



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για τον μετασχηματισμό του φυτού
Trigonella foenum-graecum (τσιμένι)

Developing a transformation protocol for the crop legume
plant *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek)

Διπλωματική εργασία
Γεωργοπούλου Μαρία-Ελένη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επιβλέπουσα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. Καρπούζας Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Πρόεδρος στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με την περάτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας που ήταν αποτέλεσμα εκτενούς αναζήτησης και έρευνας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που χωρίς την συμβολή τους δεν θα υφίστατο η εργασία αυτή.

Θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και στον Δρ. Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο για την αμέριστη εμπιστοσύνη, στήριξη και βοήθεια –πειραματική και ψυχολογική- που μου παρείχαν. Το ενδιαφέρον, οι συμβουλές και οι παρατηρήσεις τους υπήρξαν για μένα πολύτιμα αγαθά καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και αποτέλεσαν σημαντική επιρροή και για οποιαδήποτε μελλοντική σπουδή ή επαγγελματική μου ενασχόληση. Είμαι ευγνώμων για όλες τις ευκαιρίες που μου δόθηκαν κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, για τη παρουσία μου στο συνέδριο 'International Conference on Natural Products Utilization' και στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα 'Η βιολογία πάει...στο Νηπιαγωγείο'.

Επιπλέον επιθυμώ να ευχαριστήσω από καρδιάς την Δρ. Stedel Catalina, την Δρ. Σκιαδά Βασιλική, την Μπεριτζά Κωνσταντίνα καθώς και τα υπόλοιπα μέλη-συναδέλφους του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία καθώς επίσης και για τις πάντοτε καλοπροαίρετες συμβουλές τους για προβλήματα που έτυχε να αντιμετωπίσω κατά την εκπόνηση του πειραματικού σκέλους της πτυχιακής μου εργασίας. Οι κοινές συναντήσεις όλων των μελών του εργαστηρίου ήταν πολύτιμα εκπαιδευτικές και επικοδομητικές για την απόκτηση γνώσεων και για την εξέλιξη του ερευνητικού μου πνεύματος.

Δεν θα μπορούσα να παραβλέψω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε επιλογή, σε κάθε χαρά και κάθε στεναχώρια και που με στήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.1 Σκοπός διατριβής.....	7
1.2 <i>Trigonella foenum-graecum</i> (τριγωνέλλα ή τσιμένι)	7
1.3 Μέθοδος μετασχηματισμού hairy-root και ιστοκαλλιέργειες ρίζας.....	9
1.4 Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)	10
1.5 Τριτερπενοειδείς σαπωνίνες στο φυτό <i>Medicago truncatula</i>	11
1.6 TSAR1 και TSAR2: μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποίησης της βιοσύνθεσης των σαπωνινών.....	11
2. Υλικά και μέθοδοι	13
2.1 Απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5A (mini prep-alkaline lysis)	13
2.2 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων και άμεσος μετασχηματισμός Αγροβακτηρίων	14
2.3 Hairy-root μετασχηματισμός του φυτού <i>Trigonella foenum-graecum</i> (τριγωνέλλα) μέσω <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
2.4 Απομόνωση DNA με τη χρήση της μεθόδου CTAB.....	17
2.5 Ποσοτικοποίηση απομονωμένου DNA από τους ιστούς ρίζας με τη χρήση της μεθόδου Qubit	18
2.6 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)	18
3. Αποτελέσματα	20
3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού φορέα pUB-GWS-GFP	20
3.2 Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού hairy-roots των φυτών <i>Trigonella foenum-graecum</i>	20
3.3 Απομόνωση πλασμιδιακών φορέων TSAR1, TSAR2 και pUB-GW-Hyg	24
4. Συζήτηση	30
5. Βιβλιογραφία	33

Περίληψη

Το φυτό *Trigonella foenum-graecum* (τριγωνέλλα) είναι ένα ετήσιο όσπριο με καταγωγή από τις περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου και την Ινδία. Είναι ένα φυτό πολλαπλών χρήσεων, του οποίου οι σπόροι και τα φύλλα χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα ως μπαχαρικά, αρωματικοί παράγοντες και τροποποιητές της υφής ενώ οι σπόροι χρησιμοποιούνται επίσης εκτενώς λόγω των θεραπευτικών, φαρμακευτικών και θρεπτικών ιδιοτήτων τους, λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε βιοδραστικά φλαβονοειδή και φυτοστερόλες. Η τριγωνέλλα μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό στόχο της συνθετικής βιολογίας για την ενίσχυση της παραγωγής τέτοιων σημαντικών εξειδικευμένων μεταβολιτών. Ο κύριος στόχος αυτής της μελέτης ήταν να σχεδιαστεί ένα αποτελεσματικό πρωτόκολλο γενετικού μετασχηματισμού της τριγωνέλλας μέσω της χρήσης αγροβακτηρίου. Για το σχηματισμό διαγονιδιακών ριζών (hairy-roots) των φυτών τριγωνέλλας χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη *Agrobacterium rhizogenes*, ARQUA και LBA9402. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα διαφορετικά ποσοστά σχηματισμού κάλλων και αναγέννησης ριζών στα επιμολυσμένα φυτά. Το *A. rhizogenes* ARQUA έδειξε μεγαλύτερο ποσοστό αναγέννησης ριζών καθώς επίσης και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού σε σύγκριση με το στέλεχος LBA9402. Επιπλέον, τα φυτά τριγωνέλλας επιμολύνθηκαν με *A. rhizogenes* ARQUA μετασχηματισμένο με δυαδικό φορέα που περιέχει τα *TSAR1* και *TSAR2* γονίδια του φυτού *Medicago truncatula*. Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες με δομή έλικα-βρόχος-έλικα, που διεγείρουν επιλεκτικά την έκφραση των ενζύμων που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης του μεβαλονικού οξέος και των τριτερπενοειδών σαπωνινών, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ενώσεων αυτών στο *M. truncatula*. Κατά συνέπεια, με την ετερόλογη έκφραση των *MtTSARs* θα ελεγχθεί εάν το μονοπάτι σηματοδότησης στο οποίο συμμετέχουν οι *TSARs* είναι συντηρημένο στην τριγωνέλλα και αν μπορεί να διεγερθεί η παραγωγή των στεροϊδών σαπωνινών με την αύξηση του προδρόμου, μεβαλονικού οξέος.

Abstract

Trigonella foenum-graecum (fenugreek) is an annual legume originating in the Eastern Mediterranean region and India. It is a multi-purpose plant whose seeds and leaves are used in food as spice, flavoring agents and texture modifiers, and whose seeds are also used extensively for their medicinal, pharmaceutical and nutraceutical properties, due to their high content in bioactive flavonoids and phytosterols. Thus fenugreek is a significant target of biological engineering, with the aim of enhancing production of such valuable specialized metabolites. The main objective of this study was to design an efficient *Agrobacterium* mediated fenugreek transformation protocol. Hairy root cultures of fenugreek seedlings were established by two *Agrobacterium rhizogenes* strains, ARQUA and LBA9402. This resulted in different percentages of callus and root formation in the inoculated fenugreek seedlings. *A. rhizogenes* ARQUA showed greater root regeneration percentage as well as greater efficiency of hairy roots transformation compared to the LBA9402 strain. Furthermore, as an additional proof of principle, fenugreek seedlings were inoculated with *A. rhizogenes* ARQUA containing *Medicago truncatula* *TSAR1* and *TSAR2* expression constructs. These are basic helix-loop-helix transcription factors that selectively induce the expression of enzymes involved in mevalonate and triterpene saponin biosynthesis, resulting in the accumulation of the latter compounds in *M. truncatula*. Thus heterologous expression of *MtTSARs* will test whether *TSAR*-mediated signaling is conserved in fenugreek and could stimulate the production of steroid saponins by increasing the supply of their precursor mevalonate.

1. Εισαγωγή

1.1 Σκοπός διατριβής

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αρχικά η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου επιτυχούς μετασηματισμού του φυτού *Trigonella foenum-graecum* με την διαμεσολάβηση του *Agrobacterium rhizogenes* και έπειτα η ετερόλογη έκφραση των *MiTSARs* (*TSAR1* και *TSAR2*) με στόχο να ελεγχθεί εάν το μονοπάτι σηματοδότησής τους είναι συντηρημένο στην τριγωνέλλα και αν μπορεί να διεγερθεί η παραγωγή των στεροειδών σαπωνινών με την αύξηση του προδρόμου μεβαλονικού οξέος.

1.2 *Trigonella foenum-graecum* (τριγωνέλλα ή τσιμένι)

Το φυτό *T. foenum-graecum* είναι ένα δικοτυλήδονο φυτό που ανήκει στην οικογένεια Fabaceae. Σύμφωνα με τους Darlington and Wylie (1945) διαθέτει $2n=16$ χρωμοσώματα ενώ οι Joshi and Raghuvanshi (1968) ανακάλυψαν την παρουσία B-χρωμοσωμάτων σ' αυτό. Το όνομα του, *Trigonella*, το δανείστηκε από την Λατινική γλώσσα και σημαίνει «μικρό τρίγωνο» λόγω των μικρών κιτρινωπών-άσπρων τριγωνικών ανθών του (Flammang et al. 2004) ενώ το επίθετο που χαρακτηρίζει το είδος, *foenum-graecum*, σύμφωνα με τον Rosengarten (1969) σημαίνει «Ελληνικό χόρτο». Είναι αυτόχθον στις χώρες που συνορεύουν με τις ανατολικές ακτές της Μεσογείου ενώ επίσης καλλιεργείται και σε άλλες χώρες όπως η Αίγυπτος, η Ινδία και το Μαρόκο. Αν και οι κύριες περιοχές καλλιέργειας της τριγωνέλλας συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες χώρες του κόσμου, η κατανομή της καλλιέργειας είναι ευρεία, αποδεικνύοντας ότι ένα από τα χαρακτηριστικά της είναι η προσαρμογή της σε μεταβλητές συνθήκες και σε αναπτυσσόμενα περιβάλλοντα (Petrooulos 1973, Petrooulos 2002). Χρησιμοποιείται εκτενώς ως μπαχαρικό ή ως τροποποιητής της γεύσης και της υφής των τροφών αλλά πρόκειται επίσης για ένα φυτό που χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς.

Η τριγωνέλλα είναι ένα φυτό που έχει εφαρμοστεί και χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε πολλά παραδοσιακά συστήματα διαφόρων λαών έναντι ασθενειών όπως βρογχίτιδα, πυρετός, πονόλαιμος, διογκωμένους αδένες, ερεθισμούς του δέρματος, διαβήτης, έλκη αλλά και για θεραπείες τραυμάτων. Σύγχρονες έρευνες σχετικά με την τριγωνέλλα έχουν εντοπίσει τα φυσιολογικά γνωρίσματά της αλλά και μια σειρά από οφέλη για την υγεία με εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους με κλινικές δοκιμές. Τις δεκαετίες του '60 και '70 πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιδράσεων των εκχυλισμάτων των σπερμάτων του φυτού σε πειραματόζωα (Bhatt et al. 1958, Abdo & Al-Kafawi 1969). Ένας μεγάλος αριθμός μελετών επιβεβαίωσε με θετικά ευρήματα την αποτελεσματικότητα

των σπερμάτων του φυτού ως λειτουργική τροφή που μπορεί να είναι ευεργετική για την υγεία και έναντι των ασθενειών. Η τριγωνέλλα είναι γνωστή για τις πολλαπλές φαρμακολογικές και θεραπευτικές της ιδιότητες ως αντιδιαβητική, αντιοξειδωτική, υποχοληστερολαιμική, αντινεοπλασματική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδης, αντιπυρετική, ανοσορρυθμιστική, αντιυπεροξειδική και αντι-ελκογόνος (Dixit et al. 2010, Satheeshkumar et al. 2010, Xue et al. 2011).

Τα διαφορετικά δραστικά συστατικά είναι αυτά που προσδίδουν αυτές τις ιδιότητες στο φυτό. Είναι πολύ πιθανό να υπάρχει φυτοχημική συνέργεια μεταξύ διαφόρων μορίων που έχει ως αποτέλεσμα αυτό το ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δράσεων (Kalyan Venkata et al. 2017).

Τα πολυφαινολικά φλαβονοειδή είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες από αυτές τις θεραπευτικές ιδιότητες καθώς είναι υπογλυκαιμικά, υποχοληστερολαιμικά, υποτριγλυκεριδαιμικά και αντι-υπεροξειδωτικά (Gurta & Nair 1999). Η τριγωνέλλα είναι πλούσια σε φαινολικά τα οποία αναστέλλουν την υπεροξειδωση και μειώνουν αξιοσημείωτα την οξειδωτική αιμόλυση ανθρώπινων ερυθροκυττάρων (Rayyan et al. 2010, Belguith-Hadriche et al. 2013). Η από του στόματος λήψη εκχυλίσματος σπερμάτων της τριγωνέλλας (εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα σε βρώσιμα σκευάσματα) δοκιμάστηκε για την μείωση των τριγλυκεριδίων και της χαμηλής πυκνότητας LDL-χοληστερόλης, ενώ αυξάνουν την υψηλής πυκνότητας HDL-χοληστερόλη. Ως εκ τούτου η τριγωνέλλα έχει αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές και υποχοληστερολαιμικές επιδράσεις (Belguith-Hadriche et al. 2013).

Επιπλέον, οι στεροειδείς σαπωνίνες είναι υπεύθυνες για την αντιφλεγμονώδη ικανότητα και την ικανότητα διέγερσης της μήτρας και της γαλουχίας (Petit et al. 1995). Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η τριγωνέλλα έχει την ικανότητα να προωθεί την ανάπτυξη. Η σαπωνίνη I και η διοσγενίνη (diosgenin) που προήλθαν από σπέρματα του φυτού έδειξαν αυξημένη απελευθέρωση αυξητικής ορμόνης από τα κύτταρα της υπόφυσης αρουραίων, γεγονός που καταδεικνύει για πρώτη φορά ότι οι στεροειδείς σαπωνίνες προερχόμενες από την τριγωνέλλα θα μπορούσαν να διεγείρουν την απελευθέρωση αυξητικής ορμόνης σε αρουραίους (Shim et al. 2008).

Οι πολυσακχαρίτες, όπως οι galactomannans έχουν αντιδιαβητικές επιδράσεις (Madar & Shomer 1990) ενώ ένα αμινοξύ η 4-υδροξυϊσολευκίνη έχει δειχθεί πως έχει μιμητικές ιδιότητες ινσουλίνης (Broca et al. 2004). Στην μελέτη των Jin et al. (2014) καταδεικνύεται το νεφροπροστατευτικό και αντιδιαβητικό δυναμικό της τριγωνέλλας. Μείωσε τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα και βελτίωσε νεφρικές λειτουργίες όπως η αλβουμινουρία, η γλυκοζυλιωμένη αιμογλοβίνη (HbA1c), το άζωτο ουρίας του αίματος και τους δείκτες νεφρών σε νεφροπαθείς αρουραίους. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και από μια άλλη ερευνητική ομάδα (Raju et al. 2001) που έδειξαν ότι η σκόνη σπερμάτων τριγωνέλλας επανάφερε στο φυσιολογικό ανωμαλίες που προκαλούνται από τον διαβήτη, όπως για παράδειγμα η αύξηση των ενζύμων της γλυκονογένεσης και της λιπογένεσης στο ήπαρ, με τα νεφρά να επιστρέφουν στα φυσιολογικά επίπεδα.

Πολλά συστατικά της τριγωνέλλας όπως το gingerol, το cedrene, το zingerone, το eugenol και η βανιλίνη, έχουν σημαντικές αντικαρκινικές δράσεις (Al-Daghri et al. 2012). Μάλιστα μια πρόσφατη GC-MS ανάλυση σπερμάτων του φυτού

έδειξε την παρουσία δεκατεσσάρων ενεργών ενώσεων, όπως τα τερπένια και τα φλαβονοειδή συμπεριλαμβανομένων δύο βασικών συστατικών, του σκουαλενίου και της ναρινγενίνης, που παρουσίαζαν αντικαρκινική δράση (Khalil et al. 2015). Σύμφωνα με τη μελέτη των Shabbeer et al. (2009), θεραπεία με εκχυλίσματα τριγωνέλλας έδειξε ανασταλτικές επιδράσεις ανάπτυξης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού, του παγκρέατος και του προστάτη αλλά τα πρωτεύοντα κύτταρα προστάτη ή τα αθάνατα κύτταρα προστάτη παρέμειναν ανεπηρέαστα. Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων από την τριγωνέλλα αποδίδεται στην ικανότητά της να επάγει κυτταρικό θάνατο παρά την ταυτόχρονη ανοδική ρύθμιση των μονοπατιών διέγερσης της ανάπτυξης στα φυσιολογικά κύτταρα.

Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η τριγωνέλλα έχει και αντιμικροβιακή δράση. Στην μελέτη των Haouala et al. (2008) ελέγχθηκε η αντιμυκητιακή δράση υδατικών και οργανικών εκχυλισμάτων από διαφορετικά τμήματα του φυτού, καταλήγοντας ότι το εύρος της αναστολής εξαρτάται από το είδος του μύκητα κι από το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιήθηκε για τη μεταχείρισή του ενώ σε μια ακόμη μελέτη αναφέρεται η αντιβακτηριακή δράση του εκχυλίσματος φύτρων τριγωνέλλας έναντι των βακτηρίων που προκαλούν το βακτηριακό έλκος, *Helicobacter pylori*, προτείνοντας ότι οι λιγότερο πολυμερισμένες ελεύθερες φαινόλες και το φυτοχημικό σκοπολετίνη (παράγωγο κουμαρίνης) δρουν ως τα κύρια δραστικά συστατικά που είναι υπεύθυνα για τη δράση αυτή (Randhir et al. 2004).

1.3 Μέθοδος μετασχηματισμού hairy-root και ιστοκαλλιέργειες ρίζας

Τα φυτά αποτελούν απαραίτητη πηγή για την παραγωγή ενός αριθμού χημικών ουσιών, όπως τα προϊόντα του δευτερογενή μεταβολισμού και τα φυτοχημικά, που βρίσκουν ενδιαφέρον στη βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων και αρωμάτων (Khatodia and Biswas 2014). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται σε μικρές ποσότητες και συχνά συσσωρεύονται σε εξειδικευμένους ιστούς, πχ στα τριχώματα, και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, καθιστώντας δύσκολη την εξαγωγή, την απομόνωση και τον καθαρισμό τους (Kim et al 2002b). Σε πολλές περιπτώσεις, η οργανική σύνθεσή τους δεν είναι οικονομικά αποδοτική και η απομόνωσή τους από τα καλλιεργούμενα φυτά είναι η σημαντικότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για να αποκτηθούν με τον πιο οικονομικό τρόπο (Balandrin et al. 1985, Dicosmo and Misawa 1995). *In vitro* τεχνικές φυτών, στις οποίες φυτικά κύτταρα, ιστοί και όργανα καλλιεργούνται υπό αποστειρωμένες συνθήκες, εντελώς ανεξάρτητα από γεωγραφικούς και κλιματολογικούς παράγοντες, προσφέρουν εναλλακτικές λύσεις για την παραγωγή σημαντικών μεταβολιτών (Kieran 2001).

Η εκμετάλλευση των καλλιεργειών μετασχηματισμένων ριζών (που καλούνται επίσης τριχωτές «ρίζες» κατ' αναλογία με τη φυσική φυτική ασθένεια με το ίδιο όνομα, η οποία προκαλεί μαζική παραγωγή τυχαίων, πολλών στον αριθμό, ριζών) παρουσιάζει μια σχετικά νέα προσέγγιση στη βιοτεχνολογία φυτών (Milen et al. 2007). Το hairy-root είναι η εκδήλωση μιας ασθένειας που αναπτύσσεται από φυτά που έχουν τραυματιστεί και στη συνέχεια μολυνθεί από το εδαφικό gram-

αρνητικό *Agrobacterium rhizogenes*. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε αναρίθμητο αριθμό φυτικών ειδών. Συγκεκριμένα, οι γενετικοί τόποι της ρίζας (rolA, rolB, rolC) στο T-DNA που φιλοξενείται στο πλασμίδιο-επαγωγέα ρίζας (root inducing plasmids, Ri) του *A. rhizogenes*, ενσωματώνονται στο πυρηνικό γονιδίωμα του φυτού-ξενιστή, προκαλώντας τελικά νεοπλασματική ρίζα και πολλαπλασιασμό ριζών. Τα γονίδια rol πιστεύεται ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη των μετασχηματισμένων ριζών και επάγουν τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών ενεργοποιώντας την μεταγραφή των αμυντικών γονιδίων μέσω ενός αδιευκρίνιστου ως τώρα μηχανισμού (Bulgakov 2008, Meyer et al. 2000, Poojadevi et al. 2013). Οι καλλιέργειες hairy-roots είναι, επίσης, γνωστό ότι παράγουν και ένα φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών που δεν υπάρχουν στο μητρικό φυτό (Veeresham 2004).

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την πιθανότητα επιτυχίας του μετασχηματισμού του μητρικού φυτικού ιστού και την επαγωγή των hairy-roots, συμπεριλαμβανομένων του είδους του φυτού, της ηλικίας και του τύπου του φυτικού ιστού (Sevon and Oksman-Caldentey 2002), τον τύπο του στελέχους του αγροβακτηρίου και την πυκνότητα του βακτηριακού εναιωρήματος (Park and Facchini 2000). Ένας αριθμός χημικών ουσιών μπορεί επίσης να προάγει αυτές τις διεργασίες, πχ ακετοσυριγγόνη (Joubert et al. 2002).

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των hairy-roots είναι ότι συχνά παρουσιάζουν περίπου την ίδια ή και μεγαλύτερη βιοσυνθετική ικανότητα παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών σε σύγκριση με τα μητρικά φυτά (Kim et al. 2002a, b). Έχει αποδειχθεί πως οι hairy-roots καλλιέργειες είναι πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων και του προφίλ γονιδιακής έκφρασης των μεταβολικών οδών. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διασαφηνιστούν τα ενδιάμεσα και τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών (Hu and Du 2006). Τα ποικίλα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας hairy-root που τονίστηκαν παραπάνω, οδήγησαν στον πολλά υποσχόμενο ρόλο της στη μαζική παραγωγή υψηλής αξίας δευτερογενών μεταβολιτών. Ωστόσο, η αναβάθμιση των hairy-roots δεν είναι εύκολη υπόθεση καθώς λόγω των πολύπλοκων χαρακτηριστικών της, διάφορες διεργασίες βρίσκονται υπό έρευνα για να είναι εφικτή η εμπορική της εφαρμογή (Srivastava and Srivastava 2007).

1.4 Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein, GFP) της μέδουσας έχει γίνει ένας πολύ αποτελεσματικός δείκτης για χρήση στην έρευνα του γενετικού μετασχηματισμού των φυτών (Stewart 2001). Το GFP κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε από το cnidarian, *Aequorea victoria*, στις αρχές του '90 (Prasher et al. 1992). Το αγρίου τύπου GFP είναι ένα 27kDa μονομερές που αποτελείται από 238 αμινοξέα και έχει το χαρακτηριστικό της εκπομπής πράσινου φωτός όταν διεγείρεται με UV (360-400nm) ή με μπλε φως (440-480nm). Το GFP διατηρεί τον φθορισμό όταν συνδεθεί με κάποια άλλη πρωτεΐνη τόσο στο αμινο- όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο, γεγονός που την καθιστά ελκυστική φθορίζουσα ετικέτα για την παρακολούθηση υποκυτταρικών δραστηριοτήτων όπως είναι η γονιδιακή έκφραση, οι

πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, ο εντοπισμός και η παρακολούθηση πρωτεϊνών (Chalfie et al. 1994, Gu and Verma 1997, Heinlein et al. 1995, Sheen et al. 1995). Στην μελέτη των Maekawa et al. (2008) δημιουργήθηκαν, μεταξύ άλλων, οι δυαδικοί φορείς pUB-GWS-GFP και pUB-GW-Hyg που περιέχουν θέσεις ανασυνδυασμού GATEWAY.

1.5 Τριτερπενοειδείς σαπωνίνες στο φυτό *Medicago truncatula*

Το είδος *Medicago*, μέλος της οικογένειας των φυτών Fabaceae, περιλαμβάνει 87 είδη μεταξύ των οποίων το *M. truncatula*, το οποίο έχει εξελιχθεί σε φυτό-μοντέλο (Gholami et al. 2014, Crane et al. 2006). Μεταξύ των κατηγοριών των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από τα είδη του *Medicago*, οι τριτερπενικές σαπωνίνες και τα ισοφλαβονοειδή παρουσιάζουν υψηλότερο ενδιαφέρον και έχουν διερευνηθεί διεξοδικότερα (Dixon and Sumner 2003).

Το εξειδικευμένο μονοπάτι βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών αρχίζει με την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου. Αυτό είναι ένα πρόδρομο μόριο, κοινό με το μονοπάτι σύνθεσης των φυτοστερολών και είναι ένα προϊόν συμπύκνωσης έξι μορίων πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IPP). Το IPP παράγεται μέσω του κυτοσολικού μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (MVA). Το βασικό περιοριστικό ένζυμο-κλειδί αυτού του μονοπατιού είναι η ρεδουκτάση του 3-υδροξυ-3-μεθυλ-γλουταρυλ-CoA (HMGR), που καταλύει τον σχηματισμό του μεβαλονικού οξέος, του οποίου έχουν χαρακτηριστεί πέντε ισομορφές στο *M. truncatula* (Kevei et al. 2007). Κατά την διάρκεια της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών, το 2,3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται προς την πεντακυκλική β-αμυρίνη με τη διαμεσολάβηση του ενζύμου συνθάση της β-αμυρίνης (BAS) (Suzuki et al. 2002, Iturbe-Ormaetxe et al. 2003). Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα κυτοχρώματα P450 εμπλέκονται επίσης στην βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών σαπωνινών (Qi et al. 2006, Shibuya et al. 2006). Η ανταγωνιστική δράση δύο, εξαρτώμενων από το κυτόχρωμα P450, μονο-οξυγενασών (P450s) προκαλούν μια ακόμη διακλάδωση του βιοσυνθετικού μονοπατιού των τριτερπενοειδών σαπωνινών στο *M. truncatula* και κατά συνέπεια οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες χωρίζονται σε δύο διακριτές τάξεις, τις αιμολυτικές και τις μη αιμολυτικές τριτερπενοειδείς σαπωνίνες (Mertens et al. 2015). Όσον αφορά την μετα-μεταγραφική ρύθμιση της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών, η μελέτη των Pollier et al. (2013a) προτείνει ότι πραγματοποιείται από μια, αγκυροβόλουσα στην μεμβράνη E3 λιγάση της ουβικιτίνης, η οποία στοχεύει την HMGR επάγοντας την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα 26S.

1.6 TSAR1 και TSAR2: μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποίησης της βιοσύνθεσης των σαπωνινών

Η επαγόμενη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών σαπωνινών υπό συνθήκες στρες μεσολαβείται από τη συντονισμένη μεταγραφική ενεργοποίηση του μονοπατιού (Broecking et al. 2005, Suzuki et al. 2005, Pollier et al. 2013a) μια μοριακή διαδικασία στην οποία το Ιασμονικό οξύ (JA) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο (Mertens et al. 2015). Τα JAs είναι φυτο-ορμόνες που παράγονται από οξυλιπίνη και

μεσολαβούν στον επαναπρογραμματισμό πολλών μεταβολικών οδών ως απάντηση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές και αναπτυξιακές παραμέτρους (Pauwels et al. 2009, De Geyter et al. 2012). Ωστόσο, οι μεταγραφικοί παράγοντες (TF) που ενεργοποιούν τη συντονισμένη μεταγραφική ενεργοποίηση των βιοσυνθετικών γονιδίων των τριτερπενοειδών σαπωνινών που ακολουθούν την αντίληψη του JA, παραμένουν αόριστοι. Στην πραγματικότητα έχουν βρεθεί γενικά μόνο λίγοι μεταγραφικοί παράγοντες που να διαμορφώνουν την βιοσύνθεση των τερπενίων των φυτών. Ο βασικός έλικα-βρόχος-έλικα (bHLH) μεταγραφικός παράγοντας MYC2 είναι γνωστό ότι διαδραματίζει βασικό ρόλο στον καταρράκτη σηματοδότησης του JA (Kazan and Manners 2013). Τα JAs ενεργοποιούν έναν καταρράκτη σηματοδότησης που διαμεσολαβεί σε μια ευρεία κλίμακα αμυντικών αποκρίσεων που έχουν ως αποτέλεσμα μια αυστηρά ρυθμισμένη παραγωγή διαφόρων αμυντικών προϊόντων σε διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Wasternack and Hause 2013). Οι bHLHs αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων ευρέως διαδεδομένη και στα τρία ευκαρυωτικά βασίλεια (Heim et al. 2003, Toledo-Ortiz et al. 2003, Carretero-Paulet et al., 2010, Pires and Dolan 2010).

Στη μελέτη των Mertens et al. (2015) εξετάστηκαν συνολικά τα δεδομένα των μεταγραφικών στοιχείων του *M. truncatula* και μέσω αναλύσεων συνέκφρασης κατάφεραν να εντοπιστούν για πρώτη φορά δύο πολύ εξειδικευμένοι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι εμπλέκονται στην ρύθμιση διαφόρων κλάδων του μεταβολισμού των τριτερπενοειδών σαπωνινών. Συγκεκριμένα οι μεταγραφικοί παράγοντες που ανακάλυψαν, *TSAR1* (Triterpene Saponin Biosynthesis Activating Regulator 1) και *TSAR2* (Triterpene Saponin Biosynthesis Activating Regulator 2), έχουν διαφορετικές προτιμήσεις ως προς την κατεύθυνση που ακολουθούν προς τους δύο κλάδους της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών, υποδηλώνοντας κατά συνέπεια την ύπαρξη διακριτών μηχανισμών ελέγχου για τις διάφορες κατηγορίες τριτερπενοειδών σαπωνινών που συσσωρεύονται στο *M. Truncatula*.

Το *TSAR1* κατευθύνει πρωτίστως την έκφραση της συνθάσης της β-αμυρίνης (BAS) και όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν τα γνωστά μη αιμολυτικά ή soyasaponin specific P450, όπως τα CYP93E2, CYP72A61v2 και τις UGT-εξαρτώμενες γλυκοζυλοτρανσφεράσες (UGTs) UGT73K1 και UGT73F3. Αντιστρόφως, το *TSAR2* οδηγεί στην έκφραση των γονιδίων των BAS, CYP716A12, CYP72A68v2 και του UGT73F3, και κατά την υπερέκφραση στα hairy-roots οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων των αιμολυτικών τριτερπενοειδών σαπωνινών.

Η έκφραση των γονιδίων της οδού του πρόδρομου μορίου μεβαλονικού οξέος ελέγχονται και από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες *TSAR*. Επίσης αποδείχθηκε πως έχουν παρόμοιο μονοπάτι και δράση με την MKB1 E3 λιγάση της ουβικιτίνης (Pollier et al. 2013a) και είναι ξεκάθαρο ότι οι *TSARs* οδηγούν επίσης στην έκφραση του MKB1.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα *Escherichia coli* (E. coli) DH5A (mini prep-alkaline lysis)

Κύτταρα *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν

DH5a στέλεχος: Κύτταρα κατάλληλα για τη δημιουργία γονιδιακών βιβλιοθηκών όπου χρησιμοποιούνται πλασμίδια-φορείς. Μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή μετασχηματισμένων και μη αποικιών σε τρυβλία βακτηριακών καλλιιεργειών που περιέχουν Bluο-gal ή X-gal λόγω δείκτη που παρέχει συμπληρωματικότητα με το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Τα DH5a είναι ικανά να μετασχηματίζονται αποτελεσματικά με μεγάλα πλασμίδια (Novagen Competent Cells).

Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδίου (mini prep-alkaline lysis)

Προετοιμάστηκαν προ-καλλιέργειες κυττάρων *E. coli* DH5A που φέρουν τους φορείς pUB-GWS-GFP, pUB-GW-Hyg, TSAR1, TSAR2 (από stock γλυκερόλης στους -80°C) σε 5ml θρεπτικού μέσου LB (10g/L bacto-tryptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCl, $\pm 1.5\%$ w/v άγαρ για στερεό/υγρό θρεπτικό), προστέθηκε κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή του φορέα (και για τους τέσσερις φορείς: καναμυκίνη $C_t=50\mu\text{l/ml}$) και ακολούθησε επώαση των προ-καλλιιεργειών στους $37^{\circ}\text{C}/180$ στροφές για ένα 24ωρο.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδίου από βακτήρια σύμφωνα με το οποίο χρησιμοποιήθηκαν τα 5ml της προ-καλλιιεργειας τα οποία φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000g και για 30sec ενώ κάθε φορά αποβαλλόταν το υπερκείμενο και διατηρούταν μόνο το ίζημα. Στη συνέχεια, διαλυτοποιήθηκε πλήρως το ίζημα καθώς προστέθηκαν σε αυτό 300μl P1 buffer (50mM Tris, 10mM EDTA, pH 8 HCl) μαζί με RNase (3mg/ml- stock 10mg/ml), κάνοντας ανάδευση με τη συσκευή vortex. Έπειτα προστέθηκαν 300μl P2 buffer (200mM NaOH, 1,2g 1% SDS) και έγινε συνεχής ήπια ανάδευση για 5 λεπτά μέχρι να παρατηρηθεί διαυγές εναιώρημα, οπότε και προστέθηκαν 300μl P3 buffer (3M Potassium acetate, glacial acetic acid pH 5,5) με ήπια ανάδευση. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στα 10.000g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρά Eppendorfs και έγινε επανάληψη της φυγοκέντρωσης στα

10.000g για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε πάλι σε καθαρά Eppendorfs στα οποία προστέθηκαν 600μl ισοπροπανόλη και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Έπειτα το περιεχόμενο των Eppendorfs φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά και αφού με προσοχή κρατήθηκε μόνο το ίζημα απορρίπτοντας το υπερκείμενο, προστέθηκαν σε αυτό 500μl 70% αιθανόλης με ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 10.000g για 10 λεπτά. Τέλος, το διατηρούμενο ίζημα στέγνωσε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C και επαναδιαλύθηκε σε 15μl αποστειρωμένου ddH₂O.

2.2 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων και άμεσος μετασχηματισμός Αγροβακτηρίων

Κύτταρα *Agrobacterium rhizogenes* που χρησιμοποιήθηκαν

- στέλεχος ARQUA
- στέλεχος LBA9402

Πρωτόκολλο δημιουργίας δεκτικών κυττάρων και άμεσου μετασχηματισμού Αγροβακτηρίων (freeze-thaw method)

Προετοιμάστηκαν προ-καλλιέργειες *A. rhizogenes* (για την πρώτη πειραματική διαδικασία ARQUA και LBA9402, ARQUA για την δεύτερη πειραματική διαδικασία) σε 5ml θρεπτικού μέσου LB, προστέθηκε κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή του στελέχους (για το ARQUA: στρεπτομυκίνη C_t=100μg/ml, για το LBA9402: ριφαμπικίνη C_t=15μl/ml) και ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών στους 28°C/120 στροφές. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας στον επωαστήρα πραγματοποιήθηκε για ένα 48ωρο. Μετά την ολοκλήρωση του 48ωρου, 2ml από τις προ-καλλιέργειες εμβολιάστηκαν σε 50ml θρεπτικού μέσου LB (σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 250ml) και τοποθετήθηκαν και πάλι στον επωαστήρα στους 28°C/120 στροφές μέχρι να αναπτυχθεί σε OD₆₀₀=0,547 για τα ARQUA και OD₆₀₀=0,703 για το LBA9402. Να σημειωθεί ότι διπλασιασμός των αγροβακτηρίων παρατηρείται κάθε δύο ώρες. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες αφέθηκαν στον πάγο να κρυώσουν. Το περιεχόμενο τους εναποτέθηκε σε ένα falcon μπουκαλάκι των 50ml και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 3000g στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκε 1ml αποστειρωμένου διαλύματος CaCl₂ (20mM) στο ίζημα για την επαναδιάλυσή του. Το επαναδιαλυμένο ίζημα μοιράστηκε σε κρύα καθαρά Eppendorf (100μl στο καθένα). Προστέθηκε 1μg από τον φορέα στο Eppendorf με τα δεκτικά κύτταρα των Αγροβακτηρίων, τα κύτταρα ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και έπειτα ξεπάγωσαν με 5λεπτη επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C. Αμέσως μετά προστέθηκε στο Eppendorf 1ml υγρού θρεπτικού LB και επώαστηκε στους 28°C με ήπια περιστροφή (120 στροφές) για 2-4 ώρες. Η περίοδος αυτή επιτρέπει στα βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα και ενώ απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl υγρού θρεπτικού LB. Ακολούθησε επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία με θρεπτικό LB, τα κατάλληλα

αντιβιοτικά και επώαση για 2-3 ημέρες στους 28°C. Αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων αναμενόταν να εμφανιστούν στο χρονικό διάστημα αυτό.

Στην πρώτη πειραματική διαδικασία μετασχηματισμού των *A. rhizogenes* ARQUA και LBA9402 με pUB-GWS-GFP, για την επιλογή μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων:

- ARQUA: καναμυκίνη C_t=50μl/ml (για την επιλογή του φορέα) και στρεπτομυκίνη C_t=100μl/ml (για την επιλογή των βακτηρίων)
- LBA9402: καναμυκίνη C_t=50μl/ml (για την επιλογή του φορέα) και ριφαμυκίνη C_t=15μl/ml (για την επιλογή των βακτηρίων)

Στην δεύτερη πειραματική διαδικασία μετασχηματισμού των *A. rhizogenes* ARQUA με pUB-GW-Hyg, TSAR1 και TSAR2, για την επιλογή μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε καναμυκίνη C_t=50μl/ml (για την επιλογή του φορέα) και στρεπτομυκίνη C_t=100μl/ml (για την επιλογή των βακτηρίων).

2.3 Hairy-root μετασχηματισμός του φυτού *Trigonella foenum-graecum* (τριγωνέλλα) μέσω *Agrobacterium rhizogenes*

Ημέρα 1^η:

1. Αποστείρωση σπόρων

- 1.1. Σπόροι *T. foenum-graecum* μεταφέρθηκαν σε ένα falcon μπουκάλι των 50ml. (130 σπόροι για την πρώτη πειραματική διαδικασία και 182 σπόροι για την δεύτερη πειραματική διαδικασία)
- 1.2. Οι σπόροι καλύφθηκαν με θειικό οξύ (H₂SO₄) για 7 λεπτά επί συνεχή ήπια ανάδευση.
- 1.3. Ακολουθήθηκαν 4 πλύσεις με κρύο απεσταγμένο νερό (dH₂O).
- 1.4. Οι σπόροι καλύφθηκαν εκ νέου με ένα διάλυμα που περιλαμβάνει 20% χλωρίνη, 0,1% Tween20 και αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O) για 20 λεπτά επί συνεχή ανάδευση.
- 1.5. Ακολουθήθηκαν 5-7 πλύσεις με αποστειρωμένο ddH₂O και στο τέλος προστέθηκε ddH₂O αρκετό για να καλύψει την επιφάνεια όλων των σπόρων οι οποίοι τοποθετήθηκαν υπό συνθήκες σκότους στους 4°C.

2. Προ-καλλιέργειες αγροβακτηρίων

Για την πρώτη πειραματική διαδικασία, προετοιμάστηκαν προ-καλλιέργειες *A. rhizogenes* ARQUA και LBA9402 μετασχηματισμένων με τον φορέα pUB-GWS-GFP, σε 5ml θρεπτικού μέσου LB στις οποίες προστέθηκαν τα κατάλληλα αντιβιοτικά (για το ARQUA: καναμυκίνη C_t=50μl/ml και στρεπτομυκίνη C_t=100μl/ml και για το LBA9402: καναμυκίνη C_t=50μl/ml και ριφαμυκίνη C_t=15μl/ml). Ακολούθησε επώαση της προ-καλλιέργειας στους 28°C/120 στροφές και η ανάπτυξη στον επωαστήρα πραγματοποιήθηκε για ένα 48ωρο.

Για την δεύτερη πειραματική διαδικασία προετοιμάστηκαν προ-καλλιέργειες *A. rhizogenes* ARQUA μετασηματισμένων με τους φορείς pUB-GW-Hyg, TSAR1 και TSAR2 σε 5ml θρεπτικού μέσου LB στις οποίες προστέθηκαν τα κατάλληλα αντιβιοτικά (καναμυκίνη C_t=50μl/ml και στρεπτομυκίνη C_t=100μl/ml). Ακολούθησε επώαση της προ-καλλιέργειας στους 28°C/120 στροφές και η ανάπτυξη στον επωαστήρα πραγματοποιήθηκε για ένα 48ωρο.

Ημέρα 2^η:

Οι σπόροι μεταφέρθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν νερό και άγαρ (1% w/v) και διατηρήθηκαν για ένα 24ωρο σε θάλαμο ανάπτυξης (22°C) τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο για να διατηρηθούν υπό συνθήκες σκότους.

Ημέρα 3^η:

1. Απομακρύνθηκε το αλουμινόχαρτο από τα τρυβλία με τους σπόρους και διατηρήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (22°C και 16h φως ημέρας/8h σκοτάδι).
2. Τοποθετήθηκαν 500μl από τις υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων σε τρυβλία με θρεπτικό LB και τα κατάλληλα αντιβιοτικά (για το ARQUA: καναμυκίνη C_t=50μl/ml και στρεπτομυκίνη C_t=100μl/ml και για το LBA9402: καναμυκίνη C_t=50μl/ml και ριφαμυκίνη C_t=15μl/ml) και ακολούθησε επώαση για 1 ημέρα στους 28°C.

Σημείωση: Για τη μόλυνση 10-15 φυτών αντιστοιχεί 1 τρυβλίο.

Ημέρα 4^η:

Επιμόλυνση των φυτών *Trigonella foenum-graecum* με τα *A. rhizogenes* ARQUA και LBA9402

Τα φυτά μετά από 2 ημέρες βλάστησης αναμενόταν να έχουν ρίζα μήκους περίπου 1cm. Στον θάλαμο νηματικής ροής, τα φυτά τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία που περιείχαν αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί νοτισμένο με αποστειρωμένο ddH₂O για να αποφευχθεί η ξήρανση της ρίζας. Στο στάδιο αυτό με τη χρήση νυστεριού κόπηκε η ρίζα των φυτών στο σημείο του υποκοτυλίου (περίπου 3mm). Αφότου απομακρύνθηκε το άκρο της ρίζας, το διατηρημένο άκρο του φυτού επικαλύφθηκε με τις αποικίες των αγροβακτηρίων. Στη συνέχεια το επιμολυσμένο φυτό τοποθετήθηκε σε τετράγωνα τρυβλία με θρεπτικό ½ Murashige and Skoog (2,2g/L θρεπτικό Murashige and Skoog, 1% σουκρόζη, 0,05% MES, άγαρ 0,6%, KOH pH 5,7). Ανά τρυβλίο τοποθετήθηκαν 5-6 επιμολυσμένα φυτά και στη τέλος σφραγίστηκαν με parafilm στο οποίο έγιναν πολλαπλά ανοίγματα με τη χρήση βελόνας για να επιτραπεί η απομάκρυνση αερίων (πολύ σημαντικό!). Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (20°C και 16h φως ημέρας/8h σκοτάδι) με

γωνία περίπου 45° για 3-4 μέρες ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα να πέσουν τα φυτά.

Ημέρα 8^η:

Μεταφορά των φυτών σε τρυβλία με αντιβιοτικό

Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία με θρεπτικό ½ Murashige and Skoog και αντιβιοτικό (αμπικιλίνη Cτ=400μg/ml) με σκοπό τον θάνατο των αγροβακτηρίων γύρω από τα φυτά. Και πάλι τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm στο οποίο προκλήθηκαν πολλαπλά ανοίγματα με βελόνα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν κατακόρυφα στον θάλαμο ανάπτυξης (20°C και 16h φως ημέρας/8h σκοτάδι).

Για δύο ακόμα φορές και ανά 3-4 ημέρες τα φυτά μεταφέρονταν εκ νέου σε τρυβλία με αντιβιοτικό σύμφωνα με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε την 8^η ημέρα.

Ρίζες εμφανίστηκαν από την 12 ημέρα και όταν θεωρήθηκε πως ήταν αρκετά μεγάλες για μεταφύτευση, τα τρυβλία με τα φυτά μεταφέρθηκαν αρχικά σε θάλαμο ανάπτυξης (22°C και 16h φως ημέρας/8h σκοτάδι) και τέλος τα φυτά μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με περιεχόμενο 2:1 άμμος/βερμικουλίτης. Οι γλάστρες ποτίζονταν εναλλάξ ανά δύο με τρεις ημέρες με dH₂O και Holand nutrient solution.

“Holand nutrient solution”:

- MgSO₄ (συγκέντρωση του στοκ 1M): 2ml/L
- KH₂PO₄ (συγκέντρωση του στοκ 1M): 1ml/L
- FeEDTA (συγκέντρωση του στοκ 1/10M): 1ml/L
- Micro elements: 1ml/L
- KNO₃ (συγκέντρωση του στοκ 20g/100ml): 5ml/L
- Ca(NO₃)₂ 4H₂O (συγκέντρωση του στοκ 2,36g/100ml): 5ml/L

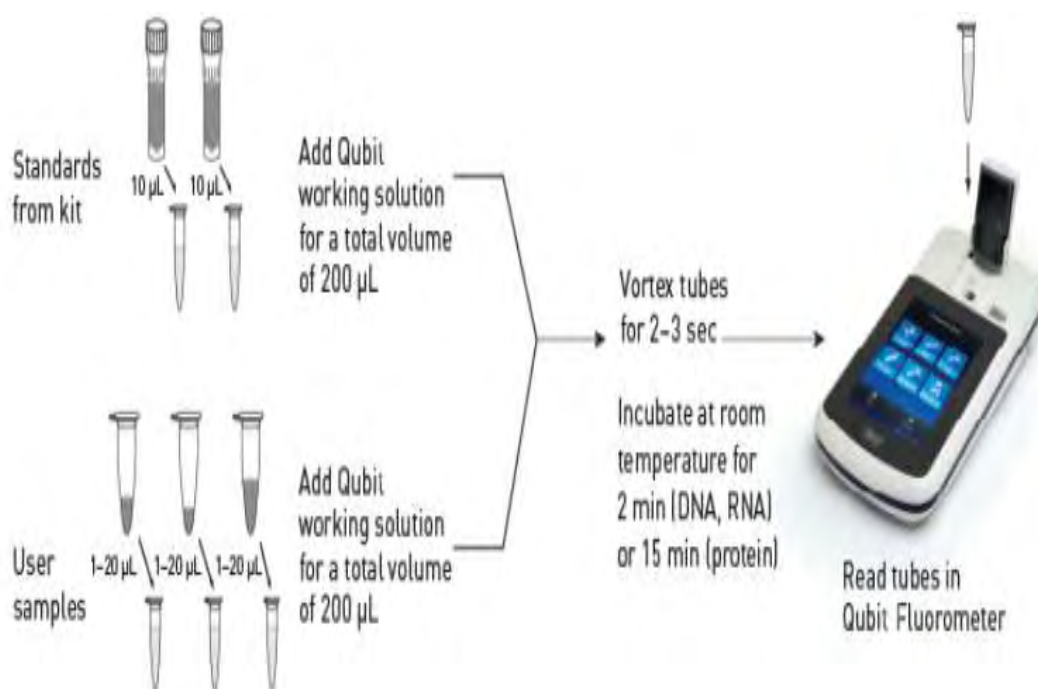
2.4 Απομόνωση DNA με τη χρήση της μεθόδου CTAB

Για την απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση ιστού ρίζας από κάθε φυτό σε υγρό άζωτο με τη χρήση πλαστικού εμβόλου. Παράλληλα με τη διαδικασία αυτή το διάλυμα CTAB buffer είχε τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 65°C για να προθερμανθεί. Σε κάθε Eppendorf λειοτριβημένου ιστού προστέθηκαν 100μl CTAB buffer και 1μl μερκαπτοαιθανόλης και επώαστηκαν για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο (65°C). Στην συνέχεια, προστέθηκαν 150μl γλωροφόρμιο και 1:25 ισοαμυλική αλκοόλη και ακολούθησε ανάδευση με vortex.

Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm. Το υδατικό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο tube και προστέθηκε σε αυτό 0,7 vol ισοπροπανόλης. Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια και επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα το περιεχόμενο κάθε Eppendorf φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στα 13.000 rpm. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 0,5ml παγωμένης αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm για να σταθεροποιηθεί το ίζημα. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και τα Eppendorf τοποθετήθηκαν στους 37°C για 20 περίπου λεπτά μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη στο εσωτερικό τους. Τέλος το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 15μl αποστειρωμένου ddH₂O και RNάση σε τελική συγκέντρωση 0,66 mg/ml.

2.5 Ποσοτικοποίηση απομονωμένου DNA από τους ιστούς ρίζας με τη χρήση της μεθόδου Qubit

Αρχικά δημιουργήθηκε ένα διάλυμα mix στο οποίο προστέθηκαν για κάθε δείγμα και τα standard διαλύματα (για τη ρύθμιση της συσκευής Qubit), 199μl Qubit ρυθμιστικού και 1μl Qubit αντιδραστήριο. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος αυτού και προστέθηκαν σε Qubit tubes 190μl από το mix και 10μl (τελικός όγκος 200μl) από τα standard διαλύματα, αναδεύτηκε το περιεχόμενο και ρυθμίστηκε η συσκευή. Έπειτα σε Qubit tubes προστέθηκαν 198μl από το mix και 2μl από το δείγμα. Ακολούθησε ανάδευση και τα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν.



Εικόνα 1: Απεικόνιση της διαδικασίας ποσοτικοποίησης με τη χρήση της συσκευής Qubit.

2.6 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση ακολουθιών DNA καθώς οδηγεί σε επαναλαμβανόμενη αντιγραφή μιας επιλεγμένης περιοχής ενός μορίου DNA. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών του DNA γίνεται με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Τα απαραίτητα συστατικά μιας αντίδρασης PCR είναι:

- Δίκλωνο μόριο DNA που επιθυμείται η ενίσχυσή του.
- Ζεύγος κατάλληλων εκκινητών που υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και προσδιορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (0,1-1μM).
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (20-25 units/ml),
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs: 200μM από το καθένα) και
- Ιόντα Mg^{+2}

Μια τυπική αντίδραση PCR ξεκινά με την θέρμανση του μείγματος με στόχο τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν ενωμένα τα δύο πολυνουκλεοτίδια της διπλής έλικας οπότε το DNA-στόχος αποδιατάσσεται σε μονόκλιωνα μόρια. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας με αποτέλεσμα μερική επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA-στόχου όπως επίσης και πρόσδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες. Στο σημείο αυτό μπορεί να αρχίσει η σύνθεση του DNA οπότε η θερμοκρασία αυξάνεται στη βέλτιστη θερμοκρασία για την Taq πολυμεράση ώστε να επιτευχθεί η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων. Οι τρεις αυτές διαδικασίες επαναλαμβάνονται από 20 έως 35 φορές με αποτέλεσμα η αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Στο πείραμα αυτό, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου επιλογής GFP (στην πρώτη πειραματική διαδικασία) και του υποκινητή 35S (στην δεύτερη πειραματική διαδικασία) στα μετασχηματισμένα φυτά *T. foenum-graecum* με χρήση της πολυμεράσης Taq της Kappa.

Αντιδραστήρια PCR	Αρχική Συγκέντρωση	Όγκος
Μήτρα DNA		1-3μl
KapaTaq buffer with $MgCl_2$	5x	2μl
Μίγμα dNTPs	10μM	0,4μl
Forward primer	10μM	0,4μl
Reverse primer	10μM	0,4μl
KapaTaq	5U/μl	0,08μl
ddH ₂ O		Μέχρι τελικό όγκο 20μl

Παρακάτω παρατίθεται το πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης που επαναλήφθηκε για 35 κύκλους με σκοπό την ενίσχυση του γονιδίου επιλογής (GFP):

Συνθήκες ενίσχυσης	Θερμοκρασία/ Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	55°C για 30 δευτερόλεπτα
Επέκταση	72°C για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επέκταση	72°C για 2 λεπτά

Επιπλέον, παρατίθεται το πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης που επαναλήφθηκε για 35 κύκλους με σκοπό την ενίσχυση του υποκινητή 35S πριν το γονίδιο υδρομυκίνης (Hyg^R):

Συνθήκες ενίσχυσης	Θερμοκρασία/ Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C για 30 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	54°C για 30 δευτερόλεπτα
Επέκταση	72°C για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επέκταση	72°C για 2 λεπτά

3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού φορέα pUB-GWS-GFP

Ο φορέας pUB-GWS-GFP απομονώθηκε από κύτταρα *E. coli* DH5A και χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *A. rhizogenes* LBA9402.

Σημείωση: Ο ίδιος φορέας είχε χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό κυττάρων *A. rhizogenes* ARQUA σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου.



Εικόνα 2: Το ένθεμα του T-DNA που περιέχει ο δυαδικός φορέας. Ανάμεσα στο δεξί συνοριακό (RB) και στο αριστερό (LB) περιέχονται ο υποκινητής 35S και οι κωδικές αλληλουχίες του γονιδίου GFP. Επίσης περιέχεται ο υποκινητής του γονιδίου της ουβικιτίνης πριν από ιντρόνιο ουβικιτίνης το οποίο βελτιώνει τις μεταγραφικές δραστηριότητες.

3.2 Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού hairy-roots των φυτών *Trigonella foenum-graecum*

Φυτά *T. foenum-graecum* μετασχηματίστηκαν με *A. rhizogenes* LBA9402 και *A. rhizogenes* ARQUA που περιέχουν στο T-DNA τους τις αλληλουχίες του γονιδίου GFP. Δημιουργήθηκαν δύο ομάδες μετασχηματισμένων φυτών καθώς η μία από αυτές μετασχηματίστηκε με το *A. rhizogenes* LBA9402 ενώ η άλλη με το *A. rhizogenes* ARQUA.

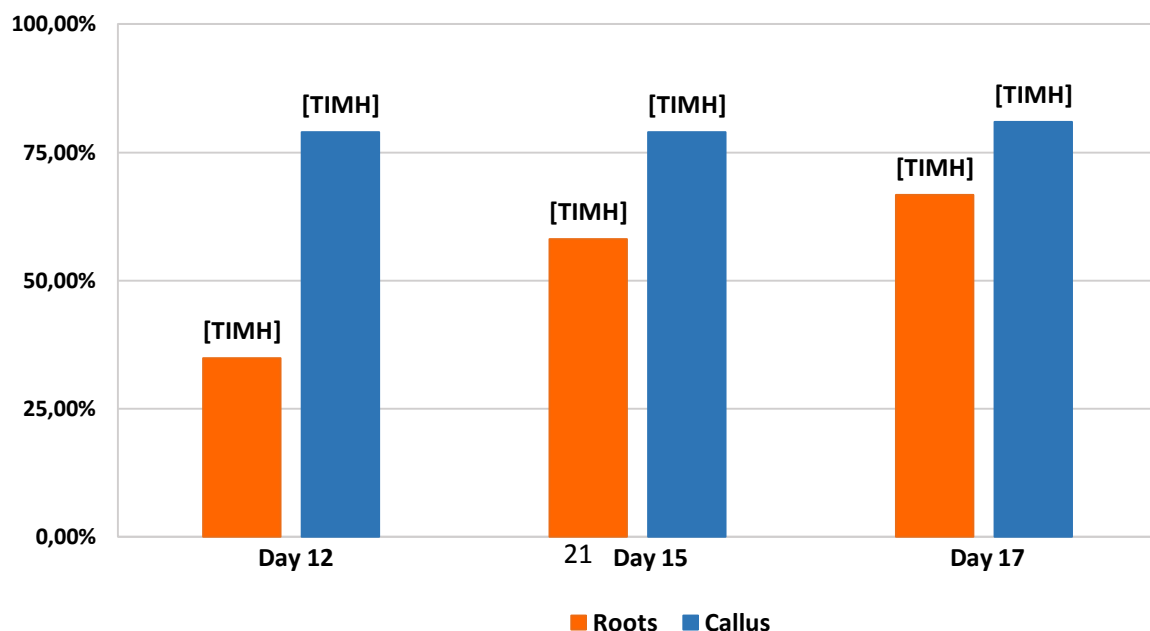


Εικόνα 3: Αντιπροσωπευτικές εικόνες αναγεννημένων ριζών, μορφολογίας hairy-roots, φυτών *Trigonella foenum-graecum*.

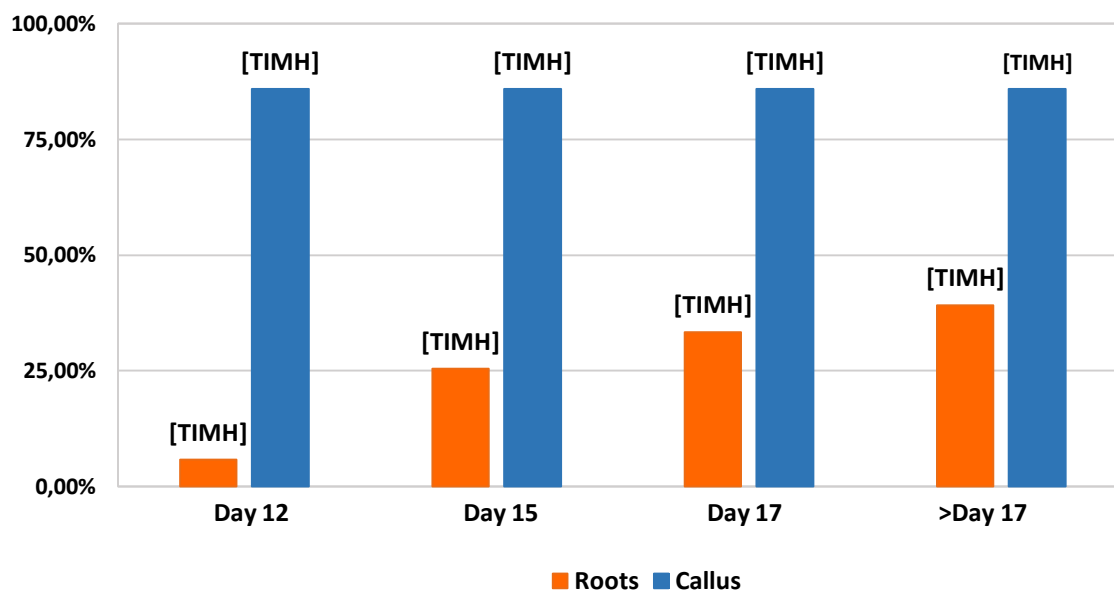
Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των φυτών (μετασηματισμένων με ARQUA και με LBA9402) στα οποία αναγεννήθηκαν ρίζες καθώς επίσης και των φυτών στα οποία παρατηρήθηκε σχηματισμός κάλλου. Τα νούμερα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1):

	Day 12		Day 15		Day 17		>Day 17	
	ARQUA (43 plants)	LBA9402 (51 plants)	ARQUA (43 plants)	LBA9402 (51 plants)	ARQUA (42 plants)	LBA9402 (51 plants)	ARQUA (42 plants)	LBA9402 (51 plants)
Roots	15 (35%)	3 (5,88%)	25 (58%)	13 (25,49%)	28 (66,67%)	17 (33,33%)	28 (66,67%)	20 (39,22%)
Callus	34 (79%)	44 (86%)	34 (79%)	44 (86%)	34 (81%)	44 (86%)	34 (81%)	44 (86%)

Πίνακας 1: Καταμέτρηση φυτών με αναγεννημένες ρίζες και φυτών που σχημάτισαν κάλλο.



Πίνακας 2: Στο παραπάνω γράφημα αποτυπώνονται τα δεδομένα του Πίνακα 1 εκφρασμένα σε ποσοστά επί τοις εκατό των φυτών που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes* ARQUA. Οι στήλες με χρώμα πορτοκαλί αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά αναγεννημένων ριζών ενώ οι στήλες με μπλε χρώμα τα ποσοστά σχηματισμού κάλλου.



Πίνακας 3: Στο παραπάνω γράφημα αποτυπώνονται τα δεδομένα του Πίνακα 1 εκφρασμένα σε ποσοστά επί τοις εκατό για τα φυτά που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes* LBA9402. Οι στήλες με χρώμα πορτοκαλί αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά αναγεννημένων ριζών ενώ οι στήλες με μπλε χρώμα τα ποσοστά σχηματισμού κάλλου.

Παρατηρήθηκε πως τα φυτά *T. foenum-graecum* που μολύνθηκαν με pUB-GWS-GFP σε *A. rhizogenes* ARQUA παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης ριζών, ενώ τα φυτά που μολύνθηκαν με pUB-GWS-GFP σε *A. rhizogenes* LBA9402 παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό δημιουργίας κάλλου.

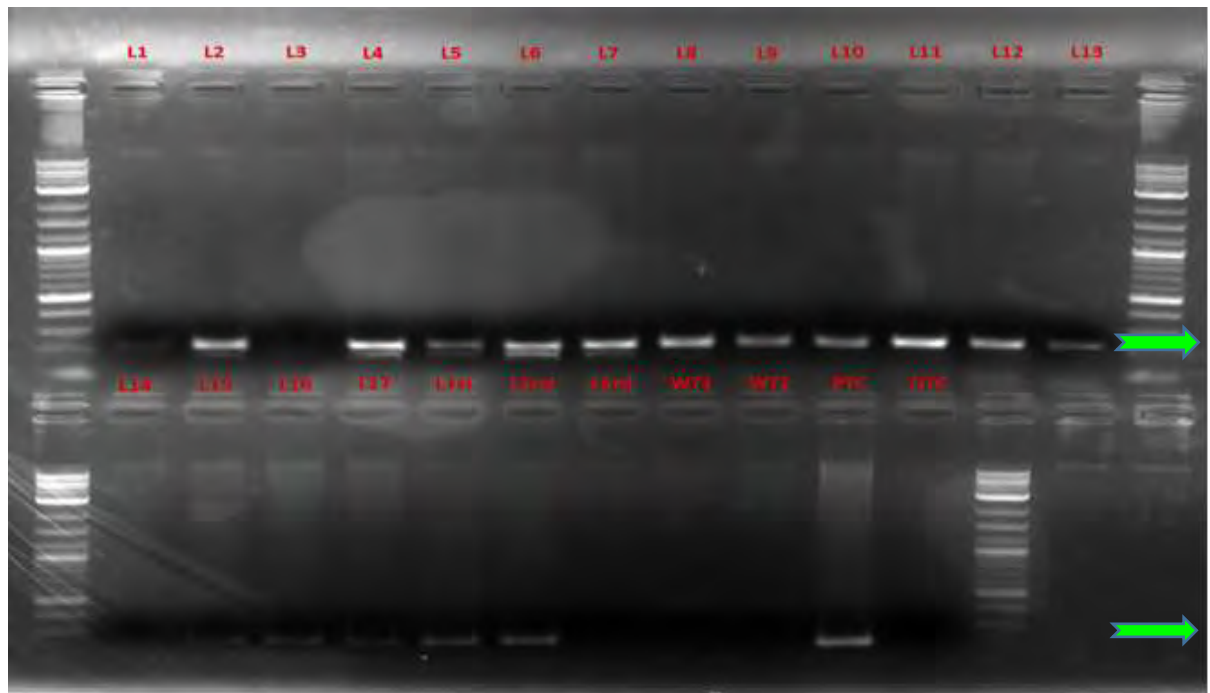
Όταν κρίθηκε ότι η ρίζα των φυτών στις γλάστρες ήταν μεγάλη και υγιής ώστε η δειγματοληψία να μην προκαλέσει βλάβη στο φυτό, έγινε δειγματοληψία και απομόνωση DNA με την μέθοδο CTAB. Ο έλεγχος της απομόνωσης αλλά και η ποσοτικοποίηση επετεύχθη με την μέθοδο Qubit.

Με την μέθοδο αυτή επιβεβαιώθηκε η επιτυχής απομόνωση DNA από τα δείγματα ενώ με βάση τις ποσότητες που απομονώθηκαν κρίθηκε και η πόσότητα που χρησιμοποιήθηκε από κάθε δείγμα για την επίτευξη της PCR (σύμφωνα με το πρωτόκολλο). Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενίσχυσαν το γονίδιο GFP, το οποίο

βρίσκεται μέσα στο ένθεμα T-DNA και αφού ολοκληρώθηκε η ενίσχυση, όλα τα δείγματα φορτώθηκαν σε gel αγαρόζης 1,4%. Η PCR είχε δουλέψει επιτυχώς καθώς εμφανίζεται η επιθυμητή ζώνη στο θετικό control (PTC) ενώ δεν παρατηρείται μάλιστα στο αρνητικό control (NTC). Η παρουσία μιας μπάντας περίπου 200bp στα δείγματα υποδηλώνει την ύπαρξη του γονιδίου GFP άρα και την επιτυχία του hairy-roots μετασχηματισμού στα δείγματα αυτά (Εικόνα 4, 5).

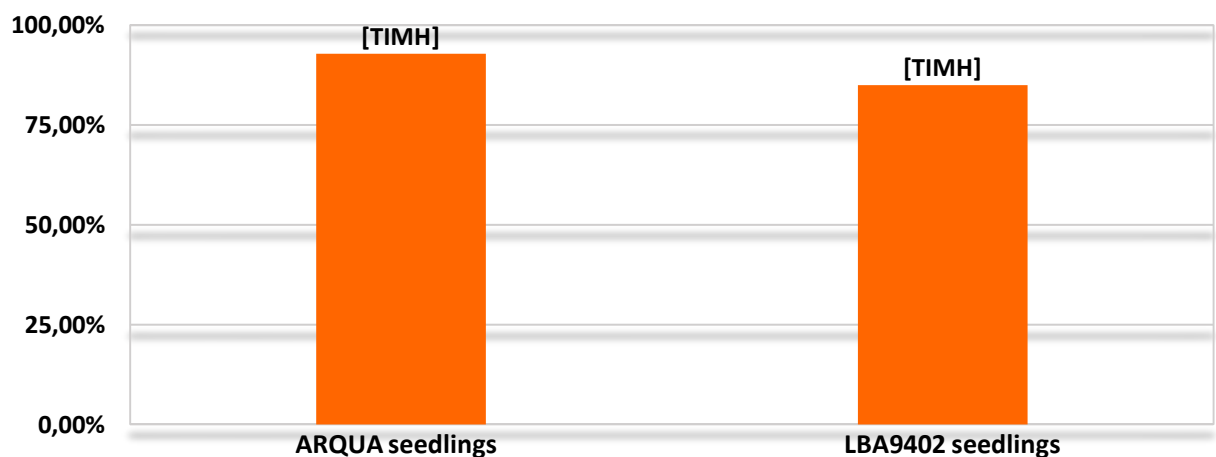


Εικόνα 4: Προϊόντα PCR με εκκινητές που στοχεύουν το γονίδιο GFP στα φυτά που μολύνθηκαν με ARQUA. Το αρνητικό control δίνει το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Όλα τα δείγματα, εκτός από τα A12 και A20, εμφανίζουν μία μπάντα με το επιθυμητό μέγεθος (~200bp). Άρα τα 26 δείγματα που εμφανίζουν την μπάντα είναι μετασχηματισμένα.



Εικόνα 5: Προϊόντα PCR με εκκινητές που στοχεύουν το γονίδιο GFP στα φυτά που μολύνθηκαν με LBA9402. Το θετικό control και το αρνητικό control δίνουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Όλα τα δείγματα, εκτός από τα L3, L14 και L3rd, εμφανίζουν μία μπάντα με το επιθυμητό μέγεθος (~200bp). Άρα τα 17 δείγματα που εμφανίζουν την μπάντα είναι μετασηματισμένα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιτυχούς μετασηματισμού εκφράζονται σε ποσοστά επί τοις εκατό στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4). Συνολικά ανιχνεύθηκαν 92,86% μετασηματισμένα φυτά με το στέλεχος *A. rhizogenes* ARQUA και 85% με το στέλεχος *A. rhizogenes* LBA9402.



Πίνακας 4: Ποσοστό επί τοις εκατό των επιτυχώς μετασηματισμένων φυτών. Το 92,86% των μολυσμένων με pUB-GWS-GFP σε *A. rhizogenes* ARQUA είναι επιβεβαιωμένα μετασηματισμένα ενώ το ποσοστό των επιτυχώς μετασηματισμένων φυτών με pUB-GWS-GFP σε *A. rhizogenes* LBA9402 είναι 85%.

3.3 Απομόνωση πλασμιδιακών φορέων TSAR1, TSAR2 και pUB-GW-Hyg

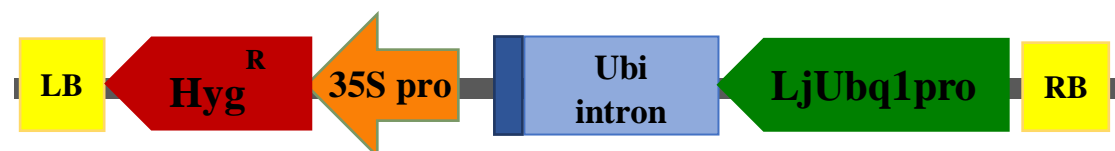
Οι φορείς που απομονώθηκαν από κύτταρα *E. coli* DH5A και χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *A. rhizogenes* ARQUA είναι:

- Ο φορέας που περιείχε τις κωδικές αλληλουχίες του γονιδίου *MtTSAR1* του *M. truncatula* με την ταυτόχρονη παρουσία του υποκινητή του γονιδίου της ουβικιτίνης του *L. japonicus* για να οδηγήσει την έκφραση του *TSAR1* και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (Hyg^R) σαν δείκτης επιλογής.
- Ο φορέας που περιείχε τις κωδικές αλληλουχίες του γονιδίου *MtTSAR2* του *M. truncatula* με την ταυτόχρονη παρουσία του υποκινητή του γονιδίου της ουβικιτίνης του *L. japonicus* για να οδηγήσει την έκφραση του *TSAR2* και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (Hyg^R) σαν δείκτης επιλογής.
- Ο φορέας pUB-GW-Hyg (control) που περιείχε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (Hyg^R) σαν δείκτη επιλογής.

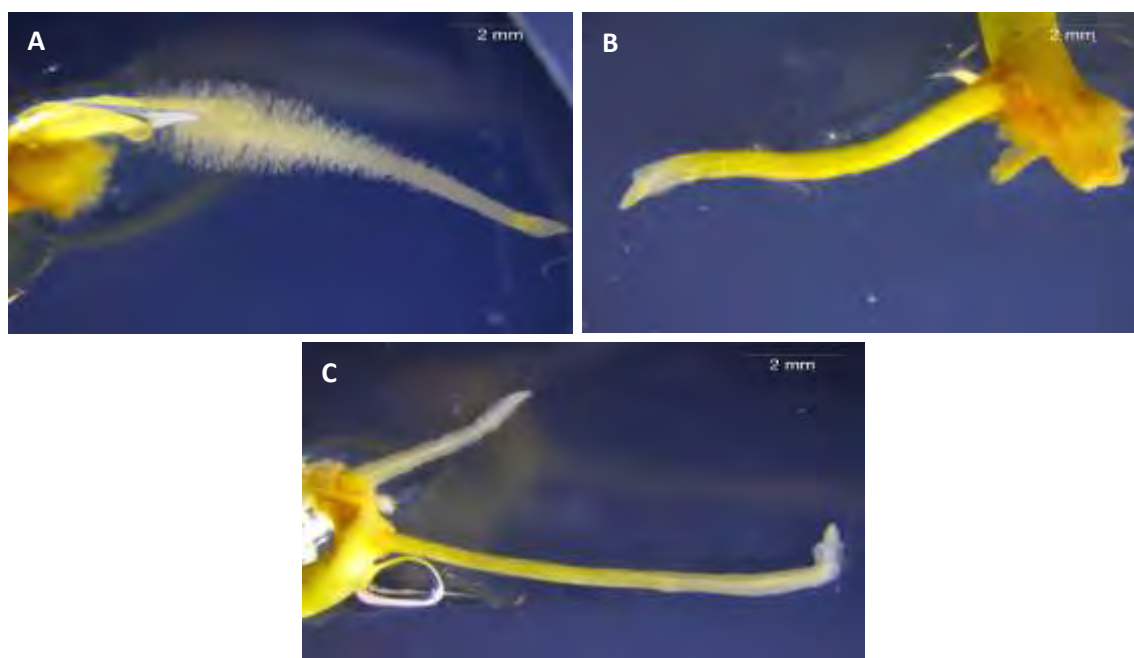
Οι φορείς που απομονώθηκαν παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 6, 7).



Εικόνα 6: Το ένθεμα του T-DNA που περιέχει ο δυαδικός φορέας. Ανάμεσα στο δεξί συνοριακό (RB) και στο αριστερό (LB) περιέχονται ο υποκινητής του γονιδίου της ουβικιτίνης (*LjUbq1pro*), οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2*, ο υποκινητής 35S καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (Hyg^R).



Εικόνα 7: Το ένθεμα του T-DNA που περιέχει ο δυαδικός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ως control. Ανάμεσα στο δεξί συνοριακό (RB) και στο αριστερό (LB) περιέχονται ο υποκινητής 35S και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (Hyg^R). Επίσης περιέχεται ο υποκινητής του γονιδίου της ουβικιτίνης πριν από ιντρόνιο ουβικιτίνης το οποίο βελτιώνει τις μεταγραφικές δραστηριότητες.

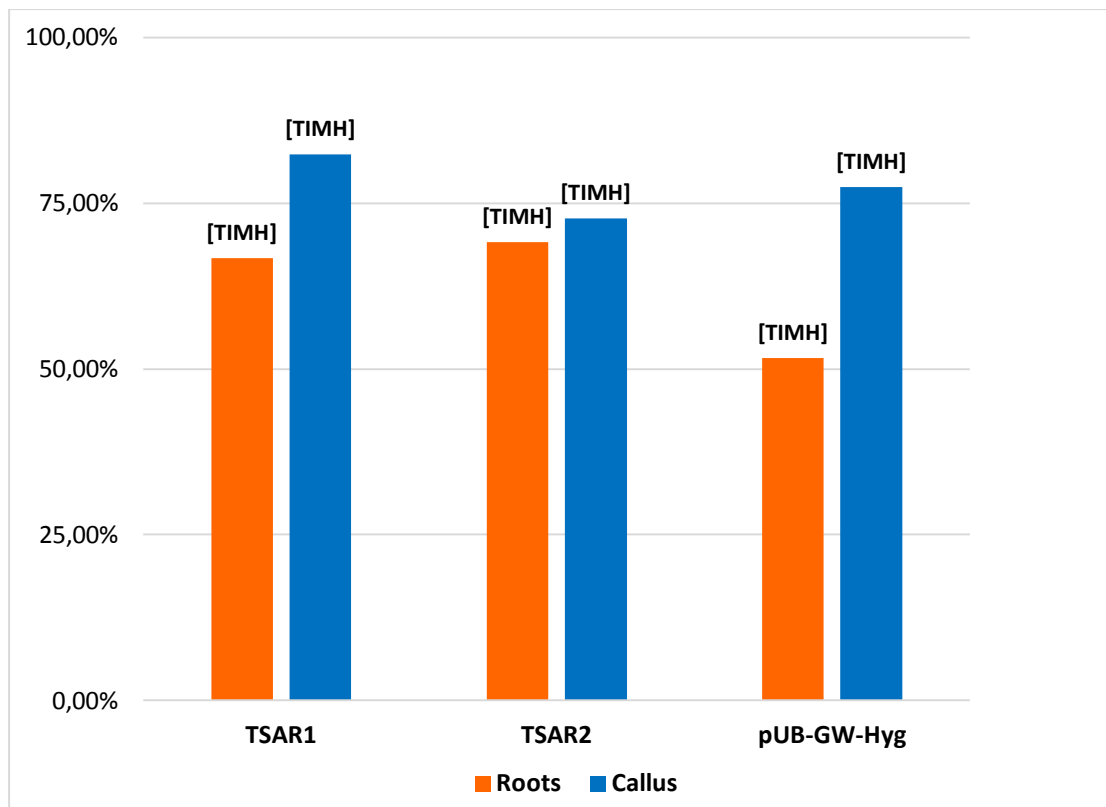


Εικόνα 8: Αντιπροσωπευτικές εικόνες αναγεννημένων ριζών, μορφολογίας hairy-root, φυτών *Trigonella foenum-graecum* μετασχηματισμένων με *A. rhizogenes* ARQUA που περιέχουν τον φορέα *TSAR2* (A), *TSAR1* (B) και pUB-GW-Hyg (C).

Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των φυτών στα οποία αναγεννήθηκαν ρίζες καθώς επίσης και των φυτών στα οποία παρατηρήθηκε σχηματισμός κάλλου. Τα νούμερα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5):

Construct	Total	Roots	Callus
TSAR1	51	34 (66,67%)	42 (82,35%)
TSAR2	55	38 (69,09%)	40 (72,73%)
pUB-GW-Hyg (CONTROL)	62	32 (51,61%)	48 (77,42%)

Πίνακας 5: Καταμέτρηση φυτών με αναγεννημένες ρίζες και φυτών που σχημάτισαν κάλλο.

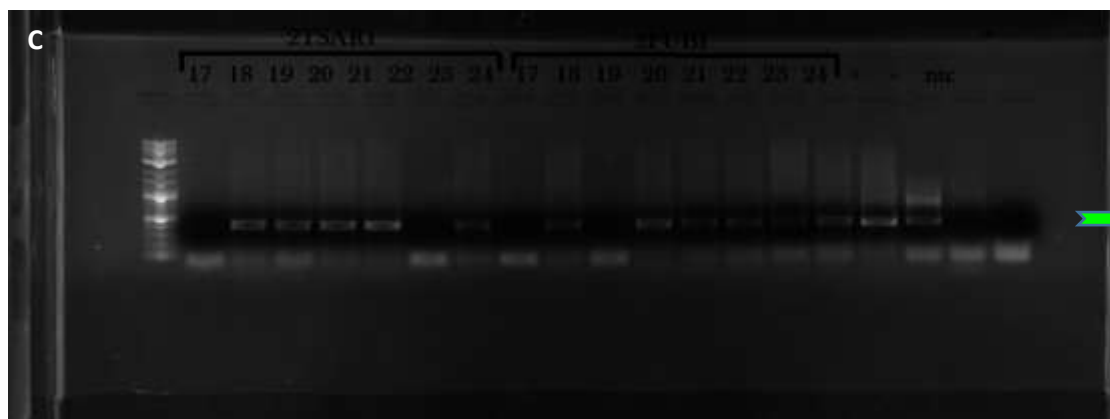
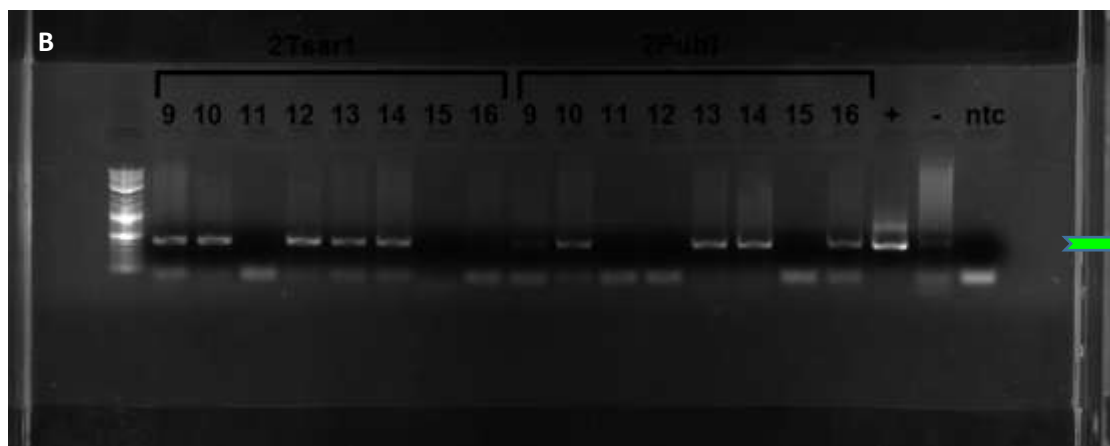
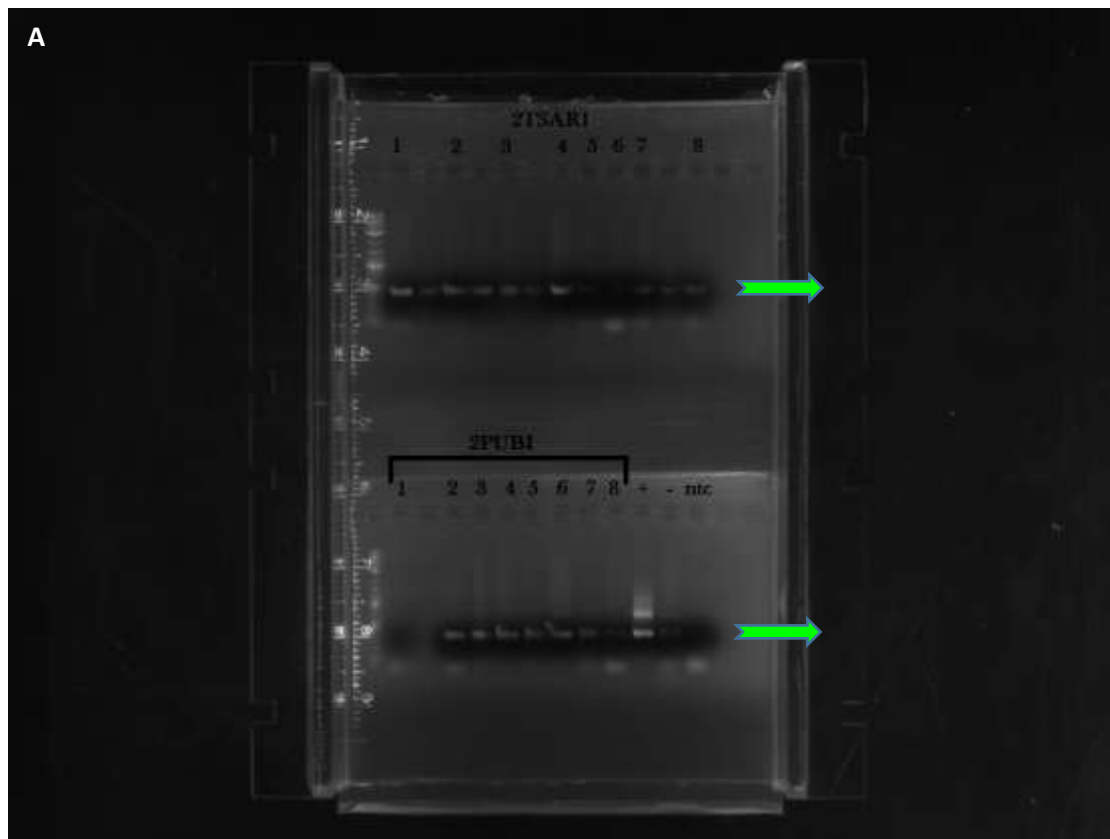


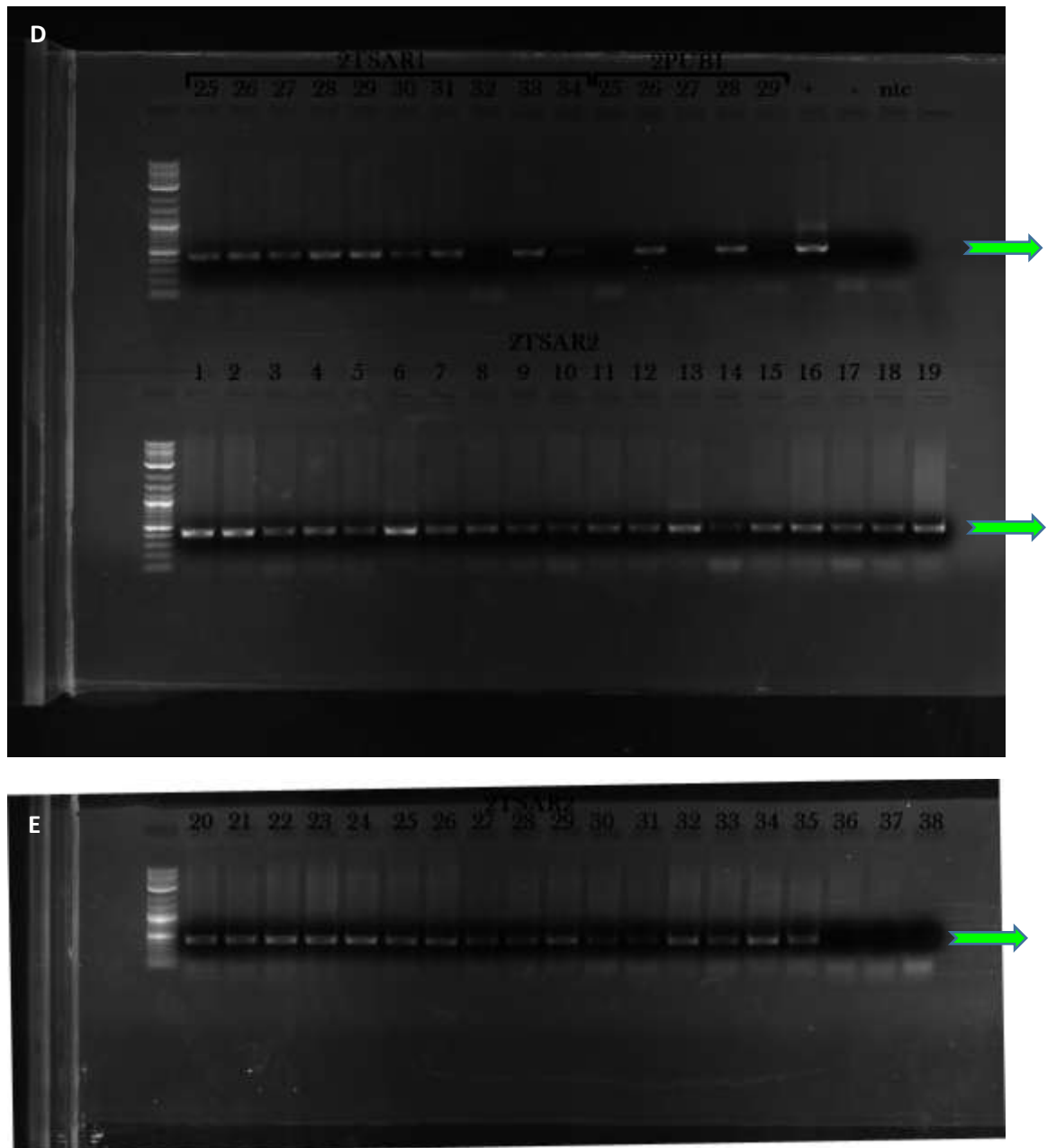
Πίνακας 6: Στο παραπάνω γράφημα αποτυπώνονται τα δεδομένα του Πίνακα 5 εκφρασμένα σε ποσοστά επί τοις εκατό για τα φυτά που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes* ARQUA μετασχηματισμένα με *TSAR1*, *TSAR2* και pUB-GW-Hyg (control). Οι στήλες με χρώμα πορτοκαλί αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά αναγεννημένων ριζών ενώ οι στήλες με μπλε χρώμα τα ποσοστά σχηματισμού κάλλου.

Όταν κρίθηκε ότι η ρίζα των φυτών στις γλάστρες ήταν μεγάλη και υγιής ώστε να μην προκληθεί βλάβη στα φυτά, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και απομόνωση DNA με την μέθοδο CTAB. Ο έλεγχος της απομόνωσης αλλά και η ποσοτικοποίηση επετεύχθη με την μέθοδο Qubit.

Με τη μέθοδο αυτή επιβεβαιώθηκε η επιτυχής απομόνωση DNA από τα δείγματα ενώ με βάση τις ποσότητες που απομονώθηκαν κρίθηκε και η πόσοτητα που χρησιμοποιήθηκε από κάθε δείγμα για την επίτευξη της PCR (σύμφωνα με το πρωτόκολλο). Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενίσχυαν τον υποκινητή 35S πριν το γονίδιο της υδρομυκίνης (Hyg^R), το οποίο βρίσκεται μέσα στα ενθέματα T-DNA, και αφού ολοκληρώθηκε η ενίσχυση όλα τα δείγματα φορτώθηκαν σε gel αγαρόζης 1%. Η PCR είχε δουλέψει επιτυχώς καθώς εμφανίζεται η επιθυμητή μπάντα στο θετικό control (+) ενώ δεν παρατηρείται μπάντα στο αρνητικό control (χωρίς γενετικό υλικό, NTC). Ελέγχθηκαν συνολικά, 29 φυτά pUB-GW-Hyg, 34 *TSAR1* φυτά, και 38 *TSAR2*. Η παρουσία μιας μπάντας περίπου 600bp στα δείγματα υποδηλώνει την ύπαρξη του υποκινητή 35S άρα και την επιτυχία του hairy-roots μετασχηματισμού στα δείγματα αυτά. Το ποσοστό μετασχηματισμού στα pUB-GW-Hyg δείγματα είναι

75,86%, 82,35% στα *TSAR1* δείγματα και 94,74% στα *TSAR2* δείγματα. Τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται παρακάτω (Εικόνα 9):





Εικόνα 9: Προϊόντα PCR, σε δείγματα pUB-GW-Hyg (pUBI), TSAR1 και TSAR2 με εκκινητές που στοχεύουν τον υποκινητή 35S πριν το γονίδιο της υγραμοκίνης (Hyg^R) στις κασέτες. Τα θετικά control δίνουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, όπως και τα control χωρίς γενετικό υλικό (NTC). Στα δείγματα pUB-GW-Hyg (συνολικά 29) που ελέγχθηκαν και φαίνονται στις υπο-εικόνες A, B, C και D, όλα εκτός των 1, 11, 12, 15, 18, 25 και 27, εμφανίζουν μπάντα με το επιθυμητό μέγεθος (~600bp). Άρα τα 22 δείγματα που εμφανίζουν την μπάντα είναι μετασηματισμένα. Συνεπώς το ποσοστό μετασηματισμού στα pUB-GW-Hyg δείγματα είναι 75,86%. Στα δείγματα TSAR1 (συνολικά 34) που ελέγχθηκαν και φαίνονται στις υπο-εικόνες A, B, C και D, όλα εκτός των 11, 15, 17, 22, 24 και 32, εμφανίζουν μπάντα με το επιθυμητό μέγεθος (~600bp). Άρα τα 28 δείγματα που εμφανίζουν την μπάντα είναι μετασηματισμένα. Συνεπώς το ποσοστό μετασηματισμού στα TSAR1 δείγματα είναι 82,35%. Στα δείγματα TSAR2 (συνολικά 38) που ελέγχθηκαν και φαίνονται στις υπο-εικόνες D και E, όλα εκτός των 36 και 37, εμφανίζουν μπάντα με το επιθυμητό μέγεθος (~600bp).

Άρα τα 36 δείγματα που εμφανίζουν την μπάντα είναι μετασχηματισμένα. Συνεπώς το ποσοστό μετασχηματισμού στα *TSAR2* δείγματα είναι 94,74%.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη περιγράφεται ο επιτυχής σχεδιασμός ενός πρωτοκόλλου μετασχηματισμού του φυτού *T. foenum-graecum* με τη διαμεσολάβηση δύο διαφορετικών στελεχών *A. rhizogenes*, ARQUA και LBA9402. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός hairy-roots στα οποία επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής μετασχηματισμός με την μέθοδο PCR και επακόλουθη ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Και τα δύο στελέχη *A. rhizogenes* που χρησιμοποιήθηκαν, ARQUA και LBA9402, έδωσαν σημαντικά υψηλά ποσοστά μετασχηματισμένων φυτών. Μάλιστα, το *A. rhizogenes* ARQUA ήταν εκείνο για το οποίο παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αποδοτικότητα στην ικανότητα μετασχηματισμού φυτών τριγωνέλλας σε ποσοστό 92,86% (συγκριτικά με το άλλο στέλεχος LBA9402: 85%). Στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα ποσοστά μετασχηματισμού φυτών τριγωνέλλας που μολύνθηκαν με *A. rhizogenes* ARQUA με τις κασέτες pUB-GW-Hyg, *TSAR1* και *TSAR2*, με ποσοστά μετασχηματισμού 75,86%, 82,35% και 94,74% αντίστοιχα. Όπως προειπώθηκε, η επιτυχία του μετασχηματισμού επηρεάζεται από παράγοντες όπως ο τύπος του στελέχους του αγροβακτηρίου, η πυκνότητά του (Park and Facchini 2000, Jian et al. 2009) και η κατάσταση της ανάπτυξης του βακτηριακού εναιωρήματος (Jian et al. 2009). Στην παρούσα μελέτη η πυκνότητα των βακτηριακών εναιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν για το ARQUA $OD_{600}=0,5$ και για το LBA9402 $OD_{600}= 0,7$. Στην μελέτη των Shahabzadeh et al. 2013, η βέλτιστη πυκνότητα βακτηριακού εναιωρήματος για την δημιουργία hairy-roots καλλιεργειών της τριγωνέλλας ήταν $OD_{600}= 1,2$. Σε φυτά *Lotus corniculatus* (Jian et al. 2009) η καλύτερη πυκνότητα για την επαγωγή καλλιεργειών hairy-roots ήταν $OD_{600}= 0,6$, ενώ σε φυτά σόγιας (*Glycinemax* (L.)

Merr.) χρησιμοποιήθηκαν αγροβακτήρια δύο διαφορετικών πυκνοτήτων, $OD_{600} = 0,6$ ή $OD_{600} = 1,2$ (Chen et al. 2017). Η επιτυχία του σχηματισμού των hairy-roots καλλιεργειών εξαρτάται επίσης και από το είδος του φυτού, την ηλικία και τον τύπο του φυτικού ιστού (Sevon and Oksman-Caldentey 2002) ενώ τα διαφορετικά είδη φυτών και ιστών μπορεί να αντιδράσουν διαφορετικά ανάλογα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των αγροβακτηρίων (Quandt et al. 1993). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν μια πολύ υψηλή συχνότητα μετασχηματισμού, που κυμαινόταν από 75,86% ως 94,74%, με το 94,74% να είναι και το υψηλότερο ποσοστό μετασχηματισμού που έχει παρατηρηθεί για την τριγωνέλλα. Η συχνότητα μετασχηματισμού στο πείραμα των Shahabzadeh et al. (2013) σε φυτά τριγωνέλλας κυμαινόταν μεταξύ 57,54-87,45%, στη σόγια στην αναφορά των Mazarei et al. (1998) από 5- 90% και 5- 85% στο έργο των Savka et al. (1990), ενώ τέλος στο *L. japonicus* από 78-85% (Díaz et al. 2005).

Επιπλέον, ως πρόσθετη απόδειξη του επιτυχούς πρωτοκόλλου μετασχηματισμού του φυτού *Trigonella foenum-graecum*, το επόμενο πειραματικό βήμα περιλάμβανε την επιμόλυνση των φυτών με *A. rhizogenes* ARQUA μετασχηματισμένου με φορείς που περιείχαν τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *MtTSAR1* και *MtTSAR2* του *M. Truncatula*, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της ουβικιτίνης του *L. japonicus*, για να οδηγήσει την έκφραση των *TSAR1* και *TSAR2*. Στο φυτό *M. truncatula* η επαγωγή της βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών σαπωνινών υπό συνθήκες στρες διαμεσολαβείται από τη μεταγραφική ενεργοποίηση του μονοπατιού (Suzuki et al. 2004, Broeckling et al. 2005). Έτσι, με την ετερόλογη έκφραση των *MtTSARs* στο φυτό *T. foenum-graecum* επιδιώκουμε να ελέγξουμε εάν είναι συντηρημένο το σηματοδοτικό μονοπάτι των *TSARs* και αν θα μπορούσε να διεγείρει την παραγωγή στεροειδών σαπωνινών με την αύξηση της παροχής του πρόδρομού τους, του μεβαλονικού οξέος. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη εισαγωγής λειτουργικού γονιδίου στην τριγωνέλλα μέσω των διαμεσολαβούμενων από αγροβακτήριο hairy-root καλλιεργειών.

Ο αρχικός σκοπός της παρούσας εργασίας, δηλαδή η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου επιτυχούς μετασχηματισμού του φυτού *Trigonella foenum-graecum* με την διαμεσολάβηση του *Agrobacterium rhizogenes*, έχει στεφθεί επιτυχώς. Εναλλακτικά στην τεχνική genotyping PCR, για τον έλεγχο του μετασχηματισμού, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μελέτη της έκφρασης του γονιδίου GFP ώστε να εκμεταλλευτεί ο φθορισμός αυτής της πρωτεΐνης. Ωστόσο, φθορισμός GFP δεν ανιχνεύθηκε σε πιθανά μετασχηματισμένα φυτά.

Σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου, είχε επιχειρηθεί να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου GFP, της ίδιας κασέτας έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, με υποκινητή τον 35S. Ωστόσο επειδή δεν ανιχνεύθηκε αυξημένη έκφραση GFP, θεωρήθηκε ότι ο υποκινητής 35S (που βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου GFP και καθορίζει την έκφρασή του) δεν λειτουργεί επιτυχώς στην τριγωνέλλα. Γι' αυτό και στα επόμενα στάδια, χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός, του 35S, υποκινητής. Δημιουργήθηκε λοιπόν μια νέα κατασκευή για την οποία επιλέχθηκε ο υποκινητής του γονιδίου της ουβικιτίνης του φυτού *Lotus japonicus* (LjUbq1pro) πριν τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *TSAR1* και *TSAR2*. Η έκφραση των διαγονιδίων στα φυτά ελέγχεται σε διαφορετικά στάδια: μεταγραφή,

μετάφραση και σταθερότητα προϊόντος-πρωτεΐνης. Τα βασικά ρυθμιστικά στοιχεία της έκφρασης των διαγονιδίων είναι οι υποκινητές και οι ενισχυτές στο επίπεδο της μεταγραφής, οι 5'-UTR και 3'-UTR (αμετάφραστες περιοχές) των γονιδίων στο επίπεδο της μετάφρασης και τέλος στο επίπεδο σταθερότητας του προϊόντος-πρωτεΐνης, πεπτίδια οδηγού ή άλλες αλληλουχίες που απαιτούνται για τη διαμερισματοποίηση των πρωτεϊνικών προϊόντων και την προστασία τους από πρωτεολυτική αποικοδόμηση (Vyacheslavona et al. 2012). Οι περισσότερες κατασκευές υπερέκφρασης συναρμολογούνται σε πλασμιδιακούς φορείς χρησιμοποιώντας ετερόλογους υποκινητές. Εν κατακλείδι, η σύνθεση μιας κατασκευής με τα κατάλληλα επιμέρους στοιχεία είναι και αυτή που θα εξασφαλίσει και την μεγαλύτερη επιτυχία. Η εργασία αυτή επιβεβαίωσε την επιλογή του ενδογενούς υποκινητή του γονιδίου της ουβικιτίνης ως καταλληλότερου για την υπερέκφραση γονιδίων στο φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*. Τέτοιου είδους μελέτες είναι σημαντικές για τη δημιουργία μιας τράπεζας βιομερών (bioparts) για τη χρήση των φυτών ως εργοστάσια παραγωγής χρήσιμων και οικονομικά σημαντικών ουσιών μέσω προσεγγίσεων συνθετικής βιολογίας.

Το δεύτερο σκέλος της παρούσας μελέτης, που αφορά την ετερόλογη έκφραση των *MtTSARs* (*TSAR1* και *TSAR2*) με στόχο να ελεγχθεί εάν το μονοπάτι σηματοδότησής τους είναι συντηρημένο στην τριγωνέλλα και αν μπορεί να διεγερθεί η παραγωγή των στεροϊδών σαπωνινών, δεν έχει ακόμη ολοκληρωθεί. Το πρώτο τμήμα αυτού του στόχου, δηλαδή ο μετασχηματισμός της τριγωνέλλας με τα *MtTSARs*, έχει επιτευχθεί. Η επιτυχία του μετασχηματισμού θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί επίσης με εφαρμογή της τεχνικής qReal-Time PCR η οποία είναι ιδιαίτερα κομβικό πειραματικό στάδιο το οποίο πρέπει επίσης να πραγματοποιηθεί για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *MtTSAR1* και *MtTSAR2* στα μετασχηματισμένα φυτά τριγωνέλλας. Είναι τόσο απαραίτητη διότι θα αποδείξει σε ποια από τα μετασχηματισμένα φυτά οι κατασκευές υπερέκφρασης εντέθηκαν σε ενεργή μεταγραφική περιοχή και κατά συνέπεια εκφράζουν τα γονίδια αυτά.

Επιπρόσθετα, για την ολοκλήρωση της πλήρους αρχικής σύλληψης της συγκεκριμένης μελέτης θα πρέπει να συμπληρωθούν επιπλέον βασικά πειραματικά στάδια. Το αμέσως επόμενο βήμα είναι να ελεγχθούν οι αλλαγές που συνέβησαν σε μεταγραφικό επίπεδο στα μετασχηματισμένα, με τα *MtTSARs*, φυτά τριγωνέλλας με τη χρήση εκκινητών για τα διάφορα γονίδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης των τριτερπενίων. Το κύριο ερώτημα που τίθεται αφορά την ικανότητα των μεταγραφικών παραγόντων *TSAR1* και *TSAR2* να ενεργοποιούν τα γονίδια που κωδικοποιούν το ένζυμο HMGR που ελέγχει τη ροή των μεταβολιτών για το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων, οδηγώντας στον σχηματισμό του πρόδρομου μορίου τους, του μεβαλονικού οξέος. Συνεπώς προτείνεται η εφαρμογή qRT-PCR για τα γονίδια αυτά. Τέλος, θα ήταν ενδιαφέρον να διαπιστωθεί αν το μονοπάτι βιοσύνθεσης των τριτερπενίων καθοδηγείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες *MtTSAR1* και *MtTSAR2* και στα μετέπειτα στάδια, με την πραγματοποίηση υγρής και αέριας χρωματογραφίας. Πρόκειται για μεθόδους διαχωρισμού χημικών ουσιών που στηρίζονται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινούμενης και μια στατικής φάσης.

Το φυτό *T. foenum-graecum* είναι πολύ σημαντικό αγρονομικά και χρησιμοποιείται εκτενώς λόγω των θεραπευτικών, φαρμακευτικών και θρεπτικών ιδιοτήτων του καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικά προϊόντα του δευτερογενή μεταβολισμού όπως είναι τα φλαβονοειδή, οι φυτοστερόλες και οι σαπωνίνες. Η συγκεκριμένη μελέτη προτείνει ένα πρωτόκολλο μετασχηματισμού υψηλής αποδοτικότητας που ανοίγει τον δρόμο για περαιτέρω γενετικές μελέτες και εξέλιξη της διαχείρισης του μεταβολισμού της τριγωνέλλας. Η ετερόλογη έκφραση των *TSARs* θα μπορούσε να δείξει την πιθανή ύπαρξη συντηρημένου μεταβολικού μονοπατιού των σαπωνινών στην τριγωνέλλα και αν πράγματι επηρεάζεται το μονοπάτι αυτό, τότε πιθανώς το πρωτόκολλο που προτείνουμε θα μπορούσε να εφαρμοστεί για παραγωγή σαπωνινών ή άλλων δευτερογενών μεταβολιτών (με τη χρήση διαφορετικών κασετών υπερέκφρασης) από ριζικές ιστοκαλλιέργειες. Τέλος, αν τα πειραματικά αυτά δεδομένα ακολουθήσουν κατάλληλες μελέτες, σε συνδυασμό με τους απαραίτητους ελέγχους και κλινικές δοκιμές, τα θεραπευτικά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού της τριγωνέλλας θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την πρόληψη, αντιμετώπιση και θεραπεία διαφόρων ανθρώπινων ασθενειών.

5. Βιβλιογραφία

1. Abdo MS, Al-Kafawi AA, 'Experimental studies on the effect of *Trigonella foenum-graecum*', 1969, *Planta Med* 17:14–18
2. A.D. Meyer, J. Tempé, P. Costantino, 'Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes', in: G. Stacey, N.T. Keen (Eds.), *Plant–Microbe Interactions*, APS Press, St. Paul, MN, 2000, pp. 93–139.
3. Al-Daghri N.M., M.S. Alokail, K.M. Alkharfy, A.K. Mohammed, S.H. Abd-Alrahman, S.M. Yakout, O.E. Amer, S. Krishnaswamy, 'Fenugreek extract as an inducer of cellular death via autophagy in human T lymphoma Jurkat cells', *BMC Complement. Altern. Med.* 12 (2012) 202
4. Anne Osbourn, Rebecca J. M. Gossb and Robert A. Fieldc, 'The saponins-polar isoprenoids with important and diverse biological Activities', *Nat. Prod. Rep.*, 2011, 28, 1261
5. Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S., and Bollinger W. H., 1985, 'Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials', *Science* 228: 1154–1160.
6. Belguith-Hadriche O., Bouaziz M., Jamoussi K., Simmonds, M.S., El Feki A., Makni-Ayedi F., 2013, 'Comparative study on hypocholesterolemic and

- antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds', *Food Chem.* 2, 1448-1453.
7. Bhatt RH, Khorana ML, Patel JR, et al. (1958). 'Pharmacological studies of saponins of the fruits of *Luffa echinata* Roxb. and seeds of *Trigonella foenum-graecum* Linn.', *Indian J Psychol* 2:309–21
 8. Broca C, Breil V, Cruciani-Guglielmacci C, et al. (2004). 'Insulinotropic agent ID-1101 (4-hydroxyisoleucine) activates insulin signaling in rat', *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E463–71
 9. Broeckling CD, Huhman DV, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P, Dixon RA, Sumner LW, 2005, 'Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism', *J Exp Bot* 56: 323–336
 10. Bulgakov VP, 2008, 'Functions of rol genes in plant secondary metabolism', *Biotechnol Adv* 26:318–324
 11. Carretero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martínez-García JF, Bilbao-Castro JR, Robertson DL, 2010, 'Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae', *Plant Physiol* 153: 1398–1412
 12. Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward and D.C. Prasher, 1994, 'Green fluorescent protein as a marker for gene expression', *Science* 263:725-888.
 13. Clara L Díaz, Mette Grønlund, Helmi RM Schlaman, and Herman P Spaink, 'Induction of hairy roots for symbiotic gene expression studies', *Lotus japonicus Handbook*, pp. 261-277, Chapter 6.2
 14. Crane C1, Wright E, Dixon RA, Wang ZY, 'Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* -transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots', *Planta*, 2006, May, 223(6):1344-54.
 15. Darlington CD, Wylie AP., 'Chromosome atlas of flowering plants', George Allen & Unwin Ltd., London. 1945, p: 164.
 16. De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A, 2012, 'Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism', *Trends Plant Sci* 17: 349–359
 17. DiCosmo F., and Misawa, M., 1995, 'Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production', *Biotechnol. Adv.* 13: 425–453.
 18. Dixit PP, Misar A, Mujumdar AM, Ghaskadbi S., 2010, 'Pre-treatment of Syndrex protects mice from becoming diabetic after streptozotocin injection', *Fitoterapia* 81:403–12
 19. Dixon R. A. and Sumner L. W., *Plant Physiol.*, 2003, 131, 878–885.
 20. Flammang, A., Cifone, M., Erexson, G., Stankowski, L., 2004, 'Genotoxicity testing of a fenugreek extract', *Food Chem. Toxicol.* 11, 1769–1775
 21. Gholami A., De Geyter N., Pollier J., Goormachtig S., Goossens A., 2014, 'Natural product biosynthesis in *Medicago* species', *Nat Prod Rep* 31: 356-380

22. Gupta R, Nair S., 1999, 'Antioxidant flavonoids in common Indian diet', South Asian J Prev Cardiol 3:83–94]
23. Gu X. and D.P.S. Verma, 1997, 'Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division', Plant Cell 9:157-169.
24. Haouala, R., Hawala, S., El-Ayeb, A., Khanfir, R. et al., 'Aqueous and organic extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. inhibit the mycelia growth of fungi', J. Environ. Sci. 2008, 20, 1453–1457.
25. Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey PC, 2003, 'The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity', Mol Biol Evol 20: 735–747
26. Heim R. and Tsien R.Y., 1996, 'Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer', Curr. Biol.: 178-182.
27. Heinlein, M., B.L. Epel, H.S. Padgett and R.N. Beachy, 1995, 'Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton', Science 270:1983-1985.
28. Hu, Z. B., and Du, M., 2006, 'Hairy root and its application in plant genetic engineering', J. Int. Plant Biol. 48: 121–127.
29. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE, 2003, 'Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*', Plant Mol Biol 51: 731–743
30. J. Chappell, Curr. Opin. Plant Biol., 2002, 5, 151–157.
31. Jean-Paul Vincken, Lynn Heng, Aede de Groot, Harry Gruppen, 'Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom', Phytochemistry 68, 2007, 275–297
32. Jian B, Hou W, Wu C, Liu B, Liu W, Song S, Bi Y, Han T., 2009, 'Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of super root-derived *Lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics', BMC Plant Biol. 9: 1-14
33. Jin, Y., Shi, Y., Zou, Y., Miao, C. et al., 'Fenugreek prevents the development of STZ-induced diabetic nephropathy in a rat model of diabetes', *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014, 2014, 259368.
34. Joshi S, Raghuvanshi SS., 'Bchromosomes, pollen germination in situ and connected grains in *Trigonella foenumgraecum*. Beitr', Biol. Pf.I. 1968; 44 (2): 161 – 6.
35. Joubert P, Beaupere D, Lelievre P, Wadouachi A, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS, 2002, 'Effect of phenolic compounds on *Agrobacterium vir* genes and gene transfer induction—a plausible molecular mechanism of phenol binding protein activation', Plant Sci 162:733–743
36. Kalyan C. Nagulapalli Venkata, Anand Swaroop, Debasis Bagchi and Anupam Bishayee, 'A small plant with big benefits: Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) for disease prevention and health promotion' Mol Nutr Food Res., 2017, Jun;61(6).

37. Kazan K, Manners JM, 2013, 'MYC2: the master in action', *Mol Plant* 6: 686–703
38. Kevei Z, Lougnon G, Mergaert P, Horváth GV, Kereszt A, Jayaraman D, Zaman N, Marcel F, Regulski K, Kiss GB, et al, 2007, '3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*', *Plant Cell* 19: 3974–3989
39. Kieran P, 2001, 'Bioreactor design for plant cell suspension cultures', In: Cabral JMS (ed) *Principles of multiphase reactor design*. Harwood Academic Publishers, pp 391–426
40. Kim, Y. J., Weathers, P. J., and Wyslouzil, B. E., 2002a, 'The growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid and gas phase reactors', *Biotechnol Bioeng.* 80: 454–464.
41. Kim, Y. J., Wyslouzil, B. E., and Weathers, P. J., 2002b., 'Invited review: secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors', *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 38: 1–10.
42. Khalil M.I.M., M.M. Ibrahim, G.A. El-Gaaly, A.S. Sultan, 'Trigonella foenum (fenugreek) induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line, HepG2, mediated by upregulation of p53 and proliferating cell nuclear antigen', *Biol. Med. Res. Int.*, 2015.
43. Khatodia Surender and Biswas Kakoli, 'A comparative study of Hairy Root Culture induction efficiency in four medicinally important plants using *Agrobacterium rhizogenes*', *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2014) 3(5): 625-633
44. Li Chen, Yupeng Cai, Xiujie Liu, Chen Guo, Shi Sun, Cunxiang Wu, Bingjun Jiang, Tianfu Han, Wensheng Hou, 'Soybean hairy roots produced in vitro by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation', *THE CROP JOURNAL* XX (2017) XXX-XXX
45. Madar Z, Shomer I., 1990, 'Polysaccharide composition of a gel fraction derived from fenugreek and its effect on starch digestion and bile acid absorption in rats', *J Agric Food Chem* 38:1535–39
46. Maekawa Takaki, Kusakabe Mitsumasa, Shimoda Yoshikazu, Sato Shusei, Tabata Satoshi, Murooka Yoshikatsu and Hayashi Makoto, 'Polyubiquitin Promoter-Based Binary Vectors for Overexpression and Gene Silencing in *Lotus japonicus*', *MPMI* Vol. 21, No. 4, 2008, pp. 375–382, The American Phytopathological Society
47. Mazarei T, Ying Z, Houtz RL., 1998, 'Functional analysis of the Rubisco large subunit \hat{A} N-methyltransferase promoter from tobacco and its regulation by light in soybean hairy roots', *Plant Cell Rep.* 17: 907-912
48. Mertens Jan, Jacob Pollier, Robin Vanden Bossche, Irene Lopez-Vidriero, José Manuel Franco-Zorrilla, and Alain Goossens, 'The bHLH Transcription Factors TSAR1 and TSAR2 Regulate Triterpene Saponin Biosynthesis in *Medicago truncatula*', *Plant Physiol.* 2016 Jan; 170(1): 194–210.
49. Meyer A, Tempe J, Constantino P, 2000, 'Hairy root: a molecular over-view. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes', In:

- Stacey G, Keen NT, ed. Plant – microbe interactions Vol.5. Saint Paul, MN: APS Press, 93 – 139
50. Milen I, Georgiev & Atanas I, Pavlov & Thomas Bley, ‘Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances’, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74:1175–1185
 51. Park S-U, Facchini PJ, 2000, ‘Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures’, *J Exp Bot* 347:1005–1016
 52. Pauwels L, Inzé D, Goossens A, 2009, ‘Jasmonate-inducible gene: what does it mean?’, *Trends Plant Sci* 14: 87–91
 53. Petit PR, Sauvaire YD, Hillaire-Buys DM, et al., 1995, ‘Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol’, *Steroids* 60:674–80
 54. Petropoulos GA., ‘Agronomic, genetic and chemical studies of *Trigonella foenumgraecum* L., PhD. Diss. Bath University, England. 1973, 145p.
 55. Petropoulos GA., ‘Fenugreek, The genus *Trigonella*’, Taylor and Francis, London and New York. 2002, p: 255.
 56. Pires N, Dolan L, 2010, ‘Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants’, *Mol Biol Evol* 27: 862–874
 57. Pollier J, Moses T, González-Guzmán M, De Geyter N, Lippens S, Vanden Bossche R, Marhavý P, Kremer A, Morreel K, Guérin CJ et al., (2013a), ‘The protein quality control system manages plant defence compound synthesis’, *Nature* 504: 148–152
 58. Poojadevi Sharma, Harish Padh, Neeta Shrivastava, ‘Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants’, *Eng. Life Sci.* 2013, 13, No. 1, 62–75
 59. Prasher, D.C., V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergrast and M.J. Cormier., 1992, ‘Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein’, *Gene* 111:229-233.
 60. Qi, X., Bakht, S., Qin, B., Leggett, M., Hemmings, A., Mellon, F., Eagles, J., Werck-Reichhart, D., Schaller, H., Lesot, A., Melton, R., and Osbourn, A., 2006, ‘A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense’, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 18848– 18853
 61. Quandt HJ, Pühler A, Broer I., 1993, ‘Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules’, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 699-706
 62. Raju, J., Gupta, D., Rao, A. R., Yadava, P. K. et al., ‘*Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes’, *Mol. Cell. Biochem.* 2001, 224, 45–51.
 63. Randhir, R., Lin, Y-T., Shetty, K., ‘Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors’, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2004, 13, 295–307.

64. Rayyan, S., Fossen, T., Andersen, O.M., 2010, 'Flavone C-glycosides from seeds of fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L.', J. Agric. Food Chem. 12, 7211-7217
65. Rosengarten F., 'The Book of Spices', Livingston, Wynnewood, Penns., USA. 1969, 250p.
66. Satheeshkumar N, Mukherjee PK, Bhadra S, Saha BP., 2010, 'Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum-graecum* L. and its constituents', Phytomedicine 17:292-5
67. Savka MA, Ravillion B, Noel GR, Farrand S., 1990, 'Induction of hairy roots on co-cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode', Phytopathology 80: 503-508
68. Sevon N, Oksman-Caldentey K-M, 2002, 'Agrobacterium rhizogenes mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids', Planta Med 68:859-868
69. Shabbeer S, Sobolewski M, Anchoori RK et al., 2009, 'Fenugreek: A naturally occurring edible spice as an anticancer agent', Cancer Biol Ther 8:272-8
70. Sheen, J., S.B. Hwang, Y. Niwa, H. Kobayashi and D.W. Galbraith, 1995, 'Green fluorescent protein as a new vital marker in plant cells', Plant J.8:777-784.
71. Shibuya, M., Hoshino, M., Katsube, Y., Hayashi, H., Kushiro, T., and Ebizuka, Y., 2006, 'Identification of b-amylin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay', FEBS J.273:948-959.
72. Shim SH, Lee EJ, Kim JS, et al., 2008, 'Rat growth-hormone release stimulators from fenugreek seeds', Chem Biodivers 5:1753-61
73. Srivastava Smita and Srivastava Ashok K., 'Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites', Critical Reviews in Biotechnology, 27:29-43, 2007
74. Stewart Jr C.N., 'The utility of green fluorescent protein in transgenic plants', Plant Cell Rep, 2001, 20:376-382
75. Surender Khatodia and Kakoli Biswas, 2014, 'International Journal of Current Microbiology and Aplide Science' 3(5): 625-633.
76. Suzuki H, Achnine L, Xu R, Matsuda SPT, Dixon RA, 2002, 'A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*', Plant J 32: 1033-1048
77. Suzuki H, Reddy MSS, Naoumkina M, Aziz N, May GD, Huhman DV, Sumner LW, Blount JW, Mendes P, Dixon RA, 2005, 'Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic reprogramming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*', Planta 220: 696-707
78. Takaki Maekawa, Mitsumasa Kusakabe, Yoshikazu Shimoda, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Yoshikatsu Murooka and Makoto Hayashi, 'Polyubiquitin Promoter-Based Binary Vectors for Overexpression and Gene Silencing in *Lotus japonicas*', MPMI Vol. 21, No. 4, 2008, pp. 375-382.

79. Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH, 2003, 'The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family', *Plant Cell* 15: 1749–1770
80. Veerasham. C., 2004, 'Medicinal Plant Biotechnology', CBS Pub., New Delhi, 377–419.
81. Vyacheslavova A. O., Berdichevets I. N., Tyurin A. A., Shimshilashvili Kh. R., Mustafaev O. N. and Goldenkova-Pavlova I. V., 'Expression of Heterologous Genes in Plant Systems: New Possibilities', ISSN 1022-7954, *Russian Journal of Genetics*, 2012, Vol. 48, No. 11, pp. 1067–1079.
82. Wasternack C, Hause B, 2013, 'Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*', *Ann Bot (Lond)* 111: 1021–1058
83. Xue W, Lei J, Li X, Zhang R., 2011, '*Trigonella foenum-graecum* seed extract protects kidney function and morphology in diabetic rats via its antioxidant activity', *Nutr Res* 31:555–62