

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

« Ετερόλογη έκφραση του μονοπατιού βιοσύνθεσης των βηταλαϊνών στις ρίζες του ψυχανθούς *Lotus japonicus* »

“Heterologous expression of the betalain biosynthetic pathway in *Lotus japonicus* hairy roots ”



Μπάη Ιωάννα

Λάρισα, 2017

### Τριμελής Επιτροπή

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών)
2. Καρπούζας Δημήτριος (Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας)
3. Σκαμνάκη Βασιλική (Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού)

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τους επιβλέποντες καθηγητές μου, κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και κο. Κωνσταντίνο Γκαραγκούνη καθώς για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν στην ανάθεση αυτής της διπλωματικής εργασίας, για την υπομονή, το χρόνο και κάθε είδους στήριξη, γνωστική και ηθική που απλόχερα μου παρείχαν. Το ειλικρινές ενδιαφέρον τους και οι παρατηρήσεις τους τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας υπήρξαν για μένα πολύτιμα αγαθά για την διεκπεραίωση τόσο της ερευνητικής μου εργασίας, καθώς και για κάθε μελλοντική μου ενασχόληση.

Πολλές ευχαριστίες, επιπρόσθετα, οφείλω στην οικογένειά μου, για τη βοήθεια και τη ψυχολογική υποστήριξη που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω το κάθε μέλος της ομάδας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και ιδιαίτερα τις Χιονίδου Ειρήνη και Catalina Stedel, όπου πλαισίωνε τον αγώνα μου στο έργο αυτό μέσω των εύστοχων παρατηρήσεων και πολύτιμων συμβουλών κατά τις κοινές συναντήσεις και συζητήσεις μας όλο αυτό το διάστημα. Η πολύ καλή συνεργασία και η αμέριστη βοήθειά τους σε θεωρητικά και πρακτικά προβλήματα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων θα αποτελούν για μένα πολύτιμη παρακαταθήκη για το μέλλον.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Περίληψη.....	06
2. Abstract.....	07
3. Εισαγωγή.....	08
3α. <i>Lotus japonicus</i> .....	09
3β. Hairy root – Φαινότυπος τριχωτή ρίζα.....	11
3γ. Βακτηριακό στέλεχος <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	12
3δ. Betalains/ Βηταλαΐνες.....	14
3ε. Πλασμιδιακός φορέας pX 11.....	21
4. Υλικά και μέθοδοι.....	24
4α. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E.coli</i> .....	24
- Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων προς μετασχηματισμό.....	24
- Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό φορέα pX 11.....	25
- Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού φορέα από κύτταρα βακτηρίου (Αλκαλική λύση).....	26
4β. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>A.rhizogenes</i> .....	27
- Προετοιμασία ικανών κυττάρων <i>A.rhizogenes</i> προς μετασχηματισμό.....	27
- Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό φορέα (Freeze-thaw method) .....	27
- Plasmid rescue.....	27
4γ. Ανάπτυξη φυτών <i>L.japonicus</i> .....	28
- Απολύμανση σπόρων.....	28
- Μεταφορά σπόρων σε τρυβλία άγαρ.....	28
4δ. Μετασχηματισμός hairyroot.....	28
- Πρωτόκολλο μετασχηματισμού hairy root (Μόλυνση φυτών με αγροβακτήρια και μεταφορά φυτών σε B5 medium plates).....	28
- Μεταφορά φυτών σε B5 medium plates + σεφοταξίμη.....	29
- Ξέπλυμα μολυσμένων φυτών με EtOH 70%(προαιρετικά).....	30
4ε. Επιβεβαίωση μετασχηματισμού hairy root των φυτών.....	30
- Εμφάνιση ρίζας και απομόνωση DNA μετασχηματισμένων φυτών με πρωτόκολλο CTAB.....	30
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	31
- Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	33
- Επιβεβαίωση μετασχηματισμού φυτών.....	34
- Αναφορά σε περαιτέρω αντιδράσεις και επαναλήψεις.....	34



5. Αποτελέσματα/Συμπεράσματα και σχολιασμός.....	35
6. Συζήτηση/Μελλοντικοί στόχοι –Υποθέσεις.....	42
7. Βιβλιογραφία.....	44
- <i>L.jaronicus</i> .....	44
- Hairy root.....	45
- Πλασμίδιο pX 11.....	48
- Βηταλαΐνες .....	49

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βηταλαΐνες είναι μια κατηγορία χρωστικών κόκκινου χρώματος σε φυτά της Caryophyllales, όπου αντικαθιστούν τη χρωστική ανθοκυανίνη. Είναι πιο συχνά αισθητές στα πέταλα των λουλουδιών, αλλά μπορούν επίσης να χρωματίσουν τους καρπούς, τα φύλλα, τους μίσχους και τις ρίζες των φυτών που τις περιέχουν. Οι βηταλαΐνες περιλαμβάνουν χρωστικές, όπως αυτές που βρίσκονται στα τεύτλα. Επιπρόσθετα, έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον από τη βιομηχανία τροφίμων ως πιθανές φυσικές εναλλακτικές λύσεις για συνθετικές χρωστικές τροφίμων σήμερα. Είναι γνωστό πως το κόκκινο εκχύλισμα τεύτλων, το οποίο περιέχει σημαντικές ποσότητες των betacyanins, χρησιμοποιείται σήμερα σε προϊόντα όπως γιαούρτια και παγωτά. (Roland et al., 1992). Για αυτό το λόγο είναι ιδιαίτερης σημασίας η περιγραφή στην παρούσα μελέτη των χαρακτηριστικών της ανάπτυξης, της καλλιέργειας και της παραγωγής βηταλαΐνων και σε ρίζες ενός φυτού, εύκολα διαθέσιμο με μικρό κύκλο ζωής και ανάπτυξης, όπως είναι το *L.japonicus*. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την παραγωγή διαγονιδιακών ριζών στο φυτό *L.japonicus*, μέσω της μόλυνσης του με το βακτηριακό στέλεχος *A.rhizogenes* με στόχο την μελέτη της παραγωγής των χρωστικών βηταλαΐνων στις διαγονιδιακές ρίζες. Στην παρούσα εργασία, γίνεται παραγωγή βηταλαΐνων από φυτά *L.japonicus* τα οποία υπέστησαν μετασχηματισμό. Με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα pX 11 μετασχηματίστηκαν αρχικά βακτηριακά στελέχη *E.coli* και στη συνέχεια *A.rhizogenes*. Τα βακτηριακά αυτά στελέχη στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό φυτικών ριζών. Οι φυτικοί σπόροι αναπτύχθηκαν σε αρχικό στάδιο σε τρυβλία με άγαρ μέχρι να φυτρώσουν και στη συνέχεια αφού μετασχηματίστηκαν μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με B5 medium θρεπτικό μέσο που είναι πιο εξειδικευμένο αφού περιέχει αντιβιοτικά κατάλληλα για περαιτέρω ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και περιορισμό όσο το δυνατόν σε μεγαλύτερη έκταση των πιθανών μολύνσεων. Αφού επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα των hairy root μετασχηματισμένων φυτών τόσο με απομόνωση γενετικού υλικού όσο και με εξειδικευμένες PCRs, το αποτέλεσμα που απορρέει είναι πως αν και είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός των γονιδίων των βηταλαΐνων του πλασμιδίου, ο φαινότυπος δεν εκφράζεται καθώς δεν εμφανίζεται «κόκκινη ρίζα». Η αδυναμία εμφάνισης του φαινοτύπου μπορεί να οφείλεται σε λάθος χειρισμούς ή πιθανές επιμολύνσεις καθώς και σε μη επαρκή γνώση όλων των μηχανισμών που εμπλέκονται στη γονιδιακή έκφραση στο συγκεκριμένο είδος φυτού. Για το λόγο αυτό, σε επόμενες μελέτες θα πρέπει να γίνει ακόμη προσεκτικότερος χειρισμός αλλά και εμβάθυνση μελέτης των σηματοδοτικών μονοπατιών των βηταλαΐνων.

## ABSTRACT

Betalains are a class of red dye in Caryophyllales plants, where they replace the anthocyanin dye. They are more often noticed on flower petals, but they can also be found for coloring the fruits, leaves, stems and roots of the plants that contain them. Betalains include colorants, such as those found in beets. In addition, they have gained particular interest from the food industry as possible natural alternatives to synthetic food dyes today. It is known that red beet extract, which contains significant amounts of betacyanins, is currently used in products such as yogurt and ice cream. (Roland et al., 1992). That is the reason why, it is of particular importance to describe in this study the characteristics of the growth, cultivation and production of betalain using a model- plant easily available that is having a small life cycle and enough growth until the appearance of a root, such as *L. japonicus*. Thus, it is necessary to develop a methodology for producing transgenic roots in the *L. japonicus* plant by infecting it with *A.rhizogenes* bacterial strains, so that we could study the production of betalain pigments in transgenic roots. In the present study, betalain is produced from *L.japonicus* plants which have undergone transient transformation. Using the plasmid vector pX11, bacterial strains of *E. coli* and then *A.rhizogenes* were transformed. The *A.rhizogenes* bacterial strains were the ones used to transform plant roots. Plant seeds were initially grown in agar plates until they grew showing roots and then transformed into plates with B5 medium nutritional material that is more specific for *L.japonicus* since it contains antibiotics suitable for further development of the root system and restrictions as much as possible to a larger extent of possible infections. After confirming the results of hairyroot transformed plants by both genetic material isolation and specific PCRs, the result was that although the transformation of the plasmid beta-lactam gene is successful, it is not expressed, as the phenotype of the "red root" does not appear. The inability of optimizing the phenotype may be due to mistaken manipulations or potential transfusions as well as inadequate knowledge of all the mechanisms involved in betalains' gene expression. Therefore, in future studies, careful consideration should be given to study the signal transduction pathways associated with the beta-tagged genes.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βηταλαΐνες είναι φυσικές χρωστικές ουσίες κυρίως φυτικές που σήμερα κερδίζουν δημοτικότητα για χρήση τους ως χρωστικές στη βιομηχανία τροφίμων. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών στην αισθητική, τη διατροφική ασφάλεια και σε διάφορες πτυχές των τροφίμων έχει αυξηθεί παράλληλα με τη ζήτηση για φυσικές χρωστικές ουσίες, όπως οι βηταλαΐνες που είναι κατάλληλες για να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική λύση χρωστικών σε προϊόντα διατροφής. Παρά το γεγονός ότι οι βηταλαΐνες του κόκκινου παντζαριού είναι από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες χρωστικές στα τρόφιμα, δεν είναι τόσο καλά μελετημένες σε σύγκριση με άλλες φυσικές χρωστικές ουσίες, όπως οι ανθοκυανίνες, τα καροτενοειδή ή οι χλωροφύλλες. Επιπρόσθετα, είναι ιδιαίτερης σημασίας η ενδεχόμενη εφαρμογή ως λειτουργικά τρόφιμα, για αυτό το λόγο χρήζει μελέτης η εξέταση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων, όπως και η αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντι-λιπιδαιμική και αντιμικροβιακή δράση των βηταλαΐνων που προέρχονται από πηγές όπως το κόκκινο παντζάρι, ο αμάραντος, το φραγκόσυκο και το κόκκινο πιταχάγιες, (Gengatharan et al.,2005).

Ένα καλό αρχικό βήμα για τη μελέτη όλου αυτού του πεδίου αποτελεί η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την παραγωγή διαγονιδιακών ριζών στο φυτό *L.japonicus*, μέσω της μόλυνσης του με το βακτηριακό στέλεχος *A.rhizogenes* με στόχο την μελέτη της παραγωγής βηταλαΐνων, των χρωστικών ουσιών αυτών στις διαγονιδιακές ρίζες. Στην παρούσα εργασία, γίνεται παραγωγή βηταλαΐνων από φυτά *L.japonicus* τα οποία υπέστησαν μετασχηματισμό. Με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα pX 11 μετασχηματίστηκαν αρχικά βακτηριακά στελέχη *E.coli* και στη συνέχεια, *A.rhizogenes*. Ως φυτικό είδος για την πειραματική διαδικασία επιλέχθηκε το *L.japonicus* διότι είναι εύκολος ο μετασχηματισμός του με βακτηριακά στελέχη *A.rhizogenes*.

## 1. Lotus japonicus

Το *L.japonicus* είναι ένα αγγειόσπερμο άγριο ψυχανθές που ανήκει στην οικογένεια Fabaceae. Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι πολύ διαφορετικά και αποτελούνται περίπου από 20.000 είδη.

Έχουν σημαντική γεωργική και βιολογική σημασία καθώς, όπως πολλά από τα είδη των ψυχανθών, είναι πλούσιες πηγές πρωτεΐνης και ελαίου και μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα επίπεδα του ατμοσφαιρικού άζωτου. Το πολυετές ψυχανθές *L.japonicus* έχει μικρό μέγεθος γονιδιώματος (470 Mb/ διπλοειδές με 6 απλοειδή χρωμοσώματα), ένα σύντομο χρονικό διάστημα γενιάς (2-3 μήνες) (Shusei et al.,2008) και μπορεί να μετασχηματιστεί εύκολα με τη χρήση πρωτοκόλλων που βασίζονται σε μετασχηματισμό με *A.rhizogenes*. Περισσότερα χαρακτηριστικά είναι εμφανή και στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1 (Handberg et al.,1992):περίληψη των χαρακτηριστικών του φυτού *L.japonicus*

<b>Αναπτυξιακά χαρακτηριστικά</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Αρχικά μικρό φυτό</li><li>- θαμνώδες φυτό μετά τον σχηματισμό δευτερογενών βλαστών και με πολυετή διακλαδώσεις</li><li>- περίοδος από σπορά μέχρι ανθοφορία: 7 εβδομάδες</li><li>- χρόνος γενιάς από σπόρο σε σπόρο: 3-4 μήνες</li><li>- μικροί σπόροι: 1,2gr ανά 1000 σπόρους</li><li>- Αναγέννηση από τη βάση του στελέχους</li><li>- Φυτικός πολλαπλασιασμός από κομβικά σημεία</li></ul>
<b>Διάδοση</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Μεγάλα άνθη</li><li>- Αυτογονιμοποίηση</li><li>- Περίπου 20 σπόρια ανάπερικάρπιο</li><li>- Περίπου 6000 σπόρια ανά φυτό</li><li>- Καμία διασκόρπιση σπόρων</li><li>- Πιθανή μόλυνση από τα χέρια</li></ul>
<b>Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Διπλοειδές: 2n=12</li><li>- 0,5 pgDNA ανά απλοειδές γονιδίωμα</li></ul>
<b>Καλλιέργεια ιστών</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Αναγέννηση από κάλλους</li><li>- Μετασχηματισμός με <i>A.tumefaciens</i></li></ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Επιλογή υγρομυκίνης και καναμυκίνης</li> <li>- Αναγέννηση διαγονιδιακών φυτών</li> <li>- Μεταφορά της ανθεκτικότητας υγρομυκίνης στο F<sub>1</sub></li> </ul>
<b>Ριζικά οζίδια</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Γρήγορη αύξηση <i>Rhizobium loti</i></li> <li>- Καθορισμένα οζίδια</li> </ul>

Συγκεκριμένα, μεταξύ των έξι διπλοειδών ειδών (*Lotus filicaulis*, *Lotus conimbricensis*, *Lotus angustissimus*, *Lotus japonicus*, *Lotus parviflorus*, *Lotus castellanus*), το *L.japonicus* ( «Gifu αριθμό B-129, Grant et al, 1962, Larsen et al. , 1955) επιλέχθηκε για περαιτέρω έρευνα. Κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στο πολυετές *L.japonicus*, ο οικότυπος «Gifu» έχει τη μικρότερη παραγωγή το χρόνο και την πιο άφθονη ανθοφορία (Handberg et.al.,1992) Το πρωταρχικό φυτό είναι μικρό και μπορεί να καλλιεργηθεί in vitro σε δοκιμαστικούς σωλήνες, και σε υψηλή πυκνότητα σε σακουλάκια με χώμα. Τα ώριμα φυτά είναι «θαμνώδη» και αποτελούνται από πολλά κλαδιά έως 30 cm μάκρους. Τα μεγάλα κίτρινα άνθη βρίσκονται σε ζεύγη (πιο σπάνια ένα ή τρία) στους μίσχους και στις διακλαδώσεις των μασχαλών κατά μήκος των κλαδιών. Η ανθοφορία δεν είναι ταυτόχρονη και συνεχίζεται για ένα κλαδί μετά τη συγκομιδή των ώριμων λοβών σε άλλα κλαδιά. Η ανάπτυξη του λουλουδιού γίνεται κάτω από συνθήκες φωτισμού και ειδικότερα σε κατά μέσο όρο 16 ημέρες σε συνεχές φως και 70% υγρασία. Μετά την επικονίαση, ένας λοβός που περιέχει περίπου 20 σπόρους αναπτύσσεται. Σε χρονικό διάστημα 6 μηνών μπορούν να συγκομισθούν έως 6000 σπόροι από ένα ενιαίο φυτό. Οι σπόροι διατηρούνται στους 4 ° C για 2 χρόνια και εξακολουθούν να μπορούν να βλαστήσουν με υψηλή συχνότητα. Μεμονωμένα φυτά μπορούν επίσης να πολλαπλασιάζονται από κομβικά τμήματα με ριζοβολία σε συχνότητα 90%. Τέλος, η τεχνική μέσω διασταυρώσεων περιγράφηκε καθιστώντας δυνατή την κλασική γενετική (Grant et. al., 1962). Τα *L. japonicus* είναι ευπαθή σε *A.rhizogenes* και διαγονιδιακά φυτά μπορούν να αναγεννηθούν με επιλογή υγρομυκίνης ή καναμυκίνης. (Handberg et al.,1992).

Πολλά μέσα έχουν συσταθεί για τη διευκόλυνση κλωνοποίησης βάση χάρτη των γονιδίων του *Lotus*. Τα περισσότερα πειράματα μεταλλαξιγένεσης έχουν γίνει με οικότυπο «Gifu». Ο οικότυπος MG-20 είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος φορέας διασταυρώσεων για την κίνηση των πληθυσμών χαρτογράφησης. Τα *Lotus burtii* (Kawaguchi et al, 2005) και *Lotus filicaulis* είναι εναλλακτικοί φορείς διασταυρώσεων. Δύο αμιγείς σειρές ανασυνδυασμένων χαρτογραφημένων

πληθυσμών είναι διαθέσιμες και έχει δημοσιευθεί ένας ενοποιημένος γενετικός χάρτης του *Lotus* (Hayashi et al. 2001).

## **2. HAIRYROOT-ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ «ΤΡΙΧΩΤΗ ΡΙΖΑ»**

Το *A.rhizogenes* είναι ένα εδαφικό Gram αρνητικό βακτήριο που παράγει τη νόσο των πυκνά διακλαδισμένων ριζών σε δικοτυλήδονα φυτά λόγω του ότι περιέχει πλασμίδια που επάγουν ρίζα (Ri πλασμίδια). Αυτά τα πλασμίδια μπορούν να μολύνουν τις ρίζες φυτών και να επαχθεί η παραγωγή ενός αριθμού χημικών ενώσεων με κατάληξη –οπίνες (τροφή για το βακτήριο) και να αναπτυχθούν ανώμαλα (Agroo et al.,1995).Το *A.rhizogenes* επάγει το σχηματισμό των πολλαπλασιαζόμενων πολυ-διακλαδισμένων τυχαίων ριζών στη θέση της μόλυνσης, τις ονομαζόμενες και «πυκνά διακλαδισμένες ρίζες» (Ayora-Talavera et al., 2002; HuandDu, 2006). Επιπλέον, το *A.rhizogenes* προκαλεί το φαινότυπο «τριχωτή ρίζα» (hairyroot) στα φυτά. Οι μη φυσιολογικές ρίζες είναι ιδιαίτερα εύκολο να καλλιεργηθούν σε τεχνητό περιβάλλον, επειδή δεν χρειάζονται ορμόνες (Agroo et al., 1995) και είναι νεοπλαστικές, με απεριόριστη ανάπτυξη. Οι νεοπλαστικές ρίζες που παράγονται από μόλυνση με *A.rhizogenes* χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και γενετική σταθερότητα. Αυτές οι γενετικά μετασχηματισμένες καλλιέργειες ριζών μπορούν να παράγουν υψηλότερα επίπεδα των δευτερογενών μεταβολιτών ή ποσότητες συγκρίσιμες με εκείνες των ακέραιων/άθικτων φυτών (Banerjee et al., 2002; HuandDu, 2006).Τα Ri πλασμίδια μπορούν να κατασκευαστούν με τεχνικές γενετικής μηχανικής ώστε να περιέχουν T-DNA και να επάγουν μετασχηματισμό των φυτικών κυττάρων.

Οι καλλιέργειες αυτές των μετασχηματισμένων ριζών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών σε πολλά φυτά. Το βασικό πρόβλημα για την εμπορική εκμετάλλευση καλλιεργειών πυκνά διακλαδισμένων ριζών είναι η κλιμάκωσή τους, καθώς υπάρχει η ανάγκη για χρησιμοποίηση ενός ειδικά σχεδιασμένου βιοαντιδραστήρα που θα επιτρέπει την ανάπτυξη των διασυνδεδεμένων ιστών με άνιση κατανομή στον όγκο του δοχείου. Επιπροσθέτως, τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του ετερογενούς συστήματος κατά τη διάρκεια της μαζικής κλίμακας καλλιέργειας πυκνά διακλαδισμένων ριζών επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή των μεταβολιτών. Η ανάγκη ανάπτυξης νέων μοντέλων βιοαντιδραστήρα για τέτοιου τύπου καλλιέργειες εξακολουθεί να υφίσταται (HuandDu, 2006). Είναι επίσης σημαντικό να αναπτυχθούν και νέα μοντέλα με τη βοήθεια υπολογιστή για διάφορες παραμέτρους (κατανάλωση οξυγόνου, ρυθμός απέκκρισης



προϊόντος στο μέσο κτλ). Επιπλέον, οι μετασχηματισμένες ρίζες είναι σε θέση να αναγεννήσουν διαγονιδιακά γενετικά σταθερά φυτά ή κλώνους. Λόγω αυτού του ιδιαίτερου χαρακτηριστικού της γρήγορης και συχνής αναγέννησης και ανάπτυξης φυταρίων επιτρέπεται ο κλωνικός πολλαπλασιασμός φυτών.

Όσον αφορά το μηχανισμό εμφάνισης των ριζών, το πρώτο στάδιο είναι η αλληλεπίδραση των φυτών με παθογόνα του εδάφους ή άλλες πηγές της ριζόσφαιρας. Έτσι, παρατηρείται έκκριση φαινολικών ενώσεων όπως η ακετοσυριγκρόνη, η οποία ασκεί χημειοτακτικές επιδράσεις που προσελκύουν τα βακτήρια. Με αυτό τον τρόπο, ορισμένα βακτηριακά γονίδια ενεργοποιούνται και αναπτύσσουν την ικανότητα υπό ορισμένες συνθήκες να μεταφέρουν το T-DNA τους από το πλασμίδιο που επάγει τη δημιουργία ριζών (Ri πλασμίδιο) στο εσωτερικό του φυτού μέσω του σημείου τραυματισμού. Μετά την ολοκλήρωση και την έκφραση, *in vitro* ή υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρείται ο φαινότυπος των πυκνά διακλαδισμένων ριζών, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υπερανάπτυξη του ριζικού συστήματος. Το ριζικό σύστημα που αναπτύσσεται στα φυτά αυτά όμως δεν είναι πλήρως γεωτροπικό και όσον αφορά τα φύλλα όταν και αν αυτά αναπτυχθούν έχουν διαφορετική μορφολογία (ρυτιδωμένα, τσαλακωμένα) από τα φυσιολογικά (HuandDu, 2006).

### **3. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *Agrobacterium rhizogenes***

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

Μετά από μόλυνση των φυτών (όπως το καρότο και η καλαγχόη) με στελέχη του *A. rhizogenes* τα οποία φέρουν ένα πλασμίδιο τύπου αγροπίνης που επάγει τη δημιουργία ριζών (Ri πλασμίδιο), τα φυτά εμφανίζουν στο ριζικό τους σύστημα το

φαινότυπο πυκνών διακλαδισμένων ριζών και μάλιστα σε αφθονία στις θέσεις μόλυνσης (Riker, 1930; Offringa et al., 1986). Ωστόσο, η μόλυνση άλλων φυτικών ειδών όπως το ηλιοτρόπιο και το μπιζέλι, με τα ίδια βακτηριακά στελέχη, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ανοργάνωτων όγκων. Ο μοριακός μηχανισμός που διέπει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ *A. rhizogenes* και φυτού, μοιάζει με εκείνο του βακτηριακού οιδήματος στα ζαχαρότευτλα από το *A. tumefaciens*, το οποίο περιέχει το πλασμίδιο επαγωγής όγκου (Ti). Και στις δύο περιπτώσεις, ένα τμήμα του DNA του πλασμιδίου, το μεταφερόμενο DNA (T-DNA), εισάγεται στα φυτικά κύτταρα μέσω των θέσεων μόλυνσης (Chilton et al., 1977; Chilton et al., 1982; Spano, et al., 1982; Offringa et al., 1986). Το T-DNA που υπάρχει σε αυτές τις σειρές βρέθηκε ότι προέρχεται από ένα τμήμα του Ri πλασμιδίου (Chilton, et al., 1982; Spano et al., 1982; Terfer, 1984; Costantino, 1984). Γι' αυτό, πιθανολογείται ότι αυτό το τμήμα του Ri DNA περιέχει γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον απεριόριστο πολλαπλασιασμό των μετασχηματισμένων σειρών. Πράγματι, όπως αποδείχθηκε, μια μετάλλαξη παρεμβολής στο μέσον αυτής της T-περιοχής οδηγεί στην απώλεια της ιδιότητας δημιουργίας ριζών (rhizogenicity) σε φύλλα καλαγχόης (White et al., 1983). Ωστόσο, η διαγραφή σχεδόν ολόκληρης της T-περιοχής, συμπεριλαμβανομένου του μεσαίου τμήματος, δεν οδηγεί σε απώλεια της ριζογέννεσης σε μίσχους καλαγχόης ή σε απώλεια της ογκογονικότητας στο μπιζέλι και το ηλιοτρόπιο (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), γεγονός που υποδηλώνει ότι άλλα οhc γονίδια βρίσκονται σε άλλα σημεία/άλλο σημείο στο Ri πλασμίδιο (Offringa et al., 1986). Επιπλέον, δείχθηκε ότι σε μια δεύτερη περιοχή των Ri πλασμιδίων παρατηρείται εμφάνιση αγροπίνης υπό συνθήκες, όταν μεταφέρεται σε φυτικά κύτταρα κατά την διάρκεια της μόλυνσης. Η περιοχή αυτή είναι μεγαλύτερη των 15kb και τοποθετημένη δεξιά της T-περιοχής που περιγράφηκε προηγουμένως και περιέχει γονίδια για τη βιοσύνθεση της αγροπίνης (De Paolis, et al., 1985). Μέχρι στιγμής, δεν είχαν εντοπιστεί οhc γονίδια στην περιοχή αυτή [που ονομάζεται TR (δεξιά) -περιοχή για να διακριθεί από την ήδη γνωστή TL (αριστερά) -περιοχή], αλλά, περιέργως, εντοπίστηκε ένα τμήμα του DNA που παρουσιάζει ομολογία με Ti aux γονίδια και βρίσκεται δίπλα στο γονίδιο συνθάσης της αγροπίνης (White, & Nester, 1980; Huffman, et al., 1984; Jouanin, 1984). Να σημειωθεί ότι αυτός ο "aux" τόπος (locus) του Ri πλασμιδίου ανιχνεύθηκε επίσης και σε ορισμένες μετασχηματισμένες σειρές, ως μέρος του TR-DNA (Offringa et al., 1986).

Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης (μετασχηματισμός μέσω T-DNA των Ri πλασμιδίων) είναι το ότι τεχνικά είναι ευκολότερος και πιο γρήγορος ο



μετασχηματισμός συγκριτικά με τον αντίστοιχο με *A.rhizogenes*. Αντί για διάστημα 4-6 μηνών που απαιτείται για την αναγέννηση διαγονιδιακών φυτών μετά από μετασχηματισμό που χρησιμοποιείται το *A.rhizogenes*, η παραγωγή Ri T-DNA διαγονιδιακών ριζών διαρκεί μόνο λίγες εβδομάδες. Έτσι, αυτή η τεχνική είναι καλά προσαρμοσμένη για χρήση σε τεχνικές RNAi για τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας (Limprens et al. 2004) και για την πραγματοποίηση λειτουργικής ανάλυσης προαγωγού (Boisson-Dernier et al. 2005). Ακόμη η προαναφερθείσα τεχνική είναι κατάλληλη για τη χρησιμοποίηση της με σκοπό την ταχεία αξιολόγηση της συμπληρωματικότητας των φυτικών μεταλλακτών που διαθέτουν υποψήφια γονίδια (π.χ. Endre et al. 2002; Levy et al. 2004) στα οποία ο γενετικός καθοριστικός παράγοντας της αντίστοιχης μετάλλαξης προσδιορίζεται από τη ρίζα (Chabaud et al., 2006). Ο κύριος περιορισμός αυτής της προσέγγισης είναι ότι, δεδομένου ότι οι βλαστοί δεν μετασχηματίζονται, η διαρκής συντήρηση των σύνθετων φυτών δεν είναι εύκολα εφικτή ούτε με αγενή πολλαπλασιασμό ούτε με αυτογονιμοποίηση. Παρ' όλα αυτά, ο περιορισμός αυτός μπορεί πλέον να παρακαμφθεί, δεδομένου ότι έχει προσφάτως δειχθεί ότι μετασχηματισμένες από Ri T-DNA ρίζες *M.truncatula* μπορούν να αναγεννηθούν επιτυχώς σε φυτάρια (Crane et al., 2006; Chabaud et al., 2006).

#### **4. ΒΕΤΑΛΑΙΝΣ/ΒΗΤΑΛΑΙΝΕΣ**

Οι βηταλαΐνες είναι μια κατηγορία ερυθρών και κίτρινων χρωστικών που αποτελούν παράγωγα ινδόλης. Βρέθηκαν σε φυτά της τάξης των Καρυοφυλλωδών (*Caryophyllales*), στα οποία αντικαθιστούν χρωστικές ανθοκυανίνες τόσο στα λουλούδια όσο και στους καρπούς των φυτών (Strack et al., 2002).

Οι βηταλαΐνες έχουν λειτουργίες ανάλογες με αυτές των ανθοκυανινών όσον αφορά το χρωματισμό. Μάλιστα, οι βηταλαΐνες εντοπίζονται πιο συχνά στα πέταλα των λουλουδιών, αλλά μπορεί να χρωματίσουν τους καρπούς, τα φύλλα, τους μίσχους και τις ρίζες των φυτών που τις περιέχουν. Σπανιότερα παρατηρείται και η έκφραση του σε μύκητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα χρωστικών των βηταλαΐνών είναι αυτές που βρίσκονται στα τεύτλα.





Εικόνα 1 Απεικόνιση χρωματισμού σε ρίζες τεύτλων

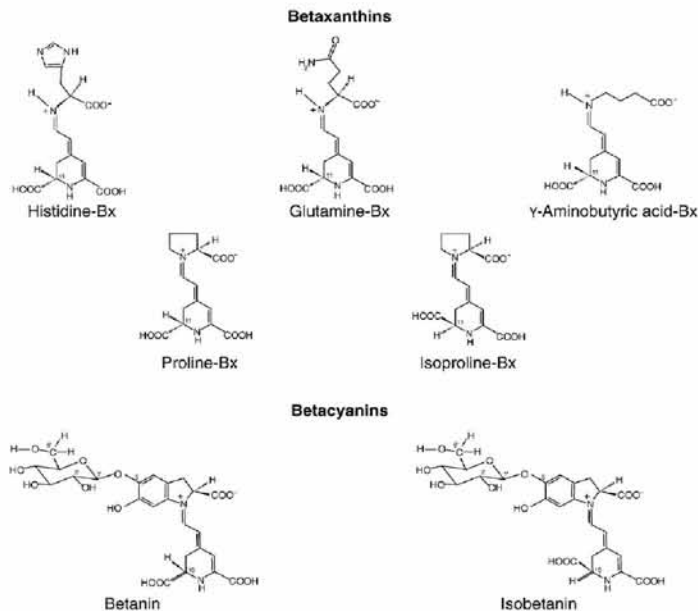
Οι πρόσφατες εξελίξεις στην έρευνα για βιοσύνθεση βηταλαϊνών περιλαμβάνει την περιγραφή ορισμένων «πρώιμων» αντιδράσεων, δηλαδή, αρχικά ένα ειδικό σχηματισμό *dopa* με τη βοήθεια βηταλαϊνης (τόσο στα φυτά όσο και στους μύκητες) και δεύτερον τη διάσπαση *dopa* (κυρίως σε μύκητες). Οι ερευνητικές εργασίες για βηταλαϊνο-ειδικές γλυκοζυλοτρανσφεράσες (σε GT) έχουν δώσει νέες προοπτικές για την εξέλιξη των δευτερευόντων φυτικών ενζύμων. Προτείνεται ότι αυτές οι GTs είναι αυτές που φυλογενετικά σχετίζονται με τις αντίστοιχες GTs των φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι τα καθοριστικά βήματα στη βιοσύνθεση βηταλαϊνης, δηλαδή η συμπύκνωση του βηταλαϊνικού χρωμοφόρου και βηταλαμικού οξέος με κυκλο-*dopa* και των αμινοξικών οξέων ή των αμινών προς σχηματισμό της αντίστοιχης αλδιμίνης των ερυθρό-ιώδων betacyanins και των κίτρινων betaxanthins, είναι πιο πιθανό να είναι μη-ενζυματική αντίδραση.

Οι βηταλαϊνες έχουν προσελκύσει τους ερευνητές για περαιτέρω μελέτη λόγω της χρήσης τους για χρωματισμό τροφίμων και εξαιτίας των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων αλλά και της δυνατότητας χρήσης τους για σάρωση ριζών που εμπλέκονται με την προστασία έναντι ορισμένων διαταραχών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

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

- Οι βητακυανίνες που περιλαμβάνουν ερυθρές έως και ιώδεις χρωστικές ουσίες βηταλαϊνών. Μεταξύ των βητακυανινών που υπάρχουν σε φυτά, περιλαμβάνονται η βητανίνη, η ισοβητανίνη (isobetanin), η προβητανίνη (probetanin) και η νεοβητανίνη (neobetanin).

- Οι βηταξανθίνες οι οποίες είναι οι χρωστικές βηταλαϊνών που εμφανίζονται με χρωματικές αποχρώσεις από κίτρινο έως πορτοκαλί. Μεταξύ των βηταξανθινών που υπάρχουν σε φυτά, περιλαμβάνονται οι vulgaxanthin, caraxanthin, portulaxanthin, και indicaxanthin.



**Εικόνα 2 Χημική δομή betaxanthins και betacyanins (Mosshammer et al., 2006)**

Παλαιότερα οι βηταλαΐνες θεωρούνταν ότι σχετίζονταν με τις ανθοκυανίνες, τις ερυθρωπές χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στα περισσότερα φυτά. Τόσο οι βηταλαΐνες, όσο και οι ανθοκυανίνες, είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στα κενοτόπια των φυτικών κυττάρων. Ωστόσο, οι βηταλαΐνες διαφέρουν δομικά και χημικά από τις ανθοκυανίνες και δεν έχουν ποτέ βρεθεί στο ίδιο φυτό μαζί (Francis, 1999, Stafford, 1994). Για παράδειγμα, οι βηταλαΐνες περιέχουν άζωτο, ενώ οι ανθοκυανίνες όχι (Robinson, 1963). Είναι πλέον γνωστό ότι οι βηταλαΐνες είναι αρωματικά παράγωγα ινδόλης που συντίθεται από τυροσίνη, παράγωγα τα οποία δεν σχετίζονται χημικά με τις ανθοκυανίνες και δεν είναι καν φλαβονοειδή (Raven, et al., 2004). Κάθε βηταλαΐνη είναι ένας γλυκοζίτης, και αποτελείται από ένα σάκχαρο και ένα έγχρωμο τμήμα. Η δε σύνθεσή των βηταλαϊνών είναι πλέον σίγουρο πως προωθείται από το φως (Salisbury et al., 1991).

Ο πρόσφατος χαρακτηρισμός των διαφορετικών βιοδραστικότητας των βηταλαϊνών μέσα από πειράματα με εκχυλίσματα που περιέχουν βηταλαΐνες και καθαρισμένες (αμιγείς) χρωστικές ουσίες, έχει ανανεώσει το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας σχετικά με τα μόρια που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικές χρωστικές ύλες κατατάσσοντας τις βηταλαΐνες στις πρώτες θέσεις των κατάλληλων

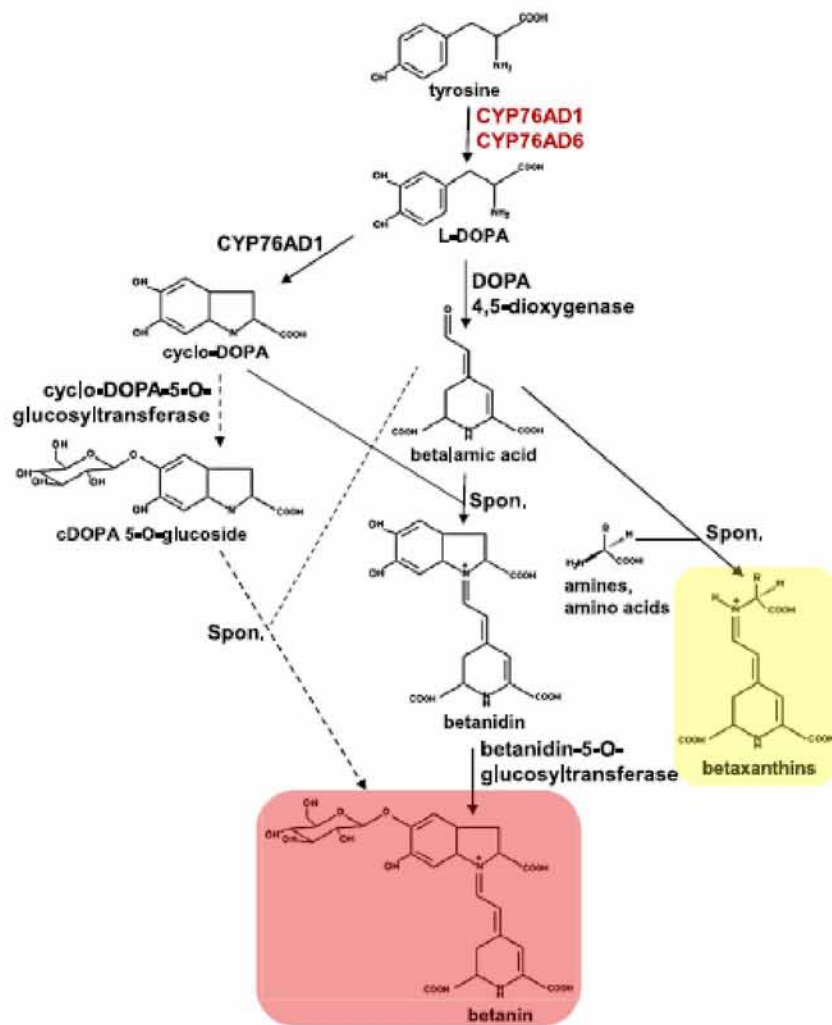


φυσικών χρωστικών. Επιπρόσθετα, μελέτες με πολλαπλές καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν επιδείξει ένα υψηλό δυναμικό χημειοπρόληψης και εντοπίζεται σημαντική στήριξη της άποψης αυτής μέσω *in vitro* πειραμάτων τα οποία υποδηλώνουν τόσο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των μορίων των βηταλαϊνών όσο και δράση κατά των (ελευθέρων) ριζών.

Άλλα πειράματα σε *in vivo* μοντέλα με ζώα και μελέτες βιοδιαθεσιμότητας, ενισχύουν τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζουν οι βηταλαΐνες στη διατροφή. Οι βιοδραστικότητες που περιγράφονται παραπάνω όμως ενδέχεται να μην υποστηρίζονται από τη δομική μονάδα των βηταλαϊνών, το βηταλαμικό οξύ, κυρίως όσον αφορά την υψηλή ικανότητα δράσης κατά των (ελευθέρων) ριζών. Αν και απαιτούνται περισσότερες έρευνες με καθαρισμένες (αμιγείς) ενώσεις, οι τρέχουσες ενδείξεις υποδηλώνουν μια ισχυρή δυναμική που προάγει την υγεία για αυτό το λόγο και οι βηταλαΐνες έχουν προσελκύσει τόσο το επιστημονικό, όσο και το οικονομικό ενδιαφέρον για τη χρήση τους ως χρωστικές ουσίες (Stintzing & Carle, 2007; Moreno et al., 2008). Η υψηλή σταθερότητα των βηταλαϊνών, η ανεξαρτησία του pH τους και οι αντιοξειδωτικές ιδιοότητες τους συμβάλλουν στο να χρησιμοποιούνται ευρέως ως φυσικές χρωστικές ύλες τροφίμων και συμπληρώματα διατροφής (Azeredo, 2009; Polturak et al., 2015).

Ένα ενδιαμέσο της οδού της βηταλαΐνης, η L-3,4-διυδροξυφαινουλαανίνη (L-DOPA), είναι επίσης ένας εμπορικός πολύτιμος μεταβολίτης που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της νόσου του Parkinson (Nagatsu & Sawada, 2009). Παρ' όλα αυτά, η βιοσύνθεση βηταλαϊνών παρέμεινε ελάχιστα κατανοητή σε σύγκριση με τις άλλες κύριες κατηγορίες φυτικών χρωστικών ουσιών, δηλαδή τις ανθοκυάνες και τα καροτενοειδή (Polturak et al., 2015).

Όσον αφορά τις νέες εξελίξεις στην έρευνα σχετικά με το βιοσυνθετικό μονοπάτι της βηταλαΐνης, το πρώτο βήμα δέσμευσης στην οδό, η 3-υδροξυλίωση της τυροσίνης, καταλύεται τόσο από το κυτόχρωμα P450s, το CYP76AD1 όσο και από το CYP76AD6 σε κόκκινα τεύτλα. Οι διακεκομμένες γραμμές του παρακάτω σχήματος μάλιστα ορίζουν τις αντιδράσεις μιας εναλλακτικής οδού για τον σχηματισμό βητανίνης, όπου η κύκλο-DOPA γλυκοζυλιώνεται πρώτα και έπειτα συμπυκνώνεται με βηταλαμικό οξύ (αυθόρμητες αντιδράσεις συμπύκνωσης). (Polturak et al., 2015).



Εικόνα 3 Βιοσυνθετικό μονοπάτι (Nakatsuka et al., 2013)

Από τις πιο πρόσφατες μελέτες παρατηρείται πως η έκφραση των τριών γονιδίων είναι επαρκής για την παραγωγή ετερόλογης βηταλαΐνης σε φυτά. Όπως συζητήθηκε παραπάνω, είναι δυνατή η παραγωγή τόσο ερυθρών βητακυανινών (betacyanins), όσο και κίτρινων βηταξανθινών (betaxanthins) μέσω παροδικής υπερέκφρασης του γονιδίου λόγω χάρη σε φύλλα του *N. benthamiana*.

Επιπρόσθετα, επετεύχθη προσπάθεια παρασκευής βηταλαΐνων σε είδη φυτών που δεν την παράγουν φυσικά, μέσω σταθερού μετασχηματισμού. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε κλωνοποίηση Golden braid (Sarrion-Perdigones et al., 2013) για να δημιουργηθεί μια κατασκευή τεσσάρων γονιδίων σε έναν πλασμιδιακό φορέα, που ονομάζεται πλέον pX11. Σε αυτόν εντοπίζονται τα γονίδια για τα CYP76AD1, BvDODA1 και cDOPA5GT, τα οποία μάλιστα εκφράζονται παράλληλα και καθοδηγούνται από συστατικούς υποκινητές. Επίσης υπάρχει και ένα γονίδιο αντίστασης στην καναμυκίνη για επιλογή με χρήση αντιβιοτικού. Ο pX11

πλασμιδιακός φορέας αρχικά δοκιμάστηκε με αgroεμποτισμό στο *N. benthamiana* (Polturak et al., 2015).



Εικόνα 4 Μορφή και χρωματισμός επιτυχούς μετασχηματισμένου φύλλου όπου έχουμε έκφραση βηταλαϊνών .

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

Παρομοίως, με τον συν-διαποτισμό των pDODA1 και Pad1-GT και έμμεσα την εισαγωγή του pX 11 σε ριζικούς ιστούς των φυτών παρατηρήθηκε ερυθρός χρωματισμός του ιστού. Με την πραγματοποίηση LC-MS ανάλυσης του ιστού που έχει διαποτιστεί με pX 11 διαπιστώθηκε η σύνθεση βηταλαϊνών. Ειδικότερα, βρέθηκαν κορυφές που αντιστοιχούν σε βητανίνη και ισο-βητανίνη, όπως παρατηρήθηκε και σε προηγούμενες μελέτες και μετά τον συν-διαποτισμό των pDODA1 και Pad1-GT φορέων υπερέκφρασης.

Επίσης εντοπίστηκε η ένωση indicaxanthin, συστατικό της βηταξανθίνης (προλίνη-betaxanthin), υποδεικνύοντας κάποιο επίπεδο ροής προς σχηματισμό της βηταξανθίνης. Δύο επιπλέον μεταβολίτες αναγνωρίστηκαν ως βητακυανίνες, με βάση τα φάσματα απορρόφησης στο φως και τον κατακερματισμό τους, ο οποίος περιελάμβανε το σχεδόν πανταχού παρόν θραύσμα βητακυανίνης, τη βητανιδίνη (betanidin) ( $m/z = 389$ ). Ο ιστός φύλλου που διαποτίστηκε με pX 11 εμφανίστηκε έντονα χρωματισμένος ερυθρός, παράγοντας βητακυανίνες σε μεγάλες ποσότητες,



απ' ότι υποδηλώνει ο χρωματισμός. Ο ιστός που διαποτίστηκε, αξιολογήθηκε στη συνέχεια για το σύνολο του περιεχομένου σε βητακυανίνη με φασματοφωτομετρική ανάλυση και βρέθηκε να περιέχει κατ' εκτίμηση,  $330 \text{ mgkg}^{-1}$ , ποσότητα υψηλότερη από ότι στα ερυθρά φύλλα της *Bougainvillea glabra* και τα ερυθρά πέταλα της *Myrabilis jalapa*, που περιέχουν 120 και  $250 \text{ mgkg}^{-1}$  βητακυανίνης αντίστοιχα, και 2,3 φορές μικρότερη ποσότητα από ότι στο ερυθρό εκχύλισμα ρίζας τεύτλων, το οποίο εκτιμήθηκε ότι περιέχει  $760 \text{ mgkg}^{-1}$ .

Ακολούθως, ο φορέας pX 11 χρησιμοποιήθηκε για σταθερό μετασχηματισμό διαφόρων ειδών φυτών, συμπεριλαμβανομένων του καπνού (*Nicotiana tabacum*), της ντομάτας (*S.lycopersicum*), της πατάτας (*S.tuberosum*), της μελιτζάνας (*S.melongena*), του δένδρου καπνού (*Nicotiana glauca*), του ευρωπαϊκού μαύρου στρύχνου (*Solanum nigrum*), της πετούνιας (*Petunia xhybrida*) και του *N.benthamiana*. Μοσχεύματα των διαφόρων ειδών καλλιεργήθηκαν με αγροβακτήρια και τοποθετήθηκαν σε εξειδικευμένο μέσο επιλογής. Στα *N. benthamiana*, *N. glauca*, πετούνια και ντομάτα, μικρές κηλίδες ερυθρού-ιώδους χρωματισμού ήταν ορατές στην επιφάνεια του εκφυτεύματος μέσα σε 2 ημέρες συν-καλλιέργειας με αγροβακτήρια. Σε όλα τα είδη που μετασχηματίστηκαν, η εισαγωγή pX 11 προκάλεσε το σχηματισμό των ερυθρών-ιωδών κάλων (ή τύλων), οι οποίοι εμφανίστηκαν γενικά μέσα σε 1-2 εβδομάδες από την καλλιέργεια. Μελαγχρωματικοί *N.benthamiana* και *N.glauca* ιστοί κάλου (τύλου) βρέθηκαν να περιέχουν βητανίνη και ισο-βητανίνη με LC-MS. Επιπλέον, μια νέα άγνωστη ένωση βητακυανίνης βρέθηκε στον κάλο (τύλο) του *N. Glauca* (Polturak et al., 2015).

Στην περίπτωση του συγκεκριμένου πειράματος σε γενικές γραμμές αρχικά απολυμάνθηκαν σπόροι και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε τρυβλία άγαρ 0,8%. Αφού έγινε η μόλυνση των φυτών με τα μετασχηματισμένα αγροβακτήρια, μεταφέρθηκε το σύνολο των φυτών σε B5 medium τρυβλία και στη συνέχεια επαναμεταφέρθηκαν σε B5 medium τρυβλία στα οποία είχε προστεθεί το αντιβιοτικό σεφοταξίμη και όπου παρέμειναν τα φυτά μέχρι να εμφανιστεί ρίζα ικανή για παρατήρηση. Και έτσι τέλος παρατηρήθηκαν προσεκτικά οι ρίζες σε στερεοσκόπιο καθώς και απομονώθηκε το γενετικό υλικό βάσει πρωτοκόλλου CTAB και πραγματοποιήθηκαν PCRs για ταυτοποίηση του μετασχηματισμού.



5. ori: colE1/pMB1/pBR322/pUC αρχή αναδιπλασιασμού, υψηλού αριθμού αντιγράφων.

6. AmpR: προσδίδει αντίσταση στην αμπικιλίνη, στην καρβενικιλίνη και σε συναφή αντιβιοτικά και αποδίδει ως προϊόν την β-λακταμάση.

7. pPHIS4: κωδικοποιεί ένα πολυλειτουργικό ένζυμο HIS4 (CAY67990.1: πολυλειτουργικό ένζυμο που περιέχει φωσφοριβοσυλο-ATP πυροφωσφατάση, φωσφοριβοσυλο-AMP κυκλοϋδρολάση και δραστηριότητες αφυδρογονάσης της ιστιδινόλης. Καταλύει το δεύτερο, τρίτο, ένατο και δέκατο βήματα στην βιοσύνθεση ιστιδίνης).

8. CYP76D6 και CYP76D1: 10-υδροξυλάση γερανιόλης, βιοσύνθεση των ιριδοειδών μονοτερπενοειδών και αρκετές κατηγορίες αλκαλοειδών μονοτερπενοειδούς, μυρτιά (*Catharanthus roseus*)

Τα γονίδια αυτά απομονώθηκαν από το παντζάρι (*Beta vulgaris*)

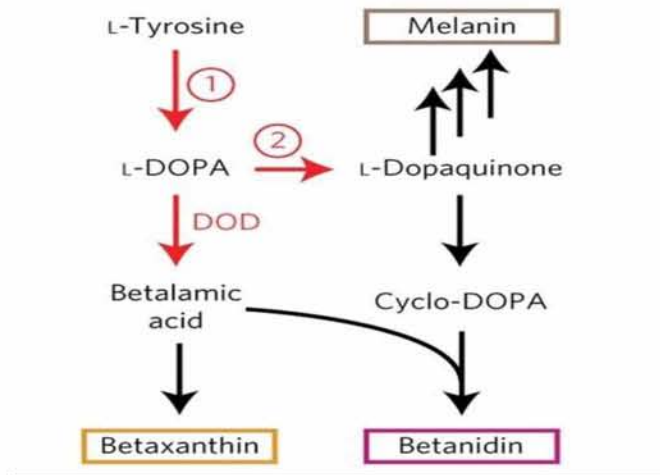
9. P35S: Ο υποκινητής του 35S RNA είναι ένας πολύ ισχυρός ιδιοσυστατικός υποκινητής, υπεύθυνος για τη μεταγραφή του συνόλου του γονιδιώματος του CaMV (ιός του μωσαϊκού του κουνουπιδιού). Είναι γνωστό για τη χρήση του στην μεταμόρφωση φυτών. Προκαλεί υψηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης σε δικοτυλήδονα φυτά.

10. c-DOPA5GT: γονίδιο που κωδικοποιεί μια τυροσινάση (απομονώθηκε από το φυτό *M. Jalap*)

11. DODA: DOPA 4,5 διοξυγενάση

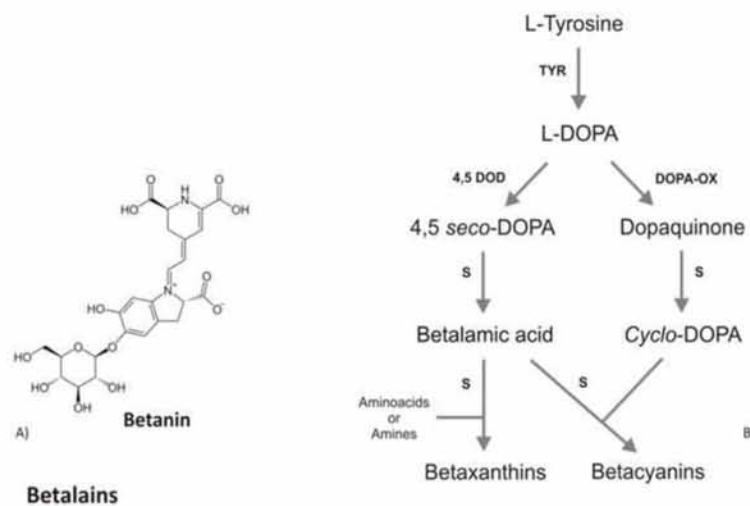
Τελικά, σχηματίστηκε μια πολυγονιδιακή κατασκευή για έκφραση των κόκκινων βηταγονιδίων BvDODA1 και CYP76AD1, μαζί με το γονίδιο της *M. Jalapa* κυκλοεξαρωμένης-DOPA-5-O-γλυκοσυλοτρανσφεράσης (cDOPA5GT). Τα BvDODA1 (407 bp), CYP76AD1 (418 bp), BvCYP76new (471 bp), και CYP76AD6 (420 bp) κλωνοποιήθηκαν σε ένα pTRV2 παράγοντα και μεταφέρθηκαν μέσω ενός στελέχους *A.tumefaciens* GV3101. Προσδίδοντας το κόκκινο χρώμα (*B.vulgaris*). (Polturak et al., 2015)





Εικόνα 6 Αντιδράσεις σχηματισμού βηταξανθίνης και βητανιδίνης μέσω DOPA.

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



Εικόνα 7 Βιοσυνθετικό μονοπάτι βηταλαϊνών.

\* *Pichia pastoris* (είδος ζυμομύκητα): χρησιμοποιείται συχνά ως ένα σύστημα έκφρασης για την παραγωγή πρωτεϊνών. Διαθέτει δύο γονίδια οξειδάσης της

αλκοόλης, τα AOX1 και AOX2, τα οποία έχουν έντονα επαγόμενο υποκινητή. Αυτά τα γονίδια επιτρέπουν στο ζυμομύκητα να χρησιμοποιεί μεθανόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Οι υποκινητές AOX επάγονται από τη μεθανόλη και η δράση τους καταστέλλεται από π.χ. γλυκόζη.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Αρχικά το πλασμίδιο pX 11 εισήχθη σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωσή του παράλληλα με την αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων. Αφού απομονώθηκε το γενετικό υλικό, έγινε δεύτερη εισαγωγή του πλασμιδίου στη συνέχεια σε στελέχη *A.rhizogenes* με τη μέθοδο freeze-thaw. Τα βακτηριακά αυτά στελέχη στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό φυτικών ριζών *L.jaronicus* κατά την 8η ημέρα ανάπτυξης των φυτικών ριζών. Οι φυτικοί σπόροι αρχικά αναπτύχθηκαν σε αρχικό στάδιο σε τρυβλία με άγαρ μέχρι να φυτρώσουν και στη συνέχεια αφού μετασχηματίστηκαν μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με B5 medium θρεπτικά υλικό που είναι πιο εξειδικευμένο για περαιτέρω ανάπτυξη του ριζικού συστήματος. Παράλληλα έγινε και περιορισμός όσο το δυνατόν σε μεγαλύτερη έκταση των πιθανών μολύνσεων αφού προστέθηκαν κατάλληλα αντιβιοτικά όπως η σεφοταξίμη. Αφού επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα των hairy root μετασχηματισμένων φυτών τόσο με απομόνωση γενετικού υλικού με βάση το πρωτόκολλο CTAB όσο και με εξειδικευμένες PCRs τόσο για την ύπαρξη γενομικού υλικού όσο και με στοχευμένους εκκινητές για τα γονίδια του πλασμιδίου, το αποτέλεσμα που απορρέει είναι πως αν και είναι επιτυχής ο μετασχηματισμός, το γονίδιο των βηταλαϊνών του πλασμιδίου δεν εκφράζεται καθώς δεν εμφανίζεται ο φαινότυπος «κόκκινης ρίζας» σε φωτογραφίες του στερεοσκοπίου και πόσο μάλλον με γυμνό μάτι όπως αναμενόταν.

### **1. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli***

#### **1α. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ**

Προετοιμάζονται υγρές καλλιέργειες LB των 5ml μετά από 1 μέρα επώαση *E.coli* streaking plates και γίνεται εμβολιασμός 200ml LB με 1-2ml της αρχικής καλλιέργειας. Ακολουθεί ανάπτυξη της καλλιέργειας σε 37 °C έως ότου OD<sub>600</sub>= 0.3-0.6 (~3h) και μεταφορά σε 50ml σωληνάρια τύπου φάλκον. Αφού γίνει φυγοκέντρηση 4000g/15-20min/4°C, απορρίπτεται το υπερκείμενο και κρατάται το



λευκό ίζημα που περιέχει τα κύτταρα *E.coli*. Στη συνέχεια, γίνεται επαναδιάλυση σε 25-30ml αποστειρωμένο, παγωμένο  $MgCl_2$  100mM (σε πάγο) και δεύτερη φυγοκέντρηση 4000g/10min/4°C. Απορρίπτεται και πάλι το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 40-50ml  $CaCl_2$  100mM (παγωμένο και αποστειρωμένο). Μετά από επώαση σε πάγο για 20-45min, επανάληψη φυγοκέντρησης 4000g/10min/4°C και επαναδιάλυση ιζήματος σε 1-3ml επαναδιαλύεται σε αιωρηματικό ρυθμιστικό διάλυμα 15% γλυκερόλη και 85%  $CaCl_2$  και μοιράζεται ανά 100μl σε 1.5ml σωληνάρια τύπου errendorf. Τέλος, τα σωληνάρια τύπου errendorf αποθηκεύονται στους -80 °C αφού ψυχθούν τα δείγματα πρώτα σε υγρό  $N_2$

## 1β. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pX 11

Αφού ξεπαγώσουν τα δεκτικά κύτταρα και ενώ διατηρούνται στον πάγο προστίθεται 1μl πλασμιδιακό DNA και ακολουθεί επώαση για 30min στον πάγο. Έπειτα, τα κύτταρα υπόκεινται σε Heat shock σε υδατόλουτρο 42 °C για 30-50min και επωάζονται σε πάγο για 5 min ώστε να επανέλθουν τα κύτταρα στους 37°C και προστίθεται 1ml LB υγρό\* . Ακολουθεί επώαση για 45-60min ώστε να αρχίσουν και πάλι να εκφράζονται οι κυτταρικές πρωτεΐνες και μετά πρόσθεση - διαχωρισμός των δειγμάτων σε 100-200μl LB υγρό συνολικού όγκου 1.5ml διότι είναι κυκλικό DNA και σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση Τέλος, προετοιμάζονται στοκ γλυκερόλης (300μl γλυκερόλη και 700μl δείγματος σε 1.5ml σωληνάρια τύπου errendorf και αποθηκεύονται σε -80 °C αφού περαστούν από υγρό άζωτο). Στη φάση αυτή ο μετασχηματισμός *E.coli*- pX 11 πλασμιδίου (100μl δεκτικά κύτταρα +0,5μl πλασμιδίου) γίνεται για να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα και να έχουμε μεγάλη ποσότητα πλασμιδίου για μελλοντική χρήση.

\*Σύσταση υγρού LB (1000ml) :NaCl 10gr, Bacteriological peptide 10gr, Yeast 5gr

- Η επιλογή των ενζύμων πέψης και η ένδειξη του προτύπου πέψης προκύπτει ως εξής:

  1. Από SnapGene παίρνω την αλληλουχία του πλασμιδίου pX 11 και στη συνέχεια τη μεταφέρω στο NEBcutter (NewEnglandBiolabs ->TOOLS and RESOURCES ->NEBcutter: Να είναι επιλεγμένα circular, submit Custom digest ->χάρτης πέψης)
  2. Επιλέγω τα κατάλληλα ένζυμα με τα εξής κριτήρια:

- ✓ Τα δύο κομμάτια να δίνουν το άθροισμα του πλασμιδιακού DNA (16kB)
  - ✓ Τα δύο τμήματα να είναι ευδιάκριτα και να έχουν ελάχιστη διαφορά 1kB
  - ✓ Και τα 2 ένζυμα να κόβουν 2 φορές και να έχουν ίδιες συνθήκες πέψης
2. Πραγματοποίηση πέψης σε πάγο, προσθέτοντας στο tube (Vτελ.=30μl) με το απομονωμένο πλασμίδιο (2,5μl DNA) το mini-prep, 23,7μl ddH<sub>2</sub>O, buffer (1μl/1X) και BSA (0,3μl) και στο τέλος το κάθε ένζυμο (0,5μl) προς επώαση για 1-2 ώρες/37<sup>0</sup>C.
  3. Το gel 1% agarose (80ml TE buffer, 0,8gr agar) και προσθέτω 5μl ladder και 5μl πλασμιδίου (τρέχω 100/20min). (Για τον υπολογισμό των μl: 6x loading buffer\* V<sub>A</sub>= V<sub>F</sub>-1x\*=6μl, όπου V<sub>F</sub>= 30+ V<sub>A</sub>).

#### 1γ. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ (ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ)

Αρχικά γίνεται φυγοκέντρηση 30" σε 10.000g/4 °C των 1.5ml βακτηριακής υγρής LB καλλιέργειας και απόρριψη του υπερκείμενου. Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος σε 300μl P1 ρυθμιστικού διαλύματος<sup>1</sup> με RNase και ανάμειξη (vortex) μέχρι να ομογενοποιηθεί και προσθήκη 300μl P2 ρυθμιστικού<sup>2</sup> και ήπια ανάδευση για 5min μέχρι να γίνει εμφανές το εναιώρημα. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 300μl P3 ρυθμιστικού<sup>3</sup> και ήπια ανάδευση. Μετά από επώαση για 10 min σε πάγο, γίνεται μεταφορά υπερκείμενου σε καθαρά 1.5ml σωληνάρια τύπου erpendorf και ανάδευση (spin) για 2min (10.000g/4 °C). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα καθαρά 1.5ml σωληνάρια τύπου erpendorf σε καθένα από τα οποία προστίθενται 600μl 2-προπανόλης και γίνεται ανάδευση για κατακρήμνιση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση για 15min (10.000g/4 °C), αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 500μl EtOH. Έπεται ήπια ανάδευση για να φύγει η 2-προπανόλη και τα άλατα που εμποδίζουν το πλασμιδιακό DNA και φυγοκέντρηση για 10min (10.000g/4 °C). Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα στεγνώνει σε 37 °C για 10min πριν επαναδιαλυθεί σε 20μl ddH<sub>2</sub>O και γίνεται αποθήκευση στους -20 °C.

\* 1,2,3

#### Ρυθμιστικά διαλύματα

P1 (50mM Tris: ρύθμιση pH, 10mM EDTA, pH 8 HCl)



P2 (200mM NaOH, 1% SDS)

P3 (3Mpotassium acetate, pH 5.5 glacial acetic acid)

## 2.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *A.rhizogenes*

### 2α. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *A.rhizogenes* προς ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Από stock *LBA1334 A.rhizogenes* κάνουμε υγρή καλλιέργεια LB και επωάζεται 24 ώρες. Ακολουθεί εμβολιασμός των 50ml LB με 2ml της αποστειρωμένης καλλιέργειας και επώαση για 4h περίπου σε 28 °C και 180rpm μέχρις ότου OD<sub>600</sub> = 0,6 (για τυφλό στις μετρήσεις χρησιμοποιείται 1ml LB πριν τον εμβολιασμό).

### 2β. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *A.rhizogenes* ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pX 11/ FREEZE-THAW METHOD

Αρχικά γίνεται φυγοκέντρηση για 5min (3.000g/4 °C) των καλλιεργειών που προετοιμάστηκαν και διατηρήθηκαν στη συνέχεια σε πάγο και αφού απορρίπτεται το υπερκείμενο, γίνεται επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1ml 20mM CaCl<sub>2</sub> ώστε να γίνουν διαπερατές οι κυτταρικές μεμβάνες και τα κλάσματα των 0.1 ml μοιράζονται σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erpendorf. Στη συνέχεια, προστίθεται στο κάθε ένα περίπου 1μg πλασμιδιακού DNA *LBA1334 pX 11* και τα κύτταρα ψύχονται σε υγρό άζωτο. Έπεται επώαση σε υδατόλουτρο 37 °C για 5min και επιστροφή των δειγμάτων στον πάγο και όχι στον πάγο. Προστίθεται 1ml LB στα σωληνάρια τύπου erpendorf και επωάζονται για 2-4h σε 28 °C με ήπια ανάδευση ώστε τα βακτήρια να αρχίσουν να εκφράζουν τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και γίνεται φυγοκέντρηση των σωληναρίων τύπου erpendorf για 30sec. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, γίνεται επαναδιάλυση σε 0.1ml LB και άπλωμα των υγρών καλλιεργειών στις αντίστοιχες στερεές με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (εδώ καναμυκίνη και στρεπτομυκίνη). Τα τρυβλία επωάζονται στους 28 °C για 2-3 ημέρες μέχρι οι μετασχηματισμένες καλλιέργειες να εμφανιστούν και γίνεται streaking σε νέα τρυβλία 2 ημέρες πριν χρησιμοποιηθούν για μετασχηματισμό. Συγκεκριμένα, ο μετασχηματισμός *A.rhizogenes* με μέθοδο freeze-thaw (1μg DNA plasmid και 2ml *LBA1334 strain*) πραγματοποιείται για να έχουμε στελέχη για μελλοντική επιμόλυνση σε φυτική ρίζα.

2γ. PLASMID RESCUE: Απομονώσαμε το pX 11 από τα αγροβακτήρια και το ξαναεισάγαμε σε *E.coli* (100μl *E.coli* και 0,5μl pX 11) (με βάση τη διαδικασία που



περιγράφηκε) για να ελέγξουμε αν όντως είχε περάσει το πλασμίδιο στα αγροβακτήρια.

### **3.ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ *L.japonicus***

#### **3α. ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΣΠΟΡΩΝ**

Διαχωρισμός 300 σπόρων σε σωληνάριο τύπου Falcon 15ml και προσθήκη πυκνού  $H_2SO_4$  ώστε να υπερκαλυφθούν οι σπόροι. Επώαση μέχρι να αρχίσουν να αποχρωματίζονται με ήπια ανάδευση για περίπου 7 λεπτά. Δίπλα σε τρεχούμενο νερό βρύσης αφαιρείται το πυκνό  $H_2SO_4$  και κάνουμε 2-3 πλύσεις με κρύο  $dH_2O$ . Στη συνέχεια, προστίθεται στο σωληνάριο τύπου Falcon 10% χλωρίνη μέχρι να καλυφθούν τα σποράκια και γίνεται ανάδευση στο shaker για 15 λεπτά. Ακολουθούν πλύσεις με  $ddH_2O$  (6-7) σε πλήρεις αποστειρωμένες συνθήκες (Laminar). Στην τελευταία πλύση το νερό μένει στο σωληνάριο τύπου Falcon και αφού καλυφθεί με αλουμινόχαρτο επωάζεται για 24h/4°C

#### **3β. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΠΟΡΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ ΑΓΑΡ**

- I. Προετοιμασία τρυβλία άγαρ 0.8% (300 φυτά -> 15 τρυβλία -> 1000ml  $dH_2O$  + 8gr agar)
- II. Μεταφορά: Με καθαρές αποστειρωμένες λαβίδες τοποθετούνται στρόγγυλα διηθητικά φίλτρα σε στρόγγυλα τρυβλία και πάνω τοποθετούνται τα σποράκια να στεγνώσουν. Με νέα καθαρή λαβίδα τοποθετούνται 10-10 τα σποράκια σε δύο σειρές ίσα ίσα να στερεώνονται στο άγαρ και γίνεται καλό κλείσιμο τρυβλίων με παραφίλμ και τρύπημα με tip τριγύρω για να μη συσσωρευτεί υγρασία. Τέλος, τα τρυβλία καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και επωάζονται.

### **4. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ – HAIRY-ROOT**

#### **4α. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ –HAIRYROOT**

(ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ B5 MEDIUM PLATES)

Πάντα σε καλά αποστειρωμένες συνθήκες (Laminar) σε ένα καθαρό στρόγγυλο τρυβλίο τοποθετούνται 2 φύλλα διηθητικό χαρτί. Στο τρυβλίο με τα ανεπτυγμένα αγροβακτήρια προστίθενται 2ml ddH<sub>2</sub>O και με τη βοήθεια του tip ομογενοποιούνται τα κύτταρα. Ακολουθεί εμποτισμός των διηθητικών με το κυτταρικό διάλυμα και πρόσθεση των φυτών ένα-ένα με αποστειρωμένη λαβίδα για μόλυνση. Ενώ ακόμη τα φυτά βρίσκονται στο τρυβλίο με το διηθητικό κόβεται η ρίζα στο κατάλληλο σημείο με αποστειρωμένο νυστέρι και με άλλη καθαρή λαβίδα γίνεται squeezing στο σημείο εγκοπής (τα φυτά μένουν 1-2 λεπτά στο διάλυμα). Με καθαρή λαβίδα τα φυτά μεταφέρονται στα B5 medium τρυβλία \* σε δύο σειρές ανά 7-8. Κλείνονται τα τρυβλία με παραφιλμ και γίνεται τρύπημα και τοποθέτηση αλουμινοχαρτου. Η επώαση που ακολουθεί πραγματοποιείται στο θάλαμο αυστηρά σε κάθετη θέση για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις.

\* Σύσταση B5 medium (100ml): 0.33gr Gamborg's B5 salt, 2gr sucrose, 1gr bactoagar

- ✓ Να γίνει πεχαμέτρηση με NaOH 1N ώστε pH=5.5 και στη συνέχεια να προστεθεί το άγαρ.
- ✓ Μετά την αποστείρωση προστίθενται και B5 βιταμίνες (εδώ 700ml B5 mediumάρα 700μl B5 vitamins).
- ✓ Η διαδικασία γίνεται δύο φορές τη μία για τα φυτά του πειράματος και την άλλη για τα κοντρόλ φυτά με καθαρά υλικά.

#### 4β. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ B5 MEDIUM + ΣΕΦΟΤΑΞΙΜΗ

Προετοιμασία τριών τρυβλίων 1ο με ddH<sub>2</sub>O και 100μl σεφοταξίμη, 2<sup>ο</sup> με ddH<sub>2</sub>O και 50μl σεφοταξίμη και 3<sup>ο</sup> με ένα στρόγγυλο διηθητικό χαρτί. Μεταφορά από τα B5 medium τρυβλία τα φυτά ένα-ένα με καθαρή λαβίδα στο 1<sup>ο</sup> τρυβλίο και επώαση για 10 λεπτά. Ομοίως μεταφορά στο 2<sup>ο</sup> τρυβλίο και ήπια ανακίνηση για λίγα δευτερόλεπτα. Μετά, μεταφορά στο 3<sup>ο</sup> τρυβλίο και στέγνωμα για 1 λεπτό πριν μεταφερθούν στα B5 medium + cef τρυβλία σε 2 σειρές ανά 7 ή 8 (Η σύσταση παραμένει ίδια απλά αφού αποστειρωθεί και κρυώσει το θρεπτικό προστίθεται η σεφοταξίμη- 2.100μl για 700ml). Τα τρυβλία κλείνουν με παραφιλμ, τρυπώνονται και μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης

- ✓ Επίσης, η διαδικασία γίνεται δύο φορές τη μία για τα φυτά του πειράματος και την άλλη για τα κοντρόλ φυτά με καθαρά υλικά

#### 4γ. ΞΕΠΛΥΜΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΕΙΟΗ 70% (ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΟ ΑΝ ΤΑ ΦΥΤΑ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΕΦΙΚΤΟ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΟΥΝ ΛΟΓΩ ΕΚΤΕΤΑΜΜΕΝΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ)

Μεταφέρονται τα φυτά (με αποστειρωμένες και καμμένες λαβίδες κατά τις μεταφορές) σε 30ml διαλύματος αιθανόλης για 1 λεπτό και στη συνέχεια αφού περαστούν από ddH<sub>2</sub>O και στεγνώσουν για 1 λεπτό σε διηθητικό τοποθετούνται σε νέα τρυβλία B5 medium + cef όπως περιγράφηκε προηγουμένως

Συμπερασματικά, την 1<sup>η</sup> ημέρα έγινε η απολύμανση των σπόρων και μετά από 24 ώρες (2<sup>η</sup> ημέρα) μεταφέρθηκαν τα σπόρια σε τρυβλία άγαρ και έγινε streaking με αντιβιοτικά σε αγροβακτήρια. Την 5<sup>η</sup> ημέρα από την αρχή του πειράματος έγινε προετοιμασία υγρών καλλιεργειών αγροβακτηρίων και βγάλσιμο αλουμινόχαρτου από τρυβλία φυτών. Την 7<sup>η</sup> ημέρα ακολούθησε η μεταφορά υγρών καλλιεργειών σε στερεά τρυβλία με τα κατάλληλα αντιβιοτικά για κάθε στέλεχος και την 8<sup>η</sup> ημέρα έγινε μόλυνση φυτών με αγροβακτήρια. Αφού τη 10<sup>η</sup> ημέρα βγήκε το αλουμινόχαρτο από τα φυτά, την 13<sup>η</sup> ημέρα έγινε μεταφορά φυτών σε B5 medium+cef και στη συνέχεια παρακολουθώντας την ανάπτυξη των φυτών καθημερινά για πιθανές επιμολύνσεις καταλήγουμε την 29<sup>η</sup> ημέρα να πάρουμε τα τελικά αποτελέσματα και να γίνει φύτεμα όσων φυτών κρίνονται κατάλληλα (μετασχηματισμένα και επαρκώς ανεπτυγμένα).

#### 5.ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ HAIYROOT, ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η επιβεβαίωση του μετασχηματισμού μπορεί να γίνει μέσω φθορισμού αλλά και μέσω ενίσχυσης του γονιδίου GFP με PCR. Σε στερεοσκόπιο Leice MZ10F συνδεδεμένο με κάμερα Leica DFC295 λαμβάνονται οι εικόνες των παρακάτω μετασχηματισμένων ριζών.

#### 5α. ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΡΙΖΑΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΡΙΖΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΤΩΚΟΛΛΟ CTAB



Στην αρχή, αφαιρούνται οι ρίζες που δεν είναι μετασχηματισμένες και οι μετασχηματισμένες κόβονται με λεπίδα κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες και τοποθετούνται σε tubes τα οποία παγώνονται καλά κλειστά σε υγρό άζωτο. Ανοίγονται προσεκτικά τα tubes και με πλαστικό «γουδοχέρι» θρυμματίζονται οι ρίζες. Προστίθενται 200μl προθερμασμένο στους 65 °C ρυθμιστικό διάλυμα CTAB \* και 1μl μερκαπτοαιθανόλη και επώαση των tubes για 15 λεπτά στους 65 °C. Στη συνέχεια, προστίθενται 150μl χλωροφόρμιο και 1:25 ισοαμυλική αλκοόλη και αναμειγνύονται στο vortex. Μετά γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά/13000rpm και μεταφορά υπερκειμένου σε νέα tubes. Ακολουθεί προσθήκη 70% ισοπροπανόλης, ήπια ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα και θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και πλύσιμο το ιζήματος που περιέχει το DNA με 70% κρύα αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 5 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί το ίζημα και απόρριψη πάλι του υπερκειμένου και στέγνωμα το ιζήματος στο πάγκο με ανοιχτά tubes. Γίνεται επαναδιάλυση του DNA σε 50μl RNA free ddH<sub>2</sub>O και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο. Τέλος, πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και αποθήκευση στους -20 °C

\* Σύσταση CTAB: 100mM Tris-Cl pH=8, 20mM EDTA pH=8, 1,4M NaCl, 2% w/v CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), 1% w/v PVP40,000 (polyvinyl pyrrolidone)

## 5β. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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

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

PCR	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
DNA-εκμαγείο	1
Ορθόδρομος εκκινητής F (10μM)	0,8
Οποσθόδρομος εκκινητής R (10μM)	0,8
dNTPs (10 mM)	0,4
TaqDNA πολυμεράση (5 unit/μl)	0,08
BufferTaq πολυμεράσης με Mg	2
ddH <sub>2</sub> O	14,92
Τελικός όγκος	20

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

Name	Sequence	Tm	Product (bp)	Target	
35S_Fnew	GCCGTGAAGACTGGCGAAC	61,67	443	35S	Specific by BLAST against Lotus nr
35S_Rnew	TGCGAAGGATAGTGGGATTGTG	60,42			
qRTcYP76AD1 F	TGTGCTAGACGTICTTCTCAGCT	59,92		CYP76AD1	<i>Mirabilis jalapa</i>
qRTcYP76AD1 R	AAAATGTCGACGAGCAAATG	52,38			
MjcDOPA5GF	ATTCCCCGCCATTTCTCCCC	60,4	901	MjcDOPA5Gt	<i>Mirabilis jalapa</i>
MjcDOPA5GR	CAACCCCATTCGTCCTCC	60,88			
BvDODA1_F	TGATGAATGGTGAAGATGCTAATG	57,37	488	BvDODA1	<i>Beta vulgaris</i>
BvDODA1_R	AGCCAATGCTCGTCTAAGT	59,09			

Αυτή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιλαμβάνει την αρχική αποδιάταξη των κλώνων στους για 5', ακολουθούμενη από 35 κύκλους που αρχίζουν στους 95 °C για 30 δεύτερα, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών για 30" και στους 72°C για 1 λεπτό για την επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων τμημάτων. Μετά το

πέρας των κύκλων, η αντίδραση συνεχίζεται για 5 λεπτά στους 72°C για την επιμήκυνση όλων των τμημάτων DNA και αδρανοποιείται στους 4°C.

#### 5γ. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

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

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

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

Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μέχρι να λιώσει.
- Στη λιωμένη αγαρόζη, προστίθεται 0,001 % v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- Σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, προστίθενται οι «χτένες», οι οποίες θα δημιουργήσουν τις υποδοχές των δειγμάτων. Προστίθεται το διάλυμα της αγαρόζης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.



- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνονται οι «χτένες» και η πηκτή τοποθετείται στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE, μέχρι την πλήρη κάλυψη της πηκτής.
- Πραγματοποιείται η φόρτωση του μάρτυρα (marker) και των δειγμάτων στις υποδοχές της πηκτής. Στα δείγματα προς ανάλυση, προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X DLB για την οπτικοποίηση των δειγμάτων στην πηκτή, καθώς και στην ικανότητα τους να διατηρούν τα δείγματα στις υποδοχές και να μην έξω από αυτές.
- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/cm.
- Τα δείγματα γίνονται ορατά με τη χρήση του υπεριώδους φωτός και μιας κάμερας που επιτρέπει τη λήψη φωτογραφιών της πηκτής.

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

#### 5δ. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ

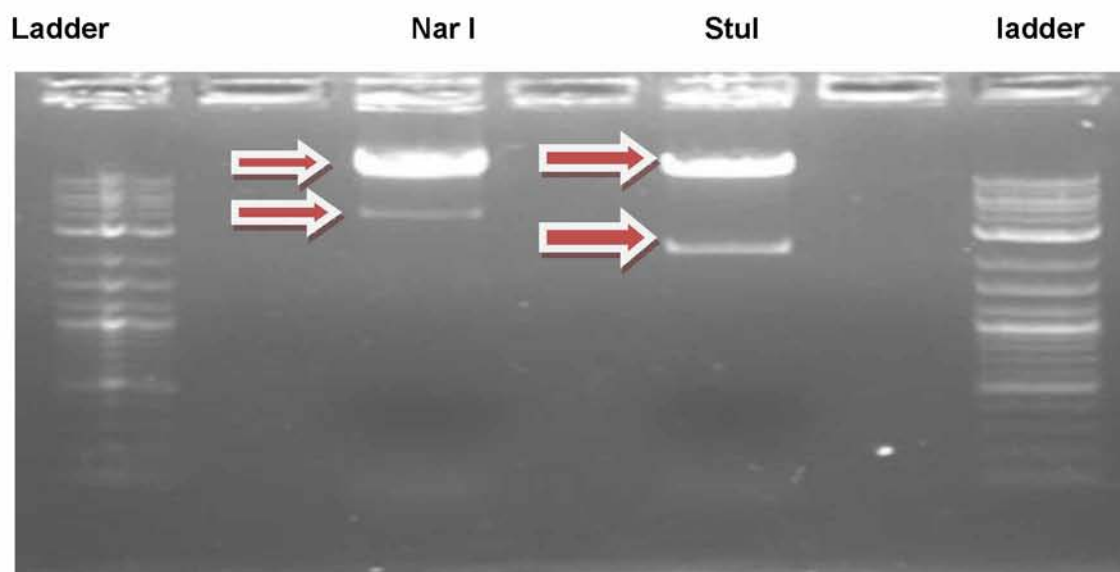
Η ανίχνευση του φορέα θεωρείται ότι μπορεί να γίνει μέσω ανίχνευσης κόκκινου χρώματος με γυμνό μάτι.

#### 5ε. ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΕ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥΣ

Στη συνέχεια με genomic DNA PCR ταυτοποιήσαμε την ύπαρξη DNA μετά από απομόνωση DNA από τις ρίζες και ηλεκτροφορήσαμε σε gel 1% agarose.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NarI, StuI ώστε να πιστοποιηθεί ότι τα βακτήρια μετασχηματίστηκαν επιτυχώς.



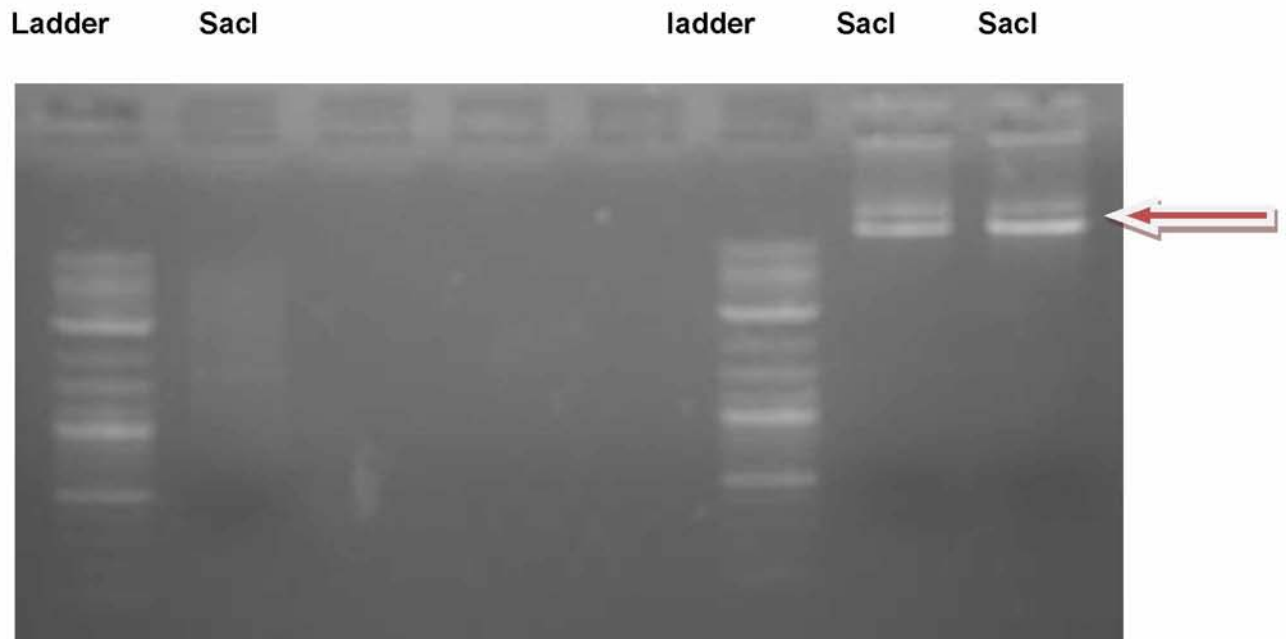
Εικόνα α1 Πέψη *E.Coli* με NarI και StuI (0,5μl το καθένα) και load 5μl

Έγινε επαλήθευση του μετασχηματισμού με πέψη *E.Coli* με NarI και StuI και έδωσε σωστό πρότυπο πέψης και συμπεραίνουμε άρα έχει γίνει σωστά ο ανασυνδυασμός.

Από τα δύο παραπάνω αποτελέσματα είδαμε ότι η πέψη με το StuI είναι αναμενόμενη (>10kb και μια ~ 2.5kb) ενώ το NarI, δίνει μόνο μια ζώνη >10kb και μια αχνή ~4kb. Επίσης στις πέψεις με NarI φαίνεται να υπάρχει λιγότερο DNA. (Το NarI δε μας δίνει το σωστό πρότυπο επειδή χρησιμοποιήσαμε 2 διαφορετικά στελέχη *E.coli* και *A.rhizogenes*. που μπορεί να κάνουν διαφορετικές μεθυλώσεις σε διάφορα σημεία επομένως και έτσι να μην αναγνωρίζεται η αλληλουχία από τη NarI το οποίο εμποδίζεται από μεθυλίωση των θέσεων αναγνώρισής του (NEB product manual). Επίσης το ένζυμο αυτό χρειάζεται 2 διαδοχικές αλληλουχίες αναγνώρισης για να τις κόψει αποδοτικά).

Δεδομένου ότι ξεκινήσαμε με το σωστό πλασμίδιο, ότι στο μετασχηματισμό των αγροβακτηρίων το αρνητικό κοντρόλ είναι σωστό, δοκιμάσαμε καινούριο ένζυμο το SacI.

- Επαναληπτική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *SacI* για να ενισχυθεί ο ισχυρισμός του επιτυχούς ανασυνδυασμού.



Εικόνα α2 Πέψη με *SacI* (0,5μl)

Φαίνεται ότι τα 2 τελευταία δείγματα μας δίνουν μόνο τη ζώνη του πλασμιδίου άρα δεν έγινε πέψη και το πρώτο δείγμα μια πολύ αχνή 1.500 bp και καθόλου 4.000 άρα όχι το επιθυμητό πρότυπο άρα όχι πέψη και ίσως να απαιτείται να επαναληφθεί η διαδικασία. Αυτό δε συνέβη όμως διότι ήταν απλά μια πέψη για ενίσχυση του ήδη πιστοποιημένου αποτελέσματος από την προηγούμενη πέψη.

Εν κατακλείδι, αφού και οι 2 περιπτώσεις πέψεων είναι αποδεκτές είτε λόγω εμφάνισης του προτύπου ζωνώσεων που αναμένεται είτε λόγω μη αναγκαιότητας της δεύτερης πέψης, μπορούμε να θεωρήσουμε πως ο ανασυνδυασμός είναι επιτυχής και άρα τα *E.coli* βακτήρια είναι κατάλληλα για χρήση σε μετασχηματισμό.



- Λήψη εικόνων από στερεοσκόπιο με σκοπό να ελεγχθεί λεπτομερώς το ριζικό σύστημα και η εμφάνιση ή όχι του φαινοτύπου «κόκκινης ρίζας».



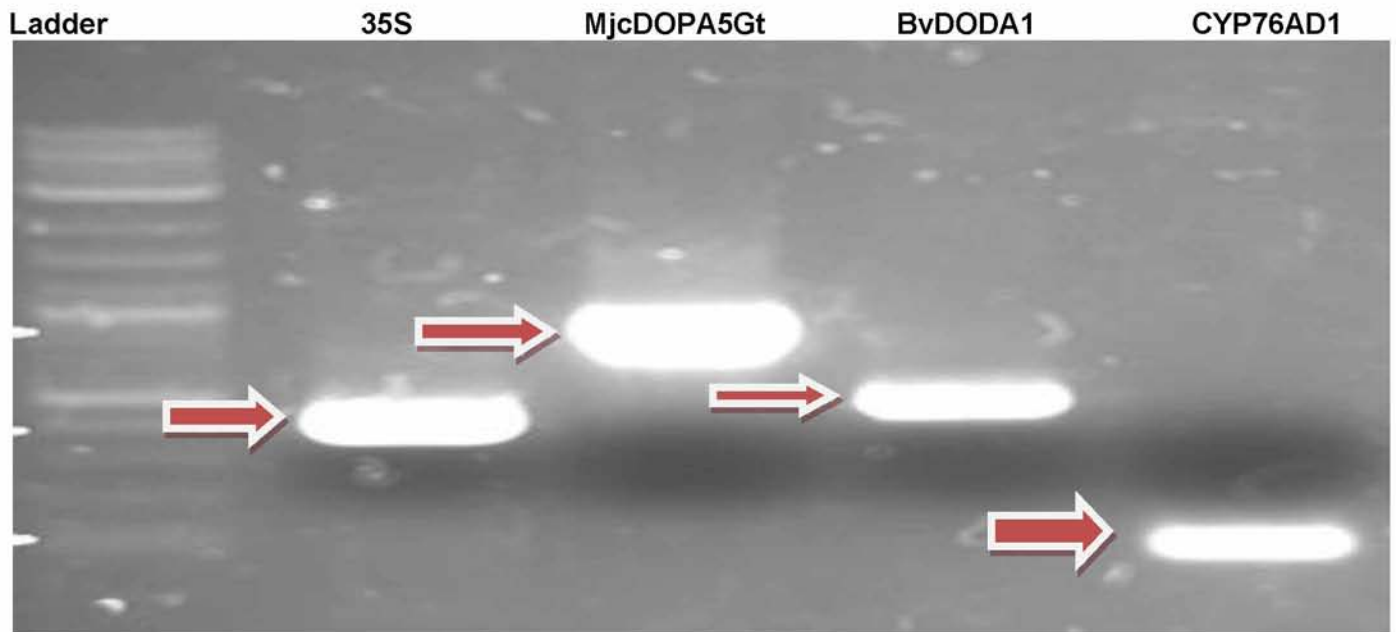
Εικόνα β1.2 Ρίζα μετασχηματισμένη με rub1 πλασμίδιο και σμίκρυνσή της



Εικόνα β3 Φυτό με ρίζα μετασχηματισμένη με pX 11 πλασμίδιο

Τα αποτελέσματα που πήραμε όπως φαίνεται ξεκάθαρα στις εικόνες είναι παρόμοια τόσο για τα control μετασχηματισμένα φυτά με rub1 όσο και για τα μετασχηματισμένα με το p X 11 πλασμίδιο και σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν εμφανίζεται κανένας χρωματισμός στις ανεπτυγμένες ρίζες.

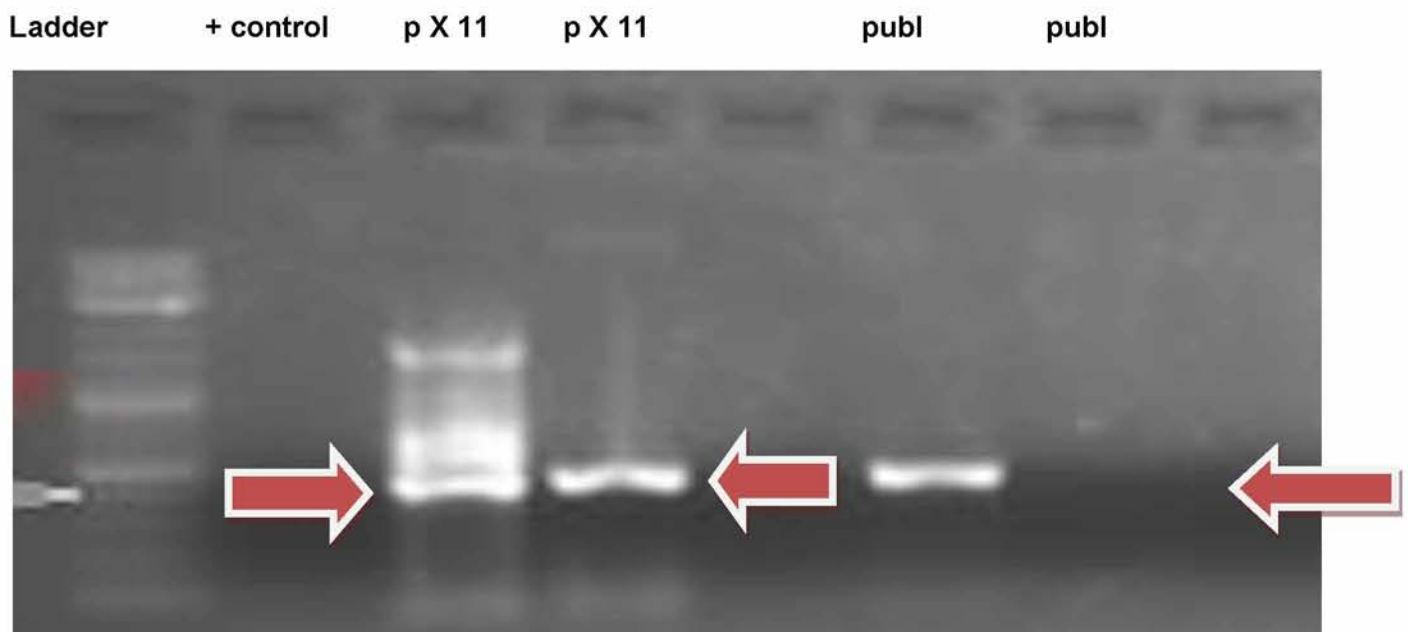
- PCR για έλεγχο πιστότητας των εκκινητών και εντοπισμό στο πλασμίδιο pX11:



Για τον 35S εκκινητή πήραμε προϊόν ~ 500bp, για τον MjcDOPA5Gt αντίστοιχα ~1000bp καθώς και για τον BvDODA1 ~500bp και τον CYP76AD1 ~100bp. Άρα, και οι 4 εκκινητές είναι κατάλληλοι για χρήση καθώς λειτουργούν και για τις 4 περιοχές που σχεδιάστηκαν και μετά από πέψη στο πλασμίδιο pX11 δίνουν τις αναμενόμενες ζώνες .

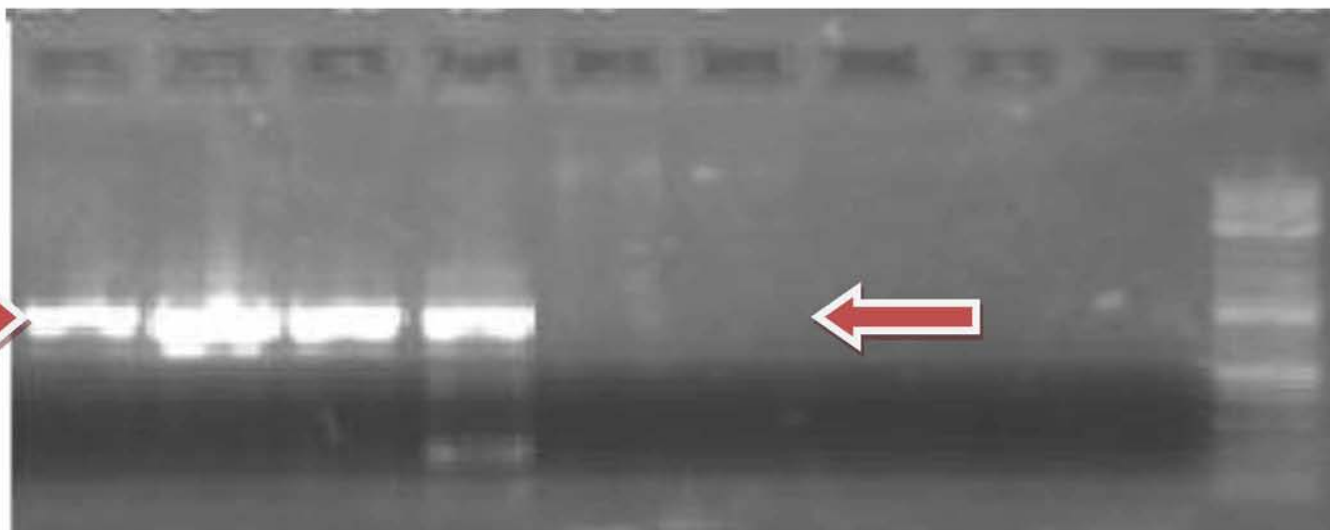
- Κάναμε PCRs με διαφορετικούς εκκινητές όπως φαίνονται παραπάνω και πήραμε τα αποτελέσματα που φαίνονται στην εικόνα ακριβώς κάτω ( gel 1% agarose/100ml) :

A. Για τον εκκινητή 35S στα μετασχηματισμένα με pX 11 πλασμίδιο φυτά (είτε που λήφθηκαν από τρυβλίο ανάπτυξης είτε σε επόμενο αναπτυξιακό στάδιο/ φύτεμα) παίρνουμε την αναμενόμενη ζώνη ~500bp ενώ στα publ φυτά (ομοίως σε ανάπτυξη σε τρυβλίο και φυτεμένα) όπως αναμένεται δεν έχουμε προϊόν:



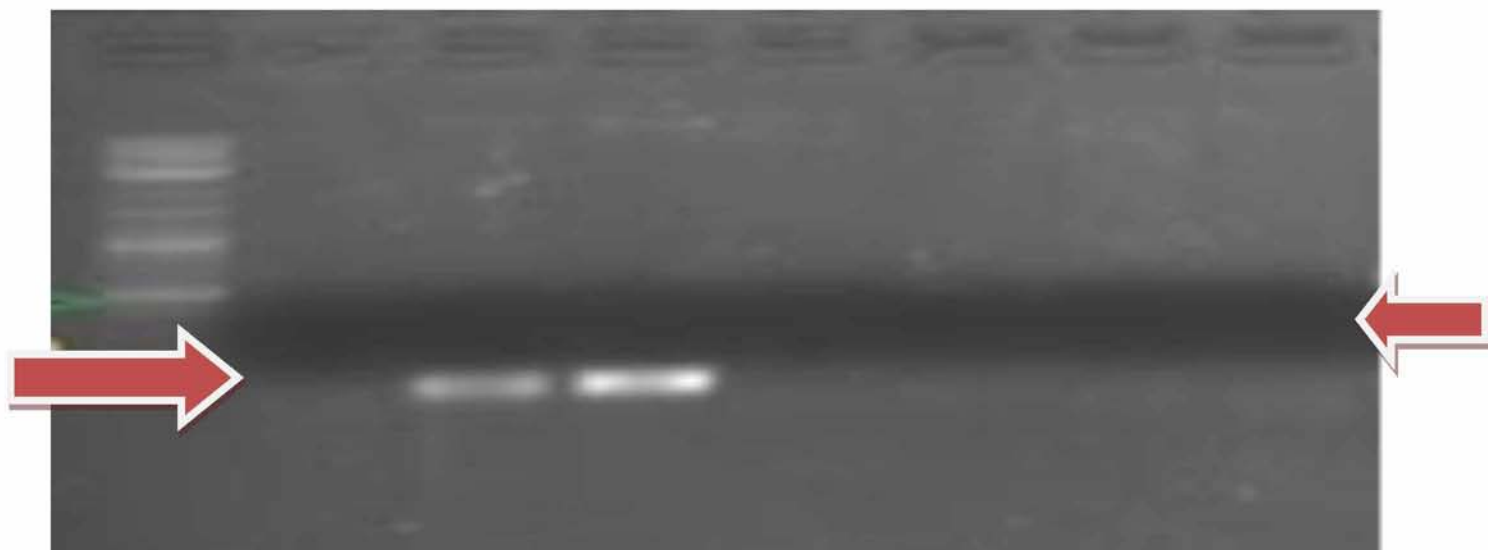
Β. Για τον εκκινητή MjcDOPA5Gt ομοίως εμφανίζεται μπάντα ~1000bp μόνο στα φυτά που αναμένεται (μετασχηματισμένα με pX 11) και σε κανένα από τα κοντρόλ (+: σκέτο πλασμίδιο, - : φυτά χωρίς πλασμίδιο) :

p X 11    p X 11    p X 11    p X 11    publ    publ    +control    -control    -control    ladder



Γ. Για τον εκκινητή CYP76AD1 επίσης τα αποτελέσματα επαληθεύονται αφού εμφανίζεται ζώνη ~100bp στα μετασχηματισμένα με pX 11 πλασμίδιο φυτά και όχι στα υπόλοιπα:

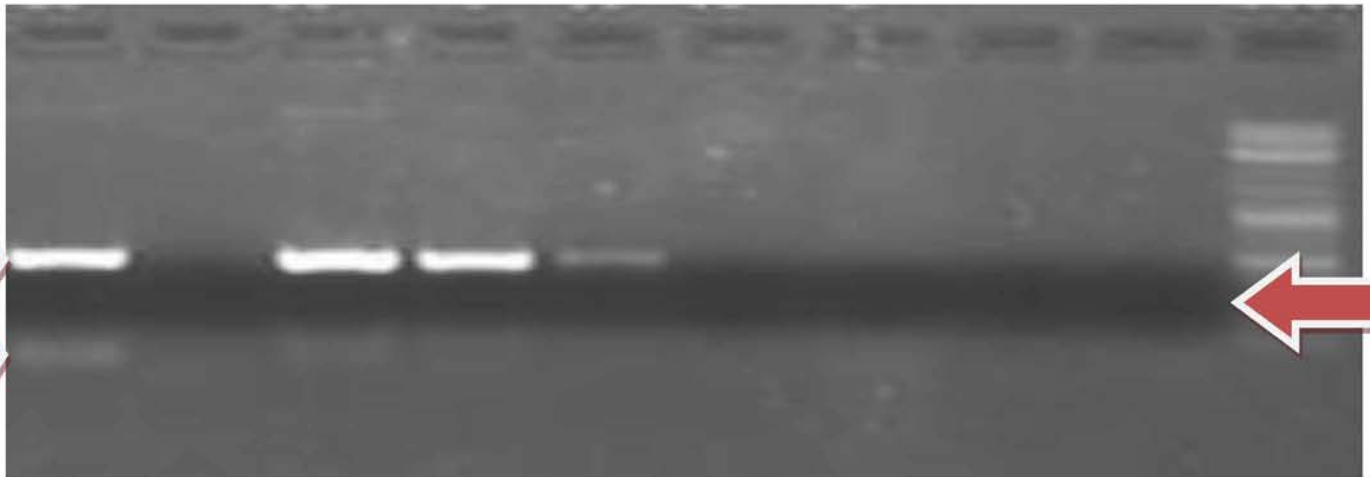
Ladder    + control    p X 11    p X 11    p X 11    publ    publ    publ





Δ. Τέλος, και για τον εκκινητή BvDODA1 τα αποτελέσματα αντίστοιχα επαληθεύουν μόνο τα μετασχηματισμένα με pX 11 φυτά εμφανίζοντας μπάντα ~500bp και καμία μπάντα στα κοντρόλ φυτά:

p X 11 + control p X 11 p X 11 p X 11 publ publ publ - control ladder



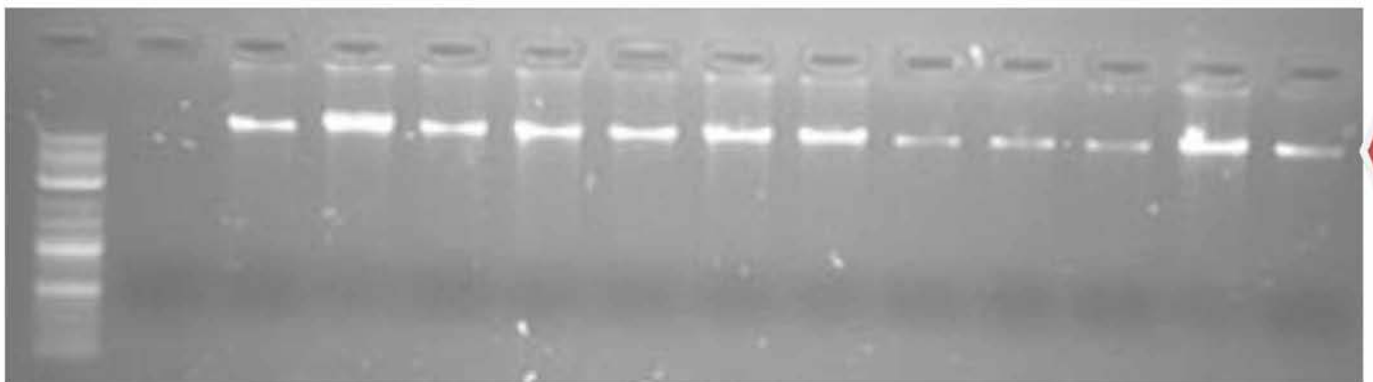
- Η θερμοκρασία για την PCR 35S + MjcDOPA5Gt ήταν 55 °C και για την PCR CYP76AD1 + BvDODA1 ήταν 53° C.

Και από τα τέσσερα πρότυπα γίνεται ταυτοποίηση του εντοπισμού του πλασμιδίου pX 11 στα μετασχηματισμένα φυτά καθώς ελέγχονται διάσπαρτες περιοχές του ( μέσω των τεσσάρων περιοχών που ενισχύονται) και άρα θεωρείται ότι έχει ενσωματωθεί το σύνολο του γενωμικού υλικού του πλασμιδίου.

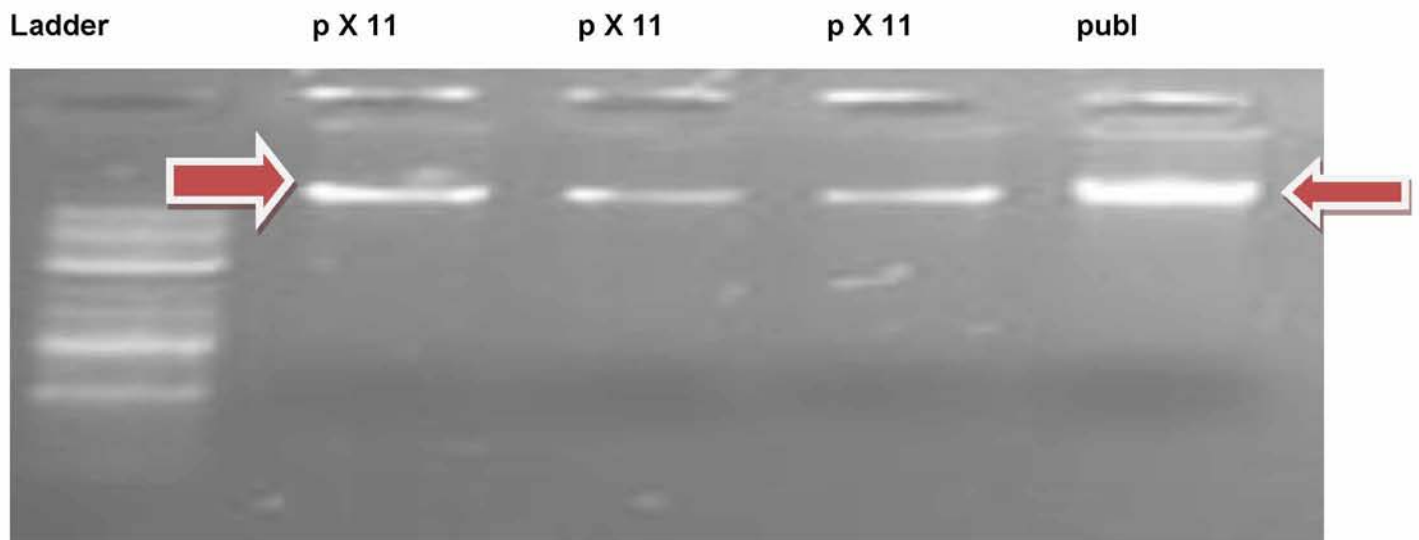
- Στη συνέχεια ταυτοποιήσαμε την ύπαρξη DNA μετά από απομόνωση DNA από τις ρίζες και ηλεκτροφορήσαμε σε gel 1% agarose.

Αποτελέσματα γενετικού υλικού ριζών μετασχηματισμένων φυτών που φυτεύτηκαν :

Ladder pX11 pX11 pX11 pX11 pX11 pX11 pX11 pX11 pX11 pX11 publ publ publ publ



Αποτελέσματα γενετικού υλικού ριζών μολυσμένων που περιέχουν την κατασκευή pX11.

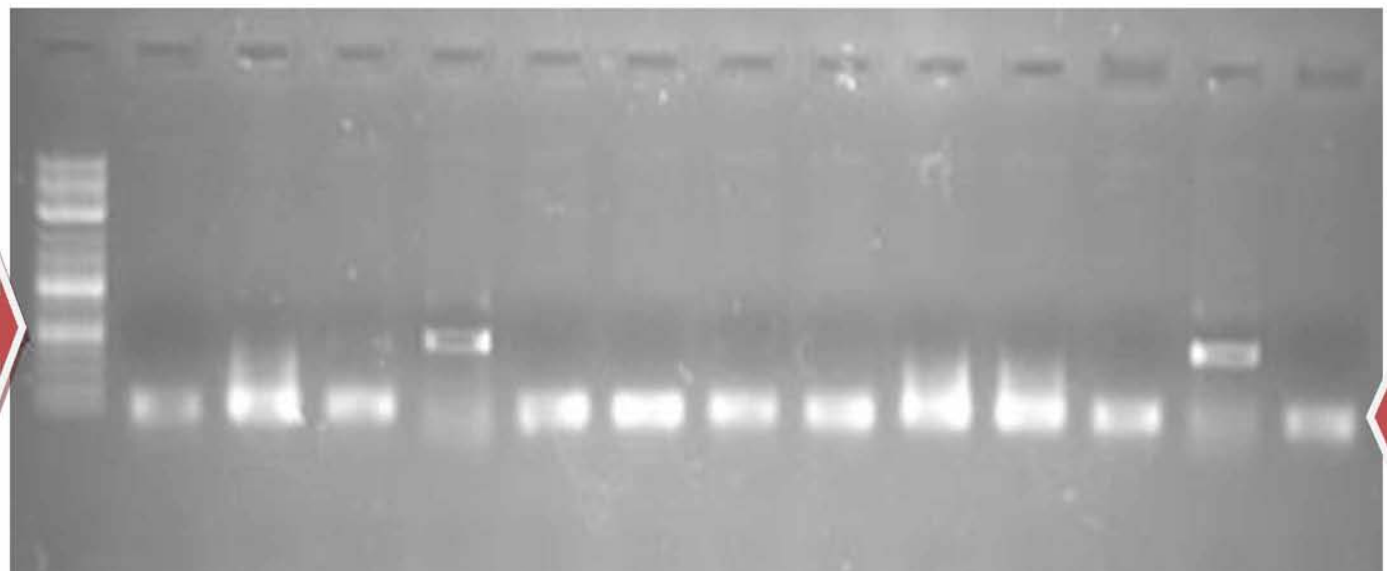


Αφού παρατηρείται ύπαρξη προϊόντος σε όλα τα δείγματα, επιβεβαιώνεται πως μέσω της διαδικασίας απομόνωσης του γενετικού υλικού είχαμε το αποτέλεσμα που περιμέναμε και άρα όλα τα δείγματα περιέχουν DNA και άρα η μη ύπαρξη ζώνης σε επόμενο στάδιο δε θα ευθύνεται στην απουσία γενετικού υλικού.

- Τέλος, κάναμε επαναληπτική PCR με 35S εκκινήτες για να δούμε αν τα φυτά ήταν μετασηματισμένα και τρέξαμε επίσης σε gel 1% agarose:

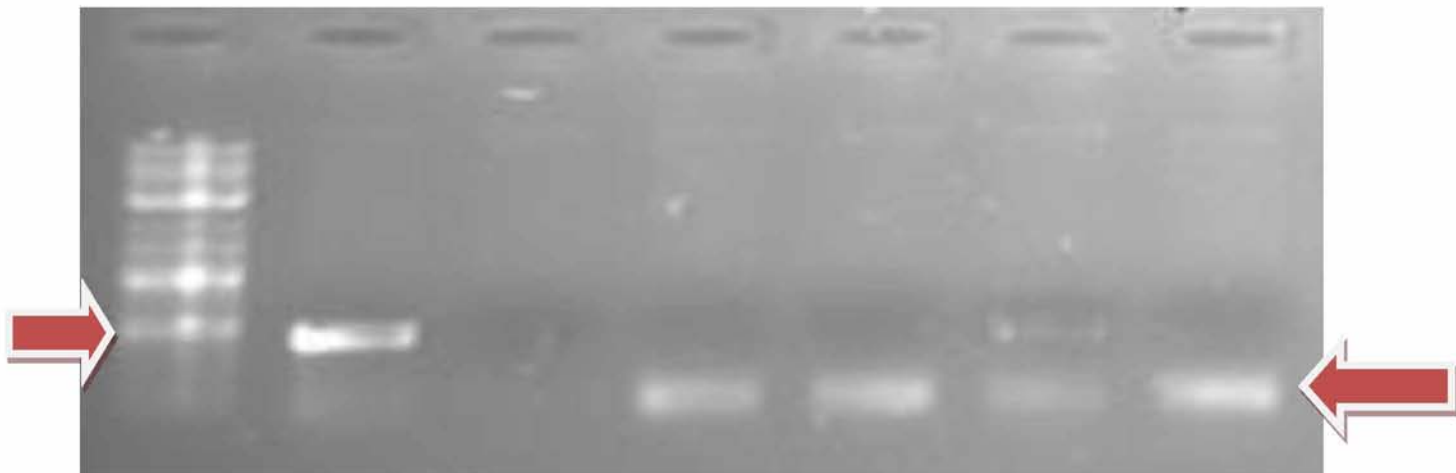
Αποτελέσματα γενετικού υλικού ριζών μετασηματισμένων φυτών που φυτεύτηκαν :

Ladder	pX11	pX11	pX11	pX11	pX11	px11	pX11	pX11	pX11	publ	publ	publ	publ



Αποτελέσματα γενετικού υλικού ριζών που ήταν μολυσμένα αλλά είχαν ανασυνδυαστεί με το πλασμίδιο.

Ladder + control - control pX11 pX11 pX11 publ



Εδώ πιστοποιείται η ύπαρξη DNA στο γενετικό υλικό των δειγμάτων που είχαν απομονωθεί σε προηγούμενο στάδιο. Άρα, τα φυτά που μελετήθηκαν ήταν επιτυχώς ανασυνδυασμένα.

Ανακεφαλαιώνοντας, από το σύνολο των αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι όλες οι διαδικασίες ήταν επιτυχείς καθώς το πλασμίδιο μετασχημάτισε τα *E.coli* και πιθανότατα και τα *A.rhizogenes* βακτήρια αν και σε αυτά δεν κάναμε έλεγχο εντοπισμού του πλασμιδίου αλλά οι πέψεις στα ανασυνδυασμένα φυτά με pX11 ήταν οι αναμενόμενες. Συνεπώς ο μετασχηματισμός των βακτηρίων όσο και μετέπειτα των φυτών που μετασχηματίστηκαν με αυτά είναι επιτυχής αλλά παρόλα αυτά, ο φαινότυπος «κόκκινης ρίζας» δεν εμφανίστηκε.

## 7.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Λόγω της μεγάλης οικονομικής σημασίας της παραγωγής βηταλαϊνών με παραδοσιακά μέσα από τις φυσικές τους πηγές, μια βιοτεχνολογική διαδικασία είναι πιο πιθανό να πετύχει με κυτταρικές σειρές ικανές να παράγονται υψηλά επίπεδα εκείνων των χρωστικών ουσιών που συσσωρεύονται μόνο σε χαμηλά επίπεδα σε ολόκληρο το φυτό. Επιπρόσθετα, η έκφραση των βηταλαϊνών σε ένα τόσο καλό φυτικό μοντέλο θα ισχυροποιήσει και άρα και όλα τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από το συγκεκριμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι. Ειδικότερα, θα ισχυροποιηθούν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες και η δυνατότητα σάρωσης των ριζών για προστασία έναντι διαταραχών σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες και μέσω της αύξησης των επιπέδων της L-Dopa θα υπάρχουν περισσότερα μόρια που μετά την απομόνωση τους θα είναι ικανά για αντιμετώπιση της ασθένειας του Parkinson.



Επιπλέον, θα είναι εύκολα διαθέσιμες ουσίες που περιέχονται στις βηταλαΐνες και επάγουν πιο στοχευμένη καταπολέμηση φλεγμονής σε κυτταρικό επίπεδο και προστασία από αυτοάνοσα νοσήματα καθώς και άλλα μόρια που βοηθούν στη μείωση των επιπέδων LDL και την αύξηση της συγκέντρωσης διαφόρων μικροθρεπτικών και ποσοτήτων καλίου και μαγνησίου. Για αυτό και χρήζει περαιτέρω έρευνας η ετερόλογη έκφραση του συγκεκριμένου βιοσυνθετικού μονοπατιού έκφρασης των βηταλαΐνων. Ένα καλό παράδειγμα αυτού θα ήταν η *in vitro* παραγωγή βηταλαΐνων χρησιμοποιώντας φυτά του γένους *L.japonicus* που είναι ιδιαίτερα εύχρηστα λόγω του μικρού χρόνου ανάπτυξης τους του εύκολου μετασχηματισμού τους και του χαμηλού κόστους επεξεργασίας τους. Μέσω της εφαρμογής των σχετικά απλών τεχνικών που περιγράφηκαν, θα μπορούσε να προβλεφθεί, εκτός από το ρόλο τους ως χρωστικές τροφίμων, η χρησιμοποίηση των βηταλαΐνων ως μέσο για την εισαγωγή των απαραίτητων διαιτητικών αμινοξέων σε τρόφιμα. Παρόλα αυτά, παρατηρούμε πως αν και με κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές εισήχθησαν τα γονίδια στις ρίζες του φυτού *L.japonicus*, τα φυτά δεν εμφάνισαν τον επιθυμητό φαινότυπο «κόκκινης ρίζας». Όσον αφορά το μετασχηματισμό οι αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκαν πιστοποιούν πως είναι επιτυχής αλλά παρά το γεγονός αυτό δεν παρατηρείται φαινοτυπική έκφραση.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η αδυναμία εμφάνισης του φαινοτύπου «κόκκινη ρίζα» στα φυτά *L.japonicus* δε σχετίζεται με μη πραγματοποίηση του μετασχηματισμού αλλά θα έπρεπε να λάβουμε υπόψη άλλες παραμέτρους. Κατά κύριο λόγο θα πρέπει σε μελλοντικές μελέτες πριν από οτιδήποτε άλλη παράμετρο να εξεταστεί η καταλληλότητα του γενικού εκκινητή 35S καθώς εκ των υστέρων παρατηρήθηκε σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές πως λειτουργεί σωστά στα περισσότερα φυτικά είδη και κυρίως στο πειραματικό μοντέλο *A.thaliana* αλλά όχι στα ψυχανθή όπως το *L.japonicus*. Ένας καλός αντικαταστάτης θα μπορούσε να είναι ο ιδιοσυστατος υποκινητής ουβικουϊτίνης του *L.japonicus* και χρήζει να ελεγχθεί κατά την ετερόλογη έκφραση του βιοσυνθετικού μονοπατιού των βηταλαΐνων. Παραδείγματος χάρη, ίσως η κατασκευή του πλασμιδίου να μην είναι κατάλληλη για έκφραση στο συγκεκριμένο τύπου φυτού και για αυτό σε επόμενα πειράματα θα βοηθούσε να ελεγχθεί περαιτέρω ώστε σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο ώστε να μην παρεμποδίζεται η εμφάνιση του φαινοτύπου μέσω πρωτεϊνών διαφορετικών ανάμεσα στα φυτικά είδη. Ακόμη, η παρουσία ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των βηταλαΐνων όσο και καταβολικών ενζύμων θα βοηθούσε να ελεγχθεί πριν πιθανή επανάληψη. Επιπρόσθετα, κάτι ανάλογο θα μπορούσε να γίνει και σε

μεταγραφικό επίπεδο μέσω εντοπισμού και σύγκρισης των διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων κάθε είδους ώστε να υπάρχουν οι κατάλληλοι για το συγκεκριμένο φυτικό στέλεχος και όχι για άλλα φυτά που δοκιμάστηκε και άλλες μελέτες. Έτσι, θα ήταν πολύ χρήσιμο το πλασμίδιο που θα εισαχθεί σε επόμενες μελέτες να έχει υποκινητές γονιδίων που δουλεύουν σταθερά στο *L.japonicus*. Επιπλέον, αξίζει να μελετηθεί και ο υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών που φέρει το πλασμίδιο και να εντοπιστεί ή όχι η ύπαρξη τους σε κυτταρικό επίπεδο και όχι απλά να πιστοποιηθεί η πιστότητα του μετασχηματισμού και ο εντοπισμός της γενετικής πληροφορίας καθώς και η μη εμφάνιση του φαινοτύπου «κόκκινη ρίζα». Τέλος, στην συγκεκριμένη περίπτωση, παρατηρήθηκαν αρκετές μολύνσεις σε ριζικό επίπεδο και σημαντικό θα ήταν πριν οποιαδήποτε άλλη ενέργεια να επαναληφθεί περισσότερες φορές από ότι ήδη έγινε η διαδικασία όπως έχει σχεδιαστεί ώστε να σιγουρευτούμε πως η έκφραση του φαινοτύπου δεν καταστέλλεται λόγω αλλοίωσης των ριζικών ιστών που μετασχηματίστηκαν.

Καταλήγοντας, αξίζει να τονιστεί πως η έκφραση του πλασμιδίου pX 11 που επάγει τη σύνθεση βηταλαϊνών είναι ιδιαίτερης σημασίας για τους λόγους που περιγράφηκαν και παραπάνω. Ειδικά σε ένα φυτό- μοντέλο με τα χαρακτηριστικά του *L.japonicus* δε θα έπρεπε η πειραματική διεργασία να σταματήσει εδώ αλλά να συνεχιστεί μέχρις ότου να υπάρξουν περισσότερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

## **8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ *L.japonicus*

Handberg, K., and Stougaard, J. (1992). Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. Plant Journal. 2:487-496.

Hayashi M, Miyahara A, Sato S, Kato T, Yoshikawa M, Taketa M, Hayashi M, Pedrosa A, Onda R, Imaizumi-Anraku, Bachmair A, Sandal N, Stougaard J, Murooka Y, Tabata S, Kawasaki S, Kawaguchi M and Harada K. (2001) Construction of a genetic linkage map of the model legume Lotus japonicus using an intraspecific F2 population. DNA Research 8:301-310.



Masayoshi Kawaguchi, Andrea Pedrosa-Harand, Koji Yano, Makoto Hayashi, Yoshikatsu Murooka, Katsuharu Saito, Toshiyuki Nagata, Kiyoshi Namai, Hiroshi Nishida, Daisuke Shibata, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Masaki Hayashi, Kyuya Harada, Niels Sandal, Jens Stougaard, Andreas Bachmair, and William F. Grant (2005) Lotus burtii Takes a Position of the Third Corner in the Lotus Molecular Genetics Triangle; DNA Res.; 12: 69 - 77.

#### BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ HAIRY ROOT

Arroo RRJ, Develi A, H Meijers, E Van de Westerlo, Kemp AK, Croes AF 1995. Effect of exogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in Tagetes patula hairy root cultures. *Physiol Plant*, Volume 93, Issue 2, pages 233–240.

Akiyoski, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W. & Gordon, M. P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5994-5999g.

Ayora-Talavera T, Chappell J, Lozoya-Gloria E, Loyola-Vargas VM 2002. Overexpression in Catharanthus roseus hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. *Appl Biochem Biotechnol*. 2002 Feb;97(2):135-45.

Banerjee S1, Shang TQ, Wilson AM, Moore AL, Strand SE, Gordon MP, Lafferty Doty S 2002. Expression of functional mammalian P450 2E1 in hairy root cultures. *Biotechnol Bioeng*. 15;77(4):462-6.

Barry, G. F., Rogers, S. G., Fraley, R. T. & Brand, L. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4776-4780.

Boisson-Dernier A, Andriankaja A., Chabaud M., Niebel A., Journet E.-P., Barker D. and de Carvalho-Neibel F. (2005) MtENOD11 gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 18: 1269-76.

Braun, A. C. (1958) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 344-349.

Buchmann, I., Marner, F.-J., Schroder, G., Waffenschmidt, S. & Schroder, J. (1985) EMBO J. 4,853-859.



Chabaud M, Boisson-Dernier A, Zhang J, Taylor CG, Yu O and Barker DG 2006. *Agrobacterium rhizogenes-mediated root transformation*. *Medicago truncatula* handbook version November 2006. Διαθέσιμο από:

Chilton, M.-D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P. & Nester, E. W. 1977. *Cell* 11, 263-271.

Chilton, M.-D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. & Tempe, J. 1982. *Nature* (London) 295, 432-434.

Crane C., Wright E., Dixon R.A. and Wang Z.-Y. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223: 1344-1354.

Costantino, P., Spano, L., Pomponi, M., Benvenuto, E. & Ancora, G. (1984)

De Paolis, A., Mauro, M. L., Pomponi, M., Cardarelli, M., Spano, L. & Costantino, P. (1985) *Plasmid* 13,1-7.

Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P. and Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962-966.

Furner I, Huffman G, Amasino R, Garfinkel D, Gordon M, Nester E. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature*. 1986;319:422–427.

Garfinkel, D. J., Simpson, R. B., Ream, L. W., White, F. F., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1981) *Cell* 27, 143-153.

Hu Z-B, Du M 2006. Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. vol. 48, no. 2, pp. 121-127.

*J. Mol. Appl. Genet.* 2,465-470.

Jouanin, L. (1984) *Plasmid* 12, 91-102.

Limami, M. A., Sun, L.-Y., Douat, C., Helgeson, J., & Tepfer, D. (1998). Natural Genetic Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* : Annual Flowering in Two Biennials, Belgian Endive and Carrot. *Plant Physiology*, 118(2), 543–550.

Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., Bisseling T. and Geurts R. (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 55: 983-92.

Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ané, J.M., Laubert, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C. and Debelle, F. (2004). A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependant protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364.

Meyer AD, Takanari I, Meins F., Jr Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene. *Mol Gen Genet.* 1995;249:265–273.

Mireille Chabaud, Aurélien Boisson-Dernier, Juan Zhang, Christopher G. Taylor, Oliver Yuand David G. Barker ,November 2006. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation.

Offringa I.A., Melchers L.S., Regensburg-Tuink A.J.G., Costantino P., Schilperoort R.A., and Hooykaas P.J.J. 1986. Genetics Complementation of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing aux mutants by genes from the TR-region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* (hairy root disease/phytohormones).*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 83, pp.6935-6939.

Ooms, G., Hooykaas, P. J. J., Moolenaar, G. & Schilperoort, R. A. (1981) *Gene* 14, 33-50.

Riker, AJ 1930. *J. Agric. Res.* (Lahore) 41, 507-540.

Schroder, O., Waffenschmidt, S., Weiler, E. W. & Schroder, J. (1984) *Eur. J. Biochem.* 138, 387-391.

Skoog, F. & Miller, C. O. (1957) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131.

Spano, L., Pomponi, M., Costantino, P., Van Slogteren, G. M. S. & Tempe, J. 1982. *Plant Mol. Biol.* 1, 291-300.

Thomashow, L. S., Reeves, S. & Thomashow, M. F. (1984) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 81, 5071-5075.

Tepfer, D. A. & Tempe, J. (1981) *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D* 292, 153-156.

Tepfer, D. (1984) *Cell* 37, 959-967.

Tepfer D (1982) La transformation génétique de plantes supérieures par *Agrobacterium rhizogenes*. In 2e Colloque sur les Recherches Fruitières. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Bordeaux, France, pp 47–59.

Tepfer D (1983) The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In A Puhler, ed, *Molecular Genetics of the Bacteria Plant Interaction*. Springer Verlag, Berlin, pp 248–258.

Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*. 1984;37:959–967.

White F, Garfinkel D, Huffman G, Gordon M, Nester E. Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature*. 1983;301:348–350.

Willmitzer, L., Simons, G. & Schell, J. 1982. *EMBO J.* 1, 139-146.

Willmitzer, K., Sanchez-Serrano, J., Buschfeld, E. & Schell, J. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186, 16-22.

White, F. F., Garfinkel, D. J., Huffman, G. A., Gordon, M. P. & Nester, E. W. 1983) *Nature (London)* 301, 348-350.

White, F. F. & Nester, E. W. (1980) *J. Bacteriol.* 144, 710-720.

Huffman, G. A., White, F. F., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1984) *J. Bacteriol.* 157, 269-276.

<https://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/AgrobacteriumRhizogenes.pdf>

#### BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ σ X 11

Azeredo HMC. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 44: 2365–2376.

Francis FJ 1999. *Colorants*. Egan Press. ISBN 1-891127-00-4.

Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology* 57: 761–780.



Moreno DA, Garcia-Viguera C, Gil JL, Gil-Izquierdo A. 2008. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Reviews* 7: 261–280.

Nagatsu T, Sawada M. 2009. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism & Related Disorders* 15: S3–S8.

Polturak G, Breitel D, Grossman N, Sarrion-Perdigones A, Weithorn E, Pliner M, Orzaez D, Granell A, Rogachev I, Aharoni A 2015. Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.13796. [Epub ahead of print]

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE 2004. *Biology of Plants* (7th ed.). New York: W. H. Freeman and Company. p. 465. ISBN 0-7167-1007-2.

Salisbury FB, Cleon WR 1991. *Plant Physiology* (4th ed.). Belmont, California: Wadsworth Publishing. pp. 325–326. ISBN 0-534-15162-0.

Stafford, HA 1994. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science* 101 (2): 91–98. doi:10.1016/0168-9452(94)90244-5. ISSN 0168-9452. Retrieved 20 May 2013

Stintzing F, Carle R. 2007. Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends In Food Science & Technology* 18: 514–525.

Strack D, Vogt T, Schliemann W 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62 (3): 247–69. doi:10.1016/S0031-9422(02)00564-2. PMID 12620337.

Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* 54: 733–749.

Trevor R 1963. *The Organic Constituents of Higher Plants*. Minneapolis: Burgess Publishing. p. 292.

#### BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ ΒΗΤΑΛΑΪΝΕΣ

Ashwini Gengatharan, Gary A. Dykes, Wee Sim Choo, 2015, Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods

J. A. Fernández-López, R. Castellar, J. M. Obón, L. Almela, 2012, Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears

Mohammad Imtiyaj Khan, 2015, Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability

Roland R. Leathers, Catherine Davin, Jean Pierre Zryd, 1992, Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. Var. bikores monogerm (red beet),