

Zadanie 3.5. Wytworzenie materiałów wyjściowych borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) o wysokiej jakości owoców oraz analiza molekularna specyficznych fragmentów genomów.

Cel zadania:

Uzyskanie materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian deserowych oraz przydatnych do przetwórstwa i przechowywania (mrożenie), plennych, odznaczających się wysoką jakością i trwałością owoców i o różnej porze dojrzewania owoców. Kontynuacja oceny materiałów selekcyjnych borówki wysokiej otrzymanych w latach 2015-2020 oraz realizacja nowych programów hodowlanych. Identyfikacja sekwencji genomowych, skorelowanych z cechami jakości owoców i wytypowanie markerów molekularnych, przydatnych do selekcji materiałów hodowlanych borówki wysokiej pod względem badanych cech.

Opis zadania:

Zakres rzeczowy zadania oraz przyjęte cele zrealizowano zgodnie z założeniami w 2021 roku. Wykonano 40 kombinacji krzyżowań, uzyskując 1385 owoców, z których wydobyto nasiona oddzielnie dla każdej kombinacji, w sumie ok. 16,6 tys. nasion. Przeprowadzono wstępną ocenę starszych siewek pod względem siły wzrostu i pokroju krzewów, intensywności kwitnienia, zawiązywania owoców oraz plonowania i jakości owoców.

Przeprowadzono weryfikację tożsamości genetycznej DNA siedmiu odmian (potencjalnych form rodzicielskich). Wykonano wstępną ocenę fenotypową 10 nowych klonów hodowlanych w kolekcji pod względem wybranych cech. Prowadzono rozmnażanie metodą *in vitro* 10 klonów hodowlanych w szklarni, a także prowadzono 2 doświadczenia odmianowo-porównawcze.

Ponadto, wykonano ocenę zróżnicowania genetycznego sześciu odmian borówki wysokiej, w wyniku której możliwe było pogrupowanie genotypów na takie, które produkują owoce z nalotem oraz na te, u których nie odnotowano cechy woskowości skórki. Dla wytypowanych odmian, zróżnicowanych pod względem badanej cechy, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów KCS4 i FAR2, związanych z produkcją warstwy kutykuli na owocach borówki. Łącznie przeprowadzono ponad 120 testów qPCR.

1) Wykonanie programu krzyżowań z wykorzystaniem różnych form rodzicielskich o komplementarnych cechach fenotypowych i użytkowych, zbiór owoców, wybieranie nasion, stratyfikacja i wysiew nasion.

Wykonano program krzyżowań (40 kombinacji zapyleń). Przy wyborze form rodzicielskich brano pod uwagę cechy fenotypowe oraz opisy pomologiczne i pokrewieństwo genetyczne DNA. W sumie wykastrowano i zapyłono 2971 kwiatów, łącznie uzyskano 1385 owoców, z których wydobyto nasiona oddzielnie dla poszczególnych kombinacji, w sumie uzyskano ok. 16,6 tys. nasion. Nasiona odpowiednio przygotowano i przechowywano w lodówce (temperatura 6-8°C) do momentu stratyfikacji. Aktualnie nasiona poddane są około 2-2,5 miesięcznej stratyfikacji (22.11.2021 – 30.01. 2022 r.) w specjalnym inkubatorze do stratyfikacji nasion z automatycznie kontrolowaną temperaturą, wilgotnością i doświetlaniem. Na przedwiośniu 2022 roku nasiona poddane będą kiełkowaniu i produkcji kolejnej populacji siewek borówki wysokiej pokolenia F₁.

2) Uprawa, ocena i selekcja siewek w polowych kwaterach selekcyjnych.

Wykonano podstawowe zabiegi uprawowe i pielęgnacyjne w 4 kwaterach hodowlano-selekcyjnych (w sumie 9 697 siewek), które posadzono w latach 2015-2016 i 2019-2020 na polach w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach, zajmujących powierzchnię ok. 0,5 ha. W kwaterach selekcyjnych (PS-6-BOR'2015 i PS-7-BOR'2016) wykonano ocenę starszych siewek pod względem siły wzrostu i pokroju krzewów, intensywności kwitnienia i zawiązywania owoców, plonowania roślin, wielkości i jakości owoców w celu selekcji wartościowych pojedynków. W sumie wyselekcjonowano 468 pojedynków, które jesienią posadzono na specjalnie przygotowanym i zakwaszonym polu w SD w Dąbrowicach. Natomiast pozostałe siewki zlikwidowano, a pole po kwaterach selekcyjnych przeznaczono do rekultywacji.

3) Rozmnażanie najcenniejszych genotypów o określonym statusie mieszańca (molekularna weryfikacja tożsamości genetycznej) dla uzyskania cennych klonów.

Kontynuowano rozmnażanie w kulturach *in vitro* 10 klonów hodowlanych (10, 13, 104, 132B, 140, 156A, 159, 160, 181, 228). Rozpoczęto proces ich ukorzenia i adaptacji do warunków *ex vitro*. Łącznie uzyskano 811 roślin. Ponadto, łącznie w kulturach *in vitro* utrzymywano rośliny 31 genotypów.

Zweryfikowano tożsamość genetyczną 21 roślin, reprezentujących 7 odmian borówki wysokiej ('Compact', 'Sierra', 'Star', 'Elliot', 'Legacy', 'Simulta', 'Duke'). Łącznie wykonano 1512 reakcji PCR, w wyniku których potwierdzono identyczność wszystkich badanych roślin.

4) Ocena wartości produkcyjnej klonów selekcyjnych w kolekcji klonów i rozmnożenie najcenniejszych klonów.

Wykonano wstępną ocenę fenotypową 10 nowych klonów hodowlanych w kolekcji pod względem cech morfologicznych (siła wzrostu i pokrój krzewu), terminu i intensywności kwitnienia, uszkodzeń mrozowych pędów oraz przymrozkowych pąków i kwiatów, a także terminu dojrzewania owoców, plonowania roślin, wielkości, barwy, obecności nalotu na skórce, jędrności i smaku, w celu selekcji najbardziej wartościowych genotypów w roku 2022 oraz w kolejnych 3-4 latach.

5) Ocena wartości produkcyjnej klonów selekcyjnych w kolekcji klonów i rozmnożenie najcenniejszych klonów.

W 2021 roku prowadzono 2 doświadczenia odmianowo-porównawcze zlokalizowane na polu w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach.

Borówka 1/2019 – doświadczenie porównawcze z 19 klonami hodowlanymi (04/2010, 26/2010, 30/2010, 48/2010, 49/2010, 51/2010, 53/2010, 57/2010, 58/2010, 59/2010, 65/2010, 68/2010, 69/2009, 70/2010, 75/2010, 76/2010, 77/2009, 77/2010, 9P) oraz 3 odmiany standardowe ('Bluecrop', 'Duke' i 'KazPliszka'). Materiałem do badań były doniczkowe (P9) rośliny borówki wysokiej pochodzące z dwóch metod vegetatywnego rozmnażania: sadzonki zielne (*ex vitro*) i z kultur tkankowych (*in vitro*). Doświadczenie założono wiosną 2019 roku, w układzie bloków losowych, w 3 powtórzeniach po 5 roślin na poletku. Rozstawa sadzenia roślin wynosiła 3,0 x 0,75 m. Rośliny nawadniano automatycznie systemem kropłowym. Wszystkie zabiegi uprawowe i pielęgnacyjne stosowano jak na plantacjach towarowych tego gatunku. W 2021 roku wykonano wstępną ocenę w/w genotypów rosnących w tym doświadczeniu. Ocena dotyczyła siły wzrostu (pomiar wysokości i szerokości roślin), plonu i jakości owoców.

Siła wzrostu, oceniana na podstawie wysokości i szerokości roślin, badanych klonów hodowlanych i odmian standardowych była zróżnicowana i uzależniona od genotypu i metody vegetatywnego rozmnażania roślin. Ogólnie średnia siła wzrostu wszystkich ocenianych genotypów rozmnażanych *in vitro* była trochę większa niż rozmnażanych przez sadzonki zielne (*ex vitro*). Wyniki wskazują, że wśród genotypów rozmnażanych *ex vitro* najsilniej rosły krzewy klonów: 9P, 59/2010, 53/2010, 68/2010, 26/2010, 57/2010 i 49/2010, a najslabiej – odmiana 'Duke' oraz klony: 76/2010, 75/2010 i 04/2010. W przypadku badanych genotypów rozmnażanych *in vitro* największe krzewy miały 49/2010, 9P, 57/2010, 59/2010, 53/2010, 26/2010 i 51/2010, najmniejsze – odmiany standardowe ('Bluecrop', 'KazPliszka' i 'Duke') oraz klony: 04/2010, 48/2010, 77/2009 i 69/2009.

Wstępne wyniki wskazują, że plonowanie młodych roślin borówki wysokiej było także zróżnicowane i uzależnione od genotypu i metody rozmnażania. Generalnie, średni plon owoców z krzewów wszystkich klonów hodowlanych i odmian standardowych rozmnażanych w kulturach *in vitro* był wyższy o około 35%, w porównaniu do metody *ex vitro*. W przypadku rozmnażania metodą *ex vitro* najwyższe plony (1,36-3,69 kg/poletko) zebrano z krzewów kilku klonów oznaczonych 30/2010, 76/2010, 75/2010, 04/2010, 77/2009 i 51/2010. Dla metody *in vitro* najwyższe (1,80-3,37 kg/poletko) plony owoców wydały rośliny odmiany 'Bluecrop' oraz sześciu klonów: 59/2010, 51/2010, 30/2010, 49/2010, 77/2010 i 48/2010.

Wielkość owoców była także zróżnicowana i uzależniona od genotypu i metody rozmnażania badanych klonów i odmian. Ogólnie, średnia masa owoców wszystkich genotypów rozmnażanych *ex vitro* była nieco wyższa niż dla metody *in vitro*, wynosiła odpowiednio 26,4 i 23,1 g/10 szt. owoców. Dla metody rozmnażania *ex vitro* największe (27,5-35,8 g/10 szt.) owoce wytwarzały dwie odmiany standardowe ('KazPliszka' i 'Bluecrop' oraz kilka klonów: 58/2010, 77/2010, 51/2010, 76/2010, 59/2010, 68/2010 i 70/2010. Genotypy rozmnażane *in vitro* takie, jak: 'Duke', 59/2010, 77/2010, 76/2010, 58/2010 i 70/2010 wytwarzały największe owoce, o średniej masie od 24,0 do 38,5 g/10 szt.

Wykonano także ocenę jakości owoców, tj. zawartość ekstraktu i witaminy C w owocach 22 genotypów borówki wysokiej. Średnia zawartość ekstraktu w owocach borówki wysokiej analizowanych odmian standardowych i klonów była identyczna i wynosiła 11,9%, niezależnie od metody wegetatywnego rozmnażania. Wśród genotypów rozmnażanych *ex vitro* najwięcej ekstraktu (13,4-14,3%) określono dla czterech klonów: 65/2010, 26/2010, 69/2009 i 57/2010. Największą zawartość ekstraktu (13,5-15,2%) w owocach testowanych genotypów rozmnażanych *in vitro* uzyskano dla odmiany 'KazPliszka' oraz klonów oznaczonych: 59/2010, 68/2010, 26/2010 i 69/2009.

Zawartość witaminy C w owocach badanych genotypów borówki wysokiej była także bardzo zróżnicowana i uzależniona od metody wegetowanego rozmnażania. Średnia ogólna zawartość tej witaminy wszystkich genotypów wynosiła 12 mg/100 ml (*ex vitro*) oraz 14,9 mg/100 ml (*in vitro*). Najwięcej (14,0-17,8 mg/100 ml) witaminy C w owocach ocenianych genotypów rozmnażanych *ex vitro* określono u odmiany 'Duke' oraz pięciu klonów: 76/2010, 30/2010, 04/2010, 68/2010 i 75/2010. W przypadku metody rozmnażania *in vitro* stwierdzono, że najwięcej witaminy C (17,3-23,7 mg/100 ml) w owocach miała odmiana 'KazPliszka' oraz cztery klony: 65/2010, 49/2010, 75/2010 i 68/2010.

Borówka 2/2020 - doświadczenie porównawcze z 15 klonami (BOR-91, BOR-101, BOR-134A), BOR-143, BOR-143, BOR-147, BOR-161, BOR-181, BOR-198, BOR-230, BOR-232, BOR-234B, BOR-234E, BOR-235B, BOR-251 i BOR-263) oraz 2 odmianami stardadowymi ('Bluecrop' i 'Duke') rozmnożonymi *in vitro*, założone polu w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach, wiosną 2020 roku.

Ze względu na młody wiek roślin, wiosną 2021 roku wykonano ocenę przezimowania i adaptacji roślin, a następnie wstępne obserwacje i ocenę siły wzrostu roślin w/w genotypów rosnących w tym doświadczeniu polowym. Na podstawie wstępnych wyników badań stwierdzono małe zróżnicowanie ocenianych genotypów pod względem siły wzrostu. Zakłada się, że ocena wybranych cech użytkowych (cech morfologicznych) będzie kontynuowana w nadchodzącym roku 2022, a plonowanie i jakość owoców będzie prowadzona w kolejnych 3-4 latach.

W badaniach molekularnych wykonano następujące etapy prac:

6) Wytypowanie perspektywicznych genotypów mieszańcowych (wstępna ocena fenotypowa) i wyizolowanie DNA/RNA z tkanek roślin form rodzicielskich zróżnicowanych pod kątem obecności woskowego nalotu na owocach.

Zróżnicowanie genetyczne sześciu odmian: 'Liberty', 'Aurora', 'Rubel', 'Toro', 'Bluegold' i 'Bonifacy' (potencjalnych form rodzicielskich), przeprowadzono przy zastosowaniu metod SSR-PCR (na matrycy wyizolowanego DNA) oraz qPCR (na matrycy wyizolowanego RNA). Do testów użyto oligonukleotydów specyficznych dla regionów mikrosatelitarnych genomu *V. corymbosum*. Przeprowadzona analiza pozwoliła zgrupować badane odmiany borówki w dwa klastry. Jeden zawierał odmiany wytwarzające woskowy nalot na owocach, drugi – odmiany wytwarzające owoce bez nalotu lub ze słabym nalotem. W ramach przeprowadzonych analiz, najmniejsze podobieństwo genetyczne (28%) odnotowano pomiędzy odmianami 'Bonifacy' i 'Buegold'.

7) Wytypowanie sekwencji genów kandydujących (dostępne bazy, literatura) do analizy PCR i qPCR poprzez opracowanie ich profili ekspresyjnych.

Do badań nad molekularną oceną regulacji cechy woskowości owoców borówki wysokiej wykorzystano matryce RNA wyizolowane z odmian 'Liberty', 'Aurora', 'Rubel', 'Toro', 'Bluegold' i 'Bonifacy'. Z roślin tych w sezonie wegetacyjnym sukcesywnie zbierano: kwiaty, zawiązki owoców, owoce niedojrzałe oraz owoce dojrzałe - w pełni wybarwione, z których wyizolowano całkowite RNA. Przygotowane na matrycy RNA próbki cDNA, przeznaczono do ilościowych testów PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).

Do analizy porównawczej aktywności badanych genów wytypowano gen referencyjny GADPH (koduje dehydrogenazę gliceraldehydo-3-fosforanową) o stabilnym poziomie ilości transkryptu w układzie badawczym (gen ref. vs. gen badany) oraz dwa geny KCS4 (koduje syntazę beta ketoacylo CoA) i FAR2 (koduje tłuszczową reduktazę acylo-CoA), uczestniczące w regulacji szlaku produkcji kutykuli i wosku na powierzchni owoców. W uzyskanych wynikach, zaobserwowano istotnie wysoką aktywność obu badanych genów w skórce owoców odmian 'Liberty', 'Bluegold' i 'Bonifacy'. Odmiany te charakteryzują się obecnością warstwy kutykuli, co świadczy o potencjalnej korelacji wytypowanych genów z badaną cechą. Dla obu badanych genów odnotowano także niską aktywność w miąższu i skórce owoców odmian: 'Aurora' i 'Toro' (wcale lub słabo produkują wosk). Jedynie w owocach odmiany 'Rubel' dużą aktywność

badanych genów zaobserwowano w owocach dojrzałych, co może wskazywać na inny sposób regulacji cechy, specyficzny dla tej odmiany.

Działania upowszechnieniowo-promocyjne:

Prowadzono spotkania informacyjne dla producentów owoców oraz szkółkarzy zainteresowanych odmianami borówki amerykańskiej (wysokiej) oraz udzielano licznych porad i konsultacji na temat realizowanego programu hodowli twórczej w Instytucie Ogrodnictwa – PIB i dotychczasowych osiągnięć, wartości produkcyjnej różnych odmian oraz ich przydatności do uprawy w Polsce.

W dniu 23 listopada 2021 wygłoszono referat nt. „Zastosowanie markerów molekularnych do potwierdzenia tożsamości odmianowej w ochronie praw hodowcy” – dr Anita Kuras, w ramach seminarium on-line pt. „Kierunki i osiągnięcia hodowli twórczej roślin ogrodnictwa w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach” (<https://www.youtube.com/watch?v=QTFdDBnpWAY>).

Przygotowano raport nt. „Wstępna ocena plonowania i jakości owoców genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w 2021 roku”, który zamieszczono na stronie internetowej IO – PIB.

Wykonanie miernika:

1. Wykonanie programu krzyżowań – plan 40 kombinacji, wykonanie 40 kombinacji.
2. Wyselekcjonowanie i rozmnożenie materiałów wyjściowych (klonów) o pożądanych cechach – plan 10 klonów, wykonanie 10 klonów.
3. Wytypowanie sekwencji DNA/RNA dla pożądanych cech – plan 2, wykonanie 2.
4. Przygotowanie publikacji lub artykułu popularno-naukowego – plan 1, wykonanie 1.
Pluta S. Keller-Przybyłkiewicz S. 2021. Postęp w hodowli jakościowej borówki wysokiej. Jagodnik nr 8(70)/2021:66-69.
5. Raport upowszechniający uzyskane wyniki badań i osiągnięcia zamieszczony na stronie internetowej IO – PIB: plan 1, wykonanie 1.