INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA
I GLEBOZNAWSTWA
PAŃSTWOWY INSTYTUT
BADAWCZY

STUDIA
I
RAPORTY
IUNG-PIB

31(5)

PROGRAM WIELOLETNI

2011-2015

PUŁAWY 2012

ROLA BADAŃ NAUKOWYCH W KSZTAŁTOWANIU POSTĘPU W PRODUKCJI CHMIELU I TYTONIU

WSPIERANIE DZIAŁAŃ
W ZAKRESIE KSZTAŁTOWANIA
ŚRODOWISKA ROLNICZEGO
I ZRÓWNOWAŻONEGO
ROZWOJU PRODUKCJI ROLNICZEJ
W POLSCE

INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor: *prof. dr hab. Wiesław Oleszek*

Redaktor: *dr Urszula Skomra*

Recenzenci: *prof. dr hab. Stanisław Berbeć*
prof. dr hab. Wiesław Oleszek

Opracowanie redakcyjne i techniczne: *mgr Ewa Decka-Cywińska*

ISBN 978-83-7562-119-8

Egzemplarz bezpłatny

Nakład 250 egz., B5, zam. 64/D/12
Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG-PIB w Puławach
tel. (81) 8863421 w. 301 i 307; fax (81) 8864547
e-mail: iung@pulawy.pl; http://www.iung.pulawy.pl

STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB

ROLA BADAŃ NAUKOWYCH W KSZTAŁTOWANIU POSTĘPU W PRODUKCJI CHMIELU I TYTONIU

ZESZYT 31(5) 2012

SPIS TREŚCI

Wstęp 7
1. Urszula Skomra – Stan aktualny i perspektywy uprawy chmielu w Polsce.....9
2. Urszula Skomra, Marcin Przybyś, Anna Trojak-Goluch – Kierunki badań naukowych wspierające doskonalenie genotypów chmielu 21
3. Monika Agacka, Urszula Skomra – Chmiel jako źródło bioaktywnych metabolitów wtórnych dla przemysłu piwowarskiego i farmaceutycznego..... 39
4. Apoloniusz Berbeć, Andrzej Madej – Obecna sytuacja i perspektywy uprawy tytoniu w Polsce na tle świata i Unii Europejskiej 51
5. Anna Depta, Magdalena Kawka, Karolina Kursa, Teresa Doroszewska – Nowoczesne metody i techniki w ulepszaniu genotypów tytoniu dla produkcji rolniczej i poprawy jakości surowca 69
6. Marcin Przybyś – Tytoń – zielony bioreaktor 133

Wstęp

Postęp w produkcji rolniczej zależy od ciągłego doskonalenia odmian roślin uprawnych oraz wdrażania nowych technologii, które pozwalają lepiej wykorzystać potencjał tych odmian, a także dostosować produkcję do wzrastających wymagań dotyczących efektywności gospodarowania oraz jakości surowca.

Uprawa chmielu i tytoniu należy do najbardziej wyspecjalizowanych gałęzi produkcji rolnej, wymaga dużej wiedzy fachowej oraz specjalistycznego zaplecza technicznego. Duży wkład w rozwój sektora produkcji chmielu i tytoniu wniosły badania naukowe prowadzone między innymi w IUNG-PIB. Na szczególne uznanie zasługuje opracowanie i wdrożenie wielu innowacyjnych rozwiązań technologicznych, które w znacznym stopniu przyczyniły się do unowocześnienia i intensyfikacji produkcji tych gatunków oraz specjalizacji gospodarstw. Innym wymiernym efektem badań naukowych było wprowadzenie do uprawy nowych odmian chmielu i tytoniu, lepiej przystosowanych do wymagań plantatorów i odbiorców surowca, charakteryzujących się większą plennością, korzystnymi cechami agronomicznymi oraz odpornością na najważniejsze choroby.

Kluczowe znaczenie dla dalszego doskonalenia genotypów chmielu i tytoniu ma rozwój i wykorzystanie nowoczesnych metod badawczych opartych na najnowszej wiedzy z zakresu biologii molekularnej, biotechnologii i inżynierii genetycznej. Zastosowanie w hodowli nowoczesnych technik, takich jak kultury *in vitro*, markery molekularne, czy genetyczna modyfikacja roślin, przyczynia się do zwiększenia efektywność selekcji, umożliwia kontrolowany transfer genów, a w konsekwencji powoduje skrócenie cyklu hodowlanego i obniżenie kosztów uzyskania nowych odmian. Rozwój biologii molekularnej oraz nowoczesnych technik analitycznych otworzył również możliwości alternatywnego wykorzystania tych gatunków poza przemysłem tytoniowym i piwowarskim. W ostatnich latach poczyniono duże postępy w badaniach nad wykorzystaniem tytoniu transgenicznego jako bioreaktora do produkcji zrekombinowanych białek, które mogą znaleźć zastosowanie w różnych dziedzinach życia, przede wszystkim w medycynie, przemyśle i ochronie środowiska. Duże nadzieje wiąże się również z wykorzystaniem właściwości prozdrowotnych niektórych metabolitów wtórnych chmielu. Duża aktywność biologiczna tych związków oraz szerokie spektrum oddziaływania wskazują na ich znaczny potencjał terapeutyczny.

Niniejszy zeszyt z serii „Studia i Raporty IUNG-PIB" zawiera opracowania wykonane w ramach realizacji zadania 3.5 programu wieloletniego IUNG-PIB pt. „Ocena wpływu postępu biologicznego i agrotechnicznego na uprawę chmielu i tytoniu w Polsce". Punktem wyjścia dla realizacji celów zadania była charakterystyka aktualnej sytuacji oraz określenie perspektyw rozwoju uprawy chmielu i tytoniu w aspekcie zmian zachodzących na światowych rynkach tych surowców. W opracowaniu dużo miejsca poświęcono różnym strategiom stosowanym w celu ulepszania genotypów chmielu i tytoniu oraz nowoczesnym metodom i technikom, które

wspomagają tradycyjną hodowlę, czyniąc ją bardziej efektywną. Szeroko omówiono również najnowsze badania dotyczące kierunków transformacji genetycznej tytoniu oraz metabolitów wtórnych chmielu, których wyniki rzucają nowe światło na możliwości niekonwencjonalnego wykorzystania tych gatunków.

Problematyka przedstawiona w niniejszym zeszycie dowodzi bezspornej roli badań naukowych w kształtowaniu postępu w produkcji chmielu i tytoniu. Należy jednak pamiętać, że jednym z podstawowych czynników wpływającym na zakres wykorzystania wyników badań jest stała współpraca środowiska naukowego z praktyką rolniczą, która pozwala na upowszechnianie postępu naukowo-technicznego poprzez publikacje, szkolenia i specjalistyczne doradztwo. Niniejsze opracowanie jest jednym z elementów popularyzacji dotychczasowych osiągnięć oraz nowych kierunków w badaniach nad chmielem i tytoniem. Mamy nadzieję, że tematyka publikacji wzbudzi zainteresowanie szerokiego grona czytelników oraz przyczyni się do wzrostu świadomości producentów chmielu i tytoniu o znaczeniu nauki w unowocześnianiu produkcji tych gatunków.

Kierownik zadania 3.5

dr Urszula Skomra

Urszula Skomra

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

STAN AKTUALNY I PERSPEKTYWY UPRAWY CHMIELU W POLSCE*

Wstęp

Chmielarstwo w Polsce ma wieloletnią tradycję. Pierwsze wzmianki o uprawie chmielu w klasztorach i dobrach szlacheckich pochodzą z IX i X w. (18). W XIII w. chmiel uprawiano na Śląsku oraz w Wielkopolsce, która była kolebką polskiego chmielarstwa. Pochodzący z tego rejonu chmiel nowotomyski był bardzo ceniony, o czym może świadczyć fakt, że w 1883 r. uzyskał on najwyższą cenę na rynku światowym (18). W XVI w. uprawa chmielu rozwinęła się również w rejonie lubelskim i małopolskim. Szczyt rozwoju chmielarstwa na terenach polskich przypadł na okres przed I Wojną Światową. Na ziemiach trzech ówczesnych zaborów uprawiano łącznie około 7000 ha chmielu, z czego 4300 przypadało na obszar znajdujący się w obecnych granicach Polski (10, 17). Działania wojenne I Wojny Światowej doprowadziły do zmniejszenia powierzchni chmielników do około 1200 ha, ale areał został dość szybko odbudowany i w 1928 r. osiągnął ponad 3500 ha (17). Spowodowało to kryzys nadprodukcji, który doprowadził do zmniejszenia powierzchni uprawy o ponad 40% (do 1973 ha w roku 1932). W 1935 r. w ówczesnych granicach Polski chmiel uprawiano na obszarze 3110 ha, z tego ponad połowa (57%) zlokalizowana była w województwie wołyńskim, które po II Wojnie Światowej znalazło się poza granicami naszego kraju. Okres powojenny był wyjątkowo trudny w historii chmielarstwa polskiego. Nowy układ granic pozbawił nasz kraj największego rejonu uprawy chmielu na Wołyniu. Na pozostałym obszarze większość plantacji zlikwidowano, zarówno na skutek działań wojennych oraz prowadzonej przez okupanta planowej eliminacji uprawy chmielu w Wielkopolsce, jak i przeprowadzonej w 1944 r. reformy rolnej. W granicach Polski w 1945 r. pozostało jedynie 92 ha plantacji chmielu, z tego 88 w województwie lubelskim (17). Ocalałe chmielniki stały się bazą wyjściową do pozyskiwania materiału szkółkarskiego, niezbędnego do zakładania nowych plantacji. Ponadto sprowadzono do naszego kraju około milion sadzonek chmielu z ówczesnej Czechosłowacji. Pozwoliło to na stosunkowo szybkie odbudowanie areału, który na początku lat 60. ubiegłego stulecia ustabilizował się

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

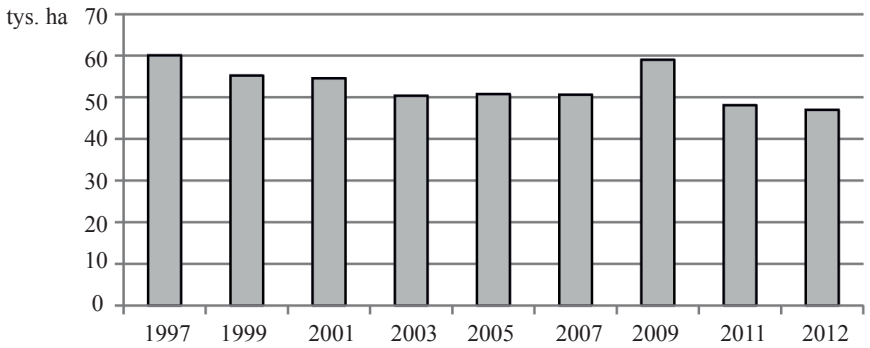
na poziomie 2200-2500 ha. Postęp hodowlany oraz technologiczny, jaki dokonał się w tym czasie, ugruntował pozycję polskiego chmielarstwa na wiele lat. Uprawa nastawiona była na pokrycie potrzeb rodzimego przemysłu piwowarskiego. Wielkość produkcji najczęściej w pełni zabezpieczała te potrzeby (3, 4).

Po przystąpieniu do UE Polska stała się integralną częścią światowego rynku chmielu, ze wszystkimi tego konsekwencjami. Zostały wprowadzone regulacje obrotu chmielem, zgodne z rozwiązaniami prawnymi obowiązującymi w krajach UE, których celem było dostosowanie krajowego chmielarstwa do międzynarodowych standardów. Jednocześnie zostały zniesione bariery celne chroniące rodzimy rynek, co spowodowało znaczący wzrost konkurencji. Obecnie, w większym stopniu niż kiedykolwiek wcześniej, plantatorzy i przetwórcy muszą być przygotowani do podporządkowania się regułom światowego rynku chmielu.

Niniejsze opracowanie ma na celu przedstawienie sytuacji w uprawie, przetwórstwie i wykorzystaniu chmielu na świecie i w Polsce w ostatnich latach. Podjęto również próbę oceny perspektyw uprawy tego gatunku w Polsce w aspekcie zmian zachodzących na światowym rynku chmielu.

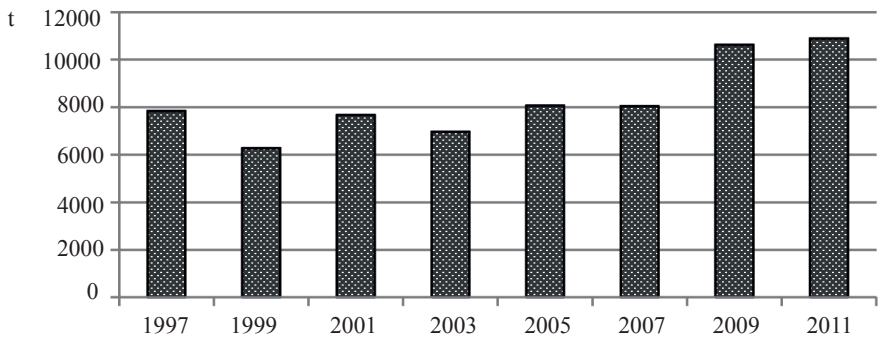
Światowy rynek chmielu

Od wielu lat areał uprawy chmielu na świecie systematycznie się zmniejsza (rys. 1). Obecnie roślina ta jest uprawiana na powierzchni około 47 000 ha, podczas gdy w roku 1997, a więc 15 lat temu, plantacje chmielu zajmowały 60 000 ha. Należy podkreślić, że mimo znacznego ograniczenia światowego areału chmielu produkcja alfa kwasów systematycznie wzrasta (rys. 2). Przyczyną takiej sytuacji jest postęp hodowlany i technologiczny, jaki osiągnięto w sektorze uprawy chmielu, oraz zmiana struktury odmianowej. W ciągu ostatnich kilkunastu lat wprowadzono do uprawy szereg nowych odmian, charakteryzujących się wysokim potencjałem plonowania oraz podwyższoną zawartością alfa kwasów w szyszkach. Średnia koncentracja alfa kwasów u najnowszych supergoryczkowych odmian chmielu sięga 14-19%, a potencjał plonowania jest szacowany na 3000-3500 $kg \cdot ha^{-1}$ (12, 13, 16). Unowocześniono również metody produkcji i zmechanizowano najbardziej pracochłonne czynności w uprawie chmielu, co pozwoliło na lepsze wykorzystanie potencjału uprawianych odmian. Przez szereg lat utrzymywała się na świecie tendencja do zwiększania areału odmian goryczkowych kosztem aromatycznych (rys. 3). W 2008 r. nastąpiło zrównoważenie powierzchni uprawy obu typów użytkowych chmielu, a w następnych latach dominującą pozycję zajęły odmiany goryczkowe. W 2011 r. zajmowały one 51,5% całego areału chmielu, podczas gdy w roku 2005 stanowiły 46%. Przyczyną tej zmiany była pogłębiająca się dysproporcja pomiędzy opłacalnością uprawy odmian aromatycznych i goryczkowych, spowodowana między innymi uzależnieniem ceny chmielu od zawartości alfa kwasów w szyszkach. Uprawa odmian goryczkowych, charakteryzujących się znacz-



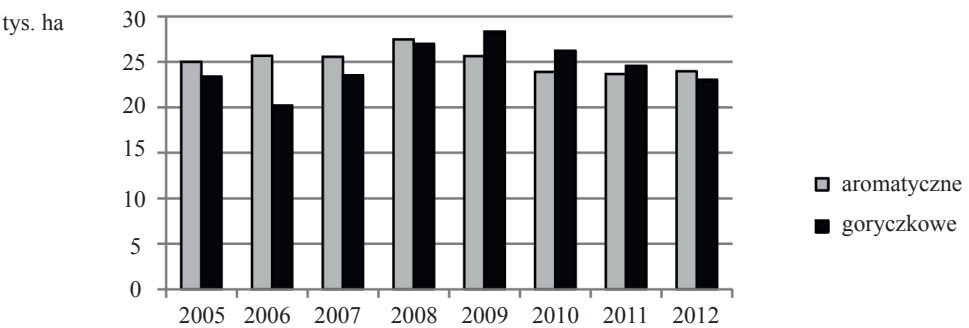
Rys. 1. Powierzchnia uprawy chmielu na świecie w latach 1997-2012

Źródło: Raporty Międzynarodowej Organizacji Producentów Chmielu IHGC (www.hmelj-giz.si/ihgc/) (15).



Rys. 2. Produkcja alfa kwasów na świecie w latach 1997-2011

Źródło: Raporty Międzynarodowej Organizacji Producentów Chmielu IHGC (www.hmelj-giz.si/ihgc/) (15).

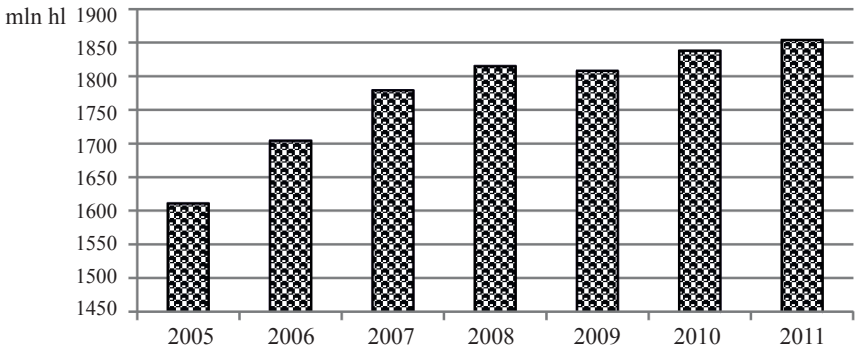


Rys. 3. Powierzchnia uprawy odmian aromatycznych i goryczkowych chmielu na świecie w latach 2005-2012

Źródło: Raporty Międzynarodowej Organizacji Producentów Chmielu IHGC (www.hmelj-giz.si/ihgc/) (15).

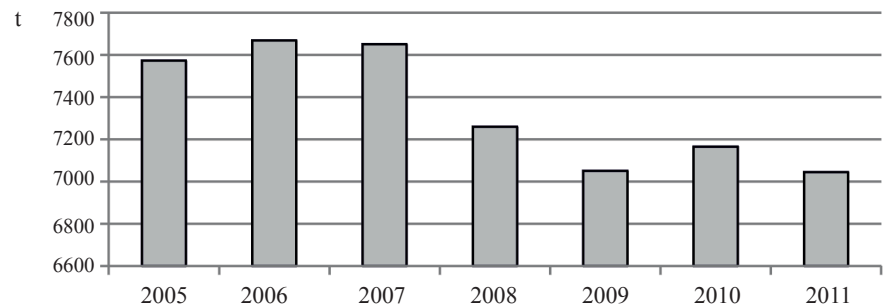
nie wyższą koncentracją alfa kwasów w porównaniu z aromatycznymi, a także zazwyczaj wyższym potencjałem plonowania, daje możliwość wyprodukowania tej samej ilości alfa kwasów na mniejszym areale oraz przy mniejszych nakładach. Z 1 ha plantacji klasycznej odmiany aromatycznej, jak 'Lubelski', 'Żatecki' czy 'Hersbrucker', można uzyskać przeciętnie od 30 do 70 kg alfa kwasów, podczas gdy z tego samego areału odmiany supergoryczkowej – od 200 do 400 kg. Obecnie ponad 77% alfa kwasów wyprodukowanych na świecie pochodzi z odmian goryczkowych chmielu, natomiast w roku 2005 było to 72,5% (8, 9). Od 2010 r. powierzchnia uprawy odmian aromatycznych na świecie ustabilizowała się na poziomie około 24 000 ha, natomiast areał odmian goryczkowych ograniczono o ponad 3 000 ha, tj. 12%. Likwidacji uległy przede wszystkim nasadzenia starych odmian goryczkowych o stosunkowo niskiej koncentracji alfa kwasów, takie jak: 'Northern Brewer', 'Nugget' czy 'Galena'. Ich miejsce zajęły odmiany nowoczesne: 'Hercules', 'Apollo', 'Super Galena'. Konsekwencją tych zmian był znaczący wzrost produkcji alfa kwasów (rys. 2).

Głównym odbiorcą surowca chmielowego jest przemysł piwowarski, który wykorzystuje ponad 95% światowej produkcji (2). Rynek chmielu jest więc w dużym stopniu uzależniony od kondycji tej gałęzi przemysłu. Produkcja piwa na świecie systematycznie rosła do roku 2008, a następnie trend ten został zahamowany i produkcja ustabilizowała się na poziomie około 1800 mln hektolitrów (rys. 4). Analizując zapotrzebowanie na alfa kwasy należy stwierdzić, że rosło ono znacznie wolniej niż produkcja piwa, a w ostatnich latach drastycznie się zmniejszyło, mimo stabilizacji na rynku piwa (rys. 5). Przyczyną takiej sytuacji jest znaczne zredukowanie dawki alfa kwasów stosowanej do chmielenia piwa (1). W 2005 roku średnia dawka alfa kwasów wynosiła 4,7g·hl^{-1} piwa, podczas gdy w 2011 roku jej poziom szacowano na 3,8 g·hl^{-1} (9). Jest to spadek o ponad 19%. Powodem tak dużych zmian jest między innymi udoskonalenie technologii produkcji piwa poprzez wprowadzenie precyzyjnego dawkowania alfa kwasów oraz ich lepsze wykorzystanie w procesie gotowania brzeczki. Było to możliwe dzięki zastąpieniu chmielu prasowanego przez granulaty i ekstrakty chmielowe, które są obecnie stosowane powszechnie do chmielenia piwa. Produkty te charakteryzują się ściśle określonym składem chemicznym, co umożliwia dodawanie ich do piwa w takiej ilości, która odpowiada ściśle określonej dawce alfa kwasów. Istotną cechą produktów chmielowych jest ich trwałość. Granulaty mogą być przechowywane bez utraty swoich właściwości przez okres 12-18 miesięcy, natomiast ekstrakty nawet przez 5 lat (5). Dzięki temu w latach urodzajnych nadmiar alfa kwasów może być magazynowany, co częściowo stabilizuje sytuację na rynku. Obecnie chmiel jest niemal w całości przetwarzany na różnego rodzaju produkty. W 2011 r. około 56,5% szyszek chmielu wyprodukowanych na świecie przerobiono na granulaty, a 42,5% na ekstrakty, przy czym udział ekstraktów w produktach chmielowych stale rośnie (9). Szacuje się, że w 2012 r. zapotrzebowanie na alfa kwasy będzie się kształtowało na poziomie około 7125 t, tj. o prawie 450 t mniej, niż w roku 2005, mimo że w tym czasie produkcja piwa wzrosła o 260 mln hektolitrów (9). Taka sytuacja, w połączeniu ze wzrostem wydajności produkcji, przyczyniła się



Rys. 4. Produkcja piwa na świecie w latach 2005-2011

Źródło: Hopsteiner Committed to the Brewer. 2011 Guidelines for Hop Buying. (www.hopsteiner.com/pdf/Guidelines_2011.pdf) (9).



Rys. 5. Zapotrzebowanie na alfa kwasy w latach 2005-2011

Źródło: Hopsteiner Committed to the Brewer. 2011 Guidelines for Hop Buying. (www.hopsteiner.com/pdf/Guidelines_2011.pdf) (9).

do stworzenia dużej nadwyżki alfa kwasów w ogólnym bilansie światowym. Zapasy alfa kwasów w postaci trwałych produktów rosną systematycznie od 2008 r. powodując spadek cen surowca. Niestety, perspektywy nie są korzystne, bowiem w 2012 r., mimo spadku areału chmielu na świecie, nadal szacuje się, że nadprodukcja alfa kwasów będzie wynosiła ponad 1500 t (tab. 1). Odpowiada to w przybliżeniu produkcji uzyskiwanej z 10 000 ha plantacji chmielu.

Tabela 1

Bilans alfa kwasów na świecie w latach 2007-2012

Rok produkcji	Produkcja alfa kwasów (t)	Rok zużycia alfa kwasów	Produkcja piwa (mln hl)	Dawka alfa kwasów ($g \cdot hl^{-1}$)	Zapotrzebowanie na alfa kwasy (t) (d-e)	Bilans alfa kwasów (t) (b-f)
a	b	c	d	e	f	g
2007	6983	2008	1815	4,0	7260	-277
2008	9748	2009	1808	3,9	7051	+2697
2009	10062	2010	1838	3,9	7168	+2894
2010	8192	2011	1854	3,8	7045	+1147
2011	8627	2012	1875	3,8	7125	+1502

Źródło: Hopsteiner Committed to the Brewer. 2011 Guidelines for Hop Buying. (www.hopsteiner.com/pdf/Guidelines_2011.pdf) (9).

Mimo tak dużej podaży alfa kwasów, na rynku światowym odczuwany jest niedobór surowca z odmian aromatycznych chmielu. Wzrost popytu przyczynił się do zahamo-wania procesu ograniczania areału, a nawet nieznacznego wzrostu powierzchni uprawy tych odmian zarówno w Europie, jak i USA (6). Zwrot w kierunku odmian aromatycznych obserwuje się również w pracach hodowlanych. W wielu krajach zostały w ostatnim czasie wprowadzone do uprawy nowe odmiany aromatyczne, tzw. „*flavour hops*", które łączą unikalny aromat z wyższą koncentracją alfa kwasów. Przykładem tego typu odmiany jest wyhodowana w Anglii 'Endeavour' o aromacie cytrusowym i koncentracji alfa kwasów w granicach 8,5% oraz uzyskane w Niemczech: 'Polaris', 'Mandarina Bavaria' czy 'Hüll Melon' (6, 14).

Sektor produkcji chmielu w Polsce

Uprawa chmielu w Polsce podlega rejonizacji na podstawie Ustawy z dnia 19 grudnia 2003 r. „O organizacji rynków owoców i warzyw, rynku chmielu, rynku tytoniu, rynku suszu paszowego oraz rynków lnu i konopii uprawianych na włókno" (Dz. U. 2011, Nr 145, poz. 868 z późniejszymi zmianami). Na podstawie Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi zostały określone trzy rejony uprawy chmielu: lubelski, wielkopolski oraz dolnośląski. Wielkość i struktura uprawy chmielu w poszczególnych rejonach jest zróżnicowana (tab. 2). W lubelskim rejonie uprawy koncentruje się 85,0% krajowego areału. Chmiel jest uprawiany przede wszystkim w małych gospodarstwach rodzinnych, w których powierzchnia chmielników kształtuje się na poziomie 2 ha. Większość prac jest wykonywana samodzielnie, tylko największe gospodarstwa korzystają z najemnej siły roboczej. Mimo niewielkiego areału, gospodarstwa chmielarskie na Lubelszczyźnie posiadają specjalistyczne maszyny do uprawy i zbioru oraz indywidualne suszarnie chmielowe. Najczęściej uprawa chmielu w tym rejonie nie jest jedynym źródłem dochodu w gospodarstwie. W rejonie wielkopolskim, a także dolnośląskim, dominują wyspecjalizowane gospodarstwa, nastawione wyłącznie na uprawę chmielu.

W Polsce uprawia się obecnie około 1500 ha chmielu, co plasuje nasz kraj na piątym miejscu w świecie i trzecim w Europie. Od 2005 roku powierzchnia uprawy systematycznie się zmniejsza (tab. 3). Proces ten do roku 2009 przebiegał stosunkowo wolno, bowiem ubywało około 50-60 ha chmielu rocznie. Wyjątek stanowił rok 2008, w którym

Tabela 2

Charakterystyka rejonów uprawy chmielu w Polsce na podstawie areału plantacji zgłoszonych do ewidencji Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych w 2012 r.

Rejon uprawy	Powierzchnia uprawy chmielu (ha)	Udział w ogólnym areale (%)	Liczba plantatorów	Średnia powierzchnia plantacji (ha)
Lubelski	1266,2	85,0	612	2,07
Wielkopolski	154,1	10,3	30	5,1
Dolnośląski	70,2	4,7	6	11,7

Źródło: Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, MRiRW (11).

Tabela 3

Powierzchnia uprawy chmielu, liczba plantatorów oraz średnia powierzchnia plantacji w Polsce w latach 2006-2012

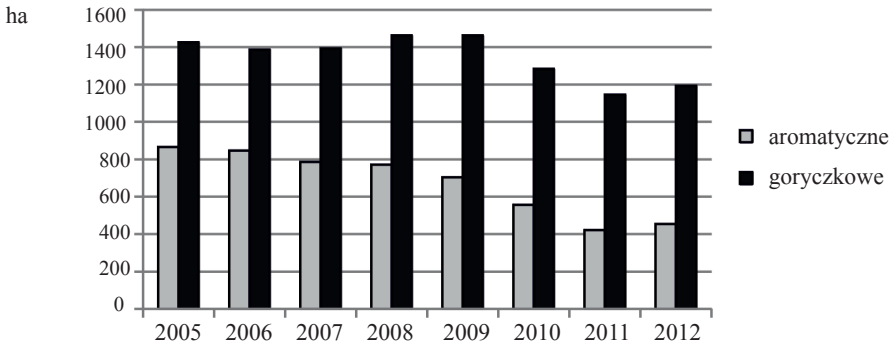
Wyszczególnienie	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Powierzchnia uprawy (ha)	2 234	2 179	2 233	2167	1840	1646	1491
Liczba plantatorów	1 113	1 066	1 026	1010	859	689	648
Średnia powierzchnia plantacji (ha)	2,01	2,04	2,18	2,15	2,14	2,39	2,30

Źródło: Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, MRiRW (11).

areał chmielu zwiększył się o ponad 54 ha. Zmiana ta spowodowana była wyjątkowo wysokimi cenami surowca w 2007 r. oraz doniesieniami ze światowego rynku chmielu i piwa o poważnym deficycie surowca w perspektywie następnych kilku lat. Niestety, informacje te nie sprawdziły się i w następnych latach wystąpiła nadprodukcja chmielu na świecie, co w konsekwencji spowodowało drastyczne obniżenie cen skupu i zmniejszenie areału. Najbardziej gwałtowne zmiany widoczne są w ostatnich latach. W 2010 r. powierzchnia uprawy chmielu została zredukowana o 15,1% w stosunku do roku poprzedniego, natomiast w 2011 i 2012 odpowiednio o 10,5% oraz 9,4%. W ciągu ostatnich trzech lat liczba plantatorów chmielu zmniejszyła się o ponad 35%. Pozytywnym trendem jest wzrost średniej powierzchni plantacji, która obecnie przekracza 2 ha.

Nadprodukcja chmielu na świecie spowodowała obniżenie cen oraz trudności ze zbytem surowca. Problemy te dotknęły również polskich plantatorów. Wg MRiRW w 2008 r. w Polsce nie zostało skupione 326 t szyszek chmielowych, natomiast w roku 2009 – 1029 t. Zakładając średni plon z 1 ha plantacji na poziomie 1,5 t, była to ilość wyprodukowana na około 700 ha, co stanowiło ponad 30% ówczesnego areału. Był to wyraźny sygnał do zmniejszenia produkcji. Zbiory chmielu w Polsce w 2010 r. były niższe o 50% w porównaniu z rokiem 2009 (tab. 4). Złożyło się na to kilka czynników. Powierzchnia uprawy została zredukowana o blisko 330 ha. W wyniku powodzi, która dotknęła rejon o najwyższej koncentracji uprawy chmielu w Polsce (gmina Wilków), zniszczeniu uległo około 300 ha chmielników. Wielu plantatorów, przy braku pewności zbytu surowca, zdecydowało się na zawieszenie produkcji lub ograniczenie liczby przewodników na plantacji (standardowo 4400 przewodników na 1 ha, oszczędnie – 2200). System polegający na doprowadzeniu do każdej karpy tylko jednego przewodnika zapewnia przetrwanie roślin w dobrej kondycji, a jednocześnie powoduje zmniejszenie nakładów na uprawę chmielu (mniejsza liczba przewodników, mniejsze nakłady pracy na naprowadzanie roślin i zbiór, oszczędność środków ochrony roślin). Te radykalne działania nie przyniosły znacznej poprawy sytuacji. W 2010 r. ilość chmielu, jaka pozostała w magazynach plantatorskich, oszacowano na 337 t, natomiast w roku 2011 było to 259 t (dane MRiRW).

W Polsce uprawiane są zarówno odmiany goryczkowe, jak i aromatyczne, ale ich areał w ciągu ostatnich lat uległ dość istotnym zmianom (rys. 6).



Rys. 6. Areał odmian aromatycznych i goryczkowych w Polsce w latach 2005-2012

Źródło: Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, MRiRW (11).

Przede wszystkim obserwuje się systematyczne zwiększanie dysproporcji pomiędzy odmianami aromatycznymi i goryczkowymi, na korzyść tych ostatnich. Wynika to przede wszystkim z małej opłacalności produkcji odmian aromatycznych. Ich ceny od wielu lat nie rekompensują zwiększonych nakładów na uprawę, dlatego wielu plantatorów zdecydowało się na zastąpienie odmian aromatycznych goryczkowymi. Powierzchnia odmian aromatycznych w Polsce zmniejszyła się z 865,8 ha w 2005 r. do 461,8 ha w 2012 r., tj. o 46,7%. W tym samym czasie powierzchnię bardziej opłacalnych odmian goryczkowych zredukowano o 27,8%. W 2012 r. ich areał stanowił 69,0% całkowitej powierzchni uprawy chmielu w Polsce, podczas gdy w roku 2005 było to 62,2%. Załamanie w sektorze uprawy chmielu, jakie nastąpiło po roku 2009, również w większym stopniu dotknęło odmiany aromatyczne niż goryczkowe (spadek areału odpowiednio o 34,4% oraz 29,7%).

Struktura odmianowa jest jednym z elementów wpływających na poziom produkcji alfa kwasów, bowiem odmiany goryczkowe i aromatyczne znacznie różnią się pod względem średniej koncentracji tego składnika w szyszkach. U odmian aromatycznych wartość ta kształtuje się w granicach 3-4%, natomiast u goryczkowych 8-14%. Zwiększanie powierzchni uprawy odmian goryczkowych, powoduje więc wzrost potencjału produkcyjnego alfa kwasów. Proces ten dodatkowo pogłębia się poprzez zmiany zachodzące w obrębie obu grup użytkowych, które polegają na zastąpieniu starszych, mniej wydajnych odmian, nowymi o wyższym potencjale plonowania i koncentracji alfa kwasów.

Produkcja alfa kwasów jest wypadkową areału chmielu, plonu z jednostki powierzchni oraz koncentracji tego składnika w szyszkach. Te dwa ostatnie elementy są w dużym stopniu modyfikowane przez warunki agroklimatyczne w poszczególnych latach uprawy. Z tego powodu poziom produkcji alfa kwasów wykazuje dość znaczne zróżnicowanie w poszczególnych latach (tab. 4).

Tabela 4

Produkcja chmielu oraz alfa kwasów w Polsce w latach 2006-2011

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Odmiany goryczkowe (t)	2 014,5	2 335,8	2 359,1	2 717,9	1453,4	1761,2
Odmiany aromatyczne (t)	874,4	920,3	1 086,8	974,3	376,0	500,9
Ogółem chmiel (t)	2 888,9	3 256,1	3 445,9	3 692,2	1829,4	2262,1
Alfa kwasy (t)	172,4	330,6	326,0	214,3	120,8	194,5

Źródło: Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, MRiRW (11).

Tabela 5

Produkcja piwa w Polsce oraz zapotrzebowanie na alfa kwasy w latach 2004-2012

Rok produkcji	Produkcja alfa kwasów** (t)	Rok zużycia alfa kwasów	Produkcja piwa*** (mln hl)	Dawka alfa kwasów* ($g \cdot hl^{-1}$)	Zapotrzebowanie na alfa kwasy (t) (d•e)	Bilans alfa kwasów (t) (b-f)
a	b	c	d	e	f	g
2004	215,0	2005	30,4	7,0	212,8	+ 2,2
2005	237,0	2006	32,5	7,0	227,5	+ 9,5
2006	172,4	2007	35,6	6,5	231,4	- 59,0
2007	330,6	2008	36,3	6,3	228,7	+ 101,9
2008	326,0	2009	32,9	6,0	197,4	+ 128,6
2009	214,3	2010	33,5	5,5	184,3	+ 30,0
2010	120,8	2011	34,9	5,5	192,0	- 71,2
2011	194,5	2012	35,0*	5,5	192,5	+ 2,0

*dane szacunkowe

Źródło: ** MRiRW (11); *** Canadean & Döhler Polska (w 7); Hopsteiner Committed to the Brewer. 2011 Guidelines for Hop Buying. (www.hopsteiner.com/pdf/Guidelines_2011.pdf) (9).

Produkcja piwa w Polsce dynamicznie wzrastała do roku 2008, po czym zanotowano lekki spadek i stabilizację na poziomie około 34-35 mln hektolitrów rocznie (tab. 5). Dawki alfa kwasów stosowane do chmielenia piwa w Polsce są wyższe od średniej światowej, ale i w naszym kraju zaznacza się tendencja do ich stopniowego zmniejszania z około 7 $g \cdot hl^{-1}$ w latach 90. do 5,5 $g \cdot hl^{-1}$ w chwili obecnej. Z analizy zapotrzebowania browarów i poziomu produkcji alfa kwasów wynika, że w ostatnich latach dwukrotnie wystąpił znaczny niedobór tego składnika na rynku. Taka sytuacja miała miejsce w 2007 r., który był bardzo niekorzystny z powodu niskich plonów. Był też kolejnym rokiem, w którym zawartość alfa kwasów w szyszkach chmielu była zdecydowanie niższa od przeciętnej. Drugim rokiem, który zamknął się ujemnym bilansem alfa kwasów, był 2011. Tym razem przyczyną było drastyczne zmniejszenie areału z powodu dekoniunktury oraz powodzi. Poza tymi wyjątkowymi sytuacjami, przy przeciętnym poziomie plonowania i koncentracji alfa kwasów, produkcja chmielu w Polsce jest wystarczająca dla zaspokojenia potrzeb przemysłu piwowarskiego na

terenie kraju, a nawet je przewyższa. Należy jednak wziąć pod uwagę, że część naszego chmielu jest eksportowana, z drugiej strony krajowe browary importują znaczne ilości produktów chmielowych. Wg danych MRiRW w 2010 r. sprowadzono do Polski 1056 t granulatów chmielowych oraz 121 t ekstraktów. Przy założeniu, że średnia zawartość alfa kwasów w granulacie (typ 90) wynosi 8%, a w ekstrakcie 45%, sprowadzono do naszego kraju około 139 t alfa kwasów, co stanowiło blisko 75% szacowanego zapotrzebowania. Sytuacja powtórzyła się również w 2011 r., gdy zaimportowano ok 117 t alfa kwasów w postaci granulatów i ekstraktów, co pokryło 61% zapotrzebowania krajowych browarów. Niestety, eksport szyszek (1198 t w roku 2010 oraz 454 t w 2011) nie zrekompensował nadwyżki surowca powstałej w wyniku nadmiernego importu, w konsekwencji część chmielu wyprodukowanego przez polskich plantatorów nie została kupiona. Jest to tym bardziej zaskakujące, że – jak podaje MRiRW – wg danych Komisji Europejskiej ceny chmielu uzyskane w Polsce w sezonach 2009/10, 2010/11 oraz 2011/12 należały do najniższych w Europie. Średnia cena w naszym kraju wynosiła odpowiednio 2,79 EUR, 3,05 EUR oraz 2,77 EUR za kg szyszek chmielowych. Średnia cena w EU kształtowała się na poziomie 4,55 EUR, była więc od 33 do 39% wyższa.

Perspektywy

Niestety wydaje się, że w najbliższych latach sytuacja na rynku chmielu nie ulegnie radykalnej poprawie. Prawdopodobnie opłacalność produkcji chmielu pozostanie niska, bowiem w umowach kontraktacyjnych na lata 2012-2016 proponuje się ceny na poziomie 12-16 zł za kg szyszek, co praktycznie nie pokrywa wszystkich kosztów produkcji. Należy jednak podkreślić, że wielu plantatorów nadal nie ma podpisanych wieloletnich umów i będą oni sprzedawać chmiel po cenach wolnorynkowych. Poziom tych cen będzie zależał od rozwoju sytuacji na światowym rynku chmielu. Systematyczne zmniejszanie areału tego gatunku na świecie prawdopodobnie doprowadzi do wyrównania poziomu podaży i popytu, co w konsekwencji powinno spowodować wzrost cen surowca. Niestety, proces ten może być długotrwały ze względu na duże zapasy alfa kwasów zmagazynowane w postaci trwałych produktów, które są oferowane browarom po niskich cenach. Oznacza to, że w perspektywie kolejnych kilku lat ceny chmielu nie wzrosną znacząco. Sytuacja plantatorów będzie więc coraz trudniejsza. Na rynku utrzymają się ci, którzy będą w stanie obniżyć koszty produkcji tak, aby zachować rentowność gospodarstwa nawet przy niskim poziomie cen surowca.

Innym problemem jest przywrócenie stabilizacji zbytu chmielu. Z przeprowadzonej analizy wynika, że główną przyczyną trudności ze sprzedażą wyprodukowanego surowca jest nadmierny import do Polski produktów chmielowych. Pod wpływem nacisków ze strony MRiRW oraz przedstawicieli kupców i plantatorów chmielu, branża piwowarska podjęła zobowiązanie o sukcesywnym zwiększaniu

wykorzystania krajowego surowca. W 2013 r. browary mają zaspokoić 70% zapotrzebowania przy użyciu chmielu wyprodukowanego w Polsce, a w 2016 r. zadeklarowały korzystanie z polskiego surowca w 90%. Jeśli zobowiązania te wejdą w życie, w pewnym stopniu ustabilizują sytuację na krajowym rynku. Niestety, na wyraźne efekty tego rozwiązania trzeba również poczekać kilka lat.

Obserwowane w ostatnim czasie ożywienie w sektorze odmian aromatycznych jest spowodowane zmniejszeniem areału, co skutkuje niedoborami surowca z tych odmian na rynku. Drugim czynnikiem jest wzrost zainteresowania konsumentów piwami pełnymi, mocno chmielonymi oraz smakowymi. Ten sektor produkcji piwa w ostatnim czasie szybko się rozwija, co budzi nadzieję na wzrost zapotrzebowania na chmiel typu aromatycznego. Trzeba jednak pamiętać, że nadal jest to produkcja niszowa, co oznacza, że jej potrzeby mogą być bardzo szybko zaspokojone.

Nadzieję na ustabilizowanie sytuacji budzi fakt, że w 2012 r. większość kupców, chcąc zapewnić sobie pewny dostęp do surowca, zawarło z plantatorami chmielu długoletnie umowy kontraktacyjne. Takie umowy dają gwarancję zbytu surowca i uzyskania dochodu w dłuższej perspektywie czasowej, co przy uprawie gatunków wieloletnich, takich jak chmiel, jest szczególnie istotne.

Literatura

1. B a r a n o w s k i K. Stosowanie niskich dawek granulatów i ekstraktów chmielowych do produkcji klasycznych piw dolnej fermentacji. Przem. Ferm i Owoc. Warz., 2006, **9**: 19-21.
2. B i e n d l M., P i n z l C.: Hops and health. Wyd. German Hop Museum, Wolnzach, 2008.
3. D w o r n i k i e w i c z J.: Potencjał produkcyjny krajowego chmielarstwa a zapotrzebowanie browarów na surowiec. Przem. Ferm. i Owoc.Warz., 2004, **6**: 18-19.
4. D w o r n i k i e w i c z J.: Baza chmielarska w Polsce w 2005 r. Przem. Ferm. i Owoc.Warz., 2005, **5**: 28-29.
5. D w o r n i k i e w i c z J.: Stan aktualny i perspektywy uprawy chmielu w Polsce do roku 2020. Studia i Raporty IUNG-PIB, 2009, **14**:133-145.
6. E v a n s R.: Hops: A strange, strange world. Hop Market Report. Brewers'Guardian, November/December 2011: 55-59.
7. F r ą c e k G.: Możliwe innowacje produktowe w ramach kompetencji browaru. Przem. Ferm i Owoc. Warz., 2010, **7-8**: 22-23.
8. Hopsteiner Committed to the Brewer. 2008 Guidelines for Hop Buying. www.hopsteiner.com/pdf/Guidelines2008.pdf.
9. Hopsteiner Committed to the Brewer. 2011 Guidelines for Hop Buying. www.hopsteiner.com/pdf/Guidelines_2011.pdf.
10. M i g d a l J., Z a o r s k i T.: Poradnik plantatora chmielu. Wyd. IUNG Puławy, 1996.
11. MRiRW. Rynek chmielu (www.minrol.gov.pl/pol/Rynki-Rolne/Zintegrowany-System-Rolniczej-Informacji-Rynkowej/).
12. N e s v a d b a V.: Českе odrudy chmele. Chmelarstvi, 2009, **7-9**: 67-70.
13. N e s v a d b a V.: Variabilita vynosu u vysokoobsažných genotypu chmele (*Humulus lupulus L.*). Chmelarstvi, 2009, **7-9**: 70-72.
14. New hop breeding trend – hops with floral, citrus and fruity aromas. Bavarian State research Center for Agriculture. Annual Report 2011. Special Crop: Hops. March 2012: 50-53.

15. Raporty Międzynarodowej Organizacji Producentów Chmielu IHGC (www.hmelj-giz.si/ihgc/)
16. S e i g n e r E., L u t z A., E h r m a i e r H., E n g e l h a r d B.: Hercules. Hopfenrundschau International 2006/2007: 40-45.
17. Z a o r s k i T.: Zarys dziejów chmielarstwa polskiego. Wyd. IUNG Puławy, 2002.
18. Z u b L.: Uprawa chmielu. PWRiL, Warszawa, 1962.

Adres do korespondencji:

dr Urszula Skomra
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 220
e-mail: urszula.skomra@iung.pulawy.pl

S T U D I A I R A P O R T Y IUNG-PIB
ZESZYT 31(5) 2012

Urszula Skomra, Marcin Przybyś, Anna Trojak-Goluch

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

KIERUNKI BADAŃ NAUKOWYCH WSPIERAJĄCE DOSKONALENIE GENOTYPÓW CHMIELU*

Wstęp

Doskonalenie odmian chmielu jest jednym z najważniejszych czynników wzrostu produkcji. Wielkość i tempo postępu hodowlanego w chmielarstwie zależą od wykorzystania osiągnięć naukowych w zakresie genetycznych podstaw procesów i zjawisk związanych z ulepszaniem genotypów chmielu, a także wdrażania nowoczesnych metod wspierających prace hodowlane. W tworzeniu nowych odmian coraz szerzej wykorzystywane są techniki molekularne, ułatwiające dobór odpowiednich form rodzicielskich do krzyżowań oraz selekcję uzyskanych materiałów pod kątem pożądanych cech. Ulepszanie odmian chmielu wspomagane jest również metodami biotechnologicznymi, takimi jak poliploidyzacja genomów lub kultury tkankowe w warunkach *in vitro*. Zastosowanie nowoczesnych technologii do ulepszania genotypów chmielu będzie w najbliższej przyszłości jednym z najistotniejszych czynników wpływających na dynamikę postępu biologicznego w produkcji tego gatunku.

I. Markery molekularne

Rozwój technik molekularnych spowodował powstanie licznych systemów markerów molekularnych wspomagających prace hodowlane. Stwarza to możliwość prowadzenia selekcji roślin w oparciu o genotyp, a nie tylko na podstawie obserwacji fenotypowych. Dzięki temu proces selekcji został znacznie skrócony i przede wszystkim uniezależniony od warunków środowiska. Markery molekularne pozwalają na wykrywanie różnic w genomie na poziomie sekwencji nukleotydowej. Mogą więc być bardzo przydatnym narzędziem do precyzyjnego rozróżniania odmian chmielu, ustalania ich pokrewieństwa, określania płci potomstwa oraz wykrywania obecności genów warunkujących odporność na choroby lub szkodniki, a także cechy jakościowe.

Znajomość genetycznego zróżnicowania odmian chmielu oraz stopnia ich pokrewieństwa jest szczególnie istotna dla hodowców, pomaga bowiem w precyzyj-

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

nym konstruowaniu programów hodowlanych. Dobór odpowiednich partnerów do krzyżowań pozwala realizować strategie hodowlane skierowane na uzyskanie różnorodnych celów. Prawidłowa identyfikacja genotypów chmielu jest również podstawą funkcjonowania banków genów. Cechy morfologiczne roślin oraz skład chemiczny szyszek podlegają wpływom warunków środowiskowych, dlatego charakteryzują się dużą zmiennością w latach i rejonach uprawy. Z tego powodu identyfikacja genotypów chmielu w oparciu o obserwacje roślin i analizy chemiczne surowca bywa niewystarczająca, szczególnie w przypadku braku danych o pochodzeniu obiektów. Analiza zmienności na poziomie DNA umożliwia prawidłową identyfikację genotypów podobnych czy wręcz identycznych pod względem genetycznym, a także pozwala na uzyskanie precyzyjnych informacji o pochodzeniu odmian oraz ich pokrewieństwie. Prawidłowa identyfikacja odmian chmielu jest również istotna dla przemysłu piwowarskiego. Każda odmiana chmielu jest specyficzna pod względem zawartości oraz składu żywic i olejków chmielowych, nadaje więc piwu charakterystyczny smak i aromat. Skład chemiczny szyszek chmielowych jest w dużym stopniu modyfikowany przez czynniki glebowe i klimatyczne w poszczególnych rejonach uprawy chmielu oraz latach zbioru. Z tego powodu rozróżnianie odmian chmielu na podstawie parametrów chemicznych bywa zawodne, a w przypadku mieszaniny odmian jest właściwie niemożliwe. Metody molekularne oparte na analizie DNA rozwiązują te problemy, ponieważ wspomagają i ostatecznie potwierdzają rezultaty uzyskane na podstawie badań morfologicznych oraz analiz chemicznych.

Jeszcze kilka lat temu najczęściej wykorzystywaną techniką do identyfikacji odmian chmielu była metoda RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA*). Polega ona na losowej amplifikacji polimorficznego DNA, dzięki zastosowaniu do reakcji PCR jednego dziesięcionukleotydowego startera o dowolnie wybranej sekwencji, co prowadzi do uzyskania kilku bądź kilkunastu produktów. T s u c h i y a i i n. (51) wykorzystali tę metodę do odróżnienia 12 komercyjnych odmian chmielu oraz potwierdzili jej skuteczność w rozpoznawaniu mieszaniny odmian. Š u s t a r - V o z l i č i J a v o r n i k (48) wykorzystali technikę RAPD do rozróżniania 65 odmian chmielu pochodzących z całego świata. Udało im się sklasyfikować poszczególne odmiany do grup europejskiej i północnoamerykańskiej. Użyteczność stosowania tej metody została również potwierdzona w kolejnych badaniach (30, 34). W ostatnich latach obserwuje się odejście od markerów molekularnych RAPD na rzecz markerów AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism*) oraz mikrosatelitarnych. Jest to spowodowane tym, że markery RAPD, pomimo swojej prostoty i łatwości generowania, mają jedną zasadniczą wadę – niską powtarzalność, wynikającą głównie z obniżonej temperatury przyłączania starterów podczas reakcji PCR. Uzyskiwanie markerów AFLP polega na trawieniu identyfikowanego DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi, które różnią się częstością rozpoznawania miejsc restrykcyjnych (52). Pierwszy enzym – najczęściej *Eco*RI, trawi DNA z małą

częstością, natomiast drugi – *Mse*I –z dużą. W wyniku działania enzymów otrzymuje się liczne fragmenty DNA, do których w kolejnym etapie AFLP dołączane są 10-30 nukleotydowe adaptory. Zawierają one dwie części – sekwencję rdzeniową o długości kilkunastu nukleotydów oraz sekwencję specyficzną dla miejsca restrykcyjnego. Na podstawie sekwencji adaptorów syntetyzuje się startery AFLP, które składają się z trzech części: regionu homologicznego do części rdzeniowej adaptora (przy końcu 5'), części środkowej odpowiadającej sekwencji miejsca restrykcyjnego oraz części selekcyjnej (przy końcu 3'). Po przyłączeniu adaptorów, DNA jest poddawane dwóm amplifikacjom PCR – preamplifikacji oraz selektywnej amplifikacji. Te dwa ostatnie etapy przebiegają z użyciem specyficznych starterów posiadających przy końcu 3' od jednego (w przypadku preamplifikacji) do czterech selekcyjnych nukleotydów (w przypadku selektywnej amplifikacji). Liczba nukleotydów obecnych przy końcu 3' startera zastosowanego w ostatnim etapie AFLP warunkuje liczbę otrzymanych fragmentów DNA. Im jest ich mniej, tym liczba uzyskanych w efekcie produktów PCR jest większa (52). Badania prowadzone z wykorzystaniem markerów AFLP pozwoliły na określenie zakresu zróżnicowania genetycznego wśród odmian uprawnych chmielu oraz źródeł ich pochodzenia (16, 38, 50). Większość badaczy wyróżniła dwie główne grupy odmian, odzwierciedlające ich pochodzenie oraz kierunki hodowli. Pierwsza grupa obejmuje głównie genotypy aromatyczne, wywodzące się od odmiany botanicznej *Humulus lupulus var. lupulus* występującej na terenie Europy, natomiast druga grupa zawiera odmiany goryczkowe, uzyskane przez krzyżowanie form europejskich z dzikimi genotypami północnoamerykańskimi.

Mikrosatelity, czyli proste powtórzenia sekwencji (SSR) (ang. *simple sequence repeats*) są krótkimi (1-5 par zasad), powtarzającymi się okresowo fragmentami sekwencji DNA, które w dużej liczbie występują w genomach eukariotycznych. Zmienność długości mikrosatelit wynika ze zmian w liczbie powtórzeń wspomnianych krótkich fragmentów, które są łatwo wykrywane za pomocą reakcji PCR (44). Dużą zaletą markerów mikrosatelitarnych jest ich kodominujący charakter, pozwalający na rozróżnienie u heterozygot komponentów pochodzących od form rodzicielskich. Pierwsze badania nad mikrosatelitami u chmielu prowadzili B r a d y i i n. (6). Wyselekcjonowali oni 4 markery mikrosatelitarne użyteczne w określaniu zróżnicowania genetycznego chmielu uprawnego i dzikiego. Podobne badania prowadzili J a k š e i i n. (21), którzy dla czterech *loci* mikrosatelitarnych zidentyfikowali 63 allele. W późniejszym okresie opracowano 25 markerów mikrosatelitarnych, o motywach GA, GT, ACA, AGA, CAG i ACTC, które amplifikowały 256 różnych alleli (44). J a k š e i i n. (20) podjęli próbę porównania możliwości określenia zmienności genetycznej za pomocą dwóch rodzajów markerów molekularnych: mikrosatelit i AFLP. Uzyskane metodą UPGMA dendrogramy pokrewieństw genetycznych badanych genotypów chmielu wykazywały niską korelację między dwoma systemami markerów. Dendrogram stworzony dla markerów mikrosatelitarnych

wykazywał dość dobre grupowanie spokrewnionych genotypów chmielu, podczas gdy dendrogram AFLP lepiej odwzorowywał pokrewieństwa ściśle związanych ze sobą genotypów, a ponadto umożliwił odróżnienie geograficznie odległych genotypów.

Do oceny zróżnicowania genetycznego chmielu na podstawie jego rDNA, wykorzystywane były także markery molekularne RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*) (35). Technika RFLP polega na generowaniu wielu fragmentów DNA powstających w czasie specyficznego trawienia za pomocą enzymów restrykcyjnych rozpoznających określone miejsca w łańcuchu DNA. Polimorfizm generowanych fragmentów wynika głównie z mutacji w miejscach restrykcyjnych. W chmielu rDNA występuje w dwóch wariantach długości 10,3 i 9,3 tysięcy par zasad i jest reprezentowane przez 3 fenotypy: A, B i C, które udało się ustalić dzięki zastosowaniu do trawienia restryktazy XhoI (35). Wyniki przeprowadzonych badań z wykorzystaniem markerów RFLP pozwoliły na stwierdzenie, że północnoamerykańskie odmiany chmielu wywodzą się ze skrzyżowania genotypów europejskich z miejscowymi – północnoamerykańskimi.

Techniki molekularne okazały się również niezwykle przydatnym narzędziem wspomagającym selekcję pożądanych genotypów chmielu w pracach hodowlanych. Markery molekularne związane z określonymi cechami pozwalają na szybką identyfikację właściwych osobników we wczesnych fazach rozwojowych roślin, co znacznie przyspiesza proces selekcji. W przypadku chmielu, który jest gatunkiem dwupiennym, niezwykle istotne jest wczesne rozpoznanie płci poszczególnych osobników. Jedynie osobniki żeńskie wytwarzają szyszki będące surowcem dla przemysłu piwowarskiego, dlatego podlegają one wielokierunkowej ocenie i selekcji w warunkach polowych. Obecność osobników męskich na plantacji jest niepożądana, ponieważ powodują one zapylenie kwiatostanów, a w konsekwencji wytworzenie nasion w szyszkach. Szyszki zawierające nasiona charakteryzują się gorszymi cechami jakościowymi, co utrudnia selekcję perspektywicznych genotypów. Zastosowanie markerów molekularnych pozwala na określenie płci roślin chmielu w fazie siewek. Eliminuje to konieczność oczekiwania na wytworzenie kwiatostanów, co w przypadku chmielu trwa zwykle 2-3 lata od wysiania nasion. W ostatnich latach opracowano markery mikrosatelitarne, stosowane do rozróżniania płci, wykrywające osobniki męskie. Zostały one opracowane dla chmielu europejskiego, północnoamerykańskiego i japońskiego (22). Do rozróżniania płci chmielu wykorzystano również markery ISSR (ang. *inter simple sequence repeat*). Duży polimorfizm markerów ISSR bazuje na dużej liczbie i wysokiej zmienności mikrosatelit w genomie. Startery reakcji PCR w tej technice zawierają fragmenty komplementarne do motywów mikrosatelit, ale również 1-3 nukleotydowe kotwice na końcu 5' lub 3'. Pozwalają one na amplifikację regionów pomiędzy sąsiadującymi motywami mikrosatelitarnymi (10). Testowano 25 starterów ISSR na chmielu pochodzącym

z Rosji i Europy. Dwa z nich generowały fragmenty specyficzne dla męskich roślin chmielu. Na podstawie sekwencji tych fragmentów opracowano dwie pary starterów dla markerów STS (ang. *sequence tagged site*) użytecznych do wykrywania osobników męskich (10).

Głównym zadaniem prac hodowlanych jest uzyskanie odmian chmielu odpowiadających wymaganiom przemysłu piwowarskiego oraz plantatorów. Podstawowymi cechami branymi pod uwagę w ocenie wartości odmian są potencjał plonowania i zawartość alfa kwasów. Cechy te oceniane są w roślinach chmielu bezpośrednio na podstawie pomiaru wielkości plonu szyszek oraz ich analizy chemicznej. Najczęściej pierwsze wyniki plonowania i zawartości alfa kwasów można uzyskać w trzecim roku wzrostu roślin w warunkach polowych, przy czym ocenę należy prowadzić przez kilka lat ze względu na duże uzależnienie tych cech od warunków pogodowych, szczególnie u roślin młodych. Powoduje to znaczne wydłużenie cyklu hodowlanego. W celu przyspieszenia selekcji oraz zwiększenia efektywności prac hodowlanych podejmowane są próby odnajdywania *loci* cech ilościowych QTL (ang. *quantitative trait loci*), dotyczących zawartości alfa kwasów oraz plonu. Č e r e n a k i J a v o r n i k (8) wykorzystały markery AFLP i mikrosatelitarne do poszukiwania *loci* związanych z syntezą alfa kwasów. Analiza wyników wykazała istnienie 4 potencjalnych QTL-ów (alpha 1-4). Dalsze badania doprowadziły do odnalezienia potencjalnych QTL-ów dla plonu oraz wagi suchych szyszek (9, 19).

Ważnym kierunkiem hodowli chmielu jest odporność na choroby i szkodniki. Klasyczna hodowla odpornościowa opiera się na selekcji prowadzonej w warunkach dużego nasilenia czynnika chorobotwórczego. Mogą to być warunki naturalne lub sztuczne, jednak w obu przypadkach selekcji pożądanych genotypów dokonuje się na podstawie reakcji rośliny gospodarza na czynnik chorobotwórczy. Reakcja ta może wyrażać się poprzez występowanie objawów chorobowych o różnym nasileniu, wówczas selekcję pożądanych pojedynków można przeprowadzić na podstawie obserwacji symptomów. W przypadku braku objawów choroby stosuje się laboratoryjne metody oceny, takie jak serologiczny test ELISA lub analiza PCR. Testy biologiczne posiadają wiele ograniczeń. Przede wszystkim są uzależnione od warunków środowiska, fazy rozwojowej rośliny gospodarza oraz patogeniczności czynnika chorobotwórczego. Wymagają dużej staranności wykonania i wielu powtórzeń, dlatego są bardzo pracochłonne. Znaczący wzrost efektywności prac hodowlanych można uzyskać stosując markery molekularne identyfikujące geny warunkujące cechę odporności. Markery pozwalają na precyzyjną selekcję pożądanych genotypów we wczesnej fazie rozwoju roślin, z pominięciem pracochłonnych testów odpornościowych. Dotychczas opracowano markery AFLP dla pochodzącego z odmiany WyeTarget genu R2 warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego chmielu (*Podosphaera macularis*). Obecnie znanych jest 6 markerów AFLP dla genu R2, przy czym dwa są szczególnie silnie sprzężone z cechą odporności (1,7cM) (39). Opracowano również 2 markery AFLP dla pochodzącego z odmiany Buket

genu Rbu, który podobnie jak R2 warunkuje odporność na mączniaka prawdziwego (40). Prowadzone są również prace nad opracowaniem markerów związanych z odpornością chmielu na mszycę śliwowo-chmielową oraz werticiliozę (8, 19).

W przyszłości markery molekularne będą stosowane coraz częściej, ponieważ w znaczny sposób przyspieszają proces hodowlany i ograniczają koszty. W chwili obecnej najczęściej stosowanym systemem markerów są mikrosatelity. Dotychczasowe badania z ich zastosowaniem ograniczały się do niewielkiej liczby markerów mikrosatelitarnych w granicach od 8 do 24 (4, 18, 22, 31), lecz ostatnio opracowano ponad 1000 nowych mikrosatelit (23). Większa liczba markerów molekularnych, które obejmują *loci* równomiernie rozłożone na chromosomach, jest niezbędna dla rozwoju narzędzi do mapowania genów, które znajdą zastosowanie w ulepszaniu roślin uprawnych (23). Dodatkowo, cały czas wprowadzane są nowe techniki, jak np. DarT (ang. *diversity arrays technology*) – bazująca na mikromacierzach. Przy użyciu tej metody zidentyfikowano ponad 700 polimorficznych markerów, które wykorzystano do rozróżniania chmielu pochodzącego z różnych rejonów geograficznych (17).

II. Poliploidyzacja genomów

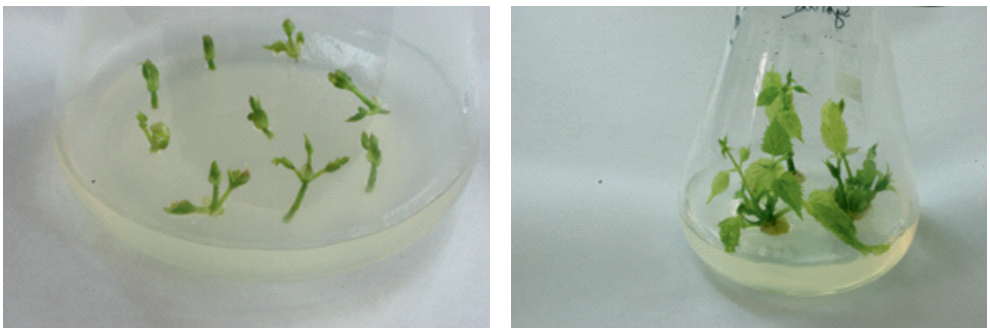
Szeroko stosowanym sposobem poprawy potencjału plonowania roślin uprawnych jest metoda poliploidyzacji genomów. W przypadku chmielu za najbardziej optymalny stopień ploidalności uważa się poziom triploidalny. Niewątpliwie największą zaletą triploidów (2n=3x=30 chromosomów) w porównaniu z roślinami diploidalnymi (2n=2x=20 chromosomów) jest to, że nie zawiązują one nasion w szyszkach (26). Z punktu widzenia przemysłu piwowarskiego, obecność nasion jest niepożądana, bowiem zawarte w nich tłuszcze i białka wpływają niekorzystnie na proces fermentacji piwa. Najważniejszą z użytkowego punktu widzenia właściwością jałowych roślin chmielu jest zdolność do wytwarzania wysokiej jakości surowca, tj. o większej zawartości żywic miękkich, garbników i polifenoli (24). Ponadto chmiel triploidalny, z uwagi na obecność dwóch genomów odmiany matecznej i jednego odmiany ojcowskiej, jest zbliżony genotypowo i fenotypowo do odmiany matecznej. W hodowli chmielu to podobieństwo roślin triploidalnych do osobników matecznych jest szczególnie istotne, gdyż pozwala na zachowanie większości korzystnych cech odmiany wyjściowej. Z drugiej jednak strony genom wniesiony przez rośliny męskie w mniejszym lub większym stopniu poszerza skalę zmienności gatunku oraz ułatwia otrzymanie genotypów o nowych cechach użytkowych, np. odporności na choroby. Wśród zalet chmielu triploidalnego należy również wymienić właściwość szybkiego zamykania szyszek po ich uformowaniu, co ogranicza możliwość porażenia przez grzyby *Pseudoperonospora humuli* i *Podosphaera macularis,* powodujące odpowiednio mączniaka rzekomego i prawdziwego chmielu (45). Szyszki są mniej podatne na kruszenie, co przy maszynowym zbiorze

i pakowaniu surowca pozwala uniknąć większych strat cennej dla browarnictwa lupuliny. Istnieje również pogląd, że rośliny triploidalne chmielu charakteryzuje większa niż w przypadku diploidów żywotność i bujność.

Próby badań nad poliploidalnym chmielem podjęto już w 1948 r., kiedy po raz pierwszy zastosowano chemiczną metodę poliploidyzacji roślin (11). W wyniku traktowania młodych siewek roztworem kolchicyny uzyskano rośliny miksoploidalne niektórych odmian chmielu. Wśród potomstwa otrzymanego ze swobodnego zapylenia zidentyfikowano rośliny triploidalne. Pionierskie prace D a r k' a (10) nad chmielem triploidalnym, kontynuowane były przez N e v e ' a (45), następnie przez H a u n o l d' a (13), a syntetyczne opracowanie na temat hodowli poliploidów chmielu zostało opracowane przez K r a l j (25). W Polsce prace zmierzające do otrzymania triploidów chmielu rozpoczęto pod koniec lat 60. ubiegłego stulecia w Wyższej Szkole Rolniczej w Lublinie (45). Kolejne badania prowadzono w latach 90., niestety nie zaowocowały one wprowadzeniem do rejestru triploidalnych odmian uprawnych.

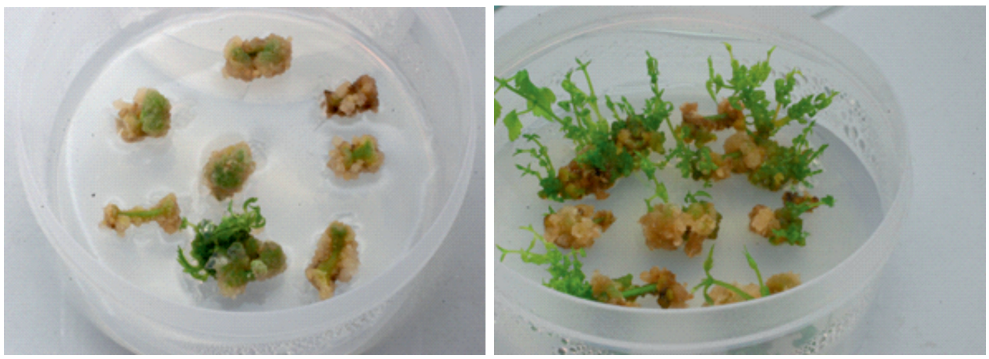
Notowany w ostatnich latach wzrost potencjału produkcyjnego i konkurencyjności zagranicznych odmian w stosunku do polskiego chmielu skłoniły do podjęcia prób uzyskania jego odmian triploidalnych. Prace prowadzone są w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach, a wybrane do badań odmiany reprezentują różne typy użytkowe. Jedną z nich jest goryczkowa odmiana 'Marynka', charakteryzująca się wysoką zawartością alfa kwasów oraz korzystnymi cechami aromatu. Kolejne to supergoryczkowa odmiana 'Iunga' o zawartości alfa kwasów przekraczającej 12% i bardzo wysokim potencjale plonowania oraz aromatyczna odmiana 'Sybilla'.

W procesie uzyskiwania roślin triploidalnych pośrednim ogniwem są rośliny tetraploidalne (2n=4x=40 chromosomów). Są one krzyżowane z diploidalnymi osobnikami męskimi, dając w potomstwie formy triploidalne. W badaniach zastosowano metodę indukcji tetraploidów z wykorzystaniem środków mutagennych. W tym celu merystemy wierzchołkowe pochodzące z roślin rosnących w warunkach *in vitro* umieszczano w płynnej pożywce MS zawierającej różne stężenia kolchicyny: 0,01%, 0,05%, 0,1%. Inkubacja materiału roślinnego przebiegała na wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 25°C przez 24h, 48h i 72h przy oświetleniu (20µmol $m^{2} \cdot s^{-1}$). Po zakończeniu ekspozycji stożki wzrostu płukano w wodzie, przenoszono na pożywkę agarową MS w celu wzrostu pędów, a następnie ryzogenezy (rys. 1). Ostatecznie, żywotne i dobrze ukorzenione rośliny przenoszono do miniszklarenek wypełnionych mieszaniną torfu z perlitem. Dalszy wzrost roślin przebiegał w szklarni (rys. 3).



a) b)

Rys. 1. Wzrost stożków wzrostu chmielu w kulturach *in vitro* po:
a) 5, b) 21dniach od zabiegu kolchicynowania
Źródło: dokumentacja własna.



a) b)

Rys. 2. Regeneracja pędów chmielu w kulturach *in vitro*. Fragmenty łodyg odmiany Sybilla po:
a) 1, b) 28 dniach wzrostu na podłożu wzbogaconym w IAA i BAP
Źródło: dokumentacja własna.

Rys. 3. Młode sadzonki tetraploidalnych roślin chmielu
Źródło: dokumentacja własna.

Prowadzono również próby uzyskania tetraploidów, polegające na wykorzystaniu znacznego poziomu naturalnej endopoliploidyzacji, występującej w komórkach somatycznych roślin. Zastosowano metodę organogenezy pośredniej pędów w kulturze *in vitro*. Technika ta jest uznawana za trudną z uwagi na to, że efektywność poliploidyzacji zależy od kilku czynników, między innymi od użytego genotypu, składu pożywki, zawartości hormonów, jak i źródła eksplantatu. Do badań użyto opisane powyżej trzy odmiany chmielu oraz dwa rodzaje eksplantatów: fragmenty łodyg i ogonków liściowych. Materiał roślinny, po uprzedniej dezynfekcji, wyłożono na pożywkę do indukcji tkanki kalusowej (32). Po upływie 8 tygodni kalus został przeniesiony na podłoża inicjujące tworzenie pędów (rys. 2). W celu poprawy potencjału organogenetycznego tkanki kalusowej do podłoży wzrostowych dodano kwas indolilo-3-octowy (IAA) w stężeniach 0,1 $mg \cdot l^{-1}$ 0,5 $mg \cdot l^{-1}$ w kombinacji z trzema cytokininami: benzyloaminopuriną (BAP) – 1mg/l i 2 mg/l, N6-2- isopentyl adeniną (2iP) – 3$mg \cdot l^{-1}$i 6 $mg \cdot l^{-1}$oraz rybozydem zeatyny 2$mg \cdot l^{-1}$ i 5 $mg \cdot l^{-1}$. Ogółem przetestowano 12 kombinacji pożywek. Wszystkie zregenerowane pędy o długości powyżej 1 cm odcinano od kalusa i przenoszono na pożywkę ukorzeniającą. Dobrze ukorzenione rośliny przenoszono do substratu torfowego i adaptowano do warunków szklarniowych (rys. 3).

W celu oceny stopnia ploidalności roślin poddanych działaniu kolchicyny, jak również uzyskanych w wyniku organogenezy pośredniej pędów, wykorzystano nowoczesną technikę pomiaru zawartości DNA z użyciem cytometru przepływowego Beckman Coulter Cell Lab Quanta™ S.C. Identyfikacja roślin tetraploidalnych odbywała się w fazie młodych sadzonek, co pozwoliło na wczesną selekcję genotypów różniących się stopniem ploidalności i ograniczenie zajmowanej powierzchni szklarniowej.

Analiza cytometryczna roślin traktowanych kolchicyną wykazała obecność osobników o różnym stopniu ploidalności, w tym diploidów 2n=2x=20, tetraploidów 2n=4x=40 oraz miksoploidów, tj. zawierających w tkankach somatycznych zarówno komórki diploidalne, jak i tetraploidalne. Spośród trzech badanych odmian największą efektywność poliploidyzacji uzyskano dla odmiany ‘Iunga’. W wyniku przeprowadzonych prac uzyskano ponad 70 roślin tetraploidalnych. W przypadku odmiany ‘Marynka’ skuteczność poliploidyzacji wyniosła od kilku do kilkudziesięciu procent. Efektem tego było uzyskanie 48 roślin tetraploidalnych. Najsłabiej zabiegowi poliploidyzacji poddała się odmiana ‘Sybilla’ z której uzyskano 28 tetraploidów.

Analiza zawartości DNA roślin uzyskanych w wyniku organogenezy pośredniej wykazała wyraźny wpływ genotypu na efektywność poliploidyzacji. Największy udział roślin tetraploidalnych stwierdzono u odmiany ‘Iunga’, a najmniejszy u odmiany ‘Marynka’. Ponadto na efektywność poliploidyzacji miał wpływ rodzaj użytego eksplantatu. U wszystkich badanych odmian największy procentowy udział tetraploidów stwierdzono wśród regenerantów uzyskanych z ogonków liściowych, a najmniejszy w populacji roślin zregenerowanych z łodygi.

Otrzymane w trakcie badań rośliny terapoidalne posłużyły jako materiał wyjściowy do uzyskania triploidów 2n=3x=30. Wykonano krzyżowania z dziko rosnącymi diploidalnymi osobnikami męskimi, w wyniku których uzyskano populację roślin triploidalnych. Rośliny te zostaną ocenione pod względem cech agronomicznych w następnych latach badań.

III. Kultury merystemów i uwalnianie roślin od wirusów i wiroidów

Specyfika uprawy chmielu, podobnie jak innych roślin wieloletnich, rodzi wiele problemów związanych z brakiem zmianowania. Jednym z nich jest systematyczne obniżanie się zdrowotności roślin, spowodowane nagromadzeniem patogenów, zarówno w roślinach jak i w glebie. Na plantacjach chmielu uprawia się wyłącznie rośliny żeńskie, które są rozmnażane w sposób wegetatywny, co dodatkowo sprzyja rozprzestrzenianiu patogenów. Sytuację tę potęguje fakt, że uprawa chmielu w Polsce jest bardzo skoncentrowana. Około 1300 ha, tj. blisko 83% areału, znajduje się w lubelskim rejonie uprawy, przy czym największe skupisko plantacji chmielu umiejscowione jest na żyznych madach nadwiślańskiej gminy Wilków. Szczególnie niebezpieczne dla upraw wieloletnich są patogeny, takie jak wirusy i wiroidy, których nie można zwalczać przy użyciu chemicznych metod ochrony roślin. Do najgroźniejszych wirusów występujących w roślinach chmielu należą: wirus mozaiki jabłoni *Apple mosaic virus* (ApMV) oraz wirus mozaiki chmielu *Hop mosaic virus* (HpMV) (41). Spośród wiroidów, na plantacjach chmielu w Polsce najczęściej notowany jest wiroid utajony chmielu *Hop latent viroid* (HpLVd) (43). Patogeny te występują powszechnie, nie powodując najczęściej widocznych objawów chorobowych. Mimo to, potencjał plonowania oraz koncentracja alfa kwasów w szyszkach porażonych roślin są najczęściej niższe w porównaniu ze zdrowymi (15, 28, 29, 33).

Brak widocznych objawów porażenia przez wirusy i wiroida utajonego utrudnia identyfikację roślin chorych i uniemożliwia ich eliminację z plantacji. Taka sytuacja powoduje niekontrolowane rozprzestrzenianie się patogenów i, w konsekwencji, zwiększanie liczby porażonych roślin wraz z wiekiem plantacji. Jest to powodem stopniowego obniżania się produktywności chmielników. Jedyną skuteczną metodą ograniczania tych patogenów jest stosowanie zdrowego materiału szkółkarskiego do zakładania nowych plantacji chmielu. Niestety, z powodu powszechnego występowania wirusów i wiroida utajonego w roślinach chmielu oraz bezobjawowego przebiegu infekcji, tradycyjny materiał rozmnożeniowy, jakim są sztobry, nie może być używany do produkcji zdrowych sadzonek. Sztobry pozyskuje się z istniejących plantacji chmielu podczas corocznego cięcia karp. Zabieg ten wykonywany jest w okresie spoczynku roślin, najczęściej wiosną, przed rozpoczęciem wegetacji, co niestety jest dodatkowym czynnikiem utrudniającym weryfikację zdrowotności rozmnażanych roślin. Wraz ze sztobrami, na nowo zakładane

plantacje przenoszone są wszystkie patogeny zasiedlające podziemne pędy chmielu, w tym również wirusy i wiroid utajony. Takie plantacje chmielu już w momencie ich zakładania charakteryzują się niską zdrowotnością roślin, co powoduje szybkie obniżenie produktywności.

Prace nad uzyskaniem zdrowego materiału szkółkarskiego chmielu skupiały się początkowo na uwalnianiu roślin od wirusów. W tym celu stosowano regenerację wierzchołków wzrostu połączoną z termoterapią w temperaturze 35°C (1). Metoda ta pozwalała na skuteczną eliminację wszystkich wirusów występujących w roślinach chmielu i była szeroko stosowana w programach produkcji zdrowego materiału szkółkarskiego w Wielkiej Brytanii, Niemczech, Republice Czeskiej oraz USA (2, 27, 37, 47). Metodę tę stosowano również w Polsce do uwalniania od wirusów naszych rodzimych odmian chmielu (7, 42). Niestety, regeneracja wierzchołków wzrostu połączona z termoterapią nie eliminowała z roślin chmielu innego groźnego patogena, jakim był wiroid utajony. Co więcej, wysoki poziom porażenia materiału roślinnego poddawanego termoterapii sugerował, że oddziaływanie wysokiej temperatury mogło stymulować namnażanie tego termofilnego patogena (3, 43). W celu uwolnienia roślin chmielu jednocześnie od wirusów i wiroida utajonego należało wyeliminować terapię podwyższoną temperaturą i zastąpić ją zastosowaniem merystemów do regeneracji w kulturach *in vitro*. Szybko dzielące się komórki merystemu są w mniejszym stopniu zasiedlane przez czynniki chorobotwórcze niż ma to miejsce w wyspecjalizowanych tkankach, dlatego istnieje duże prawdopodobieństwo, że rośliny wyprowadzone bezpośrednio z merystemów wierzchołkowych będą wolne od patogenów. Niezwykle istotna w tej metodzie jest dokładność izolacji merystemu oraz jego wielkość. Aby zwiększyć prawdopodobieństwo uzyskania roślin zdrowych należy pobierać merystemy małe, bez zawiązków liści. Z drugiej strony, bardzo małe merystemy mają mniejszą szansę na przeżycie po izolacji. Zarówno wielkość izolowanego merystemu, jak i warunki jego regeneracji w kulturach *in vitro* muszą być opracowane indywidualnie dla każdej odmiany chmielu. W Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach metoda ta została opracowana i wykorzystana w praktyce do eliminacji wirusów i wiroida utajonego z roślin czterech odmian chmielu (12, 13). W wyniku prowadzonych prac uzyskano ponad 330 000 całkowicie zdrowych sadzonek odmian ‘Magnum’, ‘Sybilla’, ‘Iunga’ i ‘Lubelski’.

Produkcja takiego elitarnego materiału szkółkarskiego przebiegała w dwóch etapach. W pierwszym etapie uzyskano rośliny poszczególnych odmian chmielu metodą regeneracji merystemów wierzchołkowych w warunkach *in vitro*. Regeneracja z merystemów wierzchołkowych nie gwarantuje, iż wszystkie rośliny będą wolne od patogenów, dlatego bardzo ważnym elementem procesu produkcji była diagnostyka roślin wyprowadzonych z kultur *in vitro* przy użyciu metod adekwatnych do rodzaju patogena. Do wykrywania obecności wirusów stosowano immunoenzymatyczną metodę

DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) z odpowiednim zestawem przeciwciał. Do detekcji wiroida wykorzystywano metodę molekularną opartą na technice RT-PCR. Jedynie rośliny otrzymane bezpośrednio z merystemów wierzchołkowych oraz zdiagnozowane jako wolne od wirusów i wiroida utajonego chmielu mogły stanowić rośliny mateczne, wykorzystywane jako materiał wyjściowy do kolejnych rozmnożeń. Drugi etap produkcji zdrowych sadzonek polegał na cyklicznym, wegetatywnym rozmnażaniu roślin matecznych przez sadzonki zielne uzyskane z niezdrewniałych fragmentów pędu obejmujących jedną parę liści. Metoda rozmnażania chmielu przez sadzonki zielne charakteryzuje się bardzo dużą wydajnością. Z jednej rośliny matecznej można uzyskać w sezonie wegetacyjnym ponad 100 roślin potomnych, podczas gdy metodą ukorzeniania sztobrów uzyskuje się tylko około 10 roślin. Celem wykluczenia obecności wirusów i wiroida utajonego na poszczególnych etapach produkcji, systematycznie przed każdym cięciem materiału matecznego prowadzono diagnozę w kierunku obecności tych patogenów. Ponadto w sposób losowy badano również gotowe sadzonki chmielu przeznaczone do przekazania plantatorom. Aby ograniczyć występowanie owadów będących wektorami wirusów, wszystkie okna w szklarni zabezpieczono specjalnymi siatkami ochronnymi, profilaktycznie wykonywano również zabiegi ochronne przeciwko niebezpiecznym dla chmielu szkodnikom i patogenom. Zachowanie tych środków ostrożności pozwoliło na uzyskanie materiału szkółkarskiego chmielu o najwyższym stopniu zdrowotności.

Wdrożenie do praktyki zdrowych sadzonek chmielu było znaczącym elementem poprawy jakości surowca. Szyszki uzyskane ze zdrowych roślin charakteryzowały się wyższą zawartością żywic ogółem, a szczególnie żywic miękkich, w porównaniu z surowcem pochodzącym z plantacji założonych przy użyciu sadzonek tradycyjnych, uzyskanych przez ukorzenianie sztobrów (tab. 1). Różnica w koncentracji alfa kwasów była szczególnie duża w przypadku odmiany ‘Lubelski’, która jest uprawiana od ponad 40 lat i jest bardzo silnie porażona przez wirusy, co wynika z badań prowadzonych w IUNG (41). Zdrowe rośliny tej odmiany charakteryzowały się zawartością alfa kwasów wyższą o ponad 72% w porównaniu z porażonymi. Uwolnienie roślin chmielu od wirusów i wiroida utajonego wpływało również korzystnie na zawartość olejków eterycznych oraz ich skład (tab. 2). Szczególnie duży wzrost zawartości olejków obserwowano u odmiany ‘Iunga’. W szyszkach z roślin wolnych od wspomnianych wyżej patogenów była ona wyższa o 47%. Chmiel odmiany ‘Lubelski’ charakteryzował się nie tylko wyższą zawartością olejku, ale również jego lepszym składem. W olejku z tego chmielu obserwowano wyższą zawartość składników, które korzystnie wpływają na aromat piwa, tj. humulenu, kariofilenu oraz farnezenu, zmniejszyła się natomiast zawartość niekorzystnego myrcenu.

Wyższa jakość surowca przekłada się na wzrost dochodu gospodarstw chmielarskich, bowiem cena chmielu uzależniona jest często od zawartości alfa kwasów w szyszkach. Ponadto surowiec taki łatwiej znajduje nabywcę, co jest niezwykle

istotne w obecnej, bardzo trudnej sytuacji na rynku chmielu. Innym bardzo ważnym aspektem stosowania zdrowego materiału szkółkarskiego jest ograniczenie rozprzestrzeniania się patogenów. Powszechnie stosowana praktyka pozyskiwania sadzonek z istniejących chmielników prowadzi często do rozmnażania roślin starych, porażonych przez czynniki chorobotwórcze lub też wykazujących znaczny stopień degeneracji, spowodowany wieloletnią uprawą w monokulturze. Sztobry pozyskiwane są z roślin będących w stanie spoczynku i pozbawionych części nadziemnej, co utrudnia eliminację egzemplarzy wykazujących niekorzystne cechy lub objawy chorobowe. W Polsce plantacje chmielu, z których pozyskiwany jest materiał rozmnożeniowy, nie podlegają kwalifikacji przez wyspecjalizowane inspekcje. Decyzja o rozmnażaniu roślin jest uzależniona wyłącznie od plantatora, który często nie jest świadomy istniejących zagrożeń. W przypadku wirusów i wiroida utajonego

Tabela 1

Zawartość żywic chmielowych (wg Wöllmera) w szyszkach odmian 'Lubelski' i 'Iunga' pochodzących z roślin zdrowych oraz porażonych przez wirusy i wiroida utajonego chmielu

Badana odmiana chmielu		Żywice ogółem (% s. m.)	Żywice miękkie (% s. m.)	Żywice twarde (% s. m.)	Alfa kwasy (KW) (% s. m.)	Frakcja beta (% s. m.)
'Lubelski'	szyszki z roślin zdrowych	19,3	17,0	2,3	7,6	9,4
	szyszki z roślin porażonych	15,6	13,7	1,9	4,4	9,3
'Iunga'	szyszki z roślin zdrowych	29,4	25,9	3,5	14,5	11,4
	szyszki z roślin porażonych	28,1	24,4	3,7	12,8	11,6

Źródło: wyniki badań własnych.

Tabela 2

Zawartość i skład olejków chmielowych w szyszkach odmian 'Lubelski' i 'Iunga' pochodzących z roślin zdrowych oraz porażonych przez wirusy i wiroida utajonego chmielu

Badana odmiana chmielu		Olejki ogółem ($ml \cdot 100g^{-1}$)	Myrcen (%)	Humulen (%)	Kariofilen (%)	Farnezen (%)
'Lubelski'	szyszki z roślin zdrowych	1,4	39,4	33,9	7,2	1,3
	szyszki z roślin porażonych	1,2	46,7	25,2	6,3	0,9
'Iunga'	szyszki z roślin zdrowych	2,2	59,8	15,7	6,0	0,7
	szyszki z roślin porażonych	1,5	52,0	25,3	5,2	1,3

Źródło: wyniki badań własnych.

chmielu, nawet staranna weryfikacja zdrowotności, przeprowadzona w pełni sezonu wegetacyjnego, nie zapobiega rozmnożeniu roślin porażonych, gdyż patogeny te najczęściej nie wywołują widocznych objawów chorobowych. Tradycyjna metoda rozmnażania chmielu z wykorzystaniem sztobrów stwarza więc wysokie ryzyko przeniesienia wielu groźnych czynników chorobotwórczych na nowe plantacje.

Podsumowanie

Wykorzystanie w doskonaleniu genotypów chmielu metod i technologii opartych na najnowszej wiedzy ułatwia wybór odpowiednich komponentów rodzicielskich do krzyżowań, wpływa na zwiększenie efektywności selekcji oraz umożliwia ocenę materiałów hodowlanych we wczesnych stadiach rozwoju roślin, co ogranicza liczebność genotypów przeznaczonych do dalszych etapów hodowli. Wymiernym efektem wdrożenia tych technik jest skrócenie cyklu hodowlanego oraz obniżenie kosztów wytworzenia nowych odmian o pożądanych cechach. Intensyfikacja prac hodowlanych jest niezwykle istotna z uwagi na dużą dynamikę zmian na rynku chmielu.

Podstawowym czynnikiem wpływającym na zakres wykorzystania postępu biologicznego jest zasób wiedzy producentów. Dzięki stałej współpracy pomiędzy środowiskiem naukowym a plantatorami chmielu, efekty badań są wdrażane do praktyki, przyczyniając się do unowocześnienia produkcji oraz wzrostu jej efektywności.

Literatura

1. A d a m s A. N.: Elimination of viruses from the hop (*Humulus lupulus*) by heat therapy and meristem culture. J. Hort. Sci., 1975, **50**: 151-160.
2. A d a m s A. N., D a r b y P., E b b e l s D. L.: Production and distribution of virus-tested hops in the U.K. Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases, Rauischholzhausen (A. Eppler Edt.) Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 1989: 127-130.
3. B a r b a r a D. J., M o r t o n A., A d a m s A. N.: Assessment of UK hops for the occurrence of hop latent and hop stunt viroids. Ann. appl. Biol., 1990, **116**: 265-272.
4. B a s s i l N. V., G i l m o r e B.: Genic SSRs for European and North American hop (*Humulus lupulus* L.) Genetic Resources and Crop Evolution, 2008, **55**: 959-969.
5. B r a d y J. L., S c o t t M. R., T h o m a s M. R.: DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS), Euphytica, 1996, **91**: 277-284.
6. C a j z a M., Z i e l i ń s k a L., L u b i k M.: Elimination of viruses from the hop and propagation of virus-free plant material in the west Poland. Journal of Plant Protection Research, 1996, **37**: 59-66.
7. Č e r e n a k A., J a v o r n i k B.: Marker assisted selection in hop breeding. Acta Hort., 2005, **668**: 35-39.
8. Č e r e n a k A., S a t o v i c Z., J a k š e J., L u t h a r Z., C a r o v i c - S t a n k o K., J a v o r n i k B.: Identification of QTLs for alpha acid content and yield in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica, 2009, **170**: 141-154.

9. Danilova T. V., Karlov G. I.: Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica, 2006, **151**: 15-21.
10. Dark S. O. S.: The use of poliploidy in hop breeding. Wye College, University of London, Dept. of Hop Research. Annual Report, 1952: 34.
11. Doroszewska T., Skomra U., Przybyś M., Czubacka A., Grudzińska-Sterno M.: Uzyskiwanie zdrowych sadzonek chmielu jako element restrukturyzacji odmianowej. Studia i Raporty IUNG-PIB, 2008, **13**: 97-110.
12. Grudzińska M., Solarska E., Czubacka A., Przybyś M., Fajbuś A.: Elimination of *Hop latent viroid* from hop plants by cold treatment and meristem tip culture. Phytopathol. Pol., 2006, **40**: 21-30.
13. Haunold A.: Polyploid breeding with hop *Humulus lupulus* L. Technical Quarterly Master Brewers Assoc. of America, 1972, **9(1)**: 36-40.
14. Hay F. S., Close R. C., Beatson R.: The effect of virus infection on the yield and alpha/beta-acid content of the hop variety Superalpha. Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases, Rauischholzhausen (A. Eppler Edt.) Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 1989: 137-148.
15. Henning J. A., Steiner J. J., Hummer K. E.: Genetic diversity among world hop accessions grown in the USA. Crop Sci., 2004, **44**: 411-417.
16. Howard E. L., Whittock S. P., Jakše J., Carling J., Matthews P. D., Probasco G., Henning J. A., Darby P., Čerenak A., Javornik B., Kilian A., Koutoulis A.: High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DArT). Theoretical and Applied Genetics, 2011, **122:** 1265-1280.
17. Jakše J., Bandelj D.: Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). Molecular Ecology Notes, 2002, **2(4)**: 544-546.
18. Jakše J., Čerenak A., Radišek S., Satovic Z., Luthar Z., Javornik B.: QTL mapping of verticillium resistance and yield traits in hop. Proc. of the Sci. Com. IHGC, Lublin, Poland, 2011: 45-47.
19. Jakše J., Kindlhofer K., Javornik B.: Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. Genome, 2001, **44**: 773-782.
20. Jakše J., Satovic Z., Javornik B.: Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). Genome, 2004, **47**: 889-899.
21. Jakše J., Stajner N., Kozjak P., Čerenak A., Javornik B.: Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). Molecular Breeding, 2008, **21**: 139-148.
22. Koelling J., Coles M. C., Matthews P. D., Schwekendiek A.: Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. Molecular Breeding, 2012, **30**: 479-484.
23. Koutoulis A., Roy A. T., Price A., Sherriff L, Leggett G.: DNA ploidy level of colchicine treated hops (*Humulus lupulus* L.), Scientia Horticulturae, 2005, **105**: 263-268.
24. Kralj D.: Diploid and polyploid breeding with hop. EUCARPIA Meeting Section on Mutation and Poliploidy, Novi Sad, 1976.
25. Kralj D., Kump M.: Polyploidy in hop breeding, *Humulus lupulus* L. In.: Horn W., Jensen, C. J., Odenbach W., Schieder O.: Genetic Manipulation in Plant Breeding. Walter de Gruyter and Co., Berlin and New York, Germany, 1986.
26. Kremheller H. Th., Ehrmaier H., Gmelch F., Hesse H.: Production and propagation of virus-free hops in Bavaria, Federal Republic of Germany. Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases, Rauischholzhausen (A. Eppler Edt.) Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 1989: 131-134.

27. Kremheller H. Th., Ehrmaier H., Roβbauer G.: Reinfection of virus-free hop plantings with prunus necrotic ringspot and hop mosaic – viruses and the effect of these viruses on yield, alpha-acids and symptom expression. Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases, Rauischholzhausen (A. Eppler Edt.) Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 1989: 149-156.
28. Krofta K., Kroupa F.: Qualitative indicators of virus-free hops of Czech provenance. Rostlinna Vyroba, 1995, **8**: 383-388.
29. Murakami A.: Hop variety classification using the genetic distance based on RAPD. J. Inst. Brew., 2000, **106**: 157-161.
30. Murakami A., Darby P.: Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, **53**: 1553-1562.
31. Okada Y., Saeki K., Inaba A., Suda N., Kaneko T., Ito K.,: Consruction of gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter. Journal of Plant Physiology, 2003, **160**: 1101-1108.
32. Patzak J., Matoušek J., Krofta K., Svoboda P.: Pathogenic effects of HLVd. Proc. Sci. Commission. Canterbury, England, 2001: 52-56.
33. Patzak J., Svoboda P., Oriniakova P., Matoušek J.: Czech hop characterization using RAPD method and genetic distance analysis of selected genotypes. Rostlinna Vyroba, 1999, **45(4)**: 165-172.
34. Pillay M., Kenny S. T.: Structure and inheritance of ribosomal DNA variants in cultivated and wild hop, *Humulus lupulus* L. Theoretical Applied Genetics, 1996, **93**: 333-340.
35. Probasco G., Winslow S.: The use of shoot-tip culture to eliminate viruses from hop varieties grown in the United States. MBAA Technical Quarterly, 1986, **23**: 26-31.
36. Seefelder S., Ehrmaier H., Schweizer G., Seigner E.: Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. Plant Breeding, 2000, **119**: 257-263.
37. Seefelder S., Lutz A., Seigner E.: Mapping of a powdery mildew resistance gene in hop (*Humulus lupulus* L.). IHGC Proceedings of the Scientific Commission, George, 20-25 February 2005, South Africa: 31-34.
38. Seefelder S., Seigner E.: Molecular markers for powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) resistance in hops. IHGC Proceedings of the Scientific Commission, Dobrna-Žalec, 24-27 June 2003, Slovenia: 8-11.
39. Skomra U.: Występowanie wirusów w roślinach chmielu (*Humulus lupulus* L.) na Lubelszczyźnie. Pam. Puł., 2001, **126**: 107-124.
40. Solarska E., Skomra U.: Uszlachetnianie materiału nasiennego chmielu. Uszlachetnianie materiałów nasiennych – materiały konferencyjne, Olsztyn-Kortowo, 1994: 301-304.
41. Solarska E., Skomra U., Kitlińska J., Wojcierowski J.: The occurrence of hop latent viroid (HLVd) in hop plants in Poland. Phytopathol. Pol., 1995, **10**: 55-59.
42. Stajner N., Jakše J., Kozjak P., Javornik B.: The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Science, 2005, **168**: 213-221.
43. Svoboda P.: Kultivace izolowanych vrcholů chmiele (*Humulus lupulus* L.) *in vitro*. Rostlinna Vyroba, 1992, **38**: 523-528.
44. Šustar-Vozlič J. Š., Javornik B.: Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. Plant Breeding, 1991, **118(2)**: 175-181.
45. Tarkowski C., Zub L.: Chmiel poliploidalny i jego wartość użytkowa. Postępy Nauk Rolniczych, 1959, **2(56)**: 45-50.
46. Townsend M. S., Henning J. A.: Potential heterotic groups in hop as determined by AFLP analysis. Crop Sci. 2005, **45**: 1901-1907.

47. Tsuchiya Y., Araki S., Takashio M., Tamaki T.: Identification of hop varieties using specific primers derived from RAPD markers. J. Ferment. Bioeng.,1997, **84 (2)**: 103-107.
48. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.: AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 1995, **23(21)**: 4407- 4414.

Adres do korespondencji:

dr Urszula Skomra
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 220
e-mail: urszula.skomra@iung.pulawy.pl

ZESZYT 31(5) STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB 2012

Monika Agacka, Urszula Skomra

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

CHMIEL JAKO ŹRÓDŁO BIOAKTYWNYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH DLA PRZEMYSŁU PIWOWARSKIEGO I FARMACEUTYCZNEGO*

Wstęp

Chmiel zwyczajny *Humulus lupulus* L. jest powszechnie wykorzystywany przez przemysł browarniczy do produkcji piwa. Ten wieloletni gatunek należący do rodziny konopiowatych (*Cannabaceae*) odznacza się dwupiennością. Na plantacjach produkcyjnych uprawiane są tylko osobniki żeńskie, które wytwarzają owocostany zwane szyszkami. Szyszki są surowcem dla przemysłu piwowarskiego, który wykorzystuje ponad 95% chmielu wyprodukowanego na świecie (26). W szyszkach występują specyficzne związki chemiczne, nadające piwu charakterystyczny smak i aromat. Najcenniejsze składniki znajdują się w lupulinie, która jest produkowana przez gruczoły lupulinowe rozmieszczone na listkach okwiatu i okrywy kwiatowej szyszki chmielowej (fot. 1).

Nieco mniej znane jest wykorzystanie chmielu w farmacji, medycynie oraz przemyśle kosmetycznym. Chmiel jest składnikiem preparatów o działaniu uspokajającym i ułatwiającym zasypianie. Stosowany jest również do produkcji szamponów oraz kremów i mleczek opóźniających procesy starzenia, a także jako składnik kąpieli regenerujących.

Wyniki badań wskazują, że metabolity wtórne chmielu charakteryzują się wielokierunkową aktywnością biologiczną, co otwiera nowe możliwości dla wykorzystania chmielu poza przemysłem piwowarskim (10, 12, 13, 14, 15, 17, 26, 27).

1. Chmiel jako surowiec do produkcji piwa

Piwo to napój otrzymany w wyniku fermentacji alkoholowej. Podstawowymi surowcami wykorzystywanymi w produkcji piwa są: woda, drożdże, jęczmień i chmiel. Chmiel odgrywa szczególną rolę, bowiem zawarte w szyszkach żywice i olejki nadają piwu niepowtarzalny smak i aromat. Przypuszczalnie po raz pierwszy piwo wytworzyli Sumerowie około 6500 lat temu, natomiast najstarsze wzmianki

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

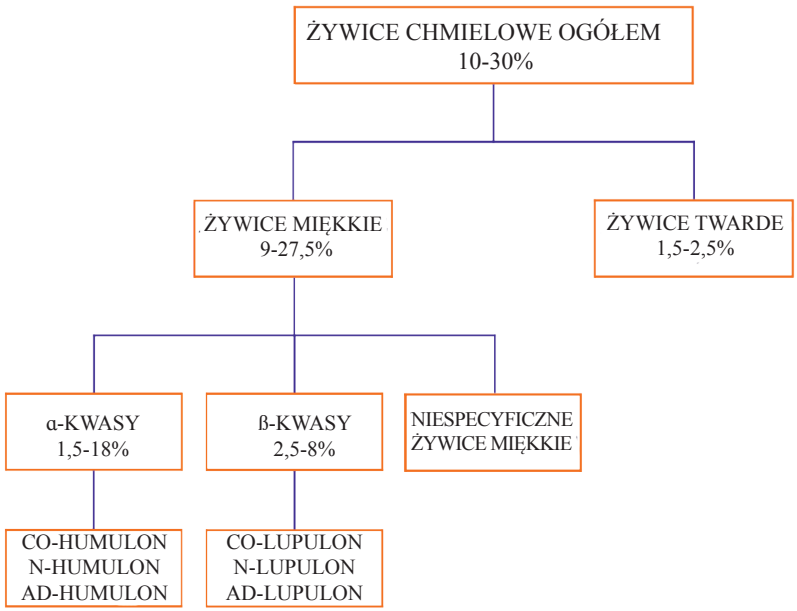
Fot. 1 Owocostan chmielu zwyczajnego. Na przekroju widoczne gruczoły lupulinowe.
Źródło: dokumentacja własna.

o produkcji piwa w krajach słowiańskich pochodzą z V wieku (28). Jednak znaczący wzrost produkcji piwa nastąpił w XIX wieku, dzięki wprowadzeniu innowacji technicznych oraz pasteryzacji wydłużającej przydatność piwa do spożycia. Produkcja piwa w tamtym czasie kształtowała się na poziomie 247,4 mln hektolitrów (28). Obecnie piwo jest produkowane na wszystkich kontynentach, a jego popularność stale rośnie. W 2011 roku światowa produkcja piwa wyniosła 1,92 miliarda hektolitrów. W Polsce wyprodukowano 37,8 mln hektolitrów piwa, co plasuje nasz kraj na czwartym miejscu w Europie i dziewiątym na świecie (18).

Żywice chmielowe

Najważniejszymi składnikami chmielu wykorzystywanymi przez przemysł browarniczy w procesie produkcji piwa są żywice chmielowe. Podziału żywic na poszczególne frakcje dokonano ze względu na ich zróżnicowane powinowactwo do rozpuszczalników organicznych. Żywice chmielowe dzielą się na żywice miękkie i żywice twarde (rys. 1). W skład żywic miękkich wchodzą głównie alfa i beta kwasy oraz niespecyficzne żywice miękkie.

Największe znaczenie w kształtowaniu charakterystycznej goryczki chmielowej w piwie mają alfa kwasy. Są one mieszaniną optycznie czynnych homologów, składającą się z humulonu (35-70%), kohumulonu (20-65%) i adhumulonu (10-15%) (26). Zawartość humulonu i kohumulonu jest warunkowana genetycznie i charakterystyczna dla poszczególnych odmian chmielu, natomiast w przypadku adhumulonu nie stwierdzono istotnych różnic odmianowych (11, 26). Alfa kwasy są słabo rozpuszczalne w wodzie, ale w trakcie warzenia piwa ulegają one izomeryzacji do dobrze rozpuszczalnych izo-alfa kwasów. Kwasy te stanowią ponad 80% wszystkich komponentów chmielowych, które znajdują się w piwie i to głównie one odpowiadają za szlachetną goryczkę (10, 26). Izo-alfa kwasy nie tylko decydują o charakterystycznym smaku piwa, ale również stabilizują pianę oraz działają bakteriostatycznie. Ich rola w stabilizowaniu piany w piwie polega na reakcji



Rys. 1. Podział żywic chmielowych

Źródło:Briendl, Pinzl, 2000; Analitica EBC Section 7 Hops (1, 8).

z polipeptydami (19, 26). Największy udział w tym procesie mają izohumulon i izoadhumulon, których zawartość w piwie jest dużo wyższa niż izokohumulonu. Dodatkowe poprawienie trwałości piany można uzyskać stosując zredukowane zizomeryzowane ekstrakty chmielowe, zawierające w swoim składzie di-hydro-izo-alfa kwasy oraz tetra-hydro-izo-alfa kwasy, które w większym stopniu niż izo-alfa kwasy wzmacniają trwałość piany (19). Właściwości antybakteryjne izo-alfa kwasów odgrywają szczególną rolę, ponieważ chronią piwo przed rozwojem bakterii pełniąc rolę naturalnych konserwantów. Izo-alfa kwasy wykazują działanie antyseptyczne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, takich jak: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphyllococcus* czy *Bacillus*. Bakterie Gram-ujemne (np. *Escherichia coli*) są zupełnie odporne na działanie izo-alfa kwasów albo reagują jedynie przy ich bardzo wysokim stężeniu (26, 27).

Drugim bardzo ważnym komponentem żywic miękkich są beta kwasy, które składają się z nieczynnych optycznie homologów: lupulonu (20-55%), kolupulonu (20-55%) i adlupulonu (10-15%) (11, 26). Beta kwasy bardzo łatwo ulegają utlenianiu, a ich pochodne charakteryzują się silnymi właściwościami goryczkowymi. Wykazano, że beta kwasy ograniczają niekorzystne procesy utleniania w piwie, jednak ich wysoka zawartość wpływa niekorzystnie na walory smakowe tego napoju, bowiem powodują one mniej szlachetną goryczkę (5, 11, 26).

Żywice twarde powstają w wyniku utleniania i polimeryzacji żywic miękkich (głównie alfa i beta kwasów); procesy te zachodzą intensywnie w trakcie prze-

chowywania chmielu i zależą od temperatury, wilgotności oraz dostępu do światła i tlenu (6). Utlenianie i polimeryzacja żywic miękkich do żywic twardych są procesami niekorzystnymi, wpływają na tzw. „zestarzenie" chmielu, podczas którego traci on wartość goryczkową i technologiczną. Piwo wyprodukowane z chmielu o podwyższonej zawartości żywic twardych charakteryzuje się ostrą, nieprzyjemną goryczką, co ma negatywny wpływ na jego smak i aromat (6). Najbardziej narażony na niekorzystne procesy utleniania jest chmiel nieprzetworzony, w dużo mniejszym stopniu granulat chmielowy, natomiast ekstrakty, powstające przy użyciu ciekłego dwutlenku węgla, nie wykazują praktycznie żadnych zmian w składzie żywic w czasie kilkuletniego przechowywania (9).

Olejki chmielowe

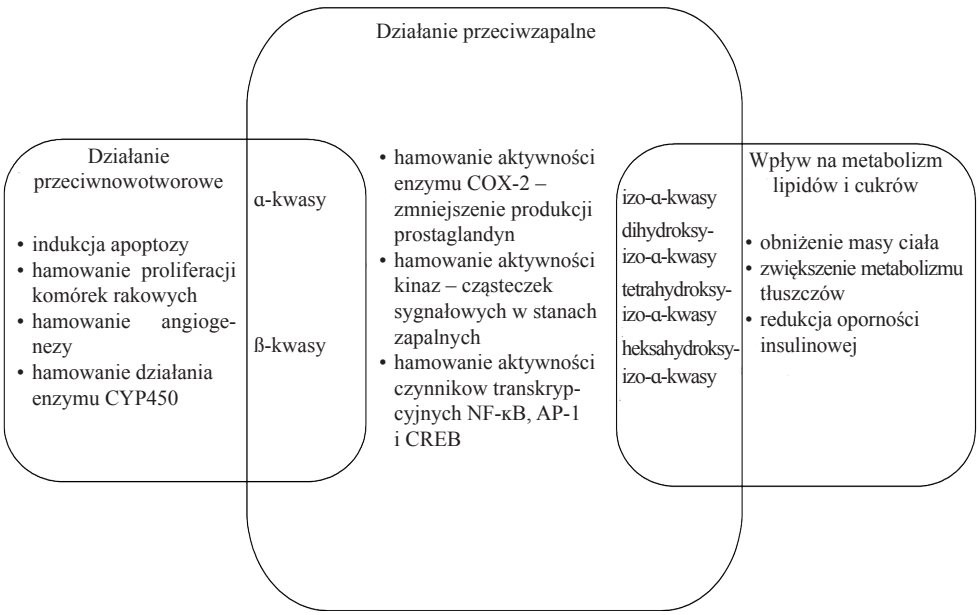
Olejki eteryczne to mieszanina ponad 300 związków chemicznych, których łączna zawartość w chmielu wynosi od 0,03 do 3%. W skład tej grupy wchodzą głównie mono- i seskwiterpeny oraz produkty ich utleniania (4). Składniki olejków tworzą kompozycje zapachowe, charakterystyczne dla poszczególnych odmian chmielu. Zazwyczaj tylko 2-3 związki występują w wysokich stężeniach, stanowiąc od 20% do 70% wszystkich składników olejku. Koncentracja pozostałych komponentów jest dużo niższa, mimo to wpływają one na jakość profilu aromatycznego (3, 11). Przyjmuje się, że charakterystyczny chmielowy aromat piwa jest efektem wzajemnego oddziaływania wielu różnych związków chemicznych występujących w olejku chmielowym (11). Dominującymi składnikami olejku eterycznego chmielu są myrcen, humulen, kariofilen i farnezen. Do najbardziej pożądanych związków, nadających przyjemny zapach chmielowy należą humulen i produkty jego utleniania, takie jak tlenki humulenu I i II oraz alkohole: humulol i humulenol-2. Pozytywny wpływ na jakość aromatu w piwie wywierają również kariofilen i tlenek kariofilenu oraz farnezen. Związki te są prekursorami „chmielowo-żywicznego" zapachu i smaku piwa. Natomiast o aromacie „kwiatowo-chmielowym" piwa decyduje zawartość linalolu i alfa-terpineolu. Do związków niekorzystnie wpływających na smak i aromat piwa należą myrcen i geraniol. Myrcen wraz z produktami jego utleniania powoduje ostrą, nieprzyjemną goryczkę, a geraniol w wysokich stężeniach odpowiada za powstanie „perfumeryjnego" zapachu w piwie. Humulen i myrcen występują w największym stężeniu, dlatego też stosunek obu tych związków w olejku eterycznym jest ważną cechą jakościową, charakterystyczną dla odmiany. Wyższy stosunek humulenu do myrcenu w surowcu przekłada się na korzystniejszy aromat piwa i jest charakterystyczny dla aromatycznych odmian chmielu (5, 6). Olejki są związkami lotnymi, które w trakcie warzenia piwa ulatniają się w ponad 90%. Z tego powodu chmiel odmian aromatycznych stosowany w celu nadania piwu szlachetnego chmielowego aromatu jest dodawany do brzeczki dopiero w końcowym etapie jej gotowania, tak aby w maksymalnym stopniu ograniczyć straty cennych komponentów.

2. Właściwości prozdrowotne chmielu

Chmiel w medycynie ludowej wykorzystywano od pokoleń. Najstarsze zapisy o właściwościach leczniczych tej rośliny pochodzą z XI wieku (8). Chmiel był uważany za remedium na szeroką gamę dolegliwości. Tradycyjnie wykorzystywany był jako środek łagodzący stany nadpobudliwości i nerwowości, a także jako specyfik uspokajający u osób cierpiącym na bezsenność. Uważano, że chmiel pomaga w problemach trawiennych i poprawia apetyt, a także przynosi ulgę w bólach zębów, ucha oraz nerwobólach. Polecany był jako środek przeciwskurczowy i moczopędny. Wywar z chmielu stosowano w problemach z jelitami i w gorączce, natomiast kompresami chmielowymi leczono zapalenie płuc. Chmiel używany był w aromaterapii jako środek łagodzący stresy, nadpobudliwość i nerwobóle. Właściwości uspokajające, przeciwreumatyczne, przeciwbólowe i przeciwzapalne chmielu wykorzystywane były przez plemiona amerykańskie. Również w tradycyjnej medycynie chińskiej oraz w Indiach chmiel stosowany był w leczeniu szeregu różnych schorzeń (27).

Właściwości prozdrowotne żywic i olejków chmielowych

Niemal wszystkie metabolity wtórne chmielu wykazują mniejsze lub większe działanie bioaktywne. Właściwości takie posiadają również żywice i olejki chmielowe znane przede wszystkim ze swoich walorów smakowych i zapachowych wykorzystywanych przez przemysł piwowarski. W badaniach laboratoryjnych alfa i beta kwasy oraz ich pochodne wykazywały różnorodną aktywność biologiczną (rys. 2).



Rys. 2. Właściwości biologiczne alfa i beta kwasów

Źródło: Van Cleemput, 2009 (26).

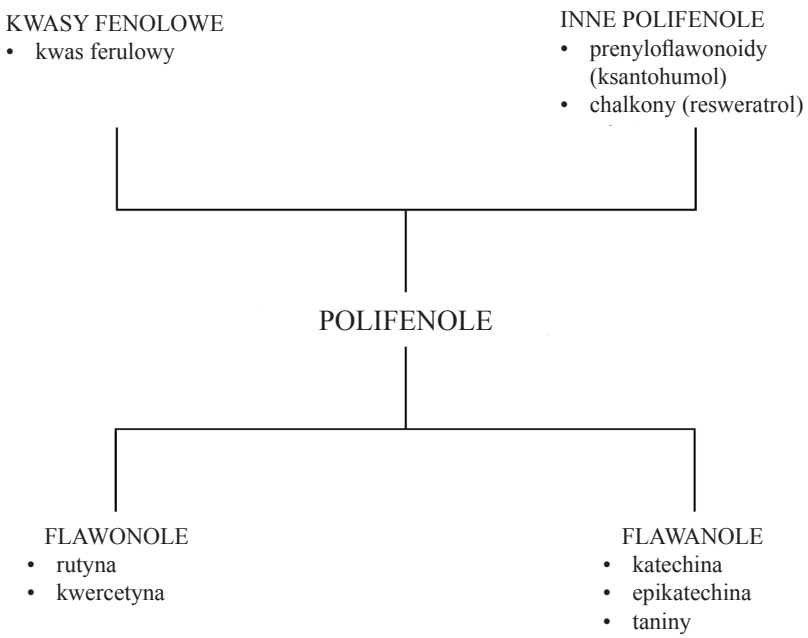
Beta kwasy działały hamująco na rozwój bakterii. Ich właściwości antybakteryjne ujawniały się nie tylko wobec bakterii powodujących psucie żywności, lecz także wobec bakterii chorobotwórczych. Badania wykazały, że beta kwasy hamują rozwój prątków gruźlicy oraz *Helicobacter pylori* – bakterii zwiększającej ryzyko wystąpienia choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy (26). W warunkach *in vitro* beta kwasy wspomagały działanie antybiotyków, co mogłoby przyczynić się do obniżenia dawki leku stosowanej w zwalczaniu niektórych chorób (26). W testach laboratoryjnych alfa i beta kwasy wykazywały również dużą aktywność antyoksydacyjną, która polegała na neutralizowaniu wolnych rodników. Wolne rodniki odpowiedzialne są za wiele niekorzystnych procesów w komórkach. Powodują m.in. uszkodzenia nici DNA i chromosomów, inaktywację enzymów, powstawanie mutacji i transformacji nowotworowej komórek. Testy wykazały, że beta kwasy są silniejszymi antyoksydantami niż witamina C (kwas askorbinowy) i E (tokoferol) (26). Badania dowiodły, że alfa kwasy wykazują właściwości przeciwzapalne, polegające na blokowaniu aktywności cyklooksygenazy-2 – enzymu uczestniczącego w powstawaniu stanów zapalnych w organizmie (12, 26). Przeprowadzono pilotażowe testy w celu określenia skuteczności komercyjnych preparatów zawierających izo-alfa kwasy w łagodzeniu objawów towarzyszących chorobom związanym z przewlekłymi zapaleniami, np. zapaleniem stawów (26). U pacjentów przyjmujących preparat zawierający izo-alfa kwasy obserwowano zmniejszenie odczuwania bólu, a także złagodzenie objawów klinicznych choroby. Badania wykazały również chemoprewencyjne właściwości alfa i beta kwasów. Związki te posiadają zdolność indukcji apoptozy (śmierci) komórek nowotworowych, hamują proliferację (nadmierny wzrost) tych komórek oraz hamują angiogenezę (rozwój naczyń krwionośnych zaopatrujących komórki nowotworowe w tlen i substancje odżywcze). Poprzez takie wielokierunkowe działanie alfa i beta kwasy mogą skutecznie zapobiegać rozwojowi choroby nowotworowej. Niestety, na razie właściwości te udowodniono tylko w badaniach laboratoryjnych (7, 12, 26).

Chmiel znany jest z działania uspokajającego i nasennego. Właściwości te przypisuje się przede wszystkim olejkom eterycznym. Największą aktywność pod tym względem wykazuje jeden ze składników olejku chmielowego – alkohol 2-metylo-3-buten-2-ol (10). Olejki eteryczne przejawiają również działanie przeciwbakteryjne w stosunku do Gram-dodatnich bakterii np. *Staphylococcus ureus*, *Enterococcus faecalis* i niektórych Gram-ujemnych, np. *Escherichia coli*, *Salmonella* (21).

Właściwości prozdrowotne polifenoli chmielowych

Polifenole to grupa związków powszechnie występujących w roślinach, bardzo zróżnicowanych pod względem struktury, właściwości chemicznych i biologicznych. Do polifenoli roślinnych zaliczane są m. in. flawonoidy, izoflawony, prenyloflawonoidy oraz antocyjany. Polifenole wpływają korzystnie na zdrowie człowieka

dzięki różnorodnym właściwościom biologicznym. Związki te wykazują działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwmutagenne, antynowotworowe, chronią przed chorobami serca i miażdżycą. Do najbardziej znanych i aktywnych biologicznie związków z tej grupy należą: genisteina występująca w soi, kwercetyna obecna w zielonej herbacie, resweratrol zawarty w winogronach i czerwonym winie oraz kwas ferulowy, którego źródłem są ziarna zbóż i kukurydzy. Chmiel zawiera zarówno polifenole powszechnie występujące w świecie roślin, jak i charakterystyczne tylko dla tego gatunku (rys. 3).



Rys. 3. Podział polifenoli chmielowych

Źródło: Biendl i Pinzl, 2000 (8).

Wśród polifenoli chmielowych najważniejsza grupa to prenyloflawonoidy, do których należą ksantohumol, jego izomer – izoksantohumol oraz desmetyloksantohumol i jego pochodne: 8-prenylnaringenina i 6-prenylnaringenina.

Ksantohumol jest głównym prenyloflawonoidem chmielu, a jego stężenie waha się w zależności od odmiany od 0,1 do 1,1% suchej masy i stanowi 80-90% wszystkich prenyloflawonoidów występujących w chmielu (16, 25). Ksantohumol wykazuje silne działanie antyoksydacyjne, polegające na neutralizowaniu wolnych rodników: hydroksylowego i nadtlenkowego (12, 15, 16). Rodnik hydroksylowy jest najbardziej reaktywnym rodnikiem tlenowym. Powoduje uszkodzenia DNA w komórkach, a wraz z innymi reaktywnymi formami tlenu wywołuje tzw. stres oksydacyjny, który wpływa na powstawanie niektórych chorób. Ponadto ksantohumol powstrzymuje utlenianie lipidów w błonach komórkowych, dzięki czemu ogranicza

powstawanie zaburzeń w funkcjonowaniu komórek, co w konsekwencji przyczynia się do lepszej ochrony organizmu przed chorobami (25). Badania wykazały również aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybową ksantohumolu. W warunkach *in vitro* hamował on rozwój bakterii odpowiedzialnych za powstawanie trądziku, a także wykazywał współdziałanie z antybiotykami w ograniczaniu namnażania tych bakterii (16, 22). Ksantohumol wykazywał również silne działanie hamujące w stosunku do bakterii powodujących próchnicę zębów czy choroby skóry (16, 22). Właściwości przeciwwirusowe ksantohumolu skierowane są przeciwko niektórym wirusom DNA i RNA, m.in. przeciwko wirusowi HIV-1. Oddziaływanie ksantohumolu polega na przeciwdziałaniu replikacji wirusa w komórkach krwi, lecz niestety nie hamuje on wnikania patogenu do komórek (12, 22). Badania wykazały również umiarkowane działanie przeciwgrzybiczne ksantohumolu w stosunku do grzybów *Trichophyton spp*. powodujących choroby skóry u ludzi oraz względem pleśni *Mucor rouxianus* (13, 27). Najwięcej uwagi i badań poświęcono właściwościom przeciwnowotworowym ksantohumolu. W warunkach *in vitro* wykazuje on działanie ograniczające we wszystkich fazach powstawania i rozwoju choroby nowotworowej. Związek ten ma zdolność hamowania syntezy DNA, blokowania cyklu komórkowego i różnicowania komórek oraz aktywacji apoptozy w komórkach nowotworowych (12, 25, 27). Ksantohumol hamuje również aktywność aromatazy 450 – enzymu kontrolującego syntezę estrogenów w organizmie (16). Podwyższony poziom estrogenów wpływa na rozwój niektórych nowotworów. W leczeniu chorób nowotworowych bardzo ważne jest zahamowanie procesu angiogenezy, czyli tworzenia się nowych naczyń krwionośnych wokół guza. Naczynia te są niezbędne do wzrostu guza, a także umożliwiają tworzenie przerzutów, pozwalając na rozprzestrzenianie się choroby w organizmie człowieka. Badania laboratoryjne wykazały, że ksantohumol i pozostałe chmielowe prenyloflawonoidy posiadają zdolność angioprewencji (12, 16, 27). Efektywność ksantohumolu potwierdzono w stosunku do linii komórkowych raka piersi, jajnika, okrężnicy, prostaty i białaczki. Stwierdzono ponadto, że nie wpływa on negatywnie na komórki wątroby, dzięki czemu nie powoduje skutków ubocznych nawet przy długotrwałym stosowaniu (13, 16, 22, 25).

Innym prenyloflawonoidem specyficznym dla chmielu jest desmetyloksantohumol. Zawartość tego związku w szyszkach wynosi 0,05-0,3% (16). W wyniku izomeryzacji desmetyloksantohumolu powstają pochodne o działaniu estrogennym: 6-prenylonaryngenina oraz 8-prenylonaryngenina, które są jednymi z silniejszych znanych fitoestrogenów. Właściwości tych związków testowano zarówno w badaniach *in vitro,* jak i *in vivo*. Aktywność estrogenna 8-prenylonaryngeniny polega na łączeniu się z receptorami estradiolu oraz indukowaniu sygnału podobnego do sygnału estrogenowego (10). Związek ten wykazuje działanie 10-20 tys. razy słabsze w porównaniu z 17-beta-estradiolem, ale dużo silniejsze, niż np. fitoestrogeny soi czy koniczyny, które są powszechnie wykorzystywane do produkcji suple-

mentów diety stosowanych w łagodzeniu objawów menopauzy (10). Ze wstępnych badań klinicznych wynika, że 8-prenylonaryngenina hamuje dolegliwości związane z menopauzą u kobiet, zapobiega uderzeniom gorąca oraz ogranicza rozwój osteoporozy (17). Autorzy badań podkreślają, że działanie lecznicze 8-prenylonaryngeniny było widoczne, mimo że dzienne spożycie tego związku (100 lub 250 μg) było wielokrotnie niższe od zalecanej dziennej dawki izoflawonów sojowych (50-100 mg) (17). Oprócz działania estrogennego, 8-prenylonaryngenina posiada również właściwości antynowotworowe. Wykazuje zdolność do hamowania namnażania komórek raka piersi oraz indukowania apoptozy (8, 10, 12).

Wyniki badań wskazują, że chmiel jest źródłem wielu substancji o zróżnicowanej aktywności biologicznej, w tym również o potencjalnym działaniu prozdrowotnym. Głównym źródłem bioaktywnych metabolitów wtórnych chmielu w diecie człowieka jest piwo. Niestety, zawiera ono jedynie śladowe ilości tych substancji. Do wyprodukowania 1 hektolitra piwa potrzeba około 5 g alfa kwasów, co w zależności od odmiany odpowiada 40-130 g chmielu. Zawartość ksantohumolu w szyszkach chmielowych wynosi jedynie 0,1-1,1% i waha się w zależności od odmiany, sposobu uprawy i warunków klimatycznych (16, 25). Koncentracja polifenoli chmielowych w piwie jest jeszcze mniejsza niż można byłoby przypuszczać biorąc pod uwagę dawkę chmielu, związki te bowiem ulegają przemianom podczas warzenia piwa. Stwierdzono, że zawartość ksantohumolu w piwie stanowi jedynie około 30% jego wyjściowej dawki w szyszkach chmielowych, przy czym występuje on głównie w formie izoksantohumolu, którego aktywność biologiczna jest znacznie mniejsza (25). Koncentracja polifenoli w piwie zależy nie tylko od dawki chmielu, ale również od rodzaju produktu chmielowego użytego do produkcji piwa. Granulaty i ekstrakty etanolowe zawierają 95% wyjściowej zawartości ksantohumolu, natomiast ekstrakt powstały przy użyciu dwutlenku węgla zaledwie 5% (16). Zatem piwa wyprodukowane z ekstraktów CO_2 są najuboższe w polifenole. Szacuje się, że aby ksantohumol mógł oddziaływać prozdrowotnie jako związek chemoprewencyjny, jego stężenie w piwie powinno wynosić około 5mg·l^{-1} (25). Niestety zawartość ksantohumolu w różnych rodzajach piwa zazwyczaj kształtuje się na poziomie od kilku do kilkudziesięciu mikrogramów, a więc jest kilkaset razy mniejsza niż dawka terapeutyczna (tab. 1). W Niemczech, Belgii i Republice Czeskiej opracowano technologię produkcji piwa wzbogaconego w ksantohumol, co pozwoliło podnieść zawartość tego związku nawet do 10 mg·l^{-1} w piwach ciemnych (16). W celu wzbogacenia piwa w ksantohumol opracowano technologię otrzymywania tego związku, m.in. poprzez izolację z odpadów powstających po ekstrakcji ciekłym dwutlenkiem węgla, ekstrakcję etanolową wyciągu żywic chmielowych oraz syntezę chemiczną (16). Prowadzone są również prace hodowlane w kierunku uzyskania odmian chmielu o podwyższonej zawartości prenyloflawonoidów w szyszkach (24, 25). Wzrost stężenia polifenoli w chmielu można również uzyskać na drodze modyfikacji szlaku biosyntezy tych związków poprzez zastosowanie odpowiednich technik inżynierii genetycznej (2, 25).

Tabela 1

Zawartość polifenoli w wybranych piwach produkowanych w Republice Czeskiej

Marka piwa	Ksantohumol $\mu g \cdot l^{-1}$	Izoksantohumol $\mu g \cdot l^{-1}$	8-prenylonaryngenina $\mu g \cdot l^{-1}$
Branik, beczkowe	9	206	21
Gambrinus, beczkowe	34	450	191
Primus, beczkowe	<0,2	<20	<2
Meštan, dietetyczne	1,9	250	25
Bernard, 12%	28	1350	150
Premium Żatec, 11%	28	1180	175
Pilzner Urquell, 12%	26	1910	116
Budweiser Czech, 12%	16	860	25

Źródło: Krofta i in., 2005 (20).

Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że chmiel zawiera wiele związków o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, które mogłyby w przyszłości znaleźć zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu niektórych chorób, w tym tak groźnych jak nowotwory. Aktywność biologiczną chmielowych metabolitów wtórnych przetestowano jak dotąd głównie w warunkach laboratoryjnych. Brakuje kompleksowych badań klinicznych, które pozwoliłyby lepiej zrozumieć wpływ tych związków na organizm człowieka. Badania kliniczne umożliwiłyby również ostateczną weryfikację właściwości leczniczych metabolitów wtórnych chmielu, ponieważ związki te podlegają w organizmie człowieka przemianom, które mogą w znacznym stopniu wpływać na ich działanie terapeutyczne.

W praktyce wykorzystywane są przede wszystkim te walory chmielu, które mają znaczenie w procesie produkcji piwa. Potencjał leczniczy tej rośliny jest eksploatowany w bardzo niewielkim stopniu, przede wszystkim w ziołowych preparatach o działaniu uspokajającym oraz suplementach diety stosowanych w ograniczaniu objawów menopauzy.

Jeżeli dotychczasowe ustalenia dotyczące właściwości prozdrowotnych chmielu zostaną potwierdzone w badaniach klinicznych, to niewątpliwie gatunek ten zajmie znaczącą pozycję na rynku fitofarmaceutyków. Otworzy to nowe możliwości również przed plantatorami chmielu.

Literatura

1. Analitica EBC Section 7 Hops, European Brewery Convention, Fachverlag Hans Carl, Nurmberg, 2007.
2. Aldinger C., Stanke M., Alheit K., Gatica A., Hohnle M., Matoušek J., Weber G.: Modification of the synthesis of bioactive flavonoids in transgenic hop *Humulus lupulus* L. by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L. Proc. of the Sci. Com. IHGC, Leon, Hiszpania, 2009: 56-59.
3. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 2008, **46**: 446-475.

4. B a m f o r t h C h. W.: Beer: An ancient yet modern biotechnology. Chem. Educator, 2000, **5**: 102-112.
5. B a r a n o w s k i K.: Ocena jakości chmielu na podstawie zawartości alfa kwasów oraz wpływ składników olejków chmielowych na aromat piwa. Materiały konferencyjne z seminarium w Kazimierzu Dolnym, 17-18 czerwca 1997.
6. B a r a n o w s k i K.: Określenie stopnia zestarzenia się chmielu, granulatu i ekstraktu oraz jego wpływ na sposób obliczania a następnie dozowania ich dawek w procesie produkcji piwa. Materiały konferencyjne z seminarium w Kazimierzu Dolnym, 17-18 czerwca 1997.
7. B i e n d l M.: Hops and health. Master Brewers Association of the Americas, 2009, doi:10.1094/TQ-46-2-0416-01.
8. B i e n d l M., P i n z l Ch.: Hops and health. German Hop Museum Wolnzach, 2000.
9. B o l i b o k M.: Wpływ metod analizy chmielu na wyniki określania zawartości alfa kwasów. Materiały konferencyjne z seminarium w Kazimierzu Dolnym, 17-18 czerwca 1997.
10. C h a d w i c k L. R., P a u l i G. F., F a r n s w o r t h N. R.: The pharmacognosy of *Humulus lupulus L*. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. Phytomedicine, 2006, **13**: 119-131.
11. D e K e u k e l e i r e D.: Fundamentals of beer and hop chemistry. Química Nova, 2004, **23**: 108-112.
12. G e r h a ü s e r C.: Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. European J. Cancer, 2005, **41(13)**: 1941-1954.
13. G e r h a u s e r C.: Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus L*.) in comparison with activities of the hop constituents and xanthohumol metabolites. Molecular Nutricion Food Research, 2005, **49(9)**: 827-831.
14. G e r h a ü s e r C., A l t A. P., K l i m o K., K n a u f t J., F r a n k N., B e c k e r H.: Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. Phytochemistry Reviews, 2002, **1(3)**: 369-377.
15. G e r h a u s e r C., A l t A., H e i s s E., G a m a l - E l d e e n A., K l i m o K., K n a u f t J., N e u m a n n I., S c h e r f H. R., F r a n k N., B a r t s c h H., B e c k e r H.: Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. Mol. Cancer Ther., 2002, **1(11)**: 959-969.
16. G o ł ą b c z a k J., G e n d e s z e w s k a - D a r m a c h E.: Ksantohumol i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu-aspekty biologiczne i technologiczne. Biotechnologia, 2010, **1(88)**: 82-96.
17. H e y e r i c k A., V e r v a r c k e S., D e p y p e r e H., B r a c k e M., D e K e u k e l e i r e D.: A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. Maturitas, 2006, **54(2)**: 164-175.
18. Der Barth Bericht, Barth-Hass Group, Hopfen 2011/2012, Nurnberg, 2012.
19. K o r d i a l i k - B o g a c k a E., A m b r o z i a k W.: Investigation of the foam-active polypeptides during beer fermentation. J. Sci. Food Agric., 2004, **84**: 1960-1968.
20. K r o f t a K., P o u s t k a J., N o v a k o v a K., H a j š l o v a.: Contents of prenylflavonoids in Czech hops and bers. Acta Hort., 2005, **668**: 201-206.
21. L a n g e z a a l C. R., C h a n d r a A., S h e f f e r J. J. C.: Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus L*. cultivars. Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition 1992, **14(6)**: 353-356.
22. M i e l c z a r e k M., K o ł o d z i e j c z y k J., O l a s B.: Właściwości lecznicze chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus L*.). Postępy Fitoterapii, 2010, **4**: 205-210.
23. N a t a r a j a n P., K a t t a S., A n d r e i I.: Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. Phytomed, 2008, **15(3)**: 194-201.
24. N e s v a d b a V., K r o f t a K.: Hop breeding on high contents of desmethyloxanthohumol. Proc. of the Sci. Com. IHGC, Leon, Hiszpania, 2009: 20.
25. S t e v e n s J. F., P a g e J. E.: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! Phytochemistry, 2004, **65(10)**: 1317-1330.

26. Van Cleemput M., Cattoor K., De Bosscher K., Haegeman G., De Keukeleire D., Heyerick A.: Hop (*Humulus lupulus*) – derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. J. Nat. Prod., 2009, **72(6)**: 1220-1230.
27. Zanoli P., Zavatti M.: Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. Journal of Etnopharmacology, 2008, **116(3)**: 383-396.
28. Zaorski T.: Zarys dziejów chmielarstwa polskiego. IUNG Puławy, 2002.

Adres do korespondencji:

dr Urszula Skomra
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 220
e-mail: urszula.skomra@iung.pulawy.pl

S T U D I A I R A P O R T Y IUNG-PIB
ZESZYT 31(5) 2012

Apoloniusz Berbeć, Andrzej Madej

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

OBECNA SYTUACJA I PERSPEKTYWY UPRAWY TYTONIU W POLSCE NA TLE ŚWIATA I UNII EUROPEJSKIEJ*

Uprawa tytoniu w świecie

Tytoń jako gatunek botaniczny i jako roślina uprawna pochodzi z Ameryki Południowej. Nie są znane początki uprawy tej rośliny, jednak wiele wskazuje na to, że tytoń uprawny został udomowiony bardzo dawno temu lub nie występował jako roślina dzika, gdyż obecnie, jeśli występuje w stanie dzikim, to tylko w formie zbiegów z uprawy (6). Pierwsze ślady uprawy tytoniu przez rdzennych mieszkańców Ameryki Południowej pochodzą sprzed ok. 6000 lat. Przypuszczalnie tytoń od początku był stosowany jako używka, ale pierwsze zachowane ślady palenia tytoniu pochodzą z Ameryki Środkowej (obecnego Meksyku), z przełomu ery starożytnej i nowożytnej (16). Z taką formą wykorzystania tytoniu przez tubylców zetknęli się po raz pierwszy uczestnicy wyprawy Kolumba w roku 1492. Za ich pośrednictwem tytoń trafił do Europy i bardzo szybko, bo już na początku XVI w., jego użycie rozpowszechniło się w Hiszpanii, a stamtąd w ciągu XVI w. w innych krajach Europy i Bliskiego Wschodu. Pod koniec XVI w. rozpoczyna się komercjalna uprawa tytoniu przez Europejczyków, na początku na Kubie i Santo Domingo (obecnie Haiti), a nieco później przez angielskich kolonistów w północnoamerykańskiej Virginii. Jednocześnie, za pośrednictwem żeglarzy angielskich i holenderskich, tytoń trafia na Daleki Wschód. Tak więc na przestrzeni jednego wieku tytoń z lokalnej używki stał się rośliną znaną prawie na całym świecie.

Do Polski tytoń dotarł najprawdopodobniej w pierwszej połowie XVI w. z Turcji, a pod koniec XVII w.nasz kraj stał się uczestnikiem międzynarodowego obrotu tytoniem na mocy umowy, w myśl której król Jan III Sobieski zobowiązał się dostarczać tytoń królowi Francji Ludwikowi XIV (14).

Tytoń uprawiany jest w blisko 100 krajach świata. Listę krajów – największych producentów tytoniu przedstawia tab.1. Z wyjątkiem Włoch, kraje produkujące najwięcej tytoniu na świecie leżą poza Europą. Według danych FAO Polska w roku 2010 z produkcją ok. 31000 t i powierzchnią uprawy ok. 16000 ha zajmowała 22 pozycję

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

na świecie (4). Na tle największych producentów tytoniu w Polsce uzyskuje się stosunkowo wysoką średnią wydajność z jednostki powierzchni (ok. 2 $t \cdot ha^{-1}$). Zwracają uwagę bardzo wysokie plony we Włoszech, które dość trudno wytłumaczyć na gruncie przyrodniczo-rolniczym.

Tabela 1

Produkcja tytoniu w 10 krajach – największych producentach tytoniu w roku 2010 (wg FAOSTAT)

lp	Kraj	Produkcja roczna (tys. ton)	Powierzchnia uprawy (tys. ha)	Średni plon ($t \cdot ha^{-1}$)
1	Chiny	3006	1345	2,23
2	Brazylia	781	446	1,75
3	Indie	756	460	1,64
4	USA	326	137	2,38
5	Malawi	215	181	1,19
6	Indonezja	211	251	0,84
7	Argentyna	123	75	1.64
8	Pakistan	119	56	2.13
9	Zimbabwe	110	94	1.17
10	Włochy	97	22	4.41
22	Polska	31	16	1.94

Źródło: FAOSTAT (4).

Globalna produkcja surowca tytoniowego nieco wzrosła w ostatniej dekadzie (tab. 2), pomimo intensywnej akcji prowadzonej przez szereg organizacji, w tym WHO, na rzecz ograniczenia, a nawet likwidacji uprawy tytoniu. Znaczny spadek produkcji (prawie o połowę) miał miejsce w Europie, w nieco mniejszym stopniu w Ameryce Płn. (USA i Kanada), a więc tam, gdzie odziaływanie propagandy antytytoniowej było i jest najsilniejsze. W częściach świata produkujących najwięcej tytoniu – w Azji i w Ameryce Płd – produkcja surowca tytoniowego znacząco wzrosła.

Tabela 2

Produkcja tytoniu w wybranych częściach świata w latach 2001-2010 (tys. ton)

Rok	Świat	Azja	Ameryka Płn.	Ameryka Płd.	Europa	EU
2001	6574	3764	508	739	537	459
2002	6520	4571	450	874	526	452
2003	6029	3721	410	849	508	451
2004	6591	3912	442	1155	515	454
2005	6761	4209	336	1129	492	428
2006	6601	4217	379	1108	350	291
2007	6195	3767	401	1098	337	282
2008	6641	4228	408	1034	346	294
2009	7128	4585	419	1056	356	299
2010	7114	4680	366	960	323	251

Źródło: FAOSTAT (4).

Uprawa tytoniu w krajach UE

Aktualnie w krajach UE produkuje się ok. 280000 t tytoniu rocznie. Najwięksi producenci to Włochy, Bułgaria, Polska i Hiszpania. Tytoń produkuje ok. 80000 rolników na obszarze 100000 ha, przy czym średni obszar uprawy przypadający na 1 producenta wynosi ok. 1,25 ha (3). Postępujący proces kurczenia się produkcji tytoniu na obszarze UE wynika z polityki wobec sektora tytoniowego. Na podstawie reformy przeprowadzonej w roku 2004, wprowadzono w roku 2006 tzw. „*decoupling*", który polegał na rozerwaniu związku między produkcją surowca tytoniowego a wsparciem finansowym dla tej produkcji (3). W myśl tej zasady, rolnik uprawiający tytoń w okresie przed wprowadzeniem nowych regulacji był uprawniony do otrzymywania dopłaty, niezależnie od tego, czy dalej uprawiał tytoń, czy też zaniechał tej uprawy. Poszczególnym krajom UE pozostawiono decyzję co do tego, czy wprowadzić całkowity *decoupling*, czy też pozostawić do 60% wsparcia w formie powiązanej z produkcją, a pozostałą ilość jako nie związaną z produkcją. Od roku 2010 we wszystkich krajach UE wprowadzono całkowite zerwanie związku wsparcia finansowego z produkcją tytoniu, które zastąpiono ujednoliconą dopłatą stanowiącą 50% poprzedniej pomocy. Pozostałe 50% przeznaczono na ogólne wsparcie dla rejonów, w których uprawia się tytoń.

Odmiany tytoniu ze względu na swoje właściwości biologiczne, a także sposób suszenia i zastosowania liści tytoniowych, dzielą się na tzw. grupy użytkowe. W Europie uprawiane są odmiany należące do pięciu grup: a) tytoń jasny, odmiany typu Virginia, b) tytoń jasny, odmiany typu Burley, c) tytoń ciemny suszony powietrzem, d) tytoń ciemny suszony powietrzem z możliwością dosuszenia i wędzenia, e) tytoń suszony na słońcu (11, 12). W tab. 3 zamieszczono dane o produkcji tytoniu w krajach EU w roku 2010. Najwięcej tytoniu wyprodukowały Włochy i Bułgaria (ok. 89000 i 83000 t). Polska z produkcją 31000 t. uplasowała się na czwartej pozycji (za Włochami, Bułgarią i Hiszpanią). W większości krajów UE, z wyjątkiem Belgii, Grecji i Rumunii, najwięcej uprawiano Virginii. Odmiany Virginia i Burley stanowiły większość wyprodukowanego w UE tytoniu (67%), z wyłączeniem Grecji, gdzie dominowała produkcja tytoniu orientalnego (suszonego na słońcu – 75% wyprodukowanego tytoniu.

Ceny płacone rolnikom uprawiającym tytoń w UE różnią się znacznie w zależności od typu użytkowego, a także od kraju członkowskiego (tab. 4). Najwyższe ceny za swój surowiec uzyskiwali w roku 2010 plantatorzy z Francji, Niemiec i Belgii, a najniższe, dość znacznie odbiegające od średniej, rolnicy uprawiający tytoń w Rumunii. W Polsce ceny tytoniu Virginia kształtowały się na średnim poziomie, zaś tytoni suszonych powietrzem były znacznie niższe (z wyjątkiem Rumunii). W roku 2011 zanotowano pewien spadek w stosunku do roku poprzedniego.

Tabela 3

Produkcja tytoniu w EU w roku 2010 (w tonach).

	Tytoń jasny odmiany typu Virginia	Tytoń jasny odmiany typu Burley	Tytoń ciemny suszony powietrzem	Tytoń ciemny z możliwością dosuszenia i wędzenia (Kentucky)	Tytoń suszony na słońcu (orientalny)	Ogółem	Udział procentowy w UE
Belgia		12	127			139	0,05
Bułgaria	11672	10110			61833	83615	28
Niemcy	4275	17	682			4974	2
Grecja	3044				18300	21344	7
Hiszpania	29767	3247	2767			35781	12
Francja	10846	6604	261			17711	6
Włochy	50801	25875	9326	3109		89111	30
Węgry	5219	2374				7593	3
Polska	18287	11382	1117	489		31275	11
Portugalia	655	256				911	0,3
Rumunia	700	1200				1900	0,6
Całkowita produkcja	135266	61077	14280	3598	80133	294354	100
Procent ogólnej produkcji	46	21	5	1	27	100	100

Źródło: Komisja Europejska. Rolnictwo i Rozwój Obszarów Wiejskich. Rynki Rolnicze: Tytoń nieprzetworzony (3).

Tabela 4

Ceny wypłacane za surowiec tytoniowy rolnikom w krajach EU (euro/kg) w roku 2010.

	Tytoń jasny odmiany typu Virginia	Tytoń jasny odmiany typu Burley	Tytoń ciemny suszony powietrzem	Tytoń ciemny z możliwością dosuszenia i wędzenia (Kentucky)	Tytoń suszony na słońcu (orientalny)
Belgia		2,40	2,45		
Bułgaria	1,97	2,29			2,74
Niemcy	3,20		2,40		
Grecja	2,03				3,50
Hiszpania	2,28	1,70	1,69		
Francja	2,61	2,84	2,70		
Włochy	2,47	1,88	1,09		
Polska	2,07	1,48	1,22	1,20	
Rumunia	0,80	0,80			
Polska (2011)	1,86	1,32	1,19	1,40	

Źródło: Komisja Europejska. Rolnictwo i Rozwój Obszarów Wiejskich. Rynki Rolnicze: Tytoń nie przetworzony (3). Dane dla Polski za rok 2011wg informacji MRiRW.

Gospodarstwa tytoniowe i powierzchnia uprawy w Polsce

Według danych Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w roku 2011 uprawiano tytoń w ok. 12300 gospodarstwach. Większość tych gospodarstw (ok. 90%) jest zrzeszona w 11 grupach producenckich. Powierzchnia uprawy tytoniu w gospodarstwie wynosi przeważnie od 0,5 do 1,5 ha (średnio 1,2 ha w roku 2011). Średnia wielkość gospodarstw, w których uprawia się tytoń, waha się od 4 do 6 ha gruntów rolnych i znacznie odbiega od aktualnej średniej krajowej wynoszącej 10 ha. W gospodarstwach tych tytoń jest często jedyną uprawą towarową i jedynym źródłem dochodów. Uprawa tytoniu odznacza się dużą pracochłonnością i w swojej tradycyjnej postaci – małym stopniem zmechanizowania. Jest to jednocześnie uprawa wysoce specjalistyczna, wymagająca dużej wiedzy fachowej w zakresie agrotechniki, ochrony roślin oraz wymagająca dobrej organizacji pracy. Gospodarstwa tytoniowe występują z reguły w rejonach słabo rozwiniętych gospodarczo, o dużym stopniu bezrobocia. Uprawa jest rozmieszczona w pięciu wydzielonych ustawowo rejonach: 1) lubelsko-podkarpackim, 2) małopolskim 3) kujawsko-pomorskim 4) mazurskim 5) dolnośląskim. Około połowa całego areału uprawy tytoniu zlokalizowana jest w rejonie lubelsko-podkarpackim (głównie woj. lubelskie – ok. 47% obszaru uprawy). Rejon małopolski i rejon świętokrzyski stanowią łącznie ok. 25% całej powierzchni uprawy tytoniu. Na kolejne 2 rejony przypada pozostała część uprawy (po ok. 10% na każdy rejon).

Tabela 5

Powierzchnia uprawy tytoniu (tys. ha) i produkcja surowca tytoniowego (tys. t) w Polsce w latach 2006-2012

Rok	Powierzchnia/ produkcja	Ogółem	Grupa użytkowa			
			Tytoń jasny odmiany typu Virginia	Tytoń jasny odmiany typu Burley	Tytoń ciemny suszony powietrzem	Tytoń ciemny z możliwością dosuszenia i wędzenia (Kentucky)
2006	powierzchnia (ha)	16,8	9,8	6,0	0,7	0,3
	produkcja (t)	40,5	22,5	14,5	2,3	1,2
2007	powierzchnia	17,6	10,8	5,8	0,5	0,5
	produkcja	39,6	23,9	12,6	1,5	1,6
2008	powierzchnia (ha)	16,8	10,6	5,1	0,7	0,5
	produkcja (t)	41,2	24,2	13,1	2,2	1,7
2009	powierzchnia (ha)	16,9	10,3	5,3	0,7	0,5
	produkcja (t)	42,0	24,8	12,9	2,3	1,9
2010	powierzchnia (ha)	16,9	10,3	5,7	0,7	0,2
	produkcja (t)	31,3	18,3	11,4	1,1	0,5
2011	powierzchnia (ha)	14,7	9,6	4,4	0,5	0,3
	produkcja (t)	30,1	19,5	8,9	1,1	0,5
2012	powierzchnia (ha)	14,9	9,9	3,8	0,4	0,7
	produkcja (t)	39,5	25,7	10,3	1,2	2,3

Źródło: dla lat 2006-2010 – Komisja Europejska. Rolnictwo i Rozwój Obszarów Wiejskich. Rynki Rolnicze: Tytoń nieprzetworzony (3), dla lat 2011-2012 – informacja MRiRW (dla roku 2012 dane szacunkowe).

Powierzchnia uprawy tytoniu w Polce, w latach 2006-2009 wykazywała pewną stabilizację, a załamanie nastąpiło dopiero w latach 2010-2011 (tab. 5).

W latach 2010 i 2011 nastąpił wyraźny spadek produkcji, szczególnie jeśli chodzi o ilość wyprodukowanego surowca. Wiązało się to głównie z zaprzestaniem dopłat powiązanych z produkcją i wycofaniem się części rolników z uprawy tytoniu, a także niesprzyjającymi warunkami pogodowymi w roku 2010.

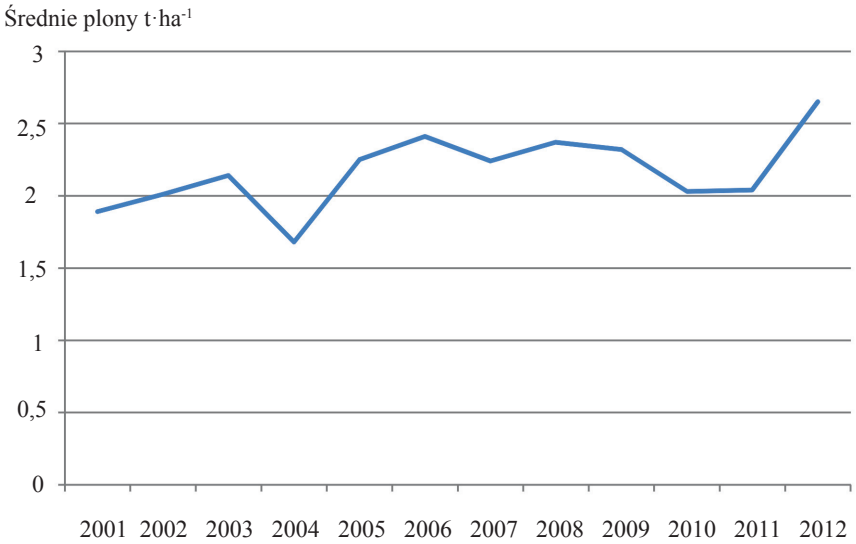
W Polsce uprawia się cztery grupy odmian tytoniu:

1. Tytoń jasny, odmiany typu Virginia (rejony: lubelsko-podkarpacki, świętokrzysko-małopolski, kujawsko-pomorski, mazurski, dolnośląski).
2. Tytoń jasny, odmiany typu Burley (rejony: lubelsko-podkarpacki, świętokrzysko-małopolski, kujawsko-pomorski, mazurski, dolnośląski).
3. Tytoń ciemny suszony powietrzem, odmiany typu Mocny Skroniowski i Puławski (rejony: lubelsko-podkarpacki, świętokrzysko-małopolski, mazurski).
4. Tytoń ciemny suszony powietrzem, z możliwością dosuszenia i wędzenia, odmiany typu Kentucky (rejony: świętokrzysko-małopolski, kujawsko-pomorski).

Wielkość produkcji i plony tytoniu w Polsce

W roku 2009, wg różnych danych, w Polsce wyprodukowano ok. 42-44000 t wysuszonych liści tytoniu (3, 4, 7, 8). Liście odmian typu Virginia (grupa I) stanowiły ok. 59%, odmian typu Burley (grupa II) – 31%. Udział odmian typu Mocny Skroniowski (grupa III) i Kentucky (grupa IV) stanowiły odpowiednio ok. 5,5 i 4,5% ogólnej ilości wyprodukowanego tytoniu. W roku 2010 ogólna produkcja zmniejszyła się wydatnie i wynosiła od 31000 t (3) do ok. 3000 t (9) i na zbliżonym poziomie utrzymała się w roku 2011. Tę gwałtowną obniżkę w stosunku do lat poprzednich wywołały, oprócz czynnika ekonomicznego, wyjątkowo niesprzyjające warunki pogodowe w sezonie 2010 (długie okresy chłodnej i deszczowej pogody na przemian z krótkimi okresami bardzo wysokich temperatur). Spowodowało to obniżenie masy jednostkowej blaszki liściowej (tzw. treściwości liści) i w rezultacie niskie plony. Poza tym w wielu okolicach wystąpiły lokalne podtopienia, a nawet powodzie, które spowodowały zniszczenie części upraw.

Średnie plony tytoniu z jednostki powierzchni w ostatniej dekadzie wykazywały znaczną tendencję wzrostową: w roku 2000 wynosiły ok. 2,1 $t \cdot ha^{-1}$, a w roku 2009 2,5 $t \cdot ha^{-1}$. W latach 2010-2011 średnie plony zmniejszyły się według różnych danych do ok. 2,0-2,2 $t \cdot ha^{-1}$ (4, 9) (rys. 1). Za główną przyczynę tego załamania produkcji, jak i uzyskiwanych plonów, można uznać bardzo niesprzyjające uprawie tytoniu warunki pogodowe. Należy jednak mieć na uwadze także to, że realnie uzyskane wyniki produkcji tytoniu mogą odbiegać od zarejestrowanych u pierwszych przetwórców. Powodem tego jest zjawisko sprzedaży surowca tytoniowego kupcom niezarejestrowanym i niewiadomego pochodzenia. Skala tego zjawiska jest niemożliwa do dokładnego określenia, według niektórych opinii jest ona marginalna, według innych znacząca. Niewątpliwie (przynajmniej dla niektórych producentów), możliwość odsprzedaży tytoniu poza oficjalnym systemem skupu mogła, szczególnie po 2009 roku, nabrać dodatkowej atrakcyjności. Mogło to skłonić plantatorów, szczególnie tych produkujących tytoń o niskiej jakości, do skorzystania z oferty kupców działających poza oficjalną siecią skupu, którzy oferują ceny wyższe niż łączna średnia wartość tytoniu sprzedanego oficjalnie (cena + dopłata), przy jednocześnie mało rygorystycznych wymaganiach odnośnie jakości oraz pozostałości niepożądanych składników w liściach. Z tego powodu dostępne dane dotyczące produkcji surowca tytoniowego i wydajności z jednostki powierzchni są prawdopodobnie niższe od rzeczywistych. Według szacunków Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w roku 2012 można spodziewać się wzrostu średnich plonów do ponad 2,5 $t \cdot ha^{-1}$ (rys. 1).



Rys. 1.Średnie plony tytoniu w Polsce w latach 2001-2010 (t·ha^{-1})

Źródło: FAOSTAT (4) dla lat 2001-2010 i w oparciu o informację MRiRW dla lat 2011-2012 (dla roku 2012 dane szacunkowe).

Koszty i opłacalność produkcji tytoniu w Polsce

Koszty ponoszone przez producentów na uprawę tytoniu wykazują stałą tendencję rosnącą, wynikającą z ogólnego wzrostu cen środków produkcji w rolnictwie (w szczególności nawozy, środki ochrony roślin i nośniki energii). Tytoń jest uprawą intensywną, wymagającą dużych nakładów na nawożenie (najlepiej mieszankami nawozowymi specjalnie dedykowanymi do danego typu tytoniu), jak również na środki chemicznej ochrony roślin, gdyż jest porażany przez wiele chorób i szkodników. Przede wszystkim jednak tytoń, a w szczególności dominujący w uprawie typ Virginia, jest uprawą energochłonną. Nakładów energii w formie opału wymaga produkcja rozsady, a w typie Virginia – dodatkowo suszenie, aczkolwiek nakłady energii na dosuszanie mogą występować również w pozostałych typach. Wg oceny IUNG-PIB koszty materiałowe w roku 2010 w przeliczeniu na 1 ha uprawy kształtowały się na poziomie 11400 zł dla tytoniu Virginia i 8400 zł dla tytoniu Burley i pozostałych dwóch grup tytoniu. Średnie koszty materiałowe na uprawę tytoniu w Polsce w 2010 roku wynosiły ok 10400 zł·ha^{-1}. Innym elementem, w istotny sposób wpływającym na rachunek ekonomiczny produkcji tytoniu, są koszty robocizny. Te ostatnie również wzrastają systematycznie, a dodatkowo pracownik najemny jest coraz trudniejszy do pozyskania i często charakteryzuje się niską wydajnością pracy. W latach 2010-2011 cena najmu pracownika do uprawy tytoniu oscylowała wokół 10 zł za godz. Problem siły najemnej dotyczy przede wszystkim gospodarstw uprawiających tytoń na większym niż przeciętny areale.

W roku 2009 średni dochód przypadający na jednostkę (1 kg) wyprodukowanego tytoniu wynosił ok. 13,1 zł, na co składała się średnia cena skupu przez pierwszych przetwórców (4,1 zł·kg^{-1}) oraz dopłaty – związana i niezwiązana z produkcją (łącznie średnio 9 zł·kg^{-1} – tab. 6). W roku 2010 w związku z likwidacją dopłat związanych z produkcją tytoniu przy jednoczesnej podwyżce cen (średnio 7,4 zł·kg^{-1} płacone przez skupujących i 4,8 zł/kg w formie dopłaty nie związanej z produkcją – łącznie 12,2 zł·kg^{-1}), nastąpił pewien spadek średniej łącznej wartości 1 kg surowca tytoniowego sprzedawanego w Polsce. Przede wszystkim drastycznej zmianie uległa proporcja ceny skupu (zależnej od klasy wykupowej, tj. jakości surowca) do dopłaty – niezależnej od jakości wyprodukowanego tytoniu.

Z analizy przeprowadzonej ostatnio w IUNG-PIB, wykonanej *ad hoc* i nie poprzedzonej szczegółowym wywiadem na temat realnie ponoszonych kosztów i uzyskiwanych przychodów w konkretnych gospodarstwach wynika, że rentowność uprawy tytoniu wyrażona nadwyżką bezpośrednią bez uwzględnienia kosztów robocizny, a więc przy założeniu korzystania wyłącznie z pracy członków rodziny, wynosiła w roku 2009 ok. 23000 zł rocznie z 1 ha uprawy (tab. 6). W Polsce średnia powierzchnia uprawy tytoniu w gospodarstwie wynosiła w 2009 roku ok. 1,4 ha. Przy założeniu niekorzystania z robocizny najemnej (możliwym przy takim areale) dochód bezpośredni z tytułu uprawy tytoniu wyniósł ok. 32000 zł na statystyczne gospodarstwo uprawiające tytoń (oznacza to ok. 650 zł miesięcznego dochodu na członka rodziny w gospodarstwie – tab. 7).

W roku 2010 przy spadku średniego plonu (do ok. 2,0 t·ha^{-1}) ha i spadku dochodu uzyskiwanego z 1 kg do 12,2 zł, dochód ten zmalał do ok. 14500 zł na 1 ha uprawy i do 19000 zł (ok. 400 zł na członka rodziny) w statystycznie średnim gospodarstwie uprawiającym tytoń (powierzchnia uprawy 1,4 ha) .

Należy również pamiętać, że wielu plantatorów, szczególnie drobnych, uzyskało w roku 2010 wyniki znacznie poniżej średniej, szczególnie w rejonach dotkniętych trudnymi warunkami pogodowymi. W małoobszarowych gospodarstwach również jakość uzyskanego surowca jest zwykle poniżej średniej. Przykładowo gospodarstwo uprawiające tytoń na powierzchni ok. 1 ha, uzyskujące plon 1,8 t·ha^{-1} (w tabelach 6 i 7 określane jako „gospodarstwo słabe"), przy średniej cenie (łącznie z dopłatą) ok. 10 zł·ha^{-1}, mogło liczyć na nadwyżkę bezpośrednią wynoszącą ok. 7800 zł (ok. 140 zł miesięcznie na członka rodziny, przy założeniu niekorzystania z pracy najemnej). Wymienione wyżej wyniki ekonomiczne tworzą ogólne odczucie nieopłacalności uprawy tytoniu. Przy założeniu, że średnie gospodarstwo tytoniowe o pow. ok. 5 ha (w tym 1,5 ha tytoniu) posiada na utrzymaniu 4 osoby, a tytoń stanowi jedyne źródło stałego dochodu, można łatwo wyliczyć (uwzględniając jednolitą płatność obszarową), że w roku 2010 na 1 osobę w gospodarstwie przypadł dochód wynoszący ok. 5700 zł rocznie (ok. 480 zł miesięcznie). Stanowi to mniej niż połowę średniego miesięcznego dochodu na członka rodziny w Polsce, wynoszącego 1114 zł w roku 2010 (10) i nieco więcej niż połowę średniego dochodu w rodzinach rolniczych

(880 zł). Powyższe relacje można uważać za główne wytłumaczenie obserwowanego spadku zainteresowania uprawą tytoniu. Spadek ten nie jest jeszcze większy, ponieważ uprawiający tytoń mogą mieć inne dochody (rolnicze i pozarolnicze) oraz brak jest uzasadnionej ekonomicznie alternatywy dla uprawy tej rośliny.

W roku 2011 utrzymane były zasady wsparcia obowiązujące w roku 2010 (jednolita płatność obszarowa i płatność niezwiązana z produkcją), a taryfy wykupowe (podane do wiadomości przez głównych pierwszych przetwórców) nie różniły się znacząco od obowiązujących w roku 2010. Niewielki wzrost dochodów w porównaniu z uzyskiwanymi w roku poprzednim może wynikać ze wzrostu plonu i jego jakości do poziomu z 2009 roku, oraz z faktu, że w roku 2011 wystąpiła średnia nadwyżka bezpośrednia, wynoszącą ok. 19000 zł z ha (550 zł miesięcznie na członka rodziny). Ewentualny wzrost dochodu netto spowodowany przez wprowadzenie ostatnio do masowej uprawy wysokoplonujących i wysokojakościowych odmian zarówno produkcji krajowej, jak i zagranicznej, może jednak zostać zniwelowany przez dalszy wzrost cen środków produkcji.

W latach 2012-2013 obowiązuje w Polsce wsparcie specjalne z tytułu poprawy jakości produktów rolnych na podstawie art. 68 ust. 1, a pkt. i rozporządzenia Rady (WE) Nr 73/2009 (13). Zasady tego wsparcia reguluje ustawa o zmianie ustawy o płatnościach w ramach systemów wsparcia bezpośredniego z dnia 27. 01. 2012 roku (Dz.U. 2012 p. 243) (15). Wsparcie obejmuje rolników będących producentami surowca tytoniowego wysokiej jakości, którzy zawarli umowy na uprawę z zatwierdzonymi pierwszymi przetwórcami. Wysokość wsparcia jest powiązana z cenami uzyskiwanymi za dostarczany surowiec w punktach skupu. Płatność z tytułu wsparcia jakości obowiązuje równolegle z dotychczasową płatnością niezwiązaną z produkcją. W odróżnieniu od tej ostatniej, która obejmuje plantatorów produkujących surowiec tytoniowy w latach 2005 i 2006, jedynym warunkiem ubiegania się o płatność w programie wsparcia jakości będzie posiadanie gospodarstwa rolnego o pow. przynajmniej 1 ha, znajdującego się w jednym z 5 okręgów uprawy tytoniu (11). Program jest opracowany oddzielnie dla trzech grup tytoniu (Virginia, Burley oraz grupę tytoni ciemnych, powstałą z połączenia odmian typu Mocny Skroniowski i Kentucky – grupy III i IV). W oparciu o dotychczasowe wyniki produkcji szacuje się, że program obejmie 9,5 tys. ton tytoniu klasy I i II w typie Virginia, 3,9 tys. ton tytoniu klasy I w typie Burley i 3,4 tys. ton tytoniu klasy I w grupach III i IV. W oparciu o powyższe wyliczenia i na podstawie ogólnej kwoty przeznaczonej na ten program (ok. 30 mln euro rocznie) szacuje się, że średnia dopłata do produkowanego w Polsce tytoniu będzie wynosić odpowiednio 2,0, 2,2 i 0,9 euro dla Virginii, Burleya i tytoni ciemnych.

Przyjmując utrzymanie cen za tytoń oferowanych przez pierwszych przetwórców na poziomie z roku 2010 oraz uzyskiwane wydajności na poziomie 2009 roku, wartość brutto 1 kg wyprodukowanego tytoniu będzie na poziomie ok. 20 zł za kilogram (cena płacona przez 1. przetwórcę + dopłata obszarowa + dopłata niezwią-

zana z produkcją+dopłata z tytułu jakości). Spodziewana przy takich założeniach nadwyżka bezpośrednia dla plantatora produkującego tytoń na pow. 1 ha, bez zatrudniania pracowników najemnych będzie zależeć od cen środków produkcji, ale może się kształtować na poziomie ok. 40000 zł (tab. 7). Można przyjąć, że w przypadku funkcjonowania w latach 2012-2013 omawianego systemu wsparcia produkcji roczny dochód z uprawy tytoniu należącego do jednej z dwóch głównych grup (Virginia i Burley) na statystycznie średniej powierzchni 1,4 ha wynosiłby ok. 58000 zł rocznie, co by oznaczało średni miesięczny dochód w wysokości ok. 1200 zł na 1 z 4 osób pracujących w gospodarstwie, a więc zrównanie dochodu na członka rodziny ze średnią ogólnopolską.

Powyższe szacunki i kalkulacje nie uwzględniały kosztów robocizny osób pracujących w gospodarstwie, ani nakładów na amortyzację budynków, sprzętu i urządzeń. Przyjęcie takiej zasady jest zgodne z realiami małych gospodarstw produkujących tytoń, w których percepcja dochodowości kształtuje się na podstawie tej części wartości sprzedanego plonu, która pozostaje po odjęciu kosztów materiałowych.

Poziom zapotrzebowania na tytoń w Polsce

W Polsce działa 6 zarejestrowanych pierwszych przetwórców tytoniu, posiadających uprawnienia do skupowania surowca na terenie naszego kraju: Universal Leaf Tobacco Poland sp. z o. o., FTK sp. z o.o. (niedawno przejęta wraz ze spółką-matką Lubelskimi Zakładami Tytoniowymi przez francuską firmę Biosyntec), Philip Morris Polska Tobacco sp. z o. o., Luxor sp. z o. o., Tabak Polen sp. z o.o. oraz Belfepac Nv (przetwórca belgijski, który posiada prawo do zawierania umów z polskimi plantatorami). Firmy te przerabiają łącznie 26000 t tytoniu. Jednocześnie eksport tytoniu surowego w roku 2010 z Polski wynosił ok 21000 t, a import do Polski – ok. 75000 t.

Na terenie Polski zlokalizowanych jest ponadto 6 zakładów należących do międzynarodowych firm tytoniowych (Philip Morris Polska – zakład w Krakowie, British American Tobacco Polska – zakłady w Augustowie i pod Myślenicami, Japan Tobacco Polska – zakład w Poddębicach, Imperial Tobacco Polska – zakłady w Tarnowie Podgórnym i w Radomiu) oraz Zakłady Tytoniowe w Lublinie. Firmy te produkują łącznie ok. 135000 t wyrobów tytoniowych.

Na podstawie danych dotyczących przerobu tytoniu surowego w Polsce i danych eksportu tytoniu (11) można przyjąć, że rynek w naszym kraju jest w stanie zaabsorbować ok. 50000 t nieprzerobionego tytoniu rocznie. Można przypuszczać, że w przypadku wycofania się części działających w Polsce pierwszych przetwórców ich rolę na rynku w pewnym stopniu (trudnym do ustalenia), mogą przejąć kupcy zagraniczni, którzy w zaistniałej sytuacji zechcą podjąć starania o uzyskanie

licencji na kontraktowanie tytoniu u plantatorów w Polsce. Pewną rolę w podtrzymaniu zapotrzebowania na tytoń mogą też odegrać wyżej wspomniani nielicencjonowani kupcy, skupujący tytoń bezpośrednio u plantatorów.

Konsekwencje zaprzestania ukierunkowanego subsydiowania rynku tytoniowego po 2013 roku

Zaprzestanie wsparcia plantatorów tytoniu na drodze takich czy innych dopłat mających związek z produkowanym przez nich surowcem oznacza, że o opłacalności produkcji decydować będzie jedynie cena oferowana przez pierwszych przetwórców. Można z dużym prawdopodobieństwem przyjąć, że taryfy wykupowe na tytoń w Polsce osiągnęły obecnie poziom światowych cen rynkowych i jeśli będą się zmieniać, to zmiany te będą głównie związane z wahaniami cen na tych rynkach. Średnia cena skupu tytoniu Virginia w Polsce w roku 2010 wynosiła ok. 8 zł za kg, co jest bliskie wartości 2,8 USD, wokół której oscylowały ceny tytoniu surowego na świecie. Ewentualne podniesienie taryf wykupowych w Polsce mogą spowodować dwie okoliczności: a) główni producenci tytoniu są geograficznie odlegli od Polski (Ameryka Płd, Daleki Wschód, Afryka) i sprowadzanie tytoniu na potrzeby przerobu w Polsce wiąże się z dodatkowymi kosztami przewozu, b) w Polsce zlokalizowane są duże zakłady produkujące wyroby tytoniowe (50% ich produkcji jest eksportowana) i ich likwidacja pociągnęłaby za sobą powstanie problemów logistycznych, ekonomicznych, a nawet politycznych.

W sytuacji zaprzestania subsydiów, przeciętne polskie gospodarstwo tytoniowe (ok. 1.4 ha tytoniu), przyjmując nawet niewielki wzrost plonów (do 2,7 $t \cdot ha^{-1}$) i ceny jednostkowej surowca (do 8 zł/kg), uzyska wartość sprzedaży surowca nie większą niż 30 tys. zł (tab. 7). Przyjmując nieunikniony wzrost kosztów materiałowych o ok. 10%, uzyskaną nadwyżkę bezpośrednią na 1 ha bez uwzględnienia kosztów robocizny można szacować poniżej 10000 zł (tab. 7), co oznacza mniej niż 300 zł miesięcznie na osobę w czteroosobowej rodzinie uprawiającej tytoń na powierzchni 1,4 ha.

Parametry opłacalności, które prawdopodobnie wystąpią po roku 2013 będą gorsze niż obecne i porównywalne do tych, które wystąpiły w 2010 roku w słabszych gospodarstwach uprawiających tytoń. O ile wyraźne pogorszenie opłacalności uprawy tytoniu w roku 2010 w stosunku do lat poprzednich jeszcze nie spowodowało gwałtownego załamania uprawy, to sytuacja po roku 2013 może stanowić szok dla producentów tytoniu, tym bardziej, że wystąpi ona po dwuletnim okresie przypuszczalnie znacznej poprawy w tym względzie.

Można się zatem spodziewać, że główną konsekwencją zaprzestania subsydiowania produkcji tytoniu będzie masowy odpływ plantatorów, szczególnie drobnych i średnich, przy jednoczesnym zwiększeniu powierzchni uprawy przez dużych producentów, którzy przez dwa lata względnie wysokiej opłacalności zgromadzą odpowiednie rezerwy środków koniecznych na dodatkowe zwiększenie powierz-

chni uprawy. Zakładając intensywną produkcję tytoniu (plon w granicach 3,5 $t \cdot ha^{-1}$) o wysokiej jakości (8,5 $zł \cdot kg^{-1}$) na powierzchni 10 ha i kosztach najmu pracowników sezonowych wynoszących ok. 120000 zł, można będzie osiągnąć dochód z uprawy w wysokości ok. 60000 zł, co może już uzasadniać celowość kontynuowania takiej produkcji. Na jeszcze większych areałach dochody mogą być odpowiednio większe. Dużą rolę w utrzymaniu produkcji tytoniu w Polsce w tych zmienionych warunkach, oprócz dostępu do względnie taniej siły roboczej, będzie miał zapewne do odegrania dobrze funkcjonujący system kredytowania, dotychczas nie posiadający szczególnie istotnego znaczenia z uwagi na małą skalę produkcji i stosunkowo niskie nakłady w poszczególnych gospodarstwach.

Inne uwarunkowania

Istotnym czynnikiem mogącym mieć bardzo znaczący wpływ na uprawę tytoniu, zarówno w Polsce jak i w wielu innych krajach świata, jest prowadzona na wielu płaszczyznach i przez wiele organizacji kampania antytytoniowa. Znalazła ona swój najbardziej dobitny wyraz w międzynarodowym traktacie, tzw. Ramowej Konwencji Kontroli Rynku Wyrobów Tytoniowych (FCTC), przygotowanej pod auspicjami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), która weszła w życie w roku 2005 i którą dotychczas ratyfikowało 168 krajów (5). Postanowienia traktatu mają na celu ograniczenie popytu i podaży wyrobów tytoniowych i obejmują regulację reklamy i promocji, opakowania i oznakowania, zawartość produktu i informację o produkcie oraz politykę cenową i fiskalną. FCTC nakłada na ratyfikujące kraje obowiązek wprowadzania skutecznych programów walki z paleniem tytoniu zgodnych z prawem krajowym i uwzględniających lokalne uwarunkowania kulturowe, społeczne i polityczne (17). Od roku 2007 Konferencja Stron (COP) – ciało zarządzające Konwencją – zaostrzyła kurs antytytoniowy, przyjmując szereg tzw. wytycznych wybiegających poza postanowienia traktatowe i obliczonych już nie tylko na ograniczenie popytu na wyroby tytoniowe i konsumpcji tych wyrobów, ale także mających na celu bezpośrednio lub pośrednio likwidację lub przynajmniej drastyczne ograniczenie uprawy tytoniu. W roku 2010 COP ogłosiła wytyczne w ramach artykułów 9 i 10 Konwencji. Wytyczne te nakładają ograniczenia lub zakazują stosowania składników, substancji aromatyzujących i innych dodatków, które „zwiększają atrakcyjność" wyrobu tytoniowego (2). Ograniczenia te, w przypadku przyjęcia ich przez państwa – strony traktatu, praktycznie wyeliminują zapotrzebowanie przemysłu na niektóre typy tytoniu, przede wszystkim na szeroko rozpowszechnione w uprawie odmiany typu Burley. Tytonie te, ze względu na swoje właściwości fizyczne są szeroko stosowane w wyrobach tytoniowych jako umożliwiające tzw. sosowanie, czyli dodawanie do produktu różnych substancji nadających pożądane właściwości gotowemu wyrobowi. Wytyczne przygotowywane na rok 2012 odnoszą się do artykułów 17 i 18 Konwencji, których postanowienia zobowiązują strony traktatu do zapewnie-

Tabela 6

Szacunkowa opłacalność uprawy tytoniu w Polsce (aktualna i prognozowana). Dane uśrednione dla dwóch głównych typów tytoniu na 1 ha uprawy

Rok	Średnia cena skupu (zł·kg^{-1})	Wsparcie związane i niezwiązane z produkcją (zł·kg^{-1})	Wsparcie związane z jakością (zł·kg^{-1})	Wartość 1 kg plonu wraz z dopłatami	Plon (t·ha^{-1})	Wartość plonu (zł·ha^{-1})	JPO*** (zł·ha^{-1})	Razem przychód (zł·ha^{-1})	Koszty materiałowe (zł·ha^{-1})	Koszty najmu pracowników (zł·ha^{-1})	Nadwyżka bezpośrednia (zł·ha^{-1})
2009	4,1	9,0		13,1	2,5	32750	507	33257	10000		23257
2010	7,4	4,8		12,2	2,0	24400	562	24962	10400		14562
2010 przykładowe „gospodarstwo słabe”*	5,0	4,8		9,8	1,8	17640	562	18202	10400		7802
2011	7,4	4,8		12,2	2,5	30500	600*	31100	10800		20300
2012-2013	7,6	4,8	8,0	20,4	2,6	53040	650*	53690	11500		42190
Po 2013	8,0			8,0	2,7	21600	700*	22300	12500		9800
Po 2013 intensywne gospodarstwo 10 ha tytoniu**	8,5			8,5	3,5	29750	700*	30350	12500	12000	5850

* gospodarstwo uprawiające tytoń na pow. ok. 1 ha, uzyskujące plon 1,8 t·ha^{-1};
** gospodarstwo uprawiające tytoń na pow. ok. 10 ha, uzyskujące plon 3,5 t·ha^{-1}
*** JPO-jednolita płatność obszarowa

Tabela 7

Szacowany dochód z uprawy tytoniu w Polsce w latach 2009-2013 i po roku 2013 (aktualny i prognozowany).dla różnych lat i gospodarstw

Rok/typ gospodarstwa	Przychód na gospodarstwo (zł)	Koszty materiałowe (zł) ***	Nadwyżka bezpośrednia na gospodarstwo (zł)	Miesięczny dochód na członka rodziny (zł)
2009 (gospodarstwo średnie – 1,4 ha tytoniu)	46560	14000	32560	678
2010 (gospodarstwo średnie – 1,4 ha tytoniu)	34009	14560	19449	405
2010 (przykładowe gospodarstwo słabe – 1 ha tytoniu)*	18202	10400	7802	163
2011 (gospodarstwo średnie – 1,4 ha tytoniu)	43540	15120	28420	592
2012-2013 (gospodarstwo średnie – 1,4 ha tytoniu)	75166	16100	59066	1231
po 2013 (gospodarstwo średnie – 1,4 ha tytoniu)	31220	17500	13720	286
po 2013 (intensywne gospodarstwo 10 ha tytoniu)**	303500	245000	58500	1219

* gospodarstwo uprawiające tytoń na pow. ok. 1 ha, uzyskujące plon 1,8 $t \cdot ha^{-1}$;
** gospodarstwo uprawiające tytoń na pow. ok. 10 ha, uzyskujące plon 3,5 $t \cdot ha^{-1}$;
*** dla gospodarstwa o pow. 10 ha, uwzględnione również koszty robocizny w wys. 120000 zł

nia alternatywnych środków utrzymania plantatorom tytoniu dotkniętym spadkiem podaży. Opracowywane przez COP wytyczne wykraczają daleko poza postanowienia w/w artykułów i mają na celu bezpośrednie wymuszenie ograniczenia uprawy tytoniu. Mają one obejmować m.in. zakaz stosowania cen minimalnych na tytoń, zakaz pomocy technicznej dla rolników uprawiających tytoń przez firmy skupujące, zakaz zawierania kontraktów z rolnikami przez firmy tytoniowe. Wprowadzenie w życie tych wytycznych oznacza całkowitą destrukcję organizacji produkcji tytoniu przez miliony plantatorów na całym świecie (1). Jednak nie wszyscy czołowi producenci ratyfikowali konwencję FCTC (nie ratyfikowały m.in. Argentyna, USA, Malawi, Zimbabwe, Indonezja). Trudno także przypuszczać, by do projektowanych wytycznych zastosowali się dwaj najwięksi producenci (Chiny i Brazylia), godząc się tym samym na trudne do przewidzenia perturbacje gospodarcze i społeczne w swoich krajach. Należy więc przypuszczać, że wbrew intencjom projektodawców, zamierzone przez FCTC restrykcje nie wpłyną w znaczący sposób na globalną podaż surowca tytoniowego. Głównym skutkiem ewentualnego wprowadzenia w życie tych rozwiązań będzie przesunięcie uprawy tytoniu z krajów, które do rygorów konwencji się zastosują, do krajów nie związanych konwencją lub nie godzących się na jej postanowienia. Z dużym prawdopodobieństwem można więc przyjąć, że marzenie protagonistów Ramowej Konwencji o „świecie wolnym od tytoniu" nie sprawdzi się w możliwej do przewidzenia przyszłości. Jest jednak równie oczywiste, że uprawa tytoniu i los rolników-producentów tytoniu w wielu krajach, w tym w Polsce, są zagrożone i że w najbliższym czasie będą w większym stopniu zależeć od decyzji politycznych niż od naturalnej gry rynkowej.

Literatura

1. A b r u n h o s a A.: Chief executive report. Published by International Tobacco Growers' Association. Tobacco Courier, 2012, **53**: 6-7.
2. Anon. FCTC Update. COP4 15th to 20th of November. Chief executive report. Published by International Tobacco Growers' Association. Tobacco Courier, 2010, **48**: 21-26.
3. European Commission. Agriculture and Rural Development. Agricultural markets: Raw tobacco 2011. http://ec.europa.eu/agriculture/markets/tobacco/index_en.htm
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Crops. Tobacco unmanufactured. http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx
5. Framework Convention Alliance. http://www.fctc.org
6. G o o d s p e e d T. H.: Genus Nicotiana. Chronica Botanica. Waltham, Mass, 1954.
7. Konferencja prasowa Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi Marka Sawickiego „Aktualna sytuacja na rynkach rolnych" 20 kwietnia 2011 r. MRiRW.Warszawa. Materiały informacyjne
8. Odpowiedź podsekretarza stanu w Ministerstwie Rolnictwa i Rozwoju Wsi – z upoważnienia ministra na interpelację nr 17089 w sprawie dopłat do produkcji surowca tytoniowego 2010. http://orka2.sejm.gov.pl/IZ6.nsf/main/6306BD46
9. Rocznik statystyczny rolnictwa. Główny Urząd Statystyczny, Warszawa, 2011.
10. Rocznik statystyczny. Główny Urząd Statystyczny, Warszawa, 2011.

11. Rozporządzenie ministra Rolnictwa z 14 marca 2012 w sprawie rejonów uprawy tytoniu. Dz.U. 2012. poz. 276 par. 2.
12. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 173/2011 Art. 1, poz.3
13. Rozporządzenie Rady WE 73/2009 Art. 68 ust.1
14. S k i e n d z i e l e w s k i J.: Uprawa tytoni papierosowych. Warszawa, 1949.
15. Ustawa o zmianie ustawy o płatnościach w ramach systemów wsparcia bezpośredniego oraz niektórych innych ustaw z dnia 27 stycznia 2012. Dz.U. 2012 p. 243
16. V o g e l E.: Tobacco Encyclopedia. Part II. History. Published by Tobacco Journal International, 1984.
17. Z y g u l s k a A. L., K o w a l c z y k A.: Palenie tytoniu, jako problem medyczny i prawny – wybrane zagadnienia. Zdr. Publ., 2008, **118(3)**: 341-347.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Apoloniusz Berbeć
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 221
e-mail: berbec@iung.pulawy.pl

S T U D I A I R A P O R T Y IUNG-PIB
ZESZYT 31(5) 2012

Anna Depta, Magdalena Kawka, Karolina Kursa, Teresa Doroszewska

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

NOWOCZESNE METODY I TECHNIKI W ULEPSZANIU GENOTYPÓW TYTONIU DLA PRODUKCJI ROLNICZEJ I POPRAWY JAKOŚCI SUROWCA*

Wstęp

Tytoń uprawny stanowi jedną z ważniejszych dla człowieka roślin przemysłowych. Głównym celem prac hodowlanych jest dostarczenie rolnikom odpornych odmian, zapewniających stabilne plonowanie i tym samym decydujących o opłacalności produkcji, a dla przemysłu – surowca o dobrych cechach jakościowych. Nowe odmiany tytoniu z jednej strony powinny cechować się odpornością na patogeny, szczególnie na te, których zwalczanie jest utrudnione lub kosztowne, z drugiej zaś surowiec z nich otrzymany powinien odznaczać się odpowiednimi właściwościami technologicznymi ważnymi z punktu widzenia przemysłu tytoniowego. Obecnie prace nad ulepszaniem genotypów tytoniu łączą metody tradycyjnej hodowli z metodami biotechnologicznymi, np. zastosowaniem kultur *in vitro,* czy technikami biologii molekularnej, co znacznie skraca i ułatwia proces hodowlany. Tytoń jako roślina modelowa jest również obiektem wielu badań z zakresu genetyki, biologii molekularnej i biotechnologii, a uzyskane wyniki mają znaczący wkład w rozwój tych dziedzin nauki. W poniższym rozdziale zostały omówione zarówno metody i techniki znane i stosowane od wielu lat, jak również te najnowsze, które zrewolucjonizowały hodowlę i genetykę roślin.

Bariery krzyżowalności w mieszańcach międzygatunkowych/przełamywanie nieżywotności form mieszańcowych

Wykorzystanie gatunków oddalonych w hodowli daje szansę transferu wielu korzystnych genów, warunkujących lepszy plon lub odporność na choroby i szkodniki. Niestety, krzyżowanie międzygatunkowe wiąże się z wieloma trudnościami. Wraz z rozwojem nauki zwiększają się możliwości przełamywania barier krzyżowalności, do których należą niezgodność krzyżówkowa, śmiertelność oraz bezpłodność mieszańców.

Niezgodność krzyżówkowa, czyli niemożność uzyskania nasion mieszańcowych, może być spowodowana wieloma czynnikami. Jako pierwszą przyczynę wymienia się

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

trudność dotarcia łagiewki pyłkowej do zalążni. Może być ona spowodowana różnicą w długości słupka pomiędzy gatunkiem matecznym i ojcowskim, fizjologiczną inhibicją wzrostu łagiewki pyłkowej lub mechanicznymi trudnościami w penetracji łagiewki przez tkankę słupka. Inhibicja fizjologiczna, określana jako tzw. niezgodność gametofityczna, jest warunkowana genetycznie (149), natomiast inhibicja mechaniczna jest spowodowana różnicami w wielkości komórek gatunków rodzicielskich. Dotarcie łagiewki do zalążni nie gwarantuje jeszcze sukcesu, gdyż gamety żeńska i męska nie zawsze się łączą ze sobą. Wiąże się to z podziałami komórek ośrodka bez utworzenia zarodka i bielma, a w konsekwencji niewytworzenie nasion lub utworzenie diploidalnego bielma i powstanie nasion bez zarodka. Zjawiskiem spotykanym przy krzyżowaniu z udziałem dzikich gatunków rodzaju *Nicotiana* jest powstawanie haploidalnych lub diploidalnych roślin typu matecznego lub ojcowskiego, spowodowane podziałami komórkowymi komórki jajowej lub jądra plemnikowego w woreczku zalążkowym. Haploidy mateczne uzyskano w krzyżówkach *Nicotiana tabacum* × *N. africana* (26), natomiast haploidy typu androgenicznego powstały w krzyżówce *N. tabacum* × *N. gossei* (27). Przyczyną niezgodności krzyżówkowej może być również nieprzeżywalność zarodka i w konsekwencji nieżywotne nasiona. Zahamowanie rozwoju zarodka tłumaczy się niezgodnością między matecznym bielmem i obcym zarodkiem.

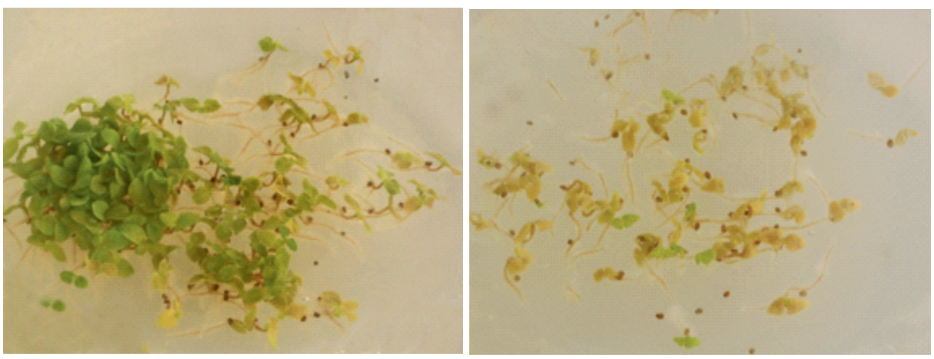
Sposobami na przełamanie tego typu niezgodności są: odpowiedni dobór gatunków i odmian do krzyżowań, nacięcie szyjki słupka (173) oraz zastosowanie tzw. pyłku mentora. Ostatnia metoda, opisana przez P a n d e y w roku 1977 (149), polega na zmieszaniu zgodnego pyłku z niezgodnym pyłkiem właściwym i naniesienie ich na znamię słupka. Pyłek-mentor poddawany jest wcześniej promieniowaniu jonizującemu, co pozwala zniszczyć jego jądra generatywne, ale nie niszczy zdolności kiełkowania i tworzenia łagiewki pyłkowej, która dostarcza substancji stymulujących dla wzrostu łagiewki pyłku właściwego. Uzyskanie żywotnych nasion w krzyżówkach *N. tabacum* × *N. rosulata* i *N. tabacum* × *N. debneyi* było możliwe na drodze sztucznego zapylenia wyciętych zalążków i hodowli zapłodnionych zalążków w warunkach *in vitro* (177). W momencie wystąpienia barier o charakterze zygotycznym zapłodnienie *in vitro* może okazać się nieskuteczne. Kolejnym sposobem mającym na celu poprawę żywotności i liczby nasion jest zastosowanie różnych związków chemicznych, jak na przykład kwas giberelinowy (120). W celu zapobieżenia abscysji, opadaniu kwiatów i zwiększeniu liczby nasion, można zastosować 5% mieszaninę IAA w lanolinie na szypułki kwiatowe (31) lub przeprowadzić wielokrotne zapylanie tych samych kwiatów.

W latach 70. opracowano metodę fuzji protoplastów, czyli łączenia ze sobą komórek somatycznych. Opisana przez G a m b o r g a i W e t t e r a w 1975 roku (75) metodyka obejmowała trzy etapy: izolację protoplastów na drodze enzymatycznego rozkładu ścian komórkowych, łączenie protoplastów w obecności glikolu polietylenu oraz selektywną hodowlę produktów fuzji. Użycie odpowiedniej

pożywki pozwala odróżnić kalus form mieszańcowych od kalusa form rodzicielskich. Pierwszym międzygatunkowym mieszańcem w rodzaju *Nicotiana* uzyskanym na drodze fuzji był *N. langsdorfii* × *N. tabacum* (32). Prace nad izolacją i fuzją protoplastów tytoniu prowadzono również w IUNG w Puławach z wykorzystaniem dwóch metod (144, 145). Pomyślny przebieg izolacji, łączenia protoplastów i regeneracji roślin napotykał jednak dalsze trudności związane z prowadzeniem wydajnej i szybkiej metody selekcji mieszańców somatycznych. Poza tym metoda fuzji protoplastów pozwalała obejść bariery krzyżowalności na drodze gametycznej, ale nie zmniejszała trudności łączenia genomów krzyżowanych gatunków.

Nieprzeżywalność mieszańców, czyli zamieranie roślin w fazie siewki lub na dalszym etapie rozwoju, może być spowodowane somatyczną niestałością chromosomów (133). Nieregularne podziały mitotyczne i inne przejawy niestałości chromosomowej we wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego prowadzą do utworzenia różnych, często niezbalansowanych genotypów i, co za tym idzie, pojawianie się w F_1 zróżnicowanych, często nieprzeżywających fenotypów. Nieżywotność mieszańców została podzielona na cztery typy w oparciu o objawy (193):

- Typ I – brązowienie wierzchołka pędu i korzenia,
- Typ II – brązowienie liścieni i korzeni (rys. 1),
- Typ III – żółknięcie liści,
- Typ IV – tworzenie wielu pędów.



Rys. 1. Nieżywotność typu II w mieszańcach międzygatunkowych *N. tabacum* 'VAM' × *N. africana* (a) oraz *N. tabacum* 'Wiślica' × *N. africana* (b)

Źródło: fot. A. Depta, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

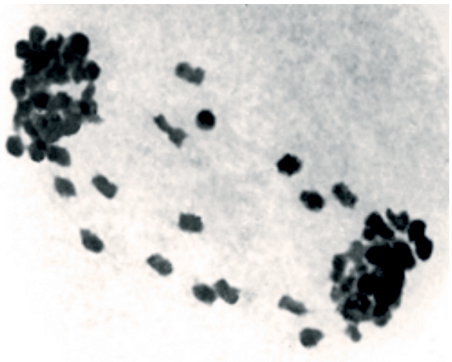
Badania wskazują, że co najmniej typ II i III związany jest z programowaną śmiercią komórki, czyli apoptozą, której towarzyszą kondensacja chromatyny, fragmentacja jądra i wewnątrzjądrowa fragmentacja DNA. Te obserwacje wskazują, że nieżywotność mieszańców jest kontrolowana genetycznie, w wyniku interakcji między genomami oraz, że czynniki cytoplazmatyczne nie biorą w tym udziału. W rodzaju *Nicotiana* sekcji *Suaveolentes,* co najmniej dziewięć gatunków (*N. africana, N. debneyi, N. excelsior, N. goodspeedii, N. gossei, N. maritima, N. megalosiphon, N. suaveolens* i *N. velutina*) tworzy nieżywotne mieszańce w typie II po krzyżowaniu z tytoniem uprawnym (128, 175, 192).

Analiza monosomiczna oraz wykorzystanie metod molekularnych pozwoliły stwierdzić, że za letalność mieszańców *N. tabacum* i *N. debneyi* odpowiada pojedynczy dominujący gen (*Hybrid Lethality* A1; HLA1), pochodzący od dzikiego gatunku, który wchodzi w interakcje z genem lub genami na chromosomie Q u *N. tabacum*. W celu określenia, który subgenom *N. tabacum* jest odpowiedzialny za letalność mieszańców, wykonano dwie krzyżówki pomiędzy *N. debneyi* × *N. sylvestris* oraz *N. debneyi* × *N. tomentosiformis*. We wszystkich przypadkach wykonano krzyżówki zwrotne. Mieszańce z *N. sylvestris* zamierały na etapie siewki, a obserwacje mikroskopowe i cytometryczne wskazywały na proces apoptozy. Mieszańce z *N. tomentosiformis* były żywotne i nie zaobserwowano żadnych zmian w genomie. Świadczy to jednoznacznie o obecności genów letalności w subgenomie S *N. tabacum*. W rodzaju *Nicotiana* mogą występować inne kombinacje genowe prowadzące do zamierania mieszańców. Przykładem reakcji w typie III jest mieszaniec *N. tabacum* i *N. repanda*. W tym przypadku krzyżowanie z przodkami tytoniu, czyli *N. sylvestris* i *N. tomentosiformis*, wskazuje na obecność genów letalności w subgenomie T (93, 174).

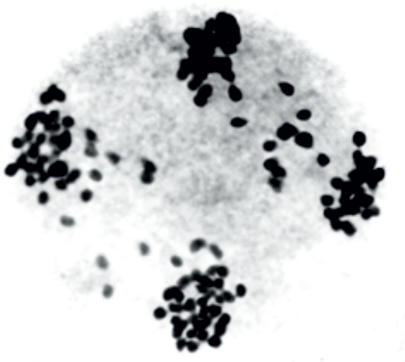
Do sposobów przełamywania tego typu odporności należy m.in. wysiew jak największej liczby nasion roślin mieszańcowych oraz optymalizacja warunków środowiskowych dla wzrostu i rozwoju młodych roślin. Zastosowanie hodowli tkankowej pozwoliło uzyskać żywotne rośliny mieszańcowe, u których następowała degeneracja systemu korzeniowego na etapie siewki. Do tego typu mieszańców należą m.in.: *N. occidentalis* × *N. tabacum* (176), *N. tabacum* × *N. debneyi* (177), *N. suaveolens* × *N.tabacum* (119). Żywotne rośliny mieszańcowe *N. tabacum* × *N. africana* uzyskano stosując kulturę *in vitro* liścieni (60). Kolejną metodę zastosowali Reed i Collins w 1978 (157), dla mieszańców *N. stoctonii* × *N. tabacum*, *N. nesophila* × *N. tabacum* i *N. repanda* × *N. tabacum*. Polegała ona na przeniesieniu w sześć dni po zapyleniu zapłodnionych zalążków aseptycznie usuniętych z zalążni.

Sposobem utrzymania żywotnych roślin mieszańcowych może być przetrzymywanie ich w warunkach podwyższonej temperatury. Badania wskazały, że optymalna jest temperatura 34ºC. Obniżenie temperatury do 28ºC inicjuje zamieranie roślin. Odwrotnie zachowują się rośliny wyjściowe, brane do krzyżówek, dla których najlepsza temperatura to 28ºC.

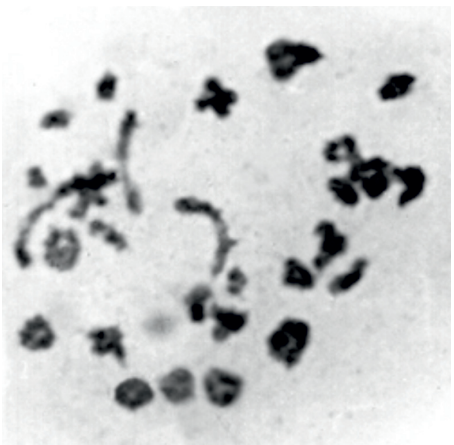
Bezpłodność mieszańców międzygatunkowych stanowi duży problem w hodowli, gdyż niemożliwe jest uzyskanie nasion z samozapylenia, jak również wykonanie krzyżówek wstecznych. Dotyczy to niemal wszystkich mieszańców w rodzaju *Nicotiana*, w tym krzyżówek z *N. tabacum*. Wyjątkiem są mieszańce *N. alata* × *N. langsdorfii* oraz *N. alata* × *N. amplexicaulis* (84). Bezpłodność międzygatunkowych mieszańców *Nicotiana* wywołana jest głównie strukturalnymi różnicami w chromosomach, co uniemożliwia ich normalną koniugację oraz różnicami w liczbach chromosomów u gatunków biorących udział w powstaniu mieszańca. Prowadzi to do przypadkowego rozchodzenia się uniwalentów podczas podziałów mejotycznych i tworzenia niezbalansowanych chromosomów i niefunkcjonalnych gamet (rys. 2).



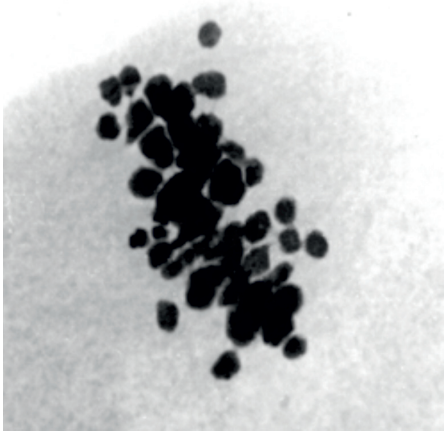
a) Anafaza I KMP roślin pokolenia BC_2 – chromosomy opóźnione



b) Anafaza II KMP roślin pokolenia BC_2 – chromosomy opóźnione



c) Diakineza w KMP roślin pokolenia BC_2F_2 – 24 biwalenty i 4 uniwalenty



d) Metafaza I KMP roślin pokolenia BC_2 – 15 uniwalentów poza płytką metafazową

Rys. 2. Zaburzenia mejozy obserwowane u mieszańców *N. tabacum* × *N. africana*.

Źródło: Doroszewska, 2004 (58).

Inne nieregularne procesy, które przyczyniają się do zaburzeń w normalnym rozchodzeniu się chromosomów, to pęknięcia chromosomów, mostki chromatynowe i powstawanie chromosomów w równikowej strefie mejozytu. Takie zaburzenia obserwowano wśród mieszańców międzygatunkowych *N. tabacum* × *N. africana* (54).

Istnieje kilka metod pozwalających przełamać problem bezpłodności mieszańców. Należą do nich wykorzystanie niezredukowanych gamet lub podwojenie liczby chromosomów somatycznych międzygatunkowego mieszańca F_1 za pomocą tzw. trucizn mitotycznych. Są to związki chemiczne, które zakłócają przebieg tworzenia się wrzeciona kariokinetycznego podczas podziału komórki, w wyniku czego następuje podział chromosomów, po którym nie następuje rozejście się siostrzanych chromatyd do biegunów. Podzielone chromosomy zostają w płaszczyźnie równikowej komórki i w telofazie są otoczone wspólną błoną jądrową. Usunięcie w tym momencie związku antymito-

tycznego, poprzez płukanie, pozwala komórce na prawidłowy podział. Najczęściej używanym w tym celu związkiem chemicznym jest kolchicyna, aplikowana podczas kiełkowania nasion bądź rozwoju stożków wzrostu (12).

Druga grupa metod poliploidyzacyjnych wykorzystuje komórki poliploidalne, naturalnie występujące w roślinie lub ich indukcję w warunkach *in vitro* poprzez zastosowanie hormonów wzrostowych, czy wydłużenie czasu prowadzenia kultury (59). W ten sposób uzyskano amfidiploidalne mieszańce *N. tabacum* × *N. africana*, które charakteryzowały się wysoką płodnością (55), warunkującą ich dalsze wykorzystanie w hodowli odpornościowej. Komórki poliploidalne występują w części korowej i walca osiowego łodygi i korzeni. Powstają głównie w procesie endomitozy. Można je pobudzić do podziałów i tworzenia kalusa poprzez zranienie lub zastosowanie hormonów wzrostowych. Spontaniczne amfidiploidy mogą powstać na drodze zapłodnienia niezredukowanej komórki jajowej przez niezredukowane jądro plemnikowe lub przez spontaniczne podwojenie chromosomów we wczesnych fazach rozwoju embrionalnego u mieszańca F_1. Najbardziej skuteczną metodą uzyskania płodnych mieszańców międzygatunkowych jest krzyżowanie tetraploidalnych form obu gatunków rodzicielskich lub krzyżowanie formy diploidalnej z tetraploidalną, prowadzące do otrzymania częściowo płodnego pokolenia seskwidiploidalnego (55).

Innym sposobem przełamania barier krzyżowalności pomiędzy gatunkiem uprawnym i dzikim jest zastosowanie krzyżowania pomostowego poprzez gatunek trzeci, który krzyżuje się zarówno z gatunkiem uprawnym, jak i dzikim. Po raz pierwszy w roku 1967 zastosował tę metodę B u r k (29). Krzyżował on *N. repanda* z *N. tabacum* w celu przeniesienia odporności na mozaikę od *N. repanda*. Gatunkiem pomostowym był *N. sylvestris*. Inną kombinację pomostową zastosował B o l s u n o v w roku 1971 (24) w celu przeniesienia odporności na mączniaka rzekomego z *N. exigua* do *N. tabacum*. W pierwszym etapie skrzyżował on *N. exigua* z *N. rustica*, a następnie tak otrzymanego mieszańca krzyżował z *N. tabacum*.

Uzyskanie płodnych i żywotnych form mieszańcowych jest bardzo ważnym etapem na drodze wykorzystania pożądanych cech gatunków oddalonych. Jednakże introgresja czynników odporności z gatunków dzikich do genomu *N. tabacum* wiąże się z trudnościami w rozbiciu grup sprzężeń przenoszonych na dużych odcinkach materiału genetycznego, warunkującego szereg cech niekorzystnych pod względem gospodarczym. Powoduje to, że mimo istniejącego potencjału czynników odporności w rodzaju *Nicotiana,* niewiele jest odmian uprawnych niosących geny odporności od dzikich gatunków.

Tworzenie haploidów i podwojonych haploidów

Połączenie tradycyjnej hodowli tytoniu z metodami biotechnologicznymi, np. zastosowaniem kultur *in vitro* jest ważne z praktycznego punktu widzenia, ponieważ pozwala znacznie przyspieszyć proces hodowlany. Skrócenie czasu potrzebnego na

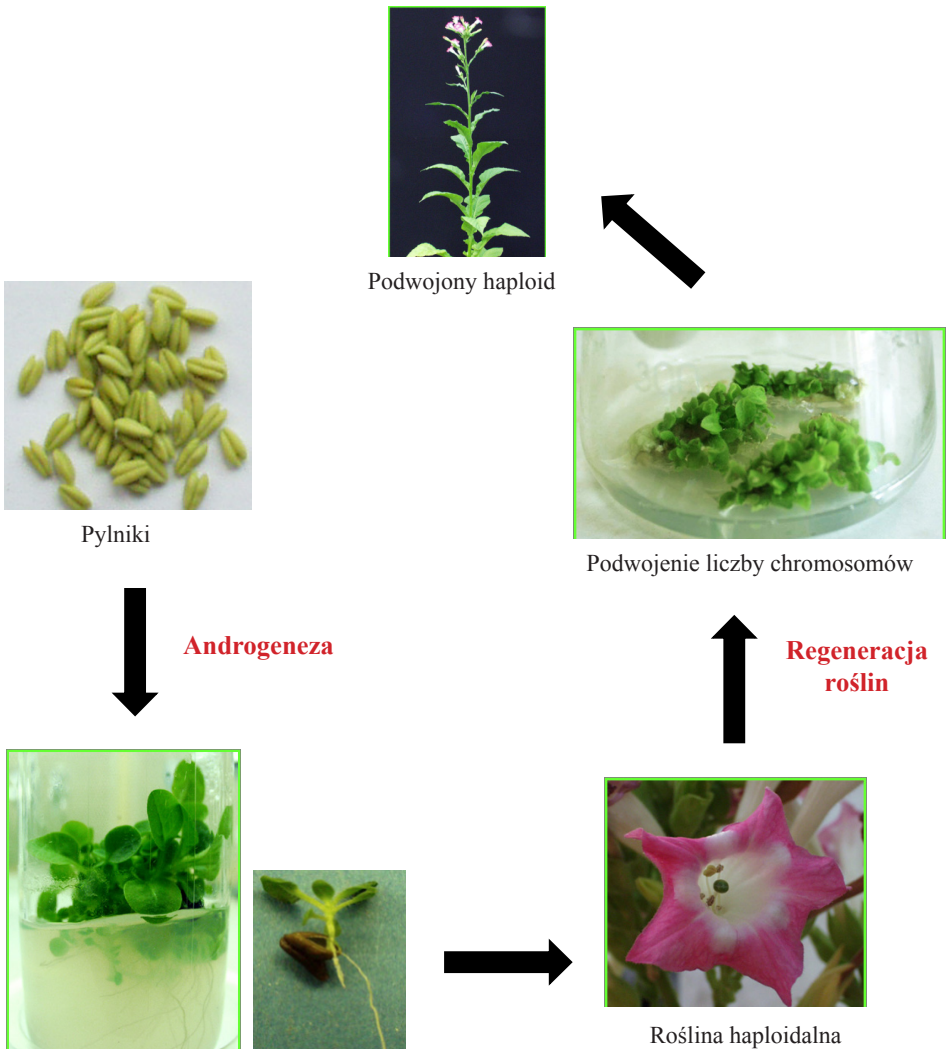
wyhodowanie nowej odmiany można osiągnąć przez otrzymanie roślin haploidalnych z mieszańcowego pokolenia F_1, czyli roślin z gametyczną liczbą chromosomów. Dzięki temu selekcja roślin pod względem pożądanej cechy jest ułatwiona, ponieważ właściwości kodowane przez allele recesywne zostają ujawnione w fenotypie. Po raz pierwszy rośliny haploidalne otrzymała w 1921 roku D. B e r g n e r (158) dla gatunku *Datura stramonium*, natomiast pierwsze doniesienia o uzyskaniu haploidalnych roślin *N. tabacum* przez C l a u s e n 'a i M a n n 'a (153) pochodzą z 1924 roku. Znaczne przyspieszenie w tym względzie nastąpiło w wyniku opracowania metod otrzymywania haploidów w warunkach laboratoryjnych np. z wykorzystaniem kultury *in vitro* pylników. Pierwsze takie rośliny *N. tabacum* otrzymał B o u r g i n i N i t s c h w 1967 roku (153). Najwięcej haploidalnych tkanek czy roślin powstających bądź to spontanicznie, bądź z wykorzystaniem różnych technik do ich indukcji, zaobserwowano w rodzinie psiankowatych (*Solanaceae*), do której m.in. należy tytoń, ale także u kapustnych (*Brassicaceae*), roślin zbożowych (*Cereales*) oraz traw (*Gramineae*) (126).

Haploidy mogą powstawać spontanicznie bądź w wyniku indukcji z wykorzystaniem różnych technik haploidyzacji. Techniki te opierają się na takich procesach biologicznych jak androgeneza *in vitro*, gynogeneza *in vitro*, apomiksja czy eliminacja chromosomów. Dla wielu gatunków roślin charakterystyczny jest tylko jeden z procesów, natomiast dla *N. tabacum* wszystkie wymienione metody okazały się skuteczne w otrzymywaniu roślin haploidalnych (153). Najpowszechniej wykorzystywaną techniką jest **androgeneza *in vitro***. Jest to proces, w czasie którego haploidalne mikrospory (komórki macierzyste pyłku) zmieniają kierunek swojego rozwoju – generatywnego, a więc prowadzącego do tworzenia ziaren pyłkowych, na nowy wegetatywny, który prowadzi do powstania zarodków, a następnie roślin. Całe niedojrzałe pylniki lub izolowane mikrospory są wykładane na pożywkę wzbogaconą odpowiednimi fitohormonami, które powodują zmianę kierunku rozwoju mikrospor i powstanie zarodków haploidalnych (rys. 3). Można wyróżnić dwa typy rozwoju mikrospory w roślinę haploidalną: embriogenezę bezpośrednią przez stadium wielojądrowej lub wielokomórkowej mikrospory, aż do otrzymania pędu oraz embriogenezę pośrednią ze stadium formowania się kalusa. Oprócz roślin haploidalnych mogą powstawać także formy diploidalne, poliploidalne, miksoploidalne oraz formy o garniturze chromosomowym niespotykanym w przyrodzie ani niepowstające na drodze krzyżowania, które także mogą być przydatne w hodowli nowych odmian. To właśnie dzięki androgenezie wyhodowano rośliny, które posłużyły do wyprowadzenia wielu nowych odmian tytoniu. Skuteczna androgeneza wymaga zastosowania jednego lub kilku bodźców zewnętrznych, tzw. czynników stresowych, którymi można oddziaływać na całe rośliny, pojedyncze kwiaty, pylniki lub izolowane mikrospory (179). O efektywności powstawania roślin z zarodków mikrosporowych decyduje wiele czynników genetycznych, ale także chemiczne i fizyczne właściwości samej kultury *in vitro*. Do najważniejszych z nich należą:

- kondycja rośliny, która jest dawcą eksplantatów (stan fizjologiczny i wiek rośliny oraz warunki wzrostu takie jak: wilgotność, nawożenie, oświetlenie, temperatura);
- gatunek rośliny, jej ploidalność, genotyp w obrębie gatunku, np. odmiana lub linia hodowlana;
- sposób traktowania wstępnego, czyli działanie różnymi czynnikami chemicznymi lub fizycznymi na całą roślinę lub pylniki, celem zaindukowania androgenezy (rodzaj i czas oddziaływania czynnika stresowego);
- sposób prowadzenia kultury (całe pylniki, wyizolowane mikrospory, metody łączone, stadia rozwojowe pylników lub mikrospor, sposób uwalniania mikrospor);
- pożywka (skład, konsystencja, wartość osmotyczna);
- warunki kultury *in vitro* (temperatura, światło) (122, 123).

Najłatwiej wywołać androgenezę w pylnikach gatunków z rodziny *Solanaceae*. Do tej pory przeprowadzono liczne badania nad ustaleniem optymalnych warunków androgenezy *in vitro* u *Nicotiana* dotyczące m.in. składu pożywek, faz rozwojowych mikrospor czy warunków wzrostu. W przypadku pożywek wymagany skład jest bardzo prosty (cukier, sole mineralne), natomiast kluczowa okazała się dostępność żelaza, którego brak skutecznie zatrzymuje embriogenezę w fazie globularnej. Hormony wzrostowe są koniecznym stymulatorem podziałów komórkowych w pyłku większości roślin, natomiast w przypadku tytoniu zastosowanie hormonów takich jak auksyny, cytokininy czy gibereliny nie wpływa na zwiększenie liczby zaindukowanych mikrospor, a w wyższych stężeniach związki te mogą działać nawet jako inhibitory. Poza tym, dodanie do pożywki węgla aktywowanego działa pozytywnie, prawdopodobnie poprzez absorpcję nadmiaru substancji wzrostowych syntetyzowanych przez rozwijające się organy roślin oraz absorpcję różnych toksycznych substancji z pożywki hamujących embriogenezę. Niezwykle ważne jest rozpoznanie właściwej fazy rozwojowej mikrospor, w której może dokonać się inicjacja rozwoju zarodków i, jak ustalono, jest to stadium bezpośrednio przed, w trakcie lub bezpośrednio po pierwszym podziale mitotycznym (mikrospora jednojądrowa zwakuolizowana, dwukomórkowe ziarno pyłku). Jednak największy odsetek zaindukowanych pylników oraz największą liczbę zarodków uzyskanych z pojedynczego pylnika uzyskano, kiedy mikrospory były w późnej fazie jednojądrowej lub były w trakcie pierwszego podziału mitotycznego (10). Innymi czynnikami istotnie wpływającymi na embriogenezę u tytoniu są zastosowany fotoperiod podczas prowadzenia kultury *in vitro*, wiek rośliny, z której pobierano pąki oraz sposób traktowania wstępnego, np. niska lub wysoka temperatura czy zastosowane warunki anaerobowe (10). Mikrospory tytoniu pozytywnie reagują na stres ciepła, który powoduje m.in. dezintegrację cytoszkieletu, syntezę białek szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins,* HSP) oraz na stres głodu, czyli brak w pożywce wstępnej przyswajalnych węglowodanów lub zastąpienie ich niemetabolizowanym mannitolem. Powo-

duje to zmianę struktury chromatyny, pojawienie się białek HSP, odróżnicowanie plastydów i obniżenie poziomu syntezy RNA. Także umieszczenie mikrospor tytoniu w pożywce o podwyższonym pH (8,0-8,5) przez 4-6 dni skutecznie indukuje embriogenezę, ponieważ uniemożliwia wykorzystanie sacharozy znajdującej się w pożywce i tym samym indukuje stres głodu. Chemicznym czynnikiem stresowym może być kwas abscysynowy, który hamuje syntezę cząsteczek mRNA niezbędnych do rozwoju funkcjonalnego pyłku (126).



Rys. 3. Otrzymywanie roślin haploidalnych i podwojonych haploidów na drodze androgenezy *in vitro*.
Źródło: opracowanie i fot. A. Czubacka, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

Modyfikacją metody androgenezy z wykorzystaniem pylników jest technika, w której pylniki umieszcza się w odpowiednich pożywkach płynnych o wysokiej osmolarności, dzięki czemu są one stymulowane do uwalniania mikrospor. Technikę tę z dużym sukcesem zastosowano u *N. tabacum* (65). Androgeneza z wykorzystaniem kultury pylników jest metodą powszechnie stosowaną dla wielu różnych gatunków roślin, w tym także tytoniu, zwłaszcza w celach hodowlanych. Jej największą zaletą jest prostota, dzięki temu duża liczba pylników może zostać wyłożone na pożywkę, co z kolei pozwala ominąć problem dość niskiej wydajności otrzymywania haploidów z pojedynczych pylników. Jednakże dla badań z zakresu biologii komórki czy genetyki, obecność sporofitowej ściany pylnika otaczającej mikrospory może być problematyczna, dlatego częściej stosowana jest androgeneza z wykorzystaniem izolowanych mikrospor. Ponieważ zarówno składniki pożywki, jak i czynniki zewnętrzne działają bezpośrednio na izolowane mikrospory z pominięciem ścian pylnika, znacznie więcej mikrospor w optymalnych warunkach może zostać skutecznie zaindukowanych do rozwoju. Poza tym, można uniknąć regeneracji diploidalnych zarodków z tkanki somatycznej pylnika. I m a m u r a i i n. w roku 1982 (94), którzy prowadzili badania nad kulturami izolowanych mikrospor tytoniu odkryli, że pobudzenie do rozwoju embriogenetycznego może wystąpić bez wcześniejszego oddziaływania czynnikami stresowymi, czy to na całe rośliny, pąki czy pylniki, z których będą izolowane mikropory. Komórki macierzyste pyłku były izolowane we wczesnej fazie dwujądrowej podczas mejozy i umieszczane w pożywce bez dodatku sacharozy, a po określonym czasie (5-7 dni) przenoszone na pożywkę zawierającą 2% sacharozę oraz 5 mM glutaminę. Stres spowodowany brakiem przyswajalnych węglowodanów w pierwszej pożywce powodował odróżnicowanie mikrospor i zmianę kierunku rozwoju.

Drugim sposobem uzyskiwania haploidów jest **gynogeneza**, czyli proces polegający na rozwoju roślin z niezapłodnionej komórki jajowej lub innych haploidalnych komórek woreczka zalążkowego. Czynniki, które decydują o jej skuteczności są podobne jak w przypadku androgenezy *in vitro*, czyli są to m.in.: gatunek, genotyp i kondycja rośliny dawcy, warunki prowadzenia kultury *in vitro*, stosowane czynniki stresowe czy fazy rozwojowe w jakich znajdują się zalążnie, zalążki i woreczki zalążkowe (195). Ten sposób otrzymywania roślin haploidalnych jest mniej powszechny w porównaniu z procesem androgenezy, głównie ze względu na trudności techniczne, np. podczas izolacji komórek jajowych czy określania stadium rozwojowego woreczków zalążkowych, podczas wykładania zalążni lub zalążków na pożywkę. Może jednak stanowić alternatywę w stosunku do innych metod, zwłaszcza dla tych gatunków, u których androgeneza nie powiodła się lub przebiegała z niską wydajnością oraz dla roślin męskosterylnych. Zwykle na pożywkę wykładane są zalążnie i zalążki lub całe zawiązki kwiatowe, natomiast bardzo rzadko wyizolowane komórki jajowe. Metoda ta nie jest powszechnie używana przede wszystkim ze względu na niską wydajność i dużą pracochłonność.

W przypadku otrzymywania roślin haploidalnych tytoniu, dla których skuteczna okazała się znacznie prostsza metoda androgenezy *in vitro*, gynogeneza jest rzadko stosowana.

Kolejnym sposobem uzyskiwania haploidów jest wykorzystywanie **apomiksji**. Proces apomiksji polega na rozwoju zarodków haploidalnych z komórek gametofitu o zredukowanej liczbie chromosomów, bez udziału zapłodnienia. Można wyróżnić kilka form apomiksji i są to: partenogeneza haploidalna, apogamia, semigamia, androgeneza i poliembrionia rzekoma. Najczęściej wykorzystywana jest partenogeneza haploidalna, czyli rozwój zarodka z haploidalnej, niezapłodnionej komórki jajowej, która została wcześniej zaindukowana (153). Czynnikami, które indukują ten typ rozwoju zarodka są m.in.: pyłek o zmienionych właściwościach pod wpływem działania np. wysokiej temperatury czy promieniowania jonizującego, który traci zdolność do zapłodnienia komórki jajowej lub pyłek innego gatunku, rodzaju czy pyłek tego samego rodzaju, ale o zmienionej ploidalności, który nie ma zdolności do zapłodnienia. Rozwojowi zarodka towarzyszą różne zaburzenia, m.in. zahamowanie rozwoju bielma, dlatego rozwój, aż do stadium rośliny musi zachodzić na sztucznych pożywkach. Zjawisko partenogenezy haploidalnej wykorzystano m.in. do uzyskania roślin haploidalnych tytoniu poprzez zaindukowanie komórek jajowych napromieniowanym pyłkiem (148). N i e l s e n i C o l l i n s w roku 1989 (140) do otrzymania haploidów wykorzystali pyłek dzikiego gatunku tytoniu *N. africana*. Rośliny haploidalne, tzw. haploidy mateczne, które wykiełkowały z nasion mieszańców powstałych ze skrzyżowania odmiany 'KY 17' i *N. africana,* różniły się od form mieszańcowych nie tylko liczbą chromosomów, ale także np. wigorem oraz kolorem łodygi. Formy mieszańcowe ze względu na niedostatecznie rozwinięty system korzeniowy po pewnym czasie zamierały.

Eliminacja chromosomów, jako kolejna metoda otrzymywania haploidów, może zachodzić zarówno w kulturach *in vitro* bardzo młodych zarodków mieszańcowych, jak i w tkankach somatycznych pod wpływem działania różnych czynników fizycznych i chemicznych. Zarodki mieszańcowe powstają przez zapylenie rośliny pyłkiem innego gatunku, np. pyłkiem formy dzikiej. W przypadku bardzo młodych zarodków mieszańcowych umieszczonych na sztucznych pożywkach w czasie pierwszych podziałów mitotycznych dochodzi do redukcji chromosomów formy dzikiej. Zarodek na dalszych etapach rozwoju posiada jedynie gametyczną liczbę chromosomów matecznych. Redukcja liczby chromosomów może być skutkiem asynchronii w cyklach mitotycznych form rodzicielskich, nieprawidłowości w budowie wrzeciona kariokinetycznego lub zaburzeń systemu enzymatycznego (100). Eliminacje chromosomów z tkanki somatycznej można natomiast otrzymać przez stosowanie promieniowania jonizującego, czy przez dodanie do pożywki w odpowiednich stężeniach hormonów, herbicydów lub pochodnych aminokwasów (153).

Tak jak już wspomniano, rośliny haploidalne tytoniu wzbudzają powszechne zainteresowanie hodowców, ale nie tylko, ponieważ są także wykorzystywane w szeroko pojętych badaniach genetycznych. W hodowli z wykorzystaniem

haploidów zwraca się przede wszystkim uwagę na wybór jak najlepszych materiałów wyjściowych, opracowanie metod otrzymania jak największej liczby roślin haploidalnych w krótkim czasie, najlepiej przy niskim nakładzie kosztów oraz na odtworzenie płodności poprzez diploidyzację. Pomimo, że liczba zregenerowanych roślin haploidalnych jest zwykle bardzo mała przy dużym nakładzie pracy, to korzyści płynące z pozyskania nawet kilku roślin o pożądanych cechach, a potem wykorzystanie ich w dalszej hodowli, są ogromne. Należą do nich wszystkim skrócony czas hodowli przez możliwość uzyskania homozygot z heterozygotycznych rodziców w jednym pokoleniu oraz ułatwiona, wydajna selekcja pożądanych kombinacji genów z populacji mieszańcowych, ponieważ homozygoty nie wykazują dominacji i segregacji cech. W programach hodowlanych prowadzonych w IUNG-PIB można znaleźć wiele przykładów połączenia tradycyjnej hodowli tytoniu z metodami biotechnologicznymi, m.in. prace nad uzyskaniem odmian tytoniu łączących w sobie odporność na *Thielaviopsis basicola* pochodzącą od *N. glauca* oraz *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) pochodzącą od odmiany 'Polalta'. W wyniku prowadzonych badań uzyskano 24 odporne rośliny haploidalne z mieszańcowego pokolenia F_1 stosując haploidyzacę na podłożu Nitsch and Nitsch z wykorzystaniem androgenezy *in vitro* (182).

W dziedzinie genetyki dzięki haploidom możliwe staje się ujawnienie, a potem zbadanie genów recesywnych, które normalnie w roślinach diploidalnych występują w układzie heterozygotycznym. Haploidy wykorzystywane są także w badaniach nad mapowaniem i analizą genomów, do identyfikacji *loci* cech ilościowych (QTL), w transformacji genetycznej, a także w hodowli nowych odmian z wykorzystaniem markerów genetycznych. Haploidy można także wykorzystać do analizy pochodzenia gatunków przez obserwowanie chromosomów w mejozie. Na podstawie obserwacji można np. stwierdzić, czy gatunek wyjściowy był autopoliploidalny czy allopoliploidalny (103). Poprzez krzyżowanie haploidów z roślinami o innej ploidalności otrzymujemy aneuhaploidy, których potem można użyć do badań chromosomów i genów. Rośliny haploidalne wykorzystywane są także w hodowli mutacyjnej np. w hodowli tytoniu odpornego na streptomycynę (127) oraz mogą służyć jako materiał wyjściowy do izolacji i fuzji protoplastów. M e l h e r s i L a b i b w roku 1974 (129) jako pierwsi wyizolowali i dokonali fuzji protoplastów pochodzących z dwóch bezchlorofilowych odmian *N. tabacum*.

Wyselekcjonowane rośliny haploidalne, które mają pożądane cechy, ale są niepłodne, poddawane są procesowi **diploidyzacji**, czyli podwajania liczby chromosomów. Genotyp podwojonych haploidów (DH) jest taki sam jak genotyp haploidów, z których powstały a jednocześnie rośliny te są płodne, co jest ważne dla dalszych etapów hodowli. Opracowanie efektywnych metod produkcji stabilnych genetycznie, homozygotycznych linii podwojonych haploidów jest kluczowym elementem wykorzystania roślin haploidalnych w badaniach genetycznych czy programach hodowlanych. Linie te są cennymi roślinami rodzicielskimi

w krzyżowaniach mających na celu wprowadzenie nowej odmiany uprawnej. Diploidyzacja może zachodzić spontanicznie, bądź z zastosowaniem związków chemicznych powodujących dezorganizację mikrotubul i uniemożliwiających rozdział chromosomów do komórek potomnych, np. kolchicyny. Kolchicynę można aplikować w trakcie rozwoju roślin matecznych, dodając do pożywek w kulturach zarodków *in vitro* lub na wierzchołki haploidalnych pędów wegetatywnych. Efektywność diploidyzacji przez dodanie kolchicyny we wczesnym etapie kultury *in vitro* waha się w granicach od 83% do 91%, w zależności od gatunku i zastosowanego stężenia (126). Zwykle, otrzymywanie roślin DH przy użyciu kolchicyny daje bardzo dobre efekty. W przypadku *Nicotiana* skutecznym sposobem diploidyzacji jest regeneracja pędów w kulturze *in vitro* na drodze spontanicznej poliploidyzacji. Fragmenty walca osiowego łodygi dojrzałych roślin haploidalnych tytoniu są wykładanie na pożywkę LS (118) z dodatkiem fitohormonów – kinetyny o stężeniu 2,0 $mg \cdot l^{-1}$ i IAA o stężeniu 2,0 $mg \cdot l^{-1}$ według L l o y d (119) (rys. 3). Skuteczną modyfikacją tej metody dającą możliwość uzyskania większej liczby podwojonych haploidów jest przechowywanie fragmentów łodyg w kulturach *in vitro* w ciemności przez 28 dni, a następnie pasaż eksplantatów na pożywkę zawierającą BAP (6-benzylaminopurynę) oraz 4-krotnie wyższą zawartość kinetyny (48). Stosując metodę regeneracji fragmentów łodyg otrzymano diploidyzację wyselekcjonowanych genotypów haploidów uzyskanych z mieszańcowego pokolenia F_1 odmian 'Polalta' i 'Wiślica'. Celem badań było otrzymanie linii podwojonych haploidów, niosących w sobie odporność na TSWV pochodzącą od odmiany 'Polalta', przy jednoczesnym braku morfologicznych deformacji liści, które zwykle występują po krzyżowaniu z innymi odmianami uprawnymi podatnymi na TSWV (112). Technikę tę wykorzystano także w badaniach nad uzyskaniem transgenicznych linii podwojonych haploidów tytoniu w kulturach *in vitro,* co znacznie skróciło czas uzyskania stabilnych linii. Diploidyzacji poddawano formy haploidalne mieszańców powstałych ze skrzyżowania transgenicznych linii hodowlanych z formami nietransformowanymi, stosując dwie metody: kolchicynowanie oraz metodę regeneracji fragmentów łodyg. Wyniki badań wskazały na drugą z wymienionych metod jako bardziej wydajną w danych warunkach eksperymentu, a także wykazały brak występowania zakłóceń w procesie powstawania i dojrzewania mikrospor u transgenicznych linii DH, o czym świadczą prawidłowy przebieg mejozy oraz wysoka żywotność pyłku. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było szybkie uzyskanie kolejnych pokoleń podwojonych haploidów i tym samym ocena ekspresji transgenu oraz zbadanie sposobu jego dziedziczenia (48).

Podstawową zaletą linii podwojonych haploidów (DH) jest ich kompletna homozygotyczność, co znacznie upraszcza ocenę fenotypową oraz odtworzona płodność. Linie DH mogą poprawić wydajność i szybkość metod tradycyjnej hodowli, które zwykle są czasochłonne i pracochłonne, a w połączeniu z selekcją opartą na markerach genetycznych znacznie skracają ten proces. Podwojone haploidy mają zastosowanie nie tylko w programach hodowlanych, ale także

w mapowaniu genetycznym, podstawowych badaniach genetycznych i molekularnych, w badaniach mutacyjnych i nad transformacją (39). Tytoń należy do roślin modelowych, dla których opracowano bardzo skuteczne metody otrzymywania haploidów i podwojonych haploidów wykorzystywanych w hodowli. Obecne badania skupiają się głównie na modyfikacjach istniejących już metod oraz na połączeniu istniejących technik z badaniami genetycznymi (10).

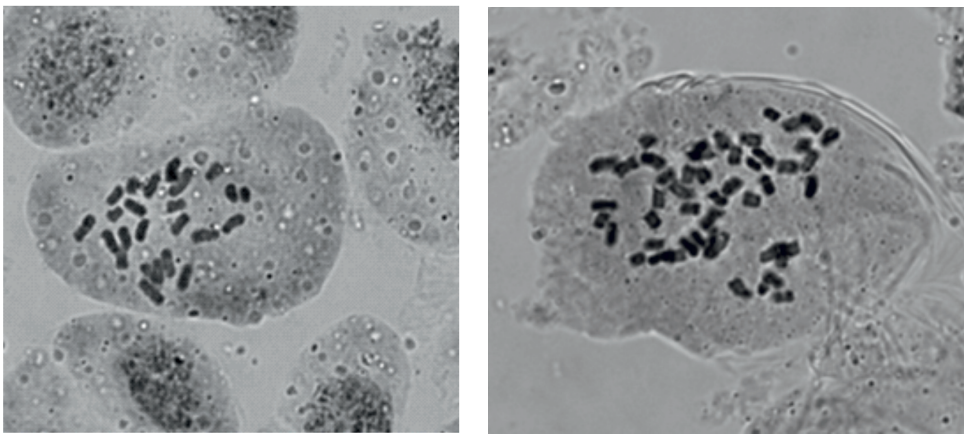
Możliwości oceny ploidalności – liczenie chromosomów i cytometria przepływowa

Badania cytologiczne i cytogenetyczne obejmują badanie chromosomów, czyli określanie ich liczby i struktury, obserwacje przebiegu mejozy, badanie żywotności pyłku i zdolności jego kiełkowania oraz określanie zawartości DNA jądrowego i wielkości genomu. Metody stosowane w badaniach chromosomów roślinnych można podzielić na proste, które nie wymagają kosztownej aparatury oraz zaawansowane, które łączą metody cytologiczne z technikami molekularnymi, np. hybrydyzacją *in situ,* czy takie, które wymagają specjalistycznej aparatury w postaci cytometru przepływowego.

Najprostszą metodą badania liczby i struktury chromosomów jest wykonywanie preparatów cytologicznych i przeprowadzanie obserwacji mikroskopowych. Poprawne wykonanie preparatu, czyli uzyskanie obrazu chromosomów, które są dobrze widoczne, nie nakładają się na siebie i są pozbawione cytoplazmy, jest kluczowe dla uzyskania satysfakcjonujących wyników. Cała procedura przygotowywania preparatów składa się z doboru odpowiedniego materiału w zależności od celu badania, utrwaleniu go, wykonaniu preparatu i wybarwieniu chromosomów. Jeśli badania dotyczą ustalania liczby chromosomów mitotycznych, najczęściej wykorzystywane są merystemy wierzchołkowe korzeni i pędów, a także młode pąki kwiatowe lub liście, jak również komórki pochodzące z hodowli *in vitro*. Do oceny mejozy najodpowiedniejsze są komórki macierzyste pyłku otrzymane z pylników. Pobrany materiał, w celu nagromadzenia komórek w stadium metafazy i skrócenia chromosomów, powinien być wstępnie traktowany wybranym środkiem chemicznym (8-hydroksychinolina, kolchicyna, paradichlorobenzen, α-bromonaftalen) lub przetrzymywany na lodzie. Tak przygotowane preparaty należy następnie utrwalić za pomocą mieszaniny kwasu octowego lodowatego i alkoholu (etylowego lub metylowego). Przy dłuższym przechowywaniu materiał należy przełożyć do alkoholu etylowego 96% i trzymać w lodówce. Preparaty sporządza się metodą zgniataną, polegającą na maceracji tkanki, rozdrabnianiu na pojedyncze komórki i po nakryciu szkiełkiem nakrywkowym, silnym zgnieceniu w celu uwolnienia chromosomów z cytoplazmy. Wybarwienie chromosomów jest możliwe dzięki zastosowaniu odpowiednich barwników, do których należą m.in. acetoorceina, acetokarmin, nigrozyna. Obserwacje i analizę liczby chromosomów przeprowadzamy bezpośrednio pod mikroskopem

(rys. 4). Pewnym ułatwieniem, szczególnie przy dużej liczbie chromosomów, jest wykonanie rysunku lub fotografii poszczególnych płytek metafazowych (159).

Ocena liczby chromosomów jest wykorzystywana w wielu pracach naukowych i hodowlanych. D o r o s z e w s k a i in. w roku 2009 (56), przygotowując album dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana*, sporządzili preparaty mitotyczne ponad 60 gatunków zgromadzonych w kolekcji IUNG-PIB, w celu weryfikacji poprawności danych literaturowych. W hodowli mieszańców międzygatunkowych wymagana jest analiza cytologiczna na każdym etapie hodowli. D o r o s z e w s k a w 1994 (60) uzyskała mieszańca międzygatunkowego *N. tabacum* 'BP-210' × *N. africana*.



Rys. 4. Wybarwione chromosomy obserwowane pod mikroskopem świetlnym

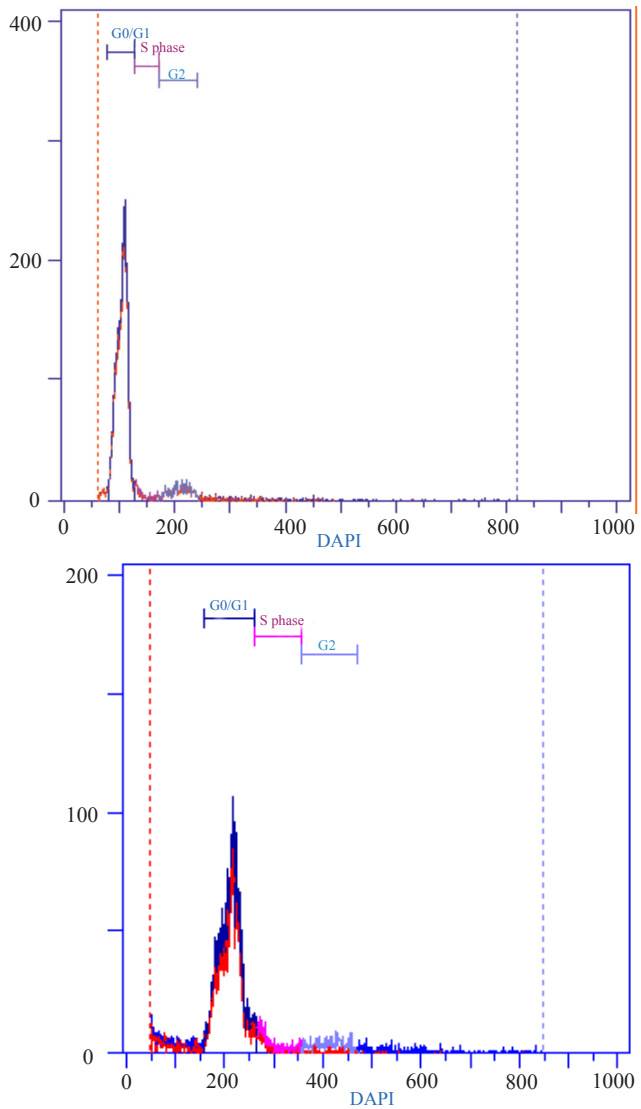
Źródło: Doroszewska i in., 2009 (56).

Ocenie cytologicznej podlegały amfihaploidalne rośliny pokolenia F_1, płodne amfidiploidy uzyskane przez podwojenie w kulturach *in vitro* oraz formy seskwidiploidalne, a także dalsze pokolenia uzyskane w wyniku samozapylenia lub krzyżówek wstecznych z tytoniem uprawnym. Dalsze badania wyżej wymienionych form mieszańcowych z *N. africana* wykonano w pokoleniach BC_2-BC_2F_6. Obserwowano zmienną liczbę chromosomów mitotycznych w poszczególnych pokoleniach. Stabilne linie 48-chromosomowe stwierdzono w pokoleniu BC_2F_4 (61, 62).

Dzikie gatunki tytoniu stanowią źródło odporności na wiele chorób, w tym choroby wirusowe. Z tego powodu dużo uwagi poświęca się hodowli odpornościowej. Krzyżowanie międzygatunkowe, jako krzyżowanie oddalone, wiąże się z licznymi trudnościami spowodowanymi różnicami w liczbie chromosomów. Oceny parowania chromosomów i, co za tym idzie, żywotności pyłku, dokonał B e r b e ć w roku 1987 (15), w mieszańcach F_1 *N. tabacum* × *N. benavidesii*, *N. knightiana* × *N. tabacum* oraz *N. raimondii* × *N. tabacum*. We wszystkich tych mieszańcach obserwowany był znaczny udział uniwalentów i kilku biwalentów. W latach 2003, 2007 T r o j a k - G o l u c h i B e r b e ć (180, 181) badali cytologicznie mieszańce *N. tabacum* × *N. glauca* na poziomie amfihaploidów, amfidiploidów i seskwi-

diploidów, natomiast Laskowska i Berbeć w 2005 (108) badali w ten sam sposób mieszańca *N. tabacum* × *N. alata*. Badania cytologiczne na poziomie amfihaploidów przeprowadzono także dla mieszańców *N. wuttkei* Clarkson et Symon, która jest źródłem odporności na *Peronospora hyoscyami* de Bary, z trzema odmianami *N. tabacum* L. (odmiany: 'Puławski 66',' Wiślica' i 'TN 90') (110).

Pomiary cytologiczne pozwalają odróżnić rośliny amfihaploidalne i amfidiploidalne lub haploidy i podwojone haploidy, czyli formy o różnej ploidalności. Jest to jednak metoda praco- i czasochłonna. W celu usprawnienia oceny ploidalności możliwe jest zastosowanie nowocześniejszych technik, takich jak na przykład cytometria przepływowa (ang. *flow cytomery*, FCM). Metoda ta była pierwotnie stosowana w diagnostyce klinicznej, a dopiero od początku lat osiemdziesiątych używana jest także w cytologii i cytogenetyce roślin (168). Cytometria przepływowa pozwala na pomiar zawartości jądrowego DNA oraz badanie cyklu komórkowego, poziomu endoreplikacji, wielkości genomu i opiera się na analizie względnej intensywności fluorescencji jąder barwionych flourochromami. Cytometr może być też wyposażony dodatkowo w system segregujący przepływające komórki. Jest to technika, która nie tylko stanowi szybką metodę alternatywną wobec żmudnego liczenia chromosomów z zastosowaniem mikroskopu świetlnego, ale jest też znacznie dokładniejsza, np. pozwala na identyfikację miksoploidów. Do przeprowadzenia pomiaru jądra komórkowe muszą być wyizolowane, zabarwione i znajdować się w postaci zawiesiny. Najczęściej wykorzystywanymi barwnikami fluorochromowymi są DAPI (indolo-4',6-dwuamidyno-2-fenyloidyna), który przyłącza się do par AT w DNA oraz PI (jodek propidyny) interkalujący dwuniciowy DNA. Fluorescencja jąder jest proporcjonalna do zawartości DNA (159). Wyniki pomiarów na cytometrze przepływowym przedstawiane są w postaci danych liczbowych oraz wykresów dwu- i trójwymiarowych. Wykresy są w postaci cytogramów i histogramów, choć do wizualizowania wyników związanych z fluorescencją zwykle stosowane są histogramy (rys. 5). Ta szybka i bardzo dokładna metoda jest obecnie często stosowana w hodowli i nasiennictwie wielu roślin uprawnych. Przykładowo, stosując FCM można oznaczać ploidalność komponentów matecznych, zapylaczy i mieszańców w trakcie procesu hodowlanego, a także sprawdzać jednorodność nasion o przeznaczeniu handlowym (167). Technikę cytometrii przepływowej stosuje się powszechnie w badaniach hodowlanych prowadzonych w IUNG-PIB. W roku 2011 Trojak-Goluch i in. (182) wykorzystali tę metodę do szybkiego odróżniania roślin haploidalnych od roślin o innej ploidalności w badaniach, których celem było uzyskanie roślin haploidalnych z pylników pokolenia F_1 mieszańców linii WGL 3 i linii PW-834, które łączą w sobie odporność na *Thielaviopsis basicola* i *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).



Rys. 5. Histogramy uzyskane z cytometru przepływowego pozwalające na odróżnienie haploidów i diploidów

Źródło: A. Czubacka, A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

Transformacja i tworzenie form transgenicznych

Rozwój kultur *in vitro*, inżynierii genetycznej i genetyki molekularnej pozwolił na opracowanie molekularnych technik uzyskiwania genetycznie zmodyfikowanych odmian różnych roślin, w tym tytoniu, które są całkowicie odmienne od metod klasycznych, np. tradycyjnego krzyżowania. Wśród organizmów o zmodyfikowanej informacji genetycznej istotną rolę odgrywają rośliny transgeniczne.

Transformacja genetyczna polega na wprowadzeniu do genomu biorcy fragmentu DNA dawcy, dzięki czemu nabywa on określonych, nowych, unikalnych cech, które warunkowane są przez dany fragment DNA i tym samym staje się on organizmem genetycznie zmodyfikowanym (GMO). Tradycyjna hodowla mająca na celu ulepszenie genotypu, opierająca się na krzyżowaniu międzyodmianowym czy międzygatunkowym, nastręcza często szeregu trudności wiążących się z istnieniem barier krzyżowalności czy z koniecznością wyeliminowania na drodze selekcji niekorzystnych cech, które także zostały przeniesione. Alternatywą dla tego często żmudnego i czasochłonnego procesu jest transformacja genetyczna. Transformacja zapewnia precyzyjną modyfikację genomu, dlatego zmiany w genotypie rośliny nie są tak duże, co prowadzi do krótszej i bardziej efektywnej stabilizacji genotypu oraz selekcji w kierunku pożądanych cech. Do tej pory wykorzystując różne techniki transformacji otrzymano nowe odmiany roślin charakteryzujące się np. zwiększoną odpornością na owady, odporne na patogeny, herbicydy czy służące jako swoiste bioreaktory do produkcji określonych metabolitów wtórnych i rekombinowanych białek. Technika ta omija skutecznie bariery krzyżowalności i pozwala na przenoszenie do genomu biorcy genów kodujących pożądane cechy nie tylko od roślin, ale także od zwierząt i mikroorganizmów (89).

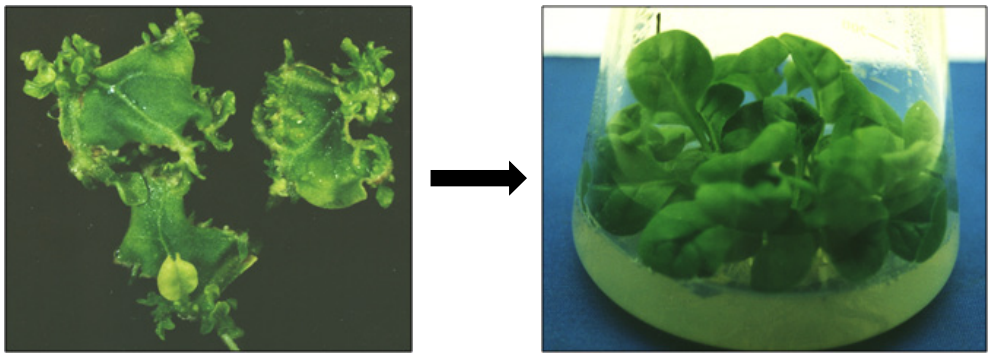
Obecnie istnieje kilkanaście metod transformacji genetycznej roślin, które w zależności od mechanizmu można podzielić na dwie grupy: na transformację wektorową i bezwektorową. Metodykę transformacji różnych gatunków roślin dostosowuje się do ich indywidualnych właściwości i bierze się pod uwagę cechy danej rośliny, takie jak np. efektywność regeneracji w warunkach *in vitro*, ale także cechy transgenu i wydajność jego ekspresji. W transformacji wektorowej wektorami są określone, zmodyfikowane plazmidy Gram-ujemnych bakterii glebowych z rodzaju *Agrobacterium*, głównie *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes*. Bakterie te w odpowiedzi na określone sygnały z komórek roślinnych mają naturalną zdolność do infekcji, czyli przekazywania fragmentu DNA własnego plazmidu do jąder komórkowych, gdzie dochodzi do stabilnej integracji z genomem biorcy. W przypadku transformacji roślin jest to najbardziej wydajna, najmniej kosztowna i obecnie najczęściej wykorzystywana metoda (76). Pozwala na wprowadzenie dość dużych fragmentów DNA i ich stabilną integrację z genomem biorcy. Dużą zaletą jest także przenoszenie do genomów biorcy jedynie od jednej do kilku kopii transgenów. W warunkach naturalnych pierwszym etapem przenoszenia genów jest kolonizacja bakterii na fragmencie uszkodzonej tkanki roślinnej, a następnie aktywacja i ekspresja genów wirulencji bakterii pod wpływem różnych związków, głównie fenolowych i monocukrów, wydzielanych przez zranioną tkankę. W wyniku tego powstaje szereg białek, które pełnią różnorakie funkcje, np. są czynnikami transkrypcyjnymi, odpowiadają za aktywację innych białek poprzez fosforylację, pełnią rolę endonukleaz wycinających fragment DNA, czy tworzą tzw. kanał transferowy, przez który DNA jest przenoszony do rośliny. Oprócz genów wirulencji, które bezpośrednio zaangażowane są w transformację i są zlokalizowane na plazmidzie

w postaci sześciu operonów *vir*A, *vir*B, *vir*C, *vir*D, *vir*E, *vir*G w procesie przenoszenia uczestniczą także geny znajdujące się na chromosomie głównym bakterii, które odpowiedzialne są m.in. za regulację ekspresji genów *vir*, syntezę i transport wielu związków czy za syntezę białek niezbędnych bakteriom do adhezji na powierzchni rośliny (51). To właśnie dzięki tej kaskadzie różnych czynników możliwe jest wycięcie, zreplikowanie, transport, a następnie integracja z genomem biorcy fragmentu nazwanego T-DNA (ang. *transfer DNA*), który znajduje się w obrębie plazmidu Ti (ang. *tumor inducing*) lub Ri (ang. *root inducing*) w zależności od gatunku bakterii. W integrację T-DNA z genomem biorcy zaangażowane są także białka jądrowe rośliny. W komórkach *Agrobacterium* może znajdować się od jednego do kilku takich plazmidów, a każdy z nich może zawierać jeden bądź więcej fragmentów T-DNA.

Naturalną zdolność bakterii *Agrobacterium* do infekowania roślin wykorzystano w warunkach *in vitro* do przeprowadzania różnych modyfikacji genetycznych. Dzięki temu, że geny znajdujące się w obrębie T-DNA nie odpowiadają za wycinanie czy przenoszenie DNA, możliwe jest wklonowanie w ich miejsce dowolnych konstrukcji genowych i tym samym skuteczne przeniesienie i zintegrowanie ich z genomem biorcy (124). W warunkach *in vitro* pierwszym etapem transformacji wektorowej z udziałem specjalnie przygotowanej kultury *Agrobacterium* jest inokulacja eksplantatu pochodzącego ze sterylnej hodowli w zawiesinie bakteryjnej przez około kilkanaście minut. W przypadku tytoniu, który odznacza się dużymi możliwościami regeneracyjnymi i wysokim powinowactwem do *A*. *tumefaciens* transformacja przebiega szybko i wydajnie, a powszechnie stosowaną metodą zapoczątkowaną w 1984 roku jest metoda krążków liściowych (90). Komórki bakterii w obszarze T-DNA plazmidów mają wklonowany konstrukt genowy składający się zazwyczaj z pożądanego transgenu i genu selekcyjnego, czasami także genu reporterowego. Po etapie inokulacji, która trwa maksymalnie do kilkudziesięciu minut i opłukaniu eksplantatów w wodzie destylowanej są one wykładane na pożywki regeneracyjne bez antybiotyków zwykle na okres kilku dni. W tym czasie dochodzi do przekazania T-DNA bakterii wraz z wklonowanym konstruktem do komórek roślinnych. Następnie krążki liściowe przenosi się na taką samą pożywkę regeneracyjną zawierającą dodatkowo antybiotyki kanamycynę i karbenicylinę w celu eliminacji bakterii i selekcji transformantów. Po kilku tygodniach zregenerowane pędy przenosi się na pożywkę ukorzeniającą zawierającą obydwa antybiotyki (58) (rys. 6). Jeśli konstrukt zawierał także geny reporterowe, np. białka zielonej fluorescencji GFP, lucyferazy czy β-glukuronidazy, selekcja tkanek transformowanych może opierać się na metodach histochemicznych lub bardziej dokładnych technikach molekularnych z wykorzystaniem specyficznych starterów i reakcji PCR (124).

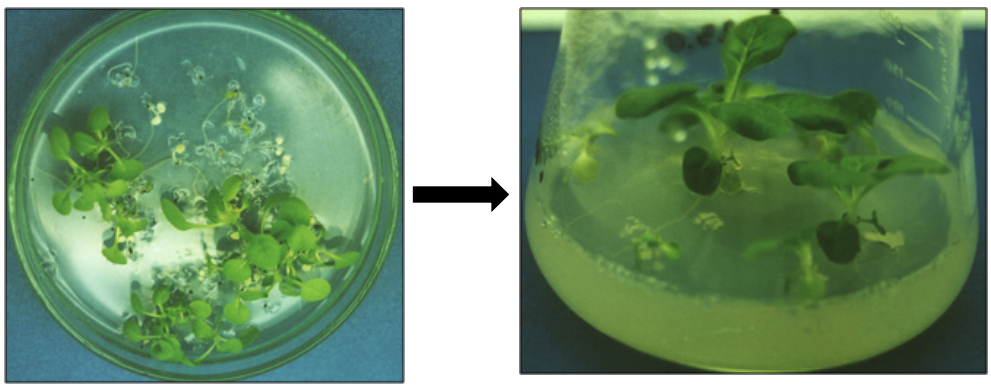
Tytoń łatwo ulega transformacji przy użyciu skutecznej i taniej metody wektorowej z wykorzystaniem bakterii, dlatego nie stosuje się powszechnie innych metod do jego transformacji. Dla roślin, u których agroinfekcja w ogóle nie zachodzi, jest

mało skuteczna lub pojawiają się trudności w regeneracji roślin w kulturach *in vitro* stosuje się inne metody, takie jak infiltrację, technikę PTP (ang. *pollen tube pathway*), mikrowstrzeliwanie, czy technikę z wykorzystaniem włókien krzemowo-karbidowych (124). W przypadku tytoniu stosuje się bezwektorową metodę biolistyczną, czyli mikrowstrzeliwanie, zwłaszcza w przypadku transformacji plastydów.



Transformacja krążków liściowych przy pomocy *Agrobacterium tumefaciens*

Regenarcja i selekcja roślin transformowanych na pożywce z antybiotykiem



Selekcja roślin transgenicznych na pożywce z antybiotykiem

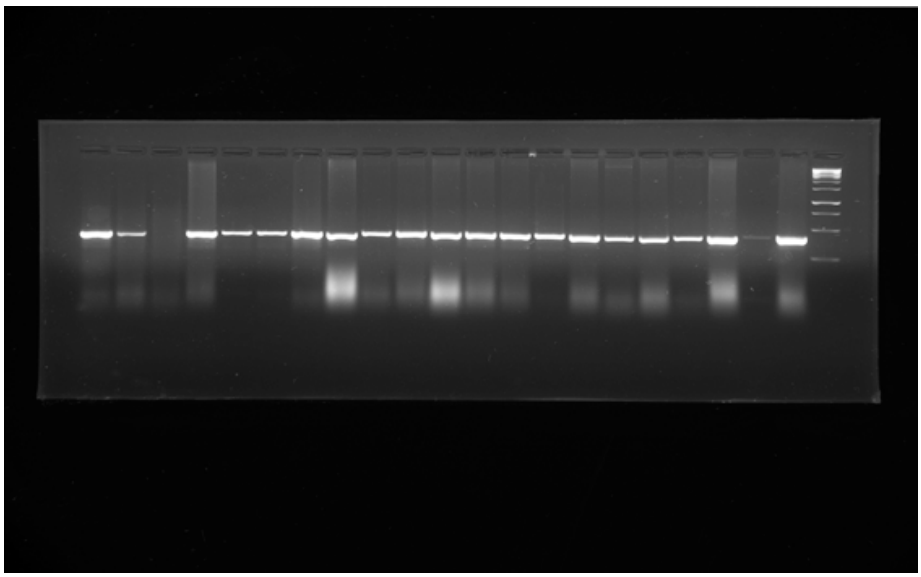
Rys. 6. Transformacja genetyczna tytoniu
Źródło: Doroszewska, 2004 (58).

W tym celu wykorzystuje się jako nośniki cząsteczki złota lub wolframu, które opłaszczone są cząsteczkami DNA. Po umieszczeniu nośników z DNA na powierzchni tkanek w atmosferze częściowej próżni i w obecności sprężonego helu zaczynają one z dużą szybkością penetrować tkanki. Możliwe jest wprowadzenie nawet kilku transgenów o dowolnie wybranych długościach. Jest to metoda skuteczna, ale wymagająca specjalnego sprzętu i odczynników. Inną techniką, którą także zastosowano u tytoniu, jest transformacja z zastosowaniem *Agrobacterium* wspomagana sonifikacją (SAAT, ang. *sonication-ssisted Agrobacterium transformation*). Eksplantaty w obecności *Agrobacterium* są poddawane przez krótki okres działaniu

ultradźwięków, co powoduje powstanie wielu jednakowych uszkodzeń na powierzchni tkanki. Ułatwia to bakteriom dostęp do wnętrza komórek i znacznie poprawia wydajność transformacji (165).

Duże możliwości regeneracyjne tytoniu oraz łatwość przeprowadzania transformacji prostą metodą wektorową z *Agrobacterium* spowodowała, że badania nad transformacją tytoniu rozwijały się bardzo dynamicznie. Z praktycznego punktu widzenia szczególnie istotne są badania nad uzyskiwaniem odmian odpornych, np. na patogeny wirusowe, grzybowe, bakteryjne lub na herbicydy. Prace badawcze nad transformacją prowadzone w IUNG-PIB opierały się na uzyskaniu odporności tytoniu na najważniejsze gospodarczo izolaty wirusa Y ziemniaka PVY. Ponieważ choroby wirusowe stanowią istotny problem w uprawie tytoniu, głównie ze względu na brak możliwości ich zwalczania metodami chemicznymi (47), tak ważne staje się poszukiwanie innych metod ochrony roślin przed wirusami m.in. poprzez transformację. Połączenie zaś technik transformacji z mechanizmem naturalnej odporności staje się doskonałym narzędziem do uzyskiwania trwalszej odporności na choroby wirusowe (58). Do transformacji użyto trzech konstrukcji genowych: konstrukcji LMVCP niosącej gen białka płaszcza wirusa mozaiki sałaty (LMV) i konstrukcji pROKY niosącej zmodyfikowany gen polimerazy wirusa PVY ze wstawką wirusową w orientacji sensownej (pROKY1) oraz w orientacji antysensownej (pROKY2). Konstrukcje te były sprzężone z markerem selekcyjnym, którym był gen fosfotransferazy neomycynowej, warunkujący odporność na kanamycynę. Uzyskane wyniki procesu transformacji były pomyślne, co w dużej mierze jest zasługą dobrze dobranych warunków regeneracji roślin w kulturze *in vitro*. Regeneracja roślin z eksplantatów na podłożu z kanamycyną była na poziomie 40-50% u trzech odmian transformowanych przy użyciu LMVCP oraz czterech odmian transformowanych wektorami pROKY1 i pROKY2. Detekcja wybranych roślin transgenicznych z użyciem technik molekularnych wykazała skuteczną transformację z wykorzystaniem wszystkich trzech konstrukcji genowych (58). Celem dalszych badań było porównywanie skuteczności zastosowanych konstrukcji genowych oraz analiza ekspresji transgenów w dalszych pokoleniach roślin transgenicznych (rys. 7). Analiza taka wykazała m.in. największą skuteczność transgenu LMVCP w ochronie antywirusowej oraz stabilizację cechy odporności w dalszych pokoleniach. W przypadku dwóch pozostałych transgenów szybka stabilizacja dziedziczenia transgenu niestety nie przekładała się na odporność roślin w następnych pokoleniach co przypuszczalnie było skutkiem wzrostu metylacji wirusowej wstawki (47).

Przeprowadzono także badania porównawcze między liniami transgenicznymi i nie poddanymi transformacji pod względem ważnych cech biologicznych i agronomicznych, m.in. wysokości roślin i ich morfologii, powierzchnii liści, przebiegu mejozy i żywotności pyłku, składu chemicznego liści i wykazano jedynie nieznaczne różnice, głównie w jakości wysuszonych liści (46). Podobne badania porównawcze, obejmujące m.in. charakterystykę wzrostu, morfologię, jakość i skład chemiczny liści oraz inne ważne cechy użytkowe, przeprowadzone na plantacjach tytoniu



Rys. 7. Elektroforetyczna analiza produktów amplifikacji metodą PCR transgenu ROKY obecnego w roślinach tytoniu odmiany 'AC Gayed'

Źródło: fot. A. Czubacka, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

w Chinach także nie wykazały znacznych różnic. Nie wykazano różnic w jakości i składzie chemicznym liści, jedynie linia transgeniczna charakteryzowała się lepszym plonowaniem (191). Uzyskiwanie odporności na PVY poprzez transformację genem białka płaszcza wirusa PVY (CP), wirusa mozaiki sałaty LMV (CP) czy genem polimerazy PVY było i nadal jest przedmiotem wielu badań, np. uzyskano pięć linii odpornych na wirusa transformując je genem białka płaszcza CP z węgierskiego izolatu PVY-H czy uzyskano transgeniczny, odporny tytoń odmiany 'Xanthi', używając jako transgenu zmodyfikowanego genu białka płaszcza wirusa mozaiki sałaty (58). We wszystkich powyższych badaniach odporność na wirusa PVY uzyskiwano transformując rośliny naturalnymi genami pochodzącymi z wirusów. Metoda ta jest coraz częściej stosowana w zapobieganiu chorobom wirusowym, a odporność taka nazywana jest odpornością pochodzącą od patogena (ang. *patogen derived resistance,* PDR). Pierwsze próby uzyskiwania odporności tą drogą polegały na introdukcji do genomu biorcy genów kodujących białko płaszcza (CP) wirusa, a odporność taka nazywana jest odpornością uzyskaną za pośrednictwem CP (ang. *coat protein-mediated protection*). Innym rodzajem odporności jest odporność warunkowana genem kodującym wirusową replikazę (ang. *replicase-mediated*). Podstawową różnicą między powyższymi rodzajami oporności jest to, że odporność warunkowana RNA odznacza się wysoką specyficznością, czyli chroni przed infekcją przez szczep, z którego pochodził transgen, bądź przez szczep blisko spokrewniony (58).

Metodę transformacji wykorzystano także do uzyskania odporności tytoniu na inne choroby wirusowe. A n d e r s o n i i n. w roku 1989 (3) transformowali

tytoń genem białka płaszcza jednego ze szczepów mozaiki tytonowej (TMV). Uzyskane rośliny wykazywały odporność nie tylko na TMV, ale miały podwyższoną odporność na inne choroby powodowane przez AMV, PVY, PVX i CMV. Wysoki stopień odporności tytoniu odmiany 'Burley 49' na cętkowaną plamistość liści tytoniu (TEV) uzyskano dzięki transformacji genem białka płaszcza TEV (115). W przypadku uzyskiwania odporności na brązową plamistość pomidora na tytoniu (TSWV) transformowano 12 odmian uprawnych tytoniu genem N w orientacji sens, kodującym nukleoproteinę N z izolatu L3 wirusa (izolat bułgarski) i już w pokoleniu R_2 uzyskano kompletnie odporne linie sześciu odmian. Po zanalizowaniu dziedziczenia w pokoleniach R_3-R_6 i wyselekcjonowaniu linii odpornych wykazano, że odporność dziedziczy się w sposób stabilny (169). Oprócz badań w kierunku uzyskiwania odporności na choroby wirusowe prowadzone są także badania nad odpornością bakteryjną. W roku 1998 B a t c h v a r o v a i i n. (9) transformowali sześć odmian tytoniu plazmidem zawierającym gen *ttr,* warunkujący odporność na P*seudomonas syringa* pv. *tabaci*. Stwierdzili oni, że odporność na tę bakterię uzyskana drogą transformacji jest dziedziczna, a wzrost liczby roślin odpornych w kolejnych pokoleniach świadczy o dobrej transmisji transgenu. Jednak stabilne linie odporne i homozygotyczne pod względem genu *ttr* uzyskano w zależności od odmiany w pokoleniach R_4-R_7. Badania nad zwiększeniem odporności tytoniu, a także *Arabidopsis thaliana* na patogeny grzybowe prowadzili m.in. S h u k u r o v i i n. w roku 2012 (166) transformując rośliny trzema konstruktami zawierającymi geny kodujące białka o właściwościach przeciwgrzybowych, pochodzące od innej rośliny – gwiazdnicy pospolitej (*Stellaria media* L.). Rośliny transgeniczne niosące pełnej długości gen dla białka *pro-SmAMP1* wykazywały najwyższą odporność wobec takich patogenów grzybowych jak *Bipolaris sorokiniana* oraz *Thielaviopsis basicola*. Transformacja tytoniu obejmuje nie tylko badania nad uzyskaniem odporności na choroby, ale także dotyczy odporności na herbicydy (52) i szkodniki, np. mszycę brzoskwiniowo-ziemniaczaną *Myzus persicae* (35) oraz nad zwiększoną tolerancją na stresy abiotyczne, takie jak duże zasolenie, temperatura, stres osmotyczny (2, 200).

Transformacji genetycznej oprócz genomu jądrowego może także podlegać stabilny genom chloroplastowy. Tytoń był pierwszą rośliną wyższą, u której przeprowadzono ten typ transformacji z dużą wydajnością i obecnie jest to roślina modelowa, która bardzo często jest wykorzystywana, np. do produkcji ważnych białek. Transformacja plastydów znalazła zastosowanie w badaniach podstawowych plastydów, w ulepszaniu genotypów poprzez wprowadzanie genów odporności na choroby czy stresy abiotyczne, ale także w produkcji na większą skalę ważnych białek rekombinowanych o znaczeniu terapeutycznym, np. somatotropiny ludzkiej, przeciwciał monoklonalnych, interferonów, enzymów (152). W wielu wypadkach wybór transformacji chloroplastowej jest lepszy, a korzyści z zastosowania tej technologii to m.in.: możliwość uzyskania wysokiej ekspresji transgenu, co w przypadku uzyskiwania białek rekombinowanych jest bardzo istotne, wprowadzanie transgenu w określone miejsce w wyniku homologicznej rekombinacji, możliwość

ekspresji różnych transgenów w jednym czasie, łatwa eliminacja genów markerowych, a także nierozprzestrzenianie się transgenów z pyłkiem roślin. Transformacja plastydów nie zachodzi z udziałem *A. tumefaciens*, ale specjalnie skonstruowanych wektorów. Podstawą wektora jest określona sekwencja genomu plastydowego organizmu, u którego chcemy dokonać transformacji, dzięki temu proces transformacji jest miejscowo specyficzny. Jest to tzw. lewa i prawa sekwencja flankująca, każda o wielkości około 1-2 kb (121). Integracja transgenu do genomu chloroplastowego zachodzi poprzez homologiczną rekombinację pomiędzy sekwencjami flankującymi wektora a genomem plastydowym. Są wprawdzie konstruowane wektory, które mogą być użyte do transformacji większej liczby roślin, ale warunkiem ich zastosowania jest istnienie dostatecznego poziomu homologii sekwencji flankujących i genomu gospodarza. Konstrukt zawierający sekwencje flankujące, gen, którego ekspresję chcemy uzyskać i gen markerowy jest wprowadzany do komórek z użyciem techniki biolistycznej (mikrowstrzeliwania), PEG-u lub protoplastów. Selekcja roślin transplastomicznych, czyli zawierających transgen odbywa się na pożywkach selekcyjnych. Do tej pory skonstruowano wiele wektorów do transformacji chloroplastowej tytoniu, które skierowane są na różne regiony genomu chloroplastowego. M a d a n a l a i i n. w roku 2012 (121) skonstruowali wektor do transformowania plastydów tytoniu w celu otrzymywania rekombinowanego białka YFP. Wyznaczyli także nowe miejsce włączania konstruktu do genomu. Sekwencje flankujące, odpowiednie do wybranego regionu genomu, zostały wyznaczone poprzez analizę BLAST aby zapewnić odpowiedni poziom homologii także dla innych gatunków roślin. Rośliny transplastomiczne, które otrzymano odznaczały się wysokim poziomem ekspresji białka YFP na poziomie 5-6% wszystkich rozpuszczalnych białek.

Transformacja tytoniu pozwala na prowadzenie nie tylko szerokich badań nad stabilnością wbudowanych genów i ich wpływem na cechy użytkowe roślin, ale także ma wymiar bardzo praktyczny. Tytoń i jego transformacja jest przedmiotem wielu badań i bardzo ciekawych wyników w zakresie produkcji pożądanych przez człowieka związków (praca dr. M. Przybysia w niniejszym zeszycie „Studia i Raporty IUNG-PIB"). Obecnie transgeniczny tytoń, podobnie jak inne transgeniczne rośliny nie jest dopuszczony do komercyjnej uprawy. Niezwykle istotne jest natomiast, aby z chwilą prawnej i publicznej akceptacji upraw roślin transgenicznych były one przygotowane w ośrodkach naukowych ze względu na konkurencyjność produktów rolniczych na rynkach światowych (58).

Cytoplazmatyczna męska sterylność

Hodowla tytoniu, podobnie jak innych gatunków roślin uprawnych, opiera się często na krzyżowaniu i uzyskiwaniu form mieszańcowych. Poza odmianami, stosuje się często także gatunki dzikie, stanowiące rezerwuar wielu genów.

Zastosowanie krzyżowania oddalonego powoduje w wielu przypadkach powstanie form cytoplazmatycznie męskosterylnych (cms). Przyczyną cytoplazmatycznej

męskiej jałowości jest brak współdziałania pomiędzy odpowiednimi czynnikami genetycznymi jądra i cytoplazmy, odpowiedzialnymi za rozwój męskich organów generatywnych i mikrosporogenezę. Powstaje ona w mieszańcach oddalonych, gdzie jądro komórkowe jednego gatunku nie współgra prawidłowo z cytoplazmą drugiego. Ogromną rolę w tym procesie odgrywa mitochondrium. Cytoplazmatyczna męska sterylność obejmuje szereg procesów prowadzących do zaburzeń mikrosporogenezy, co powoduje tworzenie niefunkcjonalnych mikrospor lub ziaren pyłku. Zaburzenia cytologiczne ujawniają się przede wszystkim w dwóch tkankach: tapetum i komórkach macierzystych pyłku (KMP). Tapetum to warstwa komórek bezpośrednio otaczająca różnicujące się KMP oraz odżywiająca je. Komórki tapetum w roślinach cms charakteryzują się nadmierną wakuolizacją, utratą charakteru komórkowego tkanki i tworzeniem wielojądrowych syncytiów, jak również występują zaburzenia czasu naturalnej degeneracji, polegające na opóźnionym lub przedwczesnym obumieraniu. Badania wykazały, że u męskosterylnych roślin w tapetum i mikrosporach mitochondria często są mniejsze, a system grzebieni znacznie uboższy, z nienaturalnie rozdętymi membranami, natomiast w roślinach płodnych mitochondria posiadają doskonale rozbudowany system grzebieni wewnętrznych. Mitochondrialny DNA roślin odznacza się wysokim stopniem skomplikowania, zarówno pod względem struktury, jak i mechanizmów związanych z przetwarzaniem informacji genetycznej. Tylko nieduża część genomu mitochondrialnego zawiera sekwencje kodujące białka. Ponadto posiada on pewną liczbę tzw. otwartych ramek odczytu (*orf*), mogących potencjalnie kodować geny, których funkcja pozostaje jak dotąd nieznana. W mtDNA występują również sekwencje homologiczne z DNA jądrowym i chloroplastowym oraz małe i duże sekwencje powtórzone (125). Cytoplazmatyczna męska sterylność to cecha dziedziczona po formie matczynej, tzn. jest przenoszona do kolejnych pokoleń przez rośliny mateczne niezależnie od użytej formy ojcowskiej (5, 25, 88, 116, 138).

Cytoplazmatyczna męska sterylność jest zjawiskiem naturalnym u roślin wyższych, odnotowanym u ponad 150 gatunków. Cms u tytoniu, podobnie jak w przypadku innych gatunków uprawnych (kapusty, marchwi, cebuli, ryżu, sorga, słonecznika, pszenicy, jęczmienia, kukurydzy, soi, bawełny i wielu innych), stanowi podstawę dla rozwoju i produkcji mieszańców F_1 dla celów komercyjnych. Niezdolność do wytwarzania funkcjonalnego pyłku eliminuje konieczność przeprowadzania pracochłonnej, ręcznej kastracji pylników oraz gwarantuje, że otrzymane nasiona są wynikiem kierunkowego krzyżowania, a nie samozapylenia. Ponadto formy cytoplazmatycznie męskojałowe pozwalają na ochronę praw autorskich hodowcy, gdyż zapobiegają nieautoryzowanej produkcji nasion. Stanowią też cenny materiał użytkowy oraz materiał do badań cytologicznych, fizjologicznych i molekularnych zmierzających do poznania mechanizmów odpowiedzialnych za ekspresję cechy niepłodności pyłku (13, 125). Formy męskosterylne możemy otrzymać na drodze hodowli poprzez selektywną eliminację chromosomów rośliny matecznej

i zastępowaniu ich chromosomami innego gatunku na drodze krzyżowania wstecznego. W przypadku tytoniu, w mieszańcach pozostaje cytoplazma rośliny matecznej, najczęściej dzikiego gatunku z rodzaju *Nicotiana*, zaś formę ojcowską, warunkującą genom, stanowi *N. tabacum* (33, 146, 151).

Ze względu na czas, w którym następuje załamanie męskiego rozwoju generatywnego, G a b e l m a n w 1956 roku (74) podzielił cytoplazmatyczną męską sterylność na pyłkową, pręcikową i funkcjonalną. Pierwsza ma charakter postmejotyczny i objawia się zaburzeniami w rozwoju mikrospor po fazie tetrad, co może prowadzić do braku pyłku lub wytwarzania pyłku niefunkcjonalnego w morfologicznie niezmienionych lub mało zmienionych pylnikach. Druga objawia się zmianami degeneracyjnymi całych pręcików, w których często nawet nie dochodzi do tworzenia komórek mejotycznych lub też pojawia się silna nieregularność w podziałach mejotycznych. Funkcjonalna męska sterylność występuje wtedy, gdy mikrospory rozwijają się normalnie, ale nie dochodzi do ich uwolnienia wskutek niepękania pylników. W rodzaju *Nicotiana* przeważa typ pręcikowy (79).

C h a p l i n w roku 1962 (37) wyróżnił kilka typów męskiej sterylności w zależności od użytego gatunku dzikiego:

- typ pierwszy to normalnie wykształcone męskie organy generatywne;
- typ drugi to kwiaty męskosterylne, pylniki skurczone, ale nitki pręcików o normalnej długości (*N. bigelovii*);
- typ trzeci to nitki pręcików skrócone i pylniki zdegenerowane (*N. megalosiphon* i *N. suaveolens*);
- typ czwarty to pylniki o skróconych nitkach nie zawierające ziaren pyłku (*N. plumbaginifolia*);
- typ piąty to przekształcone pylniki w formie płatków korony (*N. undulata*),
- typ szósty to zniekształcone płatki korony i zdegenerowane pylniki (*N. debneyi*).

Ponadto, czasem występuje zjawisko feminizacji męskich organów generatywnych, czyli pojawiania się słupków ze znamionami w miejscu pręcików (*N. repanda*) (78).

Wpływ cytoplazmy na powstawanie męskiej sterylności u tytoniu może być w pewnym stopniu modyfikowany przez czynniki środowiska. Ta sama odmiana męskosterylna może być częściowo płodna w określonych warunkach. Odgrywają tu rolę takie czynniki jak długość dnia, warunki termiczne oraz intensywność światła (146). B e r b e ć i B e r b e ć w roku 1976 (18) badali wzrost i rozwój form tytoniu (*N. tabacum*) odtworzonych na cytoplazmie *N. glauca* w zróżnicowanych warunkach fotoperiodu. Kontrolę stanowiły genetycznie analogiczne formy roślin z normalną i zmutowaną cytoplazmą *N. tabacum*. We wszystkich warunkach fotoperiodu badane rośliny były męskosterylne. W pewnych układach fotoperiodycznych rosły one szybciej i wytwarzały większą masę wegetatywną oraz różniły się przebiegiem rozwoju generatywnego w porównaniu do obu formami z cytoplazmy *N. tabacum*.

Związek cytoplazmy z męską jałowością roślin odkrył w 1906 roku C o r r e n s (43). Początek badań nad cytoplazmatyczną męską jałowością w rodzaju *Nicotiana*

wiąże się z wykryciem w roku 1928 przez E a s t' a (66) męskojałowych roślin w potom-stwie mieszańca *N. sanderae* × *N. langsdorfii*. Pierwszą alloplazmatyczną formę tytoniu uprawnego *N. tabacum* z podstawioną cytoplazmą gatunku *N. debneyi* opisał w roku 1950 C l a y t o n (42). Płodne amfidiploidy *N. debneyi* × *N. tabacum* kilkakrotnie krzyżował wstecznie z *N. tabacum*, jako rodzicem ojcowskim, uzyskując już w pokoleniu seskwidiploidalnym rozszczepienie na formy o różnym stopniu męskiej płodności. W pokoleniu BC_3 występowały już niemal wyłącznie rośliny męskojałowe. Cecha męskiej jałowości była przekazywana bez wyjątku na wszystkie rośliny dalszych pokoleń uzyskanych w wyniku krzyżowania wstecznego z tytoniem uprawnym. Powyższy schemat lub jego modyfikacje zastosowano przy uzyskaniu prawie wszystkich następnych form alloplazmatycznych. Przeniesienie cytoplazmy *N. repanda* do *N. tabacum*, ze względu na bariery krzyżowalności, odbyło się z zastosowaniem tzw. krzyżowania pomostowego. Formę pomostową stanowił mieszaniec *N. sylvestris* × *N. tabacum*. Na drodze krzyżowania międzygatunkowego pomiędzy *N. excelsior* × *N. tabacum*, *N. amplexicaulis* × *N. tabacum* oraz *N. rustica* × *N. tabacum* uzyskano formy cytoplazmatycznie męskosterylne. Ostatnia krzyżówka wymagała krzyżowania pomostowego z *N. alata* (139). Formę *N. tabacum* z cytoplazmą *N. eastii* uzyskano natomiast już w pierwszym pokoleniu mieszańcowym. Substytucja cytoplazmy polegała tu prawdopodobnie na procesie androgenezy lub selektywnej eliminacji chromosomów gatunku dzikiego w jej toku (19). Formę alloplazmatyczną typu *tabacum* odkryto jako spontaniczną mutację (20). Cytoplazmatyczną męską sterylność uzyskano również w przypadku, gdy rodzicem żeńskim był gatunek uprawny. Przykładami takich krzyżówek międzygatunkowych są *N. tabacum* × *N. glutinosa*, *N. tabacum* × *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* × *N. glauca* oraz *N. tabacum* × *N. alata*. Przypuszcza się, że mechanizm powstawania tego typu męskiej jałowości polega na indukcji zmian w cytoplazmie przez gen lub geny jądrowe gatunku dzikiego we wczesnych pokoleniach mieszańcowych (30, 79, 138, 170). W 2007 roku uzyskano nową męskosterylną linię *N. tabacum* odmiany 'Wiślica' z cytoplazmą pochodzącą od *N. wuttkei* (109). Rośliny alloplazmatycznego analoga odmiany 'Wiślica' z cytoplazmą *N. wuttkei* były niższe, zakwitały później i miały liście o mniejszej powierzchni w porównaniu z roślinami wyjściowej odmiany płodnej.

Na początku lat 70. XX wieku założono w Puławach kolekcję alloplazmatycznych form tytoniu uprawnego *N. tabacum*, w oparciu o genotyp jądrowy odmiany 'Zamojska 4'. Kolekcję stopniowo rozbudowywano poprzez włączenie do niej alloplazmatycznych form uzyskanych w IUNG-PIB, a także sprowadzonych z innych placówek naukowych. Listę form wraz z miejscem pochodzenia podano w tabeli 1. Obserwacje zmian dotyczących budowy kwiatu i pokroju roślin u alloplazmatycznych form *N. tabacum* odmiany 'Zamojska 4' prowadzono w warunkach polowych (tab. 1) (17). Z uwagi na szersze wykorzystanie w uprawie odmiany 'Wiślica' niż odmiany 'Zamojska 4', wszystkie rodzaje cytoplazmatycznej męskiej jałowości przeniesiono do 'Wiślicy'. Wymienione linie allo-

plazmatyczne *N. tabacum* odmiany 'Wiślica' są przechowywane w kolekcji IUNG-PIB w Puławach. Morfologia kwiatów większości alloplazmatycznych form *N. tabacum* 'Wiślica' nie różniła się od swoich analogów w odmianie Zamojska 4. Pewne różnice zaobserwowano dla cms *N. amplexicaulis*, cms *N. debneyi*, cms *N. megalosiphon* oraz cms *N. undulata*. Badania polowe wykazały ponadto zwiększoną podatność na wirusa Y ziemniaka (PVY) w przypadku cms *N. exigua*, cms *N. suaveolens*, cms *N. amplexicaulis*, cms *N. knightiana*, cms *N. occidentalis*, jak również kilka form (cms *N. bigelovii*, cms *N. exigua*, cms *N. occidentalis* i cms *N. undulata*) zostało porażonych przez *Cercospora nicotianae* powodującą białe plamy na liściach (13). U niektórych alloplazmatycznych analogów odmiany 'Zamojska 4' obca cytoplazma podwyższała podatność na mączniaka rzekomego tytoniu (formy cms *N. eastii*, cms *N. plumbaginifolia* i cms *N. glutinosa*) (17).

Informacje dotyczące podatności na choroby oraz morfologii roślin są niezwykle cenne, gdyż najczęściej używanymi źródłami cytoplazmatycznej męskiej jałowości w przemysłowych odmianach i mieszańcach tytoniu jest cms *N. suaveolens* i cms *N. undulata* (13, 17).

Niektóre formy męskosterylne tytoniu oparte na cytoplazmie dzikich gatunków posiadają wiele cech niepożądanych cech użytkowych. Stwierdzono u nich powolniejszy wzrost, późniejsze zakwitanie, zmniejszenie liczby liści, obniżkę plonu i pogorszenie jakości surowca (146). W niektórych przypadkach obca cytoplazma może korzystnie wpływać na produkcję alkaloidów. Wprowadzenie obcego plazmonu modyfikuje cechy tytoniu uprawnego związane z wartością użytkową. Powszechnie obserwowanym zjawiskiem u form alloplazmatycznych jest zahamowanie wzrostu, szczególnie początkowego (*N. megalosiphon*, *N. debneyi*, *N. suaveolens*, *N. plumbaginifolia*), opóźnienie zakwitania, zmniejszenie liczby liści i ich rozmiarów (*N. raimondii*, *N. knightiana*). Dwa ostatnie czynniki są najczęstszą przyczyną obniżenia plonu. Pogorszenie jakości wysuszonego surowca powodowała cytoplazma *N. megalosiphon*, *N. bigelovii* i *N. plumbaginifolia*. Takiego negatywnego wpływu nie wywoływały natomiast *N. undulata* i *N. suaveolens* (16).

W celu uzyskania form cms, poza tradycyjnym krzyżowaniem międzygatunkowym, obecnie wykorzystuje się kilka metod inżynierii genetycznej (125, 151):

- potranskrypcyjne wyciszanie genów jądrowych odpowiedzialnych za produkcję pylników w roślinach transgenicznych;
- potranskrypcyjne wyciszanie genów mitochondrialnych, np. zablokowanie ekspresji dehydrogenazy pirogronianowej w tapetum pylnikowym tytoniu, co powoduje nadmierną wakuolizację i rozrost tapetum oraz zaburzenia w budowie ściany mikrospor (197);
- transformacja roślin za pomocą konstruktów zawierających geny chimeryczne,
- asymetryczna fuzja protoplastów, tzw. cybrydyzacja, czyli łączenie genomu jądrowego jednego gatunku z genomem cytoplazmatycznym (mitochondria, chloroplasty) drugiego gatunku lub linii genetycznej.

Jedną z metod uzyskiwania mieszańców cytoplazmatycznie męskosterylnych jest

asymetryczna fuzja protoplastów. Polega ona na inaktywacji genomu jądrowego jednego z partnerów, głównie za pomocą promieniowania jonizującego lub gamma. Dzięki tej metodzie można krzyżować przedstawicieli różnych rodzajów, a uzyskane w ten sposób mieszańce noszą nazwę cybrydów (16). Jednym z pierwszych przykładów fuzji asymetrycznej w rodzaju *Nicotiana* jest podstawienie cytoplazmy *N. africana* w genomie *N. tabacum* (107). Metoda ta została wykorzystana również w celu uzyskania mieszańca *N. tabacum* 'K326' × *N. repanda*. Uzyskane formy morfologicznie przypominały tytoń uprawny, ale były męskosterylne. Badania molekularne wykazały, że uzyskane cybrydy oraz potomstwo otrzymane w kolejnych pokoleniach z krzyżowania wstecznego z *N. tabacum* miały jądro pochodzące od *N. tabacum* i cytoplazmę od *N. repanda*. Obecność mitochondrium gatunku dzikiego zostało potwierdzone dzięki użyciu primerów dla mitochondrialnego genu *atp*A specyficznych dla *N. repanda* (172). A t a n a s s o v i i n. w roku 1998 (5) dzięki fuzji asymetrycznej uzyskali mieszańca *N. tabacum* × *N. alata*. Analiza Southern-blot wykazała obecność w cybrydach genomu jądrowego od *N. tabacum* i chloroplastów od *N. alata*. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych sugeruje, że genomy mitochondrialne cybrydów pochodzą z rekombinacji obu genomów mitochondrialnych form rodzicielskich. Wspomniana rekombinacja mitochondriów została potwierdzona w badaniach nad cybrydami *N. tabacum* x *N. suaveolens* (71). W roku 1999 D r a g o e v a i i n. (64) uzyskali międzyrodzajowe cytoplazmatycznie męskosterylne cybrydy pomiędzy *N.tabacum* i *Petunia hybryda*. Formy te posiadały morfologię tytoniu. Badania molekularne wykazały obecność genomu jądrowego od *N. tabacum*, chloroplastów od *Petunia hybryda* i zrekombinowane mitochondria posiadające cechy obu rodziców.

Nowoczesne metody badań z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych i analiz hybrydyzacyjnych z sondami molekularnymi u roślin płodnych i męskosterylnych pozwoliły na identyfikację regionów mtDNA związanych z cechą cms. Analiza genów skorelowanych z męską sterylnością wykazała, że ich sekwencje nukleotydowe ulegają rearanżacji w regionach kodujących i flankujących. W przypadku niektórych roślin cms zidentyfikowano transkrypcyjnie aktywny, unikalny typ genów, tzw. geny chimeryczne. Są one produktem rekombinacji złożonym z fragmentów sekwencji kodujących lub flankujących podstawowych genów mitochondrialnych i niezidentyfikowanych sekwencji *orf*. Geny chimeryczne mogą odpowiadać za powstanie białek, które zakłócają prawidłowy proces mikrosporogenezy. Badania ekspresji genów mitochondrialnych w roślinach płodnych i sterylnych wskazały na istnienie różnic w strukturze syntetyzowanych cząsteczek RNA, jednak nie wszystkie ujawnione zmiany mają związek z cechą cms. Badania O c z o ś z roku 1980 (146) pozwalają wnioskować, że przyczyną powstawania męskiej sterylności u tytoniu mogło być osłabione tempo gromadzenia RNA ogólnego i białka w liściach, mniejsza intensywność syntezy rybosomalnego RNA i opóźnione rozpoczęcie przemieszczania do stożka wzrostu łodygi związków niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych oraz białka w organach generatywnych. Badania B e r g m a n a i i n. z roku 2000 (22) nad cytoplazmatycznie męskosterylnymi mieszańcami *N. repan-*

da × *N. tabacum* dotyczące zawartości ATP i ADP w organach kwiatowych pozwoliły stwierdzić, że pylniki męskosterylne tych gatunków produkują znacznie mniej ATP, a tym samym charakteryzują się obniżoną proporcją ATP/ADP w stosunku do płodnych odpowiedników. Stwierdzono również zmieniony wzorzec transkrypcyjny dla mitochondrialnego genu *atp*1 u tytoniu.

Cytoplazmatyczna męska sterylność jest procesem odwracalnym. Mechanizm przywracania płodności roślinom męskosterylnym wiąże się najczęściej ze zmianą ekspresji genów mitochondrialnych warunkujących sterylność pyłku. Proces ten zachodzi przy udziale dominujących restorerów (Rf) i może być wynikiem supresji lub kompensacji sterylnego genomu mitochondrialnego (33, 163). Badania nad przywracaniem płodności wskazują na tzw. restorery jądrowe, czyli specyficzne fragmenty chromosomu odpowiedzialne za odtwarzanie jąderka. Jąderkotwórczy fragment jest najczęściej położony w satelitarnej części chromosomu. U tytoniu prowadzono badania nad restorerami płodności w męskosterylnej formie z cytoplazmą od *N. repanda* i genomem *N. tabacum*. Wprowadzenie do genomu męskosterylnego mieszańca fragmentu jąderkowego, pochodzącego od *N. repanda*, spowodowało przywrócenie zdolności do wytwarzania normalnych pylników. Uważa się, że po wprowadzeniu restorera system *N. tabacum* odpowiedzialny za organizację jąderka jest eliminowany przez satelitarny fragment z *N. repanda*, który w rodzimej cytoplazmie znajduje warunki do przywrócenia płodności. Wykazano również, że raz przywrócona płodność jest przekazywana na potomstwo (25, 77, 78, 116).

Jak wspomniano, stosowane w hodowli formy cms pozwalają na ochronę praw autorskich, utrzymanie w czystości genetycznej mieszańców F_1 i większą plastyczność odmian. Ma to bardzo duże znaczenie dla szybkiego reagowania na zaopatrzenie rynku, jak też na pojawiające się nowe rasy i izolaty patogenów. Należy podkreślić, że uzyskane w ostatnich latach w IUNG-PIB odmiany tytoniu charakteryzujące się odpornością na *Chalara elegans* oraz dobrymi cechami plonowania i jakości surowca są męskosterylne (14). Podobnie, uzyskane w roku 2004 przez D o r o s z e w s k ą (58) linie BPA zawierają odporność na PVY pochodzącą od *N. africana* i są potencjalnymi kandydatami do uprawy w przyszłości (rys. 8).

Rys. 8. Męskosterylne kwiaty *N. tabacum* BPA

Źródło: fot. T. Doroszewska, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB..

Tabela 1

Formy alloplazmatyczne *N. tabacum* odmiany 'Zamojska 4' w kolekcji IUNG w Puławach.

Lp.	Źródło podstawionej obcej cytoplazmy	Pochodzenie
1	*N. amplexicaulis*	IUNG Puławy, Polska
2	*N. bigelovii*	TRB, Harare, Zimbabwe
3	*N. debneyi*	IUNG Puławy, Polska
4	*N. eastii*	IUNG Puławy, Polska
5	*N. exigua*	IUNG Puławy, Polska
6	*N. glaca*	IUNG Puławy, Polska
7	*N. glutinosa*	WITIM Krasnodar, Rosja
8	*N. goodspeedii*	TRB, Harare, Zimbabwe
9	*N. knightiana*	IUNG Puławy, Polska
10	*N. megalosiphon*	WITIM Krasnodar, Rosja
11	*N. occidentalis*	WITIM Krasnodar, Rosja
12	*N. plumbaginifolia*	WITIM Krasnodar, Rosja
13	*N. raimondii I*	IUNG Puławy, Polska
14	*N. raimondii II*	IUNG Puławy, Polska
15	*N. suaveolens*	TRB, Harare, Zimbabwe
16	*N. tabacum*	IUNG Puławy, Polska
17	*N. undulata*	WITIM Krasnodar, Rosja

Źródło: Berbeć, 1998 (17).

Markery molekularne roślin i patogenów

Ulepszanie genotypów tytoniu z wykorzystaniem nowoczesnych metod opiera się głównie na prowadzeniu hodowli molekularnej, czyli selekcji pożądanych genotypów na podstawie polimorfizmu markera molekularnego sprzężonego z *loci* określonych cech. Markery wykorzystuje się też do identyfikacji specyficznych sekwencji patogenów wywołujących choroby. Wykorzystywane w hodowli markery, dzięki swoim właściwościom, umożliwiają bardziej precyzyjną i szybką selekcję w porównaniu z innymi metodami oceny. Są to głównie markery odporności na choroby, stresy, niedobory pokarmowe czy też służące rozróżnianiu form cytoplazmatycznej męskiej sterylności. Identyfikacja markerów molekularnych patogenów pozwala na szybkie i wysoce wiarygodne wykrycie infekcji, nawet jeśli objawy zewnętrzne choroby nie występują, a także na lepsze poznanie czynników chorobowych, określenie przynależności systematycznej i tym samym skuteczniejsze ich zwalczanie. Wykorzystując odpowiednie metody molekularne możliwe jest zbadanie zmienności genetycznej w obrębie gatunków, podgatunków, ras i szczepów patogenów.

Tabela 2

Zmiany części kwiatowych i pokroju roślin u alloplazmatycznych form *N. tabacum* odm. 'Zamojska 4' w zależności od rodzaju obcej cytoplazmy

	Zmiany morfologiczne	Źródła cytoplazmy
Pylniki	normalny	*knightiana, raimondii I, raimondii II*
	szczątkowy lub brak	*amplexicaulis, glauca, tabacum, megalosiphon, suaveolens*
	twory płatkowate	*eastii, glutinosa, plumbaginifolia*
	twory płatkowate i słupkowate	*occidentalis, goodspeedii*
	twory słupkowate	*exigua, debneyi, bigelovii, suaveolens, undulata*
Słupek	normalny	*amplexicaulis. eastii, glauca, glutinosa, knightiana, raimondii I, raimondii II, plumbaginifolia, tabacum*
	o zmienionej morfologii (normalny lub zniekszcałcony)	*bigelovii, debneyi, exigua, suaveolens, undulata*
	zniekształcony	*goodspeedii, occidentalis*
Zmieniona korona		*eastii, glutinosa, plumbaginifolia, goodspeedii, occidentalis, suaveolens*
Zmieniony pokrój		*debneyi, eastii, exigua, glutinosa, goodspeedii*, megalosiphon*, plumbaginifolia, undulata*

* znacznie odbiega od pokroju odmiany 'Zamojska 4'

Źródło: Berbeć, 1998 (17).

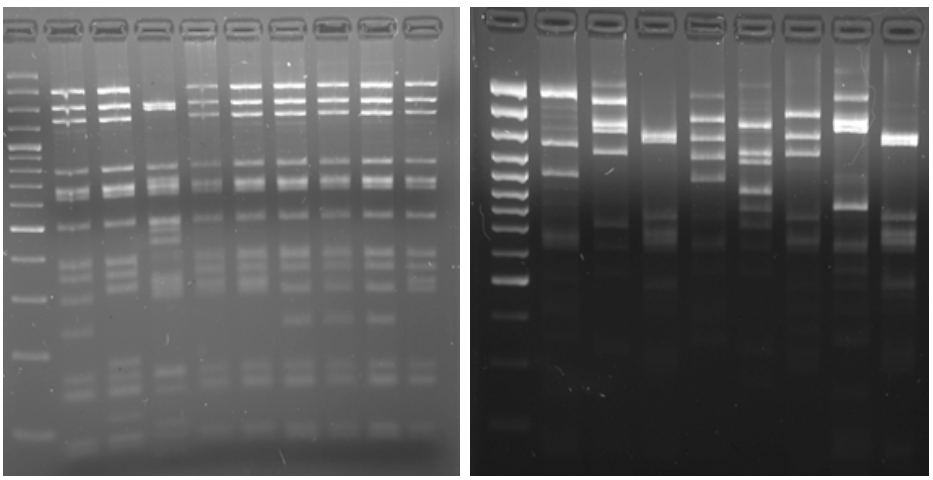
Metody molekularne wykorzystywane do generowania markerów molekularnych można podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa opiera się na wykorzystaniu enzymów restrykcyjnych, a następnie porównywaniu powstałych fragmentów oraz na metodach hybrydyzacji, druga zaś na zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*). Metody oparte na reakcjach PCR odznaczają się wysoką czułością i specyficznością. W ostatnich latach powstało wiele odmian reakcji PCR, np. *nested*-PCR (tzw. wewnętrzny *PCR*), *multiplex-PCR*, *RT-PCR* czyli PCR poprzedzony procesem odwrotnej transkrypcji, kiedy analizowany materiał genetyczny jest w postaci RNA, *real-time* PCR czyli PCR w czasie rzeczywistym pozwalający na ominięcie etapu identyfikacji DNA w żelu i analizę przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym. Podstawowymi markerami rutynowo wykorzystywanymi w badaniach genetycznych, taksonomicznych i filogenetycznych są markery RFLP, RAPD, SSR, STS i AFLP. Dalsze, liczne modyfikacje metody PCR oraz często połączenie jej z trawieniem restrykcyjnym, doprowadziło do powstania wielu nowych markerów, takich jak np. SCAR, IRAP, REMAP, CAPS.

RFLP, czyli analiza długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*) to metoda nie opierająca się na technice PCR,

w której porównuje się wielkości fragmentów DNA wcześniej poddanych trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Analiza RFLP może być poprzedzona reakcją PCR (RFLP-PCR). Zróżnicowany obraz prążków po rozdziale elektroforetycznym wynika głównie z mutacji, która objęła miejsce restrykcyjne, bądź delecji lub duplikacji fragmentu DNA pomiędzy miejscami restrykcyjnymi. Jeżeli liczba uzyskanych prążków jest bardzo duża, można rozdzielone w żelu fragmenty DNA poddać denaturacji, przenieść na bibułę nitrocelulozową i przeprowadzić hybrydyzację ze znakowaną sondą. Uzyskuje się charakterystyczny obraz, tzw. profil genetyczny. Markery RFLP mogą być wykorzystywane do konstruowania map genetycznych, wykrywania obcego DNA w tkance roślinnej, (co pozwala na identyfikację czynnika chorobowego w dalszych etapach badań) w badaniach taksonomicznych, filogenetycznych roślin i patogenów czy w identyfikowaniu form cytoplazmatycznej męskiej sterylności. Metoda ta znalazła liczne zastosowania w badaniach genetycznych *Nicotiana*, a także patogenów wywołujących różnorakie choroby u tytoniu. G l a i s i i n. w roku 1998 (81), badając region odpowiedzialny za charakter nekrotyczny wirusa PVY, który wywołuje brunatną nekrozę nerwów liści tytoniu, zastosowali technikę RFLP do strawienia genomów 10 izolatów PVY będących reprezentantami czterech grup PVY: PVY^{N}, PVY^{NTN}, $PVY^{N}W$ i PVY^{0}. Badania RFLP genomów izolatów, które były amplifikowane w dwóch fragmentach, pozwoliły na podzielenie izolatów na 5 grup (pierwszy fragment: grupa A – PVY^{N}, grupa B – PVY^{NTN} i $PVY^{N}W$, grupa C – PVY^{0}; drugi fragment: grupa D – PVY^{N} i PVY^{NTN}, grupa E – PVY^{0} i $PVY^{N}W$). Poza tym, badania wykazały, że regionem odpowiedzialnym za charakter nekrotyczny jest część 5'wirusowego RNA. Metoda została też wykorzystana w badaniach nad PVY prowadzonych w IUNG-PIB i posłużyła do grupowania genetycznego, a do następnie analizy filogenetycznej izolatów $PVY^{N}W$ i PVY^{NTN} (154, 155) (rys. 9). Oprócz wirusów, tą samą techniką badano także patogeniczne grzyby, m.in. P*hytophthora parasitica*, powodującą zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi tytoniu (73) oraz izolaty *Rhizoctonia solani* wyizolowane z tytoniu i wywołujące rizoktoniozę. W ostatnim przypadku amplifikowano techniką PCR geny rDNA wraz z sekwencjami ITS, ponieważ regiony te są jednymi z najbardziej zróżnicowanych *loci*, przeprowadzano analizę ITS-RFLP z różnymi enzymami restrykcyjnymi, a następnie stworzono dendrogramy, na podstawie których oceniano różnorodność genetyczną izolatów (86). Markery RFLP są stosunkowo wysoce polimorficzne i odtwarzalne, występują powszechnie, dziedziczą się w sposób kodominujący, czyli sonda hybrydyzacyjna może zwykle wiązać się z różnymi allelami w jednym *locus*. Dają także możliwość jednoczesnego skreeningu nieograniczonej liczby fragmentów DNA przy zastosowaniu niezmienionej procedury badawczej. Z drugiej strony technika ta jest pracochłonna i czasochłonna oraz wymaga użycia dużej ilości wysokiej jakości, nieuszkodzonego DNA, dlatego obecnie nie jest już tak powszechnie używana i jest zastępowana przez tańsze i prostsze metody oparte na reakcjach PCR.

Jedną z metod opartych na reakcjach PCR jest łańcuchowa reakcja polimerazy z arbitralnie wybranymi starterami, czyli **RAPD** (ang. *random amplified polymorphic*

DNA). Reakcja jest prowadzona z użyciem jednego startera o dowolnie wybranej sekwencji, przyłączającego się do obu nici matrycy, co prowadzi do powstania wielu fragmentów komplementarnego DNA. Generując te startery nie jest konieczna znajomość sekwencji badanego DNA. Polimorfizm markerów RAPD wynika z reanżacji lub delecji pomiędzy miejscami przyłączania starterów (189). Zwykle wykonuje się kilka reakcji RAPD z różnymi przypadkowymi starterami, które najczęściej pochodzą z firmy OPERON. Lokalizacja oraz liczba miejsc komplementarnych dla danego startera jest różna, nawet dla organizmów blisko spokrewnionych, co stanowi podstawę do ich różnicowania. Prowadząc analizę porównawczą produktów RAPD z markerami RAPD charakterystycznymi dla danego patogena, oczywiście przy użyciu jednakowych starterów, można w szybki i prosty sposób zidentyfikować sprawcę choroby (187).



Rys. 9. Wzory restrykcyjne po trawieniu DNA genomu wirusa PVY enzymami restrykcyjnymi
Źródło: Przybyś, 2011 (155).

Metody RAPD są stosowane do oceniania genetycznej różnorodności wśród wielu organizmów, w tym bardzo często grzybów patogenicznych. W przypadku bakterii, których genom jest mały, uzyskuje się zwykle zbyt małą liczbę produktów RAPD. Użyto jej między innymi do identyfikacji izolatów grzyba *Phytophthora parasitica var. nicotianae*, który powoduje u tytoniu zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi oraz do odróżniania izolatów patogenicznych od niewywołujących objawów choroby. Wyniki badań patogeniczności różnych izolatów w testach szklarniowych zostały całkowicie potwierdzone metodą RAPD, a na podstawie wygenerowanych markerów utworzono drzewa filogenetyczne i pogrupowano izolaty w odpowiednie klastry. Technika okazała się być czułą i niezawodną metodą szybkiej identyfikacji izolatów grzybowych (198, 199). Badano także różnorodność genetyczną i tworzono drzewa filogenetyczne wielu gatunków rodzaju *Nicotiana* (44, 196). Y u i L i n w 1997 roku (196), wykorzystując 34 arbitralnie wybrane startery, porów-

nawali 18 genotypów tytoniu należących do 9 gatunków sekcji *Tomentosae* i *Alatae*. Na podstawie stworzonych dendrogramów, 18 genotypów *Nicotiana* zostało podzielonych na dwa klastry. Badania potwierdziły także przynależność *N. sylvestris* do sekcji *Alatae*, co było zgodne z klasyfikacją według Goodspeed'a. Z wykorzystaniem techniki RAPD identyfikowano geny odporności na czarną zgniliznę korzeni tytoniu (6) oraz geny odporności na *Peronospora tabacina* powodującego mączniaka rzekomego tytoniu (132). Markery wykorzystano także w konstrukcji map genetycznych (ponieważ RAPD dostarcza dużej liczby markerów) do projektowania na ich podstawie markerów SCAR specyficznych dla danego gatunku. Wadami techniki RAPD jest generowanie dominujących markerów oraz jej duża wrażliwość na warunki prowadzonej reakcji, dlatego wyniki uzyskane przez oddzielne grupy badaczy mogą znacząco różnić się od siebie. Innym ograniczeniem jest brak możliwości rozróżnienia heterozygot od genotypów homozygotycznych (7).

W celu ominięcia ograniczeń związanych z powtarzalnością techniki RAPD opracowano metodę **AFLP**, czyli selektywną amplifikację fragmentów restrykcyjnych (ang. *selective restriction fragment amplification*). AFLP łączy w sobie metodę RFLP z reakcją PCR i polega na powieleniu specyficznych fragmentów restrykcyjnych. W metodzie tej nie jest porównywana długość fragmentów, ale obecność lub brak amplifikacji fragmentów DNA. Do wykrywania fragmentów restrykcyjnych stosuje się amplifikację PCR, a nie hybrydyzację metodą Southerna, tak jak w RFLP. Technika ta, podobnie jak RAPD, nie wymaga wcześniejszej charakterystyki sekwencji badanego genomu i jest używana głównie do badań genomów roślin, bakterii i wirusów (184). W pierwszym etapie do fragmentów DNA otrzymanych w wyniku trawienia dwoma enzymami restrykcyjnymi przyłączają się krótkie adaptory. Następuje wstępna selekcja fragmentów w reakcji preamplifikacji ze starterami komplementarnymi do adaptorów i miejsc restrykcyjnych, posiadającymi na końcu 3' nukleotyd selekcyjny. Dzięki nukleotydom selekcyjnym dochodzi do ograniczenia liczby powielanych fragmentów. Właściwa selekcja fragmentów jest prowadzona ze starterami selekcyjnymi, które posiadają na końcu 3' dwa lub trzy dodatkowe nukleotydy selekcyjne (184). Liczba amplifikowanych fragmentów może być modyfikowana poprzez użycie primerów z większą lub mniejszą liczbą selektywnych nukleotydów, przez rodzaj nukleotydów selektywnych, zawartość par GC oraz użycie różnych enzymów. Zależy także od wielkości i złożoności genomu. Pomimo że markery AFLP są przeważnie dominujące, metoda ta jest stosowana m.in. do identyfikacji odmian hodowlanych roślin, do tworzenia bardzo zagęszczonych map u roślin wyższych oraz do identyfikacji i różnicowania populacji roślin i patogenów. Stosując technikę AFLP zbadano m.in. zróżnicowanie genetyczne istniejące w rodzaju *Nicotiana*. Dzięki analizie 46 linii tytoni użytkowych oraz 7 dzikich gatunków z użyciem 8 różnych kombinacji starterów, zaobserwowano wysoki stopień podobieństwa profili AFLP linii użytkowych oraz znacznie większą ilość polimorfizmów wśród gatunków dzikich. Wzajemne porównanie profili AFLP dostarczyło dodatkowych informacji o pochodzeniu *N. tabacum* (158).

Kolejnymi markerami są markery **STS** (ang. *sequence tagged sites*), czyli miejsca znaczone sekwencyjnie. Są to markery w postaci krótkiego regionu DNA o długości 200-300 par zasad i są określane przez sekwencję specyficznych starterów umożliwiających ich amplifikację. W przypadku generowania tych starterów konieczna jest znajomość sekwencji badanego DNA, ponieważ startery są projektowane na podstawie znajomości sekwencji całego fragmentu DNA. Markery STS mają zastosowanie głównie do identyfikacji chromosomów i ich regionów, do konstrukcji map fizycznych, przeszukiwania klonów biblioteki DNA. Funkcjonalny marker STS amplifikuje jeden region genomu i produkuje jeden prążek na żelu elektroforetycznym (1).

Markery mikrosatelitarne, dzięki takim cechom jak: wysoki polimorfizm, rozpoznawanie różnych alleli w jednym *locus*, dziedziczenie kodominujące, wysoka odtwarzalność, powszechność występowania (także w genomach chloroplastów i mitochondriów), położenie specyficzne względem chromosomów oraz wysoka wydajność genotypowania z ich udziałem, stały się popularnymi markerami używanymi w hodowli molekularnej i badaniach genetycznych roślin (99). Do markerów mikrosatelitarnych należą markery **SSR** – proste sekwencje powtarzalne (ang. *simple sequence repeats*), **STR** – krótkie tandemowe powtórzenia (ang. *short tandem repeats*) lub **SSLP** – polimorfizm długości prostych sekwencji (ang. *simple sequence length polymorphism*). Markery te składają się z wielokrotnie powtórzonych sekwencji kilku nukleotydów (od 1 do 5), np. AT, AG, GACA, są rozrzucone w dużej liczbie w genomach eukariotycznych i odznaczają się dużym polimorfizmem wewnątrzgatunkowym. Markery te są generowane z użyciem pary specyficznych, specjalnie zaprojektowanych starterów mających zdolność przyłączania się do unikatowych sekwencji flankujących mikrosatelity. Aby zaprojektować specyficzne startery należy wcześniej zidentyfikować sekwencje flankujące mikrosatelitę przez sekwencjonowanie, dlatego markery te, w przeciwieństwie do markerów RAPD czy AFLP ,wymagają wcześniejszej znajomości sekwencji DNA. Markery SSR, podobnie jak markery RFLP, są kodominujące i pozwalają na identyfikację różnych alleli w jedym *locus* SSR. Poza tym, występują zarówno w regionach kodujących, jak i niekodujących oraz odznaczają się wysokim stopniem polimorfizmu długości, dlatego łatwo i w sposób odtwarzalny mogą być identyfikowane w reakcji PCR. Dzięki tym cechom możliwe jest uzyskiwanie jednakowych wyników przez różne grupy badawcze (161). Markery SSR, podobnie jak IRAP czy REMAP, wykorzystuje się głównie do badania różnorodności genetycznej i selekcji genotypów. B i n d l e r i i n. w roku 2011 (23) na podstawie około 5 tysięcy wygenerowanych, nowych markerów mikrosatelitarnych stworzyli także mapę genetyczną tetraploidalnego tytoniu o wysokiej rozdzielczości. Mapa ta pod względem gęstości markerów i rozdzielczości jest porównywalna do map najlepiej scharakteryzowanych genomów rodzaju *Solanaceae*, czyli pomidora i ziemniaka. Oprócz jądrowych SSR (nuSSR), występują także mitochondrialne (mtSSR) oraz chloroplastowe (cpSSR). Te ostatnie zostały odkryte po raz pierwszy u *Nicotiana* (186).

Markery **ISSR,** czyli polimorfizm odcinków DNA pomiędzy mikrosatelitami (ang. *inter simple sequence repeat*), umożliwiają otrzymanie profili genotypów roślin w postaci obrazu wielu prążków, tzw. *fingerprinting* DNA lub „odcisk palca DNA". Stosowany jest tylko jeden starter o długości 17-18 nukleotydów, posiadający 1-2 nukleotydy selekcyjne na końcu 3', dzięki którym może przyłączyć się w miejscu połączenia mikrosatelity z unikatowym DNA (201). W badaniach polimorfizmu DNA, oprócz sekwencji mikrosatelitarnych, wykorzystywane są też inne sekwencje występujące powszechnie i w dużej liczbie w genomach roślinnych, czyli retrotranspozony. Są to sekwencje powtórzone, rozproszone w krótkich i długich odstępach. Markery **IRAP,** czyli polimorfizm odcinków DNA pomiędzy retrotranspozonami (ang. *inter-retrotransposon amplified polymorphism*), są generowane dzięki zastosowaniu specyficznego startera przyłączającego się do końcowych sekwencji LTR (ang. *long terminal repeats*, długie terminalne powtórzenia). Natomiast markery **REMAP,** czyli polimorfizm odcinków DNA pomiędzy retrotranspozonem a mikrosatelitą (ang. *retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*), można identyfikować przy zastosowaniu pary starterów: startera specyficznego do sekwencji LTR oraz startera mikrosatelitarnego. W obu technikach polimorfizm jest wykrywany poprzez obecność lub brak produktu reakcji PCR. Brak amplifikacji wskazuje na nieobecność retrotranspozonu w danym *locus* (98). Markery ISSR, IRAP, REMAP odznaczające się wyjątkowym polimorfizmem umożliwiają tworzenie złożonych profili DNA, dlatego często są stosowane do badania zróżnicowania genetycznego między odmianami czy liniami roślin. W pracach związanych z ulepszaniem genotypów tytoniu markery IRAP i ISSR zastosowali Y a n g i i n. w roku 2007 (194), badając szczegółowo różnorodność genetyczną i wzajemne korelacje pomiędzy 118 genotypami tytoniu, należącymi do gatunków dzikich, orientalnych i uprawnych. Przeprowadzone badania pokazały niski poziom zróżnicowania genetycznego między różnymi typami tytoni uprawnych, natomiast zdecydowanie wyższy między gatunkami dzikimi. Pozwoliły także na porównanie pokrewieństwa genetycznego pomiędzy różnymi typami tytoniu charakteryzującymi się odmiennymi cechami jakościowymi ważnymi dla przemysłu.

Markery **SSAP** (ang. *sequence specific amplified polymorphism,* polimorfizm sekwencyjnie specyficznej amplifikacji) powstają dzięki prostej modyfikacji techniki AFLP. Różnicują długość odcinków pomiędzy miejscem integracji retrotranspozonu zawierającym sekwencje LTR, a miejscem restrykcyjnym. Wykorzystywane są dwa startery – AFLP oraz starter przyłączający się do sekwencji LTR. Jest to technika wykorzystywana głównie do profilowania DNA (185).

Inne markery, których generowanie opiera się na sekwencjach mikrosatelitarnych i retrotranspozonowych to, m.in.: **MP-PCR** (ang. *microsatellite primed PCR*, amplifikacja z użyciem starterów mikrosatelitarnych), **IMP** (ang. *inter-MITE polymorphism*, polimorfizm długości odcinków pomiędzy sekwencjami MITE), **RAMP** (ang. *random amplified microsatellite polymorphism*, polimorfizm losowo

amplifikowanych mikrosatelitów), **SAMPL** (ang. *selectively amplified microsatellite polymorphic locus*, selektywnie amplifikowany polimorficzny *locus* mikrosatelitarny), **ERAP** (ang. *exon-retrotransposon amplification polymorphism*, polimorfizm na odcinku egzon-transpozon).

Diagnostyka chorób i patogenów roślin

Metody biologiczne i serologiczne

Ocena zdrowotności roślin opiera się w pierwszym etapie na obecności lub braku objawów chorobowych. Ze względu na mnogość patogenów (wirusy, wiroidy, fitoplazmy, bakterie, grzyby) oraz podobieństwo wielu symptomów chorobowych jest to metoda mało precyzyjna.

Objawy chorobowe mogą występować na całej roślinie, to znaczy mogą być systemiczne lub mogą być zlokalizowane w obrębie wybranych organów, tkanek, grup komórek lub nawet pojedynczych komórek chorej rośliny. Powszechnie wyróżnia się następujące typy objawów chorobowych występujących u roślin: więdnięcia, nekrozy, zgnilizny, zrakowacenia, zmiany zabarwienia, zniekształcenia, narośla, rany i wydzieliny (106).

W hodowli tytoniu dużo uwagi poświęca się chorobom wirusowym ze względu na brak ochrony chemicznej. Dokonuje się oceny odporności, m.in. na wirusa Y ziemniaka (*Potato virus* Y, PVY), wirusa brązowej plamistości pomidora (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) oraz wirusa mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (rys. 10), zarówno w warunkach polowych, jak i w ścisłych doświadczeniach szklarniowych po sztucznej inokulacji (57, 82, 147). Obserwacje wykonuje się w kilku terminach, dokumentując wszelkie zmiany na roślinach. W przypadku wirusów możliwa jest sytuacja, gdy mimo braku objawów wirus jest obecny w roślinie. Z tego względu konieczne są dodatkowe badania.

Najdawniej i najpowszechniej używaną metodą wykrywania i identyfikacji wirusów roślin jest test biologiczny. Polega on na wykorzystaniu rośliny wskaźnikowej, o której wiemy, że jest podatna na danego patogena. Zaletą tej metody jest jej prostota oraz czułość. Wadą natomiast – dość długi czas oczekiwania na wyniki (106). L a s k o w s k a i Be r b e ć w roku 2006 (111) wykorzystali test biologiczny w ocenie odporności *N. alata*, *N. sanderae* oraz mieszańców *N. tabacum* 'TB-566' tetra × *N. alata*. Gatunkiem wskaźnikowym była *N. glutinosa*. Inokulacja sokiem z roślin wykazujących reakcję nadwrażliwośći po zakażaniu TSWV nie spowodowała u *N. glutinosa* żadnej reakcji chorobowej, co świadczy o braku wirusa. Inokulacja sokiem z roślin mających chlorotyczne plamy powodowała u *N. glutinosa* również chlorotyczne zmiany na liściach. Natomiast porażenie systemiczne rośliny wskaźnikowej wystąpiło, gdy użyto soku z rośliny z systemicznymi objawami.

Rośliny wskaźnikowe stosowane są również w celu odróżnienia blisko spokrewnionych wirusów. Do takich wirusów należą TMV i ToMV (ang. *Tomato mosaic virus*) Sztuczna inokulacja gatunków wskaźnikowych pozwala na identyfikację wirusa ze względu na zróżnicowane objawy. *N. sylvestris* oraz *N. tabacum* 'White Burley' reaguje na TMV systemicznym porażeniem, podczas gdy porażenie ToMV skutkuje jedynie lokalnymi plamami nekrotycznymi (72, 85).

Rys. 10. Objawy chorób wirusowych (od lewej): *Potato virus* Y (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tobacco mosaic virus* (TMV)

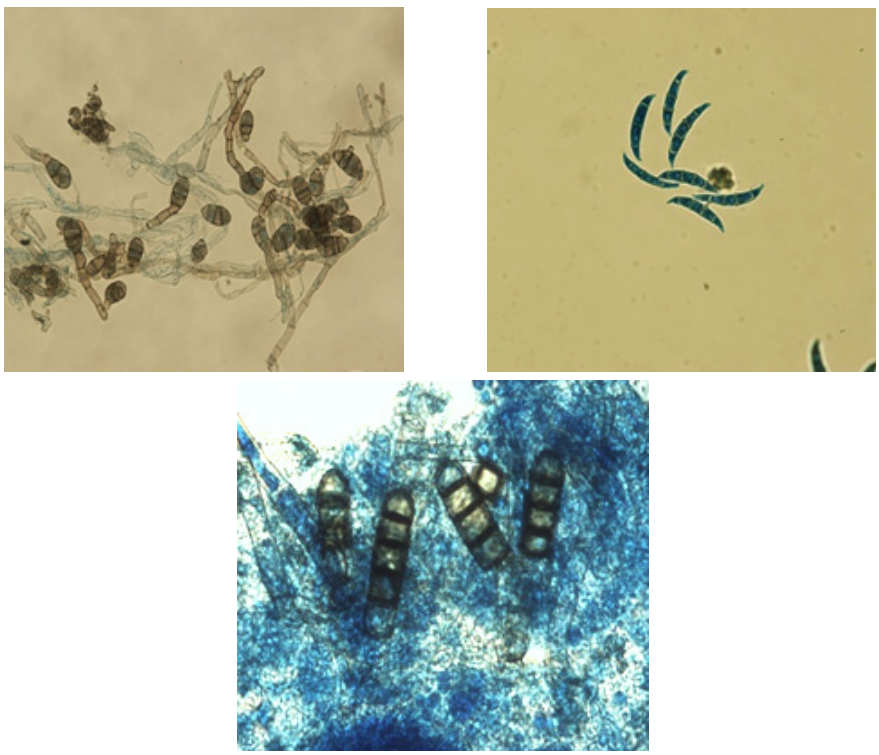
Źródło: fot. T. Doroszewska, A. Depta, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

Identyfikacji chorób bakteryjnych oraz grzybowych dokonuje się głównie za pomocą mikroskopu. Przygotowanie preparatu polega na pobraniu fragmentu zmienionej tkanki i obserwacji pod określonym powiększeniem. W przypadku grzybów ocenia się rodzaj grzybni oraz występowanie form przetrwalnikowych (rys. 11).

W celu jednoznacznej identyfikacji patogena wykonuje się testy serologiczne. Analityczne metody immunologiczne wykorzystują specyficzną reakcję między antygenem a przeciwciałem. Jednym z najpowszechniej stosowanych testów w badaniach, zarówno naukowych, jak i diagnostycznych jest test ELISA (41, 114).

Wzmianki o nowych metodach immunoenzymatycznych: teście ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) oraz teście EIA (*Enzyme Immunoassay*) pojawiły się

w latach 60. XX wieku. Zostały odkryte przez dwie niezależne grupy badawcze: Petera Perlmanna i Eva Engvall z Uniwersytetu w Sztokholmie oraz Antona Schuursa i Baukea van Weemen z Holandii, a ich rozwój nastąpił w latach 70. i 80. (160). Mimo, iż techniki różniły się od siebie metodyką wykonania, w obu wykorzystano enzymy do wykrywania reakcji antygenów ze swoistymi przeciwciałami. Test ELISA stanowił obiecującą alternatywę dla stosowanych powszechnie testów radioimmunologicznych (*Radioimmunoassay* – RIA), bazujących na szkodliwym dla zdrowia, radioaktywnym znakowaniu (113). Początkowo test ELISA był stosowany do wykrywania przeciwciał w surowicy, jednak za jego pomocą można analizować także ilość antygenów w danej próbce. W wielu publikacjach można odnaleźć informacje dotyczące użycia tego testu w różnych dziedzinach badań, różniące się jedynie metodą wykonania lub wprowadzeniem niewielkich modyfikacji (68). Pierwszą zastosowaną techniką było opłaszczenie antygenu lub przeciwciała na fazie stałej/immunosorbencie. Następnie pojawiły się płytki mikrotrialne. Ten test sprawdzał się przy identyfikacji wirusa HIV u kobiet w ciąży, czy też w wykrywaniu chorób zwierzęcych (69). Prosty, czuły i wszechstronny, stał się podstawowym i fundamentalnym narzędziem w przemyśle farmaceutycznym oraz znalazł zastosowanie



Rys. 11. Choroby grzybowe tytoniu (od lewej):
zarodniki *Alternaria*, zarodniki *Fusarium*, chlamydospory *Thielaviopsis basicola*

Źródło: D. Czarnecka, M. Kawka, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

w przemyśle spożywczym, rolnictwie, oraz w różnych testach klinicznych (45, 67, 69, 160). Wykorzystywany jest także do wykrywania specyficznych białek, np. Cry u organizmów modyfikowanych genetycznie (117).

Testy ELISA standardowo wykonywane są na polistyrenowych lub pleksiglasowych, 96-dołkowych płytkach. Płytkę opłaszcza się odpowiednim antygenem lub przeciwciałem. W celu uniknięcia nieselektywnego wiązania się białek do fazy stałej podczas następnych etapów testu, wolne miejsca często blokuje się za pomocą buforu blokującego. Łączenie się antygenu ze specyficznym przeciwciałem uwidacznia reakcja barwna, powstająca dzięki enzymom przekształcającym odpowiedni substrat. W teście stosowane są przeciwciała poliklonalne lub monoklonalne. Najczęściej stosowane enzymy to fosfataza alkaliczna, która przekształca bezbarwny fosforan p-nitrofenolu w żółty p-nitrofenol oraz peroksydaza chrzanowa, która daje niebieskie zabarwienie w obecności tetrametylobenzydyny (45). Zmiana barwy roztworu mierzona jest spektrofotometrycznie.

Heterogenną immunoanalizę, jaką jest test ELISA, możemy podzielić na:

1. bezpośrednią,
2. pośrednią,
3. *Double Antibody Sandwich* (DAS-ELISA),
4. *Triple Antibody Sandwich* (TAS-ELISA),
5. kompetencyjną (konkurencyjną).

Bezpośredni test ELISA jest najprostszym ze wszystkich rodzajów tego testu. Pierwszym etapem jest związanie (opłaszczenie) antygenu na płytce. Po okresie inkubacji następuje płukanie w celu usunięcia niezwiązanych antygenów i zablokowanie miejsc nie zajętych przez antygen. Kolejnym etapem jest dodanie znakowanego enzymem przeciwciała specyficznego dla antygenu i inkubacja w celu połączenia antygenu z przeciwciałem. Ponownie płukanie w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał. Antygen połączony ze znakowanym przeciwciałem, po dodaniu substratu odpowiedniego dla enzymu, powoduje reakcję barwną, a intensywność koloru świadczy o ilości badanego białka w próbie.

Pośredni test ELISA stosowany jest do wykrycia obecności przeciwciała. Podobnie jak w metodzie bezpośredniej antygen jest opłaszczony, ale następnie dodawane jest swoiste przeciwciało, które wiąże się podczas inkubacji z antygenem. Dopiero antyprzeciwciało znakowane enzymem, po dodaniu substratu, przekształca się w barwny produkt (45). Zaletą metody pośredniej jest to, że nie trzeba znakować przeciwciał specyficznych względem antygenu przeciwciał. Pozwala to na użycie różnych przeciwciał pierwotnych, bez potrzeby dodatkowych manipulacji związanych z ich znakowaniem, po czym przeciwciała te mogą zostać wykryte za pomocą zawsze takich samych przeciwciał znakowanych

Kolejnym rodzajem jest test kanapkowy ELISA (*Double Antibody Sandwich*-ELISA, DAS-ELISA), gdzie w pierwszym etapie swoiste przeciwciała są opłaszczane w studzienkach płytki. Niezwiązane przeciwciała są usuwane podczas płukania.

Następnie dodawany jest antygen, który reaguje z przeciwciałami. Po inkubacji i płukaniu dodawane jest drugie przeciwciało znakowane enzymem, które wiąże się z unieruchomionym antygenem. Po dodaniu odpowiedniego substratu uzyskuje się reakcję barwną. Szybkość tworzenia barwnego produktu jest proporcjonalna do ilości antygenu (21). W metodzie TAS-ELISA (ang. *Triple Antibody Sandwich*-ELISA) mamy dodatkowe antyprzeciwciało połączone z enzymem (45, 130).

Test kompetencyjny stosowany jest do wykrywania i oznaczania ilościowego antygenów i przeciwciał, które są dostępne w formie oczyszczonej lub wysoce oczyszczonej. Może być przeprowadzany w dwóch wariantach: jako test „z wyłapywaniem antygenu" lub „z wyłapywaniem przeciwciała". W teście tym wykorzystuje się mieszankę znakowanego antygenu lub przeciwciała, które są dodawane do materiału badanego. Aby dokonać pomiaru stężenia przeciwciał, fazę stałą opłaszcza się odpowiednim antygenem. Następnie na fazę stałą działamy mieszanką badanej surowicy i specyficznego względem danego antygenu przeciwciała monoklonalnego wyznakowanego enzymem. Wówczas następuje współzawodnictwo pomiędzy przeciwciałami w surowicy a przeciwciałami wyznakowanymi. Nieznakowane przeciwciała, obecne w surowicy, będą obniżały proporcjonalnie ilość znakowanych przeciwciał wiązanych przez antygeny połączone z fazą stałą.

Poza wymienionymi rodzajami testu ELISA istnieje jeszcze wiele modyfikacji tej metody, jednakże zasada działania jest podobna.

Test ELISA jest obecnie stosowany na szeroką skalę, umożliwiając wykrywanie i identyfikację wirusów wielu gatunków roślin, w tym tytoniu. Jedną z głównych chorób wirusowych u tytoniu, powodującą brunatną nekrozę nerwów liści, jest wirus Y ziemniaka (PVY). Brunatna nekroza nerwów liści tytoniu jest chorobą o dużym znaczeniu gospodarczym. Pojawianie się nowych izolatów wirusa, zdolnych do przełamywania odporności tytoniu, skłania do poszukiwania źródeł odporności pośród dzikich gatunków rodzaju *Nicotiana*. W IUNG-PIB w Puławach do badań użyto sześciu izolatów należących do trzech grup: PVY^{NW}, PVY^{NZ} i PVY^{NTN} różniących się charakterystyką serologiczną i zdolnością przełamywania różnych źródeł odporności. Rośliny zakażano metodą inokulacji w warunkach szklarniowych. Prowadzono systematyczne obserwacje objawów chorobowych oraz wykonano testy DAS-ELISA, z użyciem dwóch rodzajów przeciwciał (PVY, PVY^{N}). Badane gatunki uległy porażeniu w różnym stopniu, w zależności od użytego izolatu, wykazując zróżnicowane objawy chorobowe i ich nasilenie oraz zróżnicowane wartości testu ELISA (57). Wirus Y ziemniaka (PVY) jest również jednym z najgroźniejszych wirusów występujących w uprawach ziemniaka. Może porażać także uprawy pomidora, papryki, bakłażana. Objawy na ziemniaku mogą obejmować np. mozaikę widoczną na liściach, drobne lub duże nekrotyczne plamy na liściach, nekrotyczne smugi wzdłuż ogonków liściowych, czy zamieranie całych roślin. Izolaty PVY zgromadzone w kolekcji IHAR-PIB w Młochowie zostały przebadane testem DAS-ELISA. W prowadzonych doświadczeniach wykorzystano tytoń (*N. tabacum*) odmianę 'Samsun'; pomidora (*Solanum lycopersicum*) odmiany:

'Rutgers', 'Malinowy Ożarowski', typ Bawole Serce; paprykę (*Capsicum annuum*) odmiany: 'Alexander' i 'Rokita' jako indykatory. Rośliny zakażano wirusem metodą sztucznej inokulacji. Rośliny badano serologicznie oraz obserwowano objawy. Rośliny wykorzystywane były także do namnażania izolatów do dalszych badań Do wykrywania izolatów użyto surowicę typu PVY wykrywającą wszystkie izolaty wirusa Y ziemniaka. Do różnicowania izolatów wykorzystano dwie surowice monoklonalne, pierwszą typu PVY $^{O/C}$ wykrywającą izolaty o genie płaszcza typu PVY^{O} lub PVY^{C} oraz typu PVY ^{N} wykrywającą izolaty o genie płaszcza typu PVY^{N} lub PVY^{NA} (83).

Duże zagrożenie dla upraw tytoniu, jak również innych gatunków z rodziny *Solanaceae,* stanowi wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) oraz wirus mozaiki tytoniu (TMV). Zastosowanie metod serologicznych pozwala z jednej strony wskazać rośliny podatne (150), jak również poszukiwać nowych źródeł odporności. W tym celu dokonano sztucznej inokulacji dzikich gatunków *Nicotiana* zgromadzonych w kolekcji IUNG-PIB, a następnie poszukiwano gatunków nie wykazujących objawów i wolnych od wirusa, które mogłyby posłużyć w hodowli odpornościowej (dane niepublikowane).

N. tabacum służy również jako roślina kontrolna przy wykrywaniu wirusów w innych gatunkach roślin. Gatunek ten stanowił roślinę wskaźnikową zastosowaną do wykrywania wirusa mozaiki ogórka (ang. *Cucumber moscaic virus*, CMV) u pelargonii metodą DAS-ELISA. Wyniki testu wykazały pozytywne reakcje na przeciwciała CMV, zarówno u pelargonii, jak i tytoniu (162). Zastosowana metoda DAS-ELISA wykonana została z wykorzystaniem poliklonalnego przeciwciała dla nepowirusów ToRSV (ang. *Tomato ringspot virus*), TRSV (ang. *Tobacco ringspot virus)* i ArMV (ang. *Arabis mosaic virus*) w celu wykrycia ich u roślin ozdobnych (80). *N. tabaccum* L. 'Samsun' posłużyła jako roślina wskaźnikowa w wykrywaniu wirusa TMV infekującego fiołka afrykańskiego (*Saintpaulia ionantha*). Użyto koniungatu IgG (anti-TMV) znakowanego peroksydazą. Reakcję uwidoczniono przy zastosowaniu substratu σ-fenylodiaminy (OPD) (171). Natomiast test ACP-ELISA z użyciem poliklonalych przeciwciał wykorzystano do wykrycia wirusa AMV (ang. *Alfalfa mosaic virus*) u roślin pastewnych. Kontrolę pozytywną stanowiły rośliny *N. glutinosa* oraz *N. tabaccum* 'Samsun' NN i *N. tabacum* 'White Burley', gdzie w przypadku tytoniu szlachetnego poziom adsorbancji był wysoki dla wszystkich izolatów wirusa AMV (131).

Testy ELISA, szeroko rozpowszechnione, niekiedy są niewystarczające i wówczas są wspomagane lub zastępowane przez metody molekularne. Wiąże się to z możliwością wystąpienia reakcji krzyżowej między blisko spokrewnionymi wirusami, co uniemożliwia jednoznaczną identyfikację patogena metodami serologicznymi. Ponadto markery molekularne są znacznie czulszą metodą wykrywania wirusów niż testy ELISA (137).

Metody molekularne – markery odporności

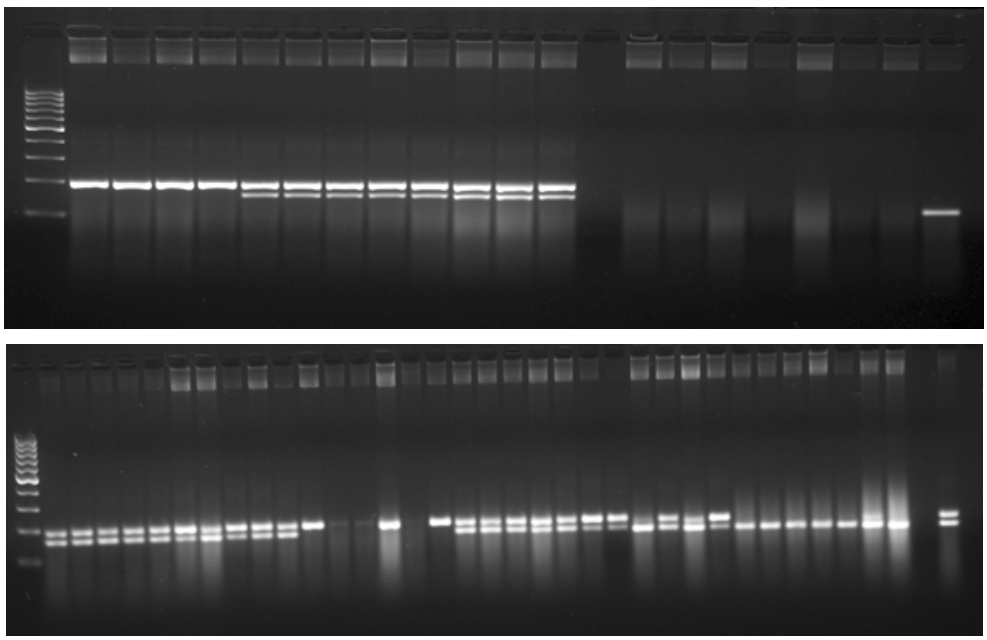
Tworzenie nowych odmian tytoniu o ulepszonym genotypie wymaga monitorowania odporności na czynniki infekcyjne. Metody biologiczne, czyli obserwacja zewnętrznych objawów choroby, czy metody serologiczne nie zawsze pozwalają na prawidłową diagnozę, dlatego w takich przypadkach najskuteczniejsze i niezawodne okazują się metody biologii molekularnej. Uzyskiwanie nowych, odpornych odmian tytoniu metodami klasycznej hodowli może być znacznie przyspieszone dzięki nowoczesnym metodom biologii molekularnej, m.in. poprzez poszukiwanie markerów odporności na choroby. W części „Markery molekularne roślin i patogenów" zostały wymienione i szczegółowo scharakteryzowane najważniejsze grupy markerów, natomiast tutaj będą omówione markery związane z odpornością na choroby.

Markery molekularne roślin, ściśle powiązane z genami odporności, pozwalają na szybkie i precyzyjne określenie występowania genetycznych podstaw odporności w roślinie i wykluczenie ze wstępnych badań osobników, które takich czynników nie posiadają. Proces poszukiwania markerów molekularnych sprzężonych z genami, np. odporności na daną chorobę lub z QTL (ang. *quantitative trait loci, loci* cech ilościowych) warunkującymi inne cechy, jest bardzo czasochłonny i wymaga zarówno wiedzy z zakresu biologii molekularnej, genetyki jak i bioinformatyki. Jedną ze strategii jest wykrywanie markera z wykorzystaniem map genetycznych i analiza potomstwa powstałego z krzyżowań linii homozygotycznych o różnych wartościach danej cechy. W tym celu wyprowadzane są tzw. linie blisko izogeniczne, różniące się jedynie allelami w *locus* danej cechy lub, co jest częściej praktykowane i szybsze, prowadzona jest analiza zbiorczych prób segregantów (BSA, ang. *bulk segregant analysis*). Analiza BSA opiera się na otrzymaniu mieszańca F_2 z krzyżowania linii, które różnią się pod względem danej cechy, a następnie wytypowaniu dwóch grup skrajnych po 20 osobników. Następnie prowadzona jest analiza DNA i typowanie markerów identyfikujących różnice między DNA segregantów. Skrajne fenotypy posiadają przeciwstawne allele w *locus* warunkującym daną cechę oraz w *loci* silnie z nim sprzężonymi, oraz te same allele w pozostałych *loci*. Do innych wykorzystywanych strategii należy mapowanie asocjacyjne (ang. *association mapping*), poszukiwanie genu kandydującego (GC) lub bezpośrednie badanie sekwencji dzięki wykorzystaniu automatycznego sekwencjonowania DNA. W poszukiwaniu markerów związanych z odpornością na różne choroby, ale też z innymi ważnymi cechami użytkowymi, powszechnie wykorzystywane są techniki takie jak: AFLP, RAPD, RFLP, SSR czy SSAP. Do tej pory odnaleziono wiele markerów odporności głównie opierając się na technice RAPD, np. związanych z czynnikiem odporności na czarną zgniliznę korzeni (6), z dominującym genem „*Ph*" niosącym odporność na czarną zgniliznę podstawy łodygi (96), czy z genem „*Va*" warunkującym częściową odporność na nekrotyczny szczep wirusa PVY. W ostatnim przypadku zamplifikowano dziesięć markerów polimorficznych pomiędzy podatną linią BY4, a odporną linią F_{55}, za pomocą pojedynczych i pod-

wójnych starterów użytych w 3500 różnych kombinacji. Markery te okazały się być silnie sprzężone z *locus* genu warunkującego odporność na PVY i dzięki temu pozwoliły na szybszą selekcję roślin odpornych (142). Technikę AFLP zastosowano natomiast do poszukiwania genów odporności na bakterię *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, atakującą m.in. tytoń. Uzyskano 117 markerów AFLP polimorficznych między odporną linią W6, a odmianą podatną, używając 3072 różnych kombinacji starterów. Markery te następnie były analizowane w liniach podwojonych haploidów powstałych z mieszańców osobników podatnych i odpornych, a na ich podstawie sporządzono mapy wzajemnych sprzężeń. Ostatecznie zidentyfikowano 15 markerów związanych z odpornością na chorobę (141). T o n g i i n. w roku 2012 (178) poszukiwali QTL (*loci* cech ilościowych) związanych z odpornością na chorobę grzybową – brunatną suchą plamistość liści tytoniu, wywoływaną przez *Alternaria alternata*. W tym celu otrzymali mieszańce F_2 z krzyżowania linii, które różnią się daną cechą, w tym wypadku podatnością na alternariozę, a następnie skonstruowali mapy genetyczne na podstawie markerów SSR. Rezultatem badań było zmapowanie 3 QTL związanych z odpornością.

Markery AFLP, RAPD, RFLP, SSR czy SSAP zwykle jednak nie sprawdzają się w badaniach selekcyjnych prowadzonych na szeroką skalę, w których liczy się prostota, szybkość i niski koszt. W badaniach selekcyjnych techniki takie jak RAPD czy AFLP służą do wytypowania charakterystycznych fragmentów DNA, które są amplifikowane z największą częstotliwością, a następnie na ich podstawie projektowane są specyficzne startery. Zwykle markery RFLP zamieniane są w markery STS, a markery RAPD, AFLP, SSAP w markery SCAR lub CAPS. Markery **SCAR,** czyli sekwencyjnie charakteryzowany amplifikowany region (ang. *sequence characterized amplified region,* SCAR), odznaczają się wysoką specyficznością, dobrą powtarzalnością i pozwalają wiarygodnie wykrywać polimorfizmy w badanym *locus*. W przeciwieństwie do markerów RAPD czy AFLP, które mogą być niestabilne i występować ze zbyt niską częstotliwością jeśli badania dotyczą większego materiału hodowlanego, markery SCAR idealnie nadają się do hodowli odpornościowej i prowadzania prac selekcyjnych. Przewaga markerów SCAR nad markerami RAPD wynika z tego, że są one kodominujące, wykrywają pojedyncze *locus*, są identyfikowane w żelu jako wyraźne prążki, są mniej wrażliwe na warunki reakcji oraz odznaczają się większą powtarzalnością. Markery RAPD i AFLP można zamienić w marker SCAR przez wycięcie prążka z żelu, oczyszczenie DNA, wklonowanie w odpowiedni wektor, a następnie zsekwencjonowanie i zaprojektowanie specyficznych starterów. Markery RAPD łatwo zamienić w markery SCAR, ponieważ fragmenty DNA są wielkości od 500 do 1500 bp (8), natomiast markery AFLP, które są wielkości 150-300 bp, należy izolować razem z regionami flankującymi (164). Specyficzne markery SCAR na podstawie markerów AFLP, opracowano m.in. dla genów odporności na mączniaka rzekomego tytoniu (wywoływany przez *Peronospora tabacina*), czarną zgniliznę korzeni (wywoływany przez *Thielaviopsis basicola*) i brunatną nekrozę nerwów liści

(wywoływany przez PVY). Markery AFLP generowano z wykorzystaniem 92 genotypów *N. tabacum* L. należących do różnych typów tytoniu. Stosując 11 kombinacji starterów otrzymano 33 polimorficzne fragmenty, które posłużyły do skonstruowania dendrogramów. Po ich analizie wyłoniono 7 fragmentów DNA związanych z trzema różnymi odpornościami: dwa fragmenty związane z odpornością na mączniaka rzekomego tytoniu pochodzącą od *N. debneyi* Domin, dwa z genem *Va* z odpornością na PVY oraz trzy fragmenty powiązane z odpornością na czarną zgniliznę korzeni pochodzącą od *N. debneyi* (97). M o o n i N i c h o l s o n w roku 2007 (136) opracowali 3 markery AFLP SCAR służące do szybkiej i wiarygodnej selekcji genotypów tytoniu niosących gen odporności na brązową plamistość pomidora (TSWV), pochodzący od odmiany 'Polalta'. Podatną na TSWV odmianę 'K326' skrzyżowali z odporną odmianą 'Polalta', a następnie, posługując się techniką AFLP oraz analizą zbiorczych prób segregantów, wyłonili markery sprzężone z genem odporności. Przykładem wykorzystania tych markerów są prace hodowlane nad uzyskaniem haploidalnych genotypów tytoniu, łączących w sobie odporność na *Thielaviopsis basicola* i *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Markery umożliwiają szybki screening roślin odpornych (182) (rys. 12).



Rys. 12. Analiza produktów amplifikacji metodą PCR markerów AFLP SCAR związanych z genem odporności na TSWV u tytoniu w żelu agarozowym.

Źródło: fot. K. Kursa, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

Markery CAPS (ang. *cleaved amplified polymorphic sequences*) to trawione amplifikowane sekwencje polimorficzne. Na początku amplifikuje się sekwencje DNA,

które wcześniej zostały zmapowane i zsekwencjonowane przy użyciu starterów o unikatowych sekwencjach i w ten sposób uzyskuje się markery STS. Pary starterów są zazwyczaj tak dobierane, aby produkty PCR zawierały introny, ponieważ to zwiększa szanse na znalezienie polimorfizmu. Następnie uzyskane produkty PCR poddawane są trawieniu enzymami restrykcyjnymi i uzyskuje się wzory prążków. Inna nazwa tej metody to PCR-RFLP (105). Dzięki tym markerom możliwe jest ominięcie etapu blottingu DNA i hybrydyzacji przy użyciu sond molekularnych, które występują w technice RFLP (104). Markery CAPS są kodominujące, specyficzne względem danego *locus* i pozwalają na rozróżnienie roślin homozygotycznych od heterozygotycznych dla danej pary alleli (105). Przekształcenie markera RFLP w marker STS polega na zsekwencjonowaniu fragmentu RFLP i zaprojektowaniu pary specyficznych starterów. Kiedy po rozdziale w żelu, brak jest wyraźnego zróżnicowania długości fragmentów DNA uzyskanych w reakcji PCR, można konwertować marker STS w marker CAPS przez trawienie enzymami restrykcyjnymi.

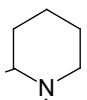
Metody analityczne – klucz do rozwoju produkcji rolniczej

Istotną cechą określającą jakość tytoniu jest skład chemiczny jego liści. Odmienna zawartość związków chemicznych w surowcu powoduje, że ma on zróżnicowane przeznaczenie użytkowe. Podobnie jak smak czy aromat, bogaty skład związków w liściach zależy w dużej mierze od odmiany tytoniu oraz sposobu jego uprawy – siedliska, przebiegu pogody, sposobu zbierania, suszenia i preparowania liści (156). Na zmiany zawartości poszczególnych substancji chemicznych w surowcu mają także wpływ infekcje roślin powodowane przez patogeny (bakterie, grzyby, wirusy). Przekierowują one metabolizm komórkowy, co bezpośrednio modyfikuje skład surowca, powodując powstawanie niepożądanych związków (183). Największy problem stanowią wirusy, ponieważ chemiczne ich zwalczanie jest nieskuteczne. Jedyne sposoby walki z nimi to usuwanie wektorów i stosowanie odmian odpornych (58).

Najważniejszymi związkami chemicznymi tytoniu są alkaloidy. Jest to grupa związków występująca głównie w roślinach w postaci soli kwasów organicznych. W swojej budowie zawierają układ cykliczny z co najmniej jednym atomem azotu. Wykazują właściwości zasadowe i mają silne działanie fizjologiczne na organizmy ludzkie i zwierzęce. W ich budowie chemicznej możemy wyróżnić:

pierścień pirydynowy (wszystkie alkaloidy tytoniu)

pierścień piperydynowy (anabazyna, anatabina)



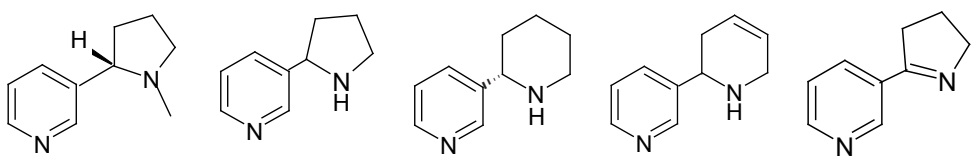
pierścień pirolidynowy (nikotyna, nornikotyna, miozmina)

Pierścień pirydynowy pochodzi z kwasu nikotynowego, dlatego wszystkie alkaloidy tytoniu możemy zaliczyć do pochodnych tego kwasu (50). Geneza pierścienia drugiego – piperydynowego, pozwala nam zaliczyć je do pochodnych lizyny, bądź ornityny, ponieważ pierścień ten powstaje w wyniku cyklizacji i dekarboksylacji tych związków. Natomiast pierścień trzeci – pirolidynowy powstaje w podobny sposób, ale z ornityny, proliny lub kwasu glutaminowego (143).

Najważniejszym alkaloidem tytoniu jest nikotyna. Produkowana jest ona przede wszystkim w korzeniach i wraz ze wzrostem rośliny transportowana ksylemem do pozostałych jej części. Alkaloid ten należy do silnych neurotrucizn. Dawka śmiertelna nikotyny zawiera się w granicach 40-60 mg (91). Jest odpowiedzialna za uzależnienie od produktów tytoniowych, ale także coraz częściej wykorzystywana jako substancja wspierająca walkę z różnymi chorobami (nocny bezdech, zespół Touretta i zaburzenia koncentracji) (11). W małych dawkach pobudza układ nerwowy, podwyższa ciśnienie tętnicze, a w większych zaburza oddech i pracę serca. Dodatkowo wykazuje właściwości napotne, moczopędne, wymiotne i wykrztuśne (135). Indianie stosowali ją jako środek leczniczy o działaniu przeciwbólowym, przeciwrobaczym, rozkurczającym, łagodzącym ukąszenia owadów i węży (134).

Absorpcja nikotyny zmienia się wraz ze zmianą pH wchłanianego przez palacza dymu tytoniowego – przy pH=5,84 zostaje pochłonięty jedynie 1% nikotyny, natomiast w pH=7,99 następuje wzrost wartości absorpcji tego alkaloidu do 59% (102). O odczynie dymu decyduje między innymi zawartość cukrów w liściach, na co z kolei ma wpływ proces suszenia surowca. Im wolniej są suszone liście tytoniu, tym większa w nich strata cukrów, i tym bardziej alkaliczny jest odczyn dymu. Zwiększanie absorpcji nikotyny przez organizm człowieka, pojawia się także, podczas konsumowania produktów tytoniowych wraz z napojami alkoholowymi (102).

Oprócz nikotyny, tytoń zawiera także takie alkaloidy jak: nornikotyna, anabazyna, anatabina, miozmina, tzw. alkaloidy wtórne (rys. 13).



Rys. 13. Budowa wybranych alkaloidów

Ich stężenie nie jest już tak wysokie, jak stężenie nikotyny. Ilość nornikotyny waha się w granicach 3-5% całkowitej zawartości alkaloidów tytoniowych, podczas gdy nikotyna stanowi ich 90% (34). Główne badania chemiczne skierowane są głównie na określenie zawartości nikotyny i nornikotyny w materiale roślinnym. Dzieje się tak, ponieważ większa zawartość nikotyny powoduje wzrost jakości tytoniu, natomiast

duże stężenie nornikotyny – obniża tę jakość. Warto wspomnieć, że procentowe zawartości alkaloidów, mogą znacznie się różnić między poszczególnymi gatunkami (tab. 3):

- *N. rustica* L. może zawierać 5-8 razy więcej nikotyny niż *N. tabacum* (102);
- *N. glauca* zawiera dużo większe stężenie anabazyny niż nikotyny, inaczej niż pozostałe odmiany *Nicotiana* (188);
- ciemny tytoń Burley może zawierać nawet 10 razy mniej nikotyny niż inne odmiany *N. tabacum* (36).

Tabela 3

Zawartości poszczególnych alkaloidów w różnych gatunkach i odmianach tytoniu

	Stężenie alkaloidów				
Nazwa	NIKOTYNA [%]	NORNIKOTYNA [ppm]	ANABAZYNA [ppm]	ANATABINA [ppm]	NORNIKOTYNA/ NIKOTYNA [%]
Nicotiana occidentalis	<0,02	210	84	67	94
Nicotiana glauca	<0,02	140	4800	130	65
Nicotiana rustica	0,42	180	54	140	4,2
Nicotiana maritima	<0,02	220	84	86	100
Nicotiana gossei	0,29	5600	52	250	200
'PBD6'	0,37	99	<20	140	2,7
'VTA'	0,098	<50	<20	<50	-
'VAM'	0,123	<50	<20	<50	-
'VRG2'	0,29	80	<20	120	2,8
'VRG5'	2,3	1400	160	1600	6,2
'TN86'	0,191	70	<20	77	3,6
'Wiślica'	0,35	140	<20	220	4

Źródło: Kursa, wyniki nieopublikowane.

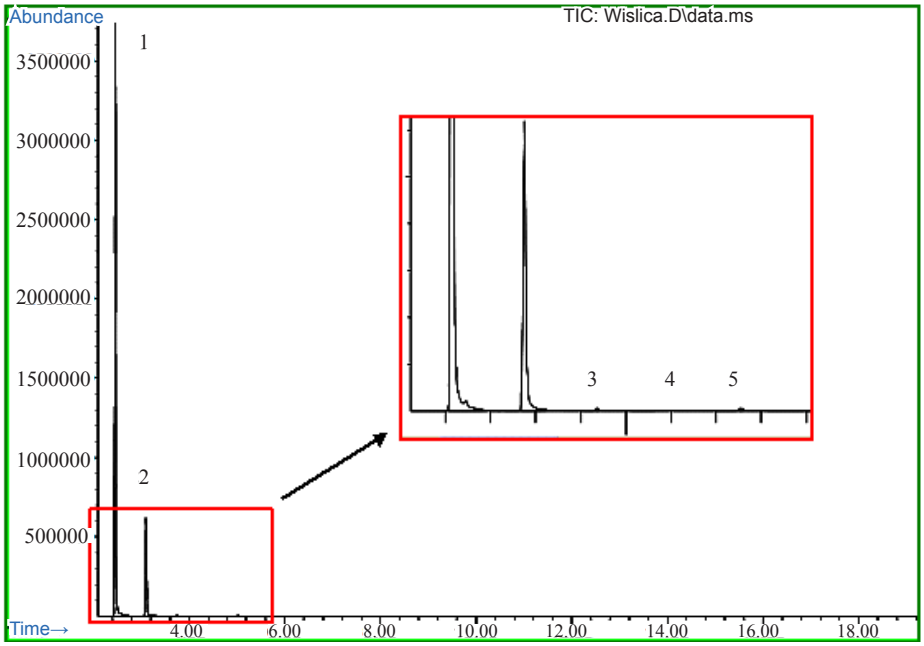
Niestety, wysoka zawartość alkaloidów wtórnych powoduje znaczną redukcję cukrów w surowcu. Dodatkową wadą takich roślin jest to, że w czasie zbioru wykazują niższą zawartość chlorofilu w liściach. Cecha ta objawia się intensywnym, żółtym zabarwieniem, co niekorzystnie wpływa na walory wizualne surowca (36).

Rośliny, które gromadzą nikotynę jako ich elementarny alkaloid nazywane są „niekonwerterami" (*nonconverters*), natomiast te, które znaczną część tego al-

kaloidu przekształcają w nornikotynę, to „konwertery" (*converters*). Proces formowania (konwersji) nornikotyny z nikotyny, polega na oksydacyjnej N-demetylacji i katalizowany jest przez gen – *CYP82E4*, który ulokowany jest w starzejących się liściach. Jego budowa molekularna nie jest jeszcze jednoznacznie poznana, ale wiadomo, że jest to nietrwały, zmienny *locus* pochodzący z *N. tomentosiformis*. Prawdopodobieństwo, że to właśnie ten gen jest odpowiedzialny za proces konwersji, naukowcy tłumaczą silną korelacją pomiędzy aktywnością genu *CYP82E4*, a zawartością nornikotyny. Aktywność ta jest szczególnie wzmożona w trakcie procesu starzenia się liści. W tym samym czasie znacznie wzrasta stężenie wyżej wymienionego alkaloidu wtórnego. Z tego też powodu uważa się, że *CYP82E4* odgrywa kluczową rolę w procesie przemiany nikotyny w nornikotynę u tytoniu. W zielonych częściach roślin nornikotyna występuje w niewielkiej ilości, a jej obecność najprawdopodobniej warunkowana jest aktywnością genu *CYP82E5v2*, który jest odpowiednikiem *CYP82E4* (34).

Skład chemiczny tytoniu można badać między innymi, przy pomocy chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC–MS) (49). Jest to jedna z najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej. Przy jej pomocy można analizować substancje mające w warunkach analizy postać gazów. GC polega na separowaniu analizowanych związków chemicznych na kolumnie chromatograficznej. Rozdzielenie tych składników jest wynikiem różnego ich podziału między fazę ruchomą (gaz nośny) i nieruchomą (wypełnienie kolumny) układu chromatograficznego. Różny rozdział składników mieszaniny pomiędzy obie fazy, powoduje zróżnicowanie prędkości migracji, a w konsekwencji separację składników. Po rozdzieleniu mieszaniny na kolumnie chromatograficznej, poszczególne cząsteczki są jonizowane w spektrometrze mas. Tam rozpadają się na charakterystyczne fragmenty, które mają właściwy dla nich stosunek masy do ładunku (m/z) i są separowane w polu magnetycznym. Zebrane widma masowe porównywane są najczęściej ze znanymi widmami masowymi znajdującymi się w bibliotece.

Analiza materiału metodą GC-MS, pozwala zatem określić jakość zawartych w surowcu związków. Podstawą tej oceny jest sprawdzenie położenia piku na chromatogramie – weryfikacja czasu retencji. Czas ten jest wielkością stałą i charakterystyczną dla określonej substancji w danych warunkach prowadzonego procesu (typ i wypełnienie kolumny, rodzaj gazu nośnego i jego przepływ oraz program temperaturowy). Oprócz analizy jakościowej, możliwe jest także wykonanie oznaczenia ilościowego. O ilości związku w mieszaninie możemy wnioskować na podstawie wysokości i powierzchni odpowiadającego mu piku. Ponieważ wartość wysokości piku stosujemy tylko wtedy, kiedy pik jest wąski i symetryczny (co w praktyce jest rzadkością), dlatego też dużo częściej do analizy ilościowej wykorzystujemy pole jego powierzchni. Istota tego oznaczenia polega na porównaniu wielkości piku badanego związku, z wielkością piku substancji wzorcowej o znanym stężeniu (metoda dodatku wzorca zewnętrznego lub wewnętrznego) (190) (rys. 14 i 15).



Rys. 14. Chromatogram przedstawiający analizę alkaloidów tytoniowych 'Wiślicy' przy zastosowaniu dodatku wzorca wewnętrznego (1 – IS - chinolina):
2 – nikotyna, 3 – nornikotyna, 4 – anabazyna, 5 – anatabina

Źródło: Kursa, wyniki nieopublikowane.

```
Quant Title  : nikotyna
QLast Update : Tue Jul 03 09:09:48 2012
Response via : Initial Calibration

        Compound                  R.T. QIon  Response  Conc Units Dev(Min)
-------------------------------------------------------------------------
Internal Standards
  1) chinolina                   2.458  102 11301533     0.40 mg/ml     0.00

Target Compounds                                                   Qvalue
  2) nikotyna                    3.099   84  8139394     1.06 mg/ml      99
  3) nornikotyna                 3.744   70    51480     0.06 mg/ml      92
  4) anabazyna                   4.594   84    45701     0.02 mg/ml#     17
  5) anatabina                   5.019  105    85086     0.10 mg/ml      99
-------------------------------------------------------------------------

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed
```

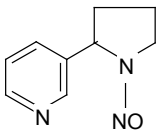
Rys. 15. Raport ilościowy alkaloidów w 'Wiślicy'

Źródło: Kursa, wyniki nieopublikowane.

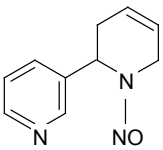
Ważną cechą tej metody analitycznej jest jej szybkość oraz fakt, że może ona być stosowana dla surowca nieprzetworzonego (surowych liści tytoniu) oraz tego pobranego z produktu końcowego (papierosy, snusy).

Poza obecnymi w liściach tytoniu alkaloidami, ogromne znaczenie dla zdrowia człowieka ma także występowanie w nich N-nitrozoamin:

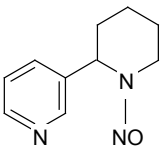
N-nitrozonornikotyna (NNN)



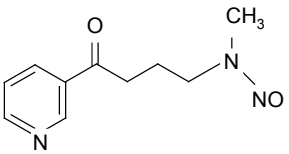
N-nitrozoanatabina (NAT)



N-nitrozoanabazyna (NAB)



4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon (NNK) (92)



W odpowiednich warunkach następuje konwersja wtórnych alkaloidów tytoniowych do bardziej szkodliwych TSNA (ang. *tobacco-specific nitrosamines*), które nie są związkami pożądanymi w surowcu (40). Powstają one przede wszystkim podczas procesu N-nitrozowania nikotyny i pozostałych alkaloidów po zebraniu liści, w trakcie ich powietrznego suszenia i fermentacji. Błona komórkowa pęka, a nieszczelne ściany komórkowe pozwalają na wymieszanie zawartości komórki oraz otwierają ją na chemiczne i egzogenne reakcje biotyczne. Azotany (V) zostają zredukowane do azotanów (III) przy udziale mikroorganizmów (53). W Instytucie Tytoniowym w Oyamie w Japonii zbadano, że najniższa zawartość TSNA w liściach jest podczas suszenia ich w stałej temperaturze 50°C. Przy 60°C ilość tych związków znacznie wzrastała, mimo że proces trwał krócej. Natomiast przy 40°C nie widać było żadnych zahamowań w procesie N-nitrozowania (63).

TSNA występują także w dymie papierosowym. Specyficzne dla tytoniu N-nitrozoaminy zostają uwolnione z papierosa podczas jego spalania. Azotyny zawarte w płynach fizjologicznych, w czasie tego procesu, w obecności katalizatora, prowadzą do endogenicznego nitrozowania amin. Ilość uwalnianych związków kancerogennych jednak nie zmniejsza się w trakcie palenia papierosa, tylko ciągle rośnie, ponieważ natychmiast na ich miejsce, w procesie pirosyntezy powstają nowe nitrozoaminy (53).

Do podwyższenia poziomu TSNA przyczynia się także nieodpowiednie przechowywanie tytoniu i jego produktów. Próbki przechowywanie w temperaturze pokojowej charakteryzują się znacznie zwiększonym poziomem nitrozoamin w porównaniu z przechowywanymi w lodówce i zamrażarce .

Specyficzne dla tytoniu N-nitrozoaminy są składnikami nie tylko suszonych liści, ale także różnych wyrobów tytoniowych, np. plastrów, gum do żucia. Jeden papieros zawiera 9-180 ng NNK, 50-500 ng NNN, 3-25 ng NAB oraz 55-300 ng NAT (53). Margines zawartości TSNA w tytoniu jest dosyć szeroki, ponieważ jest on istotnie skorelowany z ilością azotanów znajdujących się w liściu (101). Zielone liście tytoniu nie zawierają nitrozoamin (134) (tab. 4).

Tabela 4

Zawartość poszczególnych nitrozoamin w różnych gatunkach i odmianach tytoniu

	Stężenie TSNA			
Nazwa	NNN [ppm]	NAT [ppm]	NAB [ppm]	NNK [ppm]
N. occidentalis	0,02	<0,005	<0,003	<0,005
N. glauca	<0,003	<0,005	0,009	<0,005
N. rustica	0,020	0,020	<0,003	0,006
N. maritima	0,004	<0,005	0,004	<0,005
'PBD6'	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
'VTA'	<0,003	0,006	0,004	0,030
'VAM'	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
'VRG2'	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
'VRG5'	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
'TN86'	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
'Wiślica'	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005

Źródło: Kursa, wyniki nieopublikowane.

TSNA wykazują silne właściwości rakotwórcze (4, 70). Związki te są odpowiedzialne za występowanie nowotworów jamy ustnej, gardła, krtani i przełyku (87). N-nitrozonornikotyna (NNN) powoduje powstawanie złośliwych nowotworów płuc, a 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon (NNK) indukuje powstawanie gruczolaków i gruczolakoraków. Badania wykazały, że najmniej kancerogenna jest nitrozoanatabina (NAT) (53). U palaczy TSNA powodują zmianę profilu lipidowego krwi. Podwyższają zawartość frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), jednocześnie obniżając ilość frakcji lipoprotein o gęstości dużej (HDL). Zadaniem LDL jest transport cholesterolu z wątroby do tkanek, przez co wzrasta prawdopodobieństwo rozwoju miażdżycy, a także zwiększa się ryzyko choroby wieńcowej. Zmniejszenie zawartości HDL powoduje obniżenie poziomu całkowitego cholesterolu we krwi, poprzez jego transport z tkanek obwodowych i frakcji lipidowych osocza do wątroby (87). Inną funkcją nitrozoamin jest znaczne obniżenie poziomu katalazy i dysmutazy nadtlenkowej – enzymów biorących udział w niwelowaniu wpływu wolnych rodników na organizm człowieka oraz podwyższenie stężenia dialdehydu malonowego – wskaźnika oksydacyjnego uszkodzenia komórek (102).

Określenie składu chemicznego surowca jest niezmiernie ważne, wpływa on bowiem zdecydowanie na jakość wyrobów tytoniowych. Zagadnienie to jest także bardzo istotne dla producentów, którzy wymagają roślin zdrowych, charakteryzujących się szlachetną jakością oraz obfitym plonowaniem.

Podsumowanie

Kierunki prac hodowlanych nad tytoniem wyznaczane są przede wszystkim zapotrzebowaniem przemysłu na surowiec o dobrych cechach jakościowych. Niemniej ważne jest dostarczenie rolnikom odpornych odmian, zapewniających stabilne plonowanie i tym samym decydujących o opłacalności produkcji. Tradycyjne metody hodowli są długotrwałe i pracochłonne. Trudności te są stopniowo przezwyciężane dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod i technik biotechnologicznych, które zostały dokładnie omówione w powyższym rozdziale. Zestawienie metod tradycyjnych z nowoczesnymi wpływa znacząco na postęp w pracach hodowlanych i daje szansę na uzyskanie ulepszonych genotypów tytoniu, zarówno pod względem właściwości rolniczych, jak i jakości surowca. Podsumowując, połączenie nauki i praktyki pozwala osiągnąć zamierzone cele w sposób bardziej celowy, szybszy i dający lepsze rezultaty.

Literatura

1. Agarwal M., Shrivastava N., Padh H.: Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Rep., 2008, **27**: 617-631.
2. Almeida A. M., Villalobos E., Araújo S. S., Leyman B., Van Dijck P., Alfaro-Cardoso L., Fevereiro P. S., Torné J. M., Santos D. M.: Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. Euphy., 2005, **146**: 165-176.
3. Anderson E. J., Stark D. M., Nelson R. S., Tumer N. E., Beachy R. N.: Transgenic plants that express the coat protein gene of TMV or AMV interfere with disease development of non related viruses. Phytopath., 1989, **12**: 1284-1290.
4. Andra S. S., Marris K. C.: Tobacco-specific nitrosamines in water: An unexplored environmental health risk. Environment International, 2011, **37**: 412-417.
5. Atanassov I. I., Atanassova S. A., Dragoeva A. I., Atanassov A. I.: A new CMS source in *Nicotiana* developed via somatic cybridization between *N. tabacum* and *N. alata*. Theor. Appl. Genet., 1998, **97**: 982-985.
6. Bai D., Reeleder R., Brandle J. E.: Identification of two RAPD markers tighly linked with the *N. debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco. Theor. Appl. Genet., 1995, **91**: 1184-1189.
7. Bardakci F.: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk. J. Biol., 2001, **25**: 185-196.
8. Barret P., Delourne R., Foisset N., Renard M.: Development of a SCAR (sequence-characterized amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus*. L. Theor. Appl. Genet., 1998, **97**: 828-833.
9. Batchvarova R., Nikolaeva V., Slavov S., Bossolova S., Valkov V., Atanasova S., Guelemerov S., Atanassov A., Anzai H.: Transgenic tobacco cultivars resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Theor. Appl. Genet., 1998, **97**: 986-989.

10. B e l o g r a d o v a K., L e w i c k a I., H e b e r l e - B o r s E., T o u r a e v A.: An overview on tobacco doubled haploids.In: Touraev A.: Advances in haploid production in higher plants, Springer-Science+Business Media B.V., 2009, chapter 5.
11. B e n o w i t z N. L.: Pharmacology of nicotine: Addiction and Therapeutics. Annual Rev. Pharmacol. Toxicol. 1996, **36**: 597-613.
12. B e r b e ć A., D o r o s z e w s k a T.: Formy tetraploidalne dzikich gatunków *Nicotiana* uzyskane w Zakładzie Hodowli i Uprawy Tytoniu IUNG w Puławach. Pam. Puł., 1991, **99**: 195-204.
13. B e r b e ć A., L a s k o w s k a D.: Investigations of isogenomic alloplasmics of Flue-cured tobacco *Nicotiana tabacum* cv. Wiślica. Beiträge zur Tobakforschung International. Contributions to Tobacco Research, 2005, **21(5)**: 258-263.
14. B e r b e ć A.: Agrotechnika mieszańcowych odmian tytoniu Virginia. Instrukcja upowszechnieniowa nr 179, IUNG-PIB, Puławy, 2011.
15. B e r b e ć A.: Chromosome pairing and pollen fertility in the interspecific F_1 hybrids *Nicotiana tabcaum* L.× *N. benavidesii* Goodspeed, *N. knightiana* Goodspeed × *N. tabacum*, and *N. raimondii* Macbride × *N. tabacum*. Genetica Polonica, 1987, **28(3)**: 263-269 .
16. B e r b e ć A.: Cytologiczne morfologiczne i użytkowe właściwości alloplazmatycznych form tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum* L. z cytoplazmą gatunków *N. knightiana* Goodspeed oraz *N. raimondii* Macbride. Rozprawa Habilitacyjna, IUNG, Puławy, 1994.
17. B e r b e ć A.: Kolekcja alloplazmatycznych cytoplazmatycznie męskojałowych form tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 1998, **463**: 51-61.
18. B e r b e ć J., B e r b e ć A.: Growth and development of *Nicotiana tabacum* L. form reconstituted on the cytoplasm of *Nicotiana glauca*. Grah. Genetica Polonica, 1976, **17(3)**: 309-318
19. B e r b e ć J., B e r b e ć A.: Męska jałowość u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) uzyskana drogą jednoetapowego podstawienia cytoplazmy gatunku *Nicotiana eastii*. Kostoff. Pam. Puł., 1992, **100**: 135-139.
20. B e r b e ć J.: A cytoplasmic male sterile mutant from of *Nicotiana tabacum* L. Z. Pflzucht., 1974, **73**: 204-216.
21. B e r g J. M., T y m o c z k o J. L., S t r y e r L.: Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009.
22. B e r g m a n P., E d q v i s t J., F a r b o s I., G l i m e l i u s K.: Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial atp1 transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. Plant Molecular Biology, 2000, **42**: 531-544.
23. B i n d l e r G., P l i e s k e J., B a k a h e r N., G u n d u z I., I v a n o v N., V a n d e r H o e v e n R., G a n d a l M., D o n i n i P.: A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. Theor. Appl. Genet., 2011, **123**: 219-230.
24. B o l s u n o v I.: New *Nicotiana* amphidiploid as a valuable starting material for the control of virulent blue-mold lines. Int. Tob. Sci. Congr. Sth Hamburg Proc., 1971, **160**.
25. B u d a r F., P e l l e t i e r G.: Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. Life Science, 2001, **324**: 543-550.
26. B u r k L. G., G e r s t e l D. U., W e r s m a n E. A.: Maternal haploids of *Nicotiana tabacum* L. Science, 1979, **206**: 585.
27. B u r k L. G., H e g g e s t e d H. E.: The genus *Nicotiana*. A source of resistance to diseases of cultivated tobacco. Econ. Bot., 1966, **20(1)**: 76-88.
28. B u r k L. G., N e a s M. O.: 4n *N. tabacum* × *N. nudicaulis*. A colchicines induced tetraploid hybrid. Tob. Sci., 1966, **10**: 65-66.
29. B u r k L. G.: An interspecific bridge-cross: *Nicotiana repanda* through *N. sylvestris* to *N. tabacum*. J. Hered., 1967, **58**: 215-218.
30. B u r k L. G.: Male sterile flower anomalies in interspecific tobacco hybrids. J. Hered., 1960, **51**: 27-31.
31. B u r k L. G.: Viable hybrids from monosomics of *N. tabacum* by *N. langsdorfii*. Tob. Sci., 1972, **16**: 43-45.

32. Carlson R. S., Smith H. H., Dearling R. D.: Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci., 1972, **69**: 2292-2294.
33. Carlsson J., Leino M., Sohlberg J., Sundström J. F., Glimelius K.: Mitochondrial regulation of flower development. Mitochondrion, 2008, **8**: 74-86.
34. Chakrabarti M., Bowen S. W., Coleman N. P., Meekins K. M., Dewey R. E., Siminszky B.: CYP82E4-mediated nicotine to nornicotine conversion in tobacco is regulated by a senescence-specific signaling pathway. Plant Mol. Biol., 2008, **66**: 415-427.
35. Chang T., Chen L., Chen S., Cai H., Liu X., Xiao G., Zhu Z.: Transformation of tobacco with genes encoding *Helianthus tuberosus agglutinin* (HTA) confers resistance to peach-potato aphid (*Myzus persicae*). Transgenic Res., 2003, **12**: 607-614.
36. Chaplin J. F., Weeks W. W.: Association between percent total alkaloids and other traits in Flue-cured tobacco. Reprinted from CROP SCIENCE, May-June 1976, **16**: 416-418.
37. Chaplin J. F.: Use of male sterile tobaccos in the production of hybryd seed. Tobacco Sci., 1962, **8**, 105-109.
38. Chaplin J. F., Mann T. J.: Interspecific hybridization, gene transfer, and chromosome substitution in *Nicotiana*. N. Carolina State Coll. Agr. Exp. Sta.Tech. Bul.,1961, **145**.
39. Chen J. F., Cui L., Malik A. A., Mbira K. G.: *In vitro* and dihaploid production via unfertilized ovule culture. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2011, **104**: 311-319.
40. Chen P. X., Qian N., Burton H. R., Moldoveanu S. C.: Analysis of Minor Alkaloids in tobacco. A Collaborative Study, Int., 2005, **21**: 369-379.
41. Clark M. F., Adams A. N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorent assay for the detection of plant viruses. J.gen Virol, 1977, **34**: 475-483.
42. Clayton E. E.: Male sterile tobacco. J. Hered, 1950, **41**: 171-175.
43. Correns C.: Die Verenbung der Geschlectformen bei den Gynodiocischen Pflanzer. Ber. Dtsch. Bot.Ges., 1909, **24**: 459-474.
44. Cossirat J. C.: Genetic diversity and varietal identification the species *Nicotiana tabacum* by RAPD markers. Annaesddll Tabacum, 1994, (Section 2), **26**, 1-7.
45. Crowther J. R.: Methods In Molecular Biology The ELISA Guidebook. 2001, **149**.
46. Czubacka A., Doroszewska T.: Estimating agronomic traits of transgenic tobacco lines. Euphy., 2010, **172**: 35-47.
47. Czubacka A., Doroszewska T.: Odporność transgenicznych linii tytoniu na wirus Y ziemniaka (PVY). Biotechnologia, 2010, **2(89)**: 72-82.
48. Czubacka A., Doroszewska T.: Uzyskiwanie transgenicznych linii podwojonych haploidów tytoniu metodą kultur tkankowych. Biotechnologia, 2004, **2(65)**: 16-24.
49. Da Graça Lourenço M., Matos A., Conceição Oliveira M.: Gas-liquid chromatographic determination of major tobacco alkaloids, J. Chromat. A, 2000, **898**: 235-243.
50. Dawson R. F.: Biosynthesis of the nicotiana alcaloids. Amer. Sc., 1960, **48**: 321.
51. de la Riva G. A., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Padro C.: *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. J. Biotech., 1998, **1**: 118-127.
52. Delon R., Pelissier B., San L. H., Borrod G., Freyssinet G.: Transgenic tobacco resistant to oxynil herbicides: five years of field experiments. Ann. Tabac., 1993, **25(2)**: 17-26.
53. Desai D., Lin G., Morimoto H., Williams P. G., El-Bayoumy K., Amin S.: Synthesis of (±) [5-^{3}H] N'-nitrosoanatabine, a tobacco-specific nitrosamine. Journal of Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals, 2002, **45**: 1133-1141.
54. Doroszewska T., Berbeć A.: Chromosome pairing and microsporogenesis in interspecific F_1 hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. J. Genet. Breed., 1996, **50**: 75-82.
55. Doroszewska T., Berbeć A.: Cytogenetical investigation of poliploid interspecific hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. J. Genet. Breed., 2000, **54**: 77-82.
56. Doroszewska T., Depta A., Czubacka A.: Album gatunków z rodzaju *Nicotiana*/ Album of *Nicotiana* species. IUNG-PIB, Puławy, 2009.

57. D o r o s z e w s k a T., D e p t a A.: Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. Phytopathologia, 2011, **59**: 9-24.
58. D o r o s z e w s k a T.: Krzyżowanie oddalone i transformacja genetyczna w uzyskiwaniu odporności tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka (PVY). Monografie i rozprawy naukowe, 2004, **9:**7-135.
59. D o r o s z e w s k a T.: Możliwości transferu czynników odporności na nekrotyczny szczep ziemniaczanego wirusa Y (PVY^{NZ}) od *Nicotiana africana* Merxm. do tytoniu uprawnego. Mat. II Kraj. Symp.: „Odporność roślin na choroby, szkodniki i niesprzyjające czynniki środowiska". IHAR Radzików, 1995: 77-79.
60. D o r o s z e w s k a T.: Przełamywanie barier nieżywotności i bezpłodności międzygatunkowych mieszańców *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana africana* Merxm. metodą kultur tkankowych. Pr. Ogr. Bot. PAN, 1994, **5/6**: 465-472.
61. D o r o s z e w s k a T.: Transfer of tolerance to different Potato virus Y (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. Plant Breed., 2010, **129(1)**: 76-81.
62. D o r o s z e w s k a T.: Uzyskanie stabilnych linii hodowlanych tytoniu z czynnikami odporności na różne izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY) od dzikiego gatunku *Nicotiana africana* Merxm. Biuletyn IHAR, 2007, **244**: 273-287.
63. D o r o s z e w s k a T.: Wtórne alkaloidy – powstawanie i wpływ na tworzenie nitrozoamin. Opracowanie dla Universal Leaf Tobacco Poland Sp. z o.o. Puławy, 2004.
64. D r a g o e v a A., A t a n a s s o v I., A t a n a s s o v A.: CMS due to tapetum failure in cybrids between *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. Plant Cell, Tissue and Culture, 1999, **55**: 67-70.
65. D u n w e l l J. M.: Embryogenesis from pollen *in vitro*. In: Biotechnology in Plant Science, Academic Press, 1985: 49-76.
66. E a s t E. M.: Studies on self-sterility. IX. The behavior of crosses between self-sterile and self-fertile plants. Genetics, 1928, **17**: 175-202.
67. E n g v a l l E., P e r l m a n n P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 1971, **8**: 871–874.
68. E n g v a l l E., P e r l m a u n P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. Immunology, 1972, **109**: 129-35.
69. E n g v a l l E.: The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clinical Chemistry, 2010, **5**: 319-320 .
70. F a n t R. V., H e n n i n g f i e l d J.E., N e l s o n R. A., P i c k w o r t h W. B.: Pharmacetico-kinetics and pharmacodynamics of moist snuff in humans. Tobacco Control, 1999, **8**: 387-392.
71. F i t t e r J., T h o m a s M. R., N i u C., R o s e R.: Investigation of *Nicotiana tabacum* (+) *N. suaveolens* cybrids with carpelloid stamens. Journal of Plant Physiology, 2005, **162**: 225-235.
72. F l e t c h e r J. T., M a c N e i l l B. H.: The identification of strains of *Tobacco mosaic virus* from tomato crops in Southern Ontario. Can J. Microbiol, 1971, **17**: 123-128.
73. F ö r s t e r H., O u d e m a n s P., C o f f e y M. D.: Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. Exp. Mycol., 1990, **14**: 18-31.
74. G a b e l m a n W. H.: Male sterility in vegetable breeding. In: Genetics in plant breeding. Brookhaven Symposia on Biology, 1956, 113-122.
75. G a m b o r g D. L, W e t t e r L. R.: Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada. Saskatoon, 1975: 22-25.
76. G e l w i n S. B.: *Agrobacterium* – mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. Microb. and Mol. Biol. Rev., 2003, **67**: 16-37.
77. G e r s t e l D. U., B u r n s L. G., B u r k L. G.: A case of cytoplasmic male sterility in *Nicotiana tabacum* and its restoration. Assoc. South. Biol. Bull., 1977, **24**: 53.
78. G e r s t e l D. U., B u r n s L. G., B u r k L. G.: Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana*, restoration of fertility, and the nucleus. Genetics, 1978, **89**: 157-169.

79. Gerstel D. U.: Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana* (A review). North Carolina Agric. Res. Service Tech. Bul., 1980, **263**.
80. Ghotbi T., Shahraeen N.: Natural incidence and infectivity level of three nepoviruses in ornamental crops in Iran. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 2009, **1(3)**: 039-044.
81. Glais L., Tribodet M., Gauthier J. P., Astier-Manifacer S., Robaglia C., Kerlan C.: RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of the different biological groups of *Potato Virus* Y. Arch. Virol., 1998, **143**: 2077-2091.
82. Głażewska Z.: Odporność dzikich gatunków *Nicotiana* oraz odmian *N. tabacum* i *N. rustica* na nekrotyczne szczepy wirusa Y. Materiały XVII Sesji Naukowej Instytutu Ochrony Roślin, 1977, 277-287.
83. Golnik K.: Ocena zróżnicowania szczepów wirusa Y ziemniaka – *Potato virus Y.* Estimation of diversification among strains of *Potato virus Y.* 2011, Autoreferat Pracy Doktorskiej.
84. Gopinath D. M., Krishnamurty K. U., Krishnamurty A. S.: Cytological studies on interspecific hybrids involving a new Australian species *Nicotiana amplexicaulis*. Can. J. Genet. Cytol., 1966, **7**: 328-340.
85. Green S. K., Hwang L. L., Kyou Y. J.: Epidemiology of *Tomato mosaic virus* in Taiwan and identification of strain. J. Plant Dis. Protect. 1987, **94**: 386-397.
86. Gurkanli C. T, Ozkoc I., Gunduz I.: Molecular and conventional identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Samsun, Turkey. J. Phytopathol., 2009, **157**: 686-696.
87. Güven A., Köksal N., Büyükbese M. A.: Effects of using a different kind of smokeless tobacco on cardiac parameters; 2003, **3**: 230.
88. Harvey P. H., Levings C. S., Wernsman E. A.: The role of extrachromosomal inheritance in plant breeding. Adv. Agron., 1972, **24**: 1-27.
89. Herreera-Estrella W., Simpson J., Martinez-Trujillo M.: Transgenic plants: an historical perspective. Meth. in Mol. Biol., 2005, **286**: 3-32.
90. Horsh R., Fry J., Hoffman N., Eichholtz D., Rogers S., Fraley R.: A simple and general method for transferring genes into plants. Science, 1985, **227**: 1229-1231.
91. Hukkanen J., Jacob III P., Benowitz N.: Metabolism and disposition kinetics of nicotine. Pharmacol. Rev., 2005, **57**: 79-115.
92. Idris A. M., Ibrahim S. O., Vasstrand E. N.: The Swedish Snus and the Sudanese Toombak: are they different? Oral Oncol., 1998, **34**: 558-566.
93. Iizuka T., Kuboyama T., Marubashi W., Oda M., Tezuka T.: *Nicotiana debneyi* has a single dominant gene causing hybryd lethality in crosses with *N. tabacum*. Euphytica, 2012, **186**: 321-328.
94. Imamura J., Okabe E., Kyo M., Harada H.: Embryogenesis and plantlet formation through direct culture of isolated pollen of *Nicotiana tabacum* Samsun and *Nicotiana rustica* Rustica. Plant Cell Physiol., 1982, **23**: 713-716.
95. Jacobi V., Bachand G. D., Hamelin R. C., Castello J. D.: Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. Journal of Virological Methods, 1998, **74**: 167-178.
96. Johnson E. S., Wolff M. F., Wernsman E. A.: Marker-assisted selection for resistance to black shank disease in tobacco. Plant Dis., 2002, **12**: 1303-1309.
97. Julio E., Verrier J. L., de Borne F. D.: Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. Theor.Appl.Genet., 2006, **112(2)**: 335-346.
98. Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A.: IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor. Appl. Genet., 1999, **98**: 704-711.
99. Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A. K.: Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphy., 2011, **177**: 309-334.

100. K a s h a K. J.: Haploids from somatic cells. W: Kasha K. J.: Haploids in higher plants. Procced. 1.st. Inter. Symp., 1974: 67-87.
101. K a v v a d i a s D., S c h e r e r G., U r b a n M., C h e u n g F., E r r i n g t o n G., S h e p p e r d J., M c E w a n M.,: Simultaneous determination of four tobacco-specific N-nitrosamines (TSNA) in human urine. Journal of Chromatography B, 2009, **877**: 1185-1192.
102. K i l l i n e M., O k u r E., K u r u t a s E. B.: The effects of Maras powder (smokeless tobacco) on oxidative stress in users, Cell Biochem Funct., 2004, **22**: 233-236.
103. K i m b e r G., R i l e y R.: Haploid angiosperms. Bot. Rev., 1963, **29**: 480-530.
104. K o m o r i T., N i t t a N.: Utlization of CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers. Breed. Sci., 2005, **55**: 93-98.
105. K o n i e c z n y A., A u s u b e l F. M.: Procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J., 1993, **4**: 403-410.
106. K r y c z y ń s k i S.: Podstawy fitopatologii, 2002, Fundacja Rozwój SGGW.
107. K u m a s h i r o T., A s a h i T., K o m a r i T.: A new source of cytoplasmic male sterile tobacco obtain by fusion between *N. tabacum* and X-irradiated *N. africana* protoplasts. Plant Sci., 1988, **55**: 247-254.
108. L a s k o w s k a D., B e r b e ć A.: Cytology and fertility of viable hybrids of *Nicotiana tabacum* L. cv. TB-566 with *N. alata* Link et Otto. J. Appl. Genet., 2005, **46(1)**: 11-18.
109. L a s k o w s k a D., B e r b e ć A.: Nowa męskosterylna linia *Nicotiana tabacum* L. z cytoplazmą *N. wuttkei* Clarkson et. Symon. Biuletyn IHAR, 2007, **244**: 289-296.
110. L a s k o w s k a D., B e r b e ć A.: Production and characterization of amphihaploid hybrids between *Nicotiana wuttkei* Clarkson et Symon and *N. tabacum* L. Euphy., 2012, **183**: 75-82.
111. L a s k o w s k a D., B e r b e ć A.: Resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Nicotiana alata* and *N. sanderae* and in hybrids between *N. tabacum* and *N. alata*. Plant Breeding and Seed Science, 2006, **54**: 91-100.
112. L a s k o w s k a D., B e r b e ć A.: TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from hybrid between 'Polalta' i 'Wiślica'. Plant Breed., 2010, **129**: 731-733.
113. L e n g S. X., M c E l h a n e y J. E., W a l s t o n J. D., X i e D., F e d a r k o N. S., K u c h e l G. A.: Elisa and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci., 2008, **63(8)**: 879-884.
114. L i b u d z i s z Z., K o w a l K., Ż a k o w s k a Z.: Mikrobiologia techniczna: Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności. Wydawnictow Naukowe PWN, Warszawa, 2008.
115. L i n d b o J. A., D o u g h e r t y W. G.: Untranslatable transcript of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. Virol., 1992, **189**: 725-733.
116. L i n k e B., B ö r n e r T.: Mitochondrial effects on flower and pollen development. Mitochondrion, 2005, **5**: 389-402.
117. L i n k i e w i c z A., W i ś n i e w s k a I., S o w a S.: Molekularne metody wykrywania i identyfikacji organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO), Biotechnologia , 2006, **3(74)**: 44-52.
118. L i n s m a i e r E. M., S k o o g F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 1965, **18**: 100-127.
119. L l o y d R.: Tissue culture as a means of circumventing lethality in an interspecific *Nicotiana hybrid*. Tob. Sci., 1975, **19**: 4-6.
120. Ł u n i e w a M. L.: Hybrids of *Nicotiana alata* with *N. glauca*. Biul. Gław. Bot. Sada Moskwa-Leningrad., 1964, **33**: 27-32.
121. M a d a n a l a R., G u p t a V., S i n g h P. K., T u l i R.: Development of chloroplast transformation vectors, and a new target region in the tobacco plastid genome. Plant Biotechnol. Rep., 2012, **6**: 77-87.
122. M a h e s h w a r i S. C., R a s h i d A., T y a g i A. K.: Haploids from pollen grains – retrospect and prospect, Am. J. Bot., 1982, **69(5)**: 865-879.

123. Maheshwari S. C., Tyagi A. K., Malhotra K., Sopory S. K.: Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms – the current status. Theor. Appl. Genet., 1980, **58**: 193-206.
124. Majewska - Sawka A., Pląder W.: Transformacja genetyczna komórek roślinnych. W: Malepszy S.: Biotechnologia Roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009, 429-454.
125. Majewska - Sawka A., Sadoch Z.: Cytoplazmatyczna męska sterylność roślin – mechanizmy biologiczne i molekularne. Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych., 2003, 52, **4(261)**: 413-423.
126. Majewska - Sawka A.: Otrzymywanie haploidów. W: Malepszy S.: Biotechnologia Roślin, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009, 87-99.
127. Maliga P., Breznowits A. Sz., Marton L.: Streptomycin – resistant plants from callus culture of haploid tobacco. Nature, 1973, **244**: 29-30.
128. Marubashi W., Yamada T., Niwa M.: Apoptosis detected in hybrids between *Nicotiana glutinosa* and *N. repanda* expressing lethality. Planta, 1999, **210**: 168-171.
129. Melhers G., Labib G.: Somatic hibridisation of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of " haploid" light sensitive varieties of tobacco. Mol. Gen. Genet., 1974, **135**: 277-294.
130. Mih A. M., Atiri G. I., Rossel H. W.: Strain-typing of *Potato virus Y* isolates from potato in Nigeria by infectivity tests and ELISA. African Crop Sci. J., 1995, **3(1)**: 99-104.
131. Mih A. M., Hanson J.: *Alfalfa mosaic virus*: occurrence and variation among isolates from forage legumes in Ethiopia. Tropical Grasslands, 1998, **32**: 118-123
132. Milla S. R., Levin J. S., Lewis R. S., Rufty R. C.: RAPD and SCAR markers linked to an introgressed gene conditioning resistance to *Peronospora tabacina* D.B. Adam. in tobacco. Crop Sci., 2005, **45**: 2346-2354.
133. Moav R., Cameron D. R.: The expression of instability in *N. tabacum* x *N. plumbaginifolia*. Am. J. Bot., 1960, **47**: 87-89.
134. Modnicki D.: Turkish (Aztec) Tobbaco (*Nicotiana Rustica* L.) unnoticeable danger? Przegląd lekarski, 2007, **64**: 10.
135. Moerman D. E.: Native American ethnobotany, Tmber Press, Portland, Oregon, 1998.
136. Moon H., Nicholson S.: AFLP and SCAR markers linked to *Tomato spotted wilt virus* resistance in tobacco. Crop Sci., 2007, **47**:1887-1894.
137. Mumford R. A., Barker I., Wood K. R.: The detection of *Tomato spotted wilt virus* using the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 1994, **46**: 303-311.
138. Nicova V., Pundeva R., Petkova A.: *Nicotiana tabacum* L. as a source of cytoplasmic male sterility in interspecific cross with *N. alata.* Link & Otto. Euphy., 1999, **107**: 9-12.
139. Nicova V., Vladova R., Pundeva R., Shabanov D.: Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana tabacum* L. obtained through interspecific hybridization. Euphy., 1997, **94**: 375-378.
140. Nielsen M. T., Collins G. B.: Variation among androgenic and gynogenic double haploids of tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.). Euphy., 1989, **43**: 263-267.
141. Nishi T., Tajima T., Noguchi S., Ajisaka H., Negishi H.: Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance. Theor. Appl. Genet., 2003, **106**: 765-770.
142. Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Ohno T., Kubo T.: Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to *Potato virus Y* (PVY). Mol. Gen. Genet., 1999, **262**: 822-829.
143. Nowacki E., Nowacka D.: Biogenetyczna klasyfikacja alkaloidów. Wiadomości botaniczne. Tom IX, zeszyt 3, 1965.
144. Oczoś A., Doroszewska T., Laskowska D.: Izolowanie protoplastów z liści tytoniu oraz utrzymywanie ich żywotności. I. Uzyskiwanie materiału do izolacji protoplastów. Pamiętnik Puławski – Prace IUNG, 1988, **93**: 195-205.
145. Oczoś A., Laskowska D., Doroszewska T.: Izolowanie protoplastów z liści tytoniu oraz utrzymywanie ich żywotności. II. Ocena dwu metod izolacji w zastosowaniu do niektórych gatunków *Nicotiana*. Pamiętnik Puławski – Prace IUNG., 1989, **95**: 61-70.

146. O c z o ś A.: Fizjologiczne przyczyny występowania cytoplazmatycznej męskiej sterylności u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L). Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa. Praca habilitacyjna, 1980.
147. O p o k a B.: Poszukiwanie źródeł odporności na *Lycopersicon virus* 3 Smith (*Tomato spotted wilt virus*) w rodzaju *Nicotiana*. Pamiętnik Puławski – Prace IUNG, 1990, **96**: 187-194.
148. P a n d e y K. K., P h u n g M.: Hertwig effect in plants: Induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. Theor. Appl. Genet., 1982, **62**: 295-300.
149. P a n d e y K. K.: Mentor pollen: possible role of wall-held pollen growth promoting substance in overcoming intra and interspecific incompatibility. Genetica, 1977, **47**: 219-229.
150. P a r r e l l a G., G o g n a l o n s P., G e b r e - S e l a s s i e K., V o v l a s C., M a r c h o u x G.: An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. J. Plant Path., 2003, **85**: 227-264.
151. P e l l e t i e r G., B u d a r F.: The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. Current Opinion in Biotechnology, 2007, **18**: 121-125.
152. P l ą d e r W.: Transformacja plastydów. W: Malepszy S.: Biotechnologia Roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009, 448-453.
153. P r z y b o r o w s k i J. A.: Haploidyzacja roślin wyższych i jej zastosowania. Wiadomości Botaniczne, 1994, **38(3/4)**: 53-62.
154. P r z y b y ś M., D o r o s z e w s k a T.: Genetic grouping of PVY^{NW} and PVY^{NTN} isolates by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR amplified whole PVY genome. Acta Bioch. Pol., 2009, **56,** Supplement 3/2009: 94.
155. P r z y b y ś M.: Charakterystyka i występowanie wirusa Y ziemniaka (PVY) w głównych rejonach uprawy tytoniu w Polsce. Praca doktorska, IUNG-PIB, Puławy, 2011.
156. R a j e w s k i M.: Rośliny przyprawowe i używki roślinne. PWRiL, Warszawa, 1992.
157. R e e d S., C o l l i n s G. B.: Interspecific hybrids in *Nicotiana* through *in vitro* culture of fertilized ovules *N. stoctonii* × *N. tabacum*, *N. nesophila* × *N. tabacum*, *N. repanda* × *N. tabacum*. J. Heredity, 1978, **69(5)**: 311-315.
158. R e n N., T i m k o M. P.: AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. Genome, 2001, **44**: 559-571.
159. R o g a l s k a S., M a ł u s z y ń s k a J., O l s z e w s k a M.: Podstawy Cytogenetyki Roślin,. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
160. R u d o l f M. L.: Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry, 2005, **51**: 2415-2418.
161. S a g h a i M a r o o f M. A., B i y a s h e v R. M., Y a n g G. P., Z h a n g Q., A l l a r d R. W.: Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, **91**: 5466-5470.
162. S a i d i A. S a f a e i z a d e h M.: First Report of *Cucumber moscaic virus* infecting geraniums (*Pelargonium* spp.) in Iran. Asian J. Plant Path., 2011, **5(4)**: 163-165.
163. S c h n a b l e P. S., W i s e R. P.: The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Sci. 1989, **3**: 175-180
164. S h a n X., B l a k e T. K, T a l b e r t L.: Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. Theor. Appl. Genet., 1999, **98**: 1072-1078.
165. S h a r m a K. K., B h a t n a g a r - M a t h u r P., T h o r p e T. A.: Genetic transformation technology: status and problems. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 2005, **41**: 102-112.
166. S h u k u r o v R. R., V o b l i k o v a V. D., N i k o n o r o v a A. K., K o m a k h i n R. A., K o m a k h i n a V. V., E g o r o v T. A., G r i s h i n E. V., B a b a k o v A. V.: Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens. Transgenic Res., 2012, **21**: 313-325.
167. Ś l i w i ń s k a E.: Analiza cyklu komórkowego buraków cukrowych o różnym stopniu ploidalności za pomocą cytometrii przepływowej. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 1997, **202**: 35-40.
168. Ś l i w i ń s k a E.: Wykorzystanie cytometrii przepływowej w biotechnologii roślin. Biotechnologia, 2002, **1(56)**: 122-128.

169. Stoeva P., Yankulova M., Nikolaeva V., Bachvarova R., Ivanova L., Maiss E., Adam G., Valkov V., Guelemerov S., Atanassov A.: Long-term resistance to *Tomato spotted wilt virus* in transgenic tobacco cultivars expressing the viral nucleoprotein gene: greenhouse and field tests. Mol. Bred., 1998, **4**: 155-164.
170. Stoyanowa M.: Proučvanija na chibridi mieždu vidovete *Nicotiana tabacum* L. x *N. glauca* Grah. Oddalenna chibridizacja rasteni, 1972, BAN: 127-136.
171. Sulzinski M.A., Jurkonie D.D., Adonizio Ch.S.: *Tobacco mosaic virus* Subliminal Infection of African Violet. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1994, **119(4)**: 702-705.
172. Sun Yu-He, Xue Qing-Zhong, Ding Chang-Min, Zhang Xian-Yin, Zhang Li-Li, Wang Wei-Feng, Ali Shaukat.: Somatic cybrization between *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* based on a single inactivation procedure of nuclear donor parental protoplasts. Plant Sci., 2005, **168**: 303-308.
173. Swaminthan M.S., Murty B.R.: One way incompatibility in some species crosses in the genus *Nicotiana*. Indian J. Genet. Plant Breed., 1957, **17**: 23-26.
174. Tezuka T., Kuboyama T., Matsuda T., Marubashi W.: Possibile involvement of genes on the Q chromosome of *Nicotiana tabacum* in expression of hybryd lethality and programmed cell death during interspecific hybridization to *Nicotiana debneyi*. Planta, 2007, **226**: 753-764.
175. Tezuka T., Marubashi W.: Apoptotic cell death observed during the expression of hybrid lethality in interspecific hybrids between *Nicotiana tabacum* and *N. suaveolens*. Breed Sci., 2004, **54**: 59-66.
176. Tiernowski M.F., Butenko R.G., Mosiejewa M.E.: The use of tissue culture to overcome the barrier of incompatibility between species and sterility of interspecific hybrids. Sov. Genet., 1974, **8**: 27-33.
177. Tiernowski M.F., Sankareva I.K., Larkina N.I.: Production of interspecific tobacco hybrids by the pollination of ovules *in vitro*. Sov. Genet., 1976, **12**: 1209-1213.
178. Tong Z., Jiao T., Wang F., Li M., Leng X., Ga Y., Li Y., Xiao B., Wu W.: Mapping of quantitative trait *loci* conferring resistance to brown spot in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Plant Breed., 2012, **131**: 335-339.
179. Touraev A., Vincente O., Heberle-Bors E.: Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends Plant Sci., 1997, **2**: 297-302.
180. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Cytological investigations of the interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *N. glauca* Grah. J. Appl. Genet., 2003, **44(1)**: 45-54.
181. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Meiosis and fertility in interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *N. glauca* Grah. and their derivatives. Plant Breed., 2007, **126**: 201-206.
182. Trojak-Goluch A., Laskowska D., Agacka M., Czarnecka D., Kawka M., Czubacka A.: Effectiveness of combining resistance to *Thielaviopsis basicola* and *Tomato spotted wilt virus* in haploid tobacco genotypes. Breed. Sci., 2011, **61**: 389-393.
183. Verrier J.L., Marchand V., Cailleteau B., Delon R.: Chemical change and cigarette smoke mutagenity increase associated with CMV-DTL and PVY-N infection in Burley Tobacco. Inf. Bull., CORESTA, Cape Town, 2001, **1**.
184. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., 1995, **23**: 4407-4414.
185. Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas W.T.B., Powell W.: Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (SSAP). Mol. Gen. Genet., 1997, **253**: 687–694.
186. Weising K., Gardner R.C.: A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome, 1999, **42**: 9-19.

187. W e l s h J., M c C l e l l a n d M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res., 1990, **18**: 7213-7118.
188. W e y b r e w J. A., M a n n T. J.: Comparative composition of certain *Nicotiana* species and their F_1 hybrids with *Nicotian tabacum*. Tobacco Science VII, 1963, **8**: 30-38.
189. W i l l i a m s J. G. K., K u b e l i k A. R., L i v a k K. J., R a f a l s k i J. A., T i n g e y S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 1990, **18**: 6531-6535.
190. W i t k i e w i c z Z., H e t p e r J.: Chromatografia Gazowa. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2001.
191. W u Y., L i u X., Z h e n g Y., S u n S.: Technics of breeding a new transgenic tobacco line and a G28 mutant resistant to *Potato virus* Y – vein necrosis strain. Inf. Bull. CORESTA, China, 1999, 13-14.
192. Y a m a d a T., M a r u b a s h i W., N i w a M.: Apoptotic cell death induces temperature-sensitive lethality in hybrid seedlings and calli derived from the cross of *Nicotiana suaveolens* × *N. tabacum*. Planta, 2000, **211**: 614-622.
193. Y a m a d a T., M a r u b a s h i W., N i w a M.: Detection of four lethality types in interspecific crosses among *Nicotiana* species through the use of three rescue methods for lethality. Breed Sci., 1999, **49**: 203-210.
194. Y a n g B. C., X i a o B. G., C h e n X. J., S h i C. H.: Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using intersimple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. Ann. of Appl. Biol., 2007, **150(3)**: 393-401.
195. Y a n g H. Y., Z h o u C.: *In vitro* induction of haploid plants from unpolinated ovaries and ovules. Theor. Appl. Genet., 1982, **63**: 97-104.
196. Y u Y. L., L i n T. Y.: Construction of phylogenetic tree for *Nicotiana* species based on RAPD markers. J. Plant Res., 1997, **110**: 187-193.
197. Y u i R., I k e t a n i S., M i k a m i T., K u b o T.: Antisence inhibition of mitochondria puryvate dehydrogenaze E1alpha subunit in anther tapetum causes male sterility. Planta J., 2003, **34**: 57-66.
198. Z h a n g X. G., S u n W. X., G u o L., Y u J. F., C h a n g C. J.: Genetic and pathogenic variation among tobacco black shank strains of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from the main tobacco growing in China. J. Phytopath., 2003, **151**: 259-266.
199. Z h a n g X. G., Z h e n g G. S., H a n H. Y., H a n W., S h i C. K., C h a n g C. J.: RAPD PCR for diagnosis of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* isolates which cause black shank on tobacco. J. Phytopathol., 2001, **149**: 569-574.
200. Z h o u S., C h e n X., Z h a n g X., L i Y.: Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene BADH and a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *SeNHX1*. Biotechnol. Lett., 2008, **30**: 369-376.
201. Z i ę t k i e w i c z E., R a f a l s k i A., L a b u d a D.: Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchor polymerase chain reaction amplification. Genomics, 1994, **20**: 176-183.

Adres do korespondencji:

mgr Karolina Kursa
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 551
e-mail: kkursa@iung.pulawy.pl

STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB
ZESZYT 31(5) 2012

Marcin Przybyś

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

TYTOŃ – ZIELONY BIOREAKTOR*

Wstęp

Gwałtowny rozwój biologii molekularnej w ostatnich latach umożliwił wykorzystanie roślin, jako bioreaktorów do produkcji niemal nieograniczonej ilości zrekombinowanych białek, które znajdują zastosowanie w medycynie (diagnostyka, profilaktyka, leczenie chorób), przemyśle (biopolimery, enzymy) i ochronie środowiska (fitoremediacja). Tytoń był i jest główną rośliną wykorzystywaną, w tzw. rolnictwie molekularnym (ang. *molecular farming*). Wynika to z bardzo wydajnej transformacji genetycznej oraz dużej ilości wytwarzanej biomasy. Światowy popyt na rekombinowane białka rośnie szybciej niż możliwości tradycyjnych systemów produkcyjnych. Dotyczy to zarówno białek wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym, jak również enzymów przemysłowych i wtórnych metabolitów. Tradycyjne systemy produkcyjne, wykorzystujące mikroorganizmy lub hodowle komórkowe, są ograniczone trudnościami w zwiększaniu skali procesów oraz dużymi kosztami produkcji, szczególnie w odniesieniu do potrzeby stosowania bardzo skomplikowanej i kosztownej aparatury, ale również drogimi etapami końcowego oczyszczania produktu. Produkcja zrekombinowanych białek w roślinach pozwala na łatwe i tanie zwiększenie skali produkcji, a poza tym zapewnia możliwości niedostępne w tradycyjnych systemach. Rośliny, jako zielone bioreaktory, posiadają zdolność do przeprowadzania potranslacyjnych modyfikacji białek – glikozylacji, lub do tworzenia mostków dwusiarczkowych, które są często niezbędne do aktywności biologicznej białek wielu ssaków (60, 38). Przy wykorzystaniu roślin jako zielonych bioreaktorów, szczególnie w przemyśle farmaceutycznym, nie ma ryzyka zanieczyszczenia wirusami i patogenami ludzkimi, ponieważ nie są znane przypadki zakażania roślin przez ludzkie patogeny. Uprawa roślin jest tania w porównaniu do kosztów prowadzenia hodowli komórkowych, a jako źródło energii wykorzystywane jest światło słoneczne, co dodatkowo redukuje koszty. Tytoń wykazuje duże stężenia białek rozpuszczalnych, co stanowi atrakcyjną cechę dla wykorzystania tej rośliny jako platformy do produkcji zrekombinowanych białek. Tytoń umożliwia wykorzystanie różnych systemów

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

ekspresyjnych: ze stabilnie wbudowanym transgenem w genom jądrowy (rośliny transgeniczne) lub chloroplastowy (rośliny transplastomiczne) lub z przejściową ekspresją transgenów opartą na zakażaniu roślin i namnażaniu zrekombinowanego wirusa.

Systemy ekspresji genów

Stabilna transformacja genomu jądrowego

Jest prowadzona najczęściej przy użyciu patogena roślinnego *Agrobacterium tumefaciens*, który wydajnie przenosi rDNA do genomu jądrowego komórek roślinnych. Miejsce integracji genów przenoszonych za pomocą *Agrobacterium* jest przypadkowe. Szczepy *Agrobacterium* wykorzystywane w transformacji zostały technikami inżynierii genetycznej zmodyfikowane w taki sposób, aby wyeliminować geny wirulencji powodujące u zakażonych roślin guzowatość korzeni, jednocześnie pozostawiając te, które są odpowiedzialne za wydajny transfer rDNA. Alternatywną metodą wprowadzania DNA do komórki roślinnej jest mikrowstrzeliwanie (ang. *biolistic, gene gun*). Jest to metoda bezpośredniego (bezwektorowego) wprowadzania obcego DNA. W tej metodzie rDNA opłaszcza złote kulki (zwykle ok. 1μm średnicy), które są wstrzeliwane do tkanki roślinnej przy użyciu sprężonego helu. Tak wprowadzone rDNA ulega następnie intergracji z genomem. Taki sposób wprowadzania rDNA często skutkuje większą liczbą kopii genu, która częściej ulega integracji z genomem, niż w przypadku stosowania *Agrobacterium*.

Stabilna transformacja genomu chloroplastowego

rDNA wprowadza się do chloroplastów najczęściej stosując metodę mikrowstrzeliwania lub przy użyciu wektora. Jako wektor najczęściej stosuje się pochodne wektorów *Escherichia coli* zawierające sekwencje plastydowe długości 1-2 kb, które na obu końcach otaczają gen selekcyjny i wprowadzany rDNA. Takie wektory namnażane są w *E.coli*, a następnie wprowadzane do plastydów, gdzie gen markerowy i wprowadzany rDNA ulegają integracji z genomem chloroplastowym (64). Zaletą transformacji genomu chloroplastowego jest wysoka zawartość produkowanych rekombinowanych białek – nawet do 46% ogółu białek rozpuszczalnych TSP (ang. *total soluble protein*) (87).

Ekspresja przejściowa

Polega na wprowadzeniu do rośliny zrekombinowanego DNA za pomocą wektora wirusowego. W tym celu wykorzystuje się odpowiednio przygotowane wirusy, gdzie w genom wirusa wbudowuje się rDNA. Następnie roślinę zakaża się tak spreparowanym wirusem. W efekcie w zakażonej roślinie, poza białkami wirusa, produkowane jest również białko kodowane przez wprowadzony gen. Wprowa-

dzany gen w tej metodzie nie ulega integracji z materiałem genetycznym rośliny (87). Wykorzystanie ekspresji przejściowej pozwala na bardzo szybkie wytworzenie dużych ilości zrekombinowanych białek w krótkim czasie. Metodę tę można wykorzystać na przykład do szybkiego reagowania podczas wybuchu pandemii (np. ostatnia pandemia grypy A/H1N1) (99).

Wytwarzanie białek terapeutycznych w tytoniu

Tytoń nie jest jadalny dla człowieka i dla zwierząt, co minimalizuje ryzyko wprowadzenia do łańcucha żywieniowego materiału modyfikowanego genetycznie. Te cechy sprawiły, że tytoń idealnie nadaje się do wykorzystania jako zielony bioreaktor do produkcji biofarmaceutyków. Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad produkcją białek terapeutycznych w transgenicznych roślinach tytoniu, a niektóre przechodzą właśnie etap badań klinicznych na człowieku (99).

Produkcja przeciwciał

Przeciwciała stanowią dużą grupę nowych leków (tab. 1). Monoklonalne przeciwciała tradycyjnie produkowane są w hodowlach linii komórkowych hybrydoma. Utrzymywanie takich hodowli jest kosztowne. Produkcja w roślinach jest więc tanią alternatywą. Tytoń był pierwszą rośliną wykorzystaną do tego celu. Już w 1989 roku H i a t t i i n. (36) uzyskali w nim w pełni funkcjonalne przeciwciało monoklonalne 6D4. W tym celu użyli dwóch transgenicznych roślin rodzicielskich, z których jedna wytwarzała ciężki łańcuch, a druga lekki łańcuch przeciwciała. Proste skrzyżowanie tych roślin spowodowało, że w pokoleniu F_1 rośliny wytwarzały w pełni funkcjonalne, złożone z ciężkich i lekkich łańcuchów, przeciwciało. Białka te były wytwarzane z dość dużą wydajnością i stanowiły 1,3% ogółu białek rozpuszczalnych (TSP).

Innym rodzajem przeciwciał uzyskanych w tytoniu były przeciwciała sekrecyjne IgA (SIgA) (ang. *secretory IgA*) o bardziej skomplikowanej budowie, składające się z kompleksu 2 jednostek IgA (2 ciężkie i 2 lekkie łańcuchy) połączonych łańcuchem J oraz z łańcucha wydzielniczego (43). Są to przeciwciała naturalnie produkowane przez organizm, wydzielane na powierzchnię błon śluzowych, w celu ochrony przed infekcjami i toksynami. Produkcja tego typu zrekombinowanych białek przy wykorzystaniu linii komórkowych ssaków jest bardzo droga i skomplikowana, z uwagi na konieczność stosowania dwóch niezależnych oraz mieszanych linii komórkowych i stałego nadzoru nad prowadzeniem tej hodowli (99). Zastosowanie tytoniu do wytwarzania tego typu przeciwciał bardzo uprościło ten proces oraz ograniczyło jego koszty. W ten sposób udało się uzyskać w tytoniu humanizowane (o cechach zbliżonych do przeciwciał ludzkich) mysie przeciwciało sekrecyjne IgA1 (Guy's 13 SIgA-G). Mysie przeciwciało monoklonalne IgG1 (Guy's 13) rozpoznaje

antygeny I/II (SA I/II) *Streptococcus mutans* – głównego sprawcy próchnicy zębów, a jego użycie terapeutyczne zapobiega kolonizacji jamy ustnej przez tę bakterię (101). Uzyskanie humanizowanego SIgA-G było możliwe poprzez wyprowadzenie niezależnych linii tytoniu z ekspresją, odpowiednio: lekkich łańcuchów Guy's 13 IgG, ciężkich łańcuchów przeciwciała hybrydowego IgG-A, mysiego łańcucha J oraz szczurzego łańcucha wydzielniczego. Następnie, dzięki serii krzyżowań tych linii, uzyskano tytoń wytwarzający w pełni funkcjonalną wielkocząsteczkową mysią immunoglobulinę Guy's13 SIgA-G z wydajnością dochodzącą nawet do 500 μg na gram liści (58). Badania kliniczne na ludziach potwierdziły skuteczność pozyskiwanych z tytoniu przeciwciał SIgA-G w zapobieganiu kolonizacji jamy ustnej przez *S. mutans* (59). Od 2005 roku dostępny jest już na rynku komercyjny preparat o nazwie CaroRx™ bazujący na uzyskiwanych w tytoniu przeciwciałach SIgA-G (99).

Tytoń może być również wykorzystany do wytwarzania fragmentów przeciwciał m.in. fragmentów przeciwciał (Fab) (ang. *antibody-binding fragment*), czy zmiennych fragmentów jednołańcuchowych przeciwciał (scFv) (ang. *single-chain variable fragment*). Te małe syntetyczne przeciwciała są w pełni funkcjonalne i posiadają zdolność specyficznego wiązania antygenu. Wykorzystywane są zarówno w diagnostyce jak i leczeniu (92). W tytoniu udało się uzyskać przeciwciała skie-rowane przeciwko ErbB-2 (HER 2, Neu) – białku receptorowemu zaliczanemu do ludzkich nabłonkowych czynników wzrostu (EGF) (ang. *epidermal growth factor*) (27). Białko ErbB-2, szczególnie aktywne u pacjentek z nowotworami piersi, sprzyja proliferacji komórek i wydłużeniu ich czasu przeżycia, poza tym hamuje powstawanie przerzutów (51). W badaniach wykorzystano dwa niezależne systemy ekspresji konstruktu zawierającego gen kodujący ErbB-2. System ze stabilnie wbudowanym transgenem w genom jądrowy wykorzystano przy użyciu roślin tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum*, a system z przejściową ekspresją u dzikiego gatunku *Nicotiana benthamiana*. Ilość wytwarzanych przeciwciał, w przypadku systemu ze stabilnie wbudowanym transgenem, wynosiła 0,6-0,8 $g \cdot g^{-1}$ tkanki, zaś w systemie przejściowym 800 $\mu g \cdot g^{-1}$ (26,27). W ostatnich latach prowadzone są również badania nad tytoniem niosącym w jednym genomie transgeny kodujące przeciwciała skierowane przeciwko neurotoksynie botulinowej (jadowi kiełbasianemu) i wąglikowi (2). Ma to ogromne znaczenie, szczególnie w obecnym czasie, kiedy ryzyko wykorzystania broni biologicznej jest wysokie. Tytoń może stać się źródłem pozyskiwania tanich i szybkich w produkcji, skutecznych przeciwciał.

Szczepionki

Szczepienie to podawanie antygenu (szczepionki), w celu produkcji przez organizm odpowiednich przeciwciał zapewniających odporność na choroby. Szczepienie jest najbardziej efektywną i skuteczną formą zapobiegania chorobom zakaźnym. W szczepionce mogą być podawane zarówno atenuowane (wywołujące odpowiedź immunologiczną, ale niezdolne do wywołania choroby), jak i martwe formy patogenów

Tabela 1

Przykłady przeciwciał uzyskanych w tytoniu

Choroba/Patogen	Uzyskane przeciwciało	Maks. zawartość	Literatura
Botulina	Anti-BoNT/A scFv	20 mg·kg^{-1} świeżych liści	Almquist i in., 2006 (2)
HIV	2G12 mAb	1%	Floss i in., 2009 (22)
HIV	2F5 mAb		Sack i in., 2007 (86)
Nowotwór (chłoniak z komórek B)	Idiotypowo specyficzne	b.d.	McCormick i in., 2008 (70)
Nowotwór piersi i jelita grubego	Anti-Lewis Y mAb	30 mg·kg^{-1} świeżych liści	Brodzik i in., 2006 (8)
Nowotwory (szerokie spektrum)	H10 mAb	1,1 mg·kg^{-1} świeżych liści	Vilanni i in., 2009 (104)
Nowotwór jelita grubego	CO17-1A mAb	0,02% TSP	Ko i in., 2005 (48)
Nowotwór skóry	TheraCIM®	1,2µg·g^{-1}	Rodriguez i in., 2005 (82)
Powiązany z guzami nowotworowymi mózgu – antygen tenascyny-C	H10 mAb	100 mg·kg^{-1} świeżych liści	Villani i in., 2009 (104)
Streptococcus mutans	Guy's 13 mAb	b.d.	Daniell i in., 2004 (14)
Streptococcus mutans	CaroRX™	80 mg·kg^{-1} świeżych liści	Ma i in., 1998 (59)
Salmonella	Anti-LPS scFv	41,7 µg·g^{-1}	Makvandi-Nejad i in., 2005 (62)
Wąglik	Anti-PA mAb	b.d.	Hull i in., 2005 (40)
Wścieklizna	R12 mAb	0,5 mg·l^{-1}	Girard i in., 2006 (29)
W ścieklizna	SO57 mAb	0,07% TSP	Ko i in., 2003 (47)
Zapalenie wątroby typu B (HBV)	B294, B303 mAb	5g/kg świeżych liści	Gleba i in., 2005 (30)
Zapobieganie odrzucaniu przeszczepów	LO-BM2	0,29% TSP	De Muynck i in., 2009 (17)

bakteryjnych, czy wirusowych. Opracowanie szczepionek opartych na wykorzystaniu specyficznych białek, zamiast całych patogenów, stwarza mniejsze ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Zastosowanie nowoczesnych technik inżynierii genetycznej uprościło ten proces. Podobnie jak przeciwciała, szczepionki są obecnie produkowane w bakteriach, drożdżach i z wykorzystaniem linii komórkowych ssaków. Jednak tytoń w ostatnich latach staje się nowoczesną alternatywą dla systemów tradycyjnych (tab. 2). Warto wspomnieć o wytwarzanych w tytoniu szczepionkach przeciwko wirusowi HIV (ang. *Human immunodeficiency virus*), wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, cholerze, wirusowi ostrego zespołu niewydolności oddechowej (SARS) (ang.

severe acute respiratory syndrome), czy wirusowi Epsteina-Barr wywołującemu mononukleozę zakaźną. Wiele z tych szczepionek wyszło już z fazy testów laboratoryjnych i znajduje się na etapie badań na zwierzętach, poprzedzających testy kliniczne na człowieku. Przykładem takiej szczepionki może być szczepionka przeciwko ospie prawdziwej. Udało się uzyskać w tytoniu białko B5 z domeną antygenową pB5. Zastosowanie tej szczepionki u myszy wywoływało silną odpowiedź immunologiczną organizmu i wytworzenie odpowiednich przeciwciał chroniących przed chorobą (31). Tytoń został również wykorzystany do produkcji białka SARS-CoV S1. Podanie tego białka myszy prowadziło do wytworzenia specyficznych przeciwciał, zabezpieczających zwierzę przed zakażeniem wirusem SARS (80). Innym przykładem może być szczepionka przeciwko wąglikowi (*Bacillus anthracis*). W tradycyjnych systemach szczepionkę uzyskuje się przez izolację z podłoża hodowlanego antygenu ochronnego (PA) (ang. *protective antigen*). K o y a i i n. (50) uzyskali ten antygen w transgenicznym tytoniu. Ekspresja genu *pag*A kodującego białko PA zachodziła w chloroplastach. Produkowane w transgenicznym tytoniu białko PA stanowiło do 14,2% ogółu białek rozpuszczalnych rośliny (TSP). W ostatnim czasie udało się uzyskać w roślinach *N. benthamiana* kompleks immunologiczny Ebola (EIC) (ang. *Ebola immune complex*) (79). Ebola należy do najniebezpieczniejszych wirusów świata. Przez amerykańskie Centrum Kontroli Chorób został razem z wirusem Marburg zaklasyfikowany do kategorii A, oznaczonej jako stwarzające zagrożenie dla bezpieczeństwa narodowego. Wirusy te wywołują gorączki krwotoczne, a śmiertelność po zakażeniu dochodzi do 90%. Glikoproteina GP1 wirusa Ebola została połączona z C-końcem ciężkiego łańcucha humanizowanej immunoglobuliny 6D8 IgG – przeciwciała monoklonalnego specyficznie wiążącego się z liniowym epitopem na powierzchni GP1. Wspólna ekspresja kompleksu GP1-ciężki łańcuch 6D8 IgG oraz lekkiego łańcucha 6D8 w *N. benthamiana* pozwoliło na uzyskanie funkcjonalnej immunoglobuliny (EIC). Testy *in vitro* przeprowadzone na myszach BALB/C, którym podano oczyszczony EIC, wykazały produkcję przeciwciał anti-Ebola. Pokazuje to potencjał jaki daje produkcja EIC w tytoniu, w celu wytwarzania szczepionki dla ludzi. Rośliny *N. benthamiana* zostały również wykorzystane, jako zielone bioreaktory do uzyskania rekombinowanych podjednostek hemaglutyniny (HA) pochodzącej od szczepów grypy H1N1 i H5N1 (91). Szczepienie jest preferowanym sposobem zapobiegania grypie. Obecnie wykorzystywana metoda wytwarzania hemaglutyniny nie zapewnia wystarczającej wydajności i szybkości produkcji wystarczającej dla zaspokojenia światowego zapotrzebowania, szczególnie w odniesieniu do nowych potencjalnie niebezpiecznych szczepów mogących wywołać pandemię. S h o j i i i n. (91) udało się uzyskać w roślinach *N. benthamiana* 90 mg hemaglutyniny z 1 kg biomasy. Obiecujące wyniki dotyczące wykorzystania tytoniu jako zielonego bioreaktora skłoniły naukowców do próby wykorzystania u pacjentów cierpiących na chłoniaki nieziarnicze, produkowanych w tytoniu, personalizowanych przeciwciał typu scFv

jako szczepionek (69, 70). Z guzów pacjentów pobierano materiał, który posłużył do wydzielenia regionów o zmiennej sekwencji, następnie domeny idiotypowe łączono za pomocą polilinkera (krótki odcinek DNA zawierający wiele miejsc rozpoznawanych przez różne enzymy restrykcyjne) i klonowano do zmodyfikowanego genomu wirusa mozaiki tytoniowej (TMV). Tak spreparowany wirus służył do zakażania roślin tytoniu, które w następstwie infekcji wirusowej produkowały spersonalizowane przeciwciała. System ten pozwala na szybkie pozyskiwanie przeciwciał i immunizację pacjentów ich własnymi, indywidualnymi, terapeutycznymi antygenami.

Tytoń wykorzystywany jest również do produkcji szczepionek stosowanych w weterynarii. Przykładem może być szczepionka przeciwko zakaźnemu zapaleniu żołądka i jelit świń, wywoływanemu przez *Coronavirus* (TGEV) (ang. *Transmissible Gastroenteritis Virus*). W tytoniu uzyskano N-końcową domenę glikoproteiny S (N-gS), zawierającą główne miejsca antygenowe białka (100). Po podaniu świniom szczepionki zawierającej N-gS wytwarzała ona przeciwciała przeciw TGEV. W tytoniu uzyskano również białko H kodowane przez wirusa księgosuszu bydła (RPV) (ang. *Rinderpest Virus*). Choroba ta charakteryzuje się blisko 100% śmiertelnością. Dootrzewnowe podanie myszom białka H powodowało produkcję przeciwciał rozpoznających wirus RPV (46). W ostatnim czasie, w USA, firma DOW AgroSciences uzyskała zgodę Departamentu Rolnictwa na wprowadzenie do sprzedaży szczepionki wytworzonej w tytoniu, stosowanej przeciw rzekomemu pomorowi drobiu (choroba Newcastle) (102).

Cytokiny

Cytokiny to małe białka lub glikoproteiny produkowane przez wiele typów komórek. Są silnymi immunoregulatorami. Poprzez stymulację lub hamowanie aktywacji, proliferacji i różnicowania komórek oraz regulację sekrecji przeciwciał lub innych cytokin, wpływają na intensywność i długość trwania odpowiedzi immunologicznej (77). Cytokiny mogą działać zarówno na komórki, które je wydzielają, komórki w najbliższym sąsiedztwie, jak również na komórki w innych narządach. Cytokiny mogą działać zarówno synergistycznie, jak i antagonistycznie oraz mogą wywoływać kaskady sprzężeń dodatnich i ujemnych (32). Cytokiny dzielimy na: interleukiny, interferony, hemopoetyny, chemokiny, cząsteczki TNF (ang. *tumor necrotic factor*) i inne. Rekombinowane cytokiny są szeroko testowane jako farmaceutyki w leczeniu infekcji, chorób autoimmunologicznych i nowotworów (57, 76, 108). Obecnie na rynku dostępnych jest wiele rekombinowanych cytokin, ale są one bardzo drogie, przez co mało dostępne dla zastosowań terapeutycznych. Poza tym wiele z nich, produkowanych w *E. coli*, nie jest glikozylowanych. Glikozylacja jest bardzo ważnym procesem wpływającym na fałdowanie białek, stabilizującym ich strukturę oraz wpływającym na ich funkcję (99). W ostatnich latach poczyniono duże postępy w modyfikacji genetycznej enzymów biorących udział w procesie glikozylacji.

Dzięki temu możliwe stało się dodawanie lub usuwanie pożądanych grup cukrowych i uzyskiwanie białek z pożądanym wzorem cukrowym, zbliżonym do ludzkiego (18, 63). W efekcie, stało się możliwe wykorzystanie roślin, w szczególności tytoniu, do produkcji tanich zrekombinowanych cytokin (tab. 3).

Tabela 2

Przykłady szczepionek uzyskanych w tytoniu

Choroba/ Patogen	Uzyskany antygen	Max. zawartość	Literatura
Amebioza	lecA	6,3% TSP	Chebolu i Daniell 2007 (11)
Cholera	podjednostka B toksyny cholery połączona z ludzką proinsuliną (CTB-Pins)	16% TSP	Ruhlman i in., 2007 (84)
Cholera	ctxB	4,1% TSP	Daniell i in., 2001 (13)
Cholera i malaria	podjednostka B toksyny cholery (CTB) połączona z antygenem AMA-1 malarii lub CTB połączona z białkiem powierzchniowym merozoitów (MSP)	13,2% i 10,1% TSP	Davoodi-Semiromi i in., 2010 (15)
Ebola	kompleks immunologiczny EIC	50 $\mu g \cdot g^{-1}$ liści	Phoolcharoen i in., 2011 (79)
E. coli 0157:H7	Intimina	13 $\mu g \cdot g^{-1}$ świeżej masy liści	Judge i in., 2004 (44)
E. coli szczep K88	FaeG of K88 fantygen fimbii	0,15% TSP	Huang i in., 2003 (39)
Gruźlica	Ag85b	4% TSP	Floss i in., 2010 (23)
Grypa (H1N1, H5N1)	HAC1, HAI-05	90 i 50 $mg \cdot kg^{-1}$ liści	Shoji i in., 2011 (91)
Grypa	HA	200 $mg \cdot kg^{-1}$ świeżej masy liści	Shoji i in., 2008 (90)
HBV	HbsAg (HepB)	3% TSP	Thanavala i in., 1995 (96)
HCV	biało rdzenia (Hep C)	b.d.	Nianiou i in., 2008 (75)
HIV	p24 białko płaszcza HIV-Nef	0,0035% TSP 0,7% TSP	Zhang i in., 2002 (109) Marusic i in., 2007 (65)
HIV	2G12	1% TSP	Floss i in., 2009 (22)
Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV)	L1 białko płaszcza	0,5% TSP 1 $mg \cdot kg^{-1}$	Biemelt i in., 2003 (4) Kohl i in., 2006 (49)
Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV)	HPV-16 L1	24% TSP	Fernández-San Millán i in., 2008 (21)

Tabela 2. cd.

Malaria	Pfs25	400 mg·kg^{-1} świeżych liści	Farrance i in., 2011 (20)
Malaria	PyMSP4/5	10% TSP	Webster i in., 2009 (107)
Ospa prawdziwa	pB5	100 mg·kg^{-1}	Golovkin i in., 2007 (31)
Rotavirus	VP6	3% TSP	Birch-Machin i in., 2004 (6)
Toksyna tężcowa	tetC	25% TSP	Tregoning i in., 2003 (98)
Wąglik	PA	14,2% TSP	Watson i in., 2004 (106) Koya i in., 2005 (50)
Wirus Norwalk	VLP	0,23%	Mason i in., 1996 (66)
Epidemiczna biegunka świń (PED)	białko spike	2,1% TSP	Kang i in., 2005 (45)
Parwowirus psów (CPV)	CTB-2L21 GFP-2L21	33,1% TSP	Molina i in., 2004, 2005 (72, 73)
Parwowirus świń (PPV)	VP2	0,3% TSP	Rymerson, 2003 (85)
Pryszczyca	VP1 białko płaszcza	51% TSP	Lentz i in., 2010 (56)

Tabela 3

Przykłady cytokin uzyskanych w tytoniu

Grupa cytokin	Cytokina	Maks. zawartość	Literatura
Hematopoetyny	Erytropoetyna	0,0026% TSP	Matsumoto i in., 1995 (67)
	Erytropoetyna	0,05% TSP	Conley i in., 2009 (12)
	G-CSF	105 µg·l^{-1}	Hong i in., 2002 (37)
	GM-CSF	0,03% TSP	Sardana i in., 2002 (88)
	GM-CSF	2% TSP	Zhou i in., 2006 (111)
Interferony	IFN-γ	6% TSP	Leelavathi i Reddy, 2003a (53)
	IFN-α2b	20% TSP	Arlen i in., 2007 (3)
Czynniki wzrostu	aFGF (FGF-1)	8% TSP	Matsuo i in., 2007 (68)
Interleukiny	IL-2	b.d.	Redkiewicz i in., 2012 (81)
	IL-4	0,086% TSP	Patel i in., 2007 (78)
	IL-4	0,1% TSP	Ma i in., 2005 (61)
	IL-10	37 µg/g liści	Bortesi i in., 2009 (7)
	IL-10	0,27% TSP	Patel i in., 2007 (78)
	IL-12	40 ng·g^{-1}	Gutierrez-Ortega i in., 2004 (34)
	IL-13	0,15% TSP	Wang i in., 2008 (105)
	IL-18	0,051%	Zhang i in., 2003 (110)

Interleukiny

Ludzka interleukina IL-13 ma działanie plejotropowe, wywołując zarówno prozapalną, jak i przeciwzapalną odpowiedź immunologiczną (19). Możliwe jest jej wykorzystanie do leczenia wielu chorób m.in. cukrzycy typu I (T1DM) (99). Dotychczasowe, tradycyjne systemy pozyskiwania rekombinowanej IL-13 są mało wydajne (97). Dodatkowo IL-13 pozyskiwana z *E. coli* nie jest glikozylowana, przez co nienatywna, co oznacza konieczność wprowadzenia dodatkowych etapów jej obróbki: pakowanie do ciał inkluzyjnych, dodatkowe rozpuszczanie i renaturacja (97). Dodatkowe etapy powodują zwiększenie kosztów pozyskiwania tej cytokiny. Alternatywą może być wykorzystanie jako gospodarza do produkcji rekombinowanej IL-13, niskonikotynowej i niskoalkaloidowej odmiany tytoniu '81V9' (105). Ludzka IL-13 była tu produkowana w wielu formach molekularnych w ilości ok. 0,15% ogółu białek rozpuszczalnych. Różnorodne formy IL-13 wynikały z różnej glikozylacji N-końca białka. W testach laboratoryjnych polegających na trawieniu trypsyną, potwierdzono większą odporność glikozylowanych form IL-13 na trawienie, w stosunku do form nieglikozylowanych. Testy biologiczne prowadzone w warunkach *in vitro* wykazały, że zastosowanie uzyskanej w tytoniu IL-13, w hodowli czynnikozależnej ludzkiej erytroleukemicznej linii komórkowej, zachowuje funkcje biologiczne identyczne z autentyczną IL-13. Wyniki te sugerują, że wykorzystanie transgenicznego tytoniu do produkcji ludzkiej IL-13 jest bardziej odpowiednie niż konwencjonalnych systemów ekspresyjnych.

Interleukina IL-10 jest cytokiną o silnym działaniu przeciwzapalnym. Stosuje się ją w leczeniu chorób zapalanych i niektórych chorób autoimmunologicznych. W badaniach wykorzystano system ekspresji oparty zarówno na stałej ekspresji wynikającej z wbudowania genu kodującego IL-10 do genomu tytoniu jak też z systemu ekspresji tymczasowej. Zastosowano dwa rodzaje IL-10 – od myszy oraz bardzo zbliżoną do niej (wykazującą 84% identyczności sekwencji aminokwasowej) pochodzącą od wirusa Epsteina-Barr (7). W roślinach tytoniu zawartość IL-10 wynosiła odpowiednio 37 $\mu g \cdot g^{-1}$ i 10,8 $\mu g \cdot g^{-1}$ świeżej masy liści. Uzyskane interleukiny w obu przypadkach były zdolne aktywować ścieżkę sygnałową IL-10 oraz indukować specyficzną odpowiedź przeciwzapalną w makrofagach J744 myszy.

Hematopoetyny

Ludzka erytropoetyna (EPO) bierze udział w procesie powstawania erytrocytów, ale posiada również drugą aktywność – ochrony uszkodzonych tkanek poprzez hamowanie apoptozy, tłumienie stanów zapalnych, stymulację angiogenezy (28). Kanadyjscy badacze przy wykorzystaniu systemu tymczasowej ekspresji, wytworzyli w roślinach tytoniu zrekombinowaną ludzką erytropoetynę. Uzyskana była ona w ilości 0,05 % ogółu białek rozpuszczalnych. Wytworzona w ten sposób erytropoetyna wykazywała zwiększone powinowactwo do łączenia się z receptorem i była zdolna do ochrony komórek nabłonkowych nerki przed śmiercią indukowaną cytokinami (12).

W tytoniu uzyskano również czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF) (ang. *granulocyte, macrophage colony stimulating factor*). GM-CSF jest szeroko stosowaną cytokiną w leczeniu neutropenii, niedokrwistości aplastycznej oraz jest wykorzystywana w ograniczaniu infekcji po przeszczepie szpiku kostnego. Jej roczna produkcja wynosząca ok. 157 g była warta w 2003 r. 77 milionów USD (111). Badania dotyczące produkcji ludzkiego GM-CSF w systemach roślinnych prowadzone są już od kilku lat, głównie w hodowlach zawiesinowych komórek roślinnych. Niestety wydajność produkcji jest bardzo niska (41, 52, 89). Z h o u i i n. (111), wykorzystując jako wektor zmodyfikowany wirus PVX, niosący w swoim genomie gen kodujący GM-CSF, zakażając nim rośliny *N. benthamiana*, uzyskali zadowalającą wydajność produkcji tej glikoproteiny na poziomie 2% ogółu białek rozpuszczalnych. Zauważyli oni, że wiek liści znacząco wpływa na zawartość GM-CSF. W młodych liściach koncentracja GM-CSF była 2,6 razy większa. Aktywność biologiczna uzyskanego rekombinowanego ludzkiego GM-CSF została potwierdzona przez stymulację wzrostu ludzkich komórek TF-1.

Czynniki wzrostu

Kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF=FGF 1) (ang. *acidic fibroblast growth factor*) to cytokina produkowana w wielu narządach: mózgu, nerkach, siatkówce, mięśniach gładkich i komórkach śródbłonka (9). M a t s u o i i n. (68) zaproponowali wykorzystanie zmodyfikowanego wirusa mozaiki ogórkowej (CMV) (ang. *cucumber mosaic virus*) jako wektora niosącego gen kodujący aFGF. Genom tego wirusa stanowią 3 nici RNA (RNA 1-3). W cząsteczce RNA 2 zastąpiono gen kodujący białko 2a, fragmentem zawierającym miejsca restrykcyjne *Stu*I, *Mlu*I i *Spe*I, tworząc w ten sposób wektor C2-H1. Następnie gen aFGF umieszczono w wektorze C2-H1. Takim zmodyfikowanym wirusem sztucznie zakażano rośliny *N. benthamiana*. Zainfekowane rośliny wykazywały wysoki poziom produkcji aFGF, dochodzący aż do 8 % TSP.

Interferony

Interferony to grupa związków należących do cytokin, które hamują replikację wirusów i wzrost komórek oraz wzmacniają odpowiedź immuologiczną organizmu. Dlatego też znajdują szerokie zastosowanie w zwalczaniu zakażeń wirusowych. Interferony stanowią trzecią pod względem produkcji grupę biofarmacetyków, po insulinie i erytropoetynie. Niestety, średni roczny koszt leczenia jednego pacjenta zakażonego wirusem zapalenia wątroby typu C wynosi ok. 26000 USD, co mocno ogranicza ich stosowanie, szczególnie w krajach rozwijających się (3). W ostatnim czasie udało się uzyskać w roślinach tytoniu w pełni funkcjonalny ludzki interferon IFN-α2b. Gen kodujący interferon wprowadzano do DNA chloroplastowego. Uzyskano bardzo wysoką wydajność produkcji tego białka, wynoszącą do 20%

ogółu białek rozpuszczalnych, co w przeliczeniu dawało ok. 3 mg interferonu na 1 g świeżej masy liści tytoniu. Warto tu podkreślić, że doświadczenia te prowadzono w warunkach polowych (3).

Inne farmaceutyki

Kolagen jest szeroko stosowany w medycynie do wspomagania regeneracji tkanek. Tradycyjnie pozyskiwany jest z materiału zwierzęcego lub ze zwłok, ale niesie to ze sobą ryzyko ewentualnych niebezpieczeństw związanych z alergennością oraz zakażeniem patogenami. Ostatnio, do produkcji ludzkiego kolagenu typu I wykorzystano tytoń (94). W tym celu, do genomu tytoniu wprowadzono 2 ludzkie geny kodujące zrekombinowany heterotrimeryczny kolagen typu I (rhCOL1) oraz geny kodujące ludzkie enzymy: P4H (ang. *prolyl-4-hydroxylase*) i LH3 (ang. *lysyl hydroxylase 3*) – odpowiedzialne za kluczowe modyfikacje potranslacyjne. Uzyskany kolagen tworzył stabilne struktury potrójnych spirali i wykazywał biofunkcjonalność zbliżoną do ludzkiego kolagenu. Białka kolagenu stanowiły 2% TSP.

De Marchis i in. (16) wykorzystali tytoń do produkcji ludzkiej α-mannozydazy (MAN2B1). Niedobory tego enzymu powodują u ludzi α-mannozydozę, polegającą na gromadzeniu się oligosacharydów zawierających mannozę i objawiającą się nieprawidłowościami w budowie szkieletu, cechami dysmorficznymi twarzy, upośledzeniem słuchu i opóźnieniem umysłowym. Produkowany enzym był glikozylowany, a wydajność osiągnęła 10,2 jednostki na gram świeżych liści.

Innym przykładem wykorzystania tytoniu do produkcji biofarmacetyków jest pozyskiwanie ludzkiej somatotropiny (hST) (ang. *human somatotropin*) (93). Somatotropina jest hormonem wzrostu produkowanym przez przysadkę. Wytworzone białko wykazywało prawidłową aktywność biologiczną oraz posiadało prawidłową konformację przestrzenną z wytworzonymi mostkami dwusiarczkowymi. Wykorzystanie transplastomicznego systemu ekspresji pozwoliło osiągnąć dużą wydajność produkcji białka – 7% TSP. Podobny gen przeniesiony do genomu jądrowego pozwolił już tylko na 300-krotnie niższą produkcję tego białka.

Wytwarzanie biopolimerów i enzymów

Tytoń coraz częściej zaczyna być wykorzystywany nie tylko do produkcji biofarmaceutyków, ale również biopolimerów, enzymów bakteryjnych lub grzybowych. Przykładem może być uzyskiwanie polihydroksyalkanolanów (PHA) (74). Związki te należą do grupy alifatycznych poliestrów pochodzenia mikrobiologicznego, będących odnawialnym źródłem biodegradowalnych termoplastików. Znajdują zastosowanie m.in. do produkcji implantów. Konstrukcjami zawierającymi geny $phaA_{Re}$, $phaB_{Re}$ pochodzące od *Ralstonia eutropha* i $phaC_{Ac}$ z *Aeromonas caviae* transformowano jądra komórkowe tytoniu. W efekcie transgeniczny tytoń produkował PHA w ilości dochodzącej do 1500 ppm.

Podejmowane są również kroki w celu wykorzystania tytoniu do produkcji celulazy, która byłaby stosowana do uzyskiwania bioetanolu na cele energetyczne. Celuloza jest jednym z najliczniej występujących związków organicznych. W formie nieprzetworzonej znajduje zastosowanie w przemyśle papierniczym i tekstylnym. Celuloza może jednak znaleźć zastosowanie jako substrat do produkcji etanolu. Obecnie enzym celulaza wykorzystywany do hydrolizy celulozy w procesie produkcji etanolu pozyskuje się z grzyba *Trichoderma reesei*. Pozyskiwana w ten sposób celulaza jest droga, a jej produkcja mało wydajna. J i n i i n. (42), chcąc obniżyć koszty jej wytwarzania, transformowali rośliny tytoniu wprowadzając do ich genomu gen e1, kodujący domenę katalityczną termotolerancyjnej celulazy endo-1,4-β-D glukanazy E1 z *Acidothermus cellulolyticus.* Poddany transformacji tytoń wykazywał wysoki poziom produkcji celulazy.

Bardzo ciekawy jest również pomysł wykorzystania tytoniu do produkcji włókien nici pajęczej. Włókna takie cechuje duża wytrzymałość połączona z elastycznością, przez co znalazłyby one zastosowanie w produkcji sztucznych ścięgien i więzadeł, podłoży komórkowych dla kości i chrząstek, a także implantów i biodegradowalnych mikroszwów. M e n a s s a i i n. (71) transformowali tytoń kostruktami zawierającymi geny MaSp1 i MaSp2, pochodzące od *Nephila clavipes*. W konstruktach zastosowano dwa różne promotory: wzmocniony CaMV 35S oraz nowy tCUP. Obydwa geny z powodzeniem ulegały ekspresji, co w efekcie prowadziło do wytworzenia odpowiednich białek nici pajęczej.

Tabela 4

Przykłady biomateriałów i enzymów uzyskanych w tytoniu

Produkt	Użyty gen	Maks. zawartość	Literatura
Bioelastyczny polimer białkowy (PBP)	*aad*A, EG121	b.d.	Guda i in., 2000 (33)
Ksylanaza	*xyn*Z	25,5 $\mu g \cdot g^{-1}$	Chatterjee i in., 2010 (10)
Ksylanaza	*xyn*A	6% TSP	Leelavathi i in., 2003b (54)
Monelina – słodkie białko	Mon	1,3% TSP	Roh i in., 2006 (83)
Polihydroksyalkanolany (PHA)	*ubi*C	26,5% TSP	Viitanen i in., 2004 (103)
Polihydroksyalkanolany (PHA)	*pha*A, *phb*B, *phb*C	1500 ppm	Nakashita i in., 2001 (74)
Polihydroksymaślan (PHB)	*phb*A, *phb*B, *phb*C	1,7 % TSP	Lössl i in., 2003 (55)

Wykorzystanie w ochronie środowiska

Zdegradowane, zanieczyszczone tereny stanowią obecnie duży problem. Dotychczas stosowane fizykochemiczne metody remediacji są kosztowne, zaś fitoremediacja jest przyjazną dla środowiska, potencjalnie efektywniejszą i tańszą metodą oczyszczania gleby z zanieczyszczeń niż metody tradycyjne (1). Niektóre rośliny mają naturalną

zdolność do pobierania zanieczyszczeń z gleby i ich degradacji (przekształcania) w mniej toksyczne substancje. W celu zwiększenia stopnia naturalnej remediacji możliwe jest umieszczenie w genomie roślin genów bakteryjnych odpowiedzialnych za oczyszczanie gleby z niektórych zanieczyszczeń, takich jak rtęć, czy 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT) (materiał wybuchowy).

Zanieczyszczenia rtęcią spowodowane są głównie przez związki metaloorganiczne – odpady z rolnictwa, górnictwa i przemysłu. Niektóre bakterie Gram-ujemne posiadają zdolność do detoksykacji związków metaloorganicznych przez konwersję metylowanej rtęci do rtęci metalicznej, która jest mniej toksyczną formą (95). Geny biorące udział w detoksyfikacji rtęci to: *mer*A i *mer*B. Gen *mer*B koduje liazę odpowiedzialną za rozrywanie wiązań C-Hg, co prowadzi do uwalniania jonów Hg^{2+}. Gen *mer*A koduje reduktazę, która przekształca jony Hg^{2+} do formy metalicznej Hg^0 (95). A b d e l R a h m a n i i n. (1) transformowali tytoń odmiany Gold Leaf za pomocą *Agrobacterium,* niosącą plazmid Ti zawierający geny *mer*A i *mer*B. Odporność na związki rtęci testowano na podłożach zawierających fenylooctan rtęciowy (PMA) (ang. *phenyl mercuric acetate*) i chlorek rtęci (II) $HgCl_2$. Transgeniczny tytoń charakteryzował się długością korzeni i suchą masą korzeni odpowiednio 60 i 17 razy większą w stosunku do tytoniu nietransformowanego, co umożliwia lepsze pobieranie składników, w tym większej ilości związków rtęci i kumulowanie ich w roślinie (1).

Transgeniczny tytoń może być użyty także do fitoremdiacji terenów skażonch materiałami wybuchowymi. Trotyl (TNT) jest jednym z najbardziej toksycznych matriałów wybuchowych. Gram-ujemna bakteria *Enterobacter cloacae* jest zdolna do degradacji trotylu (5). Gen *nsfI* wyizolowany z *E. cloacae* koduje enzym nitroreduktazę (NR), który jest odpowiedzialny za redukcję grup nitrozowych trotylu, co w efekcie prowadzi do wytworzenia hydroksyaminodinitrotoluenu i aminodinitrotoluenu (24). H a n n i n k i i n. (35) przenieśli bakteryjny gen *nsfI* do tytoniu. Transgeniczny tytoń tolerował stężenie trotylu do 0,5 mM, co jest jednocześnie granicą rozpuszczalności trotylu w wodzie. W innych badaniach tytoń był transformowany konstruktem zawierającym gen *onr,* również pochodzący od *E. cloacae*. Gen ten koduje reduktazę tetraazotanu (V) pentaerytrytu (PETN) (25). Reduktaza PETN redukuje PETN i nitroglicerynę do azotynów. Transgeniczny tytoń wzrastał na podłożu zawierającym 1 mM nitrogliceryny, co było toksycznym stężeniem dla tytoniu nietrasformowanego. Dowiedziono, że transgeniczny tytoń zawierający geny nitroreduktazy (NR) i reduktazy PETN, nie tylko tolerują wysokie stężenia trotylu, nitrogliceryny i tetraazotanu (V) pentaerytrytu, ale również pobierają go z podłoża i degradują, czyniąc fitodetoksyfikację możliwą do zastosowania w oczyszczaniu terenów zanieczyszczonych materiałami wybuchowymi

Podsumowanie

Rośliny to skuteczne i wydajne zielone bioreaktory, użyteczne do produkcji rekombinowanych białek w celach medycznych, przemysłowych oraz dla potrzeb ochrony środowiska. Roślinne systemy ekspresji są alternatywą dla obecnie powszechnie stosowanych, tradycyjnych systemów opartych na hodowlach bakterii lub grzybów. Wśród roślinnych systemów ekspresyjnych, tytoń wyróżnia się łatwością we wprowadzaniu obcych genów oraz dużą produkcją biomasy. Przy dalszym dynamicznym rozwoju biotechnologii, tytoń może stać się rośliną, która nie będzie kojarzona z dymem papierosowym, ale będzie poprawiać jakość naszego życia życia

Literatura

1. Abdel Rahman R. A., Abou-Shanab R. A., Moawad H.: Mercury detoxification using genetic engineered *Nicotiana tabacum*. Global NEST Journal, 2008, **10(3)**: 432-438.
2. Almquist K. C., McLean M. D., Niu Y. Q., Byrne G., Olea-Popelka F. C., Murrant C.: Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco. Vaccine, 2006, **24**: 2079-2086.
3. Arlen P. A., Falconer R., Cherukumilli S., Cole A., Cole A. M., Oishi K. K., Daniell H.: Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-α2b. Plant Biotechnol. J., 2007, **5(4)**: 511-525.
4. Biemelt S., Sonnewald U., Galmbacher P., Willmitzer L., Muller M.: Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. J. Virology, 2003, **77(17)**: 9211-9220.
5. Binks P. R., French C. E., Nicklin S., Bruce N. C.: Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62(4)**: 1214-1219.
6. Birch-Machin I., Newell C. A., Hibberd J. M., Gray J. C.: Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. Plant Biotechnol. J., 2004, **2**: 261-270.
7. Bortesi L., Rossato M., Schuster F., Raven N., Stadlmann J., Avesani L., Falorni A., Bazzoni F., Bock R., Schillberg S., Pezzotti M.: Viral and murine interleukin-10 are correctly processed and retain their biological activity when produced in tobacco. BMC Biotechnology, 2009, **9**: 22.
8. Brodzik R., Głogowska M., Bandurska K., Okulicz M., Deka D., Ko K.: Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, **103**: 8804-8809.
9. Burgess W. H., Maciag T.: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. Ann. Rev. Biochem., 1989, **58**: 575-606.
10. Chatterjee A., Das N. C., Raha S., Babbit R., Huang Q., Zaitlin D., Maiti I. B.: Production of xylanase in transgenic tobacco for industrial use in bioenergy and biofuel applications. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 2010, **46(2)**: 198-209.
11. Chebolu S., Daniell H.: Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. Plant Biotechnol. J., 2007, **5**: 230-239.

12. Conley A. J., Mohib K., Jevnikar A. M., Brandle J. E.: Plant recombinant erythropoetin attenuates inflammatory kidney cell injury. Plant Biotechnol. J., 2009, **7(2)**: 183-199.
13. Daniell H., Lee S. B., Panchal T., Wiebe P. O.: Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. J. Mol. Biol., 2001, **311**: 1001-1009.
14. Daniell H., Carmona-Sanchez O., Burns B.: Chloroplast-derived antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines. w: Fischer R., Schillberg S. Molecular Farming. Verlag Publishers, Weinheim, Germany, 2004: 113-133.
15. Davoodi-Semiromi A., Schreiber M., Nalapalli S., Verma D., Singh N. D., Banks R. K., Chakrabarti D., Daniell H.: Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. Plant Biotechnol. J., 2010, **8**: 223-242.
16. DeMarchis F., Balducci C., Pompa A., Riise Stensland H. M., Guaragno M., Pagiotti R., Menghini A. R., Persichetti E., Beccari T., Bellucci M.: Human α-mannosidase produced in transgenic tobacco plants is processed in human α-mannosidosis cell lines.Plant Biotechnol. J., 2011, **9(9)**: 1061-1073.
17. De Muynck B., Navarre C., Nizet Y., Stadlmann J., Boutry M.: Different subcellular localization and glycosylation for a functional antibody expressed in *Nicotiana tabacum* plants and suspension cells. Transgenic Research, 2009, **18(3)**: 467-482.
18. Desai P. N., Shrivastava N., Padh H.: Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. Biotechnology Advances, 2010, **28**: 427-435.
19. Eisenmesser E. Z., Kapust R. B., Nawrocki J. P., Mazzulla M. J., Pannell L. K., Waugh D. S., Byrd R. A.: Expression, purification, refolding, and characterization of recombinant human interleukin-13: utilization of intracellular processing. Protein Expression and Purification, 2000, **20(2)**: 186-195.
20. Farrance C. E., Chichester J. A., Musiychuk K., Shamloul M., Rhee A., Manceva S. D., Jones R. M., Mamedov T., Sharma S., Mett V., Streatfield S. J., Roeffen W., Vegte-Bolmer M. V., Sauerwein R. W., Wu Y., Muratova O., Miller L., Duffy P., Sinden R., Yusibov V.: Antibodies to plant-produced Plasmodium falciparum sexual stage protein Pfs25 exhibit transmission blocking activity. Human Vaccines, 2011, **7**(Supplement): 191-198.
21. Fernández-San Millán A., Ortigosa S. M., Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J. M., Gaétan J., Coursaget P., Veramendi J.: Human papilloma virus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Plant Biotechnol. J., 2008, **6(6)**: 427-441.
22. Floss D. M., Sack M., Arcalis E., Stadlmann J., Quendler H., Rademacher T., Stoger E., Scheller J., Fischer R., Conrad U.: Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. Plant Biotechnol. J., 2009, **7**: 899-913.
23. Floss D. M., Mockey M., Zanello G., Brosson D., Diogon M., Frutos R., Bruel T., Rodrigues V., Garzon E., Chevaleyre C., Berri M., Salmon H., Conrad U., Dedieu L.: Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, Article ID: 274346.
24. French C. E., Nicklin S., Bruce N. C.: Aerobic degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64(8)**: 2864-2868.

25. French C. E., Rosser S., Davies G. J., Nicklin S., Bruce N. C.: Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. Nature Biotechnology, 1999, **17(5)**: 491-494.
26. Galeffi P., Lombardia A., Di Donatoa M., Latinia A., Sperandeia M., Cantalea C., Giacominib P.: Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. Vaccine, 2005, **23(15)**: 1823-1827.
27. Galeffi P., Lombardi A., Pietraforte I., Novelli F., Di Donato M., Sperandei M., Tornambé A., Fraioli R., Martayan A., Natali P. G., Benevolo M., Mottolese M., Ylera F., Cantale C., Giacomini P.: Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. Journal of Translational Medicine, 2006, **4**: 39.
28. Ghezzi P., Brines M.: Erythropoetin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. Cell Death Differ., 2004, **11**(Suppl. 1): S37-S44.
29. Girard L. S., Fabis M. J., Bastin M., Courtois D., Petiard V., Koprowski H.: Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, **345**: 602-607.
30. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S.: Magnifection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Vaccine, 2005, **23**: 2042-2048.
31. Golovkin M., Spitsin S., Andrianov V., Smirnov Y., Xiao Y., Pogrebnyak N., Markley K., Brodzik R., Gleba Y., Isaacs S. N., KoprowskiH.: Smallpox subunit vaccine produced in planta confers protection in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, **104(16)**: 6864-6869.
32. Gołąb J., Jakóbisiak M., Zagożdżon R., Obłąkowski P.: Cytokiny, w: Jakóbisiak M., Gołąb J., Lasek W. (red) Immunologia. PWN: Warszawa, 2004, 198-224.
33. Guda C., Lee S. B., Daniell H.: Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts. Plant Cell Rep., 2000, **19**: 257-262.
34. Gutierrez-Ortega A., Avila-Moreno F., Saucedo-Arias L. J., Sanchez-Torres C., Gomez-Lim M. A.: Expression of a single-chain human interleukin-12 gene in transgenic tobacco plants and functional studies. Biotechnol. Bioeng., 2004, **85**: 734-740.
35. Hannink N., Rosser S. J., French C. E., Basran A., Murray J. A. H., Nicklin S., Bruce N. C.: Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. Nature Biotechnology, 2001, **19(12)**: 1168-1172.
36. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K.: Production of antibodies in transgenic plants. Nature, 1989, **342**: 76-78.
37. Hong S-Y., Kwon T-H., Lee J-H., Jang Y-S., Yang M-S.: Production of biologically active hG-CSF by transgenic plant cell suspension culture. Enzyme and Microbial Technology, 2002, **30**: 762-767.
38. Horn M. E., Woodard S. L., Howard J. A.: Plant molecular farming: systems and products. Plant Cell Rep., 2004, **22**: 711-720.
39. Huang Y., Liang W., Pan A., Zhou Z., Huang C., Chern, J., Zhang D.: Production of FaeG, the major subunit of K88 fimbriae, in transgenic tobacco plants and its immunogenicity in mice. Infection and Immunity, 2003, **71(9)**: 5436-5439.
40. Hull A. K., Criscuolo C. J., Mett V., Groen H., Steeman W., Westra H.: Human-derived, plant-produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax. Vaccine, 2005, **23**: 2082-2086.
41. James E. A., Wang C., Wang Z., Reeves R., Shin J. H., Magnuson N. S., Lee J. M.: Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. Protein Expression Purification, 2000, **19**:131-138.
42. Jin, R., Richter S., Zhong R., Lamppa G. K.: (2003). Expression and import of an active cellulase from a thermophilic bacterium into the chloroplast both *in vitro* and *in vivo*. Plant Molecular Biology, 2003, **51(4)**: 493-507.

43. Johansen F. E., Pekna M., Norderhaug I. N., Haneberg B., Hietala M. A., Krajci P.: Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. J. Exp. Med., 1999, **190**: 915-922.
44. Judge N. A., Mason H. S., O'Brien A. D.: Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces times of Escherichia coli O157:H7 shedding in feces. Infection and Immunity, 2004, **72(1)**: 168-175.
45. Kang T-J, Seo J-E, Kim D-H: Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. Protein Expr. Purif., 2005, **41**: 378-383.
46. Khandelwal A., Sita G. L., Shaila M. S.: Expression of hemagglutinin protein of rinderpest virus in transgenic tobacco and immunogenicity of plant-derived protein in a mouse model. Virology, 2003, **308(2)**: 207-215.
47. Ko K., Tekoah Y., Rudd P. M., Harvey D. J., Dwek R. A., Spitsin S., Hanlon C. A., Rupprecht C., Dietzschold B., Golovkin M., Koprowski H.: Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, **100(13)**: 8013-8018.
48. Ko K., Steplewski Z., Glogowska M., Koprowski H.: Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, **102**: 7026-7030.
49. Kohl T., Hitzweoth I. I., Stewart D., Varsani A., Govan V. A., Christens en N. D., Williamson A. L., Rybicki E. P.: Plant-produced cottontail rabbit papillomavirus L1 protein protects against tumor challenge: a proof of concept study. Clinical and Vaccine Immunology., 2006, **13(8)**: 845-853.
50. Koya V., Moayeri M., Leppla S. H., Daniell H.: Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. Infect. Immun., 2005, **73**: 8266-8274.
51. Kruszewski W. J., Rzepko R., Warężak C., Zieliński J., Jastrzębski T., Kopacz A., Jaśkiewicz K.: Brak przydatności klinicznej wspólnego oznaczania białek: c-erbB2 i p53 w raku jelita grubego. Nowotwory. Journal of Oncology, 2006, **56(4)**: 436-441.
52. Lee J. H., Kim N. S., Kwon T. H., Jang Y. S., Yang M. S.: Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. J. Biotechnol., 2002, **96**: 205-211.
53. Leelavathi S., Reddy V. S.: Chloroplast expression of His-tagged GUSfusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. Mol. Breed., 2003a, **11**: 49-58.
54. Leelavathi S., Gupta N., Maiti S., Ghosh A., Reddy V. S.: Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. Mol. Breed., 2003b, **11**: 59-67.
55. Lössl A., Eibl C., Harloff H. J., Jung C., Koop H. U.: Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. Plant Cell Rep., 2003, **21**: 891-899.
56. Lentz E. M., Segretin M. E., Mauro M., Wirth S. A., Mozgovoj M. V., Wigdorovitz A., Bravo-Almonacid F. F.: High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants. Planta, 2010, **231(2)**: 387-395.
57. Levy Y.: Cytokine therapies in HIV infection. Med. Sci., 2006, **22**: 751-754.
58. Ma J. K. C., Hiatt A., Hein M., Vine N. D., Wang F., Stabila P.: Generation and assembly of secretory antibodies in plants. Science, 1995, **268**: 716-719.
59. Ma J. K. C., Hikmat B. Y., Wycoff K., Vine N. D., Chargelegue D., Yu L.: Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. Nat. Med., 1998, **4**: 601-606.

60. Ma J. K. C., Drake P. M. W., Christou P.: The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nat. Rev. Genet., 2003, **4**: 794-805.
61. Ma S., Huang Y., Davis A., Yin Z., Mi Q., Menassa R., Brandle J. E., Jevnikar A. M.: Production of biologically active human interleukin-4 in transgenic tobacco and potato. Plant Biotechnol. J., 2005, **3**: 309-318.
62. Makvandi-Nejad S., McLean M. D., Hirama T., Almquist K. C., Mac-Kenzie C. R., Hall J. C.: Transgenic tobacco plants expressing a dimeric single-chain variable fragment (scFv) antibody against *Salmonella enterica* serotype paratyphi B. Transgenic Res., 2005, **14**: 785-792.
63. Malabadi R. B., Ganguly A., Teixeira da Silva J. A., Parashar A., Suresh M. R., Sunwoo H. H.: Overview of plant-derived vaccine antigens: Dengue virus. J. Pharm. and Pharmaceutical Sci., 2011 **14(3)**: 400-413.
64. Maliga P.: Plastid transformation in higher plants. Ann. Rev. Plant Biol., 2004, **55**: 289-313.
65. Marusic C., Nuttall J., Buriani G., Lico C., Lombardi R., Baschieri S.: Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. BMC Biotechnol., 2007, **7**: 12.
66. Mason H. S., Ball J. M., Jian-Jian Shi, Jiang X., Estes M. K., Arntzen C. J.: Expression of Norwalk Virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1996, **93**: 5335-5340.
67. Matsumoto S., Ikura K., Ueda M., Sasaki R.: Characterization of a human glycoprotein (erythropoetin) produced in cultured tobacco cells. Plant. Mol. Biol., 1995, **27**: 1163-1172.
68. Matsuo K., Hong J-S, Tabayashi N., Ito A., Masuta C., Matsumura T.: Development of *Cucumber mosaic virus* as a vector modifiable for different host species to produce therapeutic proteins. Planta, 2007, **225(2)**: 277-286.
69. McCormick A. A., Reinl S. J., Cameron T. I., Vojdani F., Fronefield M., Levy R., Tusé D.: Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotype responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. J. Immunological Methods, 2003, **278(1-2)**: 95-104.
70. McCormick A. A., Reddy S., Reinl S. J., Cameron T. I., Czerwinski D. K., Vojdani F.: Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, **105**: 10131-10136.
71. Menassa R., Zhu H., Karatzas C. N., Lazaris A., Richman A., Brandle J.: Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. Plant Biotechnol. J., 2004, **2(5)**: 431-438.
72. Molina A., Hervas-Stubbs S., Daniell H., Mingo-Castel A. M., Veramendi J.: High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. Plant Biotechnol. J.: 2004, **2**: 141-153.
73. Molina A., Veramendi J., Hervas-Stubbs S.: Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. Virology, 2005, **342(2)**: 266-275.
74. Nakashita H., Arai Y., Suzuki Y., Yamaguchi I.: Molecular breeding of transgenic tobacco plants which accumulate polyhydroxyalkanoates. Riken Review, 2001, **42**: 67-70.
75. Nianiou I., Kalantidis K., Madesis P., Georgopoulou U., Mavromara P., Tsaftaris A.: Expression of an HCV core antigen coding gene in tobacco (*N. tabacum* L.). Prep. Biochem. Biotechnol., 2008, **38**: 411-421.
76. Papaetis G. S., Karapanagiotou L. M., Pandha H., Syrigos K. N.: Targeted therapy for advanced renal cell cancer: cytokines and beyond. Curr. Pharm. Des., 2008, **14**: 2229-2251.

77. Parkin J., Cohen B.: An overview of the immune system. Lancet, 2001, **357**: 1777-1789.
78. Patel J., Zhu H., Menassa R., Gyenis L., Richman A., Brandle J.: Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. Transgenic Res., 2007, **16**: 239-249.
79. Phoolcharoen W., Bhoo S. H., Lai H., Ma J., Arntzen C. J., Chen Q., Mason H. S.: Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. Plant Biotechnol. J., 2011, **9**: 807-816.
80. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R.: Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, **102**: 9062-9067.
81. Redkiewicz P., Więsyk A., Góra-Sochacka A., Sirko A.: Transgenic tobacco plants as production platform for biologically active human interleukin 2 and its fusion with proteinase inhibitors. Plant Biotechnol. J., doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00698.x., 2012 (w druku).
82. Rodriguez M., Ramirez N. I., Ayala M., Freyre F., Perez L., Triguero A.: Transient expression in tobacco leaves of an aglycosylated recombinant antibody against the epidermal growth factor receptor. Biotechnol. Bioeng., 2005, **89**: 188-94.
83. Roh K. H., Shin K. S., Lee Y. H., Seo S. C., Park H. G., Daniell H., Lee S. B.: Accumulation of sweet protein monellin is regulated by the psbA 5'UTR in tobacco chloroplasts. J. Plant Biol., 2006, **49**: 34-43.
84. Ruhlman T., Ahangari R., Devine A., Samsam M., Daniell H.: Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts – oral administration protects against development of insulitis in non-obese diabetic mice. Plant Biotechnol. J., 2007, **5**: 495-510.
85. Rymerson R. T., Babiuk L., Menassa R.: Immunogenicity of the capsid protein VP2 from porcine parvovirus expressed in low alkaloid transgenic tobacco. Mol. Breed., 2003, **11**: 267-276.
86. Sack M., Paetz A., Kunert R., Bomble M., Hesse F., Stiegler G.: Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HI V-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. Faseb J., 2007, **21**: 1644-1655.
87. Sala F., Riganoa M. M., Barbantea A., Bassoa B., Walmsleyb A., Castiglione S.: Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. Vaccine, 2003, **21(7-8)**: 803-808.
88. Sardana R. K., Alli Z., Dudani A., Tackaberry E., Panahi M., Narayanan M., Ganz P., Altosaar I.: Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide. Transgenic Res., 2002, **11**: 521-531.
89. Shin Y. J., Hong S. Y., Kwon T. H., Jang Y. S., Yang M. S.: High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. Biotechnol. Bioeng., 2003, **82**: 778-783.
90. Shoji Y., Chichester J. A., Bi H., Musiychuk K., de la Rosa P., Goldschmidt L., Horsey A., Ugulava N., Palmer G. A., Mett V., Yusibov V.: Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate. Vaccine, 2008, **26(23)**: 2930-2934.
91. Shoji Y., Chichester J. A., Jones M., Manceva S. D., Damon E., Mett V., Musiychuk K., Bi H., Farrance C., Shamloul M., Kushnir N., Sharma S., Yusibov V.: Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza. Human Vaccine, 2011, **7** (Supplement): 41-50.
92. Souriau C., Hudson P. J.: Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. Expert Opin. Biol. Ther., 2003, **3**: 305-318.

93. Staub J. M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P. T. J., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J. A., Spatola L.: High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. Nat. Biotechnol., 2000, **18**: 333-338.
94. Stein H., Wilensky M., Tsafrir Y., Rosenthal M., Amir R., Avraham T., Ofir K., Dgany O., Yayon A., Shoseyov O.: Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco. Biomacromolecules, 2009, **10(9)**: 2640-2645.
95. Summers A. O.: Organization, expression and evolution of genes for mercury resistance. Ann. Rev. Microbiol., 1986, **40**: 607-634.
96. Thanavala Y., Yang Y. F., Lyons P., Mason H. S., Arntzen C.: Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis-B surface-antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, **8(92)**: 3358-3361.
97. Thompson J. P., Dębiński W.: Mutants of interleukin 13 with altered reactivity toward interleukin 13 receptors. J Biol. Chem., 1999, **274**: 29944-29950.
98. Tregoning J. S., Nixon P., Kuroda H., Svab Z., Clare S., Bowe F., Fairweather N., Ytterberg J., Van Wijk K. J., Dougan G.: Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. Nucleic Acids Res., 2003, **31**: 1174-1179.
99. Tremblay R., Wang D., Jevnikar A. M., Ma S.: Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. Biotechnology Advances, 2010, **28**: 214-221.
100. Tuboly T., Yu W., Bailey A., Degrandis S., Du S., Erickson L., Nagy E.: Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. Vaccine, 2000, **18**: 2023-2028.
101. van Dolleweerd C. J., Chargelegue D., Ma J. K. C.: Characterization of the conformational epitope of Guy's 13, a monoclonal antibody that prevents *Streptococcus mutans* colonization in humans. Infection and Immunity, 2003, **71(2)**: 754-765.
102. Vermij P., Waltz E.: USDA approves the first plant-based vaccine. Nat. Biotechnol., 2006, **24**: 233-234.
103. Viitanen P. V., Devine A. L., Khan M. S., Deuel D. L., Van Dyk D. E., Daniell H.: Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Escherichia coli* ubiC gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for p-hydroxybenzoic acid biosynthesis. Plant Physiol., 2004, **136**: 4048-4060.
104. Villani M. E., Morgun B., Brunetti P., Marusic C., Lombardi R., Pisoni I.: Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. Plant Biotechnol. J., 2009, **7**: 59-72.
105. Wang D. J., Brandsma M., Yin Z., Wang A., Jevnikar A. M., Ma S.: A novel platform for biologically active recombinant human interleukin-13 production. Plant Biotechnol. J., 2008, **6**: 504-515.
106. Watson J., Koya V., Leppla S. H., Daniell H.: Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a nonfood/feed crop. Vaccine, 2004, **22**: 4374-4384.
107. Webster D. E., Wang L., Mulcair M., Ma Ch., Santi L., Mason H. S., Wesselingh S. L., Ross L., Coppel R. L.: Production and characterization of an orally immunogenic Plasmodium antigen in plants using a virus-based expression system. Plant Biotechnol. J., 2009, **7(9)**: 846–855.
108. Weigert C., Rocken M., Ghoreschi K.: Interleukin 4 as a potential drug candidate for psoriasis. Expert Opin. Drug Discov., 2008, **3**: 357-368.
109. Zhang G. G., Rodrigues L., Rovinski B., White K. A.: Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants. Mol. Biotechnol., 2002, **20**: 131-136.

110. Zhang B, Yang Y. H., Lin Y. M., Rao Q., Zheng G. G., Wu K. F.: Expression and production of bioactive human interleukin-18 in transgenic tobacco plants. Biotechnol. Lett., 2003, **25**: 1629-1635.
111. Zhou F., Wang M., Albert H. H., Moore P., Zhu Y. J.: Efficient transient expression of human GM-CSF protein in *Nicotiana benthamiana* using potato virus X vector. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, **72**: 756-762.

Adres do korespondencji

dr Marcin Przybyś
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 297
e-mail: mprzybys@iung.pulawy.pl

W serii wydawniczej **„RAPORTY PIB”**, a od 2007 r. **„STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB”** ukazały się następujące pozycje:

1. *Wybrane aspekty agrochemicznych badań gleby.* Puławy, 2006.
2. *Zasady wprowadzania nawozów do obrotu.* Puławy, 2006.
3. *Regionalne zróżnicowanie produkcji rolniczej w Polsce*. Puławy, 2006.
4. *Monitoring skutków środowiskowych planu rozwoju obszarów wiejskich.* Puławy, 2007.
5. *Sprawdzenie przydatności wskaźników do oceny zrównoważonego gospodarowania zasobami środowiska rolniczego w wybranych gospodarstwach, gminach i województwach.* Puławy, 2007.
6. *Możliwości rozwoju rolnictwa ekologicznego w Polsce.* Puławy, 2007.
7. *Współczesne uwarunkowania organizacji produkcji w gospodarstwach rolniczych.* Puławy, 2007.
8. *Efektywne i bezpieczne metody regulacji zachwaszczenia, nawożenia i uprawy roli.* Puławy, 2007.
9. *Wybrane elementy technologii produkcji roślinnej.* Puławy, 2007.
10. *Problem erozji gleb w procesie przemian strukturalnych na obszarach wiejskich.* Puławy, 2008.
11. *Uprawa roślin energetycznych a wykorzystanie rolniczej przestrzeni produkcyjnej w Polsce.* Puławy, 2008.
12. *Wybrane zagadnienia systemów informacji przestrzennej i obszarów problemowych rolnictwa w Polsce*. Puławy, 2008.
13. *Tworzenie postępu biologicznego w hodowli tytoniu i chmielu.* Puławy, 2008.
14. *Kierunki zmian w produkcji roślinnej w Polsce do roku 2020.* Puławy, 2009.
15. *Wybrane elementy regionalnego zróżnicowania rolnictwa w Polsce.* Puławy, 2009.
16. *Systemy wspomagania decyzji w zrównoważonej produkcji roślinnej.* Puławy, 2009.
17. *Stan i kierunki zmian w produkcji rolniczej (wybrane zagadnienia).* Puławy, 2009.
18. *Produkcyjne i środowiskowe aspekty współczesnych metod nawożenia i regulacji zachwaszczenia.* Puławy, 2009.
19. *Oddziaływanie rolnictwa na środowisko przyrodnicze w warunkach zmian klimatu.* Puławy, 2010.
20. *Ocena zrównoważenia gospodarowania zasobami środowiska rolniczego w wybranych gospodarstwach, gminach, powiatach i województwach.* Puławy, 2010.
21. *Możliwości rozwoju obszarów problemowych rolnictwa (OPR) w świetle PROW 2007–2013.* Puławy, 2010.
22. *Możliwości rozwoju gospodarstw o różnych kierunkach produkcji rolniczej w Polsce.* Puławy, 2010.
23. *Związki fitogeniczne jako naturalna alternatywa antybiotykowych promotorów wzrostu.* Puławy, 2010.
24. *Wybrane aspekty przemian strukturalnych na obszarach wiejskich*. Puławy, 2010.
25. *Stan obecny i perspektywy nawożenia roślin w Polsce w aspekcie regulacji prawnych.* Puławy, 2010.
26. *Stan obecny i perspektywy rozwoju rolnictwa ekologicznego w Polsce.* Puławy, 2010.
27(1). *Środowiskowe skutki działalności rolniczej i wdrażania PROW na obszarach problemowych rolnictwa.* Puławy, 2011.
28(2). *Techniki i technologie stosowane w produkcji roślinnej a środowisko przyrodnicze.* Puławy, 2012.
29(3). *Problemy zrównoważonego gospodarowania w produkcji rolniczej*. Puławy, 2012.
30(4). *Doskonalenie integrowanych technologii produkcji zbóż jarych i roślin pastewnych ze szczególnym uwzględnieniem początkowych elementów agrotechniki*. Puławy, 2012.

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

W serii wydawniczej **„STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB"** publikowane są recenzowane prace z zakresu agronomii i kształtowania środowiska rolniczego, wykonane w ramach zadań programów wieloletnich pn. „Kształtowanie środowiska rolniczego Polski oraz zrównoważony rozwój produkcji rolniczej" (2005-2010) oraz „Wspieranie działań w zakresie kształtowania środowiska rolniczego i zrównoważonego rozwoju produkcji rolniczej w Polsce" (2011-2015). W zeszytach problemowych o charakterze monografii, wydawanych w ramach tej serii, mogą być zamieszczane również prace autorów spoza IUNG-PIB, które merytorycznie mieszczą się w tematyce zadań programu wieloletniego. **Publikowane są prace problemowe, głównie mające charakter przeglądowy, z podkreśleniem znaczenia omawianych zagadnień dla rolnictwa polskiego.**

Wydruk tekstu do recenzji:
czcionka 12 p., z odstępem 1,5-wierszowym.

Przygotowanie do druku:
–tekst i tabele w programie Word, wersja 6.0 lub wyższa
–czcionka – Times New Roman
–układ pracy: wstęp, wyniki i dyskusja bądź omówienie wyników, podsumowanie, literatura

tekst
–czcionka – 11 p. (spis pozycji literatury – 9 p.)
–wcięcie akapitowe – 0,5 cm

tabele
–podział na wiersze i kolumny (z funkcji tworzenia tabel)
–szerokość dokładnie 13 cm (tabele w pionie) lub 19 cm (tabele w poziomie)
–czcionka 9 p., pojedyncze odstępy międzywierszowe
–umieszczone w oddzielnych plikach
–pod tabelą przypis ze wskazaniem źródła danych (autorstwa)

rysunki
–czarno-białe
–wykresy w programie Word lub Excel
–wymiary w zakresie 13 cm × 19 cm
–w podpisach czcionka 9 p.
–na płycie lub innym nośniku w oddzielnych plikach
–pod rysunkiem przypis ze wskazaniem źródła danych (autorstwa)

jednostki miary
–system SI
–jednostki zapisywać potęgowo (np. $t \cdot ha^{-1}$)

literatura
–spis literatury na końcu pracy w układzie alfabetycznym wg nazwisk autorów, w kolejności: nazwisko (pismo rozstrzelone), pierwsza litera imienia, tytuł pracy, miejsce publikacji: tytuł wydawnictwa (wg ogólnie przyjętych skrótów tytułów czasopism), rok, numer (pismo pogrubione), strony,
–cytowanie w tekście – jako numer pozycji ze spisu literatury (w nawiasach okrągłych) lub dodatkowo z nazwiskiem autora (pismo rozstrzelone).

Pracę do recenzji należy złożyć w 1 egzemplarzu. Po recenzji oryginalny egzemplarz recenzowany i ostateczną wersję pracy, uwzględniającą uwagi recenzenta i redaktora, złożyć do Redakcji w 1 egzemplarzu i przesłać e-mailem na adres:

Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy
e-mail: edecka@iung.pulawy.pl