

**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***

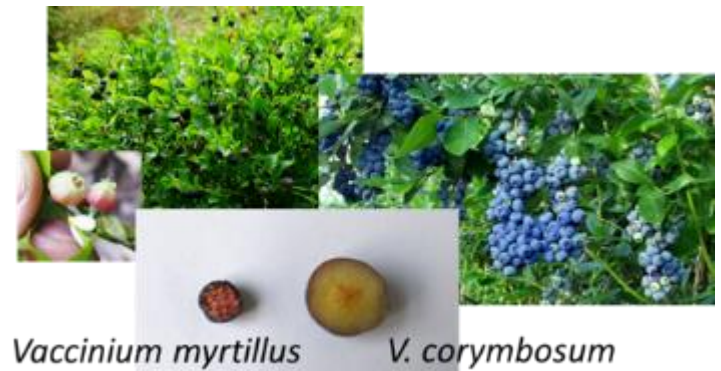
***Planowany okres realizacji zadania: 2023 – 12 m-cy***

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). Poziomą ekspresję 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.		
<b>J3</b>						
	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	<b>93,3</b>	<b>80,0</b>	57,1	6,18 abc	<b>12,96 g-h</b>	<b>7,63 a-e</b>
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	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>80,0</b>	5,83 abc	11,40 e-h	5,50 abc
<b>J8</b>						
	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	<b>82,4</b>	<b>85,7</b>	93,3	<b>13,29 h</b>	<b>6,79 a-e</b>	<b>10,29 dh</b>
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	<b>88,2</b>	<b>92,9</b>	<b>92,9</b>	<b>11,73 fgh</b>	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.

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

Genotyp	Średnica pędów (mm)	Powierzchnia liści (cm <sup>2</sup> )	Zawartość chlorofilu (CCI)	L. roślin kwitn. /posadzonych
<b>J4 2x</b>	<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	-
<b>J8 2x</b>	<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)
<b>J5 2x</b>	<u>163,1 a</u>
J5 4x-8	90,25 b
J5 4x-10	108,3 b
<b>J3 2x</b>	<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
<b>J4 2x</b>	<u>266,78 b</u>
J4 4x-2	175,46 cd
J4 4x-3	200,00 c
<b>J4 4x-5</b>	<b>342,36 a</b>
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.

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

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

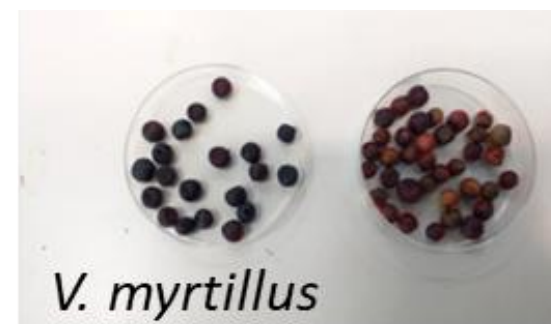


- Fenotyp większości siewek o potwierdzonej w analizach molekularnych mieszańcowości wykazywał ząbkowanie brzegów liści oraz liczbę włosków o charakterze pośrednim w porównaniu do genotypów rodzicielskich borówki czernicy i borówki wysokiej. Cechy te mogą stanowić markery morfologiczne mieszańcowości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

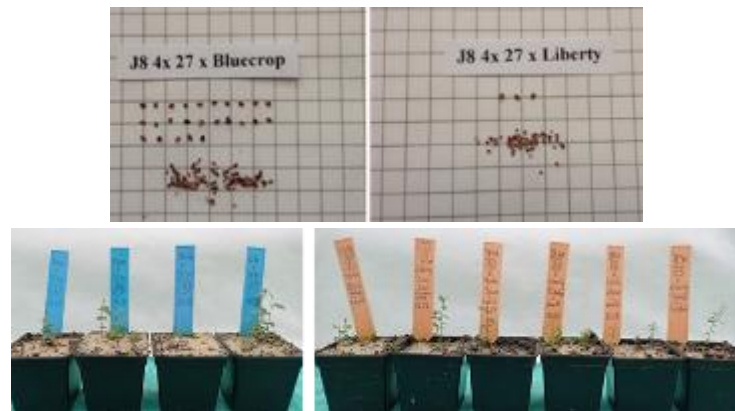


- Zbiór złożonych *de novo* kontigów, reprezentujących transkryptomy borówki czernicy (liści, miąższu i skórki owoców), w połączeniu z transkryptomem referencyjnym borówki wysokiej, posłużył do obliczenia i porównania profili ekspresji dla 24 prób zmapowanych na około 200 000 potencjalnych genów borówki.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

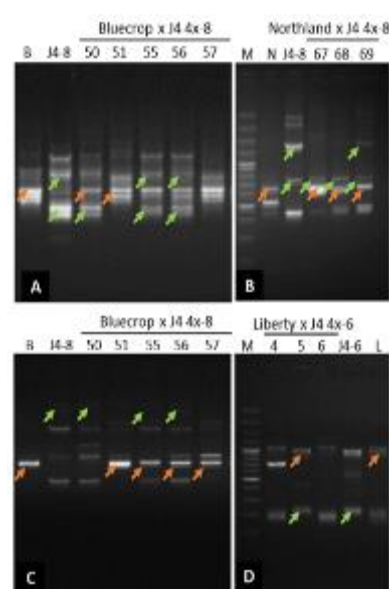
## 4. Ocena zdolności do krzyżowania tetraploidów borówki czernicy z borówką wysoką oraz ocena statusu uzyskanych siewek.

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
<b>Razem</b>	<b>10</b>	<b>693</b>	<b>21</b>	<b>0,032</b>
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
<b>Razem</b>	<b>28</b>	<b>433</b>	<b>17</b>	<b>0,039</b>
Klony 4x <i>V.m.</i> x klony 4x <i>V.m.</i>	5	30	40	1,33



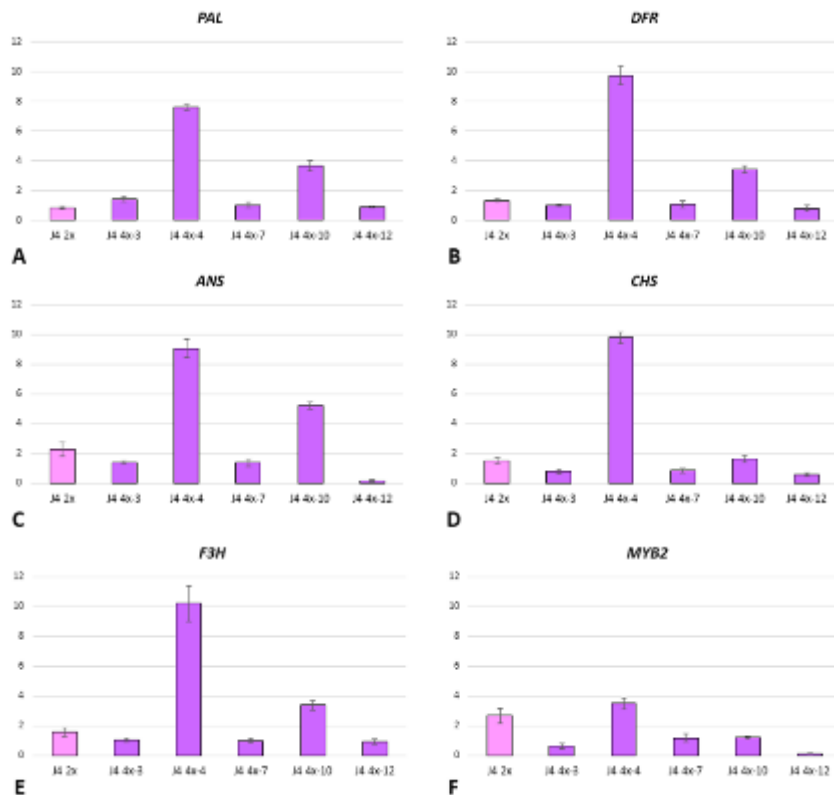
- W krzyżowaniach, w których odmiany borówki wysokiej występowały jako rośliny męskie uzyskiwano średnio - 0,032 siewki na zapylny kwiat (**uzyskano 21 siewek**). W krzyżowaniach odwrotnych, efektywność krzyżowania była podobna – 0,039 (**uzyskano 17 siewek**). Znacznie wyższą efektywność wykazano w 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.



**Elektroforegramy** amplifikacji DNA siewek *V. corymbosum* x *V. myrtillus* oraz roślin rodzicielskich; startery SSR/ISSR: UBC844 (A), UBC843 (B, C), CA421F (D);  
**N** – 'Northland',  
**L** – 'Liberty';  
**B** – 'Bluecrop';  
**4, 5, 6 itd.** – siewki z krzyżowań.  
 Zielone strzałki - allele *V. myrtillus*-4x,  
 pomarańczowe – *V. corymbosum*



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



- Wysoka nadekspresja 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	<b>5097,3</b>	2634,8	<b>4221,9</b>	2549,1
KWASY FENOLOWE	1249	1517	<b>1684,2</b>	1486	<b>1478,2</b>	1463
FLAWONOLE	48,9	12,6	<b>78,9</b>	40,5	<b>84,2</b>	20,8
ANTOCYJANY	17,3	14,1	<b>25,8</b>	11,5	<b>18,8</b>	10,1

## Wykaz publikacji wyników badań

1. Streszczenie referatu: 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. Streszczenie posteru: 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. Streszczenie posteru: 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