

**Wytwarzanie autotetraploidów borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*)
zdolnych do krzyżowania z borówką wysoką (*V. corymbosum*)
oraz badanie mechanizmu molekularnego biosyntezy
antocyjanów w miąższu owoców**

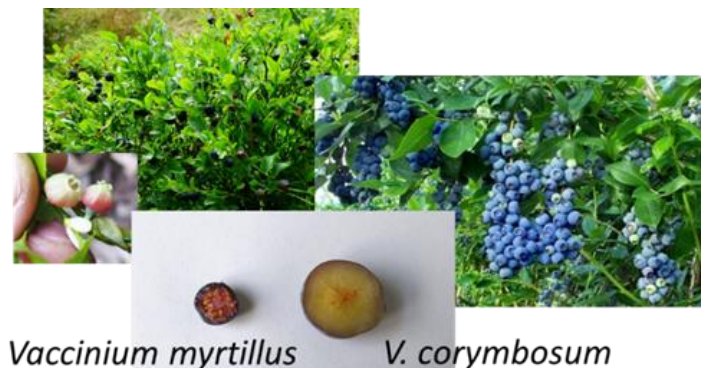
Numer zadania: 45

Planowany okres realizacji zadania: 2024 – 12 m-cy

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

Institut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice
Zakład Biologii Stosowanej

Cele projektu w 2024 r.



Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1	Optimalizacja ukorzeniania <i>in vitro</i> i aklimatyzacji mikrosadzonek do warunków <i>ex vitro</i> wybranych tetraploidów borówki czernicy Utrzymanie kultur pędów <i>in vitro</i> tetraploidów i diploidów borówki czernicy w celu zapewnienia materiału do dalszych badań	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	Optimalizacja ukorzeniania <i>in vitro</i> i aklimatyzacji mikrosadzonek <i>ex vitro</i>	Pędy tetraploidów <i>V. myrtillus</i> taksonu J9 o niskiej zdolności do ryzogenezy ukorzeniano <i>in vitro</i> w obecności paklobutrazolu i/lub IBA oraz NAA. Pędy pojedyncze lub w kępkach umieszczano na pożywce pionowo (dośw. 1.1) lub poziomo (dośw. 1.2); po 3 miesiącach ukorzeniania <i>in vitro</i> wykonano obserwacje liczby ukorzenionych pędów i parametrów ich wzrostu, następnie pędy sadzono w substracie torfowym (jak w 2023 r.) i po 6 tyg. oceniono liczbę ukorzenionych roślin.
2	Ocena fenotypowa	Tetraploidy oceniano w odniesieniu do diploidów: zawartość antocyjanów w liściach; u roślin 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, 2022 i 2023 r.
3	Poszukiwanie genów kandydujących związanych z akumulacją związków fenolowych w miąższu owoców borówki czernicy	Izolowano 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> . Sekwencjonowano (Genomed) 9 prób całkowitego RNA, przygotowano biblioteki cDNA (metodą RiboZero) i odczytano zawarte w nich sekwencje na platformie Illumina. Przeprowadzono analizę bioinformatyczną surowych odczytów (Qiagen CLC Genomics Workbench; mapowano na genomy referencyjne oraz złożono transkryptomy metodą <i>de novo</i>).
4	Ocena zdolności do krzyżowania tetraploidów borówki czernicy oraz ocena statusu mieszańca uzyskanych siewek	Do krzyżowań wykorzystano klon tetraploidalny <i>V. myrtillus</i> J3, J4, J5 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 krzyżowań w 2022 i 2024 r. 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	Wykonano analizę ekspresji dla kolejnych sześciu genów związanych z biosyntezą antocyjanów (UFGT) oraz pięciu genów regulatorowych (MYBA1, MYBA2, MYB1, MYB10, MYB100) u pięciu tetraploidalnych klonów borówki czernicy J4 (J4 4x-3, J4 4x-4, J4 4x-7, J4 4x-10, J4 4x-12) oraz ich diploidalnego odpowiednika (J4 2x). Genem referencyjnym, jak w poprzednim roku, był gen GAPDH kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego.
6	Analiza ilościowa i jakościowa związków fenolowych	Analizowano liście 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 *in vitro* i aklimatyzacji mikrosadzonek wybranych tetraploidów do warunków *ex vitro*

Tab. 1. Wpływ auksyn i paklobutrazolu na formowanie korzeni przez eksplantaty pędowe (umieszczone na pożywce poziomo) tetraploidów borówki czernicy J9 o niskich zdolnościach do ryzogenezy

Pożywka, regulatory wzrostu (mg l ⁻¹)	Genotyp						Ukorzenione eksplantaty pędowe (%)
	Liczba ukorzenionych eksplantatów pędowych						
	J9 2x	J9 4x-1	J9 4x-2	J9 4x-5	J9 4x-6	J9 4x-7	
Kontrola	3/8	1/7	0/7	3/6	1/9	1/8	20,9
Pac 0,1	1/7	3/6	3/8	6/8	2/10	1/9	33,3
Pac 1	4/6	5/6	3/8	1/7	1/9	2/12	33,3
IBA 2	0/7	1/6	0/9	0/7	-	0/7	2,7
Pac 0,1+IBA 2	1/7	7/7	2/9	6/7	4/8	-	52,6
Pac 1+ IBA 2	7/7	-	0/9	1/6	6/10	7/9	51,2
NAA 1	2/7	6/6	3/6	4/7	2/8		50,0
Pac 0,1+NAA 1	3/7	-	1/9	1/7	4/11	0/9	20,9
Pac 1+NAA 1	6/7	3/6	5/6	1/6	-	1/9	47,1
Ukorzenione eksplantaty pędowe (%)	42,9	59,0	23,9	37,7	30,8	19,0	



Rys. 1. Pędy tetraploidów borówki czernicy J9 siedem dni po sadzeniu *ex vitro*, podczas aklimatyzacji (po lewej) i 8 tyg. po posadzeniu (po prawej); z wyjątkiem jednej rośliny wszystkie zamarły.

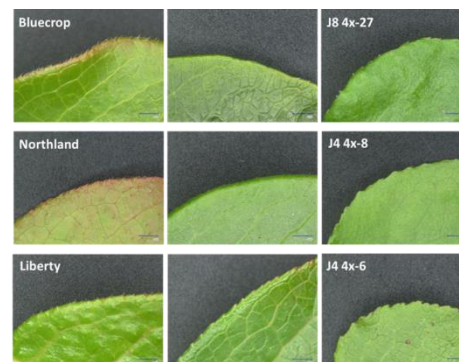
- Zdolności do formowania korzeni norweskiego genotypu borówki czernicy J9 są bardzo niskie a w przypadku tetraploidów są znikome. Jedynie traktowanie wysoce aktywną auksyną NAA oraz IBA w połączeniu z paklobutrazolem stymulowało formowanie korzeni u zaledwie połowy pędów badanych klonów tetraploidalnych (**Tab. 1**). Po posadzeniu *ex vitro*, mimo stosowani optymalnych warunków aklimatyzacji, niemal wszystkie posadzone pędy (ukorzenione i nieukorzenione) zamierały. Ostatecznie przeżyła jedna roślina (**Rys. 1**).

2. Ocena fenotypowa

- przykłady dla siewek mieszańcowych

Tab. 1. Ocena 3-letnich siewek mieszańcowych uzyskanych w 2021 r. z krzyżowań tetraploidalnej borówki czernicy z borówką wysoką

Genotyp	Liczba włosków na brzegu liścia	Liczba kwiatostanów	Liczba kwiatów/kwiatostan	Masa owoców /roślinę
Bluecrop (BC) kontrola	37,1 a	16	3,9	88,2
J4 4x-6	15,3 c			
1-BC x J4 4x	0,9 d	9	5	36,0
3-BC x J4 4x	0,0 d	10	6,4	60,8
5-BC x J4 4x	2,9 d	4	5,8	0,37
7-BC x J4 4x	27,4 b	2	5	0
10-BC x J4 4x	-	10	5,8	185,8
Liberty (L) kontrola	33,2 a	16	4,8	88,3
J4 4x-4	15,3 c			
1-L x J4 4x	0,0 e	10	8,9	221,7
2-L x J4 4x	23,7 b	5	5	0,17
4-L x J4 4x	7,1 d	20	7,6	63,5
5-L x J4 4x	7,8 d	37	6,7	50,0
Northland (N) kontrola	26,1 a	49	5,7	22,3
J4 4x-8 kontrola	14,6 d			
2-N x J8 4x	17,8 b	6	5,5	1,43
3-N x J8 4x	6,9 c	61	-	17,8



Rys. 1. Liście roślin rodzicielskich użytych do krzyżowań w 2022 borówki wysokiej (po lewej), tetraploidów borówki czernicy (po prawej) oraz ich mieszańców (po środku).



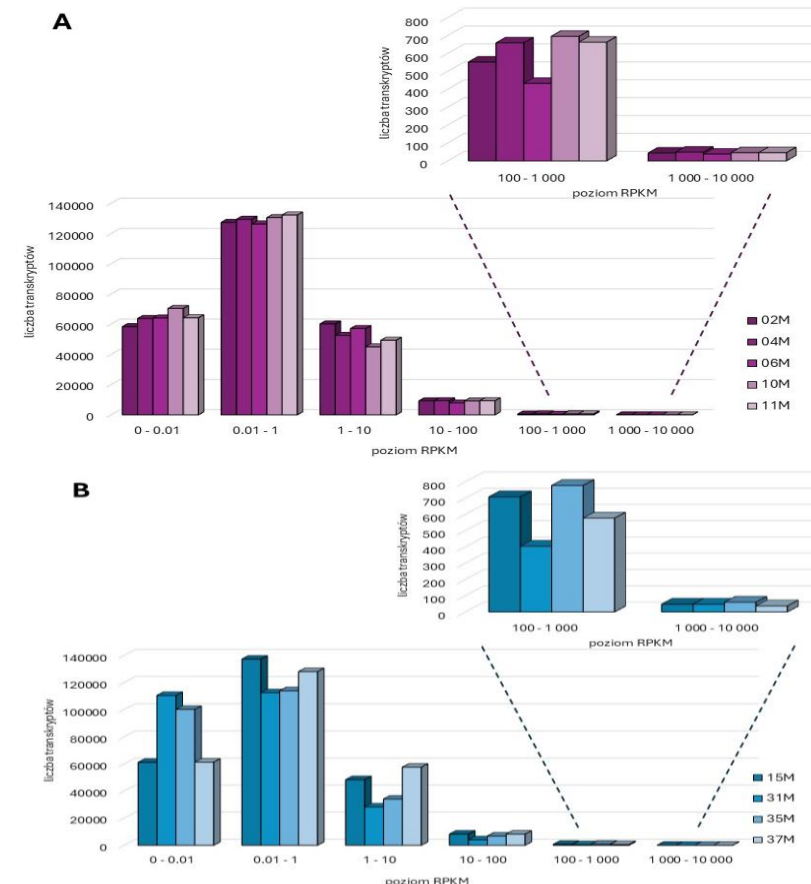
Rys. 2. Kwiaty roślin rodzicielskich oraz ich mieszańców: roślina ojcowska - borówka czernica (a); mieszańiec z 2022 r. borówki wysokiej 'Liberty' i borówki czernicy J4 4x-6 (kwiaty pojedyncze i bardziej okrągłe, jak u borówki czernicy) (b); roślina mateczna - borówka wysoka (c)

- Tegoroczna ocena tetraploidalnych klonów prowadzona na 3-letnich roślinach uprawianych w gruncie w odniesieniu do diploidów pokazała, że różnice np. średnicy pędów czy powierzchni liści ulegają zmniejszeniu lub nie występują. Nadal jednak większość tetraploidów w porównaniu do diploidów ma krótsze pędy, kilka klonów ma większe liście i wyższą zawartością chlorofilu (dane w sprawozdaniu).
- Zdolność kielkowania świeżego pyłku, mierzona po 24 godz. inkubacji na pożywce z sacharozą, u tetraploidalnych klonów borówki czernicy wybranych do krzyżowań była znacznie wyższa - wynosiła od około 65 do 85% - niż oceniana w poprzednim roku (dane w sprawozdaniu).
- U mieszańców borówki wysokiej z borówką czernicą liczba włosków na brzegach liści jest istotnie mniejsza lub pośrednia w porównaniu do genotypów rodzicielskich (**Tab. 1**) Cechy ząbkowania i owłosienia liści mogą stanowić markery morfologiczne mieszańcowości siewek uzyskanych z krzyżowań pomiędzy borówką wysoką a borówką czernicą (**Rys.1**).
- Siewki mieszańcowe w 3. sezonie uprawy *ex vitro* kwitły już niemal wszystkie i w większości zawiązały owoce. Kwiaty wielu mieszańców są podobne do kwiatów borówki czernicy (**Rys. 2**).

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

- Wyizolowano materiał genetyczny (RNA, transkryptomy) z miąższu owoców 3 odmian borówki wysokiej oraz 3 genotypów borówki czernicy w fazie czerwonych owoców i przygotowano matryce do sekwencjonowania.
- Odczytano 9 transkryptomów i zmapowano dane na genom referencyjny.
- Analizowano dane uzyskane w wyniku sekwencjonowania transkryptomów, wykonanego w 2022 – 2023 r. Do analiz transkryptomów wykorzystano wyniki sekwencjonowania matryc izolowanych z miąższu owoców 5 genomów borówki czernicy (02M, 04M, 06M, 10M, 11M) oraz 4 genomów borówki wysokiej (15M, 31M, 35M, 37M).
- Dla prób pochodzących z miąższu owoców borówki czernicy złożono *de novo* zbiór tzw. kontigów reprezentujących transkryptom borówki czernicy, który posłużył do obliczenia i porównania profili ekspresji dla prób zmapowanych na 256 000 potencjalnych genów borówki. **Rys. 1** przedstawia dystrybucję transkryptów o określonej wartości RPKM (Reads Per Kilobase Million) u poszczególnych genotypów
- Analiza BLAST wykazała podobieństwa do znanych genów dla 1454 kontigów, jednak na tym etapie badań dalsze analizy prowadzono dla kontigów, dla których $RPKM > 10$ w miąższu owoców borówki czernicy (razem 508 kontigów).

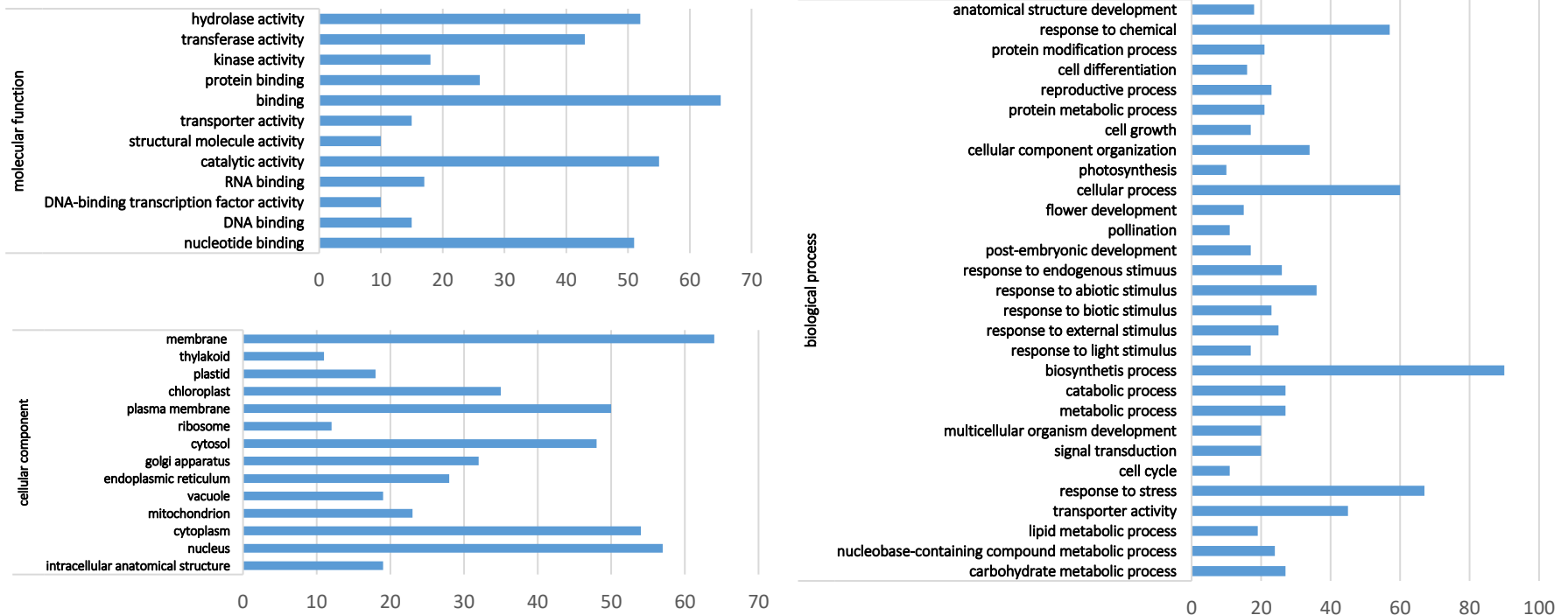
Rys. 1. Dystrybucja transkryptów u borówki czernicy (A) oraz borówki wysokiej (B) określona na podstawie wartości RPKM



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

W analizie funkcjonalnej Gene Ontology dla ponad 50% kontigów przypisano w sumie 1852 terminy GO określając ich funkcję oraz lokalizację w komórce (Rys. 2). W kategorii GO – *biological process* najczęściej przypisywano rolę w biosyntezie (90), w odpowiedzi na stres abiotyczny (67), procesach komórkowych (60) oraz odpowiedzi na czynniki chemiczne (57). W kategorii GO – *molecular function* badanym sekwencjom przypisano aktywności wiążące (65 terminów) oraz enzymatyczne właściwości katalityczne (55 terminów). Klasyfikacja pod względem lokalizacji w komórce (GO – *cellular component*) wykazała, że większość sekwencji kodowała białka zlokalizowane w błonie komórkowej (64), jądrze komórkowym (57) oraz cytoplazmie (54).

Rys. 2.



- ✓ Zidentyfikowano pulę **ponad 500 genów** charakteryzujących się zróżnicowaną ekspresją w miąższu owoców w analizie porównawczej borówki czernicy oraz borówki wysokiej, z której zostanie wytypowana pierwsza grupa genów zaangażowanych w syntezę i akumulację antocyjanów w miąższu owoców

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

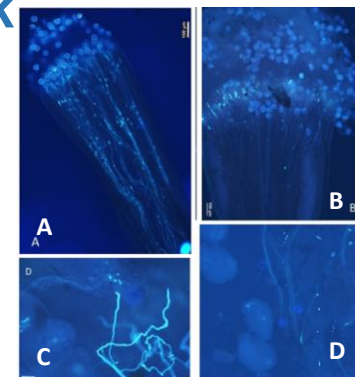
Tab. 1. Efektywność krzyżowań z 2024 r. pomiędzy 3 odmianami *V. corymbosum* i autotetraploidami *V. myrtillus* - przykłady

Krzyżowania	Liczba zapylnych kwiatów	Liczba nasion	Liczba uzyskanych siewek	Efektywność krzyżowania (l. siewek / l. zapylnych kwiatów)
Bluecrop x J3 4x	84	49	5	0,06
J3 4x -3	111	130	16	0,14
J4 4x -1	154	166	27	0,18
J8 4x -25	174	487	41	0,24
J8 4x -27	198	110	9	0,05
Suma	721*	942	98	0,14
J3 4x-10 x Bluecrop	3	15	0	0
Northland	11	55	0	0
J4 4x-1 x Bluecrop	14	0	0	0
Liberty	8	0	0	0
Northland	65	146	2	0,031

- Klony tetraploidalne borówki czernicy okazały się relatywnie dobrymi zapyłaczami dla borówki wysokiej ze średnią efektywnością krzyżowania 0,1 liczby siewek na zapylny kwiat, czyli 3-krotnie wyższą niż uzyskana w 2023 r. Jest to wynikiem wykorzystywania wyłącznie świeżego pyłku do zapyleń. W krzyżowaniach odwrotnych średnia efektywność krzyżowania była znacznie niższa – 0,007 (**Tab. 1, Rys. 1**).
- Wyniki są zaskakujące w zestawieniu z oceną kiełkowania pyłku na znamieniu, w której wykazano, że pyłek borówki czernicy słabo kiełkuje na znamieniu słupka borówki wysokiej, (**Rys. 1B, D**) chociaż część flagiewek wnika do zalążków, które następnie pomyślnie się rozwijają, o czym świadczą uzyskane liczne siewki (**Tab. 1, Rys. 1**). Natomiast w krzyżowaniach odwrotnych, mimo liczego kiełkowania pyłku borówki wysokiej na znamionach słupków borówki czernicy i wnikania do zalążków (**Rys. 1A, C**), to dobrze uformowane nasiona rozwinęły się tylko w połowie krzyżowań. Ponadto nasiona te bardzo słabo kiełkowały co skutkowało małą liczbą uzyskanych siewek (**Tab. 1**).



Ryc. 1. Siewki z krzyżowań wykonanych w 2024 r. borówki wysokiej z borówką czernicą

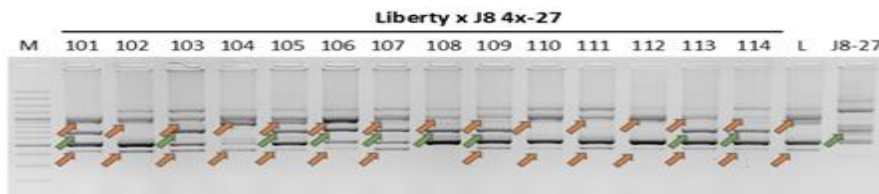


Rys. 2. Kiełkowanie na znamieniu słupka w krzyżowaniach *V. corymbosum* i *V. myrtillus*

Tab. 2. Ocena statusu mieszańca siewek z krzyżowań *V. corymbosum* i *V. myrtillus* przy użyciu markerów SSR/ISSR (przykład dla 'Liberty' x J8 4x-27)

Siewki uzyskane w 2023 roku	
Liberty x J8 4x-27	
Nr siewki	101* 102* 103* 104* 105* 106* 107* 108* 109* 141* 111* 112* 113* 114*
MA (%)	32.1 26.7 28.5 28.3 27.2 26.5 28.9 27.5 27.9 23.4 25.4 26.6 27.8 30.6
FA (%)	11.6 16.4 17.7 10.8 11.2 12.8 13.2 13.3 12.3 11.7 14.0 10.1 13.9 13.0
HA (%)	15.2 15.5 16.2 22.5 22.4 23.9 17.5 17.5 20.5 20.7 17.5 20.2 13.9 14.8

MA – allele pochodzące od rośliny matecznej, FA – allele pochodzące od rośliny ojcowskiej, HA – allele charakterystyczne dla siewek mieszańcowych; * siewka o wstępnie potwierdzonym statusie mieszańca; ** siewka o prawdopodobnym statusie mieszańca, wymagająca dalszych analiz

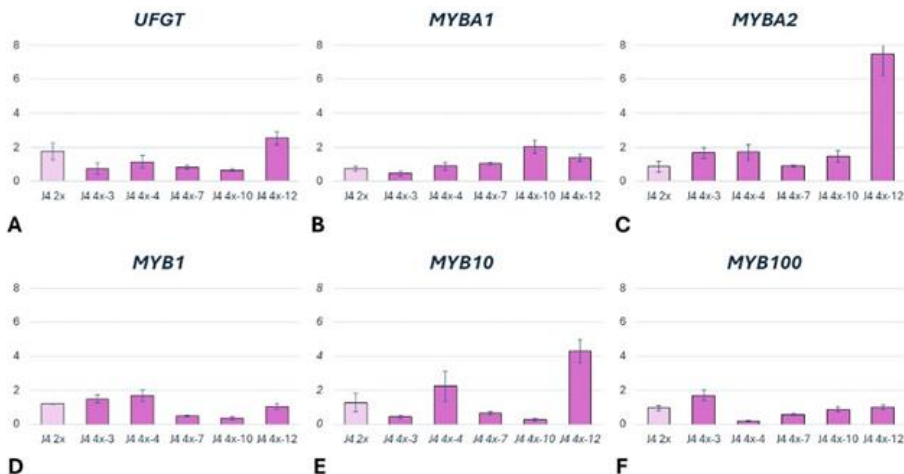


Ryc. 3. Przykładowy elektroforegram ze starterem UBC855 amplifikacji DNA (SSR/ISSR) siewek *V. corymbosum* x *V. myrtillus*-4x (z 2023 r.) oraz roślin rodzicielskich. M - 100bp DNA Ladder (ThermoScientific); rośliny mateczne: L – 'Liberty'; 101, 102, 103 itd. – numery siewek. Zielonymi strzałkami oznaczono allele pochodzące od *V. myrtillus*-4x, natomiast pomarańczowymi – od *V. corymbosum*.

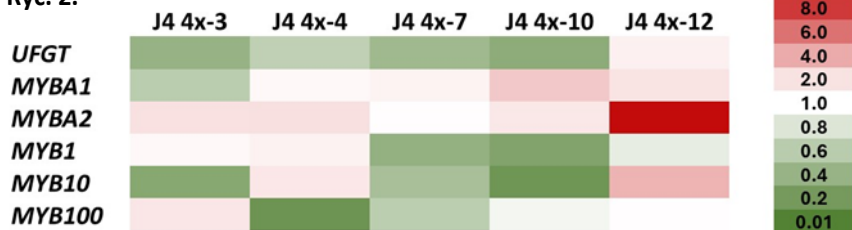
- Potwierdzono mieszańcowość kolejnych siedmiu siewek z roku 2022 – trzech siewek Liberty x J8 4x-27 i czterech siewek 'Bluecrop' x J8 4x-27 oraz piętnastu siewek z roku 2023 – czternastu 'Liberty' x J8 4x-27 (**Tab. 2, Rys. 3**) oraz jednej 'Bluecrop' x J8 4x-27.

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

Rys. 1.



Ryc. 2.



Temat badawczy 5.

- Poziom ekspresji poszczególnych genów (MYBA1, MYBA2, MYB1, MYB10, MYB100) badany u pięciu tetraploidalnych klonów borówki czernicy J4 (J4 4x-3, J4 4x-4, J4 4x-7, J4 4x-10, J4 4x-12) oraz ich diploidalnego odpowiednika (J4 2x) zależał głównie od genotypu (Rys. 1, Rys. 2).
- Nadekspresja badanych genów była wyraźnie widoczna u tetraploidalnego klonu jagody J4 4x-12 oraz, w mniejszym stopniu, u klonów J4 4x-3, J4 4x-4 i J4 4x-10. U tetraploidalnego klonu J4 4x-7 obserwowano głównie spadek ekspresji genów lub ekspresję porównywalną z poziomem ekspresji u roślin diploidalnych.
- Podwojenie liczby chromosomów u borówki czernicy może zmieniać poziom biosyntezy związków fenolowych, jednak nie zawsze przekłada się na zwiększenie ekspresji genów związanych z syntezą tych związków.

Temat badawczy 6.

- Dwa spośród 5 klonów tetraploidalnych borówki czernicy charakteryzowały się najwyższą zawartością antocyjanów (Tab. 1). Koreluje to z podwyższoną, w odniesieniu do diploida, ekspresją genów związanych z biosyntezą związków fenolowych (Rys. 1, 2).
- Duplikacja genów u borówki czernicy może wpływać na zwiększenie zawartości związków fenolowych w liściach u części uzyskanych autotetraploidów (Tab. 1).

6. Analiza ilościowa i jakościowa związków fenolowych

Tab. 1. Zawartość związków fenolowych w liściach tetraploidów borówki czernicy w odniesieniu do diploida (mg/100g)

ZWIĄZKI FENOLOWE	Klon diploidalny	Klony tetraploidalne				
	J4 2x	4x-3	4x-4	4x-7	4x-10	4x-12
FLAWANOLE	2169	1696	1565	826	1300	1046
KWASY FENOLOWE	3672	2990	2910	1716	2532	1902
FLAWONOLE	485	374	330	142	315	160
ANTOCYJANY	13,6	9,09	15,8	8,74	6,58	20,8

Wykaz publikacji wyników badań

- **Streszczenie posteru:** Podwyszyńska M., Marasek-Ciołakowska A., Markiewicz M., Mynett. K. 2024. "Cytological and morphological evaluation of interspecific hybrids of highbush blueberry and bilberry". 9th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2024, Book of Abstracts. 27-28 czerwca 2024, Kraków, P3.10, s. 53
- **Streszczenie posteru:** Markiewicz M., Podwyszyńska M. Ekspresja genów związanych z biosyntezą antocyjanów u autotetraploidów *Vaccinium myrtillus* L. XVI Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin: Biotechnologia i Kultur in vitro roślin w badaniach podstawowych i aplikacyjnych 23–25 września 2024, Kraków, s. 227-228
- **Publikacja:** Podwyszyńska M., Mynett K., Markiewicz M., Pluta S. and Marasek-Ciołakowska A. (2023). Assessment of the ability to cross bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) autotetraploids with highbush blueberry (*V. corymbosum* L.). *Acta Hort.* 1381, 81-88 DOI: 10.17660/ActaHortic.2023.1381.11 (20 pkt. wg. MNiSW)
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1381.11>