

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 2022 r.

Instytut Genetyki Roślin PAN

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

dr hab. Izabela Pawłowicz

dr Dawid Perlikowski

mgr Włodzimierz Zwierzykowski

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

prof. dr hab. Marcin Rapacz

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)

inż. Eugeniusz Paszkowski

Grunwald Hodowla Roślin Sp. z o.o.

mgr inż. Katarzyna Szwarc

Cele badań w 2022 r.

1. Analiza stopnia przezimowania traw; ocena wpływu wybranych komponentów zimotrwałości na stopień przezimowania traw - mrozoodporność, odporność na rozhartowanie, zdolność do ponownego hartowania oraz odporność na choroby; selekcja form introgresywnych traw o wysokim stopniu zimotrwałości.
2. Analiza stopnia tolerancji traw na suszę i ich regeneracji w symulowanych warunkach polowych (doświadczenie „pod daszkami”; ocena plonu suchej i zielonej masy w warunkach suszy oraz odrostu po powtórnym nawodnieniu); 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 wskaźników mrozoodporności 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 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*).
- Analiza fizjologiczno-molekularnych markerów mrozoodporności u form *L. perenne*/*F. pratensis* różniących się poziomem zimotrwałości w warunkach kontrolnych, prehartowania, hartowania, rozhartowania i ponownego hartowania: wyciek elektrolitów, fluorescencja chlorofilu, poziom akumulacji transkryptu (RT-qPCR) oraz poziom akumulacji białka (Western blot) Cor14b (*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 KNO₃ do podłoża) (*temat badawczy nr 5*).
- Badanie jakości paszowej form *L. perenne*/*F. pratensis* i *L. multiflorum*/*F. arundinacea* obejmowało analizę zawartości: (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 oznaczono (7) strawność suchej masy metodą enzymatyczną *in vitro* oraz (8) obliczono wartość energetyczną i białkową 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) – 15 mieszańców zestawionych w 1 polikros, *L. perenne*/*F. pratensis* (4x) – 15 mieszańców zestawionych w 1 polikros oraz *L. multiflorum*/*F. arundinacea* (4x) – 15 mieszańców zestawionych w 1 polikros (*temat badawczy nr 6*).

Analiza stopnia przetrzymywania traw; ocena wpływu wybranych komponentów zimotrwałości na stopień przetrzymywania traw - mrozoodporność, odporność na rozhartowanie, zdolność do ponownego hartowania oraz odporność na choroby; selekcja form introgressywnych traw o wysokim stopniu zimotrwałości.

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 40 mieszańców o stosunkowo wysokim poziomie zimotrwałości (po 20 dla każdej z lokalizacji) (Tabela 1).



Mieszańce *L. perenne*/*F. pratensis*, 12.01.2022r., w DANKO Hodowla Roślin (Szelejewo).

Temat badawczy nr 1

Wnioski

- wyselekcjonowane mieszańce introgressywne *L. perenne*/*F. pratensis* oraz *L. multiflorum*/*F. arundinacea* charakteryzowały się stosunkowo wysokim stopniem zimotrwałości, przy uwzględnieniu zarówno oceny ich przetrzymywania, jak i oceny energii odrostu wiosennego.
- istotnym komponentem zimotrwałości wyselekcjonowanych form introgressywnych mogła być mrozoodporność. Nie można wykluczyć tego, że przynajmniej niektóre z tych form były również odporne na rozhartowanie i/lub wykazywały zdolność do ponownego hartowania.
- wyselekcjonowane mieszańce *L. perenne*/*F. pratensis* i *L. multiflorum*/*F. arundinacea* o stosunkowo wysokim poziomie zimotrwałości w woj. warmińsko-mazurskim charakteryzowały się również wysokim stopniem odporności na porażenie *Microdochium nivale*. Mieszańce w woj. wielkopolskim nie wykazywały objawów porażenia *M. nivale*.

Tabela 1. 40 form introgressywnych o stosunkowo wysokim poziomie zimotrwałości.

DANKO HR		GRUNWALD HR	
PB1-1	PA1-3	3-7-1/ BC3/6Bajka+	173/11-23/F4/4p10
PB1-4	PA1-5	4-7/ BC3/5Arka	173/4-11/A1/1p4
PB1-8	PA1-7	5-7/ BC3/5Arka	173/4-48/F3/3p4
PB1-10	PA1-8	6-7/ BC3/5Arka	185/4/27
PB1-13	PA2-1	7-7 BC3/5Arka	185/4/28
PB1-14	PA2-2	2-7/ BC2/5Arka	185/6/9
BC2-11	PA2-3	173/11-23/D6/6p4	185/6/17
BC2-12	PA2-21	173/4-11/A1/1p5	185/6/57
BC2-15	185/6/57	173/4-11/B1/1p4	185/10/3
BC3-28	185/10/58	173/11-23/B4/4p3	185/10/57

Temat badawczy nr 2

Analiza stopnia tolerancji traw na suszę i ich regeneracji w symulowanych warunkach polowych (doświadczenie „pod daszkami”); ocena plonu zielonej i suchej masy w warunkach suszy oraz odrostu po powtórnym nawodnieniu); selekcja form introgressywnych traw o wysokim stopniu tolerancji suszy i/lub regeneracji po ustąpieniu stresu.

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

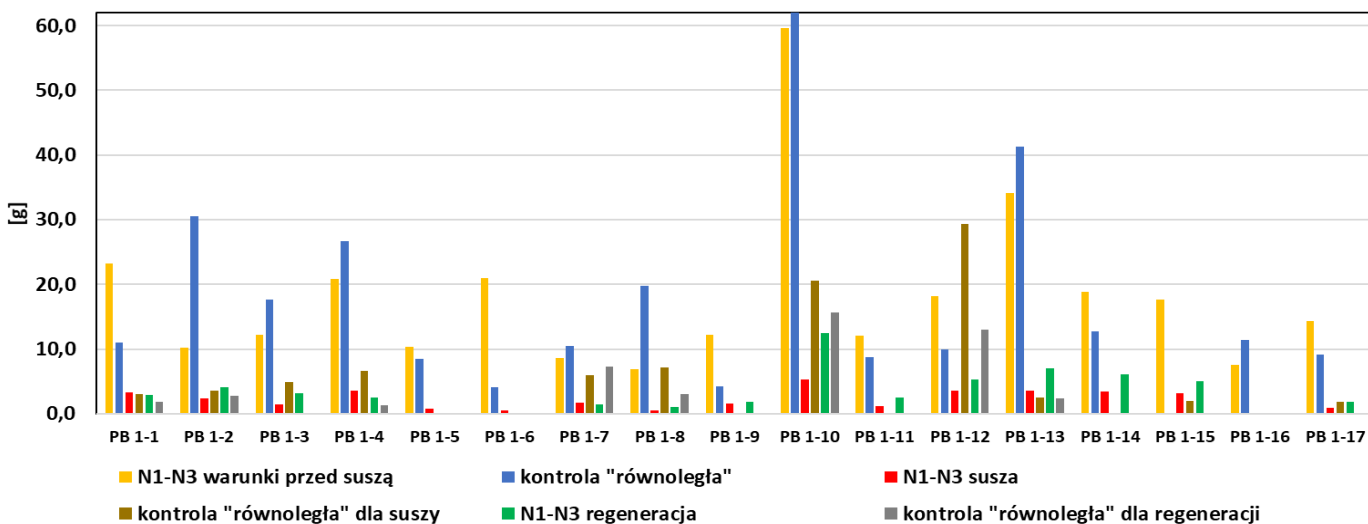
Test „pod daszkami” (listopad 2022 r.)



Sucha masa roślin populacji PB w warunkach –
(i) przed wystąpieniem stresu suszy (średnia z trzech namiotów + nawadniana „równoległa” kontrola);
(ii) w warunkach zaawansowanej suszy (średnia z trzech namiotów + nawadniana „równoległa” kontrola) oraz
(iii) w warunkach po zakończeniu suszy, w trakcie regeneracji (średnia z trzech namiotów + nawadniana „równoległa” kontrola).



Sucha masa



Spośród diploidalnych i tetraploidalnych form wybrano po 20 stosunkowo najlepszych form tolerujących suszę i/lub regenerujących po ustąpieniu warunków stresowych (Tabela 2).

Tabela 2. Wyselekcjonowane mieszańce introgressywne *L. perenne*/*F. pratensis*.

diploidy		tetraploidy	
PB1-10	PB1-7	PA1-3	PA2-9
PB1-12	PB1-8	PA1-5	PA2-10
PB1-13	PB1-9	PA1-6	PA2-12
PB1-14	PB1-11	PA1-7	PA2-13
PB1-15	PB1-17	PA2-1	PA2-14
PB1-1	BC2-11	PA2-2	PA2-15
PB1-2	BC2-6	PA2-3	PA2-21
PB1-4	BC2-9	PA2-4	PA2-24
BC2-2	BC2-3	PA2-5	PA2-27
PB1-3	BC2-5	PA2-6	PA2-29

Wnioski

- w obrębie populacji form *L. perenne*/*F. pratensis* obserwowano dużą zmienność w przeżywalności roślin w warunkach suszy. Szczególnie dużą zmiennością charakteryzowały się rośliny populacji tetraploidalnych.
- większość wyselekcjonowanych form wykazywała zarówno potencjał tolerancji suszy, jak i potencjał do regeneracji po ustąpieniu czynników stresowych.

Analiza trwałości traw w warunkach naturalnej wegetacji w polu.

Temat badawczy nr 3

Tabela 3. Formy introgressywne o stosunkowo najwyższej trwałości.

<i>Lm/Fa</i>	<i>Lp/Fp</i> woj. wielkopolskie	<i>Lp/Fp</i> woj. warmińsko- mazurskie
185/4/7	PB1-1	1-7/ KL/6 Bajka+
185/4/16	PB1-8	3-7-1/ BC3/6Bajka+
185/4/21	PB1-10	173/11- 23/D2/2p3
185/4/22	BC2-7	173/4-11/B1/1p4
185/4/31	BC2-12	173/11- 23/F4/4p10
185/4/34	PA1-1	2-7/BC2/C101/2
185/4/59	PA1-8	173/11- 49/A6/6p5
185/6/7	PA2-21	173/11- 49/A6/6p3
185/6/57	BC3-23	173/4-11/A1/1p4
185/10/58	BC3-28	173/4-48/F3/3p4

Materiałem badawczym były diploidalne i tetraploidalne formy introgressywne *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.

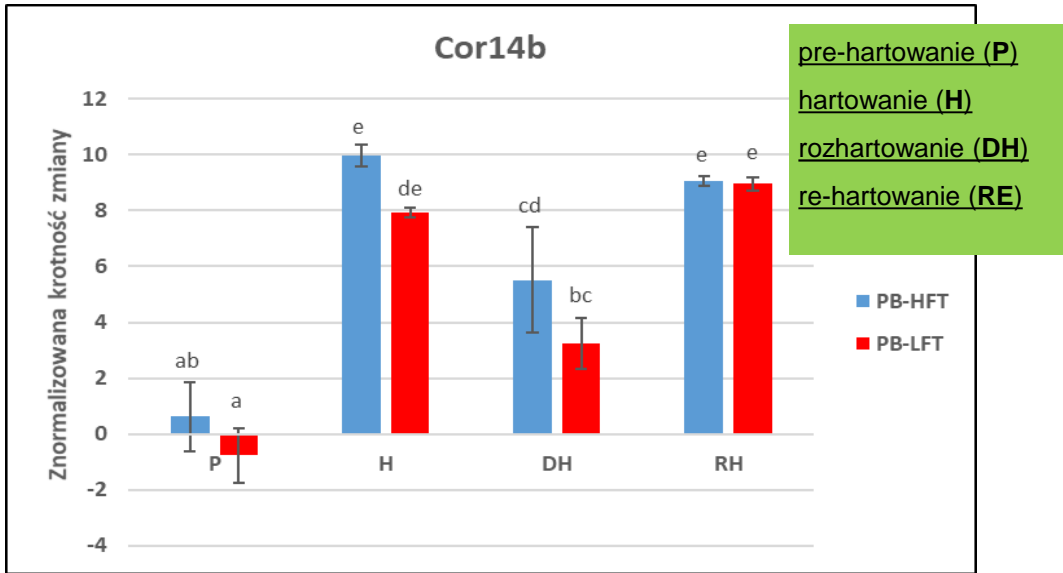
Trwałość form *L. multiflorum*/*F. arundinacea* była uzależniona od lokalizacji doświadczenia polowego. Generalnie, nie było możliwe wybranie takich form introgressywnych, które charakteryzowałyby się stosunkowo najwyższym stopniem trwałości w obu lokalizacjach. Był jeden wyjątek pod tym względem: forma 185/4/21.

W Wielkopolsce bonitacja poszczególnych form introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* w okresie wiosenno-letnim i w okresie jesienno-zimowym wahała się w przedziale odpowiednio: 0-9 i 0-7. Natomiast w woj. warmińsko-mazurskim w okresie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bonitacja analizowanych form wynosiła 2-8. Średnia bonitacja wiosenno-letnia dla roślin w Wielkopolsce wyniosła – 3,86, a dla roślin w woj. warmińsko-mazurskim – 6,5. Z kolei średnia bonitacja jesienno-zimowa dla roślin w Wielkopolsce to – 1,98, a dla roślin w woj. warmińsko-mazurskim – 5,6.

Wnioski

- trwałość analizowanych form introgressywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea* była uzależniona od lokalizacji doświadczenia polowego. Dziesięć wyselekcjonowanych najlepszych form introgressywnych charakteryzowało się stosunkowo wysoką trwałością w co najmniej jednej lokalizacji (Tabela 3).
- wyselekcjonowano 10 najlepszych form introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* o stosunkowo najwyższej trwałości w woj. warmińsko-mazurskim i 10 – o stosunkowo najwyższej trwałości w Wielkopolsce (Tabela 3).

ekspresja genu *cor14b* na poziomie transkryptu



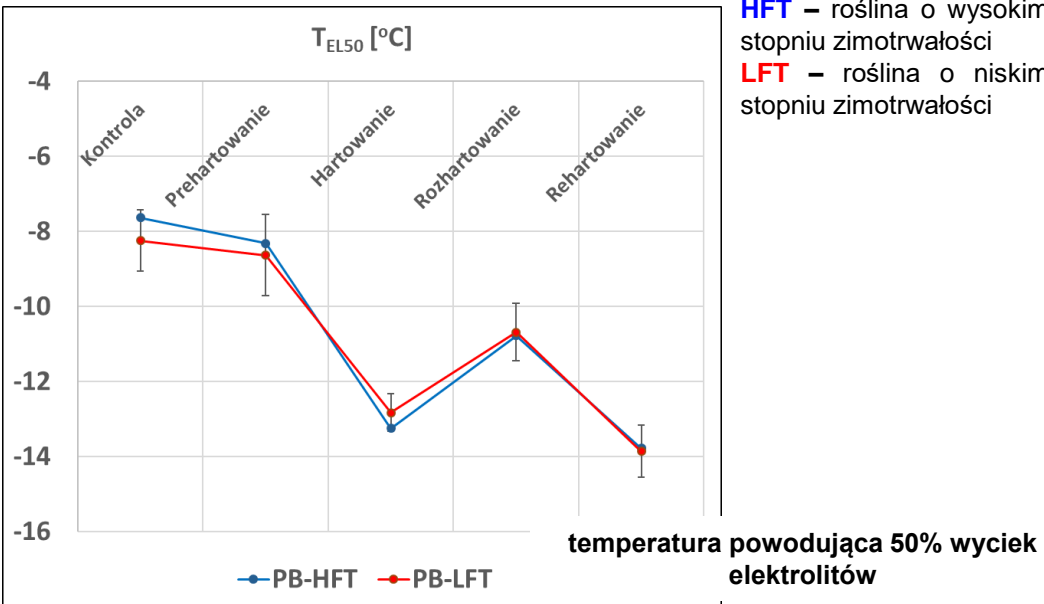
W badaniach uwzględniono 8 form introgressywnych *L. perenne*/*F. pratensis* (Tabela 4) i 4 wskaźniki fizjologiczno-molekularne.

Tabela 4.	diploidalne (2x) formy introgressywne	tetraploidalne (4x) formy introgressywne
stosunkowo wysoki poziom zimotrwałości	PB-HFT BC2-HFT	PA-HFT BC3-HFT
stosunkowo niski poziom zimotrwałości	PB-LFT BC2-LFT	PA-LFT BC3-LFT

Analizowane wskaźniki: (1) temperatura powodująca 50% wyciek elektrolitów (T_{EL50}), (2) fluorescencja chlorofilu (maksymalna wydajność fotosystemu II, Fv/Fm), (3) poziom akumulacji transkryptu (RT-qPCR) oraz (4) poziom akumulacji białka (Western blot) Cor14b.

Wnioski

- dynamika parametru T_{EL50} była związana z warunkami środowiskowymi (temperatura), w których uprawiane były rośliny w fitotronie, w układzie: kontrola, prehartowanie, hartowanie, rozhartowanie i rehartowanie. Jednak poziom mrozoodporności większości analizowanych roślin w warunkach fitotronowych nie odzwierciedlał różnic w poziomie ich zimotrwałości w polu.
- profile T_{EL50} i Fv/Fm w warunkach oscylującej temperatury środowiska były charakterystyczne i odmienne dla każdej z analizowanych grup form introgressywnych.
- ekspresja genu *Cor14b* na poziomie transkryptu wzrastała w warunkach hartowania na mróz i w warunkach ponownego hartowania po okresie ekspozycji roślin na działanie wyższej, rozhartowującej temperatury środowiska zewnętrznego.
- wzór ekspresji *Cor14b* jest dobrym wskaźnikiem zdolności roślin do hartowania się w warunkach niskiej temperatury. Jednak różnice w poziomie akumulacji transkryptu nie zawsze w sposób bezpośredni odzwierciedlają różnice w poziomie mrozoodporności badanych form introgressywnych.



HFT – roślina o wysokim stopniu zimotrwałości
LFT – roślina o niskim stopniu zimotrwałości

Masa Tysiąca Nasion (MTN)***L. perenne/F. pratensis* (2x) - 1,051 g*****L. perenne/F. pratensis* (4x) - 3,408 g*****L. multiflorum/F. arundinacea* (4x) - 3,819 g****Wnioski**

- wykazano zróżnicowanie w MTN oraz w zdolności nasion do kiełkowania (tzn. w udziale siewek normalnych i nienormalnych po skielkowaniu nasion oraz w udziale nasion martwych) pomiędzy badanymi grupami roślin. Potwierdzono istotną korelację pomiędzy MTN, a udziałem siewek normalnych po skielkowaniu nasion.
- mieszance *L. multiflorum /F. arundinacea* charakteryzowały się niższą zawartością białka ogólnego oraz wyższą zawartością włókna surowego, tłuszczu surowego, węglowodanów rozpuszczalnych w suchej masie w porównaniu do *F. arundinacea* odm. Kord. Z kolei pasza *L. multiflorum /F. arundinacea* charakteryzowała się niższą strawnością, wartością energetyczną i białkową oraz wyższą wartością wypełnieniową w porównaniu do odm. Kord.

- diploidalne mieszance *L. perenne/F. pratensis* charakteryzowały się pośrednią zawartością białka ogólnego, włókna surowego, wyższą zawartością węglowodanów rozpuszczalnych i tłuszczu surowego w suchej masie w porównaniu z odmianami *L. perenne* (Bajka) i *F. pratensis* (Pasja). Pod względem zawartości podstawowych dla traw składników pokarmowych (białka ogólnego i włókna surowego) mieszance były bardziej zbliżone do *L. perenne* niż do *F. pratensis*. Z kolei pasza *L. perenne/F. pratensis* charakteryzowała się pośrednią wartością energetyczną, białkową ze względu na podaż azotu oraz wypełnieniową pomiędzy odm. Bajka i odm. Pasja. Jednocześnie, strawność suchej masy oraz wartość białkowa wyrażona ilością dostępnej w żwaczu energii paszy były wyższe u mieszańców niż u odm. Bajka i Pasja.
- tetraploidalne mieszance *L. perenne/F. pratensis* charakteryzowały się pośrednią zawartością tłuszczu surowego pomiędzy *L. perenne* odm. Solen i *F. pratensis* odm. Pasja, a także wyższą średnią zawartością białka ogólnego oraz niższą zawartością węglowodanów rozpuszczalnych i włókna surowego w suchej masie w porównaniu z *L. perenne* i *F. pratensis*. Pod względem zawartości białka ogólnego i włókna surowego mieszance były bardziej zbliżone do *L. perenne* niż do *F. pratensis*. Pod względem wartości energetycznej paszy, mieszance traw były bardziej zbliżone do *F. pratensis*, natomiast pod względem wartości białkowej, strawności suchej masy i wartości wypełnieniowej – do *L. perenne*.

Zestawiono trzy polikrosy, z których każdy obejmował 15 roślin. W sumie do krzyżowań wykorzystano 45 mieszańców (Tabela 5).

Tabela 5. Zestawienie trzech polikrosów.	
populacja	numery form introgresywnych
<i>L. perenne/F. pratensis</i> (2x)	PB1-1, PB1-2, PB1-3, PB1-4, PB1-7, PB1-8, PB1-9, PB1-10, PB1-13, PB1-14, PB1-15, BC2-2, BC2-7, BC2-11, BC2-15
<i>L. perenne/F. pratensis</i> (4x)	PA1-1, PA1-3, PA1-5, PA1-6, PA1-7, PA1-8, PA2-1, PA2-2, PA2-3, PA2-5, PA2-12, PA2-14, PA2-21, BC3-23, BC3-28
<i>L. multiflorum/F. arundinacea</i> (4x)	185/4/7, 185/4/8, 185/4/16, 185/4/21, 185/4/22, 185/4/27, 185/4/28, 185/4/31, 185/4/34, 185/4/59, 185/6/7, 185/6/9, 185/6/17, 185/6/57, 185/10/58

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

**Część wyników badań uzyskanych w latach 2021-2022
zaprezentowano na VI Polskim Kongresie Genetyki w Krakowie, 27-30.06.2022r., (plakat).**

“Drought tolerance and winter-hardiness in *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* hybrids”.

D. Perlikowski, K. Lechowicz, I. Pawłowicz, G. Żurek, M. Rapacz, E. Paszkowski, K. Szwarc, W. Zwierzykowski, A. Kosmala

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
Temat badawczy nr 1			
1.1	Liczba genotypów badanych pod kątem zimotrwałości	664	664
1.2	Liczba wyselekcjonowanych mieszańców o najwyższym stopniu zimotrwałości	40	40
Temat badawczy nr 2			
2.1	Wyjściowa liczba mieszańców poddana testom „pod daszkami”	534	534
2.2	Liczba wyselekcjonowanych mieszańców o najwyższym stopniu tolerancji suszy i/lub regeneracji po nawodnieniu	40	40
Temat badawczy nr 3			
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
Temat badawczy nr 4			
4.1	Liczba mieszańców, dla których wyznaczone zostaną fizjologiczno-molekularne markery mrozoodporności	8	8
4.2	Liczba punktów czasowych, dla których wyznaczone zostaną fizjologiczno-molekularne markery mrozoodporności	5	5
4.3	Liczba analizowanych parametrów fizjologiczno-molekularnych	4	4
Temat badawczy nr 5			
5.1	Liczba form introgresywnych, dla których badane będą parametry związane z jakością paszową	30	30
5.2	Liczba analizowanych parametrów związanych z jakością paszową	8	8
5.3	Liczba form introgresywnych, dla których przygotowane zostaną pule zbiorcze nasion	30	30
5.4	Liczba analizowanych parametrów związanych z wartością siewną nasion	2	2
Temat badawczy nr 6			
6.1	Liczba populacji mieszańców wykorzystanych w krzyżowaniach	3	3
6.2	Liczba mieszańców wykorzystanych w krzyżowaniach w obrębie trzech populacji	45	45