

OFERTA WDROŻENIOWA

Zastosowanie cytometrii przepływowej w hodowli mieszańców międzygatunkowych, poliploidów i podwojonych haploidów roślin ogrodniczych

Słowa kluczowe: cytometria przepływowa, tetraploidy, podwojone haploidy, mieszańce międzygatunkowe, jabłoń, narcyz, burak, marchew, kapusta

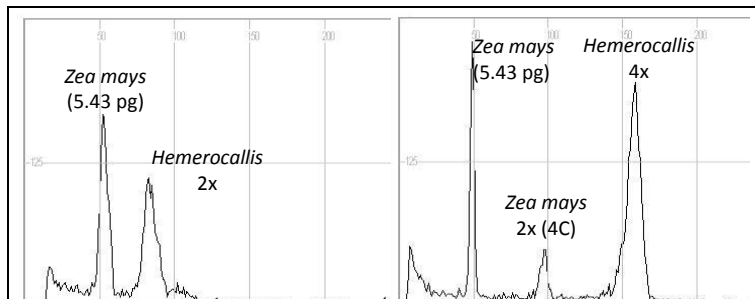
Cytometria przepływowa (FCM) jest techniką analityczną umożliwiającą ocenę zawartości jądrowego DNA (wielkość genomu) w materiale roślinnym. Analiza FCM jest powszechnie wykorzystywana w badaniach z dziedziny taksonomii, hodowli, systematyki i ewolucji. Jest to prosta i szybka metoda, polegająca na pomiarze fluorescencji DNA jądrowego, barwionego barwnikami fluorochromowymi. Najczęściej wykorzystuje się indolo-4',6-dwuamidyno-2-fenyloindynę (DAPI) i jodek propidyny (PI). Do przeprowadzenia analizy cytometrycznej wystarczy niewielki fragment tkanki, np. 0,5-1 cm² świeżych liści, z którego po rozdrobieniu izoluje się jądra komórkowe i barwi w odpowiednich buforach, zawierających wymienione barwniki.

W Instytucie Ogrodnictwa analizę FCM wykorzystuje się w badaniach służących pracom hodowlanym. Metoda ta jest przydatna do selekcji sztucznie indukowanych poliploidów wielu gatunków roślin ogrodniczych (m.in. jabłoni, porzeczki, lilii, liliowca i tulipana) oraz do wstępnej selekcji haploidów i podwojonych haploidów uzyskanych na drodze androgenezy czy gynogenezy (burak i marchew). W tego typu pracach analizowany jest poziom ploidalności przy użyciu buforów zawierających DAPI.

Wiadomo, że poszczególne gatunki roślin, a nawet ich odmiany, różnią się zawartością jądrowego DNA i w obrębie danego rodzaju wielkość ta jest zazwyczaj pochodną liczby chromosomów. Wielkość genomu jest cechą specyficzną i jego ocena może być pomocna w różnicowaniu taksonów. W Instytucie Ogrodnictwa analizę wielkości genomu dla celów taksonomicznych wykorzystano u narcyza, jabłoni i liliowca. Taka analiza jest również używana w hodowli mieszańców międzygatunkowych do szybkiego potwierdzenia statusu mieszańca z uzyskanych siewek. Jednak użycie tej metody jest uzasadnione tylko wtedy, gdy gatunki wytypowane do krzyżowań wyraźnie różnią się wielkością genomów, np. taksony w obrębie rodzaju Brassica (kapusta). Mieszańce F₁ między takimi gatunkami charakteryzują się pośrednią zawartością jądrowego DNA. W analizie wielkości genomu, wykorzystywanej w badaniach taksonomicznych, oraz w ocenie statusu mieszańców do barwienia DNA wykorzystuje się jodek propidyny oraz standard wewnętrzny – roślinę innego gatunku o znanej wielkości genomu. Dokładność metod cytometrycznych (FCM) zależy od stosowanego buforu ekstrakcyjnego, czasu barwienia oraz użytego standardu wewnętrznego. W ocenie zawartości DNA przy użyciu barwników łączących się

z kwasami nukleinowymi należy uwzględnić fakt, że w cytozolu komórek wielu gatunków występują inhibitory wybarwiania, np. związki fenolowe. Powodują one, iż odczyt może być obciążony dużym błędem – zaniżony lub nawet

niemożliwy do interpretacji, ze względu na bardzo niską jakość histogramu. Przeciwdziała temu dodatek do buforu ekstrakcyjnego antyutleniaczy, np. PVP, które częściowo lub całkowicie znoszą efekt inhibitorów.



Histogramy analizy cytometrycznej z wykorzystaniem jodku propidyny i standardu wewnętrznego (kukurydzy) użytych do pomiaru zawartości DNA w jądrach komórkowych izolowanych z liści liliowca: diploida (po lewej) i tetraploida (po prawej)



Fenotyp kwiatów liliowca: po lewej tetraploida, po prawej diploida

Innowacyjność wdrożeniowa – efekty gospodarcze i społeczne

Warunki analizy zawartości DNA jądrowego, wykonywanej przy użyciu cytometrii przepływowej, zostały zoptymalizowane dla wielu gatunków roślin ogrodniczych. Zoptymalizowane techniki FCM mogą być wykorzystywane w pracach hodowlanych do selekcji haploidów, podwojonych haploidów, poliploidów oraz do oceny statusu mieszańców, otrzymanych w wyniku krzyżowania taksonów różniących się wielkością genomu. Szersze zastosowanie techniki FCM przyczyni się do znacznego przyspieszenia prac hodowlanych, których celem jest wytworzenie ulepszonych genotypów o nowych cechach jakościowych.

Podmioty, do których skierowana jest oferta wdrożeniowa

Firmy hodowlane, ośrodki badawcze zajmujące się pracami hodowlą i pokrewne

Twórcy oferty wdrożeniowej:

Pracownia Fizjologii i Morfogenezy Roślin

Autor:

dr hab. Małgorzata Podwyszyńska, prof. IO

tel. 46 834 53 53

e-mail: malgorzata.podwyszynska@inhort.pl