



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

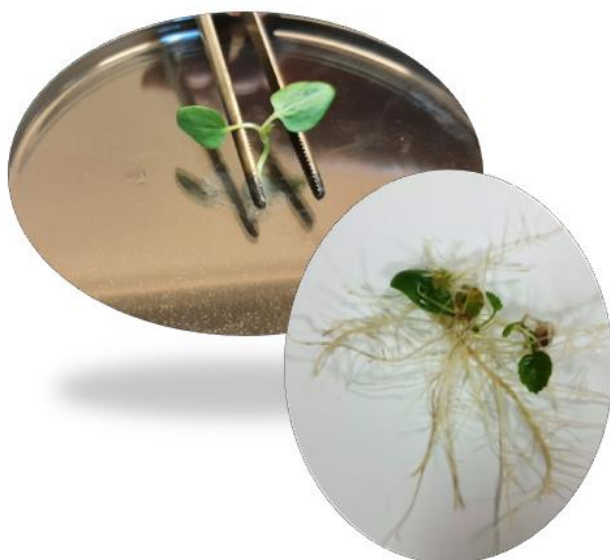
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΕΙΦΟΡΟΣ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΗ ΦΥΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στο είδος *Althea officinalis* L. ως
πλατφόρμα για ενδογενή παραγωγή βιοδραστικών συστατικών»



ΤΟΥΜΠΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΒΟΛΟΣ 2023

«Ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στο είδος *Althea officinalis* L. ως πλατφόρμα για ενδογενή παραγωγή βιοδραστικών συστατικών»

«Development of transgenic roots in *Althea officinalis* L. as a platform for endogenous production of bioactive compounds»

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΤΟΥΜΠΟΥ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πετρόπουλος Σπυρίδων, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιαννούλης Κυριάκος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Copyright © ΤΟΥΜΠΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ, 2023.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής μου διατριβής κα. Ουρανία Παυλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, για την βοήθεια της και τις εύστοχες υποδείξεις της καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, την κριτική ανάγνωση του κειμένου και πάνω από όλα τη στήριξή της. Είμαι ιδιαίτερα χαρούμενη και περήφανη που συνεργάζομαι μαζί της και έχω την ευκαιρία να μάθω ακόμα περισσότερα δίπλα της.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ευαγγελία Παναγιωτάκη, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών για τις πολύτιμες συμβουλές της και τη βοήθεια της που απλόχερα μου παραχώρησε όταν ήταν αναγκαία.

Θερμές ευχαριστίες και τον κ. Γιαννούλη Κυριάκο, Επίκουρο Καθηγητή Εργαστηρίου Γεωργίας και Εφαρμοσμένης Φυσιολογίας Φυτών καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Λαχανοκομίας του Τμήματος, κ. Σπυρίδων Πετρόπουλο, για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου, τόσο τους παλιούς όσο και τους νέους, για την αγάπη, τη στήριξη και την πίστη τους σε μένα.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θέλω να το δώσω την οικογένειά μου και κυρίως στους γονείς μου, Παναγιώτη και Μαγδαληνή, για την αμέριστη αγάπη και εμπιστοσύνη αλλά και για την στήριξή τους στην απόφασή μου να συνεχίσω τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φαρμακευτικά φυτά συνθέτουν ποικίλα βιοδραστικά συστατικά, με εξαιρετικές βιολογικές και φαρμακευτικές ιδιότητες, τα οποία αξιοποιούνται στις βιομηχανίες συμπληρωμάτων διατροφής, φαρμάκων ή/και καλλυντικών. Τα φαρμακευτικά φυτά, ως επί το πλείστον, οφείλουν τις θεραπευτικές τους ιδιότητες στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Με δεδομένο ότι η καλλιέργεια ή/και αφθονία των εν λόγω ειδών δεν απαντά στην αυξανόμενη ζήτηση βιοδραστικών συστατικών, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται προς την ενίσχυση της παραγωγής φυτικής βιομάζας κατάλληλης για τη δημιουργία εκχυλισμάτων με υψηλό βιοδραστικό δυναμικό. Η δενδρομολόχα, με επιστημονική ονομασία *Althea officinalis* L., αποτελεί φαρμακευτικό είδος, στη ρίζα του οποίου συντίθενται βιοδραστικά συστατικά που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, ανοσοτροποποιητική, αντιβηχική και καταπραϋντική δράση. Η παρούσα διατριβή είχε ως αντικείμενο μελέτης τη βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althea officinalis* L., μέσω του *Agrobacterium rhizogenes*, για την ευχερή παραγωγή διαγονιδιακών ριζών οι οποίες θα αξιοποιηθούν ως πλατφόρμα παραγωγής και εξαγωγής δευτερογενών μεταβολιτών με βιοδραστικές ιδιότητες. Προς τη κατεύθυνση αυτή, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με τη χρήση δύο διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, των *R1000* και *Arqua*, και δύο πρωτοκόλλων που διέφεραν ως προς τη σύνθεση των υποστρωμάτων, και ειδικότερα την παρουσία MES και τη συγκέντρωση σουκρόζης και ακετοσυρινγκόνης. Τα συνολικά ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημαντική επίδραση τόσο του βακτηριακού στελέχους όσο και της σύστασης των υποστρωμάτων σε όλες τις παραμέτρους που σχετίζονται με το μετασχηματισμό, όπως ο χρόνος έκπτυξης νέων ριζών, η δομή και μορφολογία των νεοεκπυσσόμενων ριζών και η συχνότητα του μετασχηματισμού. Αναφορικά με το βακτηριακό στέλεχος, τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την υπεροχή του *R1000*, η οποία προκύπτει βάσει του χρόνου εμφάνισης των νέων ριζών αλλά και του φαινοτύπου τους, ο οποίος υπήρξε χαρακτηριστικός των ριζών που προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό με το βακτήριο *A. rhizogenes*. Ειδικότερα, οι *R1000*-ρίζες εμφάνισαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των θυσσανωδών ριζών με αυξημένη ικανότητα διακλάδωσης στην εγγύτατη περιοχή του υποκοτυλίου, συχνά συνοδευόμενης από πλαγιοτροπική ανάπτυξη, ενώ τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Arqua* ανέπτυξαν ριζικό σύστημα που δε διέφερε φαινοτυπικά από το

αντίστοιχο των φυτών αγρίου τύπου. Σχετικά με την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, αναδείχθηκε η θετική επίδραση της παρουσίας του MES καθώς και των υψηλότερων συγκεντρώσεων σουκρόζης και ακετοσυρινγκόνης στα θρεπτικά μέσα εμβολιασμού και καλλιέργειας των φυτών. Βάσει των ανωτέρω, η εφαρμογή του Πρωτοκόλλου 2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της συχνότητας μετασχηματισμού, η οποία αναδείχθηκε κυρίως κατά τον εμβολιασμό με το στέλεχος *R1000*, ο οποίος επέτρεψε την ανάπτυξη φαινοτυπικά διακριτών διαγονιδιακών ριζών. Περαιτέρω, ο έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού πραγματοποιήθηκε μέσω αντιδράσεων PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *rolB2*, που εδράζει στο T-DNA, και της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes*. Η επιβεβαίωση της επιτυχούς ένθεσης του γονιδίου *rolB2*, σε συνδυασμό με την αδυναμία ενίσχυσης της αλληλουχίας *virCD*, στο σύνολο των δειγμάτων ριζών που εξετάστηκαν αποδεικνύουν τη διαγονιδιακή φύση των ριζών που αναπτύχθηκαν έπειτα από τον εμβολιασμό με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*. Συμπερασματικά, τα ευρήματα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις σχετικά με την αποτελεσματικότητα του προτεινόμενου πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών αλθέας με κύριο στόχο την παραγωγή και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών. Προς την κατεύθυνση αυτή, περαιτέρω θετικά θα δράσει προφανώς και η μελλοντική κλιμάκωση της παραγωγής σε βιοαντιδραστήρες που επιτρέπουν την ταχεία και ανεξάρτητη από τις κλιματικές συνθήκες παραγωγή της απαιτούμενης για τη βιομηχανία ποσότητα βιομάζας.

SUMMARY

Aromatic and pharmaceutical plant species produce bioactive compounds with exceptional biological and medicinal properties for exploitation in pharma, cosmetics and/or food supplements industries. Pharmaceutical plants, mainly owe their medicinal properties to the endogenous production of secondary metabolites. Given that cultivation and/or abundance of such species does not meet the increasing demands for bioactive compounds, the research interest is directed towards enhancing plant biomass suitable for the production of extracts with high bioactive potential. Marshmallow, with scientific name *Althea officinalis* L., consists a pharmaceutical plant species whose root is capable of producing bioactive compounds of interest, owing to their antimicrobial, anti-inflammatory, immunomodulatory, antitussive and pain-relieving action. This study aimed at optimizing a genetic transformation for *Althea officinalis* L., through *Agrobacterium rhizogenes*, for an efficient production of transgenic roots, suitable for exploitation in processes related to secondary metabolite extraction. In the framework of optimizing such protocol, transformation was performed using two different bacterial strains, R1000 and Arqua, and two protocols, differing with respect to media composition, specifically the addition of MES and the concentration of sucrose and acetosyringone. Overall findings highlight the essential influence of both the bacterial strain and media composition in all parameters related to transformation, such as time to root emergence, root structure and morphology as well as transformation efficiency. In relation to the bacterial strain, our findings point to the superiority of R1000, as evidenced by the time to root emergence but also the phenotype of roots, which was characteristic of *A. rhizogenes*-mediated transgenic roots. Specifically, the R1000-roots showed a typical hairy-root phenotype with high branching ability at the hypocotyl area, often accompanied by plagiotropic development. In contrast, seedlings transformed with the strain Arqua developed a root system that did not differ phenotypically to those of wild-type plants. As far as the protocol efficiency is concerned, our findings point to the positive effect of both MES and higher sucrose and acetosyringone concentrations in inoculation and culture media. As such, protocol 2 yielded considerably higher transformation frequency, which was mainly evidenced at R1000-transformed seedlings, which formed roots of a transgenic phenotype. The transgenic nature of emerged roots was demonstrated by the successful amplification of the *rolB2* gene, which is located at the Ri T-DNA, along with the absence of the *vii virCD* sequence of

A. rhizogenes, in all root samples tested. Conclusively, these findings provide strong evidence related to the efficiency of the proposed transformation protocol for the induction of hairy roots in marshmallow with primary goal of the production and extraction of secondary metabolites. Towards this direction, such approach may be combined with a large-scale biomass production in bioreactors, which allows for a fast, sustainable and independent of environmental conditions, production of the biomass required for industrial use.

Εγώ, η Τούμπου Χριστίνα είμαι η συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα. Τούμπου Χριστίνα.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
SUMMARY	vi
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Γενικά.....	1
1.1 Φαρμακευτικά φυτά.....	3
1.1.1 Η τάση για τη χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης.....	3
1.1.2 Τα φαρμακευτικά φυτά ως εργοστάσια παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών.....	5
1.1.3 Προβλήματα και προκλήσεις που απορρέουν από τη χρήση φαρμακευτικών φυτών	6
1.2 Το είδος <i>Althea officinalis</i>	8
1.2.1. Βοτανική περιγραφή	8
1.2.2. Αύξηση και ανάπτυξη.....	10
1.2.3. Χρήσιμες ουσίες	10
1.2.4 Χρήσεις	12
1.3. Βελτίωση των φαρμακευτικών φυτών	13
Μοριακοί Δείκτες	16
Καλλιέργεια <i>in vitro</i> φυτικών ιστών	16
Γενετική Μηχανική.....	17
1.4 Το <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	19
1.4.1 Το Πλασμίδιο <i>Ri</i>	20
1.4.2 Ο φαινότυπος <i>Ri</i>	22
1.4.3 Εφαρμογές του μετασχηματισμού μέσω του <i>A. rhizogenes</i> σε φαρμακευτικά φυτά	24
1.5 Σκοπός της Μελέτης	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1 Φυτικό υλικό	28
2.2 Στελέχη του <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και συνθήκες ανάπτυξης.....	28
2.3 Μετασχηματισμός σποροφύτων φακής μέσω του <i>A. rhizogenes</i>	29
2.3.1 Πρωτόκολλο 1	29
2.3.2 Πρωτόκολλο 2	32
2.4 Συλλογή ιστού και Εξαγωγή DNA	33
2.5 Έλεγχος του μετασχηματισμού μέσω PCR	35
2.6 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αгарόζης.....	37

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου μετασχηματισμού στην αλθέα	38
3.1.1 Χρόνος έκπτυξης ριζών μετά των εμβολιασμό	38
3.1.2 Φαινοτυπική αξιολόγηση του ριζικού συστήματος των μετασχηματισμένων φυτών	40
3.2 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων	43
3.3 Αλληλεπίδραση βακτηριακού στελέχους και πρωτοκόλλου	45
3.4 Προτεινόμενη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού με το βακτηριακό στέλεχος <i>R1000</i>	47
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γενικά

Οι καλλιέργειες ριζών έχουν τύχει συστηματικής μελέτης από τα πρώτα στάδια της έρευνας στην ιστοκαλλιέργεια, προσελκύοντας ωστόσο περιορισμένο ενδιαφέρον σε πρακτικό επίπεδο εξαιτίας του αργού ρυθμού ανάπτυξής τους. Αν και οι καλλιέργειες ριζών καθώς και βλαστών αξιοποιήθηκαν σε μελέτες αλκαλοειδών, κουμαρινών, σαπωνινών, φαινολικών οξέων, αιθέριων ελαίων, τερπενοειδών, γλυκοσιδίων, στεροειδών λακτονών και άλλων ενώσεων ενδιαφέροντος, και επιπλέον χαρακτηρίζονται από βελτιωμένη γενετική και βιοσυνθετική σταθερότητα, συγκριτικά με τις κυτταρικές καλλιέργειες, η αξιοποίησή τους ως πηγή δευτερογενών μεταβολιτών είναι σαφώς περιορισμένη. Εναλλακτικά, οι καλλιέργειες «τριχωτών ριζών» προσφέρουν συγκριτικά πλεονεκτήματα, τα οποία αδιαμφισβήτητα προάγουν τη χρήση τους ως πηγή δευτερογενών μεταβολιτών. Οι διαγονιδιακές ρίζες, έπειτα από ενσωμάτωση των γονιδίων *rol*, τα οποία τυπικά μεταφέρονται από το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*, εμφανίζουν φαινοτυπική και γενετική σταθερότητα, ταχύ ρυθμό αύξησης, ανεξάρτητο από πηγές εξωγενών ορμονών, και χαρακτηρίζονται από έλλειψη γεωτροπισμού. Πέραν της δυνατότητας αξιοποίησής τους για την ανακάλυψη και παραγωγή νέων βιολογικά σημαντικών συστατικών, οι διαγονιδιακές ρίζες εμφανίζουν ευκολία στη διατήρησή τους και συχνά χαρακτηρίζονται από την ίδια ή αυξημένη βιοσυνθετική ικανότητα παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών συγκριτικά με τα αγρίου τύπου μητρικά φυτά. Βάσει των ανωτέρω, τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στρέφεται προς την αξιοποίησή τους ως πλατφόρμα με υψηλό δυναμικό παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών που προορίζονται για εμπορική χρήση. Η στρατηγική αυτή κερδίζει συνεχώς περισσότερο έδαφος για τη μετάβαση από την εργαστηριακή στη μεγάλη κλίμακας παραγωγή, η οποία υποστηρίζεται μέσω της χρήσης συστημάτων βιοαντιδραστήρων.

Το είδος *Althea officinalis*, με κοινό όνομα αλθέα ή δενδρομολόχα, αποτελεί φαρμακευτικό φυτό που παραδοσιακά χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα φύλλα, οι σπόροι και κυρίως η ρίζα της αλθέας αποτελούν πηγή δευτερογενών μεταβολιτών με φαρμακευτικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να αποτελεί είδος που αξιοποιείται ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία. Τα συστατικά ενδιαφέροντος

εστιάζονται στην υψηλή περιεκτικότητα σε πηκτίνη, μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και σακχαρόζη, άμυλο, γλίσχρασμα, φλαβονοειδή, κουμαρίνες, σκοπολετίνη, τανίνες, και ασπαριγίνες, ουσίες που προσδίδουν στο φυτό αντιμικροβιακές, αντικές, αντιμυκητιακές αντιφλεγμονώδεις, καταπραϋντικές και αντιβηχικές ιδιότητες. Βάσει του βιοχημικού προφίλ των ριζών της, η αλθέα αποτελεί ένα από τα φαρμακευτικά φυτά στα οποία έχουν εφαρμοστεί πρωτόκολλα επαγωγής τριχωτών ριζών για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, χωρίς ωστόσο να έχει ερευνηθεί εκτενώς η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων που επιτρέπουν την ευχερή και ταχεία ανάπτυξη ριζών που είναι αξιοποιήσιμες ως πλατφόρμες παραγωγής βιοδραστικών ενώσεων.

1.1 Φαρμακευτικά φυτά

Ο άνθρωπος, στο πέρασμα των αιώνων, διαχρονικά αξιοποιεί τα φυτά και τα προϊόντα φυτικής προέλευσης προκειμένου να καλύψει τις βασικές του ανάγκες αλλά και να διευκολύνει τη διαβίωσή του. Σταδιακά, πέραν της εκμετάλλευσής τους ως πηγή τροφής, κατέστη εφικτή η διάκριση των φυτικών ειδών που φέρουν θεραπευτικές ιδιότητες και η αξιοποίησή τους ως φάρμακα (Shakya, 2016). Τα φυτά που έχουν ιδιότητες πρόληψης, ανακούφισης ή ίασης ασθενειών, εξαιτίας της περιεκτικότητας τους σε δραστικές ουσίες, κατατάσσονται στην ομάδα των φαρμακευτικών φυτών (Gupta *et al.*, 2019).

Τα φαρμακευτικά φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική σε όλο τον κόσμο από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα, ενώ έχουν αποτελέσει τη βάση ορισμένων συστημάτων παραδοσιακής ιατρικής. Το αρχαιότερο ίσως σύστημα παραδοσιακής ιατρικής βασισμένο στα φαρμακευτικά φυτά είναι αυτό της Αγιουρβέδα που αναπτύχθηκε στην Ινδία κατά τη 1^η χιλιετία π.Χ. Το σύστημα αυτό θεωρείται ότι επηρέασε σε μεγάλο βαθμό και την Ευρωπαϊκή ιατρική. Στην αρχαία Ελλάδα, τα φαρμακευτικά φυτά και οι ιδιότητές τους αναφέρονται από τον Θεόφραστο (300 π.Χ.) και αργότερα από τον Διοσκουρίδη (100 π.Χ.), ο οποίος σε κείμενά του περιγράφει τη συλλογή, αποθήκευση και χρήση τους (Gurib-Fakim, 2006).

Σήμερα, τα φαρμακευτικά φυτά εξακολουθούν να αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των συστημάτων υγείας για την παραγωγή φαρμάκων, συμπληρωμάτων διατροφής και καλλυντικών. Μάλιστα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), περίπου 45.000 διαφορετικά φυτά χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς, ενώ το 80 % του παγκόσμιου πληθυσμού κάνει χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης (Gupta *et al.*, 2019; Piszczek *et al.*, 2019). Επιπλέον, το 80 % των αντικαρκινικών, αντιμικροβιακών, ανοσοκατασταλτικών και καρδιαγγειακών φαρμάκων παράγονται χρησιμοποιώντας ως βάση ουσίες προερχόμενες από φαρμακευτικά φυτά (Kumari *et al.*, 2019).

1.1.1 Η τάση για τη χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης

Η παγκόσμια αγορά φυτικών φαρμακευτικών προϊόντων έχει αναπτυχθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια με μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού των ανεπτυγμένων και αναπτυσσόμενων χωρών να τα χρησιμοποιούν εξολοκλήρου ή συμπληρωματικά για

την ιατρική τους περίθαλψη. Σύμφωνα με αναφορές, σχεδόν το 1/3 των κορυφαίων φαρμακευτικών προϊόντων που διατίθενται στο εμπόριο είναι είτε εξολοκλήρου προϊόντα φυσικής προέλευσης ή αποτελούνται από παράγωγα αυτών (Elkordy *et al.*, 2021; Martvall and Lindberg, 2022). Η προτίμηση αυτή του καταναλωτικού κοινού και των βιομηχανιών στην χρήση φαρμακευτικών φυτών είχε ως αποτέλεσμα την άνθιση της παγκόσμιας αγοράς βοτάνων, με αποτέλεσμα το 2015 το κέρδος να ανέρχεται στα 108 δισεκατομμύρια δολάρια, εκ των οποίων το 48 % αφορά σε φυτικά φάρμακα (Argyropoulos *et al.*, 2019).

Η στροφή της φαρμακοβιομηχανίας προς την αξιοποίηση φαρμακευτικών φυτών για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων οφείλεται σε μια σειρά διαφορετικών παραγόντων. Πρωταρχικό αίτιο αποτελεί η επιφυλακτικότητα και η ανησυχία του καταναλωτικού κοινού απέναντι στη χρήση συνθετικών φαρμάκων και των παρενεργειών που ενδέχεται να προκαλούν στον ανθρώπινο οργανισμό (Christaki *et al.*, 2012). Στο επίπεδο αυτό, παρά το γεγονός ότι αναγνωρίζεται αδιαμφισβήτητη η ικανότητα των συνθετικών φαρμάκων να αντιμετωπίσουν επιτυχώς και σε σύντομο χρονικό διάστημα αρκετές ασθένειες, θεωρείται ότι οι παρενέργειες που πιθανόν επιφυλάσσουν είναι αρκετά πιο σοβαρές σε σύγκριση με αυτές των φυτικών φαρμάκων που θεωρούνται αμελητέες (Awasthi *et al.*, 2022).

Περαιτέρω, η εκτεταμένη χρήση φυτικών φαρμάκων, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες, οφείλεται στο ιστορικό και πολιτιστικό τους υπόβαθρο στη χρήση φαρμακευτικών φυτών, στην εύκολη προσβασιμότητα στα φυσικά τους ενδιαιτήματα αλλά και το περιορισμένο κόστος (Haq, 2004). Σε αρκετές χώρες της Αφρικής και της Ασίας η φαρμακευτική περίθαλψη βασίζεται εξολοκλήρου στη λαϊκή ιατρική και στη χρήση φαρμακευτικών φυτών, τα οποία είναι τοπικά διαθέσιμα και αποδεκτά από τους αυτόχθονες. Επιπλέον, τα κράτη των αναπτυσσόμενων χωρών, δεν έχουν τη δυνατότητα διάθεσης χρημάτων για την εισαγωγή φαρμάκων και συνεπώς αρκούνται στη χρήση τοπικών φαρμακευτικών ειδών που χαρακτηρίζονται ως περισσότερο προσιτά (Gurib-Fakim, 2006).

Τέλος, η τάση προς την αξιοποίηση φαρμακευτικών φυτών είναι απόρροια του ότι συνιστούν εργοστάσια παραγωγής πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών. Με δεδομένο ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες προσδίδουν στα φαρμακευτικά φυτά ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες, η έρευνα εστιάζει προς την αξιοποίησή τους, ιδιαίτερα για την αντιμετώπιση ή/και την ίαση ασθενειών για τις οποίες δεν υπάρχει

ακόμα αποτελεσματική θεραπεία. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών προσφέρει απεριόριστες δυνατότητες και προοπτικές απομόνωσης και αξιοποίησης των βιοδραστικών ουσιών που συνθέτουν τα φαρμακευτικά φυτά για παραγωγή φαρμάκων αλλά και ενδεδειγμένης μελέτης ειδών που μέχρι σήμερα δεν έχουν τύχει αξιοποίησης με στόχο την ανακάλυψη νέων δευτερογενών μεταβολιτών (Hosseinzadeh *et al.*, 2015). Σε κάθε περίπτωση, στο επίκεντρο των σχετικών ερευνών τίθεται η δημιουργία νέων φαρμάκων που προσφέρουν δυνατότητες ανακούφισης, αντιμετώπισης ή πρόληψης συμπτωμάτων διάφορων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων αυτών με περιορισμένη δυνατότητα αντιμετώπισης, όπως ο καρκίνος, ο ιός του HIV και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (McRae *et al.*, 2007).

1.1.2 Τα φαρμακευτικά φυτά ως εργοστάσια παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών

Τα φαρμακευτικά φυτά οφείλουν την ευεργετική τους δράση στη σύνθεση βιοδραστικών ενώσεων που χαρακτηρίζονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Πρόκειται για ουσίες που δυνητικά συντίθεται σε διάφορους τύπους φυτικών ιστών και τμημάτων, όπως τα φύλλα, τα άνθη, οι ρίζες, οι καρποί ή ακόμα και σε ολόκληρο το φυτό και έχουν ως σκοπό την προστασία από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Χάρη στον προστατευτικό τους ρόλο, οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν ιδανικές πρώτες ύλες για την παραγωγή φαρμάκων αλλά και καλλυντικών, αγροχημικών και συμπληρωμάτων διατροφής (Rahmat and Kang, 2019).

Υπάρχουν τρεις βασικές ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών στις οποίες ανήκουν ουσίες με μεγάλη φαρμακευτική σημασία. Οι ομάδες αυτές είναι τα αλκαλοειδή, τα τερπενοειδή και τα φαινολικά. Στα αλκαλοειδή εντοπίζονται ενώσεις όπως η ταξόλη και η βινβλαστίνη με αντικαρκινική δράση, η μορφίνη και η κωδεΐνη με αναλγητική και η ατροπίνη και σκοπολαμίνη με αντιχολινεργική. Αντίστοιχα, στα τερπενοειδή και στα φαινολικά εντοπίζονται ενώσεις με αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Shi *et al.*, 2021). Συνολικά, έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί περίπου 12.000 δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης (Gupta *et al.*, 2019).

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη χρήση δευτερογενών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης για την αντιμετώπιση παθογόνων και μολυσματικών παραγόντων

υπεύθυνων για την πρόκληση ασθενειών στον άνθρωπο. Τα ευρήματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς απεδείχθη η θετική τους επίδραση σε μια σειρά ασθενειών και συνδρόμων, όπως ο διαβήτης, η φυματίωση, τα έλκη, το άσθμα, ο καρκίνος, η νόσος του Αλτσχάιμερ, οι καρδιαγγειακές παθήσεις κ.α. Πέραν της αδιαμφισβήτητης συνεισφοράς τους στην αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών, οι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης πλεονεκτούν έναντι των συνθετικών φαρμάκων καθώς η χρήση τους αφενός μεν φέρει λιγότερες παρενέργειες και αφετέρου εμπεριέχει μειωμένη πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας από πλευράς των παθογόνων (Gupta *et al.*, 2019).

1.1.3 Προβλήματα και προκλήσεις που απορρέουν από τη χρήση φαρμακευτικών φυτών

Η εντατικοποίηση της χρήσης φαρμακευτικών φυτών που παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες και η αξιοποίησή τους από τις διάφορες βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων έχει επιφέρει ωστόσο ορισμένα μείζονα προβλήματα.

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η ανθρώπινη παρέμβαση και η υπερεκμετάλευση φυσικών πληθυσμών φαρμακευτικών φυτών έχουν προκαλέσει σημαντική διατάραξη των οικοσυστημάτων, οδηγώντας σε δραστική μείωση των σχετικών φυσικών αποθεμάτων. Το γεγονός ότι αρκετές βιομηχανίες στηρίζουν την παραγωγή τους σε φαρμακευτικά φυτά που συλλέγονται από φυσικά αποθέματα σταδιακά οδηγεί σε εξάντληση των πληθυσμών των εν λόγω ειδών, ένα μέρος των οποίων βρίσκεται αντιμέτωπο με τον κίνδυνο εξαφάνισης (Gantait *et al.*, 2014). Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, η τρέχουσα απώλεια φυτικών ειδών είναι μεταξύ 100 και 1000 φορές υψηλότερη από τον αναμενόμενο φυσικό ρυθμό εξαφάνισης, με αποτέλεσμα να παρατηρείται απώλεια ενός τουλάχιστον πιθανού φαρμάκου κάθε 2 χρόνια. Πλέον, αρκετά φαρμακευτικά φυτά θεωρούνται απειλούμενα προς εξαφάνιση, ειδικά σε χώρες όπου η αξιοποίηση φαρμάκων φυτικής προέλευσης αποτελεί πάγια πρακτική, όπως η Κίνα, η Ινδία, η Κένυα, το Νεπάλ, η Τανζανία και η Ουγκάντα (Chen *et al.*, 2016).

Το πρόβλημα της ραγδαίας μείωσης των φυσικών πληθυσμών και του κινδύνου εξαφάνισης ορισμένων ειδών εντείνεται περαιτέρω από τις δυσκολίες και τους περιορισμούς που ενέχει η καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών. Γενικά, η καλλιέργεια των φαρμακευτικών ειδών θεωρείται μια πρόκληση εξαιτίας των

ιδιαίτερων οικολογικών τους απαιτήσεων αλλά και του χαμηλού δυναμικού βλάστησης των σπόρων τους (Canter *et al.*, 2005). Λαμβάνοντας συνολικά υπόψη τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με την αλόγιστη εκμετάλλευση των φυσικών πόρων και τη μείωση της καλλιεργήσιμης γης, λόγω της οικιστικής ανάπτυξης και της ερημοποίησης, είναι προφανές ότι περιορίζονται σημαντικά οι προοπτικές για περεταίρω ανάπτυξη της καλλιέργειας των φαρμακευτικών ειδών (Rahmat and Kang, 2019).

Περαιτέρω, οι προοπτικές αξιοποίησης των φαρμακευτικών φυτών περιορίζονται σημαντικά από παράγοντες που σχετίζονται με την ποιότητα, η οποία πρωτίστως αφορά στην ποσότητα και ποιότητα των δευτερογενών μεταβολιτών που συντίθενται ενδογενώς. Με δεδομένο ότι το δυναμικό σύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών εξαρτάται άμεσα από τις αγροκλιματικές συνθήκες αλλά και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, είναι προφανές ότι οι μη βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες ή βλάβες στη φυσιολογία των φυτών επηρεάζουν δραστικά τόσο την παραγωγή όσο και τη δράση των παραγόμενων βιοδραστικών ενώσεων. Στα καλλιεργούμενα φαρμακευτικά φυτά, η ποιότητα υποβαθμίζεται εξαιτίας της χρήσης αγροχημικών και της παρουσίας βαρέων μετάλλων στο έδαφος (Shakya, 2016). Η περιεκτικότητα σε δευτερογενείς μεταβολίτες μειώνεται σε βαθμό που, στο πλείστο των περιπτώσεων, αποτελεί λιγότερο από 1 % του ξηρού βάρους του φυτού (Rahmat and Kang, 2019), ποσοστό που αντικατοπτρίζει μια παραγωγή που δεν μπορεί να καλύψει τις ολοένα και αυξανόμενες ανάγκες της αγοράς. Ταυτόχρονα, η σύνθεση τεχνητών δευτερογενών μεταβολιτών χαρακτηρίζεται ως ασύμφορη, εξαιτίας της πολύπλοκης δομής και διαμόρφωσης των βιοδραστικών ενώσεων φυτικής προέλευσης.

Βάσει των ανωτέρω, προκύπτει ως επιτακτική η ανάγκη για ανάπτυξη εναλλακτικών στρατηγικών για την καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών, ιδιαίτερα αυτών που χαρακτηρίζονται ως εργοστάσια παραγωγής υψηλής απόδοσης βιοδραστικών ενώσεων. Προς την κατεύθυνση αυτή, οι επιστημονικοί κλάδοι της βελτίωσης φυτών και της βιοτεχνολογίας προσφέρουν ένα σύνολο προσεγγίσεων που μελετώνται εκτενώς στο πλαίσιο ενίσχυσης των προοπτικών για την καλλιέργεια και παραγωγή φαρμακολογικά ωφέλιμων φυτικών βιοδραστικών ενώσεων (Rahmat and Kang, 2019).

1.2 Το είδος *Althea officinalis*

Το είδος *Althea officinalis*, με κοινό όνομα αλθέα ή δενδρομολόχα, αποτελεί φαρμακευτικό φυτό της οικογένειας *Malvaceae* που παραδοσιακά χρησιμοποιείται στην λαϊκή ιατρική σε πολλά μέρη του κόσμου. Τα φύλλα, οι σπόροι και κυρίως η ρίζα της αλθέας αποτελούν πηγή δευτερογενών μεταβολιτών με φαρμακευτικές ιδιότητες. Λόγω της διαθεσιμότητάς της σε βιοδραστικά συστατικά, η αλθέα αξιοποιείται ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία, αποτελώντας παράλληλα είδος καταγεγραμμένο για ασφαλή χρήση τόσο από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο όσο και από της Ηνωμένες Πολιτείες (Amini, 2019).

Η καταγωγή του είδους αποδίδεται σε χώρες που βρέχονται από την Κασπία Θάλασσα, τη Μαύρη Θάλασσα και την Ανατολική Μεσόγειο (Fahamiya *et al.*, 2016). Σήμερα εντοπίζεται στην Ευρώπη, τη δυτική και βόρεια Ασία αλλά και τη Βόρεια Αμερική, την Ινδία, το Πακιστάν και το Ιράν (Amini, 2019).

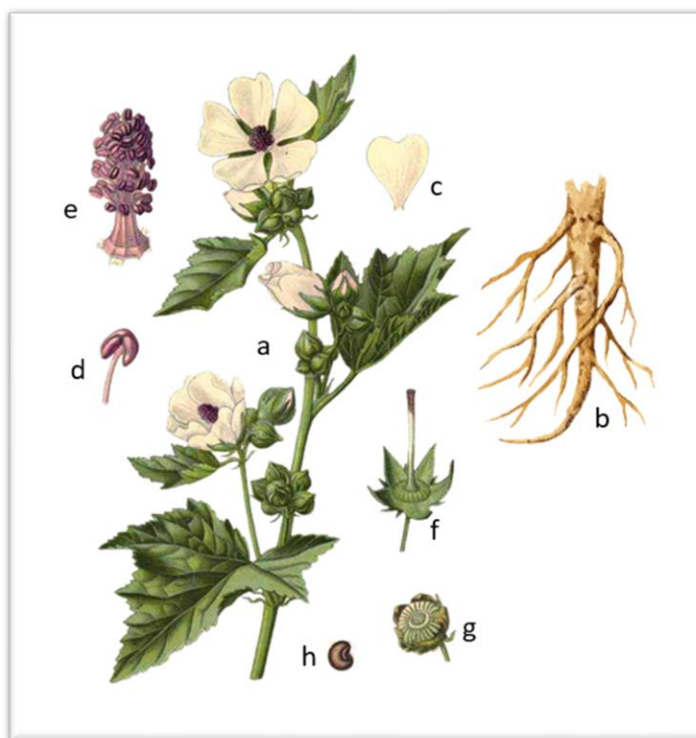
Η αλθέα οφείλει το επιστημονικό της όνομα στην αρχαία ελληνική λέξη «ἄλθειν» που σημαίνει θεραπεύω, υποδηλώνοντας την πληθώρα θεραπευτικών ιδιοτήτων έναντι διάφορων ασθενειών (Amini, 2019). Εξαιτίας των θεραπευτικών της δράσεων, χρησιμοποιήθηκε ευρέως από τους αρχαίους Έλληνες και τους Ρωμαίους. Συγκεκριμένα, έχει περιγραφεί από τον Θεόφραστο και τον Διοσκουρίδη, με τον τελευταίο να αναφέρει τη χρήση της για την αντιμετώπιση ανουρίας, διάρροιας, εσωτερικών κακώσεων και πόνου στα νεύρα. Ο Πλίνιος (77 μ.Χ.) ήταν ο πρώτος που ανέφερε τη χρήση της για την αντιμετώπιση παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος, όπως άσθμα και βρογχίτιδα. Αναφορές στη χρήση της γίνονται και σε ευρωπαϊκά μεσαιωνικά κείμενα, ενώ χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή φαρμάκων τον 19^ο και 20^ο αιώνα (Möller *et al.*, 2019).

1.2.1. Βοτανική περιγραφή

Η αλθέα είναι ένα φαρμακευτικό φυτό με πολυετή κύκλο ανάπτυξης. Αναπτύσσει βαθύ ριζικό σύστημα αποτελούμενο από κωνικές ξυλώδεις ρίζες διαμέτρου 0,2 cm έως 3 cm. Οι ρίζες είναι σκληρές και εύκαμπτες, χρώματος ανοιχτού καστανού εξωτερικά, με έντονες αυλακώσεις κατά μήκος και τραχιά υφή. Εσωτερικά έχουν κιτρινόλευκο χρώμα και είναι ινώδεις (Fahamiya *et al.*, 2016; Akbar, 2020).

Ο βλαστός είναι ατρακτοειδής ή κυλινδρικός, διαμέτρου 5 cm, όρθιας ανάπτυξης, έχει βελούδινη υφή και το ύψος του κυμαίνεται από 60 cm έως 120 cm (Akbar, 2020; Mahboubi, 2020). Πάνω στο βλαστό βρίσκονται εναλλασσόμενα τα φύλλα, τα οποία έχουν γκριζοπράσινο χρώμα και βελούδινη υφή τόσο στην επάνω όσο και στην κάτω επιφάνειά τους. Τα φύλλα που βρίσκονται χαμηλότερα στο βλαστό είναι σχεδόν κυκλικά με πλάτος 3 cm έως 8 cm, ενώ αυτά που βρίσκονται ψηλότερα είναι ωοειδή ή λογχοειδή, μυτερά, βαθιά λοβωτά και οδοντωτά (Akbar, 2020).

Στις μασχάλες των άνω φύλλων σχηματίζονται τα άνθη, χρώματος λευκού ή ροζ, είτε μεμονωμένα είτε σε συστάδες των 2 - 3 ανθέων (Akbar, 2020). Τα άνθη έχουν πλάτος 2,5 cm έως 5 cm και αποτελούνται από 6-9 σέπαλα, 5 πέταλα σε σχήμα καρδιάς και πολυάριθμους στήμονες ενωμένους σε σωλήνα όπου απαντώνται νεφρόμορφοι και μονοκύτταροι ανθήρες (Naveed *et al.*, 2011).



Εικόνα 1.1. Μορφολογία φυτού *Althea officinalis*. a. βλαστός με φύλλα και άνθη, b. ρίζα, c. καρδιάσχημο πέταλο, d. στήμονας, e. στήμονες ενωμένοι σε σωλήνα, f. ύπερος και κάλυκας, g. καρπός και h. σπόρος. (Πηγή: Masclef, 1891)

Ο καρπός μοιάζει με δίσκο και φέρει λεπτές, διακλαδισμένες και ακτινοβόλες νευρώσεις εξωτερικά, ενώ αποτελείται από πολυάριθμα καρπόφυλλα, καθένα από τα

οποία περιέχει ένα σπόρο. Οι σπόροι είναι μικρού μεγέθους, περίπου 3 mm-6 mm, λείοι, συνήθως καστανόμαυρου χρώματος, σε σχήμα νεφρού (Fahamiya *et al.*, 2016).

1.2.2. Αύξηση και ανάπτυξη

Πρόκειται για είδος με πολυετή κύκλο ανάπτυξης. Για τον πολλαπλασιασμό της αλθέας χρησιμοποιούνται σπόροι ή μοσχεύματα βλαστών ή ρίζες και η σπορά πραγματοποιείται την άνοιξη. Αργότερα το καλοκαίρι, κατά την περίοδο της άνθισης, που λαμβάνει χώρα κατά τους μήνες Ιούλιο - Αύγουστο, συλλέγονται τα άνθη και τα φύλλα, ενώ οι ρίζες συγκομίζονται το φθινόπωρο, από τον Οκτώβριο έως το Νοέμβριο, εφόσον η καλλιέργεια είναι 2 ετών. Μετά τη συλλογή, οι ίνες της ρίζας και το φελλώδες κάλυμμα αφαιρούνται και πραγματοποιείται ξήρανση σε θερμοκρασία 35 °C (Naveed *et al.*, 2011; Fahamiya *et al.*, 2016; Mahboubi, 2020).

Γενικά, η αλθέα αναπτύσσεται σε εύκρατα κλίματα και υγρές περιοχές. Συνήθως, απαντάται κοντά στις όχθες ποταμών και θαλασσών, σε έλη με υφάλμυρα νερά και σε λιβάδια με μεγάλη υγρασία. Μπορεί να αναπτυχθεί σε μια πληθώρα εδαφών, ωστόσο προτιμά τα βαθιά αργιλώδη εδάφη (Akbar, 2020).

1.2.3. Χρήσιμες ουσίες

Όντας φαρμακευτικό φυτό, η αλθέα συνθέτει αρκετές βιοδραστικές ενώσεις που της προσδίδουν θεραπευτικό χαρακτήρα. Τα συστατικά ενδιαφέροντος εντοπίζονται κυρίως στη ρίζα αλλά και στα φύλλα και στους σπόρους και προσδίδουν στο φυτό αντιμικροβιακές, αντιαλβινικές, αντιμυκητιακές αντιφλεγμονώδεις, καταπραϋντικές και αντιβηχικές ιδιότητες (Younesikelaki *et al.*, 2016; Naseri *et al.*, 2021).

Μέσω ανάλυσης του φυσικοχημικού προφίλ, που περιλαμβάνει τη χημική σύσταση, τη δομική ανάλυση, τα χαρακτηριστικά των μακρομορίων, την αντιοξειδωτική δραστηριότητα και τη θερμική συμπεριφορά των συστατικών της, έχει αποδειχθεί η υψηλή περιεκτικότητα της αλθέας σε πηκτίνη (11 %), μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και σακχαρόζη (10 %), άμυλο (25 % - 35 %), γλίσχρασμα (5 %) καθώς και φλαβονοειδή, κουμαρίνες σκοπολετίνη, τανίνες, ασπαριγίνες και πληθώρα αμινοξέων σε μικρότερες συγκεντρώσεις (Mousavi *et al.*, 2019). Αναλυτικότερα, οι

δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχονται σε συγκεκριμένα τμήματα του φυτού παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1

Πίνακας 1.1. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες της αλθέας (*Althea officinalis*) και το είδος του φυτικού ιστού όπου λαμβάνει χώρα η σύνθεσή τους (Fahamiya *et al.*, 2016).

Χημική ομάδα	Μεταβολίτης	Είδος φυτικού ιστού
Υδατάνθρακες	Γαλακτόζη	Ρίζα, σπόροι
	Γλυκόζη	Ρίζα, σπόροι
	Γλίσχρασμα	Ρίζα, φύλλα
	Καμπφερόλη	Ρίζα, φύλλα
	Ξυλόζη	Ρίζα
	Ραμνόζη	Ρίζα
	Μαννόζη	Σπόροι
Καρβοξυλικά οξέα	Γαλακτουρονικό οξύ	Ρίζα
Φαινολικά οξέα	Καφεϊκό οξύ	Ρίζα, φύλλα
	Χλωρογενικό οξύ	Ρίζα
	Πολυφαινολικά οξέα	Φύλλα
Αμινοξέα	Βεταΐνη	Ρίζα
Φλαβονοειδή	Κερσετίνη	Ρίζα, φύλλα
	Φλαβονοειδή	Ρίζα
Φωσφολιπίδια	Λεκιθίνη	Ρίζα
Βιταμίνες	Βιταμίνη C	Φύλλα
	Ριβοφλαβίνη	Φύλλα
	Καροτίνη	Φύλλα
	Νιασίνη	Φύλλα
Αρωματικές οργανικές ενώσεις	Σκοπολετίνη	Φύλλα
	Κουμαρίνη	Φύλλα
	Υδροξυκινναμωμικό οξύ	Φύλλα
Λιπαρά οξέα	Ελαϊκό οξύ	Σπόροι
	Λινολενικό οξύ	Σπόροι
	Λινολεϊκό οξύ	Σπόροι

	Παλαμικό οξύ	Σπόροι
	Στεατικό οξύ	Σπόροι
Τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή	Φυτοστερόλη	Ρίζα
	Σιτοστερόλη	Φύλλα
	Κιτράλη	Σπόροι
	Τερπινεόλη	Σπόροι
	Λιμονένιο	Σπόροι
	Φελλανδρένιο	Σπόροι
Φυτοστερόλες	β-σιτοστερόλη	Σπόροι
	Στιγμαστερόλη	Φύλλα
Αλκοόλες	Ισοβουτυλική αλκοόλη	Σπόροι
Ιχνοστοιχεία - Μέταλλα	Ιώδιο	Φύλλα
	Ψευδάργυρος	Φύλλα
	Σίδηρος	Φύλλα
	Φώσφορος	Φύλλα
	Ασβέστιο	Φύλλα
Άλλες ενώσεις	Γλυκοσίδες	Ρίζα
	Τανίνες	Ρίζα
	Ασπαραγινένιο	Ρίζα
	γ-τολουερλδεΐδη	Σπόροι

1.2.4 Χρήσεις

Κύριος τρόπος αξιοποίησης της αλθέας αποτελεί η χρήση της ως φάρμακο. Η δημοφιλέστερη φαρμακευτική της χρήση είναι για την καταπολέμηση συμπτωμάτων του κοινού κρυολογήματος, όπως βήχας, πονόλαιμος και καταρροή, παθήσεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, όπως βρογχίτιδα και ερεθισμών του στοματικού και φαρυγγικού βλεννογόνου. Η δράση της αυτή οφείλεται στην ραμνογαλακτουρόνη (RG-II), μια ένωση αποτελούμενη από υπολείμματα γλυκοζυλίου συμπεριλαμβανομένων της ραμνόζης, γαλακτόζης, ξυλόζης και γαλακτουρονικού οξέος. Μπορεί να χορηγηθεί σε μορφή εκχυλίσματος, σιροπιού, παστιλιών και δισκίων και η συνιστάμενη ημερήσια δόση για τους ενήλικες είναι 2 g-5 g αποξηραμένης ρίζας ή φύλλων έως και τρεις φορές ημερησίως (Mahboubi, 2020).

Η αλθέα έχει αναδειχθεί ως ιδιαίτερα αποτελεσματική για την αντιμετώπιση και ανακούφιση και άλλων παθήσεων του ανθρώπινου οργανισμού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος, όπως γαστρεντερίτιδα, κολίτιδα, ίκτερος και δυσπεψία, αλλά και λοιμώξεων του ουροποιητικού (Kianitalaei *et al.*, 2019). Επιπλέον, η χρήση της συνίσταται έναντι δερματικών παθήσεων και ερεθισμών, όπως τραύματα, έκζεμα, απόστημα και δερματίτιδα. Μάλιστα, το γλίσχρασμα που περιέχει συμβάλλει στην ταχύτερη αναδόμηση του δέρματος καθώς συμβάλλει στην ευχερέστερη και ταχύτερη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και νερού από τα κύτταρα (Ghaseminezhad *et al.*, 2020).

Οι φαρμακευτικές ιδιότητες της αλθέας αξιοποιούνται σε μεγάλο βαθμό και στην κτηνιατρική. Από κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν προέκυψε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία φλεγμονών της αναπνευστικής οδού, του γαστρεντερικού σωλήνα αλλά και ως αντιφλεγμονώδες (Bussmann *et al.*, 2020).

Πέραν της εκμετάλλευσής της για φαρμακευτικούς σκοπούς, η αλθέα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή ίνας. Σύμφωνα με μελέτες σχετικά τα χαρακτηριστικά των ινών της αλθέας, ως προς τη σύνθεσή τους, την αντοχή τους και τη θερμική τους αποικοδόμηση, προέκυψε ότι αποτελούν ιδανική πρώτη ύλη για την ενίσχυση πολυμερών σύνθετων υλικών (Sarikanat *et al.*, 2014).

1.3. Βελτίωση των φαρμακευτικών φυτών

Με δεδομένη την υψηλή ζήτηση σε φαρμακευτικά προϊόντα φυτικής προέλευσης, η ανάπτυξη εναλλακτικών στρατηγικών για την καλλιέργεια φαρμακευτικών φυτών που δυνητικά συνθέτουν αυξημένη ποσότητα βιοδραστικών συστατικών, και δη δευτερογενών μεταβολιτών, αποτελεί μια πρόκληση. Προς την κατεύθυνση αυτή, η έρευνα έχει στραφεί προς ποικίλες προσεγγίσεις, όπως η αξιοποίηση ειδών και γονοτύπων που φυλάσσονται σε τράπεζες γενετικού υλικού, η εφαρμογή νέων καλλιεργητικών πρακτικών, η βιώσιμη παραγωγή και χρήση τους κ.α. (Chen *et al.*, 2016). Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι η δυσκολία στην καλλιέργεια και διατήρηση φαρμακευτικών ειδών αλλά και στην επίτευξη ικανοποιητικής παραγωγής βιοδραστικών ενώσεων έγκειται στη φύση των φαρμακευτικών φυτών *per se*.

Βασικό τροχοπέδη στη δυνητική αξιοποίηση των φαρμακευτικών φυτών στο πλαίσιο εντατικής καλλιέργειάς τους αποτελεί το γεγονός ότι το πλείστο των εν λόγω

ειδών στερείται του συνδρόμου της εξημέρωσης. Η εξημέρωση των φυτών αποτελεί μια δυναμική εξελικτική διαδικασία που δημιουργεί νέες μορφές φυτών από πληθυσμούς άγριων ειδών. Μέσω της εξημέρωσης, προκύπτουν πληθυσμοί προσαρμοσμένοι σε τοπικά περιβάλλοντα, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από σταθερότητα ως προς τα γνωρίσματα υπό ισχυρή επιλογή, διατηρώντας ωστόσο σημαντική γενετική παραλλακτικότητα για γνωρίσματα που δεν επιλέγονται. Ως εκ τούτου, προκύπτουν πληθυσμοί φυτών με επιθυμητά γνωρίσματα, όπως αυξημένο μέγεθος καρπών ή σπόρων, αυξημένη ανάπτυξη του κεντρικού στελέχους σε σύγκριση με τα πλευρικά στελέχη, απώλεια ληθάργου των σπόρων, ανθεκτικότητα έναντι παραγόντων καταπόνησης, μικρότερη ευαισθησία στη φωτοπερίοδο και σταθερότητα στην ανθοφορία. Με δεδομένο ωστόσο ότι η εξημέρωση εστίασε σε έναν περιορισμένο αριθμό ειδών που προορίζονταν για διατροφική χρήση, τα περισσότερα φαρμακευτικά φυτά δεν έχουν υποστεί την εξελικτική αυτή διαδικασία, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν προβλήματα κατά την ανάπτυξή τους, κυρίως ως απόρροια της απουσίας σταθεροποίησης ή/και εξάλειψης επιθυμητών και ανεπιθύμητων γνωρισμάτων αντίστοιχα. Βάσει των ανωτέρω, καθίσταται προφανές ότι η αντιστάθμιση των εν λόγω ελλείψεων απαιτεί την αξιοποίηση του συνόλου των σύγχρονων τεχνολογιών και εργαλείων που διαθέτει η επιστήμη της βελτίωσης φυτών (Niazian, 2019).

Η «Μοριακή Βελτίωση» αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο της σύγχρονης βελτίωσης φυτών που μέσω τεχνικών και μεθόδων της μοριακής βιολογίας, σε συνδυασμό με συμβατικές βελτιωτικές προσεγγίσεις, έχει ως σκοπό την παραγωγή σύγχρονων ποικιλιών (Τσαυτάρης κ.α., 2012). Η βελτιωτική διαδικασία στα φαρμακευτικά φυτά εστιάζει κατά κύριο λόγο στους ακόλουθους βελτιωτικούς στόχους:

1. Ενίσχυση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών

Στο επίκεντρο των βελτιωτικών προγραμμάτων φαρμακευτικών φυτών τίθεται η αύξηση της παραγωγής και συσσώρευσης δευτερογενών μεταβολιτών ή/και άλλων βιοδραστικών συστατικών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συντίθενται σε συγκεκριμένους ιστούς και κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων, ενώ συχνά η ποιότητά τους είναι υποβαθμισμένη και τα επίπεδα σύνθεσής τους χαμηλά (Shi *et al.*, 2021). Στοχεύοντας στην ευχερή αξιοποίηση ωφέλιμων φυτικών βιοδραστικών ενώσεων, η έμφαση δίνεται σε ποικίλες βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις, όπως η *in vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών καθώς και η εισαγωγή ή ρύθμιση της

έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στις σχετικές μεταβολικές οδούς (Rahmat & Kang, 2019).

2. Διατήρηση και πολλαπλασιασμός φαρμακευτικών ειδών

Η εντεινόμενη τάση των καταναλωτών προς τη χρήση φυσικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη συλλογή φαρμακευτικών φυτών, με άμεση συνέπεια την ανθρώπινη παρέμβαση στα φυσικά οικοσυστήματα. Με δεδομένο τον κίνδυνο σχετικά με τη διατήρηση των πληθυσμών των φαρμακευτικών φυτών, τίθεται ως πρωταρχικός στόχος η ανάπτυξη μεθόδων διατήρησης και πολλαπλασιασμού των εν λόγω ειδών. Στο πλαίσιο αυτό, οι σύγχρονες βελτιωτικές και βιοτεχνολογικές μέθοδοι, με κύριες αυτές της ιστοκαλλιέργειας, προσφέρουν δυνατότητες γρήγορου πολλαπλασιασμού και διατήρησης γενετικού υλικού απειλούμενων ειδών. Η ιστοκαλλιέργεια επιτρέπει τη λήψη γενετικά καθαρών πληθυσμών και είναι ιδανική για τον πολλαπλασιασμό δύστροπων ειδών, όπως τα φαρμακευτικά φυτά (Rohini, 2020).

3. Διευκόλυνση της καλλιεργητικής διαδικασίας

Ενόψει της τάσης για ένταξη των φαρμακευτικών ειδών σε συστήματα εμπορικής καλλιέργειας, η έμφαση στρέφεται επισταμένα στην ανάπτυξη μεθόδων καλλιέργειας που συμβάλλουν αφενός μεν στην ελαχιστοποίηση της διατάραξης των φυσικών οικοσυστημάτων και αφετέρου στη βελτιστοποίηση της καλλιεργητικής πρακτικής ώστε η παραγωγή να απαντά στην αυξανόμενη ζήτηση των εν λόγω ειδών. Στοχεύοντας στη διευκόλυνση της καλλιέργειας φαρμακευτικών φυτών και ενίσχυση της βιωσιμότητάς της, το ενδιαφέρον εστιάζει προς τη βελτίωση γνωρισμάτων, όπως η ενίσχυση της βλάστησης και το ομοιόμορφο φύτρωμα, η παραγωγή σπόρων, η ομοιομορφία και σταθερότητα της απόδοσης και η αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Προς αυτή την κατεύθυνση, η υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες επιλογή αποτελεί βασικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των επιθυμητών γονοτύπων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και ανεξάρτητα από τις αγροκλιματικές συνθήκες (Canter *et al.*, 2005).

Η Μοριακή Βελτίωση, αξιοποιώντας τις σύγχρονες τεχνολογικές εξελίξεις, ενσωματώνει ποικίλες εργαστηριακές μεθόδους και εργαλεία που συμβάλλουν καθοριστικά στην επίτευξη των βελτιωτικών στόχων. Εξ αυτών, οι πιο διαδεδομένες για τη βελτίωση των φαρμακευτικών ειδών είναι η αξιοποίηση μοριακών δεικτών προς ενσωμάτωση σε διαδικασίες υποβοηθούμενης από δείκτες επιλογή (MAS), η

καλλιέργεια *in vitro* φυτικών ιστών και οι τεχνολογίες της Γενετικής Μηχανικής που επιτρέπουν τη στοχευμένη γενετική τροποποίηση των φυτών.

Μοριακοί Δείκτες

Ο όρος μοριακός δείκτης αναφέρεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA η οποία είναι συνδεδεμένη με χρωμοσωμικές περιοχές. Οι περιοχές αυτές μπορεί να αφορούν σε ένα ή περισσότερα γονίδια, ένα μικρό αριθμό επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων ή ακόμη και ένα νουκλεοτίδιο που διαφέρει σε δύο αλληλόμορφα. Οι μοριακοί δείκτες εμφανίζουν πλήθος εφαρμογών στη βελτίωση των φυτών, ωστόσο στην περίπτωση των φαρμακευτικών ειδών η αξιοποίησή τους στοχεύει στην ταχύτερη επιλογή μέσω εντοπισμού γονιδίων - στόχων, στη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας σε πληθυσμιακό επίπεδο και στην ταυτοποίηση ειδών (Wang *et al.*, 2020). Μέχρι σήμερα, αρκετοί τύποι μοριακών δεικτών, συμπεριλαμβανομένων των RFLP, AFLP, RAPD, SSR, SNP, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη και βελτίωση φαρμακευτικών φυτών (Poumohammad, 2013). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι δείκτες AFLP, σε συνδυασμό με τα μορφολογικά γνωρίσματα και τη σύσταση των αιθέριων ελαίων, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της γενετικής απόστασης μεταξύ ποικιλιών του είδους *Ocimum basilicum* (Labra *et al.*, 2004). Επιπλέον, μέσω της χρήσης δεικτών SNP κατέστη εφικτή η ανάπτυξη νέας ποικιλίας *Panax notoginseng*, ανθεκτικής στην ασθένεια της σήψης ριζών (Dong *et al.*, 2017), ενώ δείκτες τύπου RAPD εφαρμόστηκαν επιτυχώς για την ταυτοποίηση δειγμάτων ρίγανης (*Origanum* spp.) στο πλαίσιο ποιοτικού ελέγχου και ελέγχου νοθείας (Marieschi *et al.*, 2009). Παρά το γεγονός ότι οι εφαρμογές των μοριακών δεικτών σε φαρμακευτικά φυτά είναι σαφώς περιορισμένες συγκριτικά με άλλα είδη, τις επόμενες δεκαετίες, αναμένεται μεγαλύτερη υιοθέτηση των μοριακών δεικτών στη βελτίωση των εν λόγω ειδών, στοχεύοντας ιδιαίτερα στη χαρτογράφηση του γονιδιώματός τους και στην ταχύτερη επιλογή επιθυμητών γονοτύπων για ανάπτυξη βελτιωμένων ποικιλιών (Shi *et al.*, 2021).

Καλλιέργεια *in vitro* φυτικών ιστών

Η καλλιέργεια φυτικών ιστών (PTC) αποτελεί *in vitro* τεχνική για ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό κυττάρων, ιστών και οργάνων σε στερεά ή υγρά υποστρώματα, που συχνά περιέχουν ρυθμιστές ανάπτυξης, υπό ασηπτικές συνθήκες (Halder *et al.*, 2021). Τα κύτταρα, οι ιστοί και τα φυτά που προκύπτουν προέρχονται από μιτωτική διαίρεση

και επομένως είναι γενετικά όμοια με το μητρικό υλικό που χρησιμοποιείται. Η τεχνική παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η ταχεία παραγωγή βιομάζας ανεξάρτητα από την εποχή, οι ελεγχόμενες συνθήκες πολλαπλασιασμού και η μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών και μολύνσεων (Cardoso *et al.*, 2019).

Στα φαρμακευτικά φυτά η *in vitro* καλλιέργεια αποσκοπεί στη διατήρηση και πολλαπλασιασμό απειλούμενων ειδών, στην παραγωγή πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών και στη μείωση της συσσώρευσης τοξικών ενώσεων. Τις τελευταίες δεκαετίες, η ιστοκαλλιέργεια έχει συμβάλλει ουσιαστικά στη διατήρηση και αποκατάσταση αρκετών απειλούμενων φαρμακευτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των *Atropa acuminata*, *Valeriana jatamansi*, *Podophyllum hexandrum*, *Baliospermum montanum* και *Drosera indica* (Rohini, 2020).

Όσον αφορά στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, οι δύο δημοφιλέστερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η καλλιέργεια κάλων και τυχαίων ριζών (Halder *et al.*, 2021). Η καλλιέργεια τυχαίων ριζών, μάλιστα, παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα στην παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων και πιο γρήγορη ανάπτυξη σε σύγκριση με την κυτταροκαλλιέργεια (Rahmat & Kang, 2019). Μέσω των τεχνικών ιστοκαλλιέργειας, κατέστη εφικτή η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών διαφορετικής φύσης, χρησιμοποιώντας ποικίλου τύπου έκφυτα και ρυθμιστές αύξησης, ανάλογα με το είδος. Στο πλαίσιο αυτό, στο είδος *Althea officinalis* επετεύχθη υψηλή παραγωγή φαινολικών ενώσεων σε καλλιέργεια τυχαίων ριζών, με χρήση CuCl_2 ως ρυθμιστή ανάπτυξης (Park *et al.*, 2022), ενώ στο είδος *Artemisia annua* η αύξηση της συσσώρευσης αρτεμισίνης προσεγγίστηκε σε καλλιέργεια κάλων χρησιμοποιώντας ως διεγέρτες τις ενώσεις GA_3 και ABA (Zebarjadi *et al.*, 2018).

Γενετική Μηχανική

Η Γενετική Μηχανική αξιοποιεί ένα σύνολο τεχνολογιών μέσω των οποίων καθίσταται δυνατή η απομόνωση επιλεγμένων γονιδίων ανεξαρτήτως προέλευσης και η ενσωμάτωσή τους στον ίδιο ή διαφορετικό οργανισμό με στόχο τη δημιουργία ειδών με νέες ιδιότητες (Τσαυτάρης, 1995). Το μεταφερθέν γονίδιο ονομάζεται διαγονίδιο και έπειτα από την ενσωμάτωσή του, το φυτό δέκτης θεωρείται γενετικά τροποποιημένο ή διαγονιδιακό. Η μεταφορά πραγματοποιείται είτε άμεσα με διάφορες μεθόδους, όπως βιολιστική, ηλεκτροδιήθηση και μικροέγχυση, είτε με χρήση φορέων.

Ως μέθοδος, προσφέρει τη δυνατότητα ακριβέστερου χειρισμού των γονιδίων και ταχύτερης ενσωμάτωσής τους στον οργανισμό στόχο, συμβάλλοντας αφενός μεν σε επιτάχυνση της βελτιωτικής διαδικασίας και αφετέρου σε δραματική διεύρυνση της γονιδιακής δεξαμενής των καλλιεργούμενων ειδών (Babich *et al.*, 2020).

Στα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά, η γενετική τροποποίηση αποσκοπεί κατά κύριο λόγο στην αύξηση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών. Ο γενετικός μετασχηματισμός επιτυγχάνεται κυρίως με τη χρήση φορέων, με συνηθέστερους τα είδη του γένους *Agrobacterium*. Τα διαγονιδιακά φυτά που προκύπτουν λόγω της ενσωμάτωσης του Ri ή Ti πλασμιδίου, των *Agrobacterium rhizogenes* και *Agrobacterium tumefaciens* αντίστοιχα, εμφανίζουν αυξημένο δυναμικό παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, λόγω της υπερέκφρασης ενός ή περισσότερων βασικών ρυθμιστικών γονιδίων που εμπλέκονται στις σχετικές οδούς βιοσύνθεσης. Στοχεύοντας στην ανάπτυξη διαγονιδιακών σειρών που παράγουν αυξημένη ποσότητα δευτερογενών μεταβολιτών φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, έχει αξιοποιηθεί πληθώρα διαφορετικών προσεγγίσεων, όπως μετασχηματισμός με γονίδια που εντοπίζονται στην περιοχή T-DNA του *A. rhizogenes* ή του *A. tumefaciens* ή νέα γονίδια που τροποποιούν τις μεταβολικές οδούς-στόχους ή γονίδια που βελτιώνουν την έκφραση ενδογενών οδών ή γονίδια που δεν εμπλέκονται σε βιοσυνθετικές οδούς (Halder *et al.*, 2021).

Ο μετασχηματισμός μέσω του αγροβακτηρίου, σε σύγκριση με άλλες μεθόδους μετασχηματισμού, επιτρέπει τη σταθερότερη ενσωμάτωση καθορισμένου DNA στο γονιδίωμα του φυτού ξενιστή, επιφέροντας χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων, λιγότερες αναδιατάξεις και σταθερότερη έκφραση κατά τη διάρκεια των γενεών (Khan *et al.*, 2009). Επιπλέον, συγκριτικά με άλλες μεθόδους *in vitro* καλλιέργειας, προσφέρει ταχεία ανάπτυξη και μεγάλη παραγωγή βιομάζας με ταυτόχρονη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών σε παρόμοια ή μεγαλύτερη συγκέντρωση (Halder *et al.*, 2021).

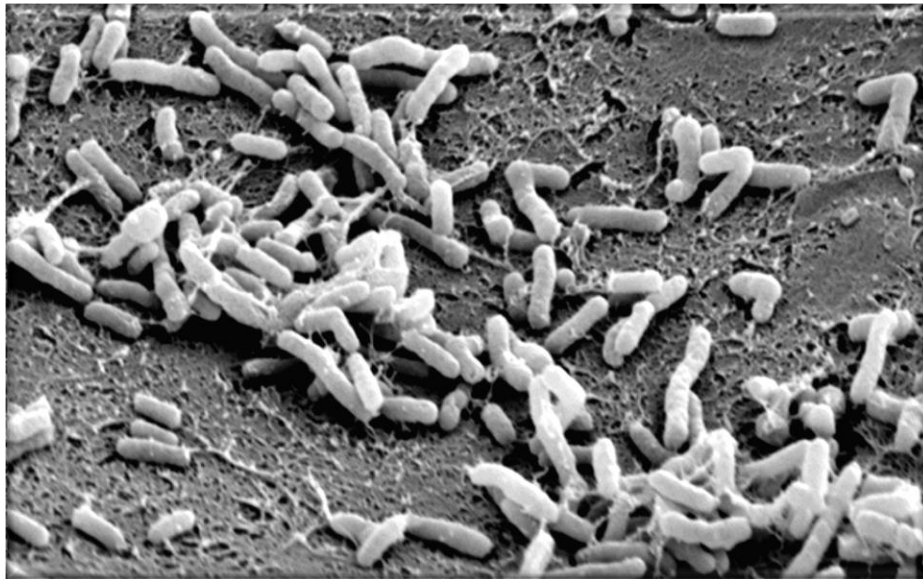
Παρά τα επιτεύγματα της βελτίωσης και της βιοτεχνολογίας ως προς την ενίσχυση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, μέσω των μεθόδων της ιστοκαλλιέργειας και γενετικής τροποποίησης, η παραγόμενη ποσότητα βιοδραστικών συστατικών δεν απαντά στις συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες αγοράς. Λύση στο πρόβλημα αυτό αποτελεί η παραγωγή της απαιτούμενης ποσότητας βιομάζας σε συστήματα βιοαντιδραστήρων μεγάλης κλίμακας (Rahmat & Kang, 2019). Οι βιοαντιδραστήρες είναι αυτόνομα συστήματα με αποστειρωμένο περιβάλλον σχεδιασμένα με τρόπο ώστε

να παρέχεται βελτιστοποίηση και εξασφάλιση της ομοιογένειας των περιβαλλοντικών συνθηκών, για παράγοντες όπως pH, αερισμός και θερμοκρασία, με στόχο τον μαζικό πολλαπλασιασμό κυττάρων και ιστών εμπλουτισμένων με βιοδραστικές ενώσεις (Khan *et al.*, 2018). Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερες μελέτες καταδεικνύουν τις δυνατότητες αξιοποίησης των διαγονιδιακών ριζών, έπειτα από μετασχηματισμό με το *A. rhizogenes*, ως ελκυστικό μέσο για καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρες, λόγω της οργανωμένης φύσης και του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξής τους καθώς και της σταθερότητας ως προς την παραγωγή μεταβολιτών (Roychowdhury *et al.*, 2013).

1.4 Το *Agrobacterium rhizogenes*

Το γένος *Agrobacterium* ανήκει στην οικογένεια *Rhizobiaceae* και περιλαμβάνει Gram-αρνητικά βακτήρια που αναπτύσσονται στο έδαφος, τόσο ως σαπρόφυτα όσο και ως παράσιτα (Nilsson and Olsson, 1997). Τα δυο πιο δημοφιλή είδη αγροβακτηρίου είναι τα φυτοπαθογόνα είδη *A. tumefaciens* και *A. rhizogenes*, πλέον γνωστά με την ονομασία *Rhizobium radiobacter* και *Rhizobium rhizogenes* αντίστοιχα. Και τα δύο έχουν τη δυνατότητα να μολύνουν, μέσω τραυμάτων, ένα εύρος δικοτυλήδων και ορισμένα μονοκοτυλήδων είδη, μεταφέροντας μέρος του γενετικού τους υλικού και ενσωματώνοντάς το στο γονιδίωμα του φυτού-ξενιστή (Bahramnejad *et al.*, 2019).

Το *Agrobacterium rhizogenes* (ή *Rhizobium rhizogenes*) είναι το φυτοπαθογόνο βακτήριο που ευθύνεται για την ανάπτυξη της ασθένειας των «τριχωτών ριζών» (Εικόνα 1.2). Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τυχαίων ριζών στη θέση της βακτηριακής προσβολής (Sarkar *et al.*, 2018). Οι ρίζες που προκύπτουν παρουσιάζουν αλλοιωμένο φαινότυπο και ταχεία πλαγιοτροπική ανάπτυξη με πληθώρα διακλαδώσεων (Roychowdhury *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.2 Μορφολογία του *A. rhizogenes* (Πηγή: <https://www.sandi.org/animal-of-the-week/rhizobium-rhizogenes/>)

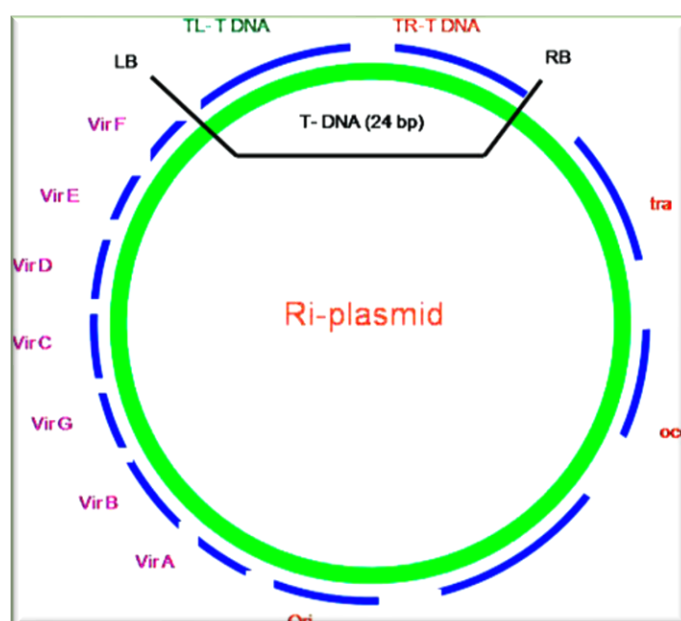
Η είσοδος και δράση του *A. rhizogenes* ξεκινά στα τραύματα του ξενιστή με τη μεταφορά και έκφραση του T-DNA του, μέσω του *Ri* πλασμιδίου, στα φυτικά κύτταρα. Μετά την επιτυχή ενσωμάτωση των γονιδίων T-DNA (10-30 kbp) στο πυρηνικό DNA, πραγματοποιούνται αλλαγές στο φυτό ξενιστή, η κυριότερη εκ των οποίων είναι ο πολλαπλασιασμός των ριζών από το σημείο εισόδου του παθογόνου (Faraz *et al.*, 2020). Οι Riker *et al.*, (1930) ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζοντας τις ρίζες που προκύπταν ως μολυσματικές ή τριχωτές ρίζες, ενώ αργότερα έγινε γνωστό οι ρίζες αυτές συνθέτουν και εκκρίνουν τις οπίνες, ενώσεις άνθρακα απαραίτητες για την επιβίωση του αγροβακτηρίου (Desmet *et al.*, 2020).

1.4.1 Το Πλασμίδιο *Ri*

Τα στελέχη του *A. rhizogenes* φέρουν στο γονιδίωμα τους μια εξωχρωμική κυκλική δομή DNA, μεγάλου μεγέθους (180 έως 250 kbp), που ονομάζεται πλασμίδιο *Ri* (*pRi*) και είναι απαραίτητο για την παθογένεια τους (Bahramnejad *et al.*, 2019). Τα πλασμίδια αποτελούνται από δύο περιοχές, αυτή που μεταφέρεται στο φυτό-ξενιστή και το μη μεταφερθέν μέρος. Το μη μεταφερθέν τμήμα αποτελείται από την περιοχή μολυσματικότητας, την έναρξη της αντιγραφής και την περιοχή καταβολισμού των οπινών. Το μεταφερθέν μέρος του *Ri* πλασμιδίου είναι το T-DNA, το οποίο ανάλογα

με τον τύπο της οπίνης μπορεί να είναι ένα απλό μόριο ή να χωρίζεται σε δύο επιμέρους τμήματα. Το T-DNA των στελεχών τύπου agropine διακρίνεται στο TL-DNA και στο TR-DNA, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους με περίπου 15 kb μη μεταφερόμενου DNA. Τα στελέχη των υπόλοιπων τύπων οπινών συνθέτουν ένα απλό T-DNA ομόλογο με το TL-DNA του τύπου agropine.

Γενικά, το T-DNA του πλασμιδίου *Ri* φέρει γονίδια υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση οπινών, την επαγωγή τριχωτών ριζών (γονίδια *rol*) και άλλα γονίδια άγνωστης λειτουργίας (ORFs). Στην περίπτωση των στελεχών τύπου agropine, το TL-DNA και το TR-DNA μεταφέρονται και ενσωματώνονται ανεξάρτητα στο γονιδίωμα του φυτού ξενιστή, ωστόσο μόνο το TL-DNA επάγει την πρόκληση τριχωτών ριζών. (Faraz *et al.*, 2020) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Δομή και γονιδιακό περιεχόμενο του πλασμιδίου *Ri* του *A.rhizogenes*. (Πηγή: Rawat *et al.*, 2019)

Με την ολοκλήρωση της μεταφοράς και έκφρασης του pRi T-DNA στο φυτικό κύτταρο, τα φυτά-ξενιστές παρουσιάζουν ορισμένες φαινοτυπικές αλλαγές που υποκινούνται από τα γονίδια T-DNA και ORFs. Συγκεκριμένα, τα γονίδια αυτά προκαλούν μεταβολές στον μεταβολισμό των ορμονών του φυτού και σε συνδυασμό με την αλλοιωμένη κυτταρική διαίρεση, οδηγούν σε τροποποίηση των μορφολογικών τους γνωρισμάτων (White *et al.*, 1985; Spena *et al.*, 1987).

1.4.2 Ο φαινότυπος *Ri*

Ο όρος «φαινότυπος *Ri*» ή «φαινότυπος τριχωτών ριζών» αναφέρεται στον αλλοιωμένο φαινότυπο που εμφανίζουν τα φυτά που έχουν μολυνθεί από το *A. rhizogenes* και αναπτύσσουν τριχωτές ρίζες. Η αλλοίωση αυτή έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται στην έκφραση των γονιδίων *rolA*, *rolB*, και *rolC*, καθένα από τα οποία ευθύνεται για συγκεκριμένες φαινοτυπικές αλλαγές (Sarkar *et al.*, 2018). Ο φαινότυπος *Ri* περιεγράφηκε αρχικά από τον Terfer (1984), και βάσει της περιγραφής του προκύπτουν τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν διαφορετικά μέρη του φυτού:

Συμπαγής ανάπτυξη

Ίσως το πιο σημαντικό και συχνό χαρακτηριστικό του φαινοτύπου *Ri* είναι η ως ένα βαθμό συμπαγής ανάπτυξη που προκύπτει από πολλαπλές μορφολογικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, τα μετασχηματισμένα φυτά εμφανίζουν μικρότερα μεσογονάτια διαστήματα και συνολικά μειωμένο ύψος σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου. Επίσης, η αυξημένη διακλάδωση και η αυξημένη ανάπτυξη των μασχαλιαίων οφθαλμών που παρουσιάζουν, παράλληλα με τη μειωμένη κυριαρχία κορυφής, συμβάλλουν περαιτέρω στη συμπαγή ανάπτυξη. Η βράχυνση των μεσογονατίων διαστημάτων σχετίζεται με την έκφραση των γονιδίων *rolA* και *rolC*, ενώ η μειωμένη κυριαρχία κορυφής και η αυξημένη διακλάδωση με την έκφραση του γονιδίου *rolC* (Roychowdhury *et al.*, 2013; Sarkar *et al.*, 2018).

Αλλοιωμένη μορφολογία φύλλων

Συχνά παρατηρούμενη αλλαγή στους φαινοτύπους *Ri* είναι η τροποποιημένη μορφολογία των φύλλων, η οποία συνήθως εκδηλώνεται με έντονη συστροφή, αλλαγές στο μέγεθος και διαφορές στη χρώση. Τα φύλλα των σειρών *Ri* εμφανίζονται ζαρωμένα, με έντονο πράσινο χρώμα και μικρότερα σε μέγεθος από αυτά των φυτών αγρίου τύπου. Η φαινοτυπική αλλοίωση των φύλλων οφείλεται στην έκφραση του γονιδίου *rolA* (Roychowdhury *et al.*, 2013; Bettini *et al.*, 2016; Sarkar *et al.*, 2018).

Αλλοιωμένη μορφολογία ρίζας

Στα δύο τρίτα των φαινοτύπων *Ri*, αναφέρθηκε μια σαφής μεταβολή στη μορφολογία των ριζών. Αυτό το χαρακτηριστικό σχετίζεται με την έκφραση του

γονιδίου *rolB* (Gutierrez-Valdes *et al.*, 2020). Τα μετασχηματισμένα φυτά μεταβάλλονται για να παράγουν διαφοροποιημένες, νεοπλαστικές ρίζες. Οι τριχωτές ρίζες χαρακτηρίζονται από ταχεία ανάπτυξη, υψηλό βαθμό πλευρικής διακλάδωσης και έλλειψη γεωτροπισμού (Häkkinen & Oksman-Caldentey, 2018). Επιπλέον, τα Ri-φυτά εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα ριζοβολίας και επομένως καλύτερα ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα που επιφέρει ορθότερη διαχείριση του νερού και των θρεπτικών συστατικών (Sarkar *et al.*, 2018). Ακόμα, συχνά αναφέρονται αυξήσεις στη βιομάζα, ένα χαρακτηριστικό εξαιρετικά ευεργετικό για τις ρίζες, ιδιαίτερα όταν αξιοποιούνται για την εξαγωγή πολύτιμων μεταβολιτών (Häkkinen & Oksman-Caldentey, 2018).

Τροποποιημένη ανθοφορία και γονιμότητα

Μεταβολές παρατηρούνται και στη μορφολογία των ανθέων, την έναρξη της ανθοφορίας και τη γονιμότητα του φυτού. Αναλυτικότερα, έχει αναφερθεί μείωση στο μέγεθος των ανθέων στις σειρές Ri, η οποία συχνά συνοδεύεται με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού τους. Η έναρξη της ανθοφορίας επηρεάζεται επίσης από την παρουσία του pRi T-DNA, με συχνότερο φαινόμενο την οψίμισή της, ωστόσο υπάρχουν αναφορές και για πρόκληση της πρωίμισής της. Τέλος, έχει καταγραφεί μειωμένη γονιμότητα εξαιτίας μείωσης της βιωσιμότητας της γύρης και μη φυσιολογικής ανάπτυξης των ωοθηκών και του σπερματοβλάστη (Sarkar *et al.*, 2018).

Οι αλλοιώσεις αυτές στο φαινότυπο των σειρών Ri ωστόσο δεν μπορούν να θεωρηθούν δεδομένες καθώς εμφανίζουν ένα εύρος παραλλαγών εντός του φυτικού είδους. Οι διαφορές στην ένταση του φαινοτύπου Ri έχουν αποδοθεί σε διάφορες μεταβλητές, όπως (1) το φυτικό είδος και ο γονότυπος, (2) το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό και (3) οι παράμετροι του μετασχηματισμού. Οι γενετικές παράμετροι, που συνιστούν τα μοναδικά συμβάντα μετασχηματισμού, περιλαμβάνουν τον αριθμό αντιγράφων των ογκογόνων pRi, την πλήρη ή περικομμένη μεταφορά του T-DNA, τα επίπεδα έκφρασης των μεταφερόμενων γονιδίων και την επίδραση της θέσης ένθεσης.

1.4.3 Εφαρμογές του μετασχηματισμού μέσω του *A. rhizogenes* σε φαρμακευτικά φυτά

Τις τελευταίες δεκαετίες, ο μετασχηματισμός μέσω του *A. rhizogenes* για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών έχει καταστεί μια ιδιαίτερα δημοφιλή τεχνική καθώς αποτελεί μια αρκετά σύντομη και εύκολη μέθοδο. Επιπλέον, παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλό κόστος, με άμεση δυνατότητα μελέτης και αξιοποίησης του διαγονιδιακού ριζικού συστήματος. Έτσι, το *A. rhizogenes* χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση φαινοτυπικά διακριτών φυτών με γνωρίσματα ενδιαφέροντος σε ένα εύρος φυτικών ειδών συμπεριλαμβανομένων και των φαρμακευτικών φυτών.

Στα φαρμακευτικά φυτά, η αξιοποίηση του *A. rhizogenes* για τη δημιουργία «σύνθετων» φυτών, αποτελούμενων από μετασχηματισμένο ριζικό σύστημα και υπέργεια μέρη άγριου τύπου, αποσκοπεί κυρίως στην παραγωγή και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών. Οι μετασχηματισμένες ρίζες έχουν την δυνατότητα να συνθέτουν τόσο τους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγουν οι ρίζες αγρίου τύπου όσο και νέα βιοδραστικά συστατικά. Επιπλέον, η ποσότητα των δευτερογενών μεταβολιτών στις περισσότερες περιπτώσεις ξεπερνά αυτή των φυτών αγρίου τύπου, ενώ η παραγωγή είναι σταθερή και μακροπρόθεσμη. Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στη γενετική σταθερότητα που χαρακτηρίζει το ριζικό σύστημα των σειρών-Ri, η οποία εντείνεται και με την ικανότητα αυτόνομης ανάπτυξής τους, απουσία ρυθμιστών ανάπτυξης (Häkkinen & Oksman-Caldentey, 2018; Hussain *et al.*, 2022). Υπάρχουν, ωστόσο, και αναφορές για μειωμένη παραγωγή μεταβολιτών που όμως μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο, τη σύνθεση των μέσων ανάπτυξης, τις συνθήκες ανάπτυξης κ.α. (Sarkar *et al.*, 2018).

Ο γενετικός μετασχηματισμός μέσω του *A. rhizogenes* για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από φαρμακευτικά φυτά έχει μακρά ιστορία, καθώς ήδη από τη δεκαετία του 80 είχε προταθεί ως μέσο παραγωγής και απομόνωσης ουσιών όπως το ροσμαρινικό οξύ και η αρτεμισίνη (Babich *et al.*, 2020). Έκτοτε, έχει αξιοποιηθεί σε περισσότερα από εκατό διαφορετικά είδη φαρμακευτικών φυτών με χρήση διαφόρων στελεχών για την επιτυχή απομόνωση ουσιών ενδιαφέροντος (Sarkar *et al.*, 2018). Μερικά από τα είδη αυτά είναι τα *Atropa belladonna*, *Hypericum*

perforatum, *Cannabis sativa*, *Taraxacum officinale*, *Salvia sclarea* και *Cichorium intybus*.

Ενδεικτικά, ο μετασχηματισμός φυτών πικραλίδας (*Taraxacum officinale*) με το στέλεχος A4 του *A. rhizogenes* οδήγησε σε εξαγωγή αυξημένης ποσότητας σεσκιτερπενίων από τις ρίζες των μετασχηματισμένων ριζών συγκριτικά με τις αντίστοιχες αγρίου τύπου (Mahesh & Jeyachandran, 2011). Αντίστοιχα, οι Tusevski *et al.* (2017) παρέλαβαν υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών και φλαβονοειδών από κλώνους τριχωτών ριζών του *Hypericum perforatum* που είχαν μετασχηματιστεί με το στέλεχος A4M70GUS. Επιπρόσθετα, ο μετασχηματισμός φυτών του είδους *Atropa belladonna* με το στέλεχος AR15834, και η μετέπειτα ανάπτυξη των φυτών σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με KNO₃, οδήγησε σε συγκέντρωση αλκαλοειδών έως και 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή των μη μετασχηματισμένων (Chashmi *et al.*, 2010).

Η αλθέα (*Althea officinalis*) αποτελεί ένα από τα φαρμακευτικά φυτά στα οποία έχουν εφαρμοστεί πρωτόκολλα επαγωγής τριχωτών ριζών για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Ωστόσο, μέχρι σήμερα οι διαθέσιμες αναφορές για μετασχηματισμό της αλθέας μέσω του *A. rhizogenes*, με χρήση διαφορετικών στελεχών, συγκεντρώνονται σε μόλις τρεις μελέτες. Η πρώτη σχετική αναφορά περιλαμβάνει τη χρήση του στελέχους LBA9402 του *A. rhizogenes* για το μετασχηματισμό φύλλων και στελεχών, η οποία οδήγησε σε ανάπτυξη μετασχηματισμένων ριζών 14 μέρες μετά τον εμβολιασμό. Αξίζει δε να αναφερθεί ότι η επιτυχία του μετασχηματισμού επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση της οπίνης mannopinelagropine στις τριχωτές ρίζες (Ionkova, 1992). Ακολούθως, οι Drake *et al.* (2013) εστίασαν στην ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών αλθέας, με τη χρήση του στελέχους LBA9402 του *A. rhizogenes*, που εκφράζουν την πρωτεΐνη κυανοβιρίνη-N (cyanovirin-N (CV-N)) που δρα ως αντικός παράγοντας, αναστέλλοντας την κυτταρική είσοδο μολυσματικών ιοσωματίων, και αξιοποιείται για την καταπολέμηση του HIV. Τέλος, η πλέον πρόσφατη έρευνα αφορά στην αξιοποίηση τεσσάρων διαφορετικών στελεχών του *A. rhizogenes* -A4, A13, ATCC15834, ATCC15834GUS- για το μετασχηματισμό φυτών του είδους *A. officinalis* με σκοπό την παραγωγή φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων. Τα ευρήματα της μελέτης ανέδειξαν το στέλεχος ATCC15834 ως το πλέον αποτελεσματικό ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού, ωστόσο η μεγαλύτερη παραγωγή φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων επετεύχθη έπειτα από μετασχηματισμό με τα στελέχη A4 και A13 αντίστοιχα (Tavassoli & Safipour Afshar, 2018).

1.5 Σκοπός της Μελέτης

Οι ολοένα και αυξανόμενες ανάγκες της αγοράς για βιοδραστικές ενώσεις φυτικής προέλευσης απαιτούν την αξιοποίηση καινοτόμων μεθόδων για ενίσχυση και επιτάχυνση της παραγωγής τους. Η γενετική τροποποίηση μέσω του *A. rhizogenes* έχει αξιοποιηθεί σε πληθώρα φαρμακευτικών φυτών για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών παρουσιάζοντας ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η *Althea officinalis* L. αποτελεί ένα από τα φαρμακευτικά φυτά που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις ιδιότητες του και θεωρείται ως πολύτιμο από πλευράς αξιοποίησής του από τη φαρμακοβιομηχανία. Παρά το γεγονός ότι έχει επιχειρηθεί η ανάπτυξη πρωτοκόλλων για το γενετικό μετασχηματισμό της *Althea officinalis* L., μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*, ως είδος δεν έχει τύχει συστηματικής έρευνας προς την κατεύθυνση αυτή με αποτέλεσμα να εκλείπουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη βελτιστοποίηση μεθόδων ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών που είναι άμεσα αξιοποιήσιμες ως πλατφόρμες παραγωγής βιοδραστικών συστατικών. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althea officinalis* L., μέσω του *Agrobacterium rhizogenes*, για την ευχερή παραγωγή διαγονιδιακών ριζών προς αξιοποίηση σε διαδικασίες εξαγωγής ουσιών ενδιαφέροντος. Στο πλαίσιο βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου, αξιοποιήθηκαν και μελετήθηκαν συγκριτικά διαφορετικά βακτηριακά στελέχη και πρωτόκολλα μετασχηματισμού, που διέφεραν κυρίως ως προς τη σύνθεση του μέσου εμβολιασμού και των θρεπτικών υποστρωμάτων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Με σκοπό τη διεξαγωγή των πειραμάτων γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν σπόροι του είδους *Althea officinalis*, με κοινό όνομα αλθέα ή δενδρομολόχα. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ταυτότητα και πιστότητα του γενετικού υλικού, οι σπόροι αποκτήθηκαν από την εταιρία Pharmasaat (<https://www.pharmasaat.de>), εταιρία παραγωγής και διανομής σπόρων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Το εν λόγω φυτικό είδος αποτελεί πολυετές βότανο με βάρος 1000 σπόρων 2,5 gr, ενώ ο σπόρος έχει ελλειπτικό σχήμα και χρώμα σκούρο καφέ (Εικόνα 2.1).



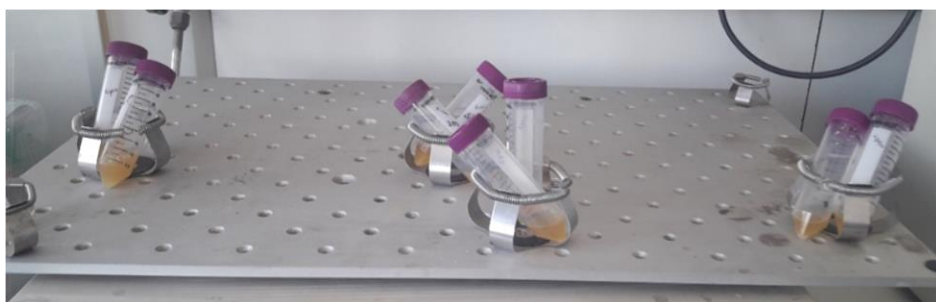
Εικόνα 2.1 Σπόροι του φυτού *Althea officinalis* L.

2.2 Στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* και συνθήκες ανάπτυξης

Ο μετασχηματισμός των φυτών αλθέας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των βακτηριακών στελεχών R1000 και Arqua του *Agrobacterium rhizogenes*. Η ανάπτυξη των βακτηρίων έλαβε χώρα σε 10 ml υγρού θρεπτικού μέσου (LB) με την παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών για κάθε στέλεχος, για διάστημα 2 ημερών, στους 28 °C ή έως ότου αποκτήσουν $OD_{600} = 0,6-1,0$ (Εικόνα 2.2). Πιο συγκεκριμένα, τα αντιβιοτικά

που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ναλιδιζικό οξύ σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ για το βακτηριακό στέλεχος *R1000* και η σπεκτινομυκίνη σε συγκέντρωση $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ για το βακτηριακό στέλεχος *Arqua*. Οι καλλιέργειες των βακτηρίων αξιοποιήθηκαν για την παρασκευή ενός εμβολίου για το μετασχηματισμό των εκφύτων αλθέας.

Για την παρασκευή του εμβολίου αρχικά έγινε συλλογή των βακτηριακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, 10 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 5 λεπτά και έπειτα έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη 10 ml MS και εκ νέου φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Τέλος, έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος (pellet) σε 1 ml υγρό MS.



Εικόνα 2.2 Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών σε μηχανικό αναδευτήρα, υπό ανάδευση στις 160 rpm.

2.3 Μετασχηματισμός σποροφύτων φακής μέσω του *A. rhizogenes*

Για τη διαδικασία του γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν υγιή σπορόφυτα αλθέας, ηλικίας 1 εβδομάδας, με φυσιολογικό φαινότυπο στα οποία εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα. Η διαδικασία του μετασχηματισμού βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Pavli και Skaracis (2010), με διαφορές μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων ως προς τη σύσταση του συνόλου των θρεπτικών υποστρωμάτων (Πίνακας 2.1 και Πίνακας 2.2).

2.3.1 Πρωτόκολλο 1

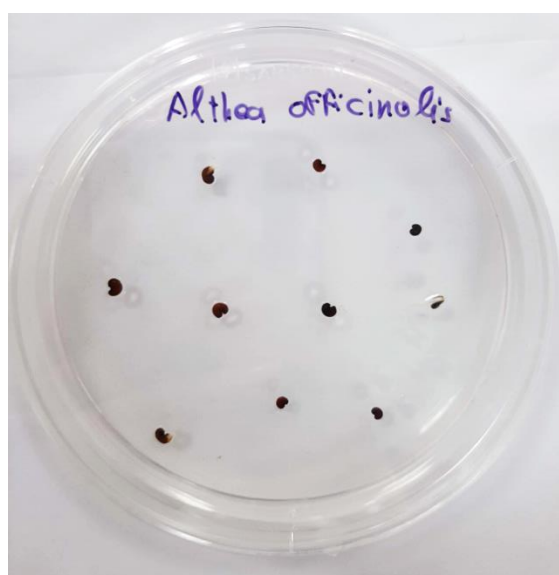
Αρχικά, σπόροι αλθέας απολυμάνθηκαν, για 5 λεπτά, με διάλυμα χλωρίνης 20 % που περιείχε Tween-20. Ακολούθησαν 4 πλύσεις με αποστειρωμένο dH_2O και στη

συνέχεια, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης (Εικόνα 2.3). Τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες στους 22 °C, 16 ώρες φωτός / 8 ώρες σκοτάδι, για διάστημα 1 εβδομάδας.

Πίνακας 2.1 Σύνθεση υποστρωμάτων πρωτοκόλλου 1 που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΣΥΝΘΕΣΗ
Υπόστρωμα βλάστησης	MS/vitamins: 2,2 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 5 g/L
Υπόστρωμα συν-καλλιέργειας	MS/vitamins: 2,2 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 5 g/L Ακετοσυριγκόνη: 100 µM
Υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/vitamins: 2,2 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 5 g/L Σεφοταξίμη: 250 mg/L
MS	MS: 4,4 g/L Sucrose: 30 g/L Ακετοσυριγκόνη: 100 µM

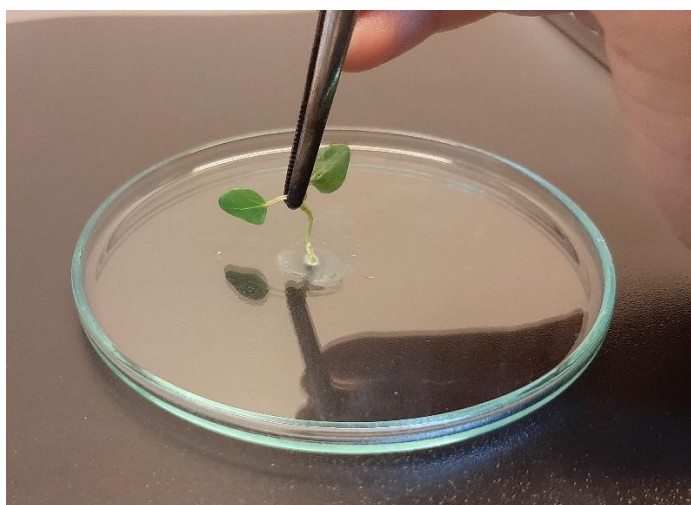
*Σε όλα τα υποστρώματα το pH ρυθμίστηκε στο $5,7 \pm 0,1$



Εικόνα 2.3 Αποστειρωμένοι σπόροι αλθέας προς βλάστηση σε τριβλία που περιέχουν υπόστρωμα βλάστησης.

Μετά το πέρας 1 εβδομάδας, υγιή σπορόφυτα χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα για τη πραγματοποίηση του μετασχηματισμού. Η διαδικασία του μετασχηματισμού περιελάμβανε την αποκοπή του υπάρχοντος ριζικού συστήματος στην περιοχή του υποκοτυλίου, με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού, και εμφύσηση του τραυματισμένου άκρου εντός του εμβολίου (Εικόνα 2.4). Στη συνέχεια, τα εμβολιασμένα φυτά μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τριβλία Petri που περιείχαν υπόστρωμα συν-καλλιέργειας, όπου και παρέμειναν για διάστημα 3 ημερών. Ακολούθησε μεταφορά των σποροφύτων σε τετράγωνα τριβλία που περιείχαν υπόστρωμα επαγωγής ριζών, εμπλουτισμένο με σεφοταξίμη (100 mg L^{-1}), προκειμένου να γίνει αναχαίτηση της ανάπτυξης των βακτηρίων. Μετά από 15 ημέρες, τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν εκ νέου σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών που περιέχει σεφοταξίμη. Τα τριβλία Petri σφραγίστηκαν μερικώς, ώστε να επιτρέπεται ο αερισμός, και τοποθετήθηκαν κατακόρυφα σε θάλαμο ανάπτυξης για περίπου 15 ημέρες (Εικόνα 2.5).

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φυτά στα οποία εφαρμόστηκαν οι ίδιες μεταχειρίσεις χωρίς να έχει προηγηθεί εμβολιασμός. Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού εκτιμήθηκε με βάση το φαινότυπο των ριζικών τριχιδίων που φύονταν στο σημείο εμβολιασμού.



Εικόνα 2.4 Εμφύσηση εκφύτων αλθέας στα βακτηριακά κύτταρα.



Εικόνα 2.5 Διαδικασία επαγωγής διαγονιδιακών ριζών στο είδος *Althea officinalis* L.

2.3.2 Πρωτόκολλο 2

Στο δεύτερο πρωτόκολλο η διαδικασία του μετασχηματισμού παρέμεινε η ίδια αναφορικά με την απολύμανση των σπόρων, την ηλικία των σποροφύτων, τον εμβολιασμό και τις μετέπειτα μεταχειρίσεις των σποροφύτων. Η μόνη διαφορά παρατηρείται στη σύνθεση των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται. Ειδικότερα, τα υποστρώματα του πρωτοκόλλου 2 διέφεραν ως προς τη συγκέντρωση σουκρόζης, θρεπτικών στοιχείων και αντιβιοτικών. Επιπλέον, στα θρεπτικά υποστρώματα του παρόντος πρωτοκόλλου προστέθηκε και ο παράγοντας MES.

Πίνακας 2.2 Σύνθεση υποστρωμάτων πρωτοκόλλου 2 που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΣΥΝΘΕΣΗ
Υπόστρωμα βλάστησης	MS/Basal salt: 2,15 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 5 g/L
Υπόστρωμα συν-καλλιέργειας	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 8 g/L Ακετοσυριγκόνη: 150 μ M
Υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 30 g/L Agar: 8 g/L Σεφοταξίμη: 250 mg/L
MS	MS/MES/vit: 4,9 g/L Sucrose: 30 g/L Ακετοσυριγκόνη: 150 μ M

*Σε όλα τα υποστρώματα το pH ρυθμίστηκε στο $5,7 \pm 0,1$

2.4 Συλλογή ιστού και Εξαγωγή DNA

Μετά το πέρας και του δεύτερου δεκαπενταήμερου των σποροφύτων αλθέας στο υπόστρωμα επαγωγής ριζών, πραγματοποιήθηκε συλλογή των δειγμάτων, τα οποία επρόκειτο για ρίζες από μετασχηματισμένα και αγρίου τύπου φυτά (Εικόνα 2.6). Τα δείγματα των ριζών τοποθετήθηκαν σε αλουμινόχαρτο, πάνω στο οποίο σημειωνόταν ο κωδικός αριθμός και το στέλεχος του βακτηρίου, και τοποθετήθηκαν απευθείας σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), προς αποφυγή μετασυλλεκτικών αλλοιώσεων, έως ότου γίνει η απομόνωση DNA.

Για την απομόνωση DNA έγινε χρήση του Kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικότερα, 100 mg ιστού από κάθε δείγμα λειοτριβήθηκαν σε κατάλληλα γουδιά (κάψα πορσελάνης), με χρήση υγρού αζώτου, έως ότου κονιορτοποιηθούν και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε eppendorf. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία λύσης των κυττάρων κατά την οποία στον κονιορτοποιημένο ιστό προστέθηκαν 400 μ l διαλύματος PL1,

ανακίνηση σε vortex και προσθήκη 10 µl RNase A. Η λύση των κυττάρων ολοκληρώθηκε με την επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10 λεπτά. Έπειτα, το προϊόν λύσης μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf με στήλη NucleoSpin® Plant II και φυγοκεντρήθηκε στις 11000 rpm για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf όπου προστέθηκαν 450 µl buffer PC και ακολούθως πραγματοποιήθηκε μεταφορά σε στήλη NucleoSpin® Plant II, η οποία έχει την ιδιότητα συγκράτησης του DNA.

Αμέσως μετά, έγινε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό και απόρριψη του υπερκείμενου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις:

1^η : 400 µl διαλύματος έκπλυσης (PW1)  11000 rpm -1 min

απομάκρυνση του υποκειμένου

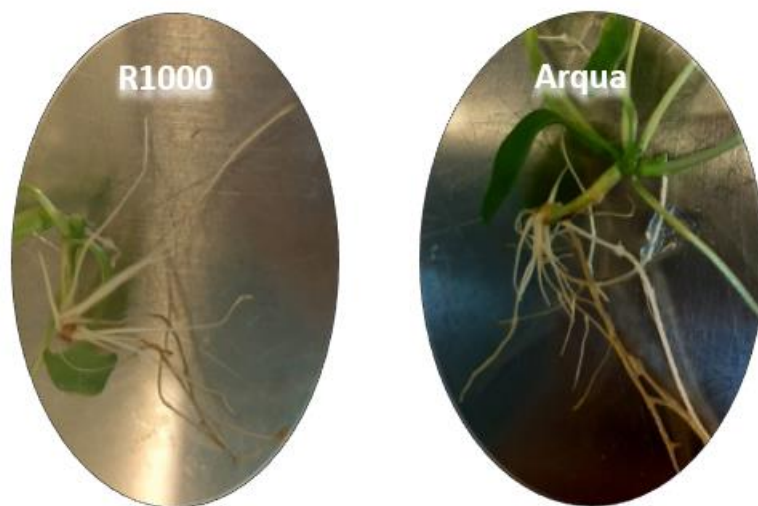
2^η : 700 µl διαλύματος έκπλυσης (PW2)  11000 rpm -1 min

απομάκρυνση του υποκειμένου

3^η : 200 µl διαλύματος έκπλυσης (PW2)  11000 rpm -1 min

απομάκρυνση του υποκειμένου

Τέλος, ακολούθησε η διαδικασία έκλουσης του DNA κατά την οποία η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο eppendorf όπου προστέθηκαν 50 µl διαλύματος έκλουσης (PE). Τα δείγματα αφέθηκαν σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 5 λεπτά προκειμένου να γίνει επώαση και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Η διαδικασία έκλουσης πραγματοποιήθηκε ξανά με την προσθήκη 30 µl ddH₂O αυτή τη φορά και επώαση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20 °C.



Εικόνα 2.6 Διαγονιδιακές ρίζες που αποκόπηκαν από τα φυτά και χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή DNA.

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους/ορατού με απορρόφηση στα 260 nm, όπου η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/μL. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης DNA των δειγμάτων υπολογίστηκε στα 100 ng/μL.

2.5 Έλεγχος του μετασχηματισμού μέσω PCR

Η επιτυχής ένθεση του διαγονιδίου ελέγχθηκε με πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η επαλήθευση της ενσωμάτωσης της T-DNA περιοχής στο φυτικό γονιδίωμα και της απουσίας των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω ενίσχυσης με χρήση εξειδικευμένων ζευγών εκκινήτων, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.

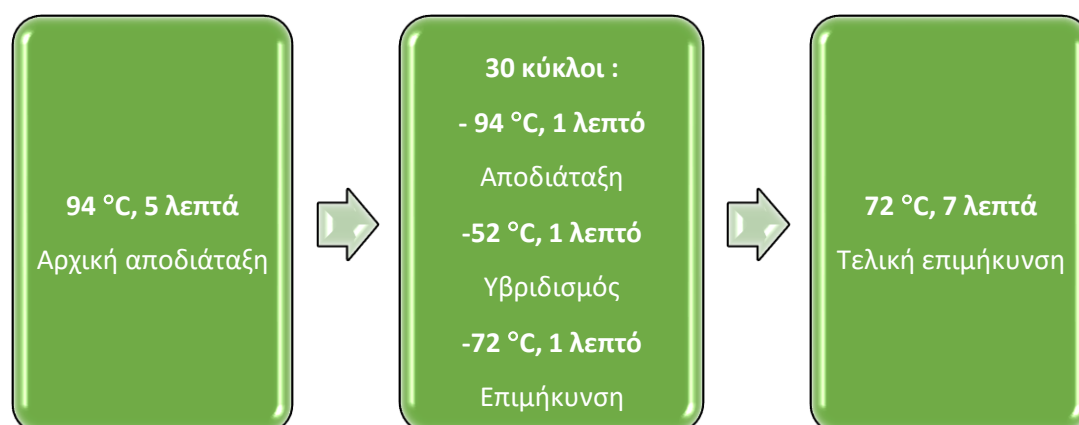
Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο μείγμα της PCR περιγράφονται στον Πίνακα 2.4, ενώ στην Εικόνα 2.5 παρουσιάζεται το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή για την πραγματοποίηση της PCR.

Πίνακας 2.3 Τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
<i>rolB2-F</i>	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT	52	423	Thilip <i>et al.</i> , 2015
<i>rolB2-R</i>	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	52		
<i>virCD-F</i>	CTCATCAGGCACGCTTG	52	1074	Pavli and Scarakis 2010
<i>virCD-R</i>	GCGGATGCTTCAAATGG	52		

Πίνακας 2.4 Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα (5x)	5
MgCl ₂ (25 mM)	1
dNTPs (10 mM)	0.5
Εκκινητές (10 mM)	1
Taq polymerase (5u/μl)	0.25
DNA (20ng/μl)	1.5
H ₂ O	14.75
Τελικός όγκος	25



Εικόνα 2.5 Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

2.6 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) για 2.5 ώρες στα 60 V. Στη συνέχεια, έγινε οπτικοποίηση των PCR προϊόντων με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου μετασχηματισμού στην αλθέα

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της αλθέας που επιτρέπει την ταχεία και αποτελεσματική επαγωγή διαγονιδιακών ριζών. Απώτερο σκοπό αποτελεί η τροποποίηση του ριζικού συστήματος, στοχεύοντας στην αύξηση της βιομάζας των ριζών για αντίστοιχη αύξηση της παραγωγής των περιεχόμενων βιοδραστικών ενώσεων. Η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού, μέσω της αξιοποίησης του *Agrobacterium rhizogenes*, προσεγγίστηκε με τη χρήση δύο διαφορετικών βακτηριακών στελεχών και την εφαρμογή δύο πρωτοκόλλων που διέφεραν ως προς τη σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων. Τα βακτηριακά στελέχη που αποτέλεσαν τους φορείς μετασχηματισμού ήταν τα *R1000* και *Arqua*, ενώ αναφορικά με τα πρωτόκολλα οι διαφορές εντοπίζονταν στην παρουσία MES και στη συγκέντρωση σουκρόζης και ακετοσυριγκόνης.

Η γενετική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω εμφάνισης του υποκοτυλίου ασηπτικά ανεπτυγμένων εκφύτων αλθέας, ηλικίας μιας εβδομάδας, στη βακτηριακή καλλιέργεια από το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος. Έκτοτε, παρατηρήθηκε η έκπτυξη από την τομή του ριζώματος ένας περιορισμένος αριθμός πλευρικών ριζών. Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού βασίστηκε στη συγκριτική αξιολόγηση των εμβολιασμένων σποροφύτων με τα φυτά αγρίου τύπου (μάρτυρες).

3.1.1 Χρόνος έκπτυξης ριζών μετά των εμβολιασμό

Τη διαδικασία του μετασχηματισμού με τα δυο διαφορετικά βακτηριακά στελέχη ακολούθησε καθημερινή καταγραφή του αριθμού των ημερών που μεσολάβησαν για την εμφάνιση νέων ριζών. Η καταγραφή αφορούσε στο χρόνο εμφάνισης ριζικών τριχιδίων μετά τον μετασχηματισμό με τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη και τα διαφορετικά πρωτόκολλα μετασχηματισμού (Πίνακας 3.1).

Στο Πρωτόκολλο 1, η εμφάνιση των πρώτων ριζών στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *R1000* σημειώθηκε σε διάστημα 14 ± 1 ημερών, έπειτα από

τον εμβολιασμό. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι οι νεοεκπτυσσόμενες ρίζες, έπειτα από εμβολιασμό με το στελέχος *R1000*, εμφάνιζαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των διαγονιδιακών ριζών που δημιουργεί ο μετασχηματισμός με το βακτήριο *A. rhizogenes*. Όσον αφορά τον εμβολιασμό με το βακτηριακό στελέχος *Arqua*, η έκπτυξη νέων ριζών σημειώθηκε 2-3 ημέρες αργότερα, δηλαδή 16 ± 1 έπειτα από τον εμβολιασμό. Ο φαινότυπος των ριζών που εκπτύχθηκαν δε διέφερε σημαντικά από τον αντίστοιχο του αγρίου τύπου, επιφέροντας σχετική αδυναμία εκτίμησης της συχνότητας μετασχηματισμού. Στο παραπάνω χρονικό διάστημα, τα μη μετασχηματισμένα φυτά (wild type) ανέπτυξαν ρίζες αγρίου τύπου.

Το Πρωτόκολλο 2 οδήγησε σε εμφανώς ταχύτερη επαγωγή ριζικών, συγκριτικά με το Πρωτόκολλο 1, ανεξαρτήτως του βακτηριακού στελέχους. Ειδικότερα, η εμφάνιση των πρώτων ριζών καταγράφηκε στα φυτά αλθέας που μετασχηματίστηκαν με το βακτηριακό στελέχος *R1000*, σε διάστημα 10 ± 1 ημερών μετά τον εμβολιασμό. Σε συμφωνία με τα αντίστοιχα ευρήματα κατά τη χρήση του Πρωτοκόλλου 1, οι ρίζες που εκπτύχθηκαν χαρακτηρίζονταν από φαινότυπο διαγονιδιακής φύσης. Αντιστοίχως, τα σπορόφυτα που μετασχηματίστηκαν με το στελέχος *Arqua* ανέπτυξαν νέες ρίζες σε διάστημα 12 ± 1 ημερών από τον μετασχηματισμό, οι οποίες ωστόσο δεν εμφάνιζαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των θυσσανωδών ριζών. Και σε αυτό το πρωτόκολλο, τα μη μετασχηματισμένα φυτά ανέπτυξαν ριζικό σύστημα αγρίου τύπου.

Πίνακας 3.1 Αριθμός ημερών που μεσολάβησαν από τον εμβολιασμό με τα βακτηριακά στελέχη του *A. rhizogenes*, *R1000* και *Arqua*, έως την έκπτυξη νέων ριζών στα δύο πρωτόκολλα μετασχηματισμού.

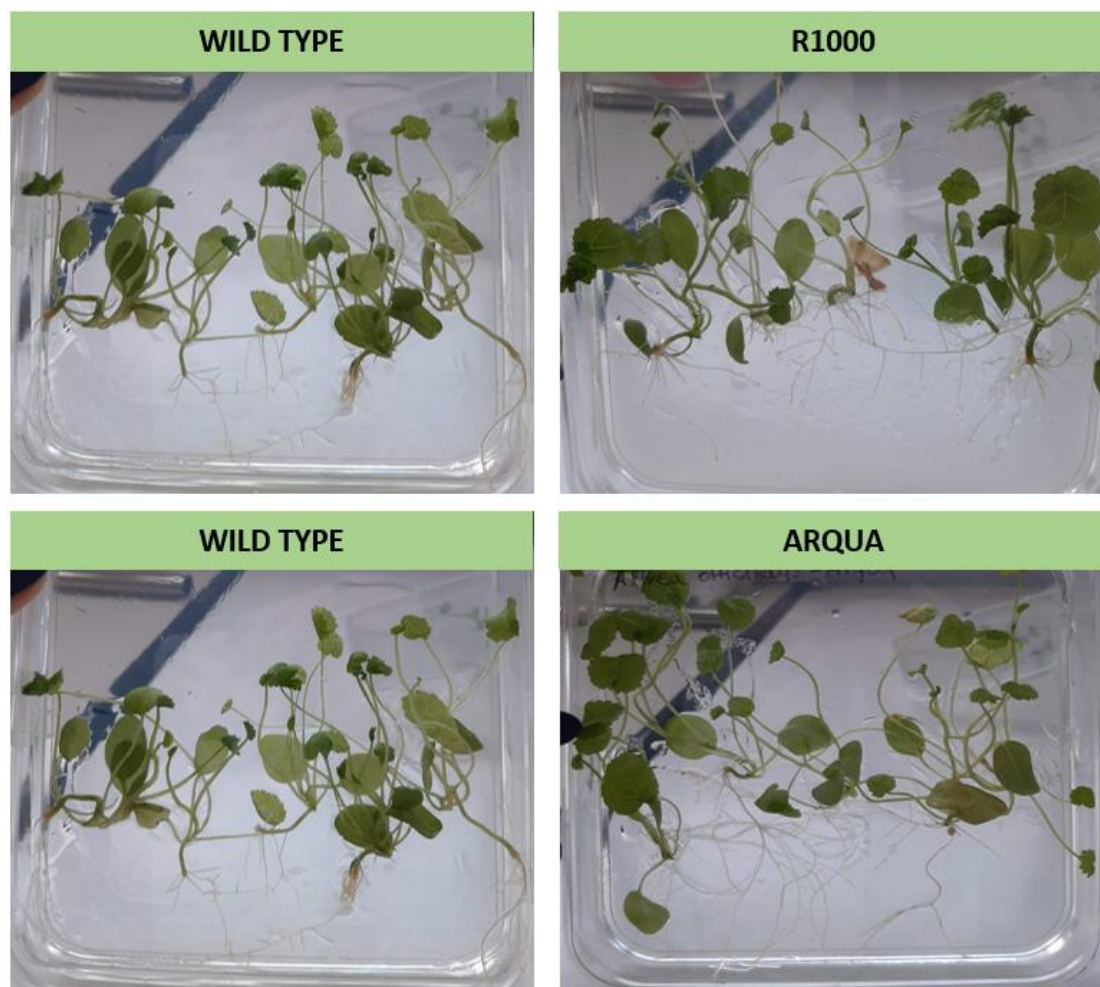
<i>A. rhizogenes</i> στελέχη	Χρόνος εμφάνισης ριζών	
	Πρωτόκολλο 1	Πρωτόκολλο 2
<i>R1000</i>	14 ± 1	10 ± 1
<i>Arqua</i>	16 ± 1	12 ± 1

3.1.2 Φαινοτυπική αξιολόγηση του ριζικού συστήματος των μετασχηματισμένων φυτών

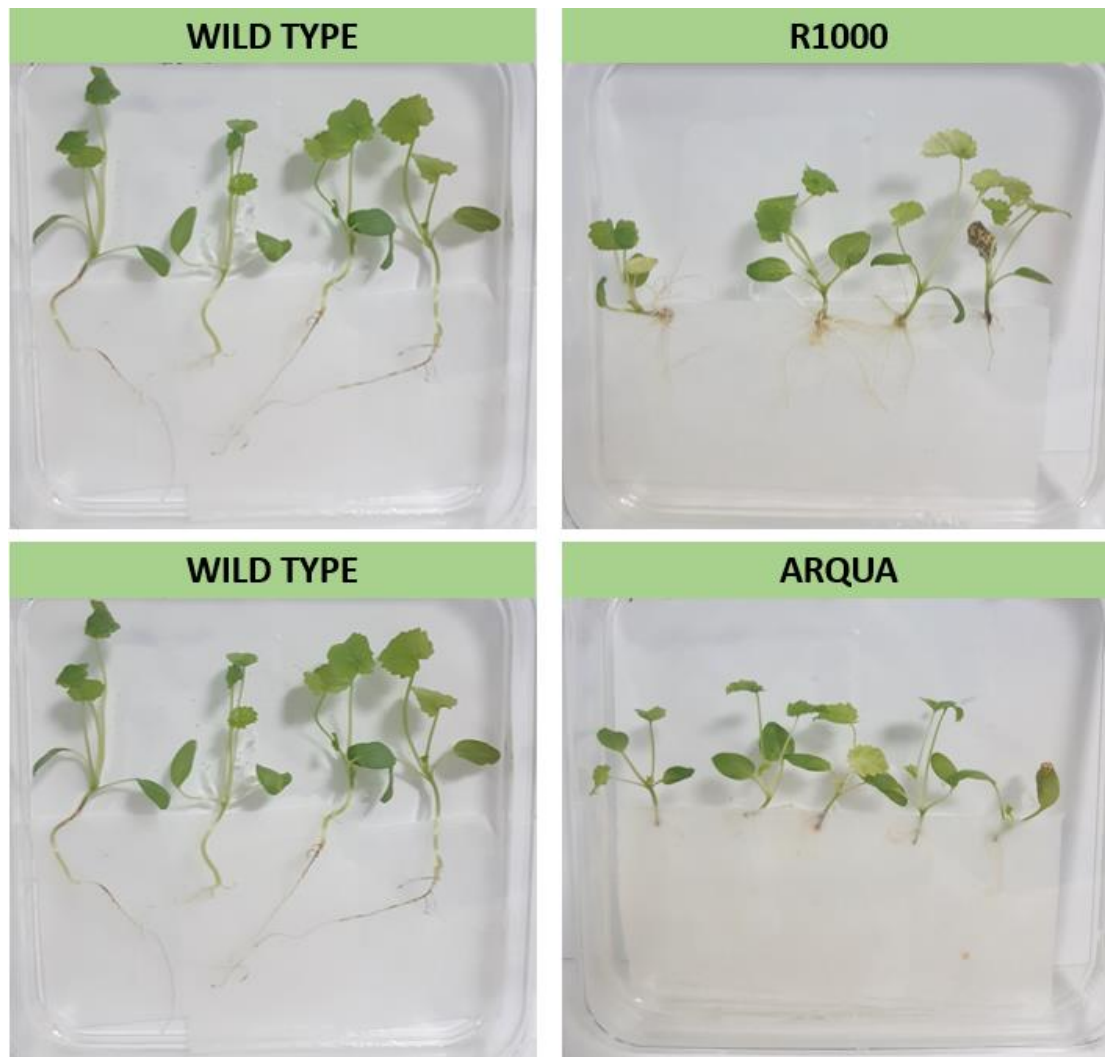
Σε διάστημα 4 εβδομάδων μετά τον εμβολιασμό, ήταν δυνατή η παρατήρηση σαφών διαφορών στον φαινότυπο, κυρίως των διαγονιδιακών ριζών και σε ορισμένες περιπτώσεις του υπέργειου μέρους, σε σύγκριση από τον αντίστοιχο των μαρτύρων. Αναλυτικά, στο σημείο εμβολιασμού των φυτών που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος *R1000* του *A. rhizogenes* παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κάλου και οι έκπτυξη μετασχηματισμένων ριζών. Οι μετασχηματισμένες ρίζες εμφάνισαν αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων και περιστασιακά πλαγιοτροπική ανάπτυξη, ενώ και η συνολική βιομάζα του ριζικού συστήματος ήταν σαφώς αυξημένη συγκριτικά με αυτή των φυτών αγρίου τύπου.

Αντίθετα, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Arqua* του *A. rhizogenes* ανέπτυξαν ριζικό σύστημα το οποίο δεν παρουσίαζε διακριτές διαφορές στη δομή και στη μορφολογία των ριζών σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Παρά την απουσία μορφολογικών διαφορών, οι ρίζες που προέκυψαν έπειτα από μετασχηματισμό με το στέλεχος *Arqua* χαρακτηρίζονταν από αυξημένη βιομάζα συγκριτικά με το ριζικό σύστημα των φυτών αγρίου τύπου. Αναφέρεται ωστόσο ότι η αδυναμία φαινοτυπικής διάκρισης των μετασχηματισμένων νεοπλαστικών ριζών δεν αποτελεί παράγοντα αποκλεισμού της επιτυχής ένθεσης και ενσωμάτωσης του T-DNA του *A. rhizogenes* στα φυτά. Επιπλέον, σε ορισμένα μετασχηματισμένα φυτά και των δύο μεταχειρίσεων παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου.

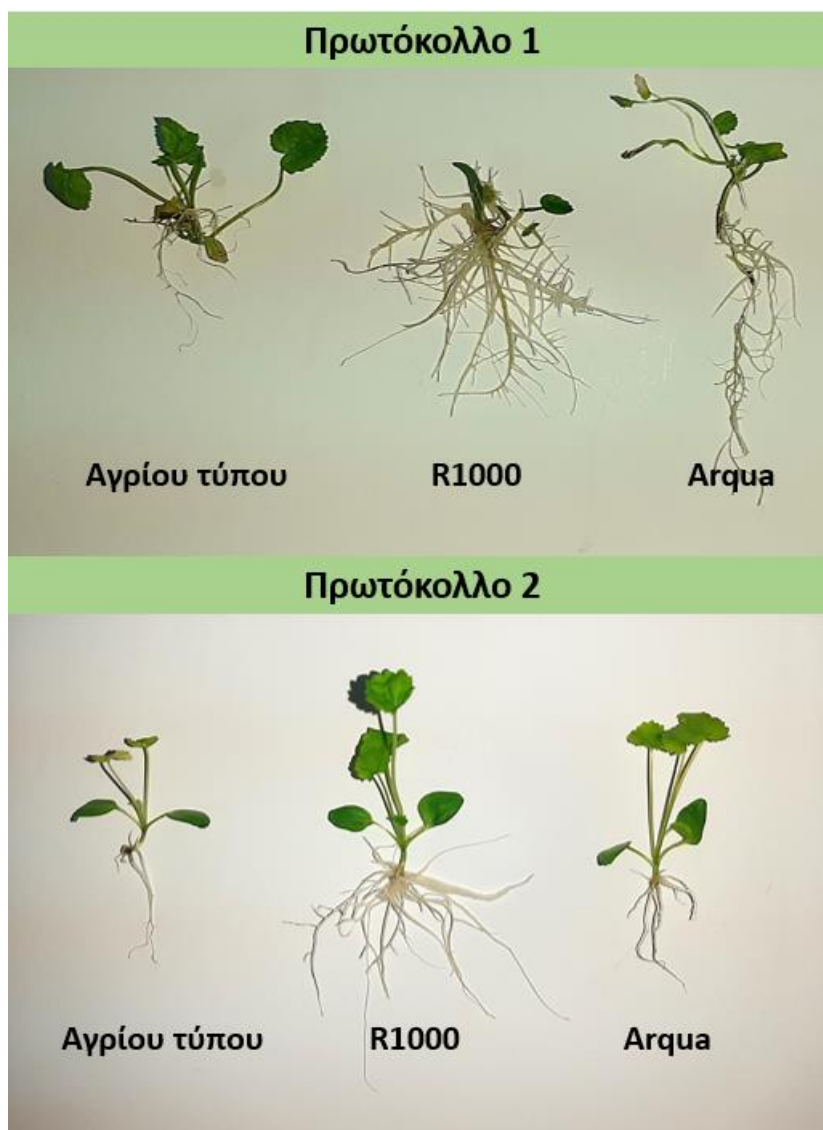
Στις Εικόνες 3.1 (*Πρωτόκολλο 1*) και 3.2 (*Πρωτόκολλο 2*) που ακολουθούν απεικονίζεται η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων ριζών αλθέας για κάθε βακτηριακό στέλεχος, συγκριτικά με το ριζικό σύστημα των φυτών αγρίου τύπου, ενώ στην Εικόνα 3.3 γίνεται συγκριτική απεικόνιση των φυτών αλθέας που μετασχηματίστηκαν με το βακτήριο *A. rhizogenes*, τέσσερις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό.



Εικόνα 3.1 Σπορόφυτα αλθέας που μετασχηματίστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*, με τη χρήση του *Πρωτοκόλλου 1*, τέσσερις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό.



Εικόνα 3.2 Σπορόφυτα αλθέας που μετασχηματίστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*, με τη χρήση του *Πρωτοκόλλου 2*, τέσσερις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό.



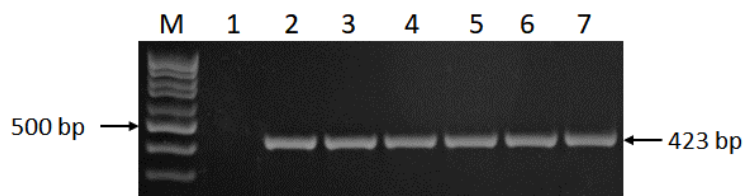
Εικόνα 3.3 Συγκριτική απεικόνιση των φυτών αλθέας που μετασχηματίστηκαν με το βακτήριο *A. rhizogenes*, τέσσερις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Παρουσιάζονται συγκριτικά τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη *R1000* και *Arqua* καθώς και τα μη-μετασχηματισμένα φυτά (αγρίου τύπου).

3.2 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων

Για την επιβεβαίωση της διαγονιδιακής φύσης του ριζικού συστήματος των φυτών αλθέας, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* καθώς και της αλληλουχίας *virCD*, προκειμένου να ελεγχθεί η ενσωμάτωση του T-DNA του *A. rhizogenes* στα φυτά.

Η διαγονιδιακή φύση των ριζών επιβεβαιώθηκε τόσο στα δείγματα που μετασχηματίστηκαν με τα στελέχη *R1000* όσο και σε αυτά που μετασχηματίστηκαν με

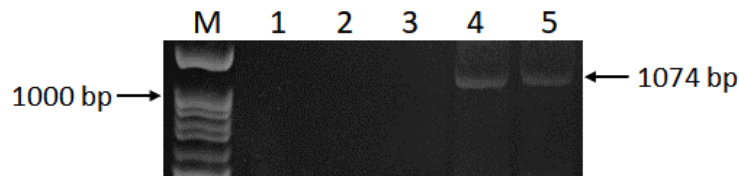
το στέλεχος *Arqua*. Απόδειξη του γεγονότος αυτού ήταν παρουσία του γονιδίου *rolB2* (423 bp) σε όλα τα δείγματα ριζών που εμβολιάστηκαν με τα 2 στελέχη του του *A. rhizogenes*, ενώ αντίθετα δεν κατέστη εφικτή η ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* στις ρίζες των φυτών αγρίου τύπου, τα οποία συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για τον έλεγχο του μετασχηματισμού. Η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* που βρίσκεται στην T-DNA του *A. rhizogenes* (423 bp). M: DNA Ladder (FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH). 1: ρίζες που προέρχονται από σπορόφυτα αγρίου τύπου (μη-μετασχηματισμένα). 2, 3, 4: νεοεκπυσσόμενες ρίζες που προέκυψαν έπειτα από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*. 5, 6, 7: νεοεκπυσσόμενες ρίζες που προέκυψαν έπειτα από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος *Arqua*. Η ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* (423 bp) σε όλα τα δείγματα ριζών που προέρχονταν από μετασχηματισμένα σπορόφυτα και η ταυτόχρονη αδυναμία ενίσχυσης του προϊόντος στις ρίζες αγρίου τύπου, επιβεβαιώνουν τη διαγονιδιακή φύση των μετασχηματισμένων ριζών.

Αναφορικά με την περιοχή *virCD* του *A. rhizogenes*, τα ευρήματα κατέδειξαν την αδυναμία ενίσχυσης του προϊόντος, με τη χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών, υποδηλώνοντας την απουσία βακτηριακού DNA στις ρίζες των μετασχηματισμένων φυτών. Όπως αναμενόταν, η ενίσχυση της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* κατέστη εφικτή αποκλειστικά στα βακτηριακά κύτταρα του *A. rhizogenes* που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ενίσχυσης του σχετικού PCR προϊόντος.

Συνολικά, τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν την απουσία υπολλειμμάτων βακτηρίων στις ρίζες που αναπτύχθηκαν παρουσία σεφοταξίμης, επιβεβαιώνοντας ταυτόχρονα τη διαγονιδιακή φύση των ριζών που σχηματίστηκαν ως αποτέλεσμα του εμβολιασμού με τα βακτηριακά στελέχη του *A. rhizogenes* (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για τον έλεγχο του μετασχηματισμού. Η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινήτων για την ενίσχυση της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* (1074 bp). M: DNA Ladder (FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH). 1: ρίζες που προέρχονται από σπορόφυτα αγρίου τύπου (μη-μετασχηματισμένα). 2: νεοεκπυσσόμενες ρίζες που προέκυψαν έπειτα από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*. 3: νεοεκπυσσόμενες ρίζες που προέκυψαν έπειτα από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος *Arqua*. 4: Κύτταρα του βακτηριακού στελέχους *R1000* του *A. rhizogenes*. 5: Κύτταρα του βακτηριακού στελέχους *Arqua* του *A. rhizogenes*. Η αδυναμία ενίσχυσης της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* στις ρίζες των φυτών αγρίου τύπου και των μετασχηματισμένων φυτών, και η αποκλειστική ενίσχυση στα βακτηριακά κύτταρα που αποτέλεσαν το εμβόλιο για το μετασχηματισμό, υπογραμμίζουν την απουσία βακτηριακού DNA στις νεοεκπυσσόμενες ρίζες, υποδηλώνοντας τη διαγονιδιακή φύση των μετασχηματισμένων ριζών.

3.3 Αλληλεπίδραση βακτηριακού στελέχους και πρωτοκόλλου

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη δυνατότητα μετασχηματισμού της αλθέας με το βακτήριο *A. rhizogenes* για την ανάπτυξη σύνθετων σποροφύτων, αποτελούμενων από υπέργειο μέρος αγρίου τύπου και διαγονιδιακό ριζικό σύστημα, όπως προκύπτει από τα ευρήματα της PCR σχετικά με τη διαγονιδιακή φύση των νεοεκπυσσόμενων ριζών. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι τόσο μεταξύ των βακτηριακών στελεχών όσο και μεταξύ των διαφορετικών πρωτοκόλλων σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές αναφορικά με το χρόνο εμφάνισης των νέων ριζών, το φαινότυπο τους αλλά και τη συχνότητα του μετασχηματισμού.

Αναφορικά με το φαινότυπο των νέων ριζών, που εξάλλου αποτελεί βασικό κριτήριο για την εκτίμηση της συχνότητας μετασχηματισμού, διαπιστώθηκε η σημαντική επίδραση του βακτηριακού στελέχους που χρησιμοποιείται ως εμβόλιο για το μετασχηματισμό. Στο πλαίσιο αυτό, ο χαρακτηριστικός φαινότυπος των θυσσανωδών ριζών με αυξημένη ικανότητα διακλάδωσης, συχνά συνοδευόμενης από πλαγιοτροπική ανάπτυξη, παρατηρήθηκε αποκλειστικά στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *R1000*, ενώ αντίθετα τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Arqua*

δεν ανέπτυξαν ριζικό σύστημα που διακρίνεται φαινοτυπικά από το αντίστοιχο των φυτών αγρίου τύπου. Δεδομένης της αδυναμίας ευχερούς διάκρισης των διαγονιδιακών ριζών στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το *Arqua* -παρά την επιβεβαιωμένη διαγονιδιακή φύση τους-, η συγκριτική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των δύο πρωτοκόλλων ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού κατέστη εφικτή για τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *R1000*.

Πίνακας 3.2 Η επίδραση του στελέχους *R1000* του *Agrobacterium rhizogenes* και των υποστρωμάτων στο χρόνο εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και στην αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού.

Στελέχη <i>A. rhizogenes</i>	Αριθμός εμβολιασμένων έκφυτων		Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών (dpt)		Συχνότητα Μετασχηματισμού (%) ^a		M.O. (S)	PCR - θετικά	
	1 ^b	2	1	2	1	2		1	2
<i>R1000</i>	25	25	14 ± 1	10 ± 1	40	72	56	+	+
<i>Arqua</i>	25	25	16 ± 1	12 ± 1	- ^c	-	-	+	+

^a Ποσοστό μετασχηματισμού (%) = αριθμός έκφυτων φακής που εμφάνισαν ριζικά τριχίδια / συνολικός αριθμός έκφυτων φακής × 100.

^b Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε

^c Αδυναμία εκτίμησης της συχνότητας μετασχηματισμού, λόγω αδυναμίας φαινοτυπικής διάκρισης του ριζικού συστήματος από το αντίστοιχο των φυτών αγρίου τύπου

Μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού με τη χρήση του στελέχους *R1000* (Πίνακας 3.2). Συγκεκριμένα, στο Πρωτόκολλο 1 η συχνότητα μετασχηματισμού κυμάνθηκε σε ποσοστό 40 %, ενώ η εφαρμογή του Πρωτοκόλλου 2, που περιλάμβανε εμπλουτισμό των θρεπτικών μέσων με MES και αυξημένη συγκέντρωση σουκρόζης και ακετοσιριγκόνης, οδήγησε σε σημαντική ενίσχυση της συχνότητας μετασχηματισμού, η οποία ανήλθε σε ποσοστό 72 %. Βάσει των ανωτέρω, προκύπτει ότι η συχνότητα του μετασχηματισμού επηρεάστηκε σημαντικά από τη σύσταση των θρεπτικών μέσων, όπως διαπιστώνεται από τη διαφορετική αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν.

3.4 Προτεινόμενη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα αναδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο του βακτηριακού στελέχους, της σύνθεσης των θρεπτικών μέσων αλλά και της συνδυασμένης επίδρασής τους στην αποτελεσματικότητα του γενετικού μετασχηματισμού στην αλθέα. Περαιτέρω τα ευρήματα, συνδυαστικά, καταδεικνύουν τόσο την υπεροχή του βακτηριακού στελέχους *R1000* όσο και του *Πρωτοκόλλου 2* αναφορικά με την ικανότητα επαγωγής διαγονιδιακών ριζών στο συγκεκριμένο είδος.

Βάσει των συνολικών παραμέτρων που αξιολογήθηκαν στο πλαίσιο βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althea officinalis*, με τη χρήση του βακτηρίου *A. rhizogenes*, προτείνεται ως πλέον αποτελεσματική η χρήση του στελέχους *R1000* και η εφαρμογή του *Πρωτοκόλλου 2*, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3 Αναλυτική μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althea officinalis* με χρήση του στελέχους *R1000* του *A. rhizogenes*.

Ημέρα	Διαδικασία	Θρεπτικό υπόστρωμα
1	Απολύμανση σπόρων & Τοποθέτηση των σπόρων σε υπόστρωμα βλάστησης	MS/Basal salt: 2,15 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 5 g/L
3	Προετοιμασία των βακτηριακών καλλιεργειών που αποτελούν το εμβόλιο για το μετασχηματισμό	LB, προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών επιλογής
	Προετοιμασία του εμβολίου για το μετασχηματισμό	MS/MES/vit: 4,9 g/L Sucrose: 30 g/L Ακετοσυριγκόνη: 150 μM
7	Μετασχηματισμός με το βακτηριακό στέλεχος <i>R1000</i> του <i>A. rhizogenes</i> & Τοποθέτηση των εκφύτων σε υπόστρωμα συν-καλλιέργειας	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 8 g/L Ακετοσυριγκόνη: 1500 μL/L

9	Μεταφορά των εκφύτων σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 30 g/L Agar: 8 g/L Σεφοταξίμη: 1000 µL/L
23	Μεταφορά σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 30 g/L Agar: 8 g/L Σεφοταξίμη: 1000 µL/L
40	Εκτίμηση της συχνότητας του μετασχηματισμού & Έλεγχος για την ένθεση και έκφραση των διαγονιδίων	PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φαρμακευτικά φυτά, από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης καθημερινότητας με τη μορφή φαρμάκων, καλλυντικών και συμπληρωμάτων διατροφής. Οι ευεργετικές τους ιδιότητες, που οφείλονται στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, τα καθιστούν ιδιαίτερα δημοφιλή στο καταναλωτικό κοινό, με αποτέλεσμα τη ραγδαία αύξηση στη ζήτησή τους *per se* ή/και των προϊόντων που παράγουν και αξιοποιούνται για ποικίλες χρήσεις (Rahmat and Kang, 2019). Στα φαρμακευτικά φυτά ευρείας χρήσης ανήκει και η αλθέα ή δενδρομολόχα, στη ρίζα της οποίας εντοπίζονται αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες με σημαντική φαρμακευτική δράση. Λόγω του βιοχημικού της προφίλ, η αλθέα αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον είδος, με τις ιδιότητες που φέρουν οι ρίζες να εκτείνονται από αντιμικροβιακή, αντιική, αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη έως και καταπραϋντική και αντιβηχική δράση (Naseri *et al.*, 2021).

Σε ευθυγράμμιση με την πλειοψηφία των φαρμακευτικών φυτών, η αλθέα στη φύση χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών καθώς και υποβαθμισμένη ποιότητα αυτών, με αποτέλεσμα την αδυναμία επαρκούς κάλυψης της αγοράς (Shakya, 2016). Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με τη δυστροπία που παρουσιάζουν τα φαρμακευτικά είδη, συμπεριλαμβανομένης της αλθέας, ως προς την καλλιέργειά τους, αναπόφευκτα καθιστούν αναγκαία την υιοθέτηση πιο δραστικών και καινοτόμων στρατηγικών για ταχεία και αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Στοχεύοντας στην παραγωγή ωφέλιμων φυτικών βιοδραστικών ενώσεων, τα τελευταία χρόνια οι προσεγγίσεις της μοριακής βελτίωσης, και δη αυτές της γενετικής μηχανικής, φέρουν συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι των αντίστοιχων συμβατικών μεθόδων (Rahmat and Kang, 2019).

Η μοριακή βελτίωση των φαρμακευτικών φυτών για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών παρουσιάζει μακρά ιστορία, με τις δύο συνηθέστερες μεθόδους που αξιοποιούνται να αφορούν στην *in vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών και στη γενετική τροποποίηση, κατά κανόνα με τη χρήση του αγροβακτήριου ως φορέα για την ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα των γονιδίων ενδιαφέροντος. Μέχρις στιγμής, απαριθμούνται πολλές εφαρμογές και των δύο μεθόδων σε μια πληθώρα φαρμακευτικών φυτών με μεγάλα ποσοστά επιτυχίας στην αύξηση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Sarkar *et al.*, 2018; Zebarjadi *et al.*, 2018; Babich *et al.*,

2020; Halder *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2022), με τη δεύτερη ωστόσο να προσφέρει δυνατότητες ταχύτερης και μεγαλύτερης παραγωγής βιομάζας που ταυτόχρονα φέρει παρόμοια ή μεγαλύτερη συγκέντρωση δευτερογενών μεταβολιτών (Halder *et al.*, 2021).

Στην κατηγορία των προσεγγίσεων της γενετικής μηχανικής, ο μετασχηματισμός με τη μεσολάβηση του *A. rhizogenes* αποτελεί την πλέον ελκυστική μέθοδο για παραγωγή πολύτιμων βιοδραστικών ενώσεων. Τα φυτά που προκύπτουν συνθέτουν στις διαγονιδιακές ρίζες τόσο τους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγουν ενδογενώς οι ρίζες αγρίου τύπου όσο και νέα βιοενεργά συστατικά, με τις ποσότητες αυτών συνηθέστατα να είναι εμφανώς αυξημένες (Hussain *et al.*, 2022). Η αποτελεσματικότητα της ταχείας επαγωγής διαγονιδιακών ριζών για την παραγωγή και απομόνωση ουσιών ενδιαφέροντος έχει αποδειχθεί σε περισσότερα από εκατό διαφορετικά είδη φαρμακευτικών φυτών (Chashmi *et al.*, 2010; Mahesh & Jeyachandran, 2011; Tusevski *et al.* 2017; Sarkar *et al.*, 2018), συμπεριλαμβανομένης και της αλθέας, για την οποία ωστόσο οι σχετικές αναφορές είναι σαφώς περιορισμένες (Ionkova 1992; Drake *et al.* 2013; Tavassoli & Safipour Afshar, 2018).

Λαμβάνοντας υπόψη αφενός μεν το σύνολο των θεραπευτικών δράσεων της αλθέας και αφετέρου το γεγονός ότι ως είδος δεν έχει τύχει συστηματικής έρευνας σχετικά με την ανάπτυξη πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού, αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου μετασχηματισμού μέσω του *Agrobacterium rhizogenes* με στόχο την ταχεία και αποτελεσματική ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών. Απώτερο σκοπό αποτελεί η επαγωγή διαγονιδιακών ριζών, οι οποίες είναι δυνητικά αξιοποιήσιμες σε διαδικασίες εξαγωγής δευτερογενών μεταβολιτών με βιοδραστικές ιδιότητες. Στο πλαίσιο βελτιστοποίησης του γενετικού μετασχηματισμού της αλθέας, αξιολογήθηκαν δύο διαφορετικά βακτηριακά στελέχη του *A. rhizogenes*, τα *R1000* και *Arqua*, και δύο πρωτόκολλα που διέφεραν ως προς τη σύσταση του μέσου εμβολιασμού και των θρεπτικών υποστρωμάτων βλάστησης, συγκαλλιέργειας και επαγωγής ριζών.

Τα συνολικά ευρήματα της μελέτης κατέδειξαν την επίδραση τόσο του βακτηριακού στελέχους όσο και της σύστασης των θρεπτικών μέσων, αλλά και της συνδυασμένης δράσης αυτών στην αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού στην αλθέα. Ως προς τη σύσταση των θρεπτικών μέσων, τα ευρήματα υπογραμμίζουν την προηγμένη αποτελεσματικότητα του Πρωτοκόλλου 2, το οποίο περιλάμβανε

υψηλότερη συγκέντρωση σουκρόζης και ακετοσυρινγκόνης αλλά και την παρουσία του ρυθμιστή MES. Ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού, η χρήση του *Πρωτοκόλλου 2*, σε συνδυασμό με τον εμβολιασμό των εκφύτων με στέλεχος *R1000*, οδήγησε σε αυξημένο αριθμό φυτών που σχημάτισαν διαγονιδιακές ρίζες στην περιοχή του υποκοτυλίου. Αναφορικά με τη σουκρόζη, αφορά σε δισακχαρίτη και είναι ευρέως γνωστό ότι υποστηρίζει την ανάπτυξη του *Agrobacterium* (Leth & McDonald, 2017). Σε συμφωνία με τα ευρήματα της μελέτης, η συγκέντρωση της σουκρόζης σε ποσοστό 3 % στο υπόστρωμα ριζοβολίας έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί την παραγωγή βιομάζας και σε άλλα είδη, όπως η ίσατις η βαφική ή κρητίδα (*Isatis tinctoria* L.) (Gai *et al.*, 2015).

Περαιτέρω, η παρατηρηθείσα θετική επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης ακετοσυρινγκόνης στη συχνότητα του μετασχηματισμού συνάδει με προηγούμενες αναφορές σχετικά με τη δράση της ως μέσου ενίσχυσης του μετασχηματισμού και παράλληλης μείωσης του απαιτούμενου χρόνου για την εμφάνιση ριζικών τριχιδίων σε διάφορα φυτικά είδη (Saranya Krishnan & Siril, 2016; Niazian *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020). Από χημική άποψη, η ακετοσυρινγκόνη είναι μια φαινολική ένωση που απαντάται στη φύση, γνωστή για την ικανότητα επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων *vir* του *Agrobacterium*, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούνται έπειτα από ανίχνευση φαινολικών ενώσεων τραυματισμένων ιστών (Stachel *et al.*, 1985). Συγκεκριμένα, η κυτταροπλασματική απόκριση στις φαινολικές ενώσεις του τραυματισμένου φυτού υπόκειται σε ρύθμιση από την πρωτεΐνη VirG, η οποία ακολούθως επάγει την ενεργοποίηση όλων των *vir* γονιδίων (Tzfira and Citovsky, 2000) και προάγει τη μεταφορά του Ri T-DNA στα φυτικά κύτταρα, βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα του γενετικού μετασχηματισμού (Du *et al.*, 2022).

Επιπλέον, η αυξημένη συχνότητα μετασχηματισμού στο *Πρωτόκολλο 2* αποδίδεται εν μέρει στη θετική επίδραση του MES, κοινή ονομασία για την ένωση 2-αιθανοσουλφονικό οξύ. Ως προς τη δράση, το MES αποτελεί συνθετικό ρυθμιστή που χρησιμοποιείται ευρέως στις καλλιέργειες φυτικών κυττάρων καθώς λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας που εξισορροπεί το pH των θρεπτικών υποστρωμάτων, ενισχύοντας έμμεσα την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού που προκαλείται από φορείς του γένους *Agrobacterium* (Iwakawa *et al.*, 2021).

Περαιτέρω, καθοριστική ως προς την επιτυχία του μετασχηματισμού ήταν και η επίδραση του βακτηριακού στελέχους που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των σποροφύτων αλθέας, όπως προέκυψε από τον χρόνο έπτυξης ριζών στο σημείο

εμβολιασμού αλλά και από την ικανότητα έκπτυξης φαινοτυπικά διακριτών διαγονιδιακά ριζών. Ειδικότερα, το στέλεχος *R1000* αναδείχθηκε ως το πλέον αποτελεσματικό στην επαγωγή ριζικών τριχιδίων, οδηγώντας στην έκπτυξη ορατά διακριτών διαγονιδιακά ριζών, συγκριτικά με το στέλεχος *Arqua* του οποίου οι ρίζες, αν και διαγονιδιακές, φαινοτυπικά δε διακρίνονταν σαφώς από τις αντίστοιχες αγρίου τύπου. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές σχετικά με την ικανότητα των βακτηριακών στελεχών του *A. rhizogenes* για επαγωγή ριζικών τριχιδίων σε φαρμακευτικά φυτά. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Arqua* έχει αναδειχθεί ως ικανό να μετασχηματίζει τα είδη *Lycium ruthenicum*, *Lycium barbarum* και *Glycyrrhiza uralensis* (Chahel, 2019; Chahel et al., 2019), ενώ το *R1000* έχει μετασχηματίσει με μεγάλη επιτυχία τα είδη *Artemisia vulgaris* (Sujatha et al., 2013), *Withania somnifera* (Thilip et al., 2015), *Astragalus membranaceus*, *Gentiana macrophylla* και *Eruca sativa* (Xue et al., 2008). Η υψηλή αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού του στελέχους *R1000* αποδίδεται στην υψηλή εγγενή ικανότητα του πλασμιδίου Ri του *R1000* για μεταφορά του Ri T-DNA στα κύτταρα ξενιστές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης (Mariashibu et al., 2013). Παρά τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών *per se* ως προς την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού, αξίζει να σημειωθεί και η αλληλεπίδρασή τους, ειδικότερα του *R1000*, με το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο μετασχηματισμού. Στο επίπεδο αυτό, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού, με τα Πρωτόκολλα 1 και 2 να επιφέρουν συχνότητα μετασχηματισμού που κυμάνθηκε σε ποσοστό 40 % και 72 %, αντίστοιχα. Βάσει των ανωτέρω, προκύπτει ότι ο εμπλουτισμός των θρεπτικών μέσων με MES, αυξημένη συγκέντρωση σουκρόζης και ακετοσιριγκόνης, συμβάλλει καθοριστικά στην ενίσχυση της συχνότητας μετασχηματισμού.

Αξιοσημείωστη είναι, επίσης, η ύπαρξη σημαντικών διαφορών σε επίπεδο φαινοτύπου, τόσο μεταξύ των διαγονιδιακών ριζών που προκλήθηκαν από τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη όσο και μεταξύ των διαγονιδιακών ριζών και των ριζών αγρίου τύπου, με τις διαφορές να αφορούν τόσο στη δομή όσο και στο ρυθμό ανάπτυξης των ριζών. Ειδικότερα, τα μη-μετασχηματισμένα φυτά εμφάνισαν ριζικό σύστημα αγρίου τύπου, απαλλαγμένου από το σχηματισμό ριζικών τριχιδίων. Στα εμβολιασμένα φυτά, ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος που αξιοποιήθηκε ως εμβόλιο στο μετασχηματισμό, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές αναφορικά με τη μορφολογία των διαγονιδιακών ριζών. Το στέλεχος *R1000* οδήγησε στο σχηματισμό

κάλου και την έκπτυξη μακριών προεκτάσεων ριζικών τριχιδίων στην εγγύτατη περιοχή του υποκοτυλίου, ενώ το στέλεχος *Arqua* προκάλεσε την έκπτυξη ριζών που φαινοτυπικά δε διέφεραν με αυτές των μη μετασχηματισμένων φυτών. Ωστόσο, ανεξάρτητα τον φαινότυπο η διαγονιδιακή φύση των ριζικών τριχιδίων επιβεβαιώθηκε και για τα δύο βακτηριακά στελέχη. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω της επιτυχούς ένθεσης -διαμέσου μέσω του Ri-T-DNA- του γονιδίου *rolB2*, το οποίο κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην επαγωγή ριζικών τριχιδίων. Το *A. rhizogenes* έχει την ικανότητα να μεταφέρει δύο ανεξάρτητα T-DNA, τα TL-DNA και TR-DNA, στο γονιδίωμα του φυτού ξενιστή, με το πρώτο - που φέρει τα γονίδια *rolA*, *rolB*, *rolC* και *rolD* - να αποτελεί προϋπόθεση για τον σχηματισμό ριζικών τριχιδίων (Faraz *et al.*, 2020). Επιπλέον, η ταυτόχρονη απουσία της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* στα ριζικά τριχίδια των εμβολιασμένων φυτών, αποτελεί απόδειξη του επιτυχή μετασχηματισμού και της αποτελεσματικότητας του εφαρμοζόμενου πρωτοκόλλου. Παρά το γεγονός ότι τα ριζικά τριχίδια δεν επιλέχθηκαν βάσει της πλέον χρησιμοποιούμενης επιλογής σε αντιβιοτικά, τα συνολικά ευρήματα της μελέτης προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες και θέτουν τη βάση για περαιτέρω βελτίωση του πρωτοκόλλου με στόχο την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς του στην επαγωγή διαγονιδιακών ριζών στην αλθέα. Η εξέλιξη αυτή αδιαμφισβήτητα θα προσφέρει σημαντικές προοπτικές αξιοποίησης των διαγονιδιακών ριζών για παραγωγή και απομόνωση βιοδραστικών συστατικών αξιοποιήσιμων στη φαρμακοβιομηχανία και σε ποσότητες που απαντούν - ποσοτικά και ποιοτικά - στις ανάγκες της αγοράς. Προς την κατεύθυνση αυτή, περαιτέρω θετικά θα δράσει προφανώς και η μελλοντική κλιμάκωση της παραγωγής σε βιοαντιδραστήρες που επιτρέπουν την ταχεία και ανεξάρτητη από τις κλιματικές συνθήκες παραγωγή της απαιτούμενης για τη βιομηχανία ποσότητα βιομάζας.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής υπογραμμίζουν την καταλληλότητα χρήσης του *A. rhizogenes* για το γενετικό μετασχηματισμό και τη δημιουργία διαγονιδιακών ιστών στην αλθέα, προκειμένου να αξιοποιηθεί ως μια πλατφόρμα για την παραγωγή πολύτιμων βιοδραστικών συστατικών. Το πλέον κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος αναδείχθηκε το *R1000* του *A. rhizogenes*, ενώ παράλληλα ιδιαίτερα θετική ήταν η επίδραση του εμπλουτισμού των μέσων με MES και υψηλότερη συγκέντρωση σουκρόζης και ακετοσιρινόνης (*Πρωτόκολλο 2*).

Τα ευρήματα της μελέτης θέτουν τα θεμέλια για περαιτέρω μελέτη και βελτίωση του πρωτοκόλλου με στόχο την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς του στην επαγωγή διαγονιδιακών ριζών στην αλθέα. Επιπλέον, η παρούσα προσέγγιση ανάπτυξης διαγονιδιακών ιστών μπορεί να αξιοποιηθεί και σε πιο πρακτικές εφαρμογές, όπως η αξιοποίησή της για μεγάλης κλίμακας παραγωγή βιοδραστικών συστατικών σε βιοαντιδραστήρες, δημιουργώντας συνθήκες για ταχεία και ανεξάρτητη από τις κλιματικές συνθήκες παραγωγή της απαιτούμενης για τη βιομηχανία ποσότητα βιομάζας. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη εισάγει μία ελκυστική διαδικασία για τη δημιουργία διαγονιδιακών ριζών στην αλθέα, οι οποίες δρουν ως πλατφόρμα για την παραγωγή βιοδραστικών συστατικών αξιοποιήσιμων στη φαρμακοβιομηχανία και σε ποσότητες που απαντούν - ποσοτικά και ποιοτικά - στις ανάγκες της αγοράς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία:

- Akbar, S. (2020). *Althaea officinalis* L. (Malvaceae). In *Handbook of 200 Medicinal Plants* (pp. 235-241). Springer, Cham.
- Amini, M. (2019). Proteomics and Biological Evaluation of Marshmallow (*Althaea officinalis*) Seeds (Doctoral dissertation, Chapman University).
- Argyropoulos, D., Carmody, K., Cogliandro, A., Cortegano, M., Jongh, W., & Paoli, A. (2019). EIP-AGRI Focus Group plant-based medicinal and cosmetic products.
- Awasthi, K., Jain, N., & Srivastva, M. P. (2022). PLANTS AS MEDICINE. *Advances in Microbiology*, 136-143.
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L., & Prosekov, A. (2020). Modern trends in the in vitro production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants. *Molecules*, 25(24), 5805.
- Bettini, P. P., Santangelo, E., Baraldi, R., Rapparini, F., Mosconi, P., Crinò, P., & Mauro, M. L. (2016). *Agrobacterium rhizogenes* rolA gene promotes tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 25(3), 225-233.
- Bussmann, R. W., Batsatsashvili, K., & Kikvidze, Z. (2020). *Althaea nudiflora* Lindl. *Althaea officinalis* L. Malvaceae. *Ethnobotany of the Mountain Regions of Central Asia and Altai*, 1-5.
- Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*, 23(4), 180-185.
- Cardoso, J. C., Oliveira, M. E., & Cardoso, F. D. C. (2019). Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37, 124-132.
- Chahel, A. A. (2019). Ri-mediated genetic transformation in licorice (*glycyrrhiza uralensis*) and *Lycium* species by establishing hairy root cultures (Doctoral dissertation, Lahore College for Women University, Lahore.).
- Chahel, A. A., Zeng, S., Yousaf, Z., Liao, Y., Yang, Z., Wei, X., & Ying, W. (2019). Plant-specific transcription factor LrTCP4 enhances secondary metabolite biosynthesis in *Lycium ruthenicum* hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136, 323-337.
- Chashmi, N. A., Sharifi, M., Karimi, F., & Rahnema, H. (2010). Differential production of tropane alkaloids in hairy roots and in vitro cultured two accessions of *Atropa*

- belladonna* L. under nitrate treatments. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(5-6), 373-379.
- Chen, S. L., Yu, H., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese medicine*, 11(1), 1-10.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2(3), 228-243.
- Dong, L. L., Chen, Z. J., Wang, Y., Wei, F. G., Zhang, L. J., Xu, J., ... & Chen, S. L. (2017). DNA marker-assisted selection of medicinal plants (I). Breeding research of disease-resistant cultivars of *Panax notoginseng*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 42(1), 56-62.
- Drake, P. M., de Moraes Madeira, L., Szeto, T. H., & Ma, J. K. (2013). Transformation of *Althaea officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* for the production of transgenic roots expressing the anti-HIV microbicide cyanovirin-N. *Transgenic research*, 22(6), 1225-1229.
- Du, C., Chai, L. A., Liu, C., Si, Y., & Fan, H. (2022). Improved *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using antibiotics and acetosyringone selection in cucumber. *Plant Biotechnology Reports*, 16(1), 17-27.
- Elkordy, A. A., Haj-Ahmad, R. R., Awaad, A. S., & Zaki, R. M. (2021). An overview on natural product drug formulations from conventional medicines to nanomedicines: Past, present, and future. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102459.
- Fahamiya, N., Shiffa, M., Aslam, M., & Muzn, F. (2016). Unani perspective of Khatmi (*Althaea officinalis*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(6), 357-360.
- Faraz, R., Gokhale, M., & Gothalwa, R. (2020). Hairy Root Culture Through *Agrobacterium rhizogenes* for Enhancement of Secondary Metabolites Production in Medicinal Plants: A Review.
- Gai, Q. Y., Jiao, J., Luo, M., Wei, Z. F., Zu, Y. G., Ma, W., & Fu, Y. J. (2015). Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. *PLoS One*, 10(3), e0119022.
- Gantait, S., Debnath, S., & Ali, N. (2014). Genomic profile of the plants with pharmaceutical value. *3 Biotech*, 4(6), 563-578.
- Ghaseminezhad, K., Zare, M., Lashkarara, S., Yousefzadeh, M., & Aghazadeh Mohandesi, J. (2020). Fabrication of *Althea officinalis* loaded electrospun nanofibrous scaffold for potential application of skin tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(16), 48587.

- Gupta, A., Singh, P. P., Singh, P., Singh, K., Singh, A. V., Singh, S. K., & Kumar, A. (2019). Medicinal Plants Under Climate Change: Impacts on Pharmaceutical Properties of Plants. *Climate Change and Agricultural Ecosystems*, 181-209.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K. M., Ritala, A., & Cardon, F. (2020). Hairy root cultures—a versatile tool with multiple applications. *Frontiers in plant science*, 11, 33.
- Häkkinen, S. T., & Oksman-Caldentey, K. M. (2018). Progress and prospects of hairy root research. In: Srivastava, V., Mehrotra, S., Mishra, S. (eds) *Hairy Roots*. Springer, Singapore.
- Halder, M., Majumder, A., Ray, S., Jha, S. (2021). Medicinal Plant Research at Crossroads: Biotechnological Approaches for Conservation, Production and Stability in Tissue Cultures and Regenerated Plants. In: Ekiert, H.M., Ramawat, K.G., Arora, J. (eds) *Medicinal Plants. Sustainable Development and Biodiversity*, vol 28. Springer, Cham.
- Haq, I. (2004). Safety of medicinal plants. *Pak J Med Res*, 43(4), 203-210.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635.
- Hussain, M. J., Abbas, Y., Nazli, N., Fatima, S., Drouet, S., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2022). Root cultures, a boon for the production of valuable compounds: A comparative review. *Plants*, 11(3), 439.
- Ionkova, I. (1992). Alternative ways for the production of biologically active substances from *Althaea officinalis*, var. Russalka. *Dokladi na B lgarskata akademiâ na naukite*, 45(9), 137-140.
- Iwakawa, H., Melkonian, K., Schlüter, T., Jeon, H. W., Nishihama, R., Motose, H., & Nakagami, H. (2021). Agrobacterium-mediated transient transformation of *Marchantia* liverworts. *Plant and Cell Physiology*, 62(11), 1718-1727.
- Khan, M. Y., Aliabbas, S., Kumar, V., & Rajkumar, S. (2009). Recent advances in medicinal plant biotechnology.
- Khan, S. A., Siddiqui, M. H., & Osama, K. (2018). Bioreactors for hairy roots culture: A Review. *Current Biotechnology*, 7(6), 417-427.
- Kianitalaei, A., Feyzabadi, Z., Hamed, S., & Qaraaty, M. (2019). *Althaea Officinalis* in Traditional Medicine and modern phytotherapy. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 9(S2), 155.

- Kumari, P., Luqman, S., & Meena, A. (2019). Application of the combinatorial approaches of medicinal and aromatic plants with nanotechnology and its impacts on healthcare. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(1), 475-489.
- Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M., & Sala, F. (2004). Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant science*, 167(4), 725-731.
- Leth, I. K., & McDonald, K. A. (2017). Media development for large scale *Agrobacterium tumefaciens* culture. *Biotechnology Progress*, 33(5), 1218-1225.
- Ma, R., Yu, Z., Cai, Q., Li, H., Dong, Y., Oksman-Caldentey, K. M., & Rischer, H. (2020). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the medicinal plant *Veratrum dahuricum*. *Plants*, 9(2), 191.
- Mahboubi, M. (2020). Marshmallow (*Althaea officinalis* L.) and its potency in the treatment of cough. *Complementary medicine research*, 27(3), 174-183.
- Mahesh, A., & Jeyachandran, R. (2011). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root induction in *Taraxacum officinale* and analysis of sesquiterpene lactones. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 145(3), 620–626.
- Mariashibu, T. S., Subramanyam, K., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Theboral, J., ... & Ganapathi, A. (2013). Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 41-54.
- Marieschi, M., Torelli, A., Poli, F., Sacchetti, G., & Bruni, R. (2009). RAPD-based method for the quality control of Mediterranean oregano and its contribution to pharmacognostic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1835-1840.
- Martvall, A., & Lindberg, K. (2022). Promotion of herbal medicines as a sustainable development strategy.
- Mascléf, A. (1891). Atlas des plantes de France utiles, nuisibles et ornementales: 400 planches coloriées représentant 450 plantes communes, avec de nombreuses fig. de détail et un texte explicatif des propriétés des plantes, de leurs usages et applications en médecine, agriculture, horticulture, dans l'industrie, l'économie domestique etc.. (Vol. 1). Klincksieck.
- McRae, J., Yang, Q., Crawford, R., & Palombo, E. (2007). Review of the methods used for isolating pharmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants. *The Environmentalist*, 27(1), 165-174.
- Möller, J., Kelber, O., & Nieber, K. (2019). Marshmallow root: A medicinal plant with a great tradition. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 40(S 01), V19.

Mousavi, S. F., Razavi, S. M., & Koocheki, A. (2019). Marshmallow (*Althaea officinalis*) Flower Gum. In: *Emerging Natural Hydrocolloids: Rheology and Functions* (Ed. Razavi, S. M. A.), 397.

Naseri, V., Chavoshzadeh, Z., Mizani, A., Daneshfard, B., Ghaffari, F., Abbas-Mohammadi, M., ... & Naseri, M. (2021). Effect of topical marshmallow (*Althaea officinalis*) on atopic dermatitis in children: A pilot double-blind active-controlled clinical trial of an in-silico-analyzed phytomedicine. *Phytotherapy Research*, 35(3), 1389-1398.

Naveed, A., Pervaiz, A. S., Tariq, S., & Khalil, A. (2011). Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5662-5666.

Niazian, M. (2019). Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249(4), 953-973.

Niazian, M., Sadat-Noori, S. A., Tohidfar, M., Galuszka, P., & Mortazavian, S. M. M. (2019). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague): an important industrial medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 132, 29-40.

Park, Y. J., Kim, N. S., Sathasivam, R., Chung, Y. S., & Park, S. U. (2022). Impact of copper treatment on phenylpropanoid biosynthesis in adventitious root culture of *Althaea officinalis* L. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52(3), 283-291.

Piszczyk, P., Kuszewska, K., Błaszowski, J., Sochacka-Obruśnik, A., Stojakowska, A., & Zubek, S. (2019). Associations between root-inhabiting fungi and 40 species of medicinal plants with potential applications in the pharmaceutical and biotechnological industries. *Applied Soil Ecology*, 137, 69-77.

Pourmohammad, A. (2013). Application of molecular markers in medicinal plant studies. *Acta Univ. Sapientiae, Agric Environ*, 5(1), 80-90.

Rahmat, E., & Kang, Y. (2019). Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *Journal of Plant Biotechnology*, 46(3), 143-157.

Rawat, J. M., Bhandari, A., Raturi, M., & Rawat, B. (2019). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root cultures: a promising approach for production of useful metabolites. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 103-118). Elsevier.

Rohini, M. R. (2020). Biotechnological interventions for conservation and multiplication of threatened medicinal plants. In *Conservation and Utilization of Threatened Medicinal Plants* (pp. 135-158). Springer, Cham.

Roychowdhury, D., Majumder, A., Jha, S. (2013). *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges. In: Chandra,

S., LATA, H., Varma, A. (eds) *Biotechnology for Medicinal Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Saranya Krishnan, S. R., & Siril, E. A. (2016). Induction of hairy roots and over production of anthraquinones in *Oldenlandia umbellata* L.: a dye yielding medicinal plant by using wild type *Agrobacterium rhizogenes* strain. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21, 271-278.

Sarikanat, M., Seki, Y., Sever, K., & Durmuşkahya, C. (2014). Determination of properties of *Althaea officinalis* L. (Marshmallow) fibres as a potential plant fibre in polymeric composite materials. *Composites Part B: Engineering*, 57, 180-186.

Sarkar, S., Ghosh, I., Roychowdhury, D., & Jha, S. (2018). The effects of rol genes of *Agrobacterium rhizogenes* on morphogenesis and secondary metabolite accumulation in medicinal plants. In *Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants* (pp. 27-51). Springer, Singapore.

Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(4), 59-64.

Shi, M., Liao, P., Nile, S. H., Georgiev, M. I., & Kai, G. (2021). Biotechnological exploration of transformed root culture for value-added products. *Trends in Biotechnology*, 39(2), 137-149.

Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C., & Schell, J. S. (1987). Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *The EMBO journal*, 6(13), 3891-3899.

Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(6047), 624-629.

Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Čalić, D., Flamini, G., & Kumari, B. R. (2013). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: hairy root production and essential oil analysis. *Industrial Crops and Products*, 44, 643-652.

Tavassoli, P., & Safipour Afshar, A. (2018). Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *3 Biotech*, 8(8), 1-8.

Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37(3), 959-967.

Thilip, C., Soundar Raju, C., Varutharaju, K., Aslam, A., & Shajahan, A. (2015). Improved *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root culture system of *Withania somnifera* (L.) Dunal using sonication and heat treatment. *3 Biotech*, 5, 949-956.

Tusevski, O., Vinterhalter, B., Krstić Milošević, D., Soković, M., Ćirić, A., Vinterhalter, D., ... & Gadzovska Simic, S. (2017). Production of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities in hairy root and shoot cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3), 589-605.

Tzfira, T., & Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*–plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology*, 1(4), 201-212.

Wang, W., Xu, J., Fang, H., Li, Z., & Li, M. (2020). Advances and challenges in medicinal plant breeding. *Plant Science*, 298, 110573.

White, F. F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of bacteriology*, 164(1), 33-44.

Xue, S. H., Luo, X. J., Wu, Z. H., Zhang, H. L., & Wang, X. Y. (2008). Cold storage and cryopreservation of hairy root cultures of medicinal plant *Eruca sativa* Mill., *Astragalus membranaceus* and *Gentiana macrophylla* Pall. *Plant cell, tissue and organ culture*, 92, 251-260.

Younesikelaki, F. S., Ebrahimzadeh, M. H., Desfardi, M. K., Banala, M., Marka, R., & Nanna, R. S. (2016). Optimization of seed surface sterilization method and in vitro seed germination in *Althaea officinalis* (L.)-an important medicinal herb. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(28), 1-6.

Zebarjadi, A., Dianatkhah, S., Mohammadi, P. P., & Qaderi, A. (2018). Influence of abiotic elicitors on improvement production of artemisinin in cell culture of *Artemisia annua* L. *Cellular and Molecular Biology*, 64(9), 1-5.

Ελληνική Βιβλιογραφία:

Τσαντάρης Α. Νιάνιου-Ομπεϊντάτ Ε. Πολύδωρος Α. (2012), Βελτίωση Φυτών, Σύγχρονη Παιδεία.

Τσαντάρης Α. 1995. Βελτίωση Φυτών Αρχές και Μέθοδοι. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία:

<https://www.pharmasaat.de>

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