

Универзитет “Св. Кирил и Методиј”-Скопје
Природно-математички факултет
Институт за биологија
Лабораторија за *in vitro* култури на растителни клетки и ткива

**ГЕНЕТСКИ И МЕТАБОЛИЧКИ ИНЖЕНЕРИНГ
НА РАСТЕНИЈАТА
(интерна скрипта)**



д-р Оливер Тушевски
д-р Соња Гацовска-Симиќ

Скопје, 2018

Содржина:

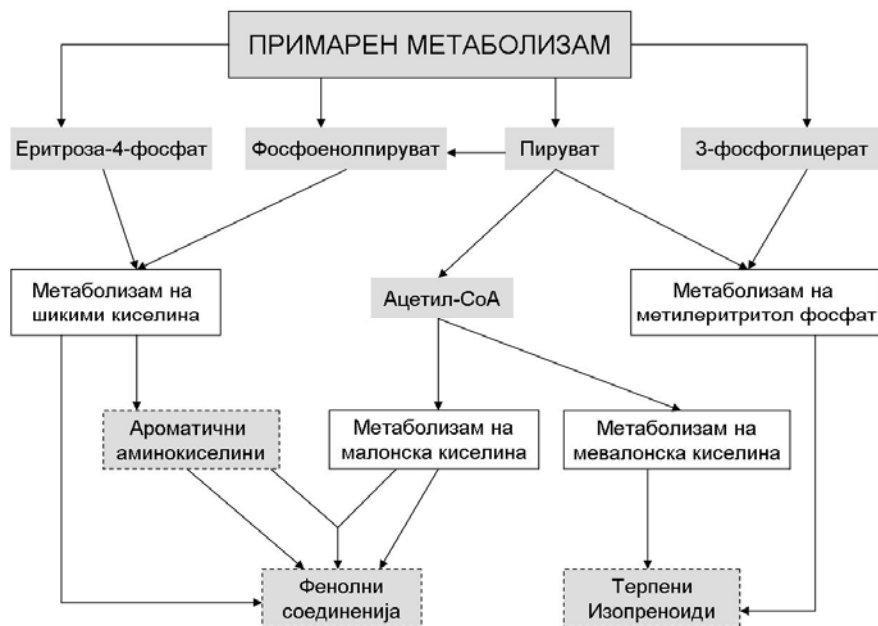
1. Вовед.....	2
1.1 Секундарни метаболити кај растенијата.....	4
2. Вегетативно размножување на лековити растенија во <i>in vitro</i> услови	9
2.1 Примена на <i>in vitro</i> културите во продукција на секундарни метаболити	14
3. Генетска трансформација на растенија во <i>in vitro</i> услови.....	18
3.1 Општи карактеристики на <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	20
3.1.1 Класификација и систематика на <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	20
3.1.2 Генетски карактеристики на <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	22
3.2 Механизам на генетска трансформација на растенија со <i>Agrobacterium</i>	27
3.2.1 Перцепција на растителните клетки од страна на <i>Agrobacterium</i>	27
3.2.2 Прикрепување на <i>Agrobacterium</i> за површината на растителните клетки	29
3.2.3 Активација на <i>vir</i> гени	31
3.2.4 Формирање на мобилна копија на T-DNA и продукција на T-DNA синцир ..	32
3.2.5 Систем за пренесување на T-синцирот во растителната клетка.....	34
3.2.6 Пренесување на T-DNA синцирот во растителната клетка	36
3.2.7 Навлегување на T-комплексот во јадрото на растителната клетка	37
3.2.8 Интеграција на T-DNA во геномот на растителната клетка	38
3.3 Генетска трансформација на растенија со <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	41
3.4 Општи карактеристики на културите на трансгени корени (“Hairy Roots”-HR) ...	46
3.5 Примена на генетски трансформирани корени (“Hairy Roots-HR”)	49
4. Содржина.....	53

1. Вовед

Метаболичките процеси во растителните клетки претставуваат комплексен систем на ензимски катализирани реакции кои овозможуваат биосинтеза на соединенија неопходни за растот и развитокот на растенијата и продукција на енергија (АТР). Соединенијата што се синтетизираат во текот на метаболичките процеси во растителните клетки можат да се поделат на примарни и секундарни метаболити зависно од нивното биосинтетско потекло, физиолошката функција, како и од дистрибуцијата во растителниот свет.

Примарните метаболички процеси кај растенијата овозможуваат биосинтеза на јаглехидрати, липиди, протеини и нуклеински киселини кои се дефинирани како примарни метаболити. Во текот на овие процеси се искористуваат мономерните соединенија (моносахариди, аминокиселини, масни киселини, нуклеотиди), со цел да се синтетизираат полимерни соединенија (полисахариди, протеини, липиди, нуклеински киселини). Примарниот метаболизам кај растителните клетки е претставен со процесите на гликолиза, циклусот на трикарбоксилни киселини, метаболизмот на пентозо-фосфати, како и процесите на биосинтеза на липиди, протеини и нуклеински киселини. Примарните метаболити претставуваат основни структурни соединенија во градбата на растителните клетки, ткива и органи. Исто така, примарните метаболити имаат есенцијална улога во одвивањето на виталните биохемиско-физиолошки процеси (фотосинтеза и респирација) кај растенијата.

Секундарните метаболити кај растенијата се добиваат од примарните метаболички процеси и претставуваат интермедиерни соединенија или крајни производи на примарниот метаболизам. Секундарните метаболити не учествуваат директно во процесите на растот и развитокот на клетките, меѓутоа тие имаат главна улога во адаптацијата и преживувањето на растенијата во нивната животна средина. Секундарниот метаболизам кај растителните клетки е претставен со метаболичките патишта на оцетна киселина, шикими киселина, малонска киселина, мевалонска киселина и метилеритритол фосфат (Сл. 1.1).



Сл. 1.1 Шематски приказ на главните биосинтетски патишта на секундарниот метаболизам.

Секундарниот метаболизам започнува да се истражува во раните почетоци на модерните ботанички истражувања, односно кон крајот на XIX^{-от} и почетокот на XX^{-от} век. Во тој период, секундарните метаболити биле дефинирани како деградациони производи на примарниот метаболизам кои немаат никаква функција кај растенијата. Според Sachs (1873), секундарните метаболити биле дефинирани како деградациони метаболички производи кои не можат да се искористат за формирање на нови клетки и притоа, не била доволно позната нивната улога во физиолошките функции на растенијата. Enger (1904), повторно го употребува терминот деградациони метаболички производи, кои секундарно можат да се искористат во заштита од хербивори. На почетокот на минатиот век, функционалниот аспект на секундарниот метаболизам не кореспондирал со тогашните научни достигнувања од областа на растителната физиологија и фитохемија и поради тоа секундарните метаболити сèуште се сметале за деградациони метаболички производи на растителниот метаболизам (Mothes, 1955). Ентомологот Gottfried Fraenkel (1959), започнува да ја потенцира екофизиолошката улога на секундарните метаболити во интеракцијата на растенијата со нивната животна средина. Сепак, кон крајот на минатиот век сèуште не била позната функцијата на секундарните метаболити и поради тоа била поставена следната дефиниција: "Секундарните метаболити се соединенија со ограничено присуство во одредена

таксономска група, кои не се неопходни за одржување на вијабилноста на растителниот организам, но, имаат улога во интеракцијата на растенијата со околната животна средина". Според оваа дефиниција, секундарните метаболити се есенцијални за адаптацијата и преживувањето на растителниот вид во еден екосистем (Luckner, 1990).

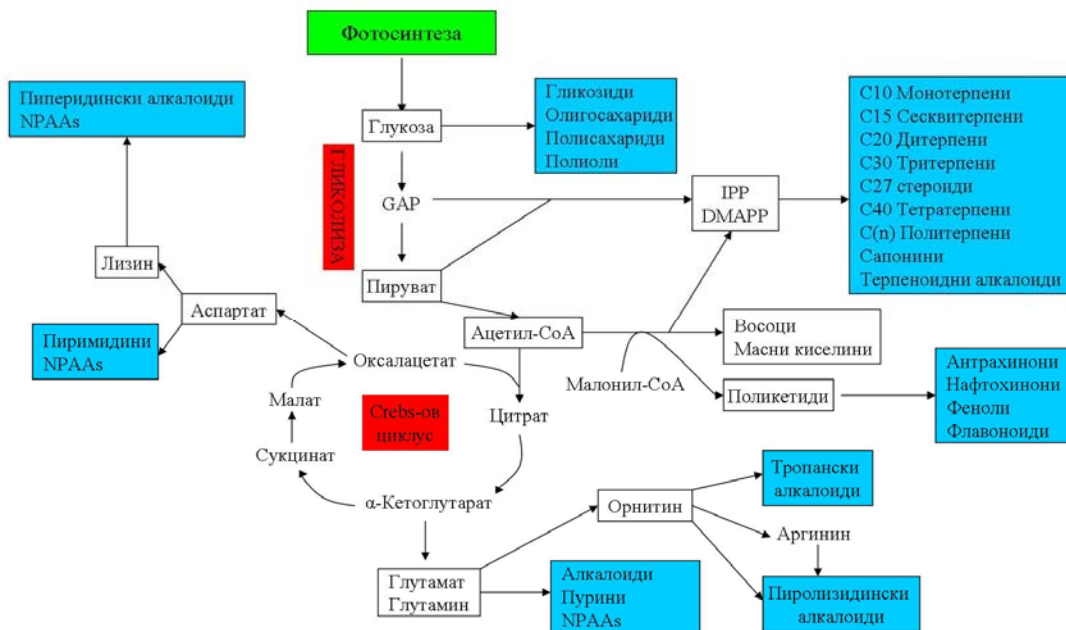
Сепак, практично е невозможно да се одреди јасна граница помеѓу примарниот и секундарниот метаболизам, бидејќи голем број примарни метаболити претставуваат интермедиерни соединенија во секундарниот метаболизам. Разликата помеѓу примарниот и секундарниот метаболизам за прв пат била воведена од страна на Albrecht Kossel (Mothes, 1980). Според Kossel (1891), примарните метаболити се застапени кај сите растителни видови и опфаќаат мал број на соединенија. Од друга страна, пак, дистрибуцијата на секундарните метаболити е ограничена на одредени таксономски категории на растенија и нивниот број е неспоредливо поголем во споредба со примарните метаболити. Исто така, секундарните метаболити не се униформно дистрибуирани во растителниот организам, туку најчесто се ограничени во одредени органи или во одредени клетки и ткива во рамките на еден орган.

Експресијата на секундарните метаболички патишта зависи од степенот на диференцијација и специјализација на растителните клетки (Rhodes, 1994). Според тоа, растителниот метаболизам се базира на два функционални аспекти: примарен метаболизам кој ги опфаќа сите процеси есенцијални за растот и развитокот и секундарниот метаболизам кој е неопходен за адаптацијата и преживувањето на растителните видови во нивната животна средина.

1.1 Секундарни метаболити кај растенијата

Секундарните метаболити можат да се класифицираат зависно од хемиските карактеристики, биосинтетското потекло и дистрибуцијата во растителниот свет.

Според хемиските карактеристики, секундарните метаболити можат да се поделат на алкалоиди, феноли и терпеноиди. Согласно со оваа класификација, алкалоидите се карактеризираат со присуство на азот во својата хемиска структура, фенолните соединенија поседуваат ароматичен прстен и фенолна хидроксилна група, додека пак, основна мономерна единица на терпеноидите е изопренот.



Сл. 1.2 Главни метаболички патишта во биосинтеза на секундарните метаболити кај растенијата. IPP-Изопентенил дифосфат, DMAPP-Диметил алил дифосфат, NPAAs-Непротеински аминокиселини, GAP-Глицералдеhid-3-фосфат.

Растителните секундарни метаболити зависно од биосинтетското потекло се делат во пет основни класи: поликетиди, терпеноиди, алкалоиди, фенилпропаноиди и флавоноиди (Сл. 1.2).

Поликетидите се добиваат од метаболизмот на мевалонската и оцетната киселина. Тие претставуваат хетерогена класа на секундарни метаболити во која се вбројуваат фенолите и флавоноидите, како и други ароматични соединенија (Сл. 1.2).

Терпеноидите се добиваат преку метаболизмот на мевалонската киселина и претставуваат најголема група на секундарни метаболити кај растенијата. Терпеноидите потекнуваат од прекурсор со пет јаглеродни атоми изопентенил дифосфат (IPP) кој претставува основна мономерна единица (C5) од која се формираат C10 (монотерпени), C15 (сесквитерпени), C20 (дистерпени), C30 (стероиди и тритерпени) и C40 (тетратерпени и каротеноиди) соединенија (Сл. 1.2).

Алкалоидите се секундарни метаболити кои се синтетизираат од различни аминокиселини (Сл. 1.2). Притоа, алкалоидите кои потекнуваат од аминокиселината триптофан се познати како индолни алкалоиди, од аминокиселината лизин се добиваат

хинолизидински алкалоиди, додека пак, аминокиселината орнитин е прекурсор во биосинтезата на пиролизидински и тропански алкалоиди (Torsell, 1997).

Фенилпропаноидите се добиваат од ароматичните аминокиселини фенилаланин и тирозин преку фенилпропаноидниот метаболизам. Флавоноидите се вбројуваат во групата на фенилпропаноиди и се синтетизираат преку фенилпропаноидниот и поликетидниот метаболизам (Сл. 1.2). Фенилпропаноидниот и терпеноидниот метаболизам се најважни биосинтетски патишта кај растенијата, за разлика од поликетидниот метаболизам кој е главно доминантен кај микроорганизмите и одредени таксономски групи на растенија (Verpoorte, 2000).

Според дистрибуцијата во растителниот свет, секундарните метаболити можат да се поделат на опиумски алкалоиди, *Strychnos* алкалоиди и *Digitalis* карденолиди (Verpoorte, 2000).

Секундарните метаболити кај растенијата се карактеризираат со широка структурна хетерогеност и диверзитет, висок степен на интерспециска варијабилност и биосинтетска пластичност. Биосинтезата на секундарните метаболити во растителните клетки и ткива се одвива под дејство на специфични ензими (Facchini и De Luca, 2008). Ензимите вклучени во секундарниот метаболизам можат да се поделат во две класи: високо специфични ензими кои учествуваат во формирањето на основниот скелет на секундарните метаболити и релативно неспецифични ензими (дехидрогенази, монооксигенази, метилтрансферази и гликозилтрансферази) кои се вклучени во модификацијата на основната структура на метаболитите. Притоа, дејството на овие релативно неспецифични ензими ја потврдува структурната хетерогеност на секундарните метаболити во растителните ткива. Одредени секундарни метаболички патишта, како што се терпеноидниот и фенилпропаноидниот метаболизам се одвиваат кај сите виши растенија. Меѓутоа, кај некои систематски групи на растенија можат да се одвиваат специфични сегменти од секундарниот метаболизам и секој растителен вид поседува специфичен состав на секундарни метаболити (Torsell, 1997). Поради тоа, секундарните метаболити можат да се користат како хемотаксономски маркери во ботаничката класификација на растенијата. Секундарниот метаболизам учествува во интеракцијата на растенијата со биотичките и абиотичките фактори на животна средина. Притоа, секундарните метаболички патишта можат да се активираат за време на одреден стадиум од развитокот на растенијата или во услови на биотички или абиотички стрес. Високиот степен на биосинтетска пластичност на секундарните

метаболити овозможува флексибилна адаптација на растенијата кон постојаните промени на условите во животната средина.

Главна карактеристика на секундарните метаболити е способноста за акумулација во растителните органи кои имаат важна улога во преживувањето и репродукцијата на растителните видови. Притоа, хидрофилните метаболити се акумулираат во вакуолите, додека пак, липофилните соединенија се депонираат во смолните и млечните канали, трихомите и кутикулата. Субцелуларната акумулација на секундарните метаболити зависи од нивната функција, биосинтетските патишта, како и од структурните особини на растителната клетка. Според физиолошката функција, секундарните метаболити се акумулираат во специфични растителни клетки или ткива. Сепак, постојат разлики помеѓу местото на биосинтеза и акумулација на секундарните метаболити. Транспортот на секундарните метаболити најчесто се одвива помеѓу соседните клетки или преку спроводниот систем кој учествува во нивната транслोकација до соодветните растителни органи (Kunze и сор., 2002). Вакуолите опфаќаат 40-90% од вкупниот волумен на растителната клетка и имаат клучна улога во акумулацијата на секундарните метаболити. Акумулацијата на секундарните метаболити во вакуолите на растителната клетка има две главни физиолошки функции: задржување на ендегените метаболити во внатрешноста на растителната клетка и заштита на секундарните метаболити од катаболичките процеси (Gunawardena и сор., 2004). Вакуоларниот транспорт на секундарните метаболити опфаќа примарен транспорт преку ABC транспортери и секундарен транспорт во антипорт со водородните јони (Martinoia и сор., 2002).

Секундарните метаболити претставуваат медијатори во интеракцијата на растенијата со надворешната средина, како и во односите растение-инсект, растение-микроорганизам и растение-растение (Verpoorte и Memelink, 2002). Меѓутоа, функцијата на секундарните метаболити не е ограничена само во интеракцијата на растенијата со животната средина и другите живи организми. Всушност, секундарните метаболити учествуваат во голем број физиолошки процеси кај растенијата, како што се хормонската регулација на клеточниот раст и морфогенетските процеси. Исто така, секундарните метаболити претставуваат модулатори на генската експресија и сигналната трансдукција (Briskin, 2000). Одредени секундарни метаболити претставуваат сигнални молекули во формирањето на коренови нодули при азотофиксацијата кај легуминозните растенија. Секундарните метаболити кои се одговорни за обојувањето на цветовите и плодовите имаат големо

значење во репродукцијата на растенијата, бидејќи ги привлекуваат полинаторните инсекти и животните кои учествуваат во расејување на семето (Dewick, 1997).

Секундарните метаболити претставуваат медијатори во одговорот на растенијата кон дејството на различни биотички и абиотички стрес фактори (Hartmann, 2007). Всушност, примарната функција на секундарните метаболити е заштита на растенијата од дејството на хербиворите (инсекти и цицачи) и патогените организми (вируси, микоплазми, бактерии и габи). Исто така, секундарните метаболити го претставуваат одбранбениот одговор на растенијата во услови на абиотички стрес, како што се промените во интензитетот на температурата и светлината во околната средина, прекумерното ултравиолетово зрачење, озонот, водниот режим и минералната исхрана, како и присуството на тешки метали во почвениот супстрат (Briskin, 2000).

Секундарните метаболити имаат големо значење во адаптацијата на растенијата кон постојаните промени на условите во животната средина. Всушност, секундарните метаболити учествуваат во два типа на резистентност на растенијата кон условите на надворешната средина, познати како пасивна и активна резистентност. Пасивната резистентност овозможува перманентна продукција на одбранбени секундарни метаболити кај растенијата независно од присуството на надворешните стрес фактори. Од друга страна, активната резистентност овозможува индуцирана продукција на одбранбени метаболити како одговор на дејството на специфични стрес фактори.

Според Hartmann, (1985) постојат две основни стратегии за учеството на секундарните метаболити во одбранбениот одговор на растенијата:

- конститутивна акумулација на одбранбени метаболити во соодветни растителни ткива или органи во концентрација неопходна за одржување на основниот одбранбен механизам;
- индуцирана продукција на активни одбранбени метаболити (фитоалексини) како одговор на нападот од патогени организми или хербивори.

Всушност, конститутивниот одбранбен механизам кај растенијата овозможува стабилно одржување на продукцијата на одбранбените секундарни метаболити во растителните ткива во концентрација неопходна за заштита од патогените и хербиворите. Од друга страна, пак, индуцираниот одбранбен механизам кај растенијата претставува агресивна стратегија на стимулирана продукција на фитоалексини при конкретно дејство на биотичките стрес фактори.

Секундарните метаболити наоѓаат широка примена во медицината, фармацевтската, прехранбената и козметичката индустрија (Roberts и Wink, 1998).

Всушност, секундарните метаболити можат да се користат за производство на природни бои (индиго, шиконин), влакна, лепила, масла (есенцијални масла), восоци, прехранбени адитиви (ванилин, капсаицин), ароматизирачки агенси и парфеми (масло од роза, масло од лаванда), стимуланти (кафеин, никотин, ефедрин), халуциногени (морфин, кокаин, мескалин, псилоцибин и тетрахидроканабинол), фармацевтски лекови (атропин, кинин, карденолиди, кодеин), антибиотици, инсектициди (никотин, пиперин, пиретрин, ротенон) и токсини (стрихнин, аконитин, колхицин, кардио гликозиди), (Croteau и сор., 2000).

Во последните неколку децении, секундарниот метаболизам се наоѓа во фокусот на истражувањата од областа на физиологијата на растенијата, фитохемијата, фармакологијата и молекуларната биологија на растенијата поради следните карактеристики (Zhang и сор., 2004):

- екстремната комплексност на секундарниот метаболизам има потреба од нови стратегии и техники за негово целосно проучување;
- диверзитетот, специфичноста и варијабилноста на секундарните метаболити во рамките на еден растителен вид претставуваат главна бариера во проучувањето на секундарните метаболички патишта;
- специфичната локализација и променливата експресија на секундарните метаболити можат значајно да интерферираат во проучувањето на биосинтетскиот потенцијал на растителните клетки;
- комплексниот геном и интеракциите помеѓу различните метаболички патишта имаат значајно влијание врз ефикасната примена на техниките на генетскиот и метаболичкиот инженеринг кај растителните клетки.

2. Вегетативно размножување на лековити растенија во *in vitro* услови

Денес на почетокот на XXI^{от} век, идентификувани се 422.000 растенија, од кои околу 72.000 растителни видови се класифицирани како лековити и ароматични растенија (Schippmann и сор., 2006). Според Светската Здравствена Организација, околу 80% од човечката популација сèуште ги користи лековитите растенија во традиционалната медицина (Vines, 2004). Меѓутоа, лековитите растенија кои наоѓаат широка примена за фитотерапијата интензивно се експлоатираат (Brevoort, 1998). Исто така, генетската и фенотипска варијабилност на растителните видови

претставуваат дополнителен проблем што доведува до погрешно идентификување на лековитите растенија од страна на локалните собирачи (Canter и сор., 2005). Поради тоа, неконтролираната експлоатација на лековитите растенија од природните популации предизвикува значајно загрозување на природните хабитати во Европските земји (Lange, 1998). Притоа, растителниот диверзитет се намалува до алармантна состојба како резултат на прекумерната експлоатација на лековитите растенија (Afolayan и Adebola, 2004). Деградацијата на шумските екосистеми и другите значајни вегетационски области е главната причина за рапидното губење на диверзитетот на лековитите растенија (Rout и сор., 2000). Исто така, климатските промени имаат изразено негативен ефект врз растителните заедници. Според Olsen, (2005), зголемувањето на бројноста на хуманата популација предизвикува интензивно искористување на достапните обработливи почвени површини за производство на храна. Поради тоа, култивирањето на лековитите растенија треба да се врши преку рационално искористување на почвените површини со цел да се овозможи континуиран извор на биолошки активни метаболити кои имаат примена во фармацевтската индустрија (Rao и Ravishankar, 2002).

Интересен е податокот дека денес во светот, особено во Соединетите Американски Држави доминира хемиската синтеза на биолошки активни компоненти во фармацевтската индустрија и само 25 % од фармацевтските производи имаат растително потекло (Raune и сор., 1991). Исто така, помеѓу светски развиените светски фармацевтски компании постои конкурентска трка за пронаоѓање на стабилен извор на обновливи ресурси на лековити растенија со елитни генотипски својства (Schippmann и сор., 2006). И покрај напредокот во хемиската синтеза на лекови, фармацевтската индустрија сèуште зависи од алтернативни извори на биоактивни метаболити, бидејќи практично е невозможно да се синтетизираат комплексните структурни карактеристики на секуларните метаболити со биолошка активност (Pezzuto, 1995).

На глобално ниво, околу 15.000 лековити растенија се наоѓаат на листата на загрозени видови поради деградација на растителните хабитати, комерцијалната експлоатација, развитокот на инвазивни растителни видови и загадувањето (Hamilton, 2008). Можноста за губење на растителниот биодиверзитет налага неопходна потреба за превземање на соодветни мерки за заштита и конзервирање на растителната популација, како и постојан развиток на безбедна и високо квалитетна фитомедицина (Chaturvedi и сор., 2007). Сепак, постои дилема дали е неопходно да се примени соодветен систем за култивирање на растителните видови или да се превземат

соодветни мерки за контролирано експлоатирање на растителните популации (Schippmann и сор., 2006). Размножување на растенијата во *in vitro* услови има голем број предности кои овозможуваат подобрување на квалитетот на лековитите растенија.

Примената на методите на култивирање на растителни клетки и ткива има посебно значење во напредокот на истражувањата за вегетативното размножување на растенијата во *in vitro* услови (Dornenburg и Knorr, 1995). Почетоците на методот на култура на растителни клетки и ткива датираат од првата деценија на XX^{от} век, кога Haberlandt (1902) изолирал и култивирал растителни клетки на вештачки хранлив медиум. На почетокот на минатиот век, прв пат било потврдено дека растителните клетки можат да се култивираат на вештачки хранлив медиум во недиференцирана состојба и неограничено време да се одржуваат во фазата на активно растење (Gautheret, 1934). Кон крајот на првата половина на XX^{от} век бил забележан голем напредок во развивање на методите и хранливите медиуми за култивирање на растителни ткива. Најчесто користени хранливи медиуми за култивирање на растителни клетки и ткива во *in vitro* услови се Murashige и Skoog, Gamborg, Hildebrandt и White (Kreis, 2007). Хранливиот медиум за култивирање на растителните клетки примарно содржи минерали, витамини, сахароза како извор на јаглерод и регулатори на растот (фитохормони), кои се неопходни за оптимален раст и развток на *in vitro* културите.

Според Rout и сор., (2000), вегетативното размножување на растенија во *in vitro* услови опфаќа примена на три различни методи:

- миропропагација, која опфаќа изолирање и култивирање на организирани меристеми (апикален изданок или аксиларна пупка) на хранлив медиум за мултипликација и регенерација;
- органогенеза, која се состои во диференцирање на адвентивни изданоци од изолирани диференцирани експлантати (корен, стебло, лист) или од претходно индуцирано калусно ткиво;
- соматска ембриогенеза, која претставува техника на индукција на соматски ембриони од изолирани соматски растителни клетки или од калусни култури.

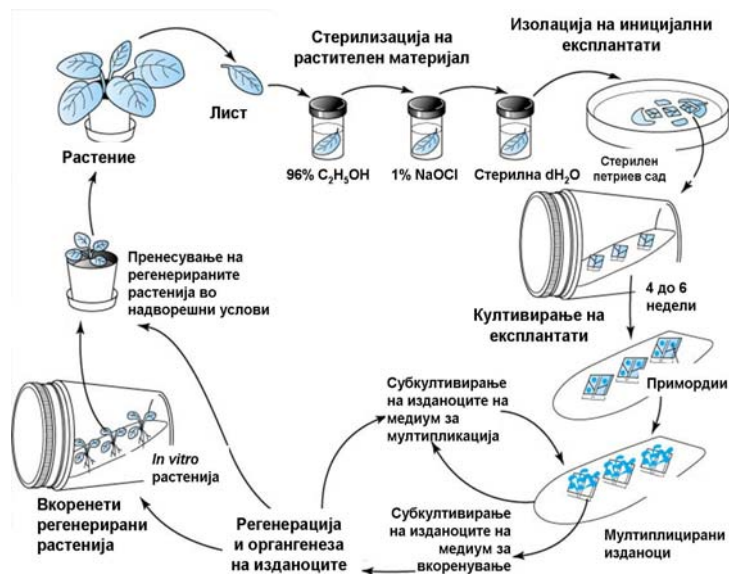
Истражувањата за микропропагација на растенијата и примената на фитохормоните во вегетативното размножување на растенијата во *in vitro* услови започнуваат кон крајот на 1960 година. Микропропагацијата на растенијата овозможува скратување на процесот на селекција, одржување на генетската

стабилност на постоечкиот генфонд и добивање на генотипски и фенотипски хомогени растенија. Способноста на растенијата за вегетативно размножување во *in vitro* услови се базира на изразената тотипотентност на растителните клетки. Всушност, тотипотентноста претставува способност на една растителна клетка да се регенерира во цело интактно фертилно растение. Составот на хранливиот медиум и физичките фактори имаат големо влијание врз стимулирање на пролиферацијата, делбата или диференцијацијата на култивираните клетки, како и врз процесите на раст и развој на мултиплицираните изданоци, формирањето на кореновиот систем и целосната регенерација на изолираните експлантати. Во *in vitro* услови, како почетни експлантати можат да се изолираат апикални пупки (меристеми), котиледони, хипкотили, сегменти од лист, стебло или корен. Микропропагацијата на растенијата во *in vitro* услови зависи од изборот на експлантатот (големина и тип), стерилизацијата на растителниот материјал, годишниот период на култивирање на експлантатите, изборот на хранливиот медиум и физичките фактори при култивирање, како и генетската стабилност на растителниот материјал.

Микропропагацијата на растенијата во *in vitro* услови опфаќа пет фази (Сл. 2.1):

- изолирање и воведување на примарни експлантати во *in vitro* услови;
- размножување (мултипликација) на изолирани експлантати;
- вкоренување (ризогенеза) на мултиплицирани изданоци;
- аклиматизација на регенирани растенија во клима комора;
- адаптација на аклиматизирани растенија на условите во надворешната средина.

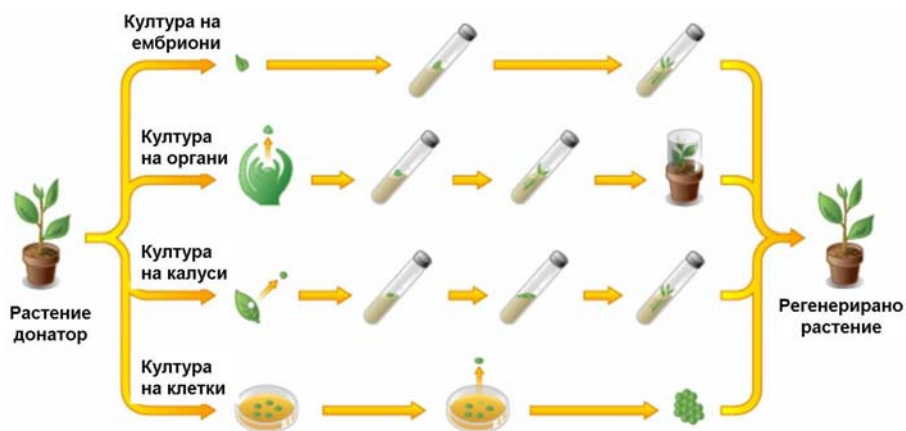
Методот на микропропагација има големо значење за растенијата кои не можат да се размножуваат преку конвенционален начин на вегетативно размножување. Тука се вбројуваат растителните видови кои не можат да ја достигнат генеративната фаза од развојот, растенија кои се карактеризираат со низок степен на герминација на семето или нехомоген квалитет на семето, како и дрвенести растенија што имаат бавен степен на растење (Canter и сор., 2005). Исто така, методот на микропропагација овозможува продукција на голем број регенеранти за краток временски период, поради високиот степен на мултипликација на култивираните експлантати. Всушност, микропропагацијата може да се применува за комерцијална мултипликација на голем број елитни растителни клонови. Растот и развојот на *in vitro* културите е независен од сезонските промени, а притоа добиените регенеранти се ослободени од микроорганизми и вируси (Debnath и сор., 2006).



Сл. 2.1 Шематски приказ на методот на микропропагација на растенијата во *in vitro* услови.

Сепак, добивањето на генетски хомогени регенеранти со методот на микропропагација зависи од изборот на соодветен тип на *in vitro* култури. Затоа, микропропагацијата најчесто започнува со култивирање на примарни експлантати од претходно постоечки меристеми (култура на изданоци или нодии), бидејќи се намалува веројатноста за појава на соматсклонска варијабилност. Притоа, органогенезата или соматската ембриогенеза се најчесто користените методи за регенерација на растенијата, бидејќи при овие процеси можат да се контролираат промените во генетскиот материјал на *in vitro* културите (George и Debergh, 2008).

Културите на растителни клетки и ткива во *in vitro* услови може да имаат неорганизиран или организиран раст и развиток. *In vitro* култури со неорганизирано растење се: култура на калуси, култура на клеточни суспензии и култура на протопласти (Сл. 2.2). Неорганизираното растење многу често се јавува кај ткивата култивирани во *in vitro* услови. Притоа, ткивото не содржи ниту една препознатлива структура од растителниот организам и поседува ограничен број диференцирани и специјализирани клетки кои нормално влегуваат во градбата на интактното растение. *In vitro* култури со организирано растење се: култура на интактни растенија, култура на ембриони, култура на органи (изданоци, меристеми, корени, антери, плодник) и култура на поединечни нодии (Сл. 2.2). Организираното растење се јавува при култивирање на организирани делови од растенијата (органи) во *in vitro* услови.



Сл. 2.2 Типови на растителни култури во *in vitro* услови.

2.1 Примена на *in vitro* културите во продукција на секундарни метаболити

Во последната деценија на минатиот век беше забележан значаен напредок во истражувањата од областа на растителната биотехнологија. Методот на култивирање на растителни клетки и ткива во *in vitro* услови (микропропагација) започна да се развива во насока на комерцијално размножување и клонирање на голем број лековити и ароматични растенија (Rathore и сор., 2010). Примената на лековитите растенија во медицината и фармацевтската индустрија е главниот предизвик за развојот на методот на микропропагација. Всушност, методот на микропропагација на лековити и ароматични растенија започна да се применува со цел да се добијат нови, безбедни, ефикасни и високо-квалитетни секундарни метаболити, кои наоѓаат широка примена во медицината, фармацевтската, прехранбената и козметичката индустрија. Затоа, методот на култивирање на растителни клетки и ткива во *in vitro* услови стана мошне ефикасна стратегија за стимулирање на продукцијата на секундарни метаболити од особен интерес (Ravishankar и сор., 1999; Dornenburg и Knorr, 1997; DiCosmo и Misawa, 1995). Сепак, конвенционалниот метод на микропропагација на лековитите растенија претставува финансиски непрофитабилна стратегија за комерцијално производство на биолошки активни метаболити. Автоматизацијата на методот на микропропагација и дизајнирањето на соодветни биореактори претставуваат алтернативни решенија за проблемите поврзани со материјалните средства (Cazzulino и сор., 1991). Исто така, методот на фотоавтотрофна микропропагација стана ефикасна техника за комерцијално

производство на клонирани лековити растенија со подобар раст и квалитет, зголемена вијабилност поради отсуство на контаминација, како и зголемен процент на аклиматизација на регенерираните *in vitro* култури (Paek и сор., 2005).

Предностите на продукцијата на секундарни метаболити со примена на методите на култивирање на растителни клетки и ткива во *in vitro* услови опфаќаат: (Zafar и сор., 1992; Rao и Ravishankar, 2002):

- контролирана продукција на секундарни метаболити независно од сезонските и климатските промени во надворешната средина, како и географската дистрибуција на растителниот вид;
- униформен раст на растителните клетки при контролирани услови за култивирање;
- биотрансформација на секундарниот метаболизам на растителните клетки со примена на методите на додавање на прекурсори во хранливиот медиум и елицитација;
- оптимизирање на условите за култивирање со цел да се стимулира или инхибира продукцијата на одредени специфични метаболити;
- методите за култивирање во стерилни (асептични) услови оневозможуваат интерференција на микроорганизмите врз биосинтетскиот капацитет на клетките;
- лесно идентифицирање на одредени метаболички реакции од примарниот и секундарниот метаболизам на ниво на интактни клетки;
- ограничениот биосинтетски капацитет на растителните клетки може да се продолжи кај интактните *in vivo* растенија;
- процесот на екстракција на растителни метаболити од *in vitro* културите е поедноставен во споредба со фитоекстракцијата од интактни *in vivo* растенија;
- методот на култивирање на растителни клетки, ткива и органи во биореактори може да се користи за комерцијална продукција на секундарни метаболити;
- *in vitro* културите можат да се користат за продукција на нови биолошки активни метаболити, кои воопшто не се присутни кај интактните *in vivo* растенија;
- развивање на нови стратегии за зголемување на квантитетот и квалитетот на секундарните метаболити кај *in vitro* културите.

Примената на *in vitro* културите во продукцијата на секундарни метаболити започнува интензивно да се проучува во шеесеттите години на XX^{от} век. Притоа, културите со неоразнизирано растење (култури на калуси и клеточни суспензии) и културите со организирано растење (култури на изданоци и корени) имаат широка

примена во експерименталните методи за стимулирање на продукцијата на секундарни метаболити. Според досегашните научни сознанија, одредени секундарни метаболити не можат да се синтетизираат со примена на култури на недиференцирани клетки (култура на калуси и клеточни суспензии). Всушност, биосинтезата и акумулацијата на одредени метаболити започнува во услови на регенерација на диференцирани растителни органи од култура на недиференцирани клетки. Така на пр., културите на растителни органи имаат широка примена во продукција на морфински алкалоиди кај *Papaver somniferum*, тропански алкалоиди кај видовите од фамилијата Solanaceae и димерни алкалоиди кај *Catharanthus roseus*. Според литературните податоци, културите на диференцирани растителни органи (култури на изданоци и корени) имаат големо значење во продукцијата на секундарни метаболити кај голем број лековити растенија, кои наоѓаат широка примена во медицината и фармацевтската индустрија (Roja, 1994).

Меѓутоа, голем број на растителни метаболити не се синтетизираат во *in vitro* услови или *in vitro* културите се карактеризираат со пониска содржина на биоактивни метаболити во споредба со интактните *in vivo* растенија. Од друга страна пак, претходно развиените протоколи и методи за микропропагација на одредени растенија не можат да се користат за вегетативно размножување на други растителни видови (Zafar и сор., 1992). За да се надминат проблемите поврзани со ограничениот биосинтетски капацитет на растителните клетки, развиени се голем број стратегии со цел ефикасно да се стимулира продукцијата на секундарни метаболити кај растителните *in vitro* култури. Во последните неколку децении беше направен голем напредок во развитокот на алтернативните методи за стимулирање на продукцијата на секундарни метаболити од *in vitro* култури на растителни клетки и ткива (Ravishankar и Rao, 2000; Ravishankar и Venkataraman, 1993; Fowler и Stafford, 1992; Payne и сор., 1991; Rao и Ravishankar, 2002).

Експерименталните методи и стратегии што се применуваат за стимулирање на продукцијата на секундарни метаболити кај *in vitro* растителни култури опфаќат:

- селекција на високо-продуктивни клеточни линии, односно растителни клетки со висок потенцијал за продукција на секундарни метаболити;
- оптимизација на составот на хранливиот медиум за да се зголеми биосинтезата и акумулацијата на секундарни метаболити;
- примена на соодветни елицитори (метод на елицитација) кои можат да ја регулираат експресијата на транскрипциони фактори преку механизмот на

сигнална трансдукција, со цел да се зголеми продукцијата на секундарни метаболити за краток временски период;

- имобилизација на растителни клетки за да се зголеми приносот на екстрацелуларни метаболити;
- пермеабилитација на *in vitro* култури за да се изврши секреција на акумулираните метаболити од растителните клетки во хранливиот медиум;
- адсорпција на секретирани метаболити во медиумот, со цел да се екстрахираат метаболичките производи од хранливиот медиум;
- биотрансформација на органските соединенија во хемиски дефинирани метаболички производи;
- продукција на секундарни метаболити во соодветен тип на биореактори;
- генетска трансформација на *in vitro* култури, со цел да се интензивира метаболичкиот пат на биосинтеза на одреден специфичен метаболит.

Главните недостатоци на примената на методите за зголемување на продукцијата на секундарни метаболити од *in vitro* култури на растителни клетки се однесуваат на недоволното познавање на биосинтетските патишта на одредени метаболички производи, нискиот степен на експресија на клучните регулаторни гени кај недиференцирани *in vitro* култури, генетската нестабилност на култивираните клетки, како и биосинтезата или акумулацијата на одредени секундарни метаболити во специјализирани ткива или органи (Bourgand и сор., 2001). Сепак, сèуште е мал и недоволен бројот на научни сознанија за регулацијата на секундарните биосинтетски патишта, што претставува главен недостаток за широката примена на *in vitro* културите во комерцијална продукција на секундарни метаболити. Затоа, неопходно потребно е добро да се познаваат регулаторните механизми на секундарниот метаболизам на молекуларно ниво, со цел да се развијат алтернативни стратегии за индустриско производство на секундарните метаболити. Според досегашните научни сознанија, културите на клеточни суспензии ефикасно се применуваат во комерцијално производство на шиконин од *Lithospermum erythrorhizon*, берберин од *Coptis japonica* и сангвинарин од *Papaver somniferum* (Rao и Ravishankar, 2002).

3. Генетска трансформација на растенија во *in vitro* услови

Генетската трансформација на растенијата претставува техника на контролирано внесување на DNA секвенци во геномот на клетката реципиент. Пренесувањето на гени, односно експресијата на туѓа DNA во клетката домаќин и наследувањето на новите особини во потомството овозможуваат добивање на генетски трансформирани растенија (трансгени растенија).

Методот на генетска трансформација на растенијата е неопходна стратегија за експериментално проучување на функцијата на гените, како и подобрување на квалитетот на растенијата преку интродуцирање на генски секвенци од интерес во растителниот геном (Birch, 1997). Примената на методот на генетска трансформација, како и проучувањето на механизмите на регулација и функцијата на гените кај трансгените растенија можат да имаат голем придонес во областа на физиологијата и биохемијата на растенијата. Всушност, методот на генетска трансформација овозможува проучување на комплексните биохемиско-физиолошки процеси кај растенијата, како што се сигналната трансдукција и генската регулација на молекуларно ниво. Сепак, најголем дел од научните истражувања за генетска трансформација на растенијата се насочени кон развој на ефикасна технологија за добивање на елитни растенија со подобрени својства, кои ќе имаат огромен бенефит за човештвото (Birch, 1997). Притоа, практично е невозможно да се добијат елитни растенија со подобрени својства со примена на конвенционалните методи на хибридизација помеѓу различни растителни видови.

Предностите на методот на генетска трансформација опфаќаат добивање на:

- растенија резистентни кон хербициди (Anthony и сор., 1999), инсекти (Dempsey и сор., 1998), вируси (Beachy, 1997), бактерии (Zhang и сор., 1999), габи (Salmeron и Vernooij, 1998) и нематоди (Jung и сор., 1998);
- растенија со подобрен нутритивен квалитет (Shewry, 1998);
- продукција на антитела и рекомбинантни протеини (Kusnadi и сор., 1998);
- растенија со модифицирани метаболички патишта со цел да се стимулира продукција на секундарни метаболити од интерес (Heuer и сор., 1999);
- растенија со елитни фенотипски карактеристики кои наоѓаат широка примена во хортикултурата (Mol и сор., 1999);

- растенија кои наоѓаат примена во фиторемедијацијата на контаминирани супстрати (Raskin и сор., 1997);
- растенија со висока содржина на метаболити со фармаколошко значење (антитела, вакцини), (Rodgers и сор., 1999);
- растенија резистентни кон еколошки стрес фактори (Holmberg и Bülow, 1998).

Методот на генетска трансформација на растенијата се базира на интродукција на DNA во тотипотентни растителни клетки, што резултира со регенерација на трансформирани клетки во интактни фертилни растенија. Клучни фактори за успешна трансформација на растенијата се селекција на соодветен метод за ефикасна интродукција на DNA во растителни клетки, како и соодветен растителен материјал (клетки или ткива) со цел да се постигне успешна регенерација на генетски трансформирани интактни растенија. Притоа, DNA може да се интродуцира во различни растителни експлантати, како што се изолирани клетки, протопласти, калусно ткиво, суспензија на клетки или диференцирани растителни органи.

Методите за генетска трансформација на растенијата можат да се поделат во две групи: директни и индиректни методи. Индиректните методи на генетска трансформација опфаќаат интродукција на DNA сегменти од бактериски плазмиди на *Agrobacterium* во геномот на растителната клетка. Всушност, најчесто применуван метод за пренесување на туѓи гени во растителниот геном е *Agrobacterium*-посредуваната трансформација (Gelvin, 2003). Предноста на методот на генетска трансформација на растенијата со *Agrobacterium* е едноставноста на техниката за изведување, поврзаниот трансфер на гени (ген од интерес со селективен маркер), висока фреквенција на стабилна трансформација со мал број на интегрирани генски копии, како и способност за пренесување на долги (>150 kb) T-DNA фрагменти, (Veluthambi и сор., 2003). Главен недостаток на овој метод е малиот процент на трансформирани клетки од примарниот експлантат, како и ограничениот број на растителни видови кои се сензитивни кон трансформација (Komari и сор., 1998). Сепак, постојат голем број на алтернативни методи со цел да се олесни трансферот на гени кај резистентните растенија со примена на *Agrobacterium*-посредуваната трансформација. Од друга страна пак, методите кои овозможуваат директен трансфер на DNA во растителните клетки се познати како директни методи на генетска трансформација. Директните методи на трансформација опфаќаат: фузија на протопласти преку метод на соматска хибридизација, трансформација на

протопласти со примена на полиетилен гликол (PEG) или електропорација, трансформација преку имбибиција, бомбардирање со микрочестички, микроинјектирање на DNA, електрофореза на ембриони и други (Rao и сор., 2009). Сепак, трансферот на DNA кај протопласти и бомбардирање со микрочестички се најчесто применувани директни методи (Birch, 1997).

Видовите од родот *Agrobacterium* можат да извршат трансфер на DNA кај голем број дикотиледони и монокотиледони растенија (DeClene и DeLey, 1976), голосемени растенија (Levee и сор., 1999), квасци (Bundock и сор., 1995), аскомицети и базидиомицети (de Groot и сор., 1998). Исто така, *Agrobacterium* може да изврши трансформација и на хумани клетки (Kunik и сор., 2001).

3.1 Општи карактеристики на *Agrobacterium rhizogenes*

3.1.1 Класификација и систематика на *Agrobacterium rhizogenes*

Видовите од родот *Agrobacterium* се Gram-негативни почвени бактерии, кои предизвикуваат различни заболувања кај растенијата. Според патогените својства, односно симптомите на болеста кај растенијата, родот *Agrobacterium* опфаќа голем број видови. Имено, *A. radiobacter* е невирулентен вид, *A. tumefaciens* предизвикува тумор на вратот на коренот (“crown gall”), *A. rhizogenes* предизвикува т.н. синдром на “влакнести корени” (“hairy root”-HR), *A. rubi* е причинител на тумор кај капината (“cane gall”), додека пак, *A. vitis* предизвикува тумори и некротични лезии кај виновата лоза (Otten и сор., 1984).

A. rhizogenes за прв пат бил опишан од страна на Riker и сор., (1930), а подоцнежната класификацијата била извршена од страна на Conn (1942). Според Riker и сор., (1930), бактериските соеви што предизвикуваат HR кај растенијата биле класифицирани во заеднички таксон *Phytomonas rhizogenes*. Потоа, биле користени таксономските термини *Bacterium rhizogenes* и *Pseudomonas rhizogenes* како синоними за *Phytomonas rhizogenes*. Conn (1942) за прв пат го предложува родот *Agrobacterium*, а во видот *A. rhizogenes* се класифицирани сите бактериски соеви кои индуцираат појава на “влакнести корени” кај растенијата.

Според подоцнежните систематски истражувања, видовите од родот *Agrobacterium* биле поделени во биотипови (биовари). Биотиповите претставуваат

таксономски категории кои опфаќаат систематизацијата на бактериските видови според одредени физиолошки особини. *A. rhizogenes* и сите други бактериски видови што поседуваат Ri (Root Inducing) плазмид и имаат способност да индуцираат HR кај растенијата се вбројуваат во биотип 2 категоријата (Veena и Taylor, 2007).

Поради постоењето на конфузија во систематизирањето, соевите на *A. rhizogenes* биле класифицирани во посебни подгрупи според способноста за продукција на специфични соединенија познати како опини. Притоа, соевите на *A. rhizogenes* што поседуваат Ri плазмид се поделени во 4 подгрупи: агропин соеви (pRiA4, pRi1855, pRiHRI, pRi15834 и pRiLBA9402), манопин соеви (pRi8196), кукумопин соеви (pRi2659) и микимопин соеви (pRi1724).

Исто така, соевите на *A. rhizogenes* можат да се класифицираат како поларни и аполарни соеви, според појавата на поларност при инфекција на растителното ткиво. Така на пр., одредени соеви индуцираат формирање на корени само на апикалната површина од коренови дискови, додека пак, други соеви индуцираат пролиферација на корени на апикалната и базалната површина од растителното ткиво (Cardarelli и сор., 1985). Агропин соевите се аполарни, бидејќи стимулираат пролиферација на “влакнести корени” независно од ориентацијата на растителното ткиво. Меѓутоа, сите останати соеви на *A. rhizogenes* се поларни и индуцираат појава на HR единствено кога растителните ткива се инокулирани со аполарна ориентација.

Според систематските карактеристики (Woese и сор. 1984), *Agrobacterium rhizogenes* се класифицира на следниот начин:

- Царство: Bacteria,
- Оддел: Proteobacteria,
- Класа: Alpha Proteobacteria,
- Ред: Rhizobiales,
- Фамилија: Rhizobiaceae,
- Род: *Agrobacterium*,
- Вид: *Agrobacterium rhizogenes* Conn.

3.1.2 Генетски карактеристики на *Agrobacterium rhizogenes*

Генетските студии покажуваат дека агробактериите поседуваат циркуларен хромозом и неколку плазмиди. Бактерискиот хромозом содржи генски секвенци, кои се неопходни за нормална физиологија и метаболизам на бактериските клетки. Хромозомските гени кај агробактериите се групирани во 3 групи според функцијата што ја поседуваат: гени одговорни за прикрепување на бактериите за површината на растителните клетки, вирулентни гени и гени одговорни за топлотен стрес (heat shock genes).

Способноста на агробактериите за прикрепување на површината на растителните клетки се базира на продукцијата на егзополисахариди (Zorreguieta и сор., 1988). Хромозомските *pscA* (*exoC*) гени кај агробактериите се вклучени во синтеза на сукциноглюкански егзополисахариди (Reuber и Walker, 1993). *ChvAB* гените учествуваат во синтеза на β -1,2-D-глюкан, додека пак, *chvE* генот врши индукцијата на *vir* гените од плазмидот кај агробактериите (Metts и сор., 1991). Индуцирана експресија на *vir* регионот може да се регулира и со помош на хромозомските *ros* гени, кои кодираат репесор на *vir* гените (Hussain и Johnston, 1997). Исто така, вирулентноста на агробактериите зависи и од активноста на *att* гени, кои се вклучени во интеракција со растителните клетки (Matthysse и сор., 2000). Всушност, *att* гените се поделени во две групи: првата група на *att* гени учествуваат во сигнализацијата помеѓу бактериите и растенијата, додека пак, другата група на *att* гени се вклучени во синтезата на соединенија кои учествуваат во иницијалните фази од прикрепувањето на агробактериите за површината на растителните клетки (Matthysse и сор., 1996).

Гените вклучени во топлотниот стрес кај агробактериите се организирани во два оперони: *groESL* и *dnaKJ* (Segal и Ron, 1995).

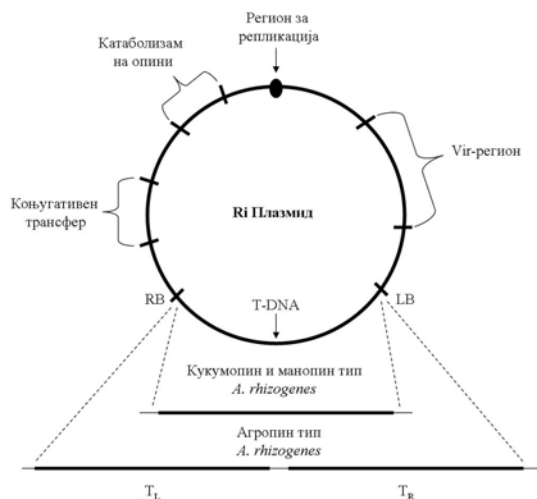
Според досегашните генетски истражувања, постојат голем број сличности помеѓу хромозомските гени кај *A. rhizogenes* и останатите агробактерии. Разликите во поврзувањето на *A. rhizogenes* и *A. tumefaciens* за површината на растителната клетка се базира на разликите во *att* гените (Sykes и сор., 1988).

Бактерискиот плазмид кај *Agrobacterium rhizogenes* е познат како Ri-плазмид (Root Induced plasmid) и има сличен состав и структура со Ti плазмидот (Tumor Induced Plasmid) кај *A. tumefaciens*. Исто така, компаративните студии покажуваат дека не

постојат значајни разлики помеѓу *A. rhizogenes* и *A. tumefaciens* во иницијалните механизми на генетска трансформација кај растенијата.

Според Suzuki и сор., (2000), Ri плазмидите кај соевите на *A. rhizogenes* имаат големина од 180-250 kbp и се состојат од 4 основни генски региони (Сл. 3.1):

- T-DNA (мобилна DNA секвенца што се пренесува во клетката-реципиент);
- вирулентни (*vir*) гени (медијатори во процесот на генетска трансформација);
- ген за репликација (*rep* регион за репликација на плазмидот);
- *tra* и *trb* региони (генски секвенци за коњугативен трансфер на плазмидот).



Сл. 3.1 Шематски приказ на структурата на Ri плазмидите кај *Agrobacterium rhizogenes*.

RB-Десна гранична секвенца; LB-Лева гранична секвенца; T_L- Лева T-DNA секвенца; T_R- Десна T-DNA секвенца (модиф. според Veena и Taylor, 2007).

3.1.2.1 T-DNA

Според досегашните истражувања (Hansen и сор., 1994), утврдено е дека сите соеви на *A. rhizogenes* содржат T-DNA регион во Ri плазмидот, кој ги поседува следните гени:

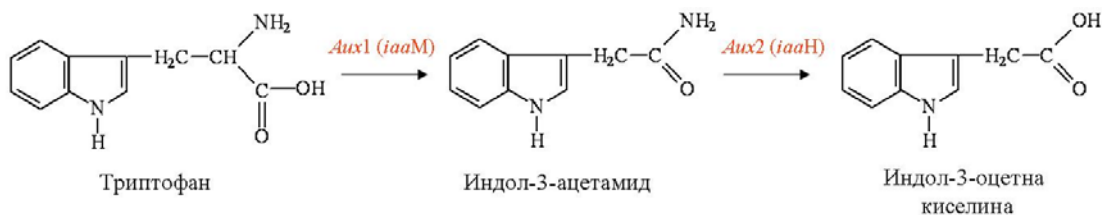
- гени за биосинтеза на опини (*mas1*, *mas2* и *ags*),
- гени одговорни за индукција и растење на “Hairy Roots”-HR (*rol* гени),
- гени за биосинтеза на ауксини (*aux* гени),
- гени со непозната функција.

T-DNA претставува плазмидна DNA секвенца што се пренесува и интегрира во растителниот геном. T-DNA секвенцата е ограничена од останатите генски региони на Ri плазмидот со репетитивни секвенци со големина од 25 bp, наречени десна (RB) и лева (LB) гранична секвенца (Сл. 3.1), (Yadav и сор. 1982). Граничните секвенци имаат важна улога во препознавањето на T-DNA секвенцата од страна на рестриктивните ендонуклеази, бидејќи ги означуваат рестриктивните места каде се врши дезинтеграцијата на DNA со посредство на одредени *vir* гени.

Одредени типови на Ri плазмиди поседуваат две одделни T-DNA секвенци меѓусебно раздвоени од останатиот дел на плазмидот со 4 гранични секвенци. Ri плазмидите со два T-DNA региони (лева T-DNA-T_L и десна T-DNA секвенца-T_R) се означуваат како раздвоени T-DNA региони (Сл. 3.1). Кукумопин и манопин Ri плазмидите поседуваат само еден T-DNA регион, за разлика од агропин Ri плазмидите кои имаат два раздвоени T-DNA региони (Сл. 3.1). T_L-DNA и T_R-DNA фрагментите имаат големина од 15-20 kbp и независно се интегрираат во растителниот геном. Сепак, пренесувањето на T_L-DNA е неопходен процес за индукција на HR кај растенијата (Sevon и Oksman-Caldentey 2002).

Досегашните генетски истражувања за организација на T_L-DNA фрагментот кај агропин Ri плазмидите овозможиле идентификација на 18 отворени рамки на читање (ORF) (Slightom и сор., 1986). ORF 10, 11, 12 и 15 се однесуваат на *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD* гените. Исто така, ORF 3, 8, 13, 13b и 14 се сметаат како потенцијални онкогени кои учествуваат во индукцијата на HR кај растенијата (Otten и Helfer, 2001). *Rol* гените, особено *rolB* имаат есенцијална улога во индукцијата, развитокот и фенотипот на HR (Binns и Costantino, 1998).

T_R-DNA фрагментот е присутен само кај агропин Ri плазмидите од *A. rhizogenes* и поседува гени одговорни за биосинтезата на ауксини (*aux1* и *aux2*) и опини (*mas1*, *mas2*, *ags*). *Aux1* (*iaaM*) генот кодира активност на ензимот триптофан моноксигеназа, кој учествува во конвертирање на аминокиселината триптофан во индол-3-ацетамид (Сл. 3.2). Од друга страна пак, *aux2* (*iaaH*) генот го кодира ензимот индол-3-ацетамид хидролаза, кој учествува во синтеза на индол-3-оцетна киселина (ауксин) од индол-3-ацетамид (Сл. 3.2), (Thomashow и сор., 1986). *Aux* гените имаат само помошна функција и не се есенцијални за индукција на HR. Всушност, функцијата на *aux* гените е ограничена во услови на недоволна синтеза на ендогени ауксини кај влакнестите корени-HR.



Сл. 3.2 Биосинтеза на ауксини (индол-3-оцетна киселина) при експресија на *aux1 (iaaM)* и *aux2 (iaaH)* онкогените од *A. rhizogenes* кај трансформираниите растителни клетки.

Исто така, во T_R-DNA фрагментот од Ri плазмидот се лоцирани и гените кои учествуваат во биосинтезата на опините. Притоа, *mas1* и *mas2* гените се одговорни за биосинтеза на манопин, додека пак *ags* генот овозможува синтеза на агропин. Меѓутоа, гените одговорни за метаболизирање на опините од страна на агробактериите се лоцирани надвор од T-DNA фрагментот на Ri плазмидот.

T_R-DNA од Ri плазмидот кај агропин соевите на *A. rhizogenes* поседува висок степен на хомологија со T-DNA секвенцата од Ti плазмидот кај *A. tumefaciens*. Од друга страна пак, T_L-DNA регионот значително се разликува од T-DNA секвенцата на Ti плазмидот и претставува хомологна секвенца со T-DNA регионот од Ri плазмидот кај манопин соевите на *A. rhizogenes* (Nilsson и Olsson 1997).

3.1.2.2 Вирулентни (*vir*) гени

Вирулентните (*vir*) гени се есенцијални за успешното одвивање на процесот на генетска трансформација кај растенијата. Хомологијата во *vir* регионот помеѓу Ri и Ti плазмидите кај *A. rhizogenes* и *A. tumefaciens* го потврдува идентичниот механизам во процесот на пренесување на гени во растителната клетка (Moriguchi и сор., 2001).

Vir регионот кај плазмидите (Сл. 3.1) претставува генски кластер со големина од 30 kbp и се состои од најмалку 12 оперони. Притоа, 8 оперони (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* и *virH*) кодираат есенцијални протеини неопходни за процесот на генетска трансформација, додека пак, останатите 4 оперони (*virI*, *virK*, *virL* и *virM*) се помошни оперони кои кодираат протеини со недоволно позната функција. *VirA*, *virG*, *virF*, *virI*, *virK*, *virL* и *virM* опероните се изградени од само еден ген, *virE*, *virC* и *virH* од два гени,

virD од четири гени, а пак, *virB* од единаесет гени. *Vir* гените кодираат протеини кои учествуваат во процесот на T-DNA трансфер во повредените растителни клетки (Winans и сор., 1994).

Функцијата на одделните оперони од *vir* регионот е различна во процесот на трансформација на растителните клетки. Кодираните протеини од страна на *virA* и *virG* гените се одговорни за перцепцијата на повредените растителни клетки, како и последователна индукција на останатите *vir* оперони. *VirC* и *virD* протеините учествуваат во формирањето на мобилна копија на T-DNA. *VirD* и *virE* протеините формираат комплекс со T-DNA и ја насочуваат кон јадрото на растителната клетка. Притоа, *virD* протеинот учествува во интеграцијата на T-DNA во геномот на растителната клетка. *VirB* кодираните протеини се одговорни за пренесување на T-DNA комплексот преку бактериските мембрани во растителната клетка.

VirA, *virB*, *virG* и *virD* генските локуси имаат есенцијална улога во процесот на туморогенеза, додека пак, останатите *vir* оперони можат позитивно да влијаат врз ефикасноста на генскиот трансфер (Sheng и Citovsky, 1996).

3.1.2.3 Генски секвенци за репликација и коњугативен трансфер на плазмиди

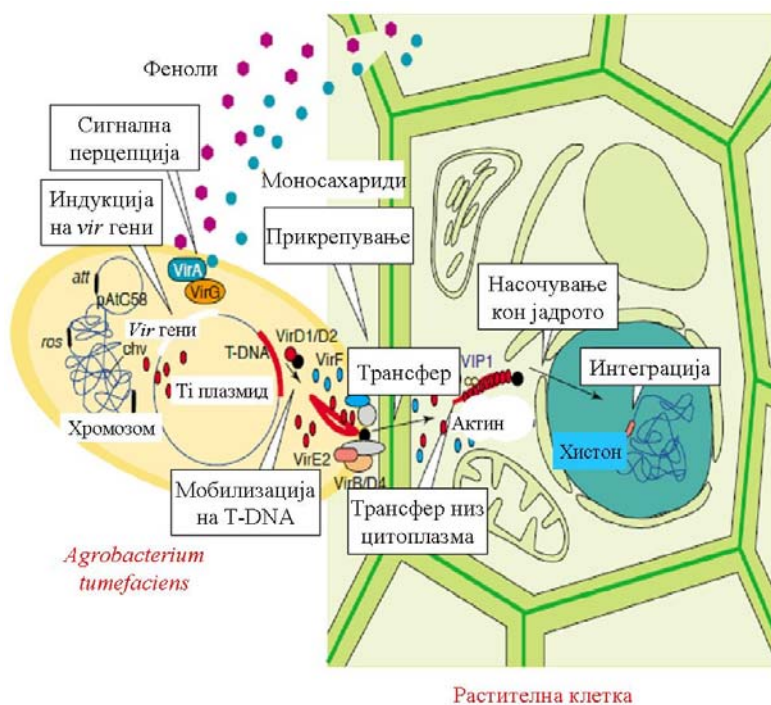
Плазмидните гени кај агробактериите се одржуваат во релативно мал број копии во споредба со хромозмските гени. Репликацијата и стабилноста на плазмидите се одвива под дејство на *repA*, *repB* и *repC* гените (Сл. 3.1), (Tabata и сор., 1989). Притоа, *repC* е неопходен за репликација на плазмидот, додека пак, *repA* и *repB* учествуваат во стабилното наследување на плазмидите.

Ri плазмидите поседуваат *tra* генски регион и *traI/trb* оперон (Сл. 3.1). *Tra* генскиот регион во комбинација со *traI/trb* оперонот се одговорни за кодирање на компоненти вклучени во формирање на коњугациски влакна (pili) и одвивање на коњугацијата помеѓу агробактериите. Притоа, *traI* е ензим одговорен во синтезата на *N*-ацил-хомосерин лактон, соединение кое учествува во хемотаксијата и интерклеточната комуникација помеѓу агробактериите (White и Winans, 2007). *TraI/trb* оперонот и *tra* регионот кај Ri плазмидите, меѓусебно се поврзани во еден генски комплекс (Dessaux и сор., 1992).

3.2 Механизам на генетска трансформација на растенија со *Agrobacterium*

Според Sheng и Citovsky (1996), *Agrobacterium*-посредуваната генетска трансформација на растенијата може да се подели во неколку фази (Сл. 3.3):

- перцепција на повредени растителни клетки од страна на *Agrobacterium*;
- прикрепување на *Agrobacterium* за површината на растителните клетки;
- индукција на *vir* гени и формирање на мобилна копија на T-DNA;
- трансфер на T-DNA од бактериската клетка во растителната клетка;
- интеграција на T-DNA во јадрото на растителната клетка.



Сл. 3.3 Шематски приказ на механизмот на *Agrobacterium*-посредувана генетска трансформација кај растенијата (модиф. според Gelvin, 2003).

3.2.1 Перцепција на растителните клетки од страна на *Agrobacterium*

Видовите од родот *Agrobacterium* се широко распространети бактерии во почвениот супстрат. Голем број почвени изолати од *Agrobacterium* не се фитопатогени и живеат независно од растителниот домаќин. Меѓутоа, фитопатогените соеви на *Agrobacterium* имаат способност да формираат тумори кај растенијата. Првиот чекор во процесот на

генетска трансформација опфаќа перцепција на растителните клетки од страна на *Agrobacterium*. Според Kahl, (1982), процесот на трансформација се одвива само кај повредени растителни клетки, поради индукцијата на серија метаболички патишта и акумулацијата на секундарни метаболити неопходни за регенерација на повреденото растително ткиво. Повредата на растителните ткива е проследена со ослободување на јаглехидрати и фенолни соединенија (Сл. 3.3), кои стимулираат хемотаксија кај агробактериите (Winans, 1992). Фенолните и јаглехидратните соединенија што се ослободуваат од местото на повреда на растителното ткиво се перцепираат како сигнални молекули од страна на *Agrobacterium* и вршат активирање на плазмидните *vir* гени (Сл. 3.3). Според Stachel и Zambryski (1986), моноцикличното фенолно соединение ацетосирингон предизвикува максимална експресија на *vir* гените, во споредба со јаглехидратите и останатите фенолни соединенија. Ацетосирингон и α -хидроксиацетосирингон се првите идентификувани фенолни соединенија како специфични активатори на *vir* гените кај *Agrobacterium* (Stachel и соp., 1985). Капацитетот на сензорниот систем на *Agrobacterium* за перцепција на различни стимулатори овозможува индуцирана експресија на *vir* гените кај широк спектар на растителни видови.

Индуцираната експресија на *vir* гените од страна на фенолите соединенија може дополнително да се интензивира во присуство на специфични моносахариди: арабиноза, галактоза, галактуронска киселина, глукуронска киселина, глюкоза, маноза, фукоза, целобиоза и ксилоза (Ankenbauer и Nester, 1990). Всушност, овие моносахариди се ослободуваат од клеточниот сид на повредените растителни клетки. Моносахаридите глюкоза и галактоза можат да извршат индуцирана експресија на *vir* гените во услови на ниска концентрација или отсуство на ацетосирингон (Cangelosi и соp., 1990). Сепак, алдозите со пиранозна конформација, како и киселите јаглехидрати покажуваат најголем капацитет за индукцијата на *vir* гените (Shimoda и соp., 1990).

pH на средината и температурата имаат особено влијание врз индукцијата на *vir* гените. Всушност, транскрипцијата на *vir* гените се одвива само во кисела средина (pH 5.2-5.7), (Stachel и соp., 1986). Исто така, оптималната температура за експресијата на *vir* гените изнесува околу 22°C и се наоѓа во корелација со оптималната температура за формирање на туморно ткиво кај растенијата. Притоа, експресијата на *vir* гените целосно се инхибира на температура повисока од 32°C (Alt-Moerbe и соp., 1988).

Според досегашните научни сознанија, присуството на фенолни соединенија и моносахариди во услови на кисела средина се неопходни фактори за индукција на *vir*

гените кај агробактериите. Всушност, ексудатот што се ослободува од повреденото растително ткиво ги содржи сите хемиски соединенија што се неопходни за индукција на *vir* гените. Притоа, интензивното ослободување на фенолни соединенија од местото на повреда на растителното ткиво се одвива со цел да се обнови клеточниот сид на повредените растителни клетки, преку акумулирање на прекурсори за биосинтеза на лигнин (Douglas, 1996). Исто така, прекумерното акумулирање на лигнин и интензивирањето на процесот на лигнификација (калоза) на местото на повреда на растителните клетки претставува заштитен механизам против инфекција од патогени микроорганизми (Dixon и Paiva, 1995). Од друга страна пак, ослободувањето на полисахаридите од местото на повреда на растителното ткиво е резултат на механичка повреда или ензимска активност на ензимите гликозидази од клеточниот сид. Киселата pH вредност на клеточниот сок од местото на повреда е резултат на ослободувањето на фенолните киселини и кисели моносахариди од вакуолите на растителните клетки (Douglas, 1996). Повредата на растителните организми најчесто се предизвикува од хербиворните животни или при замрзнување на почвениот супстрат, иако може да биде составен дел од нормалниот раст и развој на растенијата. Всушност, перцепцијата на растителните клетки од страна на агробактериите се состои од два независни процеси: прикрепување за површината на клетката домаќин и активација на вирулентните гени.

3.2.2 Прикрепување на *Agrobacterium* за површината на растителните клетки

Физичката интеракција помеѓу *Agrobacterium* и растителните клетки во инцијалните стадиуми на процесите на туморогенеза е неопходен предуслов за успешна генетска трансформација на растенијата (Lippincott и Lippincott, 1969). Механизмот на прикрепување (Сл. 3.3) може да се одвива на специфичен начин со посредство на бактериските рецепторни протеини, кои вршат модифицирање на површината и екстрацелуларниот матрикс на растителната клетка (Boyle и Finlay, 2003). Притоа, агробактериите реверзибилно се прикрепуваат за клетката домаќин, а потоа синтезираат целулозни микрофиламенти, со цел иреверзибилно да се прицврстат за површината на растителната клетка (Matthysse, 1986). Интеракцијата помеѓу агробактериите и растителните клетки се одвива со посредство на серија бактериски протеини кодирани од хромозомските гени (*chvA*, *chvB*, *pscA*, *att* и *cel*). *ChvA* и *chvB* протеините се вклучени во синтезата на β -1,2 глукан (Zorreguieta и сор., 1988), како и во транспортот на синтезираниот глукан во периплазматскиот простор на

агробактериите (Cangelosi и сор., 1989). Според досегашните научни истражувања, *chvA* и *chvB* мутантите немаат способност за прикрепување и инфицирање на растителни клетки. Исто така, хромозмски кодираните *pscA* (*exoC*) и *att* гени се одговорни за синтеза на егзополисахариди, додека пак, хромозомскиот *cel* ген е неопходен за синтеза на целулозни микрофибрили (Uttaro и сор., 1990). Процесот на трансформација започнува со формирање на активен биофилм од прикрепени агробактерии на површината на клетката домаќин. Пренесувањето на DNA и протеините од агробактериите во растителната клетка ја потврдува хипотезата за постоење на непосредна интеракција помеѓу патогенот и клетката домаќин.

Релативно мал број податоци постојат за учеството на специфични рецептори од клеточниот сид на растителната клетка во прикрепувањето на *Agrobacterium*. Според досегашните научни истражувања, познати се неколку потенцијални рецепторни протеини со потекло од растителната клетка-домаќин. Тука се вбројува протеински рецептор сличен на витронектинот (Wagner и Matthysse, 1992), рикадхезин-специфичен рецептор (Swart и сор., 1994) и неколку VirB2-интерактивни протеини (Hwang и Gelvin, 2004). Протеинот сличен на витронектинот претставува рецепторен протеин и неговата функција во прикрепувањето на бактериите се потврдува со примена на мутантни соеви на *Agrobacterium*. Притоа, мутантните соеви на *Agrobacterium* покажуваат редуцирана способност на врзување со витронектинот. Исто така, прикрепувањето на *Agrobacterium* за растителната клетка е овозможено од присуството на специфичен адхезионен гликопротеин познат како рикадхезин, кој поседува аргинин-глицин-аспартат специфичен домен за прикрепување (Swart и сор., 1994). Одредени растителни протеини што стапуваат во интеракција со VirB2 имаат улога во интеракцијата помеѓу *Agrobacterium* и растителната клетка (Lai и Kado, 2000). Во оваа група на растителни протеини се вбројуваат BTI1, BTI2 и BTI3, како и мембрански врзани GTPаза и AtRAB8 (Hwang и Gelvin, 2004). Всушност, инфекцијата со *Agrobacterium* предизвикува индуцирана и локализирана експресија на BTI протеините кон периферијата на растителните клетки. Притоа, BTI протеините одржуваат директен контакт со Т-пилусот на *Agrobacterium* за време на прикрепувањето за растителната клетка (Hwang и Gelvin, 2004). Сепак, неопходно е да се извршат дополнителни научни истражувања, со цел да се откријат потенцијалните рецепторни молекули кај растенијата што се вклучени во процесот на прикрепување на *Agrobacterium*.

3.2.3 Активација на *vir* гени

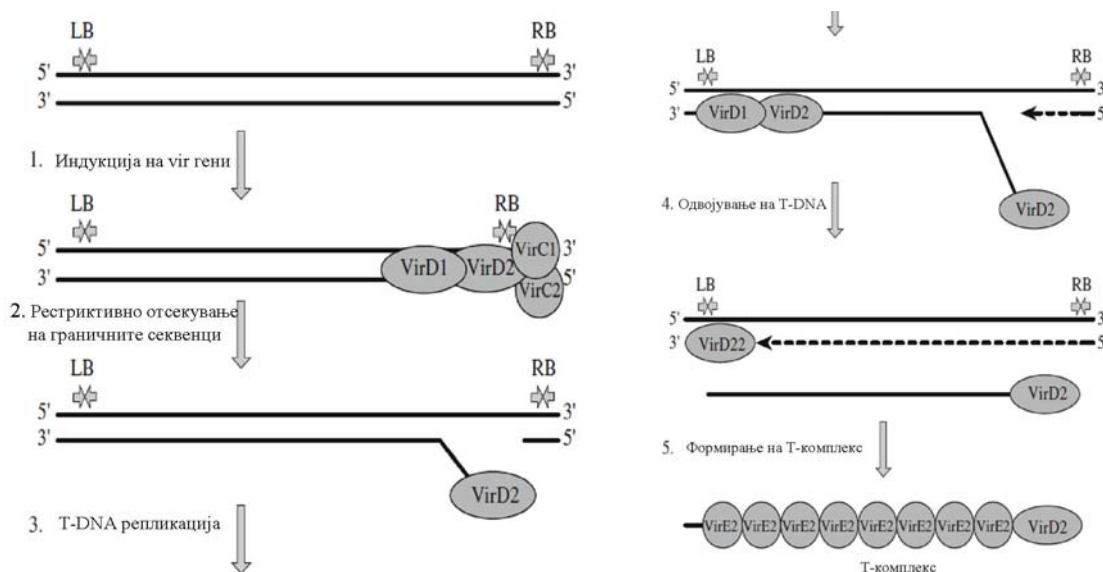
Активацијата на *vir* гените претставува клучен чекор во иницијација на процесот на трансформација на растенијата. Сепак, трансформацијата на растенијата е енергетски зависен процес и неопходно е постојано да се врши регулација на експресијата на *vir* гените. Со исклучок на *virA* и *virG* гените, индуцирана активација на останатите *vir* гени се одвива во услови на ко-култивирање на *Agrobacterium* со растителните клетки (Stachel и Nester, 1986). Агробактериите поседуваат двокомпонентен *virA/virG* сензорен систем (Сл. 3.3) за индукција на *vir* регионот, како резултат на перцепција на сигналните молекули ослободени од повредените растителните клетки (Stock и сор., 1991). *Vir* гените се активираат во присуство на различни фенолни соединенија, како што е ацетосирингон (Stachel и сор., 1985), голем број алдозни моносахариди, ниска pH средина и ниска содржина на фосфати (Palmer и сор., 2004; Brencic и Winans, 2005). *VirA/virG* посредуваната сигнална трансдукција започнува со перцепција на фенолни или јаглехидратни соединенија од страна на *virA/virG* сензорниот систем. *VirA* и *virG* гените кодираат по еден протеин, кои константно се експресираат на базално ниво. Притоа, *VirA* е мембрански сензорен протеин и врши перцепција на сигнални соединенија од средината, додека пак, *VirG* протеинот претставува цитоплазматски регулаторен протеин, кој има функција на транскрипциски активатор на останатите *vir* гени.

Откако ќе настане активација на *vir* гените, фенолните сигнални соединенија се метаболизираат од страна на *virH2* протеините (Brencic и сор., 2004). *VirH2* протеинот не е неопходен за туморогенезата и врши катализирање на реакциите на *O*-деметилација на фенолните соединенија. Притоа, производите на оваа реакција се помалку токсични во споредба со фенолните супстрати и на таков начин се оневозможува континуирана индукција на *vir* гените. Исто така, одредени фенолни соединенија можат да се катаболизираат преку метаболизмот на β -кетоадипинска киселина и се користат како извор на енергија и јаглерод од страна на агробактериите. Всушност, *virH2* има клучна улога во елиминацијата на сигналните молекули што вршат активирање на *vir* гените, процесите на детоксификација на местото на инфекција, како и искористување на фенолните соединенија како хранливи материи за агробактериите. Сите овие процеси се особено важни за преживувањето на бактериите на местото на инфекција на растителното ткиво. Иако повредата на растителното ткиво може да претставува место за прогресија на патогените, други специфични процеси се

особено важни за олеснување на процесот на трансформација. Всушност, местото на повреда на растителното ткиво се карактеризира со активирање на метаболички процеси за регенерација на повредата. Тие процеси се проследени со намалување на pH вредноста, индукција на фенилпропаноидниот метаболизам, ослободување на моносахариди и интензивна синтеза на клеточниот сид на местото на повреда на растителното ткиво (Baron и Zambryski, 1995). Исто така, клеточните делби на местото на повредата се неопходни процеси за регенерација на растителното ткиво, како и за ефикасна генетска трансформација (Braun, 1952). Притоа, клетките во стадиум на делба се посензитивни кон трансформација во споредба со клетките што се наоѓаат во стадиум на мирување. Според Yi и сор., (2002), клетките што се наоѓаат во зоната на издолжување на коренот имаат највисок капацитет за трансформација со *Agrobacterium*. Поради тоа, повредите на растителните ткива претставуваат мултифункционални сигнали за индукција на virA/virG сензорниот систем, односно *Agrobacterium* во текот на еволуцијата го оптимизирал сензорниот систем за перцепција на сигнали што потекнуваат од повредени растителни ткива. Сепак, постојат податоци за успешна генетска трансформација на интактни изртени семиња од тутун, како и индукција на vir гени без да се изврши на повреда на растителните ткива (Brensis и сор., 2005).

3.2.4 Формирање на мобилна копија на T-DNA и продукција на T-DNA синцир

Експресијата на vir гените (Сл. 3.3) предизвикува формирање на едноверижна копија на T-DNA во бактериската клетка (Stachel и сор., 1986), односно T-DNA синцир, кој се пренесува во клетката домаќин. Притоа, различни соеви на *Agrobacterium* поседуваат различен број и големина на T-DNA секвенци. Сепак, сите T-DNA секвенци се ограничени помеѓу себе со 25 bp репетитивни нуклеотидни секвенци, означени како десна (RB) и лева (LB) гранична секвенца (Zambryski и сор., 1982). Досегашните генетски студии покажуваат дека вирулентните особини на *Agrobacterium* зависат од присуството на десната гранична секвенца (Wang и сор., 1984). Формирањето на мобилна копија на T-DNA (T-синцир) започнува од десната T-DNA гранична секвенца, продолжува во 5' кон 3' правец и завршува на левата T-DNA гранична секвенца. Всушност, во формирањето на T-синцирот учествува комплекс составен од VirD2 и VirD1 протеините кои имаат функција на рестриktivни ендонуклеази (Сл. 3.4).



Сл. 3.4 Формирање на Т-комплекс при инфекција на растенија со *A. tumefaciens*. VirD1, VirD2, VirC1, VirC2 и VirE2 протеините учествуваат во мобилизацијата на Т-DNA. Испрекинатите линии го прикажуваат формираниот Т-DNA синцир. RB-Десна гранична секвенца; LB-Лева гранична секвенца (Permyakova и сор., 2009).

Притоа, протеинскиот комплекс VirD2/VirD1 специфично се врзува за суперспирализираниот плазмид (Сл. 3.4), врши негова деспирализација и предизвикува прекин помеѓу третата и четвртата база од RB на некодирачкиот (antisense) Т-DNA синцир (Wang и сор., 1987). По прекинувањето на RB, VirD2 протеинот веднаш ковалентно се поврзува за 5' крајот од некодирачкиот (antisense) Т-DNA синцир. Потоа, друг протеински комплекс VirD2/VirD1 (Сл. 3.4) врши прекин на LB, при што се ослободува формираниот Т-синцир (Young и Nester, 1988). Притоа, бактерискиот механизам за репарација врши ресинтеза на нуклеотидна празнина помеѓу десната и левата гранична секвенца (Christie, 1997). При ограничена експресија на VirD2 и VirD1 протеините, формирањето на Т-DNA синцирот може да се интензивира во присуство на VirC1 и VirC2 протеините (Сл. 3.4), (De Vos и Zambryski, 1989).

VirD2 протеинот останува ковалентно врзан за 5' крајот на Т-синцирот во текот на неговото пренесување во растителната клетка. Поврзувањето на VirD2 протеинот за Т-синцирот е неопходен предуслов за превенција од егзонуклеазното одвојување на 5'-крајот на Т-синцирот, како и за насочување на Т-синцирот кон јадрото на растителниот геном. Од друга страна пак, функцијата на VirD1 протеинот е ограничена само на отсекување на граничните секвенци од некодирачкиот Т-DNA синцир. Со цел да се

олесни транспортот во растителната клетка, неопходно е едноверижниот T-DNA синцир да се заштити од реконституирање во двоверижен синцир со кодирачка T-DNA секвенца. Поради тоа, формиранитот T-синцир се поврзува со VirE2 протеини и се пренесува во деспирализирана едноверижна форма во растителната клетка. Всушност, VirE2 протеините имаат способност да се поврзат за едноверижните DNA молекули и да формираат комплекс со филаментозна структура (Citovsky и сор., 1989). На таков начин, T-синцирот ковалентно поврзан со VirD2 протеинот и обложен со VirE2 протеини (Сл. 3.4) формира T-комплекс (VirE2/T-DNA-VirD2 комплекс).

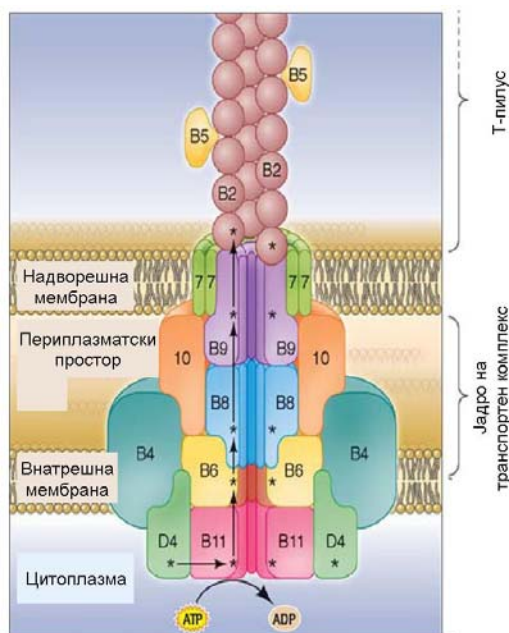
Поврзувањето на VirE2 протеините за T-синцирот има превентивна улога против дејството на нуклеазите во агробактериите, како и во намалувањето на дијаметарот на T-синцирот за 2 nm, со што се олеснува транслокацијата преку мембранскиот канал (Citovsky и сор., 1989). Според Binns и сор., (1995), VirE2 протеините го обложуваат T-DNA-VirD2 синцирот веднаш по ослободувањето во бактериската клетка и се пренесуваат во форма на T-комплекс во растителната клетка (Сл. 3.4).

Според друга хипотеза која е поверојатна, VirE2 протеините и T-синцирот не формираат T-комплекс во бактериската клетка (Сл. 3.3), бидејќи независно се пренесуваат во растителната клетка (Otten и сор., 1984). Притоа, VirE1 формира комплекс со VirE2 и на таков начин се инхибира врзувањето на VirE2 протеините за едноверижната DNA молекула во бактериската клетка (Zhou и Christie, 1999).

3.2.5 Систем за пренесување на T-синцирот во растителната клетка

T-DNA-VirD2 синцирот се пренесува во растителната клетка преку тип IV секреторниот систем (Zupan и сор., 1998). Тип IV секреторниот систем е составен од 12 транспортни протеини (Сл. 3.3), вклучувајќи 11 протеини кодирани од *virB* оперонот (*virB1-virB11*) и VirD4 протеинот (Christie, 1997). Притоа, VirB1-VirB11 и VirD4 протеините формираат две структурни и функционални компоненти: филаментозен (вирулентен) T-пилус и транспортен комплекс (Сл. 3.5).

Филаментозниот пилус е составен од два структурни протеини, VirB2 (Lai и Kado, 1998) и VirB5 (Shirasu и Kado, 1993). Всушност, вирулентниот пилус го воспоставува контактот со растителната клетка и врши сигнализација на транспортниот комплекс за иницијација на процесот на пренесување на T-DNA (Zupan и сор., 1998).



Сл. 3.5 Шематски приказ на локализацијата на VirB/D4 комплексот кај *Agrobacterium*. Свездите ги означуваат протеините кои стапуваат во интеракција со T-DNA синцирот кој се пренесува. Стрелките ја покажуваат насоката на транслокација на T-DNA синцир преку транспортниот комплекс (модиф. според McCullen и Binns, 2006).

Од друга страна пак, транспортниот комплекс се состои од virD4 и различни VirB протеини. Притоа, VirB1 протеинот покажува активност на трансглюкозилаза, со цел да го раствори бактерискиот пептидоглюкански слој и да овозможи поврзување на транспортниот комплекс за површината на агробактеријата (Baron и сор., 1997). Исто така, VirB3 и VirB4 протеините од транспортниот комплекс (Сл. 3.5) овозможуваат поврзување на вирулентниот пилус за бактеријата (Zupan и сор., 1998). Трансмембранскиот VirB4 протеин со VirB11 протеинот (Christie и сор., 1989) имаат функција на АТРази, со цел да се обезбеди енергија за транспорт на T-DNA, (Christie, 1997). VirB6 претставува трансмембрански протеин од транспортниот комплекс (Сл. 3.5) составен од шест трансмембрански домени (Zambryski, 1992) и учествува во формирањето на транспортна пора (Christie, 1997). VirB7 и VirB9 протеините ковалентно димеризираат во VirB7/VirB7 хомодимери или VirB7/VirB9 хетеродимери, (Baron и сор., 1997) и го формираат “структурното јадро” на транспортниот комплекс (Christie, 1997). VirB8 протеинот е локализиран во периплазматскиот простор од внатрешната бактериска мембрана и е вклучен во структурата на транспортниот

комплекс (Сл. 3.5). VirB10 претставува трансмембрански протеин со недоволно проучена функција. VirD4 е неопходен протеин од транспортниот комплекс за формирање на вирулентниот пилус, поседува функција на трансмембранска АТРаза и преку енергетски зависен механизам го поврзува Т-синцирот за транспортниот комплекс (Christie, 1997).

Сепак, неопходно е непосредно поврзување на вирулентниот пилус за транспортниот комплекс со цел да се овозможи ефикасно пренесување на Т-синцирот преку тип-IV секреторниот систем, односно воспоставување на физичка интеракција помеѓу бактериската и растителната клетка. Отсуството на физички контакт помеѓу бактериската и растителната клетка предизвикува затворање на транспортниот канал и акумулирање на Т-синцирите во бактерискиот клеточен сид. Интеракцијата на вирулентниот пилус со рецепторите на површината на растителната клетка овозможува настанување на промени во конформацијата на протеините од транспортниот комплекс и отворање на транспортниот канал (Zupan и сор., 1998). Отворањето на транспортниот канал овозможува пренесување на Т-комплексот од бактериската во растителната клетка. Според Binns и сор., (1995), транспортниот канал учествува и во пренесувањето на слободни VirE2 молекули или VirE2/VirE1 хетеродимери.

3.2.6 Пренесување на Т-DNA синцирот во растителната клетка

Agrobacterium врши пренесување на Т-синцирот и одделни Vir протеини во растителната клетка-домаќин преку тип IV секреторниот систем (Сл. 3.5).

Овие молекули треба да ја поминат внатрешната мембрана, периплазматскиот/пептидогlukanскиот сид и надворешната мембрана на *Agrobacterium*, како и клеточниот сид и мембранските системи на растителната клетка. Всушност, тип-IV транспортниот систем учествува при коњугативниот трансфер на плазмиди помеѓу бактериите, како и при транслोकација на вирулентни фактори од патогените организми во клетките домаќини (Cascales и Christie, 2003). Преку транспортниот комплекс се врши транслोकација на VirD2-T-DNA (Т-синцир), VirE2, VirE3, VirF и VirD5 протеините. Всушност, VirD2 се пренесува заедно со Т-DNA во растителната клетка во форма на VirD2-T-DNA синцир. VirE2 се пренесува во цитоплазмата на растителната клетка, каде го обложува VirD2-T-DNA синцирот и учествува во навлегувањето и интеграцијата на Т-DNA во растителниот геном (Gelvin, 2003).

По навлегувањето во растителната клетка, VirD2-T-синцирот се обложува со VirE2 протеините и формира T-комплекс (Сл. 3.5), кој треба да се транспортира низ цитоплазмата на растителната клетка и да се насочи кон растителниот геном. Густата конзистенција на цитоплазмата составена од различни компоненти на цитоскелетот (Luby-Phelps, 2000), како и релативно големата димензија на T-комплексот ја ограничуваат дифузијата на макромолкулите кон јадрото на растителниот геном (Abu-Arish и сop., 2004). Според Tzfira, (2006), интрацелуларниот транспорт на T-комплексот во цитоплазмата на растителната клетка се одвива преку активен механизам. Притоа, *Agrobacterium* ги користи динеинските протеини и актинските микрофиламенти на клетката домаќин како транспортен механизам за цитоплазматско движење на T-комплексот кон јадрото на растителната клетка (Henry и сop., 2006). Исто така, цитоплазматското движење на T-комплексот се одвива со посредство на VIP1 протеин од клетката домаќин. Всушност, VIP1 протеинот претставува медијатор во поврзувањето помеѓу цитоплазматските микротубули од една страна и VirE2 протеинот на T-комплексот од друга страна.

Процесот на пренесување на T-синцирот преку цитоплазмата до јадрото на растителната клетка се одвива со посредство на Vir протеините и одредени протеини од клетката-домаќин. VirD2 и VirE2 протеините поврзани за T-синцирот поседуваат сигнални секвенци за локализација на јадрото (Nuclear Localization Signal-NLS). Притоа, VirD2 и VirE2 протеините поседуваат две дводелни сигнални NLS секвенци за локализација на јадрото, кои учествуваат во насочувањето на T-DNA кон јадрото на растителната клетка (Citovsky и сop., 1994). Исто така, VirE2 протеинот функционира како трансмембрански DNA транспортер и го олеснува транспортот на едноверижни DNA молекули преку клеточната мембрана на растителната клетка (Duckely и сop., 2005). Меѓутоа, одредени соеви на *A. rhizogenes* немаат генска секвенца за кодирање на VirE2 протеини. Притоа, функцијата на VirE2 протеините ја вршат GALLS протеините. GALLS протеините содржат домени за врзување на ATP, локализација на јадрото на растителната клетка и тип-IV секреторниот систем (Hodges и сop., 2009).

3.2.7 Навлегување на T-комплексот во јадрото на растителната клетка

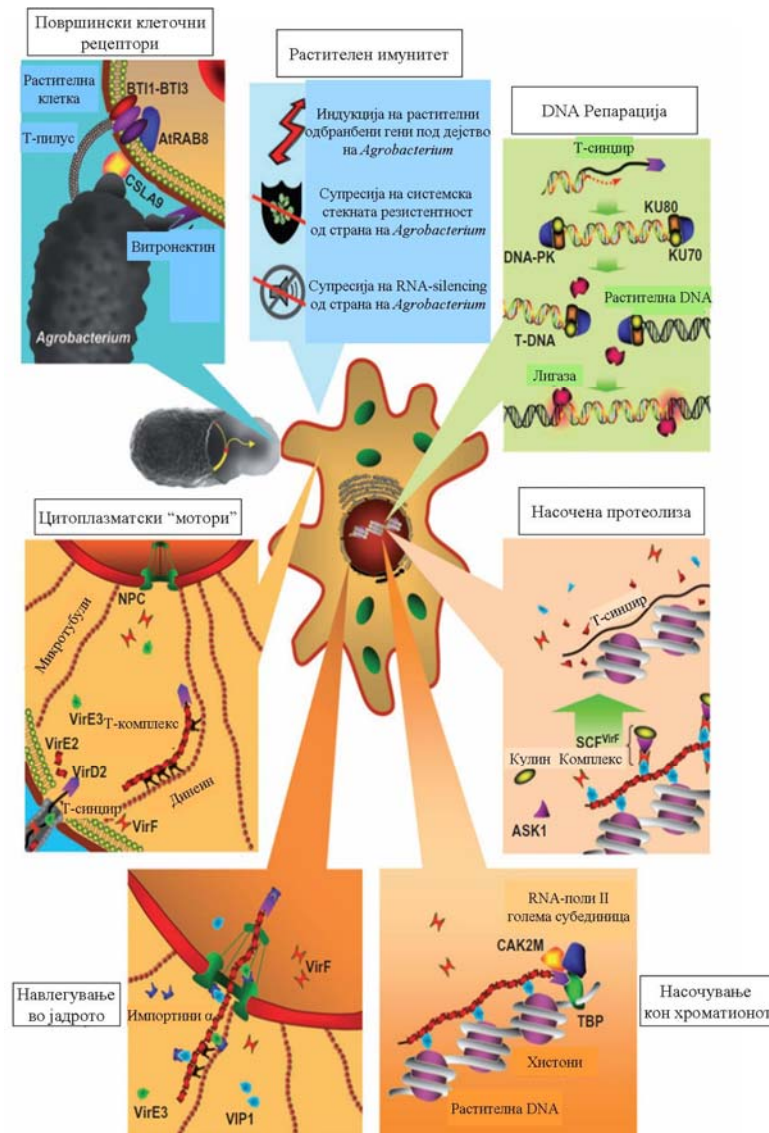
Последниот чекор во процесот на трансформација на растителните клетки зависи од насоченото движење на T-комплексот кон јадрото, ефикасното преминување низ

јадрената мембрана и интеграцијата во растителниот геном (Сл. 3.6). Т-комплексот обложен со VirD2 и VirE2 протеини има дијаметар од 15 nm (Abu-Arish и сор., 2004), што го надминува дијаметарот на нуклеарните пори (9 nm) (Rout и Wentе, 1994). Според тоа, Т-комплексот навлегува во јадрото преку активен транспорт со посредство на јадрениот механизам во клетката домаќин. Притоа, дијаметарот на нуклеарните пори може да се зголеми до 23 nm, што укажува на непречено поларно навлегување на Т-комплексот во јадрото на растителната клетка (Tzfira и Citovsky, 2000). VirD2 и VirE2 протеините имаат есенцијална улога во навлегувањето на Т-DNA синцирот во јадрото на растителната клетка. Притоа, со посредство на VirD2 протеинот започнува процесот на навлегување на Т-DNA синцирот во јадрото на клетката домаќин (Sheng и Citovsky, 1996). Т-DNA синцирот се обложува со голем број VirE2 протеини (околу 600 молекули на 20 kb Т-DNA) во цитоплазмата на растителната клетка. Обложувањето на Т-DNA синцирот со VirE2 протеини овозможува заштита на Т-комплексот од дејството на ендонуклеазите во растителната клетка (Rossi и сор., 1996) и ефикасен трансфер во растителниот геном (Zupan и Zambryski, 1997).

Во текот на навлегувањето на Т-комплексот во јадрото на растителната клетка, VirD2 и VirE2 протеините стапуваат во интеракција со целуларни фактори (растителни импортини α и циклофилини) кои припаѓаат на различни биолошки системи од клетката-домаќин (Tzfira и сор., 2001).

3.2.8 Интеграција на Т-DNA во геномот на растителната клетка

Механизмот на интеграција на Т-DNA во растителниот геном (Сл. 3.6) и функцијата на специфични растителни протеини во овој процес не се доволно проучени. Според досегашните научни истражувања, Т-DNA се интегрира со нехомологна рекомбинација во геномот на растителната клетка (Mayerhofer и сор., 1991). Исто така, генетските анализи кај инфицираните растителни клетки со *Agrobacterium* покажуваат дека повеќе Т-DNA молекули не се стабилно интегрирани во хромозмската DNA на клетката домаќин (Nam и сор., 1997). Според Narasimhulu и сор., (1996), Т-DNA молекулот навлегува во растителното јадро во форма на едноверижен синцир, меѓутоа повеќе Т-DNA молекули во јадрото имаат способност да синтетизираат комплементарната кодирачка секвенца со цел да се добие двоверижна транскрипциски активна DNA.



Сл. 3.6 Биолошки системи на растителната клетка-домаќин вклучени во *Agrobacterium*-посредуваната генетска трансформација (модиф. според Citovsky и соp., 2007).

По навлегувањето во јадрото, T-DNA се насочува кон местото на интеграција во хроматинот на растителниот геном. Сепак, одредени фактори и молекуларни механизми од клетката домаќин имаат влијание врз интрануклеарниот транспорт и интеграцијата на T-DNA во јадрото на растителната клетка (Сл. 3.6). CAK2M протеинот и TATA-box binding протеините (TBP) се главни фактори кои овозможуваат перцепција и насочување на T-DNA кон хроматинот на клетката домаќин (Bakó и соp., 2003). Исто така, VIP1 и VIP2 протеините учествуваат во насочувањето на T-DNA кон хроматинот и деспирализација на хроматинот во јадрото (Tzfira и соp., 2000).

Процесот на интеграција на T-DNA во растителниот геном претставува последен стадиум од процесот на генетска трансформација на растителната клетка. Пред да настане интеграцијата во геномот на растителната клетка, T-комплексот се ослободува од протеинските компоненти (VirD2 и VirE2), со цел да се формира комплементарна верига на едноверижната T-DNA. Овој процес на ослободување на T-синцирот од VirD2 и VirE2 протеините се врши од страна на механизмот за протеолиза на клетката-домаќин, со посредство на бактерискиот VirF протеин. Всушност, VirF протеинот претставува фактор на детерминација на клетката домаќин (Vergunst и сор., 2000) и врши дестабилизирање на комплексот помеѓу VIP1 и VirE2 протеините. Насочената протеолиза од страна на VirF протеинот го претставува главниот механизам на ослободувањето на T-DNA од протеините за време на нејзината интеграција во растителниот геном.

Сепак, сèуште не е доволно познато дали T-DNA се интегрира во форма на едноверижен синцир во локално денатурираната растителна DNA или во форма на екстрахромозомска двоверижна T-DNA (Tinland, 1996). Всушност, различни типови на протеини се инволвирани во процесите на формирање на комплементарната верига на T-DNA, формирање на прекини во хромозомската DNA на клетката-домаќин, како и лигација на прекините помеѓу двоверижната T-DNA и растителната хромозомска DNA (Сл. 3.6). VirD2 протеинот поврзан за T-DNA синцирот има функција на ендонуклеаза и врши специфично прекинување на двоверижната T-DNA и хромозомската растителна DNA (Pansegrau и сор., 1993). Притоа, интеграцијата на 5' крајот од T-DNA во растителната DNA се одвива со делеција на неколку 5' нуклеотиди (Tinland и сор., 1995). Всушност, поврзаниот VirD2 протеин за 5' крајот ја заштитува T-DNA од дејството на егзонуклеазите во растителното јадро.

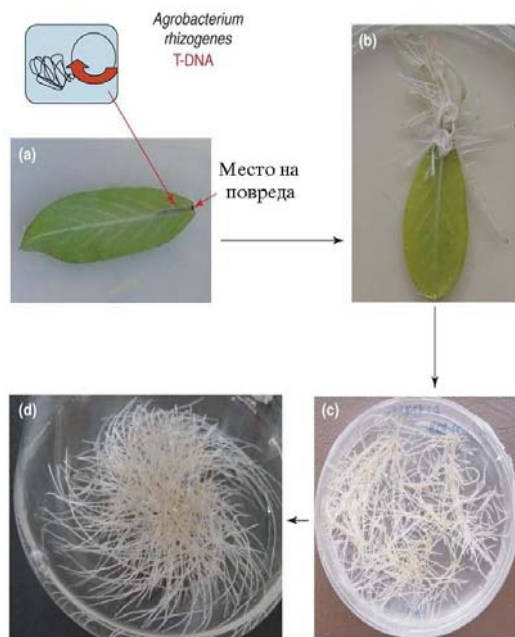
Сепак, сèуште не постојат доволно јасни модели за интеграцијата на едноверижната T-DNA во геном на растителната клетка. Според Jasin, (1996), рестриktivните ендонуклеази имаат способност да дигестираат само двоверижни DNA молекули. Поради тоа, неопходно е да се изврши синтеза на комплементарна верига на едноверижната T-DNA и како двоверижна T-DNA да се интегрира во растителниот геном (Tzfira и сор., 2003). Според тоа, T-DNA интеграцијата во растителните клетки се одвива преку нехомологна рекомбинација, дури и кога T-DNA поседува висок степен на хомологија со растителниот геном. Процесот на поврзување (лигација) на интегрираната T-DNA за растителната DNA е овозможен со посредство на специфични протеини од клетката домаќин.

3.3 Генетска трансформација на растенија со *Agrobacterium rhizogenes*

Во триесеттите години на XX-от век било потврдено дека инфекцијата на растенијата со *A. rhizogenes* предизвикува формирање на туморно ткиво кај растенијата познато како синдром на “Hairy Roots” (Riker, 1930). Терминот генетски трансформирани корени или “vlakнести корени” (“Hairy Roots”-HR) за прв пат бил воведен во литературата во 1900 година. Првите обиди за генетска трансформација на виши растенија биле направени од Askermann во 1973 година (Askermann, 1977). Култури на HR за прв пат биле добиени со инфицирање на ткива од морков и домати со *A. rhizogenes* (Chilton и сор., 1982). Tepfer и Tempe (1981) забележале индукција на голем број мали vlakнести корени на површината на инфицирани растителни експлантати со *A. rhizogenes*. Според досегашните научни истражувања, култури на HR се добиени од околу 185 растителни видови, од кои најголем број припаѓаат на фамилијата Solanaceae.

Во осумдесеттите години на минатиот век биле направени првите обиди за примената на *A. rhizogenes* како вектор за интродукција на туѓи гени од интерес во растителниот геном (Horsch и сор., 1985). Всушност, методот на *Agrobacterium*-посредувана трансформација започнала да се развива како мошне ефикасна технологија за продукција на трансгени растенија, иако голем број растителни видови сèуште се резистентни кон инфекција со *A. tumefaciens* (Gelvin, 2003). Од друга страна пак, *A. rhizogenes* поседува капацитет за инфекција на различни групи на скриеносемени (дикотиледони и монокотиледони) и голосемени растенија (De Cleene и De Ley, 1981; Tepfer, 1984).

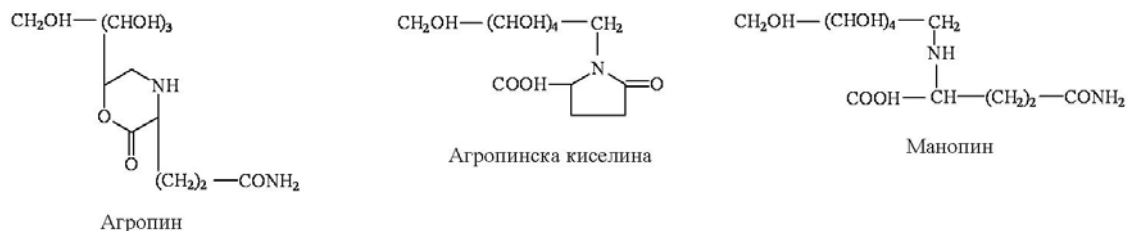
Култури на HR (Сл. 3.7) можат да се добијат со интеграција на T-DNA фрагмент (T-фрагмент) од Ri плазмидот на *A. rhizogenes* во геномот на растителната клетка. Притоа, од местото на инфекција на растителното ткиво се индуцира развиток на трансгени vlakнести корени (Chilton и сор., 1982). Всушност, секоја трансформирана клетка со T-DNA од Ri плазмидот претставува индивидуален клон (Сл. 3.7), кој го задржува диплоидниот карактер на родителската клетка. При трансформација на растителни клетки со *A. rhizogenes* се пренесуваат едниот или двата T-DNA секвенци (T_L и T_R) во растителниот геном (Jouanin, 1984).



Сл. 3.7 Култури на HR добиени при инфекција на растителни експлантати со *A. rhizogenes*. (a) инфекција на повредени растителни ткива, (b) индукција на HR од местото на повреда (инфекција) на растителното ткиво, (c) селективно изолирање на HR и култивирање на цврст хранлив медиум, (d) селективно субкултивирање на поединечни HR клонови во течен хранлив медиум (модиф. според Guillon и сор., 2006).

Интеграцијата на T_L T-DNA секвенцата во геномот на растителната клетка овозможува експресија на *rol* гени, кои имаат есенцијална улога во индукцијата, развитокот и фенотипот на HR (Binns и Costantino, 1998). Од друга страна пак, интегрирањето на T_R T-DNA секвенцата овозможува експресија на гените одговорни за биосинтеза на ауксини во геномот на растителната клетка. Притоа, содржината на ауксини се зголемува и настанува целосно намалување на потребата од егзогени фитохормони за растење и развиток на трансформираниите HR. Исто така, при пренесување на T_R T-DNA сегментот од Ri плазмидот на *A. rhizogenes* во геномот на растителната клетка настанува експресија на гени за биосинтеза на специфични опини (Rhodes и сор., 1990). Всушност, опините претставуваат деривати на аминокиселините и јаглехидратите и се користат како извор на енергија од страна на *A. rhizogenes* (Thompson и Donkersloot, 1992). Соевите на *A. rhizogenes* можат да се класифицираат според типот на опини што ги синтетизираат. Агропин соевите на *A. rhizogenes* (A4, 15834 и 1855) синтетизираат

агропин, манопин, како и агропинска киселина (Сл. 3.8), манопин соевите (8196) продуцираат манопин (Petit и сор., 1983), додека пак, кукумопин соевите синтетизираат кукумопин (Davoud и сор., 1988).



Сл. 3.8 Структурни формули на опините (агропин, агропинска киселина и манопин) карактеристични за агропин-специфични соеви на *A. rhizogenes*.

Поради присуството на две T-DNA секвенци, агропин соевите на *A. rhizogenes* се сметаат за хипервирулентни бактерии (De Paolis и сор., 1985). Процесот на синтезата на опини е резултат на пренасочување на метаболизмот на трансгените растенија кон селективно исхранување на *A. rhizogenes*. Синтетизираните опини не се метаболизираат од страна на растителните клетки, туку се секретираат во почвениот супстрат на кој се развиваат растенијата. Притоа, опините претставуваат метаболички супстрат за *A. rhizogenes* како извор на енергија, јаглерод, азот и фосфор, што претставува селективна предност во однос на останатите почвени бактерии (Zhu и сор., 2000). Феноменот на продукција на опини при кој настанува поддржување на растот на агробактериите се нарекува “генетска колонизација”.

Според досегашните научни истражувања, дикотиледоните растенија се сензитивни кон генетска трансформација со *A. rhizogenes*, додека пак, монокотиледоните растенија покажуваат висок степен на резистентност кон инфекција со *A. rhizogenes*. Голем број на дикотиледони растенија успешно се трансформирани со *A. rhizogenes* и се добиени култури на HR. Според Zambryski (1992), резистентноста на монокотиледоните растенија кон трансформација со *A. rhizogenes* се должи на ниската содржина на фенолни соединенија, кои се неопходни за активација на *vir* гените. Сепак, одредени видови се сензитивни кон трансформација, меѓутоа, индуцираните HR не можат понатаму да се субкултивираат и одржуваат во *in vitro* услови. Притоа, одржувањето на HR е оневозможено поради

спонтаното калусирање или губењето на морфологијата на корените (De Vries-Uijtewall и сор., 1988). Недостатоците поврзани со одржувањето на HR опфаќаат физичко оштетување на корените при поставување на културите на ротациона тресалка во течен медиум, при што се индуцира формирање на калусно ткиво.

Генетската трансформација на растенијата зависи од голем број фактори. Факторите кои влијаат врз ефикасноста на генетската трансформација на растенијата можат да се поделат во три групи. Во првата група се вбројуваат факторите кои се однесуваат на селекција на растителниот материјал, во втората група се факторите кои се однесуваат на сојот на *Agrobacterium* и во третата група се факторите кои ги одредуваат условите за култивирање.

Ефикасноста на трансформацијата на растителните клетки со *A. rhizogenes* зависи од: растителниот вид (Kuzovkina и Schneider, 2006), физиолошката возраст на растителниот организам, типот на растителен експлантат, како и степенот на диференцијација на растителното ткиво (Sevon и Oksman-Caldentey, 2002). Притоа, резистентноста на видовите кон *Agrobacterium*-посредуваната трансформација е главен лимитирачки фактор во добивањето на трансгени растенија (Kuzovkina и Schneider, 2006). Јувенилниот растителен материјал претставува клучен фактор за успешна индукција на HR (Hu и Du, 2006). Растителни експлантати кои можат да се користат за индукција на HR се: хипокотили, листови, лисни дршки, изданоци, котиледони, протопласти, корени и кртоли (Mugnier, 1988; Giri и сор., 2001; Krolicka и сор., 2001). Степенот на диференцијација на растителното ткиво ја одредува способноста за индукција на HR при инокулација со *A. rhizogenes* (Trypsteen и сор., 1991).

Големо влијание врз ефикасноста на генетска трансформација на растенијата има вирулентноста на сојот на *A. rhizogenes* и оптичката густина на бактериската суспензија (Park и Facchini, 2000). Притоа, растителните видови кои се резистентни на генетска трансформација со еден сој на *A. rhizogenes*, успешно можат да се трансформираат со примена на друг сој (Jung и Terfer, 1987). Агропин соевите на *A. rhizogenes* се сметаат за хипервирулентни бактерии, бидејќи имаат висок капацитет за индукција на HR кај голем број растителни видови. Примената на оптимална оптичка густина на бактериската суспензија е неопходен предуслов за успешна трансформација на растителните експлантати. Субоптималната концентрација на бактериската суспензија може да предизвика намалена достапност на бактериите за трансформирање на растителните клетки, додека

пак, високата концентрација на бактериската суспензија го намалува потенцијалот на бактериите за трансформација преку компетитивна инхибиција (Kumar и сор., 1991).

Физичките фактори и условите на култивирање имаат големо влијание врз успешното добивање на култури на HR. Притоа, физичките фактори (температурата, светлината), составот на хранливиот медиум, содржина на сахароза во медиумот за култивирање, типот на антибиотик што се применува за елиминација на бактериите, времето на ко-култивирање (Kuzovkina и Schneider, 2006), примената на ацетосирингон при ко-култивирање на експлантатите со *Agrobacterium* (Joubert и сор., 2002) се главните фактори кои влијаат врз генетската трансформација на растенијата. Сепак, ефикасноста на трансформација на растенијата со *A. rhizogenes* може да се зголеми преку манипулацијата со генотипот на растителниот вид или сојот на бактерискиот вид, како и при оптимизирање со физичките фактори и условите за култивирање (Christey, 2001).

Културите на HR кај голем број растителни видови имаат способност да се регенерираат во интактни трансгени растенија преку процесот на органогенеза (индукција на адвентивни пупки) или соматска ембриогенеза (Terfer, 1984; Cho и Wildholm, 2002). Всушност, органогенезата опфаќа директен развој на изданоци од културите на HR. Формираните изданоци можат да се субкултивираат на хранлив медиум за вкоренување, при што се овозможува регенерација на интактни трансгени растенија. Културите на HR имаат способност за спонтанa регенерација во трансгени растенија кои се карактеризираат со активна експресија на T-DNA гените (Terfer, 1984). Всушност, културите на HR можат да се регенерираат во фертилни растенија, како резултат на пренесување на T-DNA фрагментите во потомството (Altamura, 2004).

Регенерираните трансгени растенија можат да имаат променети морфолошки особини во споредба со нетрансформираниите растенија, а новоформираниот фенотип е познат како “фенотип на влакнести корени” или “Т-фенотип”. Фенотипот на “влакнести корени” кај некои трансформирани растителни видови се карактеризира со свиткани листови, намалена лисна површина, појава на асиметрични и разнобојни листови, силно развиен коренов систем, плагиотропно растење на кореновиот систем, редуцирана апикална доминација, редуцирана должина на интернодии и друго (Terfer, 1984; Hamamoto и сор., 1990). Исто така,

кај трансгените растенија бил забележан и повисок степен на морталитет во споредба со нетрансформирани растенија (Hap и сор., 1993).

3.4 Општи карактеристики на културите на генетски трансформирани корени (“Hairy Roots”-HR)

Културите на генетски трансформирани корени (HR) имаат голем број предности во споредба со културите на нетрансформирани корени и недиференцираните растителни клетки. Всушност, културите на HR се карактеризираат со генотипска и фенотипска стабилност, способност за прекумерна продукција на ендогени фитохормони, висок степен на растење, висок капацитет за продукција на секундарни метаболити и клонска варијабилност.

HR, како и другите диференцирани растителни ткива покажуваат висок степен на фенотипска и генетска стабилност при долг временски период на култивирање (Maldonado-Mendoza и сор., 1993). Всушност, веројатноста за генотипската нестабилност и појавата на соматска варијабилност кај културите на HR е релативно ниска во споредба со културите на недиференцирани клетки (Larkin и Scowcroft, 1981). Исто така, генетската стабилност на HR потекнува од стабилната интеграција на T-DNA сегментот од *A. rhizogenes* во геномот на растителната клетка. Затоа, генетската стабилност има големо значење во фундаменталните истражувања и апликативната примена на културите на HR во комерцијално производство на секундарни метаболити. Сепак, одредени научни студии ја потврдуваат цитолошката нестабилност и појавата на варијабилност во плоидноста, бројот и структурата на хромозомите кај HR (Banerjee-Chattopadhyay и сор., 1985). Промените во кариотипот кај HR може да се забележат како резултат на локализирани процеси на калусирање на местото на повреда на растителното ткиво. Всушност, калусирањето или губењето на структурниот интегритет на растителното ткиво промовира развиток на полиплоидија или анеуплоидија кај HR. Според Ramsay и Kumar, (1990), структурните промени на хромозомите кај HR потекнуваат од терминалните делеции на DNA молекулите.

Трансформирани растителни клетки со *A. rhizogenes* се карактеризираат со променет метаболизам на ауксините. HR имаат способност за растење независно од присуството на регулатори на растот во хранливиот медиум (Terfer и Tempe, 1981), бидејќи се карактеризираат со прекумерна продукција на ендогени ауксини. Способноста на HR за висока продукција на фитохормони има големо значење, бидејќи

хранливиот медиум има поедноставен состав во споредба со културите на суспензија на клетки или нетрансформирани корени. Сепак, одредени научни студии покажуваат дека егзогеното аплицирање на регулатори на растот во хранливиот медиум може да има спротивен ефект врз растот на културите на HR (Rhodes и сор., 1994). Од друга страна пак, некои истражувања покажуваат дека HR се карактеризираат со повисок степен на растење и биосинтетски капацитет во присуство на егзогени регулатори на растот во хранливиот медиум (Sauerwein и сор., 1992).

Степенот на растење на HR зависи од растителниот вид, како и од физичките фактори и услови при култивирањето. Всушност, растењето на културите на генетски трансформирани корени се карактеризира со два физиолошки параметри: линеарно издолжување на кореновиот врв и експоненцијално формирање на латерални корени (Kuzovkina и Schneider, 2006). Кривата на растење се карактеризира со кратка фаза на мирување (lag фаза), по која следи експоненцијално зголемување на биомасата на културите на HR. Зависно од растителниот вид, клеточниот циклус на културите на HR најчесто изнесува 2-7 дена (Wilson и сор., 1987). Експоненцијалната фаза на растење на HR завршува кога ќе се формира густа формација од испреплетени влакнести корени. Притоа, во текот на растењето на HR настанува ограничување на неопходните фактори за натамошно оптимално растење, односно ограничување на просторот, како и намалено снабдување со кислород и хранливи материи од хранливиот медиум. Исто така, при култивирање на HR во течен медиум настанува формирање на густе топчести формации од влакнести корени (Sharp и Doran, 1990). Културите на HR не покажуваат апикална доминација, меѓутоа се карактеризираат со формирање на адвентивни и акропетални корени. Всушност, HR се карактеризираат со плагиотропно растење и губење на сензитивноста на кореновите врвови кон силата на земјината тежа. Плагиотропното растење на HR се јавува поради редуцирање на содржината на амилопласти во кореновиот врв (Kim и Soh, 1996). Исто така, културите на HR имаат способност за формирање на идиобласти. Идиобластите не содржат хлоропласти и претставуваат клетки со задебелени клеточни сидови кои наликуваат на паренхимските клетки. Присуството на липофилни везикули и вакуоли во идиобластите има големо значење во акумулацијата на секундарните метаболити.

Процесот на растење кај HR е неспоредливо поинтензивен во споредба со нетрансформираните корени. Всушност, HR имаат способност за формирање на нови коренови меристеми со висок степен на латерално гранење (Oksman-Caldentey и Hiltunen, 1996). Бројот на латерални коренови влакненца се зголемува логаритамски во текот на раните стадиуми на растењето на сличен начин како кај културите на клеточни суспензии (Flores и Curtis, 1992). Степенот на растење на HR широко варира помеѓу различните растителни видови, како и помеѓу различните клонови од еден ист вид, бидејќи одредени клонови можат да се карактеризираат со исклучително бавен раст (Oksman-Caldentey и сор., 1994).

Културите на HR се карактеризираат со активен секундарен метаболизам и висок капацитет за продукција на секундарни метаболити. Одредени студии покажуваат дека морфолошката и структурната организација на растителните клетки имаат големо влијание врз продукцијата на одреден тип на секундарни метаболити (Rhodes и сор., 1994). Всушност, трансформацијата на растителните клетки со pRi-T-DNA нема големо влијание врз квалитативниот состав на метаболитите кај HR. Притоа, HR продуцираат секундарни метаболити што се карактеристични за интактните корени кај растенијата. Сепак, HR кај одредени растителни видови можат да се разликуваат во квалитативниот состав на секундарните метаболити во споредба со нетрансформираните корени. Досегашните научни истражувања покажуваат дека продукцијата на секундарни метаболити кај HR е идентична или повисока во споредба со интактните растенија. За разлика од културите на клеточни суспензии, културите на HR се карактеризираат со стабилна продукција на секундарни метаболити. Сепак, HR не се во асоцијација со останатите растителни органи (изданоци и листови) и затоа може да се очекуваат одредени разлики во однос на квалитативниот состав на секундарни метаболити помеѓу HR и корените кај интактните растенија. Сепак, HR најчесто содржат метаболити кои не се идентификувани кај интактните растенија, бидејќи секундарните метаболити не можат да се транспортираат, акумулираат или модифицираат до алтернативни растителни ткива (Toivonen и сор., 1989).

Значајни разлики во морфологијата на коренот, плоидноста, степенот на растење, како и содржина на секундарни метаболити биле забележани помеѓу индивидуални клонови на HR (Sevon и сор., 1998). Разликите во местото на интеграцијата на T-DNA, степенот на експресија на T-DNA гените, различната должина на интегрираните T-DNA

секвенци, како и бројот на интегрирани генски копии во растителниот геном имаат клучна улога во варијабилноста помеѓу одделните клонови (Amselem и Terfer, 1992). Сепак, клонската варијабилност овозможува селекција на елитни линии на HR со висок капацитет за продукција на секундарни метаболити.

3.5 Примена на генетски трансформирани корени (“Hairy Roots-HR”)

Културите на генетски трансформирани корени (“Hairy Roots-HR”) претставуваат ефикасен експериментален модел во проучувањето на генската експресија на секундарните метаболички патишта (Hu и Du, 2006), биосинтезата и биотрансформацијата на секундарните метаболити, метаболичкиот инженеринг (Giri и Narasu, 2000; Guillon и сор., 2006; Hu и Du, 2006; Srivastava и Srivastava 2007; Georgiev и сор., 2007), како и симбионтската интеракција помеѓу растенијата и различни биотички и абиотички фактори (Christey, 2001).

Во последните неколку децении, научните истражувања од областа на генетската трансформација на растенијата биле насочени кон испитување на потенцијалот на културите на HR за продукција на алкалоиди (Flores и сор., 1987). Денес, примената на културите на HR (Сл. 3.9) е насочена кон добивање стабилна продукција на биоактивни секундарни метаболити, кои наоѓаат широка примена во медицината, фармацевтската, прехранбената и козметичката индустрија (Terfer и Casse-Delbart 1987). Голем број од овие секундарни метаболити се биолошки активни соединенија кои покажуваат антифунгално, антибактериско, инсектицидно и фитотоксично дејство.

Според досегашните научни истражувања, голем број секундарни метаболити се изолирани од култури на HR: акридонии (Kuzovkina и сор., 2004), антрахинони (Mantova и сор., 1999), кумарини (Bais и сор., 2000), дитерпени (Hu и Alfermann 1993), флавоии (Kuzovkina и сор., 2005), глюкозинолати (Wielanek и Urbanek 1999), индолни алкалоиди (Falkenhagen и сор., 1993), лигнани (Lin и сор., 2003), нафтохинони (Brigham и сор., 1999), никотински алкалоиди (Rhodes и сор., 1986), полиамини (Biondi и сор., 2000), сесквитерпени (Komaraiah и сор., 2003), стероиди (Fujimoto и сор., 2000) и тропански алкалоиди (Mano и сор., 1989).

Кај културите на HR се применуваат следните методи за зголемување на продукцијата на секундарни метаболити: селекција на клонови со висок

биосинтетски капацитет, елицитација, пермеабилитација, додавање на прекурсори во хранливиот медиум, оптимизација на медиумот и условите за култивирање и генетска манипулација на секундарниот метаболизам.

Генетскиот инженеринг опфаќа манипулација на секундарниот метаболизам со примена на методи за пренесување и експресија на туѓи гени во геномот на растителната клетка. Притоа, интеграцијата на туѓи гени во геномот на растенијата се врши со примена на бинарен вектор систем од Ri плазмидот кај *A. rhizogenes*. Според Saito и сор., (1990), предностите на оваа техника опфаќаат:

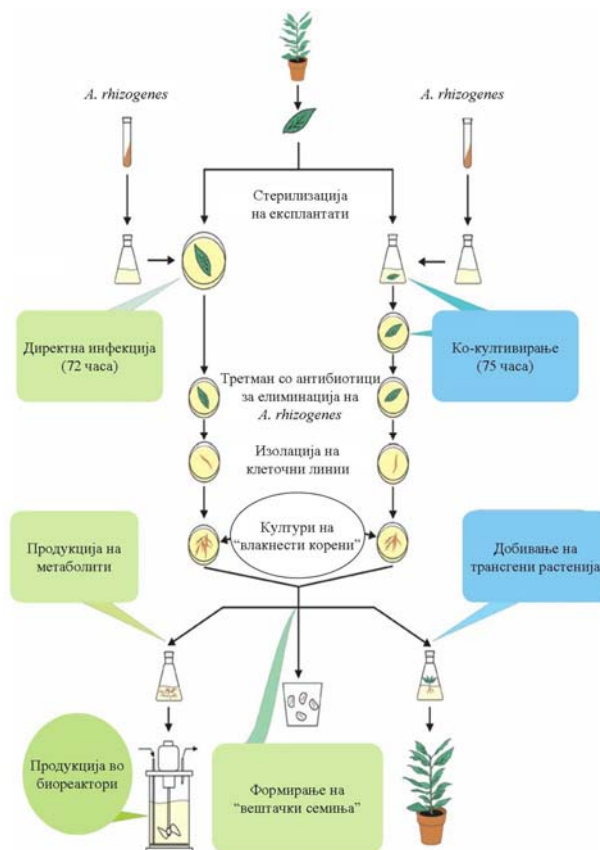
- едноставна техника на добивање HR со стабилна експресија на туѓиот ген од интерес;
- ефикасен метод за индукција на HR што се карактеризираат со висок степен на раст и капацитет за продукција на секундарни метаболити.

Културите на HR привлекуваат огромен интерес во комерцијалната продукција на протеини и ензими, кои наоѓаат широка примена во медицината (Shanks и Morgan, 1999). Всушност, HR имаат способност за продукција на супероксид дисмутаза (Heuon и Yoo, 2002), пероксидаза (Kim и Yoo, 1996), фитаза (Jin и сор., 2005), моноклонски антитела (Sharp и Doran, 2001) и протеини-инактиватори на рибозомите (Thorup и сор., 1994). Според Doran (2006), главен недостаток на HR е ниската акумулација на синтетизираните протеини во медиумот за култивирање.

Техниката за култивирање во биореактори (Сл. 3.9) претставува ефикасен метод за продукција на секундарни метаболити со примена на HR (Bourgand и сор., 2001). Всушност, продукцијата на секундарни метаболити зависи од типот на биореактор, морфо-физиолошките особини и сензитивноста на HR кон стресните услови (Wysokinska и Chmiel, 1997).

Културите на HR се користат во проучувањето на влијанието на биотичките стрес фактори, како што се интеракциите помеѓу растителните корени и азотофиксирачките бактерии (Díaz и сор., 1989), микоризните габи (Mugnier, 1997) и нематодите (Christey, 2001). Исто така, културите на HR поседуваат капацитет за регенерација на трансгени растенија толерантни кон абиотички стрес. Всушност, трансгените растенија имаат голема примена во фиторемедијација, процес преку кој се елиминираат голем број контаминанти од почвата (Suresh и Ravishankar, 2004). HR имаат релативно висок капацитет за абсорпција, акумулација, дистрибуција и детоксификација на токсичните соединенија присутни во различни

контаминирани почви, води и биолошки отпадни материјали (Pletsch и сор., 1999). Всушност, HR се карактеризираат со голема површина и висок степен на разгранетост, при што се овозможува ефикасно филтрирање на присутните полутанти во контаминираните примероци. Според досегашните научни сознанија, културите на HR од растенијата хиперакумулатори имаат способност да акумулираат голем број тешки метали од контаминираните почви (Еарен и сор., 2003; Boominathan и сор., 2004). Исто така, HR од различни растителни видови имаат способност за детоксификација на пестициди, антибиотици и други токсични материјали (Agostini и сор., 2003; Suresh и сор., 2005).



Сл. 3.9 Шематски приказ на протоколот за добивање на трансгени растенија и основната примена на културите на HR (модиф. според Georgiev и сор., 2007).

Способноста на трансгените растенија за регенерација на клонови со подобрени морфолошки и физиолошки својства овозможува широка примена на културите на HR во земјоделството и хортикултурата. Всушност, пренесувањето и стабилната интеграција на T-DNA секвенцата од Ri плазмидот на *A. rhizogenes* во

растителниот геном овозможува регенерација на трансгени растенија со подобрени фенотипски карактеристики. Регенерацијата на трансгени растенија од култури на HR, често пати предизвикува појава на карактеристичен фенотип како резултат на експресија на *rol* онкогените од Ri плазмидот на *A. rhizogenes* во геномот на растителната клетка (Kuzovkina и Schneider, 2006). Трансгените растенија со специфични фенотипски карактеристики: цуцест раст, зголемен капацитет за вкоренување, промени во големината, формата и бојата на цветовите, свиткани листови, како и зголемен степен на разгранување наоѓаат широка примена во клонското размножување на хортикултурни растенија. Исто така, генетската трансформација на растенијата има широка примена во микропропагација на растенијата, особено дрвенестите видови кои имаат низок капацитет за вкоренување во *in vitro* услови (Christey, 2001).

Културите на HR со висок регенеративен капацитет (Сл. 3.9) наоѓаат широка примена во производството на “вештачки семиња” (Uozumi и Kobayashi, 1995). Притоа, енкапсулираните HR можат да се регенерираат во трансгени клонови и да се користат за микропропагација на трансгени растенија (Kuzovkina и Schneider, 2006).

4. Литература

- Abu-Arish, A., Frenkiel-Krispin, D., Fricke, T., Tzfira, T., Citovsky, V., Grayer Wolf, S., Elbaum, M. (2004). Three-dimensional reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA. *J Biol Chem.*, 279, 25359–25363.
- Ackermann, C. (1977). Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes*-Tumoren an *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci. Lett.*, 8, 23–30.
- Afolayan, A. J., Adebola, P. O. (2004). *In vitro* propagation: A biotechnological tool capable of solving the problem of medicinal plants decimation in South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 3, 683–687.
- Agostini, E., Coniglio, M. S., Milrad, S. R., Tigier, H. A., Giulietti, A. M. (2003). Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnol Appl Biochem.*, 37, 139–144.
- Altamura, M. M. (2004). *Agrobacterium rhizogenes* rolB and rolD genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 77, 89–101.
- Alt-Moerbe, J., Neddermann, P., Vonlintig, J., Weiler, E. W., Schroder, J. (1988). Temperature sensitive step in Ti plasmid *vir* region induction and correlation with cytokinin secretion by agrobacteria. *Mol. Gen. Genet.*, 213, 1–8.
- Amselem, J., Tepfer, M. (1992). Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 on cucumber. *Plant Mol Biol.*, 19, 421–432.
- Ankenbauer, R. G., Nester, E. W. (1990). Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. *J. Bacteriol.*, 172, 6442–6446.
- Anthony, R. G., Reichelt, S., Hussey, P. J. (1999). Dinitroaniline herbicide-resistant transgenic tobacco plants generated by co-overexpression of a mutant α -tubulin and a β -tubulin. *Nat. Biotechnology*, 17, 712–716.
- Bais, H. P., Govindaswamy, S., Ravishankar, G. A. (2000). Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. *J Biosci Bioeng.*, 90, 648–653.
- Bakó, L., Umeda, M., Tiburcio, A. F., Schell, J., Koncz, C. (2003). The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 10108–10113.
- Banerjee-Chattopadhyay, S., Schwemmin, A. M., Schwemmin, D. J. (1985). A study of karyotypes and their alterations in cultured and *Agrobacterium* transformed roots of *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Theor Appl Genet.*, 71, 258–262.
- Baron, C., Llosa, M., Zhou, S., Zambryski, P. C. (1997). VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *J Bacteriol.*, 179, 1203–1210.
- Baron, C., Zambryski, P. C. (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme? *Annu Rev Genet.*, 29, 107–129.
- Beachy, R. (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 215–220.
- Binns, A. N., Beaupre, C. E., Dale, E.M. (1995). Inhibition of VirB-mediated transfer of diverse substrates from *Agrobacterium tumefaciens* by the InQ plasmid RSF1010. *J Bacteriol.*, 177, 4890–4899.
- Binns, A. N., Costantino, P. (1998). The *Agrobacterium* Oncogenes. In: Spink, H., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J. (eds). *The Rhizobiaceae* (pp. 251–266). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Biondi, S., Fornale, S., Oksman-Caldentey, K. M., Eeva, M., Agostani, S., Bagni, N. (2000). Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. *Plant Cell Rep.*, 19, 691–697.
- Birch, R. G. (1997). Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 48, 297–326.
- Boominathan, R., Saha-Chaudhury, N. M., Sahajwalla, V., Doran, P. M. (2004). Production of nickel bio-ore from hyperaccumulator plant biomass: applications in phytomining. *Biotechnol Bioeng.*, 86, 43–250.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.*, 161, 839–851.
- Boyle, E. C., Finlay, B. B. (2003). Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr Opin Cell Biol.*, 15, 633–639.
- Braun, A. C. (1952). Conditioning of the host cell as a factor in the transformation process in crown gall. *Growth*, 16, 65–74.

- Brencic, A., Angert, E. R., Winans, S. C. (2005). Unwounded plants elicit *Agrobacterium* vir gene induction and T-DNA transfer: Transformed plant cells produce opines yet are tumor free. *Mol. Microbiol.*, 57, 1522–1531.
- Brencic, A., Eberhard, A., Winans, S. C. (2004). Signal quenching, detoxification and mineralization of vir gene-inducing phenolics by the VirH2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.*, 51, 1103–1115.
- Brencic, A., Winans, S. (2005). Detection and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 69, 155–194.
- Brevoort, P. (1998). The blooming U.S. botanical market: a new overview. *Herbalgram*, 44, 33–46.
- Brigham, L. A., Michaels, P. J., Flores, H. E. (1999). Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol.*, 119, 417–428.
- Briskin, D. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol.*, 124, 507–514.
- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P. J. J. (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 14, 3206–3214.
- Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R. G., Nester, E. W. (1990). Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6708–6712.
- Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, A., Lee, C. C., Theines, C., Nester, E. W. (1989). Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of β -1,2-glucan. *Journal of Bacteriology*, 171, 1609–1615.
- Canter, P. H., Thomas, H., Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23, 180–185.
- Cardarelli, M., Spanò, L., De Paolis, A., Mauro M. L., Vitali, G., Costantino, P. (1985). Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol Biol.*, 5, 385–391.
- Cascales, E., Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial Type IV secretion systems. *Nature Rev Microbiol.*, 1, 137–149.
- Cazzulino, D., Pedersen, H., Chin, C. K. (1991). Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation. In: Vasil, I. K. (ed.). *Scale-up and Automation in Plant Propagation. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 8. Academic Press, Inc., San Diego, USA, pp. 147–177.
- Chaturvedi, H. C., Jain, M., Kidwai, N. R. (2007). Cloning of medicinal plants through tissue culture-a review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45, 937–948.
- Chilton, M. D., Tepfer, A., Petit, A., David, C., Casse-Debart, F., Tempe, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295, 432–434.
- Cho, H. J., Wildholm, J. M. (2002). Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 69, 259–269.
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cell Dev-Pl.*, 37, 687–700.
- Christie, P. J. (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol.*, 179, 3085–3094.
- Christie, P. J., Ward, J. E., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1989). A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylating activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 9677–9681.
- Citovsky, V., Kozlovsky, S. V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A., Tzfira, T. (2007). Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell Microbiol.*, 9, 9–20.
- Citovsky, V., Warnick, D., Zambryski, P. (1994). Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 and VirE2 proteins in maize and tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 3210–3214.
- Citovsky, V., Wong, M. L., Zambryski, P. (1989). Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 1193–1197.
- Conn, H. J. (1942). Validity of the genus *Alcaligenes*. *J Bacteriol.*, 44, 353–360.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, 1250–1318.
- Davioud, E., Petit, A., Tate, M. E., Ryder, M. H., Tempe, J. (1988). Cucumopine-a new T-DNA-encoded opine in hairy root crown gall. *Phytochemistry*, 27, 2429–2433.
- De Cleene, M., De Ley, J. (1981). The host range of infectious hairy roots [*Agrobacterium rhizogenes*]. *Bot Rev.*, 47, 147–194.
- de Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J., Beijersbergen, A. G. M. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.*, 16, 839–842.

- De Paolis, A., Mauro, H. L., Pomponi, M., Cardarelli, M., Spano, L., Constantino, P. (1985). Localization of agropine-synthesizing functions in the TR region of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1865. *Plasmid*, 13, 1-7.
- De Vos, G., Zambryski, P. (1989). Expression of *Agrobacterium* nopaline-specific VirD1, VirD2, and VirC1 proteins and their requirement for T-strand production in *E. coli*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2, 43–52.
- De Vries-Uijtewall, E., Gilssen, L. J. W., Flipse, E., Sree Ramulu, K., De Groot, B. (1988). Characterization of root clones obtained after transformation of monohaploid and diploid potato genotypes with hairy root inducing strains of *Agrobacterium*. *Plant Sci.* 58, 193-202.
- Debnath, M., Malik, C. P., Bisen, P. S. (2006). Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, 33–49.
- DeClene, M., DeLey, J. (1976). The host range of crown gall. *Bot Rv.*, 42, 389-466.
- Dempsey, D'M. A., Silva, H., Klessig, D. F. (1998). Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends in Microbiology*, 6, 54–61.
- Dessaux, Y., Petit, A., Teme, J. (1992). Opines in *Agrobacterium* biology. In: Verma, D. P. S. (ed). *Molecular signals in plant-microbe communications*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 109-136.
- Dewick, P. M. (1997). *Medicinal natural products*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Díaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J., Kijne, J. W. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*, 338, 579-581.
- DiCosmo, F., Misawa, M. (1995). Plant cell and tissue culture alternatives for metabolite production. *Biotech. Advances*, 13, 3, 425-453.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Doran, P. M. (2006). Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol.*, 24, 426-432.
- Dörnenburg, H., Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 674-684.
- Douglas, C. J. (1996). Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci.*, 1, 171–178.
- Duckely, M., Oomen, C., Axthelm, F., Van Gelder, P., Waksman, G., Engel, A. (2005). The VirE1VirE2 complex of *Agrobacterium tumefaciens* interacts with single-stranded DNA and forms channels. *Mol Microbiol.*, 58, 1130–1142
- Eapen, S., Suseelan, K. N., Tivarekar, S., Kotwal, S. A., Mitra, R. (2003). Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environ Res.*, 91, 127–133.
- Errera, L. (1904). Some general results on the localization of alkaloids in plants. *Proceedings of the British Association, Session de Cambridge, Tome II*: 185-187.
- Facchini, P. J., DeLuca, V. (2008). Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J.*, 54, 763–784.
- Falkenhagen, H., Stockigt, J., Kuzovkina, I. N., Alterman, I. E., Kolshorn, H. (1993). Indole alkaloids from hairy roots of *Rauwolfia serpentina*. *Can J Chem.*, 71, 2201–2203
- Flores, H. E., Curtis, W. R. (1992). Approaches to understanding and manipulating the biosynthetic potential of plant roots. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 665, 188–209.
- Flores, H., Hoy, M. W., Packard, J. (1987). Secondary metabolites from root cultures. *Trends Biotechnol.*, 5, 64-69.
- Fowler, M. W., Stafford, A. (1992). Plant cell culture process systems and product synthesis. In: Fowler, M. W., Warren, G. S., editors. *Plant biotechnology*. Oxford: Pergamon, 1992. pp. 79-98.
- Fraenkel, G. S. (1959). The raison d'etre of secondary plant substances. *Science*, 129, 1466-1470.
- Fujimoto, Y., Ohyama, K., Nomura, K., Hyodo, R., Takahashi, K., Yamada, J., Morisaki, M. (2000). Biosynthesis of sterols and ecdysteroids in *Ajuga* hairy roots. *Lipids*, 35, 279–288.
- Gautheret, R. J. (1934). Culture du tissues cambial. *C R Acad Sci.*, 198, 151–158.
- Gelvin, S. B. (2003). Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends Biotechnol.*, 21, 95–98.
- George, E. F., Debergh, P. C. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G.-J. (eds), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, Vol. 1. Springer, Dordrecht, pp. 29–64.
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., Bley, T. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 74, 1175–1185.
- Giri, A., Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol Adv.*, 18, 1-22.

- Giri, A., Ravindra, S. T., Dhingra, V., Narasu, M. L. (2001). Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Curr Sci.*, 81, 378–382.
- Guillon, S., Tremouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M., Gantet, P. (2006). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol.*, 24, 403–409.
- Gunawardena, A. H., Greenwood, J. S., Dengler, N. G. (2004). Programmed cell death remodels plant leaf shape during development. *Plant Cell*, 16, 60–73.
- Haberlandt, G. (1902). Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Sitz. Akad. Wiss. Wien*, 111, 69–92.
- Hamamoto, H., Boulter, M. E., Shirsat, A. H., Croy, E. J., Ellis, J. R. (1990). Recovery of morphogenetically normal transgenic tobacco from hairy roots co-transformed with *Agrobacterium rhizogenes* and a binary vector plasmid. *Plant Cell Rep.*, 9, 88–92.
- Hamilton, A. C. (Ed.), (2008). *Medicinal Plants in Conservation and Development: Case Studies And Lessons Learnt*. Plantlife International, Salisbury.
- Han, K. H., Keathley, D. E., Davis, J. M., Gordon, M. P. (1993). Regeneration of a transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L. black locust) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Plant Sci.*, 88, 149–157.
- Hansen, G., Vaubert, D., Clerot, D., Tempe, J., Brevet, J. (1994). A new open reading frame, encoding a putative regulatory protein in *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *C R Acad Sci III*, 317, 49–53.
- Hartmann, T. (1985). Prinzipien des pflanzlichen Sekundiirstoffwechsels. *Plant Systematics and Evolution*, 150, 15–34.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831–2846.
- Henry, T., Gorvel, J.P., Meresse, S. (2006). Molecular motors hijacking by intracellular pathogens. *Cell Microbiol.*, 8, 23–32.
- Heyer, A. G., Lloyd, J. R., Kossmann, J. (1999). Production of modified polymeric carbohydrates. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 169–174.
- Heyon, K. J. I., Yoo, Y. J. E. (2002). Optimization of SOD biosynthesis by controlling sucrose concentration in the culture of carrot hairy root. *J Microbiol Biotechnol.*, 12, 617–621.
- Hodges, L. D., Lee, L. Y., McNett, H., Gelvin, S. B., Ream, W. (2009). The *Agrobacterium rhizogenes* GALLS gene encodes two secreted proteins required for genetic transformation of plants. *J Bacteriol.*, 191, 355–364.
- Holmberg, N., Bülow, L. (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*, 3, 61–66.
- Horsch, R., Fry, J., Hoffmann, N., Eichholtz, D., Rogers, S., Fraley, R. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227, 1229–1231.
- Hu, Z. B., Alfermann, A. W. (1993). Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 32, 699–703.
- Hu, Z. B., Du, M. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. *J Int Plant Biol.*, 48, 121–127.
- Hussain, H., Johnston, A. W. B. (1997). Iron-dependent transcription of the regulatory gene *ros* of *Agrobacterium radiobacter*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 10, 1087–1093.
- Hwang, H. H., Gelvin, S. B. (2004). Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell*, 16, 3148–3167.
- Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.*, 12, 224–228.
- Jin, U. H., Chun, J. A., Han, M. O., Lee, J. W., Yi, Y. B., Lee, S. W., Chung, C. H. (2005). Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase. *Process Biochem.*, 40, 3754–3762.
- Jouanin, L. (1984). Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. *Plasmid* 12:91–102.
- Joubert, P., Beaupere, D., Lelievre, P., Wadouachi, A., Sangwan, R. S., Sangwan-Norreel, B. S. (2002). Effect of phenolic compounds on *Agrobacterium* vir genes and gene transfer induction—a plausible molecular mechanism of phenol binding protein activation. *Plant Sci.*, 162, 733–743.
- Jung, C., Cai, D., Kleine, M. (1998). Engineering nematode resistance in crop species. *Trends in Plant Science*, 3, 266–271.
- Jung, G., Tepfer, D. (1987). Use of genetic transformation by the Ri-TDNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown *in vitro*. *Plant Sci.*, 50, 145–151.
- Kahl, G. (1982). Molecular biology of wound healing: The conditioning phenomenon. In: *Molecular Biology of Plant Tumors*, eds Kahl, G., Schell, J., pp. 211–267. New York, Academic Press.

- Kim, Y. H., Yoo, Y. J. (1996). Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enzyme Microb Technol.*, 18, 531-535.
- Kim, Y. S., Soh, W. Y. (1996). Amyloplast distribution in hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biol Sci Space*, 10, 102-104.
- Komaraiah, P., Reddy, G. V., Reddy, P. S., Raghavendra, A. S., Ramakrishna, S. V., Reddanna, P. (2003). Enhanced production of antimicrobial sesquiterpenes and lipoxygenase metabolites in elicitor-treated hairy root cultures of *Solanum tuberosum*. *Biotechnol Lett.*, 25, 593-597.
- Komari, T., Hiei, Y., Ishida, Y., Kumashiro, T., Kubo, T. (1998). Advances in cereal gene transfer. *Curr Opin Plant Biol.*, 1, 161-165.
- Kossel, H. (1891). Über die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Arch Physiol Physiol Abt, Arch Anat Physiol.*, 181-186.
- Kreis, W. (2007). *In vitro* culturing techniques of medicinal plants. In: Kayser, O, Quax, W. (eds): *Medicinal plant biotechnology*. Wiley-VCH, Weinheim, 159-185.
- Krolicka, A., Staniszewska, I., Bielawski, K., Malinski, E., Szafranek, J., Lojkowska, E. (2001). Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Sci.*, 160, 259-264.
- Kumar, V., Jones, B., Davey, M. R. (1991). Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycine argyrea*. *Plant Cell Rep.*, 10, 135-138.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., Citovsky, V. (2001). Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 1871-1876.
- Kunze, R., Frommer, W.B., Flugge, U.-I. (2002). Metabolic engineering of plants: the role of membrane transport. *Metabolic Eng.*, 4, 57-66.
- Kusnadi, A. R., Hood, E. E., Witcher, D. R., Howard, J. A., Nikolov, Z. L. (1998). Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol. Prog.*, 14, 149-155.
- Kuzovkina, I. N., Alterman, I., Schneider, B. (2004). Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 65, 1095-1100.
- Kuzovkina, I. N., Guseva, A. V., Kovacs, G., Szoke, E., Vdovitchenko, Yu. M. (2005). Flavones in genetically transformed *Scutellaria baicalensis* roots and induction of their synthesis by elicitation with methyl jasmonate. *Russ J Plant Physiol.*, 52, 77-82.
- Kuzovkina, I. N., Schneider, B. (2006). Genetically transformed root cultures Generation, Properties and Application in Plant Sciences, *Progress in Botany*, Vol. 67, 275-324.
- Lai, E. M., Kado, C. I. (1998). Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.*, 180, 2711-2717.
- Lange, D. (1998). *Europe's Medicinal and Aromatic Plants: Their Use, Trade and Conservation*. Traffic International, Cambridge, UK.
- Larkin, P. J., Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet.*, 60, 197-214.
- Levee, V., Garin, E., Klimaszewska, K., Seguin, A. (1999). Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Breed.*, 5, 429-440.
- Lin, H. W., Kwok, K. H., Doran, P. M. (2003). Development of *Linum flavum* hairy root cultures for production of coniferin. *Biotechnol Lett.*, 25, 521-525.
- Lippincott, B. B., Lippincott, J. A. (1969). Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 97, 620-628.
- Luby-Phelps, K. (2000). Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol.*, 192, 189-221.
- Luckner, M. (1990). *Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals*. Springer Verlag, Berlin.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Ayora-Talavera, T., Loyola-Vargas, V. M. (1993). Establishment of root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue Org.*, 33, 321-329.
- Mano, Y., Ohkawa, H., Yamada, Y. (1989). Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci.*, 59, 191-201.
- Mantrova, O. V., Dunaeva, M. V., Kuzovkina, I. N., Schneider, B., Müller-Uri, F. (1999). Effect of methyl jasmonate on anthraquinone biosynthesis in transformed madder roots. *Russ. J. Plant Physiol.*, 46, 276-279.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B., Schulz, B. (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta*, 214, 345-355.
- Matthysse, A. G. (1986). Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Cri. Rev. Microbiol.*, 13, 281-307.

- Matthysse, A. G., Yarnall, H. A., Boles, S. B., McMahan, S. (2000). A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1490, 208–212.
- Matthysse, A. G., Yarnall, H. A., Young, N. (1996). Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 178, 5302–5308.
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J., Hohn, B., Koncz, C. (1991). T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.*, 10, 697–704.
- McCullen, C. A., Binns, A. N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 22, 101–127.
- Metts, J., West, J., Doares, S., Matthysse, A. G. (1991). A new class of chromosomal avirulent mutants of *Agrobacterium tumefaciens* which fail to induce vir genes. *J. Bacteriol.*, 173, 1080–1087.
- Mol, J., Cornish, E., Mason, J., Koes, R. (1999). Novel coloured flowers. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 198–201.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka, M., Tanaka, N., Yoshida, K. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J Mol Biol.*, 307, 771–784.
- Mothes, K. (1955). Physiology of alkaloids. *Annual Review of Plant Physiology*, 6, 393–432.
- Mothes, K. (1980). Nebenwege des Stoffwechsels bei Pflanze, Tier und Mikrobe. *Mitt. Chem. Ges. DDR*, 27, 2–10.
- Mugnier, J. (1988). Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, 7, 9–12.
- Mugnier, J. (1997). Mycorrhizal interactions and the effects of fungicides, nematicides and herbicides on hairy root cultures. In: Doran, P. M. (ed), *Hairy roots: culture and applications*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp 123–132.
- Nam, J., Matthysse, A. G., Gelvin, S. B. (1997). Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell*, 9, 317–333.
- Narasimhulu, S. B., Deng, X. B., Sarria, R., Gelvin, S. B. (1996). Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. *Plant Cell*, 8, 873–886.
- Nilsson, O., Olsson, O. (1997). Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plant.*, 100, 463–473.
- Oksman-Caldentey, K. M., Hiltunen, R. (1996). Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crops Res.*, 45, 57–69.
- Oksman-Caldentey, K. M., Sevón, N., Vanhala, L., Hiltunen, R. (1994). Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 38, 263–272.
- Olsen, C. S. (2005). Quantification of the trade in medicinal and aromatic plants in and from Nepal. *Acta Horticult.*, 678, 29–35.
- Otten, L., DeGreve, H., Leemans, J., Hain, R., Hooykaas, P., Schell, J. (1984). Restoration of virulence of vir region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* strain B6S3 by coinfection with normal and mutant *Agrobacterium* strains. *Mol. Gen. Genet.*, 195, 159–163.
- Otten, L., Helfer, A. (2001). Biological activity of the rolB-like 5' end of the A4-*orf8* gene from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 14, 405–411.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D., Hahn, E. J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 287–300.
- Palmer, A. G., Gao, R., Maresh, J., Erbiol, W. K., Lynn, D. G. (2004). Chemical biology of multihost/pathogen interactions: chemical perception and metabolic complementation. *Annu Rev Phytopathol.*, 42, 439–464.
- Pansegrau, W., Schoumacher, F., Hohn, B., Lanka, E. (1993). Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: analogy to bacterial conjugation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 11538–11542.
- Park, S-U., Facchini, P. J. (2000). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *J Exp Bot.*, 347, 1005–1016.
- Payne, G. F., Bringi, V., Prince, C., Shuler, M. L. (1991). *Plant cell and tissue culture in liquid systems*. Munich: Hanser Publ., pp. 1–10.
- Permyakova, N. V., Shumnyi, V. K., Deineko, E. V. (2009). *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Transfer of vector DNA fragments in the plant genome. *Russian Journal of Genetics*, 45, (3), 266–275.

- Petit, A., David, C., Dahl, D. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., Tempe, J. (1983). Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol Gen Genet.*, 190, 204–214.
- Pezzuto, J. M. (1995). Natural product cancer chemoprotective agents. In: Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., editors. Recent advances in phytochemistry. *Phytochemistry of medicinal plants*, vol. 29. New York: Plenum, pp. 19–45.
- Pletsch, M., Araujo, B. S., Charlwood, B. V. (1999). Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnol Adv.*, 17, 679–687.
- Ramsay, G., Kumar, A. (1990). Transformation of *Vicia faba* cotyledon and stem tissues by *Agrobacterium rhizogenes*: infectivity and cytological studies. *J Exp Bot.*, 41, 841–847.
- Rao, A. Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A., Husnain, T., Riazuddin, S. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, 27, 753–763.
- Rao, S. R., Ravishankar G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101–153.
- Raskin, I., Smith, R. D., Salt, D. E. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 221–226.
- Rathore, M. S., Gehlot, H. S., Shekhawat, N. S. (2010). Biotechnological approaches for propagation and prospecting of important medicinal plants from Indian Thar Desert. *International Journal of Plant Production*, 4(1), 67–72.
- Ravishankar, G. A., Bhyalakshmi, N., Ramachandra Rao, S. (1999). Production of food additives. In: Ramawat, K. G., Merillon, J. M., editors. *Biotechnology: secondary metabolites*. New Delhi: Oxford IBH, 1999. pp. 89–110.
- Ravishankar, G. A., Rao, S. (2000). Biotechnological production of phytopharmaceuticals. *J Biochem Mol Biol Biophys.*, 4, 73–102.
- Ravishankar, G. A., Venkataraman, L. V. (1993). Role of plant cell culture in food biotechnology: current trends, limitations and future prospects. In: Prakash, J., Pierik, R. L. M., editors. *Plant biotechnology: commercial prospects and problems*. New Delhi: Oxford IBH Press, 1993. pp. 255–274.
- Reuber, T. L., Walker, G. C. (1993). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important polysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell*, 74, 269–280.
- Rhodes, M. J. C. (1994). Physiological roles for secondary metabolites in plants: Some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.*, 24, 1–20.
- Rhodes, M. J. C., Hilton, M. G., Parr, A. J., Hamill, J. D., Robins, R. J. (1986). Nicotine production by hairy root cultures of *Nicotiana rustica*-fermentation and product recovery. *Biotechnol Lett.*, 8, 415–420.
- Rhodes, M. J. C., Parr, A. J., Giulietti, A., Aird, E. L. H. (1994). Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. *Plant Cell Tissue Org.*, 38, 143–151.
- Rhodes, M. J. C., Robins, R. J., Hamill, J. D., Parr, A. J., Hilton, M. G., Walton, N. J. (1990). Properties of transformed root cultures. In: Charlwood, B. V., Rhodes, M. J. C. (eds) *Secondary products from plant tissue culture*. Clarendon Press, Oxford, pp 201–225.
- Riker, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W., Sagen, H. E. (1930). Studies on infectious hairy root of nursery trees of apples. *J Agr Res.*, 41, 507–540.
- Roberts, M. F., Wink, M. (1998) *Alkaloids: Biochemistry, Ecological Functions and Medical Applications*. Plenum, New York.
- Rodgers, P. B., Hamilton, W. D. O., Adair, J. R. (1999). The therapeutic potential of plant-derived vaccines and antibodies. *Exp. Opin. Invest. Drugs.*, 8, 211–227.
- Roja, G. (1994). Biotechnology of indigenous medicinal plants. PhD Thesis, Bombay University, Bombay.
- Rossi, L., Hohn, B., Tinland, B. (1996). Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 126–130.
- Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18(2), 91–120.
- Rout, M. P., Wente, S. R. (1994). Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell. Biol.*, 4, 357–365.
- Sachs, J. (1873). *Lehrbuch der Botanik*. W. Engeimann, Leipzig.
- Saito, K., Yamazaki, M., Shimomura, K., Yoshimatsu, K., Murakoshi, I. (1990). Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides. *Plant Cell Rep.*, 9, 121–124.
- Salmeron, J. M., Vernooij, B. (1998). Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 347–352.

- Sauerwein, M., Wink, M., Shimomura, K. (1992). Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*. J Plant Physiol., 140, 147-152.
- Schippmann, U., Leaman, D., Cunningham, A. B. (2006). A Comparison of Cultivation and Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants Under Sustainability Aspects. In: Bogers, R. J., Craker, L. E., Lange, D. (eds). Medicinal and Aromatic Plants: Agricultural, Commercial, Ecological, Legal, Pharmacological and Social Aspects. Springer, Dordrecht, pp. 75-95.
- Segal, G., Ron, E. Z. (1995). Heat shock transcription of the groESL operon of *Agrobacterium tumefaciens* may involve a hairpin-loop structure. J. Bacteriol., 175, 3083-3088.
- Sevón, N., Hiltunen, R., Oksman-Caldentey, K. M. (1998). Somaclonal variation in *Agrobacterium* transformed roots and protoplast-derived hairy root clones of *Hyoscyamus muticus*. Planta Med., 64, 37-41.
- Sevon, N., Oksman-Caldentey, K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Med., 68, 859-868.
- Shanks, J. V., Morgan, J. (1999). Plant "hairy root" culture. Curr Opin Biotechnol., 10, 151-155.
- Sharp, J. M., Doran, P. M. (1990). Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. J. Biotechnol., 16, 171-186.
- Sharp, J. M., Doran, P. M. (2001). Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. Biotechnol Prog., 17, 979-992.
- Sheng, J., Citovsky, V. (1996). *Agrobacterium*-plant cell interaction: have virulence proteins-will travel. Plant Cell., 8, 1699-1710.
- Shewry, P. R. (1998). Manipulation of seed storage proteins. In: Transgenic Plant Research (Lindsey, K., ed.), Harwood Academic Publishers, pp. 135-149.
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y., Machida, Y. (1990). Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87, 6684-6688.
- Shirasu, K., Kado, C. I. (1993). Membrane location of the Ti plasmid VirB proteins involved in the biosynthesis of a pilin-like conjugative structure on *Agrobacterium tumefaciens*. FEMS Microbiol Lett., 111, 287-294.
- Slightom, J. L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., Tepfer, D. (1986). Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. J Biol Chem., 261, 108-121.
- Srivastava, S., Srivastava, A. K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Crit Rev Biotechnol., 27:29-43.
- Stachel, S. E., Messens, E., Vanmontagu, M., Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, 318, 624-629.
- Stachel, S. E., Nester, E. W. (1986). The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J, 5, 1445-1454.
- Stachel, S. E., Nester, E. W., Zambryski, P. C. (1986). A plant-cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 379-383.
- Stachel, S. E., Zambryski, P. C. (1986). *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A.tumefaciens*. Cell, 46, 325-333.
- Stock, J. B., Lukat, G. S., Stock, A. M. (1991). Bacterial chemotaxis and the molecular logic of intracellular signal transduction networks. Annu. Rev. Biophys. Chem., 20, 109-136.
- Suresh, B., Ravishankar, G. A. (2004). Phytoremediation-a novel and promising approach for environmental clean-up. Crit Rev Biotechnol., 24, 97-124.
- Suresh, B., Sherkhane, P. D., Kale, S., Eapen, S., Ravishankar, G. A. (2005). Uptake and degradation of DDT by hairy root cultures of *Cichorium intybus* and *Brassica juncea*. Chemosphere, 61, 1288-1292.
- Suzuki, K., Hattori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K. (2000). Complete nucleotide sequence of a plant tumor-inducing Ti plasmid. Gene, 242, 331-336.
- Swart, S., Logman, T. J. J., Smit, G., Lugtenberg, B. J. J., Kijne, J. W. (1994). Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of Rhizobiaceae. Plant Mol. Biol., 24, 171-183.
- Sykes, L., Matthysse, A. G. (1988). Differences in attachment of the biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* to carrot suspension culture cells. Phytopathology, 78, 1322-1326.
- Tabata, S., Hooykaas, P. J., Oka, A. (1989). Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. J Bacteriol., 171, 1665-1672.
- Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell, 37, 959-967.

- Tepfer, D., Tempé, J. (1981). Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4. C R Acad Sci 292:153–156.
- Tepfer, M., Casse-Delbart, F. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. Microbiol Sci., 4, 24–28.
- Thompson, J., Donkersloot, J. A. (1992). N-(Carboxyalkyl)amino acids-occurrence, synthesis and functions. Annu Rev Biochem., 61:517–557.
- Thorup, J. E., McDonald, K. A., Jackman, A. P., Bhatia, N., Dandekar, A. M. (1994). Ribosome-inactivating protein production from *Trichosanthes kirilowii* plant cell cultures. Biotechnol Prog., 10, 345–352.
- Tinland, B. (1996). The integration of TDNA into plant genomes. Trends Plant Sci., 1, 178–184.
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A. M., Hohn, B. (1995). The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. EMBO J., 14, 3585–3595.
- Toivonen, L., Balsevich, J., Kurz, W. G. W. (1989). Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Tissue Organ Cult., 18, 79–93.
- Torsell, K. B. G. (1997). Natural products chemistry. Apotekarsocieteten, Stockholm.
- Trypsteen, M., Van Lisjebettens, M., Van Severen, R., Van Montagu, M. (1991). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Echinacea purpurea*. Plant Cell Rep., 10, 85–90.
- Tzfira, T. (2006). On tracks and locomotives: the long route of DNA to the nucleus. Trends Microbiol., 14, 61–63.
- Tzfira, T., Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. Mol. Plant Pathol., 1, 201–212.
- Tzfira, T., Frankmen, L., Vaidya, M., Citovsky, V. (2003). Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA via double-stranded intermediates. Plant Physiol., 133, 1011–1023.
- Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M.-H., Citovsky, V. (2000). Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. Annu Rev Microbiol., 54, 187–219.
- Tzfira, T., Vaidya, M., Citovsky, V. (2001). VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. EMBO J., 20, 3596–3607.
- Uozumi, N., Kobayashi, T. (1995). Artificial seed production through encapsulation of hairy root and shoot tips. In: Bajaj, Y. P. S. (ed) Biotechnology in agriculture and forestry: somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer, Berlin, pp 170–180.
- Uttaro, A. D., Cangelosi, G. A., Geremia, R. A., Nester, E. W., Ugalde, R. A. (1990). Biochemical characterization of avirulent *exoC* mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Bacteriology, 172, 1640–1646.
- Veena, V., Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 43, 383–403.
- Veluthambi, K., Gupta A. K., Sharma, A. (2003). The current status of plant transformation technologies. Curr. Sci., 84, 368–380.
- Vergunst, A. C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C. M. T., Regensburg-Tuink, T. J., Hooykaas, P. J. J. (2000). VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. Science, 290, 979–982.
- Verpoorte, R. (2000). Secondary metabolism. In: Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism (Verpoorte, R., Alfermann, A. W. eds), pp. 1–29, Kluwer Academic Publishers.
- Verpoorte, R., Memelink, J. (2002). Engineering secondary metabolite production in plants. Plant Biotechnol., 13, 181–187.
- Vines, G. (2004). Herbal Harvests With a Future: Towards Sustainable Sources for Medicinal Plants. Plantlife International, Salisbury.
- Wagner, V. T., Matthyse, A. (1992). Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. J. Bacteriol., 174, 5999–6003.
- Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Zambryski, P. (1984). Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. Cell, 38, 455–462.
- Wang, K., Stachel, S. E., Timmerman, B., Van Montagu, M., Zambryski, P. (1987). Site-specific nick occurs within the 25 bp transfer promoting border sequence following induction of vir gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. Science, 235, 587–591.
- White, C. E., Winans, S. C. (2007). Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 362, 1135–1148.
- Wielanek, M., Urbanek, H. (1999). Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. Plant Cell Tissue Org., 57, 39–45.

- Wilson, P. D. G., Hilton, M. G., Robins, R. J., Rhodes, M. J. C. (1987): Fermentation studies of transformed root cultures. In: Bioreactors and Biotransformations. (Moody, G. W., Baker, P. B., eds.). London: Elsevier, 38-51.
- Winans, S. C. (1992). Two-way chemical signalling in *Agrobacterium* plant interactions. Microbiological Reviews, 56, 12-31.
- Winans, S. C., Mantis, N. J., Chen, C. Y., Chang, C. H., Han, D. C. (1994). Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. Res. Microbiol., 145, 461-473.
- Woese, C. R., Gupta, R., Hahn, C. M., Zillig, W., Tu, J. (1984). The phylogenetic relationships of three sulfur-dependent archaebacteria. Syst Appl Microbiol., 5, 97-105.
- Wysokinska, H., Chmiel, A. (1997). Transformed root cultures for biotechnology. Acta Biotechnol., 17, 131-159.
- Yadav, N. S., Vanderlayden, J., Bennett, D. R., Barnes, W. M., Chilton, M. D. (1982). Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. Proc Natl Acad Sci USA, 79, 6322-6326.
- Yi, H., Mysore, K. S., Gelvin, S. B. (2002). Expression of the Arabidopsis histone H2A-1 gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation. Plant J., 32, 285-298.
- Young, C., Nester, E.W. (1988): Association of the VirD2 protein with the 5' end of T-strands in *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol., 170, 3367-3374.
- Zafar, R., Aeri, V., Datta, A. (1992). Application of plant tissue and cell culture for production of secondary metabolites. Fitoterapia, 63, 33-43.
1. Zambryski, P. (1992). Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol., 43, 465-490.
- Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K. Goodman, H. M. (1982). Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. J Mol Appl Genet., 1, 361-370.
- Zhang, L., Xu, J., Birch, R. G. (1999). Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. Nature Biotechnology, 17, 1021-1024.
- Zhang, W., Franco, C., Curtin, C., Conn, S. (2004). To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a case study. J. Biomed. Biotechnol., 5, 264-271.
- Zhou, X. R., Christie, P. J. (1999). Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 single-stranded DNA-binding protein identifies regions required for self-association and interaction with VirE1 and a permissive site for hybrid protein construction. J Bacteriol., 181, 4342-4352.
- Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K., Winans, S. C. (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. J. Bacteriol., 182, 3885-3895.
- Zorreguieta, A., Geremia, R. A., Cavaignac, S., Cangelosi, G. A., Nester, E. W., Ugalde, R. A. (1988). Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. Mol. Plant-Microbe Interact., 1, 121-127.
- Zupan, J., Ward, D., Zambryski, P. (1998). Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. Curr Opin Microbiol., 1, 649-655.
- Zupan, J., Zambryski, P. (1997). The *Agrobacterium* DNA transfer complex. Crit Rev Plant Sci., 16, 279-295.