

# Mechanizmy odporności na abiotyczne i biotyczne stresy środowiskowe u form introgresywnych życicy wielokwiatowej i życicy trwałej z genami kostrzewy łąkowej lub kostrzewy trzcinowej

**Zadanie nr 17 realizowane w latach 2021-2026**

**Wykonawcy w 2024 r.**

## **Instytut Genetyki Roślin PAN**

prof. dr hab. Arkadiusz Kosmala (kierownik, e-mail: [akos@igr.poznan.pl](mailto:akos@igr.poznan.pl))

dr hab. Izabela Pawłowicz

dr Dawid Perlikowski

mgr Włodzimierz Zwierzykowski

mgr inż. Adrianna Czapiewska

## **Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie**

dr Elżbieta Małuszyńska

## **Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa-Państwowy Instytut Badawczy w Puławach**

prof. dr hab. Mariola Staniak

## **DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. (oddział Szelejewo)**

Koordinacja: inż. Eugeniusz Paszkowski

## **Grunwald Hodowla Roślin Sp. z o.o.**

Koordinacja: mgr inż. Katarzyna Szwarc

## **Cele badań w 2024 r.**

1. Selekcja form introgresywnych traw o wysokim stopniu zimotrwałości na podstawie oceny ich przezimowania i energii odrostu.
2. Selekcja form introgresywnych traw o wysokim stopniu tolerancji suszy i/lub regeneracji po ustąpieniu stresu.
3. Analiza trwałości traw w warunkach naturalnej wegetacji w polu.
4. Analiza fizjologiczno-molekularnych markerów tolerancji suszy (zawartość wody, relatywna zawartość wody, parametry wymiany gazowej, wyciek elektrolitów i fluorescencja chlorofilu, ekspresja genu chloroplastowej aldolazy), w symulowanych warunkach deficytu wodnego (warunki kontrolowane w fitotronie/szklarni), u wybranych, wyselekcjonowanych form introgresywnych.
5. Ocena jakości paszowej i wartości siewnej nasion.
6. Przekrzyżowania roślin.

**Wszystkie cele zrealizowano.**

## Materiał roślinny i metody badawcze

Formy introgressywne *Lolium perenne*/*Festuca pratensis* i *L. multiflorum*/*F. arundinacea*

- Ocena zimotrwałości form introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* i *L. multiflorum*/*F. arundinacea* została dokonana na podstawie potencjału odrostu roślin po zimie (uwzględniono ocenę przezimowania i ocenę energii odrostu wiosennego). Wizualnie oceniono podatność badanych form introgressywnych na porażenie *Microdochium nivale* - 2 lokalizacje (*temat badawczy nr 1*).
- Ocena stopnia tolerancji suszy i/lub regeneracji po ustąpieniu stresu form introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* prowadzona była w eksperymencie „pod daszkami”. Oceniano plon zielonej i suchej masy w warunkach suszy oraz odrost po powtórnym nawodnieniu - 1 lokalizacja (*temat badawczy nr 2*).
- Ocena trwałości form *L. perenne*/*F. pratensis* i form *L. multiflorum*/*F. arundinacea* w warunkach naturalnej wegetacji w polu prowadzona była na podstawie bonitacji oszacowanej w dwóch terminach (bonitacja wiosenno-letnia i jesienno-zimowa w skali 0-9; 9 - ocena najwyższa) - 2 lokalizacje (*temat badawczy nr 3*).
- Analiza markerów fizjologiczno-molekularnych u form *L. perenne*/*F. pratensis* różniących się poziomem tolerancji suszy i/lub regeneracji po ustąpieniu stresu: zawartość wody, relatywna zawartość wody, wymiana gazowa (transpiracja, przewodność szparkowa, intensywność fotosyntezy (asymilacja CO<sub>2</sub>), wyciek elektrolitów, fluorescencja chlorofilu (parametr Fv/Fm), poziom akumulacji transkryptu (RT-qPCR) oraz poziom akumulacji białka (Western blot) chloroplastowej aldolazy (*temat badawczy nr 4*).
- Badanie wartości siewnej nasion form *L. perenne*/*F. pratensis* i *L. multiflorum*/*F. arundinacea* obejmowało analizę: (1) masy tysiąca nasion (MTN) oraz (2) zdolności kiełkowania (ZK) nasion (ZK bez zabiegów przełamujących spoczynek, ZK po chłodzeniu i ZK po aplikacji KNO<sub>3</sub> do podłoża) (*temat badawczy nr 5*).
- Badanie jakości paszowej form *L. perenne*/*F. pratensis* i *L. multiflorum*/*F. arundinacea* obejmowało oznaczenie: (1) suchej masy (metodą wagową w 105°C), (2) azotu (N) ogólnego (metodą spektrofotometrii przepływowej), (3) włókna surowego (metodą enzymatyczno-wagową), (4) tłuszczu surowego (metodą Soxhleta) i (5) cukrów rozpuszczalnych w wodzie (metodą G. Bertranda). (6) Zawartość białka ogólnego (BO) wyliczona została ze wzoru  $BO = N \times 6,25$ . W badaniach oznaczona została (7) strawność suchej masy metodą enzymatyczną *in vitro* oraz (8) obliczona została wartość energetyczna i białkowa uzyskanej paszy, według francuskiego systemu INRA (WINWAR 1.3 współpracujący z programem INRA-tion) (*temat badawczy nr 5*).
- Krzyżowano mieszańce w obrębie każdej analizowanej grupy roślin: *L. perenne*/*F. pratensis* (2x) – 10 mieszańców zestawionych w 1 polikros, *L. perenne*/*F. pratensis* (4x) – 10 mieszańców zestawionych w 1 polikros oraz *L. multiflorum*/*F. arundinacea* (4x) – 10 mieszańców zestawionych w 1 polikros (*temat badawczy nr 6*).

## Analiza stopnia zimotrwałości form introgressywnych traw



Fot. 1. Przechimowanie mieszańców *L. perenne*/*F. pratensis* w Szelejewie (marzec 2024).

Materiałem badawczym były diploidalne i tetraploidalne formy introgressywne *L. perenne*/*F. pratensis* oraz tetraploidalne formy *L. multiflorum*/*F. arundinacea* – doświadczenia prowadzono w GRUNWALD Hodowla Roślin w Mielnie (woj. warmińsko-mazurskie) i w DANKO Hodowla Roślin w Szelejewie (woj. wielkopolskie). Wyselekcjonowano 20 mieszańców o stosunkowo wysokim poziomie zimotrwałości (po 10 dla każdej z lokalizacji) (Tabela 1).

Tabela 1. 20 form introgressywnych o stosunkowo wysokim poziomie zimotrwałości

DANKO HR	GRUNWALD HR
PB1-4	5-7/ BC3/5Arka
PB1-13	173/11-23/F4/4p10
PA1-7	173/11-49/A6/6p3
PA2-1	173/11-23/F1/1p10
PA2-10	173/11-49/B6/6p3
PA2-20	185/10/20 2-14 A2p8
BC3-45	185/10/58 7-14 A7p1
185/4/8	185/6/7 3-6 A7p5
185/4/11	185/6/7 3-6 A7p1
185/4/21	185/6/7 6-6 A6p1

### Podsumowanie/Wnioski

- 20 wyselekcjonowanych mieszańców introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* oraz *L. multiflorum*/*F. arundinacea* charakteryzowało się stosunkowo najwyższym stopniem zimotrwałości, przy uwzględnieniu zarówno oceny ich przechimowania, jak i oceny energii odrostu wiosennego.
- istotnym komponentem zimotrwałości wyselekcjonowanych form introgressywnych była mrozoodporność.
- w woj. wielkopolskim nie stwierdzono porażenia traw przez *Microdochium nivale*; natomiast było ono stosunkowo wysokie w woj. warmińsko-mazurskim.

## Temat badawczy nr 2

## Analiza stopnia tolerancji suszy form introgressywnych traw

Materiałem badawczym były formy introgressywne *L. perenne*/*F. pratensis* - diploidalne (2x): populacja PB1 i BC2 oraz tetraploidalne (4x): populacja PA i BC3. Testy prowadzono w DANKO Hodowla Roślin w Szelejewie (Wielkopolska).

Pomiary plonu wykonywano w roku 2024 w 6 terminach, gdzie jako początek suszy przyjęto pomiar z 12 czerwca, jako pomiar z okresu umiarkowanej suszy – 12 lipca tj. po 31 dniach bez nawadniania oraz jako pomiar z okresu długotrwałej suszy – 18 września tj. po 99 dniach bez nawadniania. Pomiar dokonany 9 października br. dotyczył fazy regeneracji po suszy, którą przerwano 19 września (początek podlewania). Poniżej przedstawiono wyniki zielonej masy [g] w wybranych punktach czasowych (z trzech namiotów „suchych”) dla najlepszych roślin. ZM3 – zielona masa po umiarkowanej suszy; ZM5 – zielona masa po długotrwałej suszy; ZM6 – zielona masa po regeneracji.

Wybrano 10 stosunkowo najlepszych form tolerujących suszę lub regenerujących po ustąpieniu warunków stresowych (Tabela 2).

### Podsumowanie/Wnioski

- w obrębie badanych populacji form introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* zaobserwowano dużą zmienność w przeżywalności roślin w warunkach suszy.
- w większości przypadków wyselekcjonowane rośliny charakteryzowały się zarówno tolerancją suszy, jak i zdolnością do regeneracji po ustąpieniu czynnika stresowego.
- wyselekcjonowano 10 form introgressywnych o stosunkowo najwyższym stopniu tolerancji suszy i/lub regeneracji po nawodnieniu.

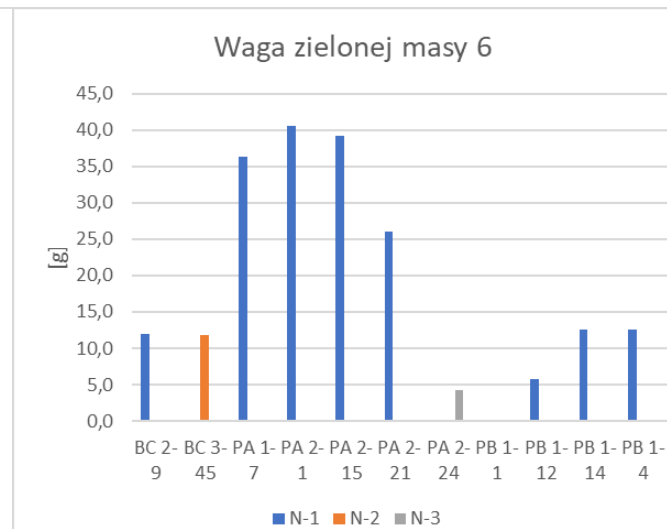
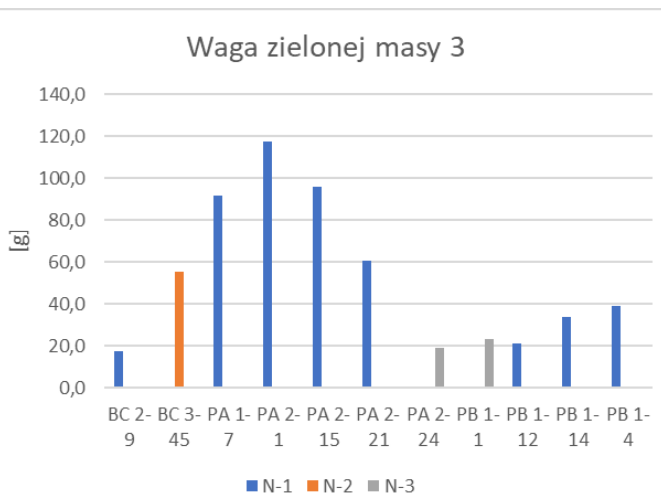


Tabela 2.  
Wyselekcjonowane mieszańce

PB1-4

PB1-12

PB1-14

BC2-9

BC3-45

PA1-7

PA2-1

PA2-15

PA2-21

PA2-24

## Analiza trwałości form introgressywnych traw w doświadczeniach polowych

### Temat badawczy nr 3

Materiałem badawczym były diploidalne i tetraploidalne formy introgressywne *L. perenne*/*F. pratensis* (**Lp/Fp**) – 25 genotypów dla każdej lokalizacji oraz formy *L. multiflorum*/*F. arundinacea* (**Lm/Fa**) – 25 genotypów dla każdej lokalizacji. Testy prowadzono w woj. wielkopolskim oraz w woj. warmińsko-mazurskim.

Tabela 3. Formy introgressywne o stosunkowo najwyższej trwałości

Lm/Fa	Lp/Fp
185/10/58 6-14 A6p8	5-7/ BC3/5Arka
185/10/58 7-14 A7p7	173/11-23/D2/2p3
185/10/58 11-14 A11p8	173/4-48/A3/3p3
185/6/7 3-6 A7p4	173/4-11/B1/1p1
185/6/7 3-6 A7p5	173/4-11/B1/1p5
185/4/4 7-8 B7p5	173/11-23/D3/3p8
185/4/2 4-8 B4p5	173/4-28/A2/2p1
185/4/7 2-8 B2p2	173/4-28/B2/2p1
185/4/7 8-8 B9p6	173/11-23/F4/4p10
185/4/7 5-8 B10p2	173/11-49/A6/6p3

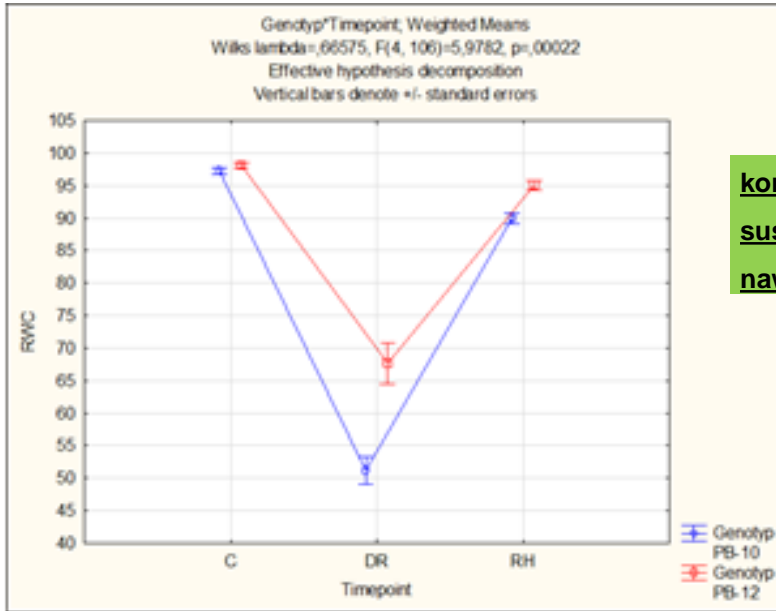
Bonitacja wiosenno-letnia oraz jesienno-zimowa w woj. wielkopolskim dla form introgressywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea* kształtowała się w przedziale 4-7, a w woj. warmińsko-mazurskim – 7-9.

Z kolei, w Wielkopolsce bonitacja form introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* w okresie wiosenno-letnimi i w okresie jesienno-zimowym wahała się odpowiednio w przedziale: 2-6 i 0-4. Natomiast w woj. warmińsko-mazurskim w okresie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bonitacja analizowanych form wynosiła odpowiednio: 5-9 i 3-9.

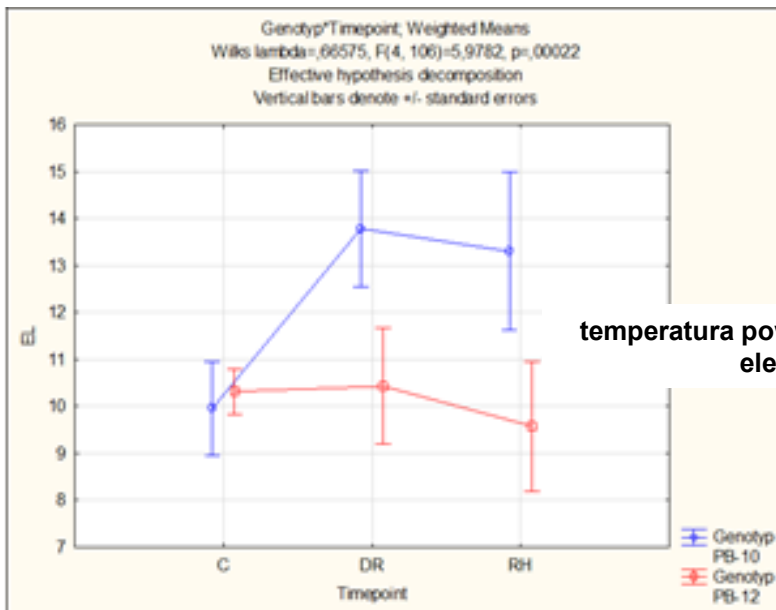
### Podsumowanie/Wnioski

- wyselekcjonowano 10 najlepszych form *L. multiflorum*/*F. arundinacea* o stosunkowo najwyższej trwałości (w woj. warmińsko-mazurskim) (Tabela 3).
- wyselekcjonowano 10 najlepszych form introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* o stosunkowo najwyższej trwałości (w woj. warmińsko-mazurskim) (Tabela 3).

Relatywna zawartość wody (RWC)



kontrola (C)  
susza (DR)  
nawodnienie (DH)



temperatura powodująca 50% wyciek elektrolitów

W badaniach uwzględniono 2 formy introgressywne *L. perenne*/*F. pratensis* (Tabela 4) i 9 wskaźników fizjologiczno-molekularnych.

Tabela 4.	Forma introgressywna
stosunkowo <u>niski</u> poziom tolerancji suszy	PB1-10
stosunkowo <u>wysoki</u> poziom tolerancji suszy	PB1-12

Analizowane wskaźniki: (1) zawartość wody, (2) **relatywna zawartość wody**, (3) **wyciek elektrolitów**, (4) fluorescencja chlorofilu (parametr Fv/Fm), (5) transpiracja, (6) przewodność szparkowa, (7) intensywność fotosyntezy (asymilacja CO<sub>2</sub>), (8) poziom transkryptu i (9) poziom białka aldolazy chloroplastowej.

### Wnioski

- dynamika analizowanych wskaźników fizjologiczno-molekularnych (parametry uwodnienia tkanek, wyciek elektrolitów, fluorescencja chlorofilu i parametry wymiany gazowej oraz akumulacja transkryptu i białka aldolazy chloroplastowej) była związana z warunkami środowiskowymi (eksperymentalnymi), w których uprawiane były rośliny w laboratorium, w układzie: kontrola/susza/ponowne nawodnienie.
- profile większości analizowanych w warunkach laboratoryjnych wskaźników fizjologiczno-molekularnych odzwierciedlały różnice w poziomie tolerancji suszy i/lub regeneracji po ustąpieniu stresu u badanych roślin w warunkach polowych.

## Masa Tysiąca Nasion (MTN)

***L. perenne/F. pratensis* (2x) - 1,9341 g**

*L. perenne* (2x) - 1,6949 g i *F. pratensis* (2x) - 2,2058 g

***L. perenne/F. pratensis* (4x) - 3,2728 g**

*L. perenne* (4x) - 2,8841 g i *F. pratensis* (2x) - 2,2058 g

***L. multiflorum/F. arundinacea* (4x) - 3,8194 g**

*F. arundinacea* (6x) - 2,2254 g

## Wnioski/Podsumowanie

- wykazano zróżnicowanie w MTN oraz w zdolności nasion do kiełkowania pomiędzy analizowanymi grupami roślin.
- mieszance *L. multiflorum /F. arundinacea*** charakteryzowały się **zbyt niską zawartością białka ogólnego**, a jednocześnie **optymalną zawartością włókna surowego** w suchej masie. Cechowały się również **korzystnym stosunkiem ilościowym węglowodanów rozpuszczalnych do białka ogólnego**. Średnia wartość jednostek energetycznych (JPM i JPŻ) w przypadku badanych form była podobna jak u *F. arundinacea* odm. Kord. Natomiast średnia zawartość białka paszy rzeczywiście trawionego w jelicie cienkim wyrażona dostępnością azotu i energii (BTJN i BTJE) była u nich niższa niż u odm. Kord.

- diploidalne mieszance *L. perenne/F. pratensis*** PB1-10, PB1-4 i PB1-13 charakteryzowały się **optymalną i zbliżoną do optymalnej zawartością białka** w suchej masie, natomiast pozostałe dwie formy **PB1-1 i PB1-12 zgromadziły zbyt mało białka** w suchej masie. Tylko jedna forma **PB1-12** charakteryzowała się **optymalną zawartością włókna surowego** w suchej masie. **U pozostałych traw zawartość włókna była zbyt niska. Niekorzystny stosunek węglowodanów rozpuszczalnych do białka ogólnego** wykazano tylko dla formy **PB1-13**. Średnia wartość jednostek energetycznych (JPM i JPŻ) u badanych form była na podobnym poziomie jak u *F. pratensis* odm. Pasja oraz niższa niż u *L. perenne* odm. Bajka. Największą wartością białkową wyrażoną w jednostkach BTJN i BTJE wykazała się forma PB1-13 (odpowiednio 119 i 95 g kg<sup>-1</sup> SM), zaś najmniejszą PB1-12.

- tetraploidalne mieszance *L. perenne/F. pratensis*** charakteryzowały się **optymalną lub zbliżoną do optymalnej zawartością białka** w suchej masie; **jednak zbyt niską zawartością włókna surowego** w suchej masie. Większość badanych form charakteryzowała się **optymalnym lub zbliżonym do optymalnego stosunkiem węglowodanów rozpuszczalnych do białka ogólnego**. Średnia wartość jednostek energetycznych JPM i JPŻ u badanych form była niższa odpowiednio o 1,6 i 1,2% w porównaniu do wartości uzyskanych u *F. pratensis* odm. Pasja i o 2,0% w odniesieniu do *L. perenne* odm. Solen. Największą wartością białkową wyrażoną w jednostkach BTJN i BTJE wykazały się formy PA2-21 (odpowiednio 131 i 98 g kg<sup>-1</sup> SM) i PA1-7 (odpowiednio 127 i 106 g kg<sup>-1</sup> SM), zaś najmniejszą – PA2-15.



## Przekrzyżowania roślin

Zestawiono trzy polikrosy, z których każdy obejmował 10 roślin. W sumie do krzyżowań wykorzystano 30 mieszańców (Tabela 5).

Tabela 5. Zestawienie trzech polikrosów	
populacja	formy introgresywne
<i>L. perenne/F. pratensis</i> (2x)	PB1-1, PB1-2, PB1-4, PB1-11, PB1-12, PB1-13, PB1-14, PB1-17, BC2-3, BC2-9
<i>L. perenne/F. pratensis</i> (4x)	PA1-7, PA2-1, PA2-10, PA2-15, PA2-20, PA2-21, PA2-24, PA2-29, BC3-15, BC3-45
<i>L. multiflorum/F. arundinacea</i> (4x)	185/4/2, 185/4/8, 185/4/11, 185/4/21, 185/4/22, 185/4/28, 185/6/7, 185/6/17, 185/10/3, 185/10/24

Badane mieszańce wykazywały zdolność do kłoszenia i wytwarzania pękających pylników. Dla każdej krzyżowanej populacji roślin uzyskano nasiona.

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
<b>Temat badawczy nr 1</b>			
1.1	Liczba form introgresywnych traw badanych pod kątem zimotrwałości	155	155
1.2	Liczba wyselekcjonowanych form introgresywnych traw o najwyższym stopniu zimotrwałości	20	20
<b>Temat badawczy nr 2</b>			
2.1	Liczba wyselekcjonowanych form introgresywnych o najwyższym stopniu tolerancji suszy i/lub regeneracji po nawodnieniu	10	10
<b>Temat badawczy nr 3</b>			
3.1	Liczba form introgresywnych traw badanych pod kątem trwałości w naturalnych warunkach polowych	100	100
3.2	Liczba wyselekcjonowanych form introgresywnych traw o najwyższej trwałości w naturalnych warunkach polowych	20	20
<b>Temat badawczy nr 4</b>			
4.1	Liczba punktów czasowych, dla których wyznaczone zostaną fizjologiczno-molekularne markery tolerancji suszy	3	3
4.2	Liczba analizowanych parametrów fizjologiczno-molekularnych w warunkach kontrolnych, w suszy i po ponownym nawodnieniu	9	9
<b>Temat badawczy nr 5</b>			
5.1	Liczba populacji form introgresywnych traw, dla których zbadana zostanie wartość siewna nasion	3	3
5.2	Liczba analizowanych parametrów związanych z wartością siewną nasion	2	2
5.3	Liczba form introgresywnych, dla których badane będą parametry związane z jakością paszową	15	15
5.4	Liczba analizowanych parametrów związanych z jakością paszową	8	8
<b>Temat badawczy nr 6</b>			
6.1	Liczba populacji mieszańców wykorzystanych w krzyżowaniach	3	3
6.2	Liczba mieszańców wykorzystanych w krzyżowaniach w obrębie każdej populacji	10	10