

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΡΟΔΙΚΟΥ
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ *Trigonella foenum-
graecum*

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΧΙΟΝΙΔΟΥ ΕΙΡΗΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

Ανάπτυξη μεθοδολογίας παροδικού μετασχηματισμού
στην *Trigonella foenum-graecum*

Developing a technique for transient transformation of
Trigonella foenum-graecum

Τριμελής επιτροπή

Λιαδάκη Καλλιόπη (Επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της εργασίας αυτής και τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι υποχρέωση μου να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους που με βοήθησαν και συνέβαλαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στην πραγματοποίησή της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση του θέματος, τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθεια ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η παρούσα πτυχιακή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Λιαδάκη Καλλιόπη και και τον κύριο Καρπούζα Δημήτριο, που συγκροτούν μαζί με τη κ. Παπαδοπούλου την τριμελή επιτροπή, για την άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα, τον διδάκτορα Καραγκούνη Κώστα για τις πολύτιμες συμβουλές του και την υποστήριξη του. Τέλος, ευχαριστώ την Catalina Stedel και όλα τα μέλη του εργαστήριο ιολογίας και μικροβιολογίας, για την βοήθειά τους στην υλοποίηση του πειράματος και την άψογη συνεργασία μας.

<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u>	<u>ΣΕΛ.</u>
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
Α.ΣΚΟΠΟΣ	6
Β.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1. <i>Trigonella foenum-graecum</i>	6
2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	7
3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	8
4. ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ	9
4.1. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	10
4.1.1 ΔΙΟΣΓΕΝΙΝΗ	12
4.1.2 ΤΡΙΓΩΝΕΛΛΙΝΗ	14
5. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΜΑΤΙΩΝ	16
6. HAIRY ROOT- ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ «ΤΡΙΧΩΤΗ ΡΙΖΑ»	17
6.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	19
7. ΒΕΤΑΛΑΙΝΣ/ΜΠΕΤΑΛΑΙΝΕΣ	22
Γ.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
ΠΕΙΡΑΜΑ Α.:ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella foenum-graecum</i>	
-HAIRY ROOT	26
1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ px11	26
2.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>Escherichia coli</i>	26
2.1ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ	29
2.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>Escherichia coli</i>	
ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ px11	30
2.3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΑΠΟ	
ΚΥΤΤΑΡΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ	31
3.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	
<i>Arqua1</i>	32
3.1 <i>Agrobacterium rhizogenes Arqua1</i>	32
3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	
<i>Arqua1</i> ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ	32
3.3ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>Agrobacterium</i>	

<i>rhizogenes Arqua1</i> ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ px11	33
4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella foenum-graecum</i>	34
5. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ <i>Trigonella foenum-graecum</i> –HAIRY ROOT	35
5.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ	
<i>Trigonella foenum-graecum</i> –HAIRY ROOT	35
6. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ HAIRY ROOT, ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	37
6.1 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella foenum-graecum</i>	
ΜΕ <i>Agrobacterium rhizogenes Arqua1</i> pUBI-GWS-GFP	37
6.1.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ pUBI-GWS-GFP	38
6.1.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΡΙΖΩΝ ΜΕ ΤΟ	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ CTAB	39
6.1.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	40
6.1.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	42
6.2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella foenum-graecum</i>	
ΜΕ <i>Agrobacterium rhizogenes Arqua1</i> px11	43
ΠΕΙΡΑΜΑ Β.: ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	44
1. ΡΙΖΟΒΙΟ <i>Sinorhizobium meliloti</i> ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ	44
1.1 ΡΙΖΟΒΙΟ <i>Sinorhizobium meliloti</i>	44
2. ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella foenum-graecum</i> ΜΕ ΡΙΖΟΒΙΟ	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	45
3. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ	46
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
ΠΕΙΡΑΜΑ Α: ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella</i>	
<i>foenum-graecum</i> –HAIRY ROOT	46
1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella foenum-graecum</i>	46
2. HAIRY ROOT ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella foenum-graecum</i>	47
2.1 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella</i>	
<i>foenum-graecum</i> ΜΕ <i>Agrobacterium rhizogenes Arqua1</i> pUBI-GWS-GFP	48
2.1.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ	
ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	48
2.1.2 <i>Trigonella foenum-graecum</i> ΜΕ <i>Agrobacterium rhizogenes Arqua1</i> px11	50

ΠΕΙΡΑΜΑ Β: ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΡΙΖΟΒΙΟ	51
1. ΦΥΜΑΤΙΑ ΦΥΤΩΝ <i>Trigonella foenum-graecum</i> ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΘΗΚΑΝ ΜΕ ΡΙΖΟΒΙΟ <i>Sinorhizobium meliloti</i>	52
2. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΜΕ GFP	54
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Trigonella foenum-graecum*, γνωστή ως Τριγωνέλλα, είναι ένα μικρό, ετήσιο ψυχανθές που χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς, ως τροφή, καρύκευμα, βαφή, και ως κτηνοτροφικό φυτό. Τα διάφορα φυτοχημικά που βρίσκονται στη Τριγωνέλλα, όπως τα στεροειδή, αλκαλοειδή και φλαβονοειδή, αποτελούν τη βάση της διαδεδομένης χρήσης του στην ιατρική. Η Τριγωνέλλα μπορεί να είναι μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και χρήσιμων ουσιών με βιοτεχνολογικές μεθόδους λόγω του μικρότερου κύκλου καλλιέργειάς της, του χαμηλότερου κόστους παραγωγής, της συνεπούς απόδοσης και ποιότητάς της. Μια γρήγορη και αποδοτική τεχνική μετασχηματισμού του φυτού είναι ο μετασχηματισμός των ριζών του-hairy root, η οποία περιλαμβάνει τον υψηλό ρυθμό ανάπτυξης ριζών και κατ' επέκταση των χρήσιμων ουσιών που παράγονται σε αυτές. Στην παρούσα εργασία, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μεθοδολογίας παραγωγής διαγονιδιακών ριζών στο φυτό-hairy root αλλά και η φυματογένεση στη Τριγωνέλλα. Για την επιβεβαίωση της ανάπτυξης της μεθοδολογίας αυτής προσπαθήσαμε να παραγάγουμε τη χρωστική μπεταλαΐνης μέσω της μόλυνσης του φυτού με το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* ARQUA1, που οδηγεί στην υπερέκφραση τριών γονιδίων από τα φυτά *Mirabilis Jalap* και πατζαριού (*Beta vulgaris*). Ωστόσο, δεν καταφέραμε την ανάπτυξη κόκκινων μετασχηματισμένων ριζών.

ABSTRACT

Trigonella foenum-graecum, or Fenugreek, is a small seeded annual legume used for: medical purposes as a dye, as a food, for food seasoning, and as a fodder plant. Various phytochemicals, found in Fenugreek, such as steroids, alkaloids, and flavonoids are widely used in medicine. Fenugreek offers a viable alternative solution for the production of secondary metabolites and useful substances because of its short life, low production cost and consistent, quality yield. *Agrobacterium*-mediated hairy root transformation offers a quick and efficient plant transformation technique that leads to increased root-growth in many plant species, offering a platform with greater biomass that can lead to increased production of useful substances. This work discusses the attempt to establish both nodulation and the hairy-root transformation techniques of Fenugreek. As a proof of principle we tried to introduce the betalain biosynthetic pathway using *Agrobacterium rhizogenes* strain ARQUA1. The reconstituted betalain biosynthetic pathway comprised of three genes from the plants *Mirabilis jalapa* and beet (*Beta vulgaris*) has been successfully introduced in a number of red species and leads to the accumulation of the easily detectable red betalain pigment. However, in all attempts to date, red transgenic roots were not developed as expected.

A.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την παραγωγή διαγονιδιακών ριζών στο φυτό *Trigonella foenum-graecum*, μέσω της μόλυνσης του με το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* με στόχο την μελέτη της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται στις ρίζες αυτού του φαρμακευτικού φυτού. Επιπλέον, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών με υπερέκφραση τριων γονιδίων από τα φυτά *M. Jalap* και πατζαριού (*Beta vulgaris*) για την παραγωγή βηταλαΐνης. Η παραγωγή αυτής της χρωστικής στις διαγονιδιακές ρίζες, αποτελεί μια άμεση επιβεβαίωση της επιτυχίας του μετασχηματισμού με γυμνό οφθαλμό, αλλά και την επίτευξη παραγωγής καινοφανών μεταβολιτών στις ρίζες της τριγωνέλλας. Τέλος, στην παρούσα εργασία έγινε ανάπτυξη μεθοδολογίας για την επιτυχή φυματογένεση στο φυτό με το ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*.

B.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. *Trigonella foenum-graecum*

Η Τριγωνέλλη ή Τριγωνέλλα η Ελληνική (*Trigonella foenum-graecum* L.) ή Τριγωνίσκος η Τήλις, χόρτος των Ελλήνων, τριγωνίσκος, Ελληνικός σανός, μοσχοσίταρο, τηντιλίδα, τηντιλίνα, τήλι, γραικόχορτο, Ελληνικό τριφύλλι, νυχάκι, στροφίλι, χέλμπα ή τσιμένι (Πλατής, 2003) (αγγλ. fenugreek), είναι ένα ετήσιο φυτό της οικογένειας των Χεδρωπών ή Κυαμοειδών (Fabaceae). Καλλιεργείται σε ολόκληρο τον κόσμο ως ημίξηρη καλλιέργεια και οι σπόροι του είναι ένα κοινό συστατικό στα φαγητά από την Ινδική χερσόνησο. Η *T. foenum-graecum*, κοινώς γνωστή ως Τριγωνέλλα, είναι ένα μικρό, εμβολιαζόμενο, ετήσιο δικοτυλήδονο ψυχανθές που ανήκει στην υποοικογένεια Papilionaceae, οικογένεια Fabaceae (Martin et al., 2011). Οι σπόροι και τα φύλλα χρησιμοποιούνται για ιατρικούς σκοπούς, ως τροφή, βαφή, και ως κτηνοτροφικό φυτό. Το φυτό χρησιμοποιείται επίσης ως γευστικός παράγοντας στην ινδική και ελβετική κουζίνα (Syeda et al., 2008; Snehlata et al., 2008; Basu et al., 2014).

Η Τριγωνέλλα είναι ετήσιο, δικοτυλήδονο, αυτο-γονιμοποιούμενο φυτό. Τα φύλλα είναι τρίφυλλα, εναλλακτικά, αποτελούμενα από τρία οδοντωτά ωοειδή φυλλάρια. Τα λουλούδια, μεμονωμένα ή σε ομάδες των δύο, εκβάλουν στις μασχάλες των φύλλων και είναι λευκά ή υποκίτρινα έως μοβ ανοικτό και παρουσιάζουν τριγωνικό σχήμα (έτσι προκύπτει και το όνομα του γένους, *Trigonella*, που εξάγεται από παλιά Ελληνική λέξη που σημαίνει «τρεις γωνίες») και χαρακτηρίζεται από στεφάνη

ψυχανθών. Δύο τύποι λουλουδιών μοσχοσίταρου έχουν περιγραφεί κλειστόγαμα (κλειστά) και ανοικτόγαμα (ανοιχτά) λουλούδια. Η πρώτη είναι η συνήθως παρατηρούμενη μορφή. Ο καρπός είναι ένας επιμήκης τοξωτός λοβός. Οι ώριμοι σπόροι είναι πολύ σκληροί, επιπεδωμένοι, χρώματος ανοιχτού έως κοκκινωπού καφέ και χαρακτηρίζονται από ένα αυλάκι που σκιαγραφεί δύο άνισα μέρη (Basu, 2006; Basu et al., 2014).

Η *Trigonella* L. περιλαμβάνει περίπου 135 είδη σε όλο τον κόσμο (Martin et al., 2011). Ο ακριβής αριθμός των ειδών της Τριγωνέλλα δεν είναι γνωστός. Ο ταξινομιστής Linnaeus πρότεινε 260 είδη μοσχοσίταρου, των οποίων μόνο 18 είναι σήμερα αναγνωρισμένα. Τα *T. foenum-graecum*, *T. balansae*, *T. corniculata*, *T. maritima*, *T. spicata*, *T. occulta*, *T. polycerata*, *T. calliceras*, *T. cretica*, *T. caerulea*, *T. lilacina*, *T. radiata*, *T. spinos* έχουν σημασία στην ιατρική (Mehrafarin et al., 2011; Aasim et al., 2014).

Τα περισσότερα είδη είναι διπλοειδή, συμπεριλαμβανομένου του *T. foenum-graecum* L. ($2n = 16$ χρωμοσώματα). Ωστόσο, ορισμένα είδη Τριγωνέλλας περιέχουν 18, 28, 30, 32 ή 44 χρωμοσώματα (Aasim et al., 2014). Το μέγεθος του γονιδιώματος του *T. foenum-graecum* είναι περίπου 685 Mbp, το οποίο είναι περίπου 1,5 φορά μεγαλύτερο από αυτό των φυτών-μοντέλων ψυχανθών, *Lotus corniculatus* L. var. *japonicus* Regel [συντομογραφία: *Lotus japonicus* (Regel) K Larsen] και βαρέλι barrel (*Medicago truncatula* Gaertn.), τα οποία έχουν συμπαγή γονιδιώματα μεγέθους περίπου 470 Mbp (Young et al., 2003).

2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΗΣ *T. foenum-graecum*

Η ακριβής προέλευση του γένους *T. foenum-graecum* εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζήτησης. Η Τριγωνέλλα πιστεύεται ότι είναι ενδημική στην περιοχή του «παλαιού κόσμου» της Μεσογείου, ενώ μια εναλλακτική ασιατική προέλευση της καλλιέργειας έχει προταθεί, αφού υπάρχει και χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια στην Ινδία, τη Νότια Κίνα και τη Μέση Ανατολή (Basu et al., 2014).

Η Τριγωνέλλα η Ελληνική πιστεύεται ότι έχει έρθει για καλλιέργεια από την Εγγύς Ανατολή. Ενώ οι Zohary και Hopf δεν είναι βέβαιοι, ως προς το ποιο άγριο στέλεχος του γένους *Trigonella* προκάλεσε τον εξημερωμένο τριγωνίσκο. Απανθρακωμένοι σπόροι τηντιλίδας έχουν ανακτηθεί από το Tell Halal, του Ιράκ, (με ραδιοχρονολόγηση από το 4000 π.Χ.) και στα επίπεδα της Εποχής του Χαλκού της

Λαχίς και αποξηραμένοι σπόροι από το τάφο του Τουταγχαμών. Ο Κάτων ο πρεσβύτερος, καταγράφει το μοσχοσίταρο με τριφύλλι και το λαθούρι, ως τις καλλιέργειες για τις ζωοτροφές (Cato the Elder, ≈160π.Χ.). Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι, χρησιμοποιούσαν τους σπόρους ως θυμίαμα και στις ταριχεύσεις. Οι Ρωμαίοι θεωρούσαν τα φύλλα της, ως πολύτιμη ζωοτροφή. Στη μεσαιωνική Ευρώπη, καλλιεργούνταν το τσιμένι σε μεγάλη έκταση ως μπαχαρικό φυτό, στους αυτοκρατορικούς κήπους του Καρλομάγνου (Πλατής, 2003).

3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Σημαντικές χώρες παραγωγής Τριγωνέλλας (ή μοσχοσίταρου) είναι: το Αφγανιστάν, το Πακιστάν, η Ινδία, το Ιράν, το Νεπάλ, το Μπαγκλαντές, η Αργεντινή, η Αίγυπτος, η Γαλλία, η Ισπανία, η Τουρκία και το Μαρόκο. Ο μεγαλύτερος παραγωγός είναι η Ινδία, όπου τα κρατίδιά της με την μεγαλύτερη παραγωγή είναι: το Ρατζαστάν, το Γκουτζαράτ, το Ουταράχαντ, το Ούταρ Πραντές, το Μάντια Πραντές, το Μαχαράστρα, το Χαρυάνα και το Πουντζάμπ. Το Ρατζαστάν, αντιπροσωπεύει πάνω από το 80% της παραγωγής της Ινδίας.

Επί του παρόντος, η καλλιέργεια Τριγωνέλλας εξαπλώνεται γύρω από τη Μεσόγειο και στη δυτική ακτή της Μαύρης Θάλασσας. Η παρουσία του σημειώνεται επίσης στη Μέση Ανατολή, την Αίγυπτο και την Αιθιοπία. Καλλιεργείται και σε άλλα μέρη της Βόρειας Αφρικής (Μαρόκο, Τυνησία), την ινδική υποήπειρο, την Κίνα, τη Μεσογειακή Ευρώπη, το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γαλλία, την Ουκρανία, τη Ρωσία και, πρόσφατα, στην Αυστραλία και τη Βόρεια Αμερική (Acharya et al., 2007a). Εξακολουθεί να είναι μια μικρής έκτασης καλλιέργεια στην ήπειρο της Βόρειας Αμερικής (Καναδάς και ΗΠΑ). Η Tristar είναι η πρώτη ποικιλία Τριγωνέλλας που κυκλοφόρησε στην ήπειρο της Βόρειας Αμερικής (Acharya et al., 2007a). Ωστόσο, εκτός από την παραγωγή ζωοτροφών, η καλλιέργεια αρχίζει σιγά-σιγά να έλκει την προσοχή φαρμακευτικών βιομηχανιών. Προϊόντα με βάση την Τριγωνέλλα, όπως τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής πωλούνται σε πολλά καταστήματα στην Ασία, τη Βόρεια Αφρική, την Αυστραλία, τη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη (Basu et al., 2014).

Η καλλιέργεια χρειάζεται συνθήκες ζεστού και ξηρού κλίματος για τη σωστή ανάπτυξή της. Υπάρχουν διάφορα είδη Τριγωνέλλας, όπως *T. foenum-graecum* L., *T. caerulea* (L.) Ser., *Medicago monspeliaca* (L.) Trautv. (= *T. monspeliaca* L.), *Medicago*

orthoceras (Kar. & Kir) Trautv. (= *T. polycerata* M. Bieb.), *Trifolium baccarinni* Chiov. (= *T. marginata* Baker) Hochst. & Steud., *T. suavissima* Lindl., *T. corniculata* Sibth. & Sm. κ.λπ. Ωστόσο, στατιστικά στοιχεία για την καλλιέργεια είναι διαθέσιμα μόνο για την *T. foenum-graecum* L. Η Ινδία παράγει την πλειονότητα των ποσοτήτων Τριγωνέλλας σε όλο τον κόσμο (Basu et al., 2014). Το μοσχοσίταρο είναι σε μεγάλο βαθμό αυτογονιμοποιούμενο φυτό, γεγονός το οποίο κάνει τον υβριδισμό του πολύ δύσκολο σε συνθήκες καλλιέργειας. Γι' αυτό, ο πιθανός τρόπος αναπαραγωγής είναι οι τεχνητές μεταλλάξεις και η χρήση βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων. Έχει παραχθεί ένας αριθμός μεταλλακτών με εφαρμογή χημικών μεταλλαξιογόνων όπως το αιθυλο-μεθανο-σουλφονικό (EMS), το αζίδιο του νατρίου (NaN_3) και το μεθυλο-μεθανο-σουλφονικό (MMS), σε σπόρους, συμπεριλαμβανομένων τετραπλοειδών φυτών με οικονομικά χαρακτηριστικά (Aasim et al., 2014).

Πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη δράση των χημικών μεταλλαξιογόνων που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες. Φυτικά κύτταρα και καλλιέργεια ιστών Τριγωνέλλας έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπως η διοσγενίνη και η τριγονελλίνη (Ramesh et al., 2010; Aasim et al., 2014). Ακόμη και από ρίζες. Η ζήτηση των μεταβολιτών Τριγωνέλλας με υψηλό περιεχόμενο σε διοσγενίνη και τριγονελλίνη αυξάνει την ανάπτυξη των πρωτοκόλλων καλλιέργειας ιστού (Mehrafarin et al., 2010; Aasim et al., 2014).

Πρόσφατα, οι σπόροι του αναγνωρίστηκαν ως μια σημαντική πηγή για από του στόματος αντισυλληπτικά και ως εκ τούτου είναι μια πιθανή λύση για την αύξηση του πληθυσμού των αναπτυσσόμενων χωρών (Basu et al., 2014).

4. ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΤΡΙΓΩΝΕΛΛΑ

Η Τριγωνέλλα είναι ένα από τα παλαιότερα και πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φαρμακευτικά φυτά που έχουν κερδίσει μια ιδιαίτερη θέση στην παραδοσιακή Ινδική, Αιγυπτιακή και Ελληνική φαρμακευτική, για διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές τους. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ως κτηνοτροφικό φυτό και προστίθενται στον κατώτερο σανό inferior hay για να βελτιώσει την οσμή του. Οι σπόροι και τα φύλλα του έχουν χρησιμοποιηθεί όχι μόνο ως τρόφιμα, αλλά και ως παραδοσιακά φάρμακα. Είναι γνωστό ότι έχει αντιδιαβητική, αντιμυκητιασική, αντιβακτηριακή, ανοσο-διαμορφωτική, αντι-φλεγμονώδη, και αντιπυρετική δράση (Shahabzadeh et al., 2013).

Τα διάφορα φυτοχημικά που βρίσκονται στο μοσχοσίταρο, όπως τα στεροειδή, αλκαλοειδή και φλαβονοειδή, αποτελούν τη βάση της διαδεδομένης χρήσης του στην ιατρική (Basu et al., 2014).

Τα φύλλα του *T. foenum-graecum* συνήθως καταναλώνονται ως λαχανικό και περιέχουν πρωτεΐνες (25,0%), άμυλο (25,9%), ουδέτερες απορρυπαντικές ίνες (12,9%), κόμμι (4,3%), τέφρα (10,8%) και λιπίδια (6,5%). Αποτελεί πλούσια πηγή ασβεστίου, σιδήρου, β-καροτένιου και άλλων βιταμινών. Ενώ οι σπόροι χρησιμοποιούνται συνήθως ως καρύκευμα σε παρασκευάσματα διατροφής λόγω ισχυρής γεύσης και αρώματος και περιέχουν λιπίδια σε ποσοστό 6-10%, υδατάνθρακες σε ποσοστό 44 έως 59% και πρωτεΐνες 20-30% με υψηλή περιεκτικότητα σε λυσίνη και τρυπτοφάνη (Aasim et al., 2014).

Επιπρόσθετα, στην Τριγωνέλλα περιέχονται αλκαλοειδή πυριδινο-τύπου, κυρίως τριγονελλίνη (0,2 έως 0,36%) χολίνη (0.5%), gentianine (ή Long χολίνη) και capraine, φλαβονοειδή, όπως απιγενίνη, λουτεολίνη, οριεντίνη, κουερσετίνη, βιτεξίνη και ισοβιτεξίνη· ελεύθερα αμινοξέα, όπως 4- υδροξυϊσολευκίνη (0,09%)· αργινίνη, ιστιδίνη και λυσίνη· ασβέστιο και σίδηρο· σαπωνίνες (0.6-1.7%)· γλυκοζίτες που αποδίδουν στεροειδείς σαπωνίνες με υδρόλυση [(διοσγενίνη, Yarm σαπωνογένης/yamogenin, τιγογενίνη, νεοτιγογενίνη και τριγογενίνη) χοληστερόλη και σιτοστερόλη· βιταμίνες A, B1, C και νικοτινικό οξύ· ενώσεις κουμαρίνης και 0,015% πτητικά έλαια (n-αλκάνια και σεσκιτερπένια)] (Krishnaswamy, 2008). Σμιλαγενίνη, σαρσασαπογενίνη, και yucca σαπωνίνες (yuccagenin, ήσσονος σημασίας στεροειδείς σαπωνίνες) έχουν επίσης απομονωθεί από τους σπόρους (Krishnaswamy, 2008; Kaur et al., 2011).

Συγκεκριμένα, τρία είναι τα σημαντικά χημικά συστατικά με φαρμακευτική αξία που έχουν τοποθετήσει το μοσχοσίταρο στα πιο κοινώς αναγνωρισμένα προϊόντα «φαρμακοτροφίμων» ή υγιεινής διατροφής, οι (i) στεροειδείς σαπωνίνες, (ii) γαλακτομαννάνες και (iii) ισολευκίνη (Acharya et al., 2006).

4.1. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Η χρησιμότητα της παραγωγής Τριγωνέλλας ως εμπορικό φυτό, ως χημική πρώτη ύλη και φαρμακευτικό φυτό, έγκειται σε:

- α) στις δύο κύριες μεταβολικές παραγωγές, συμπεριλαμβανομένης της διοσγενίνης και τριγονελλίνης ως υποχοληστεριναιμικά και αντι-διαβητικά συστατικά
- β) στην ικανότητα αυτού του φυτού σε αύξηση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών με βιοτεχνολογικές μεθόδους

γ) στην απουσία παρενεργειών, σε σύγκριση με την συνθετική διοσγενίνη ή τριγονελλίνη

δ) στη σύντομη καλλιεργητική περίοδο (ωρίμανση περίπου σε 3-5 μήνες από τη σπορά) με χαμηλό κόστος παραγωγής

ε) στην προσαρμογή σε διαφορετικά περιβάλλοντα και διάφορα κλίματα

στ) στο υψηλό δυναμικό απόδοσης της καλλιέργειας (Mehrafarin et al. 2010).

Υπάρχει ανάγκη για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το πώς μπορεί να γίνει η διαχείριση των δευτερογενών μεταβολιτών και της βιοσύνθεσης χημικών συστατικών για ιατρικούς σκοπούς (Mehrafarin et al. 2010).

Η μεταβολική μηχανική των φυσικών προϊόντων στοχεύει στη βελτίωση των φαρμακευτικών φυτών, μέσω τεχνολογιών της σύγχρονης μοριακής βιολογίας. Είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση των μηχανισμών βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών της Τριγωνέλλας, προκειμένου να προχωρήσει η παραγωγή τους δευτερογενών μεταβολιτών. Με αποτέλεσμα, η ταυτοποίηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών να είναι κατάλληλη για ιατρική χρήση και περαιτέρω ερευνητικές προσπάθειες (Mehrafarin et al. 2010).

Ορισμένες πολύ σημαντικές τεχνικές και μέθοδοι που εφαρμόζονται για την αύξηση του περιεχομένου της Τριγωνέλλας σε δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι οι ακόλουθες:

α) την καλλιέργεια ιστού

β) την καλλιέργεια κυτταρικού αιώρηματος

γ) την καλλιέργεια ριζικών τριχιδίων

δ) βιολογικούς χειρισμούς

ε) υβριδοποίηση

στ) τη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης των φυτών

ζ) χημικά μεταλλαξιγόνα

η) ακτινοβολία (Mehrafarin et al. 2010).

Η μεταβολική μηχανική της Τριγωνέλλας είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την αύξηση της απόδοσης, τόσο της διοσγενίνης όσο και της τριγονελλίνης και της αλλαγής της διανομής τους. Υπάρχουν ορισμένες δυνατότητες για την αύξηση της διοσγενίνης και της τριγονελλίνης που εμπεριέχονται στον σπόρο, είτε κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, χρησιμοποιώντας διαφορετικές καλλιεργητικές τεχνικές,

είτε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, είτε μετά τη συγκομιδή, με διάφορες τεχνικές (ένζυμα, ορμόνες, κ.λπ.) εκβλάστησης με επώαση, διαφορετικές συνθήκες επώασης και ζύμωσης με αποθήκευση, με τη χρήση καλλιέργειας ιστών και κυτταρικής καλλιέργειας (στατική ή εναιώρημα) και με βιολογικό χειρισμό της απόδοσης σε στεροειδή και αλκαλοειδή. Τέλος, το συμπέρασμα που συνάγεται για το μέλλον του fenugreek ως πηγή διοσγενίνης και τριγονελλίνης, είναι πολλά υποσχόμενο και οικονομικό (Mehrafarin et al. 2010).

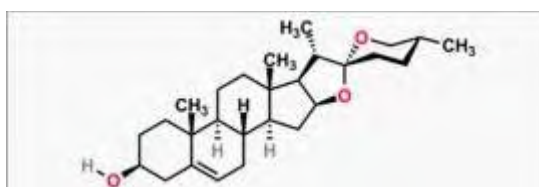
4.1.1 ΔΙΟΣΓΕΝΙΝΗ

Οι σαπωνίνες, ευρέως κατανεμημένες στο φυτικό βασίλειο, περιλαμβάνουν μια ποικιλόμορφη ομάδα ενώσεων που χαρακτηρίζονται από δομή που περιέχει μια στεροειδή ή τριτερπενοειδή αγλυκόνη και μια ή περισσότερες αλυσίδες σακχάρου. Η δομική ποικιλία τους αντικατοπτρίζεται στις φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες, οι οποίες αξιοποιούνται σε μια σειρά από παραδοσιακές και βιομηχανικές εφαρμογές (Arivalagan et al., 2013).

Οι σπόροι της Τριγωνέλλας περιέχουν 4,8% σαπωνίνες, με τη μορφή της διοσγενίνης, yamogenin, τιγογενίνης, neotigogenin, yuccagenin, lilagenin, gitogenin, neogitogenin, sarsapogenin και σμιλαγενίνης. Μεταξύ τους, η διοσγενίνη (5α-spirostan-3β-όλη) αποτελεί την κύρια στεροειδή σαπωνίνη (Mullaicharam et al., 2013).

Η διοσγενίνη χρησιμοποιείται συχνά ως πρώτη (ακατέργαστη) πρόδρομος για την παραγωγή στεροειδών φαρμάκων και ορμονών, όπως η τεστοστερόνη, τα γλυκοκορτικοειδή και η προγεστερόνη. Μελέτες αποκαλύπτουν ότι ένα μέγιστο επίπεδο διοσγενίνης βρέθηκε σε νεαρά φύλλα (20 mg g⁻¹ ξηρού βάρους) και σε ώριμους σπόρους, στους οποίους το ποσοστό κυμαίνεται μεταξύ 0,28 - 0,92%.

Δομικά, η διοσγενίνη είναι μια σαπωνίνη της spirostanol που αποτελείται από ένα υδρόφιλο, δραστικά ενεργό τμήμα σακχάρου που συνδέεται με ένα υδρόφοβο στεροειδές αγλυκόνης και είναι παρόμοιο με τη χοληστερόλη και άλλα στεροειδή.



Χημική δομή διοσγενίνης

Από την ανακάλυψή της η διοσγενίνη μια πολύ σημαντική σαπωνίνη που βρέθηκε σε σπόρους μοσχοσίταρου, είναι η μοναδική πρόδρομη ουσία που

χρησιμοποιείται για την παρασκευή συνθετικών στεροειδών στη φαρμακευτική βιομηχανία (Raju and Rao, 2012). Εμφανίζεται φυσικά ως μία γλυκοζυλιωμένη ένωση στο fenugreek, και μπορεί να απελευθερωθεί με όξινη υδρόλυση (η οποία αφαιρεί τρία κατάλοιπα υδατάνθρακα) της διοσκίνης, μιας στεροειδούς σαπωνίνης. Συντίθεται ως μέρος της οδού του melanolate στη βιοσύνθεση στεροειδών (C-18 – C-30). Η στεροειδής διοσγενίνη σχηματίζεται με τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης, στην οποία μια δομή σπειροκετάλης σχηματίζεται στο C-22, δίδοντας μια μη-πολική ένωση με 6 δακτυλίους άνθρακα (Laila and Murtaza, 2015).

Οι σαπωνίνες διοσγενύλης, που είναι στεροειδείς γλυκοζίτες και φέρουν διοσγενίνη ως αγλυκόνη, βρίσκονται συχνά ως κύρια συστατικά στα παραδοσιακά ανατολίτικα φάρμακα ως αντιυπερχοληστεροαιμικοί, αντιυπερτριακυλ-γλυκερολαιμικοί (antihypertriacylglycerolemic), αντι-διαβητικοί και αντιυπεργλυκαιμικοί παράγοντες (Manivannan et al., 2013).

Επιπλέον, υπάρχει σημαντικό εμπορικό ενδιαφέρον στην καλλιέργεια του fenugreek για το υψηλό περιεχόμενο σε σαπωνίνες. Οι σαπωνίνες, έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν υποχοληστερολαιμική, καθώς και αντιδιαβητική δραστηριότητα (Wani et al., 2012).

Ανάλογα με βιογεωγραφική προέλευση, τους γονοτυπικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, το περιεχόμενο διοσγενίνης που έχει αναφερθεί ότι περιέχεται σε σπόρους μοσχοσίταρου, ποικίλει μεταξύ 0,1% και 0,9% (Snehlata and Payal, 2012).

Η σαπωνίνη, ως φυσικό στεροειδές που περιέχεται στο fenugreek, έχει αποδειχθεί ότι έχει ευνοϊκές επιδράσεις στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης, στην αντιοξειδωτική δράση, στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αυτή η ένωση έχει βρεθεί ότι μετριάζει το οξειδωτικό στρες και τη δυσλιπιδαιμία που επάγεται από τον ΣΔ, σε επίμυες με διαβήτη τύπου 2, πράγμα το οποίο είναι ζωτικής σημασίας για τους καρδιο-μεταβολικούς κινδύνους από τη διαμόρφωση των PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors, υποδοχείς ενεργοποιημένοι από παράγοντα πολλαπλασιασμού υπεροξειδιοσωμάτων) (Laila and Murtaza, 2015).

Ακόμη, η Τριγωνέλλα έχει αναφερθεί ότι βελτιώνει τον διαβήτη τύπου 2 σε παχύσαρκους ποντικούς KK-Ay, με την προώθηση της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και την αναστολή της φλεγμονής στους λιπώδεις ιστούς και αναφέρθηκε ότι μεσολαβούνται επιδράσεις από τη διοσγενίνη. Έτσι, η καλύτερα τεκμηριωμένη ιατρική χρήση των σπόρων μοσχοσίταρου είναι ο έλεγχος του σακχάρου στο αίμα, και στους δύο τύπους ΣΔ.

Είναι γνωστό ότι η διοσγενίνη μειώνει τη χοληστερόλη του πλάσματος με την αύξηση της έκκρισης χοληστερόλης στα κόπρανα. Επομένως, η υποχοληστερολαιμική επίδραση της διοσγενίνης που περιέχεται στην τροφή, με την αύξηση της απέκκρισης της χοληστερόλης στα κόπρανα, οφείλεται κυρίως στις επιπτώσεις της στον ηπατικό μεταβολισμό της χοληστερόλης και όχι στην απορρόφηση της χοληστερόλης στο λεπτό έντερο (Laila and Murtaza, 2015).

Η διοσγενίνη έχει επίσης βρεθεί ότι διαθέτει αντικαρκινογόνες ιδιότητες, όπως η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η επαγωγή της απόπτωσης σε μια ποικιλία καρκινικών κυττάρων. Έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει τη μετανάστευση και την εισβολή των PC-3 κυττάρων με μείωση της έκφρασης των MMPs (matrix metalloproteinases, μεταλλοπρωτεϊνάσες της μεσοκυττάριας ουσίας), αναστολή των ERK, JNK και PI3K/Akt σηματοδοτικών οδών καθώς και την NF-κB δραστηριότητα, και γι' αυτό αποτελεί μια πιθανή νέα θεραπευτική δυνατότητα στα πλαίσια της αντιμεταστατικής θεραπείας (Laila and Murtaza, 2015).

Πρόσφατα, η διοσγενίνη από fenugreek έχει αναφερθεί ότι βελτιώνει τον διαβήτη τύπου 2 σε παχύσαρκους διαβητικούς, προωθώντας τη διαφοροποίηση λιποκυττάρων και αναστέλοντας της φλεγμονή σε λιπώδεις ιστούς (Laila and Murtaza, 2015).

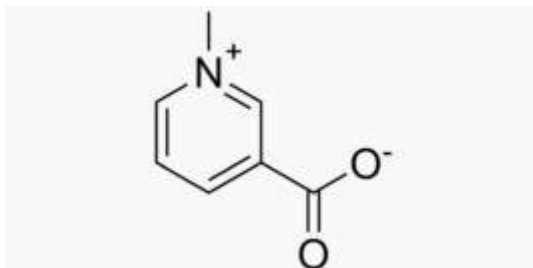
Η Τριγωνέλλα μπορεί να είναι μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για την παραγωγή διοσγενίνης λόγω του μικρότερου κύκλου καλλιέργειάς της, του χαμηλότερου κόστους παραγωγής, και της συνεπούς απόδοσης και ποιότητάς της. Οι ερευνητές προσπαθούν να παράγουν βελτιωμένες ποικιλίες από συμβατική καλλιέργεια, με τεχνικές γενετικής μηχανικής. Η γνώση των ενδιάμεσων χημικών συστατικών κατά την βιοσυνθετική οδό της διοσγενίνης, βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη. (Vaidya et al., 2013).

4.1.2 ΤΡΙΓΩΝΕΛΛΙΝΗ

Ο σπόρος της Τριγωνέλλας περιέχει κυρίως απλά αλκαλοειδή που αποτελούνται κυρίως από αυτά που παρουσιάζουν τριγωνική (πρισματική) γεωμετρία (μέχρι 0,13%), χολίνη (0,05%), gentianine και carpaine. Μεγάλο μέρος της τριγωνελλίνης αποικοδομείται κατά τη διάρκεια της φρύξης (ψήσιμο) σε νικοτινικό οξύ και άλλες πυριδίνες και πυρρόλες, οι οποίες πιθανώς αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο μέρος της γεύσης του ψητού fenugreek (Laila and Murtaza, 2015).

Η τριγωνελλίνη, ένα παράγωγο μεθυλβεταΐνης του νικοτινικού οξέος, είναι ένα από τα σημαντικότερα αλκαλοειδή που βρέθηκαν στους σπόρους του fenugreek. Η τριγωνελλίνη ή N-μεθυλονικοτινικό οξύ, απομονώθηκε για πρώτη φορά από την

Trigonella foenum-graecum και είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης που προέρχεται από τα νουκλεοτίδια πυριδίνης της τριγονελλίνης και πλέον έχει βρεθεί σε πολλά είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων του μπιζελιού, της κάνναβης, του καφέ, της σόγιας και της πατάτας (Mehrafarin et al, 2010). Πολλά όσπρια παράγουν τριγονελλίνη ως δευτερογενή μεταβολίτη που προέρχεται από NAD (δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης (Xin-Qiang Zheng, 2005).



Χημική δομή τριγονελλίνης με μοριακό τύπο: C₇H₇NO

Το νικοτινικό οξύ που σχηματίζεται από NAD μέσω νικοτιναμίδης μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά προτίμηση για το σχηματισμό του NAD, και το υπόλοιπο μπορεί να προορίζεται για μελλοντικές ανάγκες ως μορφή της τριγονελλίνης (Laila and Murtaza, 2015).

Η τριγονελλίνη συντίθεται από S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (SAM) που εξαρτάται από νικοτινική N-μεθυλοτρανσφεράση, η οποία έχει βρεθεί σε ακατέργαστα εκχυλίσματα μπιζελιού (Sridevi and Giridhar, 2013). Η τριγονελλίνη που συσσωρεύεται σε σπόρους μετατρέπεται σε νικοτινικό οξύ κατά την εκβλάστηση, και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση NAD. Με τον τρόπο αυτό, η τριγονελλίνη ενεργεί ως δεξαμενή νικοτινικού οξέος σε φυτά (Mehrafarin et al., 2010).

Διάφορες κλινικές μελέτες σε ζώα που διεξάγονται με τη χρήση μοσχοσίταρου έχουν εντοπίσει πολλά πιθανά οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση fenugreek, το οποίο θεωρείται πλέον ως πιθανό λειτουργικό τρόφιμο και φυσικό προϊόν για την υγεία, χάρη σε ποικίλους βιοδραστικούς παράγοντες (Laila and Murtaza, 2015).

Η τριγονελλίνη, που απομονώνεται από τους σπόρους της τριγωνέλλας έχει δειχθεί ότι είναι χρήσιμη στο ΣΔ (Raheleh et al., 2010). Είναι μια ορμόνη που βρίσκεται φυσικά στα φυτικά προϊόντα, ένα παράγωγο της βιταμίνης B6 και έχει αξιολογηθεί πιο διεξοδικά από τα άλλα συστατικά του fenugreek, ιδιαίτερα όσον αφορά στο ΣΔ και σε νόσους του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ).

Έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει υποχοληστερολαιμική, κατά των όγκων, κατά της ημικρανίας, αντισηπτική, υπογλυκαιμική, νευροπροστατευτική, ηρεμιστική, βελτίωσης της μνήμης, αντιβακτηριακή, και αντιακή δράση. Ενώ πρόσφατα έχει προταθεί ότι η τριγονελλίνη ασκεί υπογλυκαιμικές επιδράσεις σε υγιείς ασθενείς χωρίς ΣΔ (Laila and Murtaza, 2015).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση τριγονελλίνης σε διαβητικούς αρουραίους μπορεί να την καταστήσει ένα δυνητικά ισχυρό υποψήφιο για βιομηχανική εφαρμογή, ως φαρμακολογικό παράγοντα για την θεραπεία της υπεργλυκαιμίας, της υπερλιπιδαιμίας, και των δυσλειτουργιών ήπατος και νεφρού (Hamden et al., 2013).

Ο μηχανισμός δράσης αυτού του βιοενεργού συστατικού περιλαμβάνει το μειωμένο εκφυλισμό των β-κυττάρων του παγκρέατος, την αναστολή της εντερικής α-αμυλάσης και μαλτάσης, την αναστολή της δραστηριότητας της λιπάσης, τη σημαντική μείωση της δραστηριότητας της ασπαρτικής τρανσαμινάσης ορού (AST), της τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT), της γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάσης (GGT), και της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και των τιμών κρεατινίνης, αλβουμίνης και ουρίας.

Ωστόσο, περαιτέρω μελέτη των φαρμακολογικών δράσεων της και του ακριβούς μηχανισμού μέσω του οποίου ασκεί αυτή τη δράση, είναι αναγκαία, μαζί με την εφαρμογή αυτής της γνώσης στην κλινική χρήση της (Laila and Murtaza, 2015).

5. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΜΑΤΙΩΝ

Τα ψυχανθή απελευθερώνουν ενώσεις που ονομάζονται φλαβονοειδή από τις ρίζες τους, τα οποία προκαλούν την παραγωγή των παραγόντων νεύμα από τα βακτήρια. Όταν ο συντελεστής όζου γίνεται αισθητός από τη ρίζα, συμβαίνουν μια σειρά από βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές: η κυτταρική διαίρεση ενεργοποιείται στη ρίζα για να δημιουργήσει τον όζο, και η ανάπτυξη των ριζιδίων ανακατευθύνεται γύρω από τα βακτήρια πολλές φορές, μέχρι να ενσωματώσει πλήρως ένα ή περισσότερα βακτήρια. Τα ενθυλακωμένα βακτήρια διαιρούνται πολλαπλές φορές, σχηματίζοντας μια μικροαποικία. Από αυτή τη μικροαποικία, τα βακτήρια εισέρχονται στον όζο που αναπτύσσεται, μέσω μιας δομής που ονομάζεται μολυσματικό νημάτιο, το οποίο αναπτύσσεται μέσα από τα ριζικά τριχίδια στο βασικό τμήμα του κυττάρου επιδερμίδας, και μετά μέσα στο φλοιό της ρίζας. Στη συνέχεια, περιβάλλονται από μια μεμβράνη φυτικής προέλευσης και διαφοροποιούνται σε βακτηριοειδή που δεσμεύουν το άζωτο (Smil, 2000).

Δύο κύριοι τύποι φυματίων έχουν περιγραφεί: καθορισμένα και μη καθορισμένα (Crespi & Gálvez 2000). Τα καθορισμένα (**Determinate nodules**) φυμάτια εντοπίζονται σε ορισμένες φυλές τροπικών ψυχανθών, όπως αυτά του γένους *Glycine* (γλυκίνης, σόγιας), *Phaseolus* (φασολιά), και *Vigna* και σε ορισμένα ψυχανθή της εύκρατης ζώνης, όπως το αγριοτρώφυλλο (*Lotus*). Αυτά τα καθορισμένα φυμάτια χάνουν τη μεριστωματική δραστηριότητα σύντομα μετά την έναρξη, κατά συνέπεια η αύξηση οφείλεται στην επέκταση των κυττάρων με αποτέλεσμα ώριμους όζους, οι οποίοι είναι σφαιρικοί σε σχήμα. Άλλοι τύποι μη καθορισμένων φυματίων βρίσκονται σε ένα ευρύ φάσμα βοτάνων, θάμνων και δέντρων, όπως το *Arachis* (φυστίκι). Αυτοί συνδέονται πάντα με τις μασχάλες των πλευρικών ή αυτοφυών/επιφυών ριζών και σχηματίζονται μετά τη μόλυνση μέσω ρωγμών από όπου αυτές οι ρίζες αναδύονται και δεν χρησιμοποιούν ριζικά τριχίδια. Η εσωτερική δομή τους είναι αρκετά διαφορετική από εκείνες του τύπου σόγιας του φυματίου (Sprent 2009).

Τα μη καθορισμένα (**Indeterminate nodules**) φυμάτια βρίσκονται στην πλειοψηφία των οσπρίων και από τις τρεις υπο-οικογένειες, είτε στις εύκρατες περιοχές είτε στις τροπικές. Μπορούν να βρεθούν σε *papilionoid* ψυχανθή, όπως τα *Pisum* (μπιζέλι), *Medicago* (αλφάλφα), *Trifolium* (τριφύλλι), και *Vicia* (βίκος) και σε όλα τα ψυχανθή, όπως οι ακακίες (*mimosas*), τα λίγα οζώδη ή φυματιώδη καισαλπινιοειδή (*caesalpinoid*) ψυχανθή, όπως το μπιζέλι λιβαδοπέρδικας (*partridge pea*).

Ο όρος «μη καθορισμένα» σημαίνει ότι διατηρούν ενεργό κορυφαίο μερίστωμα που παράγει νέα κύτταρα για την ανάπτυξη κατά τη διάρκεια ζωής του φυματίου. Αυτό οδηγεί σε ένα γενικά κυλινδρικό σχήμα του φυματίου, το οποίο μπορεί να είναι εκτενώς διακλαδισμένο (Sprent 2009) Επειδή αυξάνονται ενεργά, μη καθορισμένα φυμάτια δηλώνουν ζώνες οι οποίες οριοθετούν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης/συμβίωσης. (Foucher & Kondorosi 2000; Monahan-Giovanelli et al. 2006; Van de Velde et al. 2006).

6. HAIRY ROOT-ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ «ΤΡΙΧΩΤΗ ΡΙΖΑ»

Ένα φυσικώς απαντώμενο βακτήριο του εδάφους, το *Agrobacterium rhizogenes* που περιέχει πλασμίδια επαγωγής ρίζας (που ονομάζονται επίσης Ri πλασμίδια), μπορούν να μολύνουν τις ρίζες των φυτών και να προκαλέσουν την παραγωγή μιας πηγής τροφής για το βακτήριο, έναν αριθμό χημικών ενώσεων με κατάληξη -οπίνες, και

να αναπτυχθούν ανώμαλα (Arroo et al., 1995). Οι μη φυσιολογικές ρίζες είναι ιδιαίτερα εύκολο να καλλιεργηθούν σε τεχνητό περιβάλλον, επειδή δεν χρειάζονται ορμόνες (Arroo et al., 1995) και είναι νεοπλαστικές, με απεριόριστη ανάπτυξη. Οι νεοπλαστικές ρίζες που παράγονται από μόλυνση του *A. rhizogenes* έχουν υψηλό ρυθμό ανάπτυξης (σε σύγκριση με τις μη μετασχηματισμένες ρίζες), καθώς επίσης και γενετική και βιοχημική σταθερότητα (Hu and Du, 2006).

Τα Ri πλασμίδια μπορούν να κατασκευαστούν με γενετική μηχανική για να περιέχουν επίσης T-DNA και χρησιμοποιούνται για την γενετική μεταμόρφωση (μετασχηματισμό) των φυτικών κυττάρων. Οι γενετικά μετασχηματισμένες καλλιέργειες ριζών που προκύπτουν, μπορεί να παράγουν υψηλά επίπεδα δευτερογενών μεταβολιτών, συγκρίσιμα ή ακόμη και υψηλότερα από εκείνα των ανέπαφων φυτών (Banerjee et al., 2002; Hu and Du, 2006).

Το *Agrobacterium rhizogenes*, με νέα ταξινόμηση ως *Rhizobium rhizogenes*, είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο του εδάφους που παράγει τη νόσο των πυκνά διακλαδισμένων ριζών σε δικοτυλήδονα φυτά. Το *A. rhizogenes* επάγει το σχηματισμό των πολλαπλασιαζόμενων πολυ-διακλαδισμένων τυχαίων ριζών στη θέση της μόλυνσης, τις ονομαζόμενες και «πυκνά διακλαδισμένες ρίζες» (Ayora-Talavera et al., 2002; Hu and Du, 2006).

Στη ριζόσφαιρα, τα φυτά μπορεί να υποφέρουν από τραύματα που οφείλονται σε παθογόνα του εδάφους ή άλλες πηγές. Αυτό οδηγεί στην έκκριση φαινολικών ενώσεων όπως η ακετοσυριγκόνη, οποία ασκεί χημειοτακτικές επιδράσεις που προσελκύουν τα βακτήρια. Υπό αυτές τις συνθήκες, ορισμένα βακτηριακά γονίδια ενεργοποιούνται, οδηγώντας στην μεταφορά του T-DNA τους από το πλασμίδιο της επαγωγής δημιουργίας ριζών (Ri πλασμίδιο) εντός του φυτού μέσω του τραύματος. Μετά την ολοκλήρωση και την έκφραση, *in vitro* ή υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρείται ο φαινότυπος των πυκνά διακλαδισμένων ριζών, ο οποίος συνήθως περιλαμβάνει υπερανάπτυξη του ριζικού συστήματος που δεν είναι πλήρως γεωτροπικό, και τροποποιημένη μορφολογία φύλλων (ρυτιδωμένα, τσαλακωμένα), αν υπάρχουν φύλλα (Hu and Du, 2006).

Το *Agrobacterium rhizogenes* προκαλεί την ασθένεια του φαινοτύπου «τριχωτή ρίζα» (hairy root) στα φυτά. Οι νεοπλαστικές ρίζες που παράγονται από μόλυνση με *A. rhizogenes* χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και η γενετική σταθερότητα. Αυτές οι γενετικά μετασχηματισμένες καλλιέργειες ριζών μπορούν να παράγουν υψηλότερα επίπεδα των δευτερογενών μεταβολιτών ή ποσότητες συγκρίσιμες με εκείνες

των ακέραιων/άθικτων φυτών. Οι καλλιέργειες αυτές των μετασχηματισμένων ριζών προσφέρουν την υπόσχεση για την παραγωγή πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών σε πολλά φυτά. Ο βασικός περιορισμός για την εμπορική εκμετάλλευση καλλιεργειών πυκνά διακλαδισμένων ριζών είναι η κλιμάκωσή τους, καθώς υπάρχει η ανάγκη για την ανάπτυξη ενός ειδικά σχεδιασμένου βιοαντιδραστήρα που επιτρέπει την ανάπτυξη των διασυνδεδεμένων ιστών, άνισα κατανεμημένων σε όλο το δοχείο. Πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη ρεολογικά χαρακτηριστικά του ετερογενούς συστήματος κατά τη διάρκεια της μαζικής κλίμακας καλλιέργειας πυκνά διακλαδισμένων ριζών. Η ανάπτυξη μοντέλων βιοαντιδραστήρα για καλλιέργειες πυκνά διακλαδισμένων ριζών εξακολουθεί να είναι πρόσφατο φαινόμενο (Hu and Du, 2006).

Είναι επίσης αναγκαίο να αναπτυχθούν μοντέλα με τη βοήθεια υπολογιστή για διάφορες παραμέτρους, όπως η κατανάλωση οξυγόνου και η απέκκριση του προϊόντος στο μέσο. Ακόμη, οι μετασχηματισμένες ρίζες είναι σε θέση να αναγεννήσουν γενετικά σταθερά φυτά όπως διαγονιδιακά ή κλώνους. Αυτή η ιδιότητα της ταχείας ανάπτυξης και υψηλής συχνότητας αναγέννησης φυτάρων, επιτρέπει τον κλωνικό πολλαπλασιασμό φυτών που προτιμώνται ιδιαίτερα για διάφορους λόγους.

6.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *Agrobacterium rhizogenes*

Το *Agrobacterium rhizogenes* φέρει T-DNA, που επάγει το σχηματισμό ριζών μετά την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του φυτού. Αυτό το Ri T-DNA δημιουργεί τον φαινότυπο των μεταμορφωμένων ριζών και των φυτών που αναγεννώνται (Tepfer, 1982, 1984). Αρκετά είδη, συμπεριλαμβανομένων του “morning glory” και του καπνού, φέρουν αλληλουχίες ομόλογες προς το Ri T-DNA (Tepfer, 1982; White et al, 1983; Furner et al, 1986). Τα γονίδια που κωδικοποιούνται από αυτό το υποτυπώδες Ri T-DNA εκφράζονται στον καπνό (Ichikawa et al, 1990; Meyer et al, 1995). Προτάθηκε ότι αυτός ο φαινομενικός φυσικός γενετικός μετασχηματισμός, θα μπορούσε να έχει προσαρμοστική σημασία για το φυτό (Tepfer, 1983; Meyer et al., 1995; Limami et al., 1998).

Μετά την μόλυνση φυτών όπως το καρότο και η καλαγχόη, στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* τα οποία φέρουν ένα πλασμίδιο τύπου agropine που επάγει τη δημιουργία ριζών (Ri), αποτελούν την αιτία των πυκνά διακλαδισμένων ριζών. Αυτή

η νόσος των φυτών, χαρακτηρίζεται από άφθονο πολλαπλασιασμό ριζών, από τις θέσεις μόλυνσης (Riker, 1930; Offringa et al., 1986).

Ωστόσο, η μόλυνση των φυτικών ειδών όπως το ηλιοτρόπιο και το μπιζέλι, με τα ίδια βακτηριακά στελέχη, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ανοργάνωτων όγκων. Ο μοριακός μηχανισμός που διέπει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ *A. rhizogenes* και φυτού, μοιάζει με εκείνο του βακτηριακού οιδήματος του ζαχαρότευτλου από το *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο περιέχει το πλασμίδιο επαγωγής όγκου (Ti). Και στις δύο περιπτώσεις, ένα τμήμα του DNA του πλασμιδίου, το μεταφερόμενο DNA (T-DNA), εισάγεται στα φυτικά κύτταρα, στις θέσεις μόλυνσης (Chilton et al., 1977; Chilton et al., 1982; Spano, et al., 1982; Offringa et al., 1986).

Το T-DNA που υπάρχει σε αυτές τις σειρές βρέθηκε ότι προέρχεται από ένα τμήμα του Ri πλασμιδίου (Chilton, et al., 1982; Spano et al., 1982; Tepfer, 1984; Costantino, 1984). Γι' αυτό, ήταν πιθανό ότι αυτό το τμήμα του Ri DNA περιέχει γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον απεριόριστο πολλαπλασιασμό των μετασχηματισμένων σειρών. Πράγματι, αποδείχθηκε ότι μια μετάλλαξη παρεμβολής στο μέσον αυτής της T-περιοχής οδηγεί στην απώλεια της ιδιότητας δημιουργίας ριζών (rhizogenicity) σε φύλλα καλαγχόης (White, et al., 1983). Ωστόσο, η διαγραφή σχεδόν ολόκληρης της T-περιοχής, συμπεριλαμβανομένου του μεσαίου τμήματος, δεν οδηγεί σε απώλεια της rhizogenicity σε μίσχους καλαγχόης ή σε απώλεια της ογκογονικότητας στο μπιζέλι και το ηλιοτρόπιο (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), γεγονός που υποδηλώνει ότι άλλα onc γονίδια βρίσκονται σε άλλα σημεία/άλλο σημείο στο Ri πλασμίδιο (Offringa et al., 1986).

Επιπλέον, δείχθηκε ότι σε μια δεύτερη περιοχή Ri πλασμιδίων agropine τύπου, περισσότερα από 15 ζεύγη κλοβάσεων δεξιά της T-περιοχής που περιγράφηκε προηγουμένως, μεταφέρεται περιστασιακά σε φυτικά κύτταρα κατά την διάρκεια της μόλυνσης και περιέχει γονίδια για τη βιοσύνθεση της agropine οπίνης (De Paolis, et al., 1985). Μέχρι στιγμής, δεν είχαν εντοπιστεί onc γονίδια στην περιοχή αυτή [που ονομάζεται TR (δεξιά) -περιοχή για να διακριθεί από την ήδη γνωστή TL (αριστερά) -περιοχή], αλλά, περιέργως, ένα τμήμα του DNA που παρουσιάζει ομολογία με Ti aux γονίδια υπό συνθήκες υβριδισμού χαμηλής αυστηρότητας, βρίσκεται δίπλα στο γονίδιο συνθάσης της agropine (White, & Nester, 1980; Huffman, et al., 1984; Jouanin, 1984). Αυτός ο "aux" τόπος (locus) του Ri πλασμιδίου ανιχνεύθηκε σε ορισμένες μετασχηματισμένες σειρές, ως μέρος του TR-DNA (R. Peerbolte, προσωπική επικοινωνία) (Offringa et al., 1986).



Μεταλλαγμένες ρίζες-hairy root του *Lotus japonicas* που καλλιεργούνται in vitro σε 15 ημέρες σε καλλιέργεια (διαθέσιμο από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι η ταχύτητα και η τεχνική απλότητα του μετασχηματισμού του *A. rhizogenes*. Αντί για διάστημα 4-6 μηνών που απαιτείται για την αναγέννηση διαγονιδιακών φυτών μετά από μετασχηματισμό που βασίζεται στο *A. tumefaciens*, η παραγωγή Ri T-DNA διαγονιδιακών ριζών διαρκεί μόνο λίγες εβδομάδες. Έτσι, αυτή η τεχνική είναι ιδιαίτερα καλά προσαρμοσμένη στις προσεγγίσεις που βασίζονται στο RNAi για τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας (Limpens et al. 2004), την πραγματοποίηση λειτουργικής ανάλυσης προαγωγού (Boisson-Dernier et al. 2005), και ως ένα μέσο για την ταχεία αξιολόγηση της συμπληρωματικότητας των φυτικών μεταλλακτών που διαθέτουν υποψήφια γονίδια (π.χ. Endre et al. 2002; Levy et al. 2004) όταν ο γενετικός καθοριστικός παράγοντας της αντίστοιχης μετάλλαξης προσδιορίζεται από τη ρίζα (Chabaud et al., 2006).

Ο κύριος περιορισμός αυτής της προσέγγισης είναι ότι, δεδομένου ότι οι βλαστοί δεν μετασχηματίζονται, η διαρκής συντήρηση των σύνθετων φυτών δεν είναι δυνατή είτε με αγενή πολλαπλασιασμό, είτε με αυτογονιμοποίηση. Παρ' όλα αυτά, ο περιορισμός αυτός μπορεί πλέον να παρακαμφθεί, δεδομένου ότι έχει προσφάτως δειχθεί ότι μετασχηματισμένες από Ri T-DNA ρίζες *M. truncatula* μπορούν να αναγεννηθούν επιτυχώς σε φυτάρια (Crane et al., 2006; Chabaud et al., 2006).

7. ΜΠΕΤΑΛΑΙΝΕΣ/BETALAINS

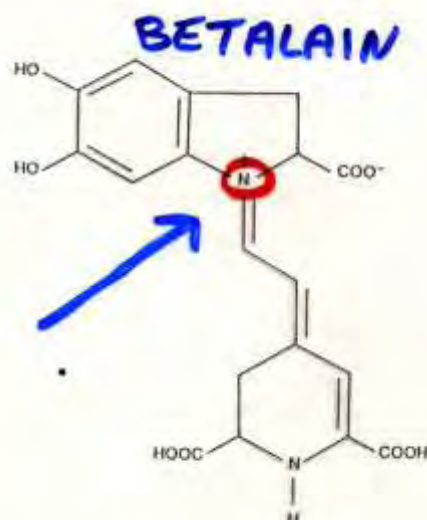
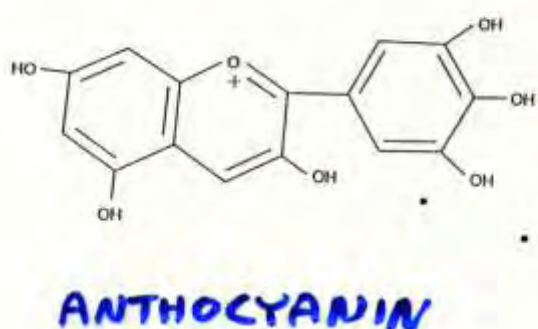
Οι μπεταλαΐνες είναι μια κατηγορία ερυθρών και κίτρινων χρωστικών προερχόμενων από ινδόλη, οι οποίες βρέθηκαν σε φυτά της τάξης των Καρυοφυλλωδών (*Caryophyllales*), στα οποία αντικαθιστούν χρωστικές ανθοκυανίνης. Οι μπεταλαΐνες παρατηρούνται επίσης σε ορισμένους μύκητες (Strack et al., 2003). Εντοπίζονται πιο συχνά στα πέταλα των λουλουδιών, αλλά μπορεί να χρωματίσουν τους καρπούς, τα φύλλα, τους μίσχους και τις ρίζες των φυτών που τις περιέχουν. Περιλαμβάνουν χρωστικές, όπως αυτές που βρίσκονται στα τεύτλα.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες βηταλαϊνών (Salisbury et al., 1991):

- Οι μπετακυανίνες περιλαμβάνουν ερυθρές έως και ιώδεις χρωστικές ουσίες μπεταλαΐνης. Μεταξύ των μπετακυανινών που υπάρχουν σε φυτά, περιλαμβάνονται μπετανίνη, ισομπετανίνη (isobetanin), προμπετανίνη (probetanin) και νεομπετανίνη (neobetanin).
- Οι μπεταξανθίνες είναι οι χρωστικές μπεταλαΐνης που εμφανίζονται με χρώμα κίτρινο έως πορτοκαλί. Μεταξύ των μπεταξανθινών που υπάρχουν σε φυτά, περιλαμβάνονται οι *vulgaxanthin*, *caraxanthin*, *portulaxanthin*, και *indicaxanthin*.

Παλαιότερα οι μπεταλαΐνες θεωρούνταν ότι σχετίζονταν με τις ανθοκυανίνες, τις ερυθρωπές χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στα περισσότερα φυτά. Τόσο οι μπεταλαΐνες, όσο και οι ανθοκυανίνες, είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στα κενοτόπια των φυτικών κυττάρων. Ωστόσο, οι μπεταλαΐνες διαφέρουν δομικά και χημικά από τις ανθοκυανίνες και δεν έχουν ποτέ βρεθεί στο ίδιο φυτό μαζί (Francis, 1999; Stafford, 1994). Για παράδειγμα, οι μπεταλαΐνες περιέχουν άζωτο, ενώ οι ανθοκυανίνες όχι (Robinson, 1963).

Είναι πλέον γνωστό ότι οι μπεταλαΐνες είναι αρωματικά παράγωγα ινδόλης που συντίθεται από τυροσίνη. Αυτά δεν σχετίζονται χημικά με τις ανθοκυανίνες και δεν είναι καν φλαβονοειδή (Raven, et al., 2004). Κάθε μπεταλαΐνη είναι ένας γλυκοζίτης, και αποτελείται από ένα σάκχαρο και ένα έγχρωμο τμήμα. Η σύνθεσή τους προωθείται από το φως (Salisbury et al., 1991).

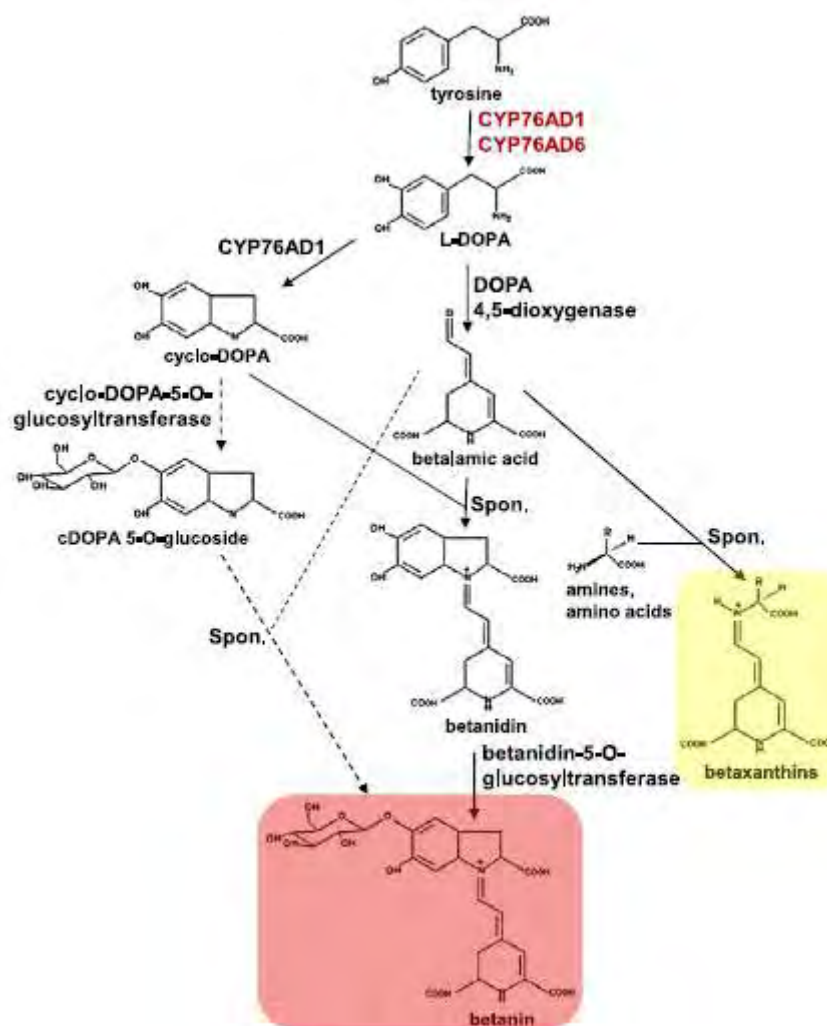


Ο πρόσφατος χαρακτηρισμός διαφορετικών βιοδραστικοτήτων σε πειράματα με εκχυλίσματα που περιέχουν μπεταλαΐνη και καθαρισμένες (αμιγείς) χρωστικές ουσίες, έχει ανανεώσει το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας σε αυτά τα μόρια που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικές χρωστικές ύλες. Μελέτες με πολλαπλές καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν επιδείξει ένα υψηλό δυναμικό χημειοπρόληψης που βρίσκει *in vitro* υποστήριξη σε μια ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και δράση κατά των ελευθέρων ριζών. Πειράματα σε *in vivo* μοντέλα (ή υποδείγματα) με ζώα και μελέτες βιοδιαθεσιμότητας, ενισχύουν τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζουν οι μπεταλαΐνες στη διατροφή. Οι βιοδραστικότητες που περιγράφονται, ενδέχεται να μην υποστηρίζονται από την υψηλή ικανότητα δράσης κατά των ελευθέρων ριζών, της δομικής μονάδας τους, του μπεταλαμικού οξέος. Αν και απαιτούνται περισσότερες έρευνες με αμιγείς ενώσεις, οι τρέχουσες ενδείξεις υποδηλώνουν μια ισχυρή δυναμική που προάγει την υγεία.

Αυτές οι χρωστικές ουσίες έχουν προσελκύσει τόσο το επιστημονικό, όσο και το οικονομικό ενδιαφέρον (Stintzing & Carle, 2007; Moreno et al., 2008). Ως συνέπεια της υψηλής σταθερότητας, της ανεξαρτησίας του pH τους και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων, χρησιμοποιούνται ευρέως ως φυσικές χρωστικές ύλες τροφίμων και συμπληρώματα διατροφής (Azeredo, 2009; Polturak et al., 2015).

Ένα ενδιάμεσο της οδού της μπεταλαΐνης, η L-3,4-διυδροξυφαιτυλαλανίνη (L-DOPA), είναι επίσης ένας εμπορικά πολύτιμος μεταβολίτης που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της νόσου του Parkinson (Nagatsu & Sawada, 2009). Παρ' όλα αυτά, η βιοσύνθεση μπεταλαΐνης παρέμεινε ελάχιστα κατανοητή σε σύγκριση με τις άλλες

κύριες κατηγορίες φυτικών χρωστικών ουσιών, δηλαδή τις ανθοκυάνες και τα καροτενοειδή (Polturak et al., 2015).



Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεταλαΐνης. Το πρώτο βήμα δέσμευσης στην οδό, η 3-υδροξυλίωση της τυροσίνης, καταλύεται τόσο από το κυτόχρωμα P450s, CYP76AD1 όσο και από το CYP76AD6 σε ερυθρό τεύτλο. Οι διακεκομμένες γραμμές ορίζουν τις αντιδράσεις μιας εναλλακτικής οδού για τον σχηματισμό βητανίνης, όπου η κύκλο-DOPA γλυκοζυλιώνεται πρώτα και έπειτα συμπυκνώνεται με βηταλαμικό οξύ. Spon.: αυθόρμητες αντιδράσεις συμπύκνωσης (Polturak et al., 2015).

Η έκφραση των τριών γονιδίων είναι επαρκής για την παραγωγή ετερόλογης μεταλαΐνης σε φυτά. Όπως συζητήθηκε παραπάνω, είναι δυνατή η παραγωγή τόσο ερυθρών μετακυανινών (betacyanins), όσο και κίτρινων μεταξανθινών (betaxanthins) μέσω παροδικής υπερέκφρασης του γονιδίου σε φύλλα του *N. benthamiana*. Στη συνέχεια, επιτεύχθηκε προσπάθεια παρασκευής μεταλαΐνης σε είδη φυτών που δεν την παράγουν φυσικά, μέσω σταθερού μετασχηματισμού. Για το σκοπό αυτό,

χρησιμοποιήθηκε κλωνοποίηση Goldenbraid (Sarrion-Perdigones et al., 2013) για να δημιουργήσει μια κατασκευή τεσσάρων γονιδίων σε έναν πλασμιδιακό φορέα, που ονομάζεται πλέον pX11, στο οποίο τα CYP76AD1, BvDODA1 και cDOPA5GT εκφράζονται παράλληλα και καθοδηγούνται από συστατικούς υποκινητές, και ένα γονίδιο αντίστασης στην καναμυκίνη για επιλογή. Ο pX11 πλασμιδιακός φορέας αρχικά δοκιμάστηκε με αγροεμποτισμό στο *N. benthamiana* (Polturak et al., 2015).



Η ανασυνδυασμένη έκφραση του κυτοχρώματος P450 CYP76AD1 ή CYP76AD6 σε φύλλα *N. benthamiana* και καθιστά ικανή τη παραγωγή L-3,4-διϋδροξυφαινυλαανίνη (L-DOPA) και μπεταλαΐνης. Συν-διείσδυση των Agrobacteria-πλασμιδίων για την έκφραση των CYP76AD1 με cDOPA5GT (pad1-GT) και DOPA 4,5-διοξυγενάσης BvDODA1 (pDODA1) στα φύλλα *N. benthamiana* προκαλεί κόκκινο χρωματισμό (Polturak et al., 2015).

Παρομοίως με τον συν-διαποτισμό των pDODA1 και Pad1-GT, η εισαγωγή του pX11 οδήγησε σε ερυθρό χρωματισμό του ιστού. Πραγματοποιήθηκε LC-MS ανάλυση του ιστού που έχει διαποτιστεί με pX11, προκειμένου να διαπιστωθεί η σύνθεση μπεταλαΐνης. Βρέθηκαν κορυφές που αντιστοιχούν σε μπετανίνη και ισο-μπετανίνη, όπως παρατηρήθηκε προηγουμένως μετά τον συν-διαποτισμό των pDODA1 και Pad1-GT φορέων υπερέκφρασης.

Επίσης εντοπίστηκε η ένωση indicaxanthin, συστατικό της μπεταξανθίνης (προλίνη-betaxanthin), υποδεικνύοντας κάποιο επίπεδο ροής προς σχηματισμό της μπεταξανθίνης. Δύο επιπλέον μεταβολίτες αναγνωρίστηκαν ως μπετακυανίνες, με βάση τα φάσματα απορρόφησης του φωτός και τον κατακερματισμό τους, ο οποίος περιελάμβανε το σχεδόν πανταχού παρόν θραύσμα μπετακυανίνης, τη μπετανιδίνη (betanidin) ($m/z = 389$). Ο ιστός φύλλου που διαποτίστηκε με pX11 εμφανίστηκε έντονα χρωματισμένος ερυθρός, παράγοντας μπετακυανίνες σε μεγάλες ποσότητες, απ' όσο φαίνεται. Ο ιστός που διαποτίστηκε, αξιολογήθηκε στη συνέχεια για το σύνολο του περιεχομένου σε μπετακυανίνη με φασματοφωτομετρική ανάλυση και βρέθηκε να περιέχει κατ' εκτίμηση, 330 mg kg^{-1} , ποσότητα υψηλότερη από ό,τι στα ερυθρά φύλλα

της *Bougainvillea glabra* της και τα ερυθρά πέταλα της *M. Jalapa*, που περιέχουν 120 και 250 mg kg⁻¹ βητακυανίνης αντίστοιχα, και 2,3 φορές μικρότερη ποσότητα από ό,τι στο ερυθρό εκχύλισμα ρίζας τεύτλων, το οποίο εκτιμήθηκε ότι περιέχει 760 mg kg⁻¹.

Ακολούθως, ο φορέας pX11 χρησιμοποιήθηκε για σταθερό μετασχηματισμό διαφόρων ειδών φυτών, συμπεριλαμβανομένων του καπνού (*Nicotiana tabacum*), της ντομάτας (*S. lycopersicum*), της πατάτας (*S. tuberosum*), της μελιτζάνας (*S. melongena*), του δένδρου καπνού (*Nicotiana glauca*), του ευρωπαϊκού μαύρου στρύχνου (*Solanum nigrum*), της πετούνιας (*Petunia x hybrida*) και του *N. benthamiana*. Μοσχεύματα των διαφόρων ειδών καλλιεργήθηκαν με αγροβακτήρια και τοποθετήθηκαν σε επιλεκτικό μέσο. Στα *N. benthamiana*, *N. glauca*, πετούνια και ντομάτα, μικρές κηλίδες ερυθρού-ιώδους χρωματισμού ήταν ορατές στην επιφάνεια του εκφυτεύματος μέσα σε 2 d συν-καλλιέργειας με αγροβακτήρια. Σε όλα τα είδη που μετασχηματίστηκαν, η εισαγωγή pX11 προκάλεσε το σχηματισμό των ερυθρών-ιώδων κάλων (ή τύλων), οι οποίοι εμφανίστηκαν γενικά μέσα σε 1-2 εβδομάδες από την καλλιέργεια. Μελαγχρωματικοί *N. benthamiana* και *N. glauca* ιστοί κάλου (τύλου) βρέθηκαν να περιέχουν μεπετανίνη και ισο-μεπετανίνη με LC-MS. Επιπλέον, μια νέα άγνωστη ένωση μετακυανίνης βρέθηκε στον κάλο (τύλο) του *N. Glauca* (Polturak et al., 2015).

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΕΙΡΑΜΑ Α.: ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum* –HAIRY ROOT

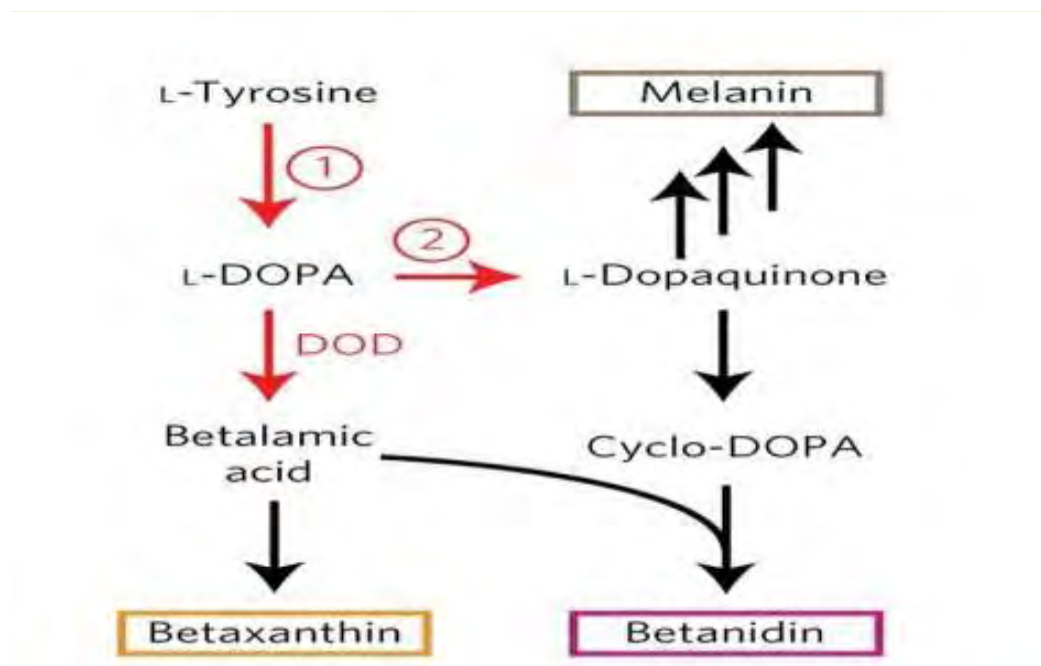
1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ px11

8. CYP76D1: υδροξυλάση, ένζυμο κυτοχρωματος P450 που απομονώθηκε από το πατζάρι (*Beta vulgaris*)

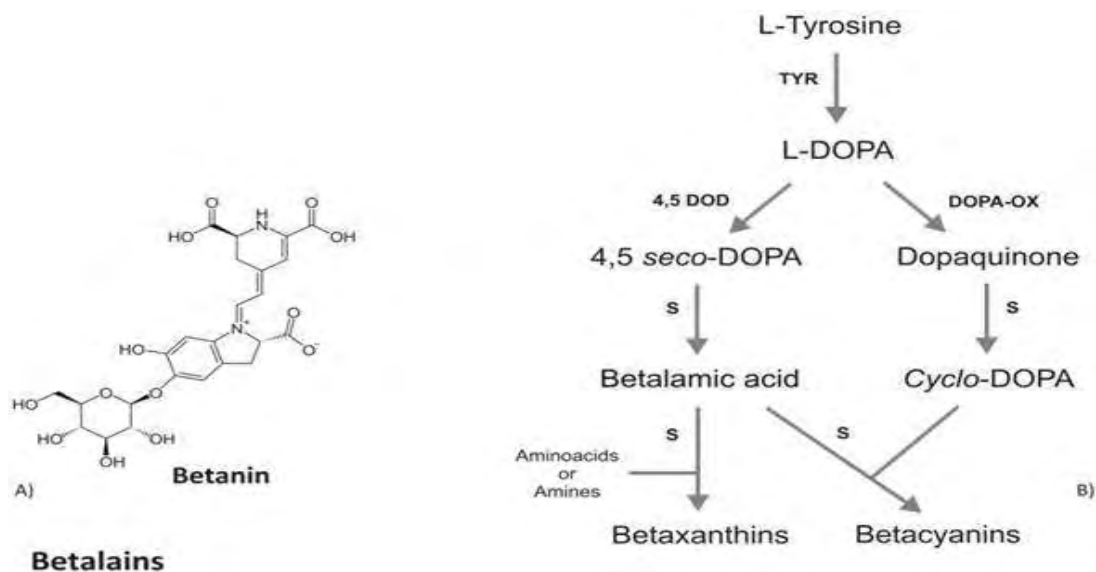
9. P35S: Ο υποκινητής του 35S RNA είναι ένας πολύ ισχυρός ιδιοσυστατικός υποκινητής, υπεύθυνος για τη μεταγραφή του συνόλου του γονιδιώματος του CaMV (ιός του μωσαϊκού του κουνουπιδιού). Είναι γνωστό για τη χρήση του στην μεταμόρφωση φυτών. Προκαλεί υψηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης σε δικοτυλήδονα φυτά.

10. c-DOPA5GT: γονίδιο κυκλο-5-O-γλυκοσυλ-τρανφεράση που απομονώθηκε από το φυτό *M. Jalap*

11. BvDODA1: DOPA 4,5 διοξυγενάση που απομονώθηκε από το πατζάρι (*Beta vulgaris*)



Συγκεκριμένα η DOD (DOPA 4,5-dioxygenase) παράγει το ενδιάμεσο μεταλαμικό οξύ, που μπορεί είτε να αντιδράσει με ελεύθερες αμίνες για να παράγει μεταξανθίνη (μια οικογένεια κίτρινων χρωστικών) ή με το παράγωγο L-ντοπακινόνης, την κυκλο-DOPA, για να παραχθεί μετανιδίνη (betanidin) (μια ιώδης χρωστική ουσία). Η betanidin είναι ασταθής, αλλά μπορεί να σταθεροποιηθεί με την προσθήκη του αναγωγικού παράγοντα ασκορβικό οξύ. Σχετικά επίπεδα παραγωγής μετανιδίνης (betanidin) χρησιμοποιήθηκαν για να συγκριθεί η δραστηριότητα οξειδάσης της DOPA (δραστηριότητα 2) σε CYP76AD1 παραλλαγές (variants).



* *Pichia pastoris* (είδος ζυμομύκητα): χρησιμοποιείται συχνά ως ένα σύστημα έκφρασης για την παραγωγή πρωτεϊνών. Διαθέτει δύο γονίδια οξειδάσης της αλκοόλης, τα AOX1 και AOX2, τα οποία έχουν έντονα επαγόμενο υποκινητή. Αυτά τα γονίδια επιτρέπουν στην *Pichia* να χρησιμοποιεί μεθανόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Οι υποκινητές AOX επάγονται από τη μεθανόλη και η δράση τους καταστέλλεται από π.χ. γλυκόζη.

2.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Escherichia coli*

2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Το βακτήριο *E. coli*, βακτηριακό στέλεχος DH5a, χρησιμοποιείται ως ξενιστής για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων που χρησιμοποιούνται στα διάφορα στάδια υποκλωνοποίησης. Τα βήματα προετοιμασίας του βακτηριακού στελέχους είναι τα παρακάτω:

- 200 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζονται με 2 ml υγρής καλλιέργειας του στελέχους που επιλέχθηκε. Το LB περιέχει τα εξής συστατικά:

Θρεπτικό υπόστρωμα LB

Συστατικά	Ποσότητες
Bactotryptone	10 gr
Yeast extract	5 gr
NaCl	10 gr
H ₂ O	1 l
Άγαρ (για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα)	1,5%

- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση μέχρι η οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος να έχει οπτική πυκνότητα στα 600 nm $O.D._{600}=0,2-0,3$.
- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml διαλύματος 0,1 M παγωμένου MgCl₂ και επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 25 ml 0,1 M διαλύματος MgCl₂ και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C και επαναδιασπείρονται σε 10 ml διαλύματος 0,1 M CaCl₂, το οποίο βρίσκεται στον πάγο.
- Η αποθήκευση των δεκτικών κυττάρων γίνεται στους -80°C με την προσθήκη 20% γλυκερόλης.

2.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Escherichia coli* ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ px11

Αρχικά, χρησιμοποιούμε έναν σωλήνα erpendorf που περιέχει 100 μl δεκτικών κυττάρων του στελέχους DH5a ξεπαγώνουν στον πάγο. Στα δεκτικά κύτταρα μεταφέρονται 10-100 ng πλασμιδίου ή της πλασμδιακής κατασκευής και το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση (stress) για 30-50 δευτερόλεπτα στους 42 °C, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου μέσα στα βακτήρια. Τα παγώνουμε άμεσα για 5 λεπτά στο πάγο για να συνέλθουν. Προστίθενται 1ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και

τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 45-60 λεπτά προκειμένου να εκφράσουν τα γονίδια τους. Περίπου 200μl των κύτταρων επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων και έχουν προθερμανθεί στους 37 °C, ώστε να διατηρηθεί αυτή η θερμοκρασία για τη βέλτιστη ανάπτυξη των βακτηρίων. Στη συγκεκριμένη εργασία, προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ml. Τέλος, η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιείται για 16 ώρες στους 37 °C, ενώ η μετέπειτα φύλαξη τους στους 4 °C.

Στην συγκεκριμένη εργασία μετασχηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a με το px11 πλασμιδιακό φορέα. Η επιβεβαίωση του μετασχηματισμού γίνεται με τη ανάπτυξη του βακτηρίου στο θρεπτικό όπου έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμυκίνη (100μg/ml).

2.3.ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Μετά τον μετασχηματισμό του βακτηριακού στελέχους *E. coli*, είναι αναγκαίο να γίνει η απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα με τα εξής βήματα:

- Φυγοκέντρηση 1,5 ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας για 30 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα και απόρριψη του υπερκείμενου. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται εις τριπλούν.
- Επαναδιάλυση ιζήματος με 300 μl διαλύματος P1 buffer (50mM Tris, 10 mM EDTA, 3mg/ml RNase Tris-HCl, pH buffer 8.0), μηχανική ανάδευση του ιζήματος σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex) μέχρι να ομογενοποιηθεί.
- Προσθήκη 300μl P2 buffer (200mM NAOH, 1% SDS), αναδέυση για το πολύ 5 λεπτά έως ότου το μίγμα γίνει διαυγές .
- Προσθήκη 300μl P3 buffer (3M Potassium acetate, glacial acetic acid pH 5,5), αναδεύουμε ήπια και επώαση για 10 λεπτά στο πάγο
- Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα και επώαση για 10 λεπτά στους 4°C.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούριο σωλήνα eppendorf 1,5ml και φυγοκέντρηση για ακόμη 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούριο σωλήνα eppendorf 1,5ml.
- Προσθήκη 600μl 2-propanol και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα και επώαση για 15 λεπτά στους 4°C.

- Απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη 500μl 70% EtOH και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά στους 4°C.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επώαση για 10 λεπτά στους 37°C.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20μl ddH₂O.

3.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Agrobacterium rhizogenes Arqual*

3.1 *Agrobacterium rhizogenes Arqual*

Το *Agrobacterium rhizogenes Arqual* είναι ένα στέλεχος αγροβακτηρίου, το οποίο μολύνει το *Medicago truncatula* (Mireille C. et.al 2006) ενώ, ακόμη βρέθηκε να προκαλεί hairy roots στο φυτό *Vicia hirsute*.

3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Agrobacterium rhizogenes Arqual* ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Μια βακτηριακή αποικία μεταφέρεται σε 5 ml LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν 100 mg/ml καναμυκίνη και στρεπτομυκίνη. Η καλλιέργεια επώάζεται στους 28°C στις 250 στροφές over night. Στη συνέχεια ακολουθούμε τη παρακάτω σειρά βημάτων:

- Μεταφορά 2ml της καλλιέργειας σε 50ml θρεπτικό LB (σε φλάσκα 250ml) και γρήγορη ανάδευση στους 28°C μέχρι η οπτική πυκνότητα να έχει τιμή OD₆₀₀=0,5-1,0 (λειτουργεί ιδανικά σε OD=0,6).
- Επώαση λίγων λεπτών της καλλιέργειας στο πάγο και φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 3000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 ml κρούου διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου συγκέντρωσης 20mM, το οποίο έχει αποστειρωθεί με φίλτρο.
- Διαχωρισμός 100μl κυττάρων σε αποστειρωμένα eppendorfs 1,5ml και φύλαξη τους στους -80°C.

3.3 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Agrobacterium rhizogenes Arqua1* ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ px11

Ο μετασχηματισμός *Agrobacterium rhizogenes Arqua1* ακολουθεί τα εξής βήματα:

- Σωλήνας erpendorf που περιέχει 100 μl δεκτικών κυττάρων του στελέχους *Arqua1* ξεπαγώνουν στο υδατόλουτρο στους 37 °C για 5 λεπτά και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
- Στα δεκτικά κύτταρα μεταφέρονται 1 μg πλασμιδίου ή της πλασμιδιακής κατασκευής.
- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε καταπόνηση ψύχους (cold stress) σε υγρό άζωτο, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου μέσα στα βακτήρια.
- Ξεπαγώνονται τα κύτταρα με τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 5 λεπτά.
- Προστίθενται 1ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε επωαστήρα στους 28 °C για 2-4 ώρες στις 80 rpm, έτσι ώστε να παραχθούν τα γονίδια της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.
- Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα, απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση σε 0,1ml θρεπτικό LB.
- Επίστρωση κυττάρων σε τρυβλία με κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων
- Επώαση στους 28 °C για 2-3 μέρες μέχρι την εμφάνιση αποικιών, ορατών με γυμνό μάτι.

Στην συγκεκριμένη εργασία μετασχηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα του Αγροβακτηρίου με το px11 πλασμιδιακό φορέα. Η επιβεβαίωση του μετασχηματισμού γίνεται με τη ανάπτυξη του βακτηρίου στο θρεπτικό όπου έχουν προστεθεί τα αντιβιοτικά καναμυκίνη (100μg/ml), στρεπτομυκίνη (100μg/ml), και ριφαμικίνη (50μg/ml),.

4.ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum*

Για την ανάπτυξη φυτών είναι απαραίτητη η απολύμανση των σπόρων του *Trigonella foenum-graecum*. Η απολύμανση πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο απολύμανσης του *Medicago truncatula* και είναι ο εξής:

- Οι 20 - 30 σπόροι εμβαπτίζονται σε 1 ml H₂SO₄ για 5 λεπτά (για το *Lotus japonicus* βάζουμε 100 σπόρους / erpendorf αλλά επειδή οι σπόροι των *Trigonella foenum-graecum* και *Medicago truncatula* είναι μεγαλύτεροι βάζουμε λιγότερους για να γίνει σωστά η απολύμανση)
- Οι σπόροι ξεπλένονται 5 φορές με παγωμένο νερό
- Προσθέτουμε 1 ml 100% χλωρίνη εμπορίου για 10 λεπτά
- Σε θάλαμο ασηπτικών συνθηκών οι σπόροι ξεπλένονται 6-7 φορές με αποστειρωμένο νερό (προαιρετικά αφήνονται 1 ώρα σε νερό πριν στρωθούν σε τρυβλία)
- Οι σπόροι τυλίγονται με αλουμινόχαρτο, τοποθετούνται στους 4°C overnight και μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης
- Έπειτα από 2 μέρες αφαιρείται το αλουμινόχαρτο και μετά από 3 μέρες φυτεύονται

Η ανάπτυξη των φυτών επιτυγχάνεται σε δωμάτιο ελεγχόμενων συνθηκών στους 21°C με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκότος. Οι γλάστρες σκεπάζονται με διαφανή μεμβράνη για όσο διάστημα χρειαστεί. Τα φυτά ποτίζονται κάθε 2 μέρες με διάλυμα Hoagland του οποίου η σύσταση είναι η παρακάτω:

Hoagland nutrient solution		
Συστατικά	Stock solutions concetration	ml/lit work solution
MgSO ₄	1M	2
KH ₂ PO ₄	1M	1
FeEDTA	1/10M	1
Micro elements		1
KNO ₃	20gr/100ml	5
Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	2,36 gr/100ml	5

Micro elements stock solution	
micro element	gr/lt stock solution
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ ,4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuCl ₂ ,H ₂ O	0,05
H ₂ MoO ₄	0,02

- ❖ Τα φυτά φυτεύονται σε υπόστρωμα άμμου / βερμικουλίτη σε αναλογία 1/2
- ❖ Στα παρακάτω υποστρώματα 0,8% άγαρ και B5/2 τοποθετούνται 5 φυτά σε κάθε συνθήκη
- ❖ Τα τρυβλία καλύπτονται με πάραφιλμ και γίνονται τρύπες για να αναπνέουν τα φυτά

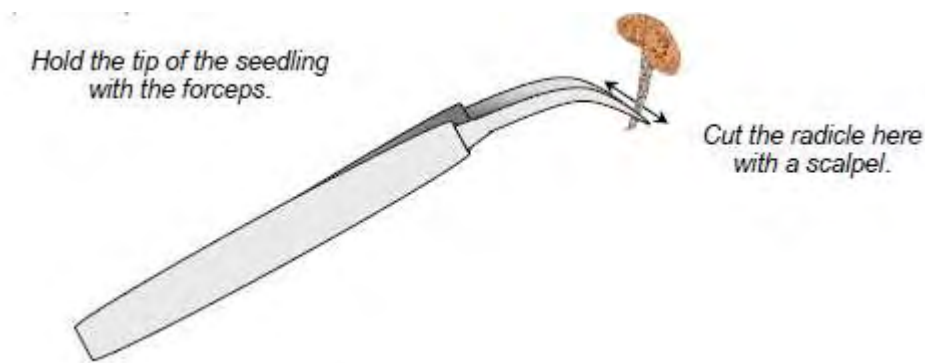
5. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ *Trigonella foenum-graecum* –HAIRY ROOT

5.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Trigonella foenum-graecum* –HAIRY ROOT

Για τον μετασχημάτισμο των φυτών ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο μόλυνσης με το *A. rhizogenes* Arqual:

- Πραγματοποιήθηκε απολύμανση 200 σπόρων με το παραπάνω πρωτόκολλο. Οι σπόροι στρώθηκαν σε τρυβλία 0,8% άγαρ και καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο. Έπειτα από 2 μέρες απομακρύνθηκε το αλουμινόχαρτο και τα φυτά μολύνθηκαν με το αγροβακτήριο μετά από 3 μέρες.
- Το στέλεχος αγροβακτηρίου από το στοκ γλυκερόλης αναπτύχθηκε για 2 μέρες σε τρυβλία LB – στρεπτομυκίνη και καναμυκίνη και για 2 μέρες σε υγρή καλλιέργεια. Στη συνέχεια 500 μl από την υγρή καλλιέργεια αναπτύχθηκαν σε τρυβλία LB - στρεπτομυκίνη και καναμυκίνη για 24 ώρες.
- Στα τρυβλία αγροβακτηρίου που έχουν αναπτυχθεί για 24 ώρες προστίθενται 2 ml αποστειρωμένο ddH₂O και με τη πιπέτα pasteur δημιουργείται ένα

εναιώρημα βακτηρίων, το οποίο τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί. Στο χαρτί τοποθετούνται 5 φυτά και απομακρύνονται οι ρίζες με νυστέρι. Η άκρη του υποκοτυλίου πρέπει να ακουμπάει στο εναιώρημα των αγροβακτηρίων και συνήθως ασκείται και μια ελαφριά πίεση με τη λαβίδα στο σημείο αυτό. Τα φυτά τοποθετούνται σε slant τρυβλία B5/2, καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης.



- Μετά από 2 μέρες αφαιρείται το αλουμινόχαρτο και αφήνονται στο θάλαμο για άλλες 3 μέρες.
- Στη συνέχεια τα φυτά μεταφέρονται σε slant τρυβλία B5/2 – cefotaxime (300μg/ml) και μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης για 17 μέρες. Κάθε 3 μέρες μεταφέρουμε τα φυτά σε καινούριο slant τρυβλίο με B5/2 – cefotaxime μέχρι να αναπτυχθεί η ρίζα.
- Τέλος επιτυγχάνεται δειγματοληψία της ρίζας και φυλάσσεται στους -80°C

Θρεπτικό υλικό B5/2	
Συστατικά	Ποσότητα
B5 Garborg's salt	0,165 gr
B5 βιταμίνες (1000X)	50 ml
Σουκρόζη	2 gr
Άγαρ	1 gr
dH ₂ O	100 ml
Το pH πρέπει να είναι αυστηρά ρυθμισμένο στο 5,5 με 1N NAOH πριν την τελική ογκομέτρηση. Οι βιταμίνες προστίθενται μετά την αποστείρωση του θρεπτικού υλικού.	

- ❖ Περίπου ~20 φυτά χρειάζονται 1 τρυβλίο αγροβακτηρίου. Τα φυτά, αφού απομακρύνουμε τις ρίζες, τα αφήνουμε 2 λεπτά μέσα στο εναιώρημα των βακτηρίων (αυτό δε το αναφέρει κάποιο πρωτόκολλο αλλά επειδή στο πρωτόκολλο του σταθερού μετασχηματισμού τα έκφυτα αφήνονται κάποια λεπτά, σκεφτήκαμε ότι ίσως αυξάνεται το efficiency της μόλυνσης).
- ❖ Σε κάθε τρυβλίο με θρεπτικό B5 τοποθετούνται 3-4 φυτά και τα φυτά καλύπτονται με milipore χάρτινη ταινία
- ❖ Η μεταφορά των φυταριών πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων.

Στην παρούσα εργασία για την επίτευξη του πειράματος μόλυνσης του *Trigonella foenum-graecum*, χρησιμοποιήθηκαν ως control τρεις φυτικές σειρές του ίδιου είδους. Συγκεκριμένα, η πρώτη φυτική σειρά ήταν φυτά που μολύνθηκαν με *Agrobacterium rhizogenes Arqual* που περιέχει τον άδειο φορέα pUBI-GWS-GFP, η δεύτερη σειρά φυτά που μολύνθηκαν με *Agrobacterium rhizogenes Arqual empty* και η τρίτη φυτική σειρά ήταν φυτά WT που ακολούθησαν το ίδιο πρωτόκολλο για hairy root αλλά δεν μολύνθηκαν με το *A. rhizogenes*. Ενώ, το κύριο πείραμα ήταν η προσπάθεια μόλυνσης του φυτού και με *A. rhizogenes Arqual* που περιέχει τον πλασμιδιακό φορέα px11 και παραγωγή μετασχηματισμένων ριζών hairy root.

6.ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ HAIRY ROOT, ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum*

6.1 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum* ΜΕ *Agrobacterium rhizogenes Arqual* pUBI-GWS-GFP

Οι ρίζες που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes Arqual* pUBI-GWS-GFP, control ελέγχονται σε μικροσκόπιο για GFP φθορισμό και αφαιρούνται οι ρίζες που δεν είναι μετασχηματισμένες. Η επιβεβαίωση του μετασχηματισμού μπορεί να γίνει μέσω φθορισμού αλλά και μέσω ενίσχυσης του γονιδίου GFP με PCR.

6.1.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ pUBI-GWS-GFP

Η υψηλή μεταγραφική δραστικότητα υποκινητών πολυουβικιτίνης έχει διερευνηθεί σε φυτά. Η ουβικιτίνη εμπλέκεται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με το πρωτεάσωμα 26S, το οποίο αναγνωρίζει ουβικουιτίνυλιωμένες-συζευγμένες πρωτεΐνες. Το γονίδιο κωδικοποιεί μια διαδοχική επανάληψη ουβικιτίνης και εκφράζεται σε διάφορους τύπους ιστού του φυτού. Η γονιδιοματική δομή του πολυουβικιτίνης διατηρείται μεταξύ των διαφόρων φυτών, συμπεριλαμβανομένων των *Helianthus annuus* (ηλίανθος), *Zea mays* (αραβόσιτος), *Petroselinum crispum* (μαϊντανός), *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (καπνός), *Solanum tuberosum* (πατάτα), *Pisum sativum* (μπιζέλι), *Oryza sativa* (ρύζι), και γλαδιόλες (Takaki M.; Mitsumasa K.; Yoshikazu S.; Shusel S.; Satoshi T.; Yoshikatsu M.; Makoto H.,2007).

Έχει αναφερθεί ότι το καλά συντηρημένο ιντρόνιο που βρίσκεται στη μη μεταφραζόμενη περιοχή 5 '(UTR) συμβάλλει στην υψηλή μεταγραφική δραστικότητα στο *A thaliana*, πατάτα, καπνό, και γλαδιόλες. Επιπρόσθετα, έχει επιτευχθεί η απομόνωση του προαγωγό πολυουβικιτίνης του *L. japonicus*, η δραστηριότητα του οποίου αναμένεται να είναι υψηλή και πανταχού παρόν στο *L. japonicus*, αλλά και η κατασκευή του υποκινητή πολυουβικιτίνης σε δυαδικά συστήματα (Takaki M.; Mitsumasa K.; Yoshikazu S.; Shusel S.; Satoshi T.; Yoshikatsu M.; Makoto H.,2007).

Αναπτύχθηκαν τέσσερα δυαδικά συστήματα με βάση τη τεχνολογία μετατροπής GATEWAY, για την υπερέκφραση ενός διαγονιδίου υπό τον προαγωγό Ljubq1 οι pub-GW-GFP και pub-GW-Hyg και για την γονιδιακή σίγηση οι pub-GWS-GFP και pub-GWS-Hyg. Συγκεκριμένα για την γονιδιακή σίγηση υπό τον υποκινητή Ljubq1 οι δύο δυαδικοί φορείς προορισμού pub-GWS-GFP και pub-GWS-Hyg έχουν tandem GATEWAY κασέτες, σε αντίθετο προσανατολισμό προς την άλλη. Αυτοί οι φορείς είναι σε θέση να παράγουν δίκλωνο RNA με το ιντρόνιο, του οποίου η δομή οδηγεί σε αποτελεσματική γονιδιακή σίγηση. Επίσης, κατασκευάστηκε pub-GFP και pub-Hyg για συμβατικές στρατηγικές κλωνοποίηση χωρίς την τεχνολογία GATEWAY (Takaki M.; Mitsumasa K.; Yoshikazu S.; Shusel S.; Satoshi T.; Yoshikatsu M.; Makoto H.,2007).

Οι δραστηριότητες του υποκινητή των τεσσάρων DNA θραύσματα Ljubq1 συγκρίθηκαν σε τριχωτό ρίζες/HAIRY ROOT. Για να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής σίγησης, μια μερική ακολουθία του γονιδίου *gus* (περίπου 450 bp) κλωνοποιήθηκε σε pUB-GWS- GFP και έγινε μόλυνση με

αγροβακτήριο-πλασμίδιο σε σταθερά μετασχηματισμένα GUS-φυτά (εκφράζουν το GUS). Ως εκ τούτου, στις διαγονιδιακές ρίζες το πρότυπο της έντασης GFP, είναι ένας δείκτης μετασχηματισμού (Takaki M.; Mitsumasa K.; Yoshikazu S.; Shusel S.; Satoshi T.; Yoshikatsu M.; Makoto H.,2007).

Στην παρούσα εργασία ο φορέας που χρησιμοποιήσαμε ως control είναι ο pUBI-GWS-GFP, καθώς έχει GFP σαν γονίδιο αναφοράς (στο οποίο έχει αφαιρεθεί το lethal gene, γιατί με βάση τη βιβλιογραφία υπάρχουν ενδείξεις ότι επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών). Η επιβεβαίωση μετασχηματισμού των φυτών hairy root μέσω της μόλυνσης τους με *Agrobacterium rhizogenes Arqua1* pUBI-GWS-GFP θα επιτευχθεί με τη μέθοδο PCR.

6.1.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΡΙΖΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΤΩΚΟΛΛΟ CTAB

Για την απομόνωση DNA από τις ρίζες των φυτών επιτυγχάνεται ως εξής:

- Λειοτριβήση των δειγμάτων (παραμονή στο υγρό άζωτο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας)
- Προσθήκη 200μl CTAB buffer (το οποίο προθερμαίνεται στο υδατόλουτρο στους 65 °C)
- Προσθήκη 1μl β-μερκαπτοαιθανόλη
- Επώαση για 10-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 200 μl Sevag buffer και αναδεύουμε σε μηχανικό αναδευτήρα για 30 δευτερόλεπτα (vortex)
- Φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο σωλήνα eppendorf
- Προσθήκη 0,7 του όγκου του υπερκειμένου ισοπροπανόλη (2propanol)
- Ανάδευση με αναστροφή και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 8-10 λεπτά
- Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα 500μl 70% αιθανόλης και αναδέυση
- Φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά

- Απόρριψη υπερκειμένου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά με ανοικτό καπάκι
- Προσθήκη 50μl RNAσης (10mg/ml)
- Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Διατήρηση στους -20°C

CTAB buffer	
Συστατικά	
Tris-Cl pH=8	100mM
EDTA pH=8	20mM
NaCl	1,4M
CTAB (cetyl tri methyl ammonium bromid)	2% w/v

*Το Sevag buffer περιέχει χλωροφόρμιο και ισομηλική αλκοόλη (3-Methylbutanol) σε αναλογία 24:1.

6.1.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR=Polymerase Chain Reaction*) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων και στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60.

Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μία θερμοκρασία στην άλλη, η οποία πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR, εκτός του DNA-εκμαγείου, είναι οι εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης. Αρχικά, προστίθεται το DNA και στη συνέχεια τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που έχουν αναμειχθεί όλα μαζί (master mix).

PCR	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)

DNA-εκμαγείο	1
Ορθόδρομος εκκινητής F (10μM)	0,4
Οπισθόδρομος εκκινητής R (10μM)	0,4
dNTPs (10 mM)	0,4
Taq DNA πολυμεράση (5 unit/μl)	0,08
Buffer Taq πολυμεράσης με Mg	2
ddH ₂ O	15,72
Τελικός όγκος	20

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε η απλή PCR για την ενίσχυση του γονιδίου GFP, έτσι ώστε να επιβεβαιώσει τον μετασχηματισμό των φύτων. Οι εκκινητές ήταν οι παρακάτω:

pUBGFP-F: GCTACCCCGACCACATGAA

pUBGFP-R: GTTGTACTCCAGCTTGTGCC

Αυτή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιλαμβάνει την αρχική αποδιάταξη των κλώνων στους 95°C για 5', ακολουθούμενη από 35 κύκλους που αρχίζουν στους 95 °C για 30 δευτερά, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στους 58°C για 30'' και στους 72°C για 1 λεπτό για την επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων τμημάτων. Μετά το πέρας των κύκλων, η αντίδραση συνεχίζεται για 5 λεπτά στους 72°C για την επιμήκυνση όλων των τμημάτων DNA και αδρανοποιείται στους 4°C.

Ακόμη, έγινε μια επιπλέον PCR με τις ίδιες συνθήκες για την επιβεβαίωση των stock στους -80°C των αγροβακτηριών *A. rhizogenes Arqual* pUBI-GWS-GFP και *A. rhizogenes Arqua-empty*. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε καλλιέργεια του κάθε αγροβακτηρίου σε LB με τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη (100μg/ml) και καναμυκίνη (100μg/ml) στους 28 °C για 48 ώρες. Στη συνέχεια, από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν 50μl και τα τοποθετήθηκαν σε καινούριο eppendorf 1,5ml και φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα στην μέγιστη ταχύτητα. Μετά την απόρριψη υπερκείμενου το ίζημα μεταφέρθηκε σε PCR tube και τοποθετήθηκαν τα υπόλοιπα αντιδραστήρια της αντίδρασης.

6.1.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων, πρωτεϊνικής ή νουκλεϊνικής φύσεως, από ένα μίγμα τους. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων να μετακινούνται από τον αρνητικό πόλο στον θετικό, λόγω της ύπαρξης φωσφορικών ομάδων που εντοπίζονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό.

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται βάσει μεγέθους και διαμόρφωσης σε πηκτή αγαρόζης. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή. Γενικά, σε πηκτή με 0,8% αγαρόζη, διαχωρίζονται τμήματα DNA μήκους 1-12 kb. Όσον αφορά τη διαμόρφωση, τα υπερελικωμένα μόρια κινούνται πιο γρήγορα από τα μόρια με «χαλαρή» διαμόρφωση και τα κυκλικά πιο γρήγορα από τα γραμμικά.

Με τη μέθοδο αυτή, τα τμήματα DNA διαχωρίζονται με βάση την απόσταση που έχουν διανύσει από την άνοδο και η σύγκριση της απόστασης που διένυσαν με την απόσταση που διανύουν στάνταρ θραύσματα γνωστού μεγέθους, πληροφορεί για το μέγεθος των πρώτων. Για να γίνουν διακριτά τα μόρια του DNA/RNA, προστίθεται το φθορίζον μόριο βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA/RNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.

Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μέχρι να λιώσει.
- Στη λιωμένη αγαρόζη, προστίθεται 0,001 % v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- Σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, προστίθενται οι «χτένες», οι οποίες θα δημιουργήσουν τις υποδοχές των δειγμάτων. Προστίθεται το διάλυμα της αγαρόζης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνονται οι «χτένες» και η πηκτή τοποθετείται στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE, μέχρι την πλήρη κάλυψη της πηκτής.
- Πραγματοποιείται η φόρτωση του μάρτυρα (marker) και των δειγμάτων στις υποδοχές της πηκτής. Στα δείγματα προς ανάλυση, προστίθεται 1/10 όγκου

διαλύματος χρωστικής 10X DLB για την οπτικοποίηση των δειγμάτων στην πηκτή, καθώς και στην ικανότητα τους να διατηρούν τα δείγματα στις υποδοχές και να μην έξω από αυτές.

- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/cm.
- Τα δείγματα γίνονται ορατά με τη χρήση του υπεριώδους φωτός και μιας κάμερας που επιτρέπει τη λήψη φωτογραφιών της πηκτής.

Υλικά για ηλεκτροφόρηση	
Υλικά	Συστατικά
TAE (50X)	24,2% w/v Tris (BDH), 57,1 ml/l CH ₃ COOH (BDH), 100 ml/l EDTA συγκέντρωσης 0,5 M (Serva).
Βρωμιούχο αιθίδιο	Παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4 ^o C.
DLB (10X)	0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη.

Στην παρούσα εργασία περιμένουμε να δούμε ζώνη μεγέθους 215bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο GFP του στελέχους *Arqua1* pUB-GWS- GFP.

6.2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum* ΜΕ *Agrobacterium rhizogenes Arqua1* px11

Η ανίχνευση του φορέα θεωρείται ότι μπορεί να γίνει μέσω:

1. Ανίχνευση χρώματος.
2. Μέσω ενζυματικού προσδιορισμού της DOPA-4,5 διοξυγενάσης (τυροσινάσης).
3. HPLC στα 530 nm (βητανίνη).
4. Μέσω της πέψης με ένζυμα περιορισμού.

Στην παρούσα εργασία η ανίχνευση των μολυσμένων ριζών με *Arqua1*-px11 θα γίνει με γυμνό μάτι λόγω του κόκκινου χρώματος στις μετασχηματισμένες ρίζες.

ΠΕΙΡΑΜΑ Β.:ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ *Trigonella foenum-graecum*

1.ΡΙΖΟΒΙΟ *Sinorhizobium meliloti* ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ

1.1 ΡΙΖΟΒΙΟ *Sinorhizobium meliloti*

Στις ρίζες των φυτών (κυρίως στο Fabaceae) που συσχετίζονται με συμβιωτικά βακτήρια που δεσμεύουν άζωτο εμφανίζονται ριζικά φυμάτια. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, τα ψυχανθή διαμορφώνουν μια συμβιωτική σχέση με ένα στέλεχος βακτηρίων ειδικό του ξενιστή, που είναι γνωστό ως ριζόβιο. Μέσα σε φυμάτια ψυχανθών, το ατμοσφαιρικό άζωτο από την ατμόσφαιρα μετατρέπεται σε αμμωνία, η οποία στη συνέχεια αφομοιώνεται σε αμινοξέα (τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών), νουκλεοτίδια (τα δομικά στοιχεία του DNA και του RNA, καθώς και στο σημαντικό από ενεργειακή άποψη μόριο ATP), και άλλα κυτταρικά συστατικά όπως βιταμίνες, φλαβόνες και ορμόνες.

Η ικανότητά τους να δεσμεύουν αέριο άζωτο κάνει τα ψυχανθή έναν ιδανικό οργανισμό στις καλλιέργειες, καθώς η απαίτησή τους για αζωτούχα λιπασμάτα μειώνεται. Πράγματι, η υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο σταματά την ανάπτυξη φυματίων, καθώς δεν υπάρχει όφελος για το φυτό, για να διαμορφώσει συμβίωση. Η ενέργεια για την καθήλωση του ατμοσφαιρικού αζώτου στο φυμάτιο προέρχεται από τα σάκχαρα που μετατοπίζονται από το φύλλο (ένα προϊόν της φωτοσύνθεσης). Το μηλικό (ή μαλειικό) ως προϊόν διάσπασης της σακχαρόζης, είναι η άμεση πηγή άνθρακα για το βακτηροειδές (κύτταρα του αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *Rhizobium*, ριζόβιο, των ριζικών φυματίων). Η δέσμευση του αζώτου στο φυμάτιο είναι πολύ ευαίσθητη σε οξυγόνο. Οι όζοι ψυχανθών φιλοξενούν μια πρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο που ονομάζεται *leghaemoglobin*, η οποία συνδέεται στενά με την μυοσφαιρίνη των ζώων, προκειμένου να διευκολυνθεί η μετατροπή του αερίου αζώτου σε αμμωνία.

Το ριζόβιο *Sinorhizobium* διαμορφώνει φυμάτια που δεσμεύουν το άζωτο στις ρίζες ορισμένων γενών των ψυχανθών φυτών, συμπεριλαμβανομένων των *Medicago*, *Melilotus* και *Trigonella*. Είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο που δεσμεύει το άζωτο (ριζόβιο). Διαμορφώνει συμβιωτική σχέση με ψυχανθή από τα γένη *Medicago*, *Melilotus* και *Trigonella*, συμπεριλαμβανομένου του ψυχανθούς-προτύπου *Medicago*

truncatula. Αυτή η συμβίωση καταλήγει σε ένα νέο όργανο φυτού που ονομάζεται ριζικό φυμάτιο.

Η συμβίωση μεταξύ *S. meliloti* και των φυτών ξενιστών του αρχίζει όταν το φυτό εκκρίνει μια σειρά από βεταΐνες και φλαβονοειδή στη ριζόσφαιρα. Αυτές οι ενώσεις προσελκύουν την *S. meliloti* στην επιφάνεια των ριζικών τριχιδίων του φυτού, όπου τα βακτήρια αρχίζουν να εκκρίνουν παράγοντα όζου (ή κόμβου).

2. ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum* ΜΕ ΡΙΖΟΒΙΟ *Sinorhizobium meliloti*

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν 16 φυτά *Trigonella foenum-graecum* (ακολουθώντας το πρωτόκολλο ανάπτυξης της παραγράφου 4.1), τα οποία στη συνέχεια φυτεύτηκαν και την ημέρα που μολύνθηκαν με το ριζόβιο αυτό. Συγκεκριμένα, 8 από τα φυτά μολύνθηκαν με *S. meliloti* αγρίου τύπου (WT), το οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό ριφαμπικίνης και τα υπόλοιπα 8 μολύνθηκαν με *S. meliloti*-GFP, το οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό τετρακυκλίνης.

Η μόλυνση με το ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*, συμβιώτη του φυτού *Medicago truncatula* πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Το βακτήριο από το στοκ γλυκερόλης αναπτύσσεται για 2 μέρες σε τρυβλίο με θρεπτικό TY και στη συνέχεια σε υγρή καλλιέργεια TY για 2 μέρες.
- Πραγματοποιείται φωτομέτρηση και αραίωση ώστε να έχουμε OD=0,1
- Τοποθετείται 1 ml ριζοβίου πολύ κοντά στις ρίζες των φυτών.
- Τα φυτά δε ποτίζονται για 2 μέρες.

Τα φυτά ποτίζονται κάθε 2 μέρες με διάλυμα Hoagland, που δεν περιέχει πηγές αζώτου για τα φυτά, η σύσταση το οποίου είναι η παρακάτω:

Hoagland nutrient solution		
Συστατικά	Stock solutions concentration	ml/ltr work solution
MgSO ₄	1M	2
KH ₂ PO ₄	1M	1
FeEDTA	1/10M	1
Micro elements		1
CaCl ₂	0,5M	10
KCl	1M	5

Micro elements stock solution	
micro element	gr/lt stock solution
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ ,4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuCl ₂ ,H ₂ O	0,05
H ₂ MoO ₄	0,02

3.ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ

Η μόλυνση των φυτών με *S. meliloti*-GFP μας δίνει την δυνατότητα να οπτικοποιήσουμε στο στερεοσκόπιο τα φυμάτια λόγω του φορισμού GFP. Βέβαια τα φυμάτια είναι εμφανή με γυμνό μάτι είτε στα φυτά που μολύνθηκαν με *S. meliloti*-GFP είτε σε αυτά που μολύνθηκαν με *S. Meliloti* αγρίου τύπου (WT).

Δ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΕΙΡΑΜΑ Α: ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum* –HAIRY ROOT

1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum*

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο μετασχηματισμού hairy root την 8^η ημέρα ανάπτυξης των φυτών κόβεται η ρίζα του φυτού για να μολυνθεί με το αγροβακτήριο. Στη παρακάτω εικόνα φαίνονται τα φυτά WT, σε τρυβλίο agar 0,8%, την 8^η μέρα πριν την απομάκρυνση της ρίζας τους.



Φυτά WT σε τρυβλίο agar 0,8% την 8^η μέρα πριν την απομάκρυνση της ρίζας τους.

2. HAIRY ROOT ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum*

Μετά το πέρας των 30 ημερών του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού hairy root περιμένουμε να δούμε τις μετασχηματισμένες ρίζες των φυτών *Trigonella*. Στην παρακάτω Εικόνα A βλέπουμε το φαινόμενο hairy root του φυτού που μολύνθηκε με *Arqua1*-pUBI-GWS-GFP μέσα στο κόκκινο πλαίσιο του τρίτου κατά σειρά φυτού. Ενώ στην Εικόνα B βλέπουμε, μέσα από το στερεοσκόπιο, επίσης μια μετασχηματισμένη ρίζα φυτού που μολύνθηκε με *Arqua1*-pUBI-GWS-GFP .



Εικόνα A: Μετασχηματισμένες ρίζες *Trigonella foenum-graecum* μολυσμένες με το *Agrobacterium rhizogenes Arqua1* pUBI-GWS-GFP . Εικόνα B: Μετασχηματισμένες ρίζες *Trigonella foenum-graecum* μολυσμένες με το *Agrobacterium rhizogenes Arqua1* pUBI-GWS-GFP υπό στερεοσκόπιο ορατού φωτός.

2.1 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum* ΜΕ *Agrobacterium rhizogenes Arqual* pUBI-GWS-GFP

2.1.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

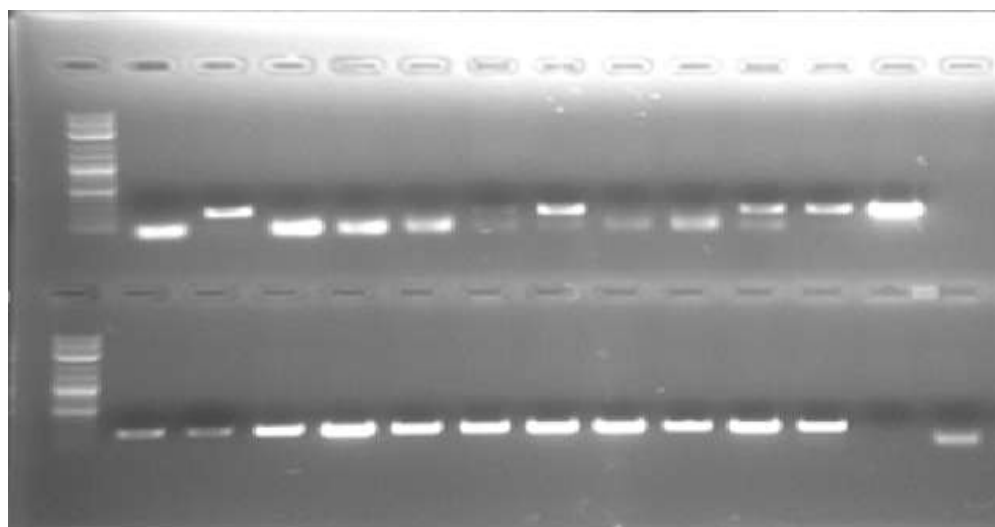
Στην συγκεκριμένη PCR χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ριζών φυτών και από τα τρία είδη φυτών control, τα φυτά WT που ακολούθησαν το πρωτόκολλο hairy root αλλά δεν μολύνθηκαν με κάποιο αγροβακτήριο, φυτά που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes Arqual* pUBI-GWS-GFP αλλά φυτά που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes Arqual empty*.

Τα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στην παρακάτω εικόνα του gel αγαρόζης 1,2%. Τα δείγματα στα πηγαδάκια στη πάνω σειρά είναι τα εξής:

- 1^η θέση: μάρτυρας
- 2^η, 3^η, 4^η, 5^η θέση: ρίζες φυτών-WT
- 6^η, 7^η θέση: αρνητικό control (ddH₂O)
- 8^η, 9^η, 10^η, 11^η, 12^η θέση: ρίζες φυτών που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes Arqual empty*
- 12^η θέση: θετικό control (pUBI-GWS-GFP πλασμίδιο)

Τα δείγματα στα πηγαδάκια στη κάτω σειρά είναι τα εξής:

- 1^η θέση: μάρτυρας
- 2^η, 3^η, 4^η, 5^η, 6^η, 7^η, 8^η, 9^η, 10^η, 11^η, 12^η, 13^η θέση: ρίζες μολυσμένες με *Agrobacterium rhizogenes Arqual* pUBI-GWS-GFP
- 8^η θέση: αρνητικό control (ddH₂O)



Τα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στο παρακάτω πίνακα. Συγκεκριμένα, έδειξαν ζώνες που επιβεβαιώνουν τον μεγαλύτερο αριθμό προέλευσης των δειγμάτων και στις δύο σειρές του ηλεκτόφωρου. Ωστόσο, οι ζώνες στη 3^η, 8^η, 11^η και 12^η θέση της πάνω σειράς του gel δίνουν θετικό αποτέλεσμα ενώ το πρώτο είναι WT δείγμα και τα υπόλοιπα τρία είναι δείγματα ρίζας φυτών που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes Arqua1 empty* αντίστοιχα.

Trigonella root samples from plants inoculated by:	GFP primers
Arqua1 pub -GWS-GFP: 1	✓
Arqua pub-GWS-GFP:2	✓
Arqua pub-GWS-GFP:3	✓
Arqua pub-GWS-GFP:4	✓
Arqua pub-GWS-GFP:5	✓
Arqua pub-GWS-GFP:6	✓
Arqua pub-GWS-GFP:7	✓
Arqua pub-GWS-GFP:8	✓
Arqua pub-GWS-GFP:9	✓
Arqua pubI-GWS-GFP:10	✓
Arqua pubI-GWS-GFP:11	x
Arqua pubI-GWS-GFP:12	x
control WT:1	x
control WT:2	✓
control WT:3	x
control WT:4	x
Arqua pubI-empty:1	✓
Arqua pubI- empty:2	x
Arqua pubI- empty:3	x
Arqua pubI- empty:4	✓
Arqua pubI- empty:5	✓

Τα θετικά αποτελέσματα (ζώνη μεγέθους GFP) στα δείγματα φυτών που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes Arqua1 empty*, οδηγούν στο ερώτημα για το εάν το βακτηριακό στέλεχος αυτό έχει επιμολυνθεί με το *A. rhizogenes Arqua1* -pUBI-GWS-GFP πλασμίδιο. Για την επιβεβαίωση καθαρότητας του stock αγροβακτηρίου, επιτεύχθηκε μια ακόμη PCR με τις ίδιες συνθήκες των stock στους -80°C των αγροβακτηρίων *A. rhizogenes Arqua1* pUBI-GWS-GFP και *A. rhizogenes Arqua1empty*. Τα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στην παρακάτω εικόνα του gel αγαρόζης 1,2%. Τα δείγματα στα πηγαδάκια είναι τα εξής:

- 1^η θέση: μάρτυρας
- 2^η, 3^η θέση: *A. rhizogenes Arqua1 empty*
- 4^η, 5^η θέση: *A. rhizogenes Arqua1* pUBI-GWS-GFP

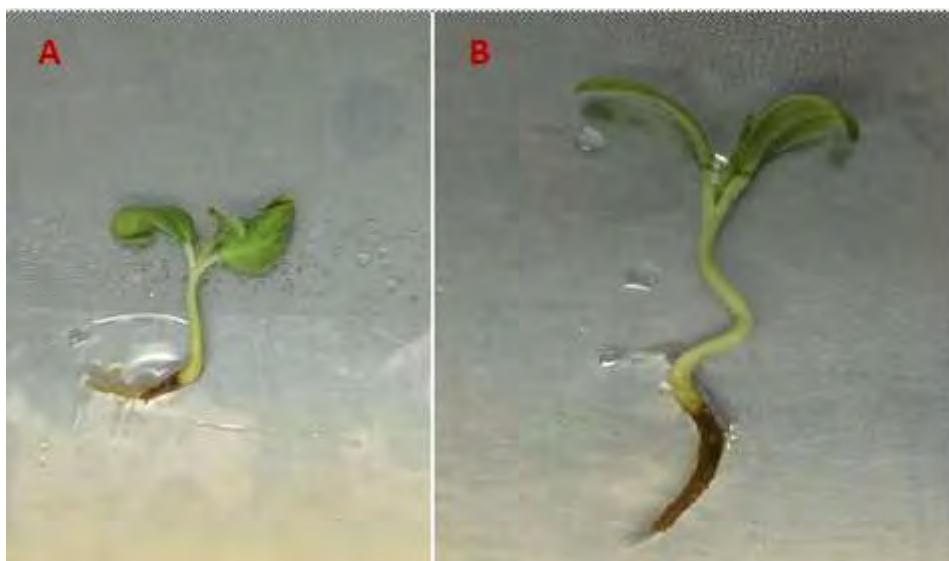
- 6^η θέση: αρνητικό control (ddH₂O)
- 7^η θέση: θετικό control (pUBI-GWS-GFP πλασμίδιο)



Τα αποτελέσματα της PCR δείχνουν πως τα stock είναι καθαρά και δεν έχουν επιμολυνθεί.

2.1.2 *Trigonella foenum-graecum* ME *Agrobacterium rhizogenes* Arqual-px11

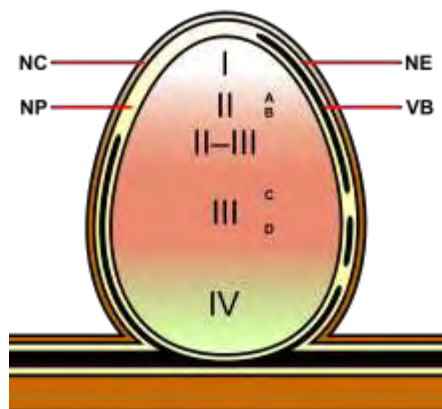
Οι μετασηματισμένες ρίζες των φυτών που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes* Arqual-px11 περιμέναμε να φέρουν κόκκινο χρώμα. Ωστόσο, τα φυτά δεν κατάφεραν να αναπτύξουν hairy roots στην παρούσα εργασία. Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται τα φυτά *T. foenum-graecum* της 3^η εβδομάδα ανάπτυξής τους.



Εικόνα A και B: Φυτά *T. foenum-graecum* μολυσμένα με *A. rhizogenes* Arqual-px11 την 3^η εβδομάδα ανάπτυξής τους.

ΠΕΙΡΑΜΑ Β: ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΡΙΖΟΒΙΟ

Στο πείραμα αυτό περιμένουμε να δούμε μη καθορισμένα (Indeterminate nodules) φυμάτια. Το κάθε Indeterminate φυμάτιο αποτελείται από τις παρακάτω ζωνώσεις:



Διάγραμμα που απεικονίζει τις διαφορετικές ζώνες μη καθορισμένου φυματίου.

Ζώνη I - δραστικό μερίστωμα. Αυτό εντοπίζεται όπου σχηματίζεται νέος ιστός φυματίου, ο οποίος θα διαφοροποιηθεί αργότερα προς τις άλλες ζώνες του οζιδίου.

Ζώνη II - η ζώνη μόλυνσης. Αυτή η ζώνη είναι διαποτισμένη με λεπτά νήματα (σχοινίες) μόλυνσης γεμάτα βακτήρια. Τα φυτικά κύτταρα είναι μεγαλύτερα από ό,τι στην προηγούμενη ζώνη και η κυτταρική διαίρεση σταματάει.

Interzone II-III - Εδώ τα βακτήρια έχουν εισέλθει στα φυτικά κύτταρα, τα οποία περιέχουν αμυλοπλάστες. Επιμηκύνονται και αρχίζουν την τελική διαφοροποίηση προς συμβιωτικά, βακτηριοειδή που δεσμεύουν το άζωτο.

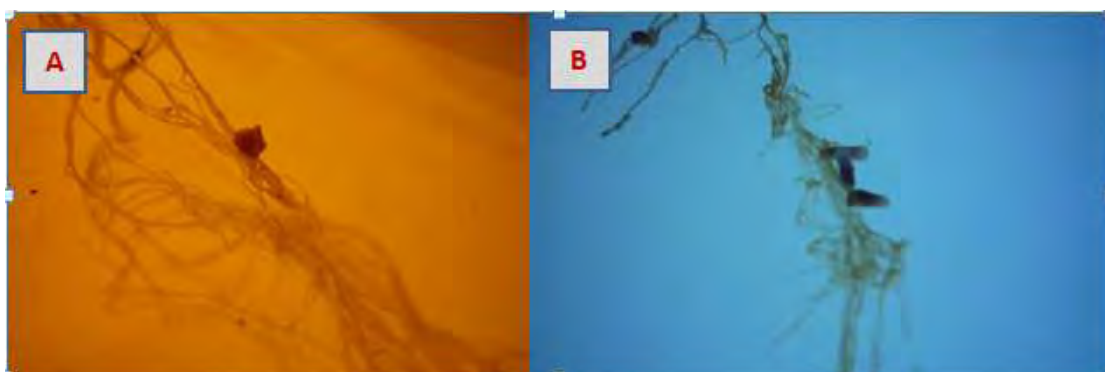
Ζώνη III - η ζώνη δέσμευσης αζώτου. Κάθε κύτταρο στη ζώνη αυτή περιέχει ένα μεγάλο, κεντρικό κενοτόπιο και το κυτόπλασμα γεμίζει με πλήρως διαφοροποιημένα βακτηριοειδή που δεσμεύουν ενεργά άζωτο. Το φυτό παρέχει σ' αυτά τα κύτταρα αιμοσφαιρίνη ψυχανθών, με αποτέλεσμα ένα διακριτό ροζ χρώμα.

Ζώνη IV - γηρασμένη ζώνη. Εδώ φυτικά κύτταρα και το περιεχόμενό τους σε βακτηριοειδή, αποδομούνται. Η αποδόμηση της συνιστώσας της αίμης της αιμοσφαιρίνης ψυχανθών, οδηγεί σε ορατό πρασίνισμα στη βάση του φυματίου. Αυτό είναι το πιο ευρέως μελετημένο είδος φυματίων, αλλά οι λεπτομέρειες είναι αρκετά διαφορετικές σε φυμάτια του φυστικιού και συγγενείς του και σε ορισμένες άλλες

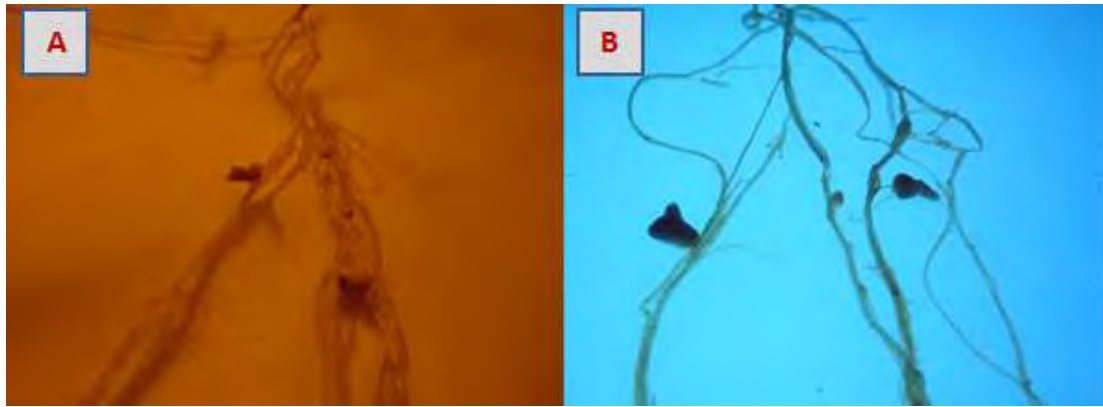
σημαντικές καλλιέργειες όπως τα λούπινα, όπου το φυμάτιο σχηματίζεται μετά από άμεση μόλυνση από *rhizobia* (γένος βακτηρίου) μέσω της επιδερμίδας και όπου λεπτά νήματα (σχοινίες) λοίμωξης δεν σχηματίζονται ποτέ. Φυμάτια αναπτύσσονται γύρω από τη ρίζα, σχηματίζοντας μια δομή που μοιάζει με κολλάρο. Σε αυτά τα φυμάτια και στον τύπο που υπάρχει στο φυστίκι, ο κεντρικά μολυσμένος ιστός είναι ομοιόμορφος, χωρίς τα μη μολυσμένα κύτταρα που παρατηρούνται σε φυμάτια σπόρων σόγιας και πολλούς απροσδιόριστους/απροσδιόριστης αύξησης τύπους, όπως στα μπιζέλια και τα τριφύλλια.

1.ΦΥΜΑΤΙΑ ΦΥΤΩΝ *Trigonella foenum-graecum* ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΘΗΚΑΝ ΜΕ ΡΙΖΟΒΙΟ *Sinorhizobium meliloti*

Τα φυμάτια που βρέθηκαν στις ρίζες των φυτών που μολύνθηκαν με το ριζόβιο *S. meliloti*-GFP αλλά και στις ρίζες των φυτών που μολύνθηκαν με *S. meliloti* αγρίου τύπου (WT) την ημέρα 21 και 33 φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα A: Ρίζες φυτών *Trigonella foenum-graecum*, 21 μέρες μετά τη μόλυνση με το ριζόβιο *S. meliloti*-GFP. Εικόνα B: Ρίζες φυτών *Trigonella foenum-graecum*, 33 μέρες μετά τη μόλυνση με το ριζόβιο *S. meliloti*-GFP.



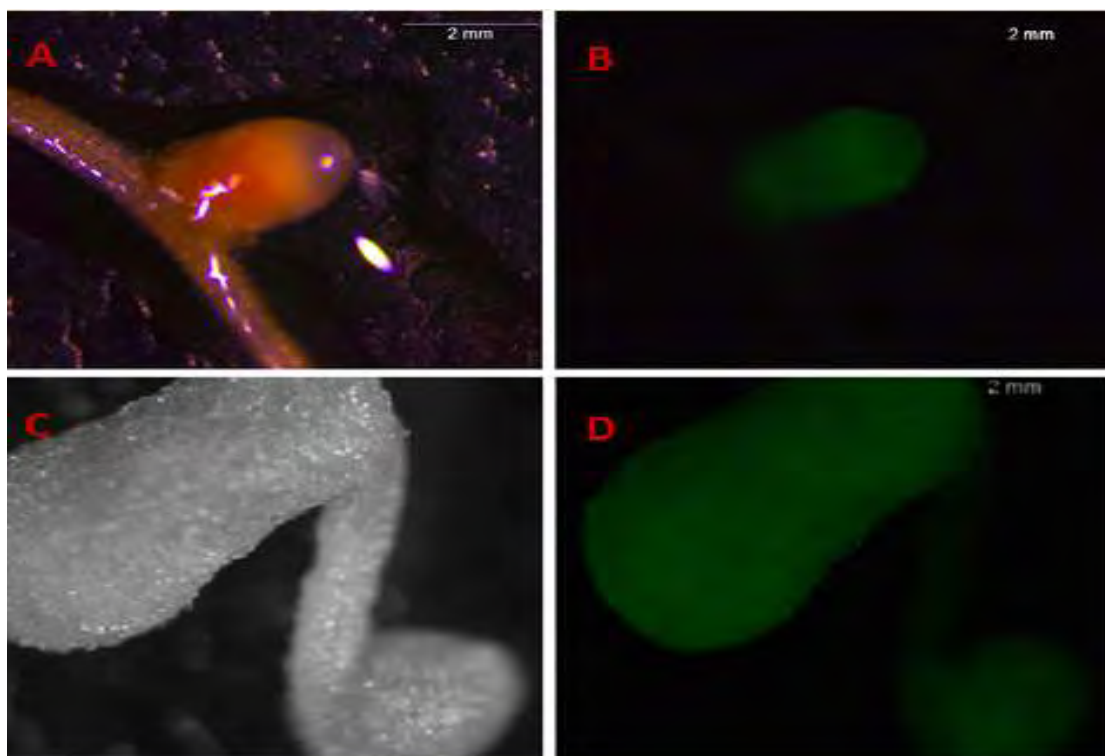
Εικόνα Α: Ρίζες φυτών *Trigonella foenum-graecum*, 21 μέρες μετά τη μόλυνση με το ριζόβιο *S. meliloti*-WT. Εικόνα Β: Ρίζες φυτών *Trigonella foenum-graecum*, 33 μέρες μετά τη μόλυνση με το ριζόβιο *S. meliloti*-WT.

Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τον συνολικό αριθμό φυματίων που βρέθηκαν στη ρίζα φυτών *Trigonella foenum-graecum* 21 και 33 μέρες μετά τη μόλυνση με το ριζόβιο *S. meliloti*-WT αλλά και με ριζόβιο *S. meliloti*-GFP:

ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ <i>S.meliloti</i> - GFP	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΗΜΕΡΑ 21 ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΗΜΕΡΑ 33 ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ
ΦΥΤΟ Νο 1	8 μεγάλα + 9 μικρά	7 μεγάλα και 9 μικρά
ΦΥΤΟ Νο 2	6 μεγάλα+4 μικρά	4 μεγάλα και 4 μικρά
ΦΥΤΟ Νο 3	2 μεγάλα + 4 μικρά	3 μεγάλα και 2 μικρά
ΦΥΤΟ Νο 1	5 μεγάλα +2 μικρά	3 μεγάλα και 4 μικρά
ΦΥΤΟ Νο 5	2 μεγάλα	6 μεγάλα και 5 μικρά
ΦΥΤΟ Νο 6	4 μεγάλα + 3 μικρά	4 μεγάλα και πολλά μικρά
ΦΥΤΟ Νο 7	1 μεγάλο +2 μικρά	Κανένα
ΦΥΤΟ Νο 8	κανένα	Κανένα
ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ <i>S.meliloti</i> - WT	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΗΜΕΡΑ 33 ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ
ΦΥΤΟ Νο 1	Κανένα	2 μεγάλα και πολλά μικρά
ΦΥΤΟ Νο 2	11 μικρά	Κανένα
ΦΥΤΟ Νο 3	3 μεγάλα +3 μικρά	2 μεγάλα και 3 μικρά
ΦΥΤΟ Νο 4	5 μεγάλα+2 μικρά	2 μεγάλα και πολλά μικρά
ΦΥΤΟ Νο 5	Κανένα	Πέθανε
ΦΥΤΟ Νο 6	4 μικρά	Κανένα
ΦΥΤΟ Νο 7	Πέθανε	Πέθανε
ΦΥΤΟ Νο 8	Πέθανε	Πέθανε

2.ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΜΕ GFP

Στην παρακάτω εικόνα γίνεται η επιβεβαίωση παραγωγής φυματίων ριζών *Trigonella foenum-graecum* μετά από 21 μέρες αφότου μολύνθηκαν με ριζόβιο *S. meliloti*-GFP οι οποίες τραβήχτηκαν στο στερεοσκόπιο.



Εικόνα A και C: Φυμάτια ριζών *Trigonella foenum-graecum* μετά από 21 μέρες αφότου μολύνθηκαν με ριζόβιο *S. meliloti*-GFP οι οποίες τραβήχτηκαν στο στερεοσκόπιο με ορατό φως. Εικόνα B και D: Φυμάτια ριζών *Trigonella foenum-graecum* μετά από 21 μέρες αφότου μολύνθηκαν με ριζόβιο *S. meliloti*-GFP οι οποίες τραβήχτηκαν στο στερεοσκόπιο φθορισμού.

Ε.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *Trigonella foenum-graecum* είναι ένα από τα παλαιότερα και πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φαρμακευτικά φυτά που καλλιεργείται σε μεγάλη εμβέλεια λόγω των ποικίλων θεραπευτικών εφαρμογών τους. Η χρησιμότητα της παραγωγής Τριγωνέλλας ως φαρμακευτικό φυτό, στηρίζεται στην σύντομη καλλιεργητική περίοδο, στο χαμηλό κόστος παραγωγής, στην εύκολη προσαρμογή σε διαφορετικές συνθήκες, στην ικανότητα του φυτού να παραγάγει δευτερογενείς μεταβολίτες με βιοτεχνολογικές

μεθόδους αλλά ουσιών όπως της διοσγενίνης και τριγωνελλίνης που θεωρούνται υποχοληστεριναιμικά και αντι-διαβητικά συστατικά αντίστοιχα. Για τους λόγους αυτούς είναι απαραίτητη η εύρεση καινούριων τεχνικών και μεθόδων που να οδηγούν στην αύξηση του περιεχομένου της Τριγωνέλλας σε δευτερογενείς μεταβολίτες.

Μια τεχνική μετασχηματισμού του φυτού αυτού είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την παραγωγή διαγονιδιακών ριζών του-hairy root. Η τεχνική αυτή είναι πολύ γρήγορη σε σχέση με τις κλασσικές τεχνικές σταθερού μετασχηματισμού ενός φυτού που διαρκούν αρκετούς μήνες. Επιπρόσθετα, η τεχνική αυτή περιλαμβάνει υψηλό ρυθμό ανάπτυξης ριζών (σε σύγκριση με τις μη μετασχηματισμένες ρίζες), καθώς επίσης και γενετική και βιοχημική σταθερότητα.

Οι μεταλαΐνες είναι ερυθρές-ιώδεις χρωστικές ουσίες, που έχει βρεθεί πως έχουν αντιοξειδωτική δράση, δράση κατά των ελευθερών ριζών ενώ χρησιμοποιούνται επίσης και ως συμπληρώματα διατροφής και φυσικές χρωστικές τροφίμων. Έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας και αυτό επιβεβαιώνεται με τη επίτευξη βιοσύνθεσής τους σε πολλά είδη φυτών, μέσω της μόλυνσης των φυτών με Αγροβακτήρια που περιλαμβάνουν το φορέα pX11.

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην προσπάθεια ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών για την παραγωγή βηταλαΐνης με την προσπάθεια ανάπτυξης μεθοδολογίας για την παραγωγή διαγονιδιακών ριζών στο φυτό *Trigonella foenum-graecum*, μέσω της μόλυνσης του με το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium rhizogene*.

Ωστόσο, υπήρξαν πολλά προβλήματα κατά την ανάπτυξη του φυτού σε *in vitro* συνθήκες και αυτό οδήγησε σε πολλές δοκιμές διαφόρων συνθηκών. Συγκεκριμένα, τα φυτά δεν επιβίωσαν στα τρυβλία ½ B5 θρεπτικού υλικού πάνω από 5 μέρες, είτε πέθαιναν είτε κιτρίνιζαν ίσως γιατί κατανάλωναν γρήγορα όλα τα θρεπτικά συστατικά του θρεπτικού υλικού και τελικά πέθαιναν από την έλλειψη θρεπτικών. Ακόμη, στο εσωτερικό του τρυβλίου εμφανιζόταν αρκετή υγρασία και τα φυτά κατέληγαν να μολύνονται και να πεθαίνουν. Για τους λόγους αυτούς καταλήξαμε να μεταφέρουμε τα φυτά κάθε τρεις μέρες σε καινούριο θρεπτικό σε μισά τρυβλία, για να έχουν διαθέσιμα συνεχώς θρεπτικά συστατικά, τα οποία καλύπτονταν με milipore ταινία για να αναπνέουν καλύτερα και να μειώνεται η υγρασία στο εσωτερικό του τρυβλίου. Με τον τρόπο αυτό καταφέραμε να αναπτύξουμε μετασχηματισμένες ρίζες-hairy root φυτών control (αυτά που μολύνθηκαν με *Arqual* pUB-GWS- GFP).

Με την επιβεβαίωση μετασχηματισμού μέσω PCR των ριζών-hairy root φυτών control που μολύνθηκαν με *Arqual* pUB-GWS- GFP, βρέθηκε πως είχαμε 91,6%

ποσοστό επιτυχίας μετασχηματισμού. Το μεγάλο ποσοστό θετικού αποτελεσματος μας οδήγησε στην αμφισβήτηση της καθαρότητας των δειγμάτων. Υποθέσαμε πως είχαν μείνει ίχνη αγροβακτηρίου στην επιφάνεια των μετασχηματισμένων ριζών και κατά την απομόνωση DNA απομονώθηκε εκτός από το DNA των ριζών και το γενετικό υλικό των αγροβακτηρίων που μόλυναν το φυτό. Για την μείωση ψευδούς θετικού αποτελέσματος, θα μπορούσαμε να επαναλάβουμε το πείραμα και στη συνέχεια πριν την δειγματοληψία να καθαρίζουμε τις ρίζες με 70% αιθανόλη, 20% χλωρίνη και τέλος ddH₂O.

Σχετικά με τα φυτά που μολύνθηκαν με *Arqua-px11* καταφέραμε να διατηρήσουμε ζωντανά και πράσινα τα φυτά έως κι 3 βδομάδες χωρίς όμως να βγάζουν ρίζα.

Τέλος, στην εργασία αυτή επυτεύχθει φυματογένεση στο φυτό με το ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*. Η επιτυχή φυματογένεση μας οδηγεί σε ένα καινούριο μελλοντικό στόχο, την ανάπτυξη μεθοδολογίας για την επιτυχή φυματογένεση στο φυτό *Trigonella foenum-graecum* με μετασχηματισμένες ρίζες-hairy root με το ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Aasim, M, Hussain N, Umer EM, Zubair M, Hussain BS, Saeed S, Rafique TS, and Sancak C 2010. In vitro shoot regeneration of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) using different cytokinins. *Afr. J. Biotechnol.* 9(42):7174–7179.
- Aasim M, Khawar KM, Yalcin G, Bakhsh A 2014. Current Trends In Fenugreek Biotechnology And Approaches Towards Its Improvement. *AJSIH Fenugreek Special Issue* Editors: S. K. Basu & G. Agoramorthy p.128-136.
- Acharya, S., A. Srichamroen, S. Basu, B. Ooraikul, and T. Basu. 2006. Improvement in the nutraceutical properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 28(suppl.1):1–9.
- Acharya, S.N., Blade, S., Mir, Z., Moyer, J.R. 2007a. Tristar fenugreek. *Can. J. Plant Sci.* 87(4): 901-903.
- Akiyoski, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W. & Gordon, M. P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5994-599g.
- Al-dalain S, El-kutry MS, Ibrahim HS 2008. Inhibitory effect of aqueous extracts of barley and fenugreek on ulcer induction in rats, *World. App. Sci.* 5(3): 332-339.
- Arivalagan M, Gangopadhyay KK, Kumar G 2013. Determination of steroidal saponins and fixed oil content in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) genotypes. *Indian J Pharm Sci* 75(1): 110–113.
- Arroo RRJ, Develi A, H Meijers, E Van de Westerlo, Kemp AK, Croes AF 1995. Effect of exogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in *Tagetes patula* hairy root cultures. *Physiol Plant*, Volume 93, Issue 2, pages 233–240.
- Ashihara H 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants, *Braz. J. Plant. Physiol.* 18(1):1-8.
- Ayora-Talavera T, Chappell J, Lozoya-Gloria E, Loyola-Vargas VM 2002. Overexpression in *Catharanthus roseus* hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. *Appl Biochem Biotechnol.* 2002 Feb;97(2):135-45.
- Azeredo HMC. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 44: 2365–2376.
- Banerjee S1, Shang TQ, Wilson AM, Moore AL, Strand SE, Gordon MP, Lafferty Doty S 2002. Expression of functional mammalian P450 2E1 in hairy root cultures. *Biotechnol Bioeng.* 15;77(4):462-6.
- Barry, G. F., Rogers, S. G., Fraley, R. T. & Brand, L. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4776-4780.

- Basch E, Ulbricht C, Kuo G, Szapary P, Smith M, 2003. Therapeutic applications of fenugreek, *Altern Med Rev.* 8(1):20-7.
- Basu SK 2006. Seed production technology for fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) in the Canadian prairies. Master of Science Thesis. Department of Biological Sciences University of Lethbridge, Alberta, Canada.
- Basu, S.K., Acharya, S.N., Bandara, M.S., Friebel, D., Thomas, J.E. 2009. Effects of genotype and environment on seed and forage yield in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) grown in western Canada. *Aust. J. Crop Sci.* 3(6): 305-314.
- Basu A, Basu SK, Kumar A, Sharma M, Chalghoumi R, Hedi A, Solorio-Sánchez F, Balogun MO, Cetzal-Ix EEH and W 2014. Fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum* L.), A Potential New Crop For Latin America. *AJSIH* Editors: S. K. Basu & G.Agoramoorthy. 4(3):145-162.
- Baynes JW 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40(4):405–412.
- Boisson-Dernier A. Andriankaja A., Chabaud M., Niebel A., Journet E.-P., Barker D. and de Carvalho-Neibel F. (2005) MtENOD11 gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 1269-76.
- Braun, A. C. (1958) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 344-349.
- Buchmann, I., Marner, F.-J., Schroder, G., Waffenschmidt, S. & Schroder, J. (1985) EMBO J. 4,853-859.
- Cato the Elder ≈160BC. De Agri Cultura, σελ. 27. Available at: http://penelope.uchicago.edu/Thayer/E/Roman/Texts/Cato/De_Agricultura/home.html
- Chabaud M, Boisson-Dernier A, Zhang J, Taylor CG, Yu O and Barker DG 2006. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. *Medicago truncatula* handbook version November 2006. Διαθέσιμο από: <https://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/AgrobacteriumRhizogenes.pdf>.
- Chapagain B, Wiesman Z, 2005. Variation in diosgenin level in seed kernels among different provenances of *Balanites aegyptiaca* Del (Zygophyllaceae) and its correlation with oil content, *Afr. J. Biotechnol.* 4(11):1209-1213.
- Chilton, M.-D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P. & Nester, E. W. 1977. *Cell* 11, 263-271.
- Chilton, M.-D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. & Tempe, J. 1982. *Nature* (London) 295, 432-434.
- Costantino, P., Spano, L., Pomponi, M., Benvenuto, E. & Ancora, G. (1984)

- Crane C., Wright E., Dixon R.A. and Wang Z.-Y. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223: 1344-1354.
- Crespi M & Gálvez S 2000. Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *Journal of Plant Growth and Regulation* 19 (2): 155–166.
- De Paolis, A., Mauro, M. L., Pomponi, M., Cardarelli, M., Spano, L. & Costantino, P. (1985) *Plasmid* 13,1-7.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P. and Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962-966.
- Foucher F & Kondorosi E 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43 (5–6): 773–786.
- Francis FJ 1999. *Colorants*. Egan Press. ISBN 1-891127-00-4.
- Furner I, Huffman G, Amasino R, Garfinkel D, Gordon M, Nester E. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature*. 1986;319:422–427.
- Garfinkel, D. J., Simpson, R. B., Ream, L. W., White, F. F., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1981) *Cell* 27, 143-153.
- Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology* 57: 761–780.
- Hamden K, Mnafigui K, Amri Z, Aloulou A, Elfeki A. Inhibition of key digestive enzymes related to diabetes and hyperlipidemia and protection of liver-kidney functions by trigonelline in diabetic rats. *Sci Pharm* 2013; 81: 233–246.
- Huffman, G. A., White, F. F., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1984) *J. Bacteriol.* 157, 269-276.
- Hu Z-B, Du M 2006. Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. vol. 48, no. 2, pp. 121-127.
- *J. Mol. Appl. Genet.* 2,465-470.
- Jouanin, L. (1984) *Plasmid* 12, 91-102.
- Kaur J, Singh H and Khan MU 2011. Multifarious Therapeutic Potential of Fenugreek: A Comprehensive Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2(3) p.863-871.
- Krishnaswamy K, 2008. Traditional indian spices and their health significance, Asia. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17 Suppl 1:265-8.
- Laila O. and Murtaza I. 2015. Fenugreek: a treasure of bioactive compounds with promising antidiabetic potential trigonilline (alkaloid). *IJFANS* 4:(1)149-157.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ané, J.M., Laubert, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C. and Debelle, F. (2004). A

- putative Ca²⁺ and calmodulin-dependant protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364.
- Limami, M. A., Sun, L.-Y., Douat, C., Helgeson, J., & Tepfer, D. (1998). Natural Genetic Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* : Annual Flowering in Two Biennials, Belgian Endive and Carrot. *Plant Physiology*, 118(2), 543–550.
 - Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., Bisseling T. and Geurts R. (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 55: 983-92.
 - Manivannan J, Arunagiri P, Sivasubramaniam J, Balamurugan E 2013. Diogenin prevents hepatic oxidative stress, lipid peroxidation and molecular alterations in chronic renal failure in rats. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* 3: 289-293.
 - Martin, E., H. Akan, M. Ekici, and Z. Aytac. 2011. New chromosome numbers in the genus *Trigonella* L. (Fabaceae) from Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 10(2):116–125.
 - Mathur V, and Mathur NK 2005. Fenugreek and other lesser known legume galactomannan-polysaccharides: Scope for development. *J. Sci. Ind. Res. (India)* 64:475–481.
 - Mehrafarin A, A Qaderi, SH Rezazadeh, H Naghdi Badi, GH Noormohammadi and Zand E 2010. Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum graecum* L.). *J. Medic. Plants.* 9(35):1-18.
 - Mehrafarin AA, SH Rezazadeh, BH Naghdi, GH Noormohammadi, E Zand and Qaderi A 2011. A review on biology, cultivation, biotechnology of fenugreek as a valuable medicinal plant and multipurpose. *J. Med. Plants.* 10(37):1-19.
 - Meyer AD, Takanari I, Meins F., Jr Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene. *Mol Gen Genet.* 1995;249:265–273.
 - Mireille Chabaud, Aurélien Boisson-Dernier, Juan Zhang, Christopher G. Taylor, Oliver Yu and David G. Barker November 2006. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation.
 - Monahan-Giovanelli H, Arango Pinedo C & Gage DJ 2006. Architecture of Infection Thread Networks in Developing Root Nodules Induced by the Symbiotic Bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 104 (2): 661–670.
 - Moreno DA, Garcia-Viguera C, Gil JL, Gil-Izquierdo A. 2008. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Reviews* 7: 261–280.

- Mullaicharam AR, Deori G, Uma MR 2013. Medicinal values of fenugreek –a review. *Res. J Pharma, Biol Chem Sci* 4(1):1304-1313.
- Nagatsu T, Sawada M. 2009. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism & Related Disorders* 15: S3–S8.
- Offringa I.A., Melchers L.S., Regensburg-Tuink A.J.G., Costantino P., Schilperoort R.A., and Hooykaas P.J.J. 1986. Genetics Complementation of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing aux mutants by genes from the TR-region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* (hairy root disease/phytohormones). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 83, pp.6935-6939.
- Ooms, G., Hooykaas, P. J. J., Moolenaar, G. & Schilperoort, R. A. (1981) *Gene* 14, 33-50.
- Polturak G, Breitel D, Grossman N, Sarrion-Perdigones A, Weithorn E, Pliner M, Orzaez D, Granell A, Rogachev I, Aharoni A 2015. Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.13796.
- Raheleh A, Hasanloo T, Khosroshahli M. Evaluation of trigonelline production in *Trigonella foenum-graecum* hairy root cultures of two Iranian masses. *Plant Omics J* 2011; 4(7): 408-412.
- Raju, J, Patlolla JMR, Swamy MV, and Rao CV 2004. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(8):1392-8.
- Ramesh BK, RHL Yogesh, SM Kantikar and Prakash KB 2010. Antidiabetic and histopathological analysis of fenugreek extract on alloxan induced diabetic rats. *Int. J. Drug Develop. Res.* 2(2):356-364.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE 2004. *Biology of Plants* (7th ed.). New York: W. H. Freeman and Company. p. 465. ISBN 0-7167-1007-2.
- Riker, AJ 1930. *J. Agric. Res.* (Lahore) 41, 507-540.
- Salisbury FB, Cleon WR 1991. *Plant Physiology* (4th ed.). Belmont, California: Wadsworth Publishing. pp. 325–326. ISBN 0-534-15162-0.
- Schroder, O., Waffenschmidt, S., Weiler, E. W. & Schroder, J. (1984) *Eur. J. Biochem.* 138, 387-391.
- Shahabzadeh Z, Heidari B, Hafez RF 2013. Induction of Transgenic Hairy Roots in *Trigonella foenum-graecum* Co-cultivated with *Agrobacterium rhizogenes* Harboring a GFP Gene. *J. Crop Sci. Biotech.* 16(4): 263-268.

- Sharma RD, Sarkar A, Hazra DK 1996. Hypolipidaemic effect of fenugreek seeds: a chronic study in non-insulin dependent diabetic patients. *Phytother Res.* 10:332–334.
- Skoog, F. & Miller, C. O. (1957) Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118-131.
- Smil, V 2000. *Cycles of Life*. Scientific American Library. ISBN 0-7167-6039-8. (http://faculty.washington.edu/stevehar/smil_ch.1.PDF).
- Snehlata HS, Dande R and Payal DR. 2008. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): An Overview. *Int J Curr Pharma Rev Res.* 2(4):169-187.
- Spano, L., Pomponi, M., Costantino, P., Van Slogteren, G. M. S. & Tempe, J. 1982. *Plant Mol. Biol.* 1, 291-300.
- Sprent JI 2009. *Legume nodulation: a global perspective*. Wiley-Blackwell, Online Library. Published Online: 2 NOV 2009.
- Sridevi V, Giridhar P 2013. Influence of altitude variation on trigonelline content during ontogeny of coffee canephora fruit. *J Food Studies*, 2(1);62-74.
- Stafford, HA 1994. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science* 101 (2): 91–98. doi:10.1016/0168-9452(94)90244-5. ISSN 0168-9452. Retrieved 20 May 2013
- Stintzing F, Carle R. 2007. Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends In Food Science & Technology* 18: 514–525.
- Strack D, Vogt T, Schliemann W 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62 (3): 247–69. doi:10.1016/S0031-9422(02)00564-2. PMID 12620337.
- Syeda BB, Muhammad IB and Shahabuddin M. 2008. Antioxidant activity from the extract of fenugreek seeds. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 9(2):78-83.
- Takaki M.; Mitsumasa K.; Yoshikazu S.; Shusel S.; Satoshi T.; Yoshikatsu M.; Makoto H.,2007.Polyubiquitin Promoter-Based Binary Vectors for Overexpression and Gene Silencing in *Lotus japonicas*
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* 54: 733–749. Tepfer D (1982) La transformation génétique de plantes supérieures par *Agrobacterium rhizogenes*. In 2e Colloque sur les Recherches Fruitières. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Bordeaux, France, pp 47–59.
- Tepfer D (1983) The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In A Puhler, ed, *Molecular Genetics of the Bacteria Plant Interaction*. Springer Verlag, Berlin, pp 248–258.
- Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell.* 1984;37:959–967.

- Tepfer, D. A. & Tempe, J. (1981) C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D 292, 153-156.
- Tepfer, D. (1984) Cell 37, 959-967.
- Thomashow, L. S., Reeves, S. & Thomashow, M. F. (1984) Proc. Nati. Acad. Sci. USA 81, 5071-5075.
- Trevor R 1963. *The Organic Constituents of Higher Plants*. Minneapolis: Burgess Publishing. p. 292.
- Vaidya K., Ghosh A., Kumar V., Chaudhary S., Srivastava N., Katudia K., Tiwari T., and Chikara S.K. 2013. De Novo Transcriptome Sequencing in *Trigonella foenum-graecum* L. to Identify Genes Involved in the Biosynthesis of Diosgenin. *The plant genome* vol. 6, no. 2 p1-11.
- Van de Velde W, Guerra JCP, Keyser AD, et al. 2006. Aging in Legume Symbiosis. A Molecular View on Nodule Senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. 141(2):711-720.
- Wani M, Sarvar FA, Agrawal J, Deshpande J, Mathew S, Khetmalas M 2012. Qualitative phytochemical analysis and antimicrobial activity studies of *Gymnema sylvestre* R. *Br.Acta Biologica Indica* 1(1):121-124.
- White F, Garfinkel D, Huffman G, Gordon M, Nester E. Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature*. 1983;301:348-350.
- White, F. F., Garfinkel, D. J., Huffman, G. A., Gordon, M. P. & Nester, E. W. 1983) *Nature* (London) 301, 348-350.
- White, F. F. & Nester, E. W. (1980) *J. Bacteriol.* 144, 710-720.
- Willmitzer, K., Sanchez-Serrano, J., Buschfeld, E. & Schell, J. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186, 16-22.
- Willmitzer, L., Simons, G. & Schell, J. 1982. *EMBO J.* 1, 139-146.
- Zerbino DR, and Birney E 2008. Velvet: Algorithm for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18(5):821-9).
- Zheng XQ, Hayashibe E, and Ashihara H 2005. Changes in trigonelline (N-methylnicotinic acid) content and nicotinic acid metabolism during germination of mungbean (*Phaseolus aureus*) seeds. *J. Exp. Bot.* 56: (416), 1615-23.
- Πλατής ΔΝ 2003. Μπαχαρικό Λεξικό. Εκδόσεις Κέδρος Α.Ε., σελ. 288, 447, 449, 455-467, 476. ISBN 960-04-2303-2.