

**Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**

Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji

---

Katedra Techniki i Technologii Gastronomicznej

**Technologia uzyskiwania  
roślin transgeniczných tytoniu  
niezdolnych do rozmnażania**

inż. Beata Kiliańczyk-Szawłowska

Nr albumu 72618

Praca magisterska wykonano  
w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin  
Uniwersytetu Warszawskiego  
pod kierunkiem  
prof. dr hab. Andrzeja Jerzmanowskiego

Opiekun bezpośredni  
dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska

*Warszawa 2000*

**Podziękowania:**

**Składam serdeczne podziękowania  
panu profesorowi Andrzejowi Jerzmanowskiemu  
za umożliwienie mi wykonania pracy magisterskiej  
w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin  
oraz opiekę i wszelkie wskazówki podczas pisania mojej pracy.**

**Dziękuję również dr Marcie Prymakowskiej-Bosak  
za miłą współpracę oraz udzielanie cennych wskazówek  
podczas wykonywania prac laboratoryjnych.**

**Dziękuję dr Danucie Kołożyn-Krajewskiej za okazaną pomoc.**

**Szczególne podziękowania składam moim kolegom i koleżankom z PBMR  
za stworzenie miłej i ciekawej atmosfery pracy i okazaną pomoc.**

**Chcę także podziękować mojemu mężowi za wielką cierpliwość i wyrozumiałość.**

# Spis treści

1. Wstęp .....	5
1.1. Techniki biologii molekularnej umożliwiające konstrukcję organizmów transgenicznych .....	6
1.1.2. Definicje Genetycznie Modyfikowanych Organizmów .....	7
1.1.3. Techniki otrzymywania GMO .....	7
1.2. Tytoń jako roślina modelowa .....	12
1.3. Rzeczywiste i potencjalne zagrożenia związane ze stosowaniem organizmów transgenicznych .....	13
1.3.1. Możliwości modyfikacji genetycznych .....	13
1.3.2. Argumenty przeciwników genetycznie modyfikowanych organizmów .....	15
1.3.3. Potencjalne zagrożenia wynikające z zastosowania nowych organizmów w żywieniu ludności .....	15
1.3.4. Żywność transgeniczna a bezpieczeństwo konsumenta .....	17
1.3.5. Odbiór społeczny nowej żywności w Polsce .....	19
1.3.6. Uregulowania prawne dotyczące GMO .....	24
1.4. Metody zmniejszenia ryzyka stosowania organizmów transgenicznych .....	25
1.5. Histon H1 - białko strukturalne chromosomów .....	27
1.5.1. Nukleosom .....	27
1.5.2. Budowa i rola histonu H1 .....	29
2. Cel pracy .....	32
3. Materiały i metody .....	33
3.1. Szczepy bakteryjne, bakteriofagi i wektory plazmidowe .....	33
3.1.1. Stosowane szczepy bakteryjne .....	33
3.1.2. Wektory plazmidowe .....	33
3.2. Materiał roślinny .....	33
3.3. Podłoża do hodowli bakterii i roślin, stosowane antybiotyki i hormony roślinne .....	33
3.3.1. Podłoża do hodowli bakterii .....	33
3.3.2. Podłoża do hodowli roślin .....	34
3.3.3. Roztwory hormonów .....	35
3.4. Transformacja bakterii .....	35
3.5. Transformacja i regeneracja tytoniu (wg. Horsch 1986) .....	36
3.5.1. Sterylizacja nasion tytoniu (wg. Valvekensa 1988 i Iwkiewiczza 1993) .....	36
3.5.2. Transformacja 2-3 tygodniowych siewek tytoniu .....	36
3.6. Izolacja DNA .....	36
3.6.1. Izolacja DNA plazmidowego z E.coli .....	36
3.6.2. Izolacja DNA plazmidowego z A. tumefaciens .....	37
3.6.3. Izolacja DNA chromosomalnego z roślin .....	37
3.7. Rekombinacja DNA in vitro .....	37
3.7.1. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi .....	37
3.7.2. Subklonowanie fragmentów DNA .....	38
3.8. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych .....	38
3.9. Izolacja DNA z żeli agarozowych .....	38
3.10. Analiza hybrydyzacyjna DNA .....	38
3.10.1. Transfer DNA z żeli agarozowych na membrany nylonowe .....	38
3.10.2. Hybrydyzacja .....	39

3.11. Preparatyka białek .....	39
3.11.1. Preparatyka całkowitych histonów z tkanek roślinnych .....	39
3.11.2. Preparatyka histonu H1 z tkanki liściowej (Mazzolini i inni, 1989) .....	40
3.12. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym .....	40
3.12.1. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w układzie kwas octowy-mocznik .....	40
3.13. Sprzęt laboratoryjny .....	40
3.14. Programy komputerowe: .....	40
4. Wyniki .....	41
4.1. Konstrukcja wektora do transformacji siewek tytoniu. ....	41
4.2. Regeneracja roślin .....	44
4.3. Analiza fenotypu roślin tytoniu uzyskanych po transformacji plazmidem pROKFH1ta w porównaniu z roślinami kontrolnymi pROKF19 .....	46
4.4. Analiza molekularna roślin tytoniu uzyskanych po transformacji plazmidem pROKFH1ta. ....	49
4.4.1. Analiza hybrydacyjna typu Southern – sprawdzenie obecności transgeny .....	49
4.4.2. Analiza preparatów białkowych .....	51
5. Dyskusja .....	52
6. Podsumowanie .....	55
7. Słownik pojęć .....	56
8. Literatura .....	59

# Wstęp

Jedną z największych zdobyczy nauki XX wieku jest nabycie umiejętności manipulowania genami. Do połowy tego wieku wyjaśniono główne prawa rządzące dziedziczeniem cech, choć nadal nie wiadomo czym właściwie jest gen. Były to odkrycia tzw. genetyki klasycznej. W latach pięćdziesiątych zaczęła rozwijać się genetyka molekularna, której rozwój można podzielić na dwa okresy. Pierwszy rozpoczął się około roku 1945 i trwał do początku lat siedemdziesiątych. Dokonano w tym okresie wielu znaczących odkryć:

1. stwierdzono, że u wszystkich organizmów geny to fragmenty ogromnych cząsteczek zwanych DNA;
2. ustalono chemiczną strukturę DNA (opracowanie modelu cząsteczki DNA przez Watsona i Cricka w 1953 roku);
3. rozszyfrowano kod genetyczny, tj. zasady zapisu w DNA białek warunkujących poszczególne cechy osobnicze, takie jak morfologia organizmu, podatność na określone choroby i wiele innych procesów.

Drugi okres zapoczątkowany około roku 1970 i trwający do dziś, rozpoczął się wraz z wprowadzeniem metod znanych pod wspólną nazwą sztucznej rekombinacji DNA lub inżynierii genetycznej. Metody te umożliwiły izolację i analizę poszczególnych genów pochodzących z wszelkich organizmów: drobnoustrojów, roślin, zwierząt. Dalszy rozwój tych metod umożliwił precyzyjną diagnostykę chorób dziedzicznych, a także nowotworowych i AIDS, a w przyszłości pozwoli być może na znalezienie skutecznych metod ich zwalczania. Metody inżynierii genetycznej wykorzystywane są również w medycynie sądowej do identyfikacji ofiar i sprawców przestępstw. Poza samą diagnostyką, inżynieria genetyczna pozwala nam również na wprowadzanie zmian w genach, a co za tym idzie uzyskanie lepszych odmian hodowanych roślin i zwierząt. Wszystko to sprawia, że inżynieria genetyczna znajduje zastosowanie i wywiera wpływ na kierunki rozwoju wielu dziedzin nauki i gospodarki takich jak : medycyna, farmacja, przemysł spożywczy, rolnictwo, biotechnologia. Szczególnie ta ostatnia dziedzina intensywnie rozwija się w ostatnich latach; powstało już wiele firm biotechnologicznych finansujących badania nad uzyskaniem nowych odmian roślin i zwierząt oraz zajmujących się wprowadzaniem produktów uzyskanych z tych odmian na rynek. Coraz częściej spotykamy się z efektami pracy biologów molekularnych zajmujących się manipulacją genami. Już w tej chwili powszechnie mówi się o tzw. nowej żywności, czy też żywności transgenicznej, określanej też mianem żywności niekonwencjonalnej, a jednocześnie temat ten wzbudza

bardzo wiele kontrowersji. Oprócz wielu pozytywów postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej niesie ze sobą wiele innych zagrożeń, jak chociażby możliwość wykorzystania technik rekombinacji DNA do produkcji broni biologicznej. Nie wszyscy zdają sobie sprawę, że zanim dojdzie do uzyskania ostatecznych produktów, które mogą znaleźć praktyczne zastosowanie i wzbudzić nasze zainteresowanie lub obawy, odbyć trzeba długą drogę. Otrzymywanie konkretnych organizmów transgenicznych, czy też opracowywanie nowych metod nie zawsze polega na dokonywaniu zmian w organizmie, który będzie ostatecznym produktem biotechnologicznym. Zwykle poprzedzające badania prowadzi się na tzw. organizmach modelowych, czyli takich, które są lepiej poznane jeśli chodzi o budowę genomu. Po sprawdzeniu, jak dany układ doświadczalny lub metoda działa na takim właśnie modelu, można je zastosować do innych organizmów, dzięki temu, że kod genetyczny jest uniwersalny (taki sam u wszystkich organizmów użytkowych). Taki właśnie schemat badawczy został zastosowany w niniejszej pracy. Został w niej przedstawiony proces uzyskania rośliny transgenicznej niezdolnej do rozmnażania; w opisanych tu badaniach jako model posłużyła roślina tytoniu (*Nicotiana tabacum*).

### **1.1. Techniki biologii molekularnej umożliwiające konstrukcję organizmów transgenicznych**

Obecne techniki biologii molekularnej pozwalają nie tylko na lepsze poznanie funkcjonowania i powstawania organizmów, lecz stwarzają również możliwość konstruowania nowych organizmów. Tworzenie nowych organizmów w pewnym sensie odbywało się już dużo wcześniej, jako skutek prowadzenia selektywnej hodowli. Zdecydowana większość współczesnych odmian roślin i zwierząt jest efektem doboru sztucznego, czyli ludzkiej ingerencji w procesy genetyczne. Nie ulega jednak wątpliwości, że dopiero współczesna biologia dała ludziom narzędzia pozwalające na precyzyjne manipulowanie zarówno swoim własnym materiałem genetycznym, jak i materiałem genetycznym organizmów należących do innych gatunków (Berg i Singer 1997).

Pojawienie się metod pozwalających na genetyczne modyfikacje lub otrzymywanie zupełnie nowych organizmów pociągnęło za sobą wyodrębnienie dyscypliny zwanej **biotechnologią molekularną**. Mianem tym określa się technologie służące do wytwarzania za pomocą inżynierii genetycznej użytecznych żywych organizmów, a także do otrzymywania innych substancji pochodzących z tych organizmów lub ich części. Organizmy otrzymane za pośrednictwem tych technologii określa się skrótem **GMO – (Genetycznie Modyfikowane Organizmy)**. Są to organizmy, których genom został zmieniony (zmodyfikowany) za pomocą technik rekombinowanego DNA (FDA, 1992).

Szczegółowa definicja GMO, sformułowana w ustawodawstwie Unii Europejskiej (UE) oraz w ustawodawstwie polskim, podana jest niżej.

### 1.1.2. Definicje Genetycznie Modyfikowanych Organizmów

Według ustawodawstwa UE:

**Organizmy genetycznie zmodyfikowane** są to organizmy, których materiał genetyczny został zmieniony w sposób inny, niż w drodze naturalnego rozmnażania lub krzyżowania (Dyrektywa 90/220/EEC).

Według ustawodawstwa polskiego:

**Organizmy genetycznie zmodyfikowane** oznaczają organizmy, których struktura genomu została zmieniona przez usunięcie jednego lub więcej genów albo zmianę jednego lub więcej genów, a także w drodze hodowli organizmów hybrydowych realizowanej z wykorzystaniem techniki inżynierii genetycznej (Art.37a ust. 2 Ustawy o Ochronie Środowiska z dnia 30.07.1997 roku, Dz.U. nr 133 poz. 885 z dnia 29.10.1997).

### 1.1.3. Techniki otrzymywania GMO

Techniki uzyskiwania organizmów transgenicznych są różne dla roślin i zwierząt.

#### Transformowanie komórek roślinnych

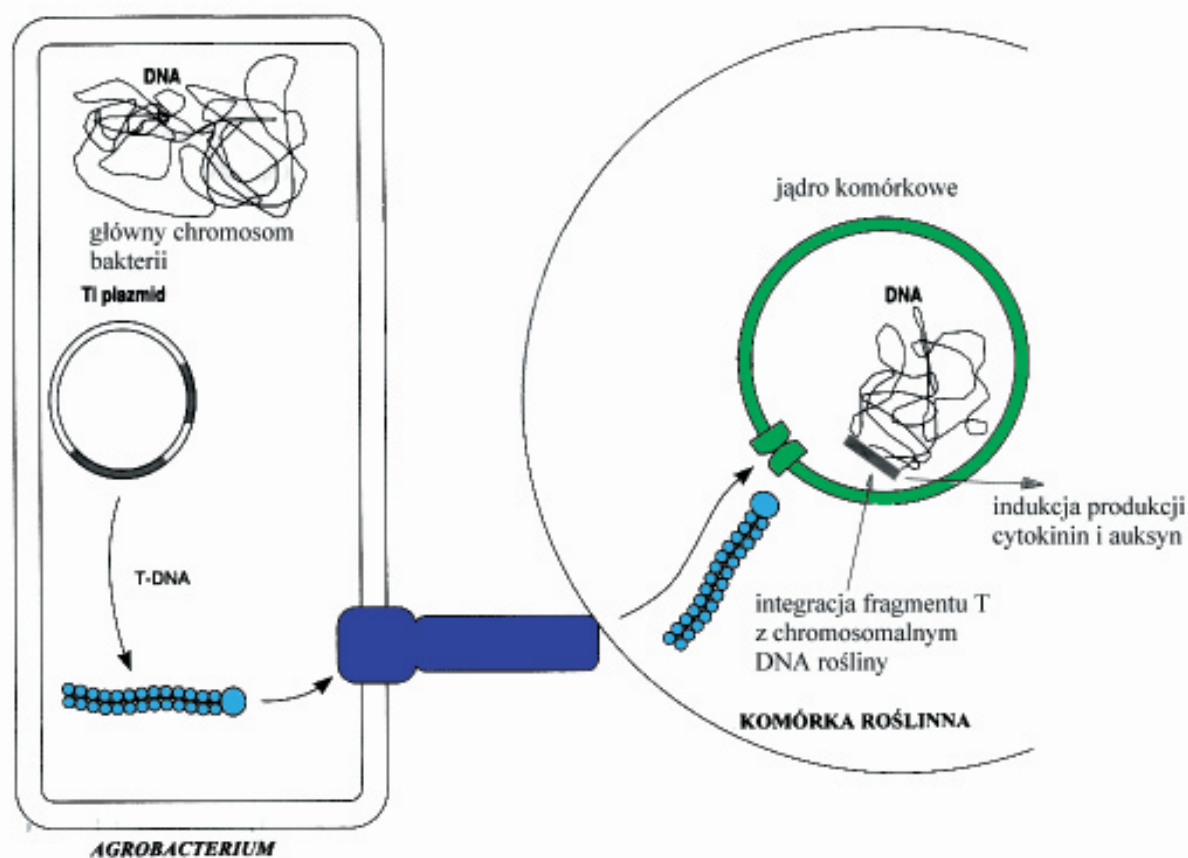
Obecnie stosuje się wiele różnorodnych technik wektorowego i bezwektorowego transformowania roślin. Kryterium wyboru metody są lokalizacja oraz wydajność ekspresji genu przeniesionego do rośliny biorcy. Poza tym, przy transformacji należy pamiętać, że nie wszystkie komórki roślinne są kompetentne (zdolne do transformacji) i totipotentne (zdolne do regeneracji całych organizmów). Te cechy komórek zależą od: gatunku, organu, stopnia rozwoju, indywidualnej historii i warunków wzrostu. Podstawą do proliferacji i regeneracji organów z komórek somatycznych jest zdolność do tzw. odpowiedzi na zranienie (Kahl 1982) – powszechnej dla roślin dwuliściennych, a bardzo rzadkiej u jednoliściennych.

Można wyróżnić trzy główne metody transformacji komórek roślinnych stosowane w zależności od rodzaju transformowanych roślin. Najprostsza polega na bezpośrednim wprowadzeniu DNA do protoplastów czyli komórek pozbawionych ściany komórkowej. Drugi sposób to transformacja za pomocą gram ujemnej bakterii glebowej *Agrobacterium tumefaciens*. Metoda ta jest najczęściej stosowaną i najskuteczniejszą dla roślin dwuliściennych. Trzecia metoda transformacji polega na wstrzeliwaniu DNA do komórek roślinnych. Jest to najczęściej stosowany sposób transformacji roślin jednoliściennych (Legocki 1990, Zimny 1996).

### Transformacja za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*

Drobnoustroje z rodzaju *Agrobacterium* wspaniale opanowały sztukę „kolonizacji genetycznej” – wprowadzania własnych genów do komórek roślinnych. *Agrobacterium tumefaciens* to bakteria glebowa wywołująca chorobę zwaną guzowatością szyjki korzeniowej lub inaczej rakiem szyjki korzeniowej. Zdolności tych bakterii wykorzystali naukowcy do otrzymywania nowych udoskonalonych odmian roślin transgeniczných poprzez wprowadzenie obcych genów za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* najlepiej poznanego gatunku zakażającego rośliny dwuliścienne. Odkryto, że nie wszystkie szczepy *Agrobacterium tumefaciens* wywołują chorobę. Porównania szczepów dokonali w 1974 roku Schell J. i Van Montagu M. wraz ze współpracownikami (Łęski 1997). Potwierdzono wówczas hipotezę, że patogenność zależy od obecności lub braku w komórce dodatkowej cząsteczki DNA (plazmidu), poza głównym DNA zawierającym informację genetyczną niezbędną do funkcjonowania komórki. Plazmid *Agrobacterium* zwany plazmidem Ti zawiera geny, które inicjują w komórce roślinnej syntezę jej własnych hormonów stymulujących podziały komórkowe: cytokininy i auksyny.

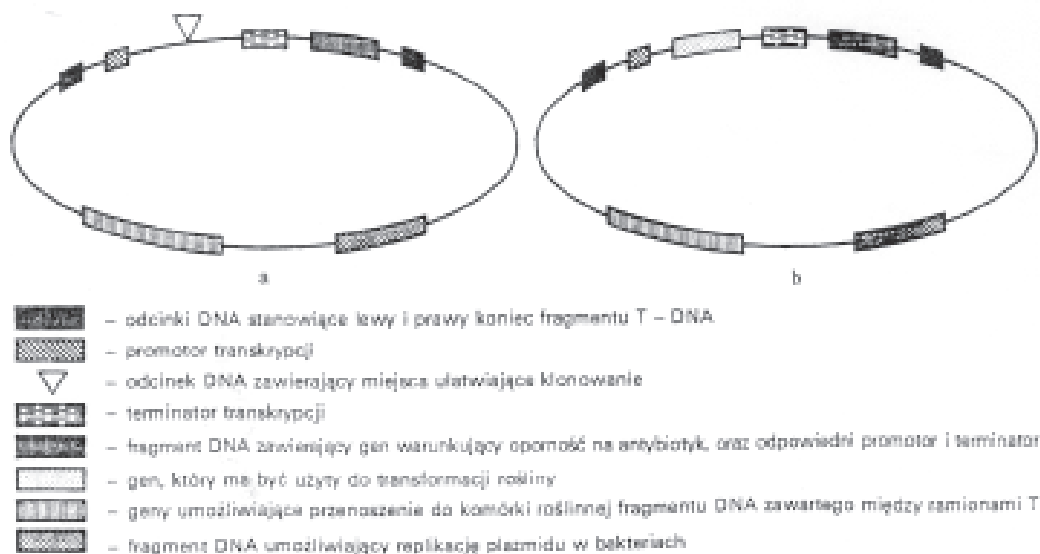
Rysunek 1. Infekcja komórki roślinnej przez *Agrobacterium tumefaciens*



Źródło: Opracowanie własne na podstawie Łęski, Wiedza i Życie 1997

Wskutek niekontrolowanej syntezy tych hormonów powstaje guz. Geny plazmidu Ti stymulujące syntezę hormonów zlokalizowane są we fragmencie plazmidowego DNA, zwanym T-DNA. To właśnie T-DNA, a nie cały plazmid Ti, wprowadzany jest do komórki roślinnej. Na obu końcach T-DNA znajdują się identyczne 25 nukleotydowe odcinki DNA. Noszą one nazwy odpowiednio: lewej i prawej granicy (ramion) rejonu T i warunkują skuteczną integrację całego fragmentu T do chromosomu rośliny. Ramiona T umożliwiają integrowanie z DNA gospodarza każdego fragmentu DNA, który się między nimi znajduje. Ta korzystna cecha sprawiła, że plazmid Ti został wykorzystany jako element umożliwiający wprowadzenie obcych genów do DNA roślin dwuliściennych (Jerzmanowski 1996). W tym celu został on „rozbrojony” przez usunięcie z fragmentu T genów warunkujących powstawanie guza, a także innych występujących tam genów. Pomiędzy lewą i prawą granicę T wprowadzono następnie nowe odcinki DNA, które pozwalają na łatwe wprowadzanie tam dowolnych genów i zapewniają ich ekspresję w komórce roślinnej, a także pozwalają na odróżnienie komórek transformowanych od nie transformowanych (Jerzmanowski 1996). Tak skonstruowana cząsteczka DNA nazywana jest wektorem transformacyjnym. (rys. 2)

Rysunek 2. Wektor plazmidowy do transformacji roślin za pomocą *Agrobacterium*



Wektor plazmidowy do transformacji roślin za pomocą *Agrobacterium* a) przed wstawieniem genu, b) z wstawionym genem, który ma być wprowadzony do genomu rośliny:

a) przed wstawieniem genu, b) z wstawionym genem, który ma być wprowadzony do genomu rośliny.

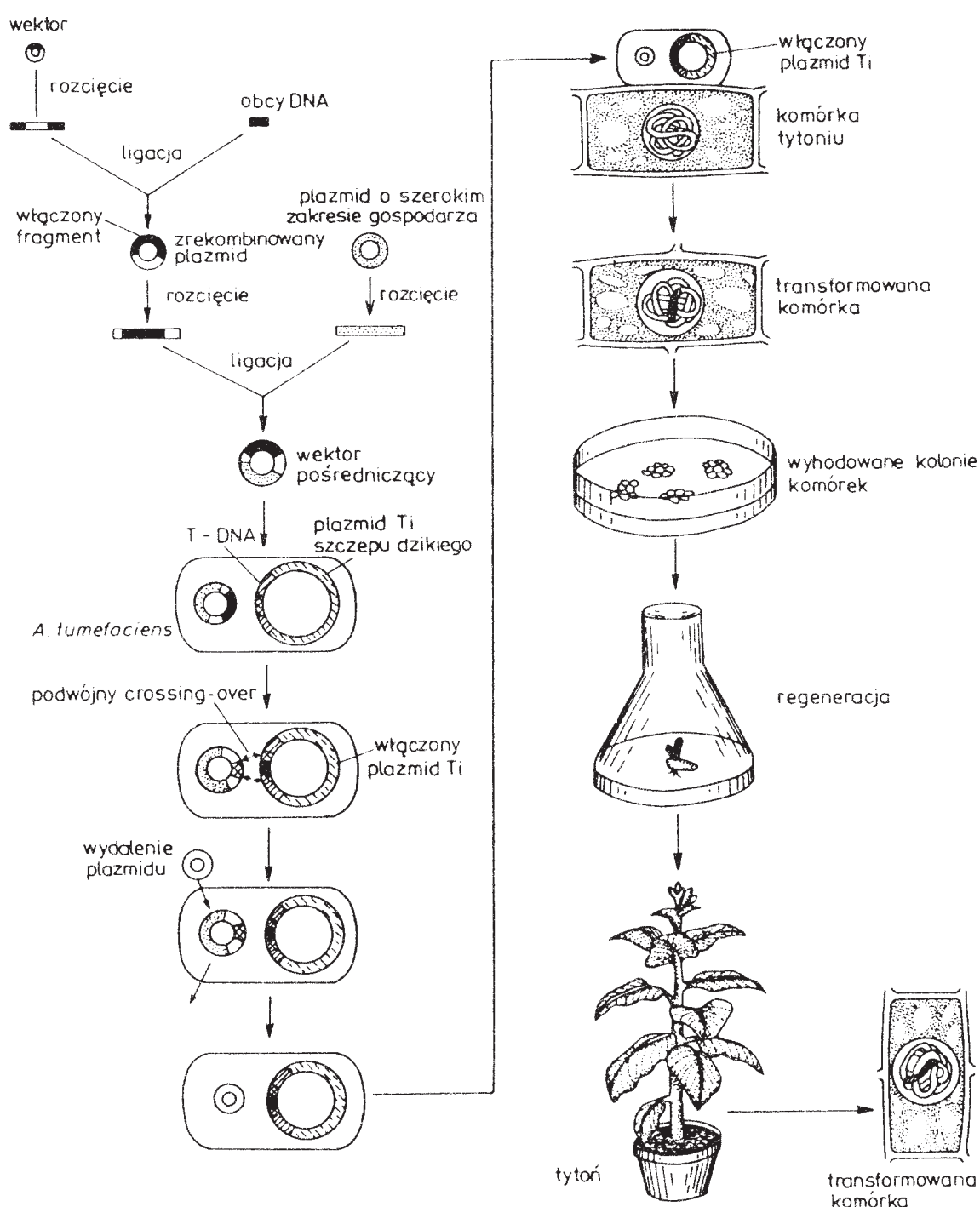
Źródło: Jerzmanowski 1996

Procedura transformacji polega na: (rys. 3)

- 1) wstawieniu w odpowiednie miejsce wektora właściwego fragmentu DNA,
- 2) wprowadzeniu wektora do *Agrobacterium* (tu następuje jego namnożenie),
- 3) inkubacji bakterii niosących wektor z fragmentem tkanki roślinnej (kokultywacja),
- 4) po kokultywacji z bakteriami przenoszenie fragmentów tkanki na pożywkę selekcyjno-regeneracyjną z odpowiednim antybiotykiem,

- 5) indukcja podziałów komórkowych i przekształcenie uformowanej już i nie proliferowanej tkanki w bezkształtną masę dzielących się komórek zwaną kalusem,
- 6) regeneracja roślin z komórek kalusa za pomocą pożywek zawierających hormony roślinne w selekcyjnie dobranej proporcji co powstaje indukcję pędu,
- 7) ukorzenianie rośliny w odpowiedniej pożywce,
- 8) przeniesienie rośliny do ziemi.

Rysunek 3. Schemat wprowadzania obcego genu do rośliny z zastosowaniem wektora pośredniczącego zawierającego fragment plazmidu Ti (wg Chilton, 1982)



Źródło: Transformowanie i regeneracja roślin – poradnik laboratoryjny. Poznań 1990

### Metoda transformacji za pomocą wstrzeliwania DNA do rośliny

Ten sposób transformacji zyskuje ostatnio dużą popularność. Polega on na „strzelaniu” do roślin z działka genowego. Działko jest urządzeniem umożliwiającym bombardowanie tkanek mikroskopijnymi kulkami powleczonymi warstewką DNA. Ciśnienie gazu w działku nadaje kulkom tak wielkie przyspieszenie, że z łatwością przenikają one przez twarde elementy struktury tkanek i komórek. Jednocześnie są na tyle małe, że nie powodują drastycznych uszkodzeń komórek.

Sposób ten pozwala na dostarczenie DNA do dowolnej tkanki roślinnej. W dalszym etapie procedury, z transformowanych komórek uzyskuje się kalus, a postępowanie w kolejnych etapach jest podobne, jak przy metodzie z zastosowaniem *Agrobacterium tumefaciens* (Jerzmanowski 1996).

### Transformacja protoplastów

Jest to najprostsza metoda otrzymywania transformowanych roślin. Wykorzystuje się w tym celu komórki sztucznie pozbawione ściany (protoplasty). Ścianę usuwa się traktując komórki mieszaniną enzymów pochodzącą z przewodu pokarmowego ślimaka, które trawią składniki ściany komórkowej nie niszcząc błony i wewnętrznych struktur komórki. Dla tak otrzymanych komórek wystarczy zwiększyć przepuszczalność zewnętrznej błony za pomocą np. krótkiej inkubacji komórek w roztworze zawierającym glikol polietylenowy, chlorek wapnia lub poddanie ich krótkiemu działaniu silnego pola elektrycznego (elektroporacja) aby wniknęły do ich wnętrza cząsteczki plazmidowego DNA. Dalsze postępowanie jest podobne jak w poprzednich metodach.

Jak widać z powyższych opisów sposoby transformacji nie są zbyt skomplikowane, lecz na tym nie koniec. Ważne jest aby transformacja była skuteczna, co oznacza stabilną ekspresję wprowadzonego genu. Często zdarza się, że wprowadzone do roślin geny nie ulegają w ogóle ekspresji, bądź jest ona bardzo słaba. Często przyczyną tego zjawiska jest tzw. „wyciszanie genów”, którego częściową konsekwencją jest przypadkowość miejsca integracji obcych genów w DNA rośliny.

Prowadzone są jednak ciągle badania nad sekwencjonowaniem genomów różnych roślin w tym użytkowych (pszenica, kukurydza, ryż) co być może pozwoli na skuteczniejsze dokonywanie transformacji. Sekwencjonowanie ma na celu dokładne poznanie składu sekwencji wszystkich genów rośliny. Te informacje pozwolą na udoskonalenie metod transformacji organizmów.

### Uzyskiwanie transgenicznych zwierząt

Zwierzęta transgeniczne uzyskuje się obecnie trzema metodami:

1. Przez nastrzyknięcie *in vitro* DNA do jednego z przedjądrzy zapłodnionej *in vivo* komórki jajowej, przed pierwszym podziałem. Jest to postępowanie prawie rutynowe i dające powtarzalne wyniki.
2. Przez infekcję wczesnego zarodka zrekombinowanym wektorem pochodzenia wirusowego.
3. Przez modyfikację genetyczną pierwotnych komórek zarodkowych ES (ang. embryo stem) i wprowadzenie ich do zarodka w stadium blastocysty. Ten ostatni zabieg udaje się tylko w komórkach myszy (Fikus M. 1996).

## 1.2. Tytoń jako roślina modelowa

Tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum* L.) należy do klasy roślin dwuliściennych. Osiąga wysokość od 75 do 300cm. Ma łodygę prostą lub rozgałęzioną o liściach podłużnych lancetowatych, ułożonych naprzemianlegle. Kwiaty tytoniu są duże, pachnące, zebrane w szczytowe podbaldachy. Kielichy kwiatowe są podłużnie cylindryczne. Różowa korona o długiej rurce i 5 zastrzonych płatkach, posiada 5 pręcików z czego 4 są równe a, piąty krótszy oraz jeden słupek. Owoce mają postać torebek pękających na szczycie. Nasiona są nerkowate, drobne i liczne. Tytoń zaliczany jest do rodziny *Solanaceae* (Psiankowate) do której należą również ziemniak i pomidor (Radomski, Jasnowski 1986).

Tytoń, który obecnie nie jest znany w stanie dzikim, pochodzi prawdopodobnie z Ameryki Południowej. Indianie zwali go „tobacco” i palili, wciągając dym nosem. Tytoń uważany był wówczas za roślinę leczniczą. Do Europy dotarł w połowie XVI w., prawdopodobnie przez Portugalię. W 1560 r. poseł francuski na dworze portugalskim, Jean Nicot de Villemain przesłał nasiona tytoniu do Francji, zalecając roślinę jako uniwersalny środek leczniczy. Jego nazwisko uwiecznił Linneusz w nazwie rodzajowej tytoniu (*nicotiana*); od niego pochodzi także nazwa głównego alkaloidu zawartego w liściach tytoniu. Obecnie tytoń uprawiany jest w większości krajów świata.

Rodzaj *Nicotiana* obejmuje około 60 gatunków. Tytoń szlachetny jest w zasadzie rośliną samopylną. (Podbielkowski 1989, Rajewski 1992).

Od pewnego czasu tytoń stał się obiektem zainteresowań biologów jako roślina wygodna do transformacji. Ze względu na pokrewieństwo z pomidorem i ziemniakiem może stanowić cenne źródło informacji dotyczących możliwości przeprowadzania doświadczeń na tych właśnie roślinach. Również z innych względów jest on dość wygodnym obiektem badawczym. Po pierwsze, daje się dość łatwo hodować w warunkach szklarniowych, jak również w warunkach sterylnych na agarze i w pożywce płynnej. Po drugie, charakteryzuje się dość krótkim czasem generacji (około 3-4 miesiące). Po trzecie, jest dość dużą rośliną u której łatwo jest zaobserwować wszelkie zmiany fenotypowe po transformacji. Po czwarte i najważniejsze, jest podatny na transformację za pomocą *Agrobacterium*, wykazując przy tym dużą zdolność do regeneracji. Warto podkreślić, że metoda transformacji *via Agrobacterium*, a także regeneracja są technikami stosunkowo prostymi. Rośliny tytoniu hodowane w optymalnych warunkach zapewniają wystarczającą ilość materiału do wykonania wszelkich analiz molekularnych i biochemicznych (Prymakowska-Bosak 1997).

### **1.3. Rzeczywiste i potencjalne zagrożenia związane ze stosowaniem organizmów transgenicznych**

Nowoczesne technologie konstruowania zmienionych genetycznie organizmów znalazły zastosowanie również przy produkcji żywności. Nowe odmiany transgeniczne mogą być bardziej odporne na stropy biotyczne i abiotyczne, posiadać lepsze właściwości sensoryczne oraz lepsze parametry technologiczne. Jednak ich zastosowanie wywołuje wiele kontrowersji i rodzi pytania związane przede wszystkim z bezpieczeństwem takiej żywności. Współcześnie dostępne techniki oparte są na znajomości biologii molekularnej, a zwłaszcza struktury genów. Biologia molekularna umożliwia skorelowanie właściwości i cech organizmów z rodzajem i strukturą konkretnych cząsteczek chemicznych. Oznacza to, że współcześni hodowcy potrafią skorelować takie cechy, jak np. szybkość wzrostu, czy odporność na owady z konkretnym odcinkiem DNA (genem), białkiem, hormonem i innymi cząsteczkami chemicznymi. Białko enzymatyczne albo białkowy hormon są „produktami” genu, który stanowi fragment genomu (kompletnej informacji genetycznej) - charakterystycznego molekularnego zapisu żywego organizmu. Możliwe jest nie tylko ustalenie za co odpowiada konkretny gen ale również wydzielenie go i przeniesienie do innego układu, np. innej rośliny lub zwierzęcia. Możliwe jest zatem kontrolowanie hodowli na poziomie molekularnym, a nie wyłącznie w oparciu o cechy morfologiczne, jak to miało miejsce w przypadku metod genetyki klasycznej (Twardowski 1997).

#### **1.3.1. Możliwości modyfikacji genetycznych**

Pierwsze eksperymenty z transgenicznymi roślinami przeprowadzono w USA, w 1986 roku na tytoniu. Od tego czasu badania prowadzone są na wielu innych gatunkach roślin. Równolegle prowadzone są badania nad transgenicznymi zwierzętami oraz drobnoustrojami. Modyfikacje genetyczne dokonane za pomocą metod inżynierii genetycznej mają przede wszystkim na celu poprawę trwałości produktów, a tym samym lepszą wydajność produkcyjną. Jak wiadomo, w produkcji żywności zasadniczy udział ma produkcja roślinna. O ogromnej roli roślin dla wyżywienia człowieka może świadczyć fakt, że stanowią one aż 93% jego diety, a w pozostałych 7% uczestniczą w pośredni sposób, będąc składnikiem pasz zwierzęcych.

Należy tu również pamiętać o drobnoustrojach, które wykorzystywane są do produkcji tzw. kultur starterowych. Kultury te używane są do pozyskania bardziej urozmaiconego asortymentu, ważnych w codziennej diecie przetworów mlecznych (Bednarski 1997, Twardowski 1997a). Wysokie wymagania stawiane kulturom starterowym (szczególnie tych wykorzystywanych w nowych technologiach przetwórstwa mleczarskiego) powodują, że wiele z nich poddaje się modyfikacjom genetycznym. Pierwszym GMO zastosowanym jako kultury starterowe były drożdże piekarskie *Sacharomyces cerevisiae* 352Ng (Bielecki i Kwapisz 1997). W przypadku mikroorganizmów waż-

nym celem jest ich **adaptacja do efektywniejszej produkcji żywności** (np. wdrożenie technologii produkcji reniny przez genetycznie modyfikowane szczepy bakterii lub drożdży- do genomu których wprowadzono geny z trawieńców cielęcych, odpowiedzialne za biosyntezę wymienionego enzymu (Twardowska i Twardowski 1997, Bednarski 1997)

Jeśli chodzi o rośliny transgeniczne zasadniczymi celami ich pozyskiwania są:

- 1. poprawa właściwości agronomicznych**, takich jak: odporność na temperaturę, zasolenie, niektóre infekcje wirusowe, grzybowe i bakteryjne. Niesie to z sobą możliwość zmniejszenia stosowania substancji chemicznych w rolnictwie, a zatem obniżenie kosztów produkcji oraz poprawę stanu środowiska;
- 2. ulepszenie właściwości produktu** przez poprawę cech sensorycznych (smak, zapach i wygląd), wydłużenie czasu składowania, zwiększenie zawartości składników naturalnych (np. witamin i mikroelementów) (Twardowski 1996);

W tabeli nr 1 przedstawiono możliwe efekty transgenizacji roślin. Jak łatwo zauważyć do najczęściej wprowadzanych cech należą: odporność na wirusy, odporność na herbicydy i owady, zwiększona produkcja określonego składnika, przedłużona trwałość.

Tabela 1. Przykłady roślin transgenicznych o zmienionych właściwościach

<i>Roślina</i>	<i>Efekt uzyskany za pomocą inżynierii genetycznej</i>
Truskawka	wyższa słodkość owoców spowolnienie procesu dojrzewania poprzez kontrolę poziomu etylenu mrozoodporność
Jabłka	odporność na owady
Banany	odporność na wirusy i grzyby
Winogrona	odmiany bezpestkowe
Seler	zwiększenie kruchości
Brokuły	spowolnienie dojrzewania
Cykoria	zwiększenie zawartości cukrów
Kapusta	odporność na szkodniki mniejsze wymiary
Dynia	odporność na grzyby
Pomidor	większa zawartość suchej substancji opóźnione dojrzewanie i mięknięcie poprawa smaku intensyfikacja barwy cieńsza skórka
Soja	odporność na wirusy odporność na herbicydy olej o obniżonej zawartości kwasu palmitynowego

<i>Roślina</i>	<i>Efekt uzyskany za pomocą inżynierii genetycznej</i>
Rzepak	zwiększona zawartość kwasu laurynowego olej o niskiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych
Ziemniak	wzrost zawartości skrobi produkcja cyklodekstryn produkcja słodkiego białka - taumatyny odporność na ciemnienie poudzerzeniowe skrobia amylopektynowa mała zawartość glikoalkaloidów mała zawartość cukrów redukujących odporność na wirusy odporność na stonkę odporność na herbicydy
Pszenica	zwiększona zawartość glutenu

Źródło: Grajek, Malepszy 1997

### **1.3.2. Argumenty przeciwników genetycznie modyfikowanych organizmów**

Wiele organizacji pozarządowych, działających na całym świecie, w tym również w Polsce często określanych jako „zieleni”, jest przeciwna rozwojowi biotechnologii, a zwłaszcza inżynierii genetycznej. Organizacja „Greenpeace” uważa, że brak szkodliwych efektów organizmów transgenicznych nie dowodzi bezpieczeństwa GMO. W związku z tym twierdzi, że stanowisko organizacji międzynarodowych (OECD i UNEP) jest nieodpowiedzialne i dlatego należy:

- wstrzymać wszelkie wprowadzanie GMO do środowiska,
- przeprowadzić szczegółową analizę wszystkich zastosowań inżynierii genetycznej i jej wpływu bezpośredniego i pośredniego na środowisko, zdrowie ludzkie i warunki socjoekonomiczne,
- wprowadzić zasadę pełnej odpowiedzialności producenta za efekty spowodowane przez jego produkty (Twardowski 1997b).

### **1.3.3. Potencjalne zagrożenia wynikające z zastosowania nowych organizmów w żywieniu ludności**

Ryzyko, jakie niesie za sobą stosowanie inżynierii genetycznej ukierunkowanej na produkcję nowych organizmów wynika przede wszystkim z zakresu wykorzystania GMO. Innej ocenie będzie podlegało zagrożenie wynikające ze stosowania zmodyfikowanych genetycznie bakterii *Escherichia coli* służącej do przemysłowej produkcji taniej insuliny w kontrolowanych warunkach hodowli tego drobnoustroju, a innej wprowadzenie do uprawy polowej nowej odmiany rośliny, którą wyposażono w cechę innego gatunku, nie stosowanego dotychczas w żywieniu ludzi. Jeżeli chodzi o zakres wykorzystania GMO przy produkcji żywności, można go podzielić w sposób następujący:

1. Produkty wytwarzane przez GMO stosowane bezpośrednio w żywieniu ludzi (np. olej sojowy o korzystniejszym składzie kwasów tłuszczowych),
2. Produkty wytwarzane przez GMO jako dodatki do żywności (kwas cytrynowy, mlekowy),
3. Produkty wytwarzane przez GMO stosowane w przemyśle spożywczym (np. enzymy),
4. GMO stosowane w przemyśle spożywczym (np. zmodyfikowane drożdże),
5. GMO jako produkty bezpośrednio stosowane w żywieniu ludzi (np. ziemniaki z cechą oporności na stonkę lub soja oporna na niektóre herbicydy, pomidor o przedłużonym okresie dojrzewania) (Ludwicki 1998a).

Ocena ryzyka związanego z zastosowaniem GMO lub ich produktów w żywieniu ludzi wymaga zidentyfikowania potencjalnych zagrożeń wynikających z ingerencji w materiał genetyczny organizmu. Istnieją dwa podstawowe typy ingerencji w materiał genetyczny: wprowadzenie genu kodującego pożądaną cechę i unieczynnienie genu kodującego niepożądaną cechę. Mimo ciągłych postępów inżynierii genetycznej nie można wykluczyć, że wraz z wprowadzeniem nowej, ściśle zdefiniowanej cechy wprowadzona zostanie również inna cecha zakodowana w DNA dawcy materiału genetycznego. Poza tym, samo wprowadzenie nowej cechy do DNA może spowodować ekspresję genów obecnych w materiale genetycznym gospodarza, które dotychczas pozostawały nieaktywne (uśpione). Z podobnym efektem można się liczyć po usunięciu fragmentu materiału genetycznego kodującego niepożądaną cechę. Dlatego też przy ocenie zagrożeń wynikających ze stosowania GMO, należy brać pod uwagę:

- konsekwencje bezpośrednie (np. żywieniowe, toksykologiczne, alergienność) wynikające z obecności w żywności nowych produktów kodowanych przez geny wprowadzone na drodze inżynierii genetycznej;
- konsekwencje bezpośrednie wynikające ze zmian w dotychczasowym poziomie produktów kodowanych przez geny wprowadzone lub zmodyfikowane na drodze inżynierii genetycznej;
- pośredni wpływ nowo wytwarzanych produktów na przebieg metabolizmu w organizmie genetycznie zmodyfikowanym, co w konsekwencji może prowadzić do wytwarzania nowych składników lub do zmienionego poziomu składników dotychczas wytwarzanych;
- konsekwencje mutacji wywołanych modyfikacją genetyczną w GMO, takich jak przerwanie sekwencji genów kontrolujących represję uśpionych genów, co prowadzi do pojawienia się nowych składników lub do zmienionego poziomu składników dotychczas występujących;
- konsekwencje transferu genów z GMO lub produktów pochodzących od tych organizmów do mikroflory zasiedlającej przewód pokarmowy;
- możliwość szkodliwego wpływu na zdrowie wynikające ze stosowania w żywieniu mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie (Ludwicki 1998b).

Rośliny transgeniczne są przewidziane do bezpośredniego spożycia w stanie surowym oraz jako surowiec do przetwórstwa spożywczego. Geny wprowadzone do roślin transgenicznych kodują biosyntezę takich samych białek jak te, które były wytwarzane przez organizmy z których pobrano gen. W wyniku biosyntezy, a następnie działania obcych białek (enzymów), syntetyzowane są przez roślinę takie substancje, jak węglowodany, tłuszcze, białka. Są one pod względem chemicznym identyczne z tymi, które człowiek spożywa codziennie w swojej diecie i podobnie trawione przez organizm. Geny wprowadzone do roślin są w całości trawione w przewodzie pokarmowym człowieka, podobnie jak kwasy nukleinowe z normalnych roślin. Nie ma więc możliwości wbudowania obcych genów spożywanych wraz z roślinami transgenicznymi do organizmu ludzkiego. Należy tu dodać, że wszelkie rodzaje żywności (niezależnie od pochodzenia) zawierają DNA, który jest trawiony i nie może zostać wbudowany do ludzkiego genomu (Grajek, Malepszy 1997; Bednarski 1997; Fikus 1997).

#### **1.3.4. Żywność transgeniczna a bezpieczeństwo konsumenta**

Ludzie oczekują, aby ich pożywienie było tak „naturalne” jak to tylko możliwe. W potocznym odczuciu, im bardziej naturalny jest dany produkt, tym lepszy i bezpieczniejszy dla konsumenta. Natomiast techniki inżynierii genetycznej wydają się społeczeństwu wysoce „nienaturalne” i oceniane są jako niebezpieczne. Natomiast w opinii specjalistów modyfikacja genetyczna w produkcji żywności to tylko naśladowanie przyrody.

Ciekawe jest, co budzi szczególne obawy jeśli chodzi o konsumpcję artykułów spożywczych zawierających materiał biologiczny, modyfikowany genetycznie. Obawy dotyczą np. tego co stanie się, gdy DNA zawarty w żywności nie zostanie strawiony. Czy geny pochodzenia bakteryjnego występujące w nowej żywności – np. geny warunkujące oporność na antybiotyki, stosowane jako specyficzne znaczniki (markery) genetyczne, mogłyby spowodować taką samą oporność u flory bakteryjnej systemu trawiennego? Mogłyby wówczas wystąpić różne problemy, np. zwiększona podatność na alergie. Z drugiej strony, oporność na antybiotyki jest cechą charakterystyczną dla wielu bakterii występujących w żywności i regularnie spożywanych przez ludzi. Niezależnie od tego, marker oporności na antybiotyki stosowany w pracach badawczych nad żywnością, może być usunięty z produktów żywnościowych w odpowiedniej fazie prac genetycznych.

Stawiane są również pytania, dotyczące możliwości niebezpiecznego zwiększenia poziomu toksyn, nowych substancji czy też alergenów w genetycznie modyfikowanych roślinach. Stanowi to również realne zagrożenie w przypadku stosowania klasycznych metod uprawy i hodowli. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę, że niezależnie od technologii otrzymywania żywności, obowiązkiem producenta jest gwarantowanie jakości i bezpieczeństwa sprzedawanych artykułów konsumpcyjnych, jak również zabezpieczenie przed obecnością wszelkich szkodliwych czynników.

Występują także obawy przed możliwością zniszczenia przez genetycznie modyfikowane rośliny układu biologicznej równowagi w środowisku. W przypadku zaniedbania kontroli i ostrożności, w trakcie rutynowych prac laboratoryjnych mogłaby zostać omyłkowo wykreowana nowa roślina. Przypadkowo otrzymana genetycznie modyfikowana roślina mogłaby np. być odporna na określone herbicydy, charakteryzować się bardzo wysoką plennością, stanowiąc niezwykle trudny do usunięcia chwast. Gdyby dodatkowo nastąpiło jeszcze wprowadzenie odporności na owady, to mogłoby mieć miejsce zaburzenie naturalnej równowagi ekologicznej. Te przypuszczenia są jednak mało prawdopodobne. Chwasty są silniejsze od wyhodowanych przez człowieka roślin, dlatego że są lepiej zaadoptowane w wyniku doboru naturalnego i to dzięki temu mają tak uprzywilejowaną, z punktu widzenia trybu życia, charakterystykę genetyczną (Twardowski 1996, WHO 1996).

Należałoby tu jeszcze przytoczyć definicję bezpiecznej żywności jaka została sformułowana i zapisana w Kodeksie Żywnościowym FAO/WHO:

**bezpieczeństwo żywności jest to pewność, że nie spowoduje ona szkodliwych skutków dla konsumenta, o ile jest przygotowana i spożywana zgodnie z przeznaczeniem.**

Wychodząc z tej definicji Światowa Organizacja Zdrowia przyjęła stanowisko, że żywność uzyskana z udziałem organizmów zmodyfikowanych genetycznie lub same GMO służące jako żywność powinny być ocenione poprzez porównanie z odpowiednimi produktami oryginalnymi, dla których istnieją standardy bezpieczeństwa. Koncepcję tę rozwinęła Organizacja ds. Współpracy Ekonomicznej i Rozwoju (ORCD) przedstawiając pogląd, wedle którego jeśli nowa żywność lub jej składnik są w znaczącym stopniu równoważne z już istniejącą żywnością (lub jej składnikiem) otrzymanymi metodami konwencjonalnymi, to w odniesieniu do bezpieczeństwa, powinny być traktowane w taki sam sposób jak, jej konwencjonalny odpowiednik.

Zgodnie z tą koncepcją żywność podzielono na 3 grupy:

### **Grupa 1**

**Żywność lub składniki żywności identyczne z odpowiednikiem wśród tradycyjnej żywności (referencyjnej);**

Dla określenia zasadniczej równoważności konieczne jest dokonanie charakterystyki genotypowej i składu na poziomie molekularnym. Porównanie to powinno obejmować cechy fenotypowe i istotne składniki GMO.

### **Grupa 2**

**Żywność lub składniki żywności wystarczająco podobne do odpowiednika wśród żywności tradycyjnej z wyjątkiem jednej lub kilku cech, które powinny być przedmiotem oceny tok-**

**sykologicznej.** Wg Ludwickiego różnica zawsze polega na wytwarzaniu określonego białka, które może być podstawowym celem modyfikacji lub np. białka enzymatycznego, dzięki któremu zmodyfikowany organizm wytwarza inne substancje, np. węglowodany, tłuszcze i inne składniki niskocząsteczkowe, których obecność może mieć określone implikacje toksykologiczne lub żywieniowe.

### Grupa 3

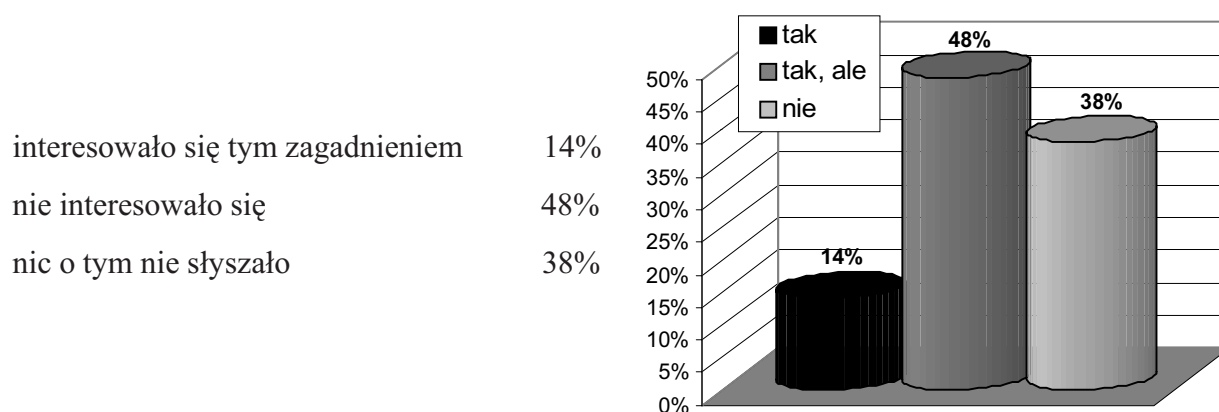
**Żywność lub składniki żywności, które nie są ani identyczne ani wystarczająco podobne do tradycyjnej żywności ponieważ różnice nie mogą być zidentyfikowane albo też dlatego, że nie istnieje odpowiednik wśród żywności tradycyjnej.** Są to naturalne dotychczas nie używane w produkcji żywności organizmy albo pochodzące z nich produkty bądź produkty poddane nowym procesom przetwórczym. Grupa ta wymaga wszechstronnych badań toksykologicznych a także żywieniowych (Urbanek – Karłowska i Fonberg – Broczek 1998)

#### 1.3.5. Odbiór społeczny nowej żywności w Polsce

W podrozdziale tym przedstawię poglądy polskiego społeczeństwa na temat żywności transgenicznej opracowane na podstawie badań Ośrodka Badań Opinii Publicznej (OBOP) opublikowanych w *Biotechnologii* nr 4(43) 1998 rok.

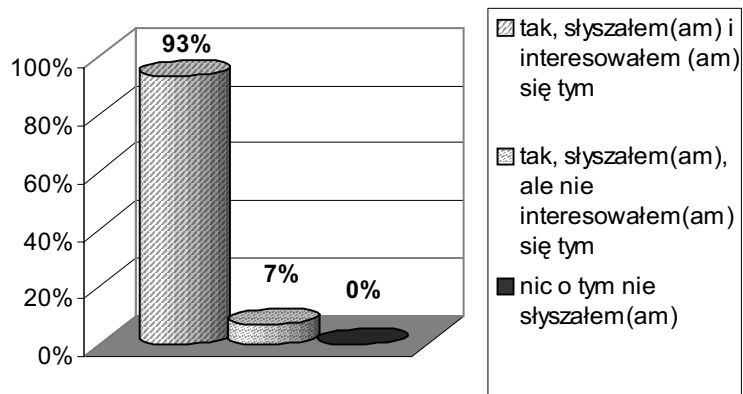
Badanie prowadzone było w terminie 27 – 30 czerwca 1998 roku metodą sondażową na próbie mieszkańców Polski powyżej 15 roku życia dobranej metodą losową, warstwowo - proporcjonalnie. Zestaw pytań adresowany do reprezentowanej próby społeczeństwa przedstawiono również polskim biotechnologom, w trakcie przygotowania uaktualnionej edycji informatora „Kto jest kim w polskiej biotechnologii”. Jest to około 200 osób, które w 90% reprezentują środowisko nauk przyrodniczych.

Na początek zapytano badanych o zainteresowanie problematyką stosowania metod biotechnologii przy produkcji żywności i napojów. Odpowiedzi były następujące:



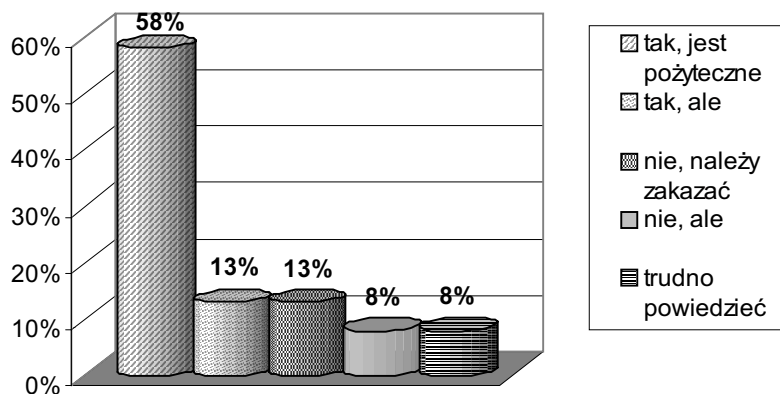
**Opinia biotechnologów:**

interesowało się tym zagadnieniem	93%
nie interesowało się	7%
nic o tym nie słyszało	0%



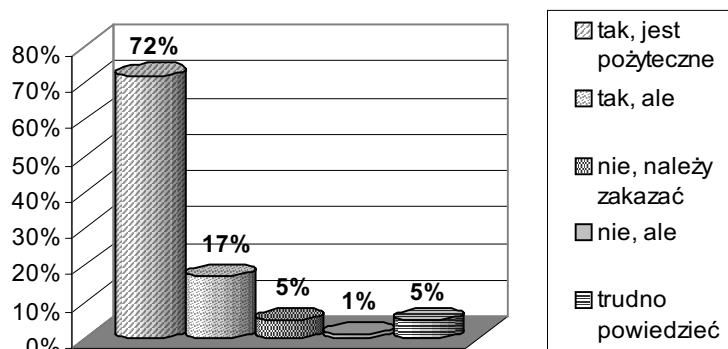
Kolejne pytanie dotyczyło opinii na temat wykorzystania biotechnologii do produkcji żywności i napojów. Uzyskano następujące odpowiedzi:

twierdzi, że jest to pożyteczne	58%
tak, ale	13%
twierdzi, że należy tego zakazać	13%
nie, ale	8%
trudno powiedzieć	8%



**Opinia biotechnologów:**

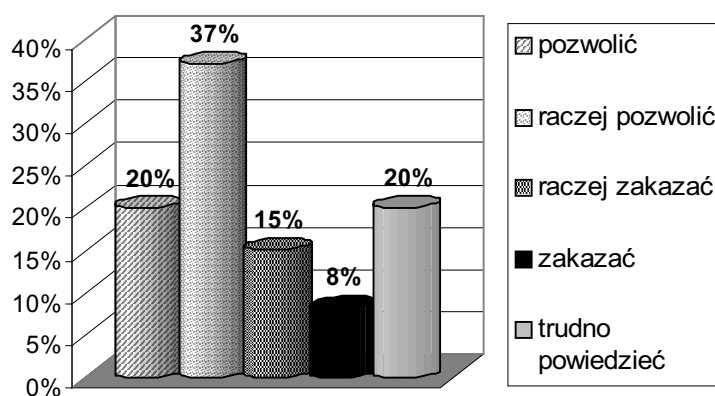
twierdzi, że jest to pożyteczne	72%
tak, ale	17%
twierdzi, że należy tego zakazać	5%
nie, ale	1%
trudno powiedzieć	5%



Wynika z tego, że ponad połowa badanych (57%) uważa, że należy zezwolić na produkcję i sprzedaż żywności transgenicznej. Prawie jedna czwarta (23%) jest temu przeciwna, a jedna piąta (20%) nie ma zdania na ten temat. Natomiast 2/3 biotechnologów jest zwolennikami produkcji nowej żywności, a tylko jedna czwarta jest temu przeciwna.

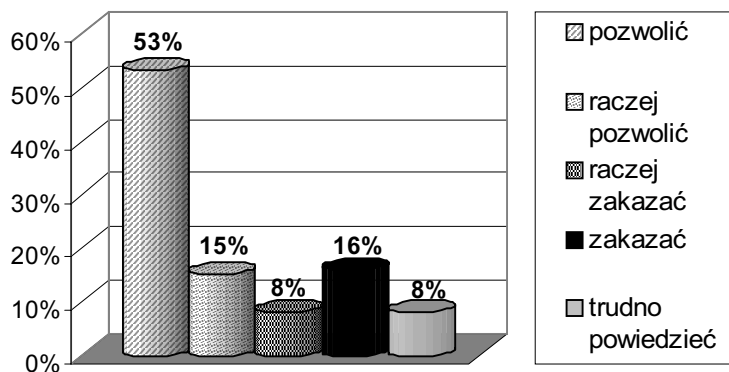
Następne pytanie brzmiało: czy Pana(i) zdaniem należy pozwolić, czy zakazać produkcji i sprzedaży żywności transgenicznej, czyli otrzymywanej z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej? Odpowiedzi były następujące:

pozwolić	20%
raczej pozwolić	37%
raczej zakazać	15%
zakazać	8%
trudno powiedzieć	20%



**Według opinii biotechnologów:**

pozwolić	53%
raczej pozwolić	15%
raczej zakazać	8%
zakazać	16%
trudno powiedzieć	8%

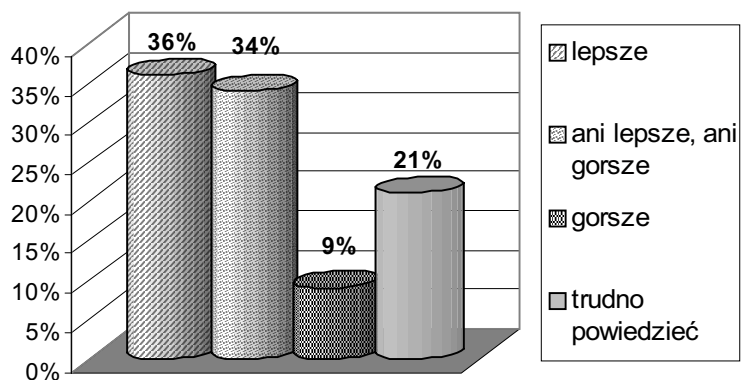


Kolejne pytanie miało wykazać, jakie są opinie Polaków na temat tradycyjnych metod produkcji przemysłu rolno - spożywczego w porównaniu z metodami stosowanymi w inżynierii genetycznej.

Treść pytania: Czy tradycyjne metody produkcji przemysłu rolno – spożywczego w porównaniu do metod inżynierii genetycznej są Pana(i) zdaniem...

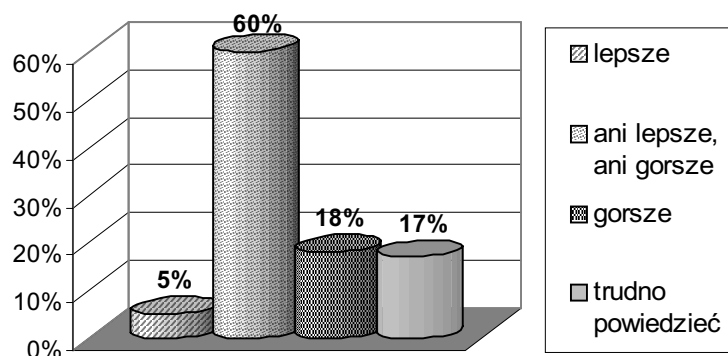
Odpowiedzi były następujące:

lepiej	36%
ani lepiej ani gorsze	34%
gorsze	9%
trudno powiedzieć	21%



**Według opinii biotechnologów:**

lepiej	5%
ani lepiej ani gorsze	60%
gorsze	18%
trudno powiedzieć	17%



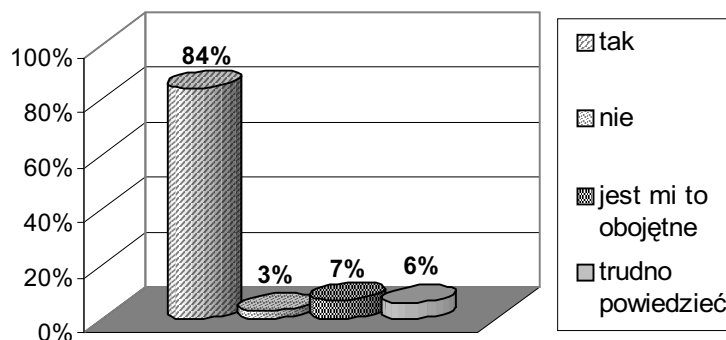
Wynika z tego, że ponad jedna trzecia badanych opowiada się za stosowaniem inżynierii genetycznej (36%). Podobny odsetek twierdzi, że żadna z metod nie jest ani lepsza ani gorsza (34%). Co dziesiąty ankietowany preferuje metody tradycyjne (9%), a co piąty nie ma zdania na ten temat (21%). Podobnie jak w poprzednim pytaniu 2/3 fachowców jest zwolennikami, a 1/5 uważa biotechnologię za gorszą od metod tradycyjnych lub nie ma na ten temat zdania.

Kolejne pytanie dotyczyło oznakowania żywności, a więc problemu nad którym ciągle trwają dyskusje specjalistów. Badanym przedstawiono 5 rodzajów tej żywności. W każdym przypadku około 4/5 respondentów opowiedziało się za specjalnym jej oznakowaniem.

Na pytanie: Czy Pana(i) zdaniem należy specjalnie oznaczać żywność otrzymaną z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej, czyli żywność transgeniczną?

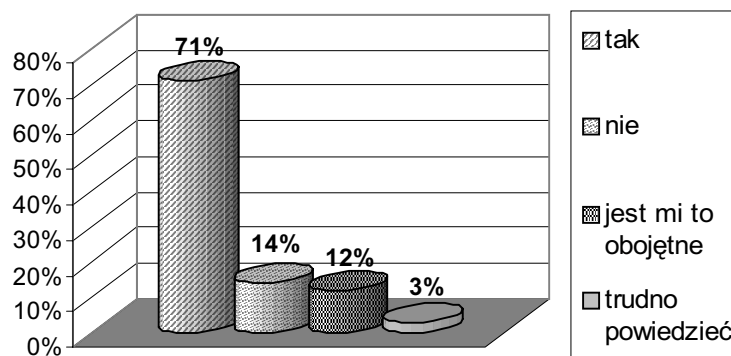
uzyskano następujące odpowiedzi:

tak	84%
nie	3%
jest mi to obojętne	7%
trudno powiedzieć	6%



**Według opinii biotechnologów:**

tak	71%
nie	14%
jest mi to obojętne	12%
trudno powiedzieć	3%



Podsumowując można powiedzieć, że z przeprowadzonych badań wynika że:

- polskie społeczeństwo akceptuje „żywność GMO”, ale wymaga jej kontroli i oznakowania;
- istotnym elementem tego stanowiska jest wskazanie oczekiwanych wyższych wartości żywności uzyskanej za pomocą nowych metod (Twardowska – Pozorska, Twardowski 1998).

**1.3.6. Uregulowania prawne dotyczące GMO**

W ostatnim okresie w środkach masowego przekazu coraz więcej mówi się na temat żywności transgenicznej. W prasie codziennej pojawiają się liczne artykuły i wypowiedzi specjalistów od biotechnologii.

Dyskutowane są również kwestie społeczne i ekonomiczne dotyczące nowej żywności. Mówi się także o znaczeniu nowoczesnych technologii dla przemysłu (Huggrtt i Conzelmann 1997). Jak można było przeczytać w Rzeczpospolitej z 14.10.99 w przemyśle spożywczym w Polsce metody inżynierii genetycznej stosowane są przy produkcji preparatów enzymatycznych, np. podpuszczki używanej w produkcji serów dojrzewających. Także w produkcji jogurtów, kefirów i maślanki wykorzystywane są modyfikowane genetycznie szczepy bakterii mlekowych. Preparaty białka sojowego są używane do produkcji 60 – 70% wszystkich wędzonek i kielbas w Polsce, gdzie są tak zwanymi białkami funkcjonalnymi (wiążą wodę). Są one tańsze od zwierzęcych białek kolagenowych. Zakłady mięsne nie są informowane, czy preparaty białka sojowego pochodzą z soi genetycznie modyfikowanej. Główni dystrybutorzy tych preparatów odpowiadają, że nie wiedzą, jakim surowcem dysponują twierdzi Jan Kaliszewski ze Stowarzyszenia Ochrony Zdrowia Konsumentów (Forowicz 1999).

W naszym ustawodawstwie istnieje zapis o organizmach genetycznie modyfikowanych (ustawa z dnia 29 sierpnia 1997 roku o kształtowaniu środowiska oraz zmianie niektórych ustaw). Jak wynika z art.1 pkt. 22 który wszedł w życie z dniem 1 stycznia 1999 roku: po art.37 dodaje się art. 37a w brzmieniu:

Art. 37a. 1. Zamierzone uwolnienie genetycznie zmodyfikowanych organizmów do środowiska w celach eksperymentalnych lub wprowadzenie do obrotu produktu zawierającego organizmy genetycznie modyfikowane lub składającego się z takich organizmów albo ich części wymaga zezwolenia Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa (Internet)

Nie ulega więc wątpliwości, że żywność transgeniczną należy znakować , w tym celu prof. Stanisław Berger z SGGW zaproponował literę „G” jak gen.

Mimo to wiele firm deklaruje, że nie zamierza stosować w swoich produktach GMO np. Alima – Gerber z Rzeszowa – producent żywności dla dzieci oraz Kraft – Jacobson – Suchard, Nutricia/Milupa również producenci żywności dla dzieci, poza tym Dr Oetker (dodatki kucharskie), Redband/Venco (cukiernie).

#### **1.4. Metody zmniejszenia ryzyka stosowania organizmów transgenicznych**

Można zaryzykować twierdzenie, że wszystkie nowe technologie i produkty budzą nasze obawy i wątpliwości. Choć z pewnością obawy związana z reformami i zmianami w szkolnictwie nie będą tak duże, jak te związane z nową żywnością, czyli dotyczące bezpośrednio naszego zdrowia, wartości na której najbardziej nam zależy. Inny będzie na pewno stosunek do nowo wynalezionej szczepionki, która może pomóc w zwalczeniu poważnej choroby, inny zaś do czegoś, co może się znaleźć na naszym stole. Jednak tak naprawdę, oba produkty powstają w podobny sposób, przy użyciu podobnych metod i w podobnych laboratoriach. Dlatego też zagrożenie zaczyna się od samego początku, tj. od etapu stołu laboratoryjnego. Od tego miejsca też należy rozpocząć stosowanie metod zmniejszania ryzyka związanego ze stosowaniem organizmów transgenicznych.

Podstawową metodą zapobiegania niekontrolowanego rozprzestrzeniania się materiału biologicznego jest odpowiednie postępowanie z odpadami po hodowlach drobnoustrojów, a więc wszelkiego rodzaju pożywkami. Same hodowle powinny być niszczone na terenie laboratorium a nie wylewane do kanalizacji. Postępowanie takie dotyczy nie tylko laboratoriów biotechnologicznych ale i zakładów przemysłowych pracujących na materiale rekombinowanym.

Kolejną ważną rzeczą przy pracy z tego rodzaju organizmami jest prowadzenie hodowli w hermetycznie zamkniętych bioreaktorach, szczególnie jeśli mamy doczynienia z wirusami czy bakte-

riami chorobotwórczymi (używanymi przy produkcji szczepionek). Natomiast hale produkcyjne powinny być wykonane według standardów uniemożliwiających wydostanie się komórek na zewnątrz. Istotną rolę odgrywa tu również monitorowanie doświadczeń w zakładzie czy laboratorium oraz poza nim.

Jedną z metod jest stosowanie szczepów, które nie mogą się rozwijać poza bioreaktorem. Najbardziej znanym tego typu drobnoustrojem są bakterie *Echerichia coli* K12 (Grajek 1997).

Jeżeli zaś chodzi o próby polowe z transgenicznymi roślinami należy je prowadzić w miejscach do tego przeznaczonych i pod ścisłą kontrolą.

Zakładanie banków genów to kolejny sposób na zachowanie całej różnorodności i bogactwa genetycznego przyrody (Jerzmanowski 1999). Trzeba pamiętać o tym, że wprowadzanie nowych ulepszonych odmian może spowodować „zgubienie” pierwotnych dzikich odmian zwierząt i roślin występujących jeszcze obecnie na Ziemi.

Warto tu również zauważyć, że metody inżynierii genetycznej pozwalają na prowadzenie prac jedynie z fragmentem genomu, a często tylko z jednym jego genem, np. organizmu patogennego co na pewno zmniejsza ryzyko w porównaniu z użyciem całego jego genomu.

Prowadzone są również badania nad możliwością usuwania z GMO wprowadzanych do nich genów markerowych (najczęściej jest to oporność na antybiotyk), które budzą najwięcej wątpliwości wśród społeczeństwa.

Podsumowując działania mające na celu zapewnienie bezpieczeństwa w biotechnologii winny obejmować:

- monitorowanie i analizowanie zagrożeń,
- prowadzenie klasyfikacji biozagrożeń,
- ocenę ulepszeń zabezpieczeń,
- opracowanie przepisów i standardów regulujących bezpieczeństwo prac,
- prowadzenie działań informacyjno-edukacyjnych.

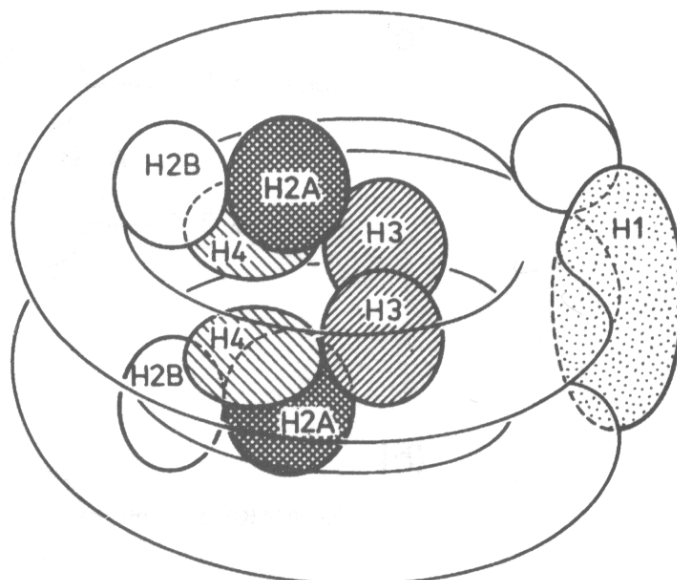
## 1.5. Histon H1 - białko strukturalne chromosomów

Chromosomy są miejscem, w którym przechowywane są wszystkie geny komórkowe. U wszystkich organizmów eukariotycznych DNA jądrowy występuje w postaci silnie upakowanego kompleksu nukleoproteinowego, zwanego chromatyną. Jej podstawową jednostką strukturalną jest nukleosom, w skład którego wchodzi odcinek DNA o długości ok. 200 par zasad i białka zwane histonami (van Holde, 1989). Oprócz histonów w chromatynie występują jeszcze tzw. białka niehistonowe, które pełnią bardzo zróżnicowane funkcje. Należą do nich niehistonowe białka strukturalne (HMG, białka szkieletu chromosomowego), enzymy związane z funkcjami DNA (DNA-i RNA-polimerazy), białka związane z modyfikacjami histonów (kinazy, metylazy, acetylazy), oraz białka regulatorowe o nieznannej dotychczas funkcji. Wśród wszystkich organizmów eukariotycznych chromatyna zbudowana jest w podobny sposób (Jerzmanowski, Staroń 1989). Stosunkowo najwięcej informacji zebrano dotychczas na temat białek histonowych, których stosunek wagowy do DNA wynosi w przybliżeniu 1:1.

### 1.5.1. Nukleosom

Badania prowadzone już na początku lat 70-tych wykazały, że chromatyna zbudowana jest z powtarzających się podjednostek, nazywanych nukleosomami (Kornberg 1974). Nukleosom złożony jest z 8 cząsteczek histonów rdzeniowych, które tworzą tzw. oktamer (po dwie każdego z rodzajów: H2A, H2B, H3, H4), jednej cząstki histonu H1 oraz odcinka DNA o długości 165-245 par zasad. Cząstkę taką można wyizolować z chromatyny trawiąc ją endonukleazami (np. nukleazą z *Micrococcus*), które preferencyjnie przecinają łatwiej dostępne miejsca między nukleosomami. Dalsze trawienie usuwa z nukleosomu końce DNA o zmiennej długości w różnych rodzajach komórek. W ten sposób otrzymuje się cząstkę rdzeniową zawierającą odcinek DNA o długości 146 par zasad, który jest najsilniej związany z oktamerem histonów (bez histonu H1) (Staroń 1996).

Badania krystalograficzne pozwoliły na dokładne odtworzenie struktury tej cząsteczki. Rdzeń nukleosomu przypomina dysk o średnicy 11nm i grubości 5,7 nm. DNA jest owinięty na zewnątrz oktameru histonowego, tworząc 1,8 obrotu lewoskrętnego superheliksu (Richmond i inni 1984; Staroń 1996). Kompletny oktamer histonowy ma budowę trójdzielną. Centralną jego część tworzy tetramer zbudowany z dwóch heterodimerów (H2A, H2B), które mają postać spłaszczonych sfer (rys 4).

Rysunek 4. Ułożenie histonów i DNA w nukleosomie (wg B. Lewin, *Genes V*, Oxford University Press, New York. 1994)

Płaszczyzna połączeń pomiędzy histonami w poszczególnych heterodimerach jest bardzo podobna i jest określana jako uścisk dłoni (Arents i inni 1991). Każdy histon rdzeniowy ma łańcuch N-końcowy, który wystaje poza DNA nukleosomalny oraz domeny C-końcowe, które uczestniczą w oddziaływaniach między histonowych wewnątrz nukleosomu. Natomiast histon H1, który ma około dwukrotnie większą masę cząsteczkową niż pozostałe histony jest usytuowany poza rdzeniem i przyłącza się do DNA nukleosomu w miejscu, w którym DNA „wchodzi” i „schodzi” z nukleosomu (Allan et al.1980)

Opisując dokładniej pozycję histonu H1 należy wspomnieć, że jest on białkiem trójdomenowym, którego cząsteczka ma środkową domenę globularną i dwie silnie zasadowe, nie zestrukturalizowane domeny: N- i C-końcową. Poza tym istnieją obecnie dwa modele opisujące ułożenie H1 w nukleosomie. Pierwsza (do tej pory powszechnie przyjmowana) zakłada, że domena globularna H1 wiąże się od strony zewnętrznej z obiema nićmi „chromosomowego” DNA w miejscu gdzie DNA wchodzi i schodzi z nukleosomu, stabilizując pozycje tych odcinków na powierzchni oktameru. Drugi model przedstawiony w 1996 roku przez A.Wolffego i E. Moundrianakisa zakłada, że histon H1 wiąże się z chromatosomalnym DNA (z dużą bruzdą) tylko w jednym miejscu, asymetrycznie w stosunku do osi symetrii nukleosomu, i jest umiejscowiony nie na zewnątrz, a od strony wewnętrznej DNA owijającego się wokół oktameru. C-końcowy fragment H1 miałby być ułożony wzdłuż podwójnej helisy linkerowego DNA i skierowany w stronę następnego nukleosomu. Spójność całego nukleosomu wynika ze specyficznego wiązania się histonów w heterodimery, oddziaływań typu białko-białko między heterodimerami, oddziaływań DNA z oktamerem oraz wiązania histonu H1 z DNA chromatosomalnym i (prawdopodobnie) z białkami oktameru (Wolffe 1994).

### 1.5.2. Budowa i rola histonu H1

Schemat budowy cząsteczki jest wspólny dla wszystkich histonów. Wszystkie histony są białkami zasadowymi, zawierają stosunkowo dużą liczbę lizyn i arginin. Zawartość tych aminokwasów jest zróżnicowana w zależności od histonu. Na przykład H1 jest bogaty w lizynę, natomiast H3 i H4, jako główny aminokwas zasadowy zawierają argininę. Wszystkie histony zawierają nadwyżkę aminokwasów zasadowych nad kwaśnymi, na skutek czego ich ładunek w fizjologicznym pH jest zawsze dodatni. Jednak najsilniej dodatnie są N-końce histonów (w przypadku histonu H1 także ogon C-końcowy). W części globularnej ładunki rozmieszczone są bardziej równomiernie. Jest to związane z różną funkcją tych domen (van Holde, 1989).

Histony należące do grupy H1 (łącznikowe) są częściowo związane z DNA pomiędzy cząsteczkami nukleosomów. Istnieje wiele wariantów histonów łącznikowych, nawet w obrębie jednego organizmu. Za pomocą analizy genetycznej polegającej na transkrypcji i translacji genów *in vitro*, analizy biochemicznej polegającej na wydzieleniu i mikrosekwencjonowaniu odpowiednich białek i analizy za pomocą specyficznych przeciwciał wykazano, że w roślinach tytoniu występuje 6 wariantów sekwencyjnych histonu H1: dwa warianty główne H1A i H1B oraz 4 warianty dodatkowe: H1C, H1D, H1E, H1F. Ponadto, ekspresując w tytoniu gen histonu H1B w odwrotnej orientacji, umieszczony pod kontrolą silnego, niespecyficznego promotora uzyskano rośliny transgeniczne, w których poziom wariantów głównych H1 został obniżony o 75%. Stwierdzono, że brak histonów H1A i H1B jest w roślinach transgenicznych kompensowany przez niemal równoważny wzrost zawartości wariantów dodatkowych. Zmiany morfologiczne i funkcjonalne w roślinach z obniżoną zawartością H1A i H1B przypominają zmiany charakterystyczne dla mutantów z cytoplazmatyczną męsko sterylnością (Prymakowska-Bosak 1999).

Wśród wielu funkcji histonu H1 wymienia się jego zdolność do stabilizacji struktury nukleosomu. Położenie H1 w stosunku do DNA powoduje, że kolejne nukleosomy ułożone są we włóknie w sposób zygzakowaty. Włókno to nazywane jest często „włóknom 10nm”, gdyż jego średnica zbliżona jest do średnicy nukleosomu. Ponadto w fizjologicznych warunkach jonowych włókno takie fałduje się spontanicznie w grubsze włókno o średnicy ok. 30nm. W stabilizacji włókna bierze udział histon H1 oraz N-końcowe zasadowe części histonów tworzących rdzeń nukleosomu. Chromatyna pozbawiona histonu H1 nie tworzy regularnego włókna 30nm. Te właściwości histonu H1 decydują prawdopodobnie o jego wpływie na regulację transkrypcji i replikacji.

Wykazano, że chromatyna aktywna transkrypcyjnie zawiera mniej histonów łącznikowych niż nieaktywna. Dlatego też H1 jest uważany za rodzaj ogólnego represora transkrypcji na poziomie inicjacji i elongacji łańcucha RNA (O'Neil 1995).

Najlepiej poznanym przykładem działania H1 jako represora specyficznego jest regulacja transkrypcji genów 5SRNA w trakcie rozwoju embrionalnego u *Xenopus levis*. W początkowych etapach rozwoju embrionalnego u *Xenopus* transkrypcji ulegają dwie rodziny genów 5SRNA: geny 5S typu oocytarnego i geny 5S typu somatycznego. Różnice pomiędzy oocytarnymi a somatycznymi genami 5SRNA dotyczą przede wszystkim sekwencji DNA, które otaczają te geny. Jak wiadomo po obu stronach genu oocytarnego znajdują się obszary bogate w pary AT, geny somatyczne otoczone są w sekwencje bogate w pary GC. W badaniach *in vitro* wykazano, że zamiana sekwencji otaczających tych genów powoduje represję przez H1 transkrypcji genu somatycznego i uwalnia od represji przez H1 transkrypcję genu oocytarnego. Wykazano doświadczalnie, że przyczyną takiego efektu H1 jest jego selektywne wiązanie się z sekwencjami AT-bogatymi, które stanowią naturalne otoczenie genu oocytarnego 5SRNA (Jerzmanowski i Cole 1990). Dalsze analizy wykazały istnienie charakterystycznych różnic w strukturze chromatyny badanych genów.

Tomaszewski i Jerzmanowski w badaniach *in vitro*, ustalili, że sekwencje bogate w AT otaczające oocytarne geny 5SRNA stanowią silny sygnał, który indukuje zależną od H1 reorganizację chromatyny w obszarze badanych genów. Wynikiem oddziaływania histonu H1 z sekwencjami bogatymi w AT jest zwiększenie odległości między nukleosomowej i częściowa stabilizacja rozmieszczenia nukleosomów. Pozycjonowane nukleosomy chronią gen oocytarnego 5SRNA i powodują represję jego transkrypcji w układzie *in vitro*. Podobny efekt histonu H1, nie występuje w przypadku rekonstytucji chromatyny zawierającej somatyczne geny 5SRNA, które pozbawione są bogatych w AT sekwencji oskrzydających (Tomaszewski 1997).

Poza tym, same oktamery histonowe mają pewną możliwość poruszania się wzdłuż DNA. Dlatego też mogą zajmować wiele pozycji translacyjnych w obrębie sekwencji genu 5SRNA. Jak wykazano doświadczalnie sekwencje w obrębie ruchliwych oktamerów histonowych są dostępne dla polimerazy III, ale obecność histonu łącznikowego ogranicza tę dostępność poprzez pozycjonowanie nukleosomu, co pociąga za sobą represję transkrypcji genu (Tomaszewski 1998)

Badania nad rolą histonu H1 w organizmach roślinnych i jego udziału w regulacji rozwoju zostały zapoczątkowane niedawno. Doświadczenia z nadekspresją H1 w roślinach tytoniu prowadziła Prymakowska-Bosak ze współpracownikami. W roślinach tych zaobserwowano: mniejszy wzrost w porównaniu z kontrolą oraz problemy z kwitnieniem i zawiązywaniem owoców (opadanie pąków kwiatowych, nie zawiązywanie owoców). Jeżeli zaś chodzi o obserwacje ultrastrukturalne to stwierdzono zwiększoną heterochromatynizację w jądrach komórek roślin z podwyższoną ekspresją histonu H1 w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Kolejne doświadczenia dotyczyły obniżenia ekspresji histonu H1 w chromatynie roślin tytoniu. Zaobserwowano zaburzenia w podziałach komórkowych (głównie mejozie) oraz występowanie mutacji homeotycznych w kwiatach.

Dogłębną analizę wpływu obniżonej ilości histonu H1 w roślinach tytoniu przeprowadził Lichota w 1999 z tego samego laboratorium. Jego badania dotyczyły wpływu obniżenia H1 na geny, które są odpowiedzialne za rozwój kwiatu w tytoniu.

Do analizy wybrano następujące geny:

- Tac 25 - gen aktywny ekspresjonowany specyficznym w ziarnach pyłku;
- Ta29 - gen ekspresjonowany w komórkach tapetum, kodujący białko bogate w glicynę.
- Nap 3 – jest homologiem genu Apetala 3 u *Arabidopsis thaliana* – jednego z głównych elementów regulacji rozwoju kwiatu, który jest wyrażany tylko w pręcikach i płatkach korony.

Analizie zostały poddane pąki kwiatowe w pierwszych czterech stadiach rozwoju oraz poszczególne elementy kwiatu. Otrzymano następujące wyniki:

- w roślinach z obniżoną ekspresją H1 zaobserwowano indukcję genu Ta29 już w 1 stadium rozwoju, w roślinach kontrolnych dopiero w 3 stadium, natomiast w dojrzałych kwiatach nie zaobserwowano sygnału ekspresji genu Ta29;
- jeżeli zaś chodzi o gen Tac25, to obniżenie ekspresji głównych wariantów histonu H1 nie wpłynęło na czasowy i przestrzenny wzór ekspresji charakterystyczny dla roślin kontrolnych. Zaobserwowano najwyższy poziom ekspresji genu w pręcikach dojrzałych kwiatach w obydwu rodzajach roślin, co jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę fakt, że gen ten jest specyficznym ekspresjonowany w pyłku;
- natomiast w przypadku genu Nap 3 zaobserwowano selektywny spadek ekspresji tego genu w stadium 3 i 4 rozwoju kwiatu w porównaniu z kontrolą. Wygaszenie to może być przyczyną mutacji homeotycznych, które pojawiają się ze zwiększoną częstością w roślinach z obniżoną ekspresją histonu H1 i dotyczą właśnie pręcików i płatków korony.

Jak wiadomo wzór ekspresji zależy od dostępności tkankowo specyficznych czynników transkrypcyjnych. Ponieważ w roślinach z obniżonym H1 zaobserwowano tylko zaburzenia czasowego wzoru ekspresji genów nap3 i Ta29 można przypuszczać, że histon H1 jest zaangażowany w specyficzne mechanizmy regulacyjne działające „ponad” czynnikami transkrypcyjnymi, np. przez blokowanie lub wzmacnianie transkrypcji w ich obecności (Lichota 1999).

## **2. Cel pracy**

Celem pracy było uzyskanie za pomocą trwałego zaburzenia w składzie wariantów histonu H1, roślin transgenicznych niezdolnych do rozmnażania.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Szczepy bakteryjne, bakteriofagi i wektory plazmidowe

#### 3.1.1. Stosowane szczepy bakteryjne

- Pochodne *Escherichia coli* K12  
DH5 $\alpha$
- Pochodne *Agrobacterium tumefaciens*:  
LBA4404: Rif<sup>r</sup> (Ooms *i inni.*, 1982)

#### 3.1.2. Wektory plazmidowe

- pROK2 (Bevan, 1984).
- pFF 19 (Timmermans *i inni.*, 1990)
- pBluescript (pBI) [Stratagene].

### 3.2. Materiał roślinny

Do transformacji za pomocą *A. tumefaciens* wykorzystywano rośliny *Nicotiana tabacum* odmiany Petit Havana SRI (Maliga *i inni.*, 1973)

### 3.3. Podłoża do hodowli bakterii i roślin, stosowane antybiotyki i hormony roślinne

#### 3.3.1. Podłoża do hodowli bakterii

Do hodowli bakteryjnych używano następujących podłoży:

- LB(Luria – Bertani)  
bacto-trypton 10g/lm  
ekstrakt bakto-drożdżowy 10g/l  
NaCl 10g/l  
pH-7,0 (Ausubel *i in.*, 1987),
- pożywka YEB  
(ekstrakt wołowy 5 g/l  
ekstrakt drożdżowy 5 g/l  
pepton 5 g/l  
sacharoza 5 g/l  
2mM MgSO<sub>4</sub>  
pH- 7,2 (Legocki *i inni.*, 1990)

Po autoklawowaniu, jeżeli było to konieczne, dodawano następujące antybiotyki: ampicylina (50 mg/ml), kanamycyna (50-100 mg/ml), rifampicyna (50-100 mg/ml).

### **3.3.2. Podłoża do hodowli roślin**

#### **A. MS- według Murashige-Skooge'a (1962)**

- Makroelementy MS 10 x stężone (g/l)

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.5
$\text{KNO}_3$	19.0
$\text{MgSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	3.7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	4.4

- Mikroelementy MS 1000 x stężone (mg/100ml)

$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2230
KI	83
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	860
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{H}_3\text{BO}_3$	620
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	25

- Witaminy MS 1000 x stężone (mg/100ml)

kwask nikotynowy	50
pirydoksyna	50
tiamina	10

Roztwory przechowywano zamrożone w  $-20^\circ\text{C}$ .

- Fe-EDTA 100 x stężone (g/l)

Fe-EDTA	4.3
---------	-----

Przechowywano w ciemnej butelce w  $4^\circ\text{C}$ .

**Podłoże MS**

1x sole MS

1x witaminy MS

1x Fe-EDTA

myo-inozytol 100 mg/l

MES 0.5 g/l

sacharoza 10 g/l

pH 5.7 doprowadzane 1N KOH

agar 8 g/l (dla pożywki stałej)

**Podłoże MST**

1x sole MS

1x witaminy MS

1x Fe-EDTA

myo-inozytol 100 mg/l

MES 0.5 g/l

sacharoza 30 g/l

NAA (kwas 3-naftylooctowy) 0.1 mg/l

BAP (6-benzyloaminopuryna) 1.0 mg/l

pH 5.7 (doprowadzane 1N KOH)

agar 8 g/l ( dla pożywki stałej)

Pożywki poddawano sterylizacji w autoklawie w temp. 120°C, przy ciśnieniu 1,0 atm. przez 15 minut, po schłodzeniu pożywek dodawano antybiotyki kanamycynę w ilości 100 mg/l, cłaforan- 500mg/l.

**3.3.3. Roztwory hormonów**

1. Auksyny: NAA rozpuszczano w 2-3 ml etanolu i dopełniano wodą destylowaną, do 100 ml, lub zawieszano w DMSO i sterylizowano przez filtrowanie.
2. Cytokininy: BAP rozpuszczano w 1 ml 0.5 M HCl i delikatnie podgrzewając dopełniano wodą destylowaną do 100 ml.

**3.4. Transformacja bakterii**

Transformację komórek *E.coli* wykonywano za pomocą  $\text{CaCl}_2$  (Maniatis *i inni*, 1990). Selekcję transformantów przeprowadzono na podłożach pełnych z odpowiednimi antybiotykami.

Transformację komórek *A. tumefaciens* prowadzono metodą elektroporacji opisaną przez producenta aparatu do elektroporacji (Bio-Rad). Selekcję transformantów prowadzono tak jak w przypadku transformacji *E. coli*.

### **3.5. Transformacja i regeneracja tytoniu (wg. Horsch 1986)**

#### **3.5.1. Sterylizacja nasion tytoniu (wg. Valvekensa 1988 i Iwkiewiczza 1993)**

Nasiona umieszczano w 70 % etanolu. Po 2 minutach sterylną pipetą usuwano etanol, a do nasion dodawano 5% wody Javell'a (Eao de Javel, Yplon, Belgia) -rodzaj bielinki (ang. comercial bleach), 0.05% Tween 20 i pozostawiano na 15 minut. W tym czasie nasiona regularnie i delikatnie mieszano. Następnie przemywano je 5 razy sterylną wodą. Tak przygotowane sterylne nasiona wysiewano na odpowiednie pożywki.

#### **3.5.2. Transformacja 2-3 tygodniowych siewek tytoniu**

**Przygotowanie bakterii:** Z hodowli nocnej *Agrobacterium* (w pożywce YEB z dodatkiem odpowiednich antybiotyków), prowadzonej w temperaturze 28°C, zaszczepiano 30 ml pożywki YEB, zawierającej rifampicynę i kanamycynę. Hodowlę prowadzono przez noc w temperaturze 28°C z intensywnym wytrząsaniem. Bakterie odwirowywano przez 10 min przy 5000 obr/min. Osad bakterii zawieszano w 20 ml 10mM MgSO<sub>4</sub> i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Następnie płukanie powtarzano jeszcze dwa razy. Końcowy osad bakterii zawieszano w 20 ml 10mM MgSO<sub>4</sub>.

Siewki tytoniu w wieku 2-3 tygodni, hodowane na sterylnej zwilżonej wodą bibule przenoszono do sterylnej zakręcanej probówki o pojemności 15 ml, zalewano wcześniej przygotowanymi bakteriami i mieszano nie dopuszczając do powstania bąbli powietrza.

Probówki z siewkami zanurzonymi w zawieszynie bakteryjnej umieszczano w sterylnym eksykatorze i inkubowano pod próżnią przez 5-10 min. Rośliny odsączano od bakterii na sterylnej bibule, a następnie rozkładano na szalce z pożywką MST. Kokultywację prowadzono przez 3 dni w 26°C (fotoperiod 16h). Po 3 dniach rośliny przenoszono na pożywkę MST z dodatkiem antybiotyków (claforan 500mg/l, kanamycyna 100 mg/l). Hodowlę prowadzono w warunkach podanych wyżej. Eksplantaty przenoszono na nowe podłoże co około 7 dni. Regenerujące pędy o długości około 1 cm odcinano od kalusa i przekładano na podłoże MS z kanamycyną. Po ukorzenieniu, rośliny przenoszono do ziemi.

### **3.6. Izolacja DNA**

#### **6.1. Izolacja DNA plazmidowego z *E.coli***

DNA plazmidów izolowano zmodyfikowaną metodą lizy alkalicznej (Birnboim i Doly, 1979). Nocną hodowlę bakteryjną wirowano w mikrowirówce, a następnie zawieszano w 100 µl roztworu GTE (50mM glukoza, 10mM Tris-HCl pH 8.0 i 1mM EDTA) i dodawano 5 µl RNA-azy A o stężeniu 10mg/ml. Po całkowitym zawieszeniu bakterii prowadzono lizę komórek w 200 µl roztworu alkalicznego SDS (200mM NaOH i 1% SDS) przez 5 minut w lodzie, a następnie dodawano 150 µl

7.5M octanu amonu. Po energicznym zmieszaniu inkubowano mieszaninę przez dalsze 10 minut w lodzie, a następnie wirowano przez 5-15 minut w mikrowirówce. Do zebranego supernatantu dodawano 900 µl etanolu w celu wytrącenia DNA. Wytrącony DNA plazmidowy osadzano na dnie próbówki przez wirowanie w mikrowirówce, płukano w 70% etanolu, a następnie suszono i zawieszano w wodzie.

### **3.6.2. Izolacja DNA plazmidowego z *A. tumefaciens***

DNA plazmidowy, podobnie jak w przypadku komórek *E. coli* izolowano za pomocą lizy alkalicznej stosując jedynie dodatkowo wstępne płukanie bakterii w 0.1% sarkozylu.

### **3.6.3. Izolacja DNA chromosomalnego z roślin**

DNA z tkanki roślinnej izolowano metodą opisaną przez Doyle i Doyle (1987). Do homogenizacji brano 1 gram świeżych liści lub zamrożonych wcześniej w ciekłym azocie i przechowywanych w - 70°C. Materiał roślinny zamrożony w ciekłym azocie ucierano w móżdżerku. Następnie dodawano 5 ml podgrzanego do 60°C buforu do ekstrakcji DNA [100mM Tris-HCl, pH8.0, 1.4M NaCl, 20 mM EDTA, 2% bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) i 0.2% b-merkaptioetanol] oraz 10ml RNA-azyA o stężeniu 10mg/ml. Próbkę inkubowano w 60°C przez 30 minut. Następnie do schłodzonej do temperatury pokojowej mieszaniny dodawano jednakową objętość chloroformu z alkoholem izoamylowym (24:1) i prowadzono ekstrakcję delikatnie mieszając przez 15 minut. Po 15 minutowym wirowaniu przy 10000 obr./min. w rotorze SS34 (wirówka Sorval), zbierano fazę wodną do świeżych próbek i dodawano 2/3 objętości zimnego izopropanolu, wytrącając DNA. Wytrącony DNA zbierano za pomocą kapilary, przenoszono do próbek Eppendorfa i płukano zimną mieszaniną 70% etanolu i 10mM octanu amonu przez 20 minut, a następnie czystym 70% etanolem, suszono i zawieszano w TE.

## **3.7. Rekombinacja DNA *in vitro***

### **3.7.1 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi**

Wszystkie trawienia za pomocą enzymów restrykcyjnych prowadzono w warunkach (ilość trawionego DNA, skład buforu do trawienia, temperatura i czas trwania reakcji oraz ilość enzymu) opisanych przez producenta enzymu lub w warunkach standardowych opisanych przez Maniatisa i innych (1990).

W przypadku, gdy enzym ulegał termicznej inaktywacji, w celu zatrzymania reakcji mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 10-15 minut w temperaturze 65°C. W pozostałych przypadkach enzym inaktywowano za pomocą fenolowania. (Maniatis *i inni*, 1990)

### 3.7.2. Subklonowanie fragmentów DNA

Fragmenty DNA i wektory przygotowywano do klonowania trawiąc je odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi a także, o ile to było konieczne, inkubując je z enzymami modyfikującymi struktury końców otrzymywanych fragmentów restrykcyjnych (np: z T4 DNA polimerazą lub fragmentem Klenowa polimerazy I), według procedur opisanych przez Ausubel'a i innych (1987). Fragmenty DNA ligowano za pomocą T4 DNA ligazy w warunkach opisywanych przez producenta enzymu, lub w warunkach standardowych (Ausubel *i inni*, 1987).

### 3.8. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Rozdzielanie fragmentów DNA prowadzono w 0.8 % żelach agarozowych pod napięciem 5-10 V/cm w buforze do elektroforezy o składzie: 90 mM Tris-HCl (pH8,0), 90 mM kwas borny, 2.5 mM EDTA pH8.3 (TBE). Do nanoszenia próbek stosowano 30% roztwor glicerolu z barwnikami (0.25% cjanoksylen, 0.25% błękit bromofenolowy). W celu detekcji kwasów nukleinowych dodawano do żeli bromek etydyny (1mg/ml) i oglądano żele w świetle UV (Maniatis *i inni*, 1990).

### 3.9. Izolacja DNA z żeli agarozowych

Fragmenty DNA z żeli agarozowych izolowano metodą elektroelucji do woreczków dializacyjnych (Maniatis *i inni*, 1990) oraz metodą elektroforetycznego wpędzania na filtry wykonane z DE-AE-celulozy (Maniatis *i inni*, 1990).

Stosowano także zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych firmy Biorad. DNA izolowano zgodnie z zaleceniami producenta.

**Stosowane skróty:** CTAB – bromek cetylotrimetyloamoniowy, EDTA – kwas etylenodiamini-tetraoctowy, SDS – sól sodowa siarczanu dodecylu, GS 3, GSA, SS-34 – typy rotorów do wirówki Sorvall (Du Pont).

### 3.10. Analiza hybrydacyjna DNA

#### 3.10.1. Transfer DNA z żeli agarozowych na membrany nylonowe

W celu depurynacji DNA, po elektroforezie, żel inkubowano w 0.25M HCl do czasu zmiany kolorów barwników do elektroforezy. Następnie żel płukano wodą i inkubowano dwukrotnie przez 30 minut lub do momentu przywrócenia kolorów barwników, w buforze do denaturacji DNA (1.5M NaCl, 0.5M NaOH). Po przepłukaniu żelu w wodzie destylowanej DNA renaturowano przez 40 minut w roztworze 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7.2 i 1mM EDTA (Maniatis *i inni*, 1990). Transfer DNA z żelu na membranę Hybond-N prowadzono według przepisu podanego przez producenta membrany.

### 3.10.2. Hybrydyzacja

#### Hybrydyzacja DNA/DNA

Jako sond do hybrydyzacji używano denaturowanych przez 10 min. w 100°C znakowanych izotopem fragmentów DNA. Sondy hybrydyzowano do DNA związanego na filtrach nylonowych w 5-10ml roztworu o składzie 5x SSC, 5x roztwór Denhardta, 0.5% SDS oraz 20-40\*g/ml sonifikowanego DNA z grasicy cielęcej, w temp. 65°C przez noc. Po hybrydyzacji filtry płukano przez 20 min. w temperaturze pokojowej w roztworze 2x SSC, 0.1% SDS, następnie przez 20 min. w temp. 65°C w roztworze 1x SSC, 0.1% SDS oraz dwukrotnie przez 20 min. w temp. 65°C w roztworze 0.1x SSC, 0.1% SDS. Po hybrydyzacji filtry poddawano autoradiografii.

### 3.11. Preparatyka białek

#### 3.11.1. Preparatyka całkowitych histonów z tkanek roślinnych

Zastosowano tu technikę ekstrakcji histonów z otrzymanej uprzednio chromatyny metodą opisaną przez Moehsa i wsp. (Moehs i inni, 1988), będącą zmodyfikowaną wersją wcześniej opracowanej metody izolacji histonów z roślin (Simon & Becker, 1976; Spiker, 1982). Fragmenty liści o masie 3g pozbawione unerwienia, homogenizowano w homogenizatorze (Waring blender) w 200ml buforu zawierającego 0.4M sacharozę, 10mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM 2-merkapt-etanol. Homogenat sączono przez 4 warstwy gazy i 2 warstwy Miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), a następnie wirowano w rotorze GS 3 (Sorvall) przy 10000 obr/min przez 10min w temp. 2°C. Supernatant odrzucano, zaś osad zawieszano (w homogenizatorze) w roztworze o składzie: 0.25 sacharoza, 10mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 5mM 2-merkapt-etanol i zwirowywano jak poprzednio. Następnie osad chromatyny poddawano ekstrakcji rozcieńczonym kwasem siarkowym (metoda skrócona). Osad zawieszano w 15 ml 0.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w homogenizatorze Pottera-Elvehjema (Wheaton, USA). Próbkę pozostawiano do ekstrakcji przez 2 godz. w chłodni na mieszadle magnetycznym, po czym zwirowywano przez 15min. w rotorze SS-34 przy 18000 obr/min. Osad odrzucono, a wyekstrahowane białka wytrącano przez dodanie 3.5 objętości zimnego acetonu i pozostawienie przez kilka godzin lub całą noc na mieszadle magnetycznym. Osad zwirowano (SS-34, 30min., 18500obr/min), suszono do sucha zimnym powietrzem i rozpuszczano w małej ilości (0.8 ml) wody.

W celu doczyszczenia preparatu, próbkę dializowano wobec 1l wody przez 1.5 godziny. Następnie preparat zateżano w wirówce próżniowej do objętości ok. 150-200ml.

Próbkę zamrażano i przechowywano w -20°C.

Wszystkie czynności wykonywano w temp. 4°C. Do wszystkich roztworów dodawano PMSF w stężeniu 0.1mM.

### **3.11.2. Preparatyka histonu H1 z tkanki liściowej (Mazzolini i inni, 1989)**

Liście pozbawione unerwienia ucierano na proszek w ciekłym azocie. Utarty materiał zalewano zimnym 5% PCA, w stosunku 2-3ml na gram zamrożonej tkanki. Ekstrakcję przeprowadzano mieszając przygotowany materiał w chłodni przez około 10 godzin. Całość zwirowywano w rotorze GSA przy 10000 obr/min przez 10 min. Zebrany supernatant ponownie wirowano w tych samych warunkach, a następnie filtrowano go przez 2 warstwy Miracloth. Do roztworu dodawano 50 lub 100% (w/v) kwas trichlorooctowy (TCA) tak, aby stężenie końcowe TCA wynosiło 18%. Białko zwirowywano przy prędkości 12500 obr/min w rotorze GSA przez 40 min. Osad zawieszano w około 3 ml wody i dializowano wobec wody zawierającej 0.1mM PMSF przez 5 godzin, a następnie zatężano w wirówce próżniowej. Preparat przechowywano w -20°C.

## **3.12. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym**

### **3.12.1. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w układzie kwas octowy-mocznik**

Rozdział białek w elektroforezie kwas octowy-mocznik zależy nie tylko od masy (tak, jak w SDS PAGE), ale i od ładunku białka. W niniejszej pracy zastosowano zmodyfikowaną wersję elektroforezy (Spiker, 1980; Hames & Rickwood, 1981).

Stosowano 15% żel rozdzielający zawierający 0.9M kwas octowy i 2.5M mocznik (pH 2.7) oraz 7.5% żel zatężający z 2.5M mocznikiem i 0.375M octanem potasu o pH 4.0. Jako bufor do elektroforezy stosowano 0.9N kwas octowy, zaś bufor do nakładania próbek miał skład: 30% sacharoza, 0.375 M octan potasu pH 4.0, 0.1% pyronina Y (barwnik). Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 200V przez ok. 5 godzin. Po wylaniu żelu rozdzielającego, a przed wylaniem żelu zatężającego, prowadzono preelektroforezę przy 200V przez co najmniej 2 godziny.

Barwienia żeli - identycznie, jak po SDS PAGE.

### **3.13. Sprzęt laboratoryjny:**

- standardowe wyposażenie pracowni biologii molekularnej
- wirówka Sorvall® RC- 5B (Du-Point)
- Komora do hodowli roślin

### **3.14. Programy komputerowe:**

- Microsoft Word
- Microsoft Excell
- Corel Draw 6.0
- Adobe Photoshop 5.0
- Netscape Communicator
- Adobe Page Maker 6.5

## 4. Wyniki

### 4.1. Konstrukcja wektora do transformacji siewek tytoniu.

**Wektor** – jest to cząsteczka DNA mogąca być nośnikiem interesującego nas odcinka genomu, która posiada zdolność do autonomicznej replikacji w danym typie komórek. Umożliwia powielanie wprowadzonego fragmentu DNA, czyli jego klonowanie, a czasami także wydajną syntezę kodowanego przez te fragmenty białka (transkrypcję i translację).

Nie istnieje uniwersalny wektor do wszystkich rodzajów komórek. Różnice w przebiegu procesów replikacji, transkrypcji i translacji między *Prokaryota* a *Eukaryota*, a także między różnymi gatunkami należącymi do każdej z tych dwóch klas organizmów, zmuszają do dobierania wektorów w zależności od tego, w jakich komórkach zamierzamy klonować dany gen.

Najważniejszym elementem warunkującym specyficzność wektora są sekwencje odpowiedzialne za inicjację replikacji tzw. sekwencje *ori* (ang. origin). Najprostsze wektory posiadają wyłącznie jedno, unikalne miejsce restrykcyjne, w które można wprowadzić obcy DNA. Obecnie najczęściej jest to tzw. polilinker – syntetyczny odcinek DNA, w którym znajduje się zwykle kilkanaście miejsc rozpoznawanych przez różne restryktazy.

Poza tym wektory posiadają zwykle geny markerowe, czyli geny odpowiedzialne za łatwo wyróżnialne cechy fenotypowe, jak np. oporność na antybiotyki, czy też zdolność do syntezy łatwo wykrywalnego enzymu (np.  $\beta$ -galaktozydaza lub acetylaza chloramfenikolu). Wektor musi być tak skonstruowany aby istniała możliwość selekcji tych komórek, do których wniknął (Encyklopedia multimedialna 1999).

W przypadku roślin wykorzystuje się pochodne tych nielicznych wirusów roślinnych, których materiałem genetycznym jest DNA. Przykładem takiego wirusa jest wirus mozaiki kalafiora. Jednak najczęściej stosowanym wektorem jest pochodzący z *Agrobacterium tumefaciens* plazmid *Ti* (omówiony już wcześniej).

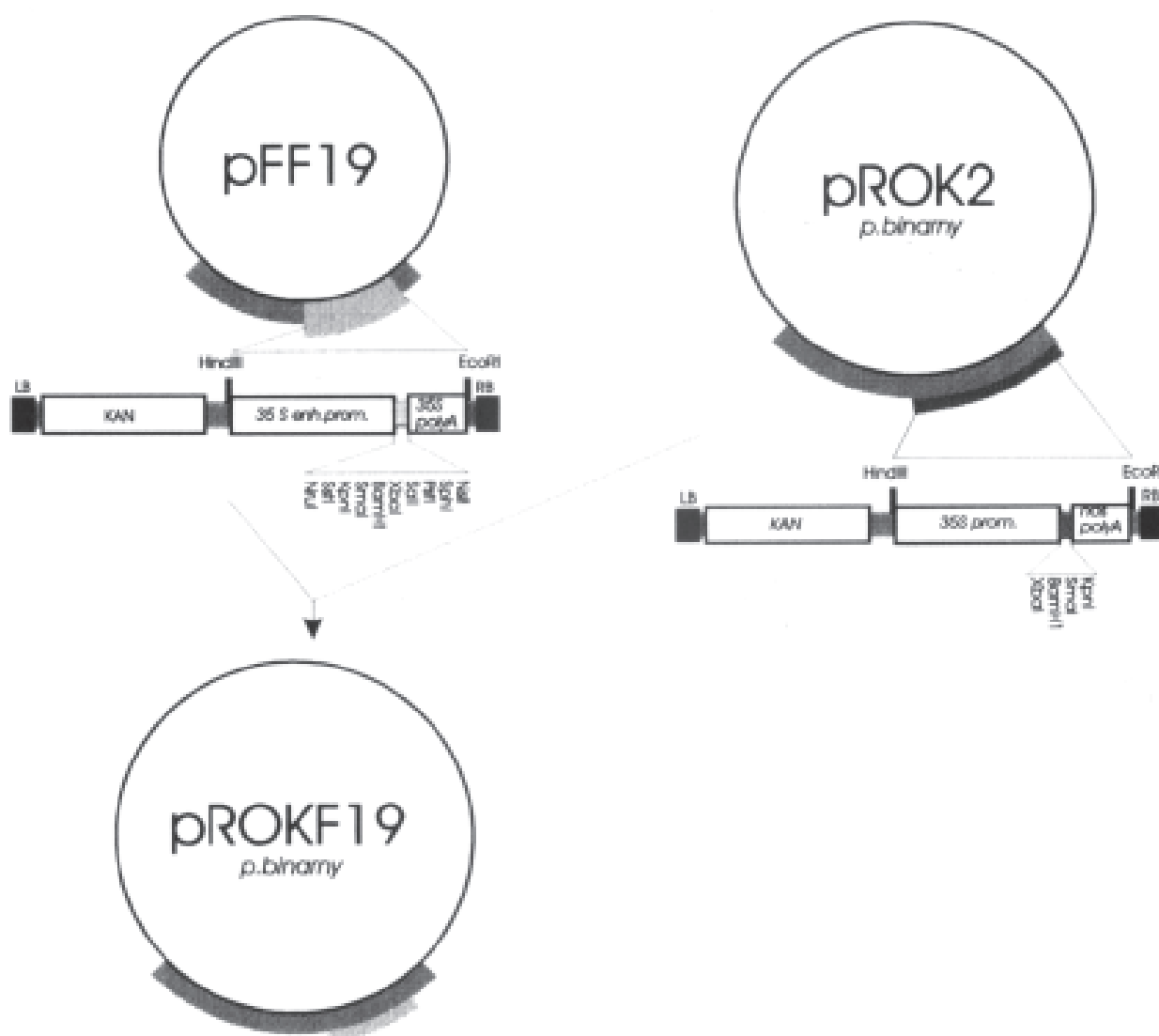
W przedstawionej pracy do transformacji roślin posłużyły dwa konstrukty: pROKF19 stosowany jako kontrola oraz pROKFH1ta zawierający właściwy transgen.

Plazmid pROKF19 został skonstruowany przez dr M. Prymakowską-Bosak. Do jego konstrukcji posłużył binarny plazmid pROK2. Plazmid ten zawiera w obszarze T-DNA marker selekcyjny w postaci kasy oporności na kanamycynę oraz dogodny polilinker zawarty pomiędzy promoto-

rem 35S RNA wirusa mozaiki kalafiora (ang. cauliflower mosaic virus – CaMV) a sekwencją terminatora syntazy nopalinowej (Bevan, 1985).

Aby uzyskać wyższy poziom ekspresji w plazmidzie pROK2, w miejsce kasety zawierającej promotor 35S CaMV oraz terminator nopalinowy wprowadzono fragment DNA pochodzący z plazmidu pFF19 zawierający zawężony promotor 35S CaMV wraz z tzw. enhanserem, tj. sekwencją wzmagającą siłę promotora, bardzo dogodny polilinker oraz terminator 35S CaMV (rys.1). Według autorów plazmidu pFF19, zmodyfikowany promotor 35S CaMV wraz z enhanserem daje około dziesięciokrotnie wyższy poziom ekspresji genu niż sam promotor 35S CaMV.

Rycina nr 1. Konstrukcja plazmidu pROKF19



1. Plazmid pFF19 z promotorem 35ScaMV, enhanser i terminator 35S.

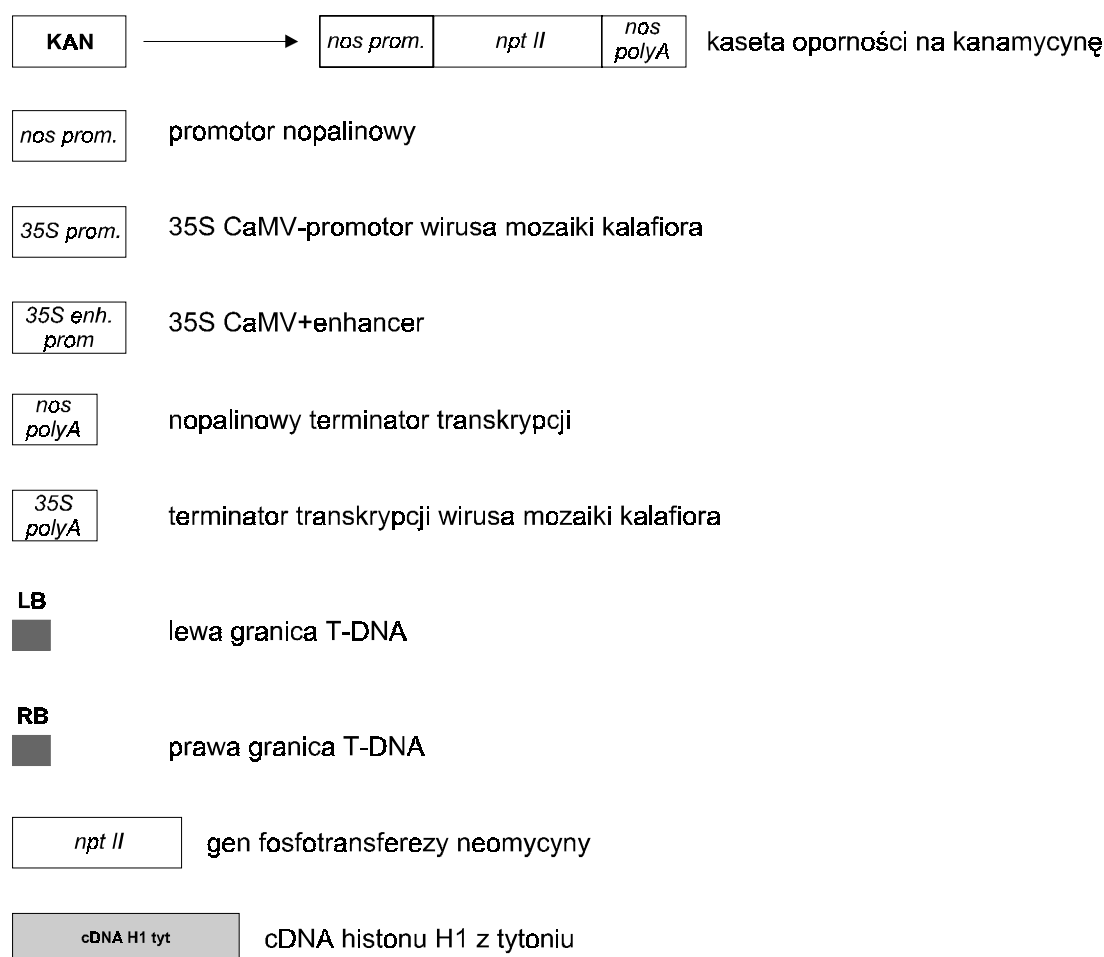
2. Plazmid pROK2 służący do transformacji roślin, zawiera promotor 35ScaMV oraz nopalinowy terminator transkrypcji.

3. Plazmid pROKF19 powstał w wyniku przeniesienia obszaru promotora 35ScaMV z enhanserem i terminatorem transkrypcji 35S do plazmidu pROK2, w miejsce promotora 35ScaMV, oraz nopalinowego terminatora transkrypcji.

Konstrukcja plazmidu binarnego zawierającego cDNA histonu H1 z tytoniu w orientacji „antsens”.

W celu obniżenia poziomu natywnego histonu H1 w tytoniu skonstruowano plazmid pROKFH1ta zawierający cDNA histonu H1 w orientacji odwróconej („anty-sens”).

Rycina nr 2. Plazmid zawierający cDNA histonu H1 z tytoniu w orientacji „antsens” (strzałką oznaczono orientację wstawki)



## 4.2. Regeneracja roślin

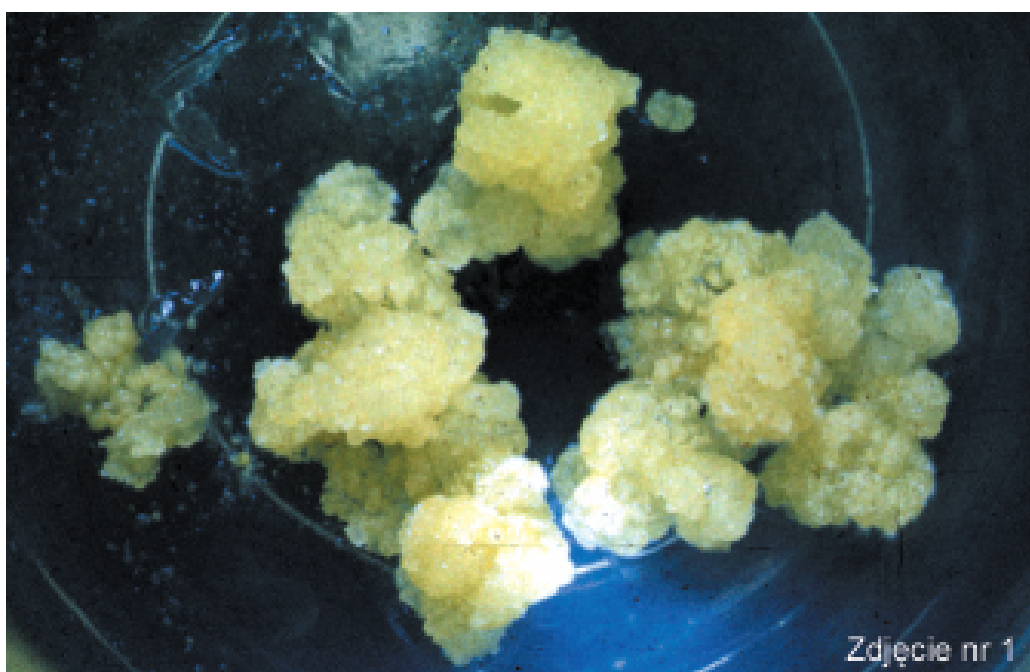
Do transformacji użyto 2 tygodniowych siewek roślin tytoniu (*Nicotiana tabacum* „Petit Havana” SR1). Bezpośrednio po transformacji rośliny zostały wyłożone na szalki z pożywką MST bez antybiotyków. Kokultywację prowadzono przez 3 dni w 26°C (fotoperiod 16h) w specjalnej komorze do hodowli roślin. Po tym czasie roślinki przenoszono na pożywkę o takim samym składzie lecz z dodatkiem antybiotyków (kanamycyna 100mg/l i claforan 500mg/l). Kanamycyna to antybiotyk pozwalający na identyfikację roślin transgenicznych, claforan natomiast to antybiotyk hamujący wzrost *Agrobacterium*.

Następnie regenerację prowadzono przez około 3 miesiące przenosząc rośliny co 10 dni na nową pożywkę.

Po upływie pierwszych 8-10 dni na transformowanych siewkach zaczął pojawiać się kalus.

Kalus to niezróżnicowana tkanka powstająca w miejscu zranienia rośliny i rosnąca w postaci mniej lub bardziej zwartej grudki o nieregularnych kształtach, co pokazuje zdjęcie nr 1.

Z takiej tkanki kalusowej dzięki obecności w podłożu odpowiednich hormonów następuje regeneracja nowej rośliny.



Po upływie kolejnych 10 dni zaobserwowano regenerację pierwszych roślin z kalusa jak na fotografii nr 2. W momencie gdy regenerujący pęd osiągał odpowiednią wielkość był odcinany przy pomocy skalpela i przenoszony na pożywkę MS z dodatkiem kanamycyny w stężeniu 100mg/l. Na tym podłożu rośliny przebywały do momentu ukorzenienia się.



Po ukorzeniu się rośliny, przenoszono do ziemi i prowadzono dalej hodowlę w warunkach szklarniowych (zdjęcie nr4)



W takich warunkach rośliny hodowano do osiągnięcia pełnego wzrostu w celu obejrzenia ich fenotypów. Tak samo postępowano roślinami zawierającymi właściwy transgen oraz z roślinami kontrolnymi.

### 4.3. Analiza fenotypu roślin tytoniu uzyskanych po transformacji plazmidem pROKFH1ta w porównaniu z roślinami kontrolnymi pROKF19

Do roślin tytoniu wprowadzono plazmid pROKFH1ta, który zawiera cDNA tytoniowego białka histonu H1 w orientacji „antysens” pod kontrolą promotora 35ScaMV z enhanserem. Transformację przeprowadzono przy pomocy *Agrobacterium* w celu uzyskania roślin z obniżoną zawartością tego białka. Po regeneracji uzyskano 30 roślin opornych na kanamycynę. U wszystkich zregenerowanych roślin zaobserwowano zmiany fenotypowe. Należy tu nadmienić, że podobne wyniki uzyskano przy czterech niezależnych transformacjach przeprowadzonych przy użyciu tego samego konstruktów. Również w pozostałych doświadczeniach ponad 90% roślin wykazywało zmiany fenotypowe (Prymakowska-Bosak i inni 1999).

Transformacja plazmidem pROKF19 pozwoliła na uzyskanie 30 roślin kontrolnych, których fenotyp był identyczny jak u dzikich roślin tytoniu (tabela nr 2).

Tabela nr 2. Transformacja siewek tytoniu via *Agrobacterium* plazmidami pROKFH1ta i pROKF19

<b>plazmid binarny wprowadzony do roślin</b>	<b>liczba zregenerowanych roślin opornych na kanamycynę</b>
pROKFH1ta	30
PROKF19	30

Jak przedstawiają poniższe zdjęcia rośliny zregenerowane po transformacji plazmidem pROKFH1ta wykazywały w stosunku do roślin kontrolnych (pROKF19) znaczne różnice fenotypowe.



Zdjęcie nr 5



Zdjęcie nr 6

Zdjęcie nr 5. Rośliny kontrolne transformowane plazmidem pRF19 o fenotypie roślin dzikiego tytoniu. Charakteryzują się jednym pędem głównym z kwiatostanem na szczycie. Żółta miarka na zdjęciu ma długość 1m.

Zdjęcie nr 6 Rośliny uzyskane po transformacji plazmidem pROKFH1ta. Są niższe od roślin kontrolnych, mają mniejsze liście niż kontrola i u większości brak dominacji pędu głównego.



Zdjęcie nr 7 Kwiaty kontrolnej rośliny tytoniu, znamiona słupka i pylniki są na tej samej wysokości. Na pędzie widoczne są zawiązki owoców.



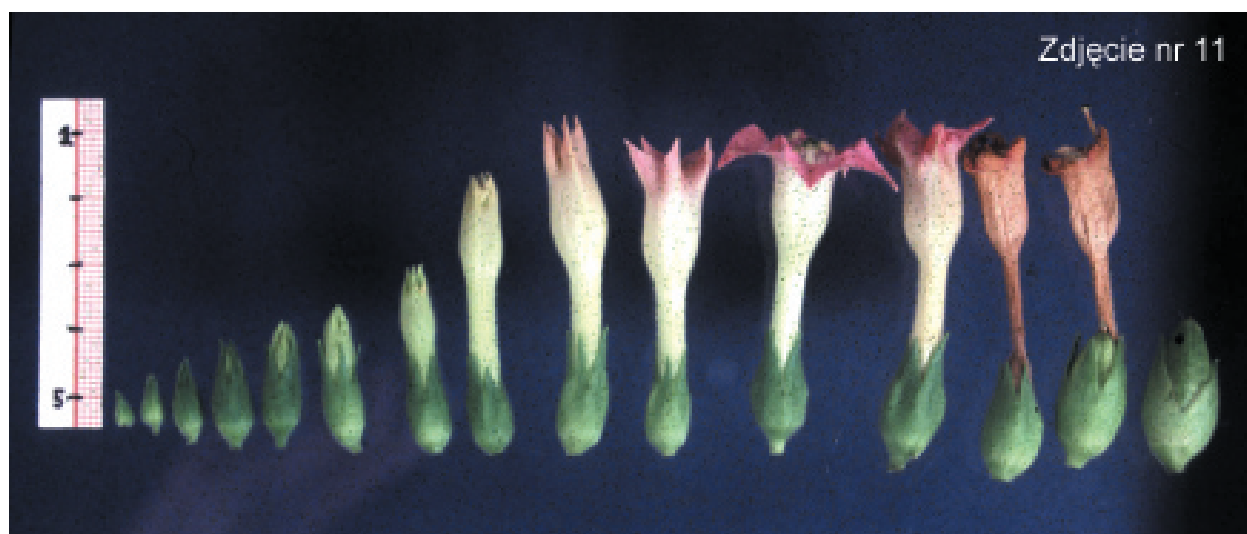
Zdjęcie nr 8 Zmienione fenotypowo kwiaty roślin po transformacji plazmidem pROKFH1ta. We wszystkich kwiatach znamię słupka wystaje ponad koronę kwiatu, pylniki są głęboko ukryte w koronie.



Zdjęcie nr 9. Porównanie kwiatu kontrolnego i transformowanego pROKFH1ta. Widoczna jest różnica w położeniu znamienia słupka w stosunku do pylników (heterostylia).



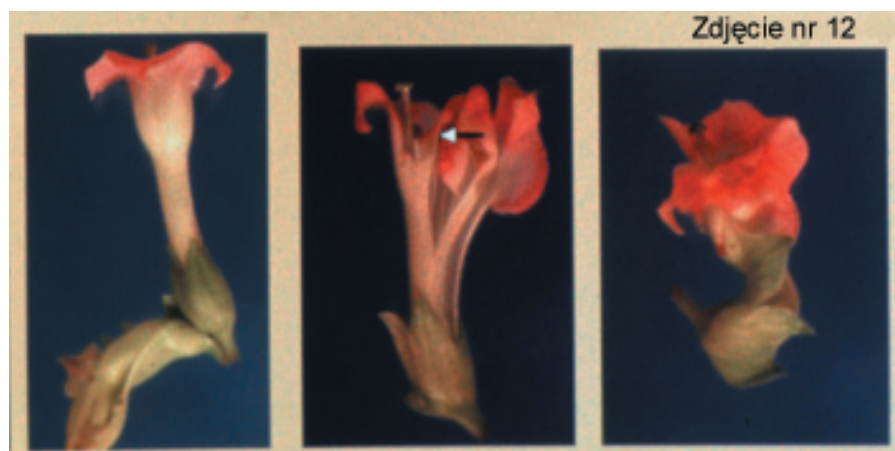
Zdjęcie nr 10. Stadia rozwoju kwiatu u rośliny zmienionej fenotypowo transformowanej plazmidem pROKFH1ta. Znamię słupka wystaje ponad koronę kwiatową, owoc się nie zawiązuje i kwiat usycha.



Zdjęcie nr 11. Stadia rozwoju kwiatu u rośliny kontrolnej aż do stadium owocu.

Wszystkie rośliny kontrolne miały pokrój taki sam jak rośliny tytoniu dzikiego. Charakterystyczną cechą tych roślin jest występowanie jednego pędu głównego na wierzchołku którego tworzy się kwiatostan (zdjęcie nr 5). Natomiast u roślin transformowanych pROKFH1ta zaobserwowano zmniejszoną dominację pędu głównego, co objawiało się niższym wzrostem i krzaczastym pokrojem roślin (zdjęcie nr 6). Wyraźniejsze zmiany obserwowano jeśli chodzi o rozwój kwiatu i tworzenie się owoców. Rośliny z transgenem nie tworzyły owoców, a ich kwiaty usychały na pędzie kwiatowym (zdjęcie nr 9, 10, 11). Zmiany w kwiecie polegały na niewielkim wydłużeniu szyjki słupek i znacznym skróceniu nitek pręcików, co doprowadziło do heterostylii i uniemożliwiło samozapylenie, a co za tym idzie wytworzenie owoców. W związku z brakiem zawiązywania owoców a więc i brakiem nasion z roślin transgenicznych uzyskano tytoń nie zdolny do rozmnażania.

Poza niezdolnością do wytwarzania owoców ze względu na nieprawidłowość budowy kwiatu obserwowano inne anomalie jeśli chodzi o tę budowę. Niektóre kwiaty roślin RFHta oprócz heterostylii charakteryzowały się mutacjami homeotycznymi polegającymi na deformacji płatków korony i pręcików i przekształcaniu się jednych części kwiatu w drugie (zdjęcie nr 12).



*Strzałka pokazuje płatek korony przekształcony w pręcik*

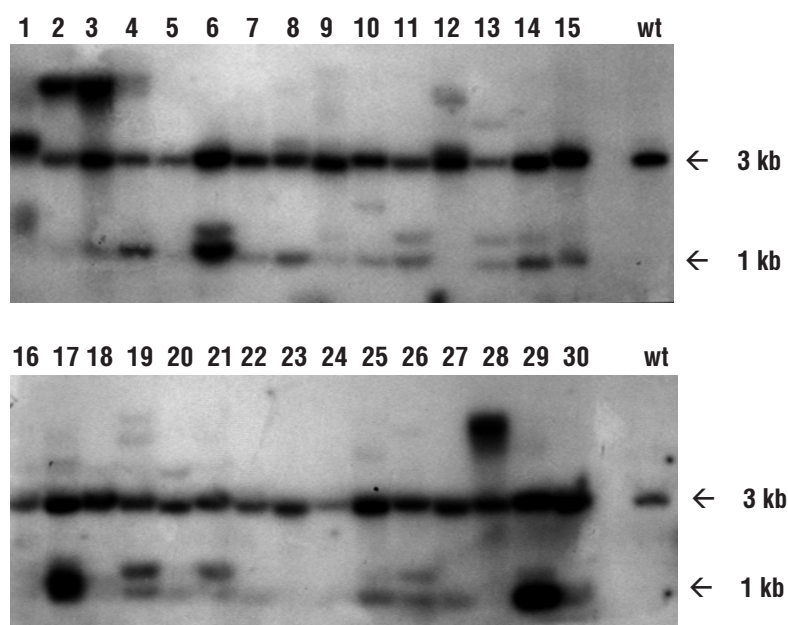
#### **4.4. Analiza molekularna roślin tytoniu uzyskanych po transformacji plazmidem pROKFH1ta.**

##### **4.4.1. Analiza hybrydyzacyjna typu Southern – sprawdzenie obecności transgenu**

W celu wykrycia obecności transgenu wyizolowano całkowity DNA z roślin transformowanych plazmidem pROKFH1ta. Następnie DNA poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym EcoRI i hybrydyzacji z sondą, którą stanowił cDNA tytoniowego histonu H1 znakowany izotopowo. Tak przygotowana sonda wykrywała dwa fragmenty: 1) o długości 3kb, w obrębie którego znajduje się gen dla histonu H1, oraz 2) o długości 1kb, odpowiadający wprowadzonemu transgenowi. Analiza

hybrydyzacyjna całkowitego DNA roślin transgenicznych wykazała, że wszystkie zregenerowane rośliny zawierają wprowadzony transgen (Zdjęcie 13)

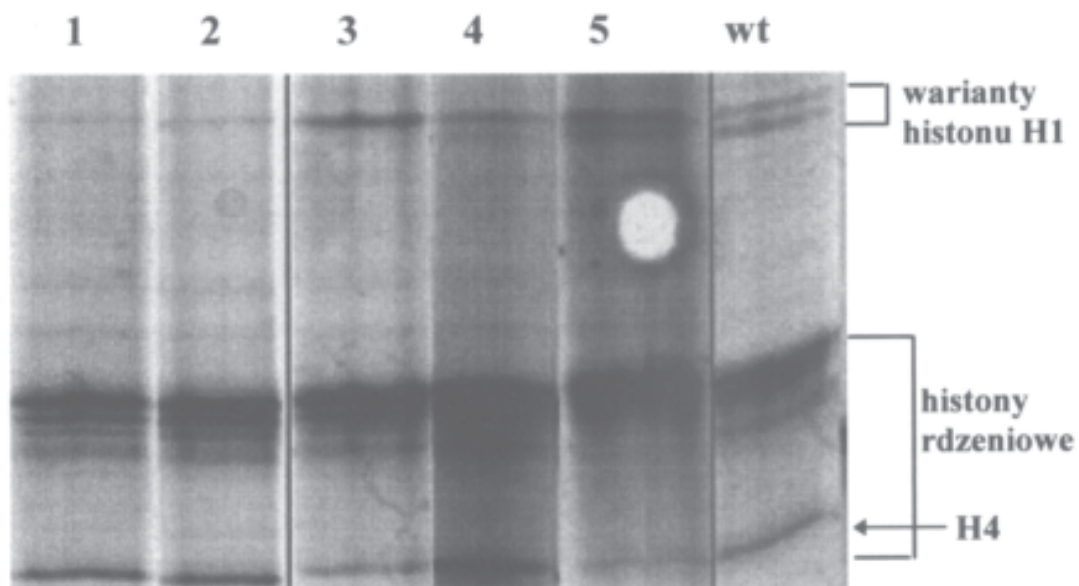
Na autoradiogramie są widoczne dodatkowe fragmenty DNA tuż nad fragmentem o wielkości 1kb, wykrywane sondą w DNA niektórych roślin (Zdjęcie 13; ścieżki 4,6,11,13,14,19,21,26,29), świadczy to o zmianach jakie nastąpiły w integrującym do genomu roślinnego T-DNA.



Zdjęcie nr 13. Autoradiogram hybrydyzacji według Southerna całkowitego DNA izolowanego z kolejnych transgenicznych roślin tytoniu transformowanych plazmidem pROKFH1ta, całkowite DNA zostało strawione restryktazą *EcoRI*, sondą było znakowane izotopowo cDNA histonu H1 z tytoniu (wszystkie badane rośliny wykazywały zmiany fenotypowe). Ścieżka wt zawiera całkowity DNA dzikiej rośliny tytoniu trawiony enzymem restrykcyjnym *EcoRI*.

#### 4.4.2. Analiza preparatów białkowych

Analizie poddano obraz całkowitych histonów niektórych roślin transgenicznych uzyskanych po transformacji plazmidem pROKFH1ta. W wyniku ekspresji wprowadzonego genu uzyskano obniżenie zawartości białka histonu linkerowego w transformowanych roślinach. Wszystkie analizowane rośliny wykazały obniżoną ilość histonu H1; pojawiły się nawet rośliny, w których całkowita zawartość białka histonu była obniżona prawie do zera (Zdjęcie nr 14 ścieżka 1-2)



Zdjęcie nr 14. Obraz histonów ekstrahowanych z chromatyny izolowanej z liści roślin transgenicznych, transformowanych plazmidem pROKFH1ta. Rozdział histonów wybranych roślin na żelu poliakrylamidowym w obecności mocznika i kwasu octowego. Ścieżka wt zawiera całkowite histony pochodzące z dzikiej rośliny tytoniu. Strzałką zaznaczono położenie na żelu histonu H1.

## 5. Dyskusja

Dotychczasowe tendencje rozwojowe w przemyśle spożywczym wskazują, że procesy biotechnologiczne są coraz szerzej stosowane do produkcji żywności.

Zastosowanie mikroorganizmów oraz enzymów (dwóch głównych czynników biotycznych) w przetwórstwie żywności jest powszechne i obejmuje zdecydowaną większość branż przemysłu spożywczego. Procesy biotechnologiczne pozwalają na produkowanie żywności mało przetworzonej oraz utylizację odpadów produkcyjnych i odczyszczanie ścieków.

Współcześnie ważną rolę w ekspansji metod biotechnologicznych, szczególnie w odniesieniu do produkcji surowców roślinnych odgrywa inżynieria genetyczna. Jednocześnie otrzymywanie produktów roślinnych wspomnianymi metodami budzi wiele obaw i wątpliwości. Pamiętać należy, że prawie cała konsumowana przez nas żywność pochodzi z organizmów otrzymanych w wyniku krzyżówek i specjalnych metod hodowli tzw. dobór sztuczny. Techniki inżynierii genetycznej, podobnie jak konwencjonalna genetyka stosowana w uprawie czy hodowli, polegają na wprowadzaniu nowego materiału genetycznego do genomu danego układu biologicznego. Różnica polega na tym, że inżynieria genetyczna oferuje możliwości wymiany materiału genetycznego pomiędzy gatunkami, co wcześniej nie było możliwe. Metody inżynierii genetycznej pozwalają na uzyskanie nowych odmian transgenicznych roślin i zwierząt, które mogą być odporne na stropy biotyczne i abiotyczne, posiadać lepsze właściwości sensoryczne oraz lepsze parametry technologiczne. Jednak zaakceptowanie przez konsumentów tak otrzymanej żywności wymaga odpowiedzi na wiele pytań związanych przede wszystkim z jej bezpieczeństwem. Należy pamiętać, że to nie naukowcy zajmujący się inżynierią genetyczną i żywnością transgeniczną wprowadzili jako pierwsi geny do naszego *menu*. Każdy człowiek, czy zwierzę odkąd istnieje i zjada produkty spożywcze pochodzenia roślinnego czy zwierzęcego zjada również geny i ich produkty. Zjadając geny człowiek nie może skorzystać z zawartej w nich informacji genetycznej. Wszystkie geny znajdujące się w pożywieniu poddawane są procesowi trawienia przewodzie pokarmowym. Ostatecznie, produkty degradacji DNA, małe i proste cząsteczki, przenikają do krwi, która rozprowadza je do wszystkich komórek organizmu, gdzie mogą być użyte jako materiał budulcowy do syntezy nowych kwasów nukleinowych. Własne geny organizm człowieka musi jednak zbudować sam wewnątrz swoich komórek. I tylko własne geny przekazać może, po-

przez komórki rozrodcze swojemu potomstwu. Człowiek od wieków spożywał i nadal spożywa geny ryb, kurczaków i roślin, nie stając się ich nosicielem. Geny roślin zielonych nie sprawiły, że organizm ludzki zaczął asymilować azot cząsteczkowy. Warto jeszcze raz podkreślić, że to co spożywamy obecnie, zostało także zmodyfikowane przez pokolenia hodowców i selekcjonerów, którzy zmieniali geny, nie kontrolując tego procesu. Dopiero współczesne metody inżynierii genetycznej pozwalają na wprowadzanie kontrolowanych zmian oraz dokładne ich badanie na etapie laboratorium.

Jedna z takich metod została przedstawiona w niniejszej pracy. Obiektem badań była roślina tytoniu do której wprowadzano specjalnie skonstruowany plazmid wektorowy w celu uzyskania obniżenia poziomu białka histonu H1. Białka histonowe są podstawowym elementem strukturalnym chromatyny. Współtworzą jednostkę strukturalną jaką jest nukleosom i oddziałują z DNA na całej długości chromosomu. Histon H1 nie wchodzi w skład rdzenia nukleosomu, lecz wiąże się z nim „od zewnątrz”.

Wcześniejsze badania prowadzone w laboratorium prof. Jerzmanowskiego w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin UW wykazały, że zakłócenie stosunku histonu H1:DNA nie zaburza podziałów komórkowych, wzrostu i wczesnych stadiów rozwoju rośliny. Wskazuje to, że stosunek H1:DNA nie jest czynnikiem krytycznym dla represji transkrypcji w przypadku większości genów. Jednak może on mieć znaczenie dla procesów występujących później w rozwoju, a także podlegających bardziej skomplikowanej regulacji genetycznej, takich jak proces reprodukcji. Jak wykazały opisane w tej pracy badania wszystkie rośliny zawierające transgen pROKFH1ta, który wpływał na poziom histonu H1, wykazywały charakterystyczne zmiany w rozwoju kwiatu. Rośliny z zakłóconym stosunkiem H1:DNA charakteryzowały się zrzucaniem bądź usychaniem kwiatów i w konsekwencji brakiem owoców. Jak zaobserwowano, bezpośrednim brakiem zapylenia u transgeniczných roślin było występowanie heterostylii. Zjawisko to świadczy o tym, że możliwe jest uzyskanie takich roślin transgeniczných, które nie wydają nasion, a tym samym nie mają możliwości rozprzestrzenienia się i krzyżowania z innymi dziko rosnącymi roślinami. Rośliny takie można wykorzystywać do analizowania różnych cech transgenu bez obawy o ich nie kontrolowane rozprzestrzenienie się. Badania tych roślin przeprowadzone za pomocą technik mikroskopii elektronowej w laboratorium prof. Kurasia wykazały poważne zmiany w procesie powstania gamet męskich (Prymakowska-Bosak 1999). Wskazuje to na bardzo selektywny wpływ zaburzenia stosunku H1:DNA na linię generatywną komórek roślinnych, co prawdopodobnie leży u podłoża obserwowanego fenotypu.

Jak wynika z niniejszej pracy, możliwe jest uzyskanie roślin transgenicznych o niezakłóconej zdolności do wzrostu wegetatywnego, które jednak - ze względu na selektywne zakłócenie w linii komórek płciowych - są niezdolne do rozmnażania. Rośliny te mogą być cennym - bo bezpiecznym modelem do badania cech roślin modyfikowanych za pomocą technik inżynierii genetycznej. Tego rodzaju modele badawcze mogą umożliwić usprawnienie technologii manipulacji genami i przyczynić się do wyeliminowania nowych, śladowych zagrożeń, jakie dziś jeszcze wiąże się z masowym stosowaniem organizmów zmodyfikowanych genetycznie.

## 6. Podsumowanie

W niniejszej pracy opisano metodę transformacji roślin za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* oraz otrzymanie za jej pomocą transgenicznych roślin tytoniu. Rośliny te zawierały gen histonu H1 w orientacji „antysens”, co spowodowało obniżenie poziomu głównych wariantów histonu H1 w roślinie. Analiza fenotypowa wykazała różnice w wyglądzie roślin transgenicznych w porównaniu do roślin kontrolnych. Różnice te dotyczyły przede wszystkim procesu kwitnienia i owocowania. Tytoń z obniżonym poziomem białka histonu H1 posiadał kwiaty charakteryzujące się heterostylią, czyli skróceniem długości pręcików w stosunku do słupka. Zmiany te spowodowały, że u roślin tych nie wystąpiło zawiązanie owoców, a kwiat usychał na pędzie. W ten sposób uzyskano rośliny nie zdolne do rozmnażania. W celu potwierdzenia obecności transgeny w roślinach poddano je analizie molekularnej, w wyniku której wykazano obecność transgeny oraz zmiany w poziomie białka histonu H1. Uzyskany tytoń transgeniczny charakteryzuje się niezdolnością do rozmnażania, może być cennym modelem badawczym w pracach zmierzających do poprawy bezpieczeństwa procedur stosowanych do otrzymywania żywności zmodyfikowanej genetycznie.

## 7. Słownik pojęć

**biblioteka** – biblioteka zrekombinowanego DNA jest zbiorem identycznych cząsteczek wektora, z których każda zawiera inną wstawkę DNA – różne wstawki razem mogą reprezentować cały genom, na przykład ludzki (ludzka biblioteka genomowa); lub zbiór kopii mRNA izolowanego z komórek określonego typu przekształconych do postaci cDNA (biblioteka cDNA)

**biologia molekularna** – dziedzina biologii badająca procesy komórkowe za pomocą metod stanowiących połączenie biochemii i genetyki

**biotechnologia** – dziedzina na pograniczu biologii i techniki, polegająca na wytwarzaniu na skalę przemysłową różnych produktów przez organizmy żywe. Podstawą biotechnologii jest uzyskanie odpowiednich szczepów organizmów, które będą produkowały w znacznych ilościach pożądaną substancję. W konstrukcji takich organizmów podstawową rolę odgrywa inżynieria genetyczna.

**cDNA** – nić DNA powstała przez skopiowanie nici RNA przez odwrotną transkryptazę; sekwencja cDNA jest komplementarna do RNA użytego jako matryca

**chromatyna** – substancja składająca się z dwuniciowego DNA zwiniętego i skondensowanego dzięki oddziaływaniom z białkami

**chromosomy** – struktury jądra komórkowego, każdy z nich zawiera wysoko skondensowaną podwójną helisę DNA związaną z białkami

**ekspresja genu** – proces wykorzystywania informacji zawartej w genomie do produkcji składnika komórki; na ekspresję składają się: transkrypcja genowej sekwencji DNA na RNA oraz dla większości genów, translacja sekwencji RNA do postaci polipeptydu

**elektroforeza** – proces, podczas którego mieszanina cząsteczek, takich jak DNA, RNA i białka jest rozdzielana zgodnie z masą i ładunkiem elektrycznym w płytce żelatynopodobnej substancji (żelu elektroforetycznym) umieszczonej w polu elektrycznym

**enzym restrykcyjny (restryktaza)** – enzymy rozpoznające krótkie sekwencje nukleotydów w DNA i dokonujące przecięcia podwójnego heliksu, często wewnątrz rozpoznawanej sekwencji

**gen** – odcinek DNA lub RNA, który stanowi jednostkę informacji genetycznej

**genom** – całość informacji genetycznej komórki; opisuje geny i inne sekwencje DNA

**hybrydyzacja** – proces, w którym dwie komplementarne, jednoniciowe cząsteczki kwasów nukleinowych łączą się ze sobą, tworząc podwójną helisę

**klonowanie** – wytwarzanie kopii organizmu wielokomórkowego przy wykorzystaniu materiału genetycznego pochodzącego z jego komórki somatycznej

**komórki somatyczne** – komórki budujące organizm wielokomórkowy z wyjątkiem komórek płciowych

**kod genetyczny** – „słownik” przekładający sekwencje nukleotydów DNA i RNA na aminokwasy w białku; słowa kodu (kodony) są serią trójek kolejnych nukleotydów (takich jak AGG, GCA itp.); każdy kodon wyznacza jeden z aminokwasów albo początek bądź koniec sekwencji kodującej

**nukleotyd** – pojedyncze składniki budulcowe DNA i RNA

**organizmy transgeniczne** – zwierzęta i rośliny, których genom został zmieniony przez wprowadzenie nowej sekwencji DNA w taki sposób, że ich potomstwo będzie dziedziczyło nową sekwencję

**plazmid** – kolist dwuniciowa cząsteczka DNA, która może ulegać replikacji niezależnie od genomu komórki

**promotor** – sekwencja nukleotydowa DNA poprzedzająca sekwencję kodującą, konieczna do rozpoczęcia transkrypcji genu przez polimerazę RNA

**replikacja** – proces powielania DNA lub RNA

**sonda** – odcinek DNA lub RNA wyznakowany radioaktywnym izotopem (lub łatwo wykrywalną grupą chemiczną) używany do wykrywania komplementarnych odcinków kwasów nukleowych metodą hybrydyzacji

**transgen** – gen, który został eksperymentalnie wprowadzony do genomu organizmu i jest przekazywany jego potomstwu (organizmom transgenicznym)

**transkrypcja** – proces wytwarzania cząsteczki RNA na matrycy jednego łańcucha DNA zgodnie z regułą komplementarności zasad. Ostatecznym produktem transkrypcji w przypadku genów kodujących białko jest cząsteczka mRNA, która jest potrzebna do produkcji białka, czyli translacji

**translacja** – wytwarzanie białka na podstawie informacji genetycznej przenoszonej z jądra komórkowego do cytoplazmy przez cząsteczkę mRNA

**wektor** – cząsteczka DNA, z którą można połączyć odcinek obcego DNA – tak zrekombinowany DNA można wprowadzić do komórki, w której będzie replikowany

## 8. Literatura

Allan J., Hartman P.G., Crane-Robinson C. & Aviles F.X.: The structure of histone H1 and its location in chromatin, *Nature* 288, (1980), 675-679;

Arents G., Burlingame R.W., Wang B.W.: The nucleosomal core histone octamer at 3,1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88: 10148—10152;

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., More D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl K.: *Current Protocols in Molecular Biology*, (F.M. Ausubel, ed.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1987;

Bednarski W.: Stan obecny i perspektywy biotechnologii żywności, *Przemysł Spożywczy* 1997, 51, 2, 29-32;

Bevan M.V.: Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucleic Acid Res.* 12, 1984, 8711-8721;

Bielecki S. Kwapisz E.: Analiza kierunków rozwoju w ochronie środowiska, *Rozwój biotechnologii pod redakcją Twardowskiego T.* Poznań 1997, 46-55;

Birboim H.C. & Doly J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acid Research* 7, 1979, 1513-1523;

Doyle J.J. & Doyle J.L.: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.* 19, 1987, 11-15;

Encyklopedia Multimedialna, [www.encyklopedia.pl](http://www.encyklopedia.pl), 1999;

Fikus M.: Nowy wspaniały świat biotechnologii w Genetyce molekularnej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1996, 456-470;

Fikus M.: Transgeniczna żywność, *Wiedza i Życie* (2), Warszawa 1997, 10-12;

Forowicz K.: Tajne łamane przez poufne, Rzeczpospolita z 14.10.99. Nr 241;

Grajek W.: Zagrożenia związane z rozwojem biotechnologii, Projekt rozważań prawnych dotyczących stosowania genetycznie modyfikowanych organizmów, Dodatek do Biotechnologii nr 1(36), Poznań 1997, 60 – 74;

Grajek W., Malepszy S.: Zastosowanie biotechnologii w przetwórstwie surowców roślinnych cz.I., Produkcja roślin transgenicznych, Przem. Spoż. 1997, 51;

Horsch R.B., Klee H.J., Stachel S., Winans S.C.E., Nester W., Rogers S.G.J., Fraley R.T.: Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf diseases, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 1986, 2571-2575

Huggett A.C., Conzelmann C.: EU regulation on novel foods: Consequences for the food industry, Trends in Food Science & Technology 1997 (vol. 8), 133-139;

Internet: Strony internetowe Stowarzyszenia Ochrony Zdrowia Konsumentów 1999-12-19;

Iwkiewicz J.: Praca magisterska. Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, 1993, Warszawa;

Jerzmanowski A.: przekaz ustny 1999;

Jerzmanowski A.: Rośliny transgeniczne w biotechnologii, Biologia w Szkole, 1996, 49, 59-72;

Jerzmanowski A., & Cole R.D.: Flanking sequences of *Xenopus* 5SRNA genes determine differential inhibition of transcription by H1 histone in vitro, J. Biol. Chem., 265, 107726-107732, (1990);

Kahl G.: Molecular Biology of Plant Tumors, wyd. Kahl, 1982, 211-267;

Kornberg R.D. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA Science 184, 1974; 868-871;

Legocki A.B.: Transformowanie komórek roślinnych, Transformowanie i regeneracja roślin – Poradnik laboratoryjny pod redakcją Legockiego A.B. Poznań 1990, 1-6;

Lichota J.: Praca magisterska, Analiza ekspresji genów rozwojowych w transgenicznym roślaku tytoniu (*Nicotiana tabacum*) z obniżoną ekspresją genów głównych wariantów histonu H1, 1999, Warszawa;

Ludwicki J.K.: Pestycydy czy organizmy genetycznie modyfikowane w diecie- jako alternatywy?, Materiały krajowej konferencji ogólnopolskiego Stowarzyszenia Ochrony Zdrowia Konsumentów, Rzeczywiste, domniemane i urojone zagrożenia zdrowia konsumenta w Polsce, 1998a;

Ludwicki J.K.: Organizmy modyfikowane genetycznie – mity i fakty, Materiały VI Konferencji Dyskusyjnej z cyklu „Fakty i fikcje w żywieniu człowieka”: Żywność niekonwencjonalna - z i przeciw, Polskie Towarzystwo Nauk Żywnościowych, Warszawa 1998b;

Łęski T.: Genetyczni kolonizatorzy, *Wiedza i Życie* (9) 1997, 18-21;

Maniatis T., Sambrook J. & Fritsch E.F.: *Molecular cloning, A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990;

Mazzolini L., Vaeck M. & Van Montagu M.: Conserved epitopes on plant H1 histones recognized by monoclonal antibodies, *Eur. J. Biochem.* 178, 1989, 779-787;

Moehs C.P., McElwain E.F. & Spiker S.: Chromosomal Proteins of *Arabidopsis thaliana*, *Plant. Mol. Biol.* 11, 1988, 507-515;

O’Neil T.E., Meersseman G., Pennings S. & Bradbury E.M.: Deposition of histone H1 onto reconstituted nucleosome arrays inhibits both initiation and elongation of transcripts by T7 RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.* 23, (1995), 1075-1082;

Ooms G., Hooykaas P.J.J., Van Veen R.J.M., Van Beelen P., Regensburg-Tuing T.J.G. & Schilperoort R.A.: Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of T-region, *Plasmid* 7, 1982, 15-29;

Podbielkowski Z.: *Słownik roślin użytkowych*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1989

Prymakowska-Bosak M.: Zastosowanie roślin transgenicznych do badania funkcji histonu H1, praca doktorska, Warszawa 1997;

Prymakowska-Bosak M., Przewłoka M., Ślusarczyk J., Kuraś M., Lichota J., Kiliańczyk B., Jerzmanowski A.: Linker Histones Play a Role in Male Meiosis and the Development of Pollen Grains in Tobacco, *The Plant Cell*, Vol.11, 2317-2329, December 1999;

Radomski J., Jasnowski J.: Botanika, Przegląd systematyczny okrytozalążkowych PWN, Warszawa 1986;

Rajewski M.: Rośliny przyprawowe i użytki roślinne, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa 1992;

Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodse D. & Klug A.: Structure of the nucleosome core particle at 7Å resolution, *Nature* 1984, 311, 532-537;

Simon J.H. & Becker W.M.: A poliethylene glyco/dextran procedure for the isolation of chromatin proteins (histones and nonhistones) from wheat germ, *Biochim. Biophys. Acta* 454, 1976, 154-171;

Spiker S.: Histone variants in plants. Evidence for primary structure variants differing in molecular weight, *J. Biol. Chem.* 157, 1982, 14250-14255;

Staroń K.: Nukleosom w Genetyka Molekularna, PWN Warszawa 1996, 119-121;

Timmermans M.C.P., Maliga P., Vivera J. & Messig I.: The pFF plasmid: cassettes utilising CaMV sequences for expression of foreign genes in plants, *J. Biotech* 14, 1990, 333-344;

Tomaszewski R., Jerzmanowski A.: The AT-flanks of the oocyte-type 5SRNA gene of *Xenopus laevis* act as a strong signal for histone H1-mediated chromatin reorganization *in vitro*, *Nucleic. Acids Res.* 25, 458-465, 1997;

Tomaszewski R., Mogielnicka E., Jerzmanowski A.: Both the 5SrRNA gene and the AT-rich flanks of *Xenopus laevis* oocyte-type 5S rDNA repeat are required for histone H1-dependent repression of transcription of pol III-type genes in *in vitro* reconstituted chromatin, *Nucl. Acids Res.* 26, 5596-5601, 1998;

Twardowska – Pozorska A., Twardowski T.: Odbiór społeczny nowej żywności („żywności GMO”) w Polsce, *Biotechnologia* nr 4(43), Poznań 1998, 20 – 47;

Twardowska A., Twardowski T.: Żywność pochodząca z genetycznie modyfikowanych organizmów-„żywność transgeniczna”, *Zbiór referatów z seminarium roczników patentowych szkół wyższych*, Zeszyt nr 17 Cedzyna 1997;

Twardowski T.: Przeciwnicy genetycznie modyfikowanych organizmów, *Postępy w ochronie roślin*, Poznań 1997b, vol.37, No.1;

Twardowski T.: Rośliny transgeniczne a legislacja i bezpieczeństwo, *Postępy w ochronie roślin*, Poznań 1997a, vol.37, No.1;

Twardowski T.: Społeczne i prawne aspekty biotechnologii, *Wydawnictwa Politechniki Łódzkiej*, Łódź 1996, 63 – 66;

Urbanek – Karłowska B. i Fonberg – Broczek M.: Nowa żywność – „novel food” – ocena bezpieczeństwa, *Materiały VI Konferencji Dyskusyjnej z cyklu „Fakty i fikcje w żywieniu człowieka”: Żywność niekonwencjonalna - za i przeciw*, Polskie Towarzystwo Nauk Żywnościowych, Warszawa 1998;

Valvekens D., Van Montagu M. & Van Lijsebettens M.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85, 1998, 5536-5540;

Van Holde K.E., *Chromatin*, wyd.: Springer-Verlag, New York 1989;

WHO: *Biotechnology and food safety, Report of a Joint FAO/WHO Consultation*, Rome, Italy, 1996, 30 September – 4 October;

Wolffe A.P.: *Regulation of chromatin structure and function*, wyd.: R.G. Landes Company, 1994 Austin;

Zimny J.: *Kultury in vitro i transformowanie roślin zbożowych*, *Wybrane zagadnienia biotechnologii roślin* pod redakcją Wypijewskiego K. Poznań 1996, 109-116;