

# 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 2023 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 hab. Lidia Błaszczuk, prof. IGR PAN

dr Dawid Perlikowski

mgr Włodzimierz Zwierzykowski

## **Uniwersytet Rolniczy w Krakowie**

prof. dr hab. Agnieszka Płażek

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

prof. dr hab. Grzegorz Żurek

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

inż. Eugeniusz Paszkowski

## **Grunwald Hodowla Roślin Sp. z o.o. - Grupa IHAR**

mgr inż. Katarzyna Szwarz, mgr inż. Katarzyna Kłodawska-Pęcińska, dr Dariusz Rydzyński, mgr Łukasz Wańkiewicz

## **Cele badań w 2023 r.**

1. Analiza stopnia zimotrwałości traw; selekcja form introgresywnych o wysokim stopniu zimotrwałości.
2. Analiza stopnia tolerancji traw na suszę i ich regeneracji w symulowanych warunkach polowych (doświadczenie „pod daszkami”); 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; analiza zdolności roślin do kwitnienia i zawiązywania nasion w warunkach naturalnych.
4. Analiza markerów molekularnych dla odmian referencyjnych *L. perenne*.
5. Ocena porażenia traw przez patogeny (ocena stopnia podatności na choroby).

**Wszystkie cele zrealizowano.**

## Materiał roślinny i metody badawcze

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

- Ocena zimotrwałości form introgresywnych *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 introgresywnych na porażenie *Microdochium nivale* - 2 lokalizacje (*temat badawczy nr 1*).
- Ocena stopnia tolerancji suszy i/lub regeneracji po ustąpieniu stresu form introgresywnych *L. perenne*/*F. pratensis* prowadzona była w eksperymencie „pod daszkami”. Oceniano plon zielonej i suchej masy w warunkach suszy oraz odrost po powtórny 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*).
- Analizę markerów molekularnych prowadzono na wybranych 4 odmianach *L. perenne*, 2 diploidalnych i 2 tetraploidalnych. Dla każdej odmiany wykorzystano 30 genotypów (w sumie 120 genotypów). Analizy w 2023 r. były związane z określeniem przydatności wybranych technik markerowych do genotypowania traw. Badane były metody, które opierają się na reakcji PCR i jej modyfikacjach w oparciu o sekwencjonowanie wybranych fragmentów genomu [high-resolution melting PCR (HRM-PCR) i digital PCR (dPCR)] (*temat badawczy nr 4*).
- Stopień porażenia form *L. perenne*/*F. pratensis* i form *L. multiflorum*/*F. arundinacea* przez patogeny określono w sześciostopniowej skali: 0-5 gdzie: 0 – rośliny zdrowe; 1 – ślad infekcji; 2 – nieliczne plamy lub objawy; 3 – połowa liści z widocznymi objawami; 4 – ¾ liści porażonych; 5 – cała roślina porażona - 2 lokalizacje (*temat badawczy nr 5*).
- Ocenę zdolności roślin do kwitnienia i zawiązywania nasion prowadzono w oparciu o analizę: (i) zdolności roślin do kłoszenia, (ii) terminu kłoszenia oraz (iii) zdolności pylników do pęknięcia - 2 lokalizacje. Oceniona została także (iv) zdolność roślin do zawiązywania nasion w trakcie wolnego przepylecia w warunkach polowych; dla wybranych roślin określono wagę osadzonych nasion [g] (*temat badawczy nr 6*).

## Analiza stopnia zimotrwałości traw; selekcja form introgresywnych o wysokim stopniu zimotrwałości.

Materiałem badawczym były diploidalne i tetraploidalne formy introgresywne *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 40 mieszańców o stosunkowo wysokim poziomie zimotrwałości (po 20 dla każdej z lokalizacji) (Tabela 1).

### Temat badawczy nr 1

Tabela 1. 40 form introgresywnych o stosunkowo najwyższym poziomie zimotrwałości

DANKO HR		GRUNWALD HR	
PB1-1	PA2-1	173/11-23/D6/6p4	185/4/2 1-8 A1p2
PB1-2	PA2-3	173/4-28/F2/2p5	173/4-11/A1/1p4
PB1-4	PA2-5	173/11-23/F4/4p10	5-7/ BC3/5Arka
PB1-11	PA2-14	173/4-11/B1/1p5	185/4/2 1-8 A1p4
PB1-13	PA2-21	173/11-49/B6/6p3	173/11-23/A4/4p4
PB1-14	185/4/11	173/4-11/C1/1p3	173/11-49/A6/6p5
PB1-17	185/4/16	173/11-23/D3/3p8	173/11-49/A6/6p3
PA1-5	185/6/9	173/11-23/F1/1p3	173/4-28/B2/2p3
PA1-7	185/6/57	173/4-11/A1/1p5	185/4/59 2-8 B2p1
PA1-8	185/10/58	185/4/2 1-8 A1p1	185/4/2 1-8 A1p2

### Podsumowanie/Wnioski

- 40 wyselekcjonowanych mieszańców introgresywnych *L. perenne*/*F. pratensis* oraz *L. multiflorum*/*F. arundinacea* charakteryzowało się stosunkowo najwyższym stopniem zimotrwałości, przy uwzględnieniu zarówno oceny ich przezimowania, jak i oceny energii odrostu wiosennego.
- istotnym komponentem zimotrwałości wyselekcjonowanych form introgresywnych 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

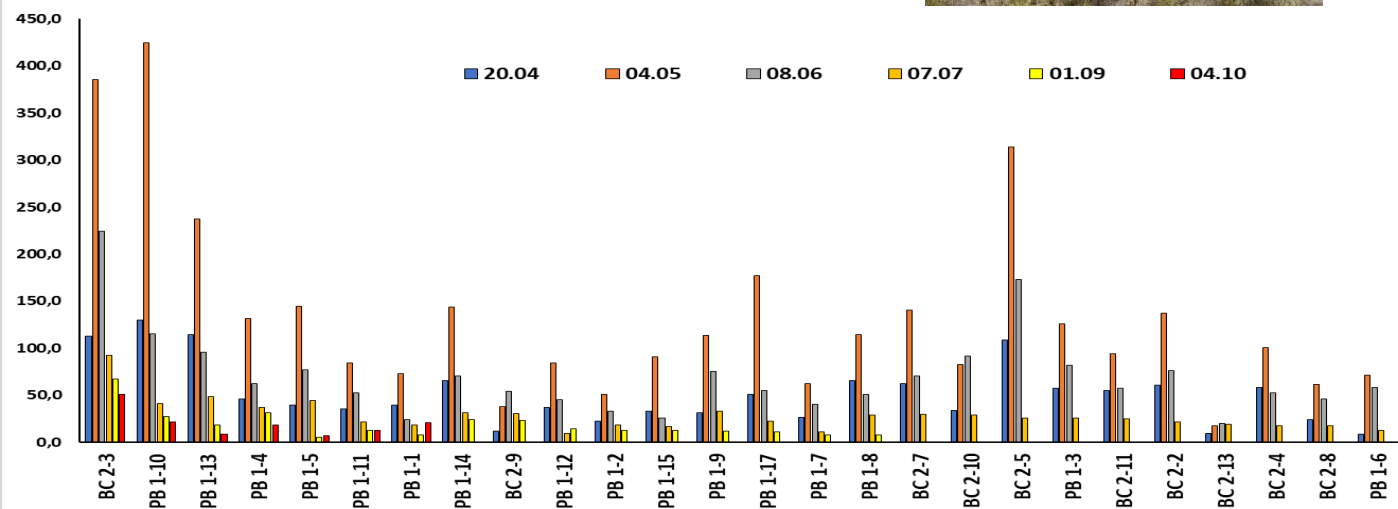
**Analiza stopnia tolerancji traw na suszę i ich regeneracji w symulowanych warunkach polowych (doświadczenie „pod daszkami”); selekcja form introgressywnych o wysokim stopniu tolerancji suszy lub regeneracji po ustąpieniu stresu.**

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

Doświadczenia selekcyjne „pod daszkami” w Wielkopolsce (okres przed suszą; maj 2023 r.).



Zielona masa [g] wybranych form **diploidalnych** *L. perenne*/*F. pratensis* w poszczególnych terminach pomiarowych (punktach czasowych). Od 8.06 trwał okres suszy symulowanej; 07.07 – susza umiarkowana; 01.09 – susza długotrwała; 4.10 to pomiar odrostu po ustąpieniu suszy długotrwałej i nawodnieniu. Przedstawiono średnie dla genotypu z trzech namiotów „suchych”.



Spośród diploidalnych i tetraploidalnych form wybrano po 15 stosunkowo najlepszych form tolerujących suszę lub regenerujących po ustąpieniu warunków stresowych (Tabela 2).

Tabela 2. Wyselekcjonowane mieszańce introgressywne <i>L. perenne</i> / <i>F. pratensis</i>			
diploidy		tetraploidy	
PB1-1	BC2-3	PA1-2	PA2-24
PB1-4	BC2-5	PA1-5	PA2-29
PB1-5	BC2-7	PA1-7	BC3-15
PB1-8	BC2-9	PA2-1	BC3-45
PB1-9	BC2-10	PA2-5	BC3-63
PB1-10		PA2-6	
PB1-11		PA2-8	
PB1-13		PA2-14	
PB1-14		PA2-17	
PB1-17		PA2-21	

### 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 albo tolerancją suszy, albo zdolnością do regeneracji po ustąpieniu czynnika stresowego.

## Analiza trwałości traw w warunkach naturalnej wegetacji w polu.

### Temat badawczy nr 3

Materiałem badawczym były diploidalne i tetraploidalne formy introgresywne *L. perenne*/*F. pratensis* (**Lp/Fp**) – 50 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 introgresywne o stosunkowo najwyższej trwałości

<i>Lm/Fa</i>	<i>Lp/Fp</i> woj. wielkopolskie	<i>Lp/Fp</i> woj. warmińsko- mazurskie
185/4/21	PB1-10	3-7-1/ BC3/6Bajka+
185/6/17	PB1-13	5-7/ BC3/5Arka
185/6/57	PB1-14	173/4-11/B1/1p1
185/10/58	BC2-7	173/4-11/B1/1p5
185/4/2 1-8 A1p1	BC2-12	173/11-49/B6/6p3
185/4/2 1-8 A1p4	PA1-8	173/11-49/A6/6p5
185/4/7 4-8 A4p6	PA2-5	173/11-23/B4/4p3
185/4/7 4-8 B4p2	PA2-21	173/11-23/F4/4p10
185/4/11 3-8 B3p8	BC3-27	173/4-11/A1/1p1
185/4/59 2-8 B2p1	BC3-29	173/11-49/A6/6p3

Bonitacja wiosenno-letnia oraz jesienno-zimowa w woj. wielkopolskim dla form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea* kształtowała się w przedziale odpowiednio: 5-8 i 4-8, a w woj. warmińsko-mazurskim – 4-8 i 3-9.

Z kolei, w Wielkopolsce bonitacja form introgresywnych *L. perenne*/*F. pratensis* w okresie wiosenno-letnimi i w okresie jesienno-zimowym wahała się odpowiednio w przedziale: 1-9 i 0-9. Natomiast w woj. warmińsko-mazurskim w okresie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bonitacja analizowanych form wynosiła odpowiednio: 2-9 i 0-8.

### Podsumowanie/Wnioski

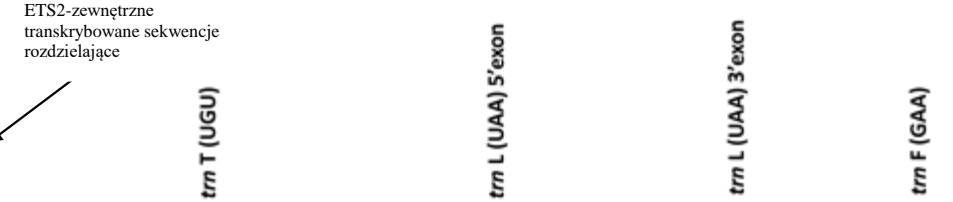
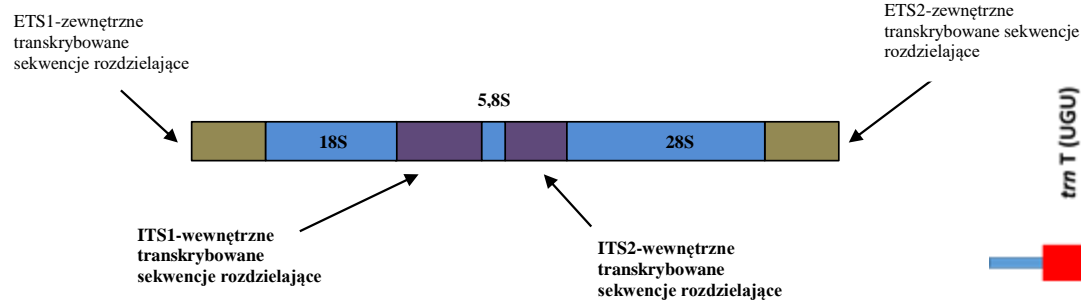
- wyselekcjonowano 10 najlepszych form *L. multiflorum*/*F. arundinacea* o stosunkowo najwyższej trwałości w woj. warmińsko-mazurskim lub w Wielkopolsce (Tabela 3).
- wyselekcjonowano 10 najlepszych form introgresywnych *L. perenne*/*F. pratensis* o stosunkowo najwyższej trwałości w woj. warmińsko-mazurskim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

## Temat badawczy nr 4

# Analiza markerów molekularnych dla odmian referencyjnych *L. perenne*.

Analizy prowadzono na wybranych czterech odmianach *L. perenne* (Lp), dwóch diploidalnych (2x): **Bajka** i **Arka** oraz dwóch tetraploidalnych (4x): **Diament** i **Solen**. Badania w 2023 r. były związane z określeniem przydatności wybranych metod do genotypowania (odmian) traw.

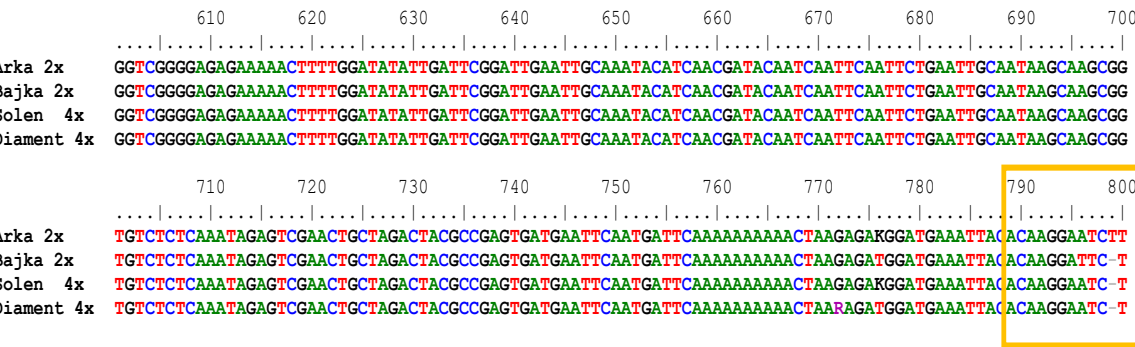
Do badań, w oparciu o literaturę i bazy danych, wytypowano dwa regiony DNA, które poddano analizie sekwencyjnej: **region ITS rDNA** (ang. internal transcribed spacer region of rRNA-encoding DNA) oraz **region chloroplastowy trnL-F** (ang. chloroplast trnL-F region).



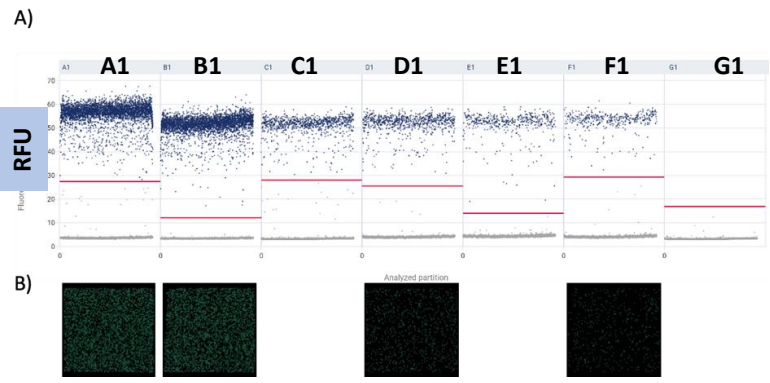
W regionach tych, stosując różne kombinacje starterów, wykryto stosunkowo dużą liczbę substytucji oraz mutacji typu indel (delecje/insercje) pojedynczych nukleotydów pomiędzy badanymi odmianami. Na ich bazie podjęto dalsze prace, w celu optymalizacji metod HRM i dPCR, w kierunku identyfikacji markerów międzyodmianowych.

**Region ITS1/ITS2 rDNA.** Niebieski kolor – sekwencje kodujące rRNA, fioletowy – wewnętrzne transkrybowane sekwencje rozdzielające, oliwkowy - zewnętrzne transkrybowane sekwencje rozdzielające.

**Region trnL-F cpDNA (chloroplastowego trnL-F).** Czerwony kolor – egzony, niebieski – regiony niekodujące.



Arka 2x TT  
Bajka 2x TT  
Solen 4x TT  
Diament 4x TT



Wyniki analizy dPCR przeprowadzonej dla: Lp Arka (2x) (kolumna A1), Bajka (2x) (kolumna B1), Solen (4x) (kolumny C1 i D1), Diament (4x) (kolumny E1 i F1) oraz próby zerowej, bez DNA (kolumna G1) z użyciem pary starterów 827bF i 940bR (region ITS1/ITS2 rDNA). A) wykresy przedstawiające intensywność fluorescencji [RFU] i obrazujące ilość mikroprób (na 8000), w których zaszła reakcja amplifikacji; B) obrazy partycji uzyskane dla czterech badanych odmian przedstawiające liczbę mikroprób (na 8000), w których doszło do reakcji amplifikacji i uzyskania oczekiwanego produktu DNA.

**Podsumowanie/Wnioski**

- zarówno region ITS rDNA, jak i trnL-F okazał się przydatny do identyfikacji polimorfizmu DNA pomiędzy badanymi odmianami.
- analiza sekwencji ITS rDNA i trn-F wykazała, że oba badane regiony DNA mogą potencjalnie posłużyć do opracowania markera HRM lub dPCR.
- wykazano przydatność systemu dPCR do identyfikacji markerów specyficznych dla wybranych odmian.

Wybrany fragment sekwencji regionu trn-F, amplifikowany przy wykorzystaniu pary starterów aB48557 i bA49291. Na pozycji 796 występuje substytucja A → T w sekwencji Lp Bajka (2x), a na pozycji 799 **insercja T** w sekwencji Lp Arka (2x). (lub **delecja T** w sekwencji Lp Bajka (2x), Solen (4x) i Diament (4x)).



Ocena porażenia mieszańców *L. multiflorum*/*F. arundinacea* w woj. warmińsko-mazurskim (czerwiec 2023 r.).

Tabela 4. Formy introgresywne o najwyższym poziomie odporności na choroby

**Lm/Fa i Lp/Fp**

PB1-3	PA2-1	173/11-23/F4/4p10
PB1-9	PA2-17	173/4-11/A1/1p1
PB1-10	PA2-21	173/11-49/A6/6p3
PB1-12	3-7-1/ BC3/6Bajka+	185/4/2 1-8 A1p1
BC2-2	5-7/ BC3/5Arka	185/4/2 1-8 A1p4
BC2-4	173/4-11/B1/1p1	185/6/7 1-5 A1p3
BC2-8	173/4-11/B1/1p5	185/4/7 4-8 A4p6
BC2-9	173/11-49/B6/6p3	185/4/2 1-8 A1p2
BC2-10	173/11-49/A6/6p5	185/10/3 4-7 A4p4
PA1-7	173/11-23/B4/4p3	185/4/59 2-8 A2p2

Materiałem badawczym były diploidalne i tetraploidalne formy introgresywne *L. perenne*/*F. pratensis* (**Lp/Fp**) – 50 genotypów dla każdej lokalizacji oraz formy *L. multiflorum*/*F. arundinacea* (**Lm/Fa**) – 25 genotypów dla każdej lokalizacji. Ocena została przeprowadzona w DANKO Hodowla Roślin w Szelejewie (Wielkopolska) oraz w GRUNWALD Hodowla Roślin w Mielnie (woj. warmińsko-mazurskie).

Wiosna i początek lata w 2023 r. były w woj. warmińsko-mazurskim ciepłe i suche. Rośliny generalnie nie wykazywały porażenia mączniakiem i rdzą, a plamistości liści występowały w znikomym stopniu. Nie udało się jednak zidentyfikować patogenów powodujących plamistości.

Badane rośliny w Wielkopolsce były porażone plamistościami liści i mączniakiem, lecz w stosunkowo niewielkim stopniu (maks. w stopniu 2). Na jednej roślinie mogły występować dwie choroby równocześnie. Mieszańce *L. perenne*/*F. pratensis* w trakcie selekcji w kierunku tolerancji suszy nie wykazywały natomiast symptomów porażenia rdzą koronową. Mikroskopowo zidentyfikowano trzy gatunki grzybów powodujących plamistości liści traw: *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera dictyoides* i *D. siccans*.

**Podsumowanie/Wnioski**

- brak objawów chorób u mieszańców traw w woj. warmińsko mazurskim w czerwcu 2023 roku był prawdopodobnie spowodowany długotrwałą suszą i stosunkowo wysokimi temperaturami występującymi w okresie wiosennym.
- w doświadczeniu prowadzonym w woj. wielkopolskim nie stwierdzono występowania rdzy na roślinach selekcjonowanych pod kątem tolerancji suszy.





Formy *L. multiflorum/F. arundinacea* uprawiane w warunkach naturalnych w GRUNWALD Hodowla Roślin.

Materiałem badawczym były diploidalne i tetraploidalne formy introgresywne *L. perenne/F. pratensis* (**Lp/Fp**) – 50 genotypów dla każdej lokalizacji oraz formy *L. multiflorum/F. arundinacea* (**Lm/Fa**) – 25 genotypów dla każdej lokalizacji. Analizy prowadzono w DANKO Hodowla Roślin w Szelejewie (Wielkopolska) oraz w GRUNWALD Hodowla Roślin w Mielnie (woj. warmińsko-mazurskie).

Wszystkie rośliny pierwszej badanej populacji (*L. multiflorum/F. arundinacea*) w obu lokalizacjach wykazały zdolność do kłoszenia i miały pękające pylniki. W Wielkopolsce większość roślin drugiej (diploidy *L. perenne/F. pratensis*) i trzeciej (tetraploidy *L. perenne/F. pratensis*) populacji wykazała zdolność do kłoszenia i miała pękające pylniki. Dziesięć roślin (4 tetraploidy i 6 diploidów) o najniższej trwałości nie wykształciła kwiatostanów. W woj. warmińsko-mazurskim większość roślin drugiej (diploidy *L. perenne/F. pratensis*) i trzeciej (tetraploidy *L. perenne/F. pratensis*) populacji również wykazała zdolność do kłoszenia i miała pękające pylniki. Dziesięć roślin (4 tetraploidy i 6 diploidów) o najniższej trwałości nie wykształciła kwiatostanów. Waga osadzonych ziarniaków dla tetraploidalnej populacji *L. multiflorum/F. arundinacea* wahała się pomiędzy 15 g (185/6/17 3-5 B3p2), a 40 g (185/6/9 5-5 A5p1); dla diploidalnej populacji *L. perenne/F. pratensis* pomiędzy 1,2 g (PB 1-17), a 19 g (PB 1-10); dla tetraploidalnej populacji *L. perenne/F. pratensis* pomiędzy 6,3 g (173/11-23/D2/2p3 oraz 173/11-23/F1/1p3), a 16 g (173/11-23/D3/3p8).

### Podsumowanie/Wnioski

- większość mieszańców *L. multiflorum/F. arundinacea* i *L. perenne/F. pratensis* wykazała zdolność do kłoszenia się i wytwarzania pękających pylników, co wskazuje na ich potencjalnie wysoką płodność męską.
- mieszańce diploidalnej i tetraploidalnej populacji *L. perenne/F. pratensis* o niskiej trwałości nie wykształciły pędów generatywnych.

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
<b>Temat badawczy nr 1</b>			
1.1	Liczba mieszańców badanych pod kątem zimotrwałości	290	290
1.2	Liczba wyselekcjonowanych mieszańców o najwyższym stopniu zimotrwałości	40	40
<b>Temat badawczy nr 2</b>			
2.1	Wyściowa liczba mieszańców poddana testom „pod daszkami”	190	190
2.2	Liczba wyselekcjonowanych mieszańców o najwyższym stopniu tolerancji suszy i/lub regeneracji po nawodnieniu	30	30
<b>Temat badawczy nr 3</b>			
3.1	Liczba mieszańców badanych pod kątem trwałości w naturalnych warunkach polowych	150	150
3.2	Liczba wyselekcjonowanych mieszańców o najwyższej trwałości w naturalnych warunkach polowych	30	30
<b>Temat badawczy nr 4</b>			
4.1	Liczba odmian <i>L. perenne</i> wykorzystana w analizie markerów	4	4
4.2	Liczba genotypów <i>L. perenne</i> wykorzystana w analizie markerów	120	120
4.3	Liczba testowanych systemów markerowych	3	3
<b>Temat badawczy nr 5</b>			
5.1	Liczba wyselekcjonowanych mieszańców o najwyższym poziomie odporności na choroby	30	30
<b>Temat badawczy nr 6</b>			
6.1	Liczba grup populacji, dla których określona zostanie zdolność roślin do kwitnienia i zawiązywania nasion	3	3

**Fodder Crops and Amenity Grasses - 35th Eucarpia, Section Meeting. 10-14 września 2023 r., Brno, Republika Czeska.**  
(„flash presentation”)

“Physiological and molecular indicators of winter-hardiness and frost tolerance in *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* hybrids”

*Dawid Perlikowski, Adrianna Czapiewska, Izabela Pawłowicz, Włodzimierz Zwierzykowski, Eugeniusz Paszkowski, Katarzyna Szwarz, Katarzyna Kłodawska-Pęcińska, Dariusz Rydzyński, Łukasz Wańkiewicz, Marcin Rapacz, Arkadiusz Kosmala\**