



# **Transformacja *Arabidopsis thaliana* z udziałem *Agrobacterium tumefaciens* niosącym geny mirozynazy *TGG1* lub *TGG2***

Joanna Troczyńska, Lucyna Drozdowska

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolniczy,  
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz

## **Transformation of *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens* with myrosinase genes *TGG1* or *TGG2***

### Summary

In order to obtain the plants with altered myrosinase activity, the transformation via *Agrobacterium tumefaciens* was performed. The myrosinase genes *TGG1* or *TGG2* from *Arabidopsis thaliana* under the control of enhanced 35S promoter and phosphotransferase neomycin II (*NPTII*) as the selectable marker were introduced into *Arabidopsis*. The presence and expression of *NPTII* gene in selected plants was confirmed by ELISA and PCR analysis. The integration of T-DNA with *TGG1* or *TGG2* gene caused differentiated effects from a multi-fold increase of myrosinase activity to its lack. No morphological differences were observed between transgenic and control plants. All the plants were fertile and produced seeds. The majority of the plants with additional copy (copies) of *TGG1* showed increased enzyme activity. Conversely, most of the plants with insertion of additional copy (copies) of *TGG2* demonstrated decreased myrosinase activity. Transgenic plants may be used in further studies explaining the physiological role of glucosinolates in plant-pest interaction and the importance of the myrosinase-glucosinolates system in growth and development.

### Key words:

myrosinases, glucosinolates, *Arabidopsis thaliana*, *Brassicaceae*.

### Adres do korespondencji

Joanna Troczyńska,  
Katedra Fizjologii Roślin,  
Uniwersytet  
Technologiczno-  
Przyrodniczy,  
ul. Bernardyńska 6,  
85-029 Bydgoszcz;  
e-mail: zan@utp.edu.pl

## 1. Wstęp

Mirozynazy ( $\beta$ -tioglukozydazy EC 3.2.3.1) są enzymami odpowiedzialnymi za hydrolizę glukozyolanów, metabolitów wtórnych występujących powszechnie u roślin z rodziny Brassicaceae (1). Tworzenie aktywnych biologicznie produktów hydrolizy tych związków jest odpowiedzią rośliny na biotyczne czynniki stresowe (2). Przypuszcza się również, że glukozyolany mogą stanowić dla roślin źródło S, C i N, a także być zapasową pulą auksyn (1).

Liczba genów kodujących mirozynazy u rzepaku wynosi 25 (1), natomiast w genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano cztery funkcjonalne geny kodujące mirozynazy, dwa ulegające ekspresji w częściach nadziemnych (*TGG1*, *TGG2*) oraz dwa w korzeniu (*TGG3* i *TGG4*) (3). Z tego względu *Arabidopsis* może być gatunkiem modelowym w badaniach funkcji systemu mirozynaza-glukozyolany. Mała liczba genów, jak się wydaje, ułatwia modyfikację aktywności enzymu *in planta*, co może skutkować wyraźniejszymi efektami.

Celem pracy było przygotowanie wektorów binarnych zawierających geny kodujące mirozynazę u rzodkiewnika (*TGG1* lub *TGG2*), wprowadzenie ich do genomu tej rośliny oraz uzyskanie i wyselekcjonowanie transgenicznych roślin ze zmienioną aktywnością enzymu.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Materiał roślinny

Materiałem badawczym był rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*), ekotyp Columbia. Rośliny rosły w doniczkach wypełnionych podłożem kwiatowym i piaskiem (3:1), w kontrolowanych warunkach (20°C dzień/18°C noc, wilgotność 70%). Rośliny, z których izolowano DNA do amplifikacji genów mirozynazy oraz rośliny będące obiektem transformacji utrzymywane były w warunkach 12-godzinnego fotoperiodu. Rośliny pokolenia T<sub>1</sub> rosły przez 10 tygodni w 8-godzinnym fotoperiodzie i przez kolejne 6 tygodni (do zbioru nasion) w 12-godzinnym fotoperiodzie.

### 2.2. Przygotowanie kaset ekspresyjnych i wektorów binarnych z genami mirozynaz

Do konstrukcji kaset genowych użyto fagemida pBluescript II SK(-), z którego usunięto fragment KpnI/XbaI polilinkera. Wektor trawiono enzymem NotI i ligowano z promotorem *P-e35S* (z wirusa mozaiki kalafiora) i sekwencją liderową genu HSP17.9 (z soi) wyciętymi z plazmidu pMON30069 (udostępniony przez Monsanto)

(rys. 1, etap 1). Produkt ligacji trawiono KpnI i SmaI i następnie wstawiono terminator *T-35S* (z wirusa mozaiki kalafiora) wycięty z wektora pRTLII enzymami KpnI i SphI (rys. 1, etap 2). Uzyskany konstrukt oznaczono jako pB  $\Delta$ 1/35S.

Kopie genów mirozynazy *TGG1* (GenBank, X79194) lub *TGG2* (GenBank, X79195) namnażano w reakcji PCR ze specyficznymi starterami na matrycy DNA wyizolowanego z liści rozetowych rzodkiewnika (4). Produkty amplifikacji trawiono enzymami BamHI i XbaI (*TGG1*) oraz NcoI i BamHI (*TGG2*).

Sekwencje genu *TGG1* klonowano do pB  $\Delta$ 1/35S, który przed ligacją cięto enzymami BglII i XbaI (rys. 1, etap 3a). Otrzymany w ten sposób wektor oznaczono jako pB *TGG1*. Przed wstawieniem sekwencji genu *TGG2* wektor pB  $\Delta$ 1/35S dodatkowo trawiono enzymami BglII i NcoI. Zmodyfikowany wektor oznaczono jako pB  $\Delta$ 2/35S. Do niego, w miejscu cięcia dla NcoI i BamHI, wprowadzano następnie kopie *TGG2* (rys. 1, etap 3b). Uzyskany konstrukt oznaczono jako pB *TGG2*.

Wektory pB *TGG1* i pB *TGG2* namnażano w komórkach bakterii *E. coli* DH5 $\alpha$ , które hodowano w pożywce LB z ampicyliną (100 mg·dm<sup>-3</sup>). Z 10 losowo wybranych kolonii bakteryjnych izolowano wektory (Qiagen DNA extraction kit) i obecność odpowiednich insertów sprawdzano za pomocą enzymów restrykcyjnych. Z namnożonych wektorów pB *TGG1* lub pB *TGG2* wycięto enzymem NotI kasety z genami mirozynazy. Kasety subklonowano do wektora pMON51850 (udostępniony przez Monsanto) trawionego uprzednio również enzymem NotI (rys. 1, etap 4a, b), który zawierał między sekwencją graniczną prawą (RB) i lewą (LB) gen fosfotransferazy neomycyny (*NPTII*) wraz z promotorem (*P-NOS*) i terminatorem (*T-NOS*). Uzyskanymi w ten sposób wektorami p*TGG1* lub p*TGG2* transformowano komórki bakterii *E. coli* DH5 $\alpha$ , które następnie hodowano w pożywce LB ze spektynomycyną (100 mg·dm<sup>-3</sup>). Z pojedynczych kolonii izolowano wektory (Qiagen DNA extraction kit) i poddano je ponownie analizie restrykcyjnej. Wektory p*TGG1* lub p*TGG2* z odpowiednimi insertami wprowadzano do bakterii *Agrobacterium tumefaciens* szczep GV3101 (pMP90RK) (udostępniony przez Csabę Koncza, Niemcy).

Wszystkie etapy przeprowadzono wg Sambrook i in. (5) lub wg instrukcji załączonych przez producentów do odpowiednich produktów.

### 2.3. Transformacja rzodkiewnika i selekcja nasion

Rośliny w początkowym stadium kwitnienia transformowano metodą infiltracji próżniowej (6). Nasiona zebrane z roślin transformowanych ( $T_0$ ) poddano selekcji na pożywce Murashige i Skooga (MS) (7) z kanamycyną (50 mg·dm<sup>-3</sup>). Po 2-3 tygodniach, siewki odporne na antybiotyk przenoszono do doniczek z podłożem. Rośliny  $T_1$  w stadium kwitnienia były osłaniane izolatorami. Z każdego osobnika zbierano nasiona. W analogicznych warunkach rosły rośliny typu dzikiego (WT).

W liściach roślin  $T_1$  przed przejściem do fazy generatywnej oznaczano obecność genu *NPTII* i produktu jego ekspresji, a także aktywność mirozynazy.

## 2.4. Test ELISA

Obecność białka NPTII w transformowanych roślinach sprawdzano testem ELISA przy użyciu zestawu PathoScreen NPTII ELISA (Agdia). Do tego celu pobierano około 50 mg świeżej masy liści rozetowych rzodkiewnika. Kontrolę negatywną stanowił ekstrakt z roślin WT rzodkiewnika, zaś kontrolą pozytywną było białko NPTII dostarczone przez producenta. Zawartość białka ogólnego w próbach oznaczono metodą Bradforda (8), stosując jako wzorzec albuminę wołową (BSA) (Sigma). Zawartość białka NPTII wyrażono w mikrogramach białka NPTII na miligram białka ogólnego.

## 2.5. Analiza PCR

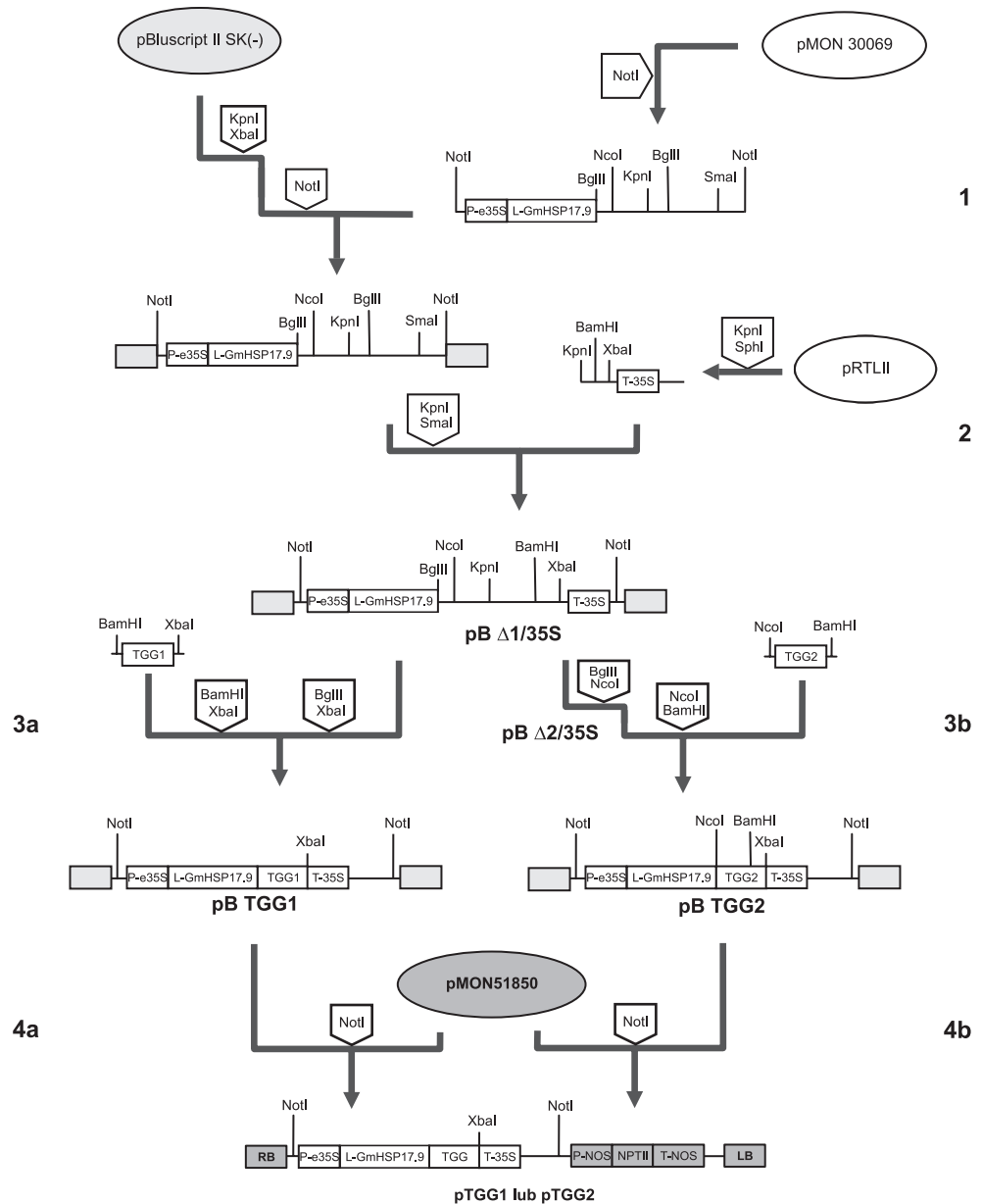
Obecność genu *NPTII* w genomowym DNA izolowanym z roślin metodą Doyle i Doyle (9) potwierdzano amplifikując fragment długości 700 pz ze specyficznymi starterami (10). Reakcję prowadzono przez 35 cykli w warunkach: 60 s/92°C, 60 s/61°C, 60 s/72°C.

## 2.6. Oznaczenie aktywności mirozynazy

Próbki liści o masie 100 mg homogenizowano w buforze ekstrakcyjnym (10 mM imidazol-HCl, pH 6,2), (11). Homogenat wirowano przez 15 min przy  $10\,000 \times g$  w temp. 4°C, po czym supernatanty nanoszono na filtry Microcon YM-10 (Millipore) i wirowano 1 godz. przy  $14\,000 \times g$  w temp. 4°C. Do oznaczeń pobierano 25 µl enzymu, dodawano 25 µl (375 µg) roztworu synigriny (Sigma) i 50 µl buforu cytrynianowego (50 mM, pH 5,5). Mieszaninę inkubowano przez 30 min w temp. 37°C, po czym reakcję hamowano poprzez umieszczenie prób we wrzącej łaźni wodnej na 5 min. Po ochłodzeniu pobierano 20 µl mieszaniny reakcyjnej i dodawano 200 µl odczynnika GOD/PAP (Aqua-med), z którym glukoza uwolniona w wyniku hydrolizy synigriny tworzyła barwny kompleks. Po 15 min inkubacji mierzono absorbancję przy  $\lambda$  500 nm wobec próby odczynnikowej (bufor imidazolowy, synigrina, bufor cytrynianowy, GOD/PAP). Ilość uwolnionej glukozy odczytano z krzywej wzorcowej. Aktywność specyficzną wyrażano w mikromolach uwolnionej glukozy  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  białka. Białko oznaczono metodą Bradforda (8), stosując jako wzorzec BSA. Istotność różnic w aktywności enzymu u potencjalnych transformantów i w roślinach kontrolnych (WT) oceniano testem Dunnetta, przy  $\alpha = 0,05$ .

### 3. Wyniki

Przy udziale *A. tumefaciens* do genomu rzodkiewnika wprowadzano genomowe kopie jednego z czterech funkcjonalnych genów kodujących mirozyny (*TGG1* lub



Rys. 1. Schemat przygotowania wektorów binarnych pTGG1 i pTGG2 zawierających geny mirozyny.

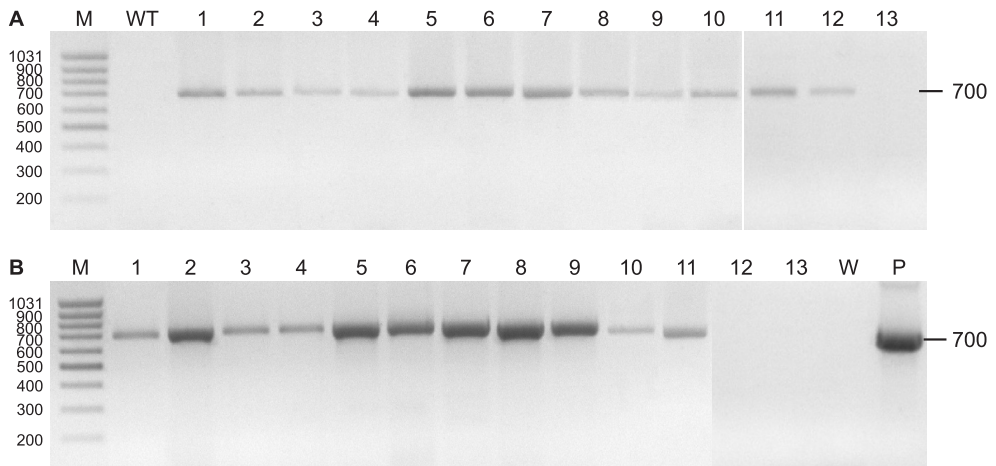
*TGG2*) u tego gatunku. Wyizolowane w reakcji PCR sekwencje składały się z 12 eksonów i 11 intronów o łącznej długości 2673 pz dla genu *TGG1* (pozycja 1785-4458 sekwencji GenBank, X79194) oraz 2714 pz dla genu *TGG2* (pozycja 1468-4182 sekwencji GenBank, X79195).

Geny mirozynazy w konstrukcjach genowych użytych do transformacji kierowane były przez konstytutywny promotor *P-e35S* wirusa mozaiki kalafiora (rys. 1, etap 4a, b). W wektorach binarnych oznaczonych odpowiednio pTGG1 i pTGG2 znajdował się także gen kodujący fosfotransferazę neomycyny (*NPTII*) pozwalający wyselekcjonować genetycznie zmodyfikowane rośliny.

Po 5-7 tygodniach od infiltracji rośliny rzodkiewnika wydały nasiona, które poddano selekcji w obecności kanamycyny. Do potwierdzenia procesu transformacji i efektów wprowadzenia dodatkowych kopii genów mirozynaz do genomu rzodkiewnika, z puli siewek opornych na zastosowany antybiotyk (pokolenie T<sub>1</sub>) wybrano 26 siewek. Połowa (13 osobników) była pochodną pokolenia, które transformowano wektorem pTGG1, druga połowa (13 osobników) wyprowadzona została z roślin transformowanych wektorem pTGG2.

Spśród roślin pokolenia T<sub>1</sub> uzyskanych po transformacji wektorem pTGG1 tylko u jednej zawartość białka *NPTII* kształtowała się na poziomie kontroli (tab.). U tej rośliny nie stwierdzono również obecności genu *NPTII* (rys. 2A). U pozostałych roślin zawartość białka *NPTII* była zróżnicowana, lecz wyższa w porównaniu z roślinami WT. Analizą PCR potwierdzono u nich obecność genu *NPTII* (rys. 2A).

U przypuszczalnych transformantów uzyskanych po transformacji wektorem pTGG2 zawartość białka *NPTII*, wyższą w porównaniu z roślinami typu dzikiego oraz obec-



Rys. 2. Analiza elektroforetyczna produktów amplifikacji DNA roślin rzodkiewnika pokolenia T<sub>1</sub> w 1% żelu agarozowym otrzymanych po transformacji wektorem pTGG1 (A) i pTGG2 (B). Ścieżki zawierają: M – marker mas cząsteczkowych DNA; WT – kontrola negatywna (DNA rośliny kontrolnej); W – kontrola negatywna (woda); P-kontrola pozytywna (wektor pTGG1).

ność genu *NPTII* stwierdzono u 10 osobników. W przypadku transformanta nr 11 zamplifikowano gen *NPTII*, natomiast nie wykryto produktu jego ekspresji (tab., rys. 2B).

W roślinach, w których na podstawie analizy PCR potwierdzono obecność genu *NPTII* badano aktywność mirozynazy. Spośród 12 roślin otrzymanych po transformacji wektorem pTGG1 istotnie wyższą aktywność stwierdzono w liściach osobników nr 1, 2, 4, 6, 7, 10, 11, 12 (tab., rys. 3A). Szczególnie wysoką aktywność enzymu, około dziesięciokrotnie wyższą w porównaniu z roślinami WT, stwierdzono u transformanta nr 6 i nieco niższą u transformantów nr 7 i 11. Łącznie wśród 12 roślin pokolenia T<sub>1</sub>, u których stwierdzono obecność genu *NPTII*: 8 (66%) wykazywało podwyższoną, 2 (17%) obniżoną i 2 (17%) niezmienną aktywność mirozynazy w porównaniu z roślinami WT.

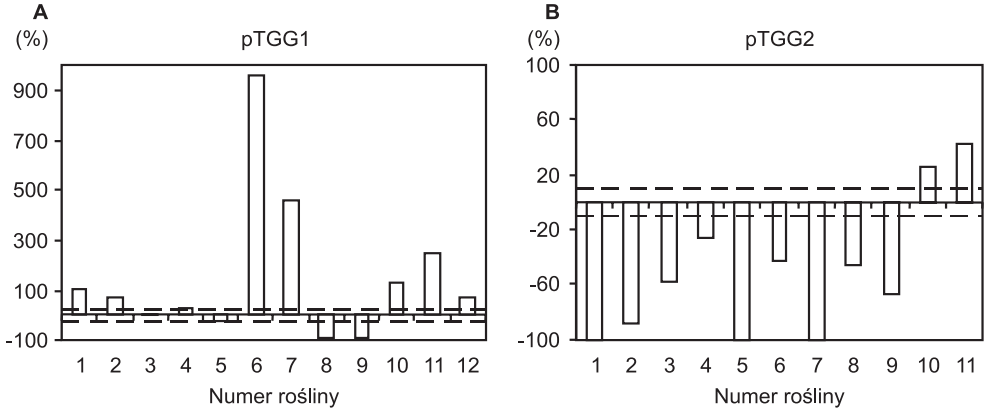
Wśród 11 transformantów uzyskanych po transformacji wektorem pTGG2, u sześciu osobników (55%) oznaczonych numerami 2, 3, 4, 6, 8, 9 aktywność enzymu była istotnie obniżona. Istotnie wyższą aktywnością mirozynazy charakteryzowały się dwie (18%) wyselekcjonowane rośliny (nr 10,11). Wzrost ten nie był tak znaczny, jak u roślin po transformacji wektorem zawierającym sekwencję genu *TGG1*. W ekstraktach pochodzących z roślin nr 1, 5 i 7 (27%) nie stwierdzono aktywności mirozynazy (tab., rys. 3B).

Zarówno w fazie wegetatywnej jak i generatywnej nie obserwowano różnic fenotypowych pomiędzy roślinami typu dzikiego, a roślinami transformowanymi. Wszystkie rośliny zakwitły w tym samym czasie i wydały nasiona.

Tabela

**Zawartość białka *NPTII* i aktywność mirozynazy w liściach roślin rzodkiewnika pokolenia T<sub>1</sub> uzyskanych po transformacji wektorami pTGG1 lub pTGG2**

Wektor	Roślina	NPTII [pg·mg <sup>-1</sup> białka]	Aktywność specyficzna mirozynazy [μmol min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> białka]	Wektor	Roślina	NPTII [pg·mg <sup>-1</sup> białka]	Aktywność specyficzna mirozynazy [μmol min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> białka]
	WT	<0,6	0,2889		WT	<0,6	0,2889
pTGG1	1	295,1	0,5876	pTGG2	1	76,3	0,0000
	2	19,0	0,4995		2	27,5	0,0357
	3	28,9	0,3039		3	103,2	0,1215
	4	235,5	0,3811		4	185,6	0,2131
	5	134,0	0,2332		5	32,8	0,0000
	6	675,5	3,0498		6	947,3	0,1660
	7	917,8	1,6079		7	355,8	0,0000
	8	65,0	0,0367		8	456,1	0,1546
	9	39,5	0,0281		9	169,7	0,0958
	10	480,1	0,6738		10	146,7	0,3634
	11	463,4	1,0104		11	0,7	0,4124
	12	540,6	0,4944				
			NIR <sub>0,05</sub> : 0,0775				NIR <sub>0,05</sub> : 0,0284



Rys. 3. Aktywność specyficzna mirozynazy w liściach transformantów rzodkiewnika uzyskanych po transformacji wektorem pTGG1 (A) i wektorem pTGG2 (B). Wartości względne w stosunku do obiektu kontrolnego (rośliny typu dzikiego). Liniami przerywanymi zaznaczono zakres przedziału ufności Dunnetta.

#### 4. Dyskusja

Wprowadzenie do genomu rzodkiewnika przy udziale *A. tumefaciens* dodatkowej kopii jednego z genów mirozynaz, *TGG1* lub *TGG2*, pod kontrolą konstytutywnego promotora *P-e35S* spowodowało zmianę aktywności enzymu *in planta*. Na podstawie analizy 23 niezależnych transformantów, u których stwierdzono obecność transgenu *NPTII* i/lub produktu jego ekspresji wykazano, że wśród nich, 10 roślin (43%) charakteryzowało się istotnie wyższą, a 8 (35%) istotnie niższą aktywnością mirozynazy w stosunku do roślin typu dzikiego. U trzech transformantów (13%) nie stwierdzono aktywności enzymu. Otrzymano także 2 rośliny (9%) nieróżniące się istotnie aktywnością w porównaniu z roślinami WT. Wpływ na zmiany aktywności enzymu prawdopodobnie mogła mieć obecna w wektorze sekwencja kodująca mirozynazę. Geny *TGG1* i *TGG2* charakteryzują się dość wysokim podobieństwem sekwencji nukleotydowych w obrębie eksonów (75%), natomiast znacznie niższym dla intronów (42%) (12). W badaniach nad wyłączeniem genów wykazano, że aby doszło do kosupresji genów natywnych długość homologicznego fragmentu może być niewielka (13).

Wyciszenie, skutkujące obniżeniem aktywności enzymu, a nawet jej brakiem zaobserwowano w wyniku wprowadzenia dodatkowych kopii genu *TGG2*. Ueda i in. (14) wykazali, że produkt ekspresji tego genu występuje w roślinie głównie w kwiatach i łuszczykach, zaś jest ledwie wykrywalny w liściach. Można przypuszczać, że gen *TGG2* jest naturalnie wyciszony, a pojawienie się jego kopii w genomie mogło spowodować supresję genów mirozynaz aktywnych w liściach. Nie stwierdzono takiego efektu u roślin uzyskanych po transformacji *Agrobacterium* z wektorem pTGG1. Przeciwnie, u większości z nich, aktywność była podwyższona. Barth i Jander (15) badając mutanty rzodkiewnika z insercją T-DNA w genach *TGG1* lub *TGG2* wyka-



zali, że w znacznym stopniu za aktywność enzymu w roślinie odpowiada *locus TGG1*. U mutantów *tgg1* obserwowano aż 95% redukcję całkowitej aktywności mirozynazy, podczas gdy u mutantów *tgg2* zmiany aktywności były niewielkie, co może sugerować różną funkcję genów *TGG1* i *TGG2* w roślinie.

Wielu badaczy przypuszcza, że istnieje metaboliczne powiązanie pomiędzy glukozynolanami indolowymi i hormonem roślinnym kwasem indolilo-3-octowym (IAA). Potwierdzeniem tych przypuszczeń mogą być wyniki badań, w których używano rośliny z nadekspresją niektórych genów włączonych w szlak biosyntezy glukozynolanów indolowych, co przejawiało się m.in. utratą dominacji wierzchołkowej, charakterystycznej dla deficytu auksyn (16). Glukozynolany indolowe mogą być także hydrolizowane przez mirozynazę do indolilo-3-acetonitrylu (IAN), który następnie przy udziale nitrylazy przekształcany jest do IAA. W pracy nie zaobserwowano jednak różnic w tempie wzrostu i rozwoju u roślin z podwyższoną aktywnością mirozynazy. Podobnie Normanly i in. (17) nie odnotowali zmian w fenotypie roślin rzodkiewnika z nadekspresją nitrylazy.

Mirozynaza naturalnie znajduje się w komórkach mirozynazowych, które są rozproszone w korzeniu, łodydze, liściach, ogonkach liściowych i w siewkach (1,18-20). W badaniach wykazano, że enzym i substraty rozdzielone są przestrzennie nie tylko na poziomie subkomórkowym (1). Taka lokalizacja zabezpiecza rośliny przed tworzeniem *in planta* toksycznych produktów hydrolizy glukozynolanów takich jak tiocyjaniany, izotiocyaniany czy nityle (1). Ektopowa ekspresja genów mirozynazy mogła znieść przestrzenną izolację składników układu obronnego roślin. Zagrożenie tworzeniem się szkodliwych produktów rozkładu prawdopodobnie nie występowało u transgenicznnych roślin z obniżoną aktywnością mirozynazy, ponieważ zmiana ekspresji kodujących je genów spowodowała obniżenie ilości enzymu. Natomiast toksyczne związki mogły się tworzyć w komórkach roślin z podwyższoną aktywnością enzymu. Nie wiadomo, w jaki sposób w roślinie zachodzi detoksykacja produktów rozkładu glukozynolanów. Przypuszcza się, że uczestniczą w tym nitrylazy i metylotransferazy katalizujące *in vivo* odpowiednio nityle i tiocyjaniany (21,22).

Wprowadzenie do genomu rzodkiewnika dodatkowych kopii genu *TGG1* i *TGG2* spowodowało zmiany aktywności mirozynazy *in planta*. Takie rośliny mogą zostać wykorzystane w dalszych badaniach wyjaśniających rolę glukozynolanów w odporności na czynniki chorobotwórcze oraz znaczenia układu mirozynaza-glukozynolany we wzroście i rozwoju.

Badania wykonano w ramach projektu PB 0669/PO6/2002/22 finansowanego przez MNiSW.

## Literatura

1. Rask L., Andreasson E., Ekblom B., Eriksson S., Pontoppidan B., Meijer J., (2000), *Plant Mol. Biol.*, 42, 93-114.
2. Giamoustaris A., Mithen R., (1995), *Ann. Appl. Biol.*, 126, 347-363.

3. Xu Z., Escamilla-Treviño L., Zeng L., Lalgondar M., Bevan D., Winkel B., Mohamed A., Cheng Ch., Shih M., Poulton J., Esen A., (2004), *Plant Mol. Biol.*, 55, 343-367.
4. Troczyńska J., Drozdowska L., Cegielska-Taras T., (2006), *Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin*, red. Adamski T., Surma M., IGR PAN, Poznań, 139-150.
5. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
6. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G., (1993), *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sciences*, 316, 1194-1199.
7. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-493.
8. Bradford M. M., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
9. Doyle J. J., Doyle J. L., (1990), *Focus*, 12, 13-15.
10. Manoharan M., Sree Vidya C. S., Lakshmi Sita G., (1998), *Plant Sci.*, 13, 77-83.
11. Mevy J. P., Rabier J., Quinsac A., Krouti M., Ribailier D., (1997), *Phytochem.*, 44, 1469-1471.
12. Xue J., Joergensen M., Pihlgren U., Rask L., (1995), *Plant Mol. Biol.*, 27, 911-922.
13. Kisiel A., Podkowiński J., Figlerowicz M., (2003), *Biotechnologia*, 2, 104-119.
14. Ueda H., Nishiyama Ch., Shimada T., Koumoto Y., Hayashi Y., Kondo M., Takahashi T., Nishimura M., Hara-Nishimura I., (2006), *Plant Cell Physiol.*, 47(1), 164-175.
15. Barth C., Jander G., (2006), *Plant Journal*, 46, 549-562.
16. Bak S., Tax F., Feldmann K., Galbraith D., Feyereisen R., (2001), *Plant Cell*, 13, 101-111.
17. Normanly J., Grisafi P., Fink G. R., Bartel B., (1997), *Plant Cell*, 9, 1781-1790.
18. Andreasson E., Jorgensen L. B., Höglund A. S., Rask L., Meijer J., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 1750-1763.
19. Drozdowska L., Thangstad O. P., Beisvaag T., Evje K., Bones A. M., Iversen T. H., (1992), 41, 213-223.
20. Kelly P. J., Bones A., Rossister J. T., (1998), *Planta*, 206, 370-377.
21. Attieh J., Kleppinger-Sparace K. F., Nunes C., Sparace S. A., Saini H. S., (2000), *Plant Cell Env.*, 23, 165-174.
22. Vorwerk S., Biernacki S., Hillebrand H., Janzik I., Müller A., (2001), *Planta*, 212, 508-516.