

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

Cel zadania:

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

W 2022 roku w szklarni wyprodukowano siewki (2000 szt.), które będą wysadzone na polu selekcyjnym w SD w Dąbrowicach wiosną 2023 roku, w celu wykonania dalszej oceny i selekcji. Przeprowadzono wstępną ocenę starszych siewek pod względem ważnych cech użytkowych (siły wzrostu i pokroju krzewów, intensywności kwitnienia, zawiązywania owoców oraz plonowania, wielkości i jakości owoców).

Wykonano wstępną ocenę fenotypową 10 nowych klonów hodowlanych w kolekcji pod względem wybranych cech. Przeprowadzono weryfikację tożsamości genetycznej DNA siedmiu odmian borówki wysokiej (potencjalnych form rodzicielskich). Metodą *in vitro* rozmnożono 10 klonów hodowlanych w warunkach szklarniowych.

Prowadzono 2 doświadczenia odmianowo-porównawcze na polach w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach. Wykonano ocenę fenotypową klonów hodowlanych i odmian standardowych pod względem siły wzrostu, pokroju krzewów, plonowania i masy (wielkości) owoców.

Wykonano analizy składu chemicznego owoców 21 genotypów borówki wysokiej oraz określono ich jakość i przydatność do deserowego wykorzystania na świeżym rynku.

Oceniono stopień zróżnicowania genetycznego 7 odmian borówki wysokiej ('Bluecrop', 'Chandler', 'Meader', 'Aino', 'Alvar', 'Arto', 'Jorma'), potencjalnych form rodzicielskich w programach krzyżowań.

Na podstawie uzyskanych wyników badane genotypy pogrupowano na takie, które produkują owoce z woskowym nalotem oraz na te, u których nie odnotowano cechy woskowości skórki. Dodatkowo, dla wytypowanych odmian, zróżnicowanych pod względem badanej cechy, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów CRE1 i LTP, związanych z produkcją warstwy kutykuli na owocach borówki. Łącznie przeprowadzono ponad 120 testów qPCR.

Opis zadania:

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

Wczesną wiosną rozpoczęto produkcję siewek borówki wysokiej pokolenia F₁, uzyskanych z nasion z programu krzyżowań (40 kombinacji) wykonanego w wiosną 2021 r. Nasiona po 3 miesięcznej stratyfikacji poddano kiełkowaniu w ogrzewanej szklarni z doświetlaniem. Młode siewki (w fazie 3-4 liści) pikowano indywidualnie do doniczek plastikowych P7 (7,0x7,0x9,0 cm) wypełnionych mieszaniną torfu kwaśnego (pH 4-5) + substrat kokosowy + piasek (w proporcji 2:2:1). W sumie wyprodukowano 2000 siewek. Aktualnie siewki przechodzą okres spoczynku w tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach. Planuje się, że dobrze wyrosnięte siewki wysadzone będą na specjalnie przygotowanym (zakwaszonym) polu selekcyjnym w SD w Dąbrowicach wiosną 2023 r.

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

Wykonano podstawowe zabiegi uprawowe i pielęgnacyjne w 4 kwaterach hodowlano-selekcyjnych (PS-6-BOR'2015, PS-7-BOR'2016, PS-8-BOR'2019, PS-9-BOR'2021) – w sumie 9697 siewek, które posadzono w latach 2015-2016 i 2019-2020 na polach w SD w Dąbrowicach, zajmujących powierzchnię ok. 0,5 ha. W kwaterach selekcyjnych (PS-6-BOR'2015 i PS-7-BOR'2016) wykonano ocenę fenotypową starszych siewek pod względem siły wzrostu i pokroju krzewów, intensywności kwitnienia oraz zawiązywania owoców. W II półroczu br. oceniono siewki pod kątem plonowania roślin, wielkości, atrakcyjności oraz jakości owoców, w tym jędrności i smaku. Ocena fenotypowa siewek będzie kontynuowana w kolejnych 2-3 latach, w celu selekcji wartościowych pojedynków borówki wysokiej.

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

Prowadzono utrzymywanie w kulturach *in vitro* 32 genotypów borówki wysokiej (10, 13, 26, 30, 48, 51, 53, 59, 68, 69, 70, 77, 104, 132B, 140, 156A, 159, 160, 181, 228, 251, D4, D4/16, Mutant'19, 'Bluecrop', 'Meander', 'Patriot', 'Brigitta Blue', 'Bluegold', 'Duke'); w sumie ok. 2700 pędów ww. genotypów.

Zweryfikowano tożsamość genetyczną 33 roślin, reprezentujących 7 odmian borówki wysokiej 'Bluecrop', 'Chandler' i 'Meader' (USA) oraz 'Aino', 'Alvar', 'Arto', 'Jorma' (Finlandia). Łącznie wykonano 2376 reakcji PCR, w wyniku których potwierdzono identyczność roślin reprezentujących odmiany: 'Chandler', 'Meader', 'Aino', 'Alvar', 'Arto', 'Jorma'. Przeprowadzone analizy wykazały również odmienność genetyczną pomiędzy roślinami reprezentującymi odmianę 'Bluecrop'.

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

W 2022 roku wykonano kolejną ocenę klonów hodowlanych w kolekcji klonów na polu w SD w Dąbrowicach. Ocena dotyczyła wybranych cech morfologicznych roślin (siły i pokroju krzewów), intensywności kwitnienia i zawiązywania owoców. W II półroczu br. wykonano ocenę klonów pod względem terminu dojrzewania owoców, plonowania roślin, wielkości, barwy, obecności nalotu na skórce, jędrności i smaku oraz odporności na główne choroby i szkodniki. Ocena fenotypowa klonów hodowlanych będzie prowadzona w kolejnych 2-3 latach, w celu selekcji wartościowych genotypów. Najcenniejsze z nich będą rozmnożone w kulturach *in vitro*.

Metodą *in vitro* rozmnożono 10 klonów hodowlanych borówki wysokiej (BOR-102, 104, 132B, 140, 156A, 159, 160, 181, 228, 251) oraz 3 genotypy ('Mutant'19, 'Bluecrop' i 'Duke'), jako potencjalne formy rodzicielskie w programach krzyżowań w przyszłości. Uzyskane rośliny posłużą także do założenia kolejnego, wstępnego doświadczenia odmianowo-porównawczego w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach. Łącznie uzyskano 790 ukorzenionych w doniczkach (P9) i zaadaptowanych do warunków *ex vitro* roślin.

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

W 2022 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').

Wykonano ocenę klonów hodowlanych i odmian standardowych borówki wysokiej w doświadczeniu odmianowo-porównawczym założonym na polu w Sadzie Pomologicznym wiosną 2019 roku. Materiał badawczy stanowiły doniczkowe (P9) rośliny ww. genotypów pochodzące od dwóch metod wegetatywnego rozmnażania: sadzonki zielne (*ex vitro*) i z kultur tkankowych (*in vitro*). Doświadczenie założono 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. W 2022 roku wykonano wstępną (drugą) ocenę młodych roślin ww. genotypów rosnących w tym doświadczeniu. Ocena 3-letnich roślin dotyczyła głównie cech morfologicznych (siły wzrostu i pokroju krzewów) oraz intensywności kwitnienia i zawiązania owoców. W II półroczu br. (lipiec - wrzesień) kontynuowano obserwacje i ocenę innych ważnych cech użytkowych, w tym plonowanie roślin, masa (wielkość) i skład chemiczny owoców.

Siła wzrostu, oceniana na podstawie wysokości i szerokości roślin, badanych klonów hodowlanych i odmian standardowych była zróżnicowana i uzależniona od genotypu i metody wegetatywnego rozmnażania roślin. Średnia wysokość roślin wszystkich ocenianych genotypów była zbliżona dla obu rozmnażanych metod (*ex vitro* i *in vitro*), odpowiednio 96,5 i 97,0 cm. Wśród genotypów rozmnażanych *ex vitro* najwyższe rośliny (106,3-127,5 cm) miały klony oznaczone 49/2010, 53/2010, 77/2010, 57/2010, 26/2010 i 68/2010. W przypadku badanych genotypów rozmnażanych *in vitro* najwyższe krzewy (107,4 -112,1 cm) miały klony: 77/2010, 26/2010, 9P i 53/2010.

Średnia szerokość roślin rozmnażanych przez sadzonki zielne (*ex vitro*) była większa, niż dla drugiej metody *in vitro*, odpowiednio 92,4 i 81,1 cm. Dla metody rozmnażania *ex vitro* najszersze rośliny (86,8 -103,0) zmierzono dla następujących klonów: 51/2010, 57/2010, 57/2010, 53/2010, 68/2010, 49/2010 i 26/2010. W przypadku drugiej metody rozmnażania (*in vitro*) najszersze krzewy (99,7-104,4 cm) wytwarzały klony: 68/2010, 57/2010, 26/2010, 49/2010, 75/2010 i 59/2010.

Obliczony wskaźnik pokroju krzewu (iloraz wysokości do szerokości roślin) był także zróżnicowany dla badanych genotypów oraz ww. metod wegetatywnego rozmnażania borówki wysokiej. Średnio wskaźnik ten dla metody *ex vitro* wynosił 1,05 i był niższy niż dla *in vitro* – 1,20. Dla metody *ex vitro*, najwyższe wartości (1,01-1,25), czyli najbardziej wzniesiony pokrój określono u odmiany 'Duke' i większości badanych klonów. W przypadku metody *in vitro* najwyższe wartości tego wskaźnika stwierdzono u odmian 'Bluecrop' i 'KazPliszka' oraz kilku klonów: 77/2009, 57/2010, 68/2010, 77/2010, 9P, 58/2010 i 70/2010, zawierał się on między 1,23 i 1,59.

Intensywność kwitnienia młodych roślin odmian standardowych i klonów hodowlanych borówki wysokiej była także zróżnicowana. Uzyskane wstępne wyniki pokazują, że różnice między metodami rozmnażania *ex vitro* i *in vitro* były mniejsze (odpowiednio 6,4 i 6,9) niż dla badanych genotypów. Najintensywniej (7,1-8,1) kwitły rośliny klonów oznaczonych 77/2009, 30/2010,

69/2009, 49/2010, 51/2010 i 75/2010 (*ex vitro*) oraz dla metody *in vitro* odmiana 'Bluecrop' i klony: 53/2010, 77/2010, 65/2010, 70/2010, 30/2010, 75/2010 i 57/2010 (7,5-8,1).

Zawiązanie owoców badanych genotypów było skorelowane z intensywnością kwitnienia. Ogólnie młode rośliny odmian i klonów rozmnażanych *in vitro* zawiązały więcej zawiązków owocowych (6,8), w porównaniu do metody *ex vitro* (5,3). Dla metody *ex vitro* najwięcej zawiązków (6,1-7,1) stwierdzono na roślinach klonów: 75/2010, 26/2010, 77/2010, 69/2009, 04/010 i 70/2010. W przypadku metody *in vitro* oceniane odmiany standardowe ('Duke' i 'Bluecrop') oraz klony: 49/2010, 48/2010, 26/2010, 70/2010, 68/2010 i 59/2010 najlepiej zawiązały owoce (7,5-8,1).

Plonowanie badanych młodych roślin borówki wysokiej było także zróżnicowane i uzależnione od genotypu i metody wegetatywnego rozmnażania. Średni plon owoców z krzewów 19 klonów hodowlanych i 3 odmian standardowych rozmnażanych w kulturach *in vitro* był wyższy o około 41%, w porównaniu do metody *ex vitro*. W przypadku rozmnażania metodą *ex vitro* najwyższe plony (3,05-5,54 kg/poletko) zebrano z krzewów kilku klonów oznaczonych 04/2010, 76/2010, 69/2010, 75/2010, 9P, 57/2010, 77/2009 i 51/2010. Dla metody rozmnażania *in vitro* najwyższe plony owoców (5,16-8,07 kg/poletko) wydały rośliny odmiany 'Bluecrop' oraz klonów: 30/2010, 58/2010, 70/2010, 51/2010, 77/2010, 48/2010 i 77/2009.

Wielkość owoców (oceniana jako masa 100 szt., w g) była także zróżnicowana i uzależniona od genotypu i metody rozmnażania badanych klonów i odmian. Ogólnie, średnia masa owoców badanych genotypów rozmnażanych *ex vitro* była wyższa ok. 5,7% niż dla metody *in vitro*, wynosiła odpowiednio 171,8 i 162,0 g/100 szt. owoców. Dla metody rozmnażania *ex vitro* największe owoce (197,1-335,0 g/100 szt.) miały klony oznaczone: 51/2010, 77/2010, 58/2010, 76/2010, 48/2010 i 70/2010. Klony hodowlane pochodzące od rozmnażania *in vitro* 77/2009, 04/2010, 59/2010, 51/2010, 70/2010, 30/2010, wytwarzały największe owoce, o średniej masie od 180,0 do 287,7 g/100 szt.

Wykonano także analizy składu chemicznego owoców 21 genotypów borówki wysokiej, tj.: zawartość ekstraktu, suchej masy, kwasowości, związków fenolowych i antocyjanów. Stwierdzono, że badane odmiany i klony hodowlane różniły się między sobą zawartością poszczególnych parametrów chemicznych. Zawartość ekstraktu w owocach borówki wysokiej analizowanych genotypów wahała się w granicach 8,8-14,1 °Bx. Najwyższą zawartość ekstraktu notowano w owocach borówki klonu BOR70/201. Zawartość suchej masy w analizowanych owocach mieściła się w przedziale 11,4-17,4%, średnio najwięcej zawierały odmiany 'Draper' i 'Duke' oraz klon BOR-Nr 17. Kwasowość owoców badanych genotypów wahała się w granicach 0,34-1,32% i była najwyższa w owocach odmiany 'Bluegold' i 'Lateblue', a najniższa w owocach 3 klonów: BOR-Nr 9, BOR-Nr 12 i BOR-Nr 17. Zawartość związków fenolowych ogółem w badanych owocach mieściła się w granicach 256-387 mg/100g, natomiast antocyjanów 82-186 mg/100g. Najwyższą zawartość związków fenolowych i antocyjanów stwierdzono w owocach borówki 4 odmian: 'Bluegold', 'Draper', 'Duke' i 'Lateblue' oraz w klonie BOR-Nr 17. Dane literaturowe donoszą, że owoce borówki wysokiej są bogatym źródłem substancji o charakterze prozdrowotnym m.in. polifenoli, w tym antocyjanów.

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 standardowymi

(‘Bluecrop’ i ‘Duke’) rozmnożonymi *in vitro*, założone polu w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach, wiosną 2020 roku.

W 2022 r. wykonano wstępną ocenę przetrzymywania i adaptacji roślin w doświadczeniu, założonym na polu w Sadzie Pomologicznym, wiosną 2020 r. W sezonie wegetacyjnym wykonano wstępne obserwacje i ocenę siły wzrostu roślin ww. genotypów. Ze względu na młody wiek badanych roślin stwierdzono małe zróżnicowanie ocenianych genotypów pod względem siły wzrostu i pokroju krzewów. Wiosną (poł.-k. maja) wykonano wstępną ocenę intensywności kwitnienia i zawiązywania owoców 2-letnich roślin ww. genotypów. Młode rośliny odmian standardowych i klonów hodowlanych borówki wysokiej nie wykazywały dużego zróżnicowania pod względem ocenianych cech użytkowych. Średnia intensywność kwitnienia badanych genotypów wynosiła 2,8 i zawierała się między 2,0 i 3,7. Zawiązanie owoców ocenianych genotypów było słabe, średnia wartość oceny tej cechy wynosiła 1,8 i wahała się od 1,0 do 2,7. Zakłada się, że ocena wybranych cech użytkowych, w tym cech morfologicznych, plonowania roślin i jakości owoców będzie przeprowadzona w sezonie 2023 r. oraz w kolejnych 3-4 latach.

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.

Przeprowadzono ocenę zróżnicowania genetycznego potencjalnych form rodzicielskich: odmian: ‘Liberty’, ‘Aurora’, ‘Rubel’, ‘Toro’, ‘Bluegold’, ‘Bonifacy’, Jurma (odmienne pod względem cechy występowania woskowego nalotu na owocach). Na matrycy wyizolowanego z liści genomowego DNA wykonano analizę zróżnicowania genetycznego odmian borówki stosując metody: SSR-PCR z użyciem 10 oligonukleotydów specyficznych dla genomu *V. corybosum*, analizy skupień metodą PCA oraz do wykreślenia dendrogramu dystansu genetycznego (UPGMA). Zgrupowano badane odmiany borówki w dwa klastry. W jednym zgrupowano odmiany wytwarzające woskowy nalot na owocach w drugim – odmiany wytwarzające owoce bez nalotu. Najmniejsze podobieństwo genetyczne (28%) odnotowano pomiędzy odmianami ‘Bonifacy’ i ‘Bluegold’, natomiast największe pomiędzy odmianami ‘Aurora’ i ‘Liberty’. Maksymalne podobieństwo pomiędzy badanymi obiektami wyniosło 55,7%. Dodatkowo z roślin ww. odmian, w sezonie 2022 (czerwiec, lipiec, sierpień), kolekcjonowano niedojrzałe i dojrzałe (w pełni wybarwione) owoce oraz skórka owoców dojrzałych dla izolacji matryc RNA, w celu przeprowadzenia analizy profili ekspresji wytypowanych genów.

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 zastosowano matryce RNA wyizolowane z ww. odmian tj: ‘Liberty’, ‘Aurora’, ‘Rubel’, ‘Toro’, ‘Bluegold’ oraz ‘Bonifacy’ i ‘Jurma’ (opis w punkcie 6). Do analizy porównawczej aktywności badanych genów wytypowano gen referencyjny GADPH. Poziom zróżnicowania aktywności transkryptu przeprowadzono dla genu kodującego białko transportujące tłuszcze - LTP (Lipid Transporter Protein) oraz genu CR1-like - koduje Acetylo Koenzym A - reduktazę tłuszczów. W uzyskanych wynikach, zaobserwowano istotnie wysoką aktywność obu badanych genów w skórce owoców odmiany ‘Bonifacy’, która charakteryzuje się obecnością warstwy kutykuli. Dla genu CER1, odnotowano wysoką aktywność także w genomach odmian ‘Bluegold’, ‘Liberty’, ‘Rubel’ i ‘Aurora’. Istotnie podwyższoną jego aktywność zidentyfikowano również w owocach

dojrzałych tych odmian. Nie zaobserwowano aktywności wybranych do badań genów w genomach odmian ‘Toro’ i ‘Jurma’, które charakteryzują się brakiem woskowego nalotu.

Działania upowszechnieniowo-promocyjne:

Podczas X Międzynarodowej Konferencji Borówkowej organizowanej 1-2.03.2022 r. w Ożarowie Mazowieckim wygłoszono referat pt. „Hodowla twórcza borówki wysokiej – główne ograniczenia uzyskania nowych odmian typu północnego”.

Podczas organizowanych „Dni Otwartych Drzwi IO-PIB” 22.06.2022 r. zapoznano grupę zainteresowanych (ok. 50 osób) z postępem w hodowli borówki wysokiej w ZHRO oraz oceną wartości produkcyjnej odmian i klonów hodowlanych w doświadczeniach odmianowo-porównawczych – S. Pluta, Ł. Seliga.

Podczas Międzynarodowego Kongresu Ogrodniczego, który odbył się w dniach 14-20.08.2022 r., w Angers, Francja, kierownik zadania celowego przedstawił E-Poster: Breeding of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) at National Institute of Horticultural Research, Skierniewice, Poland [Hodowla borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w Instytucie Ogrodnictwa – PIB, Skierniewice, Polska].

Prowadzono kilkanaście porad i zaleceń (telefonicznie, e-mailowo) producentom borówki amerykańskiej (wysokiej) dotyczących odmian i realizowanego programu hodowli twórczej tego gatunku w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach.