

## ZNACZENIE POLIAMIN W ORGANOGENEZIE *IN VITRO*

### POLYAMINES IN *IN VITRO* ORGANOGENESIS

Jan KĘPCZYŃSKI<sup>1</sup>, Izabela RUDUŚ<sup>1</sup>, Marta E. BRYŚKIEWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Fizjologii i Inżynierii Genetycznej Roślin, Uniwersytet Szczeciński

<sup>2</sup>Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

*Streszczenie:* Powszechna obecność i udział poliamin w procesach podziałów, wzrostu i różnicowania komórek, stanowiących podstawę wszystkich procesów morfogenetycznych u roślin *in vivo*, sugerują także ich istotną rolę w regeneracji organów *in vitro*. Liczne dane potwierdzają niezbędność poliamin w fazie indukcji i ekspresji organogenezy *de novo* pędów i korzeni. Chociaż molekularny mechanizm działania poliamin oraz powiązanie ich metabolizmu ze szlakami sygnałnymi innych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin wymagają jeszcze wyjaśnienia, już teraz można manipulować zawartością endogennych poliamin w celu optymalizacji procesów regeneracyjnych *in vitro*.

*Słowa kluczowe:* kaulogeneza, kultury *in vitro*, organogeneza *de novo*, poliaminy, ryzogeneza

*Summary:* Polyamines are present in all plant tissues and are implicated in a variety of growth and developmental processes. Many studies in plant tissue cultures revealed polyamine levels and activities of biosynthetic enzymes correlated with morphogenetic/regeneration capacity. Despite the lack of knowledge about the precise mode of polyamine action and interactions of their metabolism with phytohormone signaling pathways, manipulations of endogenous polyamine levels has proven successful in enhancing *in vitro* organogenesis of shoots and roots.

*Key words:* caulogenesis, *de novo* organogenesis, *in vitro* cultures, polyamines, rhizogenesis

## WSTĘP

Proces organogenezy *in vivo* prowadzi do uformowania organów wegetatywnych oraz generatywnych w wyniku różnicowania się komórek i tkanek z zawiązków merystatycznych. Natomiast w warunkach *in vitro*, termin organogenezy odnosi

się do procesu wytwarzania korzeni (ryzogeneza) i pędów (kaulogeneza) *de novo* ze zróżnicowanych komórek eksplantatu. Przebieg organogenezy *in vitro* jest uwarunkowany wrażliwością eksplantatu na bodźce hormonalne, których odbiór inicjuje odróżnicowanie komórek i nabycie przez nie kompetencji, wznowienie podziałów komórkowych, a ostatecznie wykształcenie merystemów i zróżnicowanie organów. Wyniki badań fizjologicznych oraz fenotypowej analizy mutantów z zaburzeniami rozwojowymi wskazują, że podczas odróżnicowania, komórki najpierw nabywają kompetencji do proliferacji i do ryzogenezy, a dopiero w drugiej kolejności do formowania pędów [84]. W praktyce jednak, zwykle tak manipuluje się warunkami prowadzonej kultury by wyzwolenie potencjału morfogenetycznego doprowadziło do ukształtowania pędów, które następnie są ukorzeniane.

Decydującą rolę w inicjacji i ukierunkowaniu organogenezy *in vitro* odgrywają auksyny i cytokininy, ich rodzaj i wzajemny stosunek ilościowy [32]. Oprócz tych fitohormonów w regulacji procesu wzrostu i rozwoju kultur tkankowych roślin znaczącą rolę pełnią również powszechnie występujące w organizmach zwierzęcych, mikroorganizmach i roślinach związki określane jako poliaminy (PA) [9, 15, 34]. PA należą do grupy regulatorów wzrostu o wyraźnej, wielokierunkowej aktywności biologicznej, jednak nie są uznawane za hormony roślinne, gdyż występują i są aktywne w znacznie wyższych stężeniach [36, 47].

Endogenne PA są zaangażowane w regulację podstawowych procesów komórkowych, takich jak replikacja DNA, ekspresja genów, translacja, transdukcja sygnałów, aktywność kanałów jonowych, cykl komórkowy i apoptoza [9, 46, 52]. Współdziałając w sposób bezpośredni lub pośredni z fitohormonami, odgrywają one kluczową rolę w kontroli podziałów, wydłużania i różnicowania komórek, a w konsekwencji sterują przebiegiem morfogenezy. Ponadto PA mogą być rozpatrywane jako biochemiczne markery wzrostu tkanek [17, 71], kompetencji morfogenetycznej [74], zdolności regeneracyjnych roślin [80] oraz indukcji kwitnienia [57]. Zwiększenie zawartości PA, w wyniku zwiększenia aktywności kluczowych enzymów szlaku ich biosyntezy, bądź dodania egzogennych PA, poprzedza lub towarzyszy procesom morfogenetycznym [15, 46].

Celem niniejszego artykułu jest podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat uczestnictwa PA w regulacji procesów morfogenetycznych prowadzących do formowania *de novo* organów wegetatywnych w kulturach *in vitro*.

## WYSTĘPOWANIE I METABOLIZM POLIAMIN W ROŚLINACH

Poliaminy (PA) są azotowymi, polikationowymi związkami alifatycznymi zawierającymi kilka grup aminowych. U prawie wszystkich gatunków roślin najczęściej spotykane są: diamina – putrescyna (Put), triamina – spermidyna (Spd), tetraamina – spermina (Spm), rzadziej kadaweryna (Cad) [34, 52]. PA mogą

występować zarówno w formie wolnej, skoniugowanej z niskocząsteczkowymi związkami głównie z grupy kwasów fenolokarboksylowych albo związanej z komórkowymi makrocząsteczkami, białkami, polisacharydami lub fosfolipidami [60]. Koniugaty są często traktowane jako forma transportowa PA oraz preferowany substrat dla enzymów degradujących PA. Jednak coraz częściej wykazuje się ich specyficzne znaczenie w procesach rozwojowych roślin i regulacji kluczowych procesów metabolicznych [83].

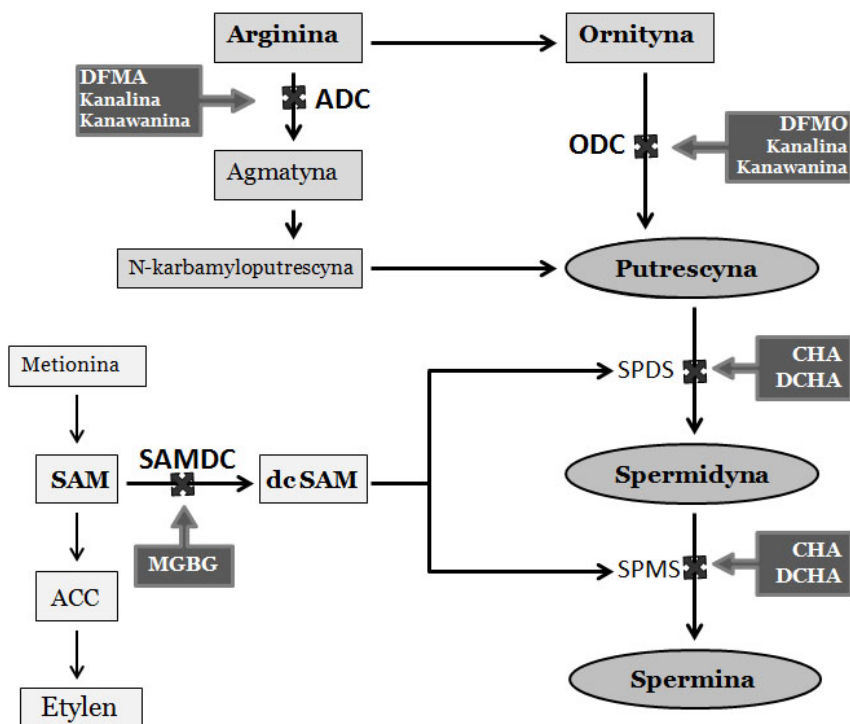
Biosynteza powszechnie występujących w roślinach PA rozpoczyna się dekarboksylacją ornityny lub argininy (ryc. 1) [36, 52]. Bezpośrednim produktem dekarboksylacji ornityny poprzez dekarboksylazę ornityny (ODC) jest Put. Natomiast dekarboksylacja argininy katalizowana przez dekarboksylazę argininy (ADC) prowadzi do powstania agmatyny, która następnie ulega hydrolizie do Put. Spd i Spm mogą być traktowane jako pochodne Put. Powstają one w wyniku przyłączenia do Put jednej lub dwóch grup aminopropylowych w reakcjach katalizowanych odpowiednio przez syntazę spermidyny (SPDS) i syntazę sperminy (SPMS). Grupy aminopropylowe dostarczane są w wyniku dekarboksylacji S-adenozynolometioniny (SAM) przy udziale specyficznej dekarboksylazy (SAMDC). SAM pełni nie tylko rolę prekursora Spd i Spm, ale odgrywa bardzo ważną rolę w biosyntezie etylenu (ryc. 1) [9, 49, 89]. Natomiast bezpośrednim prekursorem Cad jest lizyna, która ulega dekarboksylacji pod wpływem dekarboksylazy lizyny (LDC) [60].

Zawartość endogennych PA jest regulowana poprzez enzymy oksydacyjne, które powodują ich degradację [46, 52, 99]. Oksydaza poliamin (PAO) katalizuje rozkład Spd i Spm, natomiast Put podlega degradacji oksydacyjnej z udziałem oksydazy diaminowej (DAO). Obydwa te enzymy są zlokalizowane w ścianie komórkowej, a produktem ubocznym ich aktywności jest nadtlenuk wodoru. Okazało się, że podobnie jak u ssaków i drożdży, także u roślin możliwa jest powrotna konwersja Spm do Spd [87].

Istnieje możliwość manipulacji stężeniem endogennych PA poprzez zastosowanie inhibitorów ich biosyntezy. Aktywność kluczowych enzymów biorących udział w procesie biosyntezy PA, dekarboksylaz, może być nieodwracalnie bądź odwracalnie hamowana przez specyficzne inhibitory (ryc. 1) [9, 60]. Do nieodwracalnych zmian w syntezie PA dochodzi pod wpływem difluorometyloargininy (DFMA) i difluorometyloornityny (DFMO), które działają na zasadzie konkurencyjnej inhibicji, jako antymetabolity, hamując odpowiednio aktywność ADC i ODC. Biosyntezę Put można również zahamować kanawaniną i kanaliną, które działają na ADC i ODC niespecyficznie. Natomiast do odwracalnych zmian w aktywności SAMDC oraz SPDS i SPMS dochodzi odpowiednio pod wpływem, metyloglioksalo(*bis*)-guanylohydrazonu (MGBG) oraz cykloheksyloaminy (CHA) bądź dicykloheksyloaminy (DCHA).

Alternatywną drogę do zmiany zawartości PA w komórkach roślinnych stanowią metody wykorzystywane w biologii molekularnej umożliwiające ingerencję w eks-

presję genów kodujących enzymy biosyntezy bądź katabolizmu PA. Ostatnio pojawiły się doniesienia dotyczące roślin transgeniczných, w których konstytutywna nadekspresja genów *ADC* [16, 96], *ODC* [66, 81], *SAMDC* [50, 98], czy *SPDS* [68, 69] prowadzi do zmian ilościowych i jakościowych w ogólnej puli endogennych PA.



RYCINA 1. Schemat szlaku biosyntezy podstawowych roślinnych poliamin w powiązaniu ze szlakiem biosyntezy etylenu. Oznaczenia enzymów: ACO – oksydaza ACC; ACS – syntaza ACC; ADC – dekarboksylaza argininy; AIH – iminohydrolaza agmatyny; CPA – amidohydrolaza N-karbamioilputrescyny; ODC – dekarboksylaza ornityny; SAMDC – dekarboksylaza SAM; SAMS – syntaza SAM; SPDS – syntaza spermidyny; SPMS – syntaza sperminy. Inhibitory biosyntezy PA z uwzględnieniem ich miejsc działania: CHA – cykloheksyloamina; DCHA – dicykloheksyloamina; DFMA –  $\alpha$ -difluorometyloarginina; DFMO –  $\alpha$ -difluorometyloornityna; MGBG – metylglioksal-*bis*-guanylohydrazon. Oznaczenia metabolitów: ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboxylowy; SAM – S-adenozylometionina; dSAM – dekarboksylowana SAM. Na podstawie [15, 25, 47]

FIGURE 1. The polyamine metabolic pathway in plants and its linkage to ethylene biosynthesis. Enzymes: ACO – ACC oxidase; ACS – ACC synthase; ADC – arginine decarboxylase; AIH – agmatine iminohydrolase; CPA – N-carbamoylputrescine amidohydrolase; ODC – ornithine decarboxylase; SAMDC – SAM decarboxylase; SAMS – SAM synthase; SPDS – spermidine synthase; SPMS – spermine synthase. Inhibitors of PA biosynthesis and their sites of action: CHA – cyclohexylamine; DCHA – dicyclohexylamine; DFMA –  $\alpha$ -difluoromethylarginine; DFMO –  $\alpha$ -difluoromethylornithine; MGBG – methylglyoxal-*bis*-guanylohydrazone. Metabolites: ACC – 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; SAM – S-adenosylmethionine; dSAM – decarboxylated SAM. Based on [15, 25, 47]

## FORMOWANIE PĘDÓW

Wytwarzanie pędów przybyszowych w kulturach *in vitro* wymaga zastosowania cytokinin, które indukują formowanie merystemów pędowych z kompetentnych komórek eksplantatów pierwotnych lub z komórek kalusa [84]. Niezbędność cytokinin w inicjowaniu kaulogenezy wykazali m.in. Aribaud i wsp. [4], Scoccianti i wsp. [77], Kumar i wsp. [51] oraz Viu i wsp. [95]. Stwierdzono, że większe stężenie endogennych cytokinin sprzyja formowaniu pędów przybyszowych w kulturach *Ulmus glabra*, przy czym eksplantaty o większym potencjale regeneracyjnym charakteryzowały się również wyższą zawartością PA, głównie Put i Spd [58]. Wcześniej Fiala i wsp. [35] wykazali pozytywną korelację między stężeniem endogennych PA a zdolnością do formowania pąków przybyszowych w kulturach *Asparagus officinalis*, przypisując kluczowe znaczenie Spd. Ponadto, niezdolność do akumulacji PA uznana została za przyczynę braku potencjału morfogenetycznego i szybkiego starzenia się kultur protoplastów *Avena sativa* [48]. Jednak wysokie stężenie PA nie zawsze jest wyznacznikiem zdolności regeneracyjnych. Czasami brak jest bezpośredniej zależności między zawartością PA a wydajnością organogenezy [26, 27, 28]. W innych przypadkach, znaczna akumulacja wolnych i/lub związanych PA jest skorelowana z proliferacją niezróżnicowanej tkanki kalusowej [5, 13].

Zaobserwowano, że zmiany zawartości endogennych PA od momentu umieszczenia eksplantatu pierwotnego na pożywce indukującej organogenezę aż do pojawienia się uformowanych pędów są odmienne u różnych gatunków. Przykładowo, stężenie endogennej Put i Spd zdecydowanie obniża się w początkowej fazie indukcji, utrzymując dalej mniej więcej stałą wartość, podczas gdy stężenie Spm zwiększa się aż do momentu pojawienia się widocznych makroskopowo pąków przybyszowych w kulturach *Brassica campestris* i *Cucumis sativus* zainicjowanych z liścieni [24, 100]. Stopniowe obniżanie zawartości Put i znacznie szybszy spadek stężenia Spd związany był z inicjalną fazą organogenezy u *Solanum melongena*, chociaż zawartość Spm nie uległa istotnym zmianom [77]. Zupełnie inaczej zmienia się zawartość PA w organogennych kulturach *Chrysanthemum morifolium* oraz *Nicotiana tabacum*, w których indukcja bezpośredniej kaulogenezy związana jest z akumulacją Put i Spd w eksplantatach liściowych, skorelowaną ze zwiększeniem aktywności mitotycznej komórek [4, 75, 92]. Zawartość Put i Spd osiąga maksimum tuż przed lub w dniu, w którym zaczynają formować się pąki przybyszowe, a dalszemu ich różnicowaniu i proliferacji towarzyszy stopniowe obniżenie stężenia tych PA. Również Kaur-Sawhney i wsp. [48] odnotowali duże zwiększenie zawartości Put i Spd w trakcie podziałów i różnicowania się centrów merystematycznych z protoplastów *Vigna aconitifolia*. Dias i wsp. [31] wykazali, że sygnałem do różnicowania pąków przybyszowych z kompetentnych komórek eksplantatu może być zmiana stosunku ilościowego między poszczególnymi PA, związana ze zwiększeniem zawartości Spd i Spm w odniesieniu do Put.

Oprócz wolnych PA, również stężenie ich form skoniugowanych wpływa na przebieg formowania struktur merystematycznych i ich dalszego różnicowania w pąki i pędy przybyszowe. Burtin i wsp. [21] oraz Scaramagli i wsp. [75] udowodnili, że akumulacja koniugatów Put z kwasem hydroksycynamonowym (HCP) hamuje kaulogenezę w kulturach *Nicotiana tabacum*. Ponadto, Biondi i wsp. [19] wykazali, że pod wpływem estru metylowego kwasu jasmonowego (MeJA) następuje obniżenie zawartości wolnych PA i podwyższenie stężenia ich form związanych, a to wywołuje inhibicję organogenezy. Natomiast u *Solanum melongena*, formowaniu pąków przybyszowych towarzyszy wyraźne i stałe zwiększanie się zawartości skoniugowanej Put oraz przejściowe podwyższenie stężenia skoniugowanej Spm i Spd, odpowiednio w początkowej lub końcowej fazie organogenezy [77].

Zmiany stężenia PA w eksplantatach podczas poszczególnych faz organogenezy uwarunkowane są zróżnicowaną aktywnością enzymów biorących udział w ich syntezie i degradacji. Podwyższenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za metabolizm PA (ADC, ODC oraz DAO) w eksplantatach liściowych *Chrysanthemum morifolium* w fazie indukcji, prowadzi do akumulacji endogennych PA, natomiast podczas różnicowania następuje spadek ich aktywności, a w konsekwencji obniżenie stężenia PA [4]. Kluczowe enzymy szlaku biosyntezy PA, ADC i ODC charakteryzują się różną aktywnością. ADC jest odpowiedzialna za syntezę wolnej Put, natomiast ODC uczestniczy głównie w syntezie jej form skoniugowanych [21]. Ponadto, stwierdzono, że geny kodujące ADC i ODC podlegają zróżnicowanej ekspresji [33, 53]. W kulturach *Nicotiana tabacum*, wysoka aktywność ADC jest nieodzowna podczas intensywnych podziałów komórkowych oraz indukcji pąków przybyszowych, a ich dalszemu różnicowaniu sprzyja spadek aktywności ODC [21, 90]. Z kolei proces organogenezy u *Solanum melongena* jest uzależniony od wysokiej aktywności ODC [77].

Określanie zawartości endogennych PA i aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie PA dostarcza cennych informacji na temat roli tych regulatorów w procesie formowania pędów w kulturach *in vitro*. Kolejnym, ważnym źródłem informacji są wyniki badań z wykorzystaniem egzogennych PA oraz inhibitorów ich biosyntezy. W większości przypadków inhibitory odpowiedzialne za hamowanie odpowiednich enzymów szlaku biosyntezy PA hamują powstawanie pędów. Negatywny wpływ DFMA i DFMO, odpowiednio inhibitorów ADC i ODC, bądź ich mieszanin, można całkowicie lub przynajmniej częściowo odwrócić poprzez podanie Put [11, 51, 97]. Czasami egzogenne PA nie wywierają istotnego wpływu na tworzenie pędów przybyszowych, a dopiero zastosowanie inhibitorów biosyntezy może dostarczyć informacji o zaangażowaniu endogennych PA w tym procesie [31].

Odnotowano wiele przypadków stymulacji tworzenia *de novo* pędów przybyszowych w warunkach *in vitro* różnych gatunków roślin przez egzogenne PA,



ostatnio m.in. u *Bixa orellana* [70], *Capsicum frutescens* [51], *Curcuma longa* [95], *Dendrobium officinale* [97], *Malaxis acuminata* [23], czy *Momordica charantia* [88].

Egzogenna Put powodowała wolne obniżanie stężenia endogennej Put i Spd, podczas gdy zawartość Spm zwiększała się i osiągnęła maksymalną wartość tuż przed pojawieniem się pąków przybyszowych u *Cucumis sativus* [100]. Zaobserwowano, że poszczególne PA mogą mieć specyficzny udział w indukcji tworzenia pędów. Przykładowo, spośród trzech powszechnie występujących PA, Spd okazała się najskuteczniejsza w stymulacji tworzenia pędów *Torenia* [86], *Saccharum officinalis* [78] oraz *Momordica charantia* [88]. Natomiast w kulturach *Bixa orellana* najwięcej pędów uzyskano stosując egzogenną Put [70], podczas gdy Chi i wsp. [24] udowodnili kluczową rolę Spm w indukcji organogenezy *Brassica campestris*. Interesujące wyniki uzyskano w doświadczeniach nad wykorzystaniem PA w indukcji kaulogenezy u *Cucumis sativus* [94, 100]. Okazało się, że skuteczność poszczególnych PA stosowanych w indukcji jest zależna od źródła eksplantatów. Spm była niezbędna do uzyskania pędów przybyszowych z liścieni [100]. Natomiast, gdy kultury inicjowano z wierzchołków pędów, najwyższą skutecznością spośród PA charakteryzowała się Spd [94].

Egzogenne PA wpływają na proces tworzenia pędów przybyszowych nie tylko poprzez modyfikację wewnątrzkomórkowego stężenia PA. Przykładowo, egzogenna Put obniża zawartość IAA i podwyższa zawartość cytokinin, poprzez modyfikację aktywności enzymów oksydacyjnych biorących udział w ich katabolizmie [97]. Konsekwencją takiej zmiany stosunku ilościowego IAA/cytokiny na korzyść cytokinin jest stymulacja formowania pędów *Dendrobium officinale*.

Kultury *in vitro* prowadzone są w zamkniętych naczyniach hodowlanych, w warunkach ograniczonej, w mniejszym lub większym stopniu zależnie od szczelności zamknięcia, wymiany gazowej, która sprzyja akumulacji etylenu. Hormon ten uczestniczy w regulacji procesów morfogenetycznych *in vivo* i *in vitro* [49]. Szlak biosyntezy PA jest powiązany ze szlakiem biosyntezy etylenu i oba związki mogą rywalizować ze sobą o wspólnego prekursora, SAM [49]. Zależność odwrotnie proporcjonalną między zawartością PA a produkcją etylenu wykryto podczas formowania pędów przybyszowych *Nicotiana tabacum* [75]. Jednak współzawodnictwo między syntezą PA i etylenu nie zawsze jest regułą, na przykład u dwóch gatunków passiflory, organogenezie towarzyszy wysoka produkcja etylenu oraz PA [31]. Powiązanie szlaków biosyntezy PA i etylenu sprawia, że ingerencja w jeden z nich wywołuje skutek w drugim. Zaobserwowano, że egzogenne PA wpływają na produkcję etylenu w trakcie formowania pędów przybyszowych *in vitro* [24, 31, 51, 75, 100]. Egzogenna Put obniża produkcję etylenu u *Cichorium intybus*, co może być spowodowane niższą dostępnością SAM, który wykorzystywany jest do konwersji Put w Spd [11]. Jednak u *Cucumis sativus* L. [100] i *Brassica campestris* [24] stwierdzono wyższą produkcję etylenu pod wpływem egzogennej

Put. Aplikacja innych poliamin, Spd lub Spm, również stymuluje syntezę etylenu [31]. Podobną reakcję zaobserwowano po zastosowaniu inhibitora biosyntezy PA – MGBG [31, 75, 100]. Z kolei zastosowanie AVG, inhibitora syntazy ACC uczestniczącej w szlaku biosyntezy etylenu, powoduje nie tylko drastyczne obniżenie produkcji etylenu, ale również zwiększenie zawartości wolnych form PA podczas tworzenia pędów u *Brassica campestris* [24] i *Cucumis sativus* [100], natomiast w kulturach tytoniu – obniżenie zawartości form związanych [75].

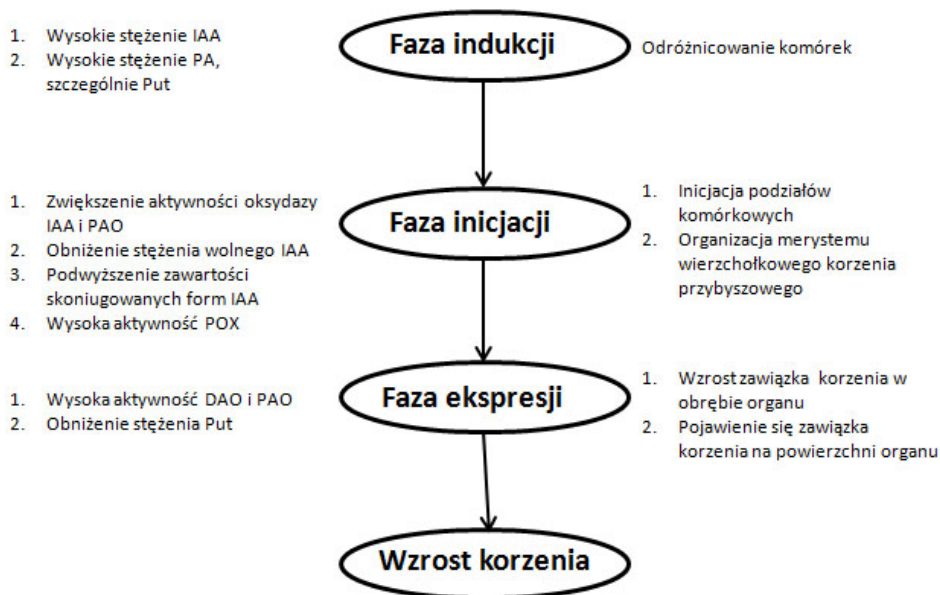
Ważnym czynnikiem wpływającym na tworzenie pędów jest światło, a jego działanie może być również powiązane z działaniem PA. Egzogenne PA stymulują indukcję pędów przybyszowych u *Capsicum frutescens* tylko wówczas, gdy kultury prowadzone są na świetle [51]. Natomiast Hunter i Burritt [44] zaobserwowali, że można wywołać zmiany w poziomie endogennych PA stosując fale świetlne o różnych długościach. Wykazano, że podczas formowania pędów przybyszowych u *Latuca sativa* L., światło czerwone i białe powodują wzrost zawartości endogennych PA (w szczególności Put) w eksplantatach liściennych, co wpływa stymulująco na formowanie pędów. Natomiast traktowanie światłem niebieskim powoduje obniżenie poziomu endogennych PA oraz zahamowanie powstawania pędów.

## RYZOGENEZA

Kluczową rolę w formowaniu korzeni przybyszowych w warunkach *in vitro* odgrywają auksyny [30, 72]. Przebieg poszczególnych faz ryzogenezy (indukcja, inicjacja, ekspresja) jest skorelowany z endogennym poziomem auksyn – wyższe stężenia konieczne są w fazie indukcji, a niższe w trakcie różnicowania [25, 30, 56, 67]. Wyniki wielu badań wyraźnie wskazują, że również PA uczestniczą w procesie ryzogenezy [2, 3, 14, 40, 41, 42]. Wykazano wzajemne powiązania pomiędzy auksynami i PA w procesie formowania korzeni (ryc. 2).

Wiadomo, że peroksydaza (POX) odpowiedzialna za katabolizm kwasu indoliloctowego (IAA) jest dobrym markerem biochemicznym poszczególnych etapów ryzogenezy [56]. Minimum aktywności POX obserwuje się w fazie indukcji, a maksimum podczas inicjacji i/lub różnicowania korzeni [22, 37, 62, 95]. W przeciwieństwie do aktywności POX, zmiany w zawartości PA są pozytywnie skorelowane ze zmianami stężenia endogennego IAA [37]. Już w 1983 roku, Kyriakidis [54] udowodnił, że auksyny stymulują biosyntezę PA. Również Hausman i wsp. [40, 41] oraz Tonon i wsp. [91] wykazali zależność pomiędzy metabolizmem Put oraz IAA, a aktywnością POX podczas procesu ryzogenezy. Stąd sugestia, że PA podobnie jak POX można wykorzystać jako wskaźniki biochemiczne przebiegu ryzogenezy.





RYCINA 2. Interakcje PA z IAA w procesie formowania korzeni przybyszowych. Na podstawie [67]  
 FIGURE 2. Interrelationships of PAs and IAA associated with adventitious root formation at different rooting stages. Based on [67]

Pozytywne korelacje pomiędzy zawartością PA a procesem tworzenia korzeni przybyszowych w kulturach *in vitro* stwierdzono u wielu gatunków, m. in. *Nicotiana tabacum* [90], *Glycine max* [55], *Vitis vinifera* × *Vitis berlandieri* [59] oraz *Solanum melongena* [79]. Podwyższenie zawartości endogennych PA obserwowano także w początkowym stadium formowania korzeni u roślin drzewiastych, na przykład u *Prunus avium* [18], *Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* L. [40, 41], *Pyrus communis* [14], *Juglans regia* [42] oraz *Nothofagus nervosa* [61]. Zawartość endogennej Put ulega podwyższeniu w strefie wzrostu podczas wydłużania, natomiast zawartość Spd i Spm zwiększa się głównie w wierzchołkach wzrostu korzeni [25].

U większości roślin zawartość Put jest wyższa niż pozostałych PA, stąd też przypisuje się jej główną rolę w procesie ryzogenezy. Jednak u *Nothofagus nervosa* Spd dominowała nad pozostałymi PA [61]. Wysoką zawartość Put i Spd w inicjalnej fazie ryzogenezy, przed wyłonieniem korzenia zarodkowego, można wytłumaczyć aktywnym uczestnictwem PA we wzroście i podziałach komórek oraz ich różnicowaniu, a więc w procesach, których konsekwencją jest wydłużanie i rozwój korzeni [9, 25, 73]. Znaczna akumulacja Put podczas formowania korzeni przybyszowych jest ściśle związana z aktywnością ADC i ODC. Stwierdzono, że

we wczesnym etapie formowania merystemów korzeniowych oraz ich różnicowania uczestniczy głównie ODC zlokalizowana w strefie wierzchołkowej korzenia u *Helianthus tuberosus* [6] i *Zea mays* [76]. Natomiast w późniejszy etap tworzenia korzeni zaangażowana jest ADC, której wysoką aktywność wykryto w komórkach wydłużających się [6]. Zarówno aktywność ADC, jak też ODC zwiększają się podczas formowania korzeni bocznych [46].

Istotną rolę PA w procesie ryzogenezy potwierdzają doświadczenia z wykorzystaniem inhibitorów ich biosyntezy. Zahamowanie aktywności ADC przez DFMA i/lub ODC przez DFMO powoduje ograniczenie procesu formowania korzeni przybyszowych u *Nicotiana tabacum* [1, 20], *Populus tremula* × *P. tremuloides* [39], *Vitis vinifera* × *Vitis berlandieri* [59], *Cichorium intybus* [12] oraz *Euphorbia esula* [28], u której inhibicję ryzogenezy wywołano także aplikacją kanawaniny oraz kanaliny [26]. Podobnie, zastosowanie inhibitorów biosyntezy PA – hamujących bezpośrednio syntezę Spd i/lub Spm (MGBG, CHA, DCHA) – może w większym lub mniejszym stopniu wpłynąć na proces ryzogenezy. Na przykład, MGBG hamuje całkowicie, a CHA częściowo tworzenie merystemoidów korzeniowych u *Nicotiana tabacum* [1, 93]. Zastosowanie jednocześnie dwóch inhibitorów uniemożliwiających biosyntezę Spd, a mianowicie DCHA i MGBG, spowodowało drastyczny spadek liczby formowanych korzeni u *Prunus avium* [18]. Odnotowano również hamujący wpływ wymienionych inhibitorów na proces ryzogenezy u *Berberis buxifolia* [2]. Trudno jednak ocenić, która z PA ma decydujące znaczenie w ryzogenezie. Zahamowanie biosyntezy określonej PA może wpływać na produkcję pozostałych. Inhibitory ADC i ODC hamując początkowe reakcje szlaku biosyntezy PA, prowadzące do wytworzenia Put, wpływają na ogólną pulę endogennych PA, a pośrednio również na zawartość Spd i Spm. Z kolei, zahamowanie aktywności SPDS i tym samym biosyntezy Spd, promuje akumulację Put [1, 40, 41, 45].

Egzogenne PA często powodują zwiększenie liczby nowo powstałych korzeni, ale wpływ ten jest ściśle zależny od ich typu, stężenia oraz etapu, w którym zostają zaaplikowane. Stymulację ryzogenezy poprzez zastosowanie egzogennych PA, głównie Put, uzyskano w kulturach *Momordica charantia* [88], *Withania somnifera* [82], *Citrus sinensis* [64], *Cucumis sativus* [94], *Phaseolus aureus* [45]. Zwykle zastosowanie PA wspomaga indukujący wpływ auksyn na ryzogenezę. Jednak Hausman i wsp. [39] zaobserwowali stymulację formowania korzeni pod wpływem egzogennych PA u *Populus tremula* × *P. tremuloides* nawet bez egzogennych auksyn. Z kolei De Klerk i wsp. [29] wykazali, że niektóre cytokiny zastosowane w niskich stężeniach mogą, podobnie jak auksyny, pozytywnie wpływać na tworzenie korzeni przybyszowych, poprzez indukowanie aktywności podziałowej w komórkach eksplantatów. Vasudevan i wsp. [94] uzyskali stymulację ryzogenezy poprzez zastosowanie egzogennej Put w kombinacji z benzyloadeniną (BA).

Egzogenne PA stymulują aktywność DAO i PAO, enzymów biorących udział w ich katabolizmie, podczas ryzogenezy u *Pinus virginiana* [85]. Aktywność DAO zwiększa się tylko wówczas, gdy rośliny są hodowane na pożywkach z Put. Natomiast Spd i Spm w większym stopniu podwyższają aktywność PAO.

W ostatnich latach podjęto również próbę wyjaśnienia udziału PA w procesie formowania korzeni u roślin pod wpływem bakterii glebowych *Agrobacterium rhizogenes*, co znajduje zastosowanie w transformacji roślin i uzyskiwaniu kultur korzeni włośnikowatych. Transformacja za pośrednictwem *A. rhizogenes* wykorzystuje naturalną zdolność tych bakterii do przekazywania części swojego materiału genetycznego komórkom roślinnym, zaś tworzenie się korzeni włośnikowatych jest objawem wbudowania do genomu rośliny-żywiciela odcinka bakteryjnego DNA, zwanego transferowym DNA (T-DNA), pochodzącego z plazmidu Ri [43]. Wprowadzony T-DNA zawiera onkogeny odpowiedzialne m.in. za syntezę IAA i/lub zwiększenie wrażliwości komórek na auksyny [38, 63], a to w konsekwencji wywołuje stymulację tworzenia merystemów korzeniowych. W wielu przypadkach indukcja korzeni spowodowana integracją fragmentu plazmidu Ri, może wynikać ze zmian w metabolizmie PA, np. u *Nicotiana tabacum* [65], *Cichorium intybus* [10, 12], *Beta vulgaris* i *Tagetes patula* [8]. PA wpływają nie tylko na wzrost kultur transformowanych korzeni, ale również stymulują w nich produkcję metabolitów wtórnych [7, 10, 11, 12]. Natomiast zastosowanie inhibitorów biosyntezy PA – DFMO i DFMA powoduje obniżenie poziomu endogennych PA, a w konsekwencji zahamowanie wzrostu korzeni włośnikowatych [12].

## PODSUMOWANIE

Wyniki trwających od lat badań dotyczących procesów formowania *de novo* pędów i korzeni w warunkach *in vitro* mają istotne znaczenie praktyczne w klonalnym rozmnażaniu roślin. Poznanie czynników determinujących uzyskanie kompetencji morfogenetycznej i dalszej realizacji określonego programu rozwojowego stanowi podstawę do opracowania skutecznych i wydajnych procedur regeneracji. Kluczową funkcję regulacyjną przypisuje się hormonom roślinnym, ale ze względu na złożoność samego procesu organogenezy, jak i mechanizmów kontrolujących jego przebieg, ważne staje się zidentyfikowanie i szczegółowe scharakteryzowanie również pozostałych czynników.

Analiza zawartości endogennych PA, aktywności enzymów uczestniczących w ich metabolizmie oraz ekspresji kodujących je genów, a także wyniki badań z wykorzystaniem egzogennych PA i inhibitorów ich biosyntezy, świadczą o zaangażowaniu poliamin w indukcję tworzenia organów przybyszowych i ich dalsze różnicowanie. Poliaminy są niewątpliwie konieczne do prawidłowego

przebiegu kaulogenezy i ryzogenezy, chociaż wyjaśnienia wymaga jeszcze mechanizm ich działania. Egzogenne PA, zastosowane w odpowiednich stężeniach, stymulują proces organogenezy w kulturach *in vitro*, jednak ich działanie polega raczej na wspomaganiu wpływu auksyn i/lub cytokinin, a nie ich zastępowaniu. Nadal niewyjaśniona pozostaje kwestia udziału poszczególnych PA oraz biologicznej aktywności PA skoniugowanych w indukcji i formowaniu organów *in vitro*.

Endogenne PA, ich zawartość i wzajemny stosunek ilościowy, mogą służyć jako markery zdolności regeneracyjnych tkanek, a równocześnie dostarczać wskazówek do optymalizacji warunków kultury *in vitro* w celu uzyskania maksymalnej odpowiedzi morfogenetycznej. Osiągnięcie odpowiednich zmian w stężeniu poszczególnych PA, ich form wolnych i związanych, w tkankach roślinnych możliwe jest nie tylko bezpośrednio przez zastosowanie egzogennych PA lub inhibitorów ich biosyntezy, ale też pośrednio, poprzez manipulację warunkami hodowli, w tym stężeniem fitohormonów lub światłem. Osiągnięcia biologii molekularnej otwierają nowe perspektywy kontrolowania metabolizmu PA na drodze regulacji ekspresji genów kodujących enzymy ich syntezy i degradacji.

Badania z wykorzystaniem roślin transgenicznych lub mutantów umożliwią ostateczne wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania PA w poszczególnych etapach organogenezy. Z kolei coraz bardziej rozwijające się analizy omiczne (genomika, transkryptomika, proteomika, metabolomika) niewątpliwie pozwolą na ustalenie sieci powiązań w szlakach sygnałnych fitohormonów i PA. W konsekwencji, możliwe będzie precyzyjne kierowanie procesami regeneracji roślin w warunkach *in vitro*, co zwiększy wydajność i opłacalność stosowanych procedur.

## LITERATURA

- [1] ALTAMURA MM, TORRIGIANI P, CAPITANI F, SCARAMAGLI S, BAGNI N. *De novo* root formation in tobacco thin layers is affected by inhibition of polyamine biosynthesis. *J Exp Bot* 1991; **42**: 1575-1582.
- [2] ARENA ME, PASTUR GM, BENAVIDES MP, CURVETTO N. Polyamines and inhibitors used in successive culture media for *in vitro* rooting in *Berberis buxifolia*. *N Z J Bot* 2005; **43**: 373-380.
- [3] ARENA ME, PASTUR MG, BENAVIDES MP, ZAPPACOSTA D, ELIASCO E, CURVETTO N. Peroxidase and polyamine activity variation during the *in vitro* rooting of *Berberis buxifolia*. *N Z J Bot* 2003; **41**: 475-485.
- [4] ARIBAUD M, CARRÉ M, MARTIN-TANGUY J. Polyamine metabolism and *in vitro* cell multiplication and differentiation in leaf explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Plant Growth Regul* 1994; **15**: 143-155.
- [5] ARIBAUD M, KEVERS C, MARTIN-TANGUY J, GASPAR T. Polyamine metabolism and *in vitro* cell multiplication and differentiation in leaf explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1999; **55**: 85-94.
- [6] BAGNI N, TORRIGIANI P, BARBIERI P. *In vitro* and *in vivo* effect of ornithine and arginine decarboxylase inhibitors in plant tissue culture. [w] Bachrach U, Kaye AM, Chayen R [red.] *Advances in polyamine research*. Vol. 4. New York, Raven Press 1983; 409-417.

- [7] BAI HP, GEORGE J, RAVISHANKAR GA. Influence of polyamines on growth of hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local) and formation of coumarins. *J Plant Growth Regul* 1999; **18**: 33-37.
- [8] BAI HP, MADHUSUDHAN R, BHAGYALAKSHMI N, RAJASEKARAN T, RAMESH BS, RAVISHANKER GA. Influence of polyamines on growth and formation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula*. *Acta Physiol Plant* 2000; **22**: 151-158.
- [9] BAI HP, RAVISHANKAR GA. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2002; **69**: 1-34.
- [10] BAI HP, RAVISHANKAR GA. Synergistic effect of auxins and polyamines in hairy root *Cichorium intybus* L. during growth, coumarin production and morphogenesis. *Acta Physiol Plant* 2003; **25**: 193-208.
- [11] BAI HP, SUDHA GS, RAVISHANKAR GA. Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local. *J Plant Growth Regul* 2000; **19**: 238-248.
- [12] BAI HP, SUDHA G, RAVISHANKAR GA. Putrescine influences growth and production of coumarins in transformed and untransformed root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local). *Acta Physiol Plant* 2001; **23**: 319-327.
- [13] BAJAJ S, RAJAM MV. Efficient plant regeneration from long term cultures of rice by spermidine. *Plant Cell Rep* 1995; **14**: 717-720.
- [14] BARALDI R, BERTAZZA G, BREGOLI A, FASOLO F, ROTONDI A, PREDIERI S, SERAFINI-FRACASSINI D, SLOVIN J, COHEN J. Auxines and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on microcuttings of two pear cultivars. *J Plant Growth Regul* 1995; **14**: 49-59.
- [15] BARON K, STASOLLA C. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2008; **44**: 384-395.
- [16] BASSIE L, ZHU C, ROMAGOSA I, CHRISTOU P, CAPELL T. Transgenic wheat plants expressing an oat arginine decarboxylase cDNA exhibit increases in polyamine content in vegetative tissue and seeds. *Mol Breeding* 2008; **22**: 39-50.
- [17] BEZOLD TN, LOY JB, MINOCHA SC. Changes in the cellular content of polyamines in different tissues of seed and fruit of normal and a hull-less seed variety of pumpkin during development. *Plant Sci* 2003; **164**: 743-752.
- [18] BIONDI S, DIAZ T, IGLESIAS I, GAMBERINI G, BAGNI N. Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol Plant* 1990; **78**: 474-483.
- [19] BIONDI S, SCARAMAGLI S, CAPITANI F, ALTAMURA MM, TORRIGIANI P. Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers. *J Exp Bot* 2001; **52**: 231-242.
- [20] BURTIN D, MARTIN-TANGUY J, PAYNOT M, CARRÉ M, ROSSIN N. Polyamines, hydroxycinnamoylputrescines, and root formation in leaf explants of tobacco cultivated *in vitro*. Effects of the suicide inhibitors of putrescine synthesis. *Plant Physiol* 1990; **93**: 1398-1404.
- [21] BURTIN D, MARTIN-TANGUY J, PAYNOT M, ROSSIN N. Effects of the suicide inhibitors of arginine and ornithine decarboxylase activities on organogenesis, growth, free polyamine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explants of *Nicotiana Xanthi* n.c. cultivated *in vitro* in a medium producing callus formation. *Plant Physiol* 1989; **89**: 104-100.
- [22] CALDERON-BALTIERA X, MARTINEZ PASTUR G, JOFRE MP, ARENA ME. Activity variation of peroxidase during *in vitro* rooting of *Nothofagus nervosa* and *Nothofagus antarctica*. *Phyton* 1998; **62**: 137-144.
- [23] CHERUVATHUR MK, ABRAHAM J, MANI B, THOMAS TD. Adventitious shoot induction from cultured internodal explants of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010; **101**:163-170.
- [24] CHI GL, LIN WS, JUSTIN EE. Role of polyamine on *de novo* shoot morphogenesis from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. *Plant Cell Rep* 1994; **13**: 323-329.



- [25] COUÉE I, HUMMEL I, SULMON C, GOUESBET G, EL AMRANI A. Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2004; **76**: 1-10.
- [26] DAVIS DG. Polyamines, auxins and organogenesis in leaf spurge (*Euphorbia esula* L.). *J Plant Physiol* 1997; **151**: 603-609.
- [27] DAVIS DG. 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid and indoleacetic acid partially counteract inhibition of organogenesis by difluoromethylornithine. *Physiol Plant* 1997; **101**: 425-433.
- [28] DAVIS DG, OLSON PA. Effect of putrescine and inhibitors of putrescine biosynthesis on organogenesis in *Euphorbia esula* L. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 1994; **30**: 124-130.
- [29] DE KLERK GJ, HANECAKOVA J, JASIK J. The role of cytokinins in rooting of stem slices cut from apple microcuttings. *Plant Biosys* 2001; **135**: 79-84.
- [30] DE KLERK GJ, VAN DER KRIEKEN W, DE JONG JC. Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 1999; **35**: 189-199.
- [31] DIAS LLC, SANTA-CATARINA C, RIBEIRO DM, BARROS RS, FLOH EIS, OTONI WC. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2009; **99**: 199-208.
- [32] DUCLERCQ J, SANGWAN-NORREEL B, CATTEROU M, SANGWAN RS. *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends Plant Sci* 2011; **16**: 597-606.
- [33] ELLER MH, WARNER AL, KNAP HT. Genomic organization and expression analyses of putrescine pathway genes in soybean. *Plant Physiol Biochem* 2006; **44**: 49-57.
- [34] EVANS PT, MALMBERG RL. Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1989; **40**: 235-269.
- [35] FIALA V, QUEROU Y, GEORGES D, DORE C. Polyamine changes during *in vitro* morphogenesis of *Asparagus* cloning. *J Plant Physiol* 1991; **138**: 172-175.
- [36] GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY R. Polyamines as endogenous growth regulators. W: Davies PJ [red.] *Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1995; 158-178.
- [37] GASPAR T, KEVERS C, HAUSMAN JF, BERTHON J, RIPETTI V. Partial uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie* 1992; **12**: 757-765.
- [38] HATTA M, BEYL CA, GARTON S, DINER AM. Induction of roots on jujube softwood cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *J Horticult Sci* 1996; **71**: 881-886.
- [39] HAUSMAN JF, KEVERS C, GASPAR T. Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised *in vitro*. *Physiol Plant* 1994; **92**: 201-206.
- [40] HAUSMAN JF, KEVERS C, GASPAR T. Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots *in vitro*. *Plant Sci* 1995; **110**: 63-71.
- [41] HAUSMAN JF, KEVERS C, GASPAR T. Putrescine control of peroxidase activity in the inductive phase of rooting in poplar shoots *in vitro*, and the adversary effect of spermidine. *J Plant Physiol* 1995; **146**: 681-685.
- [42] HELOIR MC, KEVERS C, HAUSMAN JF, GASPAR T. Changes in the concentration of auxins and polyamines during rooting of *in vitro* propagated walnut shoots. *Tree Physiol* 1996; **16**: 515-519.
- [43] HNATUSZKO-KONKA K, ŁUCHNIAK P, WIKTOREK-SMAGUR A, GERSZBERG A, KOWALCZYK T, KONONOWICZ AK. Transformacja roślin za pośrednictwem *Agrobacterium rhizogenes*. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 189-200.
- [44] HUNTER DC, BURRITT DJ. Light quality influences the polyamine content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledon explants during shoot production *in vitro*. *Plant Growth Regul* 2005; **45**: 53-61.
- [45] JARVIS BC, SHANNON PRM, YASMIN S. Involvement of polyamines with adventitious root development in stem cuttings of mung bean. *Plant Cell Physiol* 1983; **24**: 677-683.
- [46] KAKKAR RK, NAGAR PK, AHUJA PS, RAI VK. Polyamines and plant morphogenesis. *Biol Plant* 2000; **43**: 1-11.
- [47] KAKKAR R K, SAWHNEY VP. Polyamine research in plants – a changing perspective. *Physiol Plant* 2002; **116**: 281-292.



- [48] KAUR SAWHNEY R, SHEKHAWAT NS, GALSTON AW. Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna aconitifolia* and *Avena sativa*. *Plant Growth Regul* 1985; **3**: 329-337.
- [49] KĘPCZYŃSKI J, KĘPCZYŃSKA E. Manipulation of ethylene biosynthesis. *Acta Physiol Plant* 2005; **27**: 213-220.
- [50] KOLOTILIN I, KOLTAI H, BAR-OR C, CHEN L, NAHON S, SHLOMO H, LEVIN I, REUVENI M. Expressing yeast *SAMdc* gene confers broad changes in gene expression and alters fatty acid composition in tomato fruit. *Physiol Plant* 2011; **142**: 211-223.
- [51] KUMAR V, SHARMA A, PRASAD BCN, GURURAJ HB, GIRIDHAR P, RAVISHANKAR GA. Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. *Acta Physiol Plant* 2007; **29**: 11-18.
- [52] KUSANO T, BERBERICH T, TATEDA C, TAKAHASHI Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 2008; **228**: 367-381.
- [53] KWAK S-H, LEE SH. The Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by sucrose and small upstream open reading frame in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 314-323.
- [54] KYRIAKIDIS DA. Effect of plant growth hormones and polyamines on ornithine decarboxylase activity during the germination of barley seeds. *Physiol Plant* 1983; **57**: 499-504.
- [55] LEE DW, HA KS, LEE SH, HAN TJ. Effects of methylglyoxal bis(guanylhydrazone) and polyamines on carbohydrate metabolism during adventitious root formation in soybean cotyledons. *J Plant Biol* 1994; **37**: 195-201.
- [56] LI SW, XUE L, XU S, FENG H, AN L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Bot Rev* 2009; **75**: 230-247.
- [57] LIU JH, HONDA C, MORIGUCHI T. Involvement of polyamine in floral and fruit development. *JARQ* 2006; **40**: 51-58.
- [58] MALÁ J, GAUDINOVÁ A, DOBREV P, EDER J, CVIKROVÁ M. Role of phytohormones in organogenic ability of elm multiplied shoots. *Biol Plant* 2005; **50**: 8-14.
- [59] MARTIN-TANGUY J, CARRÉ M. Polyamines in grapevine microcuttings cultivated *in vitro*. Effects of amines and inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. *Plant Growth Regul* 1993; **13**: 269-280.
- [60] MARTIN-TANGUY J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul* 2001; **34**: 135-148.
- [61] MARTINEZ PASTUR G, ARENA ME, BENAVIDES MP, ELIASCO E, CURVETTO N. Role of polyamines during *in vitro* rhizogenesis of *Nothofagus nervosa* using successive culture media. *New Forests* 2007; **34**: 89-93.
- [62] MARTINEZ PASTUR G, ARENA M, HERNANDEZ L, CURVETTO N, ELIASCO E. Histological events during *in vitro* rooting of *Nothofagus nervosa* (Fabaceae). *N Z J Bot* 2005; **43**: 61-70.
- [63] MCAFEE B, WHITE E, PELCHER L, LAPP M. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) ssp. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1993; **34**: 53-62.
- [64] MENDES AFS, CIDADE LC, OTONI WC, SOARES-FILHO WS, COSTA MGC. Role of auxins, polyamines and ethylene in root formation and growth in sweet orange. *Biol Plant* 2011; **55**: 375-378.
- [65] MENGOLI M, CHRIQUI D, BAGNI N. Putrescine biosynthesis and oxidation in normal and hairy root tobacco plants. *J Plant Physiol* 1992; **140**: 153-155.
- [66] MOHAPATRA S, MINOCHA R, LONG S, MINOCHA SC. Putrescine overproduction negatively impacts the oxidative state of poplar cells in culture. *Plant Physiol Biochem* 2009; **47**: 262-271.
- [67] NAG S, SAHA K, CHOUDHURI MA. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *J Plant Growth Regul* 2001; **20**: 182-194.
- [68] NAMBEESAN S, DATSENKA T, FERRUZZI MG, MALLADI A, MATTOO AK, HANDA AK. Overexpression of yeast spermidine synthase impacts ripening, senescence and decay symptoms in tomato. *Plant J* 2010; **63**: 836-847.

- [69] NEILY MH, MATSUKURA C, MAUCOURT M, BERNILLON S, DEBORDE C, MOING A, YIN Y-G, SAITO T, MORI K, ASAMIZU E, ROLIN D, MORIGUCHI T, EZURA H. Enhanced polyamine accumulation alters carotenoid metabolism at the transcriptional level in tomato fruit over-expressing spermidine synthase. *J Plant Physiol* 2011; **168**: 242-252.
- [70] PARIMALAN R, GIRIDHAR P, RAVISHANKAR GA. Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2011; **105**: 285-290.
- [71] PASCHALIDIS KA, ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA. Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiol* 2005; **138**: 142-152.
- [72] POP TI, PAMFIL D, BELLINI C. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 2011; **39**: 307-316.
- [73] RAGONEZI C, KLIMASZEWSKA K, CASTRO MR, LIMA M, DE OLIVEIRA P, ZAVATTIERI MA. Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. *Trees* 2010; **24**: 975-992.
- [74] REY M, DIZA-SALA C, RODRIGUEZ R. Comparison of endogenous polyamine content in hazel leaves and buds between the dormancy and flowering annual phases of growth. *Physiol Plant* 1994; **91**: 45-50.
- [75] SCARAMAGLI S, BIONDI S, CAPITANI F, GEROLA P, ALTAMURA MM, TORRIGIANI PT. Polyamine conjugate level and ethylene biosynthesis: inverse relationship with vegetative bud formation in tobacco thin layers. *Physiol Plant* 1999; **105**: 367-376.
- [76] SCHWARTZ M, ALTMAN A, COHEN Y, ARZEE T. Localization of ornithine decarboxylase and changes in polyamine content in root meristems of *Zea mays*. *Physiol Plant* 1986; **67**: 485-492.
- [77] SCOCCIANI V, SGARBI E, FRATERNALE D, BIONDI S. Organogenesis from *Solanum melongena* L. (egg-plant) cotyledon explants is associated with hormone-modulated enhancement of polyamine biosynthesis and conjugation. *Protoplasma* 2000; **211**: 51-63.
- [78] SHANKAR UC, GANAPATHY A, MANICKAVASAGAM M. Influence of polyamines on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinalis* L.). *Egypt J Biol* 2011; **13**: 44-50.
- [79] SHARMA P, YADAV JS, RAJAM MV. Induction of laterals in root cultures of eggplant (*Solanum melongena* L.) in hormone-free liquid medium. A novel system to study the role of polyamines. *Plant Sci* 1997; **125**: 103-111.
- [80] SHOEB F, YADAV JS, BAJAJ S, RAJAM MV. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Sci* 2001; **160**: 1229-1235.
- [81] SINGH A, NIRALA NK, DAS S, NARULA A, RAJAM MV, SRIVASTAVA PS. Overexpression of *odc* (ornithine decarboxylase) in *Datura innoxia* enhances the yield of scopolamine. *Acta Physiol Plant* 2011; **33**: 2453-2459.
- [82] SIVANANDHAN G, MARIASHIBU TS, ARUN M, RAJESH M, KASTHURIRENGAN S, SELVARAJ N, GANAPATHY A. The effect of polyamines on the efficiency of multiplication and rooting of *Withania somnifera* (L.) Dunal and content of some withanolides in obtained plants. *Acta Physiol Plant* 2011; **33**: 2279-2288.
- [83] SOBIESZCZUK-NOWICKA E, LEGOCKA J. Nowe podejście w badaniach nad rolą poliamin w komórce roślinnej. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 527-540.
- [84] SUGIYAMA M. Organogenesis *in vitro*. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 61-64.
- [85] TANG W, NEWTON RJ. Polyamines promote root elongation and growth by increasing root cell division in regenerated Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) plantlets. *Plant Cell Rep* 2005; **24**: 581-589.
- [86] TANIMOTO S, MATSUBARA Y, ISHIOKA N. Significance of spermidine in the initiation of adventitious buds in stem segments of *Torenia*. *Plant Cell Physiol* 1994; **35**: 1071-1077.
- [87] TAVLADORAKI P, ROSSI MN, SACCIUTI G, PEREZ-AMADOR MA, POLTICELLI F, ANGELINI R, FEDERICO R. Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol* 2006; **141**: 1519-1532.
- [88] THIRUVENGADAM M, CHUNG IM, CHUN SC. Influence of polyamines on *in vitro* organogenesis in bitter melon (*Momordica charantia* L.). *J Med Plants Res* 2012; **6**: 3579-3585.

- [89] THU-HANG P, BASSIE L, SAFWAT G, TRUNG-NGHIA P, CHRISTOU P, CAPELL T. Expression of a heterologous S-adenosylmethionine decarboxylase cDNA in plants demonstrates that changes in S-adenosyl-L-methionine decarboxylase activity determine levels of the higher polyamines spermidine and spermine. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1744-1754.
- [90] TIBURCIO AF, KAUR-SAWHNEY R, GALSTON AW. Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures. *Plant Cell Physiol* 1988; **29**: 1241-1249.
- [91] TONON G, KEVERS C, GASPARD T. Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during *in vitro* rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: an auxin-independent rooting model. *Tree Physiol* 2001; **21**: 655-663.
- [92] TORRIGIANI P, ALTAMURA MM, PASQUA G, MONACELLI B, SERAFINI-FRACASSINI D, BAGNI N. Free and conjugated polyamines during *de novo* floral and vegetative bud formation in thin cell-layers of tobacco. *Physiol Plant* 1987; **70**: 453-460.
- [93] TORRIGIANI P, ALTAMURA MM, SCARAMAGLI S, CAPITANI F, FALASCA G, BAGNI N. Regulation of rhizogenesis by polyamines in tobacco thin layers. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 81-87.
- [94] VASUDEVAN A, SELVARAJ N, GANAPATHI A, KASTHURIRENGAN S, RAMESH ANBAZHAGAN V, MANICKAVASAGAM M, CHOI CW. Leucine and spermidine enhance shoot differentiation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2008; **44**: 300-306.
- [95] VIU AFM, VIU MA, TAVARES AR, VIANELLO F, LIMA GPP. Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L. *Sci Horticul* 2009; **121**: 501-504.
- [96] WANG J, SUN P-P, CHEN C-L, WANG Y, FU X-Z, LIU J-H. An arginine decarboxylase gene PtADC from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2011; **62**: 2899-2914.
- [97] WEI M, WEI SH, YANG CY. Effect of putrescine on the conversion of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* to shoots. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010; **102**: 145-151.
- [98] WI SJ, KIM WT, PARK KY. Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep* 2006; **25**: 1111-1121.
- [99] WIMALASEKERA R, TEBARTZ F, SCHERER GFE. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci* 2011; **181**: 593-603.
- [100] ZHU C, CHEN Z. Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2005; **81**: 45-53.

*Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski*

*Otrzymano: 17.12.2012*

*Przyjęto: 29.03.2013*

*Jan Kępczyński*

*Katedra Fizjologii i Inżynierii Genetycznej Roślin*

*Uniwersytet Szczeciński*

*ul. Wąska 13, 71- 415 Szczecin*

*e-mail: jankepcz@wp.pl*

