

WYKORZYSTANIE KULTUR *IN VITRO* DO BADANIA MECHANIZMÓW ODPORNOŚCI I OTRZYMYWANIA ROŚLIN ODPORNYCH NA CHOROBY GRZYBOWE

The use of *in vitro* cultures to study mechanisms of resistance and to obtain plants resistant to fungal diseases

Urszula MAŁOLEPSZA, Elżbieta KUŹNIAK–GĘBAROWSKA.

Summary: An outline is given to present the prospects and limitations of *in vitro* culture methods in studying mechanisms of resistance and in obtaining plants resistant to diseases. Various factors affecting the plant resistance including: phytoalexin production, changes in plant cell structure and others are discussed. A few case studies have been chosen to illustrate the possible experimental schemes to be used for the production and selection of new genotypes resistant to diseases.

Key words: *in vitro* culture, plant resistance mechanisms, elicitor

Dr Urszula Małolepsza, mgr Elżbieta Kuźniak–Gębarowska, Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90–237 Łódź

Każdego roku ludzkość traci około 30% produkcji roślinnej; jedna trzecia tych strat powodowana jest chorobami roślin. Główni sprawcy chorób roślin to wirusy, bakterie i grzyby. Od wielu lat na całym świecie prowadzone są badania z zakresu fitopatologii związane z odpornością i wrażliwością roślin na choroby. Rośliny, podobnie jak zwierzęta, wykazują zdolność do postinfekcyjnych reakcji mających na celu ograniczenie, zahamowanie i w końcu odwrócenie rozwoju choroby. Ukazało się wiele prac przemawiających za znaczeniem w odporności roślin niektórych syntetyzowanych przez nie związków utrudniających rozwój choroby, jak też procesów metabolicznych znoszących szkodliwe działanie patogenów. Zmiany jakie fitopatogeniczny organizm indukuje w atakowanej roślinie to między innymi: ograniczenie syntezy białek całkowitych [100], uwalnianie etyle-

nu [32, 100], wytwarzanie enzymów związanych z patogenezą i glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę [49, 77, 88, 100], zmiany ściany komórkowej [11] np. wzmocnienie przez odkładanie lignin, kalozy [119] czy tworzenie papili [1, 11, 73], gromadzenie niskocząsteczkowych związków – fitoaleksyn [5].

Ostatnio wykazano, że zwiększony poziom odporności na choroby można uzyskać traktując roślinę związkami określanymi mianem elicytorów. Właściwości elicytujące posiadają składniki ścian komórkowych mikroorganizmów patogennych [94], płyny pohodowlane z kultur patogenów i uwolnione z nich produkty [7, 33]. Reakcje obronne mogą wywoływać np. glikoproteiny, węglowodany [18, 23, 24, 30, 51, 110, 111] jak również kwasy tłuszczowe [12] czy enzymy hydrolityczne [26, 67]. Są to elicytory biotyczne. Dla wielu roślin np. soi (*Glycine max*

(L.) Merr.) i pietruszki (*Petroselinum hortense* Hoffm.) opisano działanie tzw. elicytorów endogennych, tj. uwalnianych ze ścian komórkowych roślin w wyniku działania enzymów patogena [18, 19, 30, 50, 121]. Elicytory abiotyczne to jony metali ciężkich, aminy, fungicydy, barwniki, inhibitory oddychania, polikationy, promieniowanie UV, stresy temperaturowe itp. [33, 52, 62, 67]. Zagadnienie odporności biochemicznej roślin jest bardzo złożone. Do badania licznych aspektów interakcji roślina – patogen już od około dwudziestu lat wykorzystuje się system kultur tkankowych obejmujący tkanki kalusowe, zawiesiny komórkowe, izolowane komórki i protoplasty. System kultur tkankowych jest metodą stosowaną w fitopatologii do otrzymywania roślin wolnych od patogenów, jak też do otrzymywania i selekcji nowych genotypów odpornych na choroby [108]. Podstawowe zalety systemu kultur *in vitro* decydujące o jego wykorzystaniu w badaniach interakcji roślina–patogen to:

1. oferuje on materiał roślinny hodowany w sterylnych warunkach; wyklucza się zanieczyszczenie niepożądanymi mikroorganizmami,
2. materiał roślinny hodowany jest w ściśle kontrolowanych, określonych warunkach (światło, temperatura, podłoże hodowlane),
3. istnieje możliwość wprowadzania materiału infekcyjnego do komórek gospodarza bez zranienia – wyklucza się reakcje stymulowane zranieniem,
4. możliwe jest dobranie i kontrola ilości materiału infekcyjnego i liczby komórek gospodarza,
5. materiał roślinny hodowany *in vitro* jest mało zróżnicowany fizjologicznie – występuje tu jeden, ewentualnie kilka typów komórek,
6. łatwość wprowadzania czy usuwania materiału, np. znakowanych prekursorów z hodowanych komórek.

Główną wadą systemu kultur tkankowych jest to, że komórki rosnące *in vitro* mogą się w pewnych przypadkach różnić genetycznie i fizjologicznie od komórek budujących cały orga-

nizm rośliny. Jednakże stosując kultury *in vitro* do badania mechanizmów interakcji roślina – patogen uzyskano wiele wartościowych informacji.

FITOALEKSYNY – INDUKCJA, BIOSYNTETA I ROLA W EKSPRESJI ODPORNOŚCI W KULTURACH *IN VITRO*

Fitoaleksyny to niskocząsteczkowe, antymikrobowe związki wytwarzane w roślinie w odpowiedzi na infekcję i działanie różnych toksycznych i nietoksycznych czynników [2, 4, 23]. Wytwarzane są przez wiele gatunków roślin. Szczególnie dobrze zostały scharakteryzowane u *Leguminosae* i *Solanaceae* [5]. Przypisuje się im istotną rolę w ekspresji odporności u roślin. Często badania różnych aspektów indukcji i biosyntezy fitoaleksyn prowadzi się na zawiesinach komórkowych. Komórki roślinne rosnące w płynnym podłożu zachowują zdolność wytwarzania fitoaleksyn w odpowiedzi na działanie biotycznych i abiotycznych elicytorów. W pewnych przypadkach fitoaleksyny są wytwarzane w zawieszynie bez dodania elicytorów, jednakże ich poziom i tempo wytwarzania są bardzo niewielkie [21] i obniżają się w kolejnych subkulturach [3, 21, 53]. Większość badań nad indukcją tych związków w kulturach komórkowych dotyczy produkcji izoflawonoidowych fitoaleksyn u *Leguminosae*. Zmiany w poziomie różnych enzymów metabolizmu fenylopropanoidów zachodzące w kulturach *in vitro* po działaniu zawiesziny zarodników i elicytorami badano u fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) [22, 24, 25, 28, 79, 83], soi [31, 74, 122] i kanawalii mieczokształtnej (*Conavalia ensiformis* (L.) DC.) [46]. Aktywność fenyloamoniakolizazy (PAL), enzymu katalizującego pierwszy etap biosyntezy fenylopropanoidowych fitoaleksyn z fenyloalaniny, wzrastała w traktowanych elicytorem kalusach i zawiesinach komórkowych, i wyprzedzała wzrost ilości fitoaleksyn. W zawieszynie komórkowej fasoli traktowanej elicytorem z *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Br. et Cav. zaobserwowano znaczny, choć przej-

ściowy wzrost aktywności PAL będący rezultatem syntezy *de novo* tego enzymu [28]. Bardzo silną, bo około dwudziestokrotną, indukcję PAL poprzedzającą gromadzenie glicecoliny obserwowano w zawiesinie komórkowej soi po działaniu elicytora z *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *glycinea* (Hildeb.) [31]. Około dziesięciokrotny wzrost aktywności tego enzymu, a potem gromadzenie kumarynowych fitoaleksyn miał miejsce w zawiesinie komórkowej pietruszki traktowanej elicytorem [19]. Jednakże jak dotąd nie jest do końca wyjaśnione, czy PAL odgrywa regulującą rolę w biosyntezie fitoaleksyn [98, 122]. Enzymy metabolizmu fenylopropanoidów, których wzrost aktywności notowano w traktowanych elicytorem kalusach i zawiesinach komórkowych to także: o-metylotransferaza, hydrolaza kwasu cynamonowego, syntaza flawanonu, izomeraza flawanowo-chalkonowa, dehydrogenaza alkoholu cynamonowego i inne [22, 43, 46, 74, 123].

Sugeruje się, że aktywacja genów odpowiedzialnych za syntezę mRNA warunkującego pojawianie się enzymów, które z kolei decydują o wytwarzaniu i gromadzeniu fitoaleksyn, jest najwcześniejszym symptomem reakcji obronnej rośliny. Wykazano, że indukowane elicytorem gromadzenie fitoaleksyn w zawiesinach komórkowych pietruszki, fasoli i soi jest poprzedzane gromadzeniem i translacją mRNA kodujących enzymy odpowiedzialne za biosyntezę fitoaleksyn [29, 75, 101]. Stwierdzono, że gromadzenie mRNA w zawiesinach komórkowych pietruszki i fasoli jest spowodowane przejściowym wzrostem tempa transkrypcji, co sugeruje że w syntezę fitoaleksyn włączona jest aktywacja specyficznych genów. Jednakże molekularne podstawy pierwotnego rozpoznania w układzie roślina patogen, odbierania przez roślinę sygnałów jak również kolejna seria wydarzeń prowadzących do transkrypcji tych specyficznych genów pozostają ciągle kwestią otwartą. Skoro w przypadku fasoli możliwe jest wytwarzanie fitoaleksyn w ciągu 2, 3 do 5 minut po potraktowaniu elicytorem, a protoplasty reagują już po 1 minucie, to wydaje się że droga przekazywania

sygnałów musi być krótka i prosta [57, 116]. Kurosaki i wsp. [78] wykazali, że istotną rolę w elicytacji komórek marchwi (*Daucus carota* Hoffm.) odgrywają cykliczny adenozynonofosforan i jony wapnia.

Ostatnio wielu zwolenników zyskuje teoria zakładająca udział receptorów błonowych komórek rośliny – gospodarza w procesach rozpoznania biochemicznych cech powierzchni patogena. Nie można jednak wykluczyć istnienia innego mechanizmu rozpoznania. Wydaje się, że użycie protoplastów do badań może przyczynić się do rozwiązania kwestii obecności i struktury receptorów błony komórkowej. Składnik ścian komórkowych *Phytophthora infestans* (Mont.) de By. powodował szybką aglutynację i śmierć protoplastów pochodzących z liści ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.), co wskazuje na obecność na ich powierzchni specyficznych miejsc wiążących ten składnik – receptorów [96]. O ich istnieniu świadczą też wyniki badań nad wiązaniem znakowanego radioaktywnie elicytora z *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *glycinea* (Hildeb.) (Pmg) wywołującego gromadzenie fitoaleksyn w zawiesinach komórkowych soi [104]. Aktywność elicytora z Pmg w zawiesinach soi była silnie hamowana w obecności L-metylo-mannozydu, co wskazywałoby na obecność na powierzchni komórek receptora mannozowego, niezbędnego do wywołania reakcji. Obecność receptorów mannozowych i galaktozowych stwierdzono w błonie protoplastów wielu gatunków roślin [40, 45, 80]. W protoplastach jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) i ziemniaka występują receptory fukozowe [64, 65]. Przypuszcza się też, że potencjalnym czynnikiem rozpoznania roślina – mikroorganizm mogą być lektyny [97, 99, 109]. Stwierdzono doświadczalnie udział specyficznych lektyn w procesie rozpoznania w układzie *Rhizobium* – rośliny motylkowe [20, 42]. Uważa się, że fitoaleksyny zgromadzone w roślinie w odpowiednim czasie, miejscu i stężeniu ograniczają wzrost patogena i są odpowiedzialne za występowanie odporności. Jednakże wyniki badań prowadzonych na poziomie tkanek kalusowych nie potwierdzają w pełni

tej koncepcji. Badając odporność tkanek kalusowych lucerny (*Medicago sativa* L.) na *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *medicaginis* (Pmm) stwierdzono, że po inokulacji Pmm opóźnienie tkanek odpornych było znacznie wolniejsze niż wrażliwych, ale poziom medykarpiny w pierwszym przypadku był niższy niż w drugim [90]. Co więcej, najwyższe stężenie medykarpiny osiągnięte przez tkanki odporne (około 20 µg/g świeżej masy kalusa) było znacznie mniejsze od wymaganego do zahamowania rozwoju grzybni określonego *in vitro* w teście biologicznym [90]. Dwie inne izoflawonoidowe fitoaleksyny satiwian i westitol gromadzą się w liściach lucerny po inokulacji grzybem *Helminthosporium carbonum* Ull. nie będącym patogenem lucerny [63, 68, 69]. Westitolu nie wykryto w tkankach kalusowych lucerny po potraktowaniu Pmm, Pmg i w kontroli. Niewielkie ilości satiwianu stwierdzono w kalusach potraktowanych Pmm i Pmg, jednak jego poziom był wyższy w tkankach wrażliwych. Podobne wyniki uzyskano dla układu tkanki kalusowe tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) – *Phytophthora parasitica* Dast. var. *nicotianae* (Breda de Haan) (Ppn) [13, 59, 90]. Jednak wyniki badań prowadzonych na układach tkanki kalusowe tytoniu – Ppn i tkanki kalusowe lucerny – Pmm nie powinny być interpretowane jako ostateczny dowód przeciw roli fitoaleksyn w ekspresji odporności u roślin. Równoległe prowadzone badania nad odpornością całych roślin i kultur tkankowych z nich wyprowadzonych są niezbędne do stwierdzenia czy w obu przypadkach funkcjonują takie same mechanizmy odpornościowe, czy też nie.

MODYFIKACJE ŚCIAN KOMÓRKOWYCH

Wczesną reakcją rośliny w odpowiedzi na infekcję są zmiany w ścianie komórkowej, mające na celu zahamowanie wzrostu mikroorganizmu patogenicznego. Zmiany te polegają na odkładaniu fenoli, kalozy, lignin czy białek bogatych w hydroksyprolinę. Uważa się, że opóźniając rozprzestrzenianie się patogena roślina zyskuje czas niezbędny do aktywacji pó-

źniejszych mechanizmów obronnych obejmujących np. wytwarzanie fitoaleksyn. Modyfikacje ściany komórkowej można spowodować traktując materiał roślinny elicytorem.

Stosując metody histochemiczne Heale i wsp. [56] stwierdzili pojawienie się lignin w tkankach kalusowych marchwi po potraktowaniu martwymi zarodnikami *Botrytis cinerea* (Pers.). Jednocześnie kiełkowanie żywych zarodników na tych tkankach było znacznie zahamowane. Syntezę lignin w tkankach poprzedzał wzrost aktywności peroksydazy. Biosynteza lignin prowadzi od L-fenylalaniny przez kwas kumarowy, estry CoA kwasów kumarowego, ferulowego i sinapinowego do odpowiednich alkoholi, które następnie są polimeryzowane przy udziale peroksydazy. Obok prac, które mówią o wzroście aktywności peroksydazy w zainfekowanych, czy poddanych działaniu elicytora roślinach, tkankach kalusowych i zawiesinach komórkowych, istnieją również takie, które negują udział tego enzymu w reakcjach odpornościowych [118]. Podczas gdy ogólna droga tworzenia fenylopropanoidów poprzez różne estry CoA nie jest specyficzna dla tworzenia lignin, to wzrost aktywności peroksydazy czy dehydrogenazy alkoholu cynamonowego uważa się za dowody potwierdzające wytwarzanie i gromadzenie lignin w odpowiedzi na infekcję. Grand i wsp. [43] donoszą o około pięciokrotnym wzroście aktywności dehydrogenazy alkoholu cynamonowego w zawieszynie fasoli potraktowanej elicytorem, choć jednocześnie nie stwierdzają oni obecności lignin w tych hodowlach. Wskazywałoby to, że raczej tworzenie estrów cynamonowych i związków z nimi związanych, a nie wytwarzanie lignin, ma miejsce w czasie infekcji czy działania elicytorów. Interpretację tą potwierdzają dane o gromadzeniu kwasów 4-hydroksybenzoesowego, kawowego i ferulowego równoległe ze wzrostem aktywności PAL w potraktowanych elicytorem komórkach marchwi [77].

Często w zainfekowanych lub potraktowanych elicytorem tkankach i zawiesinach komórkowych stwierdza się obecność fenoli nie zwią-

zanych z ligninami. Obecność i gromadzenie fenoli związanych ze ścianą komórkową, jak również estrów kwasu kawowego i ferulowego wykazano w traktowanych elicytorem zawiesinach komórkowych fasoli [10]. Kauss [73] donosi o zwiększaniu się ilości rozpuszczalnych w zasadach związków fenolowych związanych ze ścianami komórkowymi w traktowanych chitozaniem zawiesinach komórkowych soi. Proces ten przebiegał równoległe z indukcją syntezy kalozy i dane te potwierdzają wcześniejsze doniesienia Farmera [39] o gromadzeniu nieligninowych fenoli w traktowanych elicytorem zawiesinach soi.

Interesujący model regulacji syntezy fenoli i ich polimeryzacji w ścianie komórkowej zaproponowali Matern i Kneusel [86]. Uważają oni, że enzymem decydującym w tych procesach jest silnie zależna od pH hydroksylaza katalizująca tworzenie kwasu kawowego i jego CoA-estrów. Nie jest ona syntetyzowana *de novo*, stąd reakcja może być bardzo szybka. Traktowanie elicytorem czy infekcja powodują szybkie zmiany w błonach komórkowych prowadzące do obniżenia pH cytoplazmy. Obniżone pH aktywuje hydroksylazę.

W ostatnim czasie wiele uwagi poświęca się syntezie białek w komórkach poddanych działaniu patogena, czy elicytora [16, 48, 71]. Nowo wytworzone białka pełnią bardzo różnorodną rolę. Mogą one funkcjonować jako strukturalny składnik ścian komórkowych, mogą to być aglutyniny czy lektyny biorące udział w procesach rozpoznawania w układzie roślina – patogen. Znaczny wzrost ilości białek bogatych w hydroksyprolinę związanych ze ścianami komórkowymi obserwowano np. w zawiesinach komórkowych fasoli [9, 10]. Na szczególną uwagę zasługują enzymy hydrolityczne posiadające zdolność degradowania ścian komórkowych potencjalnych patogenów. Chityna i β -1,3-glukan to składniki ścian komórkowych wielu grzybów. Uważa się, że chitynaza i β -1,3-glukanaza są dodatkowymi elementami mechanizmu obronnego roślin. Aktywność tych dwóch enzymów wzrastała silnie w zainfekowanych roślinach [87, 92, 95], jak i w kulturach *in vitro* [15, 71].

ODPORNOŚĆ KULTUR *IN VITRO* A WARUNKI PROWADZENIA HODOWLI

W kulturach *in vitro* duży wpływ na występowanie lub brak odporności mają warunki hodowli takie jak: skład podłoża hodowlanego, ilość zastosowanego materiału infekcyjnego, temperatura, światło. Badając odporność na choroby kultur *in vitro*, a szczególnie gromadzenie przez nie fitoaleksyn, należy zwrócić uwagę na wybór odpowiedniego podłoża hodowlanego. Szczególnie istotna jest zawartość w nim regulatorów wzrostu roślin, głównie auksyn i cytokinin [25, 27, 47, 66, 90]. Aby mogła się ujawnić odporność tkanek kalusowych tytoniu na Ppn wymagana jest szczególna równowaga między auksynami i cytokininami. Odporność maleje wraz z rosnącym stężeniem cytokinin (kinetyny i benzyloadeniny) w stosunku do stężenia auksyny (kwasu indoliloctowego). W przypadku innej cytokininy (izopentyloadeniny) nie zauważono tej zależności [47]. Wielu badaczy stwierdziło, że występowanie odporności tkanek kalusowych na choroby może być uzależnione od stopnia zwartości komórek, na który w dużym stopniu wpływają regulatory wzrostu [47, 60, 66, 90]. Zbite, zwarte tkanki kalusowe tytoniu okazały się bardziej odporne na Ppn niż tkanki charakteryzujące się luźnym ułożeniem komórek. Podobną zależność stwierdzono w układzie tkanki kalusowe ziemniaka – *P. infestans*. W przypadku tkanek kalusowych lucerny szybciej i bardziej rozlegle opanowywane były przez patogeny tkanki o powierzchni wilgotnej, niż suchej. Tkanki kalusowe lucerny stają się suche wraz z rosnącym stężeniem kinetyny w podłożu [90]. Ważnym elementem mogącym zadecydować o występowaniu lub braku odporności w kulturach *in vitro* jest ilość użytego materiału infekcyjnego [66, 70, 90]. I tak, np. odporność agregatów komórkowych ziemniaka na *P. infestans* ujawnia się gdy potraktuje się je zawiesiną zarodników o stężeniu 100 do 1000/agregat, ale zanika gdy to stężenie wynosi 5000 i więcej. Gromadzenie fitoaleksyn w tkankach kalusowych jest również silnie uzależnione od ilości zastosowanego inokulum [46, 90].

Wykazano, że odporność i wrażliwość tkanek i komórek hodowanych *in vitro* ujawnia się w pewnym ograniczonym zakresie temperatur. Tkanki kalusowe tytoniu wykazują odporność na Ppn przy 20, 22, i 24°C. Zanika ona przy 28°C. Optymalna temperatura dla ujawnienia się różnic reakcji tkanek wrażliwych i odpornych to 20°C [60]. Odporność tkanek kalusowych soi na niespecyficzny szczep Pmg ujawnia się przy 16 i 20°C, ale zanika przy 24 i 28°C [66]. W układzie ziemniak-*P. infestans* największa różnica w reakcji tkanek odpornych i wrażliwych ma miejsce przy 20°C, podczas gdy przy 12 do 16°C wrażliwe tkanki wydają się być odporne, a przy 24°C kalus odporny jest opanowywany przez patogena [90]. Temperatura wpływa też na wytwarzanie fitoaleksyn w tkankach kalusowych [35]. Produkcja riszytyny i fytuberyny przez tkanki kalusowe ziemniaka w odpowiedzi na potraktowanie homogenatem z grzybni *P. infestans* była wyższa przy 20 niż przy 28°C. Podobne zjawisko obserwowano we fragmentach bulw ziemniaka [17].

Jak dotąd nie stwierdzono aby jakość i intensywność światła miała istotny wpływ na odporność materiału roślinnego hodowanego *in vitro*, choć wiadomo że np. badania nad indukcją izoflawonoidowych fitoaleksyn powinny być przeprowadzane na kulturach hodowanych w ciemności, gdyż wiele enzymów biosyntezy flawonoidów i izoflawonoidów jest indukowanych przez światło [44, 61].

WYKORZYSTANIE KULTUR *IN VITRO* DO OTRZYMYWANIA ROŚLIN WOLNYCH OD PATOGENÓW I ODPORNÝCH NA CHOROBY

Kultury *in vitro* są coraz częściej wykorzystywane przez fitopatologów do otrzymywania roślin wolnych od patogenów, a także do wytwarzania i selekcji roślin odpornych na choroby [117]. Pierwsze wolne od wirusów rośliny udało się zregenerować z merystemów wierzchołkowych, wyizolowanych z zainfekowanych roślin [91]. Jak się ostatnio okazało rośliny wolne od wirusów można też regenerować z kultur kalu-

sowych wielu ważnych gospodarczo roślin jak np. tytoniu [14] i ziemniaka [120]. Można pozbyć się wirusów w materiale hodowanym *in vitro* traktując roślinę wyjściową (donora) wysoką temperaturą, dobierając odpowiednie warunki hodowli, jak również dodając do podłoża kultury inhibitory chemiczne. Wykazano np., że obecność w podłożu wysokich stężeń regulatorów wzrostu może obniżać zawartość wirusów w tkankach roślinnych. Badano możliwość eliminacji wirusów z materiału roślinnego *in vivo* i *in vitro* stosując takie związki jak: analogi purynowe i pirymidynowe, aminokwasy, antybiotyki itp. Choć uzyskano pewne ograniczenie ilości wirusów to większość z użytych związków była dla roślin toksyczna, bądź wykazywała niewystarczającą aktywność [72, 120]. Analog nukleozydu „Virazol” [1-β-D-rybofuranosyl-1,2,4-triazol-3-karboksamid] wykazuje działanie antywirusowe zarówno w stosunku do wirusów zwierzęcych jak i roślinnych. Kumert i Toussaint [76] stosując „Virazol” próbowali otrzymać wolne od wirusów storczyki z rodzaju *Cymbidium*. Dodanie do podłoża 25 ppm tego preparatu spowodowało, że w szóstej subkulturze wszystkie protokormy były wolne od wirusów.

Rośliny regenerowane z protoplastów, zawiesin komórkowych czy tkanek kalusowych często podlegają tzw. zmienności somaklonalnej [105, 106, 116]. Zmienność ta może prowadzić do powstania nowych cech morfologicznych, zmiany czasu dojrzewania, wielkości plonów czy odporności na choroby grzybowe i wirusowe [38]. Pierwsze prace z wykorzystaniem kultur tkankowych do otrzymywania nowych cech w oparciu o zmienność somaklonalną wykonano na trzcinie cukrowej (*Saccharum officinarum* L.) i na ziemniaku [8, 58, 93, 107, 112, 113]. Później okazało się, że jest to również możliwe w przypadku wielu innych roślin np. tytoniu, ryżu (*Oryza sativa* L.), owsa (*Avena sativa* L.), kukurydzy (*Zea mays* L.), pszenicy (*Triticum vulgare* Vill.), koniczyny (*Trifolium* sp.), marchwi, ananasa (*Ananas* sp.), sałaty (*Lactuca* sp.), czosnku (*Allium* sp.), pomidora (*Lycopersicon*

esculentum Mill.), truskawki (*Fragaria* sp.) i innych [34, 36, 37, 81, 82, 114]. Zwiększoną odporność na patogeny udało się uzyskać w przypadku lucerny [55], kapusty (*Brassica* sp.) [102, 103], ziemniaka [113], trzciny cukrowej [60, 84], pomidora [37]. W wielu przypadkach jest to odporność przekazywana genetycznie, trwale dziedzicząca się.

Metoda otrzymywania nowych genotypów w oparciu o zmienność somaklonalną ma też pewne wady. Opierając się na niej nie zawsze udaje się otrzymać pożądaną cechę i wymaga ona prowadzenia badań na bardzo dużej ilości materiału roślinnego. Zmienność somaklonalna zwykle powoduje zmiany wielu cech, nie zawsze w pożądanym kierunku [8]. Wykorzystując technikę kultur *in vitro* można stymulować powstawanie nowych cech, w tym zwiększoną odporność na patogeny. Najpowszechniej stosowane jest użycie toksyn patogenów jako czynnika selekcyjnego. W przypadku gdy toksyny są czynnikiem decydującym o rozwoju choroby wydaje się, że materiał wyselekcjonowany w ich obecności powinien dać początek roślinom o zwiększonej odporności. Gengenbach i wsp. [41] zastosowali toksynę wytwarzaną przez *Helminthosporium maydis* (Rasse T Nisikado) (Hmt) do wyselekcjonowania kalusów z niedojrzałych zarodków kukurydzy. Rośliny zregenerowane z odpornego kalusa były odporne na Hmt-toksynę i na infekcję przez *H. maydis*.

Innymi często stosowanymi czynnikami selekcyjnymi są filtry z kultur patogenów. Behnke [6] wyselekcjonował odporne na *P. infestans* kalusy ziemniaka dodając do ich podłoża filtrat z hodowli tego patogena. Zregenerowane rośliny były bardziej odporne niż rośliny wyjściowe. W podobny sposób selekcjonowano z powodzeniem rośliny w kierunku zwiększonej odporności na choroby w układach rzepak (*Brassica napus* L. var. *oleifera* (Metzg.) Sink) – *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam* Tode ex Schw.) [102], rzepak – *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltz [85], lucerna – *Fusarium oxysporum* Schl. var. *medicaginis* (Weimar) Snyder et Hansen [54, 55] i inne.

Lepoivre i wsp. [84] zaadoptowali często stosowaną w mikrobiologii technikę „podwójnej warstwy” do selekcji kalusów trzciny cukrowej o zwiększonej odporności na toksyczne związki wytwarzane przez *Cercospora beticola* Sacc. Hodowlę grzyba przykryto warstwą podłoża zawierającego fungistatyczne stężenie mykostatyny lub benlatu. Metabolity z kultury patogena dyfundowały do podłoża, na które przenoszono kalusy trzciny cukrowej. Stosując tą technikę próbowano także otrzymać rośliny pszenicy o zwiększonej odporności na *Septoria nodorum* Berk. Obserwowano różnice w rozwoju choroby między roślinami otrzymanymi tą metodą, a roślinami kontrolnymi [108]. Użycie kultury żywych patogenów do wywoływania odporności w kulturach *in vitro* nie jest jednak zbyt popularne. Główna wada tej techniki polega na przerażeniu przez mikroorganizmy podłoża kultury i tkanek roślinnych.

Inna metoda selekcji opracowana przez Tagera i Meulemans [115] polega na spryskiwaniu hodowanych *in vitro* roślin żywym materiałem grzybowym. Po ustaleniu odpowiednich warunków (wiek roślin, warunki hodowli itp.) udało się otrzymać rośliny ziemniaka o zwiększonej odporności na *P. infestans*. Zregenerowane z protoplastów rośliny spryskane zawiesiną zarodników *P. infestans* wykazywały *in vitro* zwiększoną odporność na tego patogena. Rośliny te rozmnażano *in vitro* i poddawano kolejnej inokulacji. Otrzymane odporne klonów rozmnażano jak poprzednio, a następnie testowano ich odporność w warunkach polowych. Wynik eksperymentu był jednak negatywny: uzyskane rośliny były wrażliwe na patogena tak jak rośliny wyjściowe [89].

Pozytywne, pożądane cechy, jakie można zaindukować w kulturach *in vitro*, w tym odporność na choroby, nie zawsze ujawniają się w całości roślinach. Często jeśli nawet udaje się zregenerować rośliny o zwiększonej odporności, to cecha ta może się nie ujawniać w naturalnych warunkach polowych.

Technika kultur *in vitro* ma duże możliwości zastosowania w pracach badawczych nad me-

chanizmami odporności i otrzymywaniem roślin odpornych na choroby. Jednak biochemiczne i genetyczne uwarunkowania odporności i wrażliwości roślin nie są ciągle dostatecznie wyjaśnione. Identyfikacja i charakterystyka większej ilości toksyn, określenie związków włączonych w specyficzność interakcji gospodarz – patogen, związków decydujących o wirulencji patogena i odporności rośliny – gospodarza stworzą być może w przyszłości możliwość sterowania mechanizmami odporności dla celów poznawczych i praktycznych z wykorzystaniem techniki kultur *in vitro* w pełnym potencjale.

LITERATURA

- [1] AIST J. R., GOLD R. E. 1987. Prevention of fungal ingress: the role of papillae and calcium W: NISHIMURA S., VANCE C., and DOKE N. (red.), *Molecular Determinants of Plant Diseases*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, and Springer – Verlag, Heidelberg. 47–56.
- [2] ALBERSHEIM P., VALENT B. 1978. Host – pathogen interactions in plants. Plants, when exposed to digosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *J. Cell Biol.* 78: 627–643.
- [3] BAILEY J. A. 1970. Pisatin production by tissue cultures of *Pisum sativum*. *L. J. Gen. Microbiol.* 61: 409–415.
- [4] BAILEY J. A. 1982. Mechanisms of phytoalexin accumulation. W: BAILEY J. A., MANSFIELD J. W. (red.), *Phytoalexins*. John Wiley and Sons, New York, ss. 289–318.
- [5] BAILEY J. A., MANSFIELD J. W. (red.), 1982. *Phytoalexins*. John Wiley and Sons, New York.
- [6] BEHNKE M. 1979. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theor. Appl. Genet.* 55: 69–71.
- [7] BHANDAL I. S., PAXTON J. D., WIDHOLM J. M. 1987. *Phytophthora megasperma* culture filtrate and cell wall preparation stimulate glyceollin production and reduce cell viability in suspension cultures of soybean. *Phytochemistry* 10: 2691–2694.
- [8] BIDNEY D. L., SHEPARD J. F. 1981. Phenotypic variation in plants regenerated from protoplasts: the potato system. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 2691–2701.
- [9] BOLWELL G. P. 1987. Elicitor induction of the synthesis of a novel lectin-like arabinosylated hydroxyproline-rich glycoprotein in suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 172: 184–191.
- [10] BOLWELL G. P., ROBBINS M. P., DIXON R. A. 1985. Metabolic changes in elicitor-treated bean cells. Enzymatic responses associated with rapid changes in cell wall components. *Eur. J. Biochem.* 148: 571–578.
- [11] BONHOFF A., RIETH B., GOLECKI J., GRISEBACH H. 1987. Race: cultivar-specific differences in callose deposition in soybean roots following infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Planta* 172: 101–105.
- [12] BOSTOCK R. M., LAINE R. A., KUČ J. A. 1982. Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acids in potato. *Plant Physiol.* 70: 1417–1424.
- [13] BUDE A. D., HELGESON J. P. 1981. Chronology of phytoalexin production and histological changes in tobacco callus infected with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. [abstr.] *Phytopathol.* 71: 864
- [14] CHANDRA N., HILDEBRANDT A. C. 1967. Differentiation and plants from tobacco mosaic virus inclusion – bearing and inclusion – free single tobacco cells. *Virology* 31: 414–421.
- [15] CHAPPEL J., HAHLBROCK K. 1984. Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase. *Planta* 161: 475–480.
- [16] CRAMER C. L., RYDER T. B., BELL J. N., LAMB C. J. 1985. Rapid switching of plant gene expression induced by fungal elicitor. *Science* 227: 1240–1243.
- [17] CURRIER W. W., KUČ J. 1975. Effect of temperature on rishitin and steroid glycoalkaloid accumulation in potato tuber. *Phytopathol.* 65: 1194–1197.
- [18] DARVIL A. G., ALBERSHEIM P. 1984. Phytoalexins and their elicitors: A defence against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiol.* 35: 243–275.
- [19] DAVIS K., HAHLBROCK K. 1987. Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* 85: 1286–1290.
- [20] DAZZO F. B., GARDIOL A. E. 1984. Host specificity in *Rhizobium* – legume interactions. W: VERMA D. P. S., HOHN Th. (red.), *Genes involved in microbe – plant interactions*. Springer Verlag, Wien and New York.
- [21] DIXON R. A. 1980. Plant tissue culture methods in the study of phytoalexin induction. W: INGRAM D. S., HELGESON J. P. (red.), *Tissue culture methods for plant pathologist*. Blackwell Scientific, Oxford, ss. 185–196.
- [22] DIXON R. A., BENDALL D. S. 1978. Changes in the levels of enzymes of phenylpropanoid and flavonoid synthesis during phaseollin production in cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol. Plant Pathol.* 13: 295–306.
- [23] DIXON R. A., DEY P. M., LAMB C. J. 1983. Phytoalexins: Enzymology and molecular biology. W: MEISTER A. (red.), *Advances in enzymology and related areas of molecular biology.* 55: 1–35.
- [24] DIXON R. A., DEY P. M., MURPHY D. L., WHITEHEAD I. M. 1981. Dose responses for *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor – mediated enzyme induction in French bean cell suspension cultures. *Planta* 151: 272–280.

- [25] DIXON R. A., FULLER K. W. 1976. Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in tissue culture of *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 299-312.
- [26] DIXON R. A., FULLER K. W. 1977. Characterization of components from culture filtrates of *Botrytis cinerea* which stimulate phaseollin biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 287-296.
- [27] DIXON R. A., FULLER K. W. 1978. Effects of growth substances on noninduced and *Botrytis cinerea* culture filtrate - induced phaseollin production in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Plant Physiol. Pathol.* 12: 279-288.
- [28] DIXON R. A., LAMB C. J. 1979. Stimulation of *de novo* synthesis of L-phenylalanine ammonia lyase in relation to phytoalexin accumulation in *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-treated cell suspension cultures of French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta* 586: 453-463.
- [29] EBEL J. 1984. Induction of phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 232: 240-248.
- [30] EBEL J. 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of induction process. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 235-264.
- [31] EBEL J., AYERS A. R., ALBERSHEIM P. 1976. Host-Pathogen Interaction. XII Responses of suspension-cultured soybean cells to the elicitor isolated from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, a fungal pathogen of soybeans. *Plant Physiol.* 57: 775-779.
- [32] ECKER J. R., DAVIS W. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 5202-5206.
- [33] EDREVA A. 1977. Comparative chemical studies of an infectious disease (Blue mould) and physiological disorder of tobacco. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 149-161.
- [34] ENGLER D. E., GROGAN R. G. 1982. *In vitro* selection of potential disease resistant somaclonal variants of lettuce from regenerated protoplasts. *Phytopathol.* 72: 1003 (abstr).
- [35] ERSEK T., SZIRAKI I. 1980. Production of sesquiterpene phytoalexins in tissue culture callus of potato tubers. *Phytopathol.* 97: 364-368.
- [36] EVANS D. A., SHARP W. R. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* 221: 949-951.
- [37] EVANS D. A., SHARP W. R., MEDINA-FILHO H. P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. *Am. J. Bot.* 71: 759-774.
- [38] EVANS D. A., SHARP W. R. 1986. Applications of somaclonal variation. *Biotechnology* 4: 528-532.
- [39] FARMER E. E. 1985. Effects of fungal elicitor on lignin biosynthesis in cell suspension cultures of soybean. *Plant Physiol.* 78: 338-342.
- [40] FANTON C. A. L., LABAVITCH J. M. 1980. Lectin-mediated agglutination of plant protoplasts. *Physiol. Plant.* 49: 393-397.
- [41] GENGENBACH B. G., GREEN C. E., DONOVAN C. M. 1977. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5113-5117.
- [42] GIBSON D. M., STACK S., KRELL K., HOUSE J. 1982. A comparison of soybean agglutinin in cultivars resistant and susceptible to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (Race 1). *Plant Physiol.* 70: 560-566.
- [43] GRAND C., SARNI F., LAMB C. J. 1987. Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. *Eur. J. Biochem.* 169: 73-77.
- [44] GRISEBACH H., HAHNBROCK K. 1974. Enzymology and regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures. W: RUNECKLES V. C., CONN E. E. (red.), *Recent Advances in Phytochemistry*. Academic Press, New York. 8: 21-52.
- [45] GRUBER P. J., GLIMELIUS K., ERIKSSON T., FREDERIC S. E. 1984. Interaction of galactose-binding lectines with plant protoplasts. *Protoplasma* 121: 34-41.
- [46] GUSTINE D. L., SHERWOOD R. T., VANCE C. P. 1978. Regulation of phytoalexin synthesis in jackbean callus cultures. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase and o-methyltransferase. *Plant Physiol.* 61: 226-230.
- [47] HABERLACH G. T., BUDDÉ A. D., SEQUEIRA L., HELGESSON J. P. 1978. Modification of disease resistance of tobacco callus tissues by cytokinins. *Plant Physiol.* 62: 522-525.
- [48] HADWIGER L. A., WAGONER W. 1983. Electrophoretic patterns of pea and *Fusarium solani* proteins synthesized *in vitro* or *in vivo* which characterize the compatible and incompatible interaction. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 153-162.
- [49] HAHNBROCK K., CRETIN C., CUYPERS B., FRITZEMEIER K. H., HAUFFE K. D., JAHNEN W., KOMBRINK E., ROHWER F., SCHELL D., SCHMELZER E., SCHRODER M., TAYLOR J. 1987. Tissue specificity and dynamics of disease resistance responses in plants. W: WETSTEIN D., CHUA N. H. (red.), *NATO ASI Series: Plant Molecular Biology*. Plenum, New York. ss. 399-406.
- [50] HAHN M. G., DARVILL A. G., ALBERSHEIM P. 1981. Host-pathogen interactions. XIX The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Physiol.* 68: 1161-1169.
- [51] HAMDAN M. A. M. S., DIXON R. A. 1987. Fractionation and properties of elicitors of phenylpropanoid pathway from culture filtrates of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 91-103.

- [52] HARGREAVES J. A. 1979. Investigation into the mechanism of mercuric chloride stimulated phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. *Physiol. Plant Pathol.* **15**: 279–287.
- [53] HARGREAVES J. A., SELBY C. 1978. Phytoalexin formation in cell suspensions of *Phaseolus vulgaris* in response to an extract of bean hypocotyls. *Phytochemistry* **17**: 1099–1102.
- [54] HARTMAN C. L., KNOX T. R., MCCOY T. J. 1984. Field testing and preliminary progeny evaluation of alfalfa regenerated from cell lines resistant to the toxins produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis*. *Phytopathol.* **74**: 818 (Abstr).
- [55] HARTMAN C. L., MCCOY T. J., KNOX T. R. 1984. Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. *Plant Sci. Lett.* **34**: 183–194.
- [56] HEALE J. B., SHARMAN S. 1977. Induced resistance to *Botrytis cinerea* in root slices and tissue cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Physiol. Plant Pathol.* **10**: 51–61.
- [57] HEDRICK S. A., BELL J. N., BOLLER T., LAMB C. J. 1988. Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *Plant Physiol.* **86**: 182–186.
- [58] HEINZ D. J., KRISHNAMURTHI M., NICKELL L. G., MARETZKI . 1977. Cell, tissue, and organ culture in sugarcane improvement. W: REINERT J., BAJAJ Y. P.S. (red.), *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Springer Verlag, Berlin, ss. 3–17.
- [59] HELGESON J. P., BUDE A. D., HABERLACH G. T. 1978. Capsidiol: A phytoalexin produced by tobacco callus tissues. *Plant Physiol.* **61**: 58 (Suppl.)
- [60] HELGESON J. P., KEMP J. D., HABERLACH G. T., MAXWELL D. P. 1972. A tissue culture system for studying disease resistance: the black shank disease in tobacco callus cultures. *Phytopathol.* **62**: 1439–1443.
- [61] HELLER W., EGIN-BUEHLER B., GARDINER S. E., KNOBLOCH K. H., MATERN U., EBEL J., HAHLBROCK K. 1979. Enzymes of general phenylpropanoid metabolism and of flavonoid glycoside biosynthesis in parsley. *Plant Physiol.* **64**: 371–373.
- [62] HESS S. L., HADWIGER L. A. 1971. The induction of phenylalanine ammonia lyase and phaseollin by 9-aminoacridine and other DNA – intercalating compounds. *Plant Physiol.* **48**: 197–202.
- [63] HIGGINS V. J. 1972. Role of the phytoalexin medicarpin in three leaf spot diseases of alfalfa. *Physiol. Plant Pathol.* **2**: 289–300.
- [64] HOHL H. R., BALSIGER S. 1986. Probing the surface of soybean protoplasts and germ tubes of the soybean pathogen *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* with lectins. *Botanica Helvetica* **96**(2): 289–297.
- [65] HOHL H. R., BALSIGER S. 1988. Surface glycosyl receptors of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* and its soybean host. *Botanica Helvetica* **98**(2): 271–277.
- [66] HOLLIDAY M. J., KLARMAN W. L. 1979. Expression of disease reaction types in soybean callus from resistant and susceptible plants. *Phytopathol.* **69**: 576–578.
- [67] HOPPER D. G., VENERE R. J., BRINKERHOFF L. A., GHOLSON R. K. 1975. Necrosis induction in cotton. *Phytopathol.* **65**: 206–13.
- [68] INGHAM J. L., MILLAR R. L. 1973. Sativan: An induced isoflavon from the leaves of *Medicago sativa* L. *Nature* **242**: 125–126.
- [69] INGHAM J. L. 1979. Isoflavonoid phytoalexins of the genus *Medicago*. *Biochem. System. Ecol.* **7**: 29–34.
- [70] INGRAM D. S., ROBERTSON N. F. 1965. Interaction between *Phytophthora infestans* and tissue cultures of *Solanum tuberosum*. *J. Gen. Microbiol.* **40**: 431–437.
- [71] KAMBRINK E., HAHLBROCK K. 1986. Response of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor – induced reactions. *Plant Physiol.* **81**: 216–221.
- [72] KARTHA K. K. 1986. Production and indexing of disease – free plants. W: WITHERS L., ALDERSON P. (red.), *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Butterworths, London, ss. 219–238.
- [73] KAUSS H. 1987. Some aspects of calcium dependent regulation in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**: 47–72.
- [74] KOCHS G., WELLE R., GRISEBACH H. 1987. Differential induction of enzyme in soybean cell cultures by elicitor or osmotic stress. *Planta* **171**: 519–524.
- [75] KUHN D. N., CHAPPEL J., BOUDEL A., HAHLBROCK K. 1984. Induction of phenylalanine ammonia – lyase and 4-coumarate: CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**: 1102–1106.
- [76] KUMMER J., TOUSSAINT A. 1984. Utilisation du Virazole pour l'assainissement des plantes par culture *in vitro*. *Parasitica* **40**: 121–137.
- [77] KUROSAKI F., TASHIRO N., NISHI A. 1986. Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls. *Pl. Cell. Physiol.* **27**: 1587–1591.
- [78] KUROSAKI F., TSUNISAWA Y., NISHI A. 1987. The elicitation of phytoalexins by Ca⁺² and cyclic AMP in carrot cells. *Phytochemistry* **26**: 1919–1929.
- [79] LAMB C. J., DIXON R. A. 1978. Stimulation of *de novo* synthesis of L-phenylalanine ammonia-lyase during induction of phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **94**: 277–280.
- [80] LARKIN P. J. 1978. Plant protoplast agglutination by lectins. *Plant Physiol.* **61**: 626–629.
- [81] LARKIN P. J., RYAN S. A., BRETTELL R. I. S., SCOWCROFT W. R. 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **67**: 443–455.

- [82] LARKIN P. J., SCOWCROFT W. R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 197–214.
- [83] LAWTON M., DIXON R. A., LAMB C. J. 1980. Elicitor modulation for the turnover of L-phenylalanine ammonia-lyase in french bean cell suspension cultures. *Biochem. Biophys. Acta* **633**: 162–175.
- [84] LEPOIVRE P., VISEUR J., DUHEM K., CARELS N. 1966. Double – layer technique as a tool for the selection of calluses resistant to toxic material from plant pathogenic fungi. W: SEMAL J. (red.), *Somaclonal Variations and Crop Improvement*. Martines Nijhoff, Dordrecht, ss. 45–52.
- [85] MACDONALD M. V., INGRAM D. S. 1986. Towards the selection *in vitro* for resistance to *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wilts, in *Brassica napus* sp. oleifera (Metz) Sink, Winter oilseed rape. *New Phytol.* **104**: 621–629.
- [86] MATERN V., KNEUSEL R. E. 1988. Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica* **16**(2): 153–170.
- [87] MAUCH F., HADWIGER L. A., BOLLER T. 1984. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol.* **76**: 607–611.
- [88] MAZAN D., RUMEAN D., ESQUERRE-TUGAYE M. T. 1987. Molecular approaches to understanding cell surface interaction between plants and fungal pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* **25**: 337–343.
- [89] MEULEMANS M., FOURAGE G. 1986. Regeneration of potato somaclones and *in vitro* selection for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Genet.* **51**: 533–546.
- [90] MILLER S. A., MAXWELL D. P. 1983. Evaluation of Disease Resistance. W: EVANS D. A., SHARP W. R., AMIRATO P. V., YAMADA Y. (red.), *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding*. Collier Macmillan Publishers London, ss. 853–879.
- [91] MOREL G., MARTIN C. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie a virus. *C. R. Acad. Sci.* **253**: 1324–1325.
- [92] NETZER D., KRITZMAN G., CHET I. 1979. β -1,3-glucanase activity and quantity of fungus in relation to *Fusarium* wilt in resistant and susceptible near isogenic lines of muskmelon. *Physiol. Plant Pathol.* **14**: 47–55.
- [93] NICKELL L. G. 1977. Crop improvements in sugar-cane: studies using *in vitro* methods. *Crop. Sci.* **17**: 717–19.
- [94] PARKER J. E., HAHNBROCK K., SCHELL D. 1988. Different cell wall components from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicit phytoalexin production in soybean and parsley. *Planta* **176**: 75–82.
- [95] PEGG G. F., YOUNG D. H. 1981. Changes in glycosidase activity and their relationship to fungal colonization during infection of tomato by *Verticillium albo-atrum*. *Physiol. Plant Pathol.* **19**: 371–382.
- [96] PETERS B. M., CRIBBS D. M., STELZIG D. A. 1978. Agglutination of plant protoplasts by fungal cell wall glucans. *Science* **201**: 364–365.
- [97] PISTOLE T. G. 1981. Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin – like substances. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 85–112.
- [98] PORTRIDGE E., KEEN N. T. 1977. Soybean phytoalexins: Rates of synthesis are not regulated by activation of initial enzymes in flavonoid biosynthesis. *Phytopathol.* **67**: 50–55.
- [99] REISERT P. S. 1981. Plant cell surface structure and recognition phenomena with reference to symbiosis. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **12**: 71–72.
- [100] ROBY D., TOPPAN A., ESQUERRE-TUGAYE M. T. 1985. Cell surface in plant – microorganism interactions. V. Elicitors of fungal and plant origin trigger the synthesis of ethylene and of cell wall hydroxyproline – rich glycoproteins in plants. *Plant Physiol.* **77**: 700–704.
- [101] RYDER T. B., CRAMER C. L., BELL J., ROBBINS M. P., DIXON R. A., LAMB C. J. 1984. Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**: 5724–5728.
- [102] SACRISTAN M. D. 1982. Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theor. App. Genet.* **61**: 193–200.
- [103] SACRISTAN M. D. 1985. Selection for disease resistance in *Brassica* cultures. *Hereditas Suppl.* **3**: 57–63.
- [104] SCHMIDT W. E., EBEL J. 1987. Specific binding of fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max*. *Proc. of the Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 4117–4121.
- [105] SCOWCROFT W., LARKIN P. 1982. Somaclonal variation a new option for plant improvement. W: VASIL K., SCOWCROFT W., FREY K. (red.), *Plant improvement and somatic cell genetics*, ss. 159–178.
- [106] SCOWCROFT W., LARKIN P., BRETTILL R. 1983. Genetic variation from tissue culture W: HEGELSON J., DEVERALL B. (red.), *Use of tissue culture and protoplasts in plant pathology*. Academic Press, London, ss. 139–162.
- [107] SECOR G. A., SHEPARD J. F. 1981. Variability of protoplasts – derived potato clones. *Crop Sci.* **21**: 102–105.
- [108] SEMAL J., KUMMERT J., LEPOIVRE P., MEULEMANS M., VISEUR J., ANCEAU C. 1988. *In vitro* cultures for producing pathogen – free plants and selecting disease resistant genotypes. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* **23**(3): 261–269.
- [109] SEQUIERA I. 1978. Lectins and their role in host – parasite specificity. *Ann. Rev. Phytopathol.* **16**: 453–481.
- [110] SHARP J. A., VALENT B., ALBERSHEIM P. 1984. The primary structure of one elicitor active and seven elicitor – inactive hexa (β -D – glucopyranosyl) – D glucitool isolated from the mycelial walls of *Phytophthora me-*

- gasperma* f.sp. *glycinea*. *J. Biol. Chem.* **259**: 11321–11326.
- [111] SHARP J. A., VALENT B., ALBERSHEIM P. 1984. Purification and partial characterization of glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* **259**: 11312–11320.
- [112] SHEPARD J. F., BIDNEY D., SHAHIN E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science* **208**: 17–24.
- [113] SHEPARD J. F. 1981. Protoplasts as a source of disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **19**: 145–166.
- [114] SHOEMAKER N. P., SWARTZ H. J., GALLETTA G. J. 1985. Cultivar dependent variation in pathogen resistance due to tissue culture – propagation of strawberries. *Hort. Science* **20**: 253–254.
- [115] TEGERA P., MEULEMANS M. 1985. Dual culture of *in vitro* micropropagated potato plantlets with *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and assessment of general resistance of potato cultivars to the late blight fungus. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.* **50**: 1069–1080.
- [116] TEMPLETON M. D., LAMB C. J. 1988. Elicitors and defence gene activation. *Plant, Cell and Environment* **11**: 395–401.
- [117] TOMES D. 1984. An assessment of the impact of biotechnology of plant breeding. *Newsl. IAPTC* **42**: 2–9.
- [118] URBANEK H. 1987. Rola enzymów w interakcji rośliny wyższej – patogen. *Wiad. Bot.* **31**: 15–28.
- [119] VANCE C. P., KIRK T. K., SHERWOOD R. T. 1982. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopath.* **18**: 259–288.
- [120] WANG P. J., HUANG L. C. 1975. Callus cultures from potato and the exclusion of potato virus X from plants regenerated from stem tips. *Can. J. Bot.* **53**: 2565–2567.
- [121] WEST C. A. 1981. Fungal elicitors of the phytoalexin responses in higher plants. *Naturwissenschaften* **68**: 447–457.
- [122] ZAEHRINGER U., SCHALLER E., GRISEBACH H. 1981. Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Structure and reactions of naturally occurring and enzymatically prepared prenylated pterocarpans from elicitor – treated cotyledons and cell cultures of soybean. *Z. Naturforsch.* **36c**: 234–241.
- [123] ZAEHRINGER U., EBEL J., GRISEBACH H. 1978. Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Elicitor – induced increase in enzyme activities of flavonoid biosynthesis and incorporation of mevalonate into glyceollin. *Arch. Bioch. Biophys.* **188**: 450–455.