

OFERTA WDROŻENIOWA

Zastosowanie metody fluorescencyjnej do badania zgodności kojarzeniowej w hodowli roślin ogrodniczych

Słowa kluczowe: zgodność kojarzeniowa roślin, ocena efektywności zapylenia, wzrost łagiewek pyłkowych *in vivo*, interakcje pyłek-słupek, selekcja genotypów o wysokiej płodności, diagnostyka procesów zapłodnienia

Fluorescencyjna metoda oceny zgodności kojarzeniowej umożliwia bezpośrednią analizę interakcji pyłek – słupek poprzez obserwację kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu, wzrostu łagiewek pyłkowych w tkankach słupka oraz ich wnikanie do zalążka. Pozwala na wczesną ocenę skuteczności zapylenia i kompatybilności krzyżowań, co ułatwia szybkie rozpoznanie barier przedzapłodnieniowych, które w warunkach klasycznych ujawniają się dopiero na etapie zawiązywania owoców. W praktyce hodowlanej metoda ta umożliwia racjonalny dobór komponentów rodzicielskich, eliminując kombinacje krzyżowań o niskim potencjale reprodukcyjnym już na wczesnym etapie badań. Metoda fluorescencyjnego barwienia błękitem aniliny opiera się na specyficznym wiązaniu barwnika z kalozą, czyli β -1,3-glukanem odkładającym się w ścianach łagiewek pyłkowych oraz w tkankach słupka. Po związaniu z kalożą błękit aniliny wykazuje intensywną fluorescencję pod wpływem światła UV, co umożliwia wizualizację w mikroskopie fluorescencyjnym przebiegu wzrostu

łagiewek pyłkowych, ocenę ich żywotności oraz identyfikację miejsc zatrzymania lub degeneracji. Zastosowanie metody wymaga adaptacji protokołu do badanego gatunku, wynikającej ze zróżnicowanej budowy anatomicznej, stopnia lignifikacji tkanek oraz intensywności autofluorescencji. Kluczowe jest zoptymalizowanie etapu maceracji poprzez ustalenie odpowiedniego czasu, stężenia wodorotlenku sodu (NaOH) oraz temperatury inkubacji, tak aby skutecznie rozluźnić tkanki bez uszkodzenia struktur łagiewek pyłkowych oraz utrzymania właściwego pH. W niektórych gatunkach konieczne jest także klarowanie materiału za pomocą nadtlenku wodoru (H_2O_2), co redukuje barwniki fenolowe i autofluorescencję tkanek, poprawiając kontrast i czytelność obrazu fluorescencyjnego.

W Instytucie Ogrodnictwa – PIB metoda fluorescencyjnej detekcji kalozy z wykorzystaniem błękitu aniliny i obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym została zastosowana zarówno w pracach hodowlanych o charakterze twórczym, jak i w badaniach nad barierami kojarzeniowymi.

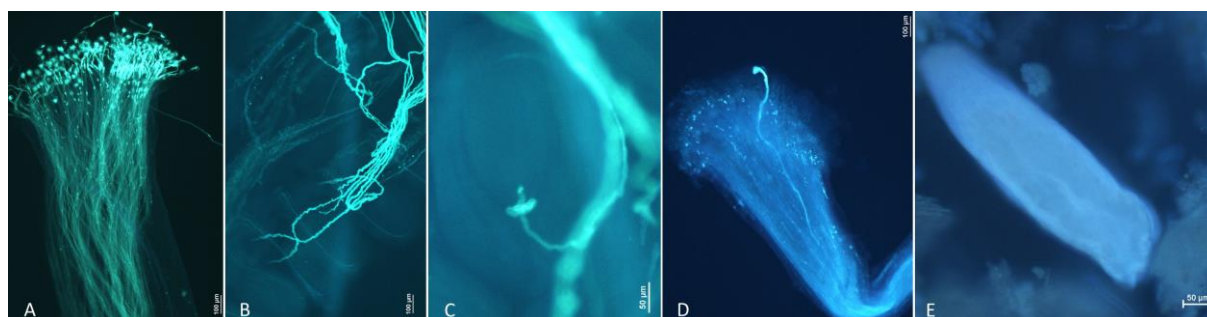
Analizy prowadzono m.in. w hodowli jagody kamczackiej i pigwowca japońskiego oraz w badaniach krzyżowalności genotypów o różnym poziomie poliploidalności u porzeczki czarnej i jabłoni. Ponadto metoda znalazła zastosowanie w badaniach krzyżowań między-gatunkowych pomiędzy jagodą leśną a borówką amerykańską. Do oceny zgodności krzyżowań zaadaptowano protokół umożliwiający wykonanie półtrwałych preparatów mikroskopowych ze słupków kwiatowych zmacerowanych

w NaOH i barwionych błękitem aniliny (Tabela 1). Metoda ta pozwala na przygotowanie preparatów do oceny zgodności kojarzeniowej dla wielu gatunków roślin ogrodniczych.

Gatunki roślin, dla których zaadaptowano ww. metodę: porzeczka czarna, jagoda kamczacka, pigwowiec japoński, jagoda leśna, borówka amerykańska, jabłoni.

Tabela 1. Zoptymalizowana procedura przygotowania preparatów ze słupków roślin do badania zgodności kojarzeniowej metodą fluorescencyjną

Utrwalanie materiału	Maceracja	Sporządzenie preparatów	Barwienie	Obserwacja
Carnoy (alkohol 96%; kwas octowy; 3:1) 10 godz.	1N NaOH 11-13 min 65°C	Metoda rozgniotowa w glicerynie	0,01% Błękit aniliny w 0,05M K ₂ HPO ₄ pH 11	Mikroskop fluorescencyjny



Fluorescencyjna ocena zdolności krzyżowej. (A-C) Krzyżowanie kompatybilne. (A) Kielkowanie ziaren pyłku na znamieniu i wrastanie w szyjkę słupka. (B) Liczne łagiewki pyłkowe na terenie zalążni (C) Wnikanie łagiewki pyłkowej do zalążka. (D-E) Krzyżowanie nieefektywne. (D) Pojedyncze ziarna pyłku kielkujące na znamieniu. (E) Zamierający zalążek.

Innowacyjność wdrożeniowa – efekty gospodarcze i społeczne

Metoda fluorescencyjna do oceny niezgodności płciowej u roślin została zoptymalizowana dla szerokiego spektrum gatunków ogrodniczych. Zastosowanie metody fluorescencyjnej umożliwia skrócenie cyklu hodowlanego o 1-2 lata w przypadku gatunków wieloletnich, dzięki wczesnej eliminacji niekompatybilnych kombinacji. Szacuje się, że pozwala to na redukcję kosztów badań hodowlanych o 15-20% poprzez ograniczenie do minimum nakładów na krzyżowania o niskim potencjale reprodukcyjnym, które w klasycznych metodach byłyby prowadzone do etapu owocowania. Wczesna selekcja pozwala skoncentrować zasoby na najbardziej perspektywicznych genotypach, przyspieszając wprowadzanie nowych odmian na rynek.

Podmioty, do których skierowana jest oferta wdrożeniowa

Firmy hodowlane, ośrodki badawcze zajmujące się pracami hodowlanymi i pokrewne.

Twórcy oferty wdrożeniowej:

Centrum Innowacyjnych i Zrównoważonych
Technologii Ogrodnich
Zakład Biologii Stosowanej

Autor:

dr hab. Agnieszka Marasek-
Ciołakowska, prof. IO
tel. 46 834 67 83
e-mail: agnieszka.marasek@inhort.pl

Współautorzy:

mgr Aleksandra Machańska
mgr Urszula Kowalska
mgr Dominika Bachmat

Rok przygotowania oferty wdrożeniowej – 2025

Praca wykonana w ramach tematu badawczego 9.7.21 „Diagnostyka mikroskopowa i cytometryczna w hodowli i ochronie roślin sadowniczych”, realizowanego w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach, finansowanego przez MNiSW.