
SPIS TREŚCI

Wprowadzenie	15
Metoda kultury <i>in vitro</i>	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

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
4 Selekcja i testowanie cech w kulturze <i>in vitro</i>	136
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
5 Biotransformacje substancji chemicznych	144
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
6 Uzyskiwanie roślin transgenicznych	171
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 mutagenazy	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
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 mikrorozmnażania	289
7.3. Rozmnażanie 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. Przeciwtłuleniace	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. Imobilizacja 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 transgenicznym	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 transgenicznym	451
7.8.1.6. Stopniowanie transgenicznym	452
7.8.1.7. Ochrona prawna odmian	453
7.8.2. Wprowadzenie odmiany transgenicznym do uprawy	453
7.8.3. Hodowla transgenicznym w Polsce	453
7.8.4. Zachowanie różnorodności biologicznym	454
7.9. Biotechnologia środowiskowa – fitoremediacja	455
7.9.1. Fitoekstrakcja	547
7.9.2. Fitodegradacja	459
7.9.3. Ryzofiltracja	460

Diagnostyka molekularna roślin

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. Selektowna 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
 Odmiany transgeniczne w ogrodnictwie	520
 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
 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
 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
13 Kontrowersje wokół biotechnologii	556
14 Podsumowanie i perspektywy	560
15 Słownik terminów	562
Wykaz skrótów	571
Skorowidz łacińskich i polskich nazw roślin	580
Skorowidz rzeczowy	587