

# SPIS TREŚCI

<b>1</b>	<b>Wprowadzenie</b>	15
<b>2</b>	<b>Metoda kultury <i>in vitro</i></b>	19
2.1.	Kultura komórek i tkanek	19
2.1.1.	Wyposażenie i prace techniczne w laboratorium	19
2.1.1.1.	Pomieszczenia	19
2.1.1.2.	Sprzęt laboratoryjny	21
2.1.1.3.	Prace techniczne	21
2.1.2.	Zdolność morfogenetyczna komórek roślinnych	24
2.1.3.	Kultura kalusa	26
2.1.4.	Kultura zawiesin komórkowych	28
2.1.5.	Kultura organów roślinnych	30
2.1.5.1.	Kultura odciętych korzeni	31
2.1.5.2.	Kultura wierzchołków i pąków bocznych pędu	31
2.2.	Kultura merystemów i uwalnianie roślin od wirusów	33
2.2.1.	Wirusy a tkanki twórcze roślin	33
2.2.2.	Obecność wirusów w tkankach i komórkach regenerujących <i>in vitro</i>	34
2.2.3.	Metody eliminowania wirusów	35
2.2.3.1.	Zwalczanie wektorów wirusów	35
2.2.3.2.	Chemoterapia <i>in vitro</i>	35
2.2.3.3.	Termoterapia <i>in vivo</i>	36
2.2.3.4.	Izolowanie wierzchołków pędów z roślin po termoterapii <i>in vivo</i>	36
2.2.3.5.	Termoterapia <i>in vitro</i>	37
2.2.3.6.	Krioterapia	37
2.2.3.7.	Kultura <i>in vitro</i> izolowanych merystemów	38
2.2.3.8.	Alternatywne sposoby kultury merystemów	39
2.2.4.	Testowanie roślin uwolnionych od wirusów	41
2.3.	Kultura pylników i mikrospor	42
2.3.1.	Rozwój technik	43
2.3.2.	Mierniki efektywności kultury pylników i mikrospor	45
2.3.3.	Czynniki wpływające na efekt kultury <i>in vitro</i> pylników i mikrospor	46
2.3.3.1.	Genotyp dawcy pylników	46
2.3.3.2.	Kondycja rośliny-dawcy	47
2.3.3.3.	Stadium rozwoju mikrospory	47
2.3.3.4.	Traktowanie wstępne (prekultura) pylników	48

2.3.3.5. Warunki kultury <i>in vitro</i> . . . . .	48
2.4. Kultura i fuzja protoplastów . . . . .	54
2.4.1. Izolowanie protoplastów . . . . .	54
2.4.2. Kultura protoplastów i regeneracja roślin . . . . .	56
2.4.3. Fuzja protoplastów . . . . .	58
2.4.3.1. Selekcja heterokarionów . . . . .	60
2.4.3.2. Weryfikacja mieszańcowości otrzymanych komórek . . . . .	66
2.4.4. Wzajemna interakcja genomów i plazmonów w komórce mieszańcowej . . . . .	67
2.5. Kultura zalążków, zalążni i zarodków . . . . .	70
2.5.1. Zapylenie <i>in vitro</i> zalążni i zalążków . . . . .	70
2.5.1.1. Przygotowanie materiału do zapylenia . . . . .	71
2.5.1.2. Zapylenie własnym pyłkiem . . . . .	74
2.5.1.3. Zapylenie obcym pyłkiem . . . . .	74
2.5.2. Kultura zarodków . . . . .	76
2.5.2.1. Kultura zarodków dojrzałych . . . . .	78
2.5.2.2. Kultura zarodków niedojrzałych . . . . .	79
2.5.2.3. Kultura prazarodków . . . . .	80
2.5.2.4. Kultura zarodków mieszańcowych . . . . .	81
2.5.2.5. Kultura zalążków . . . . .	82
2.5.3. Kultura woreczków zalążkowych i zygot . . . . .	84

### 3 Kultury roślinne w bioreaktorach . . . . . 87

3.1. Typy kultur roślinnych i ich uzyskiwanie . . . . .	87
3.1.1. Kultura zawieszinowa komórek . . . . .	88
3.1.2. Tkanki zróżnicowane . . . . .	89
3.1.2.1. Kultury korzeniowe . . . . .	89
3.1.2.2. Korzenie transformowane (włośnikowate) . . . . .	90
3.2. Przechowywanie kultur muzealnych . . . . .	90
3.3. Pożywki . . . . .	93
3.4. Inokulum . . . . .	93
3.5. Sposób prowadzenia kultury . . . . .	94
3.5.1. Kultura okresowa . . . . .	94
3.5.2. Kultura okresowo-dolewowa . . . . .	97
3.5.3. Kultura ciągła . . . . .	98
3.5.3.1. Klasyczny system otwarty . . . . .	98
3.5.3.2. Systemy ciągłe z zatrzymaniem komórek (perfuzja) . . . . .	100
3.6. Bioreaktory . . . . .	105
3.6.1. Bioreaktory z mieszaniem mechanicznym . . . . .	106
3.6.2. Bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym (air lift) . . . . .	108
3.6.3. Bioreaktory z mieszaniem hydraulicznym . . . . .	110
3.6.4. Bioreaktory z napowietrzaniem dyfuzyjnym (cell lift) . . . . .	110
3.6.5. Bioreaktory do kultur aeroponicznych . . . . .	111
3.6.6. Fotoreaktory płytowe i rurowe . . . . .	114
3.7. Zasady doboru bioreaktora . . . . .	114
3.8. Zasady powiększania skali kultury . . . . .	116
3.8.1. Skala kultury . . . . .	117
3.8.2. Teoria podobieństwa jako podstawa powiększania skali . . . . .	118
3.9. Technologiczne aspekty kultur bioreaktorowych . . . . .	122
3.9.1. Podstawowe parametry kultury . . . . .	123
3.9.2. Stres mechaniczny . . . . .	126

3.9.3. Transfer tlenu . . . . .	127
3.9.4. Zakażenia mikrobiologiczne . . . . .	130
3.9.5. Związek między sposobem prowadzenia kultury a tworzeniem produktu . . . . .	130
3.10. Metody kontroli wzrostu i metabolizmu kultury tkankowej . . . . .	132
3.10.1. Pomiar wzrostu . . . . .	132
<b>4 Selekcja i testowanie cech w kulturze <i>in vitro</i></b> . . . . .	<b>136</b>
4.1. Podstawy selekcji . . . . .	137
4.2. Sposoby selekcji . . . . .	139
4.3. Zmienność somaklonalna jako podstawa skutecznej selekcji . . . . .	140
4.4. Warunki prowadzenia selekcji . . . . .	140
4.5. Skuteczność selekcji . . . . .	142
<b>5 Biotransformacje substancji chemicznych</b> . . . . .	<b>144</b>
5.1. Wprowadzenie: charakterystyka reakcji biotransformacji . . . . .	144
5.2. Przykłady biotransformacji . . . . .	145
5.2.1. Monoterpeny . . . . .	146
5.2.2. Diterpeny . . . . .	147
5.2.3. Triterpeny . . . . .	148
5.2.4. Związki steroidowe . . . . .	149
5.2.5. Związki fenolowe . . . . .	151
5.2.6. Alkaloidy . . . . .	154
5.2.7. Inne związki . . . . .	158
5.3. Czynniki regulujące reakcje biotransformacji . . . . .	160
5.3.1. Kultury zawiesinowe i ich warunki . . . . .	160
5.3.2. Skład i pH pożywki . . . . .	161
5.3.3. Tlen . . . . .	162
5.3.4. Struktura chemiczna substratu . . . . .	162
5.3.5. Przepuszczalność błon cytoplazmatycznych . . . . .	163
5.3.6. Problem rozpuszczalności substratu . . . . .	163
5.4. Komórki, czy izolowane enzymy? . . . . .	164
5.4.1. Biotransformacja z użyciem kultur zawiesinowych . . . . .	165
5.4.2. Biotransformacja z użyciem komórek immobilizowanych . . . . .	166
5.4.3. Biotransformacje z użyciem preparatów enzymatycznych . . . . .	167
<b>6 Uzyskiwanie roślin transgenicznych</b> . . . . .	<b>171</b>
6.1. Izolowanie i charakterystyka genów . . . . .	171
6.1.1. Strategie izolacji genów . . . . .	171
6.1.1.1. Strategie izolacji genów z biblioteki genomowej . . . . .	173
6.1.1.2. Izolacja bezpośrednio z genomu . . . . .	192
6.1.2. Charakterystyka wyizolowanych genów . . . . .	193
6.1.2.1. Ustalenie i analiza położenia genów w genomie – genomika . . . . .	193
6.1.2.2. Analiza strukturalna . . . . .	196
6.1.2.3. Analiza ekspresji genów – genomika ekspresyjna . . . . .	197
6.1.2.4. Analiza funkcji genu genomika funkcjonalna . . . . .	205
6.2. Tworzenie konstrukcji genowych . . . . .	209
6.2.1. Pozyskanie i amplifikacja sekwencji kodującej genu metodą wydłużania primerów (PCR) . . . . .	209
6.2.1.1. Ogólne zasady postępowania . . . . .	210

6.2.1.2. Wpływ komponentów na wierność i wydajność metody . . . . .	210
6.2.2. Wektory . . . . .	214
6.2.2.1. Wektory bakteryjne . . . . .	214
6.2.2.2. Wektory chromosomowe . . . . .	216
6.2.2.3. T-DNA jako wektor . . . . .	217
6.2.2.4. Wektory reporterowe . . . . .	220
6.2.2.5. Wirusy jako wektory . . . . .	221
6.2.2.6. Bezwektorowy transfer genu . . . . .	221
6.2.3. Konstrukcja integrowanego DNA . . . . .	221
6.2.3.1. Promotory nieswoiste . . . . .	222
6.2.3.2. Promotory tkankowo swoiste . . . . .	222
6.2.3.3. Promotory indukowane chemicznie . . . . .	223
6.2.3.4. Sekwencje 5' i 3' końcowe . . . . .	224
6.2.4. Regulacja ekspresji transgenu w roślinach . . . . .	226
6.2.5. Konstrukcje wielogenowe . . . . .	229
6.2.6. Modyfikacja transgenu na drodze mutagenyzy . . . . .	229
6.3. Wprowadzenie genów do roślin . . . . .	233
6.3.1. Wektorowe metody transformacji roślin . . . . .	233
6.3.2. Metody bezwektorowe . . . . .	238
6.3.2.1. Transformacja protoplastów . . . . .	238
6.3.2.2. Mikrowstrzeliwanie . . . . .	240
6.3.3. Alternatywne metody transformacji roślin . . . . .	244
6.3.4. Transformacja organelli komórkowych . . . . .	245
6.4. Uzyskiwanie roślin transgenicznych . . . . .	246
6.4.1. Uwarunkowania ogólne . . . . .	246
6.4.2. Optymalizacja regeneracji pędów transgenicznych w warunkach procedury transformacji . . . . .	247
6.4.2.1. Zwiększenie udziału komórek kompetentnych do regeneracji i do transformacji . . . . .	247
6.4.2.2. Rola stresu spowodowanego zranieniem i kokulturą . . . . .	248
6.4.2.3. Prekultura (kondycjonowanie) . . . . .	249
6.4.2.4. Czas kokultury oraz zagęszczenie bakterii . . . . .	249
6.4.2.5. Czynniki zmniejszające wrażliwość tkanek na etylen i przeciwutleniacze . . . . .	249
6.4.2.6. Eliminacja bakterii . . . . .	250
6.4.2.7. Selekcja transgenicznych komórek i tkanek . . . . .	251
6.4.3. Metody transformacji niezależne od regeneracji przybyszowej . . . . .	253
6.5. Rozpoznanie i identyfikacja roślin transgenicznych . . . . .	254
6.5.1. Charakterystyczne elementy transgenu . . . . .	254
6.5.2. Identyfikacja transgeniczności techniką PCR . . . . .	256
6.5.3. Identyfikacja transgeniczności na podstawie analizy białek . . . . .	258
6.5.4. Inne metody detekcji transgeniczności . . . . .	259

## **7 Zastosowania praktyczne biotechnologii** 261

7.1. Rozmnażanie wegetatywne . . . . .	261
7.1.1. Produkcja roślin <i>in vitro</i> na świetle . . . . .	261
7.1.2. Metody rozmnażania wegetatywnego . . . . .	263
7.1.3. Kultura pędów bocznych (pachwinowych) . . . . .	263
7.1.4. Kultura pąków przybyszowych . . . . .	266
7.1.5. Embriogeneza somatyczna . . . . .	268
7.2. Materiał rozmnożeniowy o wysokiej jakości . . . . .	273

7.2.1. Charakterystyka drobnoustrojów powodujących zanieczyszczenia mikrobiologiczne eksplantatów <i>in vitro</i> . . . . .	273
7.2.1.1. Drobnoustroje epifityczne, kolonizujące powierzchnię organów roślinnych . . . . .	273
7.2.1.2. Endofity obecne w tkankach eksplantatów . . . . .	274
7.2.2. Zapobieganie pierwotnym zanieczyszczeniom mikrobiologicznym eksplantatów w stadium stabilizacji kultur . . . . .	275
7.2.2.1. Indeksacja roślin matecznych . . . . .	277
7.2.2.2. Prekultura . . . . .	278
7.2.2.3. Dezynfekcja powierzchniowa przed izolacją eksplantatów . . . . .	279
7.2.3. Zapobieganie wtórnym zanieczyszczeniom mikrobiologicznym w stadium namnażania tkanek . . . . .	281
7.2.3.1. Monitoring mikrobiologiczny podczas namnażania tkanek . . . . .	282
7.2.3.2. Wykrywanie i eliminowanie drobnoustrojów bezobjawowo zasiedlających eksplantaty . . . . .	283
7.2.3.3. Terapia antybiotykowa <i>in vitro</i> . . . . .	286
7.2.4. Biotyzacja kultur w stadium aklimatyzacji . . . . .	287
7.2.5. Niesterylna mikropropagacja . . . . .	289
7.2.6. Miniaturyzacja systemu mikrorozmnazania . . . . .	289
7.3. Rozmnazanie dla potrzeb hodowli nowych odmian . . . . .	292
7.4. Technologia sztucznych nasion . . . . .	295
7.4.1. Metody produkcji sztucznych nasion . . . . .	296
7.4.1.1. Nasiona sztuczne otoczkowane w hydrożelach . . . . .	298
7.4.1.2. Nasiona sztuczne nie otoczkowane . . . . .	301
7.4.1.3. Przechowywanie sztucznych nasion . . . . .	304
7.4.1.4. Przyszłość technologii sztucznych nasion . . . . .	305
7.5. Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach <i>in vitro</i> . . . . .	306
7.5.1. Metabolity wtórne wytwarzane przez rośliny . . . . .	308
7.5.1.1. Barwniki roślinne . . . . .	310
7.5.1.2. Związki zapachowe . . . . .	314
7.5.1.3. Substancje dla przemysłu farmaceutycznego . . . . .	316
7.5.1.4. Enzymy . . . . .	319
7.5.1.5. Przeciwtleniacze . . . . .	320
7.5.1.6. Fitoaleksyny . . . . .	321
7.5.1.7. Polisacharydy . . . . .	322
7.5.2. Czynniki wpływające na produkcję metabolitów wtórnych . . . . .	322
7.5.2.1. Wybór materiału biologicznego . . . . .	323
7.5.2.2. Warunki prowadzenia kultury <i>in vitro</i> . . . . .	325
7.5.3. Zabiegi technologiczne zwiększające produkcję metabolitów wtórnych . . . . .	331
7.5.3.1. Dodatek elicytorów . . . . .	331
7.5.3.2. Dodatek prekursorów . . . . .	332
7.5.3.3. Immobilizacja komórek . . . . .	333
7.5.3.4. Agregacja komórek . . . . .	334
7.5.4. Zabiegi technologiczne zwiększające sekrecję metabolitów wtórnych . . . . .	334
7.5.4.1. Adsorpcja metabolitów na wymiennikach jonowych . . . . .	335
7.5.4.2. Ekstrakcja metabolitów w systemie dwufazowym . . . . .	336
7.5.4.3. Zmiana natlenienia pożywki . . . . .	337
7.5.4.4. Chemiczna permeabilizacja . . . . .	337
7.5.4.5. Permeabilizacja elektryczna . . . . .	337
7.5.4.6. Zmiana pH pożywki . . . . .	338
7.5.4.7. Działanie wysokiego ciśnienia . . . . .	338
7.5.4.8. Dodatek polielektrolitów . . . . .	339

7.5.4.9. Obróbka enzymatyczna	339
7.6. Rośliny o nowych cechach	341
7.6.1. Haploidy i podwojone haploidy	341
7.6.1.1. Cechy haploidów	341
7.6.1.2. Podwojone haploidy	346
7.6.2. Właściwości uzyskane w wyniku selekcji w kulturze <i>in vitro</i>	350
7.6.2.1. Selekcja w kulturze <i>in vitro</i>	353
7.6.2.2. Testowanie w kulturach <i>in vitro</i>	354
7.6.3. Rośliny otrzymane w wyniku fuzji protoplastów	355
7.6.4. Rośliny transgeniczne	262
7.6.4.1. Odporność na choroby i szkodniki	362
7.6.4.2. Odporność na czynniki abiotyczne	375
7.6.4.3. Cechy żywieniowe i sensoryczne	391
7.6.4.4. Zmieniona płodność i partenokarpia	419
7.6.4.5. Produkcja substancji biologicznie i farmakologicznie czynnych, na potrzeby medycyny i weterynarii	423
7.7. Biotechnologia korzeni włośnikowatych	433
7.7.1. Otrzymywanie i charakterystyka korzeni włośnikowatych	435
7.7.2. Procesy i produkty	436
7.7.2.1. Biosynteza metabolitów wtórnych w korzeniach włośnikowatych	436
7.7.2.2. Efekty nowych genów w korzeniach transgenicznym	437
7.7.3. Warunki chemiczne prowadzenia kultury korzeni włośnikowatych	441
7.7.4. Warunki techniczne prowadzenia kultury korzeni włośnikowatych	442
7.7.4.1. Warunki w kolbach wstrząsanych i bioreaktorach	442
7.7.4.2. Morfologia korzeni włośnikowatych a warunki w bioreaktorach	444
7.8. Hodowla odmian transgenicznym	446
7.8.1. Etapy hodowli transgenicznej	448
7.8.1.1. Postawienie celu hodowli	448
7.8.1.2. Wybór genu	448
7.8.1.3. Wybór odmiany do transformacji	449
7.8.1.4. Wybór i wytworzenie transgenu	451
7.8.1.5. Uzyskanie odmiany transgenicznej	451
7.8.1.6. Stopniowanie transgeniczności	452
7.8.1.7. Ochrona prawna odmian	453
7.8.2. Wprowadzenie odmiany transgenicznej do uprawy	453
7.8.3. Hodowla transgeniczna w Polsce	453
7.8.4. Zachowanie różnorodności biologicznej	454
7.9. Biotechnologia środowiskowa – fitoremediacja	455
7.9.1. Fitoekstrakcja	547
7.9.2. Fitodegradacja	459
7.9.3. Ryzofiltracja	460

## 8 Diagnostyka molekularna roślin 462

8.1. Wykrywanie obecności czynników chorobotwórczym	462
8.1.1. Wykrywanie i identyfikacja czynników chorobotwórczym oparte na hybrydyzacji	463
8.1.1.1. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych	463
8.1.1.2. Hybrydyzacja <i>in situ</i> z zastosowaniem sond molekularnych, GISH	465
8.1.2. Analiza długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)	465
8.1.3. Wykrywanie i identyfikacja czynników chorobotwórczym oparte na PCR	466
8.1.3.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy	467

8.1.3.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy z arbitralnie wybranymi starterami (RAPD)	469
8.1.3.3. Analiza restrykcyjna produktów (PCR-RFLP)	471
8.1.3.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona procesem odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)	471
8.1.3.5. Selektywna amplifikacja fragmentów restrykcyjnych (SFRA; AFLP)	474
8.1.4. Wykrywanie i identyfikacja czynników chorobotwórczych oparte na reakcji łańcuchowej ligazy (LCR)	475
8.1.5. Skuteczność zastosowania markerów molekularnych w diagnostyce chorób roślin	477
8.1.6. Perspektywy zastosowania markerów molekularnych w diagnostyce chorób roślin	481
8.2. Ustalanie tożsamości genetycznej	485
8.2.1. Markery molekularne	486
8.2.1.1. Izoenzymy	486
8.2.1.2. Markery RFLP	488
8.2.1.3. Markery uzyskiwane w metodzie PCR	490
8.2.1.4. Konwersja markerów molekularnych	498
8.2.2. Konstrukcja map genetycznych z użyciem markerów molekularnych	502
8.2.3. Mapowanie porównawcze genomów roślinnych	506
8.2.4. Mapowanie <i>loci</i> warunkujących cechy ilościowe (QTL)	508
8.2.5. Selekcja za pomocą markerów molekularnych (MAS)	510
8.2.6. Analiza podobieństwa genetycznego	513

## 9 Odmiany transgeniczne w ogrodnictwie 520

## 10 Odmiany transgeniczne w rolnictwie 523

10.1. Transgeniczne odmiany soi i rzepaku jarego odporne na herbicydy	525
10.2. Transgeniczne mieszańce kukurydzy odporne na owady (gen <i>Cry</i> )	527

## 11 Regulacje prawne i ochrona własności intelektualnej 529

11.1. Perspektywy nowych zastosowań	530
11.2. Prawodawstwo	531
11.3. Podstawowe zasady bezpiecznej pracy z GMO	532
11.4. Znakowanie żywności wyprodukowanej z wykorzystaniem biotechnologii	532
11.5. Potencjalne zagrożenia dla środowiska i konsumentów związane z produkcją żywności GMO	533
11.6. Własność intelektualna w biotechnologii	533
11.6.1. Patent europejski i patent wspólnotowy	535
11.6.2. Ochrona wynalazków z zakresu biotechnologii. Wykluczenia ze zdolności patentowej	536
11.6.3. Dyrektywa nr 44/98 Parlamentu Europejskiego i Rady, z 6 lipca 1998 r. w sprawie prawnej ochrony wynalazków biotechnologicznych	538
11.6.4. Zobowiązania Polski w zakresie doskonalenia ochrony praw własności intelektualnej, przemysłowej i handlowej	541
11.7. Zakończenie i wnioski	546

## 12 Ochrona zasobów genowych 549

12.1. Zasoby genowe roślin	549
12.2. Erozja genetyczna	550
12.3. Metody ochrony zasobów genowych	551

12.4. Stan ochrony zasobów genowych roślin użytkowych na świecie . . . . .	551
12.5. Stan ochrony zasobów genowych roślin użytkowych <i>ex situ</i> w Polsce . . . . .	552
12.6. Wykorzystanie zasobów genowych . . . . .	553
12.7. Zasoby genowe a biotechnologia . . . . .	553
12.8. Regulacje prawne . . . . .	554
<b>13 Kontrowersje wokół biotechnologii</b>	556
<b>14 Podsumowanie i perspektywy</b>	560
<b>15 Słownik terminów</b>	562
Wykaz skrótów	571
Skorowidz łacińskich i polskich nazw roślin	580
Skorowidz rzeczowy	