

Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych

Aleksandra Wasilewska, Aleksandra Królicka

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, Gdańsk

Formation and characterization of hairy roots

Summary

Agrobacterium rhizogenes is a soil phytopathogen, which infects wounded plant tissue and generates overproliferation of neoplastic roots. Hairy-root cultures obtained by transformation of plant tissue by *A. rhizogenes* have evolved as an important tool for biosynthesis of plant secondary metabolites. This review discusses the methods for efficient plant transformation and hairy root formation for secondary metabolites production.

Key words:

transformation, hairy roots, secondary metabolites.

1. Wstęp

Na początku XIX w. Smith i Townesend (1) wykazali, że przyczyną powstawania tumorowych narośli na szyjce korzeniowej niektórych gatunków roślin są bakterie. Obecnie wiadomo, że czynnikiem sprawczym są bakterie z rodzaju *Agrobacterium* należące do rodziny *Rhizobiaceae*. Do niedawna systematyka rodzaju *Agrobacterium* opierała się wyłącznie na zdolnościach chorobotwórczych w stosunku do roślin (obecnością koniugacyjnego plazmidu zawierającego geny odpowiedzialne za patogeniczność bakterii) i rodzaj ten obejmował takie gatunki jak: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. vitis* oraz gatunek niepatogeniczny – *A. radiobacter*. Jednakże nomenklatura przyjęta na podstawie patogeniczności nie wykazuje powiązania z taksonomią opartą na

Adres do korespondencji

Aleksandra Królicka,
Zakład Ochrony
i Biotechnologii Roślin,
Katedra Biotechnologii,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG i AMG,
ul. Kładki 24,
80-822 Gdańsk;
e-mail:
krolicka@biotech.univ.gda.pl

biotechnologia

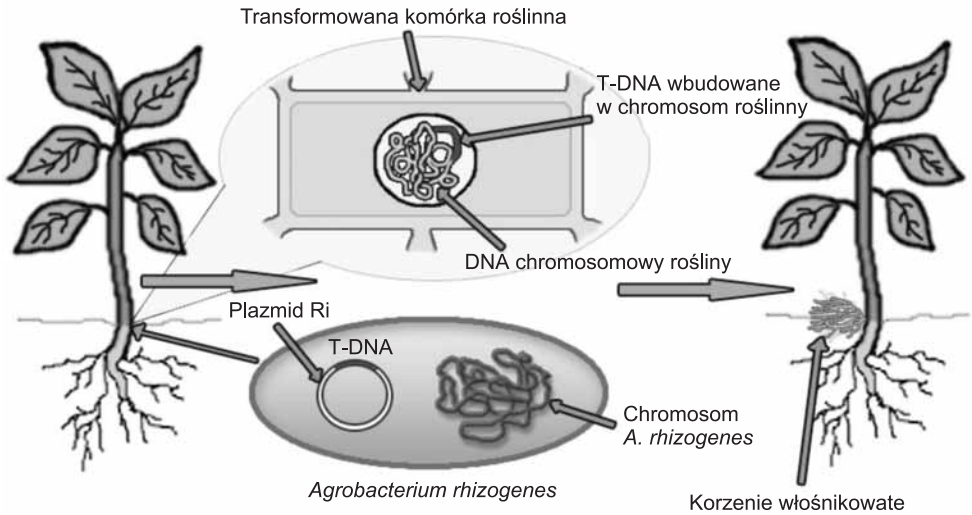
4 (71) 173–188 2005

pozostałych cechach fenotypowych i genetycznych bakterii (2). Porównanie sekwencji 16S rRNA, wskazuje na wspólne pochodzenie rodzajów *Agrobacterium* i *Rhizobium*. Young i in. (3,4) opierając się na sekwencji kodującej 16S rRNA proponują połączenie we wspólny rodzaj *Rhizobium* wszystkich gatunków z rodzaju *Agrobacterium*, *Rhizobium* i *Allorhizobium*. Sugerowane, zmienione nazewnictwo bakterii z rodzaju *Agrobacterium* wyglądałoby następująco: *Rhizobium radiobacter* (obejmujące dawne *A. tumefaciens* i część *A. radiobacter*), *R. rhizogenes*, *R. rubi* i *R. vitis* (3, www.cme.msu.edu/Bergeys). Ze względu na fakt, że większość badaczy posługuje się starą nazwą *A. rhizogenes*, taka nazwa będzie używana w dalszej części publikacji, opartej na przeglądzie literatury światowej i polskiej, opublikowanej od 1982 r. do połowy 2004 r. Celem pracy jest zebranie i usystematyzowanie zagadnień dotyczących mechanizmów warunkujących patogeniczność *A. rhizogenes* i zastosowań praktycznych tej bakterii do produkcji metabolitów wtórnych. Pominięte zostaną w pracy inne zastosowania korzeni włośnikowatych, jak np. badanie procesów biologicznych i biochemicznych zachodzących w podziemnych organach rośliny, fitoremediacja czy też produkcja białek heterogennych i przeciwciał monoklonalnych wytwarzanych dzięki transformacji roślin zmodyfikowanymi genetycznie szczepami *A. rhizogenes*.

2. Genetyczne podłoże powstawania korzeni włośnikowatych

A. rhizogenes jest gramujemną pałeczką glebową, nie wiążącą azotu atmosferycznego, wykazującą zdolność ruchu dzięki posiadaniu od 1 do 4 perytrychalnie ułożonych rzęsek. Osiąga optimum wzrostu w temperaturze wynoszącej 26°C i w przedziale pH od 5 do 9 (3). Bakterie z gatunku *A. rhizogenes* są fitopatogenami, infekującymi rośliny dwuliścienne, wywołującymi w miejscu infekcji powstawanie korzeni włośnikowatych (5). Nazwa *A. rhizogenes* nadana została przez Rikera w 1930 r. ze względu na zdolność bakterii do indukcji tworzenia korzeni włośnikowatych (*rhizogenic reaction*) w miejscu infekcji (3). W wyniku infekcji, fragment plazmidu Ri *A. rhizogenes* jest przenoszony do komórek roślinnych i w efekcie następują zmiany w metabolizmie zainfekowanych komórek roślinnych (6). Rozwój procesu chorobowego wywołwanego przez *A. rhizogenes* może prowadzić także do zniesienia efektu dominacji wierzchołkowej, skracania międzywęzła, zwiększenia liczby kwiatów, redukcji produkcji pyłku, a w rezultacie zaburzenia procesu wytwarzania nasion (7).

Zdolność *A. rhizogenes* oraz *A. tumefaciens* do transformacji roślin związana jest z obecnością w komórkach tych bakterii plazmidu wielkości około 200 tys. par zasad (pz). W wyniku transformacji fragment DNA, oznaczany jako T-DNA (*transferred DNA*), wielkości od 10 do 30 tys. par zasad wbudowany jest do genomu komórki roślinnej (8). Plazmid obecny w szczepach *A. rhizogenes* oznaczono jako pRi (*roots inducing plasmid*) (9). Nazwa plazmidu związana jest z obecnością w nim fragmentu DNA zawierającego geny, które mogą być w procesie patogenezy przeniesione do komórek roślinnych i zintegrowane z genomem roślinnym, czego efektem jest powstawa-



Rys. 1. Powstawanie korzeni włośnikowatych w wyniku wbudowania fragmentu plazmidu Ri *A. rhizogenes* (T-DNA) do genomu roślinnego.

nie korzeni włośnikowatych (rys. 1). Z kolei plazmid obecny w komórkach *A. tumefaciens* zawierający geny indukujące powstawanie tumorów nazwano pTi (*tumor inducing plasmid*) (10). Badania mechanizmów procesu transformacji prowadzone są głównie dla *A. tumefaciens*. W przypadku *A. rhizogenes* literatura jest bardzo ograniczona. Ponieważ mechanizmy transformacji obu gatunków bakterii, jak się wydaje, są bardzo podobne, dlatego też w dalszej części pracy posłużymy się wynikami badań prowadzonych na *A. tumefaciens* z uwzględnieniem informacji dotyczących *A. rhizogenes*.

W procesie transformacji roślin przez bakterie z rodzaju *Agrobacterium* uczestniczą trzy regiony DNA, dwa zlokalizowane w plazmidzie: odcinek T-DNA i region wirulencji z genami *vir* oraz trzeci zlokalizowany w chromosomie bakteryjnym zawierający geny *chv*, których ekspresja umożliwia absorpcję (*attachment*) bakterii na powierzchni rośliny (5,11). Odcinek T-DNA zawiera enzymy uczestniczące w metabolizmie hormonów roślinnych (auksyn i cytokinin) oraz geny *opin* (12). Metabolity z grupy *opin* to pochodne aminokwasów, głównie argininy, np. agropina, mannopina, kwas agropinowy, kwas mannopinowy (13), kukumopina (14), mikimopina – stereoisomer kukumopiny (15). *Opiny* są wykorzystywane jako podstawowe źródło węgla i azotu przez bakterie z rodzaju *A. rhizogenes* zasiedlające przestrzenie międzykomórkowe zainfekowanych tkanek roślinnych. Ze względu na rodzaj produkowanych przez bakterie *opin*, podzielono je na typy (np. szczepy produkujące agropinę należą do typu agropinowego). W plazmidzie Ri (poza T-DNA) znajdują się geny kodujące enzymy katabolizmu *opin* (*opc*). W przypadku niektórych szczepów (*A. rhizogenes* A4 i 15834) geny te zlokalizowane są w drugim plazmidzie (13).

Region wirulencji zawiera operony *virA*, *B*, *D*, *G*, które niezbędne są w procesie transformacji oraz operony *virC* i *virE*, których ekspresja znacznie podnosi wydajność tego procesu. Proces patogenezy polega na przeniesieniu fragmentu T-DNA z plazmidu bakteryjnego do jądra komórki roślinnej, a następnie integracji do genomu komórki roślinnej. W efekcie następują zmiany programu genetycznego zainfekowanej komórki. Przeniesienie T-DNA z komórki bakteryjnej do komórki roślinnej wykazuje pewne podobieństwo do procesu koniugacji między dwiema komórkami bakteryjnymi (9).

Proces infekcyjny związany jest z ekspresją genów *vir* zlokalizowanych w plazmidzie i genów *chv* zlokalizowanych w chromosomie bakteryjnym. Geny *chv* warunkują wytwarzanie białek i glikoprotein istotnych w procesie absorpcji bakterii z rodzaju *Agrobacterium* na powierzchni organów roślinnych (w szczególności korzeni). Ekspresja genów *vir* (w szczególności białka sensorycznego *virA*) jest indukowana przez wydzielane przez zranioną mechanicznie tkankę roślinną związki fenolowe, np. acetosyringon (16) i alfahydroksy-acetosyringon (10). Kolejny składnik kaskady sygnałowej – białko *VirG*, po ufosforylowaniu wiąże się z elementami promotorowymi „*vir*” i aktywuje transkrypcję genów wirulencji plazmidu *pTi* oraz genów chromosomalnych odpowiedzialnych za adhezję bakterii do infekowanej komórki roślinnej (17). W przypadku *A. tumefaciens* ekspresja operonu *virD* prowadzi do syntezy enzymu wycinającego fragment T-DNA z plazmidu *pTi*. Odcinki T-DNA (*pTi* i *pRi*) są otoczone sekwencjami granicznymi rozpoznawanymi przez *VirD2* (9). Białko *VirD2* podobnie jak endonukleazy, nacina DNA i pozostaje związane kowalencyjnie z końcem 5' ssT-DNA chroniąc je przed degradacją przez egzonukleazy typu 5'→3' w testach *in vitro* (18). Dodatkowo ssT-DNA opłaszczane jest przez białka *VirE2*. Do jądra komórki roślinnej przenoszony zostaje kompleks składający się z ssT-DNA i białek: *VirD2* i *VirE2*. W nowszych badaniach nad *A. tumefaciens* wskazuje się, że kompleks T-DNA - *VirD2* oraz białko *VirE2* przenoszone są niezależnie od siebie (19). Kanał umożliwiający przetransportowanie kompleksu przez błonę komórkową i ścianę komórkową zbudowany jest z białek *VirB* i *VirD4* (20). Wewnątrz komórki roślinnej kompleks DNA i białka *VirD2* i *VirE2* przenoszony jest poprzez błonę jądrową do jądra komórkowego, gdzie T-DNA ulega integracji do genomu roślinnego. Molekularne mechanizmy integracji T-DNA nie są jeszcze do końca poznane. Na podstawie badań z użyciem mutanta białka *VirD2*, zaproponowano model integracji T-DNA uwzględniając potencjalną funkcję *VirD2* jako integrazy (21). W następnym etapie jednoniciowy T-DNA włączany jest do genomu roślinnego. Ziemiencowicz i in. (22) w przeprowadzonych przez siebie badaniach wskazują, że proces ten jest katalizowany przez ligazę roślinną. W ostatnim etapie następuje dobudowanie nici kompleksarnej do ssT-DNA (21). W efekcie wbudowania T-DNA do genomu roślinnego następuje ekspresja znajdujących się w obrębie T-DNA genów warunkujących biosyntezę auksyn i cytokinin – tzw. onkogenów lub uwrażliwienie komórki na ich działanie. Przenoszone geny zawierają sekwencje regulatorowe, typowe dla komórek eukariotycznych. Przy końcu 5' genów T-DNA znajdują się sekwencje promotoro-

we – sekwencja TATA, położona 25-30 pz przed miejscem rozpoczęcia transkrypcji genu oraz sekwencja CCAAT, położona 40-50 nukleotydów przed sekwencją TATA (23). Są to elementy promotorowe, często występujące w genomach roślinnych, tak u roślin dwu- jak i jednoliściennych (23,24). Przy końcu 3' znajdują się sygnały do poliadenylacji, najczęściej AATAAA lub pokrewne: AATAAT, AATATA, TATAAA, AATGAA, AATAAG, istotne w procesie transkrypcji (23). Dzięki obecności eukariotycznych elementów regulatorowych, geny zlokalizowane w obrębie T-DNA mogą ulegać wydajnej ekspresji w komórkach roślinnych.

W zależności od szczepu w komórkach bakterii z gatunku *A. rhizogenes* występują pewne różnice w budowie regionu T-DNA (25). Szczepy bakterii typu kukumopinowego i mannopinowego posiadają pojedynczy fragment T-DNA. Z kolei typ agropinowy posiada dwa odrębne odcinki T-DNA, lewy czyli T_L -DNA i prawy T_R -DNA (26). Prawy i lewy segment T-DNA są przenoszone do komórki roślinnej niezależnie (27). Wykazano, że T_L -DNA pełni ważniejszą rolę w indukcji tworzenia korzeni włośnikowatych i jest odpowiedzialny za zmiany fenotypowe w zainfekowanej tkance, czyli powstawanie korzeni włośnikowatych (28). Ekspresja czterech genów *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD* zlokalizowanych w regionie T_L -DNA plazmidu Ri jest niezbędna do formowania korzeni włośnikowatych (28,29). Rola poszczególnych genów *rol* nie jest do końca poznana. W przypadku transformacji tytoniu gen *rolB*, jak się okazuje, jest czynnikiem istotnym w inicjacji tworzenia korzeni, poprzez zwiększenie stężenia auksyny IAA, a gen *rolA* odpowiedzialny jest za wytwarzanie korzeni włośnikowatych (30). W jednej z hipotez zakłada się, że gen *rolB* koduje β -glikozydazę zdolną do hydrolizy indolilo- β -glikozydów (31), zaś *rolC* β -glikozydazę cytokininową zdolną do hydrolizy N-glikozydów cytokinin (32). Aktywacja tych glikozydaz powoduje podwyższenie stężenia wolnych auksyn i cytokinin w zainfekowanej tkance. Druga hipoteza przedstawiona została przez zespół Maurela (33), który opublikował dane wskazujące, że ekspresja genu *rolB* powoduje podwyższenie wrażliwości komórek roślinnych na auksyny, poprzez aktywację receptorów zlokalizowanych w błonie komórkowej (34). Casanova i in. (35) wykazali natomiast, że ekspresja *rolC* obok właściwości cytokinino-zależnych, wykazuje działanie podobne do auksyn. Oprócz regeneracji pędów i zmniejszonej dominacji wierzchołkowej, stymuluje również intensywny rozrost korzeni, przy czym poziom endogennych auksyn nie ulega zmianie, mimo zwiększonej ryzogenezy (35). Gen *rolC* wpływa prawdopodobnie na metabolizm endogennych regulatorów wzrostu, bądź uwrażliwia rośliny na ich działanie, jednak dokładna jego funkcja nie jest do końca poznana (36). W przypadku *A. tumefaciens* w rejonie T_R -DNA zlokalizowane są geny *tms* 1, 2 odpowiedzialne za syntezę auksyn (37) oraz gen *tmr* odpowiedzialny za syntezę cytokinin (38). Podwyższenie poziomu hormonów roślinnych indukuje podziały komórkowe i prowadzi do powstawania guzów (*A. tumefaciens*) lub korzeni włośnikowatych (*A. rhizogenes*) (39). Równocześnie następuje ekspresja genów warunkujących biosyntezę opin. Ekspresja genów kodujących opiny jest różna w poszczególnych klonach transformowanych roślin (40) i zależy od obecności w odcinku T-DNA określonych genów, liczby

fragmentów T-DNA zintegrowanych z genomem rośliny oraz lokalizacji tych odcinków w obrębie chromosomu roślinnego.

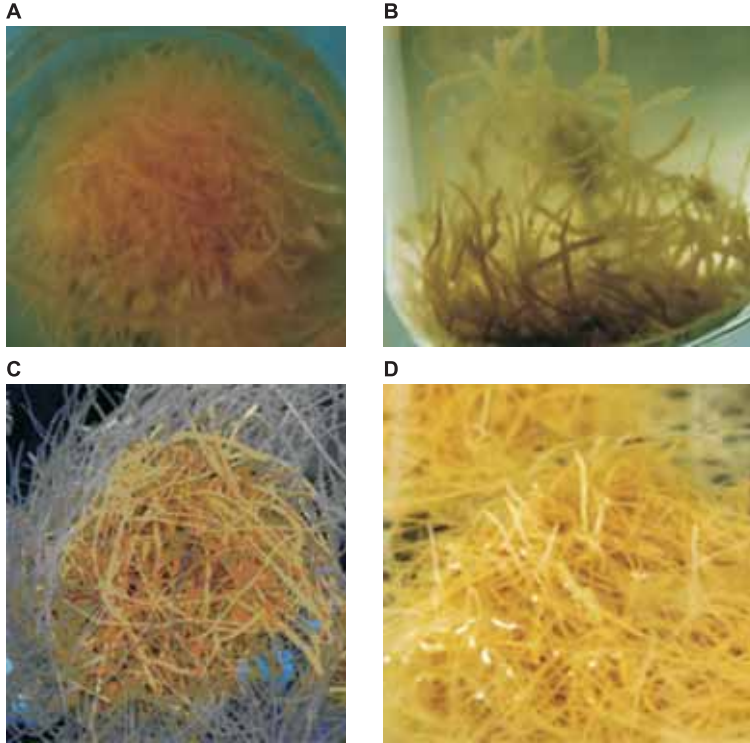
3. Transformacja w warunkach *in vitro* i czynniki wpływające na jej efektywność

Na powodzenie prowadzonego w laboratorium za pomocą *A. rhizogenes* procesu transformacji składa się wiele czynników. Efektywność transformacji zależy od genotypu *A. rhizogenes* (poziomu wirulencji), interakcji zachodzącej pomiędzy komórkami bakteryjnymi a roślinnymi, gęstości inokulum, genotypu transformowanej rośliny, typu i sposobu przygotowania eksplantatów oraz zdolności eksplantatu do regeneracji po transformacji (41). Do czynników wpływających na powodzenie transformacji zalicza się także: sposób wykonania inokulacji, warunki prowadzenia kultury oraz metodę eliminacji bakterii *Agrobacterium* z kultur transformowanych.

3.1. Dobór szczepu

W przypadku prowadzonej w laboratorium transformacji tkanki roślinnej bardzo istotne znaczenie ma zastosowanie odpowiedniego szczepu *A. rhizogenes*, ze względu na fakt, że określone szczepy bakterii wykazują specyficzność w stosunku do określonych gatunków roślin. Tak na przykład Boulton i in. (42) wykazali, że szczepy agropinowe i mannopinowe *A. rhizogenes* wywołują infekcję kukurydzy, a z kolei szczepy kukumopinowe nie są wirulentne w stosunku do tej rośliny. Uważa się również, że szczepy agropinowe wykazują wyższą wirulencję w porównaniu do innych szczepów bakterii z gatunku *A. rhizogenes*. Fakt ten może się wiązać z obecnością na plazmidzie tych bakterii dwóch odrębnych odcinków T-DNA, tzw. lewego czyli T_L-DNA i prawego T_R-DNA (26). Porter (43) sugeruje, że najwyższą wirulencję spośród szczepów *A. rhizogenes* wykazuje szczep agropinowy 15834, a następnie w kolejności szczepy A4 i LBA 9402.

Zaobserwowano także różnice w fenotypie i właściwościach transformowanych roślin z gatunku *Ammi majus*, zależnie od szczepu *A. rhizogenes* wykorzystanego w transformacji (fot. 1, dane nie publikowane). Różnice w wirulencji *Agrobacterium* i morfologii korzeni włósnikowatych mogą być wyjaśnione przez obecność w komórkach bakteryjnych różnych plazmidów (44). Na przykład w korzeniach włósnikowatych uzyskanych w wyniku transformacji *Hyoscyamus albus* przy użyciu dwóch szczepów *A. rhizogenes*, A4 i LBA-9402, wykazano duże różnice w zawartości metabolitów wtórnych. Korzenie uzyskane w wyniku transformacji szczepem A4 produkowały 3,5 razy więcej atropiny niż korzenie uzyskane po transformacji szczepem LBA-9402 (45). Powodem tych różnic mogło być użycie dwóch różnych szczepów *Agrobacterium* lub też inne czynniki takie jak: poziom ekspresji genów T-DNA, liczba kopii czy miejsce integracji.



Fot. 1. Korzenie transformowane *Ammi majus* (A – po transformacji szczepem A4, B – szczep LBA9402) i *Ruta graveolens* (C – szczep A4, D – szczep LBA9402), Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, MWB UG i AMG w Gdańsku.

3.2. Czynniki indukcji plazmidowych genów *vir*

W przypadku transformacji tkanek roślinnych bakteriami z gatunku *A. rhizogenes*, często nieodzownym warunkiem powodzenia transformacji jest dodatek do pożywki stosowanej do wzrostu bakterii, związków fenolowych, które odgrywają rolę w procesach chemotaksji i indukcji wirulencji *A. rhizogenes*. W naturalnych warunkach obecność związków fenolowych, wydzielanych przez zranioną tkankę roślinną, wpływa na aktywację plazmidowych genów *vir*, których ekspresja jest niezbędna w procesie transformacji. Melchers i in. (46) przetestowali około 50 różnych związków chemicznych pod kątem zdolności do indukcji ekspresji genów *vir* i stwierdzili, że najbardziej efektywny był acetosyringon (4-acetylo-2,6-dimetoksyfenol), niskocząsteczkowy związek fenolowy wydzielany przez zranione komórki roślinne (10,16). Dodanie acetosyringonu (stężenie końcowe 200 μM) do pożywki, na której rosły kultury *A. rhizogenes* (szczep A4) podwyższyło ponad 5-krotnie efektywność transformacji *Alhagi pseudoalhagi* (47). Zastosowanie acetosyringonu może prowadzić do poszerzenia spektrum gatunków roślin, które ulegają transformacji (48). Znacznie

słabszą efektywność indukcji transformacji wykazywały: kwas synapinowy, wanilina i kwas wanilinowy. Dodatek sacharozy do pożywki Murashige-Skooge (MS) zawierającej acetosyringon podwyższył wydajność transformacji *Atropa belladonna* (49). Kolejnymi ważnymi induktorami transformacji są takie monocukry jak: glukoza, galaktoza, arabinoza, fukoza i ksyloza (48). Cukry działają nie tylko jako czynniki chemotaktyczne, ale również jako induktory wirulencji *Agrobacterium* (50).

3.3. Wybór materiału do transformacji

Istotny jest także dobór materiału do transformacji, konkretna tkanka lub organ rośliny i jej stadium rozwojowe. Eksplantaty stosowane do transformacji mogą być różne: liście, młode siewki lub ich fragmenty (51), pędy (52), fragmenty korzeni (7), protoplasty. Zazwyczaj najbardziej wydajne jest transformowanie młodych tkanek, np. infekowanie liści z młodych pięcioletniowych roślin (53). W nielicznych przypadkach tylko określony fragment rośliny stanowi dobry materiał do transformacji. Przykładem jest *A. majus*, w którym jedynie transformacja pierwszego węzła łodygi pozwala na uzyskanie kultur korzeni włośnikowatych (54). Wiąże się to najprawdopodobniej z faktem, że ta część rośliny ma najwyższą zdolność do regeneracji. Zdolność tkanek do regeneracji ma istotne znaczenie dla powodzenia transformacji. W przypadku młodych roślin *Nicotiana tabacum* wszystkie tkanki pędu zdolne były do wytwarzania korzeni transformowanych, natomiast w przypadku tkanek dojrzałych, korzenie rozwijały się tylko w wyniku transformacji komórek miazgi (55).

Rośliny jednoliścienne (trawy, zboża, rośliny cebulowe) są ogólnie uznawane za słabo podatne na transformację przy użyciu *Agrobacterium*. Nawet w przypadku udanego transferu genów T-DNA z *A. rhizogenes* nie następuje rozrost korzeni włośnikowatych. Trudności w transformacji wynikają z braku produkcji substancji chemotaktycznych pobudzających bakterie, bądź z zakłóceń w samym procesie transferu T-DNA (44). Jednak rośliny jednoliścienne nie są całkowicie odporne na transformację (44). Akutsu i in. (56) opublikowali w 2004 r. wyniki transformacji *Alstroemeria* szczepem A13 *A. rhizogenes*. Był to pierwszy przykład transformacji roślin jednoliściennych przy użyciu *A. rhizogenes* prowadzący do stabilnej ekspresji „obcych” genów (56). Jakkolwiek transformowane rośliny nie przejawiały typowego fenotypu, obserwowanego u roślin dwuliściennych, jak również nie odnotowano rozrostu korzeni włośnikowatych. W tym przypadku sugerowana jest odmienna funkcja produktów genów T-DNA u roślin jednoliściennych.

3.4. Eliminacja bakterii z kokultury

Opracowanie wydajnej metody transformacji i uzyskanie szybko rosnących aksecnicznych korzeni włośnikowatych jest pierwszym etapem badań. Jednakże ważnym

zagadnieniem jest również wyeliminowanie bakterii *A. rhizogenes* z uzyskanych w wyniku transformacji kultur roślinnych. W tym celu prowadzi się badania pozwalające na poznanie wrażliwości różnych szczepów *A. rhizogenes* na antybiotyki. Istotny jest również fakt, że stosowane do eliminacji bakterii antybiotyki nie mogą wykazywać negatywnego wpływu na wzrost kultur roślinnych.

Kokultury (tkanki roślinne zainfekowane *A. rhizogenes*) przekłada się na pożywki z określonym antybiotykiem po 3-5 dniach od inokulacji, a określoną dawkę antybiotyku (ampicylina [1000 µg ml⁻¹]; kanamycyna [50 µg ml⁻¹] plus rimfacylina [30 µg ml⁻¹]; spektynomycyna [100 µg ml⁻¹]; karbenicylina [100 µg ml⁻¹] plus cefotaksym [30 µg ml⁻¹]) utrzymuje się przez kilka kolejnych pasażów wykonywanych zwykle co 10-14 dni. Zwykle po 5-6 pasażach korzeni transformowanych na pożywkach płynnych z antybiotykami uzyskuje się kultury tkanek roślinnych całkowicie wolne od bakterii. W dalszych etapach hodowli korzenie włośnikowate hoduje się w pożywkach płynnych bez antybiotyków (57).

3.5. Potwierdzenie procesu transformacji

Oprócz obserwowanych efektów fenotypowych w postaci szybko rosnących korzeni włośnikowatych, istotne jest potwierdzenie procesu transformacji na poziomie molekularnym. W celu potwierdzenia transformacji tkanki roślinnej przez bakterie z gatunku *A. rhizogenes* stosuje się reakcję PCR ze starterami komplementarnymi do sekwencji DNA genów *rolB* i *rolC* zlokalizowanych w regionie T₁-DNA plazmidu Ri *A. rhizogenes* (58). Przeprowadzenie testów PCR z zastosowaniem wymienionych starterów oraz DNA izolowanego z korzeni włośnikowatych jako matrycy, pozwala na wykazanie obecności sekwencji komplementarnych do genów *rolB* i *rolC* *A. rhizogenes* w transformowanych tkankach roślinnych, a tym samym potwierdzenie procesu transformacji (54). Transformację można również udowodnić stosując startery, które zawierają sekwencje komplementarne do sekwencji genów *rolB* i *virD1* (59). Wcześniej do najczęściej wykorzystywanych metod służących do potwierdzenia transformacji tkanki roślinnej przez bakterie z gatunku *A. rhizogenes* należało wykazanie za pomocą elektroforezy czy chromatografii bibułowej obecności opin w transformowanych tkankach roślin (13).

4. Charakterystyka kultur korzeni transformowanych

4.1. Opis kultur korzeni włośnikowatych

Korzenie transformowane wykazują wiele cech różniących je od naturalnie występujących korzeni. Należą do nich przede wszystkim: rozrost korzeni bocznych

i ich plagiotropizm, zdolność do wzrostu w pożywce nie zawierającej regulatorów wzrostu oraz brak przyrostu wtórnego i geotropizmu (60). Zmniejszona wrażliwość na grawitację związana jest prawdopodobnie ze zmodyfikowanym przemieszczaniem amyloplastów w statocytach lub wynika ze zmiany wrażliwości na auksyny. W efekcie, wydłużające się komórki odpowiedzialne za wyginanie wykazują zaburzony geotropizm (61). Plagiotropizm korzeni jest cechą korzystną, gdyż przyczynia się do zwiększenia ich napowietżenia w płynnej pożywce, a przez to również do szybkiej i wydajnej akumulacji biomasy korzeni (60). Inną istotną zaletą kultur korzeni włośnikowatych jest ich stabilność genetyczna. Wykazano, że stabilne genetycznie kultury korzeni włośnikowatych można prowadzić nawet przez ponad 8 lat, podczas gdy inne rodzaje roślinnych kultur *in vitro* (np. kalus, zawiesina komórkowa) wykazują skłonność do zmienności somaklonalnej, która może zaburzyć wytwarzanie cennych metabolitów wtórnych (62). Jakkolwiek w literaturze dostępne są również doniesienia świadczące o niestabilności genetycznej kultur korzeni włośnikowatych. Przykładem mogą być kultury *Duboisia*, w których stwierdzono spowolnione tempo wzrostu korzeni w czasie kolejnych pasaży (63). Zaburzenia fenotypu wynikają najprawdopodobniej ze zmian w ekspresji genów zlokalizowanych w obrębie T-DNA w transformowanych roślinach (64). Z kolei Xu i Jia (65) obserwowali zmiany liczby chromosomów w komórkach korzeni włośnikowatych.

4.2. Charakterystyka roślin zregenerowanych z korzeni włośnikowatych

Proces regeneracji roślin z korzeni transformowanych może zachodzić spontanicznie, np. w przypadku *Convolvulus arvensis* i *N. tabacum*, lub może być indukowany regulatorami wzrostu (7). W przypadku niektórych roślin, takich jak *Lycopersicon esculentum*, indukcja tworzenia pędów, a tym samym otrzymania roślin potomnych z korzeni transformowanych, jest ograniczona. Podczas badań nad różnymi odmianami pomidora zauważono jednak, że na powodzenie organogenezy wpływa genotyp roślin (macierzystych) poddawanych transformacji. Częstotliwość regeneracji pędów wahała się znacznie w poszczególnych odmianach i wynosiła 65% dla odmiany UC-97, 30% dla Momotaro i jedynie 25% w przypadku odmiany Edkawi (66).

Powstałe z korzeni włośnikowatych rośliny potomne zawierają w swoich komórkach T-DNA z plazmidu Ri. Fenotyp przekazywany jest w sposób mendelowski (jak allel dominujący), a ekspresja genów *rol* w zregenerowanych roślinach objawia się wieloma zmianami morfologicznymi i fizjologicznymi (*hairy root syndrome*) (7). Na fenotyp składa się m.in. zmniejszona dominacja wierzchołkowa, pomarszczone liście, zakłócenia tempa wzrostu, plagiotropizm i odmienna budowa kwiatów. Rośliny zregenerowane z korzeni włośnikowatych mają skrócone międzywęzła, co wpływa na ich całkowity mniejszy wzrost. Zazwyczaj jednak cechy te nie mają negatywnego wpływu na żywotność rośliny. Wyjątkiem może być obniżona produkcja nasion (7).

Istotną zmianą w roślinach regenerowanych z korzeni transformowanych jest także zjawisko corocznego zakwitania roślin dwuletnich. Przykładem mogą być typowo dwuletnie rośliny, takie jak *Cichorium intybus* czy *Daucus carota*, które po transformacji za pomocą *A. rhizogenes* stają się jednoroczne i zakwitają bez wcześniejszej wernalizacji, niezbędną w naturalnych warunkach (67).

Część elementów typowych dla fenotypu roślin transformowanych *A. rhizogenes* może objawiać się niezależnie od gatunku transformowanej rośliny, a w innych przypadkach obserwuje się cechy charakterystyczne dla gatunków, a nawet osobników (7). Uważa się, że na brak dominacji wierzchołkowej wpływa głównie białko RolC, a w efekcie obserwuje się wolniejsze tempo wzrostu rośliny (68). Jednak w badaniach nad transformowaną osiką (*Populus tremula*), nie zaobserwowano spowolnienia wzrostu, a rośliny zregenerowane były wyższe od roślin kontrolnych (69).

Rośliny transformowane wytwarzają w krótszym czasie więcej korzeni, które są bardziej rozgałęzione i utrzymują także tę samą intensywność wzrostu przez cały rok. Świeża masa korzeni może być nawet o kilkaset procent wyższa w porównaniu z masą roślin nie wykazujących ekspresji genów *rol* (69). Często charakterystyczne cechy roślin transformowanych objawiają się tylko w hodowlach *in vitro*, podczas gdy rośliny regenerowane z tych samych wyselekcjonowanych linii, ale hodowane *ex vitro* w szklarniach, zachowują naturalny, niezmienny fenotyp (69).

Istotny jest również fakt, że w literaturze dostępne są dane dotyczące wyższej koncentracji metabolitów wtórnych w tkankach roślin uzyskanych w wyniku regeneracji z kultur korzeni transformowanych niż z roślin tego samego gatunku zregenerowanych z komórek nietransformowanych: *Ajuga reptans* (70), *Vinca minor* (71), *Pelargonium* spp. (72).

4.3. Metabolity wtórne w kulturach korzeni włośnikowatych

Komórki roślinne wytwarzają szereg niskocząsteczkowych związków chemicznych – metabolitów wtórnych, których biosynteza nie jest bezpośrednio związana z powiększaniem rozmiarów i liczby komórek roślinnych. Metabolity wtórne nie stanowią jednorodnej chemicznie grupy związków. Wyróżniamy wśród nich: alkaloidy, diterpeny, flawonoidy, furanochromony, kumaryny, naftochinony i inne. Jakkolwiek ich znaczenie w fizjologii i biochemii roślin nie zawsze jest znane, to większość badaczy jest zgodna co do faktu, że odgrywają one istotną rolę w mechanizmach warunkujących odporność roślin na abiotyczne i biotyczne czynniki środowiskowe. Ponadto wiele metabolitów wtórnych pozyskiwanych z tkanek roślinnych stanowi źródło naturalnych związków mających zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym (działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe), chemicznym (herbicydy, pestycydy), kosmetycznym i spożywczym (barwniki) (73). Pomimo ciągłego postępu w opracowywaniu technologii syntezy chemicznej związków

farmakologicznie czynnych rośliny dostarczają ciągle około 25% substratów niezbędnych do produkcji leków (74).

Wielu badaczy uważa, że szerokie możliwości produkcji substancji farmakologicznie czynnych stwarzają hodowle roślinne prowadzone w warunkach *in vitro* (75,76). Niestety praca z kulturami roślinnymi i pozyskiwanie z nich wtórnych metabolitów nastęrcza wiele problemów. Przykładem są hodowle zawiesin komórkowych, które z jednej strony wykazują niską stabilność genetyczną, a z drugiej jako kultury komórek niezróżnicowanych charakteryzują się stosunkowo słabą produkcją metabolitów wtórnych (77). Ze względu na fakt, że wiele metabolitów wtórnych jest produkowanych w niewielkich ilościach przez niezróżnicowane komórki roślinne (78) od lat ogromnym zainteresowaniem cieszy się optymalizacja warunków prowadzenia kultur pędów, korzeni czy też korzeni transformowanych w celu uzyskania wysokiego poziomu syntetyzowanych produktów (10,79,80).

Prowadzone dotychczas badania dostarczają wielu dowodów, że w kulturach korzeni transformowanych można uzyskać znacznie wyższy poziom metabolitów wtórnych niż w kulturach korzeni nietransformowanych (81,82). Dobrym przykładem są korzenie włośnikowate *Ajuga reptans* L., których komórki zawierają 4-krotnie więcej 20-hydroksyekdysteronu w porównaniu z komórkami korzeni roślin rosnących w gruncie (83). Innym przykładem są korzenie włośnikowate *Atropa belladonna*, które wytwarzały średnio 3,5 mg/g suchej masy (sm) alkaloidów tropanowych, podczas gdy korzenie nietransformowane produkowały ich jedynie 0,3 mg/g sm. Wyselekcjonowany klon korzeni włośnikowatych, wykazujący najwyższą biosyntezę alkaloidów, produkował aż 27 razy więcej alkaloidów (hioscyjminy i skopolaminy), niż korzenie nietransformowane (53). Znaczna część metabolitów wytwarzanych w korzeniach włośnikowatych to niezwykle cenne związki, mające zastosowanie w medycynie. Szczególnie wartościowe są substancje wykorzystywane jako leki przeciwnowotworowe. Należy do nich np. kamptotecyna, będąca inhibitorem topoizomerazy I (stosowana przeciwko wirusowi HIV-1), która wytwarzana jest m.in. przez *Camptotheca acuminata* i *Ophiorrhiza pumila* (84).

Hodowla korzeni włośnikowatych może przyczyniać się również do poznawania i odkrywania nowych związków (55,85). Badania korzeni transformowanych *Tripterygium wilfordii* var. *regelii* doprowadziły do izolacji nowych terpenoidów: diterpenu ($C_{21}H_{28}O_3$) oraz trzech nowych seskwiterpenów, nazwanych: TWHR-1 ($C_{33}H_{38}O_9$), TWHR-2 ($C_{29}H_{34}O_7$), TWHR-3 ($C_{35}H_{37}O_8N$) (86). W korzeniach włośnikowatych *Scutellaria baicalensis* zidentyfikowano nowy glikozyd flawonowy (5, 7, 2', 6'-tetrahydroksyflawon 2'-O- β -D-glukopiranozyd); flawonoidy izolowane z korzeni roślin tego gatunku wykazują silne działanie przeciw wirusowi HIV-1 oraz T-limfotropowemu wirusowi białaczki (HTLV-1) (87). W badaniach nad związkami przeciwgrzybiczymi, hamującymi rozwój *Cladosporium flavum*, doprowadzono do zidentyfikowania nowego metabolitu roślinnego hamującego kiełkowanie spor (88). Wyizolowany z *Lithospermum erythrorhizon* związek (rhizonon), jest pochodną chinonów i ma silniejsze działanie przeciwgrzybicze niż spokrewniona z nim szikonina. W przypadku kultur korzeni włośnikowatych związek ten

jest w całości wydzielany do pożywki, co znacznie ułatwia odzyskiwanie tego metabolitu (88). Innym przykładem są korzenie włośnikowate *Catharanthus trichophyllus*, w których zaobserwowano indukcję alkaloidów indolowych (89) oraz korzenie *Swertia japonica*, w których wykryto ksanton (90). Kolejnym przykładem metabolitu, akumulowanego w dużych ilościach w korzeniach, jest czerwony barwnik, naftochinon pochodna szikoniny, pozyskiwany z *L. erythrorhizon* (91).

Ciekawą alternatywą, jak się wydaje, jest również produkcja metabolitów wtórnych w zielonych korzeniach włośnikowatych uzyskanych w roślinach z rodzaju *Asteraceae*, *Solanaceae* i *Cucurbitaceae* (92). W prowadzonych na świetle kulturach zielonych korzeni włośnikowatych można produkować metabolity, które są syntetyzowane w organach roślin zawierających chlorofil (93).

5. Podsumowanie

Korzenie włośnikowate charakteryzują się intensywniejszym przyrostem biomasy w porównaniu do innych kultur roślinnych prowadzonych w warunkach *in vitro*. Kultury korzeni włośnikowatych zapewniają długotrwałą i stabilną produkcję znaczących ilości metabolitów wtórnych. Jednocześnie manipulacja warunkami hodowli: składem pożywki, rodzajem używanego do transformacji szczepu bakterii dobrego do danego gatunku rośliny, a także selekcja klonów o najlepszych właściwościach, dodatkowo zwiększają wydajność prowadzonej hodowli i mogą zwielokrotnić poziom pożądaných związków. Dodatkowo w komórkach korzeni włośnikowatych może być wytwarzane szersze spektrum związków farmakologicznie czynnych w porównaniu z innymi rodzajami kultur roślinnych.

A. rhizogenes jest cennym narzędziem w biotechnologii roślin. Nadal pozostaje jednak wiele nie rozwiązanych do końca zagadnień, związanych z poznaniem funkcji genów warunkujących patogeniczność *A. rhizogenes* oraz dokładne poznanie funkcji wszystkich genów zlokalizowanych w plazmidzie Ri.

Praca finansowana z projektu KBN 0430/P04/2004/26 i KBN 092/P05/2003.

Autorki dziękują prof. Ewie Łojkowskiej i dr hab. Alicji Ziemienowicz za cenne uwagi w trakcie przygotowywania manuskryptu.

Literatura

1. Smith E. F., Townesend C.O., (1907), Science, 25, 671-673.
2. Bouzar H., Chilton W. S., Nesme X., Dessaux Y., Vaudequin V., Petit A., Jones J. B., Hodge N. C., (1995), Appl. Environ. Microbiol., 61, 65-73.
3. Young J. M., Kuykendall L. D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H., (2001), Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 89-103.
4. Young J. M., Kuykendall L. D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H., (2003), Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 1689-1695.

5. Nester E. W., Gordon M. P., Amasino R. M., Yanofsky M. F., (1984), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 387-413.
6. Chilton M., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempe J., (1982), *Nature*, 295, 432-434.
7. Tepfer D., (1984), *Cell*, 37, 959-967.
8. Gelvin S. B., (2003), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 16-37.
9. Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A., (1992). *Plant. Mol. Biol.*, 19, 15-38.
10. Flores E. H., Medina-Bolivar F., (1995), *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.*, 1, 59-74.
11. Zambryski P., (1989), *Cell*, 56, 193-201.
12. Bevan W. B., Chilton M. D., (1982), *Annu. Rev. Genet.*, 16, 367-384.
13. Petit A., David C., Dahl G. A., Ellis J. G., Guyon P., (1983), *Mol. Gen. Genet.*, 190, 204-214.
14. Davioud E., Petit A., Tate M. E., Ryder M. H., Tempe J., (1988), *Phytochemistry*, 27, 2429-2433.
15. Isogai A., Fukuchi N., Hayashi M., Kamada H., Suzuki A., (1988), *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3235-3237.
16. Stachel S. E., Messens E., van Montagu M., Zambryski P., (1985), *Nature*, 318, 624-629.
17. Ziemienowicz A., (2002), *Kosmos*, 3, 343-351.
18. Dürrenberger F., Cramer A., Hohn B., Koukolikova-Nicola Z., (1989), *PNAS, USA*, 86, 9154-9158.
19. Ziemienowicz A., Merkle T., Schoumacher F., Hohn B., Rossi L., (2001), *Plant Cell*, 13, 369-384.
20. de la Riva G., Gonzalez-Cabrera J., Vazquez-Padron R., Ayra-Pardo C., (1998), *EJB 1* (<http://ejb.ucv.cl/content/vol1/issue3/>)
21. Tinland B., Schoumacher F., Gloeckler V., Bravo A. M., Angel M., Hohn B., (1995), *EMBO J.*, 14, 3585-3595.
22. Ziemienowicz A., Tinland B., Bryant J., Gloeckler V., Hohn B., (2000), *Mol. Cell. Biol.*, 20, 6317-6322.
23. Slightom J., Durand-Tardif M., Jouanin L., Tepfer D., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 108-121.
24. Kehoe D. M., Degenhardt J., Winicov I., Tobin E. M., (1994), *Plant Cell*, 6, 1123-1134.
25. Tepfer M., Casse-Delbart F., (1987), *Microbiol. Sci.*, 4, 24-28.
26. de Paolis A., Mauro H. L., Pomponi M., Cardarelli M., Spano L., Constantino P., (1985), *Plasmid*, 13, 1-7.
27. Hamill J. D., Parr A. J., Rhodes M. J. C., Robins R. J., Walton N. J., (1987), *Biotechnology*, 5, 800-805.
28. Spena A., Schmulling T., Koncs C., Schell J., (1987), *EMBO J.*, 6, 3891-3899.
29. Hooykaas P. J. J., Beijersbergen A. G. M., (1994), *Annu Rev. Phytopathol.*, 32, 157-179.
30. Cardarelli M., Marriotti D., Pomponi M., Spano L., Capone I., Constantino P., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 209, 475-480.
31. Estruch J. J., Chriqui D., Grossmann K., Schell J., Spena A., (1991a), *EMBO J.*, 10, 2889-2895.
32. Estruch J. J., Schell J., Spena A., (1991b), *EMBO J.*, 10, 3125-3128.
33. Maurel C., Leblanc N., Barbier-Brygoo H., Perrot-Rechenmann C., Bouvier-Durand M., Guern J., (1994), *Plant Physiol.*, 105, 1209-1215.
34. Filippini F., Lo Schiavo F., Terzi M., Costantino P., Trovato M., (1994), *Plant Cell Physiol.*, 35, 767-771.
35. Casanova E., Zuker A., Trillas M. I., Moysset L., Vainstein A., (2003), *Sci. Hortic.*, 97, 321-331.
36. Casanova E., Valdés A. E., Zuker A., Fernández B., Vainstein A., Trillas M. I., Moysset L., (2004), *Plant Sc.*, 167, 551-560.
37. Inze D., Follin A., van Lijsebettens M., Simoens C., Genetello C., van Montagu M., Schell J., (1984), *Mol. Gen. Genet.*, 194, 265-274.
38. Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P., (1984), *PNAS, USA* 81, 5994-5998.
39. Zaenen I., van Larebeke N., Teuchy H., van Montagu M., Schell J., (1974), *J. Mol. Biol.*, 86, 109-127.
40. Yonemitsu H., Shimomura K., Satake M., Mochida S., Tanaka M., Endo T., Kaji A., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 307-310.
41. Bartoszewski G., Niemirowicz-Szczytt K., (1998), *Biotechnologia*, 40, 41-63
42. Boulton M. I., Buchholz W. G., Marks M. S., Markham P. G., Davies J. W., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 12, 31-40.
43. Porter J. R., (1991), *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10, 387-421.
44. Nguyen C., Bourgaud F., Forlot P., Guckert A., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 424-427.
45. Zehra M., Banerjee S., Sharma S., Kumar S., (1999), *Planta Med.*, 65, 60-63.

46. Melchers L. S., Regensburg-Tuink A. J. G., Schilperoort R. A., Hooykaas P. J. J., (1989), *Mol. Microbiol.*, 3, 969-977.
47. Wang Y. M., Wang J. B., Luo D., Jia J. F., (2001), *Cell Res.*, 11, 279-284.
48. Winans S. C., (1992), *Microbiol. Rev.*, 56, 12-31.
49. Yan-Nong S., Shibuya M., Ebizuka Y., Sankawa U., (1990), *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 2063-2065.
50. Giri A., Narasu M. L., (2000), *Biotechnol. Adv.*, 18, 1-22.
51. Caboni E., Lauri P., Tonelli M., Falasca G., Damiano C., (1996), *Plant Sci.*, 118, 203-208.
52. Piñol M. T., Palazón J., Cusidó R. M., Ribó M., (1999), *Plant Sci.*, 141, 41-49.
53. Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Lacoux J., Fliniaux M., Jacquín-Dubreuil A., (2000), *J. Biotechnol.*, 81, 151-158.
54. Królicka A., Staniszevska I., Bielawski K., Maliński E., Szafrank J., Łojkowska E., (2001), *Plant Sci.*, 160, 259-264.
55. Olszowska O., (1992), *Biotechnologia*, 19, 21-26.
56. Akutsu M., Ishizaki T., Sato H., (2004), *Mol. Breed.*, 13, 69-78.
57. Królicka A., Kurlenda J., Łojkowska E., (1999), *Biotechnologia*, 45, 94-103.
58. Furner I. J., Huffman G. A., Amasino R. M., Garfinkel D. J., Gordon M. P., Nester E. W., (1986), *Nature*, 319, 422-427.
59. Damiano C., Monticelli S., (1998), *EJB 1* (<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3>).
60. Giri A., Narasu M. L., (2000), *Biotechnol. Adv.*, 18, 1-22.
61. Legué V., Vilaine F., Tepfer M., Perbal G., (1994), *Physiol. Plantarum*, 91, 559-566.
62. Flores H. E., Dai J., Cuello J. L., Maldonado-Mendoza I. E., Loyola-Vargas V. M., (1993), *Plant Physiol.*, 101, 363-371.
63. Yukimune Y., Yara Y., Yamada Y., (1994), *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1443-1446.
64. Durand-Tardif M., Broglie R., Slightom J., Tepfer D., (1985), *J. Mol. Biol.*, 186, 557-564.
65. Xu Z. Q., Jia J. F., (1996), *Plant Sci.*, 120, 107-112.
66. Moghaieb R. E. A., Saneoka H., Fujita K., (2004), *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 9, 439-449.
67. Limami M. A., Sun L., Douat C., Helgeson J., Tepfer D., (1998), *Plant Physiol.*, 118, 543-550.
68. Faiss M., Strnad M., Redig P., Doležal K., Hanuš J., van Onckelen H., Schmölling T., (1996), *Plant J.*, 10, 33-46.
69. Tzfira T., Vinocur B., Altman A., Vainstein A., (1998), *Trees*, 12, 464-471.
70. Tanaka N., Matsumoto T., (1993), *Plant Cell Rep.*, 13, 87-90.
71. Tanaka N., Takao M., Matsumoto T., (1995), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 41, 61-64.
72. Pellegrineschi A., Damon J. R., Valtorta N., Paillard N., Tepfer D., (1994), *Acta Biotech.*, 12, 64-68.
73. Balandrin M. J., Klocke J. A., (1988), *Medicinal, aromatic and industrial materials from plants*, in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 4. Medicinal and Aromatic Plants I*, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin, 1-36.
74. Stafford A., Morris P., Fowler M. W., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 578-587.
75. Akerele O., Heywood V., Synge H., (1991), *The conservation of medicinal plants*, Cambridge University Press, Cambridge, USA.
76. Furmanowa M., (1992), *Biotechnologia*, 19, 27-36.
77. Charlwood B. V., Rhodes M. J., (1990), *Secondary products from plant tissue culture*, Clarendon Press, Oxford.
78. DiCosmo F., Misawa M., (1985), *Trends Biotechnol.*, 3, 318-322.
79. Flores E. H., Filner P., (1985), *Metabolic relationship of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae*, in: *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*, Eds. Neuman K. H., Barz W., Reinhard E., Springer-Verlag, New York, 174-185.
80. Payne J., Hamill J. D., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1987), *Planta Med.*, 53, 474-478.
81. Trotin F., Moumou Y., Vasseur P., (1993), *Phytochemistry*, 33, 929-931.
82. Shimomura K., Sauerwein M., Ishimaru K., (1991), *Phytochemistry*, 30, 2275-2278.
83. Skrzypczak-Pietraszek E., Grzybek J., (1997), *Biotechnologia*, 37, 93-110.
84. Kitajima M., Yoshida S., Yamagata K., Nakamura M., Takayama H., Saito K., Sekib H., Aimia N., (2002), *Tetrahedron*, 58, 9169-9178.

85. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A., (1994), *Production of secondary metabolites by hairy root cultures of Psoralea species*, Abstracts 8th Inter. Con. Plant Tissue and Cell Cult., Firenze, 246.
86. Nakano K., Yoshida C., Furukawa W., Takaishi Y., Shishido K., (1998), *Phytochemistry*, 49, 1821-1824.
87. Zhou Y., Hirotsu M., Yoshikawa T., Furuya T., (1997), *Phytochemistry*, 44, 83-87.
88. Fukui H., Feroj Hasan A. F. M., Kyo M., (1999), *Phytochemistry*, 51, 511-515.
89. Davioud E., Kan Ch., Quirion J. C., Das B. C., Husson H. P., (1989), *Phytochemistry*, 28, 1383-1387.
90. Ishimaru K., Sudo H., Satake M., Matsunaga Y., Hasegawa Y., Takemoto S., Shimomura K., (1990), *Phytochemistry*, 29, 825-828.
91. Yazaki K., Matsuoka H., Shimomura K., Bechthold A., Sato F., (2001), *Plant Physiol.*, 125, 1831-1841.
92. Sauerwein M., Wink M., Shimomura K., (1992), *J. Plant Physiol.*, 140, 147-152.
93. Saito K., Yamazaki M., Anzai H., Yoneyama K., Murakoshi I., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 219-224.