

**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

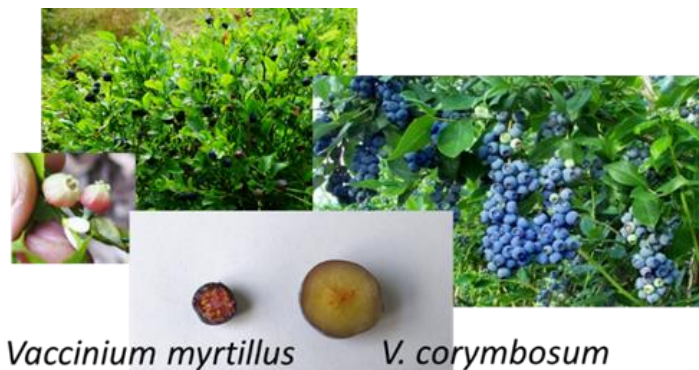
Planowany okres realizacji zadania: 2022 – 12 m-cy

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

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice
Zakład Biologii Stosowanej



Cele projektu w 2022 r.



Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1	<p>Optimalizacja ukorzeniania i aklimatyzacji mikrosadzonek wybranych tetraploidów <i>in vitro</i> do warunków <i>ex vitro</i></p> <p>Utrzymanie kultur pędów <i>in vitro</i> tetraploidów i diploidów borówki czernicy w celu zapewnienia materiału do dalszych badań</p>	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 ilościowa i jakościowa związków fenolowych	Tak

Materiał i metody

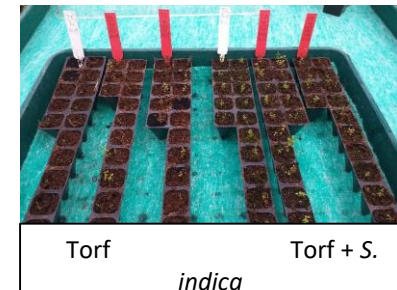
L.p.	Temat badawczy; materiał	Metodyka
1	Optimalizacja ukorzeniania i aklimatyzacji mikrosadzonek <i>ex vitro</i>	Wykorzystano pędy tetraploidów <i>V. myrtillus</i> taksonów J3 i J8 uzyskanych w 2021 r. Posadzono je w samym substracie torfowym składającym się z torfu wysokiego i piasku (5:1) oraz w substracie torfowym jw. z dodatkiem 1% grzybni pożytecznego grzyba <i>Serendipita indica</i> . Obserwacje liczby ukorzenionych roślin i parametrów ich wzrostu wykonano po 10 i 16 tyg.
2	Ocena fenotypowa	Tetraploidy oceniano w odniesieniu do diploidów: zawartość antocyjanów w ulistnionych pędach <i>z in vitro</i> ; u roślin 2,5-3-letnich parametry morfologiczne pędów i liści, zawartość chlorofilu, analiza anatomiczna liści, termin kwitnienia, procent kwitnących roślin, wielkość kwiatów, wielkość i żywotność pyłku. Wstępnej ocenie poddano także siewki z międzygatunkowego krzyżowania <i>V. corymbosum</i> z <i>V. myrtillus</i>
3	Poszukiwanie genów kandydujących związanych z akumulacją związków fenolowych w miąższu owoców borówki czernicy	Izolacja RNA przy użyciu zestawu komercyjnego firmy Norgen Biotek, izolowanego 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 (z zastosowaniem metody RiboZero) i odczyt zawartych w nich sekwencji na platformie Illumina. Analizie bioinformatyczna surowych odczytów (pakietu 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 w 2021 r. wykorzystano klony tetraploidalne <i>V. myrtillus</i> taksonu J4 (4x-8 i 4x-6) (rośliny ojcowskie) oraz odmiany borówki wysokiej 'Bluecrop', 'Northland' i 'Liberty' (rośliny mateczne). Nasiona wysiewano do podłoża bezpośrednio po ich wyizolowaniu z owoców. Efektywność krzyżowań określono jako procent uzyskanych siewek w stosunku do liczby zapylonych kwiatów. Status mieszańca siewek uzyskanych w 2021 r. z analogicznych krzyżowań badano w testach molekularnych poprzez analizę polimorfizmu DNA po amplifikacji ze starterami typu SSR i ISSR.
5	Analiza ilościowa i jakościowa związków fenolowych	Analizowano ulistnione pędy taksonu J3 borówki czernicy 4 klonów tetraploidalnych 4x-3, 4x-4, 4x-6 i 4x-11 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* na efektywność bezpośredniego ukorzeniania pędów oraz wzrost roślin tetraploidalnych klonów borówki czernicy J3 i J8.

Kombinacja	Liczba ukorzenionych roślin po 10 tyg.			Długość najdłuższego pędu po 10 tyg.		
J3						
	2x	4x-4	4x-6	2x	4x-4	4x-6
Torf	83,2	90	86,7	1,08 c	1,89 b	1,85 b
Torf + <i>S. indica</i>	100	100	96,7	1,63 b	2,55 a	1,72 b
J8						
	2x	4x-5	4x-11	2x	4x-5	4x-11
Torf	82,9	100,0	96,7	1,79 b	2,10 ab	2,21 ab
Torf + <i>S. indica</i>	97,1	90,0	96,7	1,71 b	1,50 bc	2,07 ab



Po 35 tyg. uprawy *ex vitro*

- **Najlepsze parametry ukorzeniania i wzrostu roślin uzyskano, gdy mikrosadzonki sadzono bezpośrednio do podłoża torfowego wzbogaconego ziemią z lasu lub z dodatkiem grzybnii pożytecznego endofitycznego grzyba *Serendipita indica*.**

Ukorzenianie pędów tetraploidalnych klonów borówki czernicy namnożonych *in vitro* w odniesieniu do ich diploidalnych odpowiedników

Genotyp	Liczba posadzonych roślin / ukorzenionych	Pędy ukorzenione (%)	Długość najdłuższego pędu (cm)
J3 2x	8 / 7	87,5	3,6 a
J3 4x (średnio dla 4 klonów)	50 / 28	50,0	2,9 b
J4 2x	16 / 16	100	6,0 a
J4 4x (średnie dla 10 klonów)	151 / 83	55,0	3,4 b
J5 2x	30 / 25	83,3	1,8 a
J5 4x (średnio dla 2 klonów)	60 / 49	81,7	2,1 a
J8 2x	15 / 8	53,3	3,8 a
J8 4x (średnio dla 7 klonów)	99 / 6	6,8	1,2 b
Średnio dla wszystkich diploidów	69 / 57	81,9	-
Średnio dla wszystkich tetraploidów	360 / 166	48,4	-



- Mimo, iż tetraploidy borówki czernicy charakteryzują się niższą zdolnością do ukorzeniania i aklimatyzacji w stosunku do ich diploidalnych odpowiedników, rośliny tetraploidalne uzyskano dla niemal wszystkich klonów 4x uzyskanych w wyniku poliploidyzacji *in vitro*.

2. Ocena fenotypowa

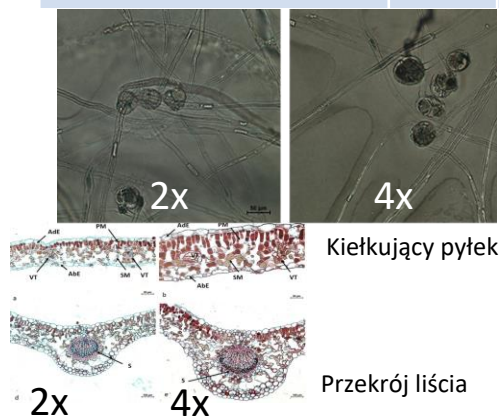
Fenotyp wybranych tetraploidalnych klonów *V. myrtillus* genotypu J4, po 3 latach uprawy *ex vitro*

Cecha	2x	Tetraploidy					
		4x-3	4x-4	4x-6	4x-8	4x-9	4x-10
Długość pędów (cm)	18,6 a	18,9a	17,1a	19,7a	20,1a	18,6a	20,2a
Liczba pędów	9,2 ab	5,5 cd	7,9 b-d	11,6 a	6,1 b-d	8,4 bc	5,8 cd
Grubość pędów (mm)	1,31e	1,78 cd	1,75 cd	1,91 bc	1,79 cd	2,9 b	2,43 a
Powierzchnia liści (cm ²)	2,81e	4,84 a	3,90 cd	3,34 de	4,10 bc	3,95 c	4,65 ab
Zawartość chlorofilu (CCI)	7,8 d	10,0 cd	10,2 cd	9,4 d	9,4 d	10,3 b-d	12,7 ab
Termin pierwszego kwitnienia	19.04	25.04	23.04	17.04	15.04	23.04	23.04
Liczba kwiatów/ roślinę kw.	44,8	-	-	9,8	4,3	-	-
Średnica kwiatu (mm)	7,14 b	-	-	8,28 a	7,46 b	-	-
Kielkowanie pyłku (%)	63,3	0,0	13,3	23,3	16,9	54,1	65,5
Średnica tetrad pyłkowych	41,9 d	-	-	56,3 b	-	-	51,3 b

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

Genotyp	Zawartość antocyjanów (µg/g św. masy)
J3 2x	151,3 a
J3 4x-3	183,3 a
J3 4x-4	169,6 a
J3 4x-6	194,7 a
J3 4x-12	233,0 ab
J3 4x-13	336,4 b
J8 2x	194,7 a
J8 4x-4	173,2 a
J8 4x-5	249,6 abc
J8 4x-6	252,1 bc
J8 4x-8	207,7 abc
J8 4x-10	226,3 abc
J8 4x-11	184,0 a
J8 4x-25	259,6 c
J8 4x-27	170,9 a

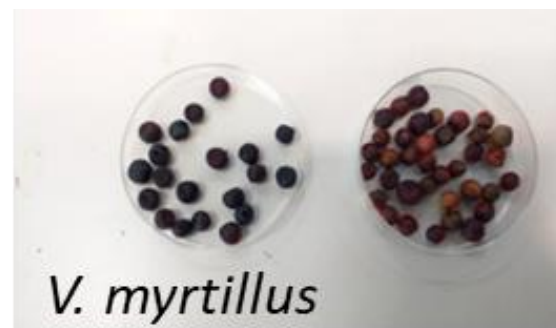
- Ulistnione pędy większości klonów tetraploidalnych borówki czernicy J3 i J8 zawierały więcej antocyjanów niż diploidy.
- Tetraploidy taksonu J4 (rośliny 2,5-3-letnie) wyróżniały się znacznie większymi i grubszymi liśćmi, wyższą zawartością chlorofilu i grubszymi pędami niż diploidy.
- W trzecim sezonie uprawy autotetraploidy wytworzone i rozmnożone *in vitro* zakwitły już niemal w 100%.
- Zdolność kiełkowania tetrad pyłkowych u połowy badanych tetraploidów borówki czernicy J4 była porównywalna do obserwowanej u diploidów.



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

Sparowane odczyty nukleotydów transkryptomów borówki czernicy i borówki wysokiej sekwencjonowane metodą NGS w 2022 roku

Odmiana (lub stanowisko)	Rodzaj tkanki do izolacji	ID próbki	Liczba sparowanych odczytów, każdy o długości około 150 nukleotydów
Zwierzyniec 1	liście	1 L 6	224 202 978
Zwierzyniec 1	miąższ	2 M 6	286 295 088
Zwierzyniec 1	skórka	2 S 1	194 565 494
Zwierzyniec 2	liście	5 L 6	249 430 250
Zwierzyniec 2	miąższ	6 M 6	226 050 140
Zwierzyniec 2	skórka	6 S 6	225 668 828
'Bluecrop' 10	miąższ	15 M 6	194 905 156
'Bluecrop' 10	skórka	15 S 6	237 782 082
'Duke' 105	liście	17 L 6	201 842 558
'Duke' 105	skórka	18 S 6	182 764 212
'Chandler' 23	miąższ	37 M 6	208 168 464
'Chandler' 23	skórka	38 S 6	177 281 064

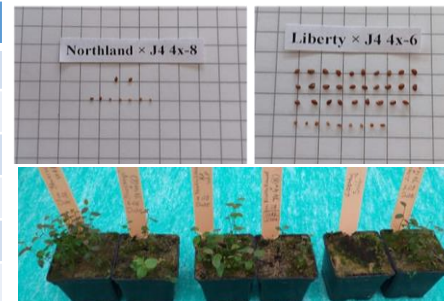


- Wstępna analiza, wykonana w firmie Genomed w oparciu o uniwersalne algorytmy kontrolne, wskazała odpowiednią jakość uzyskanych odczytów. Odczytane "surowe" sekwencje przekazano do IO-PIB, gdzie obecnie prowadzona jest analiza bioinformatyczna. Zgodnie z harmonogramem projektu zastosowane będzie składanie de novo transkryptomów dla analizowanych genotypów.

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

Efektywność krzyżowania międzygatunkowego pomiędzy 3 odmianami *V. corymbosum* (rośliny mateczne) i autotetraploidem J4 4x *V. myrtillus* (dawcy pyłku)

Parametr	'Bluecrop'	'Northland'	'Liberty'
	x J4 4x-8	x J4 4x-8	x J4 4x-6
Liczba zapylanych kwiatów	24	41	64
Procent zawiązaných owoców (%)	60,0	2,44	4,7
Liczba prawidłowo wykształconych nasion	33	9	38
Liczba uzyskanych siewek	9	4	19
(%) uzyskanych siewek / zapylony kwiat	37,5	9,8	27,9

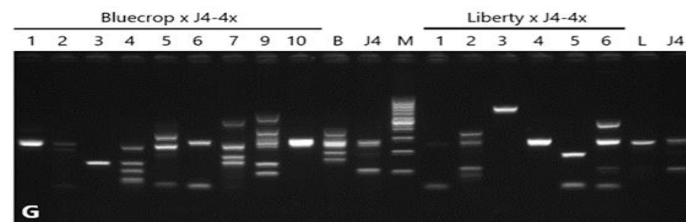


- Efektywność krzyżowania międzygatunkowego *V. corymbosum* z autotetraploidalną *V. myrtillus*, określona jako procent uzyskanych siewek w stosunku do liczby zapylanych kwiatów, była najwyższa dla borówki wysokiej 'Bluecrop', następnie dla 'Liberty' i najmniejsza dla 'Northland'. W sumie uzyskano 31 siewek.

Ocena statusu mieszańca siewek uzyskanych w wyniku krzyżowania *V. corymbosum* z *V. myrtillus* przy użyciu markerów SSR/ISSR

Nr siewki	Northland x J4-4x			Liberty x J4-4x					
	1	2	3	1	2	3	4	5	6
MA (%)	17,4	13,8	17,8	15,1	15,5	10,4	15,1	14,6	14,6
FA (%)	12,3	11,8	15,8	13,2	13,7	16,0	12,3	12,3	10,5
HA (%)	7,2	3,1	3,0	8,7	10,5	11,3	8,2	7,3	6,8

MA – allele mateczne, FA – allele ojcowskie, HA – allele charakterystyczne dla siewek



Amplifikacji DNA siewek *V. corymbosum* x *V. myrtillus* J4 4x oraz roślin rodzicielskich ze starterem SSR/ISSR VCC_J5: rośliny mateczne L - 'Liberty' i B - 'Bluecrop'; roślina ojcowska J4 4x; siewki nr 1, 2, 3 itd. z krzyżowań

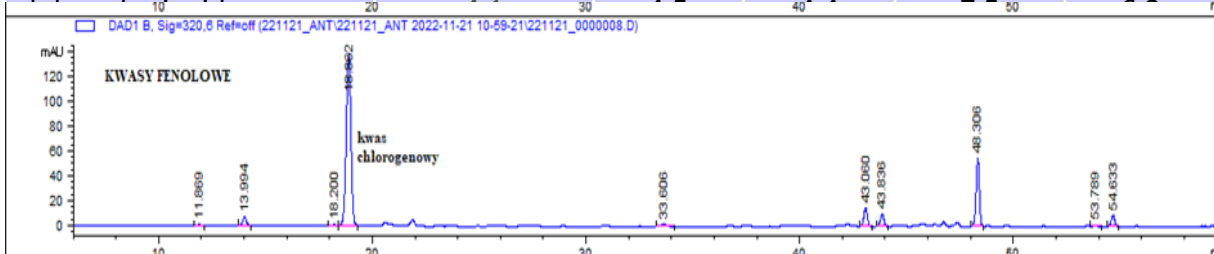
- Przy użyciu markerów SSR/ISSR potwierdzono mieszańcowość sześciu siewek – dwóch uzyskanych w wyniku krzyżowania 'Northland' x J4-4x oraz czterech uzyskanych w wyniku krzyżowania 'Liberty' x J4-4x.

5. Analiza ilościowa i jakościowa związków fenolowych

Zawartość związków fenolowych (mg/kg) w ulistnionych pędach pochodzących z kultur *in vitro* tetraploidalnej i diploidalnej borówki czernicy

Związki fenolowe	Klon diploidalny	Klony tetraploidalne			
	J3 2x	J3 4x-3	J3 4x-4	J3 4x-6	J3 4x-11
FLAWANOLE, w tym:	4850	2094	2064	3231	2735
procyjanidyna B1	248	150	192	384	239
epigallokatechina	48,5	20,2	27,4	40,7	38,1
katechina	42,2	36,0	29,0	61,4	26,4
procyjanidyna B2	576	955	321	298	357
epikatechina	529	586	611	1137	613
galusan epigallokatechiny	157	52	60	133	85
inne	3249	1907	1843	2785	2470
KWASY FENOLOWE, w tym:	953	1450	1191	1179	1516
kw. chlorogenowy	456	879	765	742	948
kw. P-kumarowy	42,2	40,9	7,0	4,4	39,2
inne	455	529	419	433	529
FLAWONOLE	59,3	30,3	7,3	10,8	58,4
ANTOCYJANY, w tym:	8,8	9,2	8,8	16,7	11,7
galaktozyd cyjanidyny	4,7	4,7	4,4	9,1	5,5

- W ulistnionych pędach borówki czernicy występują 4 klasy związków fenolowych: flawanole (katechiny), kwasy fenolowe, flawonole oraz antocyjany. Dominujące związki to katechiny, następnie kwasy fenolowe, głównie kwas chlorogenowy oraz niewielkie ilości antocyjanów.
- Formy diploidalne zawierały nawet dwukrotnie więcej flawanoli niż klony tetra-ploidalne, odwrotną zależność stwierdzono w przypadku zawartości kwasów fenolowych dominujących w klonach tetraploidalnych.
- Wyniki kolejnych analiz związków fenolowych będą odnoszone do prowadzonej jednocześnie w następnych latach analizy porównawczej ekspresji genów związanych z biosyntezą tych związków u tetraploidów i diploidów borówki czernicy.



Wykaz publikacji wyników badań

1. Streszczenie referatu: „Assessment of the phenotype and ability to cross of bilberry autotetraploids (*Vaccinium myrtillus* L.) with highbush blueberry (*V. corymbosum*); Podwyszyńska M., Mynett K., Markiewicz M., Pluta S., Marasek-Ciołakowska A. XXXI Międzynarodowy Kongres Ogrodniczy (XXXI IHC 2022), 14-20.08.2022, Angers, Francja. <https://app.swapcard.com/event/ihc-2022/planning/UGxhbm5pbmdfOTU5NDM1>
2. Streszczenie referatu: „Ocena fenotypowa autotetraploidów borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus* L.) wytworzonych w celu pokonania postzygotycznej bariery krzyżowalności z borówką wysoką (*Vaccinium corymbosum* L.); Podwyszyńska M., Markiewicz M., Mynett K., Pluta S. 59. Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego „Amor plantarum nos unit – łączy nas umiłowanie roślin”. Warszawa, 26 czerwiec – 3 lipca, 2022. Streszczenia - Abstracts of lectures and posters of the 59th Congress on the Centenary of the Polish Botanical Society” (eds. A. Szczepkowski, M. Sułkowska, K. Marciszewska). Warsaw University of Life Sciences Press, Warsaw.: s. 212-213. <https://doi.org/10.5586/978-83-963503-4-3>
3. Streszczenie posteru: „Optymalizacja ukorzeniania i wczesnej uprawy młodych roślin uzyskanych autotetraploidów borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*); Mynett K., Podwyszyńska M., Marasek-Ciołakowska A., Pluta S. 59. Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego „Amor plantarum nos unit – łączy nas umiłowanie roślin”. Warszawa, 26 czerwiec – 3 lipca, 2022. Streszczenia - Abstracts of lectures and posters of the 59th Congress on the Centenary of the Polish Polish Botanical Society” (eds. A. Szczepkowski, M. Sułkowska, K. Marciszewska). Warsaw University of Life Sciences Press, Warsaw.: s. 227. <https://doi.org/10.5586/978-83-963503-4-3>