

**Wytwarzanie autotetraploidów borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*)
zdolnych do krzyżowania z borówką wysoką (*V. corymbosum*)
oraz badanie mechanizmu molekularnego biosyntezy
antocyjanów w miąższu owoców**

Numer zadania: 45

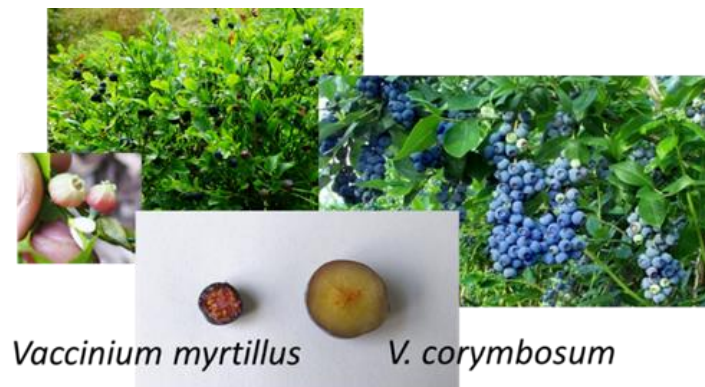
Planowany okres realizacji zadania: 2023 – 12 m-cy

Małgorzata Podwyszyńska - kierownik zadania, Monika Markiewicz, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Tadeusz Malinowski, Stanisław Pluta, Monika Mieszczakowska-Frać, Katarzyna Mynett, Łukasz Seliga

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice
Zakład Biologii Stosowanej



Cele projektu w 2023 r.



Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1	Optimalizacja ukorzeniania i aklimatyzacji mikrosadzonek wybranych tetraploidów <i>in vitro</i> do warunków <i>ex vitro</i>	Tak
2	Ocena fenotypowa	Tak
3	Poszukiwanie genów kandydujących związanych z akumulacją związków fenolowych w miąższu owoców borówki czernicy	Tak
4	Ocena zdolności do krzyżowania tetraploidów borówki czernicy oraz ocena statusu mieszańca uzyskanych siewek	Tak
5	Analiza ekspresji genów związanych ze szlakiem biosyntezy flawonoidów u wybranych tetraploidów <i>V. myrtillus</i> w odniesieniu do biosyntezy związków fenolowych	Tak
6	Analiza ilościowa i jakościowa związków fenolowych	Tak

Materiał i metody

L.p.	Temat badawczy; materiał	Metodyka
1	Optymalizacja ukorzenienia i aklimatyzacji mikrosadzonek <i>ex vitro</i>	Pędy tetraploidów <i>V. myrtillus</i> taksonów J3, J8 i J9 uzyskanych w 2021 r. sadzono w samym substracie torfowym składającym się z torfu wysokiego i piasku (5:1) oraz w substracie jw. z dodatkiem 1% grzybni pożytecznego grzyba <i>Serendipita indica</i> . Obserwacje liczby ukorzenionych roślin i parametrów ich wzrostu wykonano po 35 tyg. (dośw. 1.), 12 tyg. (dośw. 2) i 6 tyg. (dośw. 3).
2	Ocena fenotypowa	Tetraploidy oceniano w odniesieniu do diploidów: zawartość antocyjanów w ulistnionych pędach; u roślin 2,5-3-letnich parametry morfologiczne pędów i liści, kwitnienia, zawartość chlorofilu, żywotność pyłku. Ocenie poddano także siewki z krzyżowania <i>V. corymbosum</i> z <i>V. myrtillus</i> , uzyskane w 2021 i 2022 r.
3	Poszukiwanie genów kandydujących związanych z akumulacją związków fenolowych w miąższu owoców borówki czernicy	Izolacja RNA (zestaw komercyjny Norgen Biotek) z liści i owoców – oddzielnie ze skórki i miąższu, dla 3 odmian <i>V. corymbosum</i> i 3 genotypów <i>V. myrtillus</i> . Sekwencjonowanie (Genomed) prób całkowitego RNA, przygotowania biblioteki cDNA (metodą RiboZero) i odczyt zawartych w nich sekwencji na platformie Illumina. Analiza bioinformatyczna surowych odczytów (Qiagen CLC Genomics Workbench; mapowanie na genomy referencyjne oraz złożenie transkryptomów metodą <i>de novo</i>).
4	Ocena zdolności do krzyżowania tetraploidów borówki czernicy oraz ocena statusu mieszańca uzyskanych siewek	Do krzyżowań wykorzystano klony tetraploidalne <i>V. myrtillus</i> J3, J4 i J8 oraz odmiany <i>V. corymbosum</i> 'Bluecrop', 'Northland' i 'Liberty'. Oba gatunki występowały w krzyżowaniach jako rośliny mateczne i ojcowskie. Nasiona wysiewano bezpośrednio po ich wyizolowaniu z owoców. Efektywność krzyżowań określono jako liczbę uzyskanych siewek w stosunku do liczby zapylnych kwiatów. Status mieszańca siewek uzyskanych w 2022 r. z analogicznych krzyżowań badano poprzez analizę polimorfizmu DNA po amplifikacji ze starterami typu SSR i ISSR.
5	Analiza ekspresji genów związanych ze szlakiem biosyntezy flawonoidów u tetraploidów <i>V. myrtillus</i> w odniesieniu do biosyntezy związków fenolowych	Analizowano próby liści taksonu J4 borówki czernicy 5 klonów tetraploidalnych 4x-3, 4x-4, 4x-7, 4x-10 i 4x-12 oraz ich diploidalnego odpowiednika. Izolowano całkowity RNA po oczyszczeniu poddawano transkrypcji do stabilnego cDNA, na którego matrycy analizowano ekspresję 6 genów związanych z syntezą związków fenolowych (<i>PAL</i> , <i>DFR</i> , <i>ANS</i> , <i>CHS</i> , <i>F3H</i> i <i>MYB2</i>). Startery zaprojektowano na podstawie sekwencji dostępnych w bazach danych. Reakcje RT-PCR wykonano w 3 powtórzeniach, przy użyciu SybrGreen (KAPA Biosystems) w termocyklerze Rotor-Gene TM6000 (Corbet). Poziom ekspresji wyrażano w odniesieniu do poziomu mRNA wybranego eksperymentalnie genu referencyjnego GAPDH.
6	Analiza ilościowa i jakościowa związków fenolowych	Analizowano ulistnione pędy taksonu J4 borówki czernicy 5 klonów tetraploidalnych 4x-3, 4x-4, 4x-7, 4x-10 i 4x-12 oraz ich diploidalnego odpowiednika. Analiza ilościowo-jakościowa związków fenolowych została przeprowadzona przy użyciu metody chromatograficznej (HPLC) na kolumnie Phenomenex®Fusion RP.

Wyniki

1. Optymalizacja ukorzeniania i aklimatyzacji mikrosadzonek wybranych tetraploidów *in vitro* do warunków *ex vitro*

Wpływ obecności w podłożu endofitycznego grzyba *Serendipita indica* oraz zróżnicowanego nawożenia na efektywność bezpośredniego ukorzeniania pędów oraz wzrost roślin tetraploidalnych klonów borówki czernicy

Podłoże, dawka nawozu (g/l)	% ukorzenionych roślin po 35 tyg.			Długość najdłuższego pędu po 35 tyg.		
J3						
	2x	4x-4	4x-6	2x	4x-4	4x-6
Torf + 0,5 g/l	61,5	76,9	61,5	5,13 a	9,25 c-f	5,19ab
Torf + <i>S. indica</i> + 0,5 g/l	93,3	80,0	57,1	6,18 abc	12,96 g-h	7,63 a-e
Torf + 1 g/l	75,0	64,3	69,2	5,06 a	10,06 d-h	6,06 abc
Torf + <i>S. indica</i> + 1 g/l	100	100	80,0	5,83 abc	11,40 e-h	5,50 abc
J8						
	2x	4x-5	4x-11	2x	4x-5	4x-11
Torf + 0,5 g/l	57,1	66,7	100	9,38 c-f	5,40 abc	9,18 b-g
Torf + <i>S. indica</i> + 0,5 g/l	82,4	85,7	93,3	13,29 h	6,79 a-e	10,29 dh
Torf + 1 g/l	40,0	80,0	86,7	5,58 abc	5,96 abc	8,31 a-f
Torf + <i>S. indica</i> + 1 g/l	88,2	92,9	92,9	11,73 fgh	5,69 abc	5,58 abc



Ukorzeniane *ex vitro* rośliny borówki czernicy J8 4x klonu 4x-11 (czerwone etykiety) w porównaniu do diploidów (etykiety białe) w 35 tyg. po posadzeniu *ex vitro*; po lewej w obecności *S. indica*

- W dwóch seriach doświadczenia (dośw. 1 i 2) wykazano, że dodatek do podłoża grzybni *S.indica* oraz zastosowanie nawozu w niższym stężeniu (0,5 g/L) pozytywnie wpłynęło na ukorzenianie i wzrost młodych roślin borówki czernicy zarówno diploidów, jak i tetraploidów. W podłożu z dodatkiem 1% endofitycznego grzyba *S.indica* ukorzeniło się znacznie więcej pędów (od 80 do 100 %).
- W związku z bardzo niską zdolnością do ukorzeniania pędów (zarówno diploida, jak i klonów tetraploidalnych) genotypu J9, pochodzącego z Norwegii, konieczne są dalsze doświadczenia nad zwiększeniem zdolności pędów tego genotypu do ukorzeniania.

2. Ocena fenotypowa - tetraploidalne klony *V. myrtillus* genotypów J4 i J8 uprawiane w gruncie

Genotyp	Średnica pędów (mm)	Powierzchnia liści (cm ²)	Zawartość chlorofilu (CCI)	L. roślin kwitn. /posadzonych
J4 2x	<u>1,98 c</u>	<u>2,6 e</u>	<u>4,3 d</u>	<u>5/10</u>
J4 4x-1	2,7 b	3,1 de	6,3 bc	2/6
J4 4x-2	2,9 b	3,3 cd	7,0 abc	-
J4 4x-3	2,9 b	3,7 a-d	8,7 a	1/9
J4 4x-4	2,6 b	3,4 b-d	7,9 abc	1/5
J4 4x-5	2,9 b	4,0 ab	8,1 abc	2/7
J4 4x-6	3,0 ab	3,8 abc	6,1 c	2/5
J4 4x-7	2,5 bc	4,1 a	8,7 a	-
J4 4x-8	2,7 b	4,0 ab	7,1 abc	1/7
J4 4x-9	2,7 b	3,6 a-d	8,8 a	1/6
J4 4x-10	3,1 ab	3,6 a-d	8,2 a	2/5
J4 4x-11	3,6 a	3,2 cd	7,8 abc	-
J8 2x	<u>1,3 a</u>	<u>1,7 b</u>	<u>5,7 b</u>	-
J8 4x-5	1,5 a	1,9 b	8,9 a	-
J8 4x-11	1,5 a	2,5 a	7,0 ab	-

Przesiewowa ocena zawartości antocyjanów w pędach klonów tetraploidalnych z kultur *in vitro*

Genotyp	Zawartość antocyjanów (µg/g św. masy)
J5 2x	<u>163,1 a</u>
J5 4x-8	90,25 b
J5 4x-10	108,3 b
J3 2x	<u>361,07 a</u>
J3 4x-1	230,19 b
J3 4x-7	101,09 d
J3 4x-8	179,70 c
J3 4x-10	152,70 c
J3 4x-11	68,59 d
J4 2x	<u>266,78 b</u>
J4 4x-2	175,46 cd
J4 4x-3	200,00 c
J4 4x-5	342,36 a
J4 4x-6	208,54 c
J4 4x-8	209,78 c
J4 4x-9	156,62 d

- Uprawiane w gruncie tetraploidy borówki czernicy różniły się od diploidów grubszymi pędami, większymi liśćmi i wyższą zawartością chlorofilu. Ze względu na uszkodzenie przezające zakwitły pojedyncze rośliny.
- U autotetraploidalnych klonów borówki czernicy (z wyjątkiem jednego tetraploida) zawartość antocyjanów okazała się znacznie niższa w porównaniu do diploidów (w poprzednich latach badań tetraploidy zawierały więcej antocyjanu niż diploidy). Wynikać to może z tego, że pędy tetraploidów są namnażane w *in vitro* trzeci rok i w stabilnych warunkach zatraciły reaktywność na obniżoną temperaturę. W kolejnych latach wskazane są pomiary zawartości antocyjanu u roślin rosnących w warunkach polowych po okresie pierwszych jesiennych chłódów.
- Zdolność kiełkowania pyłku u tetraploidalnych klonów wybranych do krzyżowań była znacznie niższa niż oceniana w poprzednich latach – nie przekraczała 26,7%. Miało to prawdopodobnie związek z uszkodzeniem roślin przez opuchlaki.

2. Ocena fenotypowa - siewki z krzyżowań *V. corymbosum* i *V. myrtillus*)

Genotyp	Długość pędów (cm)	Powierzchnia liści (cm ²)	Zawartość chlorofilu (CCI)	Uwagi
Siewki z 2021 r.				
Liberty	-	13,9 a	13,5 bc	
J4 4x-4	20,3	3,4 c	7,9 c	
1-Liberty x J4 4x*	69,0	13,5 a	11,0 c	1. kwitn.
4-Liberty x J4 4x*	58,0	10,6 b	33,6 a	1. kwitn.
5-Liberty x J4 4x*	49,0	10,2 b	20,4 b	1. kwitn.
Northland-self	-	9,2 b	16,0 a	
J4 4x-4	20,3	3,4 c	7,9 b	
2-Northland x J4 4x	40,3	13,1 a	10,6 b	
Siewki z 2022 r.				
Bluecrop-self	21,9	5,6 a	15,7 a	
J4 4x-8	21,2	4,0 b	7,1 b	
50-Bluecrop x J4 4x-8*	19,7	5,4 a	7,2 b	p.z. **
51-Bluecrop x J4 4x-8*	14,8	3,9 b	12,6 a	
57-Bluecrop x J4 4x-8*	21	6,3 a	15,6 a	
70-Bluecrop x J4 4x-2	25,5	5,6 a	-	
Northland-self	35,5	9,3 a	16,0 a	
J4 4x-8	21,2	4,0 b	7,1 b	
67-Nothland x J4 4x-8*	20,5	4,3 b	7,3 b	p.z.
68-Nothland x J4 4x-8*	20,17	4,0 b	-	p.z.
69- Nothland x J4 4x-8*	19,0	3,7	-	p.z.

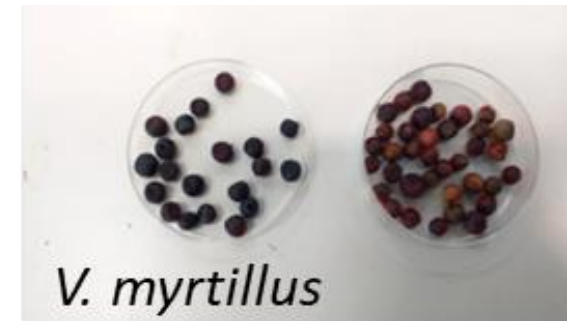


- Fenotyp większości siewek o potwierdzonej w analizach molekularnych mieszańcowości wykazywał ząbkowanie brzegów liści oraz liczbę włosków o charakterze pośrednim w porównaniu do genotypów rodzicielskich borówki czernicy i borówki wysokiej. Cechy te mogą stanowić markery morfologiczne mieszańcowości siewek uzyskanych z krzyżowań pomiędzy tymi gatunkami.

3. Poszukiwanie genów kandydujących związanych z akumulacją związków fenolowych w miąższu owoców borówki czernicy.

Sparowane odczyty nukleotydów wybranych transkryptomów borówki czernicy i borówki wysokiej sekwencjonowane metodą NGS

L.p.	Odmiana i numer rośliny (lub stanowisko)	Rodzaj tkanki do izolacji	ID próbki	Liczba sparowanych odczytów (każdy o długości ok. 150 nukleotydów)
1	Borówka czernica - stanowisko 1	miąższ	04 M	230 385 734
2	Borówka czernica - stanowisko 1	skórka	04 S	290 885 248
3	Borówka czernica - stanowisko 2	liście	07 L	238 508 356
4	Borówka czernica - stanowisko 2	miąższ	11 M	235 180 782
5	Borówka czernica - stanowisko 2	skórka	11 S	255 470 372
6	Chandler 22	liście	16 L	226 184 382
7	Borówka czernica - stanowisko 1	skórka	23 S	271 860 990
8	Borówka czernica - stanowisko 2	liście	24 L	211 312 980
9	Borówka czernica - stanowisko 2	skórka	26 S	262 750 986
10	Bluecrop 10	skórka	30 S	254 693 374
11	Chandler 22	miąższ	31 M	195 516 370
12	Duke 105	miąższ	35 M	263 598 004

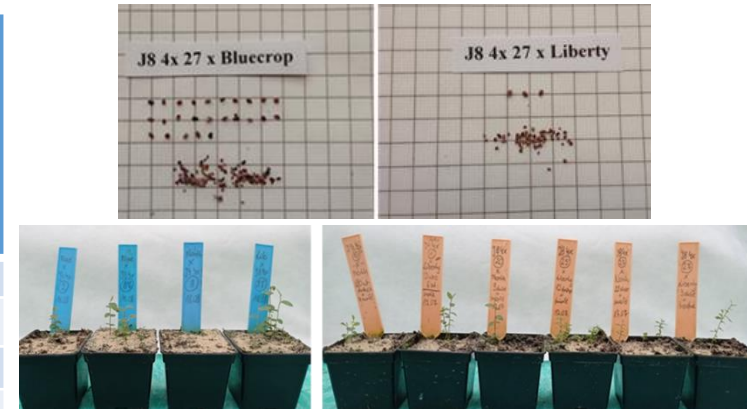


- Zbiór złożonych *de novo* kontigów, reprezentujących transkryptomy borówki czernicy (liści, miąższu i skórki owoców), w połączeniu z transkryptomem referencyjnym borówki wysokiej, posłużył do obliczenia i porównania profili ekspresji dla 24 prób zmapowanych na około 200 000 potencjalnych genów borówki. Wskazanie genów potencjalnie zaangażowanych w akumulację związków fenolowych będzie możliwe po przeprowadzeniu analiz statystycznych, co planowane jest na kolejne lata badań.

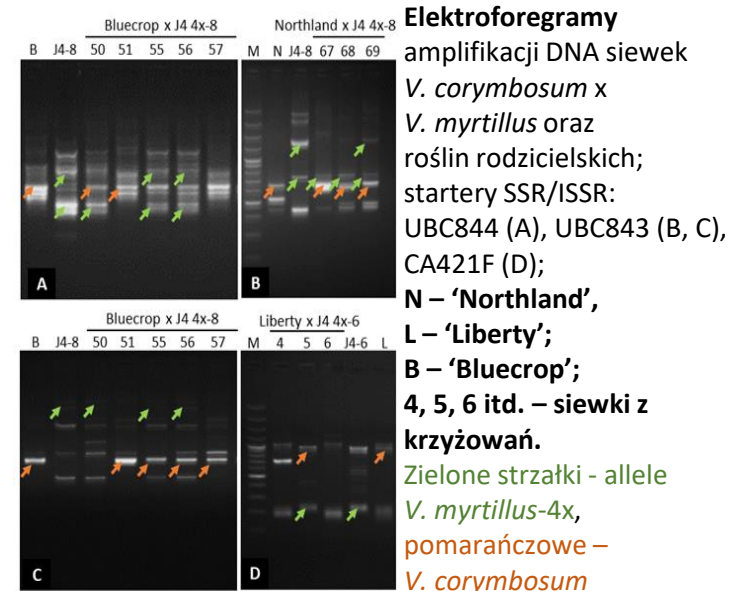
4. Ocena zdolności do krzyżowania tetraploidów borówki czernicy z borówką wysoką oraz ocena statusu uzyskanych siewek.

Efektywność krzyżowania międzygatunkowego pomiędzy 3 odmianami *V. corymbosum* i autotetraploidalnymi klonami 4x *V. myrtillus* (V.m.)

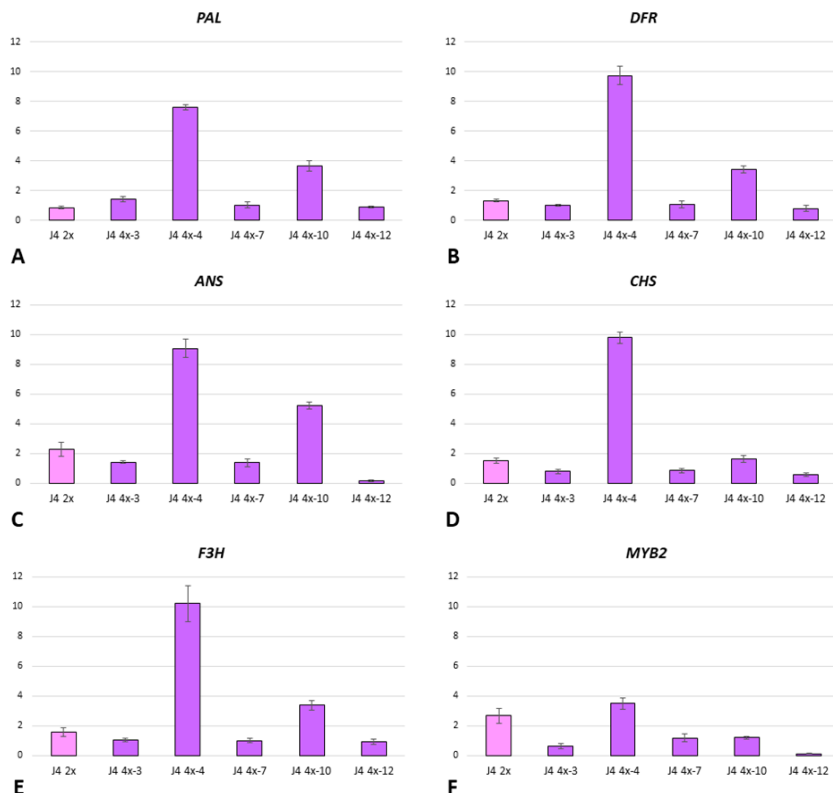
Krzyżowania	Liczba krzyżowań	Liczba zapylnych kwiatów	Liczba siewek	Efektywność krzyżowania (l. siewek / l. zapylnych kwiatów)
'Liberty' x klony 4x <i>V. m.</i>	3	190	8	0,042
'Northland' x klony 4x <i>V. m.</i>	3	180	3	0,017
'Bluecrop' x klony 4x <i>V. m.</i>	4	323	10	0,031
Razem	10	693	21	0,032
Klony 4x <i>V.m.</i> x 'Liberty'	9	161	11	0,068
Klony 4x <i>V.m.</i> x 'Northland'	10	179	6	0,034
Klony 4x <i>V.m.</i> x 'Bluecrop'	9	59	0	0,0
Razem	28	433	17	0,039
Klony 4x <i>V.m.</i> x klony 4x <i>V.m.</i>	5	30	40	1,33



- W krzyżowaniach, w których odmiany borówki wysokiej występowały jako rośliny męskie uzyskiwano średnio - 0,032 siewki na zapylny kwiat (**uzyskano 21 siewek**). W krzyżowaniach odwrotnych, efektywność krzyżowania była podobna – 0,039 (**uzyskano 17 siewek**). Znacznie wyższą efektywność wykazano w krzyżowaniach pomiędzy tetraploidami borówki czernicy (wewnątrz gatunku): średnio 1,33 siewki na zapylny kwiat (**uzyskano 40 siewek**).
- **Przy użyciu markerów SSR/ISSR potwierdzono mieszańcowość 8 siewek z 2022 r.:** 5 z krzyżowań 'Bluecrop' i tetraploidalnego klonu borówki czernicy J4 4x-8 oraz 3 siewki uzyskane w wyniku krzyżowania 'Northland' i tetraploidalnego klonu jagody J4 4x-8.



5. Analiza ekspresji genów związanych ze szlakiem biosyntezy flawonoidów u tetraploidów *V. myrtillus* w odniesieniu do zawartości związków fenolowych



- Wysoka ekspresja badanych genów (PAL, DFR, ANS, CHS, F3H, MYB2) w porównaniu do diploida była wyraźnie widoczna u dwóch klonów tetraploidalnych – J4 4x-4 oraz J4 4x-10. U pozostałych tetraploidów była podobna lub niższa.
- Podobnie jak w poprzednim roku u pędów z kultur *in vitro*, wykazano, że w pędach roślin uprawianych w pojemnikach na zewnątrz występowały cztery klasy związków fenolowych: katechiny, kwasy fenolowe, flawonole i antocyjany.
- Dwa spośród pięciu klonów tetraploidalnych borówki czernicy charakteryzowały się najwyższą zawartością trzech grup związków fenolowych: flawanoli, flawonoli i antocyjanów. Koreluje to z podwyższoną, w odniesieniu do diploida, ekspresją genów związanych z biosyntezą związków fenolowych.
- Duplikacja genów u borówki czernicy może wpływać na zwiększenie zawartości związków fenolowych w liściach u części uzyskanych autotetraploidów.

6. Analiza ilościowa i jakościowa związków fenolowych

ZWIĄZKI FENOLOWE	Klon diploidalny	Klony tetraploidalne				
	J4 2x	J4 4x-3	J4 4x-4	J4 4x-7	J4 4x-10	J4 4x-12
FLAWANOLE	3375,4	3580,6	5097,3	2634,8	4221,9	2549,1
KWASY FENOLOWE	1249	1517	1684,2	1486	1478,2	1463
FLAWONOLE	48,9	12,6	78,9	40,5	84,2	20,8
ANTOCYJANY	17,3	14,1	25,8	11,5	18,8	10,1

Wykaz publikacji wyników badań

1. Referat: Podwyszyńska M., Mynett K., Markiewicz M., Pluta S., Marasek-Ciołakowska A., Mieszczakowska-Frać M. 2023. Phenotype and crossability of synthetic bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) autotetraploids with highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Międzynarodowe Sympozjum XVI EUCARPIA Symposium on Fruit and Genetics, 11-16 września 2023, Drezno, materiały konferencyjne s. 47
2. Poster: Markiewicz M., Mynett K., Podwyszyńska M. 2023. Ocena fenotypowa siewek uzyskanych z krzyżowań międzygatunkowych borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) z borówką czernicą (*V. myrtillus* L.) oraz weryfikacja statusu mieszańca przy użyciu markerów molekularnych. VI Zjazd PTNO „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka”, 20-22 czerwca 2023, Olsztyn, materiały konferencyjne s. 36
3. Poster: Mynett K., Podwyszyńska M. Trzewik A. 2023. Optymalizacja ukorzeniania i uprawy tetraploidów borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus* L.). VI Zjazd PTNO „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka”, 20-22 czerwca 2023, Olsztyn, materiały konferencyjne s. 88