

**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***

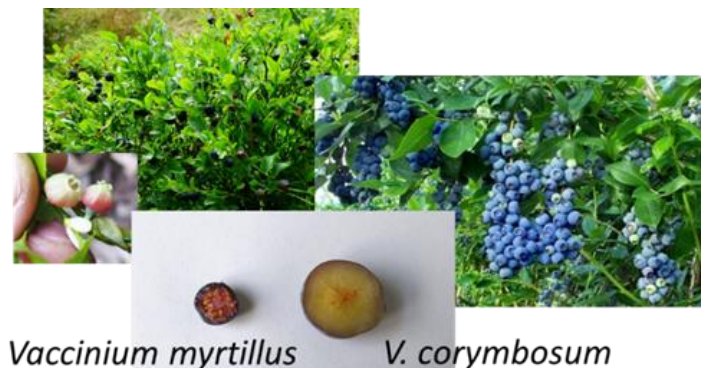
***Planowany okres realizacji zadania: 2021 – 12 m-cy***

Małgorzata Podwyszyńska - kierownik zadania, Stanisław Pluta, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Tadeusz Malinowski, Danuta Wójcik, Łukasz Seliga, Justyna Góraj-Koniarska, Agnieszka Wojtania, Monika Markiewicz, Monika Marat, Katarzyna Mynett

**Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice**  
Zakład Biologii Stosowanej



## Cele projektu w 2021 r.

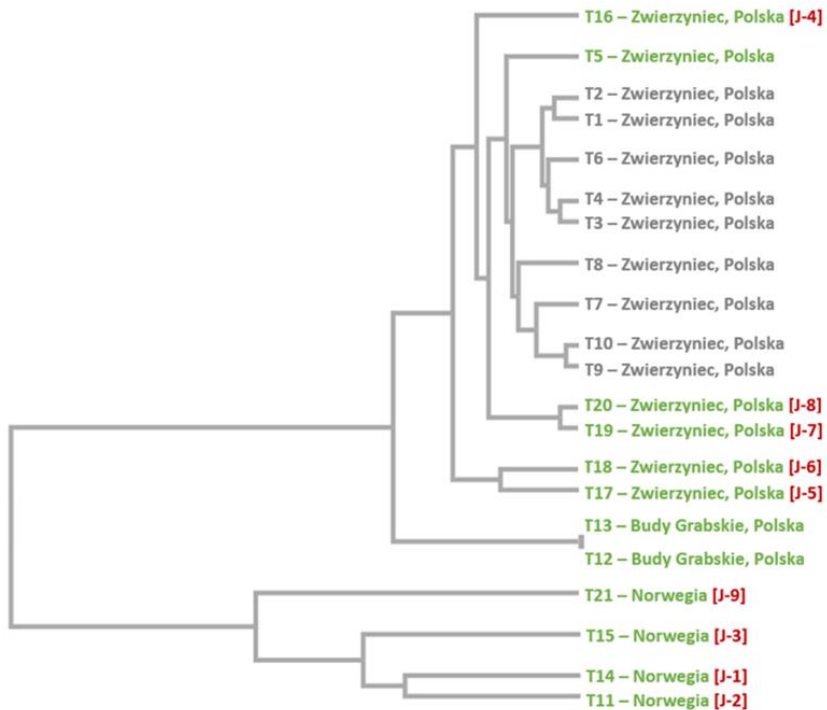


Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1	Analiza różnorodności genetycznej 20 taksonów borówki czernicy	Tak
2	Zainicjowanie kultur pędów <i>in vitro</i> i optymalizacja mikrorozmnażania pędów <i>V. myrtillus</i>	Tak
3	Optymalizacja metody poliploidyacji <i>in vitro</i>	Tak
4	Optymalizacja ukorzeniania pędów wybranych tetraploidów <i>in vitro</i> , aklimatyzacji do warunków <i>ex vitro</i>	Tak
5	Ocena fenotypowa	Tak
6	Poszukiwanie genów kandydujących związanych z akumulacją związków fenolowych w miąższu owoców borówki – izolacja	Tak

# Materiał i metody

L.p.	Temat badawczy; materiał	Metodyka
1	Analiza różnorodności genetycznej 2 taksonów borówki czernicy ( <i>V. myrtillus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>AFLP-PCR wg Vos i in. (1995) z 10 parami starterów AFLP 3' (Money i wsp. 1995, Bachem i wsp. 1996);</li> <li>analiza różnorodności – hierarchiczna analiza klastrow</li> </ul>
2	Zainicjowanie kultur pędów <i>in vitro</i> i optymalizacja mikrorozmnażania pędów <i>V. myrtillus</i> (8 taksonów <i>V. myrtillus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eksplantaty incjalne – pąki wegetatywne;</li> <li>pożywka Andersona lub WPM z dodatkiem iP lub zeatyny oraz IAA i GA<sub>3</sub></li> </ul>
3	Optymalizacja metody poliploidyzacji <i>in vitro</i> (5 genotypów <i>V. myrtillus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Poliploidyzacja <i>in vitro</i> z wykorzystaniem eksplantatów pędowych i antymitotyków: kolchicyny (125 i 250 mg l<sup>-1</sup>) i APM (5 i 10 mg l<sup>-1</sup>);</li> <li>wykrywanie tetraploidów – cytometria przepływowa</li> </ul>
4	Optymalizacja ukorzeniania pędów wybranych tetraploidów <i>in vitro</i> , aklimatyzacji do warunków <i>ex vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ukorzenianie 3-4-pędowych kępek po 10-dniowej indukcji ryzogenezy <i>in vitro</i> na pożywce z IBA i IAA, następnie sadzenie <i>ex vitro</i> w substracie (torf, pasek i trociny) lub bezpośrednio w ww. substracie bez lub z dodatkiem ziemi z lasu.</li> </ul>
5	Ocena fenotypowa (rośliny diplo- i tetraploidalne <i>V. myrtillus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tetraploidy oceniano w odniesieniu do diploidów: parametry morfologiczne pędów i liści, wielkość i gęstość aparatów szparkowych, zawartość chlorofilu, termin kwitnienia, procent kwitnących roślin, wielkość kwiatów, wielkość i żywotność pyłku, zawartość antocyjanów w pędach oraz efektywność krzyżowania interploidalnego (<i>V. corymbosum</i> x <i>V. myrtillus</i>)</li> </ul>
6	Poszukiwanie genów kandydujących związanych z akumulacją związków fenolowych w miąższu owoców borówki	<ul style="list-style-type: none"> <li>W pierwszym etapie przygotowano preparaty 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>.</li> </ul>

# 1. Analiza różnorodności genetycznej 21 taksonów borówki czernicy



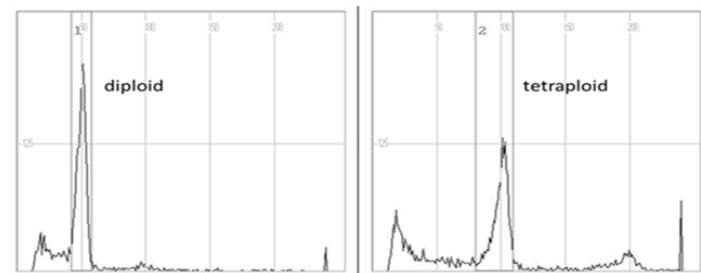
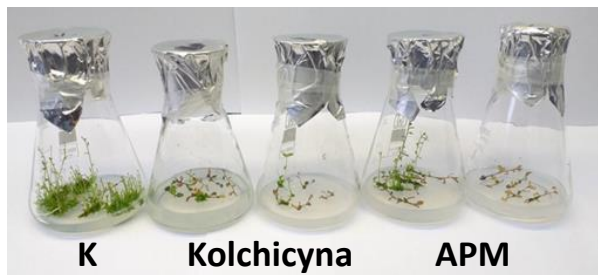
- Analiza molekularna AFLP wykazała wyraźną korelację między odległościami geograficznymi i różnicami genetycznymi roślin badanych populacji. Im większe były odległości pomiędzy populacjami tym różnice genetyczne były większe. Wyniki, wskazują, że nawet w niewielkiej populacji można znaleźć rośliny odrębne genetycznie.
- Osiem genotypów wykazujących zróżnicowanie genetyczne wybrano do dalszych prac w celu zapoczątkowania kultur in vitro, niezbędnych do wytworzenia autotetraploidów. Po ocenie zdolności wzrostu roślin w warunkach szklarniowych oraz zdolności do tworzenia pędów w kulturach in vitro, do poliploidyzacji wybrano 4 genotypy o najlepszych parametrach wzrostu i rozmnażania.

## 2. Zainicjowanie kultur pędów *in vitro* i optymalizacja mikro-rozmnażania *V. myrtillus*

Kombinacja	Genotyp								
	J-1	J-2	J-3	J-5	J-6	J-7	J-8	J-9	Średnie
	Liczba pędów po 5,5 miesiącach kultury								
2iP-10, WPM	z	z	0	1	4	z	Z	-	6
2iP-10, Anderson	z	z	z	z	z	0	z	-	0
Z-1 WPM	z	0	224	18	z	18	33	-	329
Z-1 Anderson	0	0	86	1	z	98	10	28	228
<b>Suma</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>310</b>	<b>19</b>	4	116	43	28	
	Współczynnik rozmnażania								
2iP-10, WPM	-	-	0	0	0,7	z	-	-	
2iP-10, Anderson	-	-	0	-	-	0	-	-	
Z-1 WPM	0	0	5,5	4,15	-	2,6	4,13	-	3,8
Z-1 Anderson	0	0	3,0	0,3	-	7,8	1,8	7,0	3,5

- Odpowiednim podłożem do rozmnażania borówki czernicy w kulturach *in vitro* jest pożywka o składzie podstawowym według Andersona (1976) z dodatkiem zeatyny.

### 3. Optymalizacja metody poliploidyacji *in vitro*



Antymitotyki (mg l <sup>-1</sup> )	J-3	J-4	J-5	J-8	J-9	Całkowita l. tetraploidów (Efektywność poliploidyacji, %)
Kolchicyna 125	1	3	3	1	6	14 (6.6%)
Kolchicyna 250	2	0	0	14	5	21 (10.4)
APM 5	2	3	2	8	1	16 (5.1%)
APM 10	11	2	2	6	2	23 (8.6%)
Całkowita l. tetraploidów	16	8	7	29	14	74 (7.4%)

- Efektywność poliploidyacji borówki czernicy była stosunkowo wysoka. Pojedyncza seria traktowania antymitotykami eksplantatów pędowych każdego z genotypów wystarczyła do uzyskania od 7 do 29 tetraploidów dla każdego z nich.
- Kolchicyna i APM w wyższych stężeniach: odpowiednio 250 mg l<sup>-1</sup> i 10 mg l<sup>-1</sup>, wykazywały zbliżoną skuteczność poliploidyacji, która wynosiła około 9-10%.

## 4. Optymalizacja ukorzeniania pędów wybranych tetraploidów, ich aklimatyzacji do warunków *ex vitro*, uprawy w szklarni oraz w gruncie

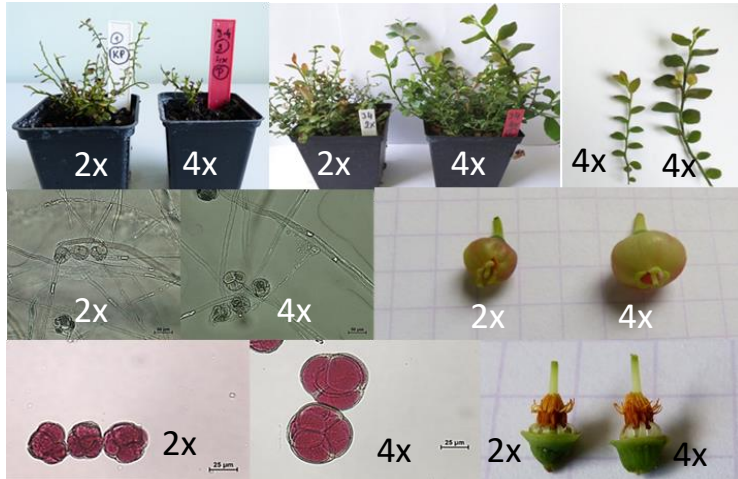
- Tetraploidy borówki czernicy charakteryzują się niższą zdolnością do ukorzeniania w stosunku do ich diploidalnych odpowiedników.
- Zastosowanie krótkiego 5-7-dniowego traktowania pędów *in vitro* auksynami nie poprawiło efektywności ich ukorzeniania.
- Najlepsze parametry ukorzeniania i wzrostu roślin uzyskano, gdy i mikrosadzonki sadzono bezpośrednio do standardowego podłoża (stosowanego dla borówki wysokiej) wzbogaconego ziemią z lasu.



Kombinacja	Liczba ukorzenionych roślin (%)			Długość najdłuższego pędu		
	Po 12 tyg.					
	2x	4x-1	4x-7	2x	4x-1	4x-7
Substrat	55,0	48,3	48,3	2,3 ± 1,3	1,7 ± 0,8	2,3 ± 1,6
Substrat + ziemia z lasu	76,7	60,0	50,0	3,2 ± 1,4	2,5 ± 1,1	3,0 ± 2,2
Średnie	65,9	54,2	49,2	2,7	2,1	2,6



## 5. Ocena fenotypowa

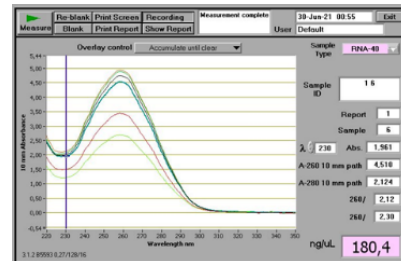
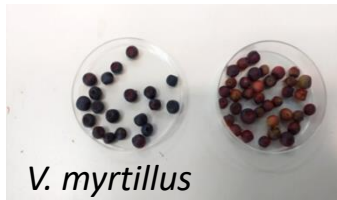


Cecha	Diploid	Tetraploid	$p$
Długość pędów (cm)	23.5 a	22,0 b	0,24
Grubość pędów (mm)	2.1 b	2,4 a	0,01
Powierzchnia liści (cm <sup>2</sup> )	1.6 b	2,6 a	0,00
Zawartość chlorofilu (CCI)	11.4 b	14,5 a	0,00
Długość aparatów szparkowych (μm)	31.7 c	37,8	0,00
Gęstość aparatów szparkowych	26.8 a	17,3	0,00
Procent kwitnących roślin (%)	66.7	20.0	-
Liczba kwiatów / roślinę kwitnącą	3.0	2.2	-
Średnica kwiatu (mm)	4.8 b	7.8 a	0.01
Średnica tetrad pyłkowych (μm)	41.9 b	56.5 a	0.00
Kiełkowanie tetrad pyłkowych (%)	94.7	89.3	-

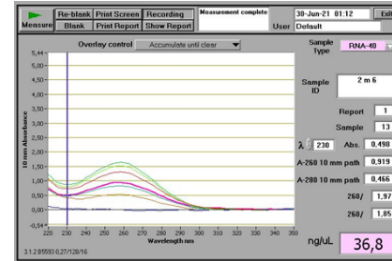
- Tetraploidy wyraźnie różniły się od diploidów. Początkowy wzrost tetraploidów był znacznie słabszy, ale po dwóch latach uprawy przewyższyły wigorem rośliny diploidalne. Tetraploidy miały grubsze pędy, większe liście, wyższą zawartością chlorofilu oraz większe aparaty szparkowe i pyłek.
- Pierwsze kwitnienie obserwowano już u 1,5-rocznych roślin, zarówno diploidalnych jak i tetraploidalnych. Neotetraploidy borówki czernicy charakteryzują się dużą żywotnością i żywotnym pyłkiem, kiełkującym w około 90% podobnie, jak pyłek diploidów.
- Uzyskano pierwsze siewki z krzyżowań autotetraploida J4-4x-4 *V. myrtillus* (dawca pyłku) z trzema odmianami *V. corymbosum* (formy mateczne).
- W kolejnych latach planowane jest potwierdzenie mieszańcowości siewek przy użyciu markerów molekularnych. Siewki zostaną także poddane ocenie fenotypowej.



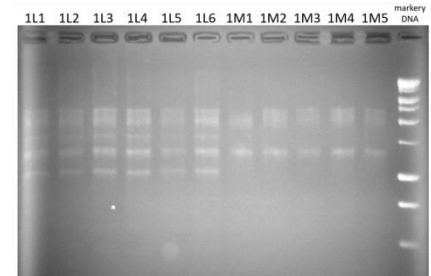
## 6. Poszukiwanie genów kandydujących związanych z akumulacją związków fenolowych w miąższu owoców borówki czernicy.



Przykładowe widma absorpcji UV preparatów RNA izolowanych z liści



Przykładowe widma absorpcji UV preparatów RNA izolowanych z miąższu



Rozdział elektroforetyczny preparatów RNA z liści (L) i miąższu (M)

- Przy użyciu zestawu komercyjnego firmy Norgen Biotek (z niewielkimi modyfikacjami) przygotowano 30 preparatów RNA izolowanego z liści i owoców (oddzielnie ze skórki i miąższu) dla 3 odmian borówki wysokiej i 3 genotypów borówki czernicy.
- Największą wydajność uzyskiwano przy izolacji RNA z liści, najniższa była wydajność izolacji z miąższu owoców.
- Preparaty te są niezbędne do dalszych badań - do utworzenia bibliotek cDNA i sekwencjonowania NGS w celu poznania molekularnego mechanizmu biosyntezy antocyjanów w miąższu owoców.
- Przygotowanie kolejnych preparatów RNA będzie wykonane w 2022 r.

## Wykaz publikacji wyników badań

1. Streszczenie posteru: „Poliploidyzacja borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*) oraz wstępna ocena fenotypowa uzyskanych autotetraploidów”; M. Podwyszyńska, K. Mynett, S. Pluta, M. Markiewicz. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku”, SGGW, Warszawa, 22 – 24 września 2021, Streszczenia: 73
2. Streszczenie posteru: „Ocena borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*) w fazie generatywnej oraz zdolność do krzyżowania z borówką wysoką (*Vaccinium corymbosum*); K. Mynett, A. Marasek-Ciołakowska, M. Podwyszyńska, S. Pluta. „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku”, SGGW, Warszawa, 22 – 24 września 2021, Streszczenia: 83
3. Streszczenie posteru: Ocena zróżnicowania genetycznego borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus* L.) w celu selekcji genotypów do wytwarzania autotetraploidów; M. Markiewicz, M. Podwyszyńska, S. „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku”, SGGW, Warszawa, 22 – 24 września 2021, Streszczenia: 92
4. Publikacja naukowa: Chromosome doubling in genetically diverse bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) accessions and evaluation of tetraploids in terms of phenotype and ability to cross with highbush blueberry (*V. corymbosum* L.). Małgorzata Podwyszyńska, Katarzyna Mynett, Monika Markiewicz, Stanisław Pluta, Agnieszka Marasek-Ciołakowska: *wysłana do wydawnictwa Agronomy – po pozytywnych recenzjach*