

Penggunaan Akar Rambut untuk Perbanyakkan Tanaman dalam Upaya Menghindari Variasi Somaklonal

Nina Artanti¹, Dadang Sudrajat², Arif Djanakum²,
Endrawanto Widayat², dan M. Ahkam Subroto¹

¹*Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Cibinong*
²*PAIR-BATAN*

ABSTRAK

Saat ini perbanyakkan tanaman secara *in vitro* umumnya dilakukan melalui teknik kultur jaringan yang melibatkan biak kalus, suspensi sel, biak embrio atau biak organ sebagai tahap awal sebelum tahap regenerasi. Penggunaan hormon eksogen secara terus menerus untuk waktu yang lama, misalnya untuk pemeliharaan kultur stok dalam bentuk kalus atau suspensi sel, dapat menyebabkan mutasi yang berakibat terjadinya fenomena yang disebut variasi somaklonal. Hal ini selanjutnya dapat menyebabkan planlet yang dihasilkan melalui proses tersebut mempunyai mutu yang tidak seragam. Dalam penelitian ini dilaporkan penggunaan biak akar rambut hasil transformasi dengan bakteri tanah *Agrobacterium rhizogenes* sebagai kultur stok untuk perbanyakkan tanaman secara *in vitro*. Biak akar rambut tersebut dapat dipelihara pada media tanpa hormon sehingga diharapkan dapat menghindari masalah variasi somaklonal dari planlet yang dihasilkan pada tahap regenerasi. Berbagai macam biak akar rambut dari species tanaman terong-terongan (*Solanum* spp.) telah berhasil diperoleh. Akar rambut dari *Solanum* spp. tersebut yang merupakan hasil infeksi dengan *A. rhizogenes* galur A4, 15834, dan 07-2001 digunakan sebagai model untuk mempelajari proses regenerasi tanaman melalui tahap pembentukan akar rambut.

Kata kunci : Akar rambut, perbanyakkan tanaman, *in vitro*, variasi somaklonal, transformasi, *Agrobacterium rhizogenes*, *Solanum* spp.

ABSTRACT

At present *in vitro* plant multiplication is generally carried out through tissue culture technique which involves callus culture, cell suspension, embryo or organ culture before it goes into regeneration step. Continuous utilization of exogene hormone for a long period, for example, for maintaining culture stock in forms of calluses or cell suspension, may cause mutation which results in fenomena existence which is called somaclonal variation. Furthermore, the plantlets which goes into the process will have different quality. This paper reported the utilization of hair root culture as the result of transformation with the soil bacterium *Agrobacterium rhizogenes* as the culture stock for *in vitro* plant multiplication. The hair root culture can be maintained in the medium without hormone, so that it can be expected to avoid somaclonal variation in the plantlets produced in the regeneration step. Various hair root culture of *Solanum* spp. were used in this research. the hair roots of *Solanum* spp. which were resulted from the infection of *A. rhizogenes* lines A4, 15834, and 07-2001 were used as the model to study the plant regeneration process through hair root formation step.

Key words : Hair root, plant multiplication, *in vitro*, somaclonal variation, transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, *Solanum* spp.

PENDAHULUAN

Teknik kultur jaringan dapat dipakai sebagai alternatif untuk memperbanyak tanaman secara *in vitro*. Berbagai macam bentuk kultur jaringan tanaman telah dipakai untuk memperbanyak tanaman, seperti biak kalus, suspensi sel, biak embrio, dan biak organ. Di samping keberhasilan-keberhasilan yang telah dicapai selama ini, berbagai masalah serius telah pula muncul. Masalah-masalah tersebut terutama berhubungan dengan pertumbuhan yang lambat, relatif rendahnya frekuensi regenerasi, dan timbulnya variasi somaklonal sebagai akibat dari efek negatif penggunaan hormon eksogen. Karena itu, dalam beberapa tahun terakhir ini telah digunakan biak akar hasil transformasi dengan bakteri tanah *Agrobacterium rhizogenes* yang disebut biak akar rambut. Penggunaan biak akar rambut sebagai kultur stok untuk menghindari timbulnya variasi somaklonal dimungkinkan karena biak akar rambut mampu dipelihara secara terus-menerus dalam waktu yang tidak terbatas pada media tanpa hormon eksogen.

Akar rambut (*hairy roots*) hasil transformasi dengan *A. rhizogenes* telah dilaporkan terbukti dapat memecahkan masalah variasi somaklonal pada berbagai tanaman dikotil (Tepfer, 1990). Telah dilaporkan pula bahwa akar rambut secara genetik bersifat stabil dengan produksi metabolit sekunder yang tinggi dan stabil (Aird *et al.*, 1988). Selain itu akar rambut tumbuh relatif cepat (Tepfer, 1990), tanaman hasil regenerasinya lebih tahan terhadap serangan penyakit (Uozumi *et al.*, 1992), mempunyai prospek untuk diintroduksi dengan gen asing untuk resistensi terhadap hama dan penyakit (Christey dan Sinclair, 1992), dan dapat dipakai sebagai bahan untuk memproduksi benih buatan (Uozumi *et al.*, 1992).

Walaupun akar rambut sangat berpotensi sebagai alat untuk mempercepat memperbanyak tanaman secara *in vitro*, namun proses regenerasinya secara umum masih sulit. Hal ini terutama disebabkan oleh kurangnya pengetahuan kita tentang dua hal yaitu: (1) pemahaman tentang peranan hormon endogen dalam proses regenerasi, dan (2) mekanisme perubahan sensitivitas rhizogenesis akibat ekspresi dari kedua gen untuk biosintesis auksin yang ada pada bagian T_R T-DNA (gen *tms1* dan *tms2*) dan ekspresi dari keempat gen *rol* (*rol A*, *rol B*, *rol C*, dan *rol D*) yang ada pada bagian T_L T-DNA. Oleh karena itu, pemahaman tentang kedua hal tersebut diharapkan dapat mempermudah tercapainya proses regenerasi akar rambut.

Dalam penelitian ini digunakan tanaman terong KB sebagai tanaman model. Alasan pemilihan terong KB sebagai model adalah: (1) Telah dikuasainya teknik inisiasi akar rambut dari tanaman ini dan (2) Terong KB merupakan tanaman penghasil solasodin, yaitu bahan baku pil kontrasepsi. Hal ini sangat relevan dalam upaya menunjang program swasembada bahan baku pil kontrasepsi yang telah dicanangkan oleh Pemerintah sejak tahun 1975.

Tanaman terong KB, khususnya *Solanum khasianum* dan proporo (*S. aviculare* dan *S. laciniatum*), dikenal sebagai tanaman penghasil solasodin dengan kadar tinggi

(1-3,8%) (Rosita *et al.*, 1991). Tanaman tersebut telah berhasil diadaptasi di Indonesia sejak tahun 1977. Pembudidayaan tanaman terong KB tersebut telah dilakukan di Balitro, Bogor (Rosita *et al.*, 1991). Berbagai masalah ditemukan di dalam perbanyakannya secara konvensional (Rosita *et al.*, 1991; Januwati *et al.*, 1991). Teknik kultur jaringan (kultur kalus) telah diaplikasikan untuk menjawab masalah-masalah tersebut, namun hasilnya masih mengecewakan karena kadar solasodin yang diperoleh sangat rendah (Rosita *et al.*, 1991). Hal ini berkaitan erat dengan proses diferensiasi dan variasi somaklonal yang diakibatkan oleh penggunaan hormon eksogen di dalam media tumbuh secara terus menerus.

Akar rambut dari *S. aviculare* dilaporkan mampu memproduksi solasodin dengan kadar yang tinggi (Subroto, 1991; Subroto dan Doran, 1994). Regenerasi terong KB melalui pembentukan akar rambut diharapkan dapat menghindari masalah variasi somaklonal dengan mempertahankan produksi solasodin yang tinggi dan stabil. Dalam tulisan ini diuraikan tentang inisiasi akar rambut dari berbagai jenis tanaman terong KB dan tahapan yang dapat ditempuh untuk memacu proses regenerasinya.

BAHAN DAN METODE

Biji dan Bibit Tanaman *Solanum* spp.

Biji *S. laciniatum* diperoleh dari Dr. P.M. Doran, Department of Biotechnology, The University of New South Wales, Sydney, Australia. Bibit *S. khasianum* diperoleh dari Dr. Ika Mariska, Balitbio, Bogor. Biji *S. mammosum* dan *S. nigrum* merupakan hasil koleksi dari Bogor. Biji *S. melongena* Black Beauty (BB) dan Gelatik (G) dibeli dari toko komersial di Bogor. Bibit *Solanum* sp.1 merupakan hasil koleksi dari Cipanas.

Bakteri *Agrobacterium rhizogenes*

Bakteri *A. rhizogenes* galur A4, 15834, dan 07-2001 diperoleh dari Dr. P.M. Doran, Department of Biotechnology, The University of New South Wales, Sydney, Australia. Bakteri *A. rhizogenes* tersebut ditumbuhkan pada media YMB dengan komposisi sebagai berikut: 0,5 g/l K_2HPO_4 , 0,2 g/l $MgSO_4$, 0,1 g/l NaCl, 0,4 g/l Yeast Extract, 10 g/l Mannitol, 15 g/l Difco Bacto Agar, dan 1 liter dH_2O ; pH medium dikoreksi menjadi 7,0 sebelum sterilisasi dengan autoklaf.

Perkecambahan Biji *In Vitro*

Semua biji disterilisasi permukaan dengan 70% etanol selama satu menit, dilanjutkan dengan 2,6% Klorox + Tween 20 selama 15 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3-5 kali. Biji kemudian ditiriskan di atas kertas saring steril di dalam cawan petri sebelum ditanam di media padat steril yang terdiri dari

garam MS normal (Murashige dan Skoog, 1962), 3% sukrosa dan 0,2% Phytigel (Sigma). Semua botol kemudian diinkubasi pada suhu 25-28°C dengan penerangan lampu TL (1.000 lux). Secara umum, biji mulai berkecambah antara 1 dan 10 minggu. Setelah kecambah berukuran ± 6 cm atau sudah keluar daun yang berukuran cukup untuk diinfeksi, maka kecambah tersebut sebagian digunakan untuk kegiatan inisiasi akar rambut.

Inisiasi Akar Rambut

Inisiasi akar rambut dilakukan dengan cara menginokulasikan koloni *A. rhizogenes* yang ditumbuhkan pada media padat pada bagian hipokotil atau daun kecambah steril dari tanaman *Solanum* yang telah dipotong/dilukai. Potongan hipokotil atau daun kecambah steril yang telah diinokulasi dengan koloni *A. rhizogenes* tersebut kemudian ditanam pada media padat MS yang mengandung 3% sukrosa tanpa hormon dengan posisi terbalik (bagian yang diinokulasi di atas). Sebagai kontrol digunakan potongan hipokotil atau daun kecambah steril yang tidak diinokulasi dengan koloni *A. rhizogenes*. Setelah akar rambut muncul pada bagian yang diinokulasi dengan bakteri (biasanya sekitar 2-4 minggu setelah inokulasi), maka akar rambut tersebut dipotong dan dikulturkan pada media padat MS yang mengandung 3% sukrosa dan 200 mg/l cefotaxime (Claforan) tanpa hormon. Penggunaan media dengan antibiotik cefotaxime dilakukan selama tiga kali subkultur atau sampai sisa bakteri telah tereliminasi.

Uji Konfirmasi Transformasi

Konfirmasi transformasi pada akar rambut dilakukan dengan uji opin. Opin adalah asam amino spesifik yang hanya diproduksi oleh akar rambut. Kandungan agropin dianalisis dengan metode Petit *et al.* (1983). Satu gram akar rambut dihomogenisasi dan dilarutkan dalam 1 ml HCl 1N, kemudian dipanaskan di *water bath* pada suhu 100°C selama 10 menit. Suspensi diangkat dan dibiarkan sampai dingin dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 g selama 10 menit. Supernatan dievaporasi pada suhu 40°C sampai presipitat kering dan presipitat yang terbentuk dilarutkan dalam 0,2 ml akuades. Ekstrak dianalisis dengan cara meneteskan 10 ml suspensi pada kertas Whatman 3MM yang telah dipola dalam alat elektroforesis Bio Phoresis, Horizontal Electrophoresis Cell (BIORAD) dengan catu daya Model 1.000/500. Larutan bufer yang digunakan terdiri atas campuran asam format, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan volume 30:60:90 (v/v) selama tiga jam dengan tegangan 30 volt/cm². Sesudah elektroforesis, kertas diwarnai dengan perak nitrat (Trevelyan *et al.*, 1950), pencucian dilakukan dengan larutan 5% Na₂S₂O₃ dan selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar.

Proses Regenerasi Akar Rambut

Akar rambut yang berhasil diperoleh dipelihara pada kondisi gelap dengan menggunakan media dasar MS dengan suplementasi 3% sukrosa tanpa hormon. Subkultur dilakukan setiap 2-3 minggu sekali dengan cara memindahkan beberapa potong akar rambut muda pada media baru. Proses regenerasi dari akar rambut dipacu dengan memanipulasi kondisi lingkungan seperti intensitas cahaya, komposisi media dan lama inkubasi.

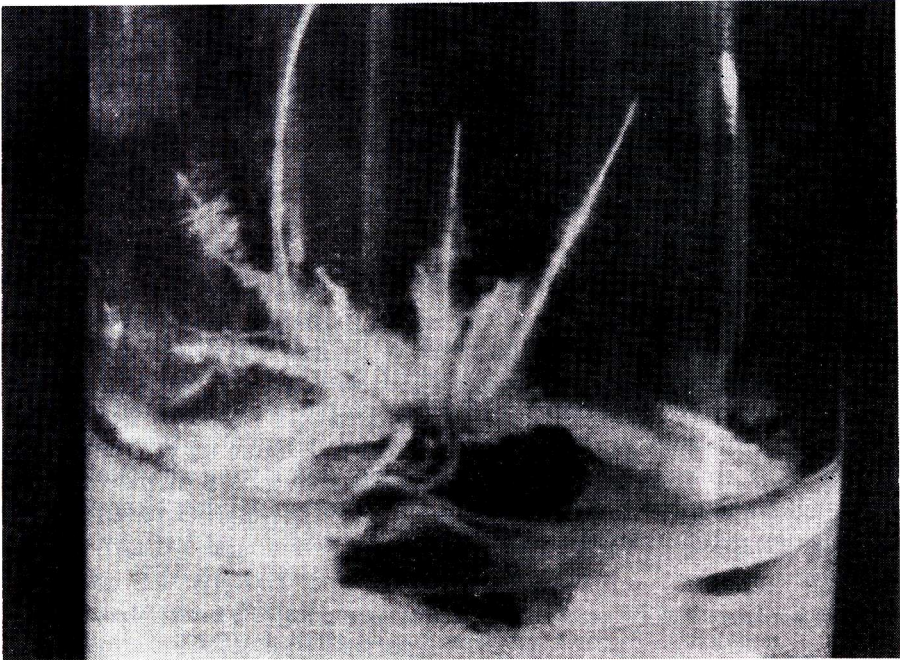
HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1 menunjukkan akar rambut yang berhasil diinisiasi dari berbagai jenis tanaman terong KB dengan menggunakan bakteri *A. rhizogenes* galur A4, 15834, dan 07-2001. *A. rhizogenes* galur A4 dan 15834 (tipe agropin) menunjukkan keberhasilan yang lebih baik dibandingkan dengan galur 07-2001. Gambar 1 menunjukkan akar rambut yang baru muncul pada bagian eksplan daun yang diinokulasi dengan bakteri, sedangkan Gambar 2 menunjukkan tipikal morfologi dari akar rambut yang telah dipotong dan dikulturkan secara aseptik.

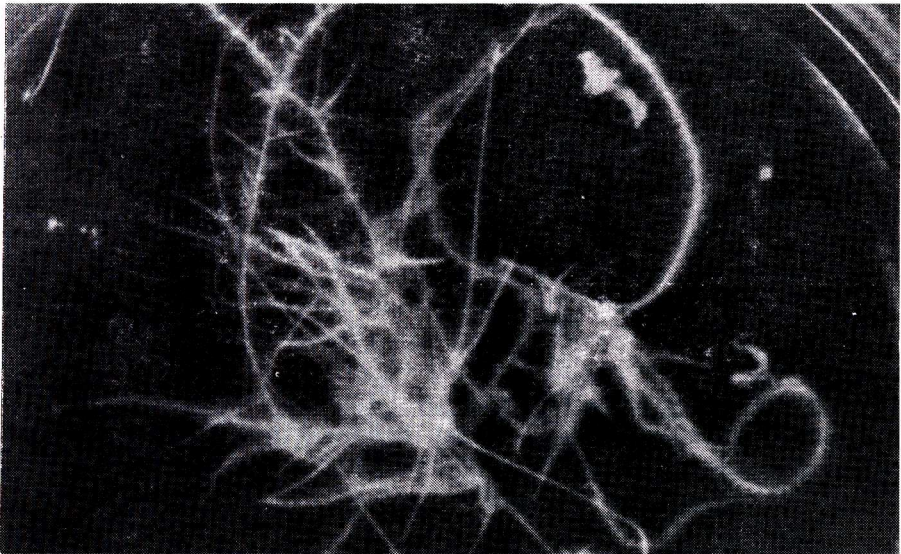
Tabel 1. Akar rambut dari berbagai jenis tanaman terong KB yang berhasil diperoleh melalui infeksi dengan *A. rhizogenes* galur A4, 15834, dan 07-2001.

| Spesies | Galur <i>A. rhizogenes</i> | Pertumbuhan | Regenerasi spontan |
|--------------------------|-------------------------------|-------------|-----------------------|
| <i>S. khasianum</i> | A4 | + | Ya |
| <i>S. laciniatum</i> | A4 | ++ | Tidak |
| | 15834 | ++ | Tidak |
| <i>S. mammosum</i> | A4 | + | Tidak |
| | 15834 | + | Tidak |
| <i>S. nigrum</i> | A4 | +++ | Tidak |
| | 15834 | +++ | Ya |
| | Kontrol | +++ | Ya |
| <i>S. melongena</i> (G) | A4 | + | Ya |
| <i>S. melongena</i> (BB) | A4 | + | Ya |
| <i>Solanum</i> sp1. | 15834 | + | Tidak |
| | 07-2001 | + | Tidak |

Keterangan: + (kurang); ++ (cukup); +++ (baik)

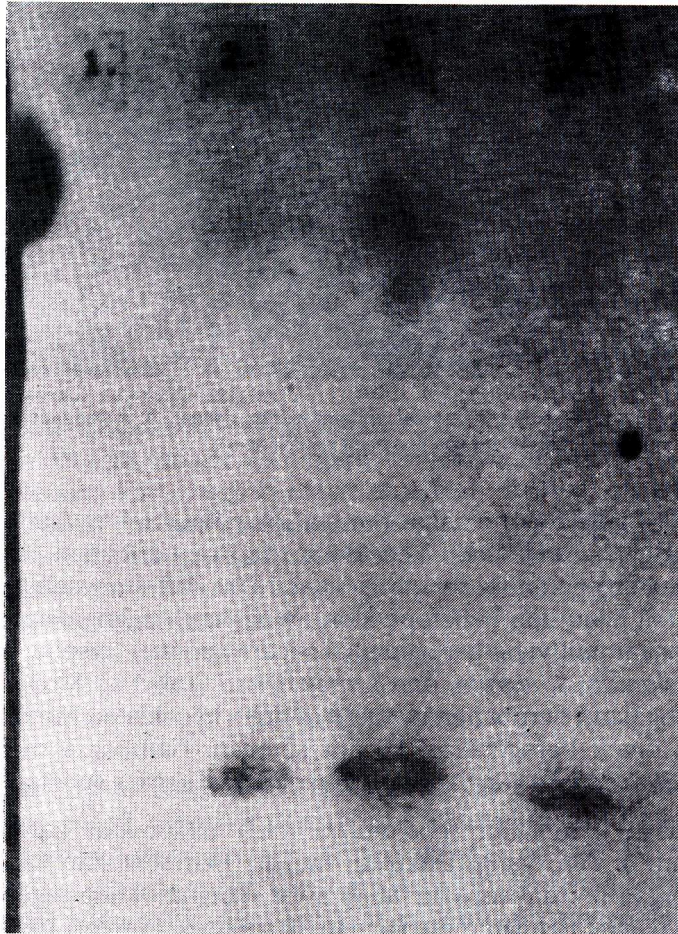


Gambar 1. Akar rambut yang baru muncul pada bagian eksplan daun dari *S. laciniatum*, empat minggu setelah inokulasi dengan *A. rhizogenes* galur 15834.

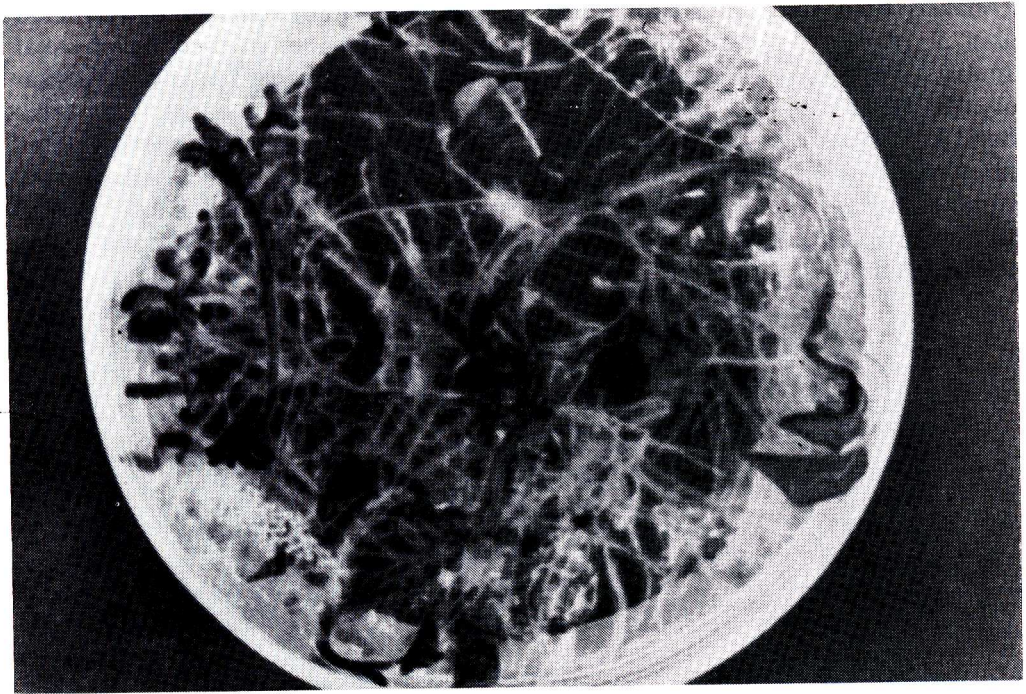


Gambar 2. Tipikal morfologi dari akar rambut *S. nigrum* hasil inokulasi dengan *A. rhizogenes* galur A4 yang telah dipotong dan dikulturkan secara aseptik.

Analisis opin yang dilakukan terhadap *S. nigrum* menunjukkan bahwa akar rambut *S. nigrum* A4 dan 15834 mampu mensintesis agropin, sedangkan akar normalnya (kontrol) tidak dapat mensintesis agropin. Ini sebagai tanda bahwa akar rambut *S. nigrum* A4 dan 15834 benar-benar telah mengalami transformasi oleh bakteri *A. rhizogenes* galur agropin (A4 dan 15834). Gambar 3 menunjukkan elektroforegram dari analisis agropin pada *S. nigrum* tersebut. Pada tahap awal pertumbuhannya, umumnya akar rambut tumbuh lambat karena adanya supresi pertumbuhan oleh penggunaan antibiotik cefotaxime. Namun setelah penggunaan antibiotik dihentikan, pertumbuhan akar rambut berubah menjadi lebih cepat.



Gambar 3. Elektroforegram dari analisis agropin pada *S. nigrum*. (1) akar kontrol; (2) standar agropin hasil ekstraksi dari bakteri *A. rhizogenes* galur A4; (3) akar rambut hasil infeksi dengan galur A4; (4) akar rambut hasil infeksi dengan galur 15834.



Gambar 4. Akar rambut dari *S. khasianum* hasil infeksi dengan *A. rhizogenes* galur A4 yang beregenerasi secara spontan pada kondisi terang.

Pada kondisi gelap, semua akar rambut yang diperoleh menunjukkan morfologi yang stabil dengan warna putih kecoklatan dan pertumbuhan yang relatif cepat. Pemindahan kultur ke kondisi terang (sekitar 1.000 lux) menyebabkan warna kultur berubah menjadi hijau dan beberapa klon mengalami regenerasi menjadi tanaman utuh. Klon akar rambut yang beregenerasi secara spontan tersebut adalah klon dari spesies *S. khasianum*, *S. nigrum*, dan *S. melongena* (Tabel 1). Klon dari spesies yang lain hanya mengalami perubahan warna dari putih kecoklatan menjadi hijau, namun tidak mampu untuk beregenerasi secara spontan. Gambar 4 menunjukkan akar rambut dari *S. khasianum* yang berhasil beregenerasi secara spontan.

Dari berbagai penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa perbanyakan tanaman secara *in vitro* yang dilakukan melalui pembentukan kalus, suspensi sel, embrio atau organ normal sebagai tahap awal sebelum tahap regenerasi umumnya menghasilkan planlet dengan mutu yang tidak seragam (Tepfer, 1990). Fenomena ini dikenal dengan istilah variasi somaklonal. Ditinjau dari segi ekonomi, khususnya dalam kasus ini, adanya variasi somaklonal tentu saja sangat merugikan karena dapat menyebabkan fluktuasi produksi dan turunnya produktivitas. Timbulnya variasi somaklonal tersebut diduga berkaitan erat dengan penggunaan hormon eksogen secara terus menerus untuk waktu yang lama, misalnya untuk pemeliharaan kultur

stok dalam bentuk kalus atau suspensi sel, yang dapat menyebabkan mutasi yang selanjutnya berakibat timbulnya variasi somaklonal.

Dalam beberapa kasus, seperti pada tomat (Van der Frits *et al.*, 1989), *Armoracia rusticana* (horseradish) (Uozumi *et al.*, 1992; 1994; Nakashimada *et al.*, 1996), *Ajuga reptans* (Tanaka dan Matsumoto, 1993), *Vinca minor* L. (Tanaka *et al.*, 1994) dan *Calystegia sepium* (Tepfer, 1990), tanaman hasil regenerasi dari akar rambut telah berhasil didapatkan. Namun kebanyakan dari tanaman tersebut adalah tanaman yang memang secara alamiah mempunyai sistem perbanyakan vegetatif dengan cara perbanyakan dari akar. Karena itu, tanaman-tanaman tersebut tidak dapat digunakan sebagai tanaman model karena kurang mewakili sebagian besar tanaman yang ada. Sampai saat ini ratusan akar rambut dari berbagai jenis tanaman telah berhasil diperoleh, namun sebagian besar dari akar rambut tersebut tidak mampu untuk beregenerasi (Tepfer, 1990). Jadi sampai saat ini mekanisme yang mengontrol proses regenerasi akar rambut masih belum dapat diungkap secara jelas.

Dari beberapa penelitian terdahulu telah memberikan petunjuk mengenai beberapa parameter kunci yang bertanggung jawab terhadap proses regenerasi akar rambut. Keterlibatan fitohormon dan cahaya pada proses regenerasi akar rambut telah dilaporkan pada tanaman horseradish (Saitou *et al.*, 1992), di mana pemberian auksin dan atau sitokinin eksogen ke dalam media pada kondisi terang sangat mempengaruhi frekuensi pembentukan tunas. Karena itu, diduga bahwa regenerasi spontan akar rambut horseradish pada media tanpa hormon pada kondisi terang disebabkan oleh meningkatnya level sitokinin endogen. Namun pembuktian dugaan ini belum pernah ditunjukkan secara empiris. Penelitian mengenai hal ini untuk akar rambut dari *Solanum* spp. yang berhasil diperoleh sedang berlangsung sebagai lanjutan dari penelitian ini. Tujuan utama dari kegiatan ini adalah untuk mengungkap secara jelas mekanisme yang melandasi proses regenerasi spontan dari akar rambut dan mengidentifikasi parameter-parameter kunci yang bertanggung jawab terhadap proses regenerasi akar rambut.

KESIMPULAN

Akar rambut dari berbagai jenis tanaman terong KB telah berhasil diperoleh. Pada kondisi yang cocok, sebagian akar rambut tersebut mampu untuk beregenerasi secara spontan menjadi tanaman utuh. Karena itu akar rambut dari tanaman terong KB dapat digunakan sebagai bahan untuk perbanyakan tanaman terong KB secara *in vitro*. Beberapa hal perlu untuk dikaji lebih lanjut, terutama mengenai masalah masih relatif rendahnya frekuensi regenerasi secara spontan, stabilitas kandungan solasodinnnya, dan identifikasi parameter-parameter kunci yang bertanggung jawab terhadap keberhasilan proses regenerasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Penelitian Riset Unggulan Terpadu IV (RUT IV) Bidang Bioteknologi tahun anggaran 1996/97. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Awan Purnawan, Eman Sulaiman, Suheni Sulaiman, dan Almaida atas bantuan teknis yang telah diberikan, dan kepada S. Jitno Rijadi atas bantuannya dalam pembuatan foto kultur.

DAFTAR PUSTAKA

- Aird, E.L.H., J.D. Hamill, and M.J.C. Rhodes. 1988.** Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15: 47-57.
- Christey, M.C. and B.K. Sinclair. 1992.** Regeneration of transgenic kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), rape (*B. napus*) and turnip (*B. campestris* var. *rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Plant Sci.* 87: 161-169.
- Januwati, S.M.D. Rosita, dan A. Abdullah. 1991.** Potensi *Costus* untuk bahan baku pil kontrasepsi. *Dalam* Zuhud, E.A.M (Ed.). *Prosiding Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan Obat dari Hutan Tropis Indonesia*. IPB, Bogor. hal. 260-266.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nakashimada, Y., N. Uozumi, and T. Kobayashi. 1996.** Efficient culture method for production of plantlets from mechanically cut horseradish hairy roots. *J. Ferment. Bioeng.* 81(1): 87-89.
- Petit, A., C. David, G. Dahl, J. Ellis, P. Guyan, F. Casse-Delbart, and J. Tempe. 1983.** Further extension of the opine concepts: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperates for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* 190: 204-214.
- Rosita, S.M.D., O. Rostiana, P. Wahid, dan D. Sitepu. 1991.** Program dan perkembangan penelitian tumbuhan obat Indonesia. *Dalam* Zuhud, E.A.M (Ed.). *Prosiding Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan Obat dari Hutan Tropis Indonesia*. IPB, Bogor. hal.137-158.
- Saitou, T., H. Kamada, and H. Harada. 1992.** Involvement of phytohormones in light induced adventitious shoot formation of horseradish hairy roots. *Plant Sci.* 86: 161-166.
- Subroto, M.A. 1991.** Characteristics of growth and solasodine production in *Solanum aviculare* aggregate cells and hairy roots. MAppSc. Thesis, Department of Biotechnology, The University of New South Wales, Sydney, Australia.

- Subroto, M.A. and P.M. Doran. 1994.** Production of steroidal alkaloids by hairy roots of *Solanum aviculare* and the effect of gibberellic acid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38: 93-102.
- Tanaka, N. and T. Matsumoto. 1993.** Characterization of *Ajuga* plants regenerated from hairy roots. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 10 (1): 78-83.
- Tanaka, N., M. Takao, and T. Matsumoto. 1994.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of *Vinca minor* L. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 11 (3): 191-198.
- Tepfer, D. 1990.** Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol. Plant.* 79: 140-146.
- Trevelyan, W.E., D.P. Procter, and J.P. Harrison. 1950.** Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature (London)* 166: 444-445.
- Uozumi, N., Y. Asano, and T. Kobayashi. 1994.** Micropropagation of horseradish hairy root by means of adventitious shoot primordia. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36: 183-190.
- Uozumi, N., Y. Nakashimada, Y. Kato, and T. Kobayashi. 1992.** Production of artificial seed from horseradish hairy root. *J. Ferment. Bioeng.* 74(1): 21-26.
- Van der Frits, M., A. van Dijk, P. Lindhout, and H. Dons. 1989.** Transformation of *L. esculentum* with T_L-DNA, T_R-DNA and the separate rol loci of *Agrobacterium rhizogenes*. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 39: 25-26.