas krūmcidoniju selekcijas programmas.

1.4.5. tabula. **Molekulāro marķieru raksturojums *Chaenomeles japonica* selekcijas materiāla genotipēšanai**

Marķieris	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
CH01a09	7.000	2.947	1.434	0.529	0.661	0.667	0.199
CH01d03	2.000	1.019	0.053	0.019	0.019	0.019	-0.010
CH03d01	7.000	2.460	1.212	0.566	0.593	0.599	0.046
CH05e03	9.000	4.487	1.699	0.755	0.777	0.785	0.029
CH-Vf1	9.000	5.068	1.841	0.788	0.803	0.810	0.018
CH01d09	10.000	2.350	1.333	0.647	0.574	0.580	-0.127
CH03d10	7.000	3.590	1.523	0.679	0.721	0.728	0.058
CH01f03b	7.000	3.225	1.345	0.811	0.690	0.696	-0.176
CH04f06	7.000	2.426	1.157	0.679	0.588	0.593	-0.156
CH01F02	10.000	3.800	1.662	0.647	0.737	0.744	0.122
CH01h02	5.000	4.083	1.461	0.176	0.755	0.763	0.766
CH01g05	10.000	5.686	1.970	0.906	0.824	0.832	-0.099
CH02c02b	5.000	2.628	1.130	0.604	0.619	0.625	0.025
CH02g01	6.000	2.847	1.300	0.680	0.649	0.655	-0.048
CH02a03	4.000	2.370	0.991	0.604	0.578	0.584	-0.044
CH03b10	5.000	1.878	0.938	0.453	0.468	0.472	0.032
CH03b06	9.000	4.484	1.714	0.830	0.777	0.784	-0.068
CH03g06	8.000	3.658	1.570	0.360	0.727	0.734	0.505
CH04g07	9.000	3.452	1.521	0.298	0.710	0.718	0.581
CH05h05	5.000	2.808	1.275	0.813	0.644	0.651	-0.262
CH05c06	7.000	4.163	1.533	0.780	0.760	0.767	-0.027
CH05d03	2.000	1.962	0.683	0.460	0.490	0.495	0.062
CH05a02_a	3.000	2.985	1.096	0.615	0.665	0.671	0.075
CH05g11	2.000	2.000	0.693	1.000	0.500	0.505	-1.000
CH05g07	8.000	5.683	1.866	0.878	0.824	0.833	-0.065
Vidēji:	6.520	3.282	1.320	0.623	0.646	0.652	0.017

Daudzveidības analīze ļāva skaidrot šķirņu klonu esamību un to savstarpējo ģenētisko līdzību (piemēram, 'Darius', 'Rasa' un 'Rondo'). Analīze norāda uz šķirņu pavairošanās procesā iegūtajām izmaiņām un nepieciešamību pēc regulāras ģenētiskās validācijas veikšanas krūmcidoniju šķirņu pavairošanas procesā. Analīze tāpat ļauj identificēt nezināmas izcelsmes augu materiālu: saskaņā ar analīzi genotips 'R. Indrāna 3' ir šķirne 'Darius' vai šīs šķirņu brīvās apputes sēklaudzis. Izveidotā SSR molekulāro marķieru kopa var tikt izmantota *Chaenomeles* selekcijas materiāla atlasē, noteiktas pazīmes nesošu genotipu grupu ģenētisko uzbūvi, jaunizveidoto šķirņu identifikāciju, pavairojamā augu materiāla identitātes verifikācijai.



1.4.3. attēls. Krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) selekcijas materiāla ģenētiskās radniecības analīze, pielietojot 25 adaptētos SSR marķierus.

Secinājumi

- Pētījumā izveidota 25 SSR molekulāro marķieru kopa un tās pielietošanas metodika *Chaenomeles* ģints augu ģenētiskajai izpētei, šķirņu identifikācijai, raksturošanai un viendabības novērtēšanai.
- Iegūta Latvijas krūmcidoniju šķirņu un selekcijas materiāla SSR molekulāro marķieru datu kopa.
- Molekulāro marķieru metode ir piemērota pieeja krūmcidoniju šķirņu un selekcijas materiāla identifikācijai, tā unikalitātes pārbaudei, nezināmas izcelsmes genotipu atpazīšanai.
- Jauno kultūraugu kā krūmcidonijas šķirņu pavairošana rūpīgi jākontrolē, vēlams, izmantojot molekulāro marķieru metodes. Tas ļautu izvairīties no vienas šķirnes ģenētiski atšķirīgu klonu tālākas pavairošanas un izplatīšanas, kā arī šķirnes unikalitātes zaudēšanas.

Literatūra

- Amiteye S. 2021. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7, e08093, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08093.
- Bartish I.V., Jeppson N., Nybom H. 1999a. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology*, 8: 791–802.
- Bartish I.V., Rumpunen K., Nybom H. 2000. Combined Analyses of RAPDs, cpDNA and Morphology Demonstrate Spontaneous Hybridization in the Plant Genus *Chaenomeles*. *Heredity (Edinb)*, 85, 383–392, doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00773.x.
- Celton J.-M., Chagne D., Tustin S.D., Terakami S., Nishitani C., Yamamoto T., Gardiner S.E. 2009. Update on comparative genome mapping between *Malus* and *Pyrus*. *BMC Research Notes*, 2: 182, doi:10.1186/1756-0500-2-182.
- Dar A.A., Mahajan R., Sharma S. 2019. Molecular Markers for Characterization and Conservation of Plant Genetic Resources. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 89, 1755–1763.
- Górnaś P., Siger A., Segliņa D. 2013. Physicochemical Characteristics of the Cold-Pressed Japanese Quince Seed Oil: New Promising Unconventional Bio-Oil from by-Products for the Pharmaceutical and Cosmetic Industry. *Ind Crops Prod*, 48, 178–182, doi:10.1016/j.indcrop.2013.04.018.
- Granados M.V., Vila R., Laencina J., Rumpunen K.; Ros J.M. 2003. Characteristics and Composition of *Chaenomeles* Seed Oil. In *Japanese Quince – Potential Fruit Crop for Northern Europe*; Rumpunen, K., Ed.; Department of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences, pp. 127–139.
- He J., Fan J., Li S., Huang B., Ban X., Wang Y. 2014. Genetic Variability of Cultivated *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai Based on AFLP Analysis. *Biochem Syst Ecol*, 57, 445–450, doi:10.1016/j.bse.2014.09.022.
- Hellína P., Vilaa R., Jordána M.J., Laencinaa J., Rumpunen K., Rosa J.M. 2003. Characteristics and Composition of *Chaenomeles* Fruit Juice. In *Japanese Quince – Potential Fruit Crop for Northern Europe*; Rumpunen, K., Ed.; Department of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences, pp. 141–148 ISBN ISBN 91-631-3765-8.
- Kaneko Y., Nagaho I., Bang S.W., Matsuzawa Y. 2000. Classification of Flowering Quince Cultivars (Genus *Chaenomeles*) Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Breed Sci*, 50, 139–142, doi:10.1270/jsbbs.50.139.
- Khoramdel Azad M., Nasiri J., Abdollahi H. 2013. Genetic Diversity of Selected Iranian Quinces Using SSRs from Apples and Pears. *Biochem Genet*, 51, 426–442, doi:10.1007/s10528-013-9575-z.
- Liebhart R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C.D., Tarchini R., Van De Weg E., Gessler C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, 10: 217 – 241.
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Rumpunen K., Bartish I., Garkava–Gustavsson L., Nybom H. 2003. Molecular and Morphological Diversity in the Plant Genus *Chaenomeles*. In: K. Rumpunen (Ed.) *Japanese Quince – Potential Fruit Crop for Northern Europe*, Final Report FAIR-CT97-3894, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Crop Science, pp. 1–14.
- Rumpunen K., Trajkovski V., Bartish I., Garkava L., Nybom H., Laencina J., Ros J.M.,

- Jordan M.J., Hellin P., Tigerstedt P.M.A. et al. 2000. Domestication of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Acta Hort*, 345–348, doi:10.17660/ActaHortic.2000.538.59.
- Shao W., Huang S., Zhang Y., Jiang J., Li H. 2021. Comparative Transcriptomics Provides a Strategy for Phylogenetic Analysis and SSR Marker Development in *Chaenomeles*. *Sci Rep*, 11, 1–14, doi:10.1038/s41598-021-95776-z.
- Silfverberg-Dilworth E., C. L. Matasci, W. E. Van de Weg, M. P. W. Van Kaaunen, M. Walser, L. P. Kodde, V. Soglio, L. Gianfranceschi, C. E. Durel, F. Costa, T. Yamamoto, B. Koller, C. Gessler, A. Patocchi 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes* 2: 202–224
- Urbanavičiūtė I., Liaudanskas M., Bobinas Č., Šarkinas A., Reziene A., Viskelis P. 2020. Japanese Quince (*Chaenomeles japonica*) as a Potential Source of Phenols: Optimization of the Extraction Parameters and Assessment of Antiradical and Antimicrobial Activities. *Foods*, 9, 1–13, doi:10.3390/foods9081132.
- Vanwynsberghe L., Decq L., Keulemans J. 2009. Transferability of *Malus × domestica* Microsatellite Markers to Other Species and Genera of the *Maloideae* Subfamily. *Acta Hort*, 839, 567–574, doi:10.17660/ActaHortic.2009.839.78.
- Vinatzer B.A., Patocchi A., Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C. 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding*, 123: 321–326.
- Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y., Kotobuki K., Ban Y., Hayashi T., Matsuta N. 2001. SSRs Isolated from Apple Can Identify Polymorphism and Genetic Diversity in Pear. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 865–870, doi:10.1007/s001220000524.
- Yamamoto T., Kimura T., Soejima J., Sanada T., Ban Y., Hayashi T. 2004. Identification of Quince Varieties Using SSR Markers Developed from Pear and Apple. *Breed Sci*, 54, 239–244, doi:10.1270/jsbbs.54.239.
- Zang D.K., Chen H., Zheng L., 2009. Guo X.F. Analysis on the Phylogenetic Relationship of Elite Cultivars in *Chaenomeles* Using AFLP. *Scientia Silvae Sinicae*, 45, 39–43.
- Zhang Y.Y., Qi H., Guo Q.M., Sun Z.Y., Zhou F.Q., Li S.B. 2016. Analysis of Genetic Diversity in *Chaenomeles* Using Apple EST-SSRs. *Biotechnology bulletin*, 32, 93–98.

R1.5 Datu kopa par *Chaenomeles* sugu savstarpējās radniecības vērtējumu

Ievads

Chaenomeles ģints pieder *Rosaceae* dzimtas *Maloideae* apakšdzimtai ar piecām sugām – *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl., *C. cathayensis* (Hemsl.) Schneider, *C. speciosa* Nakai, *C. thibetica* Yü un *C. sinensis* (Thouin) Koehquince (Sun et al., 2020). Visas piecas *Chaenomeles* sugas ir vietējās Centrālajā un Austrumāzijā; tomēr tās audzē arī Ziemeļeiropā (Rumpunen et al., 1998; Bartish et al., 2000; Kaufmane, Ruisa, 2020). Pārsvārā augļu iegūšanai izmanto *Chaenomeles japonica* augu materiālu, šo sugu pārstāv arī visas Latvijā izveidotās šķirnes. Atsevišķos krustojumos kopīgajā Latvijas-Lietuvas-Zviedrijas selekcijas programmā pielietotas arī citas ģints sugas, piemēram *C. cathayensis*, tāpēc nākotnes selekcijas aktivitātēm ir svarīgi izprast iegūtā selekcijas materiāla sugu sastāvu. Tas ļautu prognozēt hibrīdā materiāla īpašības un izvēlēties vēlamākos. Bez pielietojuma selekcijā, citu *Chaenomeles* sugu pārstāvji varētu būt potenciāli kultūraugi specifiskiem produktiem. Tāpēc ir nepieciešamība ieviest metodes un iegūt datu kopas, kas raksturo sugas, ļauj tās atšķirt, novērtēt starpsugu krustojumus.

Materiāli un metodes

Augu materiāls

Chaenomeles ģints plašākai pārstāvniecībai un potenciālā selekcijas materiāla izvērtēšanai veikta sugu pieejamības novērtēšana Latvijā. Vienīgā pieejamā atradne bija Nacionālā botāniskā dārza (NBD) kolekcija Salaspilī, kurā bija *C. speciosa*, *C. × superba* un *C. × californica* paraugi. Sadarbībā ar NBD kolēģiem ievākti 8 citu *Chaenomeles* sugu lapu paraugi (1.5.1. tabula).

1.5.1. Tabula. **Krūmciidoniju sugu materiāls molekulāro marķieru adaptācijai un genotipēšanai**

Nr. p.k.	Parauga nosaukums	DNS numurs	Koncentrācijas	Tīrība
1	<i>Chaenomeles × superba</i>	cd 118	18.3	1.95
2	<i>Chaenomeles speciosa</i> ‘Brilliant’	cd 119	49.4	1.63
3	<i>Chaenomeles</i> ‘Scarlet’	cd 120	19.4	1.86
4	<i>Chaenomeles × superba</i> ‘Pink Trail (Interpa)’	cd 121	32.4	1.61
5	<i>Chaenomeles × californica</i>	cd 122	62.7	1.74
6	<i>Chaenomeles × superba</i> ‘Vermillion’	cd 123	42.8	1.57
7	<i>Chaenomeles × superba</i> ‘Crimson and Gold’	cd 124	26.4	1.40
8	<i>Chaenomeles × superba</i> ‘Stanford Red’	cd 125	30	1.44

Viena no *Chaeneomeles* sugām ar potenciālu selekcijā un jaunu produktu izstrādē ir *C. cathayensis*. Šīs sugas paraugi Latvijā nebija pieejami, tāpēc, izmantojot botānisko dārzu sēklu apmaiņas programmu, iegūtas šīs sugas augu sēklas no Strasbūras Universitātes botāniskā dārza Francijā, izdiedzētas un iegūti sēklaudži ģenētiskajām analīzēm (1.5.1. attēls). Rezultātā iegūti 10 šīs sugas augi, kas tālākajā analīzē iekļauti kā atsevišķi genotipi. *C. cathayensis* augus bija plānots iekļaut DI ģenētisko resursu kolekcijā tālāko pētījumu veikšanai, diemžēl Latvijas klimatiskie apstākļi nebija tiem piemēroti un iegūtie augi ārpus siltumnīcas apstākļiem gāja

bojā pirmajā ziemā pēc izvietošanas uz lauka. *Chaenomeles* sugu ģenētiskajai salīdzināšanai par *Chaenomeles japonica* sugas pārstāvjiem pielietots sadaļā R1.4 augu materiāls (1.4.1. tabula).



1.5.1. attēls No sēklām iegūtais *Chaenomeles cathayensis* pētnieciskais materiāls.

Nukleīnskābju izdalīšana

Ievāktajiem paraugiem veikta DNS izdalīšana, sasmalcinot šķidrajā slāpekļī un izmantojot Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification Kit (#K0512) reaģentu komplektu, veikta izdalītās DNS koncentrācijas un kvalitātes pārbaude, izmantojot NanoDrop ND-1000 iekārtu (mērījumu rezultāti pieejami 1.5.1. tabulā).

***Chaenomeles* sugu genotipēšana**

Chaenomeles sugu paraugu genotipēšana veikta saskaņā ar R1.4. sadaļā izstrādāto PCR metodiku un pielietojot 1.4.3. tabulā norādītos SSR marķierus. Iegūtie amplifikācijas produkti identificēti un analizēti, izmantojot ģenētisko analizatoru Applied Biosystems ABI PRISM 3100-Avant un GeneMapper® Software v4.0 (Applied Biosystems) genotipēšanai.

Statistiskā analīze

Iegūtie amplifikācijas fragmentu dati apkopoti, izmantojot MS Excel programmu, tālākai datu analīzei pielietota GenAlEx v6.5 ģenētisko datu analīzes programma (Peakall, Smouse, 2006).

Rezultāti

Chaenomeles sugu savstarpējās radniecības vērtējums

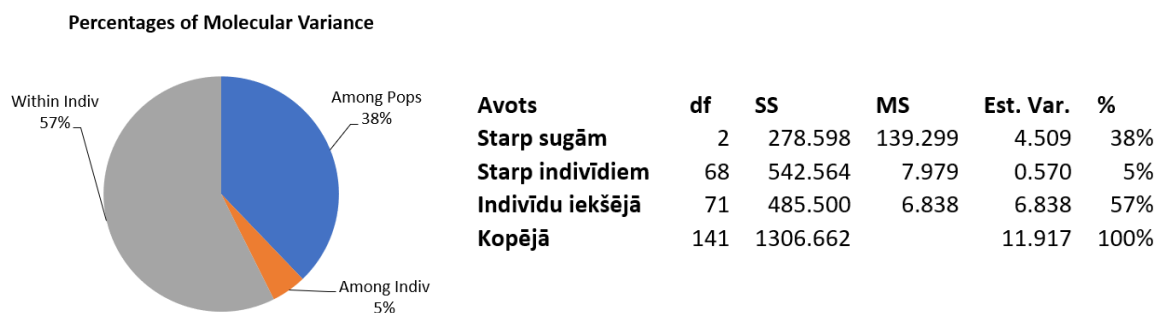
Perspektīvā selekcijas materiāla atlasei un izveidei svarīgi ir ģenētiskās izpētes rīki dažādu *Chaenomeles* ģints sugu izšķiršanai augu materiālā ar tālāku mērķi novērtēt dažādu sugu genomu klātbūtni selekcijas materiālā. Šobrīd šādi rīki *Chaenomeles* ģintij nav pieejami, līdzšinējie pētījumi ļāvuši atšķirt sugu paraugus, bet pielietotie marķieri raksturojas ar zemu atkārtotamību, kas samazina to efektivitāti. Šajā pētījumā atlasītā marķieru kopa un amplifikācijas datu kopa novērtēta arī šajā kontekstā, uzrādot augstu polimorfismu tādu *Chaenomeles* sugu grupā kā *C. × superba*, *C. speciosa* un *C. × californica*: identificēto alēļu skaits no 2 līdz 10 (vidēji 5,28), kā arī novēroto heterozigotāti no 0,125 līdz 1,000 (vidēji 0,704, 1.5.2. tabula). Analizējot šos rezultātus, jāņem vērā, ka šo grupu pārstāv tikai 8 genotipi. Savukārt 10 *C. cathayensis* paraugu grupā identificētas tikai viena vai divas alēles, un heterozigotātes līmenis bija zems (vidēji 0,112). Šāda zema ģenētiskā daudzveidība skaidrojama ar augu materiāla izcelsmi – sēklas iegūtas no viena auga, iespējams, pat no viena augļa.

1.5.2. Tabula. Molekulāro marķieru raksturojums *Chaenomeles* sugu materiāla genotipēšanai

Marķieris	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
<i>Chaenomeles</i> sp.							
CH01a09	5.000	4.000	1.474	0.875	0.750	0.800	-0.167
CH01d03	6.000	5.120	1.700	1.000	0.805	0.858	-0.243
CH03d01	4.000	2.723	1.143	1.000	0.633	0.675	-0.580
CH05e03	9.000	6.737	2.047	0.875	0.852	0.908	-0.028
CH-Vf1	10.000	8.533	2.220	0.625	0.883	0.942	0.292
CH01d09	5.000	3.879	1.461	0.750	0.742	0.792	-0.011
CH03d10	3.000	2.415	0.984	0.625	0.586	0.625	-0.067
CH01f03b	6.000	3.282	1.473	0.625	0.695	0.742	0.101
CH04f06	7.000	5.333	1.787	1.000	0.813	0.867	-0.231
CH01F02	4.000	3.161	1.240	0.571	0.684	0.736	0.164
CH01h02	3.000	1.471	0.602	0.375	0.320	0.342	-0.171
CH01g05	5.000	3.200	1.332	0.875	0.688	0.733	-0.273
CH02c02b	8.000	6.095	1.927	1.000	0.836	0.892	-0.196
CH02g01	7.000	2.844	1.450	0.875	0.648	0.692	-0.349
CH02a03	3.000	2.327	0.947	0.375	0.570	0.608	0.342
CH03b10	2.000	1.882	0.662	0.750	0.469	0.500	-0.600
CH03b06	5.000	2.667	1.244	0.750	0.625	0.667	-0.200
CH03g06	6.000	4.267	1.576	0.750	0.766	0.817	0.020
CH04g07	3.000	2.246	0.882	0.125	0.555	0.592	0.775
CH05h05	3.000	1.556	0.656	0.429	0.357	0.385	-0.200
CH05c06	3.000	2.723	1.043	0.125	0.633	0.675	0.802
CH05d03	4.000	2.560	1.125	0.750	0.609	0.650	-0.231
CH05a02_a	3.000	2.246	0.882	1.000	0.555	0.592	-0.803
CH05g11	10.000	8.000	2.187	0.750	0.875	0.933	0.143

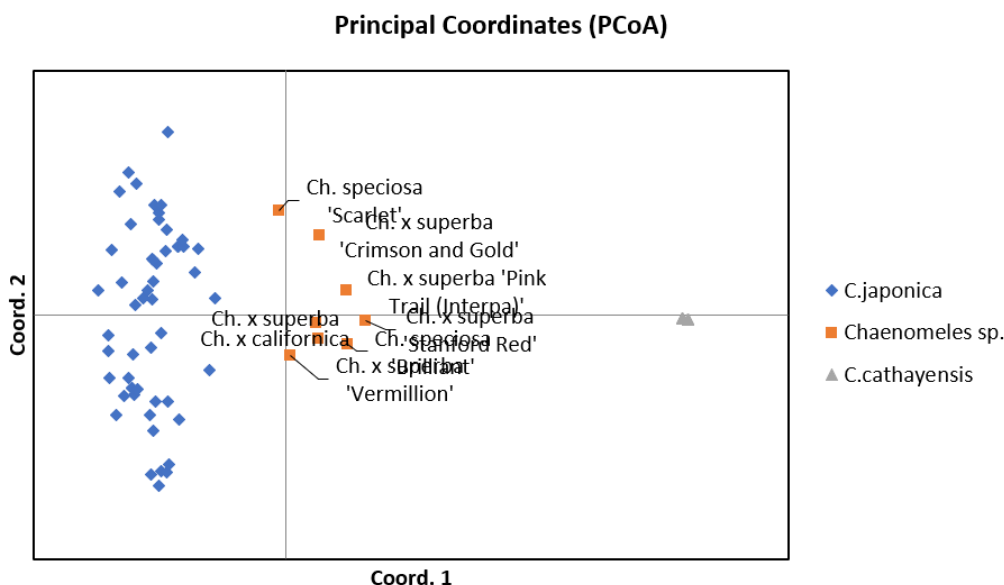
Marķieris	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
CH05g07	8.000	5.765	1.909	0.714	0.827	0.890	0.136
Vidēji	5.280	3.801	1.358	0.704	0.671	0.716	-0.063
<i>C. cathayensis</i>							
CH01a09	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH01d03	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH03d01	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH05e03	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH-Vf1	2.000	1.471	0.500	0.400	0.320	0.337	-0.250
CH01d09	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH03d10	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH01f03b	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH04f06	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH01F02	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH01h02	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH01g05	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH02c02b	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH02g01	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH02a03	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH03b10	2.000	1.471	0.500	0.400	0.320	0.337	-0.250
CH03b06	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH03g06	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH04g07	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH05h05	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH05c06	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH05d03	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
CH05a02_a	2.000	2.000	0.693	1.000	0.500	0.526	-1.000
CH05g11	2.000	2.000	0.693	1.000	0.500	0.526	-1.000
CH05g07	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—
Vidēji:	1.160	1.118	0.095	0.112	0.066	0.069	-0.625

Neatkarīgi no konstatētās iekšsugas ģenētiskās daudzveidības pielietoto marķieru kopa ļāva atšķirt šīs sistemātiskās grupas, ko apstiprina molekulārās daudzveidības analīze (AMOVA) (1.5.2. attēls) – starpsugu atšķirības bija 38%, kas ir pietiekoši lielas, lai nodrošinātu šo sugu grupu atšķiršanu, pielietojot atlasīto molekulāro marķieru kopu.



1.5.2. attēls *Chaenomeles* sugu grupu molekulārās daudzveidības analīze.

Izvēlētās marķieru kopas izšķirtspēju pierāda arī principiālo komponentu analīze (1.5.3. attēls), skaidri nodalot dažādās *Chaenomeles* sugas.



1.5.3. attēls **Krūmcidoniju sugu materiāla ģenētiskās radniecības analīze, pielietojot 25 adaptētos SSR marķierus.**

Marķieru amplificēto fragmentu datu kopa nodrošināja trīs *Chaenomeles* sugu nodalīšanu (◆ - *C. japonica* paraugi, ■ – *Chaenomeles* sugu paraugi: *C. × superba*, *C. speciosa* un *C. × californica*, ▲ – *C. cathayensis* paraugi). Šo sadalījumu apstiprina arī zināmā *Chaenomeles* sugu sistemātiskā līdzība: *C. japonica*, *C. speciosa* un *C. cathayensis* ir ģints pamatsugas, savukārt *C. × superba* (hibrīds *C. speciosa* × *C. japonica*) un *C. × californica* (trīs sugu hibrīds *C. × superba* × *C. cathayensis*). Šīs sistemātiskās likumsakarības tika parādītas arī ar atlasīto SSR marķieru analīzi.

Pētījuma rezultāti apkopoti un iekļauti starptautiskas zinātniskas publikācijas manuskriptā, rezultāti demonstrēti konferencē “Starptautiskais laikmetīgās dārzkopības simpozījs” 2023”, 2023. gada 26. janvārī, kas norisinājās Bulduros. Ziņojuma tēma “Development of tools for *Chaenomeles* germplasm genetic evaluation”, autori G. Lācis, K. Kārklīņa un E. Kaufmane. Pētījuma rezultāti integrēti DI krūmcidoniju selekcijas programmā un tiek pielietoti jaunu šķirņu izveidē: vecākaugu atlasē, hibrīdā materiāla testēšanā.

Secinājumi

- Pētījumā izveidota 25 SSR molekulāro marķieru kopa un tās pielietošanas metodika *Chaenomeles* ģints sugu ģenētiskajai izpētei un raksturošanai.
- Iegūta krūmcidoniju sugu un starpsugu krustojumu SSR molekulāro marķieru datu kopa.
- Izstrādātā molekulāro marķieru metode ir piemērota dažādu *Chaenomeles* sugu atšķiršanai, pielietojama sistemātikas un augu klasifikācijas pētījumos.

Literatūra

- Bartish I.V., Garkava L.P., Rumpunen K., Nybom H. 2000a. Phylogenetic Relationships and Differentiation among and within Populations of *Chaenomeles* Lindl. (*Rosaceae*) Estimated with RAPDs and Isozymes. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 554–563, doi:10.1007/s001220051515.
- Kaufmane E., Ruisa S. 2020. Breeding of New Cultivars of the Fruit Crop Japanese Quince (*Chaenomeles japonica*) in Latvia. *Acta Hortic*, 1281, 51–57, doi:10.17660/ActaHortic.2020.1281.9.
- Rumpunen K., Kviklys D., Kaufmane E., Garkava L. 1998. Breeding *Chaenomeles* - a new aromatic fruit crop. *Acta Hortic*, 211–216, doi:10.17660/ActaHortic.1998.484.36.
- Sun J., Wang Y., Liu Y., Xu C., Yuan Q., Guo L., Huang L. 2020. Evolutionary and Phylogenetic Aspects of the Chloroplast Genome of *Chaenomeles* Species. *Sci Rep*, 10, 1–10, doi:10.1038/s41598-020-67943-1.

R 1.6. Iegūta kallu *in vitro* pavairošanas sākumposmu tehnoloģisko komponentu efektivitātes datu kopa

Ievads

Kallas ir dekoratīvi kallu dzimtas telpaugi, kas Latvijā pazīstami kopš 19. gs. 20. gadiem, bet plašāk audzēti no 20. gs. sākuma. Lai gan Latvijā aug arī kallu savvaļas radnieks – purva cūkausis (*Calla palustris*), grieztajiem ziediem parasti audzē kultūraugu dižkallas (*Zantedeschia* sp.). Pasaulē ir zināmas septiņas dižkallu sugas. Savvaļā sastopamas tikai Āfrikas dienvidu un austrumu daļā, kur tās aug strautu malās un palienēs. Kallas parasti audzē mājās uz palodzes, siltumnīcās un plaši izmanto gan kāzu, gan bērnu floristikā. Aptuveni 2012.-2013. gadā vietējā populācijā augiem parādījās bojājumi un izkropļota augšana, kā rezultātā augi zaudēja dekoratīvās īpašības. Laiks sakrita ar jaunu *Zantedeschia* šķirņu atvešanu uz Latviju no stādaudzētavām Nīderlandē un Vācijā, kas varētu liecināt par vīrusu ieviešanu kopā ar jauno augu materiālu. Fitopatoloģijas pētījumos kallām (*Zantedeschia* sp.) ir aprakstīti vismaz 16 kallu vīrusi.

Pavairojot kallas ar augu audu kultūru metodēm, būtu iespējams saglabāt Latvijā esošo genotipu, kā arī mēģināt to atveseļot – pavairojot ar meristēmām, varētu cerēt, ka augi ir brīvi no vīrusiem. Kallas var pavairot ar augu audu kultūru metodēm, par eksplantiem izmantojot sakneņu sīkpumpura apikālo meristēmu ar pirmajiem lapu aizmetņiem (Chang et al., 2003; Ribeiro et al., 2014).

Materiāli un metodes

Augu materiāls ievākts Bulduru Dārzkopības vidusskolas siltumnīcās, nomazgāts tekošā ūdenī ar ziepēm un apgriezts. Izmēģināti vairāki sterilizēšanas protokoli (1.6.1. tabula)

1.6.1. tabula. Izmēģinātie augu materiāla sterilizēšanas protokoli

variants	etanols	liesma	Domestos	Mucasol	H2O2	apgriezti
A	30s70%		10min 10%			
B			15min 15%+10min 15%			+
C	45s 70%		15min 15%	5min 10%		+
D			15 min 15%+10min 15%		5min 5%	+
E	1 min 96% +1min96 %	2x	10 min 15%			+

Dzinumu kultūra uzsākta, izmantojot MS (Murashige and Skoog, 1962) barotni, kurai pievienots papildus agars 6 g/L, saharoze 30 g/L, 6-benzil-aminopurīns (BAP) 3 mg/L (Kulpa, 2016). pH pirms autoklāvēšanas 5,7 (pH regulēšanai izmantots NaOH un HCl). Augu materiāls ievietots mēģenēs (50 ml) un mēģenes novietotas audzēšanas telpā ar temperatūru 25 +/- 2° C, ar fotoperiodu 16h/8h diena/nakts. Aptuveni četras nedēļas pēc dzinumu kultūras uzsākšanas augu materiālu pārlīca uz proliferācijas barotnes. Pārlikšanu uz svaigas proliferācijas barotnes veica reizi 4-5 nedēļās. Proliferācijas barotnei izmēģinātas vairākas augšanas regulatoru kombinācijas (1.6.2. Tabula).

1.6.2. Augšanas regulatoru kombinācijas, kas izmēģinātas dzinumu proliferācijai

	A	B	C
BAP	3mg/l	2.5mg/l	2.5mg/l
IAA		2mg/l	
IBA			2mg/l

Apsakņošanai un aklimatizācijai izmēģinātas divas barotnes. ½ MS makroelementi, MS mikroelementi un vitamīni. Pirmajai barotnei pievienoja NAA 1 mg/L (Kulpa, 2016), bet otrai 200 mg/L ogles (Singh et al., 2009). Otro variantu novietoja pirmās trīs dienas tumsā, tad pārvietoja uz audzēšanas plauktu gaismā. Apsakņošanās notika 5 nedēļu laikā. Pēc 5 nedēļām augu materiālu pārstādīja kūdras substrātā paaugstināta mitruma apstākļos un aptuveni divu nedēļu laikā, pakāpeniski uzsākot vēdināšanu, aklimatizēja.

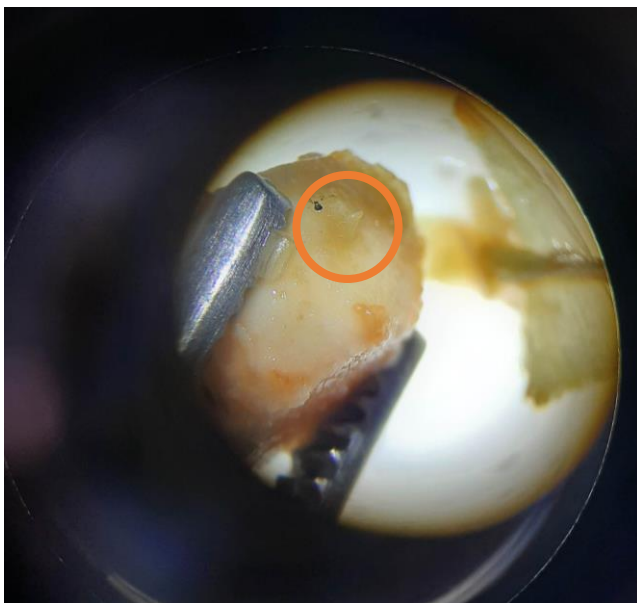
Rezultāti

Sterilizēšana – Darba gaitā pārbaudīja vairākus eksplantu sterilizēšanas protokolus un par sekmīgāko atzina protokolu ar divkārtu sterilizēšanu: sakneņus ievāc no siltumnīcā augušiēm mātes augiem, rūpīgi nomazgā tekošā ūdenī ar ziepēm un apgriež (1.6.3. tabula). Laminārā boksā sterilos apstākļos sakneņu fragmentus divreiz iemērc uz 1 minūti 96% etanolā un apdedzina, tad augu materiālu vēlreiz uzmanīgi apgriež un sterilizē 10 minūtes 15% Domestos šķīdumā, kuram pievienots piliens Tween 20. Pēc sterilizācijas sakneņus skalo trīs reizes dejonizētā, sterilā ūdenī. Pēc šī protokola sterilizēti eksplanti nodrošina *in vitro* kultūras sterilitāti 50% paraugu.

1.6.3. tabula. **Dažādu eksplantu sterilizēšanas protokolu efektivitāte**

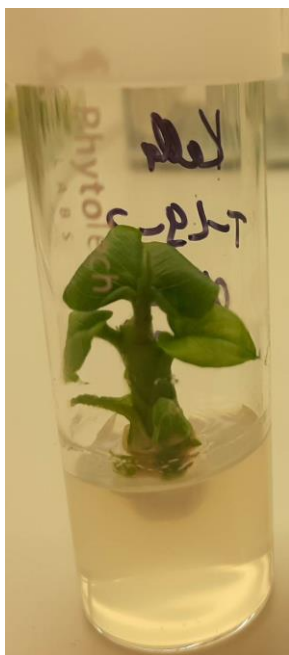
variants	etanols	liesma	Domestos	Mucasol	H2O2	apgriezti	sterili
A	30s70%		10min 10%				22%
B			15min 15%+10min 15%			+	25%
C	45s 70%		15min 15%	5min 10%		+	37%
D			15min 15%+10min 15%		5min 5%	+	25%
E	1min 96% +1min 96%	2x	10min 15%			+	50%

Aplūkojot iegūtos rezultātus par vīrusiem, R.1.7. sadaļā sterilizēšanas protokolu vēl uzlaboja. Sakneņus pēc mazgāšanas iemērcā 45 s 70% (v/v) etanolā, kam sekoja 5 min 10% Mukasola šķīdumā, 15 min 15% Domestos šķīdumā un skalošana trīs reizes autoklavētā, dejonizētā ūdenī. Augu materiālam nogrieza ārējo slāni un atkārtoti sterilizēja 10 min 15% Domestos šķīdumā un trīs reizes skaloja autoklavētā, dejonizētā ūdenī.



1.6.1. attēls. **Kallas eksplants *in vitro* kultūras uzsākšanai.**

Proliferācijas barotnes. Salīdzinot proliferācijas barotnes, noteica multiplikācijas skaitli – cik jaunie dzinumi veidojas no viena mātes auga. C barotne (2,5 g/L BAP un 2 g/L IBA) bija visvājākā – multiplikācijas skaitlis 1,25, kurai sekoja B (3 mg/L BAP) un A barotne (2,5mg/L BAP un 2 mg/L IBA) ar multiplikācijas skaitļiem 1,7 un 1,5.



1.6.2. attēls. **Kallu dzinumu kultūra.**

Apsakņošana. Salīdzinot abas barotnes, nenovēroja atšķirības. Abās barotnēs augi veidoja saknes un bija aklimatizējami. Ērtības labad nākotnē izvēlējamies izmantot barotni ar NAA 1 mg/L – nav atkārtoti jāpārceļ statīvi no gaismas tumsā, kā arī audzēšanas traukos nav ogle un tie ir vieglāk izmazgājami.



1.6.3. Attēls. **Apsakņots un aklimatizēts kallu jaunaugs.**

Secinājumi

- Kallas iespējams pavairot izmantojot *in vitro* metodes.
- Augu materiālu sterilizē: iemērc 45 s 70% (v/v) etanolā, kam seko 5 min 10% Mukasola šķīdumā, 15 min 15% Domestos šķīdumā un skalošana trīs reizes autoklavētā, dejonizētā ūdenī. Augu materiālam nogriež ārējo slāni un atkārtoti sterilizē 10 min 15% Domestos šķīdumā un trīs reizes skalo autoklavētā, dejonizētā ūdenī.
- Kā pavairošanas barotnes var sekmīgi izmantot MS barotni, kurai pievieno 3 mg/L BAP vai 2,5mg/L BAP un 2 mg/L IBA.
- Apsakņošanai izmanto MS barotni, kurai pievieno NAA 1 mg/L vai 200 mg/L ogli.

Literatūra

- Chang, H.S., Charkabarty, D., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. (2003). Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via in vitro shoot tip proliferation. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant.* 39, 129–134.
- Kulpa, D. (2016). Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia rehmannii*). *Folia Hortic.* 28 (2), 181–186 <https://doi.org/10.1515/fhort-2016-0021>.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 (3), 473–497 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Ribeiro, M.D.N.O., Pasqual, M., da Silva, A.B., and Rodrigues, V.A.(2014). Propagaça o in vitro de copo-de-leite: sulfato de adenina e 6-benzilaminopurina. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.* 20 (1), 21 <https://doi.org/10.14295/rbho.v20i1.660>
- Singh, M., Rathore, M.S., Choudhary, K., and Shekhawat, N.S. (2009). Direct shoot bud formation and tuberization from aseptically cultured root tubers of calla lily (*Zantedeschia aethiopica* L). *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 18 (2), 203–207 <https://doi.org/10.1007/BF03263320>

R 1.7 Iegūta datu kopa par vīrusu spektru vietējā kallu ģenētiskajā materiālā

Ievads

Kallas viegli pavairot veģetatīvi – gan ar tradicionālām metodēm, atdalot jaunus dzinumus no sakneņa, gan ar mikropavairošanu, tomēr kallu pavairošanu apgrūtina vīrusu klātbūtne. Fitopatoloģijas pētījumos kallām (*Zantedeschia* sp.) ir aprakstīti vismaz 16 kallu vīrusi: Calla lily chlorotic spot virus (CCSV), Calla lily latent virus (CLLV), Capsicum chlorosis virus (CaCV), Eggplant mottled crinkle virus (EMCV), Cucumber mosaic virus (CMV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), Bean yellow mosaic virus (BYMV), Dasheen mosaic virus (DsMV), Konjac mosaic virus (KoMV), Lily mottle virus (LMOV), Turnip mosaic virus (TuMV), Zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV), Carnation mottle virus (CarMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Potato virus X (PVX), Tobacco rattle virus (TRV) (Hu et al., 2010; Luvisi et al., 2016; Sastry et al., 2019). Šie vīrusi galvenokārt pieder pie *Potyviridae*, *Bunyaviridae* un *Tombusviridae* (Huang et al., 2007; Sastry et al., 2019). Tie ietekmē augu dekorativitāti, bojā ziedus un lapas, samazina ziedu skaitu, izmēru un kvalitāti (1.7.1. attēls). Šie bojājumi ievērojami ietekmē pušķkopības nozari. Līdz šim kallu vīrusi Latvijā nav pētīti. Pētījuma mērķis ir identificēt kallu slimības izraisošos vīrusus Bulduru Dārzkopības vidusskolas siltumnīcā.



1.7.1. attēls. Kallas ar vīrusu pazīmēm.

Materiāli un metodes

Pētījumā izmantoja Bulduru Dārzkopības vidusskolas siltumnīcā augošās kallas. Vīrusu klātbūtni augu materiālā noteica, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes, izdalot RNS ar Thermo Scientific™ GeneJET Plant RNA Purification Kit, veicot reverso transkripciju ar Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. PĶR reakcijai izmantojot Solis BioDyne HOT FIREPol® Blend Master Mix, reakcijas režīms: 5 min 96°C; 35 cikli – 30 s 95°C, 30 s 52°C, 30 s 72°C; 7 min 72°C. Rezultāti vizualizēti uz 1,5 % agarozes gēla.

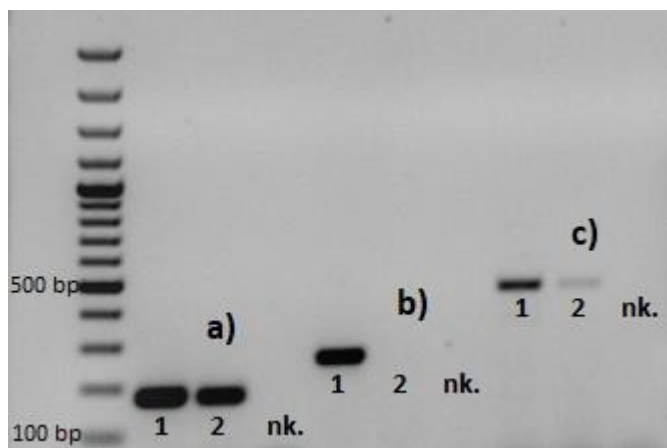
Lai atbrīvotos no vīrusu klātbūtnes kallās, izmēģināta arī termoterapija. *In vitro* augi turēti termostātā 37°C 14 dienas. Pēc tam no šiem augiem atkārtoti izgriezta meristēma un uzlikta uz barotnes.

1.7.1. tabula. **Vīrusi, kuri meklēti kallu materiālā, un izmantotie praimeris**

Vīruss		Praimeris uz priekšu		Reversais praimeris	atsauce
TSWV	L1	AATTGCCTTGCAAC CAATTC	L2	ATCAGTCGAAA TGGTCGGCA	Mumford et al., 1994
ZaMMV	ZUNF 2	GATTCTCGACCTGG CTCATC	ZUNR1	GTCCTTCACGA GTTTAGAGC	Hu et al., 2010
KoMV	ZF3	CCGCCCTGCAAAGC GCAAAC	ZR0	CTCCTATTTAA AAGACATGACT CG	Hu et al., 2010
DsMV	DF2	GACTTCTATGAGGT CAATTC	DR0	TTGAACACCGT GCACGAAGCAT C	Hu et al., 2010
TuMV	TuCPF 1	GCAGGTGAGACGCT TGATGCAGG	TuR0	TGTCCCTTGCA TCCTATCAAAT GTT	Hu et al., 2010
PVX	PVX4	TAGCACAACACAGA CCACAG	PVX 3	GGCAGCATTCA TTTCAGCTTC	Nie and Singh, 2001
CMV	CMV1 F	AGAGAGTAGGTACA ACGAAGGAGG	CMV1R	ACGTTCTCGAA GGCATCTCTGG AA	Maoka et al., 2010
TRV	TRV-262 F	GACGTGTGTACTCA AGGGTT	TRV-261 R	CAGTCTATACA CAGAAACAGA	Robinson, 1992
Control nad5 mRNA	mtF2	GCTTCTTGGGGCTTC TTGTTTCGATA	mtR1	ATCTCCAGTCA CCAACATTGGC AT	Lee and Chang, 2006.1.7.1

Rezultāti

Identificēti divi vīrusi: DsMV (Dasheen mosaic virus), kas pasaulē ir plaši izplatīts, un KoMV (Konjac mosaic virus) jeb ZaMV (Zantedeschia mosaic virus). Iepriekš KoMV konstatēts kallām Japānā, Taivānā, Ķīnā, Nīderlandē, Jaunzēlandē, Vācijā, Korejā, Brazīlijā (Sastry et al., 2019), Ungārijā (Agoston et al., 2019). Kontroles fragmenta garums pēc literatūras 185 bp, DsMV fragmenta garums 457 bp, KoMV fragmenta garums 260 bp, kas arī atbilst iegūtajiem rezultātiem.



1.7.2. attēls. a) *nad5* mRNA (kontrolē); b) KoMV; c) DsMV, nk-negatīvā kontrolē.

Secinājumi

Kallās ar morfoloģiskām izmaiņām (lapu forma, krāsojums, kropļota zieda forma) atrasti augu vīrusi – KoMV un DsMV, augu bojājumi tiešām saistīti ar vīrusa klātbūtni. Meristēmas ievadīšana, kā arī termoterapija nav pietiekama, lai atbrīvotos no vīrusiem.

Literatūra

- Agoston, J., Alma si, A., Sala nki, K., and Palkovics, L. (2019). First report of konjac mosaic virus in *Zantedeschia* from Hungary. *J. Plant Pathol.* 101 (4), 1217–1217
<https://doi.org/10.1007/s42161-019-00279-6>
- Hu, W.C., Huang, C.H., Lee, S.C., Wu, C.I., and Chang, Y.C. (2010). Detection of four calla potyviruses by multiplex RTPCR using nad5 mRNA as an internal control. *Eur. J. Plant Pathol.* 126 (1), 43–52 <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9519-y>
- Lee, S., and Chang, Y. (2006). Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA. *Plant Pathol.* 15, 187–196
- Maoka, T., Sugiyama, S., Maruta, Y., and Hataya, T. (2010). Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 potato viruses. *Plant Dis* 94 (10), 1248–1254
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-09-0787>. PubMed
- Mumford, R.A., Barker, I., and Wood, K.R. (1994). The detection of tomato spotted wilt virus using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 46 (3), 303–311
[https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)90002-7). PubMed
- Robinson, D.J. (1992). Detection of tobacco rattle virus by reverse transcription and polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 40 (1), 57–66
[https://doi.org/10.1016/0166-0934\(92\)90007-Z](https://doi.org/10.1016/0166-0934(92)90007-Z). PubMed
- Sastry, K.S., Mandal, B., Hammond, J., Scott, S.W., and Briddon, R.W. (2019). *Encyclopedia of Plant Viruses and Viroids* (New Delhi: Springer India).

R1.8. Izstrādāts leizejas *in vitro* pavairošanas sākumposmu tehnoloģiskais koncepts

Ievads

Saflora leizeja *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin pieder asteru *Asteraceae* dzimtai. Tas ir daudzgadīgs lakstaugš, kas savvaļā sastopams Altajā un Sibīrijas dienvidos, kur aug kalnu pļavās 1200-2300 m virs jūras līmeņa (Kokoska and Janovska, 2009). Vēsturiski austrumu medicīnā izmanto sakņu preparātus, kas stimulē centrālo nervu sistēnu, tonizē organismu un ietekmē dažādu orgānu sistēmu funkcinēšanu. Leizeju lieto arī kā pārtikas piedevu (Timofeev, 2006). Pēdējos 50 gados ir pētīts galvenokārt leizejas sakņu un sēklu ķīmiskais sastāvs un tā ietekme uz cilvēku (Kokoska and Janovska, 2009; Todorova et al., 2022). Farmakoloģiski aktīvo savienojumu iegūšanai ir nepieciešams atbilstošs augu materiāls, tādēļ ir veikti pētījumi arī par augu pavairošanu, tajā skaitā, *in vitro* metodes (Zand et al., 2014), ietverot arī biomasas iegūšanu (Skala et al., 2015) un ģenētisko transformāciju (Skala et al., 2019). Lai iegūtu prognozējamu bioloģiskā materiāla daudzumu, ir nepieciešama leizejas pavairošanas metožu optimizācija, tādēļ pētījuma mērķis ir noskaidrot leizejas pavairošanas iespējas ar augu audu kultūru metodēm.

Materiāli un metodes

Sēklu diedzēšana un sterilas kultūras iegūšana

Saflora leizejas (*Rhaponticum carthamoides*) *in vitro* kultūras ieguva, diedzējot Z/S “Kurmīši” ievāktas sēklas. Sēklu dezinficēšanai izmēģināja divas variantu sērijas: 1) dažādu dezinficēšanas ilgumu un 2) barotnes komponentes, kas aizkavē infekciju attīstību. Sēklu diedzēšanai izmanto Murashiges-Skuga (MS) barotni (Murashige and Skoog, 1962), kam pievienota saharoze 30 g/l, giberelskābe 0,1 mg/l, kinetīns 0,02 mg/l un agars 7,5 g/l (Plant agar, Duchefa Biochemie). Barotnes pH 5,7. Sēklas novieto uz barotnes – pa vienai mēģenēs, kuru augstums ir 15 cm un diametrs 2,5 cm. Mēģenes ir aizvērtas ar alumīnija foliju.

Barotni autoklāvē 20 minūtes 121 °C temperatūrā. Audzē 4 nedēļas, audzēšanas telpā 16±2 °C temperatūra, gaisma – 16 stundas, apgaismojums – 3000 lx virs audzēšanas traukiem.

Variantu sērijas:

1. Sēklu dezinficēšanas ilgums

Sēklas pirms dezinficēšanas 24 h mērcē tekošā krāna ūdenī, pēc tam noņem apvalku. Darbu turpina sterilos apstākļos laminārajā boksā (Kojair, BW-130 standart). Sēklas dezinficē 15 sekundes 70% etanolā, kam seko sterilizācija 5% nātrija hipohlorītā (NaOCl, aktīvā viela šķīdrajā veļas balinātājā ACE, Procter&Gamble) un skalo 3 reizes dejonizētā sterilā ūdenī. Dezinficēšanas ilguma varianti: 10, 15, 20, 25 un 30 minūtes.

2. Barotnes komponentes, kas aizkavē infekciju attīstību *in vitro*

Sēklas pirms dezinficēšanas 24 h mērcē tekošā krāna ūdenī, pēc tam pusei sēklu noņem apvalku, otrai pusei atstāj. Darbu turpina sterilos apstākļos laminārajā boksā. Sēklas sterilizē

15 sekundes 70% etanolā, 30 min 5% nātrija hipohlorītā NaOCl, skalo 3 reizes dejonizētā sterilā ūdenī.

Lai novērstu infekciju attīstību, dziedzēšanas barotnei pievieno:

- a) PPM (Plant preservative mixture) 2ml/l,
- b) antibiotikas (pievieno pēc autoklāvēšanas):
 - Nystatin 10 mg/l (Duchefa Biochemie),
 - Cephalixin Monohydrate 10 mg/l (Duchefa Biochemie).

Kultūras pavairošana *in vitro*

Pavairošanai izmanto Murashiges-Skuga (MS) barotni (Murashige and Skoog, 1962), kam pievienota saharoze 30 g/l, indolil-3-etiķskābe (IES), 6-benzilaminopurīns (BAP), indol-3-sviestskābe (ISS) un agars 7,5 g/l (Plant agar, Duchefa Biochemie). Barotnes pH 5,7.

Kultūru pavairo, dalot rozetes ik pēc 5 nedēļām un mikroštādus spraužot vertikāli barotnē. Kultivēšanas trauki 200 ml stikla burciņas, aizvērtas ar alumīnija foliju. Vienā traukā 5 mikroštādi. Audzēšanas telpā 23 ± 2 °C temperatūra, gaiss – 16 stundas, apgaismojums – 3000 lx virs audzēšanas traukiem.

Augšanas regulatoru ietekmi uz dzinumu augšanu pārbaudīja, barotnei pievienojot augsnius IES, ISS un citokonīnu BAP dažādās kombinācijās:

1. BAP 0,2 mg/l un IES 0,1 mg/l;
2. BAP 0,2 mg/l un IES 0,5 mg/l;
3. BAP 0,2 mg/l un IES 1 mg/l;
4. BAP 0,5 mg/l un IES 0,1 mg/l;
5. BAP 1 mg/l un IES 0,1 mg/l;
6. BAP 0,2 mg/l un ISS 0,1 mg/l;
7. BAP 0,2 mg/l un ISS 0,5 mg/l;
8. BAP 0,2 mg/l un ISS 1 mg/l;

Jaunstādu iegūšana

Dzinumus, kas izauguši *in vitro*, apsakņo un aklimatizē *ex vitro*. Substrātu samitrina un pilda 13x17 cm dēstu kastēs. No *in vitro* audzēšanas traukiem mikroštādus izņem (1.8.1. attēls, a) un stādīšanas laikā tur traukā ar ūdeni. Vienā dēstu kastē iestāda 20 mikroštādus.

Pirmo mēnesi štādus tur audzēšanas telpā ar 23 ± 2 °C temperatūrā, gaiss 16 stundas diennaktī, apgaismojums virs audzēšanas plaukta – 3000 lx. Lai nodrošinātu mitrumu, audzēšanas plaukti ir nosegti ar polietilēna plēvi (1.8.1. attēls, b), gaisa relatīvais mitrums 99%. Kad štādi apsakņojušies, audzēšanu turpina siltumnīcā (1.8.1. attēls, c), kurā ir 18 ± 2 °C temperatūra. Laista ar istabas temperatūras ūdeni.



1.8.1. attēls. Saflora leizejas dzinumu apsākņošana un aklimatizācija *ex vitro*: a – mikrostāds pirms likšanas substrātā; b – apsākņošana un aklimatizācija 1. mēnesī; c – jaunstādu audzēšana LU Botāniskā dārza Augu bioloģijas laboratorijas siltumnīcā.

Variantu sērijas:

1. Mikrostādu apsākņošana pēc izņemšanas no pavairošanas barotnes, tos pārstādot uz *in vitro* pavairošanas barotni bez hormoniem un audzējot četras nedēļas (telpas apstākļi – kā *in vitro* pavairošanai), pēc tam cerus dalot un stādot substrātā. Apsākņošanai izmēģināti 4 dažādi substrāti:

- KKS-U (kūdras substrāts 0-7 mm, pH 5,2-6, SIA Laflora);
- KKS-M1 (kūdras substrāts 0-7 mm, pH 4,1-4,9, SIA Laflora);
- EKO kūdra (naturāla sūnu kūdra 0-35 mm, pH 2,9-3,5, SIA Laflora), ko neitralizē ar krītu līdz pH 4,8;
- KKS (neitralizēta kūdra 0-35 mm, pH 5,5-6,5, SIA Laflora).

2. Mikrostādu apsākņošana KKS-U (0-7 mm, pH 5,2-6, SIA Laflora) kūdras substrātā pirms tam tos:

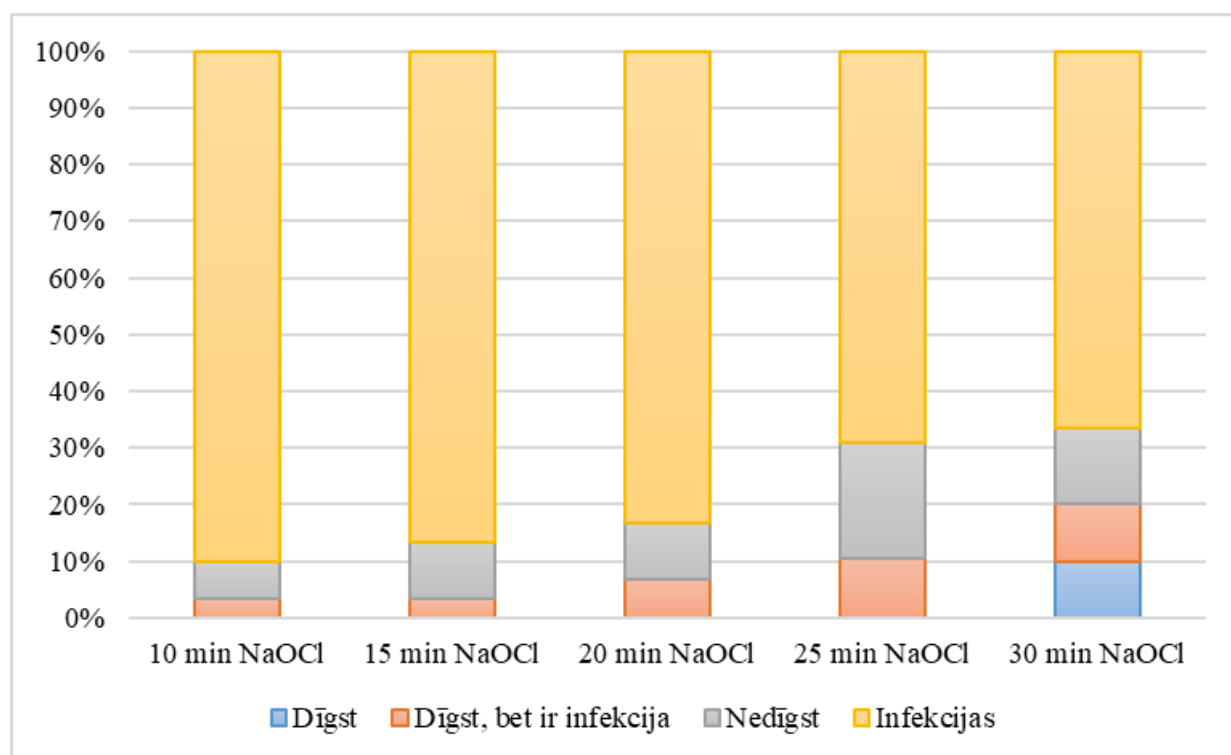
- 4 nedēļas audzējot uz *in vitro* pavairošanas barotni bez hormoniem, pēc tam stādot kūdras substrātā pusei stādu atstājot saknes, pusei saknes nogriežot;
- 4 nedēļas audzējot uz *in vitro* pavairošanas barotnes, kurai pievienota indolil-3-sviestskābe (ISS) 0,5 mg/l, stādot kūdras substrātā pusei stādu atstājot saknes, pusei – saknes nogriežot.

Rezultāti

Sēklu diedzēšana un sterilas kultūras iegūšana

1. Sēklu dezinficēšanas ilgums

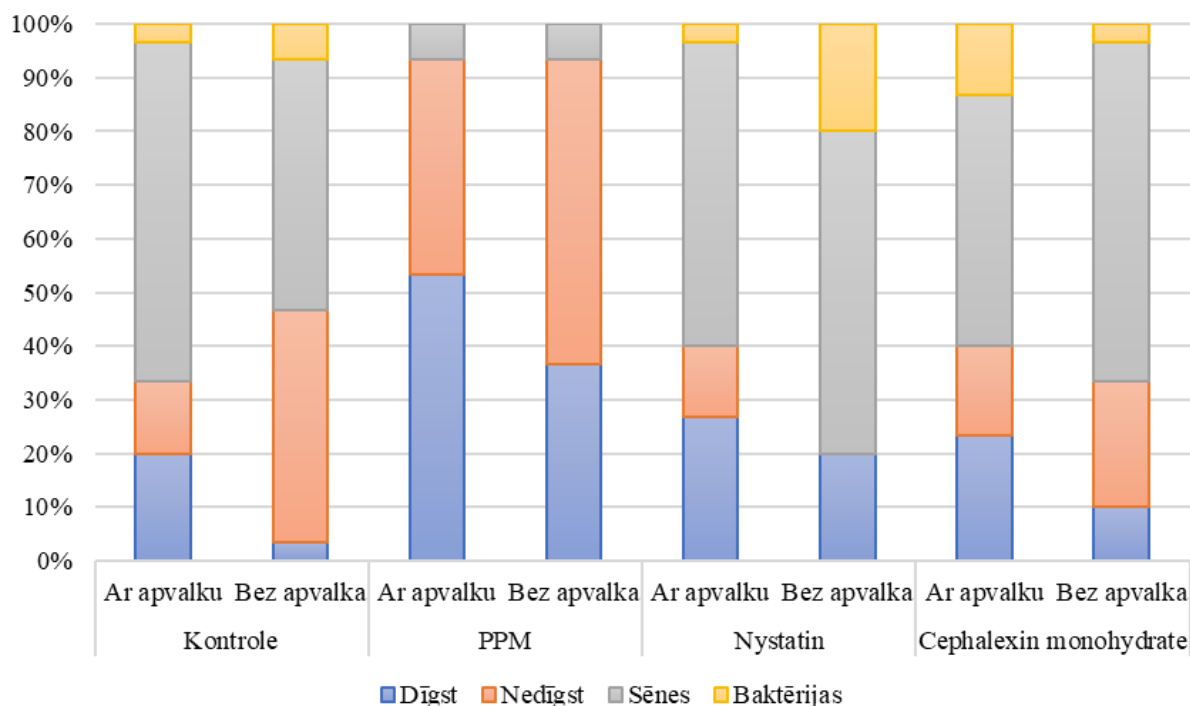
Sekmīgas Saflora leizejas *in vitro* kultūras iegūšanai primārais solis ir atrast pareizo sēklu dezinficēšanas ilgumu, kas nodrošinātu gan *in vitro* kultūras sterilitāti, gan neizraisītu dīglu bojāeju. Eksperimentā noskaidrojās, ka arī pēc 30 min NaOCl sterilizēšanas bez infekcijas izdīguši tikai 10% sēklu (1.8.2. attēls), pārējos sterilizēšanas variantos neizdevās iegūt sterilas sēklas, tāpēc bija nepieciešams domāt par citiem faktoriem sēklu sterilitātes nodrošināšanai.



1.8.2. attēls. Sterilizēšanas ilguma ietekme uz Saflora leizejas (*Rhaponticum carthamoides*) sēklu attīstību 28. dienā pēc sēklu uzlikšanas uz barotnes.

2. Barotnes komponentes, kas aizkavē infekciju attīstību *in vitro*

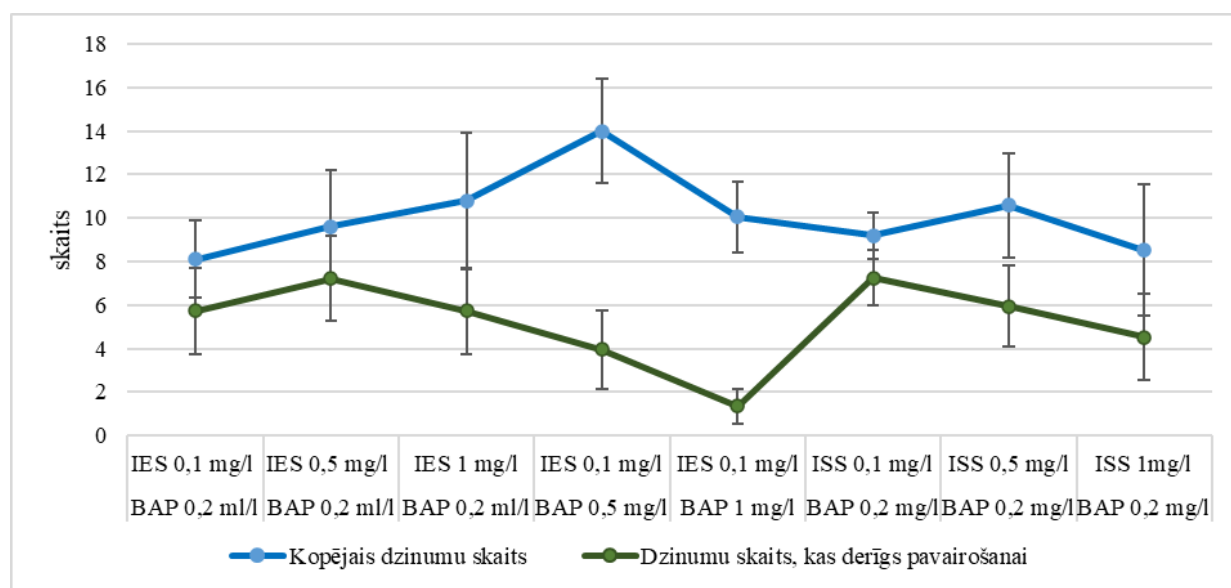
Infekcijas attīstības aizkavēšanai izmēģinātas trīs barotnes komponentes: PPM (Plant preservative mixture) (plaša spektra biocīds, kas traucē mikroorganismu attīstību) un divu veidu antibiotikas: Nystatin (fungicīds) un Cephalexin monohydrate (baktericīds). Salīdzinot ar kontroles variantu, kur nekas netika pievienots, labākie rezultāti iegūti izmantojot PPM (1.8.3. attēls), izdīguši 53% no sēklām ar apvalku un 37% no sēklām bez apvalka, pierādot, ka sēklu apvalkam nav ietekmes uz dīgšanu. Kā arī jāņem vērā, ka abos variantos infekcijas veidošanās novērojama 7% sēklu. Antibiotiku izmantošana nedeva vēlamos rezultātus, jo salīdzinājumā ar kontroli arī antibiotiku variantos novērojama plaša infekciju attīstība (1.8.3. attēls). Iespējams, tas skaidrojams ar to, ka antibiotikas barotnē salīdzinoši ātri sadalās un nesaglabā savu efektu visā sēklu dīgšanas periodā.



1.8.3. attēls. Mainīgā barotnes komponenta ietekme uz sēklu dīgšanu un infekciju attīstību 28. dienā pēc sēklu uzlikšanas uz barotnes.

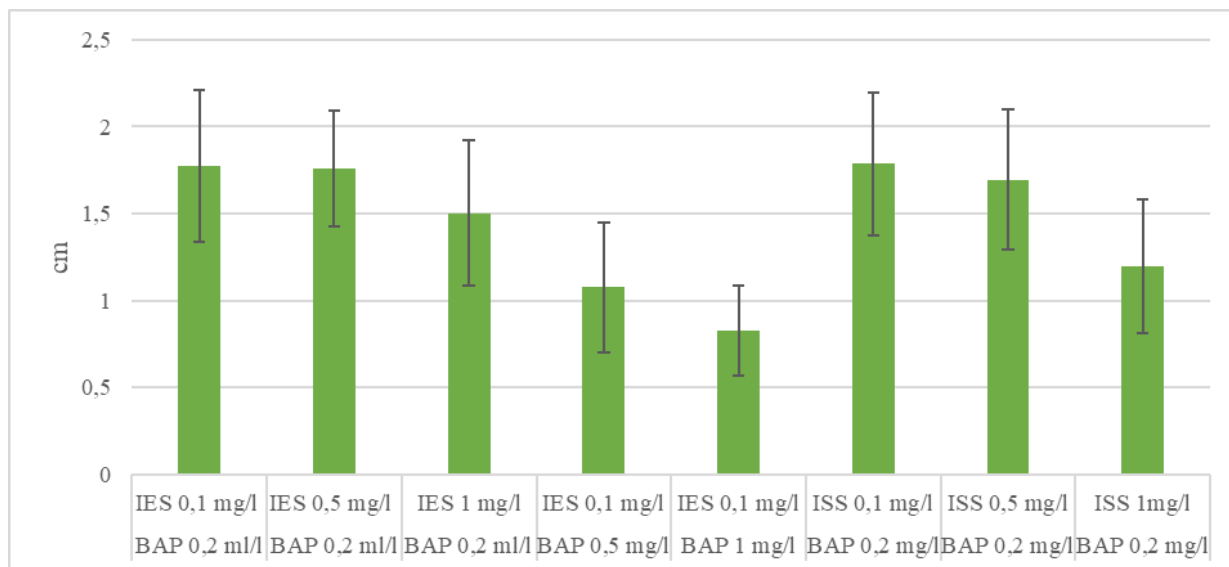
Kultūras pavairošana *in vitro*

Saflora leizejas pavairošanas procesā svarīgi atrast auksīnu un citokinīnu koncentrāciju, pie kuras no viena pārlikta mikrostāda ceru dalīšanās rezultātā iegūtu pēc iespējas vairāk tālākai pavairošanai derīgus stādus. No astoņiem izmēģinātajiem variantiem, lielākais dzinumu skaits iegūts, ja barotnei ir pievienots IES 0,1 mg/l un BAP 0,5 mg/l (1.8.4. attēls), bet šajā variantā lielākā daļa dzinumu ir īsi (1.8.5. attēls) un nav derīgi tālākai pavairošanai, kā arī novērojama vitrifikācija.



1.8.4. attēls. Viena mikroštāda vidējais dzinumu skaits atkarībā no augsīnu un citokinīnu koncentrācijas barotnē.

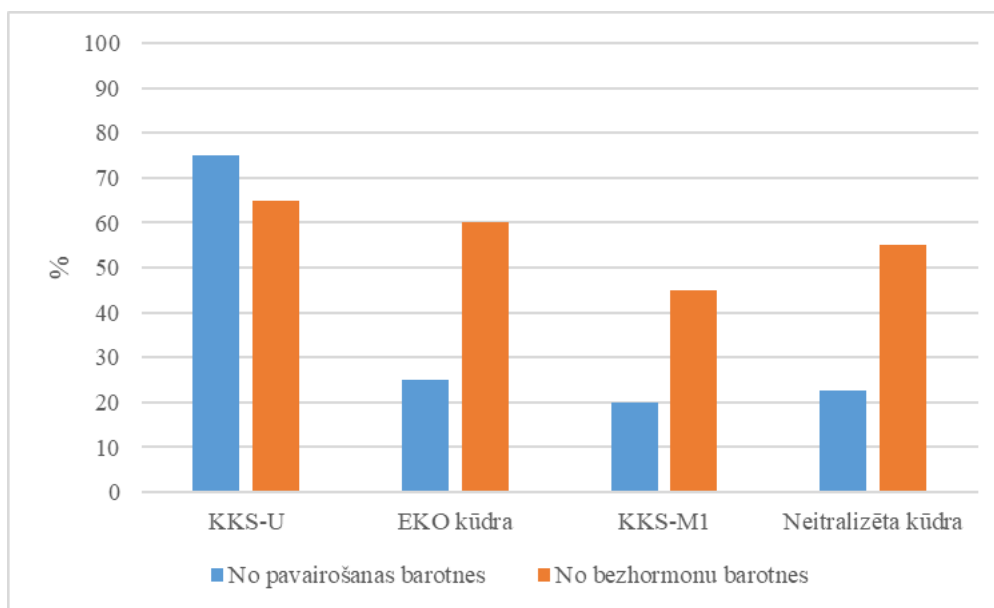
Labā viena mikroštāda jauno dzinumu skaita un pavairošanai derīgo jauno dzinumu skaita attiecība ir variantos: IES 0,5 mg/l ar BAP 0,2 mg/l un ISS 0,1 mg/l ar BAP 0,2 mg/l (1.8.4. attēls). Šajos variantos ir izveidojies pietiekami labs dzinumu garums (1.8.5. attēls), līdz ar to tālākā pavairošanas procesā iespējams izmantot abus barotņu variantus.



1.8.5. attēls. Vidējais dzinumu garums atkarībā no augsīnu un citokinīnu koncentrācijas barotnē.

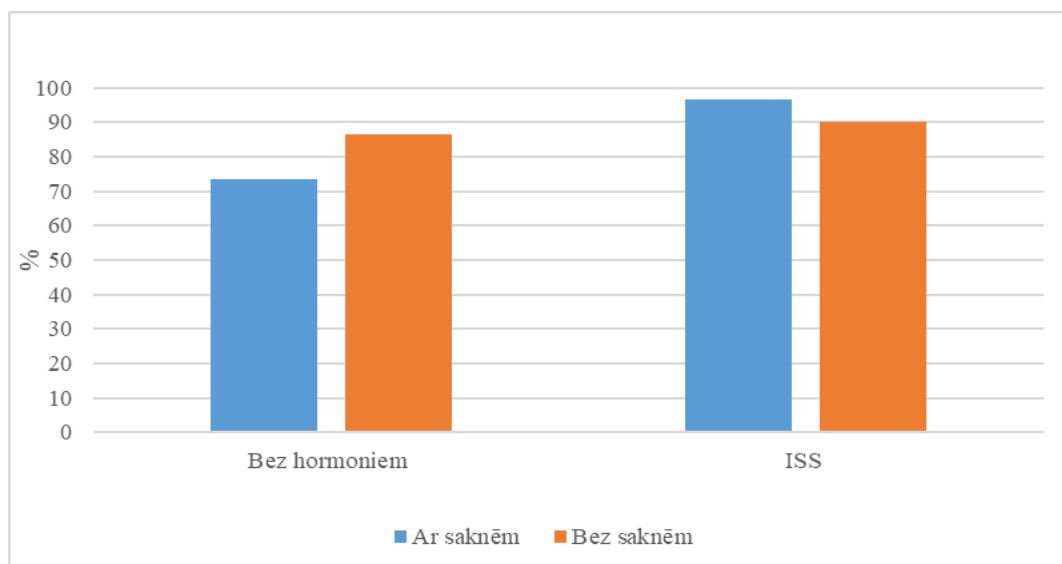
Jaunstādu iegūšana

Jaunstādu apsākņošanas procesā izmēģnātas dažādas pirmsapsākņošanas barotnes *in vitro* un apsākņošanās substrāti *ex vitro*. Uz pavairošanas barotni *in vitro* audzēti mikroštādi ir sīki un, apsākņojot tos kūdras substrātā, vēlāk ir liela to bojāeja. Lai gan KKS-U kūdrā tie apsākņojas labi, vairāk par 70% (1.8.6. attēls), pirms *ex vitro* apsākņošanās uz MS bezhormonu barotnes audzētie mikroštādi ir daudz spēcīgāki un piemērotāki *ex vitro* apsākņošanas posmam (1.8.6. attēls).



1.8.6. attēls. Jaunstādu apsākšanās atkarība no *in vitro* audzēšanas barotnes, kas izmantota tieši pirms *ex vitro* apsākšanās, un substrāta, kurā tie iestādīti.

Meklējot optimālo barotni mikrošādu audzēšanai pirms to izstādīšanas *ex vitro*, pārbaudīta arī barotne ar pievienotu ISS, kas varētu sekmēt apsākšanos. Pēc 4 nedēļām novērtējot apsākšanos KKS-U kūdras substrātā, iegūtie rezultāti liecina, ka ISS tikai nedaudz veicina apsākšanos *ex vitro*, ja rezultātus salīdzina ar tiem, kādi ir iegūti, mikrošādus pirms tam *in vitro* audzējot uz MS barotnes bez hormoniem (1.8.7. attēls).



1.8.7. attēls. Jaunstādu apsākšanās KKS-U kūdras substrātā pēc 4 nedēļām atkarībā no *in vitro* audzēšanas barotnes un sakņu esamības vai neesamības.



1.8.8. attēls. Jaunstādu apsākņošanās KKS-U kūdras substrātā 4 nedēļas pēc iestādīšanas kūdras substrātā atkarībā no *in vitro* audzēšanas barotnes, kas izmantota pirms mikroslādu izslādīšanas *ex vitro*, un sakņu esamības vai neesamības mikroslādiem tos iestādot kūdras substrātā. No kreisās: A - barotne bez hormoniem un mikroslādi ir iestādīti kūdras substrātā ar saknēm; B - barotne ar ISS un mikroslādi ir iestādīti kūdras substrātā ar saknēm; C - barotne bez hormoniem un mikroslādi ir iestādīti kūdras substrātā bez saknēm, D - barotne ar ISS un mikroslādi ir iestādīti kūdras substrātā bez saknēm.

Mikroslādu sakņu esamība to slādīšanas laikā *ex vitro* ir pēcefekts, ko labi var novērtēt vizuāli (1.8.8. attēls): jaunslādi, kuru mikroslādiem saknes bija atslātas, pēc mēneša bija lielāki un spēcīgāki atslārbā no tiem mikroslādiem, kas bija iestādīti bez saknēm, tomēr augu izdzīvošanas apjomu tas neietekmēja. Jāatzīmē, ka būtu nepieciešami tālāki ekperimenti, lai pārbaudītu *in vitro* sakņu funkcionalitāti ilgā laika periodā.

Secinājumi

1. Sēklu dezinficēšana to diedzēšanai *in vitro*: sēklas 24 h mērcē tekošā krāna ūdenī, sterilos apstākļos laminārajā boksā dezinficē 15 sekundes 70% etanolā, 30 min 5% nātrija hipohlorītā NaOCl, skalo 3 reizes dejonizētā sterilā ūdenī, novieto uz barotnes ar PPM (2 ml/l), kultivēšanas ilgums 4 nedēļas.
2. *In vitro* dzinumu pavairošanai barotnei ir jāpievieno indolil-3-etikskābe (IES) 0,5 mg/l ar 6-benzilaminopurīnu (BAP) 0,2 mg/l vai indol-3-sviestskābe (ISS) 0,1 mg/l ar 6-benzilaminopurīnu (BAP) 0,2 mg/l.
3. Jaunstādu iegūst: mikroslādu pirms izslādīšanas *ex vitro* audzējot uz Murašiges-Skuga (1962) barotnes bez fitohormoniem, izslādot ar saknēm KKS-U kūdras substrātā (kūdras substrāts 0-7 mm, pH 5,2-6, SIA Laflora).

Literatūra

- Kokoska L., Janovska D. Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: A review. *Phytochemistry*, 2009, 70, 842 -855.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15 (3), 473-497.
- Skala E., Kicel A., Olszewska M. A., Kiss A. K., Wysokinska H. Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 181098, 11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/181098>.
- Skala E., Picot L., Bijak M., Saluk-Bijak J., Szemraj J., Kicel A., Olszewska M. A., Sitarek P. An efficient plant regeneration from *Rhaponticum carthamoides* transformed roots, enhanced caffeoylquinic acid derivatives production in pRi-transformed plants and their biological activity. *Industrial Crops and Products*, 2019, vol. 129, 327-338.
- Timofeev N. P. *Leuzea carthamoides* DC.: application prospects as pharmpreparations and biologically active components. In: *Functional food for chronic diseases*. Ed. by D. M. Martirosyan, Richardson, Texas, USA, D&A Incorporated, 2006, 105-120.
- Todorova V., Ivanov K., Ivanova S. Comparison between the biological active compounds in plants with adaptogenic properties (*Rhaponticum carthamoides*, *Lepidium meyenii*, *Eleutherococcus senticosus* and *Panax ginseng*). *Plants*, 2022, 11 (1), 64, <https://doi.org/10.3390/plants11010064>.
- Zand A., Babaei A., Omidbaigi R., Daneshfar E. Study on callus induction and plant regeneration of *Leuzea carthamoides* via tissue culture system. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2014, February, 8(5), 260-268.

2. aktivitāte

R2.1. Iegūta datu kopa par smiltsērķšķu, avenu, kazeņu (*Rubus ģints*), leizejas, krūmcidoniju izejvielu, t.sk. blakusproduktu (lapu, dzinum, augļu serdes) ķīmisko sastāvu.

Ievads

Datu kopās norādītie dati par dažādu projektā iekļauto izejvielu ķīmisko sastāvu apkopoti saskaņā ar izteikto interesi no iesaistīto uzņēmēju (SIA L.E.V. Ekstraktu rūpnīca, SIA “BerryPark”, ZS “Cukuriņi”, ZS “Kurmiši”) puses.

1. AVENU UN KAZEŅU OGAS

Antocianīni ir ķīmisko savienojumu – flavonoīdu veids ar antioksidantu iedarbību. Antocianīni dabiski atrodami daudzos augos un to daļās (ziedos, lapās, augļos, dārzeņos u.c.) kā pigmenti piešķir sarkanu, purpursarkanu un zilu krāsojumu. Par svarīgākiem pārstāvjiem minami cianidīni, delfinidīni, malvidīni, pelargonidīni, peonidīni, un petunidīni. Pēdējos gados lielāku vērību iegūst flavonoīdu glikozīdi (antocianīni), pateicoties to vērtīgajām funkcionāli aktīvajām īpašībām. Par svarīgākiem antocianīnu pārstāvjiem, piemēram, upenēs (*Ribes nigrum*) minami cianidīna-3-glikozīds, delfinidīna-3-glikozīds, cianidīna-3-rutinozīds un delfinidīna-3-rutinozīds. Kazeņās kvantitatīvi visvairāk dominē cianidīna 3-glikozīds, savukārt sarkanajās avenēs citi cianidīni: cianidīna 3-soforozīds, cianidīna 3-glikozilrutinosīds, cianidīna 3-cianidinīns-3 -rutinosīds sastopams dažādās proporcijās atkarībā no šķirnes (Jordheim et al., 2011; Szymanowska et al., 2018). Kā dabīgie pigmenti tie ir svarīgi dažādu pārtikas produktu ražošanai, lai gan krāsas stabilitāte bieži tiek nodrošināta īsāku laika periodu kā ķīmiski sintezētiem pigmentiem. Antocianīni ir jutīgi savienojumi, to saglabāšanai ir nepieciešama skāba vide. Antocianīnu ekstraktiem ar pH 1.0 ir lielāka antioksidantu spēja nekā ekstraktiem ar pH 4.0 un pH 7.0 (Kalt et al., 2000).

Sadarbībā ar L.E.V. Ekstraktu rūpnīcu veikti pētījumi par dažādu rūpnieciski ražotu ekstraktu kvalitatīvajiem rādītājiem, nosakot kopējo antocianīnu saturu. Kā nākamais uzdevums bija noskaidrot detalizēto antocianīnu saturu Latvijā audzētajās rudens avenēs un kazeņās, iegūstot datu kopu vairāku sezonu robežās. Rudens aveni un kazeņu izejvielu (ogas) trīs sezonu laika periodā nodrošināja SIA “BerryPark”.

Materiāli metodes

Paraugu nosaukums: kazeņes, avenes (SIA “BerryPark”)

Antocianīni tiek izteikti ar cianidīn 3-glikozīdu **spektrofotometriski** pēc Fuleki un Francis metodes (1968).

Antocianīnu un antocianidīnu analīze ar ultraefektivitātes šķidrums hromatogrāfiju (UPLC/UV): kazeņu ekstraktos esošo antocianīnu un antocianidīnu hromatogrāfija veikta, izmantojot Eiropas Farmakopejas 9.0 metodi “Svaigu melleņu augļu sausais ekstrakts, rafinēts un standartizēts” (01/2016:2394) ar nelielām izmaiņām.

Aprīkojums: hromatogrāfiskā atdalīšana veikta, izmantojot Waters Acquity UPLC H klasi, kas sastāv no īpaši augsta spiediena gradienta vienības (Quaternary Solvent Manager), automātiskā inžektora (FTN), kolonnas krāsns (CHA) un UV detektora (PDA eļ detektors). Hromatogrāfiskie dati savākti, izmantojot Waters Empower hromatogrāfijas programmatūru.

Iestatījumi: hromatogrāfija veikta 35 °C, izmantojot Acquity UPLC BEH C18 kolonnu (1,7 µm, 2,1 × 150 mm). Identifikācija un kvantitatīva noteikšana novērtēta, izmantojot UV detektoru pie 535 nm.

UPLC prog.: Mobilā fāze: A-skudrskābe, B-acetonitrils, C-metanols, D-ūdens:

Laiks	A	B	C	D	līkne
0.0	4	2	5	89	0
3.0	4	3	7	86	6
10.0	4	4	9	83	6
15.0	4	5	9	82	3
19.0	4	5	9	82	6
25.0	4	11	25	60	4
30.0	4	14	25	57	4

Pastāvīgs plūsmas ātrums 0,250 ml min⁻¹; autosamplera temperatūra: 10°C

Paraugu sagatavošana: Antocianīni ekstrahēti no aptuveni 20,00 g ogu ar 96% etanola/0,1% HCL šķīdumu; Injekcijas tilpums UPLC sistēmā – 2.0µL.

Identifikācija: Atsauces standarti – **cianidīna 3-O-arabinozīda hlorīds** [CyAr] (antocianīni kvantificēti kā cianidīna 3-O-arabinozīda hlorīda miligrami uz 100 g svaiga svara), kas iegūts no Extrasynthese (kods Nr. 0909S; 0909S; 0908S). Lai noteiktu korelācijas koeficientus ($R^2 > 0,9995$), veikta maksimumu laukumu lineārā mazāko kvadrātu regresija atkarībā no koncentrācijas. Koncentrācijas vērtību iegūšanai izmantoti standarta līknes vienādojuma parametri (slīpums un krustpunkts) ($y = 3435x - 53171$ CyAr; y –pīķa laukums, AU·s; x –konc., µg·mL⁻¹). Darba standartšķīdumi 60,0–1800,0 µg mL⁻¹ [CyAr].

Rezultāti

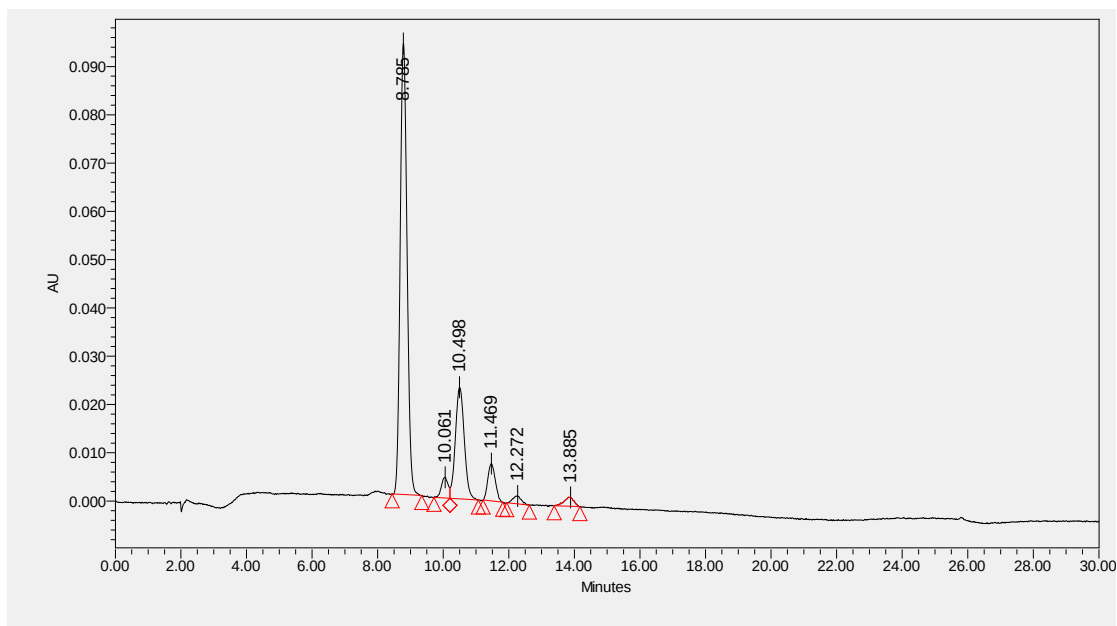
Noteikto antocianīnu savienojumu daudzums aveņu un kazeņu ogās apkopots 2.1.1. tabulā (C – koncentrācija, izteikta uz svaigas masas (FW); STDEV – standartnovirze, mg·100g⁻¹; Kopā – vērtību summa; % – ķīmisko savienojumu procentuālais daudzums).

2.1.1. tabula. **Datu kopa: antocianīnu saturs aveņu un kazeņu ogās**

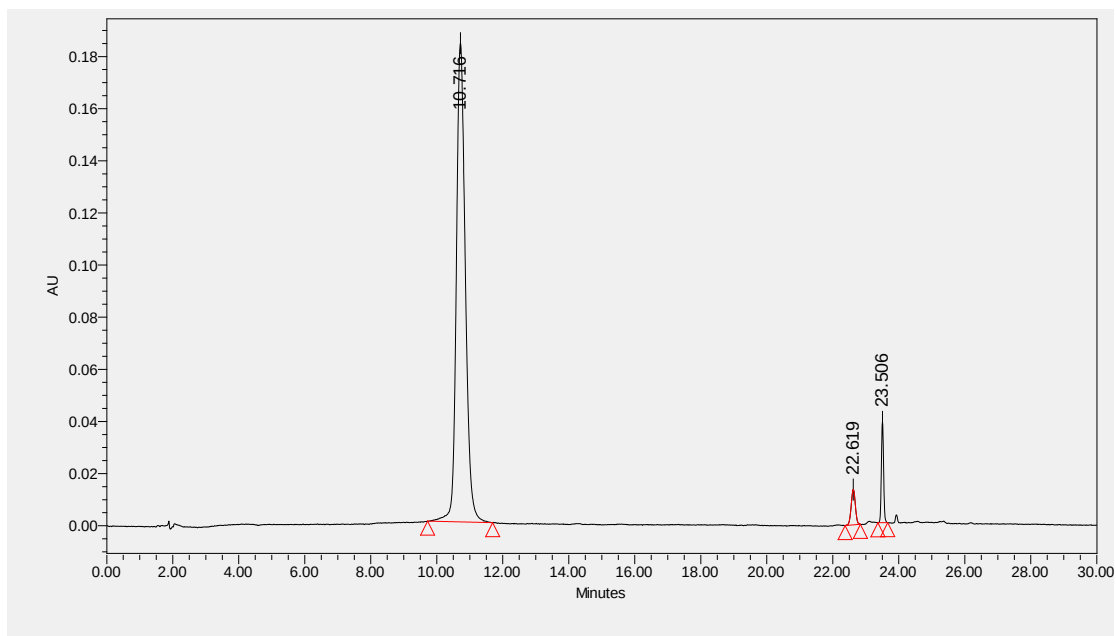
AVENES							
		2020	2021	2022			
Nr.	Nosaukums	C, mg/100g FW			VID.	STDEV (vid)	%
1	Cyanidin 3-O-sophoroside chloride	111.45	124.49	116.98	117.64	7.51	58.84
2	Cyanidin-3-O-(2''-O-glucosyl) rutinoside chloride	9.12	9.37	8.81	9.10	0.56	4.43
3	Cyanidin 3-O-glucoside chloride	36.89	45.80	41.44	41.38	4.36	20.84
4	Pelargonidin 3-O-sophoroside chloride	16.06	18.17	16.75	17.00	1.42	8.43
5	Cyanidin-3-O-rutinoside chloride	6.55	7.41	6.93	6.96	0.48	3.49
6	Pelargonidin-3-O-glucoside chloride	7.68	8.34	7.91	7.98	0.43	3.98
Kopā		187.75	213.58	198.82	200.05	14.60	100.00

KAZENES							
		2020	2021	2022			
Nr.	Nosaukums	C, mg/100g FW			VID.	STDEV (vid)	%
1	Cyanidin 3-O-glucoside chloride	271.46	266.00	279.40	272.29	13.40	90.05
2	Cyanidin-3-O-(malonyl)glucoside chloride	13.14	12.10	12.90	12.71	0.80	4.20
3	Cyanidin-3-O-(dioxalyl)glucoside chloride	16.89	17.00	18.20	17.36	1.20	5.74
Kopā		301.49	295.10	310.50	302.36	15.40	100.00

Aveņu ogas visvairāk satur sarkanā pigmenta savienojumu: Cyanidin 3-O-sophoroside chloride (vidēji 116.98 mg/10 g svaigu ogu) un kā nākamo – Cyanidin 3-O-glucoside chloride (43.44 mg/100 g svaigu ogu). Savukārt kazeņēs visvairāk pārstāvēts savienojums Cyanidin 3-O-glucoside chloride (vidēji 272.29 mg/100 g svaigu ogu). Hromatogrammas norādītas 2.1.1. un 2.1.2. attēlā.



2.1.1. attēls. Parauga UPLC hromatogramma: Aveņu ogas.



2.1.2. attēls. Parauga UPLC hromatogramma: Kazeņu ogas.

Lai noskaidrotu antociānu saturu rūpnieciski ražotiem ekstraktiem, veiktas analīzes SIA L.E.V. Ekstraktu rūpnīca sagatavotajiem deviņiem paraugiem (2.1.3. att.). Ekstrakti testēti ar spektrofometrisku metodi, kas izstrādāta, par pamatu ņemot Wrolstad et.al (2005) aprakstīto procesu. Kopējais antociānu saturs (TAC) aprēķināts un izteikts ar cianidīn-3-glikozīda ekvivalentu (CGE) saturs mg 100 g⁻¹ ekstraktā, izmantojot 7.2. formulu.

$$TAC(mgL^{-1}) = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\varepsilon \times 1} \quad (7.2.)$$

kur: MW – molekūlmasa ($MW_{\text{cianidīn-3-glikozīds}} = 449,2 \text{ g mol}^{-1}$);
 DF – atšķaidīšanas faktors;
 1 – kivetes garums, cm;
 ε – molārais ekstinkcijas koeficients ($\varepsilon_{\text{cianidīn-3-glikozīds}} = 26900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);
 10^3 – pārrēķināšanas koeficients no g uz mg.



2.1.3. attēls. Antociānus saturošu rūpnieciski ražotu ekstraktu testēšana.

Paraugos noteikts pH saturs, rezultāti apkopoti 2.1.2. tabulā.

2.1.2. tabula Antociānu saturs rūpnieciski ražotos ekstraktos

Nr.	pH	CGE mg 100 g ⁻¹
1	3,3	1367,1
2	3,07	745,3
3	2,95	2475,3
4	3,19	1916,6
5	3,39	1107,2
6	2,68	356,5
7	2,29	221,3
8	1,82	121,2
9	3,39	21,3

Secinājumi

Rūpnieciski ražotie visvairāk antiociānīnus saturoši paraugi ir Nr.3, Nr.4. un Nr.5, turklāt analīzes norāda, ka ne tikai vides pH ir svarīgs antociānīnu saglabāšanai, bet arī citi stabilizējoši savienojumi. Tas noteikti jāņem vērā ražošanas procesā.

2. AUGU LAPU ĶĪMISKAIS SASTĀVS

Literatūras apskatu un metodikas skatīt. R.2.2. sadaļā. 2.1.3., 2.1.4. un 2.1.5. tabulā atspoguļoti iegūtie rezultāti datu kopai.

2.1.3. tabula **Datu kopa: lapu (smiltsērķšķu, krūmcidoniju, aveņu, kazeņu) ķīmiskais sastāvs un antiradikālā aktivitāte (vākšanas laika ietekme)**

Nosaukumi	Ievākšanas laiks, mēneši			
	jūnijs	jūlijs	augusts	septembris
Flavonoīdu saturs, mg/100 g				
Smiltsērķšķi	164.66	173.81	278.62	253.12
Krūmcidonijas	287.85	601.02	264.93	466.31
Avenes (rudens)	73.70	201.91	383.59	384.56
Kazenes (šķirne)	166.45	179.53	419.89	351.55
Kazenes (savvaļas)	n*	213.30	200.17	251.34
Polifenolu saturs, mg/100 g				
Smiltsērķšķi	258.10	355.21	742.83	539.35
Krūmcidonijas	245.46	479.10	410.04	254.34
Avenes (rudens)	160.25	436.65	680.42	458.57
Kazenes (šķirne)	357.85	287.63	356.90	414.89
Kazenes (savvaļas)	n	352.15	431.30	169.79
Tanīnu saturs, mg/100 g				
Smiltsērķšķi	0.31	0.10	0.81	2.07
Krūmcidonijas	0.15	1.28	0.68	0.69
Avenes (rudens)	0.20	0.28	1.05	1.39
Kazenes (šķirne)	0.39	0.11	0.35	0.61
Kazenes (savvaļas)	n	0.19	0.72	0.70

Antiradikālā aktivitāte, TE mol/100 g				
Smiltsērķšķi	3.87	3.29	3.10	3.69
Krūmcidonijas	0.62	1.21	2.71	1.84
Avenes (rudens)	0.89	1.67	3.46	2.90
Kazenes (šķirne)	2.45	2.80	2.06	3.09
Kazenes (savvaļas)	n	3.22	3.33	1.77

*n- nav noteikts

FERMENTĀCIJAS IETEKME UZ AVEŅU LAPU ĶĪMISKO SASTĀVU

2.1.4. tabula

Datu kopa: kopējo fenolu, flavonoīdu, tanīnu saturs un antiradikālā aktivitāte svaigu un fermentētu aveņu lapu ūdens ekstraktu paraugos

Lapu ekstrakti	Aveņu sausās drogas daudzums uz 100ml ūdens		Fenolu saturs, mg 100 g		Tanīnu saturs mg 100g		Flavonoīdu saturs, mg 100 g		AOA (DPPH), Troloks ekv. mili moli /100g	
	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
Meža avenēs	5.9	0.9	26.4	1.1	0.8	0.0	11.9	0.3	152.6	16.1
Fermentētas meža avenēs	5.8	0.4	17.9	1.0	0.5	0.0	6.6	0.5	102.5	3.2
Mājas avenēs	5.8	0.9	27.0	3.0	0.8	0.2	11.1	1.2	168.0	22.2
Fermentētas mājas avenēs	5.6	0.8	26.0	0.9	0.8	0.0	10.6	0.8	159.4	9.7

Dažādi apstrādātu aveņu un smiltsērķšķu lapu un lapu kombināciju ekstraktu ķīmiskais sastāvs norādīts 2.1.5. tabulā.

2.1.5. tabula **Datu kopa: lapu (smiltsērķšķu, aveņu un maisījumu) ķīmiskais sastāvs un antiradikālā aktivitāte**

Nosaukums	Tanīni, mg TAE/100g	STEDV	Flavonoīdi, mg CAE/100g	STEDV	Kopējie fenoli, mg GAE/100g	STEDV	Antioksidantu aktivitāte (DPPH), mol TE /100g	STEDV
*Aveņu/smiltsērķšķu lapu ekstrakts	0.87	0.01	159.18	6.09	405.66	3.89	1.78	0.05
*Fermentētu aveņu/smiltsērķšķu lapu ekstrakts	0.73	0.03	134.84	2.4	333.69	7.67	1.58	0.04
*Fermentētu aveņu lapu ekstrakts	0.55	0.02	119.63	1.79	257.4	4.53	1.12	0.02
Aveņu lapu ekstrakts	0.83	0.01	189.62	2.4	391.76	1.15	1.59	0.02
Smiltsērķšķu lapu ekstrakts	0.98	0.03	127.41	1.19	446.94	4.14	1.96	0.03

*lapu ekstraktu pagatavošanai pievienots kompleksais enzīms Laminex BG (0.1%). Ekstrakcijas laikā pēc enzīma pievienošanas palielinās salicilātu hidrolīze, panākot pilnvērtīgāku ekstrahēšanās procesu.

3. SMILTĒRKŠĶU OGU ĶĪMISKAIS SASTĀVS

Literatūras apskatu un metodikas skatīt R.2.3. sadaļā. 2.1.6. tabulā atspoguļoti iegūtie rezultāti datu kopai.

2.1.6. tabula

Datu kopa: smiltsērķšķu šķirņu ogu raksturīgākie ķīmiskie rādītāji (trīs gadu periodā)

Šķirnes nosaukums / gads	Šķīstošā sausna, Brix%		Kopējais skābju saturs, %		C vitamīns, mg/100g		E vitamīns, mg/100g		Kopējie karotīni, mg/100g		Kopējais fenolu saturs, mg/100g	
2020.g.	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
'Prozačnaja'	8.20	0.10	3.20	0.05	72.49	2.21	27.48	1.56	13.17	3.23	105.36	5.44
'Botaničeskaja Ļubitel'skaja'	8.05	0.12	2.92	0.07	81.04	3.05	17.89	1.22	10.72	2.12	141.66	6.24
'Marija'	8.60	0.11	2.80	0.05	74.00	3.14	31.20	2.52	14.00	2.41	85.10	4.23
'Tatjana'	8.00	0.12	2.00	0.04	83.60	2.60	36.70	3.41	16.80	2.81	94.00	4.95
2021.g.												
'Prozačnaja'	8.33	0.23	3.33	0.18	72.62	2.34	27.61	1.69	13.30	3.36	105.49	5.57
'Botaničeskaja Ļubitel'skaja'	8.18	0.25	3.05	0.20	81.17	3.18	18.02	1.35	10.85	2.25	141.79	6.37
'Marija'	8.73	0.24	2.93	0.18	74.13	3.27	31.33	2.65	14.13	2.54	85.23	4.36
'Tatjana'	8.13	0.25	2.13	0.17	83.73	2.73	36.83	3.54	16.93	2.94	94.13	5.08
2022.g.												
'Prozačnaja'	8.16	0.06	3.16	0.01	72.45	2.17	27.44	1.52	13.13	3.19	105.32	5.40
'Botaničeskaja Ļubitel'skaja'	8.01	0.08	2.88	0.03	81.00	3.01	17.85	1.18	10.68	2.08	141.62	6.20
'Marija'	8.56	0.07	2.76	0.01	73.96	3.10	31.16	2.48	13.96	2.37	85.06	4.19
'Tatjana'	7.96	0.08	1.96	0.00	83.56	2.56	36.66	3.37	16.76	2.77	93.96	4.91
Vidējie rādītāji												
'Prozačnaja'	8.23	0.13	3.23	0.08	72.52	2.24	27.51	1.59	13.20	3.26	105.39	5.47
'Botaničeskaja Ļubitel'skaja'	8.08	0.15	2.95	0.10	81.07	3.08	17.92	1.25	10.75	2.15	141.69	6.27
'Marija'	8.63	0.14	2.83	0.08	74.03	3.17	31.23	2.55	14.03	2.44	85.13	4.26
'Tatjana'	8.03	0.15	2.03	0.07	83.63	2.63	36.73	3.44	16.83	2.84	94.03	4.98

4. LEIZEJAS SAKŅU UN LAPU BIOĻĢISKI AKTĪVIE SAVIENOJUMI

Literatūras apskatu un metodikas skatīt R.2.5. sadaļā. 2.1.7. tabulā atspoguļoti iegūtie rezultāti datu kopai.

2.1.7. tabula. **Datu kopa: leizejas (*Rhaponticum carthamoides*) lapu un sakņu ķīmiskais sastāvs**

Rādītāji	Daudzums*	
	Vidējais	STDEV
LAPAS (kaltētas)		
Tanīnu saturs, katehīna ekv.mg/g	13.8	0.0
Flavonoīdu saturs, mg katehīna ekv./g	19.9	0.1
Kopējais fenolu saturs, mg Gal. sk.ekv/g	48.8	1.15
Hlorofils a µg/g	41.5	2.9
Hlorofils b µg/g	27.7	7.7
AOA(DPPH), mili M TE ekv./g	135.6	25.8
AOA(FRAP), mg FeSo4 ekv./g	225.7	19.5
AOA(FRAP), miliM TE ekv./g	15.2	1.3
20-hidroksiekdizons	2.5	0.1
SAKNES (kaltētas)		
20-hidroksiekdizons	6.73	0.11

* rādītāju daudzums izteikts uz drogas sausu vienā gramā

5. ĶĪMISKO SAVIENOJUMU SATURS KRŪMCIDONIJU AUGĻOS UN BLAKUSPRODUKTOS

Analizēts četru šķirņu krūmcidoniju augļu ķīmiskais sastāvs trīs gadu periodā. 2.1.8. tabulā atspoguļoti iegūtie rezultāti datu kopai. Blakusproduktu paplašinātai izmantošanai noteikts cukuru un organisko skābju saturs (2.1.9. tabula).

2.1.8. tabula. **Datu kopa: krūmcidoniju augļu ķīmiskais sasturs (trīs gadu periodā)**

2020.g. paraugs	Šķīstošās sausnas saturs, Brix%		Kopējais skābju saturs, %		C vitamīna saturs, mg/100g		Kopējais fenolu saturs, mg/100g	
	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
ADA	8.19	0.61	5.31	0.24	41.36	1.74	666.22	16.08
DARIUS	9.17	1.02	5.04	0.24	60.63	2.27	478.60	26.76
RASA	8.52	0.64	5.11	0.33	82.25	3.77	566.67	10.98
RONDO	11.04	0.80	5.17	0.24	50.28	2.59	474.26	36.87
2021.g. paraugs	Šķīstošās sausnas saturs, Brix%		Kopējais skābju saturs, %		C vitamīna saturs, mg/100g		Kopējais fenolu saturs, mg/100g	
	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
ADA	7.88	0.95	4.07	0.12	64.93	2.16	402.10	19.36
DARIUS	9.30	0.61	4.71	0.17	31.94	1.38	543.80	8.60
RASA	8.42	0.71	4.04	0.17	18.68	1.09	523.77	5.51
RONDO	9.47	0.71	4.88	0.12	80.05	1.58	502.44	17.00
2022.g. paraugs	Šķīstošās sausnas saturs, Brix%		Kopējais skābju saturs, %		C vitamīna saturs, mg/100g		Kopējais fenolu saturs, mg/100g	
	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
ADA	7.60	0.17	4.32	0.17	75.30	2.32	334.02	21.31
DARIUS	7.25	0.29	4.80	0.17	55.11	2.54	489.11	26.84
RASA	8.42	0.39	4.12	0.17	66.61	2.10	483.16	4.52
RONDO	8.60	0.17	4.60	0.17	96.12	4.51	424.32	7.45
Vidējie rādītāji	Šķīstošās sausnas saturs, Brix%		Kopējais skābju saturs, %		C vitamīna saturs, mg/100g		Kopējais fenolu saturs, mg/100g	
	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
ADA	7.89	0.58	4.57	0.18	60.53	2.07	467.45	18.92
DARIUS	8.57	0.64	4.85	0.19	49.23	2.06	503.83	20.74
RASA	8.45	0.58	4.42	0.22	55.84	2.32	524.54	7.00
RONDO	9.70	0.56	4.88	0.18	75.48	2.89	467.01	20.44

2.1.9. tabula **Datu kopa: cukuru un skābju saturs krūmcidoniju augļu serdes daļā, 100g**

Cukuru un skābju nosaukumi	‘Rondo’	‘Darius’	‘Rasa’
Saharoze	0.26	0.19	0.18
Glikoze	0.53	0.38	0.4
Fruktoze	0.76	0.65	0.52
Ābolskābe	1.04	1.51	1.23
Hinskābe	0.85	0.81	0.75
Askorbīnskābe	ND*	ND	ND
Dzintarskābe	0.08	0.01	0.09
Etiķskābe	0.46	0.59	0.45

*ND nav identificēts

Pēc augļu serdes daļas atdalīšanas tajās konstatēts neliels daudzums cukuru, turklāt visvairāk fruktoze. Analizējot skābju saturu, noteikts, ka serdes daļā atrodamas tādas organiskās skābes kā ābolskābe (vairāk nekā 1g/100g), hinskābe, dzintarskābe un etiķskābe. Serdes daļā nav konstatēta askorbīnskābe. Dzintarskābes saturs ir niecīgs, tādēļ serdes kā blakusproduktu nebūs izdevīgi izmantot organisko skābju ieguvei.

Literatūra

- Kalt W, McDonald JE, Donner H. 2000. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. *J Food Sci*65(3):390–3
- Jordheim Monica, Kjersti Hasle Enerstvedt, and Øyvind M. Andersen (2011) Identification of Cyanidin 3-O-β-(6''-(3-Hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside) and Other Anthocyanins from Wild and Cultivated Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (13), 7436-7440 DOI: 10.1021/jf201522b
- Szymanowska, U.; Baraniak, B.; Bogucka-Kocka, A. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Postulated Cytotoxic Activity of Phenolic and Anthocyanin-Rich Fractions from Polana Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Fruit and Juice—In Vitro Study. *Molecules* 2018, 23, 1812. <https://doi.org/10.3390/molecules23071812>
- FULEKI, T., & FRANCIS, F. J. (1968). Quantitative Methods for Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 33(1), 78-83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb00888.x>
- Xuan Tien Le, Minh Thuan Huynh, Tri Nhut Pham, Van Thai Than, Tran Quoc Toan, Long Giang Bach and Nguyen Quang Trung (2019) Optimization of Total Anthocyanin Content, Stability and Antioxidant Evaluation of the Anthocyanin Extract from Vietnamese Carissa Carandas L. Fruits. *Processes* 7, 468;1-15. doi:10.3390/pr7070468
- Wrolstad RE, Durst RW, Lee J (2005) Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci Technol* 16:423–428. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.019>

R2.2. Izstrādāti trīs ekstrakti (ar konservantu/antioksidantu īpašībām) lietošanai kosmētikas ražošanā, veikta testēšana, sagatavoti ražošanas procesa apraksti un produktu tehniskie noteikumi.

Ievads

1. AUGU LAPU ĶĪMISKAIS SASTĀVS UN TO IETEKMĒJOŠIE FAKTORI

Bioloģiski aktīvo savienojumu saturs augļu un ogu lapās ir līdzīgs kā pašos augļos un ogās. To galvenie pārstāvji ir fenolskābes, esteri, flavonoīdi, antocianīni un procianidīni. Lapas ir vienas no bagātākajiem hlorogēnskābes avotiem. Dažādos pētījumos šie sekundārie metabolīti ir pierādījuši antioksidantu, pretiekaisuma, sirds slimību un nervu sistēmas aizsardzības īpašības (Varvara-Ferlemi et al., 2016). Dažādu lapu ekstraktiem piemīt antioksidantu un antimikrobiālas īpašības, tādēļ tos izmanto ne tikai pārtikas, bet arī kosmētikas produktu sastāvā.

Mājas aveņu lapas

Avenes (*Rubus idaeus*) ir multifunkcionāls auglis, kurš satur bioaktīvus dabīgos produktus, kā, piemēram, antocianīnus un ellagitanīnus (Apréa et al., 2010). Īpaši Āzijas un Eiropas valstīs aveņu lapas ir populārs pretiekaisuma un antimikrobiālais līdzeklis, ko izmanto tradicionālajā medicīnā (Patel et al., 2004). Kvercetin-3-O-glikozīdu (Q3G) un kvercetin-3-O-rutinozīdu (rutīnu). Q3G saturs ir augstāks aveņu lapu ekstraktā nekā upeņu, sausseržu, melleņu un zemeņu lapu ekstraktā, un veido 7.5% no pulvera masas. Flavonoīdu frakcija ir galvenā fenolu grupa un sastāda gandrīz 11% no lapu ekstrakta pulvera masas (Oszmiański et al., 2011). Hiperozīdu saturs variē no 0.50% līdz 0.83% (Gudej, Tomczyk, 2004). *Rubus spp.* lapas (15 aveņu un 6 kazeņu paraugiem), analizējot ar augstu veiktspējas šķīduma hromatogrāfu, norādīja uz šīs sugas bagātīgo flavonoīdu, ellagīnskābi un tanīnu saturu. Turklāt ellagīnskābes saturs lapās variē diapazonā no 2.06% līdz 6.89% (Gudej, Tomczyk, 2004). Fenolskābe ir atrasta ļoti mazos daudzumos un, galvenokārt, tās sastāvā ir kofeīnskābe (0.55 mg/g žāvētās lapās) un hlorogēnskābe (0.70 mg/g žāvētās lapās) (Ksenija Durgo et al., 2012). Daži autori ir pierādījuši, ka hidroksilgrupu skaits molekulā ietekmē antimikrobiālo aktivitāti fenolu savienojumā un flavonoīdu glikolizācija var samazināt mikroorganismu augšanas efektivitāti (Puupponen-Pimia et al., 2001; Rauha et al., 2000).

Savvaļas aveņu lapas

Savvaļas aveņu lapas satur no 260 līdz 420 mg% askorbīnskābes (Pētersone, 1975). Flavonoīdu glikozīdu (hiperozīdu) saturs savvaļas aveņu lapās variē no 0.65% līdz 0.92% (Gudej, Tomczyk, 2004). Fenolu satura koncentrācija savvaļas aveņu lapās ir lielāka nekā šķirņu kultūraugos (Teleszko et al., 2015). Šo savienojumu koncentrācija augos ir atkarīga no dažādiem faktoriem, kā, piemēram, šķirnes, audzēšanas metodes, stādīšanas vietas, laika apstākļiem un novākšanas laika, turklāt viss iepriekš minētais arī ietekmē ekstrakcijas metodes un analīžu rezultātus (Szopa et al., 2017). Pētījumā, kas veikts centrālajā Balkānu reģionā – Serbijas teritorijā, tika atklāts, ka savvaļas aveņu lapas ir bagātīgs dabīgo antioksidantu, īpaši fenolu avots. Savvaļas aveņu lapas tiek rekomendētas iekļaut tēju maisījumos, lai ārstētu dažādas infekcijas (kuņģa – zarnu trakta traucējumus u.c.), kā arī lapu ekstrakts ir efektīvs pret *Escherichia coli* (Bojana VELJKOVIĆ et al., 2019).

Kazeņu lapas

Kazenes (*Rubus fruticosus* L.) tiek plaši audzētas un pārstrādātas augļu patīkamo organoleptisko īpašību dēļ, kā arī tām piemīt augsts, veselības uzlabošanai nepieciešamo vielu daudzums (Mikulic-Petkovsek et al., 2017). Kazeņu lapās ir bagātīgs bioloģiski aktīvo vielu komplekss (Nikitina et al., 2000), tās satur augstu fenolu daudzumu – ellagīnskābi, kvercetinū, kamperolu, rutīnu, procianidīnu, katehīnu, kofeīnskābi, kā arī to atvasinājumus – ellagīntanīnu un kvercetin-3-O-β-glikopiranozīdu (Buricova et al., 2011; Gudej, Tomczyk 2004; Martini et al., 2009; Oszmianski et al., 2015; Pavlović et al., 2016). *R.idaeus* (šķirnes) un *R.fruticosus* (savvaļas) lapas ir īpaši bagātas ar tannīniem (Marczal, 1963; Okuda et al., 1992). Fenola savienojumi atkarībā no kvantitatīvām un kvalitatīvām kompozīcijām kazeņu lapām piešķir augstu antioksidantu aktivitāti (Wang, Lin, 2000). Polijā veiktajā pētījumā iegūtie dati liecina, ka šķirņu un savvaļas azeņu un kazeņu lapu kvercetīna saturs ir stipri mazāks (0.35% līdz 0.73%) nekā hiperozīda (flavonoīdu glikozīdu) saturs, kurš variē no 0.50% līdz 0.82% (Gudej, Tomczyk, 2004).

Savvaļas kazeņu lapas

Zilganā kazene (*Rubus caesius* L.) satur organiskās skābes (ābolskābi), cukurus (glikozi, fruktozi 3%, saharozi 0.9%), pektīnvielas (0.5-1.6%), celulozi (2-4%), miecvielas (lapās 14%), minerālvielas (kālijs 208 mg%, varš, mangāns), flavonoīdus, karotīnus (0.5 mg%), askorbīnskābi (augļos 25-37 mg%), B grupas vitamīnus, tokoferolus, fillohinonus, fitocīdus.

Melnā kazene (*Rubus nessensis* Hall) satur organiskās skābes (ābolskābi, pienskābi, oksalskābi), miecvielas, pektīnvielas, cukurus, askorbīnskābi, inozītu (Pētersone, 1975). Hiperozīdu saturs variē no 0.46% līdz 1.05% (Gudej, Tomczyk, 2004).

Smiltsērķšķu lapas

Pēdējos gados zinātnieki ir pētījuši smiltsērķšķu (*Hippophae rhamnoides* L.) lapu ekstraktus, un dažādās farmakoloģiskās aktivitātēs ziņots par to pozitīvo pretiekaisuma, imūnsistēmas modulējošo ietekmi, kā arī radioaktīvo aizsardzību, adaptogēno un audu reģenerāciju. Ziņots arī, ka smiltsērķšķu lapām nav citotoksiskas ietekmes, ja tos lieto iekšķīgi (Chawla et al., 2007; Ganju et al., 2005; Geetha et al., 2005; Gupta et al., 2005; Gupta et al., 2008; Saggu et al., 2007; Upadhyay et al., 2009). Smiltsērķšķu augam visas daļas ir uzskatāmas kā bioaktīvo savienojumu (izoflavonu un flavonoīdu) bagātīgs avots. Tiem ir labvēlīga ietekme uz veselību (antiaterogēna, antioksidantiska, pretvēža un antibakteriāla iedarbība) (Suomela et al., 2006). Tieši lapu ekstrakts satur augstu flavonoīdu glikozīdu saturu, tostarp izorhamnetin-3-glikozīdu un kvercetin-3-glikozīdu, kas novērš aptaukošanos un dislipidēmiju (Lee et al., 2009; Yan et al., 2015). Iegūtie dati klīniskos pētījumos ar dzīvniekiem liecina par smiltsērķšķu lapu ekstrakta efektivitāti. Tie var nomākt aptaukošanos un modulēt ar aptaukošanos saistītus vielmaiņas traucējumus, piemēram, rezistenci pret insulīnu un aknu steatozi. Lapu ekstrakts arī novērš insulīna rezistenci, kā arī uzlabo pretiekaisuma īpašības un samazina glikoneģenēzi (Eun-Young et al., 2017).

Krūmcidoniju lapas

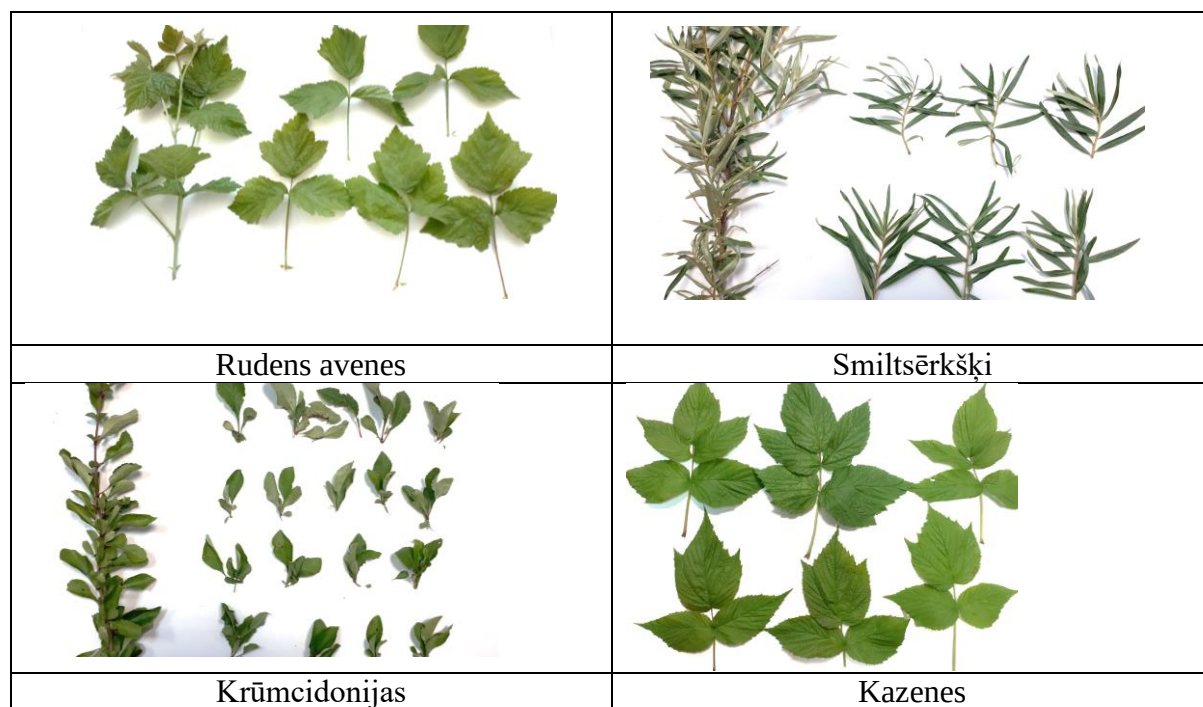
Krūmcidonijas (*Chaenomeles japonica* Lindl) visbiežāk tiek audzētas Ķīnā, Japānā un Ziemeļeiropas valstīs (Rumpunen et al., 2002). Augļu ķīmisko sastāvu raksturo dažādi

bioaktīvie savienojumi, piemēram, fenoli, triterpenoīdi, pektīni, kā arī augsts C vitamīna saturs, un šķiedrvielas (pektīni un celulozes polisaharīdi) (Ros-Garcia et al., 2004). Krūmcidoniju lapu ekstrakti uzrādīja augstu antiradikālo aktivitāti (1091 ± 22 – 1135 ± 15 $\mu\text{mol TE/g}$) CUPRAC reakciju sistēmā. Urbanavičiute ar līdzautoriem ir identificējusi četrus triterpēna savienojumus krūmcidoniju lapās: karosolskābi, betulīnskābi, oleanolskābi un ursolskābi (Urbanaviciute et al., 2019). Fenola savienojumi darbojas kā antioksidanti dažādiem mehānismiem, un tiem piemīt pretvēža, pretiekaisuma, neiroprotektīvas, pretvīrusu, sirds un asinsvadu slimību, pretdiabēta, holesterīna un triglicerīdu līmeņa mazinošas īpašības (Chahar et al., 2011).

Zinātniskos pētījumos norādīts, ka augu lapās esošo polifenolu savienojumu pretmikrobās aktivitātes spēju nodrošina ne tikai izmantojamo botānisko sugu klāsts un ģeogrāfiskā izcelsme. Būtisks ir izejvielas ievākšanas laiks un aktīvo savienojumu daudzums. **Pētījuma pirmajā posmā veikta izpēte, kā augu ievākšanas laiks ietekmē ķīmisko savienojumu saturu lapu ekstraktos. Otrajā posmā noteiktas lapu ekstraktu antimikrobiālās īpašības saskaņā ar prasībām kosmētikas produktu ražošanai, un trešajā posmā izstrādātas ekstraktu kombinācijas ar antimikrobiālām un antiradikālām īpašībām.**

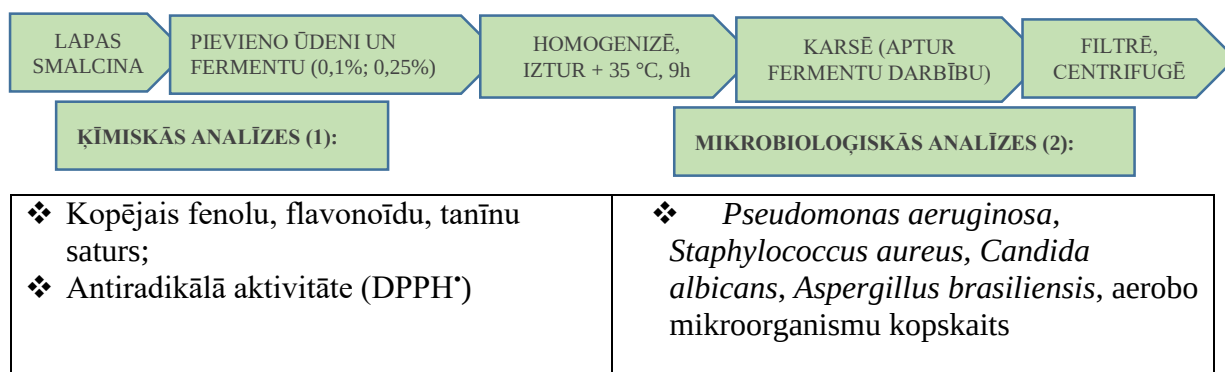
Materiāli un metodes

Pētījumam sadarbībā ar SIA “Cukuriņi”, SIA “Berrypark” un saimnieciskās darbības veicēju J. Jansonu tika ievāktas smiltsērķšķu, rudens avenu, kazeņu un krūmcidoniju lapas (2.2.1.A. att). Lai novērtētu ievākšanas laika ietekmi uz to ķīmisko sastāvu, lapas saskaņā ar izstrādāto metodiku ievāktas četras reizes sezonā. Papildus informācijas iegūšanai pētītas arī savvaļas kazeņu lapas, kas ievāktas Dārzkopības institūta dārzā.



2.2.1.A. attēls. Pētījumā izmantotās augu lapas.

Pētījumiem ekstrakti sagatavoti un analizēti saskaņā ar shēmu (2.2.1.B. att.)



2.2.1.B. attēls. Pētījumu pirmā posma shēma.

Rezultāti

Iegūtie rezultāti apkopoti 2.2.1. tabulā, novērtēts lapu ķīmiskais sastāvs un antiradikālā aktivitāte saskaņā ar novākšanas laiku.

2.2.1. tabula

Lapu (smiltsērķšķu, krūmcidoniju, aveņu, kazeņu) ķīmiskais sastāvs un antiradikālā aktivitāte

Nosaukumi	Ievākšanas laiks, mēneši			
	jūnijs	jūlijs	augusts	septembris
Flavonoīdu saturs, mg/100 g				
Smiltsērķšķi	164.66	173.81	278.62	253.12
Krūmcidonijas	287.85	601.02	264.93	466.31
Avenes (rudens)	73.70	201.91	383.59	384.56
Kazenes (šķirne)	166.45	179.53	419.89	351.55
Kazenes (savvaļas)	n	213.30	200.17	251.34
Polifenolu saturs, mg/100 g				
Smiltsērķšķi	258.10	355.21	742.83	539.35
Krūmcidonijas	245.46	479.10	410.04	254.34
Avenes (rudens)	160.25	436.65	680.42	458.57
Kazenes (šķirne)	357.85	287.63	356.90	414.89
Kazenes (savvaļas)	n	352.15	431.30	169.79
Tanīnu saturs, mg/100 g				
Smiltsērķšķi	0.31	0.10	0.81	2.07
Krūmcidonijas	0.15	1.28	0.68	0.69
Avenes (rudens)	0.20	0.28	1.05	1.39
Kazenes (šķirne)	0.39	0.11	0.35	0.61
Kazenes (savvaļas)	n	0.19	0.72	0.70
Antiradikālā aktivitāte, TE mol/100 g				
Smiltsērķšķi	3.87	3.29	3.10	3.69
Krūmcidonijas	0.62	1.21	2.71	1.84
Avenes (rudens)	0.89	1.67	3.46	2.90
Kazenes (šķirne)	2.45	2.80	2.06	3.09
Kazenes (savvaļas)	n	3.22	3.33	1.77

05.02.2021			
References kultūras	N* KVV/1ml	N log KVV/1ml	No=N/100, log KVV/1ml
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	9x10 ⁴	4.95	2.95
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	9x10 ⁶	6.95	4.95
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	9x10 ⁷	7.95	5.95
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	4.1x10 ⁷	7.61	5.61
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2.6x10 ⁶	6.41	4.41

Apkopojot datus un tos izvērtējot, otrajam posmam mikrobioloģiskai testēšanai atlasīti paraugi:

- Smiltsērķšķi (4x / septembris)
- Krūmcidonijas (3x / augusts)
- Avenes (4x / septembris)
- Kazenes (šķirne) (4x / septembris)
- Kazenes (savvaļas) (3x / augusts)

Mikrobioloģisko analīžu rezultāti

Pētījuma laikā analizēti piecu veida ekstrakti: aveņu lapas – **A**, kazeņu lapas – **K**, smiltsērķšķu lapas – **S**, krūmcidoniju lapas – **C**, savvaļas kazeņu lapas – **SK**. Lai izvairītos no varbūtības, ka paraugs varētu saturēt nelabvēlīgu mikrofloru, pirms to piesārņošanas noteikti tādi mikroorganismi kā: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* un aerobo mikroorganismu kopskaits. Iegūtie rezultāti parādīja, ka iepriekš minētie mikroorganismi netika konstatēti, līdz ar to paraugs uzskatīts kā tīrs. Tālākajā darba gaitā sagatavota suspensija, kura saturēja references kultūras, ekstraktu paraugi bija piesārņoti ar references kultūrām (2.2.2. tabula).

Sākotnējā ekstrakta kontaminācija

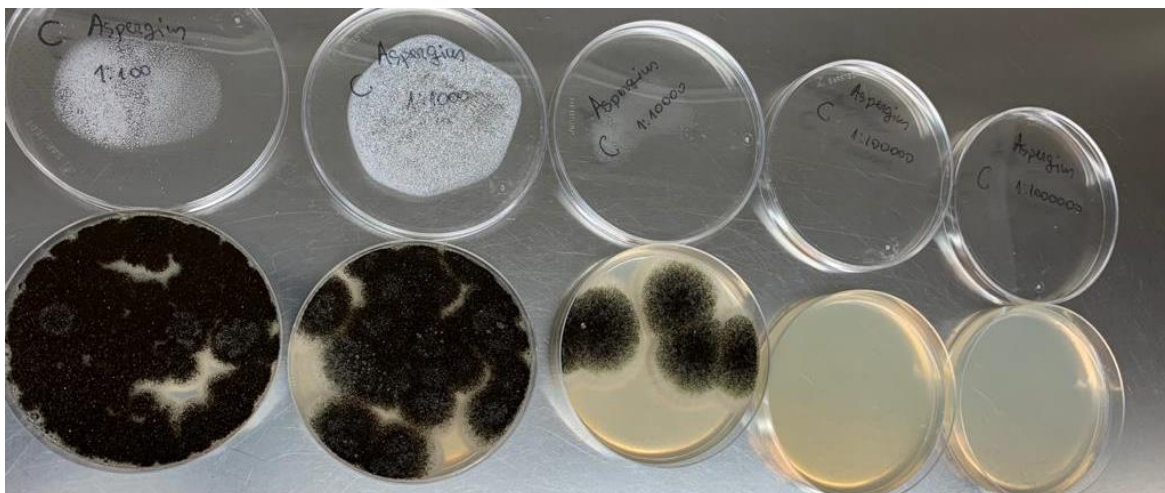
*N- mikroorganismu skaits sākotnējā suspensijā

No=N/100, inokulētu mikroorganismu skaits paraugā

Pamatojoties uz standartu ISO 11930: 2019 (Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic producēt / Kosmētika – Mikrobioloģija – Kosmētikas līdzekļa pretmikrobu aizsardzības novērtējums), ja baktēriju kopskaits samazinājās par 3 log KVV/1ml un raugu par 1 log KVV/1ml, bet pelējumu par 1 vai 0 (nepieauga) KVV/1ml pēc 28 dienu uzglabāšanas pētāmajam paraugam tiek novērota *antimikrobiālā* aktivitāte ¹.

Analizējot pētījumā iegūtos rezultātus, var redzēt, ka pēc septiņu dienu uzglabāšanas būtiski palielinājās pelējumu skaits paraugā (C), (2.2.1. attēls), (tabula 2.2.2).

¹<https://www.iso.org/standard/75058.html>



2.2.1. attēls. Ar *Aspergillus brasiliensis* kontaminēts paraugs (C) pēc septiņu dienu uzglabāšanas.

Pārējiem paraugiem pēc septiņu dienu uzglabāšanas *Aspergillus brasiliensis* kopskaits samazinājās (tabula 2.2.2.), kas var liecināt par ekstrakta *inhibējošām* īpašībām mikroorganismu attīstībai. Taču, iespējams, uzglabāšanas laikā notika inhibējošo vielu degradēšanās vai inhibējošo vielu koncentrācija bija par zemu, rezultātā mikroskopisko sēņu attīstība nav samazinājusies.

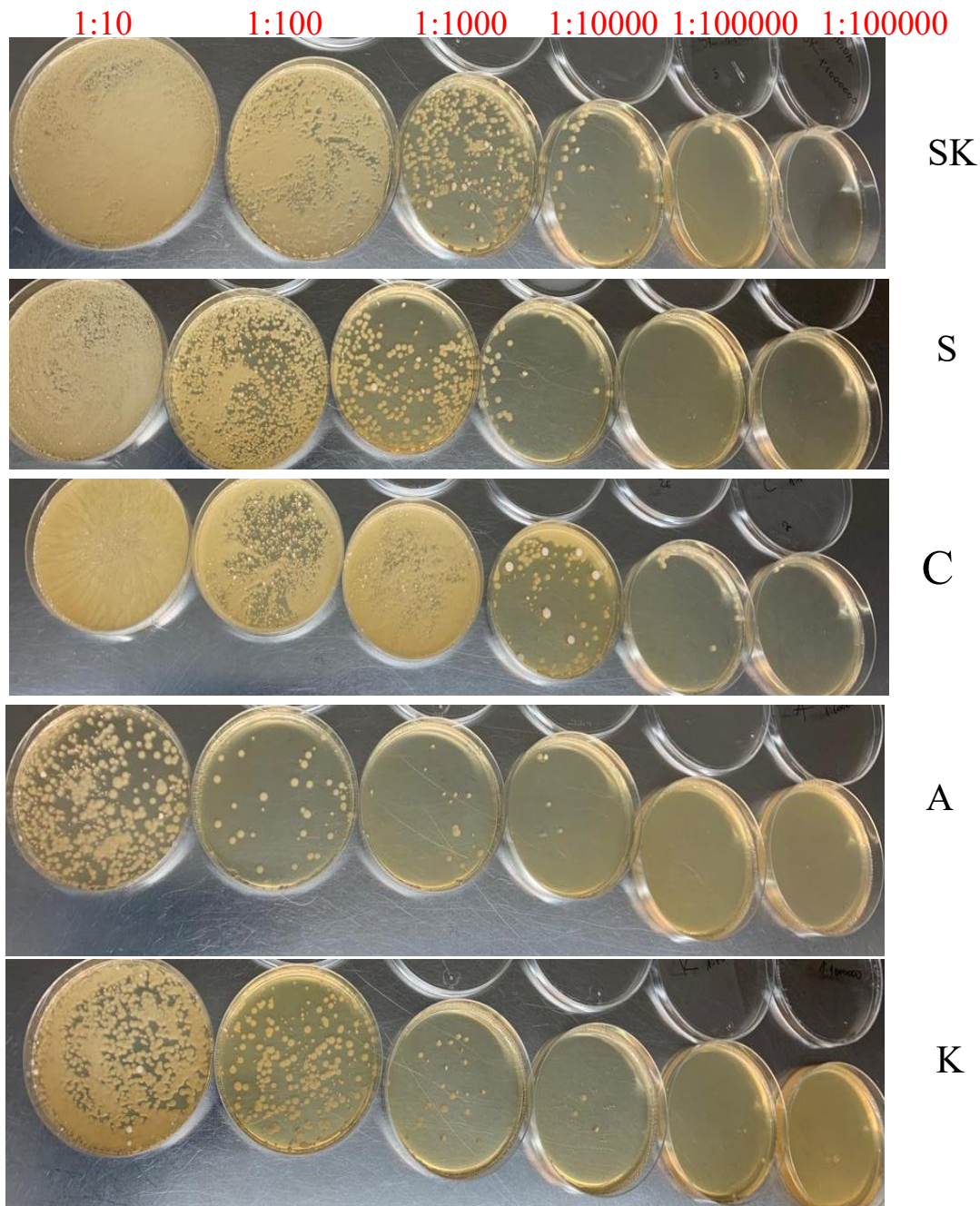
Tabula 2.2.2. Ekstrakta antimikrobiālās aizsardzības novērtējums pret pelējumu.

0. diena, 05.02.2021		N log KVV/1g	No=N/100, log KVV/1g
Sākotnējā kontaminācija ar references kultūrām			
N KVV/1g	9x10 ⁴	4.95	2.95
* <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404			*U ± 0.5 log.
2 diena (8.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	A	4.0 x 10 ³	3.60
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	C	7.0 x 10 ³	3.85
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	S	2.0 x 10 ³	3.30 ± 0.5
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SK	1.0 x 10 ³	3.00 ± 0.5
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	K	1.0 x 10 ³	3.00 ± 0.5
7 diena (15.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	A	1.0 x 10 ²	2.00
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	C	5.0 x 10 ⁴	4.70
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	S	1.0 x 10 ²	2.00
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SK	5.0 x 10 ²	2.70
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	K	4.0 x 10 ²	2.60
14 diena (22.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	A	9.0 x 10 ²	2.95 ± 0.5
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	C	1.0 x 10 ⁵	5.00
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	S	2.0 x 10 ³	3.00 ± 0.5
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SK	1.0 x 10 ⁴	4.00
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	K	2.0 x 10 ³	3.30 ± 0.5
21 diena (01.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	A	3.0 x 10 ³	3.48
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	C	3.2 x 10 ⁵	5.51
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	S	2.0 x 10 ³	3.30 ± 0.5
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SK	1.4 x 10 ³	4.15
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	K	2.0 x 10 ⁴	4.30
28 diena (08.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	A	3.0 x 10 ⁴	4.48
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	C	7.0 x 10 ⁵	5.85
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	S	1.7 x 10 ⁵	5.23
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	SK	9.0 x 10 ⁵	5.95
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	K	9.0 x 10 ⁴	4.95

*U-pieļaujamā nenoteiktība ('deviation') ir 0.5 log.

Pēc iegūtajiem rezultātiem var konstatēt (tabula 2.2.2.), ka mikroskopisko sēņu skaits uzglabāšanas laikā būtiski pieauga, līdz ar to var secināt, ka nevienam no ekstraktiem nepiemita antimikrobiālā aktivitāte pret *Aspergillus brasiliensis*.

Analizējot iegūtos rezultātus, var secināt, ka **tendence** uz *Candida albicans* inhibitora īpašībām bija novērota paraugiem A un K pēc divdesmit astoņu dienu uzglabāšanas (2.2.2. attēls), (tabula 2.2.3.). Paraugam SK pēc 14 dienu uzglabāšanas arī novērota tendence, ka raugu *Candida albicans* attīstība samazinās (tabula 2.2.3.), tomēr šī tendence nesaglabājās turpmāk, kas var liecināt par nepietiekamu inhibējošo vielu saturu ekstraktā.



2.2.2. attēls. Raugu *Candida albicans* attīstība paraugos pēc 28 dienu uzglabāšanas.

Ir jāatzīmē, ka, pamatojoties uz standartu, ja raugu samazinājums uzglabāšanas laikā ir zemāks par 1 log KVV/1ml, paraugam nepiemīt antimikrobiālās īpašības. No pētījumā analizētajiem paraugiem tikai ekstraktiem (A, K) *Candida albicans* koloniju veidojošo vienību skaits nedaudz samazinājās. Tomēr samazinājums nav sastādījis 1 log KVV/1ml (**jāsālīdzina ar inokulētu mikroorganismu skaitu paraugā No**), līdz ar to nevar teikt, ka iepriekš minētiem paraugiem piemita antimikrobiālā

aktivitāte. Bet paraugiem netika novērota **tendence** uz antimikrobiālo aktivitāti pret raugu *Candida albicans*.

Tabula 2.2.3. **Ekstrakta antimikrobiālās aizsardzības novērtējums pret raugu.**

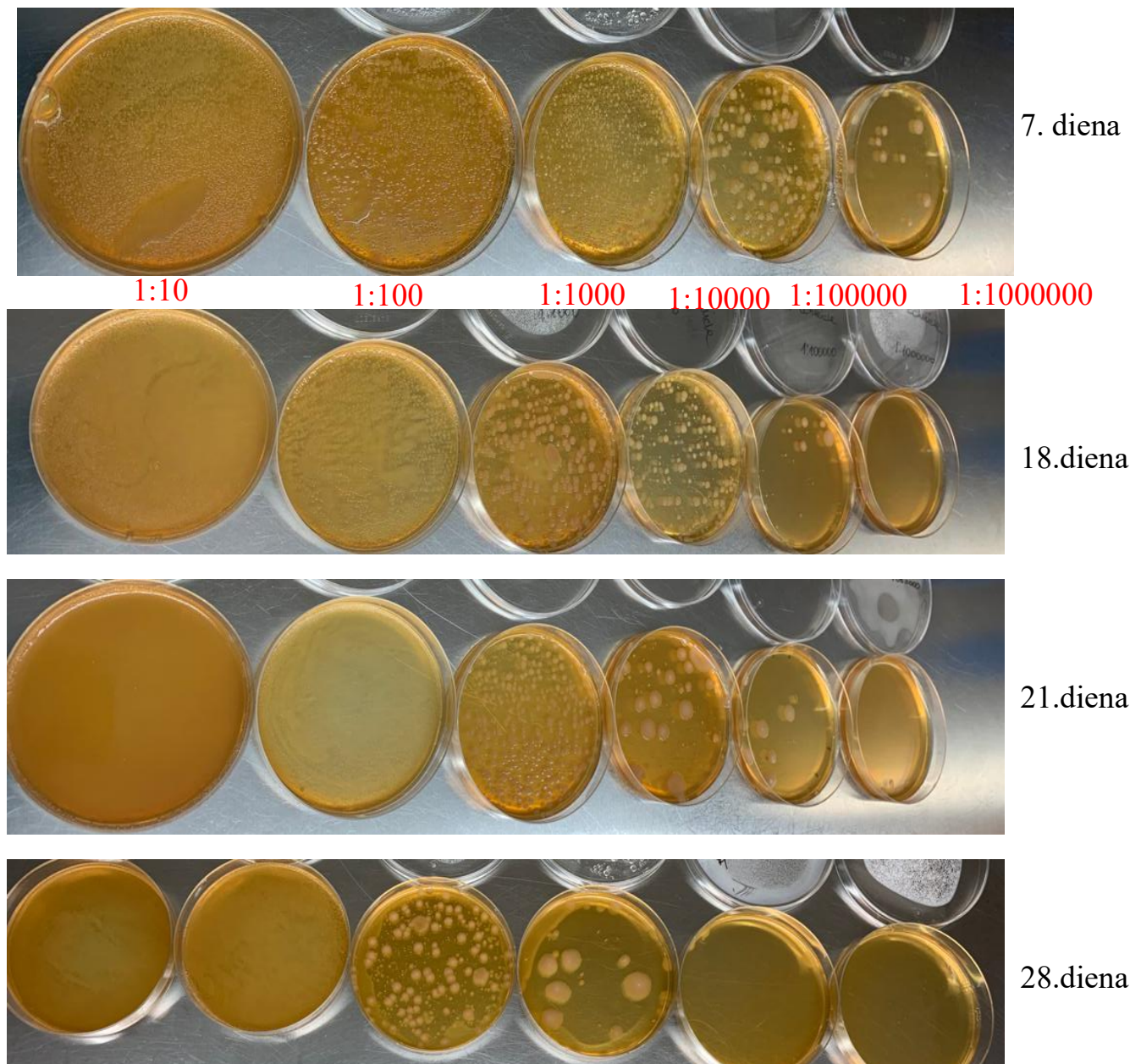
0. diena, 05.02.2021		No log KVV/1g	No=N/100, log KVV/1g
Sakotnējā kontaminācija ar references			
N KVV/1g	9x10 ⁶	6.95	4.95
* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231			U ± 0.5 log.
2 diena (8.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Candida albicans</i>	A	7.0 x 10 ³	3.85
<i>Candida albicans</i>	C	5.0 x 10 ⁶	6.70
<i>Candida albicans</i>	S	1.0 x 10 ⁶	6.00
<i>Candida albicans</i>	SK	1.1 x 10 ⁴	4.04 ± 0.5
<i>Candida albicans</i>	K	3.0 x 10 ⁴	4.48 ± 0.5
7 diena (15.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Candida albicans</i>	A	7.0 x 10 ⁴	4.85
<i>Candida albicans</i>	C	9.0 x 10 ⁶	6.95
<i>Candida albicans</i>	S	1.0 x 10 ⁶	6.00
<i>Candida albicans</i>	SK	1.4 x 10 ⁶	6.15
<i>Candida albicans</i>	K	6.0 x 10 ⁴	4.78
14 diena (22.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Candida albicans</i>	A	1.0 x 10 ⁵	5.00
<i>Candida albicans</i>	C	8.0 x 10 ⁶	6.90
<i>Candida albicans</i>	S	6.0 x 10 ⁵	5.78
<i>Candida albicans</i>	SK	9.0 x 10 ⁴	4.95
<i>Candida albicans</i>	K	9.0 x 10 ⁴	4.95
21 diena (01.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Candida albicans</i>	A	3.0 x 10 ⁴	4.48 ± 0.5
<i>Candida albicans</i>	C	3.0 x 10 ⁶	6.48
<i>Candida albicans</i>	S	1.0 x 10 ⁵	5.00
<i>Candida albicans</i>	SK	2.9 x 10 ⁵	5.46
<i>Candida albicans</i>	K	3.0 x 10 ³	3.48
28 diena (08.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Candida albicans</i>	A	4.0 x 10 ⁴	4.60
<i>Candida albicans</i>	C	2.0 x 10 ⁶	6.30
<i>Candida albicans</i>	S	4.5 x 10 ⁵	5.65
<i>Candida albicans</i>	SK	5.0 x 10 ⁵	5.70
<i>Candida albicans</i>	K	4.0 x 10 ⁴	4.60

Izvērtējot iegūtos rezultātus, var secināt, ka paraugā SK nav novērota antimikrobiālā aktivitāte pret baktēriju *Escherichia coli* (tabula 2.2.4.). Iepriekš minētā parauga baktēriju dzīvotspēja saglabājās visu uzglabāšanas laiku (2.2.3. attēls).

Tabula 2.2.4. Ekstrakta antimikrobiālās aizsardzības novērtējums pret baktēriju.

0. diena, 05.02.2021		No log KVV/1g	No=N/100, log KVV/1g
Sākotnējā kontaminācija ar references kultūrām			
N KVV/1g	9x10 ⁷	7.95	5.95
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			U ± 0.5 log.
2 diena (8.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Escherichia coli</i>	A	8.0 x 10 ⁵	5.90
<i>Escherichia coli</i>	C	4.0 x 10 ⁵	5.60
<i>Escherichia coli</i>	S	2.0 x 10 ⁴	4.30
<i>Escherichia coli</i>	SK	2.6 x 10 ⁶	6.41 ± 0.5
<i>Escherichia coli</i>	K	8.0 x 10 ⁵	5.90
7 diena (15.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Escherichia coli</i>	A	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	C	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	SK	2.4 x 10 ⁷	7.38
<i>Escherichia coli</i>	K	1.1 x 10 ⁵	5.04
14 diena (22.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Escherichia coli</i>	A	1.0 x10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	C	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	SK	1.0 x 10 ⁵	5.70
<i>Escherichia coli</i>	K	1.0 x 10 ¹	1.00
21 diena (01.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Escherichia coli</i>	A	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	C	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	SK	2.0 x 10 ⁶	6.30
<i>Escherichia coli</i>	K	1.0 x 10 ¹	1.00
28 diena (08.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Escherichia coli</i>	A	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	C	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Escherichia coli</i>	SK	4.0 x 10 ⁵	5.60
<i>Escherichia coli</i>	K	1.0 x 10 ¹	1.00

Paraugiem A, C, S, K pēc uzglabāšanas (28. diena) ir novērota būtiska antimikrobiālā aktivitāte, jo baktēriju (*Escherichia coli*) samazinājums sastādīja vairāk nekā 3 log KVV/1ml (tabula 2.2.4.)

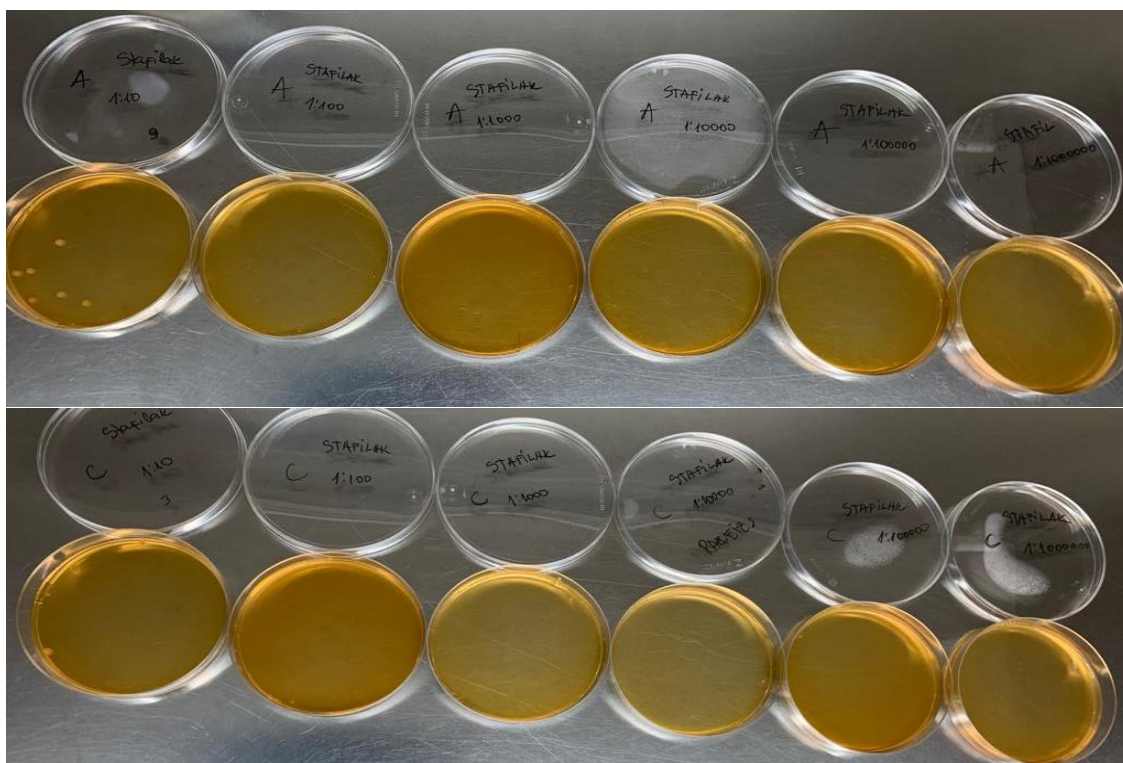


2.2.3. attēls. Uzglabāšanas laikā baktēriju *Escherichia coli* attīstība paraugā SK.

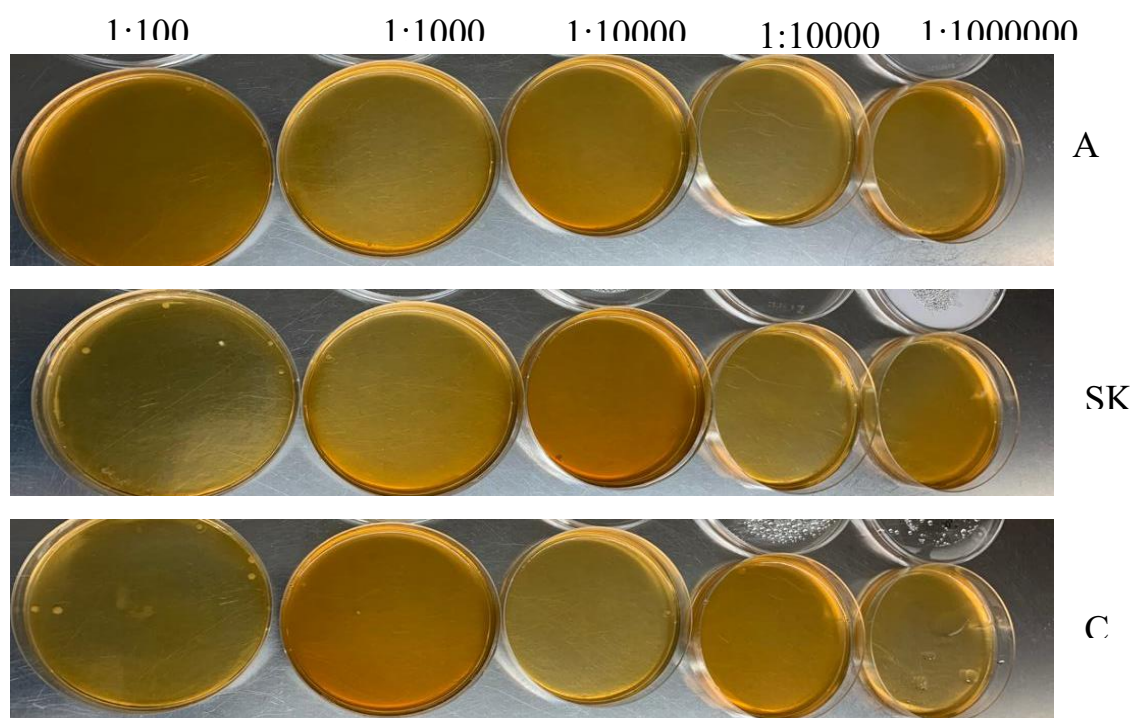
Iegūtie rezultāti liecina, ka antimikrobiālā aktivitāte pret baktēriju *Staphylococcus aureus* bija novērota visiem pētāmajiem paraugiem (tabula 2.2.5.). Neliels baktēriju *Staphylococcus aureus* saturs bija konstatēts 28. uzglabāšanas dienā (tabula 2.2.5.), paraugiem A, C (2.2.4. attēls). Tomēr šis saturs nav būtisks un nepārsniedza baktēriju atļauto robežu samazinājumu 3 log KVV/1ml.

Tabula 2.2.5. Ekstrakta antimikrobiālās aizsardzības novērtējums pret baktēriju.

0. diena, 05.02.2021		No log KVV/1g	No=N/100, log KVV/1g
Sākotnējā kontaminācija ar references kultūrām			
N KVV/1g	4.1x10 ⁷	7.61	5.61
* Staphylococcus aureus ATCC 6538			U ± 0.5 log.
2 diena (8.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
Staphylococcus aureus	A	3.0 x 10 ³	3.48 ± 0.5
Staphylococcus aureus	C	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	S	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	SK	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	K	3.0 x 10 ⁴	4.48 ± 0.5
7 diena (15.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
Staphylococcus aureus	A	9.0 x 10 ²	2.95 ± 0.5
Staphylococcus aureus	C	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	S	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	SK	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	K	1.0 x 10 ¹	1.00
14 diena (22.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
Staphylococcus aureus	A	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	C	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	S	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	SK	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	K	1.0 x 10 ¹	1.00
21 diena (01.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
Staphylococcus aureus	A	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	C	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	S	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	SK	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	K	1.0 x 10 ¹	1.00
28 diena (08.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
Staphylococcus aureus	A	9.0 x 10 ¹	1.95
Staphylococcus aureus	C	3.0 x 10 ¹	1.48
Staphylococcus aureus	S	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	SK	1.0 x 10 ¹	1.00
Staphylococcus aureus	K	1.0 x 10 ¹	1.00



2.2.4. attēls. Baktēriju *Staphylococcus aureus* attīstība pēc 28 dienu uzglabāšanas paraugos A, C.



2.2.5. attēls. Baktēriju *Pseudomonas aeruginosa* attīstība paraugos A, SK, C, pēc septiņu dienu uzglabāšanas.

Izvērtējot iegūtos rezultātus, var secināt, ka visiem analizējamiem paraugiem ir konstatēta antimikrobiālā aktivitāte pret baktēriju *Pseudomonas aeruginosa* (2.2.6. tabula). Baktēriju

pieaugums ir konstatēts tikai otrajā un septītajā uzglabāšanas dienā (2.2.5. attēls) paraugos A, SK, C.

Tabula 2.2.6. Ekstrakta antimikrobiālās aizsardzības novērtējums pret baktēriju.

0. diena, 05.02.2021		No log KVV/1g	No=N/100, log KVV/1g
Sākotnējā kontaminācija ar references kultūrām			
N KVV/1g	2.6x10 ⁶	6.41	4.41
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027			U ± 0.5 log.
2 diena (8.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A	1.0 x 10 ³	3.00 ± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SK	1.0 x 10 ³	3.00 ± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K	1.0 x 10 ¹	1.00
7 diena (15.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A	1.0 x 10 ²	2.00 ± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C	5.0 x 10 ²	2.70 ± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SK	6.0 x 10 ²	2.78 ± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K	1.0 x 10 ¹	1.00
14 diena (22.02.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SK	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K	1.0 x 10 ¹	1.00
21 diena (01.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SK	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K	1.0 x 10 ¹	1.00
28 diena (08.03.2021)	Paraugs	Rezultāts KVV/1g	log KVV/1g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SK	1.0 x 10 ¹	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K	1.0 x 10 ¹	1.00

Kritēriji un rezultātu interpretācija

Izvērtējot iegūtos datus, tie ir jāsalīdzina ar standartā (LVS EN ISO 11930:2019) (tabula 2.2.7.), dotajiem kritērijiem. Tas nozīmē, ka baktēriju koloniju veidojošo vienību pieaugums nedrīkst būt lielāks par 3 log KVV/1ml (vai arī nedrīkst būt skaita pieaugums, salīdzinot ar iepriekšējo reizi sk. tabulu 2.2.7.) 7, 14, 28 analizēšanas dienā (izaugušo koloniju veidojošo vienību skaits ir jāsalīdzina ar inokulēto mikroorganismu skaitu paraugā **No**). Raugu (*C.albicans*) koloniju veidojošo vienību pieaugums nedrīkst būt lielāks par 1 log KVV/1ml (vai arī nedrīkst būt skaita pieaugums, salīdzinot ar iepriekšējo reizi, sk. tabulu 2.2.7.) 7, 14, 28 analizēšanas dienā. Savukārt pelējuma (*A.brasiliensis*) koloniju veidojošo vienību pieaugums nedrīkst būt lielāks par 0 vai 1 log KVV/1ml 14, 28 analizēšanas dienā, sk. tabulu 2.2.7.

Tabula 2.2.7. Paraugu antimikrobiālās aizsardzības spēju novērtē atbilstoši kritērijiem.

Log redukcijas vērtības $R_x = \lg N_0 - \lg N_x^*$								
Mikroorg.	Baktērijas			<i>C.albicans</i>			<i>A.brasiliensis</i>	
Testēšana	7 d.	14 d.	28 d.	7 d.	14 d.	28 d.	14 d.	28 d.
A kritērijs	≥ 3	≥ 3 un NI**	≥ 3 un NI	≥ 1	≥ 1 un NI	≥ 1 un NI	≥ 0	≥ 1
B kritērijs	Nav testēts	≥ 3	≥ 3 un NI	Nav testēts	≥ 1	≥ 1 un NI	≥ 0	≥ 0 un NI

A kritērijs - Paraugiem piemīt antimikrobiālās aizsardzības potenciāls, t.i., līdzeklis ir aizsargāts pret mikroorganismu proliferāciju (potenciāli nav riska patērētājam).

B kritērijs - Paraugu antimikrobiālās aizsardzības potenciāls ir pieņemams, ja risku analīzes rezultāti norāda uz citu aizsardzības faktoru esamību, kas minimizē mikrobioloģisko risku (piem., iepakojums (ar dozatoru, kas minimizē kontaminācijas risku)).

* **U** - pieļaujamā nenoteiktība (*deviation*) ir 0.5 log.

** **NI** - *no increase* - nav skaita pieaugums, salīdzinot ar iepriekšējo reizi.

Secinājumi

1. Nevienam no pētītajiem paraugiem nav konstatēta antimikrobiālā aizsardzība pret mikroskopisko sēni *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.
2. Tendence uz antimikrobiālās aizsardzības īpašībām pret raugu *Candida albicans* ATCC 1023, novērota paraugiem A, K.
3. Pēc 14 dienu uzglabāšanas antimikrobiālās aizsardzības īpašības pret baktēriju *Escherichia coli* ATCC 8739, konstatētas četriem paraugiem (A,K,S,C) izņēmums ir paraugs SK, kuram šīs īpašības nebija konstatētas.
4. Jau pēc septiņu dienu uzglabāšanas visiem paraugiem novērota antimikrobiālā aktivitāte pret baktēriju *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
5. Savukārt pēc 14 dienu uzglabāšanas antimikrobiālā aizsardzība pret *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, konstatēta visiem pētāmajiem paraugiem.
6. **No pētāmajiem paraugiem var izdalīt divus labākos A, K, jo tiem ir antimikrobiālās aizsardzības pret lielāko mikroorganismu spektru. Tomēr jāatzīmē arī paraugs S, jo šis paraugs starp pētāmo baktēriju sugām neparādīja koloniju veidojošo vienību pieaugumu.**

Turpmākais pētījums

Pamatojoties uz iegūtajiem mikrobioloģisko rezultātu datiem, izvēlēts turpmākais pētījums ekstraktu gatavošanai, izmantojot dažādu lapu kombinācijas. Sagatavoti un analizēti sauso lapu ekstrakti, pēc kompleksa enzīma Laminex BG (E) pievienošanas šādās kombinācijās un 9 stundu fermentēšanas +35°C temperatūrā:

1. Aveņu lapas /Smiltsērķšķu lapas E* 0,1%
2. Aveņu lapas /Smiltsērķšķu lapas E 0,25%
3. Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,1%
4. Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,25%
5. Aveņu lapas fermentētas E 0,1%
6. Aveņu lapas fermentētas E 0,25
7. Aveņu lapas E 0,1%
8. Aveņu lapas E 0,25%
9. Smiltsērķšķu lapas 0.1%
10. Smiltsērķšķu lapas E 0.25%

Sagatavotajiem sauso lapu ekstraktiem analizēts tanīnu saturs. Rezultāts izteikts ar tanīnskābes ekvivalentu mg 100 g⁻¹. Rezultāti apkopoti 2.2.8. tabulā.

2.2.8. tabula. **Tanīnu saturs ekstraktos**

Nr.p.k.	Ekstrakts	mg tanīn skābes ekv, 100g ⁻¹	STDEV
1	Aveņu lapas /Smiltsērķšķu lapas E* 0,1%	0.87	0.01
2	Aveņu lapas /Smiltsērķšķu lapas E 0,25%	0.87	0.02
3	Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,1%	0.73	0.03
4	Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,25%	0.69	0.04
5	Aveņu lapas fermentētas E 0,1%	0.55	0.02
6	Aveņu lapas fermentētas E 0,25	0.54	0.02
7	Aveņu lapas E 0,1%	0.83	0.01
8	Aveņu lapas E 0,25%	0.83	0.03
9	Smiltsērķšķu lapas 0.1%	0.98	0.03
10	Smiltsērķšķu lapas E 0.25%	1.05	0.04

*E1- 0,1% enzīms Laminex BG un E2 - 0,25 % enzīms Laminex BG

Fermentēšanas process ievērojami samazināja flavonoīdu saturu aveņu lapās. Flavonoīdu saturs mix ekstraktos aveņu/smiltsērķšķu lapu ekstraktos no 148,36 mg katehīna ekv.100g⁻¹ (E2) līdz 159,18 mg katehīna ekv.100g⁻¹ (E1). Pievienotā kompleksā enzīma daudzums nedaudz ietekmē flavonoīda saturu, ja enzīms ir pievienots vairāk (0,25%), tad flavonoīda daudzums ekstraktā ir mazāks (2.2.9. tabula).

2.2.9. tabula. **Flavonoīdu saturs ekstraktos**

Nr. p.k.	Ekstrakts	mg katehīna ekv. 100g ⁻¹	STDEV
1	Aveņu lapas/Smiltsērķšķu lapas E* 0,1%	159.18	6.09
2	Aveņu lapas/Smiltsērķšķu lapas E 0,25%	148.36	1.19
3	Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,1%	134.84	2.40
4	Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,25%	125.60	3.01
5	Aveņu lapas fermentētas E 0,1%	119.63	1.79
6	Aveņu lapas fermentētas E 0,25	118.96	2.41
7	Aveņu lapas E 0,1%	189.62	2.40
8	Aveņu lapas E 0,25%	188.05	1.79
9	Smiltsērķšķu lapas 0.1%	127.41	1.19
10	Smiltsērķšķu lapas E 0.25%	121.94	3.01

*E1- 0,1% enzīms Laminex BG un E2 - 0,25 % enzīms Laminex BG

Fermentēšanas process ievērojami samazināja kopējo fenolu saturu aveņu lapu ekstraktā. Jauktajos ekstraktos (fermentētas aveņu lapas /smiltsērķšķu lapas) kopējo fenolu saturs bija augstāks par (21.6%), salīdzinot ar fermentēto aveņu lapu ekstraktiem. Maisījumam pievienotās smiltsērķšķu lapas paaugstināja kopējo fenolu saturu (2.2.10. tabula).

2.2.10. tabula. **Kopējo fenolu saturs ekstraktos**

Nr. p.k.	Ekstrakts	mg galluskābes ekv. /100g	STDEV
1	Aveņu lapas/Smiltsērķšķu lapas E* 0,1%	405.66	3.89
2	Aveņu lapas/Smiltsērķšķu lapas E 0,25%	397.72	1.14
3	Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,1%	333.69	7.67
4	Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,25%	330.69	3.85
5	Aveņu lapas fermentētas E 0,1%	257.40	4.53
6	Aveņu lapas fermentētas E 0,25	261.24	3.15
7	Aveņu lapas E 0,1%	391.76	1.15
8	Aveņu lapas E 0,25%	391.00	1.90
9	Smiltsērķšķu lapas 0.1%	446.94	4.14
10	Smiltsērķšķu lapas E 0.25%	444.74	3.84

*E1- 0,1% enzīms Laminex BG un E2 - 0,25 % enzīms Laminex BG

Izstrādāto ekstraktu antioksidantu aktivitāte norādīta 2.2.11. tabulā.

2.2.11. tabula. **Antioksidantu aktivitāte (DPPH[•]) lapu ekstraktos**

Nr. p.k.	Ekstrakts	M Troloks ekv, 100 g ⁻¹	STDEV
1	Aveņu lapas/Smiltsērķšķu lapas E* 0,1%	1.78	0.05
2	Aveņu lapas/Smiltsērķšķu lapas E 0,25%	1.69	0.03
3	Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,1%	1.58	0.04
4	Aveņu lapas fermentētas/Smiltsērķšķu lapas E 0,25%	1.47	0.03
5	Aveņu lapas fermentētas E 0,1%	1.12	0.02
6	Aveņu lapas fermentētas E 0,25	1.09	0.02
7	Aveņu lapas E 0,1%	1.59	0.02
8	Aveņu lapas E 0,25%	1.59	0.02
9	Smiltsērķšķu lapas 0.1%	1.96	0.03
10	Smiltsērķšķu lapas E 0.25%	1.94	0.04

*E1- 0,1% enzīms Laminex BG un E2 - 0,25 % enzīms Laminex BG

Secinājumi

Izvērtējot lapu ekstraktu analīžu rezultātus, redzami atšķirīgi rādītāji: augstākais tanīnu saturs noteikts smiltsērķšķu lapu ekstraktos, augstākais flavonoīdu saturs – aveņu lapu ekstraktos, kopējais fenolu saturs un antioksidantu aktivitāte – smiltsērķšķu lapu ekstraktos. Ņemot vērā antimikrobiālās aizsardzības pētījumu pret lielāko mikroorganismu spektru un šī pētījuma rezultātus, atlasīti paraugi, kuriem izstrādāti tehniskie noteikumi un lapu ekstrakta ražošanas procesa apraksts.

FERMENTĀCIJA UN TĀS IETEKME UZ LAPU ĶĪMISKO SASTĀVU

Ievads

Katehīni ir galvenās tējas lapās esošās bioķīmiskās sastāvdaļas, un tās fermentācijas laikā oksidējas par teaflavīniem (TF) un thearubigīniem (TR). TF ir atbildīgi par melnās tējas savelkošo garšu, spilgtumu, krāsu un spirtumu, un TR veicina tējas sajūtu mutē (biezumu) un krāsu. Melno tēju pagatavo, sasmalcinot un žāvējot svaigas tējas lapas, lai pirms galīgās apstrādes panāktu fermentāciju (Tang et al., 2018). Fermentācijas laikā daži katehīni apvienojas, veidojot kompleksus teaflavīnus un citus flavonoīdus, kas piešķir melnajai tējai raksturīgu garšu un krāsu. Lai novērstu fermentāciju, zaļā tēja tiek pagatavota, kad svaigas lapas tiek ātri apstrādātas, bet savukārt oolong tēja ir daļēji raudzēta (Khan & Mukhtar, 2018). Tējas augu lapās ir tādi enzīmi kā polifenola oksidāze un peroksidāze, kuras kaltēto tēju tvaicējot, vārot mikroviļņu krāsnī vai karsējot, inaktivē endogēnās oksidāzes. Veselību veicinoši savienojumi, piemēram, katehīni, teaflavīni, thearubigīni, flavonoli, kofeīns un citi fenola savienojumi, pārsvarā ir izplatīti zaļās un melnās tējas lapās. Katehīna atvasinājumi pieder pie flavan-3-oliem un ir zināms, ka tie ir daudz tējas produktos. Jo īpaši teaflavīni ir atbildīgi savienojumi, kas nosaka melnās tējas uzlējumu krāsu un garšu kā epikatehīna (EC), epigallokatehīna (EGC) un gallskābes konjugātus fermentācijas oksidācijas reakcijās (Musial et al., 2020). Pētījumā par detalizētu flavonoīdu profilu izmaiņām katrā zaļās un melnās tējas lapu apstrādes posmā, noskaidroja, ka pēc grauzdēšanas zaļajās lapās ievērojami palielinājās kopējais flavonoīdu saturs. Teaflavīni (TF) atradās svaigās lapās, bet pēc grauzdēšanas pilnībā pazuda. Apstrāde ar karsēšanu (250–300 ° C) bija viens no svarīgākajiem faktoriem, kas ietekmēja tējas ķīmisko sastāvu, un tika uzskatīts, ka tas izraisa noteiktu sastāvdaļu palielināšanos vai samazināšanos, žāvējot vai hidrolizējoties bezūdens apstākļos. Iespējams, ka grauzdēšanas posms arī samazina katehīna satura zudumu, deaktivizējot enzīmu polifenola oksidāzes (PPO), izraisot katehīna noārdīšanos svaigās lapās. Zaļo lapu pārstrādē grauzdēšana un žāvēšana bija vissvarīgākie faktori, mainot atsevišķu katehīnu un flavonolu saturu, un secināts, ka flavonoīdu saturu var optimizēt, kontrolējot šīs darbības nākotnē (Lee et al., 2019). Jo īpaši konstatēts, ka žāvēšanas soļi ir arī faktors, kas pozitīvi ietekmē flavonoīdu satura palielināšanos abu tēju apstrādē. Tāpēc šis rezultāts norādīja, ka katra apstrādes posma detalizētiem nosacījumiem bija svarīga loma tējas lapu flavonoīdu profilu maiņā (Lee et al., 2019). Kopumā fermentācijas iznākumu var ietekmēt dažādi apstākļi, kā, piemēram, temperatūra, laiks un pH, kā arī noplūktās lapas daudzums un stāvoklis (viena lapa vai pumpurs līdz četrām lapām un pumpurs). Fermentētā lapu sula, kas veidojas no jauniem dzinumiem ar trim lapām un pumpuru vai četrām lapām un pumpuru, nodrošināja augstu kopējo pieņemamību jeb patikšanas pakāpi un TF koncentrāciju. Šīs atšķirības rodas tāpēc, ka tējas lapām ar dažādiem noplūkušas (ievākušas) - standartiem ir atšķirīgs katehīna saturs un enzīmu aktivitātes (Tang et al., 2018).

Pamatojoties uz literatūras apskatu par fermentēšanas ietekmi uz flavonoīdu izmaiņām atkarībā no lapu apstrādes un to antimikrobiālām īpašībām, projekta ietvaros veiktas laboratoriskās analīzes divu veidu avenu lapām: savvaļā augošām meža avenu un rudens mājas avenu lapām šķirnei 'Polana'. Ķīmiskā sastāva salīdzināšanai abu avenu lapu paraugi tika gan žāvēti, gan fermentēti.

Materiāli un metodes

Meža un mājas aveņu lapu paraugi iegūti Dobelē, Dārzkopības institūtā. Aveņu lapas pēc ievākšanas nekavējoties fermentētas un žāvētas, vadoties pēc noteiktas shēmas, tālāk iepakotas un uzglabātas tumšā, sausā vietā 2 mēnešus līdz analizēšanas procesam. Lapu paraugiem noteikti rādītāji: kopējie fenoli, flavonoīdi, tanīni, antioksidantu aktivitāte.

Aveņu lapu paraugu sagatavošana

Ievāktās aveņu lapas pirms kaltēšanas nemazgā. Izvēlas veselas, labas lapas bez kaitēkļiem, atdala kātus.

Kaltēšana

Izvēlētās lapas svaigas saliek vienmērīgā slānī uz sieta, un ievieto žāvējamā (infrasarkanā) skapī 40 °C temperatūrā uz 1h (att. 2.2.6.) Izkaltušām lapām jābūt sausām un viegli saberžamām.

Fermentācija

Pirms fermentācijas lapas ievietotas Binder saldēšanas skapī -20 ° C uz 1 stundu izbērtā veidā. Pēc izņemšanas no saldētavas (att. 2.2.7.) katra lapa mehāniski saberzta, lai izdalītos sula (att. 2.2.8.). Saberztās lapas ievietotas konteinerā/traukā un apsegtas ar kokvilnas dvieli. Uzliktas zem sloga uz 15–17 stundām. Fermentētas tumšā istabā, temperatūrā ne augstākā par 23 °C. Turēšanas ilgums atkarīgs no smaržas intensitātes. Pēc turēšanas zem sloga, lai apturētu fermentācijas procesu, sākotnēji lapas žāvētas 100 ° C 30 minūtes. Tad temperatūra samazināta līdz 50 ° C un žāvēšanas process turpināts, līdz lapas kļuva sausas.



2.2.6. att. Aveņu lapu sagatavošana kaltēšanai.



2.2.7. att. Saldētas aveņu lapas.



2.2.8. att. Saberztas aveņu lapas.

Rezultāti

Aveņu lapu (svaigu un fermentētu) ķīmisko analīžu rezultāti norādīti 2.2.12. tabulā, svaigu un fermentētu lapu ūdens ekstrakti 2.2.9. attēlā.

2.2.12. tabula. **Datu kopa: kopējo fenolu, flavonoīdu un tanīnu saturs aveņu lapu paraugos**

Lapu ekstrakti	Aveņu sausās drogas daudzums, g uz 100ml ūdens		Fenolu saturs, mg 100 g		Tanīnu saturs mg 100g		Flavonoīdu saturs, mg 100 g		AOA (DPPH), Troloks ekv. mili moli /100g	
	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV	VID	STDEV
Meža avenēs	5.9	0.9	26.4	1.1	0.8	0.0	11.9	0.3	152.6	16.1
Fermentētas meža avenēs	5.8	0.4	17.9	1.0	0.5	0.0	6.6	0.5	102.5	3.2
Mājas avenēs	5.8	0.9	27.0	3.0	0.8	0.2	11.1	1.2	168.0	22.2
Fermentētas mājas avenēs	5.6	0.8	26.0	0.9	0.8	0.0	10.6	0.8	159.4	9.7



2.2.9. attēls. **Lapu ūdens ekstrakti.**

Kopējo fenolu saturs aveņu lapu paraugos variē no 360,1 līdz 5112,0 mg 100 g⁻¹, flavonoīdu saturs – no 615,82 līdz 2430,11 mg 100 g⁻¹, savukārt tanīnu saturs no 46,77 līdz 367,30 mg 100 g⁻¹. Iegūtie rezultāti norāda, ka pastāv atšķirība starp lapu ūdens un 40% etanola ekstraktiem. Vislielāko fenolu, flavonoīdu un tanīnu saturu uzrāda mājas aveņu lapu ūdens ekstrakta paraugs. Zinātniskos pētījumos norādīts, ka ūdens ir viens no labākajiem šķīdinātājiem polāro savienojumu (pie kā pieder daudzi fenolu savienojumi) ekstrakcijai no augu materiāla (Seo et al., 2014). Vislielāko antiradikālo aktivitāti uzrādīja savvaļas aveņu lapu paraugs ūdens ekstraktā – 9,82 moli/100g. Otru lielāko vērtību uzrādīja mājas aveņu lapu paraugs 40% etanola ekstraktā – 9,24 moli/100g. Savukārt vismazāko antiradikālo efektivitāti uzrādīja fermentētais savvaļas aveņu lapu paraugs 40% etanola ekstraktā, tikai 1,72 moli/100g.

Ir redzams, ka savvaļā iegūto aveņu lapu paraugs no mājās audzēto aveņu lapu parauga atšķiras – mājās augušām aveņu lapām ir vairāk sekundāro metabolītu un labāka bioloģiskā aktivitāte. Tas skaidrojams ar abu paraugu attīstības stadiju ievākšanas laikā. Ievācamo paraugu attīstības stadijas parametri tiek reglamentēti saskaņā ar informāciju par kultūraugu attīstību (attīstības stadija (AS)) (Valsts augu aizsardzības dienests, 2021). Meža avenēm ievākšanas

laikā (30. jūnijā) jau bija izveidojušies ziedu aizmetņi (attīstības fāze 5), savukārt rudens avenēs šajā laikā bija sasniegušas tikai trešo attīstības fāzi (tuvu dzinumam augšanas beigām). Zinātniskie pētījumi norāda, ka avenju un kazeņu lapās dažādās augu attīstības stadijās ķīmisko savienojumu daudzums būtiski atšķiras (Ponder & Hallmann, 2019 un Noémi, Éva, & Enikő, 2018). Rudens avenēm ķīmisko sastāvu var ietekmēt arī augšanas klimatiskie apstākļi (Freeman et al., 2011).

Secinājumi

- 1) Vislielākais kopējo polifenolu (P), flavonoīdu (F) un tanīnu (T) saturs starp analizētajiem paraugiem noteikts mājas rudens avenju tējai (attiecīgi $P=26,96 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$; $F=11,14 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ un $T=0,84 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$).
- 2) Pamatojoties uz zinātniskiem pētījumiem, pieņemts, ka fermentētu lapu paraugi ir piemēroti ekstraktu ar antiradikālām un antimikrobiālām īpašībām izstrādei, īpaši kombinācijā ar svaigām lapām.
- 3) Augu lapu ekstraktu pētījumu rezultātā izstrādāti trīs ekstrakti, kas būtu piemēroti lietošanai kosmētikas ražošanā, un ne tikai. Pateicoties to ķīmiskajam sastāvam (tanīnu un flavonoīdu saturam), ekstrakti piemēroti funkcionālas pārtikas produktu izstrādei.
- 4) Sagatavoti ražošanas procesa apraksti un tehniskie noteikumi (Pielikumi R2.2.1.; R2.2.2.; R2.2.3.)**

Literatūra

- Abliz A., Q. Aji Q., E. Abdusalam E., X. Sun X., A. Abdurahman A., W. Zhou W., N. Moore N., and A. Umar A., 2014. Effect of *Cydonia oblonga* Mill. leaf extract on serum lipids and liver function in a rat model of hyperlipidaemia, *Journal of Ethnopharmacology*, 151, pp. 970-974, 2014.
- Aprea, E., Carlin, S., Giongo, L., Grisenti, M., & Gasperi, F. (2010). Characterization of 14 raspberry cultivars by solid-phase microextraction and relationship with gray mold susceptibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1100-1105.
- Bojana VELJKOVIĆ, Nataša ĐORĐEVIĆ, Zana DOLIĆANIN¹, Braho LIČINA, Marina TOPUZOVIĆ, Milan STANKOVIĆ, Nenad ZLATIĆ, Zora DAJIĆ-STEVANović., 2019. Antioxidant and Anticancer Properties of Leaf and Fruit Extracts of the Wild Raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Notulae Botanicae Horti Cluj-Napoca Agrobotanici*. 47(2): 359-367.
- Buricova L., Andjelkovic M., Cermakova A., Reblova Z., Jurcek O., Kolehmainen, E., Verhe R., Kvasnicka F. (2011.) Antioxidant capacities and antioxidants of strawberry, blackberry and raspberry leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, Vol. 29 (2), p. 181–189.
- Chahar, M. K.; Sharma, N.; Dobhal, M. P.; Joshi, Y. C. Flavonoids: A Versatile Source of Anticancer Drugs. *Pharmacogn. Rev.* 2011, 5(9), 1–12. DOI: 10.4103/0973-7847.79093
- Chawla, R., Arora, R., Singh, S., Sagar, R.K., Sharma, R.K., Kumar, R., Sharma, A., Gupta, M.L., Singh, S., Prasad, J., Khan, H.A., Swaroop, A., Sinha, A.K., Gupta, A.K., Tripathi, R.P., Ahuja, P.S., 2007. Radioprotective and antioxidant activity of fractionated extracts of berries of *Hippophae rhamnoides*. *J. Med. Food* 10, 101–109
- Essafi-Benkhadir K., A. Refai, I. Riahi, S. Fattouch, , H. Karoui, and M. Essafi, 2012. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) peel polyphenols modulate LPS-induced inflammation in human THP-1-derived macrophages through NF- κ B, p38MAPK and Akt inhibition, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418, pp. 180-185, 2012.
- Eun-Young Kwon, Jeonghyeon Lee, Ye Jin Kim, Ara Do, Ji-Young Choi, Su-Jung Cho, Un Ju Jung, Mi-Kyung Lee, Yong Bok Park and Myung-Sook Choi. 2017. Seabuckthorn Leaves Extract and Flavonoid Glycosides Extract from Seabuckthorn Leaves Ameliorates Adiposity, Hepatic Steatosis, Insulin Resistance, and Inflammation in Diet-Induced Obesity. 2017, 9, 569.
- Ganju, L., Padwad, Y., Singh, R., Karan, D., Chanda, S., Chopra, M.K., 2005. Antiinflammatory activity of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *Int. Immunopharmacol.* 12, 1675–1684.
- Geetha, S., Singh, V., Ram, M.S., Ilavazhagan, G., Banerjee, P.K., Sawhney, R.C., 2005. Immunomodulatory effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against chromium (VI) induced immunosuppression. *Mol. Cell Biochem.* 278, 101–109.
- Grundemann C., M. Papagiannopoulos, E. Lamy, V. Mersch-Sundermann, and R. Huber, 2011. Immunomodulatory properties of a lemon-quince preparation (Gencydo®) as an indicator of anti-allergic potency, *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 18, pp. 760–768, 2011
- Gudej J., Tomczyk M. (2004). Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. *Archives of Pharmacal Research*, Vol. 27 (11), p. 1114–1119.
- Gupta, A., Kumar, R., Pal, K., Banerjee, P.K., Sawhney, R.C., 2005. A preclinical study of the effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf extract on cutaneous wound healing in albino rats. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* 4, 88–92

- Gupta, A., Upadhyay, N.K., Sawhney, R.C., Kumar, R., 2008. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Rep. Regen.* 16, 784–790
- Yan, S.X.; Li, X.; Sun, C.D.; Chen, K.S. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of quercetin and its glycosides. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2015, 40, 4560–4567.
- Ksenija Durgo, Ana Belščak-Cvitanovic, Angela Stančić, Jasna Frankic and Draženka Komes, 2012. Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves in Exhibiting Cytotoxic and Cytoprotective Activity and Human Laryngeal Carcinoma and Colon Adenocarcinoma. *Journal of Medical food.* 258-268
- Lee, J.; Jung, E.; Lee, J.; Kim, S.; Huh, S.; Kim, Y.; Kim, Y.; Byun, S.Y.; Kim, Y.S.; Park, D. 2009. Isorhamnetin represses adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Obesity (Silver Spring)* 17, 226–232.
- Marczal, G., 1963. Qualitative studies of the tannin content of *Rubus idaeus* leaf. *Herb. Hung.*, 2, 347-357.
- Martini S., D’Addario C., Colacevich A., Focardi S., Borghini F., Santucci A., Figura N., Rossi C. 2009. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 34 (1), p. 50–59.
- Mikulic-Petkovsek M., Koron D., Zorenc Z., Veberic R. 2017. Do optimally ripe blackberries contain the highest levels of metabolites.? *Food Chemistry*, Vol. 215, p. 41–49.
- Milenkovic-Andjelkovic, A.S.; Andjelkovic, M.Z.; Radovanovic, A.N.; Radovanovic, B.C.; Randjelovic, V. 2016. Phenol composition, radical scavenging activity and antimicrobial activity of berry leaf extracts. *Bulg. Chem. Commun.* 2016, 48, 27–32
- Nikitina V.S., Gerchikov A.Y., Efimenko N.B. 2000. Flavonoids from raspberry and blackberry leaves and their antioxidant activities. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, Vol. 34 (11), p. 596–598.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Iwasaki, M., Kubo, M., Orime, T., Yoshizaki, M., and Naruhashi, N., (1992.) Hydrolysable tannins as chemotaxonomic markers in the Rosaceae. *Phytochemist* 31, 3091-3096.
- Oliveira A. P., J. A. Pereira, P. B. Andrade, P. Valentão, R. M. Seabra, and B. M. Silva, 2007. Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 7926-7930, 2007.
- Oszmiański J., Wojdyło A., Nowicka P., Teleszko M., Cebulak T., Wolanin M. 2015. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* L. species. *Molecules*, Vol. 20 (3), p. 4951–4966.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Gorzelany, J., & Kapusta, I. 2011. Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/ MS. *Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12830-12835.
- Patel, A. V., Rojas-Vera, J., & Dacke, C. G. (2004). Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. *Current Medicinal Chemistry*, 11(11), 1501-1512.
- Pavlović A.V., Papetti A., Zagorac D.Č.D., Gašić U.M., Mišić D.M., Tešić Ž.L., Natić M.M. (2016.) Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia. *Industrial Crops and Products*, Vol. 87, p. 304–314.
- Pētersone A. Ārstniecības augi. 1975. Izdevniecība “Liesma”, Rīga, 306-307 lpp.
- Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K.M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 90, 494–507
- Rauha, J.P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Kähkönen, M.; Kujala, T.; Vuorela, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other

- phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 56, 3–12.
- Ros J.M., Laencina J., Hellina P., Jordan M.J., Vila R., Rumpunen K. 2004. Characterization of juice in fruits of different *Chaenomeles* species. *LWT Food Sci Technol* 2004; 37: 301–307. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, 301–307doi: 10.1016/j.lwt.2003.09.005
- Ros-Garcia JM, Sanchez JL, Hellin P, Jordan MJ, Vila R, Rumpunen K. Characterization of juice in fruits of different *Chaenomeles* species. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37 (2004) 301–307
- Rumpunen K. 2002. *Chaenomeles*: potential new fruit crop for Northern Europe. In: *Trends New Crops New Uses*. Janick J and Whipkey A (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA. 2002, 385–392
- Saggu, S., Divekar, H.M., Gupta, V., Sawhney, R.C., Banerjee, P.K., Kumar, R., 2007. Adaptogenic and safety evaluation of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. *Food Chem. Toxicol.* 45, 609–617.
- Saoussen Benzarti, Helmi Hamdi, Imen Lahmayer, Wala Toumi, Amel Kerkeni, Khadija Belkadhi, and Houcine Sebei. 2015. Total phenolic compounds and antioxidant potential of quince (*Cydonia oblonga* Miller) leaf methanol extract, *International Journal of Innovation and Applied Studies* ISSN 2028-9324 Vol. 13 No. 3 Nov. 2015, pp. 518–526
- Suomela, J.P.; Ahotupa, M.; Yang, B.; Vasankari, T.; Kallio, H. 2006. Absorption of flavonols derived from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 7364–7369.
- Szopa, A.; Kokotkiewicz, A.; Kubica, P.; Banaszczyk, P.; Wojtanowska-Krośniak, A.; Krośniak, M.; Marzec-Wróblewska, U.; Badura, A.; Zagrodzki, P.; Bucinski, A. 2017. Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. ×prunifolia* and their antioxidant activities. *Eur. Food Res. Technol.* 2017, 243, 1645–1657.
- Teleszko, M.; Wojdyło, A. 2015. Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *J. Funct. Foods* 2015, 14, 736–746.
- Upadhyay, N.K., Kumar, R., Siddiqui, M.S., Gupta, A., 2009. Mechanism of woundhealing activity of *hippophae rhamnoides* l. leaf extract in experimental burns. *evid. based complement. Altern. Med.* doi:10.1093/ecam/nep189.
- Urbanaviciute I., Liaudanskas M., Seglina D., Viskelis P., 2019. Japanese quince *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex spach leaves a new source of antioxidants for food. *Int J Food Prop* 2019; 22: 795–803
- Varvara Ferlemi A. and Lamari Fotini N. (2016). *Berry Leaves: An Alternative Source of Bioactive Natural Products of Nutritional and Medicinal Value*. Source: <https://www.mdpi.com/2076-3921/5/2/17>
- Wang S.Y., Lin H.S. (2000.) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48 (2), p. 140–146.

R2.2.1. PIELIKUMS

UZŅĒMUMS	LAD projekts Nr. 19-00-A01612-000006	Izstrādāja: (vārds, uzvārds)
	AVEŅU LAPU EKSTRAKTA RAŽOŠANAS PROCESA APRAKSTS TEHNISKIE NOTEIKUMI	Apstiprina: (vārds, uzvārds)

Tehnoloģiskā procesa apraksts attiecas aveņu lapu ievākšanai, kaltēšanai, aveņu lapu ekstraktu gatavošanai, uzglabāšanai, kvalitatīvo rādītāju noteikšanai, lai īstenotu projektā “Biotehnoloģiju kompetences attīstība augstvērtīgu dārzkopības produktu ieguvei” izvirzītos uzdevumus.

1. AVEŅU LAPU IEVĀKŠANA, APSTRĀDE PIRMS KALTĒŠANAS

Ekstrakta gatavošanai izmanto atbilstošas kvalitātes aveņu dzinumus ar lapām, kas ievākti atbilstošā veģetācijas stadijā saskaņā ar BBCH skalu (1. attēls). Ievācamo dzinumu attīstības stadijas parametri novērtēti, pamatojoties uz Valsts augu aizsardzības dienesta (VAAD) informāciju par kultūraugu attīstību (attīstības stadija (AS)).

<http://noverojumi.vaad.gov.lv/kulturaugu-fenologija/auglaugi>



1. attēls. AS 31-AS 33 – Dzinums sasniedzis apmēram 10-30% no raksturīgā garuma.

- Aveņu dzinumus ar lapām ievāc sausā laikā.
- Pirms apstrādes ievāktos aveņu dzinumus ar lapām novieto vietās, kas ir aizsargātas no tiešu saules staru ietekmes.
- Ievāktos dzinumus ar lapām pēc iespējas ātrāk nogādā uz apstrādes vietu, nemazgā, bet atlapo no stublāja, vienlaikus veic aveņu lapu vizuālo pārbaudi, šķirošanu, aizvācot sadzeltējušās, mehāniski bojātās lapas vai to daļas, vai citu augu piejaukumus (ja tādi ir).

2. AVEŅU LAPU ŽĀVĒŠANA

- Aveņu lapas izklāj uz tīriem, sausiem sietiem vai auduma rāmjiem, žāvē piemērotā aprīkojumā ar mākslīgo ventilāciju.
- Lapas žāvē + 40 °C temperatūrā.
- Žāvēto aveņu lapu sausuma pakāpi nosaka ar tausti, lapām ir jālūzt. Mitruma saturam jābūt robežās no 8-10%.

3. EKSTRAKTA GATAVOŠANA

- Kaltētās, sausās aveņu lapas samal pulverī, izmantojot piemērotas dzirnavas.
- Sagatavotais aveņu lapu pulveris iesvērts traukā (proporcija 1g:100g ūdens), atbilstoši pievienots kompleksā enzīma Laminex BG daudzums (0.1%). Ekstrakcijas laikā pēc enzīma pievienošanas palielinās salicilātu hidrolīze, tiek panākts pilnvērtīgāks ekstrahēšanās process.
- Sagatavotajam ekstraktam noteikts pH. Nepieciešamības gadījumā pH piekorigē ar sāļsskābes vai nātrija hidroksīda šķīdumu līdz pH 5.5, rūpīgi izmaisot.
- Trauku ar ekstraktu nosedz, ievieto termostātā, ekstrakciju veic +35 °C temperatūrā deviņas stundas.
- Lai inaktivētu fermentu darbību, ekstraktu uzkarsē līdz 100°C temperatūrai 10 minūtes.
- Ekstrakts tiek atdzesēts, izfiltrēts caur auduma (piem., lavsāna) filtru. Lai iegūtu dzidrāku filtrātu, lapu ekstraktu centrifugē vai filtrē ar atbilstošu aprīkojumu.

4. IEPAKOŠANA UN MARĶĒŠANA

- Iegūto dzidro aveņu lapu ekstraktu paraugu sapilda marķētos tīros, hermētiskos traukos.
- Iepakojumam jānodrošina produkta kvalitātes rādītāju un īpašību saglabāšana. Iepakojumam jāatbilst MK Noteikumu Nr.808 "Noteikumi par materiāliem un izstrādājumiem, kas paredzēti saskarei ar pārtiku" prasībām.

Marķēšana.

- Katru produkta taras vienību marķē ar **etiķeti**.
- Marķējumam jāatbilst aktuālo normatīvo aktu prasībām.
- Marķējumam jābūt neizdzēšamam, viegli salasāmam un saskatāmam.
- Etiķetei jābūt tīrai, bez poligrāfiskiem defektiem, bez krokām.
- Etiķetei vai marķējumam jābūt izturīgam pret ārējās vides ietekmi.

Marķējumā – etiķetē jāuzrāda šāda informācija:

- produkta nosaukums un (vai) preču zīme;
- ražotāja nosaukums vai ražotāja zīme (logo), juridiskā adrese, telefona numurs un mājas lapas adrese;
- neto masa vai tilpums;
- produkta sastāvdaļu saraksts atbilstoši Latvijas Republikas spēkā esošajai likumdošanai;
- būtiskās piezīmes;
- rekomendētā uzglabāšanas temperatūra no +0°C līdz +4 °C;
- izcelsmes valsts;

- derīguma garantijas termiņš ar vārdiem “**Ieteicams līdz**”, datums identificē partiju.

5. KVALITATĪVIE RĀDĪTĀJI AVEŅU LAPU EKSTRAKTAM

Ekstraktu **organoleptiskajām, fizikāli – ķīmiskajām, mikrobioloģiskām īpašībām** jāatbilst noteiktajiem rādītājiem 1.tabulā.

Rādītāja nosaukums	Aveņu lapu ekstrakts	Pārbaudes metode*
1.Izskats	Viendabīgs šķidrums bez auga lapu daļu piemaisījumiem	Pēc TN 5.1. punkta
2.Aromāts	Raksturīgs, patīkams kaltētu aveņu lapu aromāts	Pēc TN 5.1. punkta
3.Krāsa	Brūna ar nelielu zaļganu nokrāsu, botāniskajam sugas raksturojumam atbilstošā krāsā	Pēc TN 5.1. punkta
4.pH	5.5	Pēc TN 5.2. punkta
5.Kopējais fenolu saturs, mg Gal sk.ekv.	Ne mazāk kā 350 mg 100 g	Pēc TN 5.3.punkta
6.Tanīnu saturs, mg Kateh.ekv.	0,80 mg/100g	Pēc TN 5.4. punkta
7. Mikrobioloģiskie rādītāji: Pelējuma sēnītes Raugu šūnas Kopējais mikroorganismu skaits	<50 KVV/1 g <50 KVV/1 g <100 KVV/1 g	Nosaka akreditēta laboratorija

*pārbaudes metodes

5.1.Produkta izskatu un krāsu nosaka vizuāli, apskatot pārbaudāmo paraugu – ekstraktu ielietu traukā, paceļot trauku pret gaismas avotu. Aromātu pārbauda organoleptiski.

5.2.pH mērīts ar pH metru Jenway (Kalibrācija saskaņā ar iekārtas ekspluatācijas noteikumiem).

5.3.Kopējais fenolu saturs, mg Galluskābes ekv., noteikts ar spektrofotometrisku metodi, saskaņā ar Singleton et al., 1999.

5.4.Tanīnu saturs, mg Katehīna ekv. noteikts ar spektrofotometrisku metodi, saskaņā ar Paver et al., 2010.

6. KVALITĀTES GARANTIJAS

- Produkta kvalitāti apliecina uzņēmuma pārstrādes vadītājs.
- Visos ekstrakta pagatavošanas aprites posmos (lapu ievākšana, apstrāde, ekstraktu ieguve, iepakojšana un uzglabāšana) uzņēmumā tiek nodrošinātas obligātās nepieciešamās higiēnas prasības saskaņā ar ieviesto paškontroles sistēmu.
- Izgatavotājs garantē produkcijas atbilstību šī apraksta prasībām, ja patērētājs ievēro šajos noteikumos uzrādītos uzglabāšanas noteikumus.

Literatūra

Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152-178.)

Paaver, U., Matto, V. and Raal A. (2010) Total tannin content in distinct *Quercus robur* L. Galls. *AJ Medical plants research* Vol.4(8), pp. 702-705.

<https://doi.org/10.5897/JMPR10.091>

R2.2.2. PIELIKUMS

UZŅĒMUMS	LAD projekts Nr. 19-00-A01612-000006	Izstrādāja: (vārds, uzvārds)
	FERMENTĒTU AVEŅU LAPU EKSTRAKTA RAŽOŠANAS PROCESA APRAKSTS TEHNISKĀ SPECIFIKĀCIJA	Apstiprina: (vārds, uzvārds)

Tehnoloģiskā procesa apraksts attiecas uz aveņu lapu ievākšanu, saldēšanu, fermentēšanu, kaltēšanu, fermentētu aveņu lapu ekstraktu gatavošanu, uzglabāšanu, kvalitatīvo rādītāju noteikšanu, lai īstenotu projektā “Biotehnoloģiju kompetences attīstība augstvērtīgu dārzeņkopības produktu ieguvei” izvirzītos uzdevumus.

1. AVEŅU LAPU IEVĀKŠANA, APSTRĀDE PIRMS FERMENTĒŠANAS

Ekstrakta gatavošanai izmanto atbilstošas kvalitātes aveņu dzinumus ar lapām, kas ievākti atbilstošā veģētācijas stadijā saskaņā ar BBCH skalu (1. attēls).

Ievācamo dzinumu attīstības stadijas parametri novērtēti, pamatojoties uz Valsts augu aizsardzības dienesta (VAAD) informāciju par kultūraugu attīstību (attīstības stadija (AS)).

<http://noverojumi.vaad.gov.lv/kulturaugu-fenologija/auglaugi>



1. attēls. AS 31-AS 33 – Dzinums sasniedzis apmēram 10-30% no raksturīgā garuma.

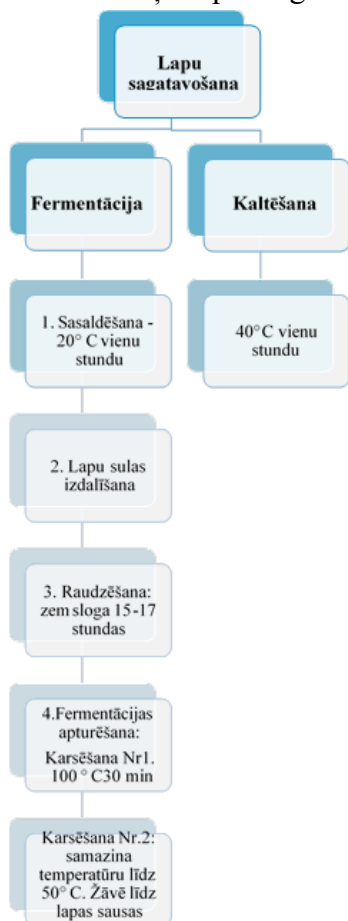
- Aveņu lapas ievāc sausā laikā;
- Pirms apstrādes ievāktos aveņu dzinumus ar lapām novieto vietās, kas ir aizsargātas no tiešu saules staru ietekmes;
- Ievāktās lapas pēc iespējas ātrāk nogādā uz apstrādes vietu, nemazgā, bet atlapo no stublāja, vienlaikus veic aveņu lapu vizuālo pārbaudi, šķirošanu, aizvācot sadzeltējušās, mehāniski bojātās lapas vai to daļas, vai citu augu piejaukumus (ja tādi ir);
- Aveņu lapas izklāj uz tīriem un sausiem plauktiem (2. attēls) un ievieto Binder saldēšanas skapī pie $-20 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrā uz 1 stundu.
- Lapas sasaldēšana uz sietiem notiek strauji. To nodrošina papildus ieslēgtā gaisa cirkulācija.



2. attēls. Avenu lapas pirms un pēc saldēšanas.

2. AVEŅU LAPU FERMENTĀCIJA UN ŽĀVĒŠANA

Fermentācija ir bioķīmisks process, kurā fermentu iedarbībā sadalās organiskie savienojumi, atbrīvojot enerģiju, un veido jaunus ķīmiskus, tai skaitā fenolu savienojumus. Fermentēšanas procesā iesaistīto baktēriju un sēnīšu darbības rezultātā aveņu lapas kļūst tumšākas. Fermentētu aveņu lapas sagatavo saskaņā ar procesa shēmu (3. attēls).



3. attēls. Fermentētu aveņu lapu sagatavošanas procesa shēma.

- Pēc stundas, kad aveņu lapu izņemtas no Binder saldēšanas skapja, tās mehāniski saberž, lai izdalītos sula.
- Saberztās lapas ievietotas konteinerā/traukā ar vāku vai pārklāju. Papildu lapām uzlikts slogs un veikta fermentēšana 15–17 stundas.

- Fermentēšanu veic tumšā telpā, ne augstākā temperatūrā par 22 ± 1 °C. Turēšanas ilgums atkarīgs no izvēlētās ekstrakta stipruma intensitātes.
- Fermentācijas apturēšanai aveņu lapas ievieto žāvējamā skapī $+100$ °C temperatūrā uz 30 minūtēm.
- Pēc tam temperatūra samazināta līdz 50 °C un žāvēšanas process turpināts līdz lapas kļūst sausas.
- Žāvēto aveņu lapu sausuma pakāpi nosaka ar tausti, lapām ir jālūzt. Mitruma saturam jābūt robežās no 8-10%.

3. EKSTRAKTA GATAVOŠANA

- Fermentētās, sausās aveņu lapas samaltas pulverī, izmantojot piemērotas dzirnavas.
- Sagatavotais aveņu lapu pulveris iesvērts traukā (proporcija 1g:100g ūdens), atbilstoši pievienots kompleksā enzīma Laminex BG daudzums (0.1%). Ekstrakcijas laikā pēc enzīma pievienošanas palielinās salicilātu hidrolīze, tiek panākts pilnvērtīgāks ekstrahēšanās process.
- Sagatavotajam ekstraktam noteikts pH. Nepieciešamības gadījumā pH piekoriģē ar sālsskābes vai nātrija hidroksīda šķīdumu līdz pH 5.5, rūpīgi izmaisot.
- Trauku ar ekstraktu nosedz, ievieto termostātā, ekstrakciju veic $+35$ °C temperatūrā deviņas stundas.
- Lai inaktivētu fermentu darbību, ekstraktu uzkarsē līdz 100 °C temperatūrā 10 minūtes.
- Ekstrakts tiek atdzesēts, izfiltrēts caur auduma (piem., lavsāna) filtru. Lai iegūtu dzidrāku filtrātu, lapu ekstraktu centrifugē, vai filtrē ar atbilstošu aprīkojumu.

4. IEPAKOŠANA UN MARKĒŠANA

- Iegūto dzidro fermentēto aveņu lapu ekstraktu paraugus sapilda marķētos tīros, hermētiskos traukos.
- Iepakojumam jānodrošina produkta kvalitātes rādītāju un īpašību saglabāšana. Iepakojumam jāatbilst MK Noteikumu Nr.808 "Noteikumi par materiāliem un izstrādājumiem, kas paredzēti saskarei ar pārtiku" prasībām.

Marķēšana.

- Katru produkta taras vienību marķē ar **etiķeti**.
- Marķējumam jāatbilst aktuālo normatīvo aktu prasībām.
- Marķējumam jābūt neizdzēšamam, viegli salasāmam un saskatāmam.
- Etiķetei jābūt tīrai, bez poligrāfiskiem defektiem, bez krokām.
- Etiķetei vai marķējumam jābūt izturīgam pret ārējās vides ietekmi.

Marķējumā – etiķetē jāuzrāda šāda informācija:

- produkta nosaukums un (vai) preču zīme;
- ražotāja nosaukums vai ražotāja zīme (logo), juridiskā adrese, telefona numurs un mājas lapas adrese;
- neto masa vai tilpums;
- produkta sastāvdaļu saraksts atbilstoši Latvijas Republikas spēkā esošajai likumdošanai;

- būtiskās piezīmes;
- rekomendētā uzglabāšanas temperatūra no +0 °C līdz +4 °C
- izcelsmes valsts;
- derīguma garantijas termiņš ar vārdiem “**Ieteicams līdz**”, datums identificē partiju.

5. KVALITATĪVIE RĀDĪTĀJI FERMENTĒTU AVEŅU LAPĀM EKSTRAKTAM

Ekstraktu **organoleptiskajām, fizikāli – ķīmiskajām, mikrobioloģiskām īpašībām** jāatbilst noteiktajiem rādītājiem 1.tabulā.

Rādītāja nosaukums	Fermentētu aveņu lapu ekstrakts	Pārbaudes metode*
1.Izskats	Viendabīgs šķidrums bez auga lapu daļu piemaisījumiem	Pēc TN 5.1. punkta
2.Aromāts	Raksturīgs, patīkams kaltētu aveņu lapu aromāts	Pēc TN 5.1. punkta
3.Krāsa	Brūna ar neredz zaļganu nokrāsu, botāniskajam sugas raksturojumam atbilstošā krāsā	Pēc TN 5.1. punkta
4.pH	5.5	Pēc TN 5.2. punkta
5. Kopējais fenolu saturs, mg Gal sk.ekv.	Ne mazāk kā 250 mg 100 g	Pēc TN 5.3.punkta
6. Tanīnu saturs, mg Kateh.ekv.	0,50 mg/100g	Pēc TN 5.4. punkta
7. Mikrobioloģiskie rādītāji: Pelējuma sēnītes Raugu šūnas Kopējais mikroorganismu skaits	 <50 KVV/1 g <50 KVV/1 g <100 KVV/1 g	Nosaka akreditēta laboratorija

*pārbaudes metodes

5.1.Produkta izskatu un krāsu nosaka vizuāli, apskatot pārbaudāmo paraugu – ekstraktu ielietu traukā, paceļot trauku pret gaismas avotu. Aromātu pārbauda organoleptiski.

5.2.pH mērīts ar pH metru Jenway (Kalibrācija saskaņā ar iekārtas ekspluatācijas noteikumiem).

5.3.Kopējais fenolu saturs, mg Galluskābes ekv., noteikts ar spektrofotometrisko metodi, saskaņā ar Singleton et al., 1999.

5.4. Tanīnu saturs, mg Katehīna ekv. noteikts ar spektrofotometrisko metodi, saskaņā ar Paver et al., 2010.

6. KVALITĀTES GARANTIJAS

- Produkta kvalitāti apliecina uzņēmuma pārstrādes vadītājs.
- Visos ekstrakta pagatavošanas aprites posmos (lapu ievākšana, apstrāde, ekstraktu ieguve, iepakošana un uzglabāšana) uzņēmumā tiek nodrošinātas obligātās nepieciešamās higiēnas prasības, saskaņā ar ieviesto paškontroles sistēmu.
- Izgatavotājs garantē produkcijas atbilstību šī apraksta prasībām, ja patērētājs ievēro šajos noteikumos uzrādītos uzglabāšanas noteikumus.

Literatūra

Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152-178.)

Paaver, U., Matto, V. and Raal A. (2010) Total tannin content in distinct *Quercus robur* L. Galls. *AJ Medical plants research* Vol.4(8), pp. 702-705.

<https://doi.org/10.5897/JMPR10.091>

R2.2.3. PIELIKUMS

UZŅĒMUMS	LAD projekts Nr. 19-00-A01612-000006	Izstrādāja: (vārds, uzvārds)
	AVEŅU/SMILTSĒRKŠĶU LAPU EKSTRAKTA RAŽOŠANAS PROCESA APRAKSTS	Apstiprina: (vārds, uzvārds)

Tehnoloģiskā procesa apraksts attiecas uz aveņu lapu un smiltsērķšķu dzinumus ar lapām ievākšanai, kaltēšanai, ekstraktu gatavošanai, uzglabāšanai, kvalitatīvo rādītāju noteikšanai, lai īstenotu projektā “Biotehnoloģiju kompetences attīstība augstvērtīgu dārzeņkopības produktu ieguvei” izvirzītos uzdevumus.

1. AVEŅU LAPU UN SMILTSĒRKŠĶU JAUNO DZINUMU AR LAPĀM IEVĀKŠANA, APSTRĀDE PIRMS KALTĒŠANAS

Ekstrakta gatavošanai izmanto atbilstošas kvalitātes aveņu un smiltsērķšķu dzinumus ar lapām, kas ievākti atbilstošā veģetācijas stadijā saskaņā ar BBCH skalu (1. attēls). Ievācamo dzinumu attīstības stadijas parametri novērtēti pamatojoties uz Valsts augu aizsardzības dienesta (VAAD) informāciju par kultūraugu attīstību (attīstības stadija (AS)).

<http://noverojumi.vaad.gov.lv/kulturaugu-fenologija/auglaugi>



1.attēls. AS 31-AS 33 – Dzinums sasniedzis apmēram 10-30% no raksturīgā garuma.

- Aveņu lapas un smiltsērķšķu jaunus dzinumus ievāc sausā laikā.
- Pirms apstrādes ievāktos aveņu un smiltsērķšķu dzinumus ar lapām novieto vietās, kas ir aizsargātas no tiešu saules staru ietekmes.
- Ievāktos dzinumus un lapas pēc iespējas ātrāk nogādā uz apstrādes vietu, nemazgā, bet atlapo no stublāja, vienlaikus veic lapu vizuālo pārbaudi, šķirošanu, aizvācot sadzeltējušās, mehāniski bojātās lapas vai to daļas, vai citu augu piejaukumus (ja tādi ir).

2. AVEŅU UN SMILTSĒRKŠĶU JAUNO DZINUMU AR LAPĀM ŽĀVĒŠANA

- Avenu lapas un smiltsērķšķu jaunus dzinumus ar lapām izklāj uz tīriem, sausiem sietiem, vai auduma rāmjiem, žāvē piemērotā aprīkojumā ar mākslīgo ventilāciju.
- Lapas žāvē + 40 °C temperatūrā.
- Žāvēto avenu un smiltsērķšķu lapu sausuma pakāpi nosaka ar tausti, lapām ir jālūzt. Mitruma saturam jābūt robežās no 8-10%.

3. EKSTRAKTA GATAVOŠANA

- Sagatavotais avenu/smiltsērķšķu lapu pulveris iesvērts traukā (proporcija 1g:100g ūdens), atbilstoši pievienots kompleksā enzīma Laminex BG daudzums (0.1%). Ekstrakcijas laikā pēc enzīma pievienošanas palielinās salicilātu hidrolīze, tiek panākts pilnvērtīgāks ekstrahēšanās process.
- Sagatavotajam ekstraktam noteikts pH. Nepieciešamības gadījumā pH piekorigē ar sālsskābes vai nātrija hidroksīda šķīdumu līdz pH 5.5, rūpīgi izmaisot.
- Trauku ar ekstraktu nosedz, ievieto termostatā, ekstrakciju veic +35 °C temperatūrā deviņas stundas.
- Lai inaktivētu fermentu darbību, ekstraktu uzkarš līdz 100 °C temperatūrā 10 minūtes.
- Ekstrakts tiek atdzesēts, izfiltrēts caur auduma (piem., lavsāna) filtru. Lai iegūtu dzidrāku filtrātu, lapu ekstraktu centrifugē, vai filtrē ar atbilstošu aprīkojumu.

4. IEPAKOŠANA UN MARKĒŠANA

- Iegūto dzidro avenu/smiltsērķšķu lapu ekstraktu paraugus sapilda marķētos tīros, hermētiskos traukos.
- Iepakojumam jānodrošina produkta kvalitātes rādītāju un īpašību saglabāšana. Iepakojumam jāatbilst MK Noteikumu Nr.808 "Noteikumi par materiāliem un izstrādājumiem, kas paredzēti saskarei ar pārtiku" prasībām.

Marķēšana.

- Katru produkta taras vienību marķē ar **etiķeti**.
- Marķējumam jāatbilst aktuālo normatīvo aktu prasībām.
- Marķējumam jābūt neizdzēšamam, viegli salasāmam un saskatāmam.
- Etiķetei jābūt tīrai, bez poligrāfiskiem defektiem, bez krokām.
- Etiķetei vai marķējumam jābūt izturīgam pret ārējās vides ietekmi.

Marķējumā – etiķetē jāuzrāda šāda informācija:

- produkta nosaukums un (vai) preču zīme;
- ražotāja nosaukums vai ražotāja zīme (logo), juridiskā adrese, telefona numurs un mājas lapas adrese;
- neto masa vai tilpums;
- produkta sastāvdaļu saraksts atbilstoši Latvijas Republikas spēkā esošajai likumdošanai;
- būtiskās piezīmes;
- rekomendētā uzglabāšanas temperatūra no +0 °C līdz +4 °C
- izcelsmes valsts;
- derīguma garantijas termiņš ar vārdiem "**Ieteicams līdz**", datums identificē partiju.

5. KVALITATĪVIE RĀDĪTĀJI AVEŅU LAPU EKSTRAKTAM

Ekstraktu **organoleptiskajām, fizikāli – ķīmiskajām, mikrobioloģiskām īpašībām** jāatbilst noteiktajiem rādītājiem 1.tabulā.

Rādītāja nosaukums	Aveņu/smiltsērķšķu lapu ekstrakts	Pārbaudes metode*
1.Izskats	Viendabīgs šķidrums bez auga lapu daļu piemaisījumiem	Pēc TN 5.1. punkta
2.Aromāts	Raksturīgs, specifisks kaltētu aveņu/smiltsērķšķu un aveņu lapu aromāts	Pēc TN 5.1. punkta
3.Krāsa	Brūna ar neredz zaļganu nokrāsu, botāniskajam sugas raksturojumam atbilstošā krāsā	Pēc TN 5.1. punkta
4.pH	5.5	Pēc TN 5.2. punkta
8.Kopējais fenolu saturs, mg Gal sk.ekv.	Ne mazāk kā 390 mg 100 g	Pēc TN 5.3.punkta
9.Tanīnu saturs, mg Kateh.ekv.	0,85 mg/100g	Pēc TN 5.4. punkta
10.Mikrobioloģiskie rādītāji: Pelējuma sēnītes Raugu šūnas Kopējais mikroorganismu skaits	<50 KVV/1 g <50 KVV/1 g <100 KVV/1 g	Nosaka akreditēta laboratorija

*pārbaudes metodes

5.1 Produkta izskatu un krāsu nosaka vizuāli, apskatot pārbaudāmo paraugu - ekstraktu ielietu traukā, paceļot trauku pret gaismas avotu. Aromātu pārbauda organoleptiski.

6.1.pH mērīts ar pH metru Jenway (Kalibrācija saskaņā ar iekārtas ekspluatācijas noteikumiem).

6.2.Kopējais fenolu saturs, mg Galluskābes ekv., noteikts ar spektrofotetrisko metodi, saskaņā ar Singleton et al., 1999.

6.3.Tanīnu saturs, mg Katehīna ekv. noteikts ar spektrofotetrisko metodi, saskaņā ar Paver et. al., 2010.

6. KVALITĀTES GARANTIJAS

- Produkta kvalitāti apliecina uzņēmuma pārstrādes vadītājs.
- Visos ekstrakta pagatavošanas aprites posmos (lapu ievākšana, apstrāde, ekstraktu ieguve, iepakojšana un uzglabāšana) uzņēmumā tiek nodrošinātas obligātās nepieciešamās higiēnas prasības, saskaņā ar ieviesto paškontroles sistēmu.
- Izgatavotājs garantē produkcijas atbilstību šī apraksta prasībām, ja patērētājs ievēro šajos noteikumos uzrādītos uzglabāšanas noteikumus.

Literatūra

Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152-178.)

Paaver, U., Matto, V. and Raal A. (2010) Total tannin content in distinct *Quercus robur* L. Galls. *AJ Medical plants research* Vol.4(8), pp. 702-705.

<https://doi.org/10.5897/JMPR10.091>

R2.3. Sagatavoti smiltsērķšķu eļļas ražošanas tehniskie noteikumi (individuālai izejvielai veikta kvalitātes standartizācija trīs gadu periodā).

Ievads

Latvijā smiltsērķšķi pieskaitāmi pie netradicionālajām kultūrām, tomēr pēdējos gadu desmitos tie ir kļuvuši populāri, par ko liecina stādījumu platību palielināšanās un dažādo produktu piedāvājums tirgū. Taču galvenā smiltsērķšķu vērtība ir to dziednieciskās īpašības. Medicīnā smiltsērķšķi izmantoti jau mūsu ēras 618.–907. gadā, un tikai kopš 19. gadsimta tie ir plašāk pazīstami kā kultūraugi. Augļus raksturo daudzveidīgs ķīmiskais sastāvs, tos uzskata par vienu no svarīgākajiem dabā esošajiem augiem, kas satur daudz un dažādus bioloģiski aktīvus savienojumus: t.sk. C, E, K₁, kā arī P un B grupas vitamīnus, karotinoīdus, sterolus, tokoferolus, nepiesātinātās taukskābes, polifenolu savienojumus, mikro un makroelementus. Smiltsērķšķu kultūras izmantošanas virzieni ir daudzveidīgi, taču, pateicoties smiltsērķšķu augļu un it sevišķi eļļas ķīmiskajam sastāvam, tos plaši izmanto medicīnā, kosmētikā, kā arī pārtikas industrijā. Smiltsērķšķu eļļai pasaulē jau sen ierādīta nozīmīga vieta farmakoloģijā un vērtīgu to padara īpašais ķīmiskais sastāvs, īpaši ar dažādu nepiesātināto un piesātināto taukskābju saturu. Zinātniskie pētījumi norāda, ka eļļas saturs augļos ir atkarīgs no dažādiem faktoriem: izcelsmes vietas, šķirnes, novākšanas laika un eļļas ieguves metodes. Latvijā tiek audzētas dažādas smiltsērķšķu šķirnes ar atšķirīgu ķīmisko sastāvu. Piemēram, šķirnes ‘Botaničeskaja Ļubitel’skaja’ ogas ir dzeltenī oranžas, tās satur mazāk karotinoīdu un ir piemērotas sulas ieguvei. Savukārt šķirnes ‘Prozračnaja’, ‘Mary’ un ‘Tatjana’ ogas ir oranžākas, karotinoīdu saturs ir lielāks, kas ir svarīgs eļļas kvalitatīvs rādītājs. Smiltsērķšķi ir vieni no nedaudzajiem augļiem, kuros eļļa sastopama gan augļu mīkstumā, gan sēklās. Projekta ietvaros tika pētīta un rūpnieciskos apstākļos SIA L.E.V. Ekstraktu rūpnīcā adaptēta smiltsērķšķu eļļas ieguves tehnoloģija, kā izejvielu izmantojot veselas ogas, kas audzētas z/s “Cukuriņi” (2.3.1. attēls).



2.3.1. attēls. Smiltsērķšķu raža z/s “Cukuriņi”.

Smiltsērķšķu eļļu var iegūt ar dažādām metodēm, turklāt metodes izvēle būs atšķirīga lietošanai mājas apstākļos un rūpnieciskajā ražošanā. Plašāk lietotais smiltsērķšķu pārstrādes

produkts ir sula. Arī to var iegūt ar dažādām metodēm, kam būs ietekme gan uz sulas iznākumu un ķīmisko sastāvu, gan arī uz palikušajām spiedpaliekām. Spiežot ar vienkāršu presi, sulas iznākums būs neliels (ap 50%) un lielākā daļa vērtīgo savienojumu (tostarp, karotinoīdu) paliks spiedpaliekās. Ogas pirms spiešanas sablenderējot, sulas iznākumu var palielināt vidēji par 22%. Vēl vairāk sulas varēs iegūt, ogas pirms tam īslaicīgi uzkarsējot. Abi pēdējie pirmapstrādes paņēmieni ļaus iegūt augstākas kvalitātes sulu ar lielāku eļļas un karotinoīdu klātbūtni, pateicoties mizas sasmalcināšanai. Ja plāno iegūt smiltsērķšķu mīkstuma eļļu, tad pēdējie divi paņēmieni būs vairāk piemēroti mājas apstākļiem. Vēl smiltsērķšķu mīkstuma eļļu no sulas var atdalīt, izmantojot centrifugēšanu ar vienkāršu piena separatoru. Sula jāuzkarsē mazliet vairāk nekā piens (virs 40 °C). Vienīgi jāņem vērā, ka “krējuma” vietā var neizdoties iegūt tīru eļļu (piena separatora mazo apgriezību dēļ), bet biezu masu. To sasaldējot un vēlāk atkausējot, vai arī izžāvējot (eļļa nostāsies trauka virspusē), iegūsim tīru smiltsērķšķu mīkstuma eļļu. Rūpnieciskai eļļas ieguvei tiek lietotas jaudīgas, šim mērķim piemērotas centrifūgas². Eļļas saturs augļu mīkstumā var būt 1,5-3% robežās. Jāatzīmē, ka arī attaukotā smiltsērķšķu sula būs vērtīga un piemērota dažādu dzērienu un citu produktu pagatavošanai.

Spiedpaliekas pēc sulas iegūšanas ir nākamais avots eļļas iegūšanai. Pamatā spiedpaliekas satur sēklas un atkarībā no sulas ieguves metodes arī daļu augļu mīkstuma un mizas daļu. Sēklu un mizu sadalīšana pa frakcijām ļauj iegūt atšķirīgas kvalitātes produktus. Rūpnieciski eļļas ieguvē gan no kaltētām spiedpaliekām, gan arī no veselām kaltētām ogām bieži izmanto iekārtu, kur eļļu iegūst ar sašķidrināto oglekļa dioksīdu (CO₂) (2.3.2. attēls).



2.3.2. attēls. CO₂ ekstraktors SIA L.E.V. Ekstraktu rūpnīcā.

Smiltsērķšķu mīkstuma eļļas ieguvei no veselām ogām ir piemēroti divi paņēmieni – mehāniski, izmantojot modernu iekārtu, un ar etanola jeb spirta palīdzību.

Klasiskajā atdalīšanas procesā produktā cietās vielas atdala no šķidruma vai atdala divus dažāda blīvuma šķidrumus. Taču, piemēram, dažādās augu izejvielās tas viss var būt kopā.

² https://www.flottweg.com/fileadmin/user_upload/data/pdf-downloads/Separator-EN.pdf

Mehāniskās iekārtas trikantera³ darbības princips ļauj nepārtraukti atdalīt trīs fāzes (ciets-šķidrums-šķidrums) vienā procesā. Priekšnosacījumi tam ir, lai šķidrums nešķīst viens otrā, lai tiem būtu atšķirīgs blīvums un lai cietvielu fāzei būtu vislielākais īpatnējais svars. Pamatojoties uz to, iekārtā īpaši izstrādātā lāpstīņriteņa sistēma nodrošina optimālus atdalīšanas rezultātus. Līdz ar to veselie smiltsērķšķu augļi tiek sadalīti trīs frakcijās uzreiz: sula-eļļa-spiedpaliekas. Jāpiezīmē gan, ka iekārtas cena ir samērā augsta un piemērota lielākiem pārstrādātājiem. Latvijā tādas vēl šobrīd nav.

Etanola izmantošana smiltsērķšķu mīkstumā eļļas ieguvei ir ļoti piemērota, jo, lietojot dažādu vienkāršu aprīkojumu (t.sk. ultraskaņas vannu un ietvaicētāju), var iegūt labu rezultātu. Turklāt uzņēmumos rūpnieciskās ražošanas apstākļos ir iespējama izlietotā etanola ietvaicēšana un izmantošana atkārtoti vai izmantošana citu produktu ražošanai, tādējādi ekonomējot izejvielas. Sadarbībā ar uzņēmumiem SIA L.E.V. Ekstraktu rūpnīcu (smiltsērķšķu eļļas ieguve rūpnieciskos apstākļos) un z/s “Cukuriņi” (smiltsērķšķu šķirņu nodrošinājums) Dārzkopības institūtā veikti vairāku faktoru ietekmes pētījumi, kas ietekmē smiltsērķšķu mīkstumā eļļas kvalitāti: šķirne, atūdeņošanai nepieciešamais etanola daudzums, apstrādes un izturēšanas laiks, pievienotās eļļas daudzums un koncentrēšana.

Materiāli metodes

Izejvielas: saldētas smiltsērķšķu ogas. Testēti četrus šķirņu paraugi: ‘Mary’ (analogi ‘Marija’ (Laro Plus), ‘Prozračnaja’ (Laro Plus), ‘Botaničeskaja Ļubitel’skaja’ (Laro Plus), ‘Industry’ (LKPS) Baltijas ogu dārzi)

Materiāli eļļas ieguvei: 96,2% spirts un rafinēta saulespuķu eļļa.

Karotinoīdu saturs noteikts pēc fotometriskās metodes, kas izstrādāta, par pamatu ņemot zinātniskajās publikācijās norādīto informāciju (Maria et al, 2012; Segliņa et al., 2021). Aprēķini veikti saskaņā ar formulu:

$$\text{Carotenoids content}(\mu\text{g/g}) = \frac{A \times V(\text{mL}) \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times P(\text{g})}$$

where A = Absorbance; V = Total extract volume; P = sample weight; $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$ (β -carotene Extinction Coefficient in petroleum ether).

Darbs veikts Dārzkopības institūta laboratorijās. Procesu validācija (tostarp dažādu paraugu sagatavošana) veikta SIA L.E.V. Ekstraktu rūpnīcā ar ražošanai piemērotām iekārtām un aprīkojumu.

Rezultāti

Karotinoīdus saturoša eļļas ekstrakta iegūšanas tehnoloģija

Īss darba apraksts. Sākotnēji noteikts vidējais karotinoīdu saturs sasmalcinātiem smiltsērķšķu ogu paraugiem trijos atkārtojumos. Aprēķināts vidējais rezultāts (2.3.1.tabula).

2.3.1.tabula. Karotinoīdu saturs smiltsērķšķu ogu paraugos

³ <https://www.flottweg.com/product-lines/tricanter/>

Smiltsērķšķu paraugi	Karotinoīdu saturs, mg 100g	
	vidējais	±
‘Mary’ (Laro plus)	20,13	3,61
‘Prozračņoje’ (Laro Plus)	14,43	1,36
‘Botaničeskaja Ļubitel’skaja’ (Laro Plus)	8,19	0,63
‘Industry’ LPKS (Baltijas ogu dārzi)	23,70	1,87

Turpmāk pētīti dažādi smiltsērķšķu ogu paraugi. Sasmalcinātas, neatkausētas ogas iesver un veic atūdeņošanu divos etapos. Veikti vairāki atūdeņošanas eksperimenti ar atšķirīgu spirta daudzumu. Iesvērtie ogu daudzumi un uzlietie spirta daudzumi, kā arī ekstrakcijas rezultāti apkopoti un norādīti tabulās turpmāk tekstā. Pēc katras atūdeņošanas paraugs ar spirtu uzliets uz sieta, lai atdalītu šķidrumu (spirtu un sulas-ūdens daļas), spiedpaliekas viegli nospiež uz sieta, lai maksimāli atdalītu mitrumu. Neliela daļa spiedpalieku, līdz ar to neliela daļa karotinoīdu paliek uz sieta. Veikts eksperiments atdalīt spiedpaliekas no smiltsērķšķu atūdeņotajiem paraugiem, uzlejot tos uz filtrauduma (2.3.3. attēls).



2.2.3.attēls. Sieti un filtraudums šķidruma atdalīšanai pēc smiltsērķšķu ogu atūdeņošanas ar spirtu.

Tomēr šis paņēmieni nebija labs, jo šķidrums nenotek tik labi, kā uz sieta. Uzlejot uz auduma atūdeņotos paraugus ar spirtu, tie jāatspiež ar rokām. Līdz ar to spiedpaliekas, iespējams, vēl vairāk paliek pie auduma un rodas lielāki karotinoīdu zudumi, nekā uz sieta. Līdz ar to izmantota atūdeņoto paraugu uzliešana un spiedpalieku atspiešana uz sieta. Pēc katra parauga atūdeņošanas (pirmās un otrās reizes) spirts savākts un paņemti paraugi, lai noteiktu karotinoīda saturu spirta ekstraktos. Šis spirts pēc pirmās atūdeņošanas reizes ir dzeltenīgs pēc krāsas, un starp paraugiem krāsas tonis ir atšķirīgs. 2.3.2. tabulā norādīts karotīnu saturs spirta ekstraktos pēc pirmās ogu atūdeņošanas reizes-pirmās noliešanas.

2.3.2. tabula. Karotinoīdu saturs spirta ekstraktā (pirmā noliešanas reize)

Varianti	Ogu paraugs	Ogas, g	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml	Karotinoīdi, mg 100 ml spirta ekstraktā
1v	‘Mary’	40	40	0,04
2v	‘Mary’	40	80	0,1
3v	‘Mary’	40	120	0,1

Pēc otrās ogu atūdeņošanas reizes, pēc noliešanas spirta ekstrakta krāsa bija kļuvusi ievērojami tumšāka-oranžāka (2.3.4. attēls).



2.3.4. attēls. Spirta ekstrakts pēc pirmās un otrās atūdeņošanas (A), spirta/eļļas ekstrakts (B).

Noteiktais karotinoīdu saturs spirta ekstraktos apkopots tabulā 2.3.3.

2.3.3.tabula. Karotinoīdu saturs spirta ekstraktos (otrā noliešanas reize)

Varianti	Ogu paraugs	Ogas, g	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml	Karotinoīdi, mg 100 ml
1v	'Mary'	40	40	0,4
2v	'Mary'	40	40	0,61
3v	'Mary'	40	40	0,72

Smiltsērķšķu ogu paraugi pēc atūdeņošanas nosvērti, un proporcionāli svaram 1:2 uzlieta eļļa. Traukos ielikti stikla irbulīši, paraugi vienmērīgi samaisīti un trauki ievietoti ūdens vannā 65 °C temperatūrā. Paraugi 30 minūtes karsēti, periodiski apmaisot trauku saturu. Pēc karsēšanas paraugus nedaudz atdzesē, tad uzlej uz filtrauduma, ļauj notecēt, nedaudz nospiež eļļu.

Eļļas ekstraktu analizēšana

Iegūtajiem eļļas ekstraktiem noteikts karotinoīdu saturs ar fotometrisko metodi. Absorbciija mērīta pie 450 nm, rezultāts izteikts ar betta karotīnu. Paraugs 'Mary' iesvērts trijos atkārtojumos, pirmajā reizē uzlejot atšķirīgu spirta daudzumu, lai veiktu atūdeņošanu divas reizes, uzglabājot paraugus diennakti telpas temperatūrā tumšā vietā (vidēji ~16 stundas).

Paralēli iesvērti paraugi, kuriem veica atūdeņošanu ultraskaņas vannā. Atūdeņošana veikta 30 minūtes, abas atūdeņošanas reizes ultraskaņas vannā. Atšķirīgs bija uzlietais spirta saturs pirmajā atūdeņošanas reizē 1v; 2v un 3v variantiem, bet otrajā reizē ūdeņošanai uzlietais spirta daudzums bija vienāds visos variantos. Ekstrahēšanas laikā ūdens ultraskaņas vannā uzsila: pēc pirmās reizes temperatūra vannā paaugstinājās līdz +32 °C, bet pēc otrās reizes paaugstinājās līdz 43°C. Salīdzinot iegūtos rezultātus, redzam, ka augstākais karotinoīdu saturs ir šķirnes 'Mary' (1V) paraugos, kur atūdeņošanai izmantots mazākais spirta daudzums proporcijās 1:1. Paraugiem 2V un 3V bija ņemts lielāks spirta daudzums smiltsērķšķu atūdeņošanai, salīdzinot ar 1V. Var secināt, ka atūdeņošanai izmantotā spirta daudzumam ir būtiska ietekme uz karotinoīdu saturu paraugos. Starp 2V un 3V nav būtiskas atšķirības. Karotinoīdu satura iznākums ir būtiski atšķirīgs arī no sēklu daudzuma smiltsērķšķu atūdeņotajā paraugā. Sēklas

ir samērā smagas, nosverot atūdeņoto paraugu, iegūstam lielāku svaru, un līdz ar to uzņemam lielāku eļļas daudzumu, kas būtiski ietekmē karotinoīdu koncentrāciju. Iegūtie rezultāti apkopoti 2.3.4. tabulā.

2.3.4. tabula. **Smiltsērķšķu eļļas ekstraktu paraugi, karotinoīdu saturs**

Varianti	Ogu paraugs	Ogas, g	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml		Atspiedas, g	Eļļa g	Karotinoīdi, mg 100 g eļļā
			1.reize	2.reize			
1v	‘Mary’	40	40	40	14,5	29	18,05
2v	‘Mary’	40	80	40	10,8	21,6	20,30
3v	‘Mary’	40	120	40	10,5	21,0	21,15
Ekstrahēšana ultraskaņas vannā (pirmā reize 30 min un otrā reize 30 minūtes)							
1v(ultrsk.)	‘Mary’	40	40	40	8,36	16,7	31,56
2v(ultrsk.)	‘Mary’	40	80	40	11,29	22,5	21,55
3v(ultrsk.)	‘Mary’	40	120	40	10,84	21,6	21,20

Pēc smiltsērķšķu atūdeņošanas atlikušajiem spirta ekstraktiem pievienota eļļa, lai ekstrahētu karotinoīdus no spirta šķīduma. Spirta ekstraktiem, kas iegūti pēc ogu atūdeņošanas, pievieno rafinētu saulespuķu eļļu. Spirta ekstrakta proporcijas norādītas 2.3.5. tabulā, pamatā tās ir 1:10. Visu samaisa un trauku liek karsēties ūdens vannā 65 °C temperatūrā 30 minūtes karotinoīdu ekstrakcijai. Tad paraugus atdzesē, vienu daļu salej mēģenēs un centrifugē, lai atdalītu spirtu. Pēc centrifugēšanas nolej dzidro spirta slāni un eļļas ekstraktu filtrē. Otru spirta/eļļas ekstrakta daļu salej dalāmā piltuvē un telpas temperatūrā nostādina, tad dekantē eļļu, jo tā ir nostājusies piltuves apakšējā daļā (2.3.4. attēls B). Eļļai, kas iegūta no spirta ekstraktiem, noteikts karotinoīdu saturs (2.3.5. tabula).

2.3.5.tabula. **Karotinoīdu saturs spirta ekstraktu eļļās**

Varianti	Spirta ekstrakts	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml	Eļļa g	Karotinoīdi, mg 100 g eļļā
U mix	Pēc atūdeņošanas 1 un 2 reizes	200	20	3,58
1v-4v	Pēc atūdeņošanas 1 reizes	300	15	2,69
1v-4v	Pēc atūdeņošanas 2 reizes	150	15	6,03

Smiltsērķšķu eļļas ekstrakti sagatavoti no šķirnes ‘Industry’ ar ultraskaņas apstrādi. Pirmo atūdeņošanu veica 15 minūtes, bet otro tikai 10 minūtes. Novērota līdzība ar iepriekšējiem eksperimentiem – augstākais karotinoīdu saturs bija iegūts pēc atūdeņošanas proporcijās 1:1. Dati redzami 2.3.6. tabulā.

2.3.6. tabula. **Karotinoīdu saturs smiltsērķšķos ‘Industry’ eļļās (ultraskaņas apstrāde)**

Varianti	Ogu paraugs	Ogas, g	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml		Atspiedas, g	Eļļa g	Karotinoīdi, mg 100 g eļļā
			1.reize	2.reize			
1v	‘Industry’	100	100	100	15,73	31,4	29,61
2v	‘Industry’	100	200	100	19,11	38,2	23,9
3V pēc atūdeņošanas spiedpaliekām (10.80g) uzliets eļļas ekstrakts ar karotīnu saturu (6,03 mg 100g)							
3v	‘Industry’	80	80	80	10,80	21,6	37,12

Tālāk veikts izmēģinājums, lai paaugstinātu karotinoīdu saturu eļļas ekstraktā. Paraugam 3V pēc atūdeņošanas uz smiltsērķšķu atspiedām uzliets eļļas ekstrakts, kurš satur karotīnus (6,03 mg 100g). Šis eļļas ekstrakts bija iegūts no spirta ekstrakta pēc smiltsērķšķu atūdeņošanas (2.3.5. att.). Paraugs 3v ‘Industry’ līdz ar to ieguva visaugstāko karotīna saturu. Tālāk veikti atkārtoti eksperimenti ar smiltsērķšķu šķirnēm: ‘Botaničeskaja Ļubitel’skaja’, ‘Prozračnaja’, ‘Mary’, ‘Industry’ atūdeņošanai attiecībā (1:2).



2.3.5. attēls. **Atūdeņošanas un karotinoīdu ekstrakcija eļļā.**

Visām šķirnēm atūdeņošana veikta ar izturēšanu 16–24 h telpā, tumšā vietā. Paraugu iesvērtais daudzums, uzlietais eļļas daudzums un iegūtais karotinoīdu saturs eļļas ekstraktos apkopots 2.3.7. tabulā.

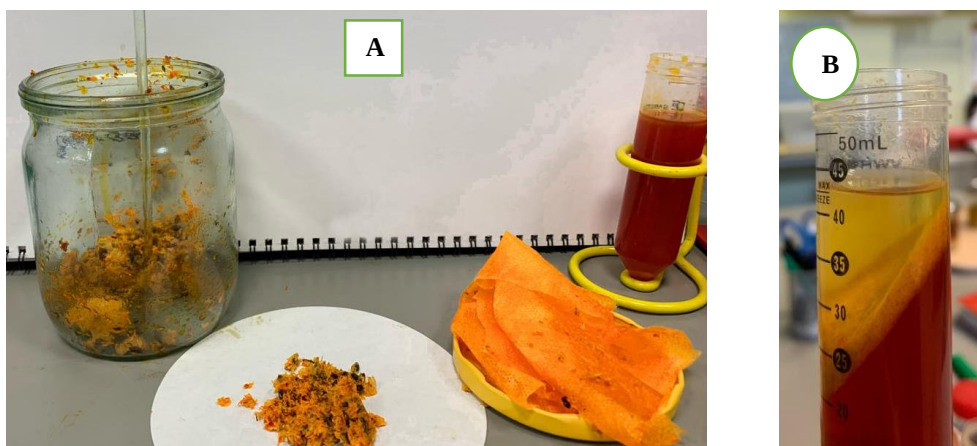
2.3.7. tabula. **Karotinoīdu saturs smiltsērķšķu eļļās**

Varianti	Ogu paraugs	Ogas, g	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml		Atspiedas, g	Eļļa g	Karotinoīdi, mg 100 g eļļā
			1. reize	2. reize			
1v	‘Botaničeskaja Ļubitel’skaja’	40	240	40	14,5	29	9,94
2v	‘Mary’	40	240	40	10,8	21,6	11,59
3v	‘Prozračnaja’	40	240	40	10,5	21,0	14,94
4v	‘Industry’	40	240	40	11,29	22,5	21,85

Izvērtējot un salīdzinot karotinoīdu daudzumus smiltsērķšķu šķirnēs, redzam, ka ‘Mary’ eļļas ekstraktā to ir ievērojami mazāk nekā ‘Prozračnaja’. Sākumā analizējot visas šķirnes,

konstatēts, ka ‘Mary’ karotinoīdi ir 20,1 mg 100 g ogu, bet ‘Prozračnaja’ 14,4 mg 100 g ogu. Analizējot datus, meklēts cēlonis, kāpēc ir mazs karotinoīdu saturs eļļā. Iemesli varētu būt vairāki:

- par maz nospiests šķidrums;
- samērā liels sēklu daudzums paraugā/proporcionāli uzliets vairāk eļļas (2.3.6. attēls).



2.3.6. attēls. Paraugs pēc karotinoīdu ekstrakcijas (A) un pēc centrifugēšanas (B).

Izvērtējot iepriekšējās ekstrakcijas rezultātus, secināts, ka karotinoīdu atšķirīgo daudzumu–koncentrāciju eļļas ekstraktā varēja ietekmēt ekstrakcijai pievienotais eļļas daudzums. Tas bija aprēķināts, nosverot smiltsērķšķu paraugus (spiedpaliekas) pēc atūdeņošanas (2.3.7. attēls). Novērots, ka spiedpaliekās traukā, salīdzinājumā ar miziņām, ir daudz sēklu, kuras pēc svara ir samērā smagas. Tās dod ievērojamu daļu pie kopējā svara, kas savukārt būtiski ietekmē vēlamo rezultātu – karotinoīdu saturu eļļas ekstraktā.



2.3.7. attēls. Smiltsērķšķu paraugi pēc atūdeņošanas un sēklas.

Spirta ekstrakti pēc pirmās un otrās atūdeņošanas reizes savākti. Ekstraktiem proporcionāli 10:1 pievienota eļļa un tie ekstrahēti ūdens vannā. Analizēts karotinoīdu saturs un iegūtie dati apkopoti 2.3.8. tabulā.

2.3.8. tabula. **Karotinoīdu saturs spirta ekstraktu eļļās**

Varianti	Spirta ekstrakts	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml	Eļļa g	Karotinoīdi, mg 100 g eļļā
1v-5v	Pēc atūdeņošanas 1. reizes	1000	100	4,65
1v-5v	Pēc atūdeņošanas 2. reizes	550	55	10,80

Turpinot eļļas ekstraktu ieguves izmēģinājumus, veikta atūdeņošana ultraskaņas vannā smiltsērķšķu ‘Prozračnaja’ paraugiem. Iesvērti ‘Prozračnaja’ paraugi trijos atkārtojumos, uzlejot atūdeņošanai spirtu 1:1, attiecīgi pirmā un otrā reizē. Šoreiz pirmā atūdeņošanas reize ilgst 25 minūtes (paraugus apmaisot ar stikla irbulīti ik pēc 10 minūtēm). Otrā atūdeņošanas reize – 20 minūtes (apmaisot vienu reizi pēc 10 minūtēm).

Pēc atūdeņošanas paraugiem noliets un atspiests spirta ekstrakts, spiedpaliekas nosvērtas. Pirmajam paraugam 1p* uzlieta saulespuķu eļļa, bet 2p** un 3p** uzlieta eļļa, kas satur karotinoīdus 10,8 mg 100 g (2.3.8. tabula “1v-5v atūdeņošanas spirta ekstraktu eļļā”).

Visi atūdeņotie smiltsērķšķu paraugi ielikti ūdens vannā karotinoīdu ekstrakcijai. Paraugi karsēšanas laikā periodiski apmaisīti. Pēc ekstrakcijas nedaudz atdzesēti telpas temperatūrā, tad eļļa atdalīta un filtrēta. Noteikts karotinoīdu saturs iegūtajos eļļas ekstraktos, dati apkopoti 2.3.9. tabulā.

2.3.9. tabulā. **Karotinoīdu saturs smiltsērķšķu ‘Prozračnaja’ eļļas ekstraktos**

Varianti	Ogu paraugs	Ogas, g	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml		Atspiedas, g	Eļļa, g	Karotinoīdi, mg 100 g eļļā
			1. reize	2. reize			
1p*	‘Prozračnaja’	80	80	80	11,59	11,6*	15,43
2p**	‘Prozračnaja’	100	100	100	18,33	18,4**	27,2
3p**	‘Prozračnaja’	120	120	120	19,46	19,5**	28,0

Salīdzinot karotinoīdu saturu ‘Prozračnaja’ eļļas ekstraktu paraugos, secināts, ka pievienotais eļļas ekstrakts paraugiem 2 un 3p** būtiski paaugstināja karotinoīdu saturu.

Veikts vēl viens mēģinājums, lai iegūtu eļļas ekstraktu ar augstāku karotinoīdu saturu, ar smiltsērķšķiem ‘Industry’. Atūdeņošanu paraugiem veica ultraskaņas vannā. Atūdeņošana 1:1, pirmā reize 25 minūtes (apmaisot ik pēc 10 minūtēm), otrā reize 15 minūtes (vienreiz apmaisot). Šajā reizē pēc atūdeņošanas nosvērtajiem paraugiem (spiedpaliekām) uzlieta eļļa nedaudz mazāk nekā attiecība 1:1, iepriekš atrēķinot procentuālo sēklu satura svaru, lai iegūtu augstāku karotinoīdu saturu.

Saskaņā ar zinātnisko literatūru (Segliņa, et al., 2021) smiltsērķšķu ogas satur:

- sulu $87 \pm 4\%$,
- spiedpaliekas $11,0 \pm 2\%$,
- sēklas $3 \pm 1\%$
- mizas $7 \pm 1\%$

‘Industry’ atspiedām uzliets eļļas ekstrakts, kas satur 14,7 mg 100 g⁻¹ karotinoīdus (iegūts, ekstrahējot spirta ekstraktus). Paraugs karsēšanas laikā sildvannā periodiski ar stikla irbulīti samaisīts. Rezultātā iegūts eļļas ekstrakts ar augstu karotinoīdu saturu 84,7 mg 100 g⁻¹ (2.3.10. tabula).

2.3.10. tabula. **Karotinoīdu saturs smiltsērķšķu ‘Industry’ eļļas ekstraktos**

Varianti	Ogu paraugs	Ogas, g	Atūdeņošanai uzliets spirts, ml		Atspiedas, g	Aprēķinātais sēklu daudzums	Uzlieta eļļa, g	Karotinoīdi, mg 100 g eļļā
			1.reize	2.reize				
1p	‘Industry’	120	120	120	15,95	4,47	11,50	84,7
2p	‘Industry’	180	180	180	24,36	6,64	17,72	50,4
‘Industry’ spirta ekstrakta eļļa								
1p	‘Industry’	120	Spirta ekstrakts 600				60	14,7
2p	‘Industry’	180	Spirta ekstrakts 700				70	15,8

Ar ‘Industry’ ogu paraugu veikta vēl viena ekstrakcija ar smiltsērķšķu atūdeņošanu ultraskaņas vannā. Atūdeņošana un karotinoīdu ekstrakcija pie tādiem pašiem nosacījumiem (pirmā atūdeņošana 25 minūtes, ik pēc 10 minūtēm paraugu apmaisot, otrā atūdeņošana 15 minūtes) un uzlieta eļļa ar karotinoīdu saturu 14,7 mg 100 g⁻¹. Ekstrakcijas rezultātā iegūts eļļas ekstrakts ar ievērojami zemāku karotinoīdu saturu 50,4 mg 100 g⁻¹ (2.3.10. tabula). Zemāku karotinoīdu saturu varētu skaidrot ar nepietiekamu atspiedi samaisīšanu karsēšanas laikā, kas būtu jāņem vērā ražošanā.

L.E.V. Ekstraktu rūpnīcas sagatavotajiem eļļu (t.sk. smiltsērķšķu) paraugiem (2.3.8. att.) Dārzkopības institūtā tiek noteikts tokoferolu saturs. Tas ir viens no eļļu kvalitātes rādītājiem, kas svarīgs rūpnieciski ražotiem produktiem.



2.3.8. att. **Rūpnieciski ražotu eļļu paraugi.**

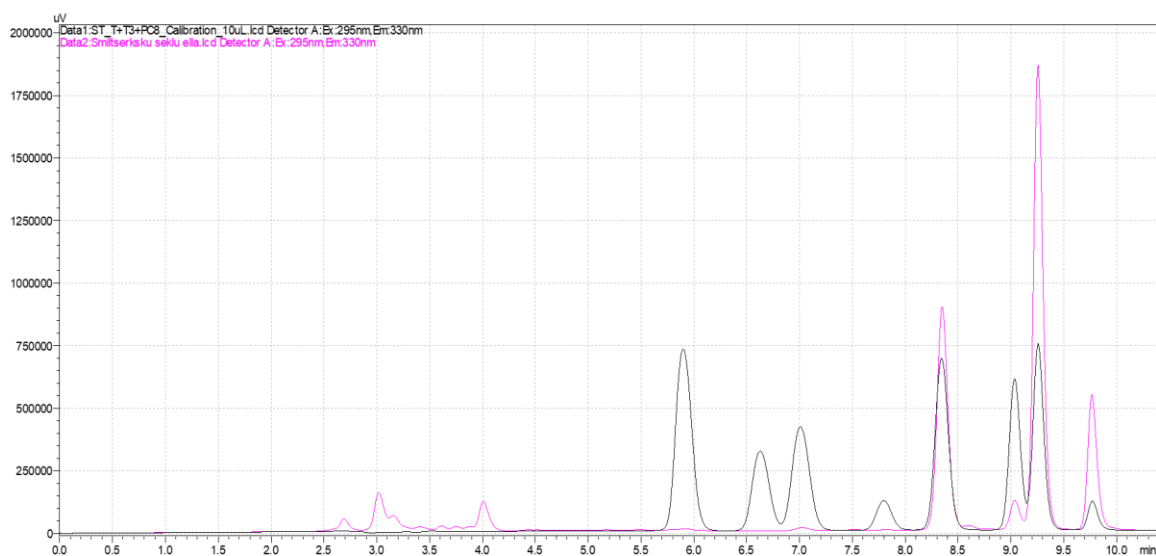
Smiltsērķšķu sēklu eļļa satur galvenokārt tokoferolus (g-T>a-T>d-T>b-T), plastohromanolu 8, kā arī atrodami g-T3 un a-T3 (2.3.11. tabula, 2.3.9. attēls).

2.3.11. tabula

Tokoferolu saturs rūpnieciski ražotā smiltsērķšķu sēklu eļļā (L.E.V. Ekstraktu rūpnīca)

Tokoferoli	d-T3	b-T3	g-T3	a-T3	d-T	b-T	g-T	a-T	PC-8
Smiltsērķšķu sēklu eļļa, mg/100 g eļļas (STDEV, 5%)	0.00	0.00	1.78	0.65	96.11	14.16	195.27	153.18	10.59

T3-tokotrienoli, T-tokoferoli, PC-8 - plastohromanols 8

**2.3.9. attēls. Smiltsērķšķu sēklu eļļas tokoferolu hromatogramma**

Secinājumi

1. Veiktie pētījumi norāda, ka β -karotīna saturs smiltsērķšķu šķirnes ‘Mary’ augļu mīkstuma eļļā, kas iegūta no veselīgiem augļiem, izmantojot etanolu, variē no 50.4 līdz 84.7 mg/100g. Turpretī šķirnes ‘Prozračnaja’ augļu mīkstuma eļļā β -karotīna saturs bija vidēji 27 mg/100g un vēl mazāks tas bija šķirnes ‘Botaničeskaja Ļubitel’skaja’ eļļā – vidēji 10 mg/100g.
2. Praktiskos pētījumos noteikts, ka β -karotīna daudzumu eļļā ietekmēja gan izmantotā smiltsērķšķu šķirne, gan arī ieguves metode. Rūpnieciski ražotā smiltsērķšķu sēklu eļļā dominēt tokoferoli ((g-T>a-T>d-T>b-T), tā satur plastohromanolu 8 (10.6 mg/100 g eļļas), kā arī tokotrienolus (g-T3, a-T3).
3. Noteikti kompleksas smiltsērķšķu eļļas (sastāv no mīkstuma, mizas un sēklām) raksturojošie rādītāji, izstrādāti tehniskie noteikumi (R2.3.1. pielikums).
4. Individuālai izejvielai (smiltsērķšķu šķirnēm) veikta kvalitātes standartizācija trīs gadu periodā, nosakot raksturīgākos ķīmiskos rādītājus (R2.1. sadaļa).

Literatūra

- Maria L, Carvalho J De, Barros P, et al (2012) Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *FRIN* 47:337–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.040>
- Segliņa, D., Krasnova, I., Grygier, A., Radziejewska-Kubzdela, E., Rudzińska, M., & Górnaś, P. (2021). Unique bioactive molecule composition of sea buckthorn (*hippophae rhamnoides* L.) oils obtained from the peel, pulp, and seeds via physical “solvent-free” approaches. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 98(10), 1009-1020. doi:10.1002/aocs.12524
- “Smiltsērķšķis” (2013), A. Brūvelis, D. Segliņa, AS “Lauku Avīze”, Rīga, 112 lpp.

R2.3.1. PIELIKUMS

UZŅĒMUMS	LAD projekts Nr. 19-00-A01612-000006	Izstrādāja: Vārds uzvārds
	KOMPLEKSAS SMILTSĒRKŠĶU EĻĻAS TEHNISKIE NOTEIKUMI	Apstiprina: Vārds uzvārds

Tehniskie noteikumi kompleksas smiltsērķšķu eļļas (turpmāk “produkta”) ieguvei sagatavoti projekta Nr. 19-00-A01612-000006 “Biotehnoloģiju kompetences attīstība augstvērtīgu dārzeņkopības produktu ieguvei” īstenošanai. Kompleksas smiltsērķšķu eļļas ieguvei izmantotas spiedpaliekas pēc sulas iegūšanas, kas sastāv no mīkstuma, mizas un sēklām. Tehniskajā aprakstā norādīti vidējie rādītāji trīs gadu periodā ar standartnovirzi.

Produkta apraksts

Izejvielas bioloģiskā definīcija: *Hippophae rhamnoides* eļļa, iegūta no smiltsērķšķiem (*Hippophae rhamnoides* L., *Elaeagnaceae*).

Smiltsērķšķu eļļas iegūšanai izmantotā ogu šķirne: ‘Marija’.

Ražas gadi: 2020. – 2022. g. raža.

Izejvielas sagatavošana un uzglabāšanas apstākļi: tīras, sausas ogas sasaldētas (vēlams kastēs, sabērtas maisos, marķētas), uzglabāšanas temperatūra -18 °C.

Eļļas ieguves process: ogas atkausētas; sula iegūta ar skrūves tipa presi (Condo Line, Zviedrija); spiedpaliekas žāvētas konvenciālā žāvēšanas iekārtā (B. Master BM40, Itālija) +45±2 C temperatūrā; eļļa iegūta ar aukstās spiešanas paņēmieni, izmantojot eļļas spiedi (Farmet UNO, Čehija).

Eļļas apstrāde: eļļa filtrēta, centrifugēta (Eppendorf, Vācija), liekā mitruma atdalīšanai.

Eļļas uzglabāšana: pildīta tumšā, slēgtā stikla tarā. Ieteicams uzglabāt +4 līdz 20 °C tumšā vietā, sargājot no tiešiem saules stariem.

Produkta derīguma termiņš: 2 gadi no ražošanas datuma.

Produktu raksturojošie rādītāji

Raksturojoši rādītāji	Apraksts / vērtība*
Izskats, garša, smarža	Tumši sarkana-oranža krāsa; specifiska, smiltsērķšķiem raksturīga garša un aromāts; nav jūtami sveši aromāti
Blīvums, (g/cm ³ ; 20 °C)	0.918±0.11
Refraktīvais indekss (20 °C)	1.482±0.023
Mitrums (%)	0.01±0.001
Skābes skaitlis (mg KOH/g)	4.2±0.1 (<20.0)
Pelni, %	0.06±0.005
Karotinoīdi (mg 100g ⁻¹ , kopējie, izteikti uz β karotīnu)	905.70±24.40
Tokoferoli, kopējie (mg%, izteikts uz alfa tokoferolu; t.sk. E vitamīns)	210.71±8.05
E vitamīns (mg /100g)	169.25±5.89
Tauki (kopā), %	99.9±0.01
<u>Taukskābes:</u>	
<i><u>Piesātinātās taukskābes:</u></i>	
Palmitīnskābe (%) [C16:0]	25.0±5.51
<i><u>Nepiesātinātās taukskābes:</u></i>	
Palmitoleīnskābe (%) [C16:1 n9c]	24.0±2.43
Oleīnskābe (%) [C18:1 n9c]	5.1±0.71
Linolskābe (%) [C18:2 n6c]	20.9±3.14
alfa-linolēnskābe (%) [C18:3 n3]	<0.1
gamma-linolēnskābe (%) [C18:3 n6]	<0.1
<u>Smagie metāli:</u>	
Kadmijs (Cd, ppm)	<0.005
Arsēns (As, ppm)	<0.005
Dzīvsudrabs (Hg, ppm)	<0.010
Svins (Pb, ppm)	<0.010

*dažādām izejvielām vērtības var atšķirties, jo to ietekmēs izejvielu kvalitatīvie rādītāji, augšanas vieta, klimatiskie apstākļi, novākšanas laiks, sulas ieguves process u.c. faktori.

Papildu informācija par Tehniskās dokumentācijas sagatavošanu

Tehniskā dokumentācija sagatavota:	APP Dārzkopības institūta Pārstrādes un bioķīmijas nodaļa Fizikālās un ķīmiskās analīzes veiktas APP Dārzkopības institūtā, BIOR, JS Hamilton
Tehniskās dokumentācijas sagatavošanā izmantotie materiāli:	https://europa.eu/youreurope/business/product-requirements/compliance/technical-documentation-conformity/index_lv.htm https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LV/TXT/?qid=1471863102250&uri=CELEX:02006R1881-20160401

R2.4. Sagatavots dzintarskābes izdalīšanas procesa apraksts (TRL3).

Ievads

Saskaņā ar jaunāko informāciju globālā dzintarskābes pārdošanas vērtība 2018. gadā bija 131,7 miljoni USD, un tiek prognozēts, ka līdz 2026. gadam tā sasniegs 203,8 miljonus USD, turpmākajos gados pieaugot ar saliktu gada pieauguma rādītāju 6,8% apmērā (Dzintarskābes tirgus 2017, 2017). Plašs rūpniecisko pielietojumu klāsts bioloģiski noārdāmu polimēru, farmaceitisko līdzekļu, ādas un ķermeņa kopšanas līdzekļu, ķīmisko vielu un pārtikas produktu ražošanā (Omwene et al., 2021) izskaidro plašo pieprasījumu pēc šīs daudzfunkcionālās aktīvās farmaceitiskās sastāvdaļas (API) (Kumar et al., 2020). Dzintarskābe (SA) ($(\text{CH}_2)_2(\text{CO}_2\text{H})_2$) (no latīņu *succinum*, dzintars), pirmo reizi pazīstama arī kā butāndiskābe, tika izolēta gandrīz pirms pieciem gadsimtiem, 1546. gadā, Georgijs Agrikola kā destilātu to ieguva no Baltijas jūras dzintara (Duffin, 2015). Pašlaik tirgū tiek piedāvāts plašs uz SA balstītu uztura bagātinātāju klāsts, kas ražots ķīmiskās sintēzes ceļā, un šķiet, ka sintētiskajam SA nav ar zālēm saistītas blakusparādības (Ives et al., 2020). Tomēr, ņemot vērā negatīvo ietekmi uz cilvēku veselību un vidi un salīdzinoši augstās izmaksas, SA ražošana, izmantojot ķīmiskos ceļus, rada bažas (Merrylin et al., 2020). Turklāt, pateicoties tehnoloģiskajiem sasniegumiem analītiskajā ķīmijā un bioķīmisko reakciju izpratnei, SA ražošana no atjaunojamiem enerģijas avotiem pievērš uzmanību kā vidi saudzējoša iespēja (Ives et al., 2020; Ladakis et al., 2020).

Augstu dzintarskābes iznākumu un relatīvi maz blakusproduktu var panākt, izmantojot lignocelulozes materiālu biorafinēšanas procesu ar plašu mikroorganismu klāstu, piemēram, *Actinobacillus succinogenes* (Salvachúa et al., 2016), *Mannheimia succiniciproducens*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* un dažādiem rekombinantās *Escherichia coli* celmiem (Ghayur et al., 2019). Biorafinēšana ir videi draudzīga alternatīva ar drošāku profilu nekā parastā ražošana, un tā varētu būt ilgtspējīgas SA rūpnieciska mēroga ražošanas nākotne. Tomēr, tāpat kā organiskās sintēzes gadījumā, SA ražošanai uz bio bāzes ir nepieciešami lieli sākotnējie ieguldījumi rūpnieciskajās iekārtās, kas izskaidro šī nišas produkta salīdzinoši augsto cenu salīdzinājumā ar no fosilajām vielām ražoto dzintarskābi (Dickson et al., 2021).

SA klātbūtne ir dokumentēta vairākos augļos un to sulās pēc ekstrakcijas ar šķidrums-šķidrums vai cietvielu fāzes, tostarp tādos augos kā *Eugenia myrcianthes* (Arena et al., 2023), *Citrus limetta*, *C. aurantifolia*, *C. nobilis*, *C. karna*, *C. medica*, *C. ichangensis*, *C. aurantium* (Sharma et al., 2018), bumbieri (*Pyrus communis* L.), āboli (*Pyrus malus*), rabarberi (*Rheum rhabarbarum*) un vilkābele (*Crataegus curvisepala*) (Cinkmanis et al., 2019). Dzintarskābes saturs augļos var svārstīties no mg līdz g uz 100 g/mL parauga. Turklāt krūmcidonijas (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach) (JQ) augļi ir viens no bagātākiem organisko skābju avotiem, saturot ābolskābi, hnskābi un dzintarskābi (Antoniewska et al., 2019; Granados et al., 2003; Hellín et al., 2020). Pateicoties selekcionāru Silvijas Ruisas un Edītes Kaufmanes (Dārzkopības institūts, LatHort) aktivitātēm augļkopības jomā un piedāvātajām pārstrādes iespējām (Seglina, et al., 2009), JQ stādījumu platība Baltijas valstīs ir palielinājusies (Juhņeviča-Radenkova et al., 2022) un saskaņā ar LAD datiem, sasniegusi 705 ha⁴. Ņemot vērā bioaktīvo vielu daudzveidību un saturu JQ augļos, projektā tika strādāts pie dzintarskābes izdalīšanas procesa, lai izveidotu organisko skābju, jo īpaši dzintarskābes noteikšanas selektīvās atgūstamības un analīzes protokolu, attiecīgi izmantojot jonu apmaiņas sveķus un uz šķidrums hromatogrāfijas-masspektrometrijas (HPLC-ESI-TQ-MS/MS) balstītas pieejas. **Interese par dzintarskābi saturošu produktu (koncentrētu sulu vai cita veida produktu) ir arī SIA L.E.V. Ekstraktu rūpnīcai, īpaši ņemot vērā uzņēmuma darbības virzienu – produktus no dabiskas izcelsmes avotiem.**

⁴ <https://www.lad.gov.lv/lv/platibu-maksajumu-statistika>

Materiāli un metodes

Kīmiskās vielas un reaģenti

Tirdzniecības standarti un reaģenti:

- Merck KGaA (Darmstadt, Vācija): dzintarskābe (SA), ramnoze, riboze, ksiloze, arabinoze, sorboze, fruktoze, mannoze, glikoze, galaktoze, saharoze, maltoze, laktoze un glicerīns;
- Merck KGaA (Darmstadt, Vācija): šķidrums hromatogrāfijas masas spektrometrijas (LC-MS) kvalitātes metanols (MeOH), skudrskābe (HCOOH) (puriss r.a.);
- Mitsubishi Chemical Corporation (Tokija, Japāna): katjonu apmaiņas sveķi DIAION™ UBK550;
- Sigma-Aldrich Chemie Ltd. (Šteinheima, Vācija): cietfāzes ekstrakcijas (CFE) kolonnas Supel™-Select HLB un Strata-X ar modificēto stirola-divinilbenzola kopolimēra pildījumu;
- Chempur (Piekary Ślaskie, Silēzija, Polija): amonija hidroksīda šķīdums (NH₄OH) (25 % v/v);
- VWR™ International, GmbH (Darmštate, Vācija): sālskābe (HCl) (37 % tilp.);
- Īpaši tīrs ūdens tika ražots, izmantojot reversās osmozes PureLab Flex Elga ūdens attīrīšanas sistēmu (Veolia Water Technologies, Parīze, Francija).
- Buferšķīdumi, ko izmantoja SA attīrīšanai un desorbcijai no katjonu apmaiņas sveķiem, aprakstīti tālāk.

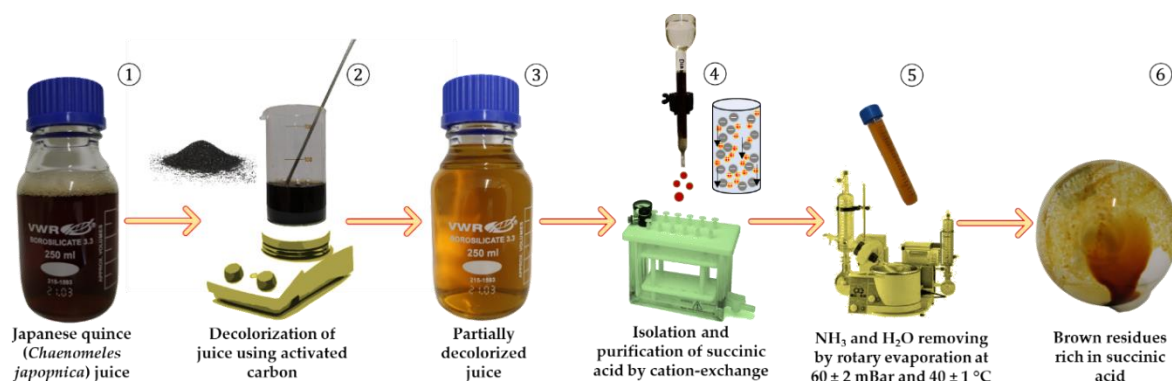
Dzintarskābes sagatavošana HPLC-ESI-TQ-MS/MS analīzei

Attīrīšana ar katjonu apmaiņas sveķiem

Dzintarskābes (SA) izolēšana un attīrīšana no krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) sulas (JQJ) matricas tika veikta pēc katjonu apmaiņas hromatogrāfijas principa, izmantojot DIAION™ UBK550 kā negatīvi lādētus sveķus pozitīvi lādētai SA adsorbcijai. Šim nolūkam 60,0 ml JQJ ar precizitāti $\pm 0,1$ ml pārņests 200,0 ml vārglāzē, un pievienots 60,0 ml dejonizēta ūdens. Pēc tam maisījums pakļauts atkrāsošanai ar aktivēto ogli, nepārtraukti intensīvi maisot uz magnētiskā maisītāja ar ātrumu 700 apgr./min un 30, 0 ± 1 , 0°C 60 minūtes. Pēc tam maisījumu centrifugēja ar ātrumu $10\,280 \times g$ 10 minūtes 20, 0 ± 1 , 0°C temperatūrā Hermle Z 36 HK centrifūgā (Hermle Labortechnik, GmbH, Wehingen, Vācija). Virsējais organiskais slānis dekantēts un filtrēts caur 0,20 μm politetrafluoretilēna (H-PTFE) hidrofilizēto membrānas filtru (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Vācija). Katjonu apmaiņas sveķu (kolonnas tilpums 12,0 ml), kas piepildīti ar 2,2 mg DIAION™ UBK550, kondicionēšana/līdzsvarošana tika veikta, izmantojot 24,0 ml buferšķīduma A šķīduma ar plūsmas ātrumu $1,0\text{ ml min}^{-1}$ zem spiediena $-1,0 \pm 0,1$ "Hg, izmantojot 12 portu Chromabond cietfāzes ekstrakcijas (CFE) vakuuma manifoldu (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren Vācija), kas savienots ar N 820 LABOPORT vakuumsūkni (KNF Neuberger AB, Stokholma, Zviedrija). Uznestais paraugs skalots ar 24,0 ml H₂O un caurplūdes frakcija (angl. *flow-through fraction*) savākta SA klātbūtnes noteikšanai. SA desorbcijai no katjonu apmaiņas sveķiem izmantots 24,0 ml buferšķīdums B. Savāktā eluāta frakcija ietvaicēta, izmantojot "Laborota 4002" rotācijas vākuma ietvaicētāju (Heidolph, Švābija, Vācija) 40 ± 1 , 0°C un $60,0 \pm 2,0$ mBar. Iegūtie sausie atlikumi turēti $-18,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ temperatūrā līdz turpmākai analīzei un

lietošanai, maksimāli 24 stundas. Paraugu sagatavošanas posmu shematisks attēlojums ir parādīts 2.4.1. attēlā:

- buferšķīdums A 10 mM sālsskābes šķīdums (pH 2,04);
- buferšķīdums B 2 M amonija hidroksīda šķīdums (11.74.).



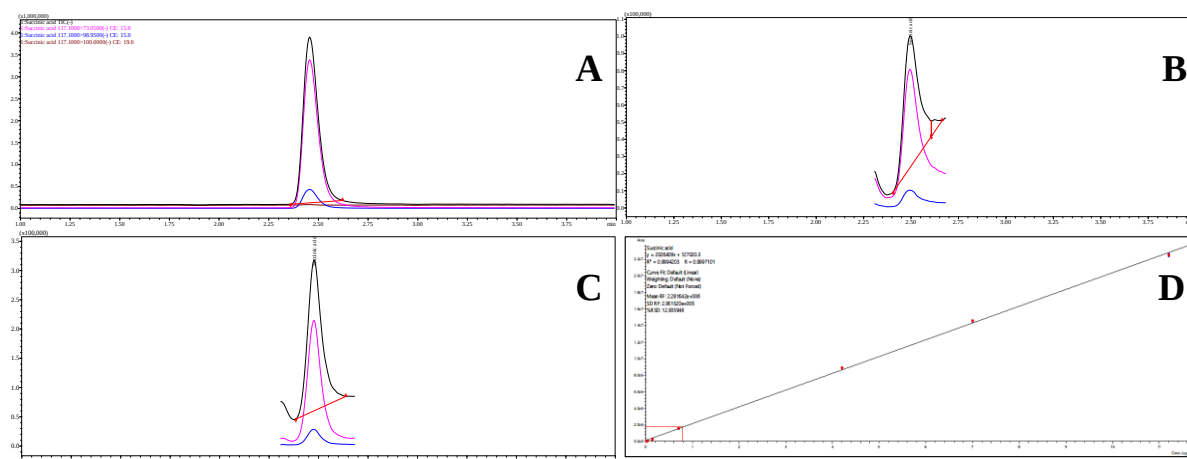
2.4.1. attēls. Paraugu sagatavošanas shematisks attēlojums, kas veikts dzintarskābes ekstrahcijai no krūmcidoniju sulas.

Attīrīšana ar SupelTM-Select HLB un Strata-X kolonnām

Paraugu sagatavošana CFE veikta, ievērojot iepriekš aprakstīto procedūru CFE ar katjonu apmaiņas sveķiem (skatīt sadaļu “Attīrīšana ar katjonu apmaiņas sveķiem”). SA izolācija veikta saskaņā ar Phenomenex un Supelco izstrādātiem protokoliem ar dažām modifikācijām. Īsumā: abu sorbentu kondicionēšana un līdzsvarošana veikta, izmantojot 1 kolonnas tilpuma (3,0 ml) tīra MeOH, kam sekoja 1 kolonnas tilpums – dejonizēta H₂O. Uznestais paraugs (3,0 ml) mazgāts ar 2 kolonnas tilpumu – dejonizēta ūdens. Caurplūdes frakcija savākta SA kvalitatīvai un kvantitatīvai hromatogrāfiskai analīzei. Pastāvīgas plūsmas nodrošināšanai ($1,0 \pm 0,2 \text{ ml min}^{-1}$) SA desorbcijas laikā izmantots “Chromabond[®] CFE” (Düren, Vācija) CFE vakuuma kolektors ar noregulētu spiedienu – $1,0 \pm 0,1 \text{ "Hg}$. SA desorbcijai no polimēru sorbentiem izmantots 1,0 ml paskābinātais 100% MeOH (MeOH: HCOOH 99:2 v/v). Iegūtā frakcija savākta un analizēta ar HPLC-ESI-TQ-MS/MS HPLC sistēmu.

HPLC-ESI-TQ-MS/MS analītiskie nosacījumi dzintarskābes analīzei

No JQJ atvasinātās SA hromatogrāfijas analīze (2.4.2. attēls) veikta ar Shimadzu Nexera UC sērijas superkritiskā šķidrums ekstrakcijas–superkritiskās šķidrums hromatogrāfijas–šķidrums hromatogrāfijas (SFE-SFC-LC) sistēmu (Shimadzu Corporation, Tokija, Japāna), tandēmā ar trīskāršā kvadrupola masselektīvo detektoru (TQ-MS-8050, Shimadzu korporācija, Tokija, Japāna) aprīkotu ar elektroizsmidzināšanas jonizāciju (ESI).



2.4.2. attēls. Selektīvo jonu hromatogramma MRM režīmā, kas dota dzintarskābes standartam ar koncentrāciju $0,0122 \text{ mg ml}^{-1}$ (A), krūmcidoniju sulas paraugam pirms cietfāzes ekstrakcijas (attīrīšanas) (B) un pēc cietfāzes ekstrakcijas ar DIAION™ UBK550 (C); Kalibrēšanas līkne, kas uzbūvēta no analītiskā standarta, ko izmantoja dzintarskābes noteikšanai krūmcidoniju sulas paraugos (D). Paraugu injekcijas tilpums $3,0 \text{ uL}$ ($0,037 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$).

$3,0 \text{ } \mu\text{L}$ paraugs ievadīts apgrieztās fāzes Shim-pack UC-RP kolonnā ($5,0 \text{ } \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$; Tokija, Japāna), kas darbojas $45,0 \text{ } ^\circ\text{C}$ temperatūrā un kustīgas fāzes ātrumu $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. Izmantotās kustības fāzes bija paskābināts H_2O ($1,0 \text{ } \%$ HCOOH v/v) (A) un paskābināts MeOH ($1,0 \text{ } \%$ HCOOH v/v) (B) izokrātiskā režīmā. MeOH injekcijas iekļautas pēc katra parauga kā tukšais tests, lai izvairītos no pārnesšanas efekta (angl. *carry-over effect*). Dati iegūti, izmantojot LabSolutions Insight LC-MS versiju 3.7 SP3 (darbstacija) (Shimadzu Corporation, Tokija, Japāna), kas izmantota arī instrumentu kontrolei un apstrādei. Šajā pētījumā izmantota jonizācija negatīvās jonu polaritātes režīmā, savukārt dati vākti profila un centroīda režīmos ar datu uzglabāšanas sliekšni 5000 absorbcijas MS. Masselektīvā detektora darbības apstākļi bija šādi: detektora spriegums $1,98 \text{ kV}$, pārveidošanas dinoda spriegums $10,0 \text{ kV}$, interfeisa spriegums $3,0 \text{ kV}$, interfeisa temperatūra $300 \text{ } ^\circ\text{C}$, desolvācijas līnijas temperatūra $250 \text{ } ^\circ\text{C}$, siltumbloka temperatūra $400 \text{ } ^\circ\text{C}$, smidzināšanas gāze – argons (Ar , tīrība $99,9\%$) ar plūsmas ātrumu $3,0 \text{ L min}^{-1}$, sildgāze – oglekļa dioksīds (CO_2 , tīrība $99,0\%$) ar plūsmas ātrumu $10,0 \text{ L min}^{-1}$ un žāvēšanas gāze – slāpeklis (N_2 , atdalīts no gaisa, izmantojot slāpekļa ģeneratoru “Peak Scientific Instruments Ltd.” (Inchinnan, Skotija, Lielbritānija), tīrība $99,0\%$) ar plūsmas ātrumu $10,0 \text{ L min}^{-1}$. SA veikta, izmantojot jonu pāreju monitoringa režīmu (angl. *multiple reaction monitoring – MRM*) iepriekš veicot LC-MS sistēmas optimizēšanu. MRM pārejas, sadursmes enerģija, Q1, Q3 un SA aiztures laiks ir parādīti 2.4.1. tabulā.

2.4.1.tabula. **MRM dzintarskābes pārejas un atbilstošā sadursmes enerģija, Q1, Q3 un aiztures laiks pētāmajai organiskajai skābei**

Organiskā skābe	Optimizēti MRM parametri								Kalibrēšanas parametri			
	RT, min	Molekulārā formula	Ionizācijas režīms	MRM pārejas	Q1 Pre Bias, V	Sadursmes enerģija, V	Q3 Pre Bias, V	Aiztures laiks, msec	R ²	RSD, %	LOD, µg mL ⁻¹	LOQ, µg mL ⁻¹
Succinic acid	2.451	C ₄ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	117.1000→73.0500	13.0	15.0	13.0	100.0	0.9994	12.93	0.44	1.34
				117.1000→98.9500	14.0	15.0	18.0	100.0				

Piezīme. Pirmās atrastās MRM dzintarskābes pārejas tika izmantotas kvantitatīvai analīzei, bet otrās kvalitatīvai. LOD – noteikšanas robežvērtība; LOQ – kvantitatīvās noteikšanas robežvērtība; RT – aiztures laiks; µg – mikrogrami

Standarta izejas šķīduma sagatavošana

Izejas šķīdums, kas satur 1.4 mg SA, pagatavots 10,0 ml 100% paskābinātā MeOH šķīdumā (MeOH:HCOOH attiecība 99:1 v/v). SA kvantitatīvā noteikšana tika veikta, injicējot 3,0 µL 10 °C temperatūrā kalibrēšanas šķīduma diapazonā no 0,0175 līdz 11,2000 µg ml⁻¹. Noteikts regresijas koeficients, detektēšanas robežvērtība (LOD) un kvantificēšanas robežvērtība (LOQ). Darba šķīdums sagatavots tieši pirms lietošanas.

Rezultāti

Pētījumu rezultāti apkopoti 2.4.1. tabulā. Dzintarskābes koncentrācija saskaņā ar pielietotajām sagatavošanas metodēm:

- 1 – krūmcidoniju sula bez pirmapstrādes (kontrole), rezultāti izteikti svaigā svarā;
- 2 – CFE, izmantojot stirola-divinilbenzola bāzes apgrieztās fāzes Strata-X (Phenomenex, Torrance, CA, ASV) kolonnu, kas piepildīta ar sorbenta daļiņu izmēru 33 µm, 85 Å, 30 mg 3 ml⁻¹;
- 3 – CFE, izmantojot modificētu stirola-divinilbenzola bāzes SupelTM-Select HLB (Supelco, Bellefonte, PA, ASV) kolonnu, kas piepildīta ar sorbenta daļiņu izmēru 50–70 µm, 80–200 Å, 60 mg 3 ml⁻¹;
- 4 – CFE, izmantojot gēla tipa poli (stirola-divinilbenzola) katjonu apmaiņas DIAION™ UBK550 (Mitsubishi Chemical Corporation, Tokija, Japāna) sveķus ar daļiņu izmēru 220 µm, 60 Å, 2,2 mg 12 ml⁻¹.

2.4.2. tabula. Dzintarskābes koncentrācija frakcijās, kas iegūtas pēc krūmcidoniju sulas attīrīšanas un koncentrēšanas ar trīs sorbentu veidu

Nosaukums	Mw	Vidējā koncentrācija, mg 100 mL ⁻¹			
		1	2	3	4
Dzintarskābe	118.09	0.202 ± 0.002	0.224 ± 0.024	0.186 ± 0.018	152.3 ± 7.9

Piezīme: norādītas vērtības ± SD (standarta kļūda) divos atkārtojumos ($n = 2$).

Šajā eksperimentā JQJ pakļauts CFE attīrīšanai, izmantojot stipri skābus DIAION™ UBK550 katjonu apmaiņas fracionēšanas sveķus. Sorbenta izvēle balstīta uz pieejamību, efektivitāti un lietošanas vienkāršību, jo nav nepieciešama īpaša aktivizēšana, izņemot kondicionēšanu ar vieglu HCl šķīdumu. Alternatīva SA attīrīšanas metode, kurā salīdzināšanas nolūkos ir izmantotas Supel™-Select HLB vai Strata-X kolonnas, ar hidrofilu modificēta stirola polimēra pildījumu. SA šķīdība var atšķirties atkarībā no šķīdinātāja un izmantotās koncentrācijas. Iepriekšējā zinātniskā pētījumā Benedikta et al. (1) ziņoja, ka SA šķīdība ūdenī nav pietiekama, lai to izmantotu kā šķīdinātāju reakcijas maisījuma pagatavošanai apkārtējās vides temperatūrā. Tāpēc cukuru un citu mazu molekulu, kas atrodas JQJ, fracionēšana ir veikta divos posmos, pirmkārt, ar aktivēto ogli ūdens klātbūtnē, kam sekoja paraugu mazgāšana ar ūdeni. Sorbeta SA eluēšanai (desorbēcijai) izmantots 2M NH₄OH, jo vairākkārt ir pierādīta efektivitāte organisko karbonskābju un aminoskābju fracionēšana no dažādiem rūpniecisko izejvielu avotiem (2–4). SA tīrība savāktajā frakcijā hromatogrāfiski analizēta, novērtējot blakus esošo organisko skābju un mono- un disaharīdu klātbūtni.

Sākotnējā analīze atklāja salīdzinoši augstu SA koncentrāciju JQJ (2.4.2. tabula). JQJ konstatētā SA koncentrācija ir 25,2 reizes lielāka, nekā ziņoja Hellin et al. (5), norādot svārstības diapazonā no 0,004 līdz 0,012 mg 100 ml⁻¹ 19 *Chaenomeles japonica* genotipu sulās. Turklāt autori ierosina izmantot JQJ tāpat kā citronu sulu, kas varētu dot pārtikas produktiem papildu konservējošas īpašības un saglabāt to kvalitāti uzglabāšanas laikā. Ievērojamas atšķirības SA koncentrācijās, kas konstatētas JQJ esošajā pētījumā, varētu būt skaidrojamas ar vairākiem faktoriem: meteoroloģiskie apstākļi, agro-tehniskās tehnoloģijas, kā arī JQJ sagatavošanai izmantotie pirmapstrādes paņēmieni. Pētījumam krūmcidoniju sula sagatavota enzimatiski, kas varēja pozitīvi ietekmēt dzintarskābes iznākumu, jo SA atrodas kompleksā ar pektīnvielām un citiem lielmolekulāriem savienojumiem.

Stirola-divinilbenzola bāzes apgrieztās fāzes Strata-X sorbenta izmantošana ievērojami palielināja SA koncentrāciju, jo tā koncentrācija eluāta frakcijā bija par 11,0% lielāks, salīdzinot ar sākotnējo koncentrāciju JQJ. SA koncentrācija eluāta frakcijā, kas iegūta pēc CFE ar Supel™-Select HLB, nodrošināja salīdzinoši mazāku SA daudzumu nekā Strata-X, jo novērots šīs organiskās skābes zudums par 7,8%, salīdzinot ar sākotnējo koncentrāciju. Tomēr ir vērts atzīmēt, ka abos gadījumos eluāta frakcijās nav konstatēta mono- un disaharīdu klātbūtne. Brūnās vielas iznākums, kas iegūts no 60,0 ml JQJ, izmantojot katjonu apmaiņas sveķus, sasniedza 75,7 mg, un šī ir vienīgā metode, kas nodrošināja pietiekamu SA daudzumu. SA koncentrācija brūnajā vielā sasniedza 152,3 mg 100 ml⁻¹, kas ir 754,4 reizes augstāka nekā pašā JQJ. CFE ar katjonu fracionēšanas sveķiem, kas līdzīgs iepriekšējiem diviem sorbentiem, nodrošināja 100% mono- un disaharīdu atdalīšanu. Tomēr turpmāka

atsevišķu organisko skābju analīze atklāja ābolskābes relatīvo daudzumu, kam sekoja hīnskābe.

Secinājumi

Dzintarskābe ir viena no vispieprasītākajām sastāvdaļām, ko plaši izmanto dažādu veselības aprūpes un ādas kopšanas līdzekļu, bioloģiski noārdāmu polimēru, kā arī pārtikas un barības piedevu ražošanā. Šis pētījums veikts, lai izveidotu protokolu dzintarskābes selektīvai atgūšanai no krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) augļu kompleksās matricas, izmantojot jonu apmaiņas fracionēšanas sveķus DIAION™ UBK550 ar negatīvi lādētām daļiņām, kas šķērssavienotas ar stirola-divinilbenzola matricu (R2.4.1. pielikums). **Apraksts atbilst TRL3 - pētījumā plānotās koncepcijas eksperimentālai pārbaudei: uzsākta izpēte un izstrāde (analītiskie/laboratorijas pētījumi), lai apstiprinātu prognozes par tehnoloģijas komponentēm.** Alternatīva dzintarskābes attīrīšanas metode, kurā salīdzināšanas nolūkos ir izmantotas Supel™-Select HLB vai Strata-X kolonnas, kas balstītas ar modificētu polimēru uz stirola bāzes. Dzintarskābes analīze, kas veikta ar vairāku reakciju monitoringu (MRM), izmantojot masselektīvo detektēšanu ar trīskāršo kvadropola sistēmu (HPLC-ESI-TQ-MS/MS), atklāja tās klātbūtni krūmcidoniju sulā bez iepriekšējas apstrādes 0,202 mg 100 ml⁻¹ apjomā. Uz stirola bāzes izgatavota polimēra Strata-X sorbenta izmantošana ļāva atgūt par 11,0% vairāk dzintarskābes no krūmcidoniju sulas salīdzinot ar sākotnējo koncentrāciju. Savukārt dzintarskābes koncentrācija eluāta frakcijā, kas iegūta pēc attīrīšanas un koncentrēšanas ar Supel™-Select HLB, nodrošināja līdz pat 7,8% zemāku daudzumu, salīdzinot ar tās sākotnējo koncentrāciju sulā. Jonu apmaiņas fracionēšanas sveķu DIAION™ UBK550 izmantošana krūmcidoniju sulas attīrīšanai un koncentrēšanai ļāva iegūt sīrupam līdzīgo brūno masu, kurā koncertētā veidā konstatēta dzintarskābe klātbūtne 152,3 mg 100 ml⁻¹ apmērā. Atrasta dzintarskābes koncentrācija frakcijā bija 754,4 reizēs vairāk nekā tas bija atrasts krūmcidoniju sulā. Visi trīs sorbenti nodrošināja pilnīgu mono- un disaharīdu izvadīšanu no sulas, jo eluāta frakcijās netika konstatētas mono- un disaharīdu pazīmes. **Projektā ir paveikts pirmais posms testēta dzintarskābes izdalīšanas iespējai no krūmcidoniju sulas, taču, lai iegūtu tīrvielu, turpmāk būtu nepieciešami papildu pētījumi.**

Literatūra

- Antoniewska, A., Rutkowska, J., & Pineda, M. M. (2019). Antioxidative, sensory and volatile profiles of cookies enriched with freeze-dried Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruits. *Food Chemistry*, **286** (October 2018), 376–387.
- Arena, M. E., Povilonis, I. S., Borroni, V., Pérez, E., Pellegrino, N., Cacciatore, C., & Radice, S. (2023). Changes in carbohydrates, organic acids, and minerals at different development stages of *Hexachlamys edulis* Fruit, a wild South American species with horticultural potential. *Horticulturae*, **9** (3), 314.
- Benedict, D. J., Parulekar, S. J., & Tsai, S. P. (2006). Pervaporation-assisted esterification of lactic and succinic acids with downstream ester recovery. *Journal of Membrane Science*, **281** (1–2), 435–445.
- Cinkmanis, I., Augspole, I., Vucane, S. and Fredijs, D. Analysis of organic acids in herbal and fruit syrups by liquid chromatography. In *FOODBALT 2019 13th Baltic Conference on Food Science and Technology Food. Nutrition. Well-Being*, 2–3 May 2019, pp. 193–197.
- Cukier, C., Lea, P. J., Cañas, R., Marmagne, A., Limami, A. M., & Hirel, B. (2018). Labeling maize (*Zea mays* L.) leaves with ^{15}N and monitoring nitrogen incorporation into amino acids by GC/MS analysis. *Current Protocols in Plant Biology*, **3** (3), e20073.
- Dickson, R., Mancini, E., Garg, N., Woodley, J. M., Gernaey, K. V., Pinelo, M., Liu, J., & Mansouri, S. S. (2021). Sustainable bio-succinic acid production: superstructure optimization, techno-economic, and lifecycle assessment. *Energy and Environmental Science*, **14** (6), 3542–3558.
- Duffin, C. J. (2015). Historical survey of the internal use of unprocessed amber. *Acta Medico-Historica Adriatica*, **13**(1), 41–74.
- Fechter, W. L., Dienst, J. H., & Le Patourel, J. F. (1996). Recovery of an amino acid (Patent No. WO 95/14002 (26.05.1995). European Patent No. WO 95/14002 (26.05.1995). Liverpool, Great Britan. European Patent Office.
- Ghayur, A., Verheyen, T. V., & Meuleman, E. (2019). Techno-economic analysis of a succinic acid biorefinery coproducing acetic acid and dimethyl ether. *Journal of Cleaner Production*, **230**, 1165–1175.
- Granados, M. V., Vila, R., Laencina, J., Rumpunen, K. and Ros, J. M. Characteristics and composition of chaenomeles seed oil. In *Japanese Quince – Potential Fruit Crop for Northern Europe* (Rumpunen, K., ed). Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Crop Science, Uppsala, 2003, 127–139.
- Hellín, M. P., Jordán, M. J., Rumpunen, K., & García, J. M. R. (2020). Chromatographic characterization of juice in fruits of different Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) genotypes cultivated in Sweden. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **32** (11), 816–825.
- Ives, S. J., Zaleski, K. S., Slocum, C., Escudero, D., Sheridan, C., Legesse, S., Vidal, K., Lagalwar, S., & Reynolds, T. H. (2020). The effect of succinic acid on the metabolic profile in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Physiological Reports*, **8** (21), 1–13.
- Juhnevic-Radenkova, K., Radenkova, V. and Krasnova, I. The impact of 1-MCP treatment and controlled atmosphere storage on the postharvest performance of four (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach) fruit cultivars. *J. Food Process. Preserv.*, 2022, **46** (1), 1–13.
- Kumar, R., Basak, B., & Jeon, B. H. (2020). Sustainable production and purification of succinic acid: A review of membrane-integrated green approach. *Journal of Cleaner Production*, **277**, 123954.
- Ladakis, D., Papapostolou, H., Vlysidis, A., & Koutinas, A. (2020). Inventory of food processing side streams in European Union and prospects for biorefinery development. In M. R. Kosseva &

- C. Webb (Eds.), *Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities* (Second Edition, pp. 181–199). Academic Press.
- Merrylin, J., Kannah, R., Banu, J., & Yeom, I. (2020). Production of organic acids and enzymes/biocatalysts from food waste. In J.. Banu, M. Gunasekaran, G. Kumar, & S. Kavitha (Eds.), *Food Waste to Valuable Resources: Applications and Managment* (pp. 119–141). Academic Press.
- Omwene, P. I., Sarihan, Z. B. O., Karagunduz, A., & Keskinler, B. (2021). Bio-based succinic acid recovery by ion exchange resins integrated with nanofiltration/reverse osmosis preceded crystallization. *Food and Bioproducts Processing*, **129**, 1–9.
- Salvachúa, D., Mohagheghi, A., Smith, H., Bradfield, M. F. A., Nicol, W., Black, B. A., Biddy, M. J., Dowe, N., & Beckham, G. T. (2016). Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, **9** (1), 1–15.
- Sharma, R., Verma, S., Rana, S., & Rana, A. (2018). Rapid screening and quantification of major organic acids in citrus fruits and their bioactivity studies. *Journal of Food Science and Technology*, 55 (4),
- Seglina D, Krasnova I, Heidemane G, et al. Influence of drying technology on the quality of dried candied *Chaenomeles japonica* during storage. *Latvian Journal of Agronomy/Agronomijas Vestis*. 2009;12:113-118
- Succinic acid market 2017*. (2017). https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/succinic-acid-market-402.html?gclid=EAIaIQobChMI3YTbwuzC_gIVi9wYCh12qQZuEAAYASAAEgLD4fD_BwE
- Xiao, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Gao, B., Chang, J. and Zhu, D. Two-stage crystallization combining direct succinimide synthesis for the recovery of succinic acid from fermentation broth. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, **7** (January), 1–11.

R2.4.1. PIELIKUMS

DI Pārstrādes un bioķīmijas nodaļa	LAD projekts Nr. 19-00-A01612-000006	Izstrādāja: Vārds uzvārds
	DZINTARSKĀBES IZDALĪŠANAS NO KRŪMCIDONIJU AUGĻIEM PROCESA APRAKSTS	Apstiprina: Vārds uzvārds

Procesa apraksts sagatavots dzintarskābes izdalīšanai no krūmcidoniju sulas, lai īstenotu projektā Nr. 19-00-A01612-000006 “Biotehnoloģiju kompetences attīstība augstvērtīgu dārzkopības produktu ieguvei” izvirzīto uzdevumu – testētu dzintarskābes izdalīšanas iespēju no krūmcidonijām, sasniedzot tehnoloģiju gatavības līmeni TRL3, un sagatavotu dzintarskābes izdalīšanas procesa aprakstu.

Protokols dzintarskābes selektīvai atgūšanai no krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) augļu kompleksās matricas izveidots, izmantojot jonu apmaiņas fracionēšanas sveķus DIAION™ UBK550, Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japāna, ar negatīvi lādētām daļiņām, kas šķērssavienotas ar stirola-divinilbenzola matricu.

Augļu sagatavošana sulas ieguvei

Sulas ieguve

Dzintarskābes klātbūtnes testēšanai galvenokārt izmanto nestandarta (mazus, neregulāras formas) krūmcidoniju augļus. Pārstrādei augļus ievāc atbilstošā gatavības pakāpē, tos mazgā, apžāvē, iepakoj maisos un sasaldē. Sulas ieguvei sasaldētos krūmcidoniju augļus izber vannās, atkausē telpas temperatūrā vidēji 24 h vai kamēr tie līdz pilnībai ir atkususi, tad spiež sulu nesmalcinot. Sulas ieguvei izmanto piemērotas iekārtas, piemēram, grozu vai paku preses.

Sulas dzidrināšana un filtrēšana

Testēšana veikta, izmantojot krūmcidoniju sulu, kas pakļauta enzimatiskai hidrolīzei ar pektīna-degradējošiem enzīmiem. Sulas dzidrināšanai pektīnvielu un kompleksu tanīnu šķelšanai izmanto enzīmu EnartisZym EZ filtrs, “Enartis” (Itālija), ar deklarēto pektolītisko un celulozītisko aktivitātēm. Sulai pievienojamā enzīma daudzums izvēlēts, pamatojoties uz ražotāja kompānijas “Enartis” instrukcijām un informāciju, kas norādīta tehnisko datu lapā. Izvēlētie dzidrināšanas apstrādes apstākļi (izturēšanas temperatūra un laiks) izvēlēti saskaņā ar citiem Dārzkopības institūtā veiktiem pētījumiem. Enzīma sastāvs un sulai pievienojamais daudzums norādīts 1.tabulā.

Enzīma īpašības, sulai pievienojamais daudzums un apstrādes apstākļi

Enzīma nosaukums	EnartisZym EZ filtrs
Enzīma komponenti, procentuālais daudzums	Glikanāze, endo-1,3(4) β (≥ 5 - $< 7\%$) Pektīnesterāze (≥ 5 - $< 7\%$) Pektīna liāze (≥ 3 - $< 5\%$) Poligalakturonāze (≥ 3 - $< 5\%$)
Inkubācijas laiks	2 stundas
Inkubācijas temperatūra (°C)	+50 $\pm$ 0,5 °C
Pievienotais enzīma daudzums (uz litru)	0,4 ml

Enzīma darbības aktivitāte apturēta, sulu karsējot +90 °C temperatūrā trīs minūtes, pēc tam sula nekavējoties atdzesēta. Pēc dzidrināšanas nogulšņu aizvākšanai sula filtrēta, izmantojot pakešu presfiltru Colombo12 (Italija), ar filtrēšanas plāksņu materiāla caurlaidību vidēji 17 mikroni. Sagatavotā sula izmantota dzintarskābes satura testēšanai.

Dzintarskābes noteikšanaKīmiskās vielas un reaģenti

Tirdzniecības standarti un reaģenti:

- Merck KGaA (Darmstadt, Vācija): dzintarskābe (SA), ramnoze, riboze, ksiloze, arabinoze, sorboze, fruktoze, mannoze, glikoze, galaktoze, saharoze, maltoze, laktoze un glicerīns;
- Merck KGaA (Darmstadt, Vācija): šķidrums hromatogrāfijas masas spektrometrijas (LC-MS) kvalitātes metanols (MeOH), skudrskābe (HCOOH) (puriss r.a.);
- Mitsubishi Chemical Corporation (Tokija, Japāna): katjonu apmaiņas sveķi DIAION™ UBK550;
- Chempur (Piekaris Šlāskie, Silēzija, Polija): amonija hidroksīda šķīdums (NH₄OH) (25 % v/v);
- VWR™ International, GmbH (Darmštate, Vācija): sālsskābe (HCl) (37 % tilp.);
- Īpaši tīrs ūdens tika ražots, izmantojot reversās osmozes PureLab Flex Elga ūdens attīrīšanas sistēmu (Veolia Water Technologies, Parīze, Francija).

Dzintarskābes sagatavošana HPLC-ESI-TQ-MS/MS analīzei

Attīrīšana ar katjonu apmaiņas sveķiem. Dzintarskābes (SA) izolēšana un attīrīšana no krūmcidoniju (*Chaenomeles japonica*) sulas (JQJ) matricas veikta pēc katjonu apmaiņas hromatogrāfijas principa, izmantojot DIAION™ UBK550 kā negatīvi lādētus sveķus pozitīvi lādētai SA adsorbcijai. Šim nolūkam 60,0 ml JQJ ar precizitāti $\pm 0,1$ ml pārnesti 200,0 ml vārglāzē, un pievienots 60,0 ml dejonizēta ūdens. Pēc tam maisījums pakļauts atkrāsošanai un nevēlamo piemaisījumu noņemšanai ar aktivēto ogli, nemitīgi intensīvi maisot uz magnētiskā maisītāja ar ātrumu 700 apgr./min un 30, 0 ± 1 , 0 °C 60 minūtes. Pēc tam maisījumu centrifugē ar ātrumu 10 280 $\times g$ 10 minūtes 20, 0 ± 1 , 0 °C temperatūrā Hermle Z 36 HK centrifūgā (Hermle Labortechnik, GmbH, Wehingen, Vācija). Virsējais organiskais slānis dekantēts un filtrēts caur

0,20 µm politetrafluoretilēna (H-PTFE) hidrofilizēto membrānas filtru (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Vācija). Katjonu apmaiņas sveķu (kolonnas tilpums 12,0 ml), kas piepildīti ar 2,2 mg DIAION™ UBK550, kondicionēšana/līdzsvarošana tiek veikta, izmantojot 24,0 ml buferšķīduma A šķīduma ar plūsmas ātrumu 1,0 ml min⁻¹ zem spiediena $-1,0 \pm 0,1$ "Hg, izmantojot 12 portu Chromabond cietfāzes ekstrakcijas (CFE) vakuuma manifoldu (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren Vācija), kas savienots ar N 820 LABOPORT vakuumsūkni (KNF Neuberger AB, Stokholma, Zviedrija). Uznestais paraugs tiek skalots ar 24,0 ml H₂O un caurplūdes frakcija (angl. *flow-through fraction*) savākta SA klātbūtnes noteikšanai. SA desorbijai no katjonu apmaiņas sveķiem izmantots 24,0 ml buferšķīdums B. Savāktā eluāta frakcija tiek ietvaicēta, izmantojot "Laborota 4002" rotācijas vākuma ietvaicētāju (Heidolph, Švābija, Vācija) $40 \pm 1, 0^\circ \text{C}$ un $60, 0 \pm 2, 0 \text{ mBar}$. Iegūtie sausie atlikumi turēti $-18,0 \pm 1,0^\circ \text{C}$ temperatūrā līdz turpmākai analīzei un lietošanai, maksimāli 24 stundas.

HPLC-ESI-TQ-MS/MS analītiskie nosacījumi dzintarskābes analīzei

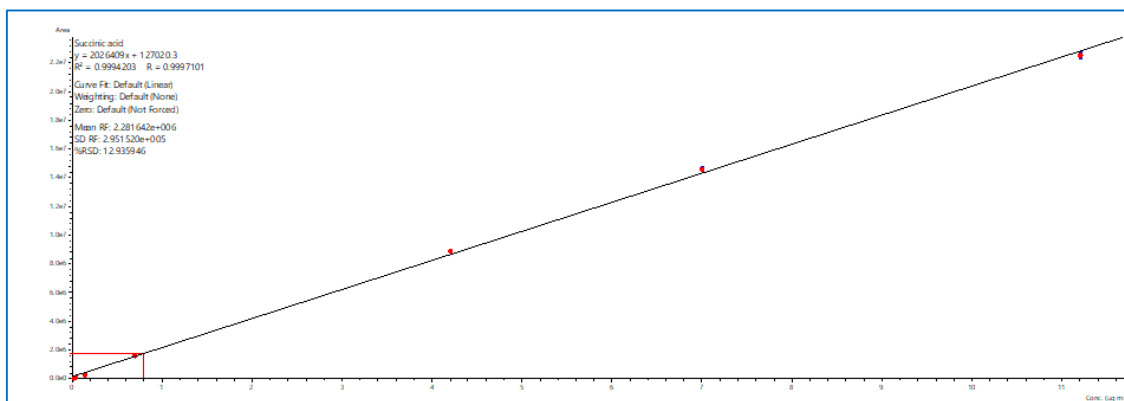
Dzintarskābes hromatogrāfiskā analīze veikta ar Shimadzu Nexera UC sērijas superkritiskā šķīduma ekstrakcijas–superkritiskās šķīduma hromatogrāfijas–šķīduma hromatogrāfijas (SFE-SFC-LC) sistēmu (Shimadzu Corporation, Tokija, Japāna), tandēmā ar trīskāršā kvadrupola maselektīvo detektoru (TQ-MS-8050, Shimadzu korporācija, Tokija, Japāna), aprīkotu ar elektroizsmidzināšanas jonizāciju (ESI).

Apraksts: 3,0 µL paraugs ievadīts apgrieztās fāzes Shim-pack UC-RP kolonnā (5,0 µm, 250 × 4,6 mm; Tokija, Japāna), kas darbojas $45,0^\circ \text{C}$ temperatūrā un kustīgas fāzes ātrumu 1,0 ml min⁻¹. Izmantotās kustīgās fāzes ir paskābināts H₂O (1,0 % HCOOH v/v) (A) un paskābināts MeOH (1,0 % HCOOH v/v) (B) izokrātiskā režīmā. MeOH injekcijas iekļautas pēc katra parauga kā tukšais tests, lai izvairītos no pārnesanas efekta (angl. *carry-over effect*). Dati iegūti, izmantojot LabSolutions Insight LC-MS versiju 3.7 SP3 (darbstacija) (Shimadzu Corporation, Tokija, Japāna), kas izmantota arī instrumentu kontrolei un apstrādei. Šajā protokolā izmantota jonizācija negatīvās jonu polaritātes režīmā, savukārt dati vākti profila un centroīda režīmos ar datu uzglabāšanas sliekšni 5000 absorbcijas MS. Maselektīvā detektora darbības apstākļi ir šādi: detektora spriegums 1,98 kV, pārveidošanas dinoda spriegums 10,0 kV, interfeisa spriegums 3,0 kV, interfeisa temperatūra 300°C , desolvatācijas līnijas temperatūra 250°C , siltumbloka temperatūra 400°C , smidzināšanas gāze – argons (Ar, tīrība 99,9%) ar plūsmas ātrumu 3,0 L min⁻¹, sildgāze – oglekļa dioksīds (CO₂, tīrība 99,0%) ar plūsmas ātrumu 10,0 L min⁻¹ un žāvēšanas gāze – slāpeklis (N₂, atdalīts no gaisa, izmantojot slāpekļa ģeneratoru "Peak Scientific Instruments Ltd." (Inchinan, Skotija, Lielbritānija), tīrība 99,0%) ar plūsmas ātrumu 10,0 L min⁻¹. SA veikta, izmantojot jonu pāreju monitoringa režīmu (angl. *multiple reaction monitoring* – *MRM*) iepriekš veicot LC-MS sistēmas optimizēšanu.

Standarta izejas šķīduma sagatavošana

Izejas šķīdums, kas satur 1.4 mg SA, pagatavots 10,0 ml 100% paskābinātā MeOH šķīdumā (MeOH:HCOOH attiecība 99:1 v/v). SA kvantitatīvā noteikšana veikta, injicējot 3,0 µL 10°C temperatūrā kalibrēšanas šķīduma diapazonā no 0,0175 līdz 11,2000 µg ml⁻¹ (1. attēls). Noteikts

regresijas koeficients, detektēšanas robežvērtība (LOD) un kvantificēšanas robežvērtība (LOQ). Darba šķīdums sagatavots tieši pirms lietošanas.



1. attēls. Analītiskā standarta kalibrēšanas līkne, ko izmanto dzintarskābes noteikšanai krūmcidoniju sulas paraugā

Izmantotā literatūra

- Benedict DJ, Parulekar SJ, Tsai SP. Pervaporation-assisted esterification of lactic and succinic acids with downstream ester recovery. *J Memb Sci.* 2006;281(1–2):435–45.
- Xiao Y, Zhang Z, Wang Y, Gao B, Chang J, Zhu D. Two-Stage Crystallization Combining Direct Succinimide Synthesis for the Recovery of Succinic Acid From Fermentation Broth. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;7(January).
- Cukier C, Lea PJ, Cañas R, Marmagne A, Limami AM, Hirel B. Labeling Maize (*Zea mays* L.) Leaves with ^{15}N and Monitoring Nitrogen Incorporation into Amino Acids by GC/MS Analysis. *Curr Protoc plant Biol.* 2018;3(3):e20073.

R2.5. Noteikti leizejas lapu pulvera kvalitatīvie rādītāji sagatavošanas un uzglabāšanas laikā, aprakstīts ražošanas process (TRL4).

Ievads

Leizeja (*Rhaponticum carthamoides*) ir asteru dzimtas daudzgadīgs augs, 50–80 centimetru, bet dažkārt pat pusotra līdz divus metrus augsts (2.5.1. att.). Tai ir spēcīgi attīstīti horizontāli sakneņi un dadžiem līdzīgi violeti ziedi. Leizeja ir endēmisks augs (sastopama tikai noteiktā, ierobežotā ģeogrāfiskā apgabalā), kas savvaļā aug Sibīrijas, Vidusāzijas, Mongolijas un Ķīnas kalnos apmēram 3000 metru virs jūras līmeņa, galvenās audzes atrodams Sajānu un Altaja kalnos. Leizejas izplatību veicinājuši cilvēki – pārceļoties uz jaunām teritorijām, viņi ņēma līdzī arī leizeju sēklas. 10. –11. gadsimtā leizeju sāka audzēt Eiropas aptieku dārzos. Savā evolūcijas procesā leizeja pielāgojusies ekstremāliem dzīves apstākļiem, kas atsaucās uz to ķīmisko sastāvu. Īpaši sakneņu bioloģiski aktīvo savienojumu saturs ir plašs: fitoekdizoni, sterīni, glikozīdi, flavonoīdi, tanīni, ēteriskās eļļas, sveķi, tauki, vaski, karotinoīdi un askorbīnskābe. Viens no svarīgākajiem savienojumiem (kopā ar citiem fitoekdizoniem) ir ekdisterons, kam ir leizejas preparātu galvenā raksturīgā iedarbība. Pētījumi norāda, ka auga virszemes daļas (ziedkopas, stublāji, lapas) satur no 0,26 līdz 0,57% ekdisterona (no absolūti sausu izejvielu masas), savukārt kultivēto augu virszemes daļās ir attiecīgi 0,35-1,22%, bet augļos līdz pat 1,51% ekdisterona. Šī steroīdu grupa, kas sastopama leizejā, ir ļoti plaša un 10–100 000 reizu pārsniedz šo vielu koncentrāciju citos augos.



2.5.1. att. Saflora leizeja (*Rhaponticum carthamoides*) jeb maralsakne ZS „Kurmīši”.

Sibīrijas tautas medicīnā Saflora leizeja ir zināma kā augs, kas “paceļ cilvēku no četrpadsmit slimībām un piepilda viņu ar jaunību”. Ir pat pieņēmums, ka pulveris no leizejas palīdzēja ķīniešiem veikt jūras ceļojumu apkārt pasaulei, apsteidzot Kolumbu par tūkstoš gadiem. Tibetā, Senajā Ķīnā un Mongolijā izmantoja leizejas spēku no seniem laikiem kā tonizējošu līdzekli pie pārpūles, kā arī kopēja noguruma mazināšanai pēc saslimšanām. Lietojot leizeju, slimniekiem uzlabojas pašsajūta, apetīte un miegs. Leizejas sakneņu iedarbība līdzinās žeņšeņa efektam, un to novārījumus plaši lieto Sibīrijas tautas medicīnā. Iedzīvotājiem sen bija zināms, ka maralbieži, govīs un zirgi meklē šo augu un pastiprināti to ēd. Sibīrijas ilgdzīvotāji 19. gadsimtā pamanīja leizejas pozitīvo ietekmi arī uz cilvēka organismu, secinot, ka sakneņu novārījums un to spirta

uzlējums ir apveltīti ar labu tonizējošu iedarbību. Tie noņem fizisko un garīgo nogurumu, renovē možumu, paaugstina apetīti, ievērojami pastiprina darbības un uzlabo kopēju pašsajūtu. Klīniski pētījumi norāda, ka leizejas preparāti stimulē centrālās nervu sistēmas darbību, un īpaši galvas smadzeņu garozu, paaugstina izturību pie fiziskas slodzes, pazemina noguruma izjūtas, paaugstina asinsspiedienu, palēnina sirds ritmu un palielina pulsācijas amplitūdu, paplašina perifēros asinsvadus un palielina asinsrites ātrumu. Šis arī bija iemesls, kādēļ leizeju un tās preparātus plaši sāka izmantot Padomju Savienībā sportistu uzvaru kaldināšanai. Pagājušā gadsimta 70.–90. gados olimpiskie panākumi profesionālajā sportā bija saistīti ar noslēpumu – no leizejas iegūtā ekdistēna, ekdisterona, saknes ekstraktu un smalki samalta pulvera izmantošanu. Lietojot auga preparātus, uzlabojās ekstrakcijas sportistu ātruma–spēka īpašības, izturība, garīgā stabilitāte un atguvšanās pēc lielā sporta ekstrēmām un nogurdinošām slodzēm. Leizejas preparāti bija oficiāli iekļauti PSRS Valsts farmakopejas izdevumos, vēlāk arī Krievijas Federācijas Valsts farmakopejā, kā arī Valsts zāļu reģistrā. Preparātu augsto efektivitāti pamatoja ar vairāk nekā 50 gadu ilgu pārbaužu rezultātiem, kas tikušas veiktas daudzās zinātniskās organizācijās un medicīnas klīnikās. Leizeja nepieder toksisko vai indīgo sugu grupai, un šī auga zaļo masu droši var lietot uzturā gan cilvēki, gan dzīvnieki un putni. Auga tonizējošās īpašības izmantotas pārtikas produktu – atspirdzinošo dzērienu «Sajāni» un «Baikāls», kā arī dažādu balzamu (“Gorno-Altajskij”, “Sibirijs” u.c.) ražošanā. Mūsdienu literatūrā nav atrasta informācija par alkaloīdu, triterpēnu saponīnu, citu spēcīgu, narkotisku vai indīgu vielu uzkrāšanos, arī ilgstoši lietojot leizeju. Kopš 2020. gada ekdisterons ir iekļauts Pasaules Antidopinga aģentūras uzraudzības programmā. Saskaņā ar dažādiem pētījumiem ar zīdītājiem ekdisteronam ir daudz dažādu farmakoloģisku efektu: tostarp anabolisks, pretdiabēta, pretiekaisuma, kardioprotektīvs un hipolipidēmisks. Ir pierādīts, ka *R. carthamoides* sakņu un/vai lapu ekstraktiem piemīt potenciāla pretvēža aktivitāte (sakņu ekstraktam) (Skala et al., 2016), trombocītu agregācijas kavēšana (lapu ekstraktam, galvenokārt flavonoīdiem) (Koleckar et al., 2008), pretmikrobu iedarbība (sakņu ēteriskai eļļai) (Havlik et al., 2009), un antioksidanta aktivitāte (lapu ekstraktam) (Miliauskas et al., 2005; Biskup et al., 2013; Biskup et al., 2009). **Latvijā leizeju vairāk nekā 15 gadus audzē zemnieku saimniecībā “Kurmīši”. Saimniecības ražoto produktu klāstā ir arī leizejas saknes (<https://www.kurmisi.com/veikals/item/seklas-saknes/leizejas-saknes/>), tādēļ ir interese par bioloģiski aktīviem savienojumiem un raksturīgās aktīvās vielas (20-hidroksiekdizona) saturu tieši tajās.**

Materiāli un metodes

1. Sakņu paraugu ekstrakcija

Sausās leizejas saknes paraugiem no Latvijas, zemnieku saimniecības “Kurmīši” (ražas gads: 2019. un 2020.) un Krievijas (ražas gads: 2019) tika samaltas ar maisītāja dzirnavām (lodīšu dzirnavas MM 400, Retsch, Vācija), izmantojot skrūvējamās 50 ml malšanas kapsulas no nerūsējošā tērauda, malšanas ilgums 30 s ar frekvenci 30 Hz. Ekstrakcijai pārbaudīti vairāki šķīdinātāji (etanols, metanols, acetons, 70% etanols, 70% acetons, 80% metanols un ūdens). Bioaktīvo savienojumu ekstrakcijai izmantota ultraskaņas metode tās augstākās efektivitātes dēļ. Īss metodes apraksts: 0,1 g maltu sakņu vai lapu ievieto 15 ml mēģenē, papildina ar 10 ml šķīdinātāja, 1 minūti maisa uz Vortex REAX virsmas (Heidolph, Schwabach, Vācija) un 15

minūtes pakļauj ultraskaņas apstrādei Sonorex RK 510 H ultraskaņas vannā (Bandelin electronic, Berlīne, Vācija) ar termostatu 60 °C temperatūrā. Pēc ultraskaņas vannas paraugus centrifugē 5 minūtes ar ātrumu $10\,000 \times g$, izmantojot Centrifuge 5804 R (Eppendorfa, Hamburga, Vācija). Ūdens ekstraktiem pārbaudīti atšķirīgi apstrādes veidi: 1) maisīšana 1 minūti un 2) karsēšana mikroviļņu krāsnī (M735R Samsung, 800W) 30 sekundes. Filtrētie paraugi caur PTFE šļirces filtru (25 mm, 0,2 µm, AlChem, Čehija) tieši ievadīti šķidruma hromatogrāfijas (LC) vai superkritiskās šķidruma hromatogrāfijas (SFC) sistēmā.

Noteikšana

LC (šķidruma hromatogrāfijas) metodes kļūst veiksmīgākas nekā SFC (superkritiskā šķidruma hromatogrāfija) ekdisteroīdu, galvenokārt 20-hidroksiekdizona, atdalīšanā no citiem *R. carthamoides* saknēs esošajiem savienojumiem. No vairākām pārbaudītajām hromatogrāfijas kolonnām Kinetex C18 (250 × 4,6 mm) ar 5 µm lielām kodola apvalka daļiņām bija visveiksmīgākā savienojumu atdalīšanā. Bioaktīvos savienojumus noteica ar DAD (Diode-Array Detection) detektoru viļņu garuma diapazonā no 200 līdz 600 nm. Savienojumi identificēti, pamatojoties uz literatūru (Głazowska et al., 2018; Skala et al., 2019; Kokoska, L., and Janovska, 2009; Skala et al., 2015), savukārt iegūtās vērtības aprēķinātas, izmantojot hlorogēnskābei un katehīnam veidotās kalibrēšanas līknes.

2. Lapu ķīmiskā sastāva noteikšana

Leizejas lapu paraugiem (ZS “Kurmīši” ievāktas 2021. jūnijā) veiktas ķīmiskā sastāva analīzes saskaņā ar zinātniskā literatūrā norādītām metodēm (2.5.1. tabula).

2.5.1.tabula. **Ķīmisko analīžu metodes**

Nr.p.k.	Ķīmiskie rādītāji	Noteikšanas metode	Literatūra
1	Kopējais fenolu saturs	Spektrofometrija	Singleton et al., 1999
2	Kopējais flavonoīdu saturs	Spektrofometrija	Mathur and Vijayvergia, 2017
2	Kopējais tanīnu saturs	Spektrofometrija	Paver et.al 2010
3	Antiradikālā aktivitāte (DPPH')	Spektrofometrija	Brand-Williams et al. 1995
4	Kopējais hlorofils	Spektrofometrija	Dere et al., 1998
5	20-hidroksiekdizons	Hromatogrāfija	Saskaņā ar sakņu paraugu analīžu aprakstu

3. Leizejas auga daļu (sakņu un lapu) paraugi



2.5.2. attēls. Leizejas lapu un sakņu paraugi no Krievijas.

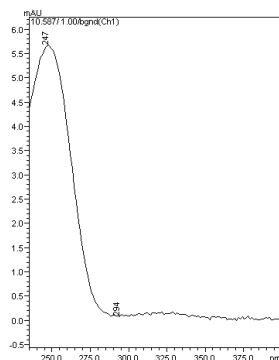


2.5.3. attēls. Leizejas lapu pulveris (ZS “Kurmīši”).

Rezultāti

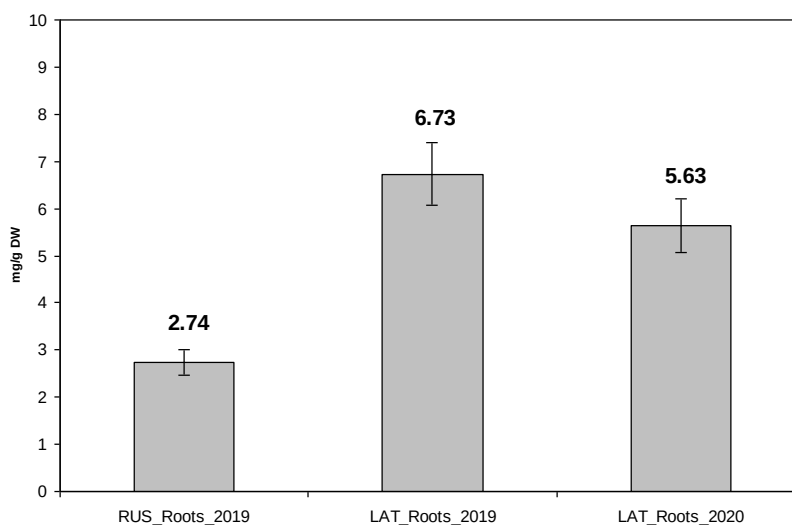
Leizejas saknes

Ekstraktos, kas iegūti no *R. carthamoides* saknēm, 20-hidroksiekdizons konstatēts kā vienīgā ekdisteroīdiem piederošā molekula (2.5.4. att.).



2.5.4. attēls. Noteiktā 20-hidroksiekdizona UV spektri *R. carthamoides* saknēs.

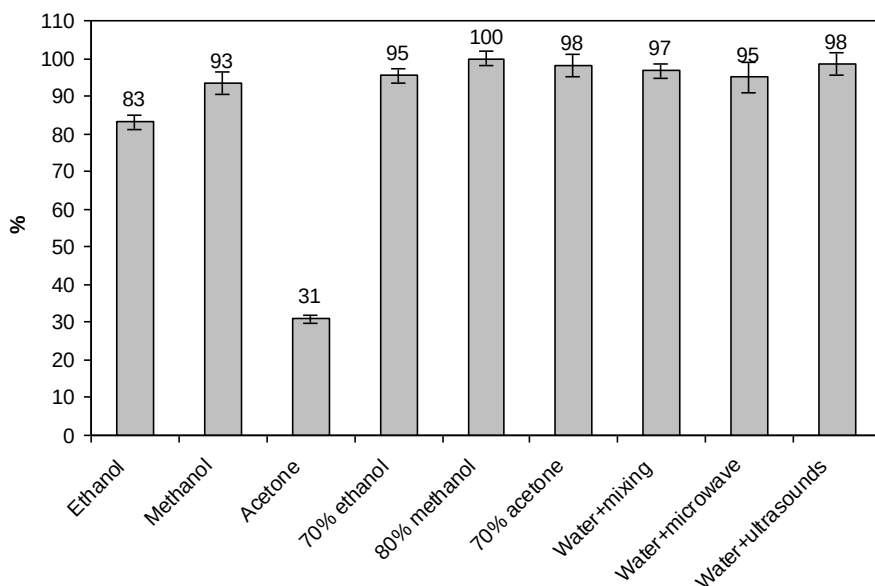
20-hidroksiekdizona saturs *R. carthamoides* saknēs, kas iegūtas no Latvijā (2019. un 2020. gadā) un Krievijā audzētiem augiem, bija 2,74–6,73 mg/g DW robežās. Iegūtā koncentrācija, īpaši Latvijā audzētos augos, saskan ar Polijā veiktiem pētījumiem par 20-hidroksiekdizona saturu *R. carthamoides* saknēs (Skała et al., 2015). Aktīvā savienojuma koncentrācija *R. carthamoides* saknēs, kas iegūta no Latvijā audzētiem augiem, abos gados (2019. un 2020. gadā) bija vairāk nekā divas reizes lielāka nekā Krievijā audzētajos augos (2.5.5. att.). Iegūtās atšķirības var rasties vairāku agronomisku un ģenētisku faktoru ietekmē, kā arī pārstrādes rezultātā – žāvēšanas metode, temperatūra, laiks vai piekļuve gaisam un saulei var būtiski ietekmēt rezultātus. Nevienu no šiem faktoriem nevar izslēgt kā ietekmējošu.



2.5.5. attēls. 20-hidroksiekdizona satura (mg/g DW) salīdzinājums no Krievijas un Latvijas iegūtajās *R. carthamoides* saknēs.

Efektivitāte

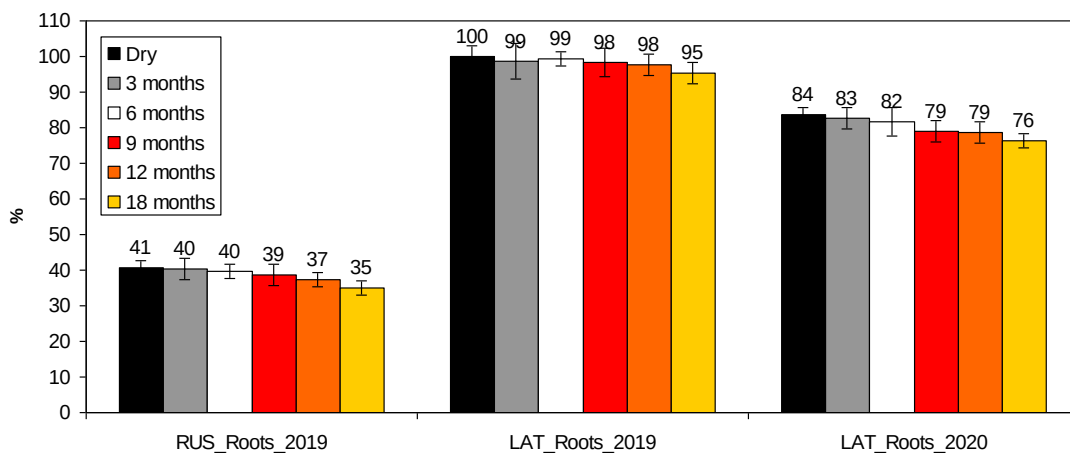
Visefektīvākais šķīdinātājs bija 80% metanola šķīdums, tomēr vairākiem šķīdinātājiem ir ļoti līdzīga 20-hidroksiekdizona ekstrahējamība (2.5.6. att.). Pozitīvi jāuzsver ekstrakta ieguves ar ūdeni efektivitāte. Tā kā ūdens ir visvairāk izmantotais šķīdinātājs uzlējumu (ekstraktu) pagatavošanai, tā ir ļoti vērtīga informācija potenciālajiem klientiem. Mikroviļņu un ultraskaņas izmantošana neuzlaboja 20-hidroksiekdizona ekstrahējamību, rezultātu atšķirība bija statistiski nenozīmīga.



2.5.6. attēls. 20-hidroksiekdizona ekstrakcijas efektivitāte no *R. carthamoides* saknēm.

Stabilitāte uzglabāšanas laikā

Neatkarīgi no pārbaudītā parauga (gads, izcelsmes vieta (Latvija vai Krievija)) 20-hidroksiekdizonam *R. carthamoides* saknēs bija raksturīga laba stabilitāte, lai gan paraugi uzglabāti 21 ± 2 °C pulvera veidā slēgtā mēģenē. Vidēji 20-hidroksiekdizona saturs pulverveida *R. carthamoides* saknēs 18 mēnešu laikā samazinājās par 10% (2.5.7. att.).



2.5.7. attēls. 20-hidroksiekdizona stabilitāte *R. carthamoides* saknēs uzglabāšanas laikā.

Lapas

Leizejas sausās lapu drogas ķīmiskā sastāva rādītāji apkopoti 2.5.2. tabulā. Leizejas lapu pulvera ražošanas procesa apraksts norādīts R2.5.1. pielikumā.

2.5.2. tabula. **Leizejas lapu ķīmiskais sastāvs**

Rādītāji	Daudzums*	
	Vidējais	STDEV
Tanīnu saturs, katehīna ekv.mg/g	13.8	0.0
Flavonoīdu saturs, mg Katenīna ekv./g	19.9	0.1
Kopējais fenolu saturs, mg Gal. sk.ekv/g	48.8	1.15
Hlorofils a µg/g	41.5	2.9
Hlorofils b µg/g	27.7	7.7
AOA(DPPH), mili M TE ekv./g	135.6	25.8
AOA(FRAP), mg FeSo4 ekv./g	225.7	19.5
AOA(FRAP), miliM TE ekv./g	15.2	1.3
20-hidroksiekdizons	2.5	0.1

* rādītāju daudzums izteikts uz drogas sausu vienā gramā

Leizejas lapu drogās kopējo fenolu saturs ir 48.8 mg Gal. sk.ekv/g. Salīdzinājumam Vergun et al., (2019) analizējot fenolu savienojumus leizejas drogās (kā šķīdinātāju izmantojot acetonu), noteica, ka kopējo fenolu saturs ir 32.43 GAE/g (DW), flavonoīdu saturs 10.16 mg QE/g (DW), antioksidantu aktivitāte DPPH 9.0 mg TE/g (DW).

Secinājumi

- 1) Aktīvā savienojuma 20-hidroksiekdizona saturs *R. carthamoides* saknēs, kas iegūtas no Latvijā (2019. un 2020. gadā) audzētiem augiem, bija robežās no 5.63 līdz 6,73 mg/g sausas. Salīdzinājumā paraugā no Krievijas aktīvā savienojuma saturs sakņu paraugā bija vidēji divas reizes mazāks. Tomēr ņemot vērā, ka nebija iespējams iegūt detalizētu informāciju par paraugu (īpaši ievākšanas gadu, sagatavošanas apstākļus un uzglabāšanu), objektīvus secinājumus izdarīt ir sarežģīti. Turklāt 20-hidroksiekdizona koncentrācija *R. carthamoides* saknēs katru gadu var būtiski atšķirties arī atkarībā no augšanas vietas.
- 2) Aktīvā savienojuma saturs visos sakņu paraugos 18 mēnešu laikā samazinājās tikai par vidēji 10%.
- 3) Tikai ūdens kā ekstrakta lietošana ļāva ļoti efektīvi atgūt (97%) bioaktīvā savienojuma 20-hidroksiekdizonu saturu paraugā.
- 4) Leizejas lapas satur kopējos fenolus 48.8 mg Gal. sk.ekv/g, a hlorofilu 41.5 µg/g. Lapu droga uzrādīja antioksidatīvās īpašības, ar DPPH radikāli 135.6 mili M TE ekv./g un ar FRAP 225.7 mg FeSo4 ekv./g.
- 5) Aktīvā savienojuma 20-hidroksiekdizona saturs Latvijā audzētā auga *R. carthamoides* lapās bija vidēji 2.5 mg/g sausas. Saskaņā ar literatūru svarīgs aktīvās vielas ietekmējošais faktors ir lapu ievākšanas laiks.
- 6) Veiktie un iegūtie pētījumu rezultāti, aprakstītais leizejas lapu pulvera ražošanas process norāda, ka ir sasniegts tehnoloģiju gatavības līmenis TRL4 - Tehnoloģijas validācija laboratorijas vidē: veikta galveno tehnoloģisko komponentu integrācija, lai pārbaudīto to kopdarbību laboratorijas vidē.

Diemžēl neparedzētie notikumi pasaulē (Covid 19 pandēmija un karš Ukrainā) kavēja plānoto pētījumu pilnvērtīgu pabeigšanu, jo nebija iespējams saņemt atkārtotus augu paraugus no Krievijas.

Literatūra

- Skala, E., et al., Inhibition of human glioma cell proliferation by altered Bax/Bcl-2-p53 expression and apoptosis induction by *Rhaponticum carthamoides* extracts from transformed and normal roots. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016, 68, 1454–1464, DOI:10.1111/jphp.12619.
- Koleckar, V. et al., In vitro antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug and Chemical Toxicology*, 2008, 31, 27–35, DOI:10.1080/01480540701688444.
- Havlik, J., et al., Norsesquiterpene hydrocarbon, chemical composition and antimicrobial activity of *Rhaponticum carthamoides* root essential oil. *Phytochemistry*, 2009, 70, 414–418, DOI:10.1016/j.phytochem.2008.12.018.
- Miliauskas, G., et al., Identification of radical scavenging compounds in *Rhaponticum carthamoides* by means of LC-DAD-SPE-NMR. *Journal of Natural Products*, 2005, 68, 168–172, DOI:10.1021/np0496901.
- Biskup, E., et al., Composition and biological activity of *Rhaponticum carthamoides* extracts obtained from plants collected in Poland and Russia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2013, 7, 687–695, DOI:10.5897/JMPR012.1061.
- Biskup, E., and Lojkowska, E., Evaluation of biological activities of *Rhaponticum carthamoides* extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2009, 3, 1092–1098.
- Głazowska, J., et al., Chromatographic separation, determination and identification of ecdysteroids: Focus on Maral root (*Rhaponticum carthamoides*, *Leuzea carthamoides*). *Journal of Separation Science*, 2018, 41, 4241–4402, DOI:10.1002/jssc.201800506.
- Skala, E., et al., An efficient plant regeneration from *Rhaponticum carthamoides* transformed roots, enhanced caffeoylquinic acid derivatives production in pRi-transformed plants and their biological activity. *Industrial Crops and Products*, 2019, 129, 327–338, DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.12.020.
- Kokoska, L., and Janovska, D., Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: A review. *Phytochemistry*, 2009, 70, 842–855, DOI:10.1016/j.phytochem.2009.04.008.
- Skala, E., et al., Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *BioMed Research International*, 2015, 181098, DOI:10.1155/2015/181098.
- Schmid K., Höhn H., Graf B., Höpli H. (2001). Phänologische Entwicklungsstadien der Himbeere (*Rubus idaeus* L.). *Agrarforschung* 8 (5), 215–222.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152–178.
- Paaver, U., Matto, V. and Raal A. (2010) Total tannin content in distinct *Quercus robur* L. Galls. *AJ Medical plants research* Vol.4(8), pp. 702–705. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.091>.
- Mathur, R., & Vijayvergia, R. (2017). Determination of total flavonoid and phenol content in *Mimusops Elengi* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(12), 5282–5285. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8\(12\).5282-85](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8(12).5282-85).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. u.-Technol.*, 28, 25–30.
- Dere, Şükran, Tohit GÜNEŞ RS. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Doga, Turkish J Bot.* 1998; 22(1):13–8.
- Vergun, O. M., Rakhmetov, D. B., Shymanska, O. V., Fishchenko, V. ., Ivanisova, E., & Brindza, J. (2019). Leaves extracts of selected crops. *Plant Introduction*, 4, 82–88.

R2.5.1. PIELIKUMS

UZŅĒMUMS	LAD projekts Nr. 19-00-A01612-000006	Izstrādāja: (vārds, uzvārds)
	LEIZEJAS LAPU PULVERA RAŽOŠANAS PROCESA APRAKSTS	Apstiprina: (vārds, uzvārds)

Apraksts leizejas (*Rhaponticum carthamoides*) lapu ievākšanai, kaltēšanai, iepakojšanai, uzglabāšanai, kvalitatīvo rādītāju noteikšanai, lai īstenotu projektā “Biotehnoloģiju kompetences attīstība augstvērtīgu dārzkopības produktu ieguvei” izvirzītos uzdevumus.

Ievērojot šo kaltēto augu ražošanas procesa aprakstu, uzņēmums garantē, ka leizejas (*Rhaponticum carthamoides*) kaltēto lapu pulveris:

- ir derīgs patēriņam cilvēka uzturā;
- augi ir audzēti un ražoti higiēniskos apstākļos, samazinot mikrobioloģiskā piesārņojuma risku un nepieļaujot kaitīgo mikroorganismu veidošanos;
- ir audzēti, ievākti un ražoti ar bioloģiskām metodēm, saskaņā ar LV un Eiropas Padomes normatīvajos aktos norādītām prasībām.

2. KALTĒŠANA

- Leizejas lapas ievāc sausā laikā;
- Ievāktās lapas pēc iespējas ātrāk nogādā uz kaltēšanas vietu, kur veic žāvējamā materiāla vizuālo pārbaudi, šķirošanu, aizvācot sadzeltējušās, mehāniski bojātās lapas vai to daļas, pārkoksnētos kātus, citu augu piejaukumus (ja tādi ir);
- Pirms apstrādes lapas novieto vietās, kas ir aizsargātas no tiešu saules staru ietekmes;
- Pārliecinās, ka kaltēšanas statīvi vai plaukti ir tīri un sausi, bez citu augu daļu daļām;
- Lapas kaltē uz sietiem, vai auduma rāmjiem piemērotā aprīkojumā ar mākslīgo ventilāciju;
- Lai iegūtu kvalitatīvus produktus, nodrošina temperatūru ne augstāku kā 40 °C.
- Produkcijas gatavību nosaka vizuāli un ar tausti, lapām ir jālūst. Mitruma saturam jābūt 8-11% robežās.
- Atkritumus (t.i., nederīgas lapas) savāc un ievieto marķētos atkritumu konteineros vai tvertnēs, kurus regulāri iztukšo un tīra.
- Lai nodrošinātu kaltēto produktu aizsardzību pret potenciālā piesārņojuma avotiem, piemēram, kaitēkļiem, mājdzīvniekiem un lieku mitruma uzņemšanu, tos pēc iespējas ātrāk iepako.

3. PULVERA SAGATAVOŠANA

- Saskaņā ar plānoto produkcijas veidu kaltētās lapas samal pulverī, izmantojot piemērotas dzirnavas.
- Malšanas laikā veidojušos putekļu aizsardzībai ieteicams lietot personīgos aizsardzības līdzekļus – sejas maskas.
- Lapu pulverim ir jābūt tuvu attiecīgā auga dabiskajai krāsai. Melni un brūni žāvējumi ir likvidējami.
- Nepieciešamības gadījumā produktu sijā vai vēlreiz smalcina.

4. IEPAKOŠANA UN MARĶĒŠANA

- Kaltētos produktus iepako tīros maisos vai kastēs ilgākai uzglabāšanai, vēlams nodrošināt hermētiskumu pulvera kvalitātes saglabāšanai.
- Tūlītējai tirdzniecībai lapu pulveri iepako paredzētos daudzumos atbilstošā iepakojumā.
- Iepakojumam jānodrošina produkta kvalitātes rādītāju un īpašību saglabāšana. Iepakojumam jāatbilst MK Noteikumu Nr.808 “Noteikumi par materiāliem un izstrādājumiem, kas paredzēti saskarei ar pārtiku” prasībām..

Marķēšana.

- Katru produkta taras vienību marķē ar **etiķeti**.
- Marķējumam jāatbilst aktuālo normatīvo aktu prasībām.
- Marķējumam jābūt neizdzēšamam, viegli salasāmam un saskatāmam.
- Etiķetei jābūt tīrai, bez poligrāfiskiem defektiem, bez krokām.
- Etiķetei vai marķējumam jābūt izturīgam pret ārējās vides ietekmi.

Marķējumā – etiķetē jāuzrāda šāda informācija:

- produkta nosaukums un (vai) preču zīme;
- ražotāja nosaukums vai ražotāja zīme (logo), juridiskā adrese, telefona numurs un mājas lapas adrese;
- neto masa vai tilpums;
- produkta sastāvdaļu saraksts atbilstoši Latvijas Republikas spēkā esošajai likumdošanai;
- būtiskās piezīmes;
- rekomendētā uzglabāšanas temperatūra no +0 °C līdz +25 °C;
- izcelsmes valsts;
- derīguma garantijas termiņš ar vārdiem “**Ieteicams līdz**”, datums identificē partiju.

5. KALTĒTO PRODUKTU UZGLABĀŠANA

- Iepakotos kaltētos produktus uzglabā sausās, labi vēdināmās telpās, tā novēršot pelējumu veidošanos vai nevēlamus produktu oksidācijas un fermentācijas procesus.
- Iepakotos produktus uzglabā telpās, kas ir aizsargātas no kaitēkļiem un mājdzīvniekiem.
- Ja logi ir atverami, tad tos aprīko ar aizsargsietiem.

- Lai nodrošinātu atbilstošu kaltēto produktu uzglabāšanu, ieteicamas piemērotas telpas ar viegli uzkopjamām telpu grīdām.
- Produktiem jābūt novietotiem uz paletēm un noteiktā attālumā no sienām, nodrošinot brīvu gaisa cirkulāciju.

6. LEIZEJAS LAPU PULVERA KVALITATĪVIE RĀDĪTĀJI

Produktu **organoleptiskajām, fizikāli – ķīmiskajām, mikrobioloģiskām īpašībām** jāatbilst rādītājiem, kas noteikti tabulā.

Rādītāja nosaukums	Leizejas lapu pulveris	Pārbaudes metode*
1.Izskats	Viendabīgi malts pulveris bez izteiktām auga lapu vai kātu daļām	Pēc TN 5.1. punkta
2.Aromāts	Viegls, patīkams kaltētu augu aromāts	Pēc TN 5.1. punkta
3.Krāsa	Gaiši zaļa, botāniskajam sugas raksturojumam atbilstošā krāsā	Pēc TN 5.1. punkta
4.Mitruma saturs %	8-11%	Pēc TN 5.2. punkta
5. Mikrobioloģiskie rādītāji: <i>Pelējuma sēnītes un raugu šūnas (KVV/1g produkta)</i>	≤ 500 KVV/1 g	Nosaka akreditēta laboratorija

*pārbaudes metodes

6.1.Produkta izskatu un krāsu nosaka vizuāli, apskatot pārbaudāmo paraugu izkliedētā dienas gaismā. Aromātu pārbauda organoleptiski.

6.2. Mitruma saturs (%).

Nosaka, izmantojot aprīkojumu - Neautomātiskie svāri (I un II klase)/Mitruma analizators /Kern MLS 50-3

7. KVALITĀTES GARANTIJAS

- Produkta kvalitāti apliecina uzņēmuma pārstrādes vadītājs.
- Visos kaltēto produktu aprites posmos (ievākšana, apstrāde, iepakojšana un uzglabāšana) uzņēmumā tiek nodrošinātas obligātās nepieciešamās higiēnas prasības, saskaņā ar ieviesto paškontroles sistēmu.
- Izgatavotājs garantē produkcijas atbilstību šī apraksta prasībām, ja patērētājs ievēro šajos noteikumos uzrādītos uzglabāšanas noteikumus.

3. aktivitāte

R3.1. Sagatavoti un publicēti 4 populārzinātniskie raksti par projekta tēmām

Sagatavoti pieci populārzinātniski raksti un divi zinātniskie raksts.

Populārzinātniski raksti:

- 1) “Kallas” Dārzs un Drava, Vasara 2022 (Līva Purmale)
- 2) “Leizeja” Dārzs un Drava, Ziema 2022 (Daliņa Segliņa, Ivars Geiba)
- 3) “Smiltsērķšķi un to vērtīgā eļļa” Dārzs un Drava, Vasara 2023 (Daliņa Segliņa, Inta Krasnova, Natalja Mažarova, Ivs Valdzers)
- 4) ”Saflora leizeja” - <https://www.botanika.lu.lv/par-mums/101-gads/seklas/saflora-leizeja/> (Signe Tomsone)
- 5) “Прореживаете малину? Не выбрасывайте листья!” 10. jūnijs 2022, Mēs kopā – Latvija (Daliņa Segliņa)

<https://www.mklat.lv/zhizn/1862-prorezhivaete-malinu-ne-vybrasyvajte-listya.html>

Zinātniskie raksti:

- 1) Purmale, L., Korica, A. and Joffe, R. (2023). First accounts of Zantedeschia sp. Dasheen and Konjac mosaic virus detection in Latvia. Acta Hort. 1359, 173-178
DOI: 10.17660/ActaHortic.2023.1359.21 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1359.21>
- 2) Sagatavota zinātniskā publikācija “A succinic acid-rich fraction recovered from the juice of Chaenomeles japonica (thunb.) lindl. ex spach) by ion exchange fractionation resin” (iesniegta žurnālā “Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B”).

R3.2. Noorganizēts gala seminārs nozarei par projekta rezultātiem

Noorganizēts gala seminārs Bulduru Dārzkopības vidusskolā 2023. gada 26. janvārī. Semināra organizēšanā aktīvu iesaistījās Botāniskā dārza Draugu biedrība sadarbībā ar Bulduru Dārzkopības vidusskolas darbiniekiem. Biedrības speciālisti nodrošināja semināra plākāta izveidi, dalībnieku atlasu, iesniegto rakstu korekciju, kopsavilkumu izdevuma maketēšanu, rediģēšanu, bilžu atlasu un apstrādi, dalībnieku reģistrāciju, semināra izdales materiālu gatavošanu, izstādes materiāla sagatavošanu, atlasu.

Biedrība nodrošināja arī Gala atskaides sagatavošanu publicēšanai, maketēšanu, rediģēšanu, bilžu, tekstu apstrādi. Par semināra rezultātiem tika sagatavota preses relīze.

Ziņojumi par projektu:

- 1) Daliņa Segliņa, Inta Krasnova, Karina Juhneviča-Radenkova, Pawel Gornas “Research on plant extracts for use in the food, pharmaceutical and cosmetic industries”
- 2) Gunārs Lācis, Katrīna Kārklīņa & Edīte Kaufmane “Development of tools for *Chaenomeles* germplasm genetic evaluation”
- 3) Līva Purmale, Rafaels Joffe & Anna Korica “Dasheen and Konjac mosaic virus elimination attempts from *Zantedeschia* sp.”
- 4) Neda Zulģe, Inga Moročko–Bičevska, Ineta Baka, Līga Lepse “The detection of viruses associated with crumbly raspberry fruit in Latvia and elimination possibilities by micropropagation”
- 5) Madara Lazdāne, Signe Tomsone & Jeļena Kalniņa “Micropropagation of *Rhaponticum carthamoides* (willd.) iljin”

Kopsavilkumu buklets pieejams šeit: <https://bulduri.lv/wp-content/uploads/2022/11/abstracts.pdf>

Izstāde “Laikmetīgā dārzkopība”, kurā iekļauti attēli no projekta norises. Pieejama Bulduru Dārzkopības vidusskolas vestibīlā.

R3.3. Noorganizēti 3 semināri Lauku dienās Dobelē

1. Ziņojums par projekta rezultātiem Dārzkopības Institūta pavasara Lauku dienās: D. Segliņa
“Augļaugu lapu ekstrakti un to perspektīvas kosmētikas nozarei”
<https://www.darzkopibasinstituts.lv/lv/raksts/2021-04-15/informativa-diena-pavasaris-2021>
2. Pavasara lauku dienās prezentēti pētījumu rezultāti par savvaļas un mājas aveņu lapu
salīdzinājumu <https://fruittechcentre.eu/lv/article/2022-05-24/informativa-diena-pavasaris-2022>
3. Projekts “Biotehnoloģiju kompetences attīstība augstvērtīgu dārzkopības produktu ieguvei”
kā bāze dārzkopības speciālistu un interesentu apmācībai (L.Purmale)
https://fruittechcentre.eu/sites/default/files/files/articles/Biotehnologiju_kompetences_attistiba.pdf
4. Botāniskā dārza draugu biedrība ar kallu audzēšanu un atveseļošanu *in vitro* iepazīstināja
Ēnu dienas dalībniekus 2023. gada 5. aprīlī.

R3.4. Sagatavoti ziņojumi par projekta rezultātiem ikgadējā Bulduru konferencē (6 gab.)

Covid-19 ietekmē konferenču norise mainījās. Regulāri par projekta rezultātiem ziņots Latvijas Universitātes starptautiskajās zinātniskajās konferencēs. Rezultāti prezentēti arī konferencēs ārpus Latvijas – Ķīnā, Francijā, Igaunijā.

- 1) A. Sparinska*, Līva Purmale, Rafaels Joffe “Advancements in CCA Aeroponic and hydroponic cultivation at Bulduri Agri-food Technical school” VertiFarm2023, Ķīna, Čengdu 2023
- 2) A.Sparinsk* un Botāniskā dārza draugu biedrības pārstāvji “Biotehnoloģiju kompetences veselīgu stādu audzēšanā” ikgadējā Dārzkopības konference, Bulduri 2023. gada 10. martā. <https://www.darzkopibaskonference.lv/>
- 3) Madara Lazdāne*, Signe Tomsone, Jeļena Kalniņa, Lita Zīra “Saflora leizejas (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin) *in vitro* kultūras uzsākšana” LU 81. starptautiskā zinātniskā konference, Rīga 2023
- 4) Anna Korica*, Rafaels Joffe, Solveiga Lapiņa, Līva Purmale “Vīrusu izraisīto infekciju izpēte kallām *Zantedeschia* sp.” LU 80 starptautiskā zinātniskā konference, Rīga 2022
- 5) Līva Purmale*, Anna Korica, Rafaels Joffe. First accounts of *Zantedeschia* sp. Dasheen and Konjac mosaic virus detection in Latvia. XXXI International Horticultural Congress (IHC2022): International Symposium on In Vitro Technology and Micropropagated Plants. Francija, Angers 2022
- 6) Līva Purmale*, Anna Korica, Rafaels Joffe “Kallu (*Zantedeschia* sp.) *in vitro* kultūras uzsākšana”, LU 79. starptautiskā zinātniskā konference, Rīga 2021
- 7) D. Segliņa, I. Krasnova, K. Juhņeviča-Radenkova “Fruit leaf extracts and their perspectives in the cosmetics industry - preliminary study”. Igaunijas Dzīvības zinātņu universitātes Polli Dārzkopības zinātniskajā centrā, 19. novembrī 2021. g.

<https://worksup.com/Polli100conference2021/#/event/agenda/plan>