

University of Life Sciences “King Michael I” from Timișoara
Faculty of Agriculture

DOCTORAL THESIS

INTRASPECIFIC BIOLOGICAL DIVERSITY IN PERENNIAL RYEGRASS (*LOLIUM PERENNE L.*)

ABSTRACT OF PHD THESIS

Scientific Coordinator:
Professor PhD. Samfira Ionel

PhD student
Toporan Ramona Loredana

Timișoara

2024

Table of Contents

Introduction

The importance and topicality of the topic

The motivation for choosing the theme

Part I: THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Chapter 1. Morphology, biology and ecology of *Lolium perenne* L.

Chapter 2. Dynamics of biological development. Dynamics of the chemical composition in the species *Lolium perenne* L.

Part II: OWN RESEARCH

Chapter 3. MATERIAL AND STUDY METHODS

Chapter 4. RESULTS AND DISCUSSIONS

4.1. Analysis of the impact of altitude on some morphological traits in *Lolium perenne*

4.2. Dynamics of biological growth according to abiotic conditions in the *Lolium perenne* species

4.3. Antimicrobial activity of *Lolium perenne* species selected from different geographical areas

Part III. GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

PART IV. ELEMENTS OF ORIGINALITY

Introduction

The work represents a research study that falls within the main concerns of the department of Grassland and Forage Crops within the Faculty of Agriculture of the U.S.V. King Mihai I of Timișoara to increase the variability of the germplasm in the main fodder species cultivated alongside the increase in the cultivation area in other species of interest.

Thus, the current research aims to collect biological material (hereafter referred to as local prevention) from areas with high degrees of abiotic factors and to establish a germplasm collection of the species *Lolium perenne* L.

Due to the fact that ryegrass is one of the most present species in breeding programs at European level, the creation of a genetic diversity that ensures for the breeding process a germplasm source with high variability is a constant concern of research institutes and stations.

Starting from these considerations, the main objective of the research activity was to create a germplasm collection represented by local origins that would ensure a source of attractive intraspecific genetic variability for the breeding process. Another objective of the study of intraspecific biological diversity was represented by the evaluation of the antimicrobial activity of different ryegrass extracts against Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi, and the prebiotic potential of these extracts was also evaluated.

The importance and topicality of the topic

The genetic resources represented by spontaneous natural populations constitute valuable genetic material for breeders of fodder species, for which adaptation to agricultural and environmental conditions are fundamental factors of biodiversity. However, the size of genetic resource collections often limits their distribution, optimal use, and sometimes conservation. In this context, the main motivation of the research was the creation of a germplasm collection represented by local sources that would ensure a source of attractive genetic variability for the breeding process.

The level and distribution of genetic variation in genbank ecotype collections is still largely unknown, but is of great interest for planning breeding programs. The yield and nutritional value of perennial forage plants are determined by genetic factors (forage plant species and variety), environmental factors (climatic and meteorological conditions), soil type, fertilization level, grazing and cutting management. Improvements in drought tolerance are limited because currently used species must maintain root contact with water to survive.

Varieties with a deeper root system are recommended, which can better exploit the water available in the soil. Selecting cultivars that are drought tolerant and then grow quickly when it rains may be the best initial approach. Unfortunately, there is little information on the growth physiology of *Lolium perenne* species under grazing conditions, with or without water stress, and this should be an active area for research. Achieving a high breeding yield has led to a trend in modern perennial ryegrass genetic lines for a lower density sorting of larger cobs. Management options currently used to address this include conservation of excess forage as ensiling, pre- or post-grazing, or mechanical mowing.

The motivation for choosing the theme

Currently, it is considered necessary to improve forage species by increasing nutritional quality, improved ecological adaptation, efficiency in the use of nutrients, water and disease resistance, which are predominantly quantitative traits. By using the biological material of perennial ryegrass collected from areas with extremely valuable interspecific diversity, the biological diversity of the morphoproductive characters at the intraspecific level was analyzed.

After the analysis of these characters, we moved on to the selection of elite forms and to the evaluation of their biological response to abiotic factors or major limiting factors. It was mainly tested the biological behavior of the perennial ryegrass under the current conditions of climate change mainly through the prism of the amounts of temperatures and precipitation that the plant had at its disposal.

Prebiotic evaluation was also performed by investigating the possibility of *Lolium perenne* extracts to function as prebiotics, supporting the growth and activity of selected probiotic strains. Tests included evaluation of changes in bacterial growth and metabolic activity of lactobacilli in the presence of the extracts. It is known that ryegrass is one of the most present species in breeding programs at the European level, which makes it problematic to create a genetic diversity that would provide a source of valuable germplasm for the breeding process. Furthermore, this species is in the breeding process of the A.S.A.S. research network. as well as the profile laboratory within Lovrin Agricultural Research and Development Station where recently valuable cultivars such as Timiș 81 and Lovrin 21 have been created.

Part I: THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Chapter 1. Morphology, biology and ecology of *Lolium perenne* L.

In the first chapter, information from the specialized literature is presented that refers to the following aspects related to the spread, ecology and genetics of the species. Also, information is provided regarding the peculiarities of perennial ryegrass as a fodder and biomass resource, its behavior in different pedo-climatic conditions. This chapter also presents the objectives and limits of the breeding process through the lens of the genetic resource provided by perennial ryegrass.

Chapter 2. Dynamics of biological development. Dynamics of the chemical composition in the species *Lolium perenne* L.

And chapter 2 belongs to the part related to the Current State of Knowledge and refers to the scientific knowledge regarding the study of biological development, genetic potential and progress. A distinct part of the bibliographic research carried out on perennial ryegrass is represented by the problem of improving the quality of forage and current selection methods for this forage species.

Part II: OWN RESEARCH

The part of own research is structured on chapters that refer to the way of organization of research, research materials and methods and own results.

Chapter 3. MATERIAL AND STUDY METHODS

The biological material used in the study came from several collection campaigns, initially consisting of a number of 34 locally sourced *Lolium perenne*. The primary source of collection of these local provenances were the interspecific plant associations that constitute mainly the permanent meadows of Mehedinți County, South-West Oltenia Region.

The localities that constituted the primary source of local provenances of perennial ryegrass were geographically arranged in the following geographical formations: the Almajului Mountains, the Mehedinți Plateau and the Blahniței Plain. Following the annual collection campaigns, a collection field was established in the area of Drobeta Turnu Severin, Mehedinți county, with *Lolium perenne* clones harvested from representative areas of Mehedinți county.

The soil on which the collection of clones was established was chernozion type, the nutrition space for each clone was 1.5 m². After the creation of the collection of clones, biometric measurements related to the biological development of *Lolium perenne* were performed, the measurements being performed weekly, for the 34 clones.

Also, the iconographic material taken from the initial practical ecosystems where the biological material was collected from Mehedinți County are presented.

On the provenances of *Lolium perenne* described in the initial material and then on the progeny obtained through clonal selection from them, numerous observations and analyzes were carried out in the field and in the laboratory, namely:

- the initiation of plants into vegetation;
- the main phenological phases;
- dynamics of growth in height and average height;
- the evolution of the number of siblings per clone;
- the appearance and formation of leaves; leaf surface dynamics.

In the generative stage:

- the development of generative shoots;
- flowering phenology;
- seed production per clone.

Thus, aspects from the establishment stage of the germplasm collection field as well as aspects from the activity of taking experimental data are represented iconographically. The performance of biometric determinations as well as the other research activities that were necessary to fulfill the research objectives were carried out chronologically and respecting the specific BBCH scale, between 00 and 99. In the case of this experiment, the BBCH 31 codes - the first case node were mainly investigated located at least 1 cm above the shoot node; BBCH 37 - the flag leaf is barely visible and still coiled; BBCH 55 - at the appearance of half an inflorescence; BBCH 71 - waxy milk phase, the first grains are half of their final size; respectively BBCH 89 - the ripening is complete and the seed is hard and difficult to split with the fingernail. These codes correspond to the vegetative and generative growth stage of *Lolium perenne*.

Chapter 4. RESULTS AND DISCUSSIONS

4.1. Analysis of the impact of altitude on some morphological traits in *Lolium perenne*

In this subchapter, the influence of the altitude where the *Lolium perenne* clones come from was analyzed on the characters: plant height, number of leaves/shoot, leaf length, leaf width, leaf area/shoot, number of shoots/bush, leaf area/bush.

The provenance of the 34 clones is different in terms of location and implicitly ecological conditions, which led us to the hypothesis that the exposure to different ecological factors of these genotypes is reflected in different responses expressed through some morphological characters. Thus, the ecological factor considered was the altitude of the site of origin of the *Lolium perenne* clones analyzed.

The aim pursued in this subchapter was to identify those morphological characters that were influenced by the altitude from which the clones of *Lolium perenne* were collected according to the different moments in which the observations were made. The dynamics of some characters relevant to biomass production during the growing season were also analyzed.

Thus, the objectives of this chapter were: - determining how the characters that influence forage production correlate with altitude: plant height, number of leaves per shoot, leaf length, leaf width, leaf area/shoot, number of shoots/bush and leaf area/bush at different times of the season of vegetation; - characterization of the dynamics during the growing season of some characters relevant for fodder production.

The observations that were the basis of the research in this chapter consist of biometric measurements performed on morphological characters, respectively: plant height, number of leaves per shoot, leaf length, leaf width, leaf area/shoot, number of shoots/bush and leaf area/bush at different times of the growing season.

The data were collected in stages, respectively on the following dates: May 1, May 15, May 22, May 29 and June 5. The biological material was represented by 34 *Lolium perenne* clones collected from as many locations. The altitudes from which the clones originate are between 49 and 740 m. The locations of origin of the clones are located in three different relief areas, namely the Almăjului Mountains, the Mehedinți Plateau and the Blahniței Plain.

The data on which the observations were made were not associated with particular phenophases because the phenological developmental stage was very different within the 34 clones at the time of data recording.

*Conclusions regarding the influence of altitude on some production characters in *Lolium perenne* in different phenophases:*

- with the advancement in vegetation, the influence of altitude on the number of shoots per bush and the leaf surface on the bush is more and more evident from one determination to another, observing the gradual increase of the Pearson correlation coefficient during the observations made.

- the larger the leaf surface per bush is, it can be stated that the proportion of leaves in the resulting fodder mass is higher, which is a characteristic sought in the selection of genetic material for fodder cultivation because the leaves have the best fodder value of total feed. Also, a large leaf area shows a high photosynthetic capacity and implicitly a greater capacity to recover after grazing or mowing of the plants.

Conclusions regarding the dynamics of some morphological characters in Lolium perenne in different phenophases:

-morphological characters such as the height of the shoots, the number of shoots per bush, the leaf surface per shoot and the leaf surface per bush are important for the selection of clones to obtain new varieties of *Lolium perenne* to be used for different purposes, respectively for fodder, weeding or grass.

-clone C1 Eşelnita has potential for lawns, because it was characterized by a small leaf area, a fact that recommends it for breeding for lawns; Clone 20 Şişeşti has high potential for grazing and weeding due to the large leaf area of the bush. Clones 10 Godeanu and 11 Balta are characterized by a large number of shoots per bush, being recommended for improvement both for lawns and for meadows sown for grazing.

4.2. Dynamics of biological growth according to abiotic conditions in the Lolium perenne species

Dynamics of biological development according to abiotic factors

For the perennial ryegrass, several measurements were made throughout the vegetation period, taking into account the dynamics of the following characters depending on the amounts of precipitation and temperatures accumulated by the plant: plant height, number of shoots, number of active leaves, leaf surface of the shoot and clone expressed in cm².

The measurements associated with the five BBCH development codes were carried out when the perennial ryegrass elites accumulated the following gradations of climatic factors: the amount of precipitation was between 62.5 and 196.4 mm, and the sum of temperatures between 454.1 and 1061,8 0C.

Depending on the bioaccumulations of the essential life factors (the sum of accumulated precipitation and temperatures), the increase in height and dimensions of the leaf, especially its length, was estimated. For this, both the experimental data and the regression lines associated with them were represented in the same coordinate system.

The mathematical interpretation of the slopes of the lines represents the growth rate, which practically determines the influence of precipitation or temperatures on the studied characters.

The biological growth of the selected elites from the Mountain Zone - Almajului Mountains.

5 local provenances were collected from the Almajului Mountains area, namely: Eşelniţa, Eibenthal, Dubova, Şviniţa and Mraconia. The altitudinal difference of the collection area is between 86 m from the Eşelniţa source and 740 m from the Mraconia source. The main type of soil is the districambosol typical for Eşelniţa, the eutricambosol typical for Eibenthal and Dubova along with luvosol and alluviosol for Şvinita and Mraconia.

As can be seen, the topography is extremely diverse, starting from 86 meters up to a maximum of over 700 meters, which primarily produces an edaphic differentiation without identifying a common soil type for the five localities where the biological material was collected. The analysis of the biological response during the period of maximum growth of the 5 origins is differentiated. Thus, two of them have a maximum increase in height at the accumulation of 10 0C, namely the Eibenthal and Mraconia provenances by 0.45 cm.

Biological growth of selected elites from the Mehedinţi Plateau Area

A number of 18 local provenances were collected from the Mehedinţi Plateau area, namely: Bârda, Bobaita, Bîlvăneşti, Şiroca, Godeanu, Balta, Sfodea, Prejna, Govorniţa, Isverna, Turbata, Ponoarele, Cerna Vârf, Ilovăţ, Şişeşti, Ciovârnoşani, Izvorul Bârzii and Breznita Bypass. The altitudinal difference of the collection area is between 104 m from the source of Izvorul Bârzii and 654 meters from the source of Godeanu. As the dominant soil type of the collection area, the typical districambosol soil with a predominant disposition on even and short slopes is distinguished this time. They are also found as soil types: eutric regosol, alluviosol, luvosol, preluvosol, eutricambosol and gleosol.

The analysis of the biological response to temperature accumulation during the period of maximum growth of the 18 provenances under the conditions of the Mehedinți Plateau is differentiated. The maximum increase in height according to temperature was recorded at the Gornovița and Ponoarele provenances with 0.48-0.50 cm, followed in value by the provenances collected from Bâlvănești 0.43 cm, Sfodea 0.42 and Prejna with 0.41 cm increase upon accumulation of 10 0C. The origins of Gornovița and Ponoarele are distinguished, where the increase in height is also associated with an increase in leaf length of 0.079 cm at the accumulation of 10 0C.

The influence of precipitation on the dynamics of the growth in height of the collected sources is extremely differentiated. It can be seen that with the accumulation of ten mm of precipitation, the minimum increase of 0.09 cm is recorded at the source of Barda. The maximum increases exceeding 0.9 cm are recorded at the Gornovița and Turbata provenances, followed by the Ponoarele provenance with 0.84 cm.

Biological growth of selected elites from the Blahnița Plain Zone.

From the Câmpia Blahniței area, 11 local provenances were collected, namely: Rogova, Vânjulet, Cioroboreni, Dănceu, Jiana, Gogoșu, Scăpău, Devesel, Burila Mare, Vrâncea and Batoți. The altitudinal difference of the collection area is between 49 m from Vrâncea and 120 meters from Scapău. Thus, the altitudinal difference specific to low plain areas is noted where usually the plant associations are built up by spontaneous associations of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*.

The dominant soil type of the collection area is not individualized, thus meeting several types of soil, namely: psamosol, preluvosol, alluviosol and gleisol. The analysis of the biological response to temperature accumulation during the period of maximum growth of the 11 provenances in the conditions of the Blahnița Plain revealed a maximum growth in the Cioroboreni and Burila Mare provenances between 0.48-0.56 cm at the accumulation of 10 0C. The increase in height is associated with an increase in leaf length between 0.060-0.069 cm.

Analysis of biological growth according to abiotic factors by ANOVA test

Two-way ANOVA analysis of variance

Thus, two characters were mainly analyzed, namely the increase in height at the accumulation of 10 0C (cm) expressed as a function of the altitudinal difference in order to identify the existence of some links between the previously stated characters.

From the analyzed data it can be seen that the values of the ANOVA coefficient F, had a large dispersion area, being between 1.00 and 11.97, and the values of the critical coefficient F_{crit} have a much more grouped distribution with values between 2.4 and 4.54. From the analysis of the significance level P we note that it is 0.49 and is above the significance value (0.05), in this case it can be hypothesized that there are no significant differences between the averages of the groups of investigated characters.

One-way ANOVA analysis of variance

To test the presence of a significant link between the biological growth of the selective elites and the main growth factors precipitation and temperatures, the one-way ANOVA test was also used. I chose this type of test because it has the ability to test two groups of experimental data to identify the connection between their means. One-way ANOVA analysis of variance on the interdependence between the biological growth of perennial ryegrass in height and the characteristics of the leaf system at 10 0C accumulation was statistically demonstrated. In this case, the significance value of P is 0.040, this value rejects the null hypothesis and statistically assures us of the existence of a significant interdependence between the dynamics of leaf dimensions and temperature accumulation.

4.3. Antimicrobial activity of *Lolium perenne* species selected from different geographical areas Perennial ryegrass was characterized as a potential antimicrobial agent against Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi, and the prebiotic potential of these extracts was also evaluated. For this purpose, various extracts were tested to determine their antimicrobial efficacy, to evaluate the synergistic effect between lactobacilli and plant extracts and their potential to be used in therapeutic or conservation applications.

Evaluation of antimicrobial activity: *Lolium perenne* extracts were prepared and tested against a spectrum of pathogenic microorganisms, including Gram-positive bacteria (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Listeria monocytogenes, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*), Gram-negative bacteria (*Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae type B*) and fungi (*Candida parapsilopsis* and *Candida albicans*). Following initial testing, three strains of lactobacilli (*Bifidobacterium lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* DG) with high probiotic potential were selected.

These strains were identified based on their ability to survive simulated gastrointestinal conditions and adhere to intestinal epithelial cells. Potentiation of activity was achieved both individually and as a mixture of strains. The strains of *Bifidobacterium lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* were potentiated either individually or in mixtures with the extracts of *Lolium perenne*. The aim of this potentiation was to evaluate the synergistic effect between lactobacilli and plant extracts, in order to improve the antimicrobial activity and prebiotic properties. Extracts of *Lolium perenne* spp. (LP) were obtained within the Laboratory of Physical-Chemical Analysis within the Interdisciplinary Research Platform.

The aerial parts of the investigated perennial ryegrass elites (codes given according to records in the Interdisciplinary Research Platform: 60C/1, 60C/2, 60C/3, 60C/4 and 60C/5) were collected during the period according to the BBCH code 69 (end flowering stage, all spikelets have flowered, some dry anthers may remain) from the collection field of S.C.D.A. Lovrin.

The correspondence used was the following: -Mraconia (elite/family number 5) – correspondence – 60C/1; -Gornovița (elite/family number 6) – correspondence – 60C/2; -Ponoarele (elite/family number 7) – correspondence – 60C/3; -Cioroboreni (elite/family number 8) – correspondence – 60C/4; -Burila Mare (elite/family number 9) – correspondence – 60C/5.

Antibacterial activity of *Lolium perenne* extracts on Gram-negative bacteria

The perennial ryegrass extracts taken in the study showed positive values of BIR% of *P. aeruginosa* strains different from one extract to another, depending on the tested concentration, but which are on an upward slope. As the concentration increases, namely to 65 µg/mL, the BIR% value becomes positive for 60C/2, 60C/3 and 60C/4, but not for 60C/5. The 60C/5 extract obtained from elite 9 from Burila Mare determines positive values of BIR% starting with the concentration of 265 µg/mL.

Antimicrobial activity, expressed as BIR% of *Lolium perenne* extracts against *S. flexneri* strains reveals that the lowest concentration with antimicrobial effect against this strain is 130 µg/mL attributed again to extract 60C/5 (obtained from elite 9 provenance of Burila Mare). Antimicrobial activity of *Lolium perenne* extracts against *E.coli* strains revealed, with the exception of the 60C/5 extract, that an increase in concentration for each individual extract led to an increase in BIR% values.

BIR% values obtained by testing extracts of *Lolium perenne*, at different concentrations, against *S. typhimurium* strains, noting that, except for extract 60C/1, all other extracts show BIR% values that fall on a downward slope once with increasing concentrations. Similar to the antibacterial activity against *S. typhimurium* strains, and in the case of *H. influenzae* strains, extracts of *Lolium perenne* determine values of BIR% that fall on a downward slope as the tested concentrations increase.

Antibacterial activity of *Lolium perenne* extracts on Gram-positive bacteria

Antimicrobial activity against *S. pyogenes* strains is observed at concentrations greater than or equal to 65 µg/mL for extract 60C/1, 525 µg/mL for extract 60C/2, 130 µg/mL for 60C/3, 265 µg/mL mL for 60C 4 and 60C/5. Antimicrobial activity against *S. aureus* strains showed antibacterial efficacy at different concentrations from one extract to another, with BIR% values falling on an upward slope, except for extract 60C/2.

The dynamics of BIR% values of *L. monocytogenes* strains using *L. perenne* extracts at different concentrations notes that this bacterial strain is the most sensitive. The antimicrobial efficacy against the *B. cereus* strain was highlighted by BIR% values that varied between - 22.07% and 22.01% for 60C/1; -27.27% and 44.45% for 60C/2; - 26.23% and 27.75% for 60C/3; -20.19% and 44.98% for 60C/4; -28.23% and 35.41% for 60C/5. The strains of *Cl. perfringens* are sensitive only to the maximum concentration tested, namely 1055 µg/mL, except for sample 60C/5 which appears to have antimicrobial activity against this anaerobic Gram-positive strain starting at the concentration of 525 µg/mL.

Antifungal activity tested on strains of *Candida* spp.

The extracts of *Lolium perenne* 60C/2 and 60C/4 show antifungal activity against the *C. parapsilosis* strain, starting with the concentration of 30 µg/mL, a fact demonstrated by positive RIM% values. Against the *C. albicans* strain, all *L. perenne* extracts, except 6C/5, demonstrated antifungal activity starting at 30 µg/mL, with RIM% values ranging from 0.34% to 11.86%. Potentiating activity on selected strains of probiotics

The synergistic action of *Lolium* extracts on the strain of *Bifidobacterium lactis* presented a potentiating picture, 4 of the 5 extracts causing bacterial growth in positive correlation with the increase in the tested concentration of the extract. The 60C/4 sample is the only one found in negative correlation with the increase in concentration, the maximum value obtained, that of 144.78% being correlated with the lowest concentration tested, while the maximum concentration tested demonstrating an effectiveness of 76.87%.

This fact denotes the existence of an antagonism between the constituents of the 60C/4 extract and the bacterial components of *Bifidobacterium lactis*. Sample 60C/5 shows values similar to the results obtained in the case of sample 60C/3. The expression of the synergistic action of the LP extracts on the *Lactobacillus casei* strain, using RPB% values, is supported by high RPB% values obtained in the case of the maximum tested concentrations. Thus the effectiveness of the tested samples analyzed through the prism of RPB% presents the following ascending order: 60C/1 < 60C/5 < 60C/2 < 60C/3 < 60C/4.

Determination of the energy value (proximate composition) of perennial ryegrass elites

In expressing the approximate energy of perennial ryegrass elites, the following elements were determined: humidity, ash, lipid, protein and carbohydrate content. The ash content varied from 6.36% in the Mraconia elite - sample 1 to 10.31% in the Ponoarele elite - sample 3, with an average value of 7.44%. The lipid content varied between 2.66 g/100 g in the Burila Mare elite - sample 5 and 3.30 g/100 g in the Mraconia elite - sample 1.

The protein content had a minimum value in the case of the Ponoarele elite - sample 3 and the maximum value in the case of the Cioroboreni elite - sample 4. The value of carbohydrates highlights elite 1 Mraconia and elite 2 Gornovita with values of 70.15 and 72.14, the other three elites have a close content of carbohydrates between 68.51 and 69.70, overall all five elites have close values.

Determination of the content of polyphenols in perennial ryegrass elites

From the results obtained for the 5 extracts, the highest content of total polyphenols was recorded for sample 4 from the Cioroboreni elite (10347.71 mg GAE/kg), and the lowest for sample 5 obtained from the Burila Mare elite (8559.99mg GAE/kg).

Determination of antioxidant properties

According to the values obtained after the test, it can be stated that the highest radical scavenging activity was observed at the maximum concentration (8.00 mg/mL) for all perennial ryegrass elites. Also, that the highest inhibition percentage belongs to sample 2 obtained from the Gornovița elite with 79.57%, followed by sample 4 Cioroboreni elite with 73.21%, sample 1 Mraconia elite with 71.80%, sample 5 Burila Mare elite with 65.36 % and sample 3 elite Ponoarele with 61.86%.

Determination of calcium (Ca) and phosphorus (P) content

The highest concentration of Ca is present in the extract from sample 1 or the Mraconia elite (3268.636 ppm) and the lowest from sample 4 the Cioroboreni elite (1351.121 ppm). The P concentration varies between 919,731 ppm obtained in sample 3 Ponoarele elite and 2404,933 ppm which was the highest concentration found in sample 4 Cioroboreni elite. The overall analysis of the results obtained from the determination of the proximate composition of perennial ryegrass elites reveals that the selection of these elites as parents in the selection process will ensure the obtaining of cultivars that produce fodder with sufficient amounts of soluble sugars to be released in the rumen to ensure good digestion of feed.

Also, the relatively high content of soluble carbohydrates makes the newly created varieties provide the prerequisites for obtaining a quality feed. Under the conditions of environmentally friendly technology, the creation of cultivation with a high carbohydrate content will ensure a 2:1 ratio of carbohydrates to crude protein, which will optimize the use of nitrogen in the rumen of animals, while also ensuring an increase in the percentage of feed conversion in animal product.

We can believe that the interest in perennial ryegrass will be more and more evident due to the clarified elements and through this study that contribute to the understanding of the interactions of this species with the environment.

Part III. GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

The comparative analysis of the intraspecific diversity of the biological material collected from the three collection areas followed the dynamics of the biological growth of perennial ryegrass under the influence of temperatures and precipitation. From the analysis of the biological growth of the provenances collected from area 1 of the Almaj Mountains, area 2 of the Mehedinti Plateau and area 3 of Blahniței Plain, the local provenances of Eibenthal, Mraconia, Gornovița, Ponoarele, Cioroboreni and Burila Mare stand out.

The biological growth of the provenances collected from area 3 Câmpia Blahniței highlighted the maximum growth of the Cioroboreni and Burila Mare provenances between 0.48-0.56 cm at the accumulation of 10 0C. In other words, height growth in perennial ryegrass is usually associated with the development of the leaf apparatus.

The obtained results revealed a better adaptation of the biological material from the Blahniței Plain area compared to that collected from the plateau area or the mountain area. The importance of knowing the impact of life factors is also supported by several specialist studies.

The evaluation of the antimicrobial activity of different extracts of *Lolium perenne* against some Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi as well as the evaluation of the prebiotic potential of these extracts indicated a significant antimicrobial activity against some Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as against some fungi, suggesting their potential as natural antimicrobial agents.

Furthermore, combining these extracts with selected lactobacilli strains has shown promise in the development of prebiotic and probiotic synergies, paving the way for innovative therapeutic uses.

In the future, increasing the participation in animal feed of perennial ryegrass varieties obtained from the Gornovița and Ponoarele elites/families will improve the internal microbial balance, ensuring adequate activity of the gastrointestinal system.

The future probiotic action of perennial ryegrass is considered beneficial for restoring the flora of the digestive tract, thus becoming important for the general health of the animal body. We can believe that the interest in perennial ryegrass will be more and more evident due to the clarified elements and through this study that contribute to the understanding of the interactions of this species with the environment.

PART IV. ELEMENTS OF ORIGINALITY

The degree of novelty and originality of this research consists in the approach to the research, especially by testing the behavior of perennial ryegrass to abiotic factors or current major restrictive factors in terms of biological development.

Modeling the biological development of aristat ryegrass according to temperature and precipitation allowed the selection of elites with maximum growth at the same unit of measurement in terms of current climate shifts.

The evaluation of the antimicrobial activity of different perennial ryegrass extracts against some Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi as well as the evaluation of the prebiotic potential of these extracts was considered particularly important in clarifying the antimicrobial potential. In practice, these observations may influence how extracts are formulated and used in antimicrobial and probiotic applications.

We recommend for future improvement studies with the objective of maximizing the antibacterial effect the selection as parental forms of elite 8 Cioroboreni with code 60C/4 and elite 9 Burila Mare 9 with code 60C/5.

We recommend for breeding with the aim of obtaining cultivation with a high probiotic effect to use parental forms obtained from the descendants of elite 6 Gornovița with code 60C/2 and elite 7 Ponoarele 60C/3.

We believe that this study is very important because in the future, global climate change will produce decreases in agricultural production, due to the lack of water during plant growth. To overcome this problem, a genetic improvement of drought tolerance is needed through the creation and expansion in culture of new varieties.

Universitatea de Științele Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara
Facultatea de Agricultură

TEZĂ DE DOCTORAT

DIVERSITATEA BIOLOGICĂ INTRASPECIFICĂ LA
RAIGRASUL PEREN (*LOLIUM PERENNE* L)

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător Științific
Prof.dr.ing. Samfira Ionel

Doctorand
Toporan Ramona Loredana

Timișoara

2024

Cuprins

Introducere	pg.3
Importanța și actualitatea temei	pg.3
Motivația alegerii temei	pg.3
Partea I: STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
Capitolul 1. Morfologia, biologia și ecologia speciei <i>Lolium perenne</i> L.	pg.44
Cap.2. Dinamica dezvoltării biologice. Dinamica compoziției chimice la specia <i>Lolium perenne</i> L.	pg.4
Partea a II-a: CERCETĂRI PROPRII	
Capitolul 3. MATERIAL ȘI METODE DE STUDIU	pg.4
Capitolul 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	pg.5
4.1. Analiza unor caractere de producție la specia <i>Lolium perenne</i> din diferite perspective	pg.5
4.2. Dinamica creșterii biologice în funcție de condițiile abiotice la specia <i>Lolium perenne</i>	pg.6
4.3. Activitatea antimicrobiană a speciei <i>Lolium perenne</i> selectată din diferite areale geografice	pg.7
Partea III. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	pg.9
PARTEA IV. ELEMENTE DE ORIGINALITATE	pg.10

Introducere

Lucrarea reprezintă o cercetare care se încadrează în preocupările principale ale disciplinei de Cultura pajiștilor și a plantelor furajere din cadrul Facultății de Agricultură a U.S.V. Regele Mihai I din Timișoara de a crește variabilitatea germoplasmei la principalele specii furajere cultivate alături de creșterea arealului de cultură la alte specii de interes.

Astfel, cercetarea de față își propune colectarea de material biologic (denumit în continuare proveniență locală) din zone cu graduări accentuate ale factorilor abiotici și înființarea unei colecții de germoplasma la specia *Lolium perenne* L. Datorită faptului că raigrasul aristat este una dintre cele mai prezente specii în programele de ameliorare la nivel European crearea unei diversități genetice care să asigure pentru procesul de ameliorare o sursă de germoplasma cu variabilitate ridicată este o preocupare constantă a institutelor și stațiunilor de cercetare.

Plecând de la aceste considerente obiectivul principal al activității de cercetare a fost acela de a crea o colecție de germoplasma reprezentată de proveniențe locale care să asigure o sursă de variabilitate genetică intraspecifică atractivă pentru procesul de ameliorare.

Un alt obiectiv de studiu a diversității biologice intraspecifice a fost reprezentat de evaluarea activității antimicrobiene a diferitelor extracte de raigra speren împotriva unor bacterii de tip Gram-pozitive, Gram-negative cât și fungi, de asemenea a fost evaluat și potențialul prebiotic al acestor extracte.

Importanța și actualitatea temei

Resursele genetice reprezentate de populațiile spontane naturale, constituie materiale genetice valoroase pentru amelioratorii de specii furajere, pentru care adaptarea la condițiile agricole și de mediu sunt factori fundamentali ai biodiversității.

Totuși, mărimea colecțiilor de resurse genetice limitează adesea distribuția lor, utilizarea optimă, și uneori conservarea. În acest context motivația principală a cercetării a fost crearea o colecție de germoplasma reprezentată de proveniențe locale care să asigure o sursă de variabilitate genetică atractivă pentru procesul de ameliorare.

Nivelul și distribuția variației genetice în colecțiile de ecotipuri ale băncilor genetice sunt încă în mare parte necunoscute, dar sunt de mare interes pentru planificarea programelor de ameliorare.

Randamentul și valoarea nutritivă a plantelor furajere perene sunt determinate de factorii genetici (specii de plante furajere și varietate), factorii de mediu (condițiile climatice și meteorologice), tipul solului, nivelul de fertilizare, pășunatul și gestionarea tăierii.

Îmbunătățirea toleranței la secetă este limitată, aceasta pentru că speciile utilizate în prezent trebuie să mențină contactul rădăcinilor cu apa pentru a supraviețui. Sunt recomandate soiuri cu sistem radicular mai adânc, care să poată exploata mai bine apa disponibilă în sol. Selecția cultivarelor care rezistă la secetă și apoi cresc rapid când plouă, poate fi cea mai bună abordare inițială. Din păcate, sunt puține informații despre fiziologia creșterii speciei *Lolium perenne* sub condiții de pășunat, cu sau fără stresul apei, iar aceasta ar trebui să fie o zonă activă pentru cercetare. Obținerea unui randament de creștere ridicat, a dus la o tendință a liniilor genetice perene moderne de raigras, pentru sortarea cu o densitate mai mică a cositoarelor mai mari. Opțiunile de gestionare folosite în prezent pentru a aborda acest lucru, includ conservarea furajelor în exces ca însilozare, pre-sau postpășunare, ori cositul mecanic.

Motivația alegerii temei

În prezent se consideră că este necesară o îmbunătățire a speciilor furajere prin creșterea calității nutriționale, o adaptare ecologică îmbunătățită, o eficiență în utilizarea substanțelor nutritive, a apei și a rezistenței la boli, care sunt trăsături predominant cantitative.

Prin utilizarea materialului biologic de raigras peren colectat din zone cu diversitate interspecifică extrem de valoroasă a fost analizată diversitatea biologică a caracterelor morfoproductive la nivel intraspecific. După analiza acestor caractere s-a trecut la selecția formelor elită și la evaluarea răspunsului biologic al acestora la factorii abiotici sau factori restrictivi majori. A fost testat în principal comportamentul biologic al raigrasului peren în condițiile actuale de schimbări climatice în principal prin prisma cantitățile de temperaturi și precipitații pe care planta le-a avut la dispoziție.

De asemenea, s-a realizat și evaluarea prebiotică s-a realizat prin investigarea posibilității extractelor de *Lolium perenne* de a funcționa ca prebiotice, susținând creșterea și activitatea tulpinilor de probiotice selectate. Testele au inclus evaluarea modificărilor în creșterea bacteriană și activitatea metabolică a lactobacililor în prezența extractelor.

Este cunoscut faptul că raigrasul aristat este una dintre cele mai prezente specii în programele de ameliorare la nivel European ceea ce face problematică crearea unei diversități genetice care să asigure pentru procesul de ameliorare o sursă de germoplasmă valoroasă. Mai mult, această specie se regăsește în procesul de ameliorare al rețelei de cercetare A.S.A.S. cât și a laboratorului de profil din cadrul S.C.D.A. Lovrin unde în ultima perioadă au fost create cultivare valoroase cum sunt Timiș 81 și Lovrin 21.

Partea I: STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Capitolul 1. Morfologia, biologia și ecologia speciei *Lolium perenne* L.

În primul capitol sunt prezentate informații din literatura de specialitate care fac referire la următoarele aspecte legate răspândirea, ecologia și genetica speciei. De asemenea, sunt redate informații privind particularitățile raigrasului peren ca resursă furajeră și de biomasă, comportarea acestuia în diferite condiții pedo-climatice. Acest capitol prezintă de asemenea obiectivele și limitele procesului de ameliorare prin prisma resursei genetice asigurată de raigrasul peren.

Cap.2. Dinamica dezvoltării biologice. Dinamica compoziției chimice la specia *Lolium perenne* L.

Și capitolul 2 face apartine de parte referitoare la Stadiul actual al cunoașterii și face referire la cunoașterea științifică privind studiul dezvoltării biologice, potențialul și progresul genetic. O parte distinctă din cercetarea bibliografică desfășurată la raigrasul peren este reprezentată de problematica ameliorării calității furajului și metode de selecție actuale la această specie furajeră.

Partea a II-a: CERCETĂRI PROPRII

Partea de cercetări proprii este structurată pe capitole care fac referire la modul de organizare al cercetărilor, materiale și metode de cercetare și rezultate proprii.

Capitolul 3. MATERIAL ȘI METODE DE STUDIU

Materialul biologic utilizat în studiu a provenit din mai multe campanii de colectare fiind constituit inițial dintr-un număr de 34 de proveniențe locale *Lolium perenne*. Sursa primară de colectare a acestor proveniențe locale au fost asociațiile vegetale interspecifice care constituie în principal pașiștile permanente ale județului Mehedinți, Regiunea de Sud-Vest Oltenia. Localitățile care au constituit sursa primară de proveniențe locale de raigras peren au fost dispuse din punct de vedere geografic în următoarele formațiuni geografice: Munții Almăjului, Podișul Mehedinți și Câmpia Blahniței.

În urma campaniilor anuale de colectare a fost înființat un câmp de colecție în zona localității Drobeta Turnu Severin, județul Mehedinți, cu clone de *Lolium perenne* recoltate din zone reprezentative ale județului Mehedinți și anume: Munții Almăjului, Podișul Mehedinți și Câmpia Blahniței. Solul pe care a fost înființată colecția de clone a fost de tip cernoziom, spațiul de nutriție pentru fiecare clonă a fost de 1,5 m².

După realizarea colecției de clone au fost efectuate măsurători biometrice legate de dezvoltarea biologică la *Lolium perenne*, măsurătorile fiind realizate săptămânal, la cele 34 de. De asemenea, materialul iconografic preluat din ecosistemele practice inițiale de unde a fost colectat materialul biologic din județul Mehedinți sunt prezentate detaliat.

Asupra proveniențelor de *Lolium perenne* descrise la materialul inițial și apoi la descendențele obținute prin selecția clonală din acestea au fost efectuate numeroase observații și analize în câmp și laborator și anume: - pornirea în vegetație a plantelor; - principalele faze fenologice; - dinamica creșterii în înălțime și înălțimea medie; - evoluția numărului de frați per clonă; - apariția și formarea frunzelor; dinamica suprafeței foliare. În etapa generativă: -

dezvoltarea lăstarilor generativi; - fenologia înfloritului; - producția de sămânță per clonă. Astfel, în lucrare sunt redată iconografic aspecte din etapa de înființare a câmpului de colecție de germoplasmă cât și aspecte din activitatea de preluare a datelor experimentale.

Efectuarea determinărilor biometrice cât și a celorlalte activități de cercetare care au fost necesare pentru îndeplinirea obiectivelor cercetării au fost desfășurate cronologic cât și respectând scala BBCH specifică, cuprinsă între 00 și 99. În cazul acestei experimentări au fost investigate preponderent codurile BBCH 31 - primul nod cse situează cu cel puțin 1 cm deasupra nodului de lăstarire; BBCH 37 - frunza steag este abia vizibilă și încă înfășurată; BBCH 55 - la apariția unei jumătăți de inflorescență; BBCH 71 - faza de lapte ceară, primele boabe sunt ajunse la jumătate din dimensiunea finală; respectiv BBCH 89 - coacerea este completă iar sămânța este tare și greu de divizat cu unghia. Aceste coduri corespund cu etapa de creștere vegetativă cât și generativă la *Lolium perenne*.

Capitolul 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1. Analiza unor caractere de producție la specia *Lolium perenne* din diferite perspective Astfel, în acest subcapitol s-a analizat influența altitudinii de unde provin clonele de *Lolium perenne* asupra caracterelor: înălțimea plantei, nr frunze/lăstar, lungime frunză, lățime frunză, suprafața foliară/lăstar, număr lăstari/tufă, suprafața foliară/tufă.

Proveniența celor 34 de clone este diferită din punct de vedere al locației și implicit a condițiilor ecologice, ceea ce ne-a condus la ipoteza că expunerea la factori ecologici diferiți a acestor genotipuri se reflectă în diferite răspunsuri exprimate prin intermediul unor caractere morfologice. Astfel, factorul ecologic considerat a fost altitudinea sitului de origine al clonelor de *Lolium perenne* analizate.

Scopul urmărit în acest subcapitol a fost de a identifica acele caractere morfologice care au fost influențate de altitudinea de la care au fost colectate clonele de *Lolium perenne* în funcție de diferite momente în care au fost efectuate observațiile. De asemenea a fost analizată și dinamica unor caractere relevante pentru producția de biomasă pe parcursul sezonului de vegetație.

Astfel, obiectivele acestui capitol au fost:

- determinarea modului în care se corelează cu altitudinea caracterele care influențează producția de furaj: înălțimea plantei, numărul de frunze pe lăstar, lungime frunză, lățime frunză, suprafața foliară/lăstar, număr lăstari/tufă și suprafața foliară/tufă în diferite momente ale sezonului de vegetație;

- caracterizarea dinamicii în cursul sezonului de vegetație a unor caractere relevante pentru producția de furaj.

Observațiile care au stat la baza cercetărilor din acest capitol constă în măsurători biometrice efectuate asupra caracterelor morfologice, respectiv: înălțimea plantei, numărul de frunze pe lăstar, lungime frunză, lățime frunză, suprafața foliară/lăstar, număr lăstari/tufă și suprafața foliară/tufă în diferite momente ale sezonului de vegetație. Datele au fost colectate în etape, respectiv la datele: 1 mai, 15 mai, 22 mai, 29 mai și 5 iunie. Materialul biologic a fost reprezentat de 34 de clone de *Lolium perenne* colectate din tot atâtea locații. Altitudinile de la care provin clonele sunt cuprinse între 49 și 740 m. Locațiile de proveniență a clonelor sunt situate în trei zone de relief diferite, respectiv Munții Almăjului, Podișul Mehedinți și Câmpia Blahniței. Datele la care au fost efectuate observațiile nu au fost asociate cu anumite fenofaze deoarece stadiul de dezvoltare fenologic era foarte diferit în cadrul celor 34 de clone la momentul înregistrării datelor.

*Concluzii privind influența altitudinii asupra unor caractere de producție la *Lolium perenne* în diferite fenofaze:*

- odată cu avansarea în vegetație, influența altitudinii asupra numărului de lăstari pe tufă și a suprafeței foliare pe tufă se manifestă tot mai puternic de la o determinare la alta, observându-se creșterea treptată a coeficientului de corelație Pearson pe parcursul observațiilor efectuate.

- cu cât suprafața foliară per tufă este mai mare se poate afirma că proporția de frunze din masa furajului rezultat este mai mare, ceea ce este un caracter urmărit la selecția de material genetic pentru cultivarea în scop furajer deoarece frunzele au cea mai bună valoare furajeră din totalul furajului. De asemenea, o suprafață foliară mare arată o capacitate fotosintetică ridicată și implicit o capacitate mai mare de refacere după pășunat sau după cosit a plantelor.

*Concluzii privind dinamica unor caractere morfologice la *Lolium perenne* în diferite fenofaze:*

-caracterele morfologice ca înălțimea lăstarilor, numărul de lăstari pe tufă, suprafața foliară pe lăstar și suprafața foliară pe tufă sunt importante pentru selecția unor clone pentru obținerea de noi soiuri de *Lolium perenne* care să fie utilizate în diferite scopuri, respectiv pentru furaj, înierbări sau gazon.

-clona C1 Eșelnița are potențial pentru gazon, deoarece s-a caracterizat prin suprafață foliară mică, fapt ce o recomandă pentru ameliorare pentru gazon; Clona 20 Șișești are potențial ridicat pentru pășunat și pentru înierbări datorită suprafeței foliare mare a tufei. Clonele 10 Godeanu și 11 Balta sunt caracterizate de un număr mare de lăstari pe tufă, fiind recomandate pentru ameliorare atât pentru gazon cât și pentru pajiști semănate pentru pășunat.

4.2.Dinamica creșterii biologice în funcție de condițiile abiotice la specia *Lolium perenne*

Dinamica dezvoltării biologice în funcție de factorii abiotici

La raigrasul peren au fost realizate mai multe măsurători de-a lungul perioadei de vegetație, luându-se în calcul funcție de cantitățile de precipitații și temperaturi acumulate de plantă dinamica următoarelor caractere: înălțimea plantei, numărul de lăstari, numărul de frunze active, suprafața foliară a lăstarului și a clonei exprimată în cm². Măsurătorile asociate celor cinci coduri de dezvoltare BBCH sunt au fost efectuate când eleitele de raigras peren au acumulat următoarele graduări ale factorilor climatici: cantitatea de precipitații a fost cuprinsă între 62,5 și 196,4 mm, iar suma temperaturilor între 454,1 și 1061,8 °C.

În funcție de bioacumulările factorilor esențiali de viață (suma precipitațiilor și a temperaturilor acumulate) a fost estimată creșterea în înălțime și dimensiunile frunzei mai ales lungimea acesteia. Pentru aceasta s-au reprezentat în același sistem de coordonate atât datele experimentale cât și dreptele de regresie asociate acestora. Interpretarea matematică a pantelor dreptelor reprezintă viteza de creștere ceea ce practic determină influența unui precipitații ori a temperaturilor asupra caracterelor studiate.

Creșterea biologică a elitelor selecționate din Zona Montană – Munții Almăjului. Din zona Munților Almăjului au fost colectate 5 proveniențe locale și anume: Eșelnița, Eibenthal, Dubova, Șvinița și Mraconia. Ecartul altitudinal al zonei de colectare este cuprins între 86 m proveniența Eșelnița și 740 metri proveniența Mraconia. Tipul principal de sol este districambosolul tipic pentru proveniența Eșelnița, eutricambosolul tipic pentru Eibenthal și Dubova alături de luvosol și aluviosol pentru Șvinița și Mraconia. După cum se poate observa orografia este extrem de diversă pornind de la 86 metri până la un maxim de peste 700 metri ceea ce produce în primul rând o diferențiere edafică neidentificând un tip de sol comun pentru cele cinci localități de unde a fost colectat materialul biologic.

Analiza răspunsului biologic în perioada de creștere maximă al celor 5 proveniențe este diferențiat. Astfel, două dintre acestea au o creștere maximă în înălțime la acumularea a 10 °C și anume proveniențele Eibenthal și Mraconia cu 0,45 cm.

Creșterea biologică a elitelor selecționate din Zona Podișul Mehedinți

Din zona Podișului Mehedinți au fost colectate un număr de 18 proveniențe locale și anume: Bârda, Bobaița, Bîlvănești, Șiroca, Godeanu, Balta, Sfodea, Prejna, Govornița, Isverna, Turbata, Ponoarele, Cerna Vârf, Ilovăț, Șișești, Ciovârșani, Izvorul Bârzii și Breznița Ocol. Ecartul altitudinal al zonei de colectare este cuprins între 104 m proveniența Izvorul Bârzii și 654 metri proveniența Godeanu. Ca tip dominant de sol al zonei de colectare se distinge de data aceasta solul de tip districambosol tipic cu o dispoziție preponderentă pe versanți uniformi și scurți. Se mai întâlnesc ca tipuri de sol: regosol eutric, aluviosol, luvosol, preluvosol, eutricambosol și gleiosol.

Analiza răspunsului biologic la acumularea de temperatură în perioada de creștere maximă al celor 18 proveniențe în condițiile Podișului Mehedinți este diferențiat. Creșterea maximă în înălțime în funcție de temperatură s-a înregistrat la proveniențele Gornovița și Ponoarele cu 0,48-0,50 cm, urmată ca valoare de proveniențele colectate de la Bîlvănești 0,43 cm, Sfodea 0,42 și Prejna cu 0,41 cm creștere la acumularea a 10 °C. Se disting proveniențele Gornovița și Ponoarele unde creșterea în înălțime este asociată și cu o creștere a lungimii frunzei de 0,079 cm la acumularea de 10 °C.

Influența aportului de precipitații privitor la dinamica creșterii în înălțime a proveniențelor colectate este extrem de diferențiat. Se poate observa că la acumularea a zece mm de precipitații creșterea minimă de 0,09 cm este înregistrată la proveniența Bârda. Creșterile maxime care depășesc 0,9 cm sunt înregistrate la proveniențele Gornovița și Turbata, urmate de proveniența Ponoarele cu 0,84 cm.

Creșterea biologică a elitelor selecționate din Zona Câmpia Blahniței.

Din zona Câmpia Blahniței au fost colectate 11 proveniențe locale și anume: Rogova, Vânjuleț, Cioroboreni, Dănceu, Jiana, Gogoșu, Scăpău, Devesel, Burila Mare, Vrânca și Batoși. Ecartul altitudinal al zonei de colectare este cuprins între 49 m proveniența Vrânca și 120 metri proveniența Scăpău. Se remarcă astfel ecartul altitudinal specific zonelor de câmpie joasă unde de obicei asociațiile vegetale sunt edificate de asociații spontane de *Lolium perenne* și *Trifolium repens*.

Tipul de sol dominant al zonei de colectare nu este individualizat întâlnindu-se astfel mai multe tipuri de sol și anume: psamosol, preluvosol, aluviosol și gleiosol.

Analiza răspunsului biologic la acumularea de temperatură în perioada de creștere maximă al celor 11 proveniențe în condițiile Câmpiei Blahniței a relevat o creștere maximă la proveniențele Cioroboreni și Burila Mare între 0,48-0,56 cm la acumularea a 10 °C. Creșterea în înălțime fiind asociată cu o creștere a lungimii frunzei cuprinsă între 0,060- 0,069 cm.

Analiza creșterii biologice în funcție de factorii abiotici prin testul ANOVA

Analiza varianței ANOVA de tip bidirecțional

Astfel, au fost analizate în principal două caractere și anume creșterea în înălțime la acumularea a 10 °C (cm) exprimată în funcție de ecartul altitudinal pentru a se identifica existența unor legături între caracterele enunțate anterior. Din datele analizate se observă că valorile coeficientului ANOVA F, au avut o arie mare de dispersie, fiind cuprinse între 1,00 și 11,97, iar valorile coeficientului critic F_{crit} au o distribuție mult mai grupată cu valori între 2.4 și 4.54. Din analiza nivelului de semnificație P observăm că acesta este de 0,49 și se situează peste valoarea de semnificație (0,05), în acest caz se poate emite ipoteza că între mediile grupurilor de caractere investigate nu există diferențe semnificative.

Analiza varianței ANOVA de tip unidirecțional

Pentru a testa prezența unei legături de semnificație între creșterea biologică a elitelor selecționante și principalii factori de creștere precipitațiile și temperaturile a fost utilizată și testarea ANOVA de tip unidirecțional. Am ales acest tip de testare deoarece are capacitatea de testa două grupuri de date experimentale pentru a identifica legătura dintre mediile acestora. Analiza varianței ANOVA de tip unidirecțional privind interdependența dintre creșterea biologică a raigrasului peren în înălțime și caracteristicile sistemului foliar la acumularea a 10 °C a fost demonstrată statistic. În acest caz valoarea de semnificație a lui P este de 0,040, această valoare respinge ipoteza nulă și ne asigură statistic de existența unei interdependențe semnificative între dinamica dimensiunilor frunzei și acumularea de temperatură.

4.3. Activitatea antimicrobiană a speciei *Lolium perenne* selectată din diferite areale geografice

Raigrasul peren a fost caracterizat ca un potențial agent antimicrobian împotriva unor bacterii de tip Gram-pozitive, Gram-negative cât și fungi, de asemenea a fost evaluat și potențialul prebiotic al acestor extracte.

În acest scop, au fost testate diverse extracte pentru a determina eficacitatea lor antimicrobiană, evaluarea efectului sinergic dintre lactobacili și extractele vegetale și potențialul lor de a fi utilizate în aplicații terapeutice sau de conservare.

Evaluarea activității antimicrobiene: extractele de *Lolium perenne* au fost preparate și testate împotriva unui spectru de microorganisme patogene, incluzând bacterii Gram-pozitive (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*), bacterii Gram-negative (*Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae* type B) și fungi (*Candida parapsilopsis* și *Candida albicans*).

În urma testărilor inițiale, au fost selectate trei tulpini de lactobacili (*Bifidobacterium lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* DG) cu potențial probiotic ridicat. Aceste tulpini au fost identificate pe baza capacității lor de a supraviețui în condiții gastrointestinale simulate și de a adera la celulele epiteliale intestinale.

Potențarea activității a fost realizată atât individual cât și ca amestec de tulpini. Tulpinile de *Bifidobacterium lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* și *Lactobacillus casei* au fost potențate fie individual, fie în amestecuri, cu extractele de *Lolium perenne*. Scopul acestei potențări a fost evaluarea efectului sinergic dintre lactobacili și extractele vegetale, în vederea îmbunătățirii activității antimicrobiene și a proprietăților prebiotice.

Extracte de *Lolium perenne* spp. (LP) a fost obținute în cadrul Laboratorului de analize fizico-chimice din cadrul Platformei de Cercetare Interdisciplinară. Părțile aeriene ale elitelor de raigras peren investigate (coduri

acordate conform înregistrărilor în Platforma de Cercetare Interdisciplinară): 60C/1, 60C/2, 60C/3, 60C/4 și 60C/5) au fost colectate în perioada conformă cu codul BBCH 69 (etapa de sfârșit a înfloririi, toți spiculeții au înflorit, pot rămâne unele antere uscate) din câmpul de colecție al S.C.D.A. Lovrin. Corespondența utilizată a fost următoarea: -Mraconia (elita/familia numărul 5) – corespondența – 60C/1; -Gornovița (elita/familia numărul 6) – corespondența – 60C/2; -Ponoarele (elita/familia numărul 7) – corespondența – 60C/3; -Cioroboreni (elita/familia numărul 8) – corespondența – 60C/4; -Burila Mare (elita/familia numărul 9) – corespondența – 60C/5.

Activitatea antibacteriană a extractelor de *Lolium perenne* asupra bacteriilor Gram negative

Extractele de raigras peren luate în studiu au prezentat valori pozitive ale BIR% a tulpinilor de *P. aeruginosa* diferite de la un extract la altul, dependent de concentrația testată, însă care se înscriu pe o pantă ascendentă. O dată cu creșterea concentrației, respectiv la 65 μg/mL, valoarea BIR% devine pozitivă pentru 60C/2, 60C/3 și 60C/4, dar nu și pentru 60C/5. Extractul 60C/5 obținut din elita 9 proveniența de Burila Mare determină valori pozitive ale BIR% începând cu concentrația de 265 μg/mL.

Activitatea antimicrobiană, exprimată prin BIR% a extractelor de *Lolium perenne* împotriva tulpinilor de *S. flexneri* relevă că cea mai mică concentrație cu efect antimicrobian împotriva acestei tulpini este de 130 μg/mL atribuită din nou extractului 60C/5 (obținut din elita 9 proveniența de Burila Mare).

Activitatea antimicrobiană a extractelor de *Lolium perenne* împotriva tulpinilor de *E.coli* a relevat cu excepția extractului 60C/5 faptul că o creștere a concentrației pentru fiecare extract în parte a determinat creșterea valorilor BIR%.

Valorile BIR% obținute prin testarea extractelor de *Lolium perenne*, în diferite concentrații, împotriva tulpinilor de *S. typhimurium*, remarcându-se că, exceptând extractul 60C/1, toate celelalte extracte prezintă valori ale BIR% care se încadrează pe o pantă descendentă o dată cu creșterea concentrațiilor.

Asemănător activității antibacteriene împotriva tulpinilor de *S. typhimurium*, și în cazul tulpinilor de *H. influenzae*, extractele de *Lolium perenne* determină valori ale BIR% încadrabile pe o pantă descendentă o dată cu creșterea concentrațiilor testate.

Activitatea antibacteriană a extractelor de *Lolium perenne* asupra bacteriilor Gram pozitive

Activitate antimicrobiană împotriva tulpinilor de *S. pyogenes*, este observată la concentrații mai mari sau egale cu 65 μg/mL pentru extractul 60C/1, 525 μg/mL pentru extractul 60C/2, 130 μg/mL pentru 60C/3, 265 μg/mL pentru 60C 4 și 60C/5.

Activitatea antimicrobiană împotriva tulpinilor de *S. aureus* a demonstrat o eficacitate antibacteriană la concentrații diferite de la un extract la altul, cu valori ale BIR% care se încadrează pe o pantă ascendentă, cu excepția extractului 60C/2.

Dinamica valorilor BIR% a tulpinilor de *L. monocytogenes* prin utilizarea extractelor de *L. perenne* la diferite concentrații remarcă că această tulpină bacteriană cea mai sensibilă.

Eficacității antimicrobiene împotriva tulpinii de *B. cereus*, a fost evidențiată prin valori BIR% ce au variat între – 22,07% și 22,01% pentru 60C/1; -27,27% și 44,45% pentru 60C/2; -26,23% și 27,75% pentru 60C/3; -20,19% și 44,98% pentru 60C/4; -28,23% și 35,41% pentru 60C/5.

Tulpinile de *Cl. perfringens* sunt sensibile doar la concentrația maximă testată și anume 1055 μg/mL, cu excepția probei 60C/5 care pare să aibă activitate antimicrobiană față de această tulpină Gram-pozitivă anaerobă începând cu concentrația de 525 μg/mL.

Activitatea antifungică testată pe tulpini de *Candida spp.*

Extractele de *Lolium perenne* 60C/2 și 60C/4 prezintă activitate antimicrobică împotriva tulpinii de *C. parapsilosis*, începând cu concentrația de 30 μg/mL, fapt demonstrat prin valori pozitive ale RIM%. Împotriva tulpinii de *C. albicans*, toate extractele de *L. perenne*, cu excepția 6C/5 și-au demonstrat activitatea antimicrobică începând cu concentrația de 30 μg/mL, cu valori ale RIM% cuprinse între 0,34% și 11,86%.

Activitatea potențatoare asupra unor tulpini selectate de probiotice

Acțiunea sinergică a extractelor de *Lolium* asupra tulpinii de *Bifidobacterium lactis* a prezentat un tablou potențator, 4 din cele 5 extracte determinând creștere bacteriană în corelație pozitivă cu creșterea concentrației testate de extract. Proba 60C/4 este singura care se regăsește în corelație negativă cu creșterea concentrației, valoarea maximă

obținută, cea de 144,78 % regăsindu-se corelată cu concentrația cea mai mică testată, pe când concentrația maximă testată demonstrând o eficacitate de 76,87 %. Acest fapt denotă existența unei antagonism între constituenții extractului 60C/4 și componentele bacteriene ale *Bifidobacterium lactis*. Proba 60C/5 prezintă valori asemănătoare cu rezultatele obținute în cazul probei 60C/3.

Expresia acțiunii sinergice a extractelor de LP asupra tulpinii de *Lactobacillus casei*, utilizând valorile RPB% este susținută de valori mari ale RPB% obținute în cazul concentrațiilor maxime testate. Astfel eficacitatea probelor testate analizate prin prisma RPB% prezintă următoarea ordine crescătoare: 60C/1 <60C/5<60C/2 <60C/3 <60C/4.

Determinarea valorii energetice (compoziției proximate) la elitele de raigras peren

În exprimarea energiei proximate a elitelor de raigras peren au fost determinate următoarele elemente umiditatea, conținutul de cenușă, lipide, proteine cât și cel de carbohidrați

Conținutul de cenușă a variat de la 6.36% la elita Mraconia -proba 1 până la 10.31% la elita Ponoarele - proba 3, cu o valoare medie de 7.44%. Conținutul de lipide a variat între 2.66 g/100 g la elita Burila Mare -proba 5 și 3.30 g/100 g la elita Mraconia -proba 1.

Conținutul de proteine a avut o valoare minimă în cazul elitei Ponoarele - proba 3 și valoarea maximă în cazul elitei Cioroboreni -proba 4.

Valoarea carbohidraților evidențiază elita 1 Mraconia și elita 2 Gornovița cu valori de 70,15 și 72.14, celelalte trei elite au un conținut apropiat de carbohidrați între 68,51 și 69,70, pe ansamblu toate cele cinci elite au valori apropiate.

Determinarea conținutului de polifenoli la elitele de raigras peren

Din rezultatele obținute pentru cele 5 extracte cel mai mare conținut de polifenoli totali a fost înregistrat pentru proba 4 elita Cioroboreni (10347.71 mg GAE/kg), iar cel mai mic pentru proba 5 obținută din elita Burila Mare (8559.99mg GAE/kg).

Determinarea proprietăților antioxidante

Conform valorilor obținute după testare se poate afirma că cea mai mare activitate de captare a radicalilor a fost observată la concentrația maximă (8.00 mg/mL) pentru toate elitele de raigras peren.

De asemenea, că cel mai mare procent de inhibiție aparține probei 2 obținută din elita Gornovița cu 79,57%, urmat de proba 4 elita Cioroboreni cu 73.21%, proba 1 elita Mraconia cu 71,80%, proba 5 elita Burila Mare cu 65.36% și proba 3 elita Ponoarele cu 61.86%.

Determinarea conținutului de calciu (Ca) și fosfor (P)

Cea mai mare concentrație de Ca este prezentă în extractul provenit din proba 1 sau elita Mraconia (3268.636 ppm) iar cea mai mică din proba 4 elita Cioroboreni (1351.121 ppm). Concentrația de P variază între 919.731 ppm obținută la proba 3 elita Ponoarele și 2404.933 ppm care a fost cea mai mare concentrație regăsindu-se la proba 4 elita Cioroboreni.

Analiza pe ansamblu a rezultatelor obținute din determinarea compoziției proximate la elitele de raigras peren relevă faptul că selecția acestor elite ca genitori în procesul de selecție va asigura obținerea de cultivare care produc furaje cu cantități suficiente de zaharuri solubile care să eliberate în rumen asigura o bună digerare a furajelor. De asemenea, conținutul relativ ridicat de carbohidrați solubili face ca soiurile nou create să asigure premisele pentru obținerea unui furaj de calitate.

În condițiile de tehnologie prietenoasă cu mediul crearea de cultivare cu un conținut ridicat de carbohidrați ridicat va asigura un raport de 2:1 dintre carbohidrați și proteina brută care va optimiza utilizarea în rumenul animalelor a azotului asigurând în același timp și creșterea procentului de transformare a furajului în produs animal.

Putem crede că interesul pentru raigrasul peren va fi tot mai evident datorită elementelor clarificate și prin acest studiu care contribuie la înțelegerea interacțiunilor acestei specii cu mediul înconjurător.

Partea III. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Analiza comparativă a diversității intraspecifice a materiei biologice colectate din cele trei zone de colectare a urmărit dinamica creșterii biologice a raigrasului peren sub influența temperaturilor și precipitațiilor. Din analiza creșterii biologice a proveniențelor colectate din zona 1 Munții Almăjului, zona 2 Podișul Mehedinți și zona 3 Câmpia Blahniței se remarcă proveniențele locale Eibenthal, Mraconia, Gornovița, Ponoarele, Cioroboreni și Burila Mare.

Creșterea biologică a proveniențelor colectate din zona 3 Câmpia Blahniței a evidențiat creșterea maximă a proveniențelor Cioroboreni și Burila Mare între 0,48-0,56 cm la acumularea a 10 °C. Cu alte cuvinte creșterea în înălțime la raigrasul peren este de regulă asociată cu dezvoltarea aparatului foliar.

Rezultatele obținute au relevat o adaptare mai bună a materialului biologic provenit din zona Câmpia Blahniței comparativ cu cel colectat din zona de podiș sau zona montană. Importanța cunoașterii impactului factorilor de viață este susținută de asemenea prin mai multe studii de specialitate.

Evaluarea activității antimicrobiene a diferitelor extracte de *Lolium perenne* împotriva unor bacterii Gram-pozitive, Gram-negative și fungi cât și evaluarea potențialului prebiotic al acestor extracte a indicat o activitate antimicrobiană semnificativă împotriva unor bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, precum și împotriva unor fungi, sugerând potențialul lor ca agenți antimicrobieni naturali.

În plus, combinarea acestor extracte cu tulpini de lactobacili selectate a arătat promisiuni în dezvoltarea de sinergii prebiotice și probiotice, deschizând calea pentru utilizări terapeutice inovative.

Pe viitor creșterea participării în hrana animalelor a unor soiuri de raigras peren obținute din elitele/familii Gornovița și Ponoarele se va îmbunătăți echilibrul microbial intern asigurând o activitate adecvată a sistemului gastro-intestinal. Acțiunea viitoare probiotică a raigrasului peren se consideră ca benefică pentru refacerea florei tractului digestiv devenind astfel important pentru sănătatea generală a corpului animalelor.

Putem crede că interesul pentru raigrasul peren va fi tot mai evident datorită elementelor clarificate și prin acest studiu care contribuie la înțelegerea interacțiunilor acestei specii cu mediul înconjurător.

PARTEA IV. ELEMENTE DE ORIGINALITATE

Gradul de noutate și originalitate al prezentei cercetării constă în modul de abordare al cercetărilor, mai ales prin testarea comportării raigrasului peren la factorii abiotici sau factori restrictivi majori actuali în ceea ce privește dezvoltarea biologică. Modelarea dezvoltării biologice a raigrasului arătat în funcție de temperatură și precipitații a permis selecția elitelor cu creșterea maximă la aceeași unitate de măsură în ceea ce privește schimbările climatice actuale.

Evaluarea activității antimicrobiene a diferitelor extracte de raigras peren împotriva unor bacterii Gram-pozitive, Gram-negative și fungi cât și evaluarea potențialului prebiotic al acestor extracte a fost considerată ca deosebit de importantă în clarificarea potențialului antimicrobian.

În practică, aceste observații pot influența modul în care sunt formulate și utilizate extractele în aplicații antimicrobiene și probiotice.

Recomandăm pentru studiile de ameliorare viitoare cu obiectiv maximizarea efectului antibacterian selectarea ca forme parentale a elitei 8 Cioroboreni cu codul 60C/4 și a elitei 9 Burila Mare 9 cu codul 60C/5. Recomandăm pentru ameliorarea cu obiectiv de a obține cultivare cu efect probiotic ridicat să fie utilizate forme parentale obținute din descendențele elitei 6 Gornovița cu codul 60C/2 și elitei 7 Ponoarele 60C/3..

Considerăm că acest studiu este foarte important deoarece în viitor, schimbările climatice globale vor produce scăderi ale producției agricole, datorită lipsei apei în perioada creșterii plantelor.

Pentru a depăși această problemă, este nevoie de o îmbunătățire genetică a toleranței la secetă prin crearea și extinderea în cultură de noi soiuri.