



Kultury komórkowe i rośliny transgeniczne w biotechnologii

Jan Szopa, Kamil Kostyń

Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski,
Wrocław

Cell cultures and transgenic plants in biotechnology

Summary

The applications of cell cultures and transgenic plants in several aspects of modern biotechnology are reviewed. The usefulness of cell cultures in biosynthetic pathway investigation, micropropagation, development of new varieties, genetic mapping and gene functioning analysis and industrial production of bioactive compounds are pointed out. The emphasis of this review is also laid on scientific aspects of transgenic plants. They are successfully used for promoters and other gene regulatory sequences study, investigation of plant primary and secondary metabolite pathways and for improving both the productivity and quality of crops. Since there is a risk to transgenic plant technology mainly because of antibiotic resistance used for transgenes selection, several methods have been worked out for release marker gene which are also briefly reviewed.

Key words:

cell cultures, transgenic plants, antibiotic resistance, marker genes.

1. Wprowadzenie

Porównawcza analiza rozwoju i przydatności badań w zakresie roślinnych kultur komórkowych i roślin transgenicznych jest sensowna, ale pod pewnym warunkiem. Ograniczeniem jest fakt, że przy tworzeniu zdecydowanej większości roślin genetycznie modyfikowanych etapem przejściowym są niezróżnicowane komórki kalusowe. Zatem techniki tworzenia kultur komórkowych są integralną częścią w ogólnej technologii transgenezy roślin. Porównanie ma jednak istotne znaczenie, wtedy gdy zamiarem

Adres do korespondencji

Jan Szopa,
Instytut Biochemii
i Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Przybyszewskiego 63/77,
51-148 Wrocław.

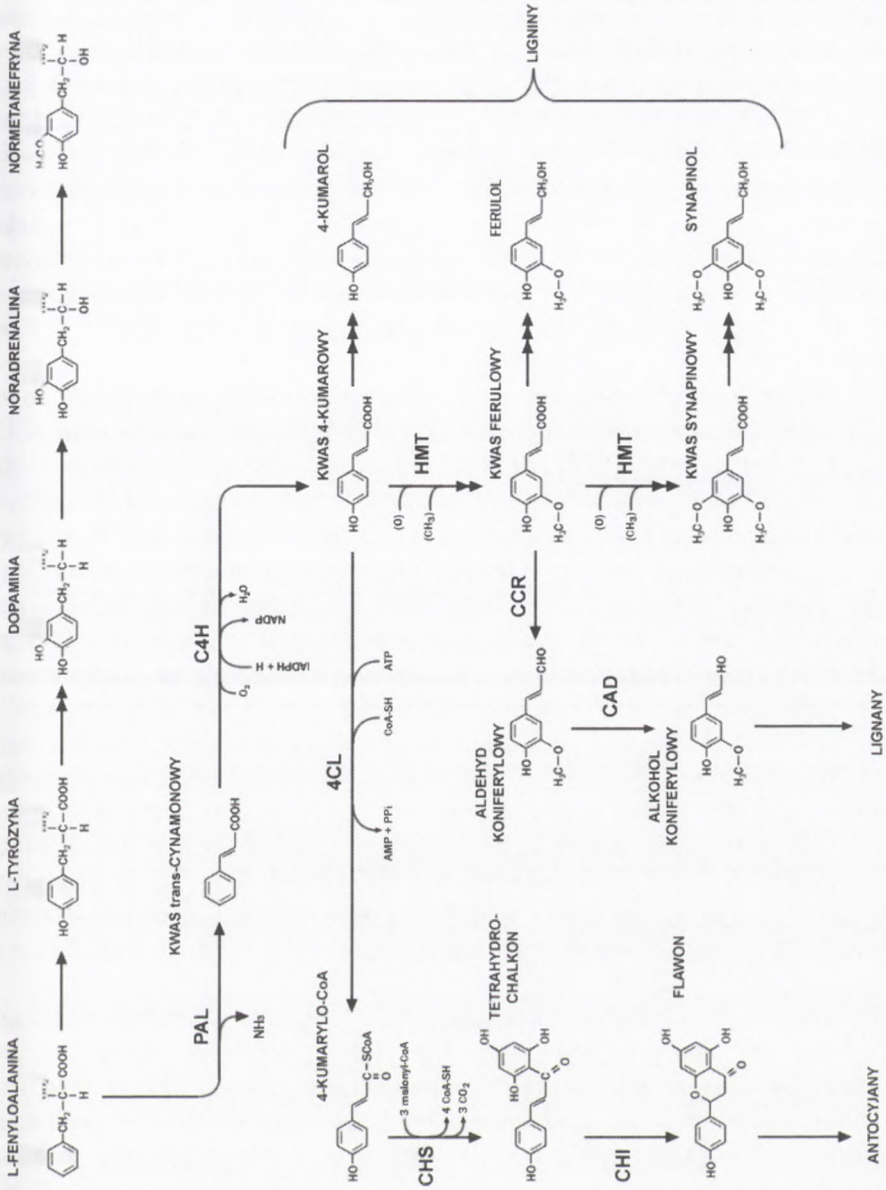
jest biotechnologiczne zastosowanie kultur komórkowych i organizmów transgenicznych. Szczególnie w obecnym czasie, gdy tak wiele wątpliwości budzi hodowla roślin transgenicznych i w zasadzie brak jest w naszym kraju społecznego przyzwolenia na otwarte użycie GMO. Ogromne zaangażowanie organizacji społecznych dezawuuujących osiągnięcia inżynierii genetycznej są podstawą tego braku przyzwolenia. Nadto wypowiadający się na temat GMO eksperci nie mają szans na całościowe przedstawienie zagadnienia w środkach społecznego przekazu i w zasadzie zostają przymuszani do odpowiedzi na takie pytania jak: jeść czy nie jeść żywności pochodzenia transgenicznego, lub, czy rośliny transgeniczne zagrażają, lub nie, naszemu środowisku naturalnemu? W tak prymitywnie postawionych pytaniach nie sposób dociec sedna sprawy i z konieczności część społeczeństwa swój stosunek do GMO wyraża jako sympatię lub jej brak do wypowiadającego opinię o organizmach modyfikowanych. Tymczasem w ogóle nie mówi się i nie przybliża tej niezwykle precyzyjnej i jeszcze bardziej złożonej technologii jaką jest transgeneza. Podstawą jej są fineryjne techniki klonowania i identyfikacji genu, tworzenia konstrukcji genowych zdolnych do wbudowania się w genom, transformacji komórek i amplifikacji transformowanych komórek w postaci komórek kalusa, a w końcu regeneracji organizmu z pojedynczej komórki kalusowej. Zatem kultury komórkowe i organizmy transgeniczne są końcowymi etapami tego złożonego i precyzyjnie planowanego przedsięwzięcia jakim jest tworzenie organizmu zmodyfikowanego genetycznie. Porównanie zatem kultur komórkowych i roślin transgenicznych ma sens w aspekcie weryfikacji szlaków metabolicznych i ustalania nowych gałęzi znanych szlaków, mikrorozmnażania, tworzenia nowych odmian, mapowania genetycznego, oceny znaczenia fizjologicznego genów i przemysłowej produkcji aktywnych biologicznie związków. W dalszych rozdziałach będą omówione najważniejsze aspekty wykorzystania kultur komórkowych i roślin transgenicznych jako systemów biologicznych.

2. Kultury komórkowe

Wytworzenie roślin transgenicznych jest na ogół równoznaczne z użyciem kultur komórkowych, ale i na odwrót, jeśli zamierzeniem jest produkcja określonego metabolitu naturalnie produkowanego w korzeniach roślin to zakłada się kulturę komórkową korzeni i poszukuje sposobów zoptymalizowania jej wzrostu oraz czynników zdolnych do maksymalnej indukcji syntezy tego metabolitu.

2.1. Szlaki biosyntezy

Kultury komórkowe są niezastąpione w ustalaniu szlaków wtórnego metabolizmu m.in., dlatego że dają możliwość bezpośredniej aplikacji substratu do każdego etapu biosyntezy. Jednym z przykładów jest szlak syntezy lignanów ze szczególnym



Rys. 1. Schemat szlaku fenylpropanoidowego.

uwzględnieniem podofylotoksyny (PT). Lignany mieszczą się w ogólnym szlaku fenylopropanoidowym i są definiowane jako $\beta\beta$ -dimery alkoholu koniferylowego. Zainteresowanie lignanami wynika z ich zastosowania w farmakologii i żywieniu (1,2). Lignany pełnią funkcję ochronną przeciw nowotworzeniu w komórkach piersi, ze względu na aktywność fitoestrogenową. Nadto ustalono cytotoksyczną aktywność dla wielu pochodnych lignanów, co wzmacnia zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego tymi związkami. Wszystkie lignany są $\beta\beta$ -dimerami pochodnych fenyloalaniny. Aminokwas daje początek wielu innym ważnym dla fizjologii roślin gałęziom szlaku fenylopropanoidowego, a w tym katecholaminom, flawonoidom, ligninom i salicylanom. Biosynteza alkoholu koniferylowego z fenyloalaniny okazała się szlakiem dość złożonym (rys. 1).

W czterech etapach kontrolowanych kolejno przez amonioliazę fenyloalaninową (PAL), 4-hydroksylazę cynamonową (C4H), ligazę CoA-hydroksycynamonową (4CL), reduktazę CoA-cynamonową (CCR) i dehydrogenazę alkoholu cynamonowego (CAD) syntetyzuje się alkohol koniferylowy. W dalszych trzech etapach katalizowanych przez białko kojarzące (ang. *dirigent protein*), reduktazę pinoresinol-lariciresinolową i reduktazę sekoizolariciresinolową, alkohol zostaje przekształcony do materesinolu, bezpośredniego substratu PT (3). Na podstawie inkubacji kultury komórkowej *Linum album* ze znakowanymi ^{13}C substratami fenylopropanoidowymi wykazano, że kwas ferulowy był przekształcany do PT. Inkubacja komórek ze znakowanymi związkami takimi jak kwas dimetoksycynamonowy i synapinowy także prowadziła do syntezy PT. W eksperymencie wykazano, że prawdopodobnie w przypadku podania kwasu dimetoksycynamonowego, istnieje szlak prowadzący do PT bez konieczności syntezy alkoholu koniferylowego. Te i inne eksperymenty, wykonane na komórkach w hodowli inkubowanych ze znakowanymi różnymi substratami szlaku fenylopropanoidowego, dały nieoczekiwany rezultat, a mianowicie, że wszystkie rośliny produkujące lignany wytwarzają związki różniące się między sobą ilością grup hydroksylowych i metoksylowych oraz tworzą się na wielu różnych drogach metabolicznych.

Totipotencja komórek roślinnych wskazuje na dostępność w każdej z nich kompletnego materiału genetycznego rośliny i sugeruje, że możliwa jest synteza wszystkich metabolitów wtórnych w kulturze komórkowej w warunkach *in vitro*. Pokazano jednak wielokrotnie, że komórki w hodowli nie zawsze gromadzą w sensie ilościowym i jakościowym te same produkty obserwowane w roślinach, z których komórki pochodzą. Niemniej jednak z powodzeniem zakończyły się próby syntezy paklitakselu, L-DOPY, kwasu rozmarynowego, koniferyny i innych związków w hodowlach komórkowych *in vitro* (4). W podobnym systemie i na dużą skalę (500 l fermentory) podjęto wytwarzanie PT w kulturze komórkowej *Linum album*, jednak obliczono, że produkcja jest nieopłacalna ze względu na niską wydajność i niestabilność komórek i dalsze próby są podejmowane dla optymalizacji procesu i obniżenia kosztów wytwarzania związku. Działania podejmowane w kierunku zwiększenia opłacalności takiej produkcji zdefiniowano w trzech punktach, po pierwsze należy tak modyfiko-

wać szlak syntezy oczekiwanego związku, aby dominował w takim sensie, że substraty reakcji są przede wszystkim kierowane do tego szlaku i równocześnie ograniczyć wpływ związków do odgałęzień szlaku, po drugie zwiększyć liczbę komórek produkujących żądany metabolit, kultury są zazwyczaj heterogenne zawierające również komórki nieprodukujące, po trzecie zmniejszyć katabolizm syntetyzowanego związku. Poziom przemysłowy produkcji metabolitu zazwyczaj osiąga się w fermentorach o pojemności od kilkuset do kilku tysięcy litrów. Poziom ten osiągnięto przykładowo dla komórek *Aralia cordata* produkujących antocyjany i hodowli komórkowej *Vitis vinifera* produkujących żeńszeniowy (ginseng) preparat korzeniowy (5).

2.2. Mikrorozmnażanie

Mikrorozmnażanie jest bodaj najbardziej eksploatowanym zastosowaniem kultur komórkowych. Opracowane postępowania mikrorozmnażania pozwoliły na pozyskanie wielu bezcennych roślin szczególnie tych o medycznym zastosowaniu (6). Mikrorozmnażanie wykorzystano do wydzielenia i rozmnożenia roślin gatunku *Mentha* odznaczających się wysoką produkcją mentolu. Zdolność komórek roślinnych do regeneracji zarówno z komórek organów roślinnych, jak i komórek embrionalnych wykorzystano do rozmnażania roślin na dużą skalę i do pewnej automatyzacji procesu. Wiele roślin o znaczeniu użytkowym jak ziemniaki, banany i rośliny ozdobne (filodendrony, *Lilium*, *Narcissus*) są rozmnażane przez somatyczną embriogenezę w bioreaktorach.

2.3. Przygotowanie nowych odmian

Stale zmieniające się warunki środowiskowe, jak zasolenie lub inne zanieczyszczenie gleb, zanieczyszczenie powietrza spowodowane rozwojem motoryzacji, ciągłe doskonalenie mikroorganizmów infekujących rośliny, to tylko niektóre z długiej listy czynników wpływających na produktywność roślin i dla których ominięcia, stale prowadzi się prace nad wyselekcjonowaniem, a następnie uprawą roślin adaptujących się chętniej do tych zmiennych warunków. Selekcja dobrze adaptujących się roślin do niekorzystnych warunków w uprawie jest sposobem na pozyskanie ulepszonych odmian, jednak jest procesem długotrwałym i nie gwarantującym, nawet w odległej perspektywie, sukcesu. Wyjściem z sytuacji jest z całą pewnością indukcja zmienności somaklonalnej w komórkach w kulturze, a następnie regeneracja roślin i selekcja tych o największej przydatności. Połączenie zatem klasycznej uprawy z kulturami komórkowymi jest korzystnym postępowaniem przede wszystkim dlatego, że uzyskuje się dużą zmienność w regenerantach. Raz wyselekcjonowany materiał roślinny może być rozmnażany również przez kultury komórkowe z dużą

wydajnością. Przykładowo regeneracja i amplifikacja przez organogenezę i somatyczną embriogenezę róż zaowocowało uzyskaniem zdrowych, wolnych od chorób infekcyjnych, roślin (7). W podobny sposób wyselekcjonowano, zamplifikowano i przechowuje się rzadkie genotypy roślin o znaczeniu medycznym z rodzaju *Apocynaceae* (*Catharanthus roseus*), *Scrophulariaceae* (*Bacopa monnieri*), *Solanaceae* (*Datura metel*) i *Liliaceae* (*Chlorophytum borivillianum*). Regeneracji tych roślin dokonano przez organogenezę i embriogenezę komórek stymulowanych auksynami i cytokininami (8). Równie cenne było zastosowanie mikrorozmnazania do udomowienia *Yucca valida*, rośliny produkującej steroidowe saponiny. Tradycyjny sposób polegający na wysiewaniu nasion pochodzących z różnych gatunków, w celu ich udomowienia, nie dały zadowalającego wyniku, ze względu na wolny wzrost roślin, natomiast zastosowanie mikroskrawków roślin pozwoliło na uzyskanie dużej ilości klonów, z których udało się wyselekcjonować takie, które dały satysfakcjonujący wzrost (9).

2.4. Mapowanie genetyczne i identyfikacja genów

Rozwój metod klonowania dużych fragmentów genomu i coraz doskonalsze techniki ich sekwencjonowania w dużej mierze zautomatyzowane sprawiają, że coraz więcej genomów roślinnych będzie kompletnie zsekwencjonowanych. Jednak, jak na razie, dostępność tych metod, ze względu na koszty, nie jest powszechna i dlatego do w miarę szybkiej i stosunkowo niedrogiej identyfikacji odmian i lokalizacji istotnych właściwości roślin w ich genomie, jak odporność na zmienne środowisko, posilkujemy się mapami genowymi utworzonymi z użyciem odpowiednich markerów. Do tworzenia takich map markerów nadają się komórki w hodowli, ponieważ posiadają kompletny genom organizmu, z którego pochodzą i są łatwe w użyciu.

Hodowla komórek *in vitro* może prowadzić do zmienności genetycznej nazywanej zmiennością somaklonalną. Pojawienie się tej zmienności jest zależne od tkanki, z której komórki pochodzą, czasu hodowli i zwykle indukuje się na etapie tkanki kalusowej.

Zmienność somaklonalna komórek może być przyczyną niestabilności genetycznej, ale też jest przyczyną pojawienia się korzystnych cech w regenerantach. Przykładowo uzyskano linie klonalne lnu o zwiększonej odporności na fuzariozę (10). Ostatnio za pomocą takiego właśnie podejścia badawczego udało się zidentyfikować dwa geny w jednym z gatunków palm. Somatyczna embriogeneza dawała rośliny o kwiatach w opończy (ang. *mantled*) różniące się od kontrolnych. Ponieważ ten fenotyp kwiatowy jest pochodzenia epigenetycznego to jego detekcja jest niemożliwa z użyciem standardowej techniki strukturalnych markerów molekularnych. Na podstawie analizy ekspresji genów w tkance kalusowej, nie dającej zmienności w kwitnieniu i ze zmienionym kwitnieniem, wykazano zwiększoną akumulację dwóch transkryptów w tej ostatniej. Jeden z transkryptów należy do białek wczesnej odpowie-

dzi na auksyny o nieznannej funkcji, natomiast drugi był podobny do syntetazy asparaginowej. Zatem zmienność somaklonalna, która objawiła się zmiennością podobną do znanego fenotypu jest wywołana zwiększoną ekspresją dwóch genów. Nadto pokazano, że oba transkrypty gromadzą się również w odpowiedzi na działanie auksynami (11). Oba geny mogą również posłużyć jako wczesne markery klonalne.

2.5. Przemysłowa produkcja biomasy i czynników bioaktywnych

Systematycznie rośnie liczba produkowanych czynnych biologicznie związków w kulturach komórkowych. Ginseng, Shikonin i Paclitaxel należą do pierwszych, a Taxol do jednych z ostatnich metabolitów, których produkcję przemysłową uruchomiono (12). Z produkcji niektórych preparatów w kulturach komórkowych rezygnuje się na korzyść ich produkcji w roślinach transgenicznych. W japońskiej firmie Plant Cell Culture Technology, Inc. zrezygnowano z produkcji antocyjanów w kulturach *in vitro* na korzyść ich ekstrakcji z roślin modyfikowanych uprawianych w warunkach polowych (13). Biorąc pod uwagę restrykcyjne przepisy, których spełnienie nakłada na producenta niebagatelne koszty (koszt jednej analizy gleby i otoczenia na obecność GMO wynosi około 1000 zł), uprawa roślin transgenicznych produkujących żądany metabolit będzie raczej nieopłacalna w porównaniu z kulturami *in vitro*.

3. Rośliny transgeniczne

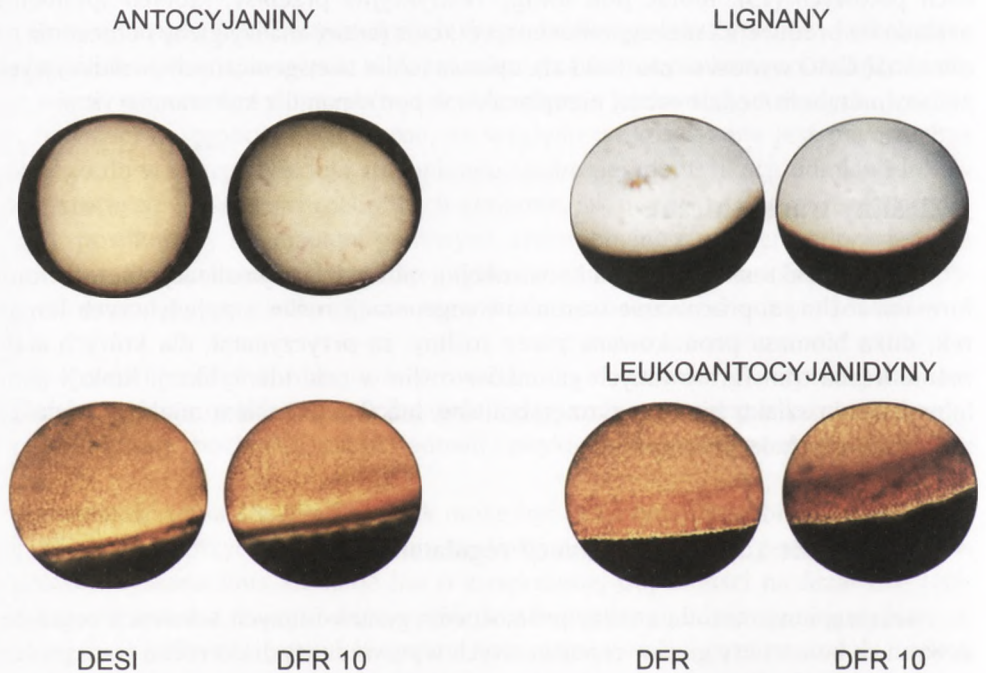
Postęp w zakresie tworzenia konstrukcji genowych, optymalizacja metod transformacji roślin, dopracowanie warunków regeneracji roślin z pojedynczych komórek, duża biomasa produkowana przez rośliny, są przyczynami, dla których stale rośnie liczba transformowanych gatunków roślin w celu identyfikacji funkcji genu lub ustalenia szlaku biosyntezy metabolitów, lub wreszcie jako miejsce produkcji związków na skalę przemysłową.

3.1. Ustalanie znaczenia sekwencji regulatorowych

Niezastąpioną metodą analizy promotorów genów i innych sekwencji regulatorowych są konstrukty genów reporterowych wprowadzanych do roślin transgenicznych. Na podstawie analizy ekspresji reportera dowiadujemy się o potencjalnej swoistości tkankowej promotora i sposobach jego regulacji czynnikami biotycznymi i abiotycznymi. W takim postępowaniu udało się wydzielić i scharakteryzować wiele promotorów o przydatności biotechnologicznej. Przykładowo promotor genu kodującego jedną z izoform białek 14-3-3 jest swoisty dla wiązek przewodzących, które składają się na włókna lniane.



Rys. 2. Histochemiczna analiza skrawków bulw ziemniaka transformowanych wektorem binarnym zawierającym gen reporterowy GUS pod kontrolą promotora 35S (A), promotora transferazy glukozy (B) i promotora genu 14-3-3 kodującego izoformę 16R (C).



Rys. 3. Bulwy ziemniaków kontrolnych (DESI) transgenicznych (DFR10), w których dokonano nadekspresji reduktazy dihydroflawonolu, głównego enzymu syntezy antocyjanów i leukoantocyjanidyn, konstrukt genowy umieszczono pod kontrolą swoistego promotora GT. Widoczne zabarwienie wiązek przewodzących (górny lewy panel) w bulwie transgenicznej i perydermie pod skórą (dolny lewy panel). Równocześnie obserwowano zmniejszenie zawartości lignin (skrawki barwione floriglucynolem) w bulwach transgenicznych (górny, prawy panel) i zwiększenie syntezy proantocyjanidyn w perydermie (dolny, prawy panel).

Wprowadzono konstrukcję genową produkującą polihydroksymaślan we włóknach właśnie za pomocą tego promotora (14). Równolegle użyty popularny promotor 35S gwarantujący ekspresję we wszystkich komórkach okazał się bezużyteczny z punktu widzenia biotechnologicznego ponieważ synteza PHB we wszystkich komórkach powodowała dramatyczne zahamowanie wzrostu roślin.

Innym ważnym biotechnologicznie promotorem jest promotor, niedawno wydzielony z genu transferazy glukozy, silnie indukowany światłem UV i o swoistości tkankowej ograniczonej do wiązek przewodzących i komórek peridermy bulw (rys. 2B) ziemniaka (15).

Promotor z powodzeniem został zastosowany do syntezy flawonoidów (rys. 3) w ziemniakach co spowodowało zwiększoną ich ochronę przed infekcją patogenną. Nadto ustalono przepływ metabolitów między różnymi gałęziami szlaku fenylopropanoidowego. Intensyfikacji syntezy antocyjanów i leukoantocyjanów towarzyszył spadek syntezy lignin. Jeszcze innym przykładem jest niedawno przez nas wydzielony i scharakteryzowany promotor indukowany patogenami i kwasem salicylowym (16).

3.2. Weryfikacja szlaków biosyntezy

Rośliny transgeniczne są wielce przydatnym narzędziem oceny ważności genu, jednak monocistronowa translacja roślinnych genów jądrowych jest o tyle niekorzystna, że nie pozwala na równoczesną manipulację wieloma genami. W pierwszych próbach trzyetapowej syntezy polihydroksymaślanu wprowadzano pojedyncze geny do roślin, a następnie rośliny krzyżowano między sobą uzyskując w końcu kompletny szlak biosyntezy (17). W podobny sposób zakończono sukcesem wprowadzenie trzech genów syntezy β -karotenu do ryżu, ale całość prac zajęła aż siedem lat (18). Sposobem na przezwycięzenie tej niedoskonałości jest transformacja chloroplastów. W przeciwieństwie do genów jądrowych większość genów chloroplastowych jest transkrybowana policistronowo, które następnie dojrzewają do transkryptu translatowanego. Istnieje zatem sposób, aby wprowadzać transgen w formie operonu, czyli przez pojedynczą transformację można wprowadzić kilka genów. Pomysł pozytywnie zweryfikowano z użyciem trzygenowego operonu cry-2Aa2 z *Bacillus subtilis* (19), a następnie z powodzeniem użyto do uzyskania roślin przydatnych w fitoremediacji ekspresjonujących *mer* operon zawierający geny reduktazy jonów rtęciowych i liazy, pochodnych organicznych rtęci (20). W aktualnych doniesieniach informuje się o modyfikacji chloroplastowego DNA w taki sposób, aby zapewnić roślinie odporność na patogeny i herbicydy oraz do wydajnej syntezy w nich białek o znaczeniu farmaceutycznym, a w tym szczepionek.

4. Eliminacja genów oporności

Poważnym ograniczeniem stosowania techniki transgenezy dla celów biotechnologicznych jest konieczność użycia genów markerowych do ich selekcji. Ze względu na skuteczność najczęstszymi markerami są geny oporności antybiotykowej. Najczęściej stosowanymi są *nptII* (kanamycyna czynnikiem selekcyjnym), *aadA* (spektynomycyna i streptomycyna), *hph* (selekcja na hygromycynie) i *bar* (selekcja na herbicydzie). Większość zastrzeżeń różnych organizacji społecznych do GMO bierze się z obecności genów dających antybiotykową oporność. Zastrzeżenia dotyczą możliwości transformacji bakterii współżyjących lub infekujących organizm genami oporności na antybiotyki, przez co nieskuteczne będzie leczenie organizmu antybiotykami. Częściowym wsparciem dla takiego zastrzeżenia stało się odnalezienie we krwi myszy karmionych plazmidem fragmentów DNA o wielkości 976 pz (21). 200-nukleotydowe fragmenty DNA plastydowego znaleziono niemal we wszystkich organach zwierząt karmionych roślinami (22). Niektóre bakterie, jak *Acinetobacter calcoaceticus* i *Bacillus subtilis*, nabierają kompetencji do transformacji, gdy są głodzone (23,24). Z przedstawionych danych wynika, że DNA roślinny nie jest całkowicie trawiony w przewodzie pokarmowym, a także, iż może przechodzić przez ścianę jelita. Teoretycznie istnieje zatem możliwość transformacji bakterii materiałem genetycznym zjadanym z pożywieniem. Stąd opracowano kilka metod pozwalających na usuwanie markerów selekcji po wyselekcjonowaniu roślin transgenicznych. Najprostszym sposobem jest wykorzystanie endogennej rekombinazy i umieszczenie genu markera pomiędzy dwoma identycznymi i krótkimi sekwencjami identycznie zorientowanymi. Bezpośrednie powtórzenia sekwencji na końcach genu są niezbędne do zainicjowania homologicznej rekombinacji. Rekombinaza oddziałuje z obu końcami genu i dochodzi do usunięcia sekwencji znajdującej się między powtórzeniami. W ten sposób usuwano gen *aadA* z transformantów plastydowych, umieszczając go pomiędzy 418-nukleotydowymi powtórzeniami. Uzyskano około 24% roślin transgenicznych nie zawierających markera (25).

Innym sposobem jest wprowadzenie również genu rekombinazy, jednak aby nie dochodziło do usunięcia sekwencji markera przed selekcją roślin, to gen rekombinazy jest pod kontrolą promotora indukcyjnego. Jeszcze innym sposobem jest umieszczenie genu reporterowego w otoczeniu sekwencji transpozonowej ułatwiającej usunięcie markera w trakcie rozwoju organizmu transgenicznego. Chociaż wytworzono metody pozwalające na usunięcie markera, to postępowanie jest zazwyczaj uciążliwe i kosztowne, stąd wprowadza się metody selekcji oparte na pozytywnym działaniu reportera. Przykładem jest gen izomerazy fosfomannozy, którego produkt przekształca fosfomannozę do fosfofruktozy, co ma pozytywny wpływ na wzrost roślin transgenicznych (26). Gen został użyty do modyfikacji wielu roślin użytkowych, w tym buraka cukrowego, ziemniaków, rzepaku, kukurydzy i pszenicy. Powszechne zastosowanie izomerazy fosfomannozy staje jednak pod znakiem zapytania, ponieważ zaobserwowano, że gen ma znaczenie w wirulencji ssaków

przez grzybowe patogeny oraz, że D-mannoza indukuje zmiany w komórkach podobne do tych pojawiających się w komórkach apoptotycznych (27).

Literatura

1. Cho J. Y., Kim A. E., Yoo E. S., Baik K. U., Park M. H., (1999), *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 1267-1273.
2. Kilkkinen A., Virtamo J., Vartiainen E., Sankila R., Virtanen M. J., Adlercreutz H., Pietinen P., (2004), *Int. J. Cancer*, 108, 277-280.
3. Davin L. B., Lewis N. G., (2000), *Plant Physiol.*, 123, 453-461.
4. Pras N., Woerdenbag H. J., (1999), *Production of secondary metabolites by bioconversion*, in: *Biotechnology; Secondary Metabolites*, 265-303, Eds. Ramawat K. G., Merillon J. M., Science Publishers, Inc., USA.
5. Koulman A., Quax W. J., Pras N., (2004), *Podophyllotoxin and related lignans produced by plants*, in: *Biotechnology of medicinal plants*, 225-266, Ed. Ramawat K. G., Science Publishers, Inc. USA, UK.
6. Rout G. R., Samantray S., Das P., (2000), *Biotechnol. Adv.*, 18, 91-120.
7. Pati P. K., Rath S. P., Sharma M., Sood A., Ahuja P. S., (2006), *Biotechnol. Adv.*, 24, 94-114.
8. Debnath M., Malik C. P., Bisen P. S., (2006), *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 7, 33-49.
9. Arce-Montoya M., Rodriguez-Alvarez M., Hernandez-Gonzalez J. A., Robert M. L., (2006, e-pub ahead of print), *Plant Cell Rep.*, Mar 10.
10. Rutkowska-Krause I., Mańkowska G., Łukaszewicz M., Szopa J., (2003), *Plant Cell Rep.*, 22, 110-116.
11. Morcillo F., Gagneur C., Adam H., Richaud F., Singh R., Cheah S. C., Rival A., Duval Y., Tregear J. W., (2006), *Tree Physiol.*, 26, 585-594.
12. Dong H-D., Zhong J. J., (2002), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 31, 116-121.
13. Ramawat K. G., Sonie K. C., Sharma M. C., (2004), *Therapeutic potential of medicinal plants: An introduction*, in: *Biotechnology of medicinal plants*, 1-18, Ed. Ramawat K. G., Science Publishers, Inc. USA, UK.
14. Wróbel M., Żebrowski J., Szopa J., (2004), *J. Biotechnol.*, 107, 41-54.
15. Korobczak A., Aksamit A., Łukaszewicz M., Lorenc K., Rorat T., Szopa J., (2005), *Plant Sci.*, 168, 339-348.
16. Aksamit A., Korobczak A., Skala J., Łukaszewicz M., Szopa J., (2005), *Plant Cell Physiol.*, 46, 1635-1645.
17. Navrath C., Poirier Y., Somerville C., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12760-12764.
18. Ye X., Al-Babili S., Klotz A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I., (2000), *Science*, 287, 303-305.
19. DeCosa B., Moar W., Lee S. B., Miller M., Daniell H., (2001), *Nat. Biotechnol.*, 19, 71-74.
20. Daniell H., Khan M. S., (2004), *Engineering the chloroplast genome for biotechnology applications*, in: *Biotechnology of medicinal plants*, 83-110, Ed. Ramawat K. G., Science Publishers, Inc. USA, UK.
21. Schubbert R., Renz D., Scmitz B., Doerfler W., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 961-966.
22. Einspanier R., Klotz A., Kraft J., Aulrich K., Poser R., Schwagele F., Jahreis G., Flachowsky G., (2001), *Eur. Food Res. Technol.*, 212, 129-134.
23. Dubnau D., Lorenz M. G., (1991), *Microbiol. Rev.*, 55, 395-424.
24. Reipschlagel K., Wackernagel W., (1992), *Arch. Microbiol.*, 157, 355-360.
25. Iamtham S., Day A., (2000), *Nat. Biotech.*, 18, 1172-1176.
26. Joersbo M., (2001), *Physiol. Plant.*, 111, 269-272.
27. Wills E. A., Roberts I. S., Del Poeta M., Rivera J., Casadevall A., Cox G. M., Perfect J. R., (2001), *Mol. Microbiol.*, 40, 610-620.