

Dosen : Prof. Dr. Ir. Rudy C. Tarumingkeng
Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto
Dr. Ir. Harjanto, MS.

KARAKTER PERTUMBUHAN AKAR RAMBUT (HAIRY ROOT) DARI PARIJA BELUT (*Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*) PADA PERLAKUAN SUKROSA DAN KASEIN HIDROLISAT DALAM MEDIA KULTUR JARINGAN

Oleh :

DEWI SUKMA

A361030031/AGR
[dsukma @plasa.com](mailto:dsukma@plasa.com)

Abstract

Root of *Trichosanthes* sp. has been reported to contain various bioactive compounds that have many potential usages in the areas of agriculture and human health. Hairy root culture was an alternative technique for studying bioactive compound accumulated within plants root tissue, such as Indonesian species of *Trichosanthes cucumerina*. The objectives of this experiment were to initiate *T. cucumerina* hairy root culture using genetic transformation mediated with *Agrobacterium rhizogenes*, to select lines of *T. cucumerina* hairy root that were stably growing on culture medium lacking plant growth regulators (PGR), and to study factors affecting biomass yield and total protein content of *T. cucumerina* hairy root.

Results of the experiment showed hairy root culture of *T. cucumerina* could be initiated using genetic transformation mediated with *Agrobacterium rhizogenes* and hairy root stably growing on culture medium lacking plant growth regulators were identified. Such hairy roots were stably growing on medium lacking PGR for at least 20 sub-culture periods. Increasing level of sucrose increased dry weight and dry matter content of hairy root. Total protein content decreased with the increased of sucrose in culture medium. Addition of casein hydrolysate (CH) did not show positive effects on biomass yield. Addition of 50 – 100 mg/l CH, however, increased protein content of hairy roots.

Keywords:

Agrobacterium rhizogenes, hairy root culture, media composition, biomass, total protein content

Pendahuluan

Kultur akar merupakan kultur jaringan akar yang hidup dan berdiferensiasi secara terorganisir membentuk biomasa akar tanpa kehadiran tipe organ lain dari tanaman seperti batang, tunas atau daun secara *in vitro* (Payne *et al.* 1992). Akar yang dikulturkan dapat berupa akar normal atau akar transgenik hasil transformasi genetik. Kultur akar normal diperoleh dengan menanam ujung akar tanaman atau kecambah secara *in vitro* dalam media yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman (ZPT). Sedangkan kultur akar transgenik diperoleh dengan menanam akar rambut (*hairy root*) yang dihasilkan dari transformasi genetik dengan bantuan *Agrobacterium rhizogenes*. Transformasi genetik dengan *Agrobacterium rhizogenes* diketahui dapat menginduksi pembentukan akar rambut akibat proses transfer T-DNA dari Ri- (*root inducing*) plasmid ke genom tanaman (Payne *et al.* 1992; Nilsson & Olson 1997). Kultur akar rambut transgenik lebih menguntungkan karena dapat ditanam dalam media tanpa penambahan ZPT.

Akar rambut telah berhasil diinduksi dari berbagai spesies *Cucurbitaceae*, seperti *Luffa cylindrica* L. Roem., *Trichosanthes sp.*, dan *Cucurbita pepo* L (Kondo *et al.* 1995, Savary & Flores 1994, Toppi *et al.* 1996, 1997). Kultur akar rambut tersebut telah digunakan untuk mempelajari keberadaan senyawa bioaktif seperti *ribosome inactivating protein* (RIP) atau senyawa bioaktif lainnya (alkaloida, flavonoida, poliaetilena dan fitoaleksin) (Toppi *et al.* 1996; Savary & Flores 1994). Akar rambut dari *L. cylindrica* dilaporkan memproduksi RIP yang diberi nama *luffin* dengan kuantitas dan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang diproduksi oleh bagian tanaman lainnya (Toppi *et al.* 1996). Sedangkan akar rambut dari *T. Kirilowii* var. *Japonicum* menghasilkan RIP yang diberi nama *trichosanthin* dan mengandung enzim kitinase kelas III (Savary & Flores 1994). Berbagai senyawa protein aktif yang diisolasi dari kultur akar tersebut dapat berguna dalam bidang pertanian atau kesehatan (Stirpe *et al.* 1992, Dong *et al.* 1994, Minami *et al.* 1992, Toppi *et al.* 1996, Vivanco *et al.* 1997, Logeman *et al.* 1992).

Kultur akar rambut merupakan metode yang ideal untuk mempelajari kandungan senyawa aktif yang diproduksi tanaman karena akar rambut dapat melakukan sintesis senyawa aktif yang diinginkan dan dapat tumbuh stabil dalam media *in vitro* (Savary & Flores 1994; Toppi *et al.* 1996). Kelebihan kultur akar rambut yang lain adalah kemudahan untuk memanipulasi berbagai faktor dalam kultur jaringan yang digunakan dengan tujuan untuk meningkatkan produksi biomasa atau senyawa aktif yang diinginkan. Manipulasi yang dapat dilakukan antara lain seleksi galur akar rambut yang produktif, optimasi

kondisi media kultur dan induksi produksi senyawa aktif dengan perlakuan elisitasi (Fu 1999).

Kemampuan untuk menginduksi dan menghasilkan biomasa akar rambut dalam jumlah yang cukup sangat diperlukan untuk melakukan evaluasi keberadaan senyawa aktif pada akar rambut spesies *Trichosanthes* asal Indonesia (paria belut, *T. cucumerina*). Oleh karena itu prosedur induksi dan seleksi akar rambut serta penentuan kondisi kultur optimum untuk menghasilkan biomasa yang tinggi perlu diidentifikasi. Percobaan ini bertujuan untuk menginduksi akar rambut dari hipokotil kecambah paria belut dengan bantuan *A. rhizogenes*, menyeleksi galur akar rambut yang tumbuh stabil dalam media tanpa penambahan ZPT, serta mempelajari pengaruh sukrosa dan kasein hidrolisat terhadap hasil biomasa, dan kadar protein total dari akar rambut paria belut.

Bahan dan Metode

Inisiasi dan Seleksi Akar Rambut

Benih paria belut yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Weleri, Jawa Tengah. Sebelum dikecambahkan secara *in vitro* benih dicuci, dibuang kulit bijinya dan direndam dalam campuran pestisida Agrep dan Dithane-M45 selama 24 jam. Selanjutnya benih direndam dalam larutan pemutih (Bayclin) dengan konsentrasi 20%, 15% dan 10% berturut-turut selama 20, 15 dan 10 menit untuk menghilangkan sisa kontaminan yang masih ada. Benih yang telah steril dibilas tiga kali dengan air steril untuk menghilangkan sisa-sisa larutan pemutih dan dikecambahkan dalam media padat MS (Murashige & Skoog 1962) dengan penambahan gula (30 g/l) dan agar (7 g/l).

A. rhizogenes strain LBA 9457 ditumbuhkan dalam media yeast manitol broth (YMB) padat yang tersusun dari *yeast extract* (0.4 g/l), manitol (10 g/l), NaCl (0.1 g/l), MgSO₄ 7H₂O (0.2 g/l), KH₂PO₄ (0.5 g/l) dan agar-agar (7 g/l) sebagai bahan pematat. Media YMB padat yang digunakan diatur dengan pH 7.0 sebelum diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1.5 psi selama 20 menit. Induksi pembentukan akar rambut dilakukan dengan cara menusukkan jarum preparat yang telah dicelupkan ke koloni bakteri umur 3 hari ke bagian hipokotil dari kecambah paria belut yang berumur 14 hari.

Pertumbuhan dan perkembangan kecambah yang diinfeksi *Agrobacterium* diamati selama 21 hari. Akar rambut yang muncul dari hipokotil maupun dari bagian kecambah yang lain diisolasi dan ditanam dalam media MS padat tanpa penambahan ZPT (MS-0) yang mengandung antibiotika cefotaxime (250 mg/l). Antibiotika cefotaxime ditambahkan dalam media untuk mematikan *Agrobacterium* yang tersisa. Akar rambut yang tumbuh

disubkultur ke dalam media dengan antibiotika cefotaxime yang masih segar setiap 14 hari dan subkultur dilakukan sampai tiga kali. Setelah tiga kali subkultur, akar rambut yang berhasil tumbuh dengan baik dalam media MS-0 padat tersebut selanjutnya dipindahkan ke media MS-0 cair tanpa antibiotik, diinkubasikan diatas pengocok (*shaker*) dengan kecepatan putaran 100 rpm, dan diletakkan dalam ruang kultur yang diatur pencahayaannya (1000 lux) selama 12 jam, dengan suhu ruangan rata-ratanya antara 25 – 27°C. Kultur akar rambut dalam media cair disubkultur ke media yang masih segar setiap 12-14 hari dan dimonitor perkembangannya selama 20 kali subkultur. Galur akar rambut yang dapat tumbuh dengan baik dalam media MS-0 cair selama 20 kali periode subkultur digunakan sebagai sumber eksplan dalam percobaan selanjutnya.

Perlakuan konsentrasi sukrosa dalam media

Dalam percobaan ini diuji pertumbuhan dan perkembangan akar berambut dalam media MS-0 yang ditambahkan beberapa konsentrasi sukrosa. Eksplan awal berupa ujung akar sepanjang 1-1.5 cm dengan densitas inokulum 3 eksplan per botol, ditanam dalam 25 ml media MS-0 dalam botol kultur volume 200 ml yang ditambahkan berbagai konsentrasi sukrosa (20, 30, 40, dan 50 g/l).

Setiap perlakuan diulang 12 kali dengan satu botol sebagai satu ulangan. Kultur akar berambut dipanen pada umur 12 HST dan diamati bobot segar, bobot kering setelah dikeringdinginkan, persentase bahan kering, dan kadar protein total.

Perlakuan Kasein Hidrolisat dalam Media

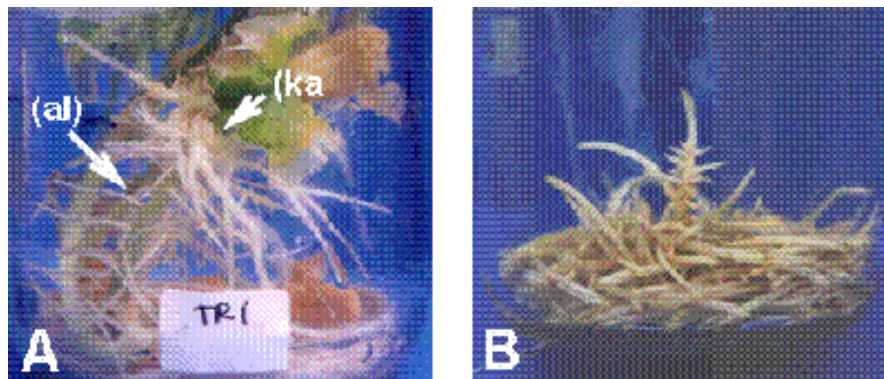
Penambahan berbagai konsentrasi kasein hidrolisat ke dalam media MS-0 diuji untuk mengetahui pengaruh kasein hidrolisat terhadap produksi biomasa dan protein total akar rambut paria belut. Kasein hidrolisat ditambahkan ke dalam media MS-0 dengan konsentrasi 50, 100 atau 150 mg/l. Perlakuan media MS-0 tanpa penambahan kasein hidrolisat digunakan sebagai kontrol. Dalam percobaan ini digunakan eksplan ujung akar (1.0 - 1.5 cm) dari galur akar rambut yang telah diseleksi dan dapat tumbuh stabil dalam media MS-0. Selanjutnya eksplan ujung akar (3 ujung akar per botol) ditanam dalam 25 ml media MS-0. Unit percobaan terdiri atas satu botol kultur dan setiap perlakuan diulang 12 kali (total 12 botol untuk setiap perlakuan). Kultur akar diinkubasikan diatas pengocok dengan kecepatan putaran 100 rpm, diletakkan dalam ruang kultur dengan pencahayaan rendah (100 lux) selama 12 jam dan dipanen pada waktu 12 HST.

Hasil

Inisiasi dan Seleksi Akar Rambut

Hipokotil paria belut yang diinfeksi dengan *A. rhizogenes* strain LBA 9457 menunjukkan gejala pembengkakan seperti tumor atau kalus pada 4 – 7 hari setelah infeksi (HSI). Respon pembentukan kalus pada hipokotil yang diinfeksi diamati dengan frekuensi 47% pada 7 HSI dan 56% pada 21 HSI.

Akar rambut mulai berkembang dari hipokotil yang diinfeksi *Agrobacterium* pada 14 HSI dan umumnya berkembang pada jaringan kalus yang terbentuk. Morfologi akar rambut yang terbentuk bervariasi dari yang tebal, kaku, dan pendek atau langsing dan memanjang. Respon pembentukan akar rambut dari jaringan yang terinfeksi *Agrobacterium* diamati dengan frekuensi 43% pada 21 HSI.



Gambar 1. Induksi dan inisiasi akar rambut dari bagian hipokotil kecambah paria belut (*Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*) dengan bantuan *Agrobacterium rhizogenes* serta pertumbuhannya dalam kultur akar rambut secara *in vitro*. (A) Induksi dan inisiasi akar rambut dari hipokotil kecambah paria belut. (ka) – jaringan kalus yang berkembang pada bagian hipokotil yang diinfeksi dengan *Agrobacterium*, (ag) – tipe akar rambut gemuk dan pendek, (al) – akar rambut langsing dan panjang dengan banyak akar aksilar. (B) Perkembangan akar rambut dalam media MS-0 cair yang diinkubasikan dengan pencahayaan 1000 lux selama 12 jam.

Selain akar rambut yang berkembang dari jaringan yang diinfeksi oleh *Agrobacterium*, sejumlah akar rambut yang tumbuh dari bagian yang tidak diinokulasi juga diisolasi dan ditanam dalam media MS-0 yang mengandung cefotaxime. Hasil pengamatan menunjukkan akar rambut yang berkembang dari bagian yang diinfeksi *Agrobacterium* mampu tumbuh dengan baik dalam medium MS-0. Sebaliknya, akar rambut yang diisolasi dari bagian kecambah yang lain tidak mampu berkembang dan mati dalam media MS-0.

Dari 42 galur akar rambut yang dievaluasi hanya didapat satu galur akar rambut yang mampu tumbuh dan berkembang dengan baik dalam media MS-0. Galur akar rambut yang lain tumbuh lambat atau sulit dibersihkan dari kontaminasi *Agrobacterium* sehingga tidak dapat digunakan dalam percobaan selanjutnya. Satu galur akar rambut yang terpilih tersebut dapat tumbuh cepat dan stabil dalam media MS-0 cair secara terus menerus sampai dengan 20 kali subkultur. Berdasarkan kemampuannya untuk tumbuh dalam media tanpa ZPT, galur akar rambut tersebut diduga merupakan akar transgenik hasil transformasi genetik dengan bantuan *A. rhizogenes*. Galur ini selanjutnya diperbanyak dan dijadikan sebagai sumber eksplan dalam percobaan selanjutnya.

Frekuensi didapatkannya galur akar rambut yang dapat tumbuh dalam media tanpa ZPT dalam penelitian ini relatif sangat rendah. Hal ini sebagian disebabkan salah satunya oleh kesulitan dalam mematikan kontaminan *Agrobacterium* setelah proses transformasi genetik selesai dilakukan. Kesulitan dalam menghilangkan kontaminan *Agrobacterium* telah dilaporkan sebagai salah satu kendala utama dalam meningkatkan frekuensi hasil transformasi genetik dengan bantuan *Agrobacterium* (Shackelford & Chlan 1996). Namun demikian tidak tertutup kemungkinan adanya berbagai faktor lain yang menyebabkan rendahnya frekuensi transformasi mengingat transfer T-DNA dari *Agrobacterium* ke tanaman merupakan proses yang kompleks dan dipengaruhi oleh berbagai faktor dari sisi tanaman dan dari sisi *Agrobacterium* (Gelvin 2000).

Pengaruh Sukrosa

Penambahan sukrosa mempunyai pengaruh yang nyata terhadap bobot segar, bobot kering, persen bahan kering, kadar protein total serta hasil protein total dari akar berambut. Rata-rata bobot segar, bobot kering, persen bahan kering, dan kadar protein total total dari akar berambut seperti terlihat pada Tabel 1.

Bobot segar dan bobot kering akar berambut cenderung meningkat dengan bertambahnya konsentrasi sukrosa. Bobot segar paling tinggi dihasilkan pada penambahan sukrosa 40g/l, lalu menurun dan berbeda nyata dengan bobot segar yang dihasilkan pada sukrosa 50 g/l. Sedangkan bobot kering akar berambut paling tinggi juga dihasilkan pada sukrosa 40 g/l namun tidak berbeda nyata dengan bobot kering pada penambahan sukrosa 50 g/l.

Tabel 1. Rata-rata produksi biomassa segar, biomassa kering dan persen bahan kering dari akar berambut *Trichosanthes cucumerina* L. pada beberapa konsentrasi sukrosa

Sukrosa (g/l)	Bobot Segar (g)	Bobot Kering (g)	Persen Bahan Kering (%)	Kadar Protein Total (mg/g BK)
20	4,22 b	0,25 c	6,16 b	155.18 a
30	4,91 b	0,34 b	6,80 b	137.03 b
40	5,98 a	0,48 a	8,11 a	134.19 c
50	4,78 b	0,42 a	8,85 a	118.54 d

Ket : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji DMRT

Persentase bahan kering akar berambut terlihat meningkat dengan peningkatan konsentrasi sukrosa. Persentase bahan kering yang terbesar dihasilkan pada sukrosa 50 g/l, tidak berbeda nyata dengan persentase bahan kering pada sukrosa 40 g/l, namun nyata berbeda dengan persentase bahan kering pada sukrosa 20 dan 30 g/l.

Kadar protein total akar berambut cenderung menurun dengan meningkatnya konsentrasi sukrosa.. Kadar protein total akar berambut berbeda nyata pada semua konsentrasi sukrosa, paling tinggi pada konsentrasi sukrosa 20 diikuti oleh sukrosa 30, 40 dan 50 g/l.

Sukrosa merupakan komponen penting dalam kultur akar berambut sebagai sumber energi, prekursor dalam konsentrasi tereduksi dan juga berperan sebagai osmotikum dalam media kultur. Nilsson dan Olsson (1997) mengemukakan bahwa untuk pertumbuhan akar berambut yang vigor, meristem harus menerima suplai gula yang cukup secara terus menerus.

Pengaruh sukrosa juga berkaitan dengan peran sitokinin dan metabolisme nitrat dan amonium. Narayanaswamy (1994) menyatakan bahwa peran sitokinin dalam pembelahan sel serta penggunaan yang efektif dari ion nitrat dan ammonium sangat tergantung kepada ketersediaan gula yang mudah diasimilasi seperti sukrosa. Pertumbuhan yang cepat dari akar berambut merupakan indikasi terjadinya pembelahan, pemanjangan ataupun diferensiasi sel yang relatif cepat, maka peningkatan konsentrasi sukrosa sampai batas tertentu dapat berpengaruh positif terhadap produksi biomassa.

Hasil uji berbagai konsentrasi sukrosa (20, 30, 40 dan 50 g/l) menunjukkan bahwa bahwa sukrosa optimal untuk produksi biomassa dan hasil protein total dari akar berambut

Trichosanthes cucumerina L. adalah 40 g/l. Pada sukrosa 40 g/l tersebut, kadar protein total dari akar berambut lebih rendah dibandingkan sukrosa 20 dan 30 g/l, tetapi karena produksi biomasanya lebih tinggi, maka hasil protein total juga menjadi tinggi.

Pada beberapa penelitian terhadap akar berambut dari berbagai tanaman, diantaranya pada akar berambut dari *Datura stramonium*, konsentrasi sukrosa hingga 50 g/l dalam media B5 dapat meningkatkan produksi biomassa dan juga produksi *hyoscyamine* (Payne *et al.*, 1987). Sedangkan Oksman-Caldentey *et al.* (1994) melaporkan bahwa pada sebagian klon akar berambut dari *Hyoscyamus muticus*, sukrosa hingga 80 g/l masih dapat meningkatkan produksi biomassa, namun kadar *hyoscyamine* maksimum dihasilkan pada sukrosa 30-50 g/l.

Morfologi akar berambut pada sukrosa 20, 30, 40 dan 50 g/l tidak menunjukkan perbedaan yang menyolok. Meskipun demikian ada kecenderungan pada sukrosa 20 dan 30 g/l, akar lebih halus dan juvenil dengan warna putih dibandingkan pada sukrosa yang lebih tinggi yaitu 40 dan 50 g/l. Pada sukrosa 40 dan 50 g/l, warna akar berambut cenderung putih kekuningan dan beberapa bagian akar menebal.

Morfologi akar yang berbeda sepertinya berhubungan dengan kadar protein total dan persentase bahan kering akar berambut. Pada akar berambut yang lebih juvenil, kadar protein total lebih tinggi karena pertumbuhan dan perkembangan sel berlangsung cepat. Sebaliknya pada akar yang cenderung menua, kadar protein total menurun namun persentase bahan kering meningkat.

Pengaruh Kasein Hidrolisat

Penambahan berbagai konsentrasi kasein hidrolisat tidak berpengaruh nyata terhadap bobot segar, bobot kering, dan persentase bahan kering biomasa akar rambut yang didapat (Tabel 4). Sebaliknya, kadar protein didapat dari akar rambut nyata dipengaruhi oleh penambahan kasein hidrolisat dalam media. Penambahan kasein hidrolisat sampai dengan 100 mg/l nyata meningkatkan kadar protein akar rambut jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Namun demikian, penambahan senyawa kompleks ini ke dalam media dengan jumlah 150 mg/l menurunkan kadar protein total dari akar rambut (Tabel 2).

Kasein hidrolisat merupakan senyawa organik kompleks dan ditambahkan dalam media *in vitro* sebagai sumber asam amino. Penambahan kasein hidrolisat diharapkan dapat membantu meningkatkan hasil biomassa dan kandungan protein total yang didapat dari kultur akar rambut. Dalam percobaan yang dilakukan penambahan kasein hidrolisat sampai dengan 150 mg/l tidak meningkatkan hasil biomassa akar rambut jika dibandingkan

dengan perlakuan kontrol. Meskipun hasil biomasa yang didapat tidak meningkat, penambahan kasein hidrolisat menyebabkan terjadinya perubahan morfologi akar rambut yang ditanam. Dalam media dengan penambahan kasein hidrolisat akar rambut yang tumbuh mempunyai ukuran lebih pendek dan mempunyai percabangan yang lebih sedikit. Hal ini merupakan ciri-ciri akar yang ada pada fase pertumbuhan sekunder.

Tabel 2. Pengaruh penambahan kasein hidrolisat dalam media MS-0 terhadap hasil biomasa, kadar protein total akar rambut paria belut (*Trichosanthes cucumerina* L).

Kasein hidrolisat (mg/l)	Bobot biomasa (g)		Persen bahan kering (%)	Kadar protein (mg/g BK)
	Basah	Kering		
0	4.4	0.32	7.5	125.3 b
50	3.6	0.27	7.6	134.5 a
100	3.5	0.26	7.7	133.1 a
150	3.1	0.25	8.4	116.8 c

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan dengan taraf α : 5%.

Pengaruh negatif penambahan asam amino dalam media tumbuh telah dilaporkan dalam kultur akar rambut tanaman *Tropaleum majus* (Wielanek & Urbanek 1999). Dalam penelitiannya diketahui produksi biomasa akar rambut dalam media dengan penambahan asam amino *L-cystein* menurun sebesar 35% dibanding kontrol. Selanjutnya, penambahan asam amino fenilalanin ke dalam media tumbuh akar rambut menyebabkan terjadinya penurunan hasil biomasa sebesar 40% dibanding kontrol. Meskipun hasil biomasa yang didapat lebih rendah tetapi hasil senyawa aktif *glucotropaeolin* yang didapat meningkat antara 40% - 70% dibanding kontrol (Wielanek & Urbanek 1999).

Daftar Pustaka

- Dong TX, Ng TB, Yeung HW, Wong RNS. 1994. Isolation and characterization of a novel ribosome inactivating protein, β -kirilowin, from the seed of *Trichosanthes kirilowii*. *Biochem Biophys Res Com* 199:387-393..
- Fu TJ. 1999. Plant cell and tissue culture for food ingredient production. Di dalam: Fu TJ, Sing G, Curtis WR (ed.) *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredient*. New York:Kluwer Academic/Plenum Publishers. hlm 1- 6

- Gelvin SB. **2000** *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:223-256.
- Kondo T, Inoue M, Mizukami H, Ogihara Y. **1995**. Cytotoxic activity of bryonolic acid isolated from transformed hairy roots of *Trichosanthes kirilowii* var. *japonica*. *Biol Pharm Bull* 18 (5): 726-729.
- Logeman J, Jach G, Tommerup H, Mundy J, Schell J. **1992**. Expression of barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology* 10:305-308.
- Minami Y, Nakahara Y, Funatsu G. **1992**. Isolation and characterization of two momordins, ribosome in-activating protein from seed of bitter melon (*Momordica charantia*). *Biosci Biotech Biochem* 569:1470-1477.
- Murashige T, Skoog F. **1962**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Narayanaswamy S. **1994**. *Plant Cell and Tissue Culture*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publ. Co. Ltd. 652pp.
- Nilsson O, Olsson O. **1997**. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plant* 100:463-473.
- Payne GF, Bringi V, Prince CL, Shuler ML. **1992**. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. New York: John Wiley and Sons.
- Savary BJ, Flores HE. **1994**. Biosynthesis of defense-related protein in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim var. *Japonicum* (Kitam). *Plant Physiol* 106:1195-1204.
- Shackelford NJ, Chlan CA. **1996**. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol Rep* 14(1):50-57.
- Stirpe F, Barbieri L, Batteli MG, Soria M, Lappi D. **1992**. Ribosome-Inactivating Proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* 10 :405-413.
- Toppi LSD, Gorini P, Properzi G, Barbieri L, Spano L. **1996**. Production of ribosome-inactivating protein from hairy root cultures of *Luffa cylindrica* (L) Roem. *Plant Cell Reports* 15:910-913.
- Toppi LSD, Pechioni N, Durantee M. **1997**. *Cucurbita pepo* L can be transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 51:89-93.
- Vivanco JM, Weitzel D, Flores HE. **1997**. Characterization of a major storage root protein isolated from the andean root crop species *Mirabilis expansa*. Di dalam: Flores HE, Lynch JP, Eissenstat D (ed.) *Radical Biology: Advances and Perspectives on the*

Function of Plant Roots. Proceeding of the 11th Annual Penn State Symposium in Plant Physiol. Vol 18. Maryland, May 22-24, 1997. hlm. 454-457.

Wielanek M, Urbanek H. 1999. Glucotropaelin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. ***Plant Cell Tissue Organ Culture*** 57:39-45.