



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΖΗΛΙΑΝΑΙΟΣ ΑΓΓΕΛΟΣ-ΜΑΡΙΟΣ

**«Γενετικός μετασχηματισμός του είδους *Atropa belladonna* L. μέσω του βακτηρίου
Agrobacterium rhizogenes ως εργαλείο για παραγωγή βιοδραστικών συστατικών»**



Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια, Π.Θ

ΒΟΛΟΣ 2024

«Γενετικός μετασχηματισμός του είδους *Atropa belladonna* L. μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes* ως εργαλείο για παραγωγή βιοδραστικών συστατικών»

«*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Atropa belladonna* L. as a tool to produce bioactive compounds»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Ουρανία Παυλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

Παναγιώτης Μαδέσης, Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος

Κυριάκος Γιαννούλης, Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φαρμακευτικά φυτά	3
1.1.2 Αξία των φαρμακευτικών φυτών... ..	4
1.1.3 Χρήσεις και προοπτικές εμπορικής αξιοποίησης των φαρμακευτικών φυτών	6
1.2 <i>Atropa Belladonna</i>	10
1.2.1 Βοτανική περιγραφή	11
1.2.2. Αύξηση και ανάπτυξη	13
1.2.3. <i>Atropa belladonna</i> και παραγωγή βιοδραστικών ουσιών	14
1.3 Έρευνα στο είδος <i>Atropa belladonna</i>	18
1.4 Πλαίσιο Βελτίωσης φυτών.....	20
1.4.1 Μοριακοί δείκτες.....	22
1.5 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	24
1.5.1 Πλασμίδιο Ri (root-inducing).....	27
1.5.2 Αξιοποίηση του <i>A. rhizogenes</i> ως φορέα γενετικού μετασχηματισμού.....	31
1.6 Σκοπός Έρευνας	32

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό	33
2.2 Προετοιμασία εκφύτων <i>Atropa belladonna</i>	34
2.3 Στελέχη του <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	36
2.4 Διαδικασία γενετικού μετασχηματισμού σπορόφυτων στην <i>Atropa belladonna</i>	36
2.5 Αξιολόγηση των μετασχηματισμένων σποροφύτων <i>Atropa belladonna</i>	37
2.5.1 Φαινοτυπική αξιολόγηση.....	37

2.5.2 Έλεγχος του μετασχηματισμού μέσω PCR	38
2.5.2.1 Εξαγωγή DNA.....	38
2.5.2.2 PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	39
2.5.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	41
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
3.1 Χρονική περίοδος έκπτυξης ριζών μετά τον εμβολιασμό	42
3.2 Αξιολόγηση φαινοτύπου μετασχηματισμένων ριζών στην <i>Atropa belladonna</i>	44
3.3 Επιβεβαίωση της διαγονιδιακής φύσης των μετασχηματισμένων ριζών.....	49
3.4 Επίδραση βακτηριακού στελέχους - Συχνότητα μετασχηματισμού	51
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτά αποτελούν σημαντική πηγή φαρμακευτικών ενώσεων, κατά κύριο λόγο δευτερογενών μεταβολιτών, που είναι υπεύθυνες για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Το είδος *Atropa belladonna* αποτελεί φαρμακευτικό φυτό πολύ μεγάλης σημασίας με ποικίλες θεραπευτικές επιδράσεις, οι οποίες προκύπτουν από μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, τα αλκαλοειδή του τροπανίου ή τροπανικά αλκαλοειδή. Σε αυτή την ομάδα τα πιο ενδιαφέροντα συστατικά είναι η υοσκιαμίνη, η ατροπίνη και η σκαλοπαμίνη (υοσκίνη), αλκαλοειδή που εντοπίζονται στην οικογένεια των *Solanaceae*. Παρά τις αναγνωρισμένες ιδιότητες των εν λόγω αλκαλοειδών, η ευρεία χρήση τους σε βιομηχανικές εφαρμογές καθίσταται πρακτικά δύσκολη λόγω της χαμηλής συγκέντρωσής τους στους ιστούς και στα μέρη του φυτού. Στο πλαίσιο αυτό, η ενίσχυση του αλκαλοειδούς περιεχομένου αυτών των φυτών με απώτερο σκοπό της συγκομιδή ικανοποιητικών ποσοτήτων, μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων, αποτελεί κύριο ερευνητικό στόχο εδώ και δεκαετίες. Μεταξύ άλλων, ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση αποτελεί η δημιουργία καλλιεργειών ριζών, οι οποίες αναπτύσσονται μέσω της χρήσης του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτόκολλου μετασχηματισμού του είδους *Atropa belladonna* με τη χρήση του *Agrobacterium rhizogenes*, και ειδικότερα του στελέχους *R1000* υπό την παρουσία της ακετοσιριγκόνης και MES στα θρεπτικά υποστρώματα. Τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα εμφάνισαν θυσσανώδες ριζικό σύστημα με αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων, ενώ ο επιτυχής μετασχηματισμός επιβεβαιώθηκε και μέσω της ενσωμάτωσης του γονιδίου *rolB2* και της απουσίας της περιοχής *virCD* του βακτηρίου. Με βάση τα ευρήματα της μελέτης, παρέχεται η προτεινόμενη μεθοδολογία για την υλοποίηση του μετασχηματισμού στο είδος *Atropa belladonna*.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φαρμακευτικά φυτά

Η χρησιμότητα των φυτών και των ιδιοτήτων τους για την κάλυψη των αναγκών του ανθρώπου αποτελεί κοινή πρακτική, καθώς αδιάκοπα διαδιδόταν είτε προφορικά είτε με τον εκάστοτε τρόπο καταγραφής και διάδοσης των πληροφοριών, από τις απαρχές της ανθρωπότητας. Με βάση τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες και το ρόλο τους στην ίαση ασθενειών, ορισμένα φυτικά είδη κατατάσσονται στην κατηγορία των φαρμακευτικών φυτών. Πιο συγκεκριμένα, ως φαρμακευτικά ορίζονται τα φυτά των οποίων ένα ή παραπάνω όργανα περιέχουν ουσίες ή πρόδρομες ουσίες που βοηθούν στην σύνθεση φαρμάκων που είναι αποδεκτά από τα δυτικά πρότυπα (Farnsworth & Soejarto, 1991).

Βάση αυτού του γενικευμένου ορισμού προκύπτουν κατηγοριοποιήσεις, σε φυτά στα οποία τα συστατικά τους έχουν τεκμηριωθεί επιστημονικά και σε φυτά που έχουν θεραπευτικές δράσεις αλλά ακόμα δεν έχουν τύχει συστηματικής μελέτης. Οι Sofowora et al. (2013) υποστηρίζουν πως, παρότι υπάρχει έλλειψη επιστημονικής επαλήθευσης σε μερικά φυτά, η χρήση τους στην παραδοσιακή ιατρική εδώ και χρονιά επαληθεύει τις φαρμακευτικές τους δράσεις. Επομένως, προτείνεται ότι στον γενικευμένο ορισμό των φαρμακευτικών φυτών είναι επιβεβλημένη η διάκριση στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Φυτά ή μέρη φυτών που χρησιμοποιούνται σε γαλήνια παρασκευάσματα, όπως αφεψήματα
- Φυτά που χρησιμοποιούνται για εξαγωγή ουσιών είτε για άμεση φαρμακευτική χρήση είτε για ημισύνθεση φαρμακευτικών ενώσεων
- Φυτά βρώσιμα ή που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία μπαχαρικών και αρωμάτων με φαρμακευτική χρήση, όπως το τζίντζερ
- Ινώδη φυτά όπως το βαμβάκι, λινάρι, γιούτα που χρησιμεύουν στην παρασκευή χειρουργικών επιδέσμων (Sofowora et al., 2013).

1.1.2 Αξία των φαρμακευτικών φυτών

Ο άνθρωπος, όπως και όλοι οι έμβιοι οργανισμοί, έχουν ως κύριο μέλημα την επιβίωση. Ανατρέχοντας στο παρελθόν παρατηρείται πως αυτή εξαρτάται από διάφορες συνιστώσες και αποδεικνύεται ότι αποτελεί τεράστια πρόκληση. Η ικανότητα συλλογής τροφής, που κατ' επέκταση διαφυλάσσει τη διατήρηση της υγείας και της ευεξίας, φαίνεται να είναι η βασική

προϋπόθεση για την επίτευξη αυτού του γενετήσιου αντανakλαστικού που λέγεται επιβίωση. Τα φυτά, εκτός από βρώσιμη ύλη, αποδεικνύεται ότι προσδίδουν αξιόλογες θεραπευτικές ιδιότητες, όπως προκύπτει από την εμπειρική τους χρήση ανά τους αιώνες.

Η ανάγκη είναι η μητέρα της εφευρετικότητας· αρχαίοι πολιτισμοί, όπως οι Σουμέριοι, μαρτυρούν τη χρήση βοτάνων και συγκεκριμένα οπιοειδών στις πήλινες ταμπλέτες τους (Awuchi & Chinaza Godswill, 2019). Εν συνεχεία, ο αρχαίος Αιγύπτιος, όπως αναφέρει ο Nunn (1996) αποτελούσαν έναν από τους πρώτους πολιτισμούς που χρησιμοποιούσαν φάρμακα, των οποίων οι ουσίες προέρχονταν από φυτά. Οι Αιγύπτιοι ιατροί συνταγογραφούσαν ηρεμιστικά, αναλγητικά και φάρμακα για της παθήσεις του ουροποιητικού συστήματος και του κοινού κρυολογήματος, αποδείξεις αυτών φέρονται και στους πάπυρους που χρονολογούνται στα 3000 έως 6000 B.C. (Halberstein, 2005; Nunn JF., 1996). Πολλά αυτοφυή φυτά, όπως το *Cymin cyminum* και *Coriander sativum*, χρησιμοποιούνταν ως μπαχαρικά ή αφεψήματα στην καταπολέμηση της αρθρίτιδας και του στομαχόπνου. Παράλληλα όμως, υπάρχουν αναφορές και σε εισαγόμενα από γειτονικά βασίλεια φυτικά είδη, όπως το *Mandragora officinarum*, που θεωρούνταν αφροδισιακό και ηρεμιστικό καθώς και το έλαιο του γένους *Cedrus* που είχε αντισηπτικές ιδιότητες (Aboelsoud, 2010; Zucconi, 2007).

Ο Αρχαιοελληνικός πολιτισμός φημίζεται επίσης για τη χρήση φυτών και των ουσιών αυτών για διάφορους σκοπούς, όπως προκύπτει από καταγραφές σε ιστορικά έργα. Στα ομηρικά έπη, υπογραμμίζεται από τον Όμηρο, η εκτεταμένη χρήση βοτάνων και φαρμακευτικών φυτών για τη θεραπεία τόσο του σώματος όσο και της ψυχής. Επίσης, συναντάται ο διαχωρισμός των φαρμακευτικών φυτών σε αυτά που θεραπεύουν και αυτά που δηλητηριάζουν (Klimis, 2009). Επιπλέον, στις γιορτές των Διονυσίων υπάρχουν αναφορές σε χρήση αλκαλοειδών από τους πιστούς, με την κατάποση του φυτού *Atropa belladonna* για τις ψυχοδραστικές του ιδιότητες (Lee, 2007). Είναι δε χαρακτηριστικό ότι η σημαντικότητα της κατοχής αυτών των φυτών έπαιρνε θρυλικές διαστάσεις. Ενδεικτικά αναφέρεται η περίπτωση της αλόης που κατά την περίοδο του Μεγάλου Αλεξάνδρου χρησιμοποιήθηκε ως καταπραϋντικό στους τραυματισμούς, τα δαγκώματα και τα εγκαύματα και επιπροσθέτως φάρμακο ενάντια σε λοιμώξεις, φλεγμονές και πρηξίματα και η απόκτηση του έπαιζε καταλυτικό ρόλο κατά τις περιόδους πολέμων (Miraldi & Baini, 2019). Ο ελληνικός πολιτισμός, εκτός της διαπιστευμένης χρήσης φαρμακευτικών φυτών, αποτέλεσε και δημιουργός πολύτιμου “ερευνητικού” υλικού. Περίπου τον 1^ο αιώνα μ.Χ, ο Διοσκορίδης, πατέρας της φαρμακογνωσίας, συνέταξε μια συλλογή 24 βιβλίων για περισσότερα από 600

θεραπευτικά φυτά, ένα έργο που αποτέλεσε δομικό λίθο στη σύγχρονη βοτανική ταξινόμηση (Halberstein, 2005; Miraldi & Bains, 2019; Ηλιόπουλος et al., 2013).

Η εισαγωγή και η ανάπτυξη των χημικών μεθόδων στην ιατρική μετά τον 16^ο αιώνα έγινε με τον Θεόφραστο ή κοινώς *Paracelsus*, η οποία επηρέασε σημαντικά τη χρήση των φαρμακευτικών φυτών. Ο Παρασελσιανισμός γέννησε τους ιατροχημικούς, άτομα τα οποία καθιέρωσαν ως ερευνητικά τους εργαλεία τις χημικές αναλύσεις και την εμπειρική παρατήρηση. Στην εποχή του Μεσαίωνα, και ιδίως μεταξύ του 16^{ου} και 18^{ου} αιώνα, η ζήτηση των σύνθετων φαρμάκων, προϊόντων της ιατροχημείας, αυξήθηκε αντικαθιστώντας τις παλαιού τύπου απλές φαρμακευτικές μορφές, όπως τα αφεψήματα. Αυτά τα φάρμακα προέχρονταν από φαρμακευτικά φυτά, ζώα και ορυκτά, με τη σπανιότητα τους να αντικατοπτρίζεται και στην τελική τους τιμή (Petrovska, 2012; Wimmeler, 2017). Στα τέλη του 18^{ου} αιώνα, μετά το έργο του Θεόφραστου, η στροφή προς τη χημική παρασκευή φαρμάκων φάνηκε να υποσκιάζει την εμπειρική χρήση των φυτών στην ιατρική χωρίς χημική επαλήθευση. Η φαρμακευτική βοτανολογία ωστόσο συνεχίζεται να αναδεικνύεται στο έργο του πατέρα της βοτανικής ταξινόμησης Linnaeus, στο οποίο περιγράφονται περισσότερα από 535 φαρμακευτικά φυτά (Loudon, 1998).

Τέλος, από τα σημαντικότερα σημεία αναφοράς στην ιστορία, αποτελούν οι αρχές του 19^{ου} αιώνα καθώς τότε έγινε η ανακάλυψη και απομόνωση των αλκαλοειδών από διάφορα φαρμακευτικά φυτά, όπως το είδος *Papaver rhoeas* (παπαρούνα). Ακολούθησε η απομόνωση διαφόρων άλλων ουσιών, με τη χρήση ακόμα πιο εξελιγμένων τεχνικών, όπως οι γλυκοζίτες, οι τανίνες, τα αιθέρια ελαία κλπ. Αυτές οι αλληπάλληλες αναβαθμίσεις των χημικών μεθόδων και τα πρωτοποριακά ευρήματα σηματοδότησαν της αρχή της επιστημονικής φαρμακευτικής (Petrovska, 2012; Verpoorte & Schripsema, 1994).

1.1.3 Χρήσεις και προοπτικές εμπορικής αξιοποίησης των φαρμακευτικών φυτών

Σήμερα, οι ουσίες που εκχυλίζονται από φαρμακευτικά φυτά έχουν ταυτόχρονη χρήση σε διάφορους κλάδους. Τα αιθέρια ελαία συνιστούν ένα πολύπλοκο μείγμα δεκάδων ή εκατοντάδων χαμηλού βάρους τερπενοειδών, που ανάλογα με το φυτό προέλευσής τους, φέρουν διαφορετικές ιδιότητες. Τα έλαια που απομονώνονται από το φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L.) ή τη μέντα (*Mentha piperita* L.) έχουν βακτηριοκτόνο και αντιφλεγμονώδη δράση, ενώ τα αιθέρια έλαια που λαμβάνονται από το είδος *Valeriana officinalis* L. έχουν ηρεμιστική δράση, βρίσκοντας εφαρμογή στις φαρμακοβιομηχανίες. Τα έλαια έχουν

χαρακτηριστική αρωματική δράση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή καλλυντικών και προϊόντων ενυδάτωσης και θρέψης μαλλιών ή δέρματος. Παραλλήλως, καθορίζονται και από τη χαρακτηριστική τους γεύση, η οποία βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων ως αρωματική ύλη (flavorings) (Caputi & Aprea, 2011).

Με βάση τα ανωτέρω, τα εκχυλίσματα από φαρμακευτικά φυτά χαρακτηρίζονται από αφθονία και ποικιλία χρήσεων, πράγμα που γίνεται αντιληπτό εάν ληφθεί υπόψη ότι τα αιθέρια έλαια αποτελούν μόνο ένα εκχύλισμα συγκεκριμένων ουσιών από το σύνολο αυτών μέσα στο φυτό.

Σύμφωνα με αναφορές, και λαμβάνοντας υπόψη αποσπασματικά τους τομείς στη βιομηχανία φαρμάκων, περισσότερο από το 25 % των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σήμερα προέρχονται από φυτά (Childs, 2009; Farnsworth, 1979). Στον Πίνακα 1.1. παρουσιάζονται οι κύριες ουσίες που έχουν απομονωθεί από φυτά και οι θεραπευτικές τους ιδιότητες.

Στην βιομηχανία καλλυντικών πέρα από τα αιθέρια έλαια, χρησιμοποιούνται φυτικά έλαια, φυτικά λίπη και κηροί. Τα φυτικά έλαια και λίπη περιέχουν τρυγλικερίδια και εμπεριέχονται στους σπόρους των φυτών. Το καστορέλαιο, το έλαιο καρύδας και το βούτυρο κακάο χρησιμοποιούνται στη σύνθεση ενυδατικών κρεμών και μαλακτικών. Μια σύγχρονη τάση επίσης είναι ο κλάδος των "cosmeceuticals", μια κατηγορία προϊόντων που περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις που συμβάλλουν στην ενίσχυση της υγείας και της ομορφιάς (Lubbe & Verpoorte, 2011).

Συνεχίζοντας, τα φαρμακευτικά φυτά έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο και σε πιο σύγχρονες τάσεις, οι οποίες έχουν δημιουργηθεί με έναυσμα την αυξημένη περιβαλλοντική ευαισθησία που χαρακτηρίζει το σήμερα καθώς και την προσπάθεια υιοθέτησης ενός πιο υγιεινού και "πράσινου" τρόπου ζωής. Στο πλαίσιο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη δημοτικότητα τα τρόφιμα που είναι εμπλουτισμένα με συστατικά που προσφέρουν οφέλη για την υγεία, πέραν της βασικής διατροφικής τους αξίας. Τα διατροφικά αυτά συμπληρώματα-φάρμακα ή "neutraceuticals" προέρχονται κατά βάση από φυτά (Wildman & Kelley, 2007). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το μπρόκολο με αντικαρκινικές ιδιότητες, το κόκκινο σταφύλι με αντιοξειδωτικές ιδιότητες και τα εκχυλίσματα σκόρδου και Ginseng (Childs, 2009).

Πίνακας 1.1. Πληροφορίες περί ουσιών από φαρμακευτικά φυτά και οι θεραπευτικές τους χρήσεις (Lubbe & Verpoorte, 2011).

Ουσίες	Χημική ταξινόμηση	Φυτό-Πηγή	Θεραπευτική Χρήση
Morphine, codeine	Alkaloids	<i>Papaver somniferum</i>	Αναλγητικό, κατά του βήχα
Digoxin	Steroidal glycosides	<i>Digitalis lanata</i>	Καρδιακές διαταραχές
Atropine	Tropane alkaloids	<i>A. belladonna</i>	Αντισπασμωδικό, διαστολέας κόρης
Scopolamine	Tropane alkaloids	<i>A. belladonna</i>	Ηρεμιστικό, κατά της ναυτίας
Paclitaxel	Diterpene alkaloid	<i>Taxus spp.</i>	Αντικαρκινικό (ωοθηκών και άλλα)
Quinine	Quinoline alkaloid	<i>Cinchona spp.</i>	Κατά της ελονοσίας
Vinblastine, vincristine	Bis-indole alkaloid	<i>Catharanthus roseus</i>	Αντικαρκινικό (λευχαιμία)
Camptothecin	Indole alkaloid	<i>Camptotheca acuminata</i>	Αντινεοπλασματικό
Galanthamine	Isoquinoline alkaloid	<i>Amaryllidaceae</i> ποικίλα μέλη	Κατά της ήπιας μορφής Αλτσχάιμερ και της Άνοιας
Artemisinin	Sesquiterpene lactone	<i>Artemisia annus</i>	Κατά της ελονοσίας
Podophyllotoxin	Lignan	<i>Podophyllum spp.</i>	Αντιυικά, αντινεοπλασματικά
Pilocarpine	Imidazole alkaloid	<i>Pilocarpus spp.</i>	Γλαύκωμα, ξηροστομία

Επιπλέον, η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση του κοινού για τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των συνθετικών προϊόντων και των “microplastics” επαναφέρει την ανάγκη των φυσικών προϊόντων βαφής για τη μείωση της παραγωγής συνθετικών (Bechtold et al., 2003). Πολλές βαφές φυσικής προελεύσεως προέρχονται από αρωματικά φυτά, όπως ο κουρκουμάς (*Curcuma longa*) από τον οποίο προκύπτει χρωστική ανοιχτού κίτρινου χρώματος από τις πολυφαινόλες του φυτού, ή η Ατρακτυλίδα (*Carthamus tinctorius*) από την οποία δημιουργείται βαφή από φλαβονοειδή, κιτρινοκόκκινου χρώματος (Lubbe & Verpoorte, 2011). Τέλος, η φυτοπροστασία είναι ακόμη ένας κλάδος που τα φυσικής προελεύσεως φυτοφάρμακα έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται από κάποιες χώρες. Αυτό αποτελεί

αποτέλεσμα των αυστηρών προδιαγραφών των φαρμάκων για τον περιβαλλοντικό τους αντίκτυπο, σε συνδυασμό με τις περιβαλλοντικές καταστροφές που επέφερε η κατά κόρον χρήση των συνθετικών φυτοπροστατευτικών από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα (Copping & Duke, 2007; Dayan et al., 2009; Lubbe & Verpoorte, 2011).

Συνοψίζοντας, η χρήση των φαρμακευτικών φυτών φαίνεται ότι αποτελεί όχι μόνο ένα κομμάτι της ανθρώπινης ιστορίας, αλλά εδραιώνεται και σε σύγχρονες καινοτομίες και εφαρμογές βιομηχανικής κλίμακας. Επίσης, φαίνεται να συνδέει το κοινό με την περιβαλλοντική συνείδηση και οι ιδιότητές τους παρέχουν προοπτικές για μια σειρά βιομηχανικών εφαρμογών, μειώνοντας παράλληλα τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι Farooqi και Sreeramu (2004) τονίζουν πως παρότι τα αλλοπαθητικά φάρμακα (προϊόντα της σύγχρονης ιατρικής) έχουν οδηγήσει σε αμέλεια των εναλλακτικών θεραπειών από τη δημιουργία τους, τις τελευταίες δεκαετίες συντελείται μια αλλαγή. Η πληθώρα παρενεργειών (side-effects), η απουσία αποδοτικότητας σε χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, και το υψηλό κόστος των αλλοπαθητικών φαρμάκων, έχουν επιφέρει άνοδο στη ζήτηση φαρμάκων φυτικής προέλευσης (Farooqi & Sreeramu, 2004). Όλα τα προαναφερθέντα συντείνουν στο συμπέρασμα ότι η χρήση των αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών δεν αποτελεί πλέον απλά μια νέα τάση, αλλά συνιστά ένα ανερχόμενο μερίδιο της παγκόσμιας γεωργίας, του οποίου η εξέλιξη προϋποθέτει την επίλυση καίριων προβλημάτων που απαντώνται στην καλλιέργεια και χρήση των εν λόγω ειδών.

Μεταξύ των κύριων προβλημάτων που προκύπτουν από την παγκόσμια ζήτηση φαρμακευτικών φυτών σε όλους αυτούς τους τομείς, τίθεται πρωτίστως ζήτημα διαθεσιμότητας για την κάλυψη των απαιτούμενων ποσοτήτων. Λόγω της αυξημένης πίεσης συγκομιδής στους ήδη υπάρχοντες πληθυσμούς (υπερσυλλογή), τις ακατάλληλες πρακτικές και τη ρύπανση και καταστροφή των φυσικών τους ενδιαιτημάτων, 15.000 είδη φαρμακευτικών φυτών απειλούνται παγκοσμίως (Dajic Stevanovic et al., 2012). Στην Ευρώπη, μόνο το 10 % καλλιεργείται από τα φαρμακευτικά φυτά που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο (Vines, 2004). Τα φυσικά οικοσυστήματα παίζουν πολύ μεγάλο ρόλο στη διατήρηση των αυτοφυών φαρμακευτικών φυτών και, κατά συνέπεια, των δευτερογενών μεταβολιτών τους. Αυτή η ‘οικολογική θέση’ περιγράφεται ως μια ένωση όλων των παραγόντων που επιτρέπουν σε έναν οργανισμό να παραμένει γόνιμος, μαζί με όλες τις επιδράσεις του στο περιβάλλον (Chase & Leibold, 2003). Η άμεση ανθρωπογενής επίδραση με τις προαναφερθέντες τεχνικές φέρνει σε ανισορροπία αυτή την “οικολογική θέση” και είναι αναγκαίο να περιοριστεί. Η καλλιέργεια αυτών των φυτών αποτελεί διασφάλιση του

περιορισμού και επαναφορά της ισορροπίας των θέσεων των φυτών στα οικοσυστήματά τους. Λόγω της ιδιαίτερης φύσης τους και των υψηλών απαιτήσεων σε συγκεκριμένες συνθήκες, έχει αποβεί δύσκολη η επίτευξη αυτής της ισορροπίας, ωστόσο η αύξηση των επιστημονικών μελετών έχει συμβάλλει προς την εδραίωση της καλλιέργειας φαρμακευτικών ειδών σε παγκόσμιο επίπεδο (Carrubba & Scalenghe, 2012).

Επιπλέον, σημαντικό τροχοπέδη αποτελεί η έλλειψη επιστημονικών δεδομένων και η δυσκολία διατύπωσης ενός καλλιεργητικού πλάνου που να αποφέρει ικανοποιητικές ποσότητες σοδειάς στις καλλιέργειες φαρμακευτικών φυτών. Ειδικότερα, τα πιο συνηθισμένα ζητήματα που έρχονται αντιμέτωποι οι παραγωγοί είναι οι αγροπεριβαλλοντικές συνθήκες, η διαθεσιμότητα και το κόστος εργασίας, οι επενδύσεις σε μηχανήματα, οι μετασυλλεκτικές εργασίες και η ύπαρξη πιστοποιημένου σπόρου ανωτέρων γονοτύπων που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας. Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με την προσβασιμότητα στους αγρίους πληθυσμούς και την προς στιγμήν αφθονία τους, κάνουν την καλλιέργεια να φαίνεται ασύμφορη. Παρά τα προβλήματα που απαντώνται, είναι αδιαμφισβήτητο ότι η καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών θα συμβάλλει προς τη μείωση της νοθείας και της πιθανότητας λανθασμένης αναγνώρισης, ενώ παράλληλα θα συμβάλλει προς τον έλεγχο της ποιότητας και ποσότητας (Dajic-Stevanovic & Pljevljakusic, 2015). Γι' αυτό είναι σημαντικό, εκτός από στρατηγικές διατήρησης των αυτοφυών πληθυσμών από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και τις κατευθυντήριες γραμμές για τις καλλιεργητικές τεχνικές, να γίνει αντιληπτό από τις τοπικές κοινωνίες η σημαντικότητα διατήρησης των φυσικών πληθυσμών ως ένα μέσο για την επίτευξη ευημερίας τόσο σε οικονομικό όσο και σε κοινωνικό επίπεδο (Baricevic et al., 2015).

1.2 *Atropa belladonna*

Το είδος *Atropa belladonna* ανήκει στην οικογένεια Solanaceae, η οποία περιλαμβάνει 4 είδη φαρμακευτικών φυτών. Τα εμπορικά φάρμακα που προκύπτουν από αυτή την οικογένεια φαρμακευτικών φυτών, δημιουργούνται κυρίως από τις δραστικές ουσίες που απομονώνονται από τα φύλλα, τα άνθη και τις ρίζες του είδους *A. belladonna* που αποτελεί φυτό με πραγματικά μακρά και πλούσια ιστορία, η οποία αντικατοπτρίζεται και στο όνομά του. Το όνομα του γένους “*Atropa*”, προέρχεται από την αρχαιοελληνική ιστορία, καθώς οι Έλληνες είχαν αντιληφθεί ότι ήταν εξαιρετικά δηλητηριώδες του και γι' αυτό το ταύτισαν με μια από τις τρεις Μοίρες, την Άτροπα. Η Κλωθώ πλέκει το νήμα της ζωής, η Λαχέσις το

μετράει και η Άτροπα είναι αυτή η οποία το κόβει. Το όνομα του είδους “belladonna” προκύπτει από τις λατινικές λέξεις “Bella” που σημαίνει όμορφη και την λέξη “Donna” που σημαίνει γυναίκα. Ο Matthiolus (1501-1577) διακεκριμένος ιατρός, περιέγραψε το έθιμο των δεσποινίδων της Βενετίας να βάζουν βάμμα Atropa στα ματιά τους ώστε να διαστέλλονται οι κόρες των ματιών τους, χαρακτηριστικό γνώρισμα μιας όμορφης γυναίκας της εποχής (Farooqi & Sreeramu, 2004; MR Lee, 2007). Ο Gerard στην έκδοση του Herbal (1633) την ονομάζει ως *Solanum lethale*, ένα όνομα προερχόμενο από τον Θεόφραστο και τον Διοσκουρίδη, το οποίο προειδοποιεί σθεναρά τους αναγνώστες για την “φονική” της φύση. Ακόμη της προσδίδει τα συνώνυμα “κοιμώμενη” και “οργισμένη” (Campbell, 2007). Αργότερα τον 18^ο αιώνα, ο Linneus αποφάσισε να ενσωματώσει τα ονόματα Atropa και Belladonna, δημιουργώντας την ονομασία που χρησιμοποιούμε σήμερα.

Τα φύλλα που προέρχονται από την *A. belladonna* συμπεριλήφθηκαν στη βρετανική φαρμακοποιία το 1809. Οι ρίζες, ωστόσο, έγιναν αποδεκτές ως φάρμακο μόλις το 1880. Τα φύλλα χρησιμοποιούνται ευρέως για την παρασκευή βαμμάτων, εκχυλισμάτων και εμπλάστρων (Farooqi & Sreeramu, 2004). Χρησιμεύει ως ανώδυνο καταπραϋντικό-διεγερτικό, αντιγαλακταγωγό, αντιδιουρητικό και μυδριαστικό ή αντιασθματικό (Nejadhabibvash et al., 2012). Επίσης, χρησιμοποιείται ως αντισπασμωδικός παράγοντας στην βρογχίτιδα, για το κρυολόγημα και τον πυρετό αλλά και ως αντιφλεγμονώδες (Aehle & Dräger, 2010; Hashimoto et al., 1993a). Παράλληλα, ανακουφίζει από τον κοκκύτη και αξιοποιείται στη θεραπεία του κολικού των νεφρών και των χοληφόρων, σε διαταραχές του στομάχου, σε πρακτικές διακοπής της εφίδρωσης στην οφθαλμολογία και για τη θεραπεία γαστρικών ελκών. Επιπροσθέτως, δρά ως αντίδοτο για καταθλιπτικά δηλητήρια, όπως το όπιο, η μουσκαρίνη και η ένυδρη χλωράλη (Farooqi & Sreeramu, 2004). Οι ρίζες χρησιμοποιούνται κυρίως στην εξωτερική θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας, των ρευματισμών και άλλων παθήσεων. Χρησιμοποιείται επίσης στη θεραπεία της επιληψίας, της νόσου του Πάρκινσον, του motion sickness και της βραδυκαρδίας (Tsung-Ming Shih et al., 2007).

Αξιοσημείωτη επίσης είναι η αναφορά στα συμπτώματα από την υπερβολική δόση (overdose) των συγκεκριμένων αλκαλοειδών, ιδιαιτέρως της ατροπίνης. Ο Lee (2007) χρησιμοποιεί την φράση “Hot as a hare, blind as a bat, dry as a bone, red as beet and mad as a hen.” για να περιγράψει τις κλινικές εκδηλώσεις της δηλητηρίασης από ατροπίνη. Ο συνδυασμός των συμπτωμάτων όπως προδιαθέτει και η πρόταση συμπεριλαμβάνει συμπτώματα πυρεξίας, η θερμοκρασία του σώματος αυξάνεται μια ώρα μετά την

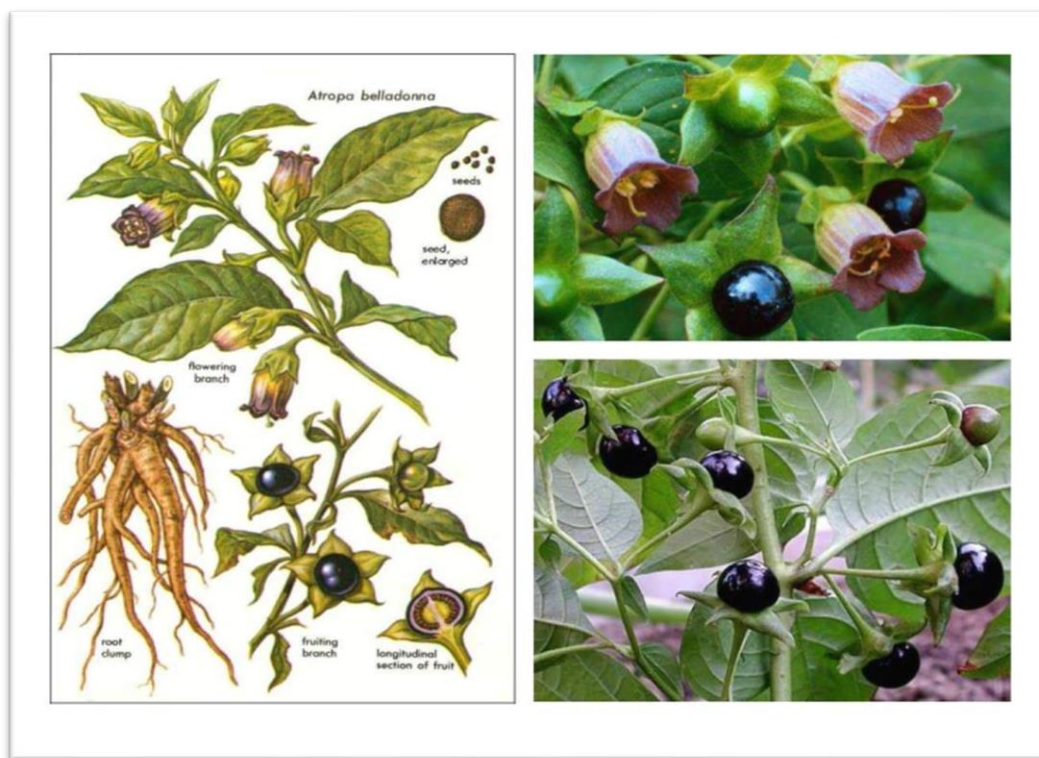
δηλητηρίαση και φτάνει στο μέγιστό της μετά τις 6-8 ώρες (Çaksen et al., 2003; Lee, 2007). Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ατροπίνης είναι η διαστολή της κόρης των ματιών, λόγω της επίδρασης στον σφιγκτήρα μυ της ίριδος, με αποτέλεσμα την θόλωση της οράσεως και σε σοβαρές περιπτώσεις καθίσταται αόρατη η ίριδα για αρκετές ημέρες (Lee, 2007). Ακολουθώντας, ένα από τα πρώιμα σημάδια είναι η καταστολή της σιελορροίας, λόγω της αντιχολιργενικής δράσης της ατροπίνης στους σιελογόνους αδένες, δημιουργώντας ξηρότητα στον λαιμό και στο στόμα, επιφέροντας έντονη δίψα και δυσκολία στην κατάποση (Berdai et al., 2012; Lee, 2007). Ένα ακόμη πρώιμο σύμπτωμα είναι το κοκκίνισμα του προσώπου και μια γενική αγγειοδιαστολή του δέρματος, όπου σε συνδυασμό με την πυρεξία, δίνει την εντύπωση ενός εμπύρετου εξανθήματος. Τελικά, οι κεντρικές αντιχολιργενικές επιδράσεις της οδηγούν σε μια σειρά οπτικών ψευδαισθήσεων, ενώ ο ασθενής φαίνεται σαν να βρίσκεται υπό την επήρεια αλκοόλ, βαδίζοντας εκτός ισορροπίας και μιλώντας ακατανόητα και ασυνάρτητα (Çaksen et al., 2003; Lee, 2007; Southgate et al., 2000).

1.2.1 Βοτανική περιγραφή

Το είδος *A. belladonna* είναι ενδημικό της κεντρικής και νότιας Ευρώπης, αναπτύσσεται σε υγρά και με λίγη σκιά μέρη, κυρίως σε βουνά. Καλλιεργείται για τις ουσίες της στην Κεντρική Ευρώπη, Αγγλία, Ρωσία, Αμερική και Βόρεια Ινδία και εγκλιματίστηκε και στην Νότια Αγγλία (Bajaj & Liisa, 1991; Farooqi & Sreeramu, 2004). Η *A. belladonna* είναι ένα εξαπλοειδές είδος ($2n = 72$), όρθιας ανάπτυξης ποώδες φυτό, το οποίο μπορεί να φτάσει μέχρι τα 150 cm. Έχει ρίζα μακριά, κυλινδρική, διακλαδισμένη, σαρκώδη, έρπουσα, πολυετή, η οποία ποικίλλει σε πλάτος από 2,5 cm έως αρκετά εκατοστά, και φέρει κιτρινοκαφέ χρώμα εξωτερικά και λευκό μέσα (Εικόνα 1.1).

Το φυτό είναι θαμνοειδές με κυλινδρικό σχήμα, μερικές φορές ελαφρώς χνουδωτό. Τα φύλλα εκφύονται εναλλάξ, αλλά στους άνω κλάδους, κάθε φύλλο συνήθως συνοδεύεται από ένα ραβδοειδές φυλλάριο (Εικόνα 1.1). Τα φύλλα είναι ωοειδή, μυτερά και μαλακά με ευδιάκριτα νεύρα και συχνά φέρουν μωβ χρωματισμούς ενδιάμεσα των νευρώσεων, ενώ η κάτω επιφάνεια είναι τριχωτή. Τα φύλλα έχουν μήκος 7,5-22,5 cm, πλάτος 5,0-10,0 cm και οι μίσχοι έχουν μέγεθος 0,6-3,75 cm. Τα άνθη φέρονται μεμονωμένα στις μασχάλες των φύλλων, είναι μεγάλα, σε σχήμα καμπάνας, το πάνω μέρος είναι καφέ-ιώδες ή μοβ ή χρυσοκαφέ με ιώδεις-καφέ νευρώσεις. Οι καρποί είναι σφαιρικοί, ελαφρώς δίλοβοι, γυαλιστεροί μωβ-μαύροι, υποκλινόμενοι από διευρυνμένο λοβό (Εικόνα 1.1). Ο καρπός είναι

ράγα (μούρο) και φτάνει τα 1,25 εκατοστά σε διάμετρο, είναι δικύτταρος και περιέχει πολλούς σπόρους σε σχήμα νεφρού ενσωματωμένους σε μια σάρκα που είναι κάπως γλυκιά και παράγει μωβ χυμούς (Farooqi & Sreeramu, 2004).



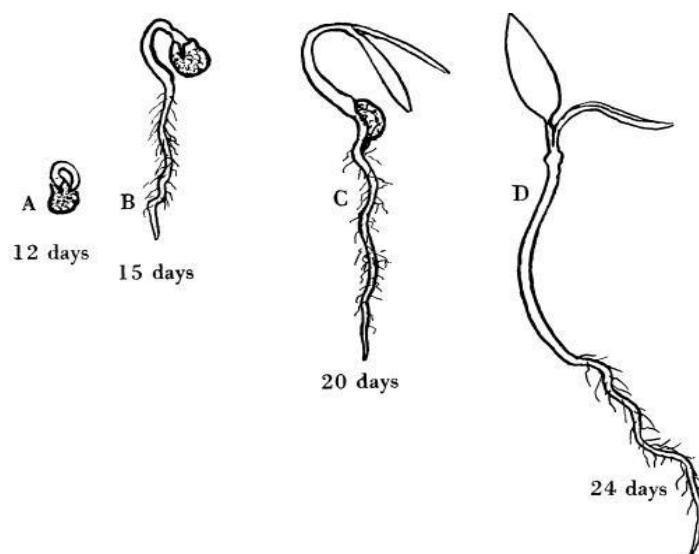
Εικόνα 1.1 Απεικονίσεις καρπών, φύλλων, ριζών και βλαστών του είδους *Atropa belladonna* (Malik et al., 2021).

1.2.2. Αύξηση και ανάπτυξη

Η *A. belladonna*, συμπεριφέρεται σαν πολυετές φυτό σε εύκρατα κλίματα και δίνει μέγιστη απόδοση σε αλκαλοειδή. Σε υποτροπικές περιοχές, μπορεί να καλλιεργηθεί ως χειμερινή καλλιέργεια και συμπεριφέρεται ως ετήσιο, καθώς καθίσταται αδύνατη η επιβίωσή της τους καλοκαιρινούς μήνες και η απόδοση σε αλκαλοειδή είναι χαμηλή. Όσον αφορά το έδαφος, αναπτύσσεται καλά σε ελαφρώς όξινα, βαθιά, γόνιμα εδάφη μέσης υφής, τα οποία είναι καλά στραγγιζόμενα, ασβεστούχα και με υψηλή ποσότητα σε χούμο (Butcher, 1947; Farooqi & Sreeramu, 2004). Όπως και τα υπόλοιπα φυτά της οικογένειας *Solanaceae*, έχει υψηλές απαιτήσεις σε άζωτο. Σε έρευνα των Baricevic et al. (1999) αναφέρεται πως η καλλιέργεια σε εδάφη με υψηλή αζωτούχα λίπανση και ταυτόχρονη υψηλή έλλειψη νερού οδηγεί σε

στρεσάρισμα των φυτών αλλά και αυξημένη σύνθεση των αλκαλοειδών hyoscyamine και scopolamine (Baricevic et al., 1999).

Ο πολλαπλασιασμός του είδους γίνεται με σπόρο, που συνήθως συλλέγεται από τον Σεπτέμβριο μέχρι τον Νοέμβριο, από το δεύτερο έτος και έπειτα. Η περίοδος μέγιστης ανάπτυξης των ριζών είναι κατά το Σεπτέμβριο - Οκτώβριο, στο τέλος του πρώτου έτος. Οι νέοι βλαστοί αναπτύσσονται το Φεβρουάριο, με τα φύλλα διπλωμένα γύρω από το στέλεχος. Αυξάνονται γρήγορα μέχρι τα μέσα Απριλίου και όταν έχουν μήκος 30 εκατοστά και έπειτα διακλαδίζονται. Στις αρχές Μαΐου, ανοίγουν τα πρώτα άνθη και οι καρποί (μούρα) ωριμάζουν στα τέλη Ιουλίου. Μια δεύτερη περίοδος ανθοφορίας μπορεί να αρχίσει στις αρχές Σεπτεμβρίου σε φυτά που προηγήθηκε κοπή. Έχει παρατηρηθεί ότι λίγα μέτρα μακριά από το μητρικό φυτό βρίσκονται μερικά σπορόφυτα κατά την διάρκεια της άνοιξης. Σπορόφυτα ηλικίας 2-3 μηνών παρατηρούνται μόνο κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, γεγονός που υποδηλώνει πως η βλάστηση γίνεται νωρίς την άνοιξη ή κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Butcher, 1947).



Εικόνα 1.2. Στάδια βλάστησης του είδους *A. belladonna* A. 12 ημερών, B. 15 ημερών, C. 20 ημερών, D. 24 ημερών (Butcher, 1947).

1.2.3. *Atropa belladonna* και παραγωγή βιοδραστικών ουσιών

Τα φύλλα και οι ρίζες της *A. belladonna* περιέχουν αλκαλοειδή τροπανίου, των οποίων η συνολική συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,13 έως 0,7 % (μέσος όρος 0,45 %). Σύμφωνα με τα ευρήματα πρόσφατης έρευνας, όπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HPLC, η συνολική

περιεκτικότητα των αλκαλοειδών στα φύλλα είναι 2,88 %, στις ρίζες 8,06 % και στο στέλεχος 1,42 % σε φυτά που εκπύχθηκαν φυσικά (περιοχή sari-kiassar), ενώ σε καλλιεργούμενα φυτά η περιεκτικότητα ήταν 1,76 % για τα φύλλα, 3,3 % για τις ρίζες, 1,42 % για το στέλεχος και 4,82 % για τους σπόρους (Πίνακας 1.2α, 1.2β) (Fatemeh Ashtiania, 2011).

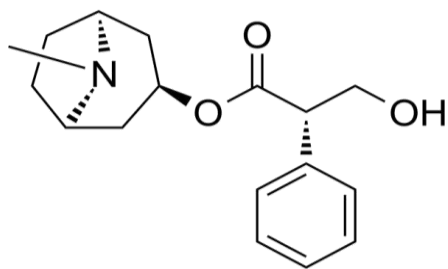
Τα αλκαλοειδή των ριζών είναι κυρίως L-hyoscyamine (Εικόνα 1.3α) και ατροπίνη (οπτικά ανενεργό ισομερές) (Εικόνα 1.3β) σε ποσότητα 0,34% και hyoscine (scopolamine) (Εικόνα 1.3γ) σε ποσότητα 0,008 % έως 0,013 % (Kamada et al., 1986). Επιπλέον, υπάρχουν μικρές ποσότητες πτητικών βάσεων, όπως pyridine, N-methyl-pyrolone, ενώ στα φύλλα απαντάται και η ένωση β -methyl esculetin (scopoletin) (Εικόνα 1.3δ). Οι πιο σημαντικές ουσίες αυτών των αλκαλοειδών στην φαρμακοποιία είναι η scopolamine, hyoscyamine και το εναντιομερές της, η ατροπίνη (Al-Ashaal et al., 2013; Farooqi & Sreeramu, 2004). Στο φυτό λειτουργούν ως αντιμικροβιακές άμυνες και αποτρεπτικά ανάπτυξης εχθρικών οργανισμών (Waterman, 1993), όμως στην ιατρική και στις φαρμακοβιομηχανίες έχουν διάφορες εφαρμογές, όπως αναπτύχθηκαν παραπάνω.

Πίνακας 1.2α Ποσότητα ολικών εκχυλισμάτων ιστών (%) (Fatemeh Ashtiania, 2011).

Δείγμα		Βλαστοί	Ρίζα	Φύλλα	Σπόροι
<i>Atropa belladonna</i>	Αυτοφυής	2,55	8.06	2,88	-
	Καλλιέργεια	1,42	3,3	1,76	4,82

Πίνακας 1.2β Ποσότητα αλκαλοειδών τροπανίου σε διάφορους ιστούς (% ξηρού βάρους) (Fatemeh Ashtiania, 2011).

<i>Atropa belladonna</i>							
Βιοδραστικές ουσίες	Καλλιεργούμενη				Αυτοφυής		
	Ρίζα	Βλαστοί	Φύλλα	Σπόροι	Βλαστοί	Ρίζα	Φύλλα
Atropine	0.0876	0.074	0.0188	0.044	0.0768	0.0572	0.0314
Scopolamine	0.00312	0.00276	0.00232	0.0252	0.018	0.00168	0.0236

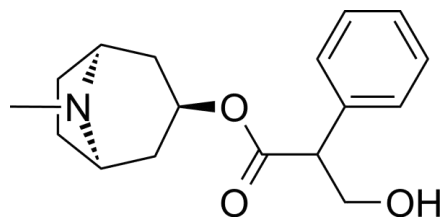


Εικόνα 1.3α

Η L-Hyoscyamine (Daturine), φυσικό αλκαλοειδές τροπανίου, ισχυρός ανταγωνιστής του μουσκαρινικού υποδοχέα (MR). Είναι επίσης λεβο-ισομερές της Ατροπίνης.

Σ.Τ: $C_{17}H_{23}NO_3$

Πηγή: <https://www.medchemexpress.com>

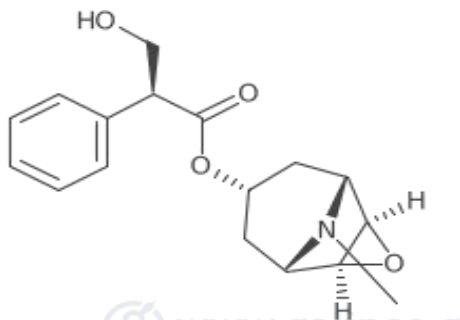


Εικόνα 1.3β Η Ατροπίνη (Tropine tropate)

είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα μουσκαρινικής ακετυλοχολίνης (mAChR) με τιμές IC_{50} 0,39 και 0,71 Nm.

Σ.Τ: $C_{17}H_{23}NO_3$

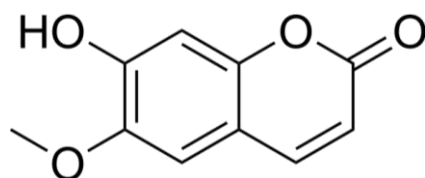
Πηγή: <https://www.medchemexpress.com>



Εικόνα 1.3γ Η Σκοπολαμίνη είναι ένα φυσικό αλκαλοειδές της μελαντόνας και έχει αντιχολινεργικές ιδιότητες. Δρα ως ανταγωνιστής της ακετυλοχολίνης και άλλων παρασυμπαθομιμητικών παραγόντων. Ο μηχανισμός δράσης της στο κεντρικό νευρικό σύστημα για την πρόληψη της ναυτίας δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Η σκοπολαμίνη προκαλεί συμπτώματα παρασυμπαθητικού αποκλεισμού.

Σ.Τ: $C_{17}H_{21}NO_4$

Πηγή: [Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων](#)



Εικόνα 1.3δ Η Σκολοπετίνη είναι αναστολέας της ακετυλοχολινεστερασης (AChE)

Σ.Τ: $C_{10}H_8O_4$

Πηγή: <https://www.medchemexpress.com>

1.3 Έρευνα στο είδος *Atropa belladonna*

Η *Atropa belladonna* αποτελεί ένα φαρμακευτικό φυτό, για το οποίο έχουν γίνει πολυάριθμες έρευνες ήδη από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Αυτές οι έρευνες εστίασαν στη βελτίωση των συνθηκών καλλιέργειας και παράλληλα στην κατανόηση των καλλιεργητικών απαιτήσεων

και ιδιαιτεροτήτων, με κύριο στόχο την αύξηση των πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών, των αλκαλοειδών του τροπανίου (Brewer & Hiner, 1950; James, 1947; Mothes, 1955). Αργότερα, με την αποσαφήνιση της μεταβολικής πορείας αυτών των αλκαλοειδών, με αρχικό κέντρο παραγωγής τους στη ρίζα, και συνεχίζοντας ανοδική πορεία προς τα φύλλα, άνθη και καρπούς (Cromwell, 1943), το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε προς το υπόγειο τμήμα της *Atropa*. Συνδυαστικά, η πρόοδος στον τομέα γενετικής βελτίωσης φυτών αλλά και η σταδιακή ενσωμάτωση των γονιδιωματικών “εργαλείων” έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων αποτελεσματικών πρωτοκόλλων για τη βελτίωση αξιοποίηση του είδους. Ήδη από τη δεκαετία του 1980, τεχνικές γενετικού μετασχηματισμού, με τη χρήση βακτηρίων του γένους *Agrobacterium*, διερευνήθηκαν είτε για να επηρεάσουν τον δευτερογενή μεταβολισμό (παραγωγή των αλκαλοειδών του τροπανίου) της *A. belladonna*, είτε για την καθιέρωση συγκεκριμένων οργανοκαλλιεργειών (τριχοειδής ρίζες ή βλαστικά τερατώματα). Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν ποικίλα στελέχη των βακτηριακών ειδών *A. tumefaciens* και *A. rhizogenes*, τα οποία μέσω των Ti- (tumor inducing) και Ri- (roots inducing) πλασμιδίων τους επιτρέπουν τη μεταφορά επιθυμητού DNA για δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. Η επιλογή του στελέχους κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιτυχία του πειράματος. Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζονται ορισμένα ευρέως χρησιμοποιούμενα στελέχη, σε συνδυασμό με τους στόχους που τέθηκαν από τους ερευνητές καθώς και τα αποτελέσματα των σχετικών ερευνών. Πιο πρόσφατες μέθοδοι χρησιμοποιούν τεχνολογίες επεξεργασίας γονιδιώματος, συγκεκριμένα πρόσφατη έρευνα των Zeng et al. (2021), μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 επιχείρησε την ανάπτυξη γονοτύπων *A. belladonna* όπου δεν θα παράγονται anisodamine και scopolamine, μέσω ρύθμισης του γονιδίου *H6H* (Zeng et al., 2021). Ακόμη πολλά υποσχόμενες αποτελούν οι έρευνες που αξιοποιούν τη μέθοδο της επαγωγής νανοσωματιδίων για την ενίσχυση της βιοσύνθεσης εξειδικευμένων μεταβολιτών σε διαγονιδιακές καλλιέργειες τριχωτών ριζών (Mmereke et al., 2024).

Εκτός από την επίτευξη της “βιομηχάνισης” των αλκαλοειδών οι Godara et al. (2014) απέδειξαν *in vitro* την ακαριδοκτόνα δράση της σκαλοπαμίνης και ατροπίνης στο “τροπικό τσιμπούρι των βοοειδών” *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, προκαλώντας υψηλά επίπεδα θνησιμότητας αλλά και μειωμένη πληθυσμιακή ανάπτυξη από τα επιζήσαντα έντομα (Godara et al., 2014). Επιπλέον, άκρως ενδιαφέρουσα είναι η έρευνα των Delgado et al. (2023), όπου η *A. belladonna* διερευνήθηκε ως προς την αποτελεσματικότητά της στο πλαίσιο του “green purification”, όπου επιδιώκεται η μείωση των επιδράσεων του καδμίου, που ανήκει στα βαρέα μέταλλα που έχει καταστρεπτική επίπτωση στην βιο-δραστηριότητα

των εδαφικών μικροοργανισμών (Delgado Laime, 2023). Τέλος, ως ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα χαρακτηρίζεται η μελέτη των Touno et al. (2006), όπου επετεύχθη κρυοσυντήρηση τριχωτών ριζών της *A. belladonna*, μέσω υαλοποίησής τους. Η προσέγγιση αποδείχτηκε επιτυχής εφόσον διατηρήθηκε η βιωσιμότητά τους και επιπλέον, η ανάλυση PCR κατέδειξε τη διατήρηση του T-DNA στις κρυοσυντηρημένες ρίζες (Touno et al., 2006).

Πίνακας 1.3 Καταγραφή ερευνών για το μετασχηματισμό της *Atropa belladonna* έως τις αρχές του 2000 (Jaziri et al., 1999).

Στελέχη <i>Agrobacterium</i>	Παρατηρήσεις	Βιβλιογραφία
<i>A. rhizogenes</i> 15834	Παραγωγή αλκαλοειδών τροπανίου	Kamada et al., 1986
<i>A. tumefaciens</i> B6S3, Bo542, C58	Διαφοροποίηση, παραγωγή Αλκαλοειδών τροπανίου	Ondřej & Protiva, 1987
<i>A. tumefaciens</i> C58Cl (pRiA4b)	Διαφοροποίηση, παραγωγή Αλκαλοειδών τροπανίου	Ondřej & Protiva, 1987
<i>A. rhizogenes</i> 8196	Διαφοροποίηση, παραγωγή Αλκαλοειδών τροπανίου	Ondřej & Protiva, 1987
<i>A. rhizogenes</i> 8196	Αντοχή στην καναμυκίνη	Ondřej & Vlasak, 1987
<i>A. tumefaciens</i> Bo542, Bo542 (pGA472)	Αντοχή στην καναμυκίνη	Ondřej & Vlasak, 1987
<i>A. rubi</i> ATCC 13335	Διαφοροποίηση	Ondřej et al., 1987
<i>A. rhizogenes</i> A4, 8196	Βιομάζα, παραγωγή Αλκαλοειδών τροπανίου	Jung & Tepfer, 1987
<i>A. rhizogenes</i> A4, TR105	Βιομάζα, παραγωγή Αλκαλοειδών τροπανίου	Sharp & Doran, 1990
<i>A. tumefaciens</i> C58C1	Προώθηση του μετασχηματισμού με ακετοσυριγγόνης	Mathews et al., 1990
<i>A. rhizogenes</i> (pRi 15834 + pARK5)	Ενσωμάτωση γονιδίων <i>bar</i> , φυτό ανθεκτικό στα ζιζανιοκτόνα	Saito et al., 1992
<i>A. tumefaciens</i> (pAL4404 + pSK223)	Ενσωμάτωση γονιδίου <i>rolC</i> , εναλλαγή ανθοφορίας και μορφολογίας	Kurioka et al., 1992
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 (pHY8)	Μεταφορά και έκφραση του γονιδίου της Hyoscyamine στην <i>A. belladonna</i>	Yun et al., 1992
<i>A. rhizogenes</i> 15834	Ενίσχυση της παραγωγής σκοπολαμίνης	Hashimoto et al., 1993b
<i>A. rhizogenes</i> 15834, MAFF03-01724	Διπλός μετασχηματισμός, μορφολογία και αλκαλοειδή τροπανίου	Jaziri et al., 1994
<i>A. tumefaciens</i> T37, <i>A. rhizogenes</i> A4	Σύνθεση, μετατόπιση, βιομετασχηματισμός των μεταβολιτών	Subroto et al., 1996; Subroto et al., 1996
<i>A. rhizogenes</i> A4 and <i>A. tumefaciens</i> R 1000 (pRiA4b)	Γενετικός μετασχηματισμός απλοειδούς φυτού	Yoshimatsu et al., 1997

1.4 Βελτίωση φυτών

Σύμφωνα με τον R.H.J. Schlegel (2018), όλες οι νέες πληροφορίες που αφορούν στη γεωπονία, τη φυτοκομία και την φυτική παραγωγή προέρχονται από δυο μορφών πρακτικές: την εμπειρική και την πειραματική. Αυτές οι παραδόσεις δεν αποτελούν σύγχρονο χαρακτηριστικό των ανθρώπινων κοινωνιών, καθώς τα τελευταία 12.000 χρόνια ο άνθρωπος έχει πάψει να είναι απλά κυνηγός και συλλέκτης και έχει αρχίσει να καλλιεργεί τη γη. Η εμπειρία προέρχεται από τις προσπάθειες των νεολιθικών αγροτών, των Ελλήνων βοτανολόγων και εκσκαφικών ριζών, των μεσαιωνικών χωριατών και των λοιπών κηπευτών καθ' όλη την διάρκεια της ιστορίας για την απόκτηση πρακτικών λύσεων στα προβλήματα που αφορούσαν τη γεωργία και την κτηνοτροφία (Schlegel, 2018). Η διερευνητική φύση του ανθρώπου πηγάζει από την αστείρευτη περιέργεια και την ανάγκη για απαντήσεις και κατανόηση των ανεξήγητων φαινομένων. Συνδυάζοντας αυτή την μεθοδικότητα του ανθρώπου με μια απερχόμενη παγκόσμια κρίση, προκύπτει η Πράσινη επανάσταση (*Green Revolution 1940s*).

Η Πράσινη επανάσταση, είναι αποτέλεσμα πληθώρας ερευνών, όπως οι δημοσιεύσεις της μαθηματικής γενετικής του Gregor Mendel (Μενδελική κληρονομικότητα 1822-1884), οι δημοσιεύσεις για την δημιουργία υβριδίων, όλες με κοινό κεντρικό θέμα τη βελτίωση των φυτών με στόχο την αύξηση της σοδειάς σε αναπτυσσόμενες χώρες (Rangarajan, 2008). Τα ονόματα αυτών που την θεμελίωσαν όπως του νικητή Νόμπελ ειρήνης, Norman Borlaug, του πατέρα της “βιομηχανοποιημένης” γεωπονίας, Henry Wallace, και πολλών άλλων που έχουν γραφτεί στην ιστορία ως σωτήρες εν δυνάμει δισεκατομμύρια ανθρώπων. Η Πράσινη επανάσταση ήταν η απάντηση των βελτιωτών και της επιστημονικής κοινότητας σε μια επικείμενη και σίγουρη καταστροφή, την παγκόσμια πείνα λόγω έλλειψης τροφής. Μια σαφέστατη επίδειξη της σημαντικότητας των μεθόδων βελτίωσης και της ανάγκης κατανόησης της γενετικής, όπως μαρτυρούν και οι κατακόρυφες αυξήσεις των ετήσιων σοδειών εκείνων των περιόδων.

Σαφέστατα, ένα τέτοιο “κίνημα” δεν θα μπορούσε να μην έχει επιπτώσεις. Η γεωργία σήμερα χαρακτηρίζεται από μια απότομη μείωση στη γενετική παραλλακτικότητα των καλλιεργούμενων φυτών. Από το σύνολο των 30.000 βρώσιμων φυτών, μόλις τα 30 αξιοποιούνται στη διατροφή σε παγκόσμιο επίπεδο. Μέσα σε αυτά, οι σημαντικότερες καλλιέργειες είναι αυτές που προέκυψαν από την Πράσινη επανάσταση, όπως ο αραβόσιτος (*Zea mays*), το σιτάρι (*Triticum aestivum*) και το ρύζι (*Oryza sativa*) (FAO, 1996a;

Hausmann et al., 2004). Αυτή η έλλειψη ενδοειδικής παραλλακτικότητας και γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών έχει ήδη δημιουργήσει τεράστια προβλήματα, όπως αυτά προέρχονται από την έλλειψη ποικιλομορφίας γονιδίων που οδηγούν σε περιορισμένη ικανότητα ανθεκτικότητας και αντοχής σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης και επιπλέον έλλειψη γενετικής παραλλακτικότητας σχετικής με ποιοτικά χαρακτηριστικά (Hausmann et al., 2004).

Στο πλαίσιο αυτό, τις τελευταίες δεκαετίες η έμφαση δίνεται στην εντατικοποίηση και βέλτιστη χρήση των διαθέσιμων φυτικών γενετικών πόρων (PGR-plant genetic resources). Ως γενετικοί πόροι μπορούν να οριστούν όλα τα υλικά που είναι διαθέσιμα για τη βελτίωση ενός καλλιεργούμενου φυτικού είδους (Becker, 1993). Το 1996, η αποτελεσματικότερη χρήση των φυτικών γενετικών πόρων, με βάση το Παγκόσμιο Σχέδιο Δράσης για την διατήρηση και την βιώσιμη αξιοποίηση αυτών, αποτελεί καταλυτικό παράγοντα στην καταπολέμηση της φτώχειας και της επισιτιστικής ασφάλειας (FAO, 1996b). Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) περιγράφει πως οι στόχοι αυτού του Παγκοσμίου Σχεδίου είναι: 1) η ανάπτυξη ποικιλιών ειδικά προσαρμοσμένων σε δυσμενή περιβάλλοντα ή περιβάλλοντα πίεσης, 2) η εξασφάλιση βιώσιμης παραγωγής σε υψηλής απόδοσης περιβάλλοντα, μέσω μειωμένης εφαρμογής αγροχημικών και αύξησης της αποδοτικότητας χρήσης νερού και θρεπτικών ουσιών (σχέσεις εισροών-εκροών), 3) η διερεύνηση εναλλακτικών παραγωγικών λύσεων, μέσω ανάπτυξης βιομηχανικών ή και φαρμακευτικών καλλιεργειών (FAO, 1996b).

Υπό το πρίσμα της βέλτιστης αξιοποίησης των διαθέσιμων φυτικών πόρων, η παρούσα πτυχιακή εργασία θέτει ως στόχο την αξιοποίηση του είδους *Atropa belladonna* ως ένα εργοστάσιο πολυτίμων, για την φαρμακοβιομηχανία και όχι μόνο, αλκαλοειδών. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, επιδιώκεται η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού των ριζών με απώτερο σκοπό την αύξηση της βιομάζας τους προς αξιοποίηση του βιοδραστικού δυναμικού τους.

1.4.1 Μοριακή Βελτίωση Φυτών

"Τα εργαλεία της γονιδιωματικής έρευνας μπορούν τελικά να αναδείξουν το γενετικό δυναμικό του άγριου και καλλιεργούμενου βλαστικού μας υλικού προς όφελος της κοινωνίας" (Tanksley & McCouch, 1997), με αυτή την πρόταση υπογραμμίζεται και η σημαντικότητα της πληθώρας γονιδιακών δεικτών για την εξελικτική μας πορεία στην

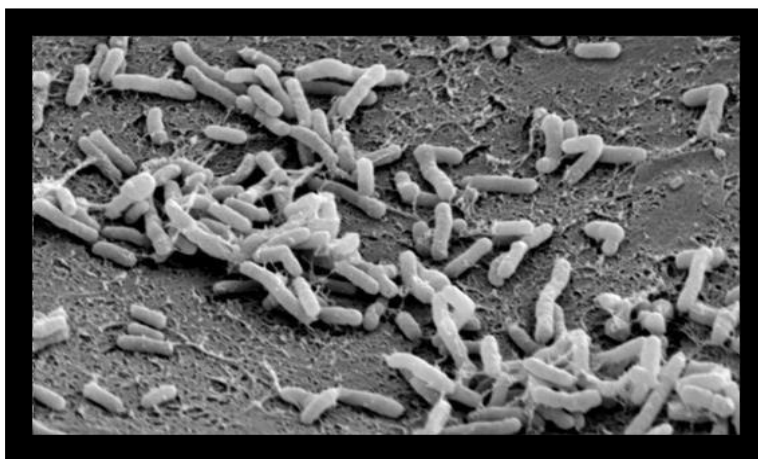
κατανόηση του γενετικού υλικού, την χαρτογράφηση του και την επέμβασή σε αυτό με σκοπό την βελτίωση των ειδών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι γονιδιακών δεικτών με τους μορφολογικούς δείκτες να αποτελούν τους πρώτους που χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες χαρτογράφησης του γενετικού υλικού. Οι μορφολογικοί δείκτες αφορούν στα διακριτά κληρονομικά χαρακτηριστικά, όπως η δομή των σπορίων, το χρώμα των ανθέων, η αναπτυξιακή νόρμα και άλλα σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά. Παρά την ευρεία χρήση και ευκολία εφαρμογής τους, οι μορφολογικοί δείκτες χαρακτηρίζονται από έλλειψη πολυμορφισμού και τον πεπερασμένο αριθμό τους, σε σχέση με τους μοριακούς δείκτες. Οι μοριακοί δείκτες, συνιστούν μία νεότερη κατηγορία δεικτών που αφορούν στην ποικιλότητα που απαντάται σε επίπεδο DNA (Baenziger et al., 2006). Συγκεκριμένα, ως μοριακός δείκτης ορίζεται μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που είναι στενά συνδεδεμένη με χρωμοσωμικές περιοχές, που περιλαμβάνουν γονίδιο ή γονίδια ή που περιέχουν ένα μικρό αριθμό νουκλεοτιδίων, που εμφανίζουν πολυμορφισμό. Οι εφαρμογές των μοριακών δεικτών είναι ποικίλες και, μεταξύ άλλων, οι σημαντικότερες εστιάζουν στον προσδιορισμό της ετεροζυγωτίας και ετερογένειας εντός ή/και μεταξύ των πληθυσμών (γενετική παραλλακτικότητα), τη γενετική χαρτογράφηση γονιδίων που ελέγχουν ποσοτικά χαρακτηριστικά (τόποι ποσοτικών χαρακτηριστικών, QTL). Επιπλέον συνεισφέρουν στην αξιοποίηση των QTL για την δημιουργία υπέρτερων γενοτύπων, μέσω αναδιασταυρώσεων ή στοχευμένης ένθεσης σε οργανισμούς στόχους (Hausmann et al., 2004). Συγκεκριμένα στο είδος *Atropa belladonna*, η χρήση των μοριακών δεικτών αφορά σε ποικίλες εφαρμογές, όπως η αύξηση της ποσότητας και ποιότητας των αλκαλοειδών, όπως η ατροπίνη, η οποία κατέχει πρωτεύοντα ρόλο στον κλάδο της φαρμακοβιομηχανίας (Zeng et al., 2021).

Μία άλλη προσέγγιση της μοριακής βελτίωσης αφορά στις μεθόδους γενετικού μετασχηματισμού με στόχο την γενετική τροποποίηση των ειδών για δημιουργία νέων ιδιοτήτων. Στο είδος *Atropa belladonna*, οι μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού έχουν οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης των επιθυμητών δευτερογενών μεταβολιτών μέσω πλασμιδίων των βακτηρίων του γένους *Agrobacterium* μετασχηματίζοντας το ριζικό σύστημα από μεταφερόμενα πλασμιδιακά γονίδια (Britton et al., 2008a; Nilsson & Olsson, 1997; Sakakibara et al., 2005; Veena & Taylor, 2007a). Οι Cucu et al. (2003) με τη χρήση αποπλισμένου *A. tumefaciens*, που φέρει το γονίδιο επιλογής neomycine phosphotransferase (*ntpII*) και το γονίδιο αναφοράς *gus*, για την β3-glucuronidase, αναφέρουν την ανάπτυξη διαγονιδιακών ιστών με ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και δραστικότητα της β3-glucuronidase (Cucu et al., 2003). Επιπλέον, με την χρήση μεθόδων γενετικού

μετασχηματισμού προέκυψαν και διαγονιδιακά φυτά *A. belladonna* που υπερεκφράζουν την η Ν-μεθυλοτρανσφεράση της πουτρεσκίνης που προέχεται από το είδος *Nicotiana tabacum* (NtPMT) και τη υοσκυαμίνη 6b-υδροξυλάση από το είδος *Hyoscyamus niger* (HnH6H)(Wang et al., 2011). Τα διαγονιδιακά φυτά μελετήθηκαν σε συνθήκες αγρού ως προς τη βιοσύνθεση και την κατανομή των αλκαλοειδών σε ώριμους καρπούς, φύλλα, στελέχη και ρίζες. Τα ευρήματα της μελέτης υποστηρίζουν την αυξημένη σύνθεση σκαλοπαμίνης (Xia et al., 2016). Σε μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα έρευνα την οποία επιμελήθηκαν οι Bai et al. (2019) απομονώθηκε το ριζικό γονίδιο SAUR (AbSAUR1) από την *Atropa belladonna*. Η κωδική περιοχή του εισήχθη στο φορέα έκφρασης και υπερεκφράστηκε στα μετασχηματισμένα φυτά. Η βιοσύνθεση των αλκαλοειδών δεν μειώθηκε και ταυτόχρονα η απόδοσή τους βελτιώθηκε σημαντικά σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (wild type) (Bai et al., 2019).

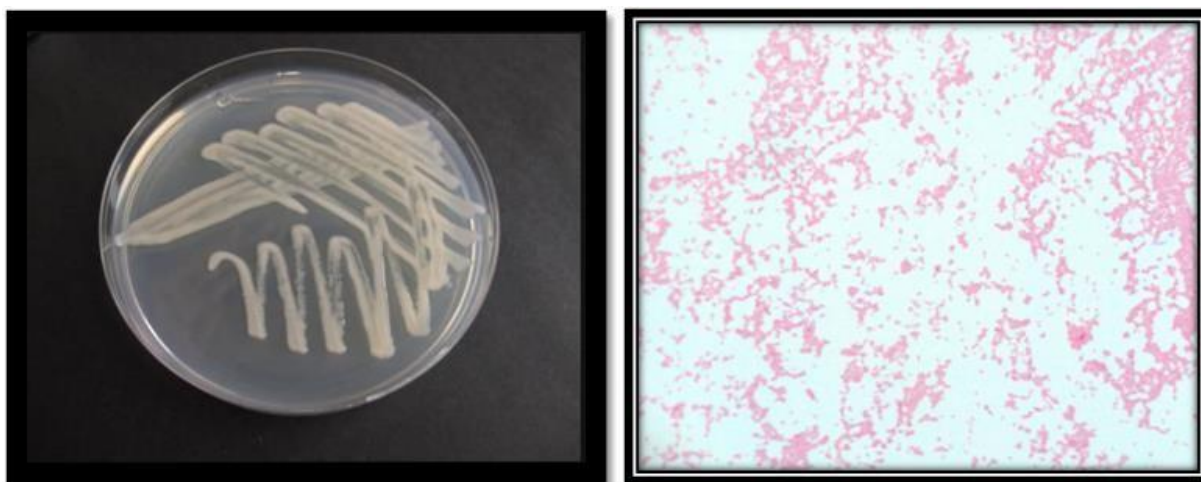
1.5 *Agrobacterium rhizogenes*

Το *Agrobacterium rhizogenes* (συνώνυμο *Rhizobium* sp.) είναι αρνητικά κατά Gram εδαφικό βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και στο γένος *Agrobacterium* (Εικόνα 1.4, Εικόνα 1.5). Το γένος περιλαμβάνει σαπροφυτικούς και παρασιτικούς οργανισμούς που εξειδικεύονται σε μεγάλο βαθμό, ανάλογα με τις φυτοπαθογόνες επιδράσεις των στελεχών (Holmes, 1988; Kersters et al., 1973). Τα είδη *A. tumefaciens* και *A. rhizogenes* αποτελούν τα πιο γνωστά του γένους που προσβάλλουν μέσω πληγών διάφορα μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά (De Cleene & De Ley, 1976; Porter & Flores, 1991).



Εικόνα 1.4. Παρατήρηση κάτω από μικροσκόπιο βακτηριακών κυττάρων *A. rhizogenes*.

Πηγή: <https://www.sanbi.org/animal-of-the-week/rhizobium-rhizogenes/>, <https://www.sanbi.org>



Εικόνα 1.5. Χρώση Gram του *A.Rhizogenes* με χρήση μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου (αριστερά), Μορφολογία αποικίας του *A.Rhizogenes* σε τριβλίο Petri μετά από επώαση 3-4 ημερών στους 28°C (δεξιά). Πηγή: <https://www.sanbi.org/animal-of-the-week/rhizobium-rhizogenes/>, <https://www.sanbi.org>

Το *A. tumefaciens* έχει ως παθογνομικό σύμπτωμα την δημιουργία τραχέων, ανώμαλων όγκων στην επιφάνεια του εδάφους στην κόμη και τον κορμό ή κάτω από αυτή στις ρίζες (crown gal) (Εικόνα 1.6) (Nilsson & Olsson, 1997) που οφείλονται σε μεταλλαγές στον μεταβολισμό των φυτικών ορμονών (Binns & Costantino, 1998). Η μόλυνση από *A. rhizogenes* χαρακτηρίζεται από μαζική παραγωγή τυχαίων ριζών με πολυάριθμα ριζικά τριχίδια, με τη συμπτωματολογία να ορίζεται ως “τριχωτές ρίζες” (hairy roots) (Εικόνα 1.6). Το φυσικό εύρος ξενιστών περιορίζεται στα εξής φυτικά είδη: μήλο, αγγούρι, ντομάτα και πεπόνι (Davioud et al., 1988; Isogai et al., 1988; Weller et al., 2000, 2004, 2006), όμως κάτω από εργαστηριακές συνθήκες μπορεί να μολύνει περισσότερα από 450 είδη φυτών (Porter & Flores, 1991; D. Tepfer, 1984). Το *A. rhizogenes* είναι ικανό να μολύνει και να μετασχηματίζει γενετικά τους περισσότερους φυτικούς ιστούς και όργανα, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, στελεχών, μίσχων, άκρων των βλαστών, κοτυληδόνων και πρωτοπλαστών (Drewes & Van Staden, 1995; Giri et al., 2001; Han et al., 1993; Króllicka et al., 2001). Η αποτελεσματικότητα της ανάπτυξης “τριχωτών ριζών” δεν είναι πάντοτε εγγυημένη και σχετίζεται με το βακτηριακό στέλεχος και τον τύπο του φυτικού ιστού που χρησιμοποιείται ως έκφυτο. Όπως αναφέρουν και οι Nilsson και Olsson (1997), τα βακτήρια του γένους *Agrobacterium* “χρησιμοποιούν” εργαλεία γενετικής μηχανικής για να μεταμορφώσουν το φυτό-ξενιστή σε ένα εργοστάσιο παραγωγής προσαρμοσμένων χημικών

τροφίμων για την ανάπτυξή τους. Τα χημικά αυτά τρόφιμα συνιστούν οι οπίνες, παράγωγα σακχάρων και αμινοξέων, οι οποίες συντίθεται από ογκογενέσεις. Η δομή των οπινών εξαρτάται από το μολυσματικό στέλεχος και δεν μεταβολίζονται από το φυτό, αλλά αποβάλλονται στο εξωτερικό περιβάλλον και καταβολίζονται τελικά από τα βακτήρια (Petil et al., 1970). Τα γενετικά αυτά εργαλεία, που έχουν στην διάθεση τους τα *Agrobacterium*, ονομάζονται πλασμίδια. Πιο συγκεκριμένα, οι λειτουργίες που απαιτούνται για τη μεταφορά DNA (T-DNA) στο κύτταρο του φυτού-ξενιστή εντοπίζεται σε περιοχές του πλασμιδίου Ti (tumor inducing) στο *A. tumefaciens* και του πλασμιδίου Ri (root inducing) στο *A. rhizogenes* (Baron & Zambryski, 1996).



Εικόνα 1.6. Συμπτώματα Crown gal από προσβολή *Agrobacterium tumefaciens* (αριστερά) και συμπτώματα Hairy roots από *Agrobacterium Rhizogenes* σε μηλιά (δεξιά).
(Πηγή: <https://www.plantdiseases.org/hairy-root-crown-gall-apple>, <https://www.plantdiseases.org>)

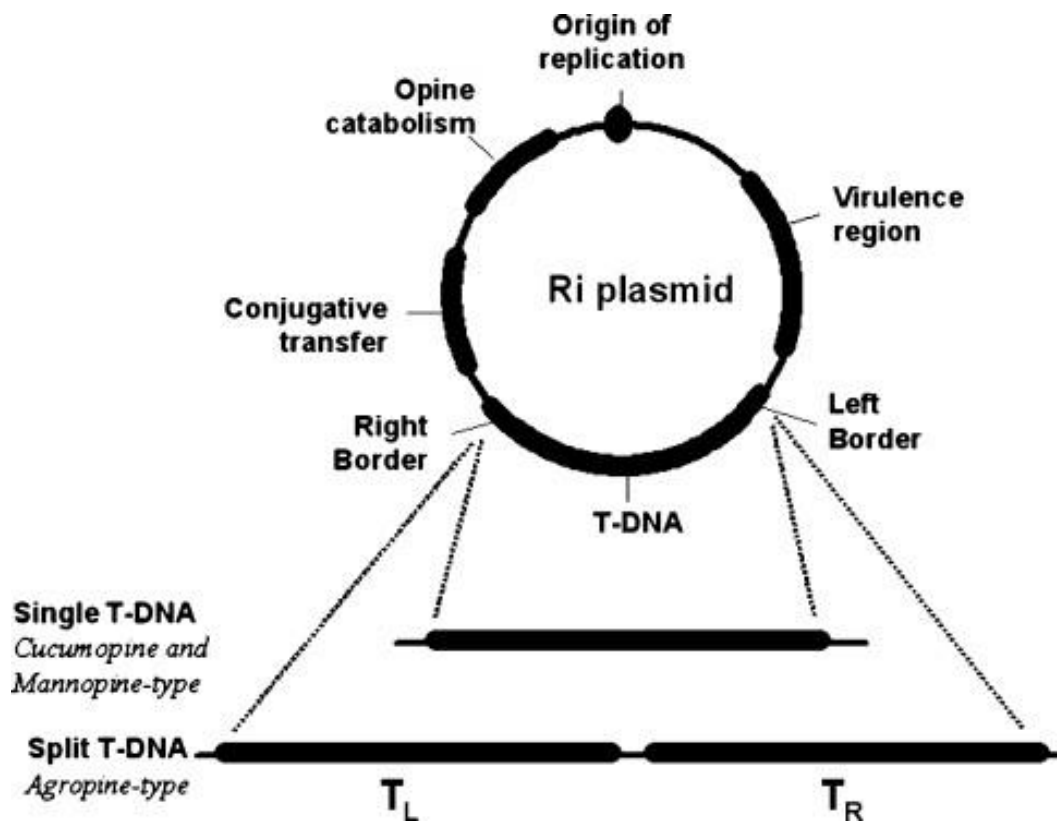
1.5.1 Πλασμίδιο Ri (root-inducing)

Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμικές κυκλικές δομές DNA και ενώ δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση των βακτηρίων, προσδίδουν ανθεκτικότητα και επηρεάζουν την παθογόνο δράση τους (Τζάμος, 2007). Συγκεκριμένα, το πλασμίδιο Ri είναι μεγάλου μεγέθους (180-250 Kbp) και είναι απαραίτητο για την παθογένεια των βακτηρίων. Τα περισσότερα από τα γονίδια που υπάρχουν στην περιοχή του μεταφερόμενου DNA των πλασμιδίων Ri έχουν χαρακτηριστεί ως ογκογονίδια (γονίδια-μετασχηματισμού) ή γονίδια σχετιζόμενα με την οπίνη, η οποία αποτελεί την πηγή άνθρακα και αζώτου για το μολυσματικό στέλεχος (Britton et al., 2008a). Σε αντίθεση με τα τυπικά προκαρυωτικά γονίδια, τα γονίδια που συνεισφέρουν στην μεταφορά του DNA ή τα γονίδια που είναι σχετιζόμενα με την οπίνη, περιέχουν αλληλουχίες μεταγραφικής ρύθμισης, θέσεις πολυαδενυλίωσης και αλληλουχίες διακίνησης πρωτεϊνών. Έτσι, η έκφραση αυτών εξασφαλίζεται στο φυτό-ξενιστή (Klee et al., 1984; Sakakibara et al., 2005).

Με βάση τα ευρήματα που προκύπτουν από τη σύγκριση γονιδιωμάτων, τη χαρτογράφηση DNA, και τα πειράματα υβριδισμού DNA/DNA, οι απομονώσεις του *A. rhizogenes* έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν μια εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των ‘τριχωτών ριζών’. Για αυτό τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη κατατάσσονται σε υποκατηγορίες, οι οποίες προκύπτουν βάσει του τύπου οπινών που παράγονται από τους μετασχηματισμένους ιστούς (Filetici et al., 1987). Τα στελέχη είναι επιβεβαιωμένο ότι παράγουν τουλάχιστον 4 κατηγορίες οπινών: χαρακτηριστικά παραδείγματα πλασμιδίων Ri (pRi) που παράγουν την αναφερόμενη οπίνη i) τύπου agropine, που είναι και τα πιο κοινά (pRiA4 του στελέχους A4), ii) τύπου cucumopine (pRi2659 του στελέχους NCPPB2659), iii) τύπου mannopine (pRi8196 του στελέχους NCIB8196) και iv) τύπου mikimopine (pRi1724 του στελέχους MAFF301724) (Estrada-Navarrete et al., 2006; Mankin et al., 2007; Moriguchi et al., 2001).

Τα πλασμίδια περιλαμβάνουν περιοχές που δεν μεταφέρονται στο φυτό-ξενιστή, όπου εδρεύουν τα γονίδια που ρυθμίζουν τη μολυσματικότητα, την έναρξη αντιγραφής και τον καταβολισμό των οπινών (Εικόνα 1.7). Επίσης, υπάρχει η μεταφερόμενη περιοχή (T-DNA) που περιέχει γονίδια επαγωγής τριχωτών ριζών: ογκογόνο γονίδια (*rol*) και γονίδια άγνωστης λειτουργίας (ORFs). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε δυο περιοχές του T-DNA του pRiA4b πλασμιδίου συναντάται ομολογία με το tms του βακτηρίου *A. tumefaciens* (Ti πλασμίδια που χαρακτηρίζονται από TrDNA) (Britton et al., 2008a). Τα ογκογόνο γονίδια

διακρίνονται σε *rolA*, *rolB*, *rolBtr* (*rolB* ομόλογο σε TrDNA) *rolC* και *rolD* (Πίνακας 1.4). Ακόμη, στην TL-DNA περιοχή του T-DNA βρίσκονται τα ORFs τα οποία διαχωρίζονται σε ORF8, ORF13, ORF14 και ORF18 (Πίνακας 1.4). Αυτές οι περιοχές όταν εκφράζονται σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς από *A. rhizogenes* διαμορφώνουν τον φαινότυπο Ri που συνοδεύεται από συγκεκριμένες μορφολογικές αλλαγές. Αναλυτικότερα, η έκφραση των Ri-μεταφερόμενων γονιδίων οδηγεί σε εξαιρετικά διακλαδιζόμενες ρίζες και, κατ' επέκταση, αύξηση της βιομάζας του υπογείου τμήματος. Οι μετασχηματισμένες ρίζες μπορούν να αναγεννηθούν σε φυτά, τα οποία έχουν αποκτήσει το φαινότυπο Ri. Πέραν των διαφορών που αφορούν στη μορφολογία των ριζών, ο φαινότυπος περιλαμβάνει επίσης καχεκτική ανάπτυξη, μειωμένους μεσογονάτιους άξονες, μειωμένη κυριαρχία κορυφής, έντονα ρυτιδωμένα φύλλα, μειωμένη γονιμότητα και άτυπες μορφολογίες των ανθέων (Terfer, 1984).



Εικόνα 1.7 Γονιδιακές περιοχές ενός πλασμιδίου Ri του βακτηρίου *A. rhizogenes* (Veena & Taylor, 2007b).

Πίνακας 1.4. Σύνοψη των αναφερθέντων ιδιοτήτων των ογκογονιδίων των πλασμιδίων Ri του *A. rhizogenes* (Britton et al., 2008a).

Γονίδια	Έκφραση	Λειτουργία
<i>rolA</i>	• Εκφράζεται τόσο σε βακτήρια όσο και σε φυτά • Ρυθμίζεται από την αυξίνη	• Μειώνει τις συγκεντρώσεις ορμονών • Μπλοκάρει τη βιοσύνθεση της GA • Παρεμβαίνει στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών • Μεταβιβάζεται μέσω Graft • Αναστέλλει την επιμήκυνση των κυττάρων μέσω διαχυτικού παράγοντα
<i>rolB</i>	• Ρυθμίζεται από την αυξίνη (αργά) • Αναστέλλεται από ολιγογαλακτουρονίδια	• Διεγείρει το σχηματισμό νέων μεριστωμάτων • Τροποποιεί την αντίληψη/ευαισθησία της αυξίνης μέσω διαταραχής της οδού μεταγωγής σήματος
<i>rolC</i>	• Ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα σακχαρόζης • Οι φυτικές πυρηνικές πρωτεΐνες αλληλοεπιδρούν με υποκινητή	• Μειώνει το μέγεθος των κυττάρων • Μπορεί να προάγει την κυτταρική διαίρεση (μέσω της σακχαρόζης) • Μπορεί να ρυθμίζει το μεταβολισμό των σακχάρων • Μπλοκάρει τη βιοσύνθεση GA
<i>ORF3n</i>	?	• Καταστολή της αποδιαφοροποίησης των ιστών
<i>ORF8</i>	• Ρυθμίζεται από αυξίνη (αργά)	• Τροποποιεί τη μεταφορά σακχαρόζης • Ο N-terminal τομέας προκαλεί συσσώρευση σακχάρων/αμύλου • Η C-terminal περιοχή μειώνει τη συγκέντρωση σακχάρων/αμύλου
<i>ORF13</i>	• Επάγεται από τραυματισμούς	• Διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο για την ενεργοποίηση της κυτταρικής διαίρεσης • Αυξάνει τον αριθμό των μιτώσεων στο ακραίο τμήμα του μεριστωματικού βλαστού • Προκαλεί αποδιαφοροποίηση • Μεταβιβάζεται μέσω Graft

1.5.2 Αξιοποίηση του *A. rhizogenes* ως φορέα γενετικού μετασχηματισμού

Το *A. rhizogenes* συστηματικά χρησιμοποιείται για τη δημιουργία *in vitro* καλλιεργειών “τριχωτών ριζών” σε μελέτες μεταβολικής μηχανικής και παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Georgiev et al., 2007; Hu & Du, 2006; Srivastava & Srivastava, 2007). Συγκεκριμένα, ήδη από το 1980 χρονολογούνται αναφορές σχετικά με την ικανότητα μετασχηματισμού διαφόρων ειδών σε συνθήκες *in vitro* και σε καθορισμένο θρεπτικό μέσο (Terfer & Tempé, 1981). Αργότερα, αυτή η γνώση χρησιμοποιήθηκε για την σταθερή παραγωγή διαγονιδιακών φυτών από τις καλλιέργειες “τριχωτών ριζών” σε έρευνες γενετικής ανάλυσης (Terfer & Casse-Delbart, 1987). Στο πλαίσιο αυτό, οι καλλιέργειες διαγονιδιακών “τριχωτών ριζών” έχουν συμβάλει στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων, με μικροοργανισμούς αζωτοδέσμευσης, μυκόρριζες και νηματώδη που απαντώνται στην περιοχή της ριζόσφαιρας (Christey, 2001).

Οι διάφοροι περιορισμοί των *in vitro* καλλιεργειών, όπως οι αυστηρές συνθήκες και η έλλειψη εναέριων διαγονιδιακών οργάνων, οδήγησαν στην ανάπτυξη των "σύνθετων φυτών" ("composite plants"), μέσω της έρευνας των Hansen et al., 1989. Τα σύνθετα φυτά αποτελούνται από άγριου τύπου βλαστό και διαγονιδιακό ριζικό σύστημα, το οποίο επετεύχθη μέσω εμβολιασμού με το βακτήριο *A. rhizogenes*. Η μεταφύτευση και η ανάπτυξη στο έδαφος ή σε υδροπονικές καλλιέργειες πλέον επιτυγχάνεται με σχετική ευκολία. Η προσέγγιση αυτή, πλεονεκτεί έναντι της συμβατικής μεθοδολογίας παραγωγής διαγονιδιακών ριζών, μέσω του *A. rhizogenes*, καθώς οδηγεί σε ανάπτυξη πλήρων φυτών σε αντίθεση με την διαθεσιμότητα μόνο του υπογείου τμήματος στην *in vitro* καλλιέργεια (Veena & Taylor, 2007b). Με αυτή την μέθοδο έχουν δημιουργηθεί σύνθετα φυτά σε περισσότερα από 20 είδη (Estrada-Navarrete et al., 2006; Kereszt et al., 2007).

Η χρήση του *A. rhizogenes* δεν περιορίζεται σε δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. Πληθώρα ερευνών έχουν αξιοποιήσει τις “τριχωτές ρίζες” σε μελέτες ανάλυσης της λειτουργικότητας των γονιδίων. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί σε πληθώρα φυτικών ειδών ότι τόσο ο μηχανισμός RNAi (Kumagai & Kouchi, 2003; Limpens, 2004; Pavli et al., 2010) όσο και η καταστολή του μηχανισμού RNAi ως εργαλείο αντίστροφης γενετικής (Waterhouse & Helliwell, 2003) είναι λειτουργικά στις τριχωτές ρίζες σύνθετων φυτών σε *in vitro* μελέτες. Η αποσιώπηση RNAi μπορεί να επιφέρει επιθυμητούς φαινοτύπους εκεί που στρατηγικές αποκλεισμού, όπως η εισαγωγή T-DNA, αδυνατούν (Lawrence & Pikaard, 2003). Αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές χρησιμοποιούν το δίκλωνο RNA (dsRNA, double-stranded) με στόχο τη σιώπηση

γονιδίων είτε σε τριχωτές ρίζες είτε σε σύνθετα φυτά (Collier et al., 2005). Στο πλαίσιο αυτό, έχει επιτευχθεί η σιώπηση γονιδίων GUS ή GFP σε διαγονιδιακά φυτά καθώς και σιώπηση γονιδίων που εμπλέκονται σε ασθένειες ή/και συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις (Collier et al., 2005; Subramanian et al., 2007). Οι ανωτέρω τεχνικές αποτελούν το ερευνητικό μέλλον της χρήσης του *A. rhizogenes* καθώς συμβάλλουν στον προσδιορισμό του ρόλου των γονιδίων στη βιολογία των φυτών.

1.6 Σκοπός της έρευνας

Η *Atropa belladonna* είναι ένα φυτό γνωστό για την ικανότητα του να παράγει αλκαλοειδή του τροπανίου. Αυτού του τύπου τα αλκαλοειδή είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας αφενός μεν λόγω της ευρείας εφαρμογής τους σε ποικίλους κλάδους της βιομηχανίας και αφετέρου λόγω της διαθεσιμότητάς τους που περιορίζεται σε συγκεκριμένα φυτικά είδη. Μεταξύ των φαρμακευτικών φυτών, το είδος *A. belladonna* έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον στον τομέα της βελτίωσης τόσο σε βασικό όσο και σε εφαρμοσμένο επίπεδο έρευνας, η οποία επικεντρώνεται κυρίως στην κάλυψη των αποθεματικών αναγκών σε ξηρή ουσία. Με δεδομένο ότι η ρίζα των φυτών αποτελεί πηγή υψηλής ποσότητας των φαρμακευτικών ενώσεων, ήδη από το 1980 διεξάγονται μελέτες που εστιάζουν στην αύξηση της βιομάζας των ριζών. Για το σκοπό αυτό, ενδείκνυται ο γενετικός μετασχηματισμός μέσω της χρήσης του βακτηρίου *A. rhizogenes* (*Rhizobium rhizogenes*) προς δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με αυξημένη ανάπτυξη ριζικού συστήματος. Τα πειράματα των σχετικών μελετών χαρακτηρίζονται από ποικιλομορφία αποτελεσμάτων, η οποία αποδίδεται στη χρήση πολυάριθμων βακτηριακών στελεχών αλλά και διαφορετικών πειραματικών συνθηκών και πρωτοκόλλων μετασχηματισμού. Η παρούσα πτυχιακή εργασία εστίασε στο γενετικό μετασχηματισμό του είδους *A. belladonna*, μέσω της χρήσης του βακτηριακού στελέχους R1000, με στόχο την ανάπτυξη ενός βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου που οδηγεί σε παραγωγή διαγονιδιακών “τριχωτών ριζών”, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη βιομάζα που δυνητικά περιέχει αυξημένη ποσότητα αλκαλοειδών ενδιαφέροντος.

2. ΥΔΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Για την διεξαγωγή του πειράματος γενετικού μετασχηματισμού έγινε χρήση σπόρων του είδους *Atropa belladonna*. Πρόκειται για είδος με βάρος 1000 σπόρων 1,1 γραμμάρια. Το σχήμα των σπόρων είναι νεφροειδές, υποκυκλικό, ενώ το χρώμα τους είναι καστανό σκούρο (Εικόνα 2.1) (WeberSeeds Botany & Ethnobotany).

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων γενετικού μετασχηματισμού, οι σπόροι προμηθευτήκαν από την εταιρία Pharmasaat, εταιρία προμήθειας πιστοποιημένου γενετικού υλικού που εδρεύει στη Γερμανία (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Σπόροι του είδους *Atropa belladonna* (αριστερά) (Πηγή: <https://www.pharmasaat.de/index.html>, WeberSeeds Botany & Ethnobotany) και σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Pharmasaat (δεξιά).

2.2 Προετοιμασία εκφύτων *Atropa belladonna*

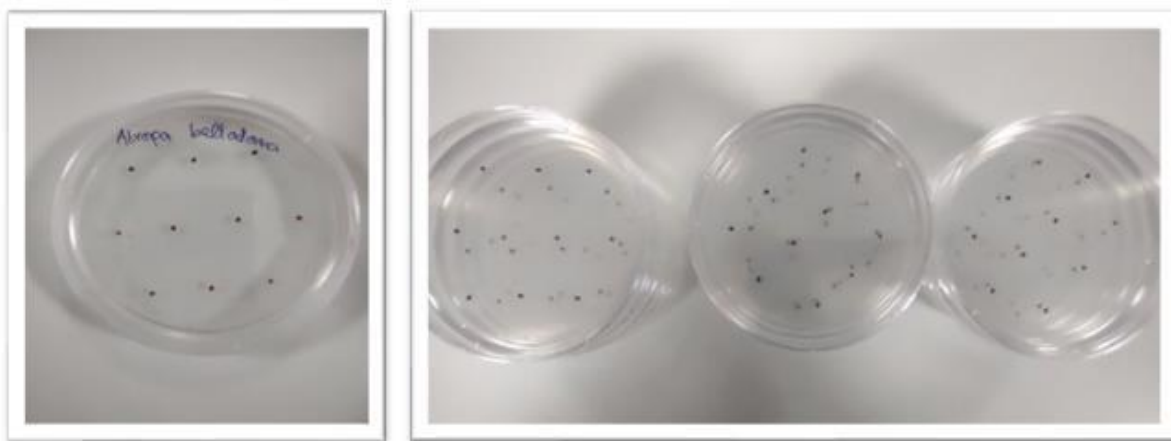
Για την προετοιμασία των εκφύτων, πρώτο στάδιο αποτέλεσε η απολύμανση των σπόρων. Για την απολύμανση, χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα χλωρίνης 20 %, που περιείχε Tween-20 (1 %). Συνοπτικά, η απαιτούμενη ποσότητα σπόρων τοποθετήθηκε σε falcon, που περιείχε διάλυμα χλωρίνης, και ακολούθησε επώαση για πέντε λεπτά με ήπια ανάδευση. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με αποστειρωμένο dH₂O, υπό συνθήκες συνεχούς ανάδευσης.

Ακολούθως, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης (Α) (Πίνακας 2.1). Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν 10 σπόροι ανά τριβλίο που έπειτα σφραγίστηκε με παραφίλμ προς αποφυγή μολύνσεων (Εικόνα 2.2). Δημιουργήθηκαν 15 τέτοια τριβλία, τα οποία περιείχαν συνολικά 150 σπόρους. Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με συνθήκες θερμοκρασίας 22°C και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως : 8 ώρες σκοτάδι.

Πίνακας 2.1 Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση του πειράματος του γενετικού μετασχηματισμού και σύνθεση αυτών.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΣΥΝΘΕΣΗ	
Υπόστρωμα Βλάστησης (Α)	Sucrose, 10 g/L Agar, 5 g/L MS/vitamins, 2.2 g/L
Υπόστρωμα Συν-καλλιέργειας (Β)	Sucrose, 10 g/L Agar, 5 g/L MS/MES/vitamins, 2.2 g/L Ακετοσυριγκόνη, 100 μM
Υπόστρωμα Επαγωγής Ριζών (Γ)	Sucrose, 10 g/L Agar, 5 g/L MS/MES/vitamins, 2.2 g/L Σεφοταξίμη, 250 mg/L
Υπόστρωμα MS	Sucrose, 30 g/L MS/MES/vitamins, 4,4 g/L Ακετοσυριγκόνη, 100 μM

*Σε όλα τα διαλύματα έγινε ρύθμιση pH = 5,6 ± 0,1.



Εικόνα 2.2. Απολυμασμένοι σπόροι *Atropa belladonna* σε θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης.

2.3 Στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes*

Στην πειραματική διαδικασία έγινε χρήση του βακτηριακού στελέχους R1000 για το γενετικό μετασχηματισμό του είδους *Atropa belladonna*. Για την ανάπτυξη της καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από stock γλυκερόλης. Για την καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα LB (10 ml), το οποίο περιείχε τα αντιβιοτικά: στρεπτομυκίνη ($25 \mu\text{gml}^{-1}$) και ναλιδιξικό οξύ ($50 \mu\text{gml}^{-1}$). Η ανάπτυξη του στελέχους έγινε σε θερμοκρασία 28°C σε μηχανικό αναδευτήρα (160 rpm) και διήρκεσε 2 ημέρες.

Ακολούθως, για την προετοιμασία του εμβολίου που αξιοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των εκφύτων, έγινε συλλογή βακτηριακών κυττάρων (10 ml) με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 1 ml MS (Πίνακας 2.1). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 5 λεπτά και επαναδιάλυση του ιζήματος σε υγρό MS, το οποίο και αποτελεί το εμβόλιο εμφύτευσης.

2.4 Διαδικασία γενετικού μετασχηματισμού σπορόφυτων του είδους *Atropa belladonna*

Στις διαδικασίες του γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα ηλικίας 7 ημερών, με φυσιολογικό φαινότυπο και χωρίς να εμφανίζουν κάποιο είδος συμπτωμάτων. Η διαδικασία του μετασχηματισμού έγινε βάσει του πρωτοκόλλου των Pavli & Skaracis (2010), με τροποποιήσεις που αφορούσαν στην ηλικία των σποροφύτων και στη σύσταση τοπικού μέσου επαγωγής ριζών.

Αρχικά, τα σπορόφυτα με χρήση απολυμασμένου νυστεριού και λαβίδας δέχθηκαν μια κοπή στο σημείο του υποκοτυλίου. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος και στην συνέχεια η αποκομμένη επιφάνεια εμβαπτίστηκε στο εμβόλιο βακτηριακών κυττάρων του στελέχους R1000. Τα εμβολιασμένα σπορόφυτα τοποθετήθηκαν σε νέα τριβλία με υπόστρωμα συν-καλλιέργειας (B) (Πίνακας 2.1).

Τα τριβλία καλύφθηκαν περιμετρικά με parafilm και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22°C – φωτοπερίοδος 16 ώρες φως : 8 ώρες σκοτάδι) για χρονικό διάστημα 3 ημερών. Έπειτα, τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε τριβλία που περιείχαν υπόστρωμα επαγωγής ριζών (Γ), τα οποία εν συνεχεία σφραγίστηκαν με parafilm και επανατοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης (θερμοκρασία 22°C – φωτοπερίοδος 16 ώρες φως:8 ώρες σκοτάδι). Η αρχική περίοδος επαγωγής ριζών διήρκεσε 2 εβδομάδες. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, πραγματοποιήθηκε δεύτερη περίοδος επαγωγής όπου τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε τριβλία με φρέσκο υπόστρωμα (Γ), τα οποία τοποθετήθηκαν με μερική κλίση σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών για διάστημα δύο εβδομάδων.

Παράλληλα, εφαρμόστηκαν ίδιες μεταχειρίσεις σε φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (άγριου τύπου-wt), στα οποία όμως δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός. Τα φυτά αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την συγκριτική αξιολόγηση του μετασχηματισμού. Ο συνολικός αριθμός τριβλίων ήταν 7, που περιείχαν συνολικά 35 φυτά, εκ των οποίων τα 25 εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος R1000 και τα υπόλοιπα αποτέλεσαν τους μάρτυρες (wt). Τα έκφυτα που εμφάνισαν τυχόν μολύνσεις απομακρύνονταν από τα τριβλία προς αποφυγή μόλυνσης και των υπόλοιπων φυτών.

2.5 Αξιολόγηση των μετασχηματισμένων φυτών του είδους *Atropa belladonna*

Η διαδικασία αξιολόγησης των μετασχηματισμένων φυτών επιτεύχθηκε με την σύγκριση τους με τα φυτά μάρτυρες, η οποία αφορούσε στα φαινοτυπικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των ριζών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος, μέσω PCR, για την επιτυχή ένθεση του διαγονιδίου *rolB2* αλλά και την παρουσία της περιοχής *virCD* του βακτηρίου *A. rhizogenes* στο γονιδίωμα των μετασχηματισμένων φυτών.

2.5.1 Φαινοτυπική αξιολόγηση

Η φαινοτυπική αξιολόγηση των εμβολιασμένων φυτών, συγκριτικά με τους μάρτυρες, περιλάμβανε συστηματική παρατήρηση των αναπτυξιακών χαρακτηριστικών και της μορφολογίας των ριζών που αναπτύχθηκαν στην περιοχή του υποκοτυλίου.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- Μορφολογία ριζών
- Μορφολογία υπέργειου μέρους
- Αριθμός διακλαδώσεων
- Συχνότητα μετασχηματισμού

2.5.2 Έλεγχος του μετασχηματισμού μέσω PCR

Με σκοπό τον έλεγχο της διαγονιδιακής φύσης των νέο-εκπτυχθέντων ριζών στα μετασχηματισμένα φυτά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR.

Έτσι, εκτιμήθηκε η ένθεση του διαγονιδίου *rolB2* καθώς και η παρουσία της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes*, η οποία θα υποδήλωνε υπολείμματα του βακτηρίου στις ρίζες των μετασχηματισμένων φυτών.

2.5.2.1 Εξαγωγή DNA

Για την συλλογή δειγμάτων προς εξαγωγή DNA, έγινε αποκοπή των ριζών από τα μετασχηματισμένα φυτά καθώς και από τα φυτά άγριου τύπου που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Τα δείγματα ριζών τοποθετήθηκαν σε αλουμινόχαρτο και, έπειτα από κατάλληλη σήμανση, τοποθετήθηκαν απευθείας σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης (-80 °C).

Για την εξαγωγή DNA, χρησιμοποιήθηκαν 200 mg ιστού από τα δείγματα, τα οποία τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο Eppendorf. Ακολούθησε προσθήκη 200 ml CTAB και τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 25 mg PVP 25, ακολούθησε εκ νέου ομογενοποίηση σε υδατόλουτρο και ακολούθως προστέθηκαν 200 μL CTAB και νέα ομογενοποίηση. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 25°C, όπου επώσθηκαν για 25 λεπτά. Ακολούθησε ανακίνηση σε Vortex, προσθήκη 200 μL φαινόλης και 200 μL χλωροφορμίου και μηχανική ανάδευση. Πραγματοποιήθηκε στην συνέχεια φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 13000 rpm για 5 λεπτά, μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf, προσθήκη 200 μL NaCl 5M και ανάδευση. Στο επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, προστέθηκαν 800 μL αιθυλικής αλκοόλης 95 %, ακολούθησε ανάδευση και τοποθέτηση των δειγμάτων στην κατάψυξη στους -20°C για 12 ώρες. Μετά την επώαση (overnight), έγινε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά. Απορρίφθηκε η υγρή οργανική φάση (αλκοόλη) και διατηρήθηκε το ίζημα. Μετά, πραγματοποιήθηκε εκ νέου καθαρισμός, με προσθήκη 1 ml αιθυλικής αλκοόλης 70 % και φυγοκέντρηση (13000 rpm) για 5 λεπτά, διατηρώντας ξανά μόνο την στερεή φάση (ίζημα). Τελευταίο βήμα της διαδικασίας ήταν η διάλυση του ιζήματος σε 50 ddH₂O, έπειτα από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για μερικά λεπτά.

Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων DNA έγινε με την χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους/ορατού με απορρόφηση στα 260 nm, όπου και η συνολική συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/μL.

2.5.2.2 PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

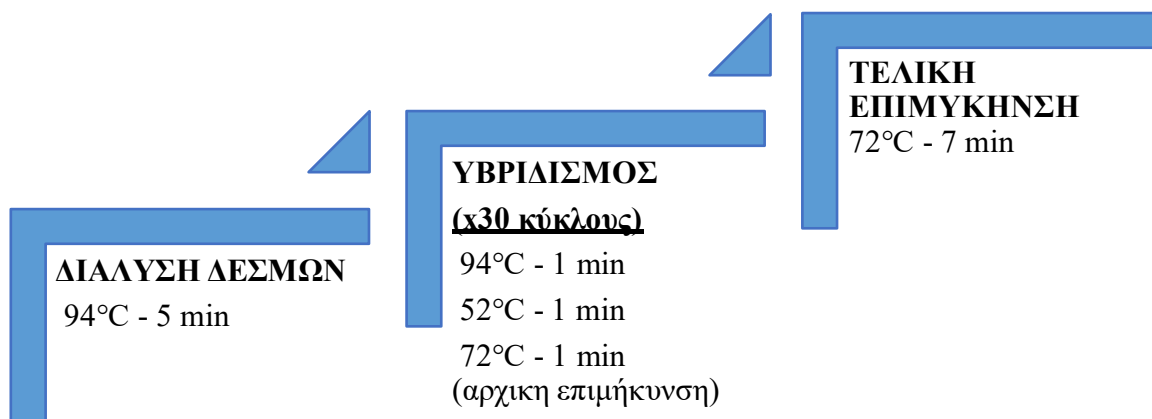
Στο πλαίσιο επαλήθευσης της διαγονιδιακής φύσης των ριζών πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR. Η διαπίστωση της ενσωμάτωσης της T-DNA περιοχής στο φυτικό γονιδίωμα και της απουσίας των βακτηριακών κυττάρων έγινε μέσω εξειδικευμένων ζευγών εκκινητών που παρουσιάζονται στο Πίνακα 2.2. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 2.3 και το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή για την πραγματοποίηση της PCR στην Εικόνα 2.5.1.

Πίνακας 2.2 Τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	θ°C	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
rolb2-F	GCTCTTGCAAGTGCTAGATTT	52	423	Thilip et a., 2015
rolb2-R	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	52		
virCD-F	CTCATCAGGCACGCTTG	52	1074	Pavli and Sarakis 2010
virCD-R	GCGGATGCTTCAAATGG	52		

Πίνακας 2.3 Αντιδραστήρια και το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε για την PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα	2
MgCl ₂	1
dNTPs	0.5
Εκκινητές	0.75
Taq polymerase	0.25
DNA	1
H ₂ O	13.75
Τελικός όγκος	20



Εικόνα 2.3 Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR.

2.5.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR έγινε σε πηκτή αгарόζης 1.5 % με ρυθμιστικό διάλυμα TBE στα 60 V. Ακολούθησε χρώση της πηκτής σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE που περιέχει βρωμιουχοαιθίδιο (0.5 mgL^{-1}) και οπτικοποίηση των προϊόντων PCR με υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας έχει ως κεντρικό στόχο την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *A. belladonna* με τη χρήση του βακτηριακού φορέα *A. rhizogenes*. Απώτερο σκοπό αποτελεί η συνεισφορά στην ανάπτυξη αποτελεσματικών πρωτοκόλλων μετασχηματισμού του είδους για δημιουργία διαγονιδιακών ριζών που είναι δυνητικά αξιοποιήσιμες για εξαγωγή φαρμακευτικών ενώσεων ενδιαφέροντος.

Στη γενετική τροποποίηση χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα *A. belladonna* ηλικίας 7 ημερών, που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες *in vitro* με στόχο την αξιοποίηση σποροφύτων που είναι απαλλαγμένα από μολύνσεις (Εικόνα 3.1). Το στέλεχος του *A. rhizogenes* που χρησιμοποιήθηκε ήταν το R1000, ενώ ο εμβολιασμός των εκφύτων έγινε στο ύψος του υποκοτυλίου, έπειτα από κοπή και απομάκρυνση του ριζικού συστήματος που είχε ήδη αναπτυχθεί. Για την ανάγκες του πειράματος, εκτός από τα εμβολιασμένα σπορόφυτα υπήρξε και ένας αριθμός άθικτων σποροφύτων αγρίου τύπου, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.1 Σπορόφυτα του είδους *Atropa belladonna* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα γενετικού μετασχηματισμού. Απεικονίζονται σπορόφυτα ηλικίας 7 ημερών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης.



Εικόνα 3.2 Σπορόφυτα του είδους *A. belladonna* που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος του *A. rhizogenes* R1000 και τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα συν-καλλιέργειας.

3.1 Χρονική περίοδος έκπτυξης νέων ριζών μετά τον εμβολιασμό

Έπειτα από τον εμβολιασμό των εκφύτων με το βακτηριακό στέλεχος R1000, ακολούθησε συστηματική καταγραφή σχετικά με το χρόνο έκπτυξης νέων ριζών και παρακολούθηση της ανάπτυξής τους (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3 Απεικόνιση των σποροφύτων *A. belladonna* που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος του βακτηρίου *A. rhizogenes* R1000 (αριστερά) και των σποροφύτων αγρίου τύπου (δεξιά) και τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών.

Τα εμβολιασμένα σπορόφυτα με το R1000, εμφάνισαν νέες ρίζες μετά την πάροδο 13-15 ημερών, ενώ χαρακτηριστικό είναι ότι οι νεοεκπυσσόμενες ρίζες εμφάνισαν πλαγιοτροπική ανάπτυξη από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξής τους (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Αρχική έκπτυξη ριζών σε σπορόφυτα *Atropa belladonna* που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000. Παρατηρείται ήδη η έκπτυξη πλαγίων ριζών, 13 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

3.2 Αξιολόγηση φαινοτύπου μετασχηματισμένων ριζών στην *Atropa Belladonna*

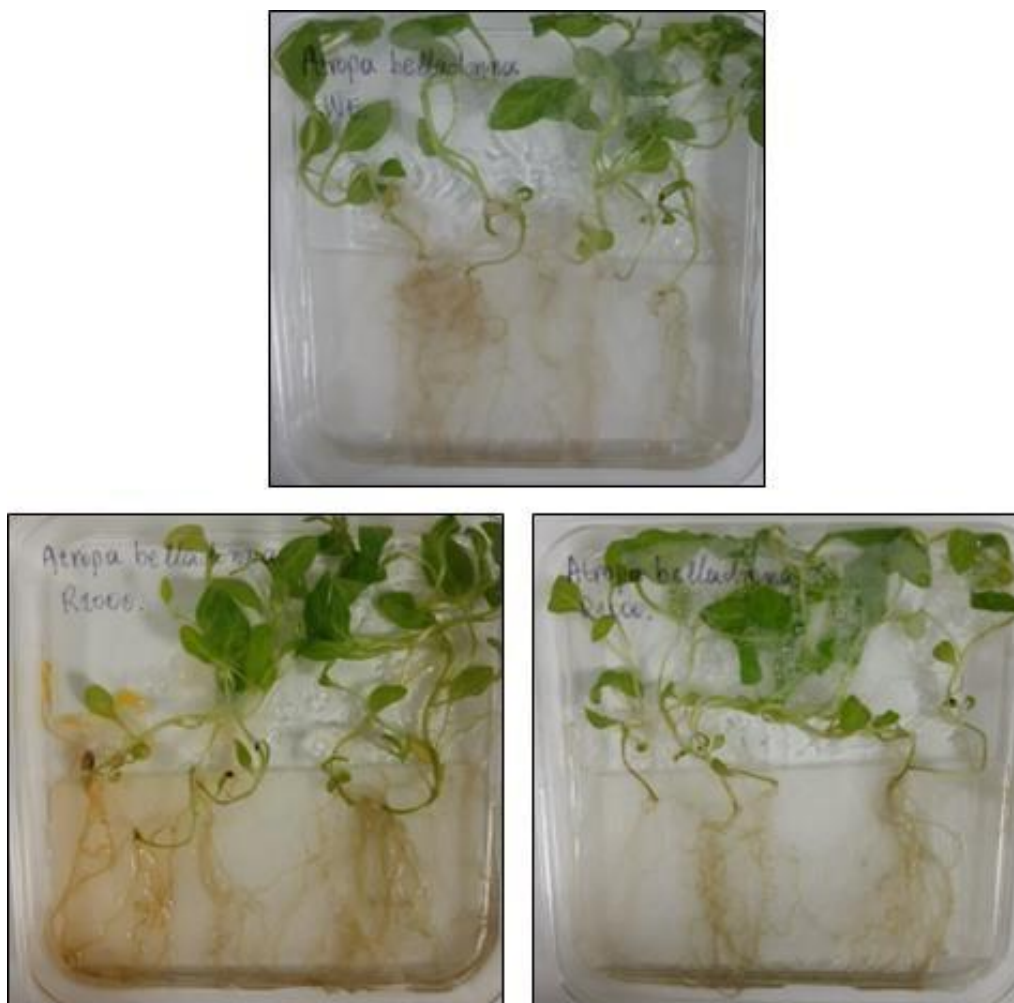
Μεταξύ των εμβολιασμένων σποροφύτων και των σποροφύτων αγρίου τύπου υπήρχαν εμφανείς φαινοτυπικές διαφορές στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, οι οποίες μεγιστοποιήθηκαν μετά το πέρας των 3-4 εβδομάδων. Είναι δε αξιοσημείωτο ότι στα εμβολιασμένα σπορόφυτα παρατηρήθηκε σχηματισμός κάλου στο σημείο εμβολιασμού (Εικόνα 3.4).

Σχετικά με τη μορφολογία των ριζών, τα εμβολιασμένα σπορόφυτα ανέπτυξαν θυσσανώδους μορφής ριζικό σύστημα, το οποίο παράλληλα χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερο αριθμό πλευρικών διακλαδώσεων και εν γένει μεγαλύτερη βιομάζα ριζών σε σχέση με το μάρτυρα που αφορούσε σε μη-εμβολιασμένα σπορόφυτα (wt) (Εικόνες 3.5 και 3.6).



Εικόνα 3.5 Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων αγρίου τύπου (επάνω) και των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος του βακτηρίου *A. rhizogenes* R1000 (κάτω), 3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Ο γενετικός μετασχηματισμός αφορά σε εμβολιασμό των σποροφύτων στο ύψος του υποκοτυλίου, έπειτα από τομή και αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μη-εμβολιασμένα σπορόφυτα ίδιας ηλικίας.

Βάσει των συνολικών αποτελεσμάτων σχετικά με την επίδραση του εμβολιασμού των σποροφύτων στο ύψος του υποκοτυλίου, προκύπτει ότι οδήγησε σε ανάπτυξη ριζικού συστήματος που φέρει τον αναμενόμενο Ri-φαινότυπο καθώς υπάρχει αλλαγή της διαμόρφωσής του και αύξηση της βιομάζας του, η οποία προκύπτει από το σχηματισμό πολλαπλών πλαγίων ριζών. Για να διαπιστωθεί η διαγονιδιακή φύση των μετασχηματισμένων φυτών ακολούθησε ανάλυση των ριζών ως προς την ένθεση του διαγονιδίου *rolB2* και την παρουσία της αλληλουχίας *virCD* του βακτηρίου.

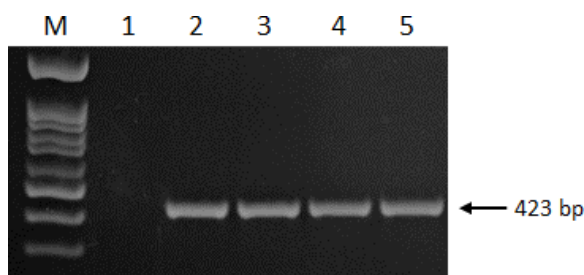


Εικόνα 3.6 Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων αγρίου τύπου (επάνω) και των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος του βακτηρίου *A. rhizogenes* R1000 (κάτω), 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Ο γενετικός μετασχηματισμός αφορά σε εμβολιασμό των σποροφύτων στο ύψος του υποκοτυλίου, έπειτα από τομή και αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μη-εμβολιασμένα σπορόφυτα ίδιας ηλικίας.

3.3 Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού και της διαγονιδιακής φύσης των μετασχηματισμένων ριζών

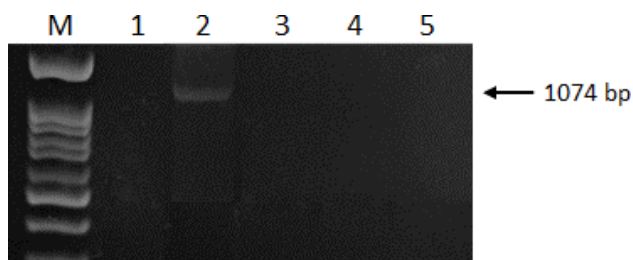
Για την επιβεβαίωση του γενετικού μετασχηματισμού εφαρμόστηκε αντίδραση PCR για τον έλεγχο της ενσωμάτωσης της T-DNA περιοχής, μέσω ενίσχυσης της αλληλουχίας του γονιδίου *rolB2*. Συμπληρωματικά, εφαρμόστηκε PCR για την ανίχνευση της αλληλουχίας *virCD* του *A. rhizogenes* ώστε να μελετηθεί το ενδεχόμενο τυχόν υπολειμμάτων του βακτηρίου στις ρίζες των μετασχηματισμένων εκφύτων.

Τα αποτελέσματα της PCR ανέδειξαν την επιτυχή μεταφορά του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος R1000, μέσω ενίσχυσης του γονιδίου *rolB2*. Όπως αναμενόταν, στους μάρτυρες (άγριου τύπου) δεν κατέστη εφικτή η ενίσχυση του προϊόντος που αντιστοιχεί στο γονίδιο *rolB2*. Επίσης, ως αναμενόμενο, η παρουσία του *rolB2* επαληθεύτηκε στα κύτταρα του στελέχους R1000 του *A. rhizogenes* (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *rolB2*: (1) Δείγμα ρίζας από φυτό-μάρτυρα με διαμόρφωση ριζικού συστήματος άγριου τύπου (wt), (2) Δείγμα βακτηριακών κυττάρων *A. rhizogenes*, (3), (4) και (5) Δείγματα ρίζας από σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000.

Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα της PCR σχετικά με τον ενίσχυση της αλληλουχίας *virCD* του *A. rhizogenes* έδειξαν ότι δεν υπήρχε παρουσία υπολειμμάτων του βακτηρίου στις ρίζες των μετασχηματισμένων φυτών. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία *virCD* εντοπίστηκε μόνο στο δείγμα-μάρτυρα που περιείχε κύτταρα *A. rhizogenes* και σε κανένα δείγμα μετασχηματισμένων ριζών (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων της PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας *virCD*: (1) Δείγμα ρίζας από φυτό-μάρτυρα με διαμόρφωση ριζικού συστήματος άγριου τύπου (wt), (2) Δείγμα βακτηριακών κυττάρων *A. rhizogenes*, (3), (4) και (5) Δείγματα ρίζας από σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000.

3.4 Επίδραση βακτηριακού στελέχους, συχνότητα μετασχηματισμού.

Σύμφωνα με τα συνολικά αποτελέσματα από τις φαινοτυπικές αξιολογήσεις και την επαλήθευση του γενετικού μετασχηματισμού με PCR, το στέλεχος R1000 του βακτηρίου *A. rhizogenes* αναδείχθηκε ως κατάλληλο για την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών στο είδος *A. belladonna*. Πέραν της επαλήθευσης της διαγονιδιακής φύσης των ριζών που αναπτύχθηκαν, έπειτα από εμβολιασμό των σποροφύτων στο ύψος του υποκοτυλίου, οι διαφορές μεταξύ των εμβολιασμένων και των σποροφύτων αγρίου τύπου αφορούσαν σε αλλαγές στη δομή, στη μορφολογία, στη βιομάζα και στον αριθμό των πλευρικών ριζών. Στον Πίνακα 3.1 περιγράφεται ο χρόνος εμφάνισης των διαγονιδιακών ριζών και η συχνότητα μετασχηματισμού, η οποία υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό των εκφύτων που ανέπτυξαν διαγονιδιακές ρίζες.

Πίνακας 3.1 Η επίδραση του βακτηριακού στελέχους R1000 του *A. rhizogenes* σε έκφυτα του είδους *Atropa belladonna*.

Αθροισμα εκφύτων	Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών (dpt)	Συχνότητα μετασχηματισμού (%)*	M.O. (S)	PCR
15	14 ± 1	66%	30	+

*Ποσοστό μετασχηματισμού (%) = αριθμός εκφύτων με ριζικά τριχίδια / συνολικός αριθμός εκφύτων (x) 100.

Βάσει των συνολικών αποτελεσμάτων της μελέτης αναφορικά με την επίδραση του βακτηριακού στελέχους R1000 ως προς ικανότητα επαγωγής διαγονιδιακών ριζών, προτείνεται η μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού του είδους *A. belladonna*.

Πίνακας 3.4.2 Προτεινόμενη μεθοδολογία για την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στο είδος *Atropa belladonna*.

Ημέρα	Διαδικασία	Θρεπτικά υποστρώματα
1-3	- Απολύμανση σπόρων - Τοποθέτηση σπόρων σε υπόστρωμα βλάστησης (A)	<u>Υπόστρωμα βλάστησης (A)</u> Sucrose, 10 g/L Agar, 5 g/L MS vitamins, 2.2 g/L

3-7	Προετοιμασία των βακτηριακών καλλιεργειών (εμβόλιο)	<u>Θρεπτικό μέσο LB</u> στρεπτομυκίνη, 25 μgml^{-1} ναλιδιξικό οξύ, 50 μgml^{-1}
7	Προετοιμασία εμβολίου για μετασχηματισμό	<u>Θρεπτικό μέσο MS</u> Sucrose, 30 g/L MS/vitamins, 4,4 g/L Ακετοσυριγκόνη, 100 μM
7-9	Μετασχηματισμός με το στέλεχος <i>R1000</i> και τοποθέτηση εκφύτων σε υπόστρωμα συν-καλλιέργειας (B)	<u>Υπόστρωμα συν-καλλιέργειας (B)</u> Sucrose, 10 g/L Agar, 5 g/L MS/vitamins, 2.2 g/L Ακετοσυριγκόνη, 100 μM
9-23	Μεταφορά εκφύτων σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών (Γ)	<u>Υπόστρωμα επαγωγής ριζών (Γ)</u> Sucrose, 10 g/L Agar, 5 g/L MS/vitamins, 2.2 g/L Σεφοταξίμη, 250 mg/L
23-40	Μεταφορά των σποροφύτων σε φρέσκο υπόστρωμα επαγωγής ριζών (Γ)	<u>Υπόστρωμα επαγωγής ριζών (Γ)</u> Sucrose, 10 g/L Agar, 5 g/L MS vitamins, 2.2 g/L Σεφοταξίμη, 250 mg/L
40	Τελική αποτίμηση για την συχνότητα μετασχηματισμού: μέτρηση ριζών, φαινοτυπικές παρατηρήσεις και έλεγχος με PCR για την ένθεση της μεταφερόμενης περιοχής στο φυτικό γονιδίωμα	

4. Συζήτηση

Το είδος *Atropa belladonna* αποτελεί αντικείμενο ερευνών εδώ και δεκαετίες, κυρίως λόγω της ικανότητας σύνθεσης πολύτιμων μεταβολιτών με φαρμακευτική αξία. Παρά την ευρεία αξιοποίηση των φαρμακευτικών ενώσεων σε ποικίλες εφαρμογές της βιομηχανίας, αναφέρεται η έλλειψη αποτελεσματικών και επαναλήψιμων πρωτοκόλλων που επιτρέπουν τη μέγιστη αξιοποίηση του είδους. Ωστόσο, ολοένα και περισσότερες μελέτες μετατοπίζουν την έμφαση στην ανάπτυξη μεθοδολογιών που επιτρέπουν την ευχερή δημιουργία καλλιεργειών ριζών ή/και την αύξηση της βιομάζας τους, με απώτερο σκοπό την αυξημένη παραγωγή των φαρμακευτικών ενώσεων ενδιαφέροντος. Για το σκοπό αυτό, έχει διερευνηθεί η δυνατότητα ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών, οι οποίες αναπτύσσονται μέσω γενετικού μετασχηματισμού με βακτηριακά στελέχη του είδους *Agrobacterium rhizogenes*, τα οποία χαρακτηρίζονται από τεράστια ποικιλομορφία πλασμιδίων και εν γένει ικανότητας επαγωγής ριζογένεσης.

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία εφαρμόστηκε γενετικός μετασχηματισμός του είδους *A. belladonna* με τη χρήση του στελέχους R1000 του *A. rhizogenes*. Η επιλογή του στελέχους βασίστηκε πρωτίστως στην αποδεδειγμένη ικανότητά του να επάγει ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών, λόγω της υψηλής μολυσματικής δράσης του, σε ένα μεγάλο εύρος φυτικών ειδών, όπως το τεύτλο (Pavli & Skaracis, 2010), η φακή (Foti & Pavli, 2020), το αγγούρι (Sahayarayan et al., 2020), η σόγια (Niazian et al., 2023), η γεντιανή (Tiwari et al., 2007), το ριζάρι (Doranie et al., 2023), κ.α. Επίσης, η επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους έγκειται στο γεγονός ότι, εξ όσων γνωρίζουμε, δεν έχει τύχει μελέτης ως προς την ικανότητα ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών στο είδος *A. belladonna*.

Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του είδους *A. belladonna*, μέσω εμβολιασμού σποροφύτων ηλικίας 7-ημερών με το βακτηριακό στέλεχος R1000 στην περιοχή του υποκοτυλίου. Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με προηγούμενες αναφορές που υπογραμμίζουν την ικανότητα του στελέχους R1000 να επάγει τη δημιουργία διαγονιδιακών ριζών. Συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός των σποροφύτων οδήγησε σε ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών, οι οποίες διέφεραν φαινοτυπικά από τις αντίστοιχες του αγρίου τύπου ως προς τη δομή, τη μορφολογία, την συνολική ποσότητα βιομάζας και τον αριθμό των πλευρικών ριζών.

Παράλληλα, στις ρίζες που αναπτύχθηκαν στα μετασχηματισμένα σπορόφυτα διαπιστώθηκε η επιτυχής ενσωμάτωση του γονιδίου *rolB2*, που αποδεικνύει τη διαγονιδιακή τους φύση. Πιο αναλυτικά, το πλασμίδιο του *A. rhizogenes* μεταφέρει δυο ανεξάρτητα DNA, τα TL-

DNA και TR-DNA. Στο T-DNA εμπεριέχονται και μεταφέρονται γονίδια επαγωγής τριχωτών ριζών, τα ογκογόνα γονίδια (*rol*) (*rolA*, *rolB*, *rolC*) καθώς και γονίδια άγνωστης λειτουργίας (ORF3n, ORF8, ORF13) (Britton et al., 2008b). Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε η παρουσία του *rolB2* εξακριβώνοντας τον επιτυχή μετασχηματισμό των σποροφύτων. Επίσης, η ανάλυση κατέδειξε την απουσία της βακτηριακής αλληλουχίας *virCD*, γεγονός που εξαλείφει την πιθανότητα υπολειμματικής παρουσίας του βακτηρίου στις ρίζες των μετασχηματισμένων φυτών.

Στο πλαίσιο βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *A. belladonna*, αναδεικνύεται επίσης η σημασία της σύστασης των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα στάδια του μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη θετική επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης σουκρόζης (3 %), η οποία φαίνεται να επιδρά θετικά στην ανάπτυξη του βακτηρίου αλλά και στη βιομάζα του ριζικού συστήματος (Yeo et al., 2023). Σύμφωνα με τους Xi et al. (2018), η παρουσία της ακετοσυριγγόνης, προάγει την ικανότητα μετασχηματισμού καθώς χρησιμοποιείται από το εισβάλλον *Agrobacterium* για τροφή και παράλληλα επάγει την έκφραση των γονιδίων *vir*, διευκολύνοντας την μεταφορά T-DNA (Veluthambi et al., 1989; Xi et al., 2018). Οι αναφορές αυτές συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου διαπιστώθηκε η υψηλής συχνότητα μετασχηματισμού (66 %). Τέλος, η χρήση του MES (ethanesulfonic acid (MES) sodium salts) υπήρξε επίσης καθοριστικής σημασίας καθώς αποτελεί επιλεκτικό παράγοντα εξισορρόπησης του pH των υποστρωμάτων, συμβάλλοντας στη μείωση της όξυνσης των θρεπτικών μέσων και, κατ' επέκταση, στην έμμεση ενίσχυση της συχνότητας μετασχηματισμού με τη χρήση βακτηριακών φορέων που ανήκουν στο γένος *Agrobacterium* (Foti & Pavli, 2020).

5. Συμπεράσματα

Τα συνολικά ευρήματα της μελέτης επιβεβαιώνουν την καταλληλότητα του βακτηριακού στελέχους R1000 του *A. rhizogenes* ως φορέα για το γενετικό μετασχηματισμό του είδους *A. belladonna*, όπως προκύπτει από την ικανότητα ευχερούς ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών με τη μέθοδο του εμβολιασμού των σποροφύτων στην περιοχή του υποκοτυλίου. Αναφορικά με τους παράγοντες που συμβάλλουν στη επιτυχία του μετασχηματισμού, υπογραμμίζεται η θετική επίδραση της αυξημένης ποσότητας σουκρόζης στο σύνολο των θρεπτικών υποστρωμάτων καθώς και της παρουσίας ακετοσυριγγόνης και MES στο μέσο του εμβολιασμού και στο θρεπτικό υπόστρωμα συνκαλλιέργειας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνεισφέρουν στις διαδικασίες γενετικού μετασχηματισμού του είδους *A. belladonna*, συμβάλλοντας έμμεσα στις προοπτικές αξιοποίησης των διαγονιδιακών ριζών με στόχο την αυξημένη παραγωγή αλκαλοειδών που συνθέτει το συγκεκριμένο είδος. Προς την κατεύθυνση αυτή, οι διαγονιδιακές ρίζες μπορούν να αξιοποιηθούν σε μελέτες που εστιάζουν στην ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση του περιεχομένου τους σε δευτερογενείς μεταβολίτες ενδιαφέροντος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aehle, E., & Dräger, B. (2010). Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update. *Journal of Chromatography B*, 878(17–18), 1391–1406. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.007>
- Al-Ashaal, H. A., Aboutabl, M. E., Maklad, Y. A., & Ahmed, A. (2013). *Tropane alkaloids of Atropa belladonna L.: In vitro: Production and pharmacological profile.*, *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 12(2), 130–135.
- Awuchi, & Chinaza Godswill. (2019). Medicinal plants: The medical, food, and nutritional biochemistry and uses. *International Journal of Advanced Academic Research*, 5(11), 220–222.
- Baenziger, P. S., Russell, W. K., Graef, G. L., & Campbell, B. T. (2006). Improving Lives: 50 Years of Crop Breeding, Genetics, and Cytology (C-1). *Crop Science*, 46(5), 2230–2244. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.11.0404gas>
- Bai, F., Li, S., Yang, C., Zhao, T., Zhang, T., Lan, X., Chen, M., & Liao, Z. (2019). Overexpression of the AbSAUR1 gene enhanced biomass production and alkaloid yield in *Atropa belladonna*. *Industrial Crops and Products*, 140, 111705. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111705>
- Bajaj, Y. P. S., & Liisa, K. S. (1991). *Atropa belladonna L.: In vitro culture, regeneration of plants, cryopreservation, and the production of tropane alkaloids.* In *Medicinal and aromatic plants III* (pp. 1–23). Springer Berlin Heidelberg New York.
- Baricevic, D., Mathe, A., & Bartol, T. (2015). Chapter 7 Conservation of Wild Crafted Medicinal and Aromatic Plants and Their Habitats. In *Medicinal and Aromatic Plants of the World: Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects* (Vol. 1, pp. 131–143). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9810-5>
- Baricevic, D., Umek, A., Kreft, S., Maticic, B., & Zupancic, A. (1999). Effect of water stress and nitrogen fertilization on the content of hyoscyamine and scopolamine in the roots of deadly nightshade (*Atropa belladonna*). *Environmental and Experimental Botany*, 42(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(99)00014-3)
- Baron, C., & Zambryski, P. C. (1996). Plant transformation: A pilus in *Agrobacterium* T-DNA transfer. *Current Biology*, 6(12), 1567–1569. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)70773-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)70773-2)

- Bechtold, T., Turcanu, A., Ganglberger, E., & Geissler, S. (2003). Natural dyes in modern textile dyehouses—How to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future? *Journal of Cleaner Production*, 11(5), 499–509. [https://doi.org/10.1016/S0959-6526\(02\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S0959-6526(02)00077-X)
- Becker, H. (1993). Pflanzenzüchtung. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer. *Plant Genetic Resources*, 2(1), 3–21.
- Berdai, M. A., Labib, S., Chetouani, K., & Harandou, M. (2012). Case report-Atropa Belladonna intoxication: A case report. *Pan African Medical Journal*, 11(1), 1–4.
- Binns, A. N., & Costantino, P. (1998). *The Agrobacterium Oncogenes*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82976135>
- Brewer, W., & Hiner, L. D. (1950). Cultivation studies of the solanaceous drugs. II. The effect of nutritional and soil reaction fertilizers on the production yields and total alkaloidal content of atropa belladonna and hyoscyamus niger. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 39(10), 586–591.
- Britton, M. T., Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2008a). The Oncogenes of Agrobacterium Tumefaciens and Agrobacterium Rhizogenes. In T. Tzfira & V. Citovsky (Eds.), *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology* (pp. 523–563). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72290-0_14
- Britton, M. T., Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2008b). The Oncogenes of Agrobacterium Tumefaciens and Agrobacterium Rhizogenes. In T. Tzfira & V. Citovsky (Eds.), *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology* (pp. 523–563). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72290-0_14
- Butcher, R. W. (1947). Atropa Belladonna L. *The Journal of Ecology*, 34(2), 345. <https://doi.org/10.2307/2256722>
- Çaksen, H., Odabaş, D., Akbayram, S., Cesur, Y., Arslan, Ş., Üner, A., & Öner, A. F. (2003). Deadly nightshade (Atropa belladonna) intoxication: An analysis of 49 children. *Human & Experimental Toxicology*, 22(12), 665–668. <https://doi.org/10.1191/0960327103ht404oa>
- Campbell, E. A. (2007). “Don’t Say It with Nightshades: Sentimental Botany and the Natural History of ‘Atropa Belladonna.’” *Victorian Literature and Culture*, vol.35, no.2. <http://www.jstor.org/stable/40347177>.
- Caputi, L., & Aprea, E. (2011). *Use of Terpenoids as Natural Flavouring Compounds in Food Industry. Volume 3, Number 1*, 9-16(8).

- Carrubba, A., & Scalenghe, R. (2012). The scent of *Mare Nostrum*: Medicinal and aromatic plants in Mediterranean soils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1150–1170. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5630>
- Chase, J., & Leibold, M. (2003). *Ecological niche: Linking classical and contemporary approaches*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Childs, N. M. (2009). . “27 Marketing and Regulatory Issues for Functional Foods and Nutraceuticals.” In *Handbook of nutraceuticals and functional foods* (2nd ed., pp. 503–516). CRC Press, Boca Raton.
- Christey, M. C. (2001). Use of ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(6), 687–700. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0120-0>
- Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Kevin Lutke, W., & Taylor, C. G. (2005). *Ex vitro* composite plants: An inexpensive, rapid method for root biology. *The Plant Journal*, 43(3), 449–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02454.x>
- Copping, L. G., & Duke, S. O. (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, 63(6), 524–554. <https://doi.org/10.1002/ps.1378>
- Cromwell, B. T. (1943). Studies on the synthesis of hyoscyamine in *Atropa belladonna* L. and *Datura stramonium* L. *Biochemical Journal*, 37(6), 717–722. <https://doi.org/10.1042/bj0370717>
- Cucu, N., Tenea, G., & Gavrilă, L. (2003). Transfer and Expression of Marker (*nptII*) and Reporter (*gus*) Genes in *Atropa Belladonna* Plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17(1), 143–148. <https://doi.org/10.1080/13102818.2003.10819210>
- Dajic Stevanovic, P. Z., Acic, B. S., & Petrovic, S. M. (2012). Conservation of diversity of medicinal and aromatic plants in Southeast Europe: Current state and future challenges. Proceedings of the 7th conference on medicinal and aromatic plants of Southeast European countries, 27–31 May, Subotica, R. of Serbia, 4–13. *Proceedings of the 7th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*, 4–13.
- Dajic-Stevanovic, Z., & Pljevljakusic, D. (2015). Chapter 8 Challenges and Decision Making in Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants Zora Dajic-Stevanovic and Dejan Pljevljakusic. In *Medicinal and Aromatic Plants of the World: Scientific, Production,*

- Commercial and Utilization Aspects* (Vol. 1, pp. 143–165). Springer Netherlands.
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-9810-5>
- Davioud, E., Petit, A., Tate, M. E., Ryder, M. H., & Tempé, J. (1988). Cucumopine—A new T-DNA-encoded opine in hairy root and crown gall. *Phytochemistry*, 27(8), 2429–2433.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)87007-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)87007-9)
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022–4034.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>
- De Cleene, M., & De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42(4), 389–466. <https://doi.org/10.1007/BF02860827>
- Delgado Laime, M. D. C. (2023). The relationship between cadmium pollution, soil biology, and *Atropa belladonna* growth. *Anthropogenic Pollution*, 7(2), 1–20.
<https://doi.org/10.57647/j.jap.2023.0702.17>
- Doranie, E., Honarmand, O., & Valizadeh, M. (2023). Effects of explant type and *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and alizarin production in madder (*Rubia tinctorum* Ardakan). *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, Online First*.
<https://doi.org/10.30479/ijgpb.2023.19535.1361>
- Drewes, F. E., & Van Staden, J. (1995). Initiation of and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum mauritianum* Scop. *Plant Growth Regulation*, 17(1), 27–31.
<https://doi.org/10.1007/BF00024491>
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P. M., & Sánchez, F. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* Transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 19(12), 1385–1393. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1385>
- FAO. (1996b). *Global Plan of Action for the Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources and the Leipzig Declaration, adopted by the International Technical Conference on Plant Genetic Resources, Leipzig, Germany, 17–23 June 1996*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. (1996a). *The State of the world's plant genetic resources for food and agriculture: Background documentation prepared for the International Technical Conference on Plant*

- Genetic Resources, Leipzig, Germany 17-23 June 1996*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farnsworth, N. R. (1979). “*Present and future of pharmacognosy.*” *Plantes medicinales et phytotherapie*.
- Farooqi, A. A., & Sreeramu, B. S. (2004). *Cultivation of Medicinal and Aromatic Crops* (Revised Edition). Universities Press(India) Private Limited.
- Fatemeh Ashtiania. (2011). Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miers plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(29). <https://doi.org/10.5897/JMPR11.482>
- Filetici, P., Spano, L., & Costantino, P. (1987). Conserved regions in the T-DNA of different *Agrobacterium rhizogenes* root-inducing plasmids. *Plant Molecular Biology*, 9(1), 19–26. <https://doi.org/10.1007/BF00017983>
- Foti, C., & Pavli, O. I. (2020). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root induction of *Lens culinaris*. *Agronomy*, 10(8), 1170.
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1175–1185. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5>
- Giri, A., Giri, C. C., Dhingra, V., & Narasu, M. L. (2001). Enhanced Podophyllotoxin Production from *Agrobacterium Rhizogenes* Transformed Cultures of *Podophyllum Hexandrum*. *Natural Product Letters*, 15(4), 229–235. <https://doi.org/10.1080/10575630108041286>
- Godara, R., Katoch, M., Katoch, R., Yadav, A., Parveen, S., Vij, B., Khajuria, V., Singh, G., & Singh, N. K. (2014). In Vitro Acaricidal Activity of *Atropa belladonna* and Its Components, Scopolamine and Atropine, against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/713170>
- Halberstein, R. A. (2005). Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Annals of Epidemiology*, 15(9), 686–699. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.02.004>
- Han, K.-H., Keathley, D. E., Davis, J. M., & Gordon, M. P. (1993). Regeneration of a transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L., black locust) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Plant Science*, 88(2), 149–157. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90086-F](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90086-F)

- Hansen, J., Jorgensen, J.-E., Stougaard, J., & Marcker, K. A. (1989). Hairy roots—A short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Reports*, 8(1), 12–15. <https://doi.org/10.1007/BF00735768>
- Hashimoto, T., Yun, D.-J., & Yamada, Y. (1993a). Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochemistry*, 32(3), 713–718. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95159-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95159-8)
- Hashimoto, T., Yun, D.-J., & Yamada, Y. (1993b). Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochemistry*, 32(3), Article 3. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95159-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95159-8)
- Hausmann, B. I. G., Parzies, H. K., Prestel, T., Su?i?, Z., & Miedaner, T. (2004). Plant genetic resources in crop improvement. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 2(1), 3–21. <https://doi.org/10.1079/PGR200430>
- Holmes, B. (1988). TAXONOMY OF AGROBACTERIUM. *Acta Horticulturae*, 225, 47–52. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.225.4>
- Hu, Z.-B., & Du, M. (2006). Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(2), 121–127. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00121.x>
- Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H., & Suzuki, A. (1988). Structure of a new opine, mikimopine, in hairy root induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(12), 3235–3237. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.52.3235>
- James, G. (1947). Effects of manuring on growth and alkaloid content of medicinal plants. *Economic Botany*, 230–237.
- Jaziri, M., Yoshimatsu, K., Homès, J., & Shimomura, K. (1994). Traits of transgenic *Atropa belladonna* doubly transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 257–262.
- Jaziri, M., Yoshimatsu, K., & Shimomura, K. (1999). Genetic Transformation of *Atropa belladonna*. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Transgenic Medicinal Plants* (Vol. 45, pp. 73–87). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58439-8_5
- Joseph Sahayarayan, J., Udayakumar, R., Arun, M., Ganapathi, A., Alwahibi, M. S., Aldosari, N. S., & Morgan, A. M. A. (2020). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains for in-vitro hairy root induction, total phenolic, flavonoids contents, antibacterial and

- antioxidant activity of (*Cucumis anguria* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), Article 11. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.050>
- Jung, G., & Tepfer, D. (1987). Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown in vitro. *Plant Science*, 50(2), 145–151.
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H., & Shimomura, K. (1986). Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports*, 5(4), 239–242. <https://doi.org/10.1007/BF00269811>
- Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C. D., Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., & Gresshoff, P. M. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols*, 2(4), 948–952. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.141>
- Kerstens, K., De Ley, J., Sneath, P. H. A., & Sackin, M. (1973). Numerical Taxonomic Analysis of *Agrobacterium*. *Journal of General Microbiology*, 78(2), 227–239. <https://doi.org/10.1099/00221287-78-2-227>
- Klee, H., Montoya, A., Horodyski, F., Lichtenstein, C., Garfinkel, D., Fuller, S., Flores, C., Peschon, J., Nester, E., & Gordon, M. (1984). Nucleotide sequence of the tms genes of the pTiA6NC octopine Ti plasmid: Two gene products involved in plant tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(6), 1728–1732. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.6.1728>
- Klimis, G. (2009). Medicinal Herbs and Plants in Homer. In S. A. Paipetis (Ed.), *Science and Technology in Homeric Epics* (Vol. 6, pp. 283–291). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8784-4_21
- Królicka, A., Staniszevska, I., Bielawski, K., Maliński, E., Szafranek, J., & Łojkowska, E. (2001). Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Science*, 160(2), 259–264. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00381-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00381-2)
- Kumagai, H., & Kouchi, H. (2003). Gene Silencing by Expression of Hairpin RNA in *Lotus japonicus* Roots and Root Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 16(8), 663–668. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.8.663>
- Kurioka, Y., Suzuki, Y., Kamada, H., & Harada, H. (1992). Promotion of flowering and morphological alterations in *Atropa belladonna* transformed with a CaMV 35S-rolC chimeric gene of the Ri plasmid. *Plant Cell Reports*, 12, 1–6.

- Lawrence, R. J., & Pikaard, C. S. (2003). Transgene-induced RNA interference: A strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations. *The Plant Journal*, 36(1), 114–121. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2003.01857.x>
- Limpens, E. (2004). RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 55(399), 983–992. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh122>
- Loudon, I. (1998). Old and Rare Books on Materia Medica in the Library of the Swedish Pharmaceutical Society. *Journal of the History of Collections*, 10(1), 118–119. <https://doi.org/10.1093/jhc/10.1.118>
- Lubbe, A., & Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 785–801. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.019>
- Malik, M., Hussain, S., Sajjad, N., Gondal, M. U., & Arshad, J. (2021). Physicochemical analysis, qualitative and quantitative investigation of atropine in medicinal plant *Atropa belladonna*. *EJPMR*, 8(5), 149–157.
- Mankin, S. L., Hill, D. S., Olhoft, P. M., Toren, E., Wenck, A. R., Nea, L., Xing, L., Brown, J. A., Fu, H., Ireland, L., Jia, H., Hillebrand, H., Jones, T., & Song, H.-S. (2007). Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPB2659) plasmid pRi2659. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(6), 521–535. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9071-4>
- Mathews, H., Bharathan, N., Litz, R., Narayanan, K., Rao, P., & Bhatia, C. (1990). The promotion of *Agrobacterium* mediated transformation in *Atropa belladonna* L. by acetosyringone. *Journal of Plant Physiology*, 136(4), 404–409.
- Miraldi, E., & Bains, G. (2019). MEDICINAL PLANTS AND HEALTH IN HUMAN HISTORY: FROM EMPIRICAL USE TO MODERN PHYTOTHERAPY. *Journal of the Siena Academy of Sciences*, 10(1). <https://doi.org/10.4081/jsas.2018.8529>
- Mmereke, K. M., Venkataraman, S., Moiketsi, B. N., Khan, M. R., Hassan, S. H., Rantong, G., Masisi, K., Kwape, T. E., Gaobotse, G., Zulfiqar, F., Kumar Sharma, S., Malik, S., & Makhzoum, A. (2024). Nanoparticle elicitation: A promising strategy to modulate the production of bioactive compounds in hairy roots. *Food Research International*, 178, 113910. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113910>

- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S. N., Kataoka, M., Tanaka, N., & Yoshida, K. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in rhizobiaceae. Edited by N.-H. Chua. *Journal of Molecular Biology*, 307(3), 771–784. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4488>
- Mothes, K. (1955). Physiology of alkaloids. *Annual Review of Plant Physiology*, 6(1), 393–432.
- MR Lee. (2007). *Solanaceae IV: Atropa belladonna, Deadly Nightshade*. 37(1), 77–84.
- N. H. Aboelsoud. (2010). Herbal medicine in ancient Egypt. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 82–86. <https://doi.org/10.5897/JMPR09.013>
- Nejadhabibvash, F., Rahmani, F., Heidari, R., Jamei, R., & Azimi, F. (2012). Study of inheritance and environment on tropane alkaloids within “hyoscyamus” species. *Australian Journal of Crop Science*, 6(10), 1428–1434.
- Niazian, M., Belzile, F., Curtin, S. J., De Ronne, M., & Torkamaneh, D. (2023). Optimization of in vitro and ex vitro *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of soybean for visual screening of transformants using RUBY. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1207762. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1207762>
- Nilsson, O., & Olsson, O. (1997). Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 463–473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03050.x>
- Norman R. Farnsworth, & Djaja D. Soejarto. (1991). Global Importance of Medicinal Plants. In *The Conservation of medicinal plants* (pp. 25–30). Cambridge University Press.
- Nunn JF. (1996). *Ancient Egyptian Medicine*. Norman, OK: University of Oklahoma Press.
- Ondřej, M., Matoušek, J., & Vlasak, J. (1987). Differentiation of transformed plants from tumors induced by *Agrobacterium rubi* ATCC 13335. *Journal of Plant Physiology*, 126(4–5), 397–407.
- Ondřej, M., & Protiva, J. (1987). In vitro culture of crown gall and hairy root tumors of *Atropa belladonna*: Differentiation and alkaloid production. *Biologia Plantarum*, 29(4), 241–246.
- Ondřej, M., & Vlasak, J. (1987). Expression of Kanamycin resistance introduced by *Agrobacterium* binary vector into *Nicotiana tabacum* and *Atropa belladonna*. *Biologia Plantarum*, 29(3), 161–166.

- Pavli, O. I., & Skaracis, G. N. (2010). Fast and efficient genetic transformation of sugar beet by *Agrobacterium rhizogenes*. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.98>
- Pavli, O.I., Panopoulos, N.J., Goldbach, R., Skaracis, G.N. (2010). BNYVV-derived dsRNA confers resistance to rhizomania disease of sugar beet as evidenced by a novel transgenic hairy root approach. *Transgenic Res.* 19(5): 915-22. doi: 10.1007/s11248-010-9364-y.
- Petil, A., Delhay, S., Tenipc, J., & Morel, G. (1970). *Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en evidence d'une relation biochimique specifique entre le souches d'Agrobacterium tumefaciens et les tumeurs qu'elles induisent* *Physiol, Veg.* 8: 205. *Physiol, Veg.* 8, 205.
- Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
- Porter, J. R., & Flores, H. (1991). Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(4), 387–421. <https://doi.org/10.1080/07352689109382318>
- Rangarajan, M. (2008). Environmental Issues in India: A Reader. *Conservation and Society*, 6(3), 183–194.
- Saito, K., Yamazaki, M., Anzai, H., Yoneyama, K., & Murakoshi, I. (1992). Transgenic herbicide-resistant *Atropa belladonna* using an Ri binary vector and inheritance of the transgenic trait. *Plant Cell Reports*, 11, 219–224.
- Sakakibara, H., Kasahara, H., Ueda, N., Kojima, M., Takei, K., Hishiyama, S., Asami, T., Okada, K., Kamiya, Y., Yamaya, T., & Yamaguchi, S. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(28), 9972–9977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500793102>
- Schlegel, R. H. J. (2018). *History of plant breeding*. CRC Press. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282271218344832>
- Seki, H., Nishizawa, T., Tanaka, N., Niwa, Y., Yoshida, S., & Muranaka, T. (2005). Hairy Root-activation Tagging: A High-throughput System for Activation Tagging in Transformed Hairy Roots. *Plant Molecular Biology*, 59(5), 793–807. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-1008-x>

- Sharp, J. M., & Doran, P. M. (1990). Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Biotechnology*, 16(3–4), 171–185.
- Sofowora, A., Ogunbodede, E., & Onayade, A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(5), 210–229. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2>
- Southgate, H. J., Egerton, M., & Dauncey, E. A. (2000). Lessons to be learned: A case study approach: Unseasonal severe poisoning of two adults by deadly nightshade (*Atropa belladonna*). *Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 120(2), 127–130. <https://doi.org/10.1177/146642400012000212>
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2007). Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 29–43. <https://doi.org/10.1080/07388550601173918>
- Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science*, 12(7), 282–285. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.006>
- Subroto, M. A., Hamill, J. D., & Doran, P. M. (1996). Development of shooty teratomas from several solanaceous plants: Growth kinetics, stoichiometry and alkaloid production. *Journal of Biotechnology*, 45(1), 45–57.
- Subroto, M. A., Kwok, K. H., Hamill, J. D., & Doran, P. M. (1996). Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(5), 481–494.
- Tanksley, S. D., & McCouch, S. R. (1997). Seed Banks and Molecular Maps: Unlocking Genetic Potential from the Wild. *Science*, 277(5329), 1063–1066. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1063>
- Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37(3), 959–967. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90430-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90430-6)
- Tepfer, D., & Tempé, J. (1981). *Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'Agrobacterium rhizogenes, souche A4.*
- Tepfer, M., & Casse-Delbart, F. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiol Sci*, 4(1), 24–28. PubMed.

- Tiwari, R. K., Trivedi, M., Guang, Z. C., Guo, G.-Q., & Zheng, G.-C. (2007). Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: Growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 26(2), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0236-0>
- Touno, K., Yoshimatsu, K., & Shimomura, K. (2006). Characteristics of *Atropa belladonna* hairy roots cryopreserved by vitrification method. *Cryo-Letters*, 27(2), 65–72. Scopus.
- Tsung-Ming Shih, Tami C. Rowland, & John H. McDonough. (2007). Anticonvulsants for Nerve Agent-Induced Seizures: The Influence of the Therapeutic Dose of Atropine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(1), 154. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111252>
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007a). *Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(5), Article 5. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8>
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007b). *Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(5), 383–403. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8>
- Veluthambi, K., Krishnan, M., Gould, J. H., Smith, R. H., & Gelvin, S. B. (1989). Opines stimulate induction of the vir genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of Bacteriology*, 171(7), 3696–3703. <https://doi.org/10.1128/jb.171.7.3696-3703.1989>
- Verpoorte, R., & Schripsema, J. (1994). Isolation, Identification, and Structure Elucidation of Alkaloids A General Overview. In H. F. Linskens & J. F. Jackson (Eds.), *Alkaloids* (Vol. 15, pp. 1–24). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84226-9_1
- Vines, G. (2004). Herbal harvests with a future: Towards sustainable sources for medicinal plants. *Plantlife International*. www.plantlife.org.uk
- Wang, X., Chen, M., Yang, C., Liu, X., Zhang, L., Lan, X., Tang, K., & Liao, Z. (2011). Enhancing the scopolamine production in transgenic plants of *Atropa belladonna* by overexpressing *pmt* and *h6h* genes. *Physiologia Plantarum*, 143(4), 309–315. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01506.x>
- Waterhouse, P. M., & Helliwell, C. A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 4(1), 29–38. <https://doi.org/10.1038/nrg982>
- Waterman, P. G. (1993). Alkaloids: General observations. *Methods in Plant Biochemistry*, 8(1–1).

- Weller, S. A., Stead, D. E., & Young, J. P. W. (2004). Acquisition of an *Agrobacterium* Ri Plasmid and Pathogenicity by Other α - *Proteobacteria* in Cucumber and Tomato Crops Affected by Root Mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2779–2785. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2779-2785.2004>
- Weller, S. A., Stead, D. E., & Young, J. P. W. (2006). Recurrent outbreaks of root mat in cucumber and tomato are associated with a monomorphic, cucumopine, Ri-plasmid harboured by various Alphaproteobacteria: Recurrent outbreaks of root mat in cucumber and tomato. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), 136–143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00214.x>
- Weller, Stead, O’neill, Hargreaves, & McPherson. (2000). Rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 and cucumber root mat in the UK. *Plant Pathology*, 49(1), 43–50. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00428.x>
- Wildman, R. E. C., & Kelley, M. (2007). *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. (Second Edition). CRC Press, Boca Raton.
- Wimmler, J. (2017). *The Sun King’s Atlantic: Drugs, Demons and Dyestuffs in the Atlantic World, 1640 - 1730*. BRILL. <https://doi.org/10.1163/9789004336087>
- Xi, J., Patel, M., Dong, S., Que, Q., & Qu, R. (2018). Acetosyringone treatment duration affects large T-DNA molecule transfer to rice callus. *BMC Biotechnology*, 18(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0459-5>
- Xia, K., Liu, X., Zhang, Q., Qiang, W., Guo, J., Lan, X., Chen, M., & Liao, Z. (2016). Promoting scopolamine biosynthesis in transgenic *Atropa belladonna* plants with pmt and h6h overexpression under field conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.034>
- Yeo, H. J., Kwon, M. J., Han, S. Y., Jeong, J. C., Kim, C. Y., Park, S. U., & Park, C. H. (2023). Effects of Carbohydrates on Rosmarinic Acid Production and In Vitro Antimicrobial Activities in Hairy Root Cultures of *Agastache rugosa*. *Plants*, 12(4), 797. <https://doi.org/10.3390/plants12040797>
- Yoshimatsu, K., Jaziri, M., Kamada, H., & Shimomura, K. (1997). Production of diploid and haploid transgenic *Atropa belladonna* plants: Morphological traits and tropane alkaloid production. *Belgian Journal of Botany*, 38–46.

- Yun, D.-J., Hashimoto, T., & Yamada, Y. (1992). Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24), 11799–11803.
- Zeng, L., Zhang, Q., Jiang, C., Zheng, Y., Zuo, Y., Qin, J., Liao, Z., & Deng, H. (2021). Development of *Atropa belladonna* L. Plants with High-Yield Hyoscyamine and without Its Derivatives Using the CRISPR/Cas9 System. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1731. <https://doi.org/10.3390/ijms22041731>
- Zucconi, L. M. (2007). Medicine and Religion in Ancient Egypt: Medicine and Religion in Ancient Egypt. *Religion Compass*, 1(1), 26–37. <https://doi.org/10.1111/j.1749-8171.2006.00004.x>

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ηλιόπουλος, Γ. Ζ., Πουλάς, Κ., Πατρινός, Γ. Π., & Καμπούρης, Μ. Ε. (2013). Η εξέλιξη της αρχαιοελληνικής Ιατρικής ως επιστήμης και ως λειτουργήματος Μια έρευνα των πηγών. *Athens Medical Society*, 30(5), 619–626.
- Τζάμος, Ε. Κ. (2007). *ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ* (Vol. 2). Σταμούλης Α.Ε.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Πηγή: [Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων](#)

Πηγή: <https://www.medchemexpress.com>

Πηγή: <https://www.sanbi.org>

Πηγή: <https://www.plantdiseases.org>

ΠΗΓΗ: <https://www.pharmasaat.de/index.html>