



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στο είδος *Inula helenium* L.: πλατφόρμα
για παραγωγή βιοδραστικών συστατικών**



ΛΑΜΠΡΙΑΝΙΔΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Π.Θ

ΒΟΛΟΣ 2023

Ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στο είδος *Inula helenium* L.: πλατφόρμα για παραγωγή βιοδραστικών συστατικών

Development of transgenic roots in *Inula helenium* L.: platform for production of bioactive compounds

ΛΑΜΠΡΙΑΝΙΔΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

Στους καταπληκτικούς παππούδες μου,

Αναστάσιο και Θεόδωρο

Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακή Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, Ουρανία Παυλή, επιβλέπουσα της πτυχιακής εργασίας μου για την καθοδήγηση της όλο αυτό το διάστημα, την πίστη της στις ικανότητές μου, την εκμάθηση των απαραίτητων μεθόδων που χρειάστηκε να ακολουθήσω και την κριτική ανάγνωση του κειμένου. Η ορθότητα της επιλογής μου, να εκπονήσω την πτυχιακή μου στο εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, επιβεβαιώνεται μέχρι και σήμερα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ευαγγελία Παναγιωτάκη, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, καθώς και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Τούμπου για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη τους, την προθυμία, την υπομονή και την συνολική τους συμβολή σε όλα τα στάδια του πειράματός μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην αδερφή μου Νένα και στους γονείς μου, Φωτεινή και Πέτρο, που συνεχίζουν να με υποστηρίζουν και να πιστεύουν σε εμένα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου που δε σταμάτησαν να με ενθαρρύνουν όλον αυτόν τον καιρό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεγάλη ομάδα των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών διαχρονικά κερδίζει το ενδιαφέρον, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο, με γνώμονα την αξιοποίηση των βιολογικών ιδιοτήτων τους για την κάλυψη ποικίλων αναγκών του ανθρώπου. Είναι πλέον ευρέως γνωστό ότι τα εν λόγω είδη αποτελούν σημαντική πηγή θρεπτικών και βιοδραστικών συστατικών, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα προς αξιοποίηση σε ένα εύρος εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής φαρμάκων, καλλυντικών ή/και συμπληρωμάτων διατροφής. Απόρροια των ανωτέρω αποτελεί η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση των φαρμακευτικών ειδών, η οποία σαφώς δεν καλύπτεται από τους ενδημικούς πληθυσμούς και την υφιστάμενη καλλιέργεια, η οποία περιορίζεται σε ελάχιστα είδη φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Το είδος Ίνουλα, με επιστημονική ονομασία *Inula helenium*, συγκαταλέγεται στα φαρμακευτικά είδη, κυρίως λόγω της περιεκτικότητας των ριζών σε συστατικά με υψηλό βιοδραστικό δυναμικό, όπως η ελενίνη και η ινουλίνη, που εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη και καταπραϋντική δράση. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *I. helenium* με στόχο τη δημιουργία σύνθετων σποροφύτων, αποτελούμενων από διαγονιδιακό ριζικό σύστημα και αγρίου τύπου υπέργειο μέρος. Απώτερο σκοπό αποτελεί η αύξηση της βιομάζας των ριζών, ως μέσου παραγωγής μεγαλύτερης ποσότητας βιοδραστικών συστατικών. Για το γενετικό μετασχηματισμό αξιοποιήθηκε το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* και ειδικότερα τα στελέχη *Arqua* και *R1000*, ενώ ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα ηλικίας μία εβδομάδας, τα οποία εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια στην περιοχή του υποκοτυλίου. Παρά το γεγονός ότι και τα δύο στελέχη οδήγησαν στην ανάπτυξη σύνθετων σποροφύτων, τα αποτελέσματα κατέδειξαν την υπεροχή του βακτηριακού στελέχους *R1000*, η οποία εκφράστηκε μέσω της αναγέννησης ριζών με το χαρακτηριστικό φαινότυπο των θυσσανωδών ριζών, την αυξημένη βιομάζα αυτών καθώς και την υψηλότερη συχνότητα μετασχηματισμού. Αντίθετα, το στέλεχος *Arqua* επέτρεψε την αναγέννηση διαγονιδιακών ριζών, οι οποίες φαινοτυπικά ωστόσο δεν διακρίνονταν σαφώς από τις ρίζες των φυτών αγρίου τύπου. Για τον έλεγχο της διαγονιδιακής φύσης των ριζών πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR, βάσει των οποίων επιβεβαιώθηκε η επιτυχής ένθεση του γονιδίου *rolB2* και η ταυτόχρονη απουσία της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes*. Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης υπογραμμίζουν την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού τους είδους *Inula helenium*, μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*, προσφέροντας την ανάπτυξη διαγονιδιακού

ριζικού συστήματος, το οποίο δυνητικά μπορεί να αξιοποιηθεί ως πλατφόρμα για την παραγωγή βιοδραστικών συστατικών ενδιαφέροντος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Φαρμακευτικά φυτά	10
1.1.1 Αξία και χρήσεις των φαρμακευτικών φυτών	11
1.1.2 Προοπτικές εμπορικής αξίας των φαρμακευτικών Φυτών	12
1.2 Το είδος <i>Inula helenium</i>	15
1.2.1. Βοτανική περιγραφή	16
1.2.2. Αύξηση και ανάπτυξη	18
1.2.3. Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις	18
1.2.4 Το είδος <i>Inula helenium</i> ως εργοστάσιο παραγωγής βιοδραστικών Ενώσεων	19
1.2.5 Προοπτικές αξιοποίησης του <i>Inula helenium</i>	21
1.2.6 Έρευνες στο είδος	22
1.3. Βελτίωση των φαρμακευτικών φυτών	22
1.3.1 Βελτιωτικοί στόχοι	23
1.3.2 Μοριακοί Δείκτες	23
1.3.3 Γενετική Μηχανική	24
1.3.4 Μετασχηματισμός <i>in vitro</i>	25
1.4 Το <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	30
1.4.1 Το Πλασμίδιο <i>Ri</i>	32
1.4.2 Αναφορές χρήσης <i>A. rhizogenes</i> για μετασχηματισμό άλλων ειδών	34
1.5 Σκοπός της Μελέτης	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 Φυτικό υλικό	37
2.2 Στελέχη του <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και συνθήκες ανάπτυξης	37
2.3 Απολύμανση σπόρων Ίνουλας – Προετοιμασία εκφύτων	38
2.4 Γενετικός μετασχηματισμός σποροφύτων Ίνουλας μέσω του βακτηρίου <i>A. rhizogenes</i>	39
2.5 Αξιολόγηση των μετασχηματισμένων σποροφύτων Ίνουλας	40
2.5.1 Φαινοτυπική αξιολόγηση	40
2.5.2 Έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού μέσω PCR	40
2.5.2.1 Εξαγωγή DNA	41

2.5.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	42
2.5.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
3.1 Ανάπτυξη του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού της Ίνουλας	43
3.1.1 Χρόνος έκπτυξης ριζών μετά των εμβολιασμό	43
3.1.2 Αξιολόγηση φαινοτύπου του διαγονιδιακού ριζικού συστήματος	44
3.2 Επιβεβαίωση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων την αναπτυγμένων φυτών	47
3.3 Αλληλεπίδραση βακτηριακού στελέχους	49
3.4 Προτεινόμενη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού με το βακτηριακό στέλεχος <i>R1000</i>	50
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φαρμακευτικά φυτά

Είναι γνωστό ότι, από τις απαρχές της ανθρώπινης ύπαρξης, τα φυτικά προϊόντα αποτέλεσαν τη θεμέλια βάση για την κάλυψη των αναγκών του ανθρώπου, με έμφαση αρχικά αυτών της διατροφής (Petrovska, 2012). Με το πέρασμα των χρόνων, χάρη στην ανθρώπινη περιέργεια και παρατήρηση, διαπιστώθηκε πως ορισμένα φυτικά είδη έχουν την ικανότητα να καταπραΰνουν, να ηρεμούν, ακόμα και να θεραπεύουν (Shakya, 2016). Πλέον, είναι ευρέως αποδεκτό ότι τα φυτά οφείλουν τις βιοδραστικές ιδιότητές τους στην ικανότητα σύνθεσης χημικών ενώσεων που εμπλέκονται σε σημαντικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, όπως αυτές της άμυνας. Απόρροια των ανωτέρω, αποτελεί το γεγονός ότι ένα μεγάλο εύρος φυτικών ειδών χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα και διαχρονικά τόσο σε παραδοσιακές πρακτικές της φαρμακευτικής όσο και στη σημερινή εξειδικευμένη φαρμακοβιομηχανία (Gershenzon και Ullah, 2022). Ως φαρμακευτικά φυτά ορίζονται οι φυτικοί οργανισμοί που διαθέτουν θεραπευτικές ιδιότητες, για τις οποίες αξιοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία φαρμάκων (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Παραδείγματα Φαρμακευτικών Φυτών (Πηγή: Vortex)

1.1.1 Αξία και χρήσεις των φαρμακευτικών φυτών

Σύμφωνα με τους Σουμέριους, οι οποίοι κατέγραψαν μερικά από τα αρχαιότερα σχετικά ιστορικά δεδομένα, από το 5000 π.Χ. είχε ήδη ανακαλυφθεί πληθώρα φαρμακευτικών φυτών (Kelly,2009). Συγκεκριμένα, ο αυτοκράτορας Shen Nung, περί το 2500 π.Χ., αναφέρει πως υπήρχαν περίπου 365 τμήματα φαρμακευτικών φυτών που χρησιμοποιούνταν για την πρακτική θεραπεία, συμπεριλαμβανομένων των ειδών ρήο (*Rhizoma Rhei*), καμφορά, *Theae folium*, *Podophyllum peltatum*, ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι πολλά εξ' αυτών αξιοποιούνται μέχρι και σήμερα (Wiart,2006). Περίπου το 1550 π.Χ., γράφτηκε ο Πάπυρος Ebers, που περιέχει μια συλλογή 700 ειδών φυτών και φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για θεραπεία ποικίλων παθήσεων και διαταραχών, όπως ρόδι, αλόη, σέννα, σκόρδο, κρεμμύδι, σύκο, κόλιανδρος, άρκευθος κλπ (Tucakov, 1964). Μάλιστα, το 300 π.Χ. χρονολογείται η συγγραφή ενός οδηγού με την ονομασία “*De Historia Plantarum*”, ο οποίος περιλαμβάνει περισσότερα από 500 γνωστά φαρμακευτικά βότανα, από το Θεόφραστο που υπήρξε μαθητής του Αριστοτέλη (Greene και Depew, 2004).

Τον 7ο αιώνα μ.Χ., οι σλαβικοί λαοί χρησιμοποίησαν το είδος *Alium sativum* ως φάρμακο, το *Sambuciflos* ενάντια σε διάφορα έντομα, όπως ψείρες, ψύλλους, σκώρους, κουνούπια και αράχνες, το *Aconitum napellus* ως δηλητήριο στο κυνήγι και τα είδη *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Iris germanica* και *Mentha viridis* για την παρασκευή καλλυντικών (Bojadzievski, 1922). Το έργο των Αγίων Κλήμη και Ναούμ στην Αχρίδα φέρει ιδιαίτερη σημασία για τη Μακεδονία καθώς γίνεται αναφορά στο φαρμακολογικό κώδικα της Νίκαιας που χρονολογείται από το έτος 850. Μέσω αυτών μεταφέρθηκαν αρχικά οι εκτεταμένες γνώσεις τους για τα φαρμακευτικά φυτά στους μαθητές τους και ακολούθως στις μάζες (Celakoski, 1997).

Τα φαρμακευτικά φυτά συνεχίζουν να παίζουν βασικό ρόλο στις μεθόδους θεραπείας και στη φαρμακοβιομηχανία, όπως έχει διαμορφωθεί σήμερα. Έχουν την ικανότητα να συνθέτουν εκατοντάδες χημικές ενώσεις που συμβάλλουν στη ρύθμιση διαφόρων βασικών λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού, συμπεριλαμβανομένης της άμυνας και προστασίας από έντομα, μύκητες, ασθένειες, καθώς και θηλαστικά (Gershenzon και Ullah, 2022). Σύμφωνα δε με αναφορές στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), περισσότερα από 40.000 φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο από επιστήμονες όσο και από το μέσο άνθρωπο στην καθημερινότητά του (Gupta *et al.*, 2019; Piszczek *et al.*, 2019). Σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στις αρχές του 21^{ου} αιώνα, το 3 έως 5 % των ασθενών στις

δυτικές χώρες, το 80 % των αγροτικών πληθυσμών στις αναπτυσσόμενες χώρες και το 85 % των πληθυσμών νότια της Σαχάρας χρησιμοποιούσαν φαρμακευτικά φυτά ως κύρια μορφή θεραπείας (Hanen *et al.*, 2011). Πλέον, η χρήση των εν λόγω φυτών εντάσσεται στην αγωγή για καταπολέμηση προβλημάτων υγείας περίπου του 85 % του ανθρώπινου πληθυσμού παγκοσμίως (Pešić, 2015).

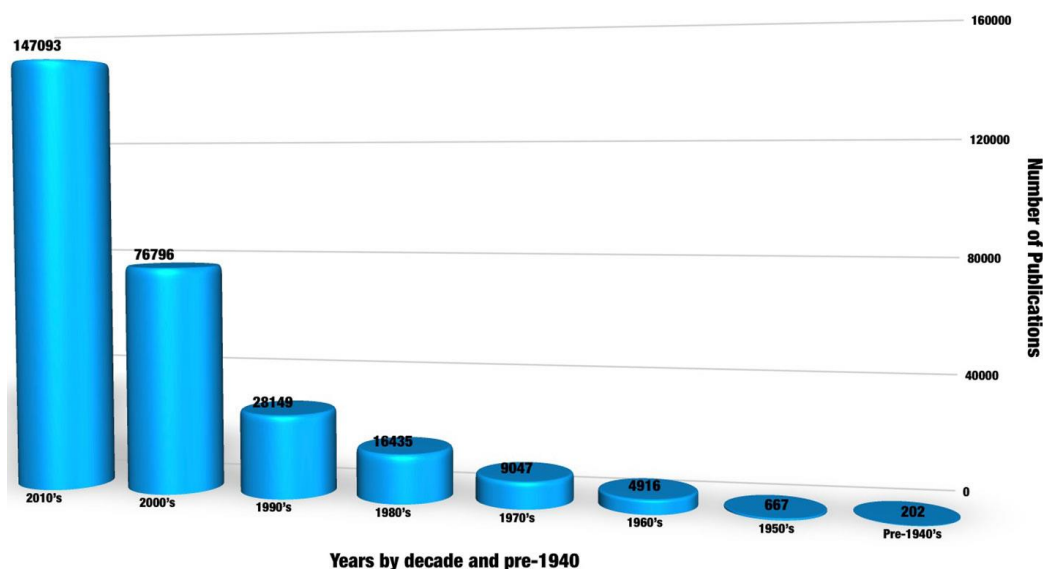
Οι αρχές του 19^{ου} αιώνα αποτέλεσαν θεμελιώδη περίοδο στη γνώση και τη χρήση των φαρμακευτικών φυτών, καθώς την περίοδο αυτή χρονολογείται η ανακάλυψη, τεκμηρίωση και απομόνωση αλκαλοειδών από την παπαρούνα (1806), την *ipecacuanha* και τη στρυχνό (1817), την κινίνη (1820), το ρόδι (1878) και άλλα φυτά. Έπειτα, με την απομόνωση των γλυκοσιδών, σηματοδοτήθηκε η αρχή της επιστημονικής φαρμακευτικής. Με την εξέλιξη των χημικών αναλυτικών μεθόδων, κατέστη εφικτή η ανακάλυψη πρόσθετων δραστικών ουσιών από φαρμακευτικά φυτά, όπως οι τανίνες και σαπωνοσίδες, τα αιθέρια έλαια, οι βιταμίνες, οι ορμόνες κ.λ.π. (Dervendzi, 1992).

1.1.2 Προοπτικές εμπορικής αξιοποίησης των φαρμακευτικών φυτών

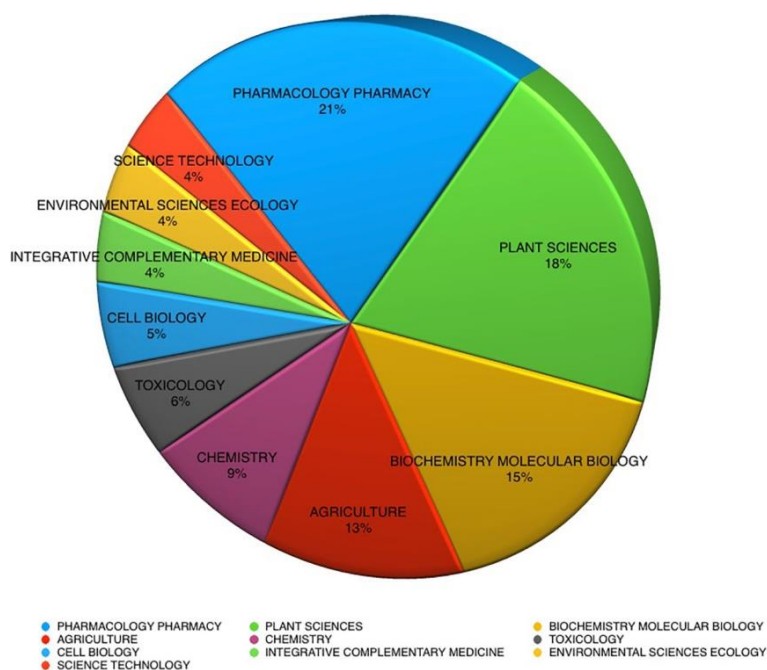
Σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθη στην Κινεζική Ακαδημία Ιατρικής, συμπεριλαμβανόμενων και των βάσεων δεδομένων Web of Science, KCI- Korean Journal, MEDLINE®, Russian Science Citation καθώς και των βάσεων δεδομένων ευρετηρίου SciELOCitation, τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί εντονότατα προς τη συστηματική μελέτη και τις προοπτικές αξιοποίησης των φαρμακευτικών φυτών. Στο επίπεδο αυτό, είναι ενδεικτικό το γεγονός ότι ο αριθμός των σχετικών δημοσιεύσεων έχει σχεδόν τριπλασιαστεί, από 4.686 που ήταν το έτος 2008 να αγγίζουν τις 14.884 το έτος 2018 (Jiang, 2020) (Εικόνα 1.2).

Μεταξύ των επιστημονικών δημοσιεύσεων που αφορούν σε φαρμακευτικά φυτά, η συντριπτική πλειοψηφία άπτεται των τομέων της φαρμακολογίας και της φαρμακευτικής. Συγκεκριμένα, το 69 % αυτών περιλαμβάνει δημοσιεύσεις που εντάσσονται θεματικά της επιστημονικές περιοχές της βιοχημείας και μοριακής βιολογίας, της γεωπονίας και των φυτοεπιστημών (Jian, 2020) (Εικόνα 1.3).

Εικόνα 1.2:Αριθμός δημοσιεύσεων σχετικών με την ανάλυση χημικών ουσιών που προέρχονται από φαρμακευτικά φυτά, από το 1940 ως και σήμερα (Πηγή: Jiang, 2020)



Εικόνα 1.3:Ποσοστό δημοσιεύσεων σχετικών με την ανάλυση χημικών ουσιών που προέρχονται από φαρμακευτικά φυτά ανά επιστημονικό κλάδο, κατά την περίοδο 2008 – 2018 (Πηγή: Jiang, 2020)

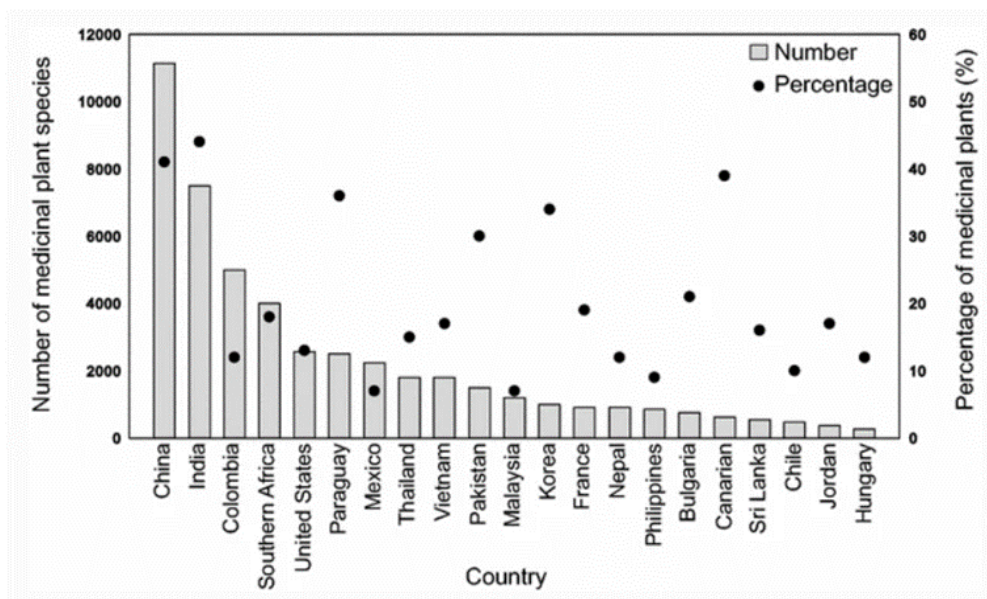


Η έρευνα επιβεβαιώνει πως περίπου το 1/3 των ευρύτερα γνωστών φαρμακευτικών προϊόντων, ανεξαρτήτως της κατεύθυνσης χρήσης τους, φέρουν ως βάση προϊόντα φυτικής προέλευσης,

είτε τμηματικά είτε εξ' ολοκλήρου (Elkordy *et al.*, 2021). Επιπλέον, έως και το 80 % των ανθρώπων στις αναπτυσσόμενες χώρες εξαρτώνται πλήρως από φυτικά φάρμακα για την πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας τους και πάνω από το 25 % των συνταγογραφούμενων φαρμάκων στις ανεπτυγμένες χώρες προέρχονται από άγρια φυτικά είδη (Hamilton, 2004). Σε ευθυγράμμιση με τα ανωτέρω, τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μία ραγδαία αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής φαρμακευτικών φυτών, σημειώνοντας σχετικά κέρδη περί τα 108 δισεκατομμύρια ευρώ το έτος 2015, με το 48 % αυτών, που αντιστοιχεί σε 52 δισεκατομμύρια ευρώ, να αφορούν μόνο βότανα που προορίζονται για τη φαρμακοβιομηχανία (Argyropoulos *et al.*, 2019) (Εικόνα 1.4).

Με δεδομένη την έλλειψη συστημάτων καλλιέργειας των εν λόγω ειδών και το γεγονός ότι η αξιοποίησή τους αφορά σχεδόν αποκλειστικά σε άντληση από φυσικούς πληθυσμούς, φτάνοντας συχνά στο σημείο της κατάχρησης, έχει συντελεστεί σημαντική μείωση του πληθυσμού τους στα φυσικά τους ενδιαίτηματα, ενώ για ορισμένα είδη είναι πλέον ορατός ο κίνδυνος εξάλειψής τους. Υπολογίζεται ότι η απώλεια φυτικών ειδών είναι κατά 100 -1000 φορές υψηλότερη εν συγκρίσει με τον αναμενόμενο ρυθμό φυσικής εξαφάνισης (Pimm *et al.*, 1955). Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση για τη Διατήρηση της Φύσης και το Παγκόσμιο Ταμείο Άγριας Ζωής, υπάρχουν έως 80.000 είδη ανθοφόρων φυτών που χρησιμοποιούνται για ιατρικούς σκοπούς παγκοσμίως, εκ των οποίων περίπου 15.000 είδη απειλούνται με εξαφάνιση από υπερσυλλογή και καταστροφή αντίστοιχων οικοτόπων .

Λαμβάνοντας υπόψη τους κινδύνους που ελλοχεύει η χρήση των φυσικών πληθυσμών, καθίσταται απαραίτητη η διεξαγωγή σχετικών ερευνών και η λήψη μέτρων για την αειφόρο χρήση των φαρμακευτικών φυτών. Προς αυτή την κατεύθυνση, ο στρατηγικός σχεδιασμός περιλαμβάνει προτάσεις σχετικά με τη συστηματική καταγραφή των ειδών, την παρακολούθηση της υφιστάμενης κατάστασης καθώς και την ανάπτυξη συστημάτων για συντονισμένες πρακτικές διατήρησης που βασίζονται τόσο σε στρατηγικές *in situ* όσο και *ex situ* (Upreti *et al.*, 2012). Οι προσπάθειες για την *in situ* διατήρηση απειλούμενων ειδών επικεντρώνονται κυρίως στη δημιουργία προστατευόμενων περιοχών και στην υιοθέτηση προτύπων ενδιαφέροντος και φροντίδας που είναι προσανατολισμένα όχι αποκλειστικά στα είδη αλλά στο οικοσύστημα γενικότερα (Ma *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.4: Πλήθος και ποσοστό ειδών φαρμακευτικών φυτών που χρησιμοποιούνται σε διάφορες χώρες. (Πηγή: Chen *et al.*, 2016)

1.2 Το Είδος *Inula helenium*

Το είδος *Inula helenium*, ευρύτερα γνωστό στον ελληνικό χώρο με τις κοινές ονομασίες Ίνουλα, Κόνυζα και Ελεκαμπάνη, είναι πολυετής πόα και κατατάσσεται στην οικογένεια των Asteraceae ($2n=20$ χρωμοσώματα). Η επιστημονική ονομασία της Ίνουλας κατατέθηκε το 1753 από τον Carl Nilsson Linnaeus και υποστηρίζεται πως η λέξη *Inula* προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη ιαθείς, που σημαίνει γιατρευτείς, και η λέξη *helenium* αποδίδεται στη σύνδεση του φυτού με την ωραία Ελένη της Τροίας (Giacomo, 1960). Σε κάποιες άλλες περιοχές, μάλιστα, έχει χρησιμοποιηθεί και το όνομα Panacéede Chiron, που προέρχεται από το όνομα του Κένταυρου Χείρωνα, του δάσκαλου του Αχιλλέα, ο οποίος γνώριζε τις ιδιότητες και χρήσεις όλων των βοτάνων που χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά στην ιατρική.

Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει η μυθολογική προέλευση του συγκεκριμένου είδους καθώς λέγεται πως δημιουργήθηκε από τα δάκρυα της ωραίας Ελένης, της γυναίκας του Μενέλαου, όταν την απήγαγε ο Πάρις και την οδήγησε στην Τροία. Ήταν ευρύτερα γνωστό στον τότε ανεπτυγμένο κόσμο, ότι οι Κέλτες το αντιμετώπιζαν ως ιερό βότανο (Howard, 1987), εξαιτίας της αντίληψης πως το χρησιμοποιούσε ο θεός Ερμής για το στομάχι, την όραση και τις θρομβώσεις (Culpeper, 1814). Σύμφωνα με το Θεόφραστο, η Ίνουλα χρησιμοποιούνταν σε

μείγμα με ελαιόλαδο και κρασί για την αντιμετώπιση τσιμπήματος αράχνης, κάμπιας του πεύκου αλλά και οχιάς (Roques, 2015).

Με την πάροδο του χρόνου, σημειώθηκαν και άλλες χρήσεις του φυτού, πέραν του τομέα της φαρμακευτικής. Κατά τα ρωμαϊκά χρόνια, περιγράφηκε μία μέθοδος ελέγχου ποιότητας του μελιού με τη χρήση της Ίνουλας, ενώ παράλληλα αναφέρεται η χρήση του φυτού ως καρύκευμα στη μαγειρική (Hill, 1936) και στη ζαχαροπλαστική (Sanderson *et al.*, 2005). Επιπλέον, έχει συμβάλει στη δημιουργία του αφεντιού στη Γαλλία και στην Ελβετία αλλά και ενός αρωματικού μείγματος τόνωσης στην Αγγλία (Chisholm, 1911). Χαρακτηριστικά, ο Πλίνιος ανέφερε πως *«δεν πρέπει να περνά μέρα χωρίς να τρώμε μερικές από τις ρίζες της για να μας βοηθήνε στην πέψη και να απομακρύνουν τη μελαγχολία»*. Περαιτέρω, υπήρξε η θεώρηση ότι η Ίνουλα ευεργετεί την καρδιά, ενώ ο Γαληνός υποστήριζε ότι κάνει καλό ακόμα και στην ισχιαλγία.

Στα νεότερα χρόνια, το φυτό συνδέθηκε από το λαό με τα ξωτικά και τις νεράιδες, δικαιολογώντας έτι την άτυπη ονομασία του «ξωτικό» (Greer, 2017). Έχει αποδειχθεί και η ακαρεοκτόνος ικανότητα της καθώς, όταν περιέχεται σε μικρό ποσοστό σε υδατικό εκχύλισμα, προκαλεί θάνατο τόσο σε μολυσματικές προνύμφες, εντός 40 ημερών, όσο και στα αυγά, εντός 20 ημερών (El Garhy and Mahmoud, 2002).

1.2.1. Βοτανική περιγραφή

Η Ρίζα του φυτού είναι διακλαδισμένη, βλεννώδης, με ριζίδια, μεγάλο πάχος και είναι ικανή να φτάσει έως και 30 εκατοστά μήκος. Το χρώμα της εξωτερικά προσεγγίζει το κόκκινο ενώ εσωτερικά είναι λευκό. Είναι πικρή στη γεύση και η οσμή της παραπέμπει σε κάτι γλυκό και λουλουδένιο (Εικόνα 1.5).

Ο Βλαστός του φυτού μπορεί να φτάσει ύψος 90 ως 200 εκατοστά, δε λυγίζει εύκολα, δεν έχει διακλαδώσεις, με εξαίρεση τα άνθη, και οι αποχρώσεις του κυμαίνονται από πράσινο ως μοβ με τριχίδια χαμηλού ύψους (Wagenitz, 1979).



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση των φυτικών τμημάτων του είδους *Inula helenium* (Πηγή: Köhler F.E., 1897)

Τα Φύλλα της Ίνουλας είναι επίσης μεγάλα σε μέγεθος, πράσινα και τριχωτά στην επάνω επιφάνεια και υπόλευκα στην κάτω. Είναι ωοειδή, οδοντωτά και κυματιστά γύρω από τις άκρες 2, με το μέγεθος τους να κυμαίνεται μεταξύ 40 και 70 εκατοστών. Τα φύλλα είναι εναλλασσόμενα, με τα κατώτερα να είναι έμμισχα και να αγκαλιάζουν τον κολεό, πλάτους 10-20 και μήκους 40-80 εκατοστά. Αντίθετα, αυτά που βρίσκονται κοντά στην ανθοκεφαλή είναι άμισχα, πλάτους 5-8 εκατοστά και μήκους 10-45 εκατοστά (Wagenitz, 1979) (Εικόνα 1.5).

Το Άνθος βρίσκεται στο τέλος του διακλαδιζόμενου στελέχους και φέρει μορφή ανθοκεφαλής που φτάνει σε μήκος τα 5 εκατοστά. Είναι σύνθετο, αποτελείται από μία εξωτερική ζώνη, που φέρει συνολικά 50-100 μικρά άνθη, και μία εσωτερική ζώνη, όπου απαντώνται 100-250 άνθη, τα άνθη του δίσκου, τα οποία είναι ανοιχτού κίτρινου χρώματος.

Ο Καρπός είναι επίμηκες αχάινιο, με τέσσερις ή πέντε νευρώσεις, σχεδόν τετράπλευρο μεγέθους, 5-10 χιλιοστά (Oberdorfer, 2001). Περιβάλλεται από χνούδι που στην κορυφή είναι σαν τούφα, το λεγόμενο πάππο, με μήκος τρίχας τα 6-10 χιλιοστά, έντονα χρώμα του είναι ανοιχτό κοκκινο-καφέ (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Σπόρος του είδους *Inula helenium* (Πηγή: Bilińska E., Buchwald W., 2015)

1.2.2. Αύξηση και ανάπτυξη

Η Ίνουλα είναι ένα ποώδες πολυετές φυτό με την επικονίαση να επιτυγχάνεται από μέλισσες και πεταλούδες. Η περίοδος ανθοφορίας κυμαίνεται από τον Ιούλιο έως και το Σεπτέμβριο, σπάνια ανθίζει και τον Οκτώβριο, ανάλογα με τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες της περιοχής. Κατά την περίοδο μεταξύ τέλη φθινοπώρου και αρχές χειμώνα, αναπτύσσονται οι σπόροι, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για σπορά την επόμενη καλλιεργητική περίοδο όσο και για ζωοτροφή. Το φθινόπωρο συλλέγεται και η ρίζα, ηλικίας 2-3 ετών, η οποία, αφού επεξεργαστεί και αποξηρανθεί καταλλήλως, αξιοποιείται στη φαρμακευτική και στη μαγειρική. Το φύλλωμα που έχει εξασθενήσει ή νεκρωθεί πρέπει να αφαιρείται νωρίς την άνοιξη ή κατά το φθινόπωρο. Την ίδια περίοδο, πραγματοποιείται και ο πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο της διαίρεσης. Ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα μαλακού ξύλου ή με σπόρο, με βλάστηση σε θερμοκρασία 10 °C, γίνεται την άνοιξη.

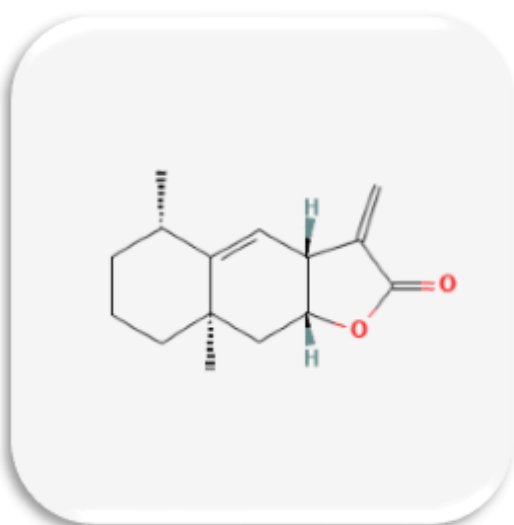
1.2.3 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις

Η Ίνουλα παραδοσιακά απαντάται σε περιοχές της Ευρώπης και της δυτικής Ασίας (Pignatti, 1982) αλλά, πλέον, έχει μετοικήσει και σε άλλα μέρη του πλανήτη όπου επικρατούν ευνοϊκές περιβαλλοντολογικές συνθήκες. Ως είδος, η Ίνουλα χρειάζεται ήλιο αλλά μπορεί να ανταπεξέλθει και σε μερική σκιά, ενώ το έδαφος μπορεί να είναι βαθύ, πλούσιο, ισορροπημένο σε υγρασία και ικανό για αποστράγγιση όταν αυτό είναι απαραίτητο. Προτιμά εδάφη με

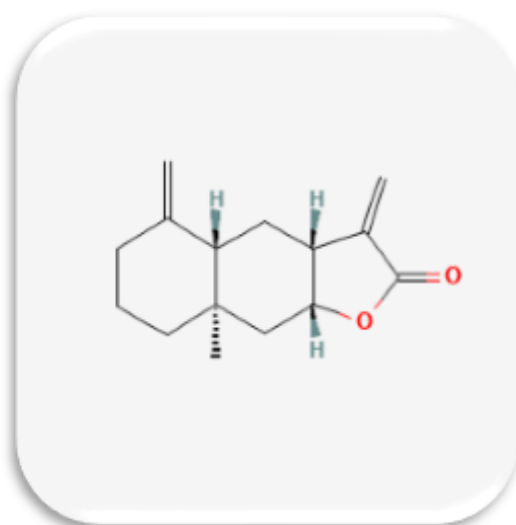
ουδέτερη τιμή pH, αλλά μπορεί να προσαρμοστεί σε μεγάλο εύρος τιμών, ενώ μπορεί να αναπτυχθεί σε υψόμετρο από 500 ως 1200 μέτρα (Pignatti, 1982).

1.2.4 Το είδος *Inula helenium* ως εργοστάσιο παραγωγής βιοδραστικών ενώσεων

Η Ίνουλα περιέχει μία πληθώρα αξιόλογων ενώσεων, οι οποίες, με τη σειρά τους, αξιοποιούνται ως πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή ιδιαίτερα σημαντικών ουσιών. Μία από τις σημαντικότερες ουσίες είναι η *ελενίνη*, η οποία εξάγεται από το αιθέριο έλαιο, χρησιμοποιώντας αλκοόλη ή άλλους μη πολικούς διαλύτες, και απαντάται σε συγκέντρωση 4 %. Η ελενίνη αποτελεί ένα μείγμα δύο ισομερών οργανικών ενώσεων, την αλαντολακτόνη και την ισοαλαντολακτόνη, οι οποίες ανήκουν στη χημική ομάδα των σεσκιτερπενικών λακτονών (Seca *et al.*, 2015). Οι ανωτέρω λακτόνες εντοπίζονται σε υγρό διάλυμα ελενίνης σε συγκέντρωση 40 % προς 60 %, αντίστοιχα (Xu, 2014) (Εικόνες 1.7 και 1.8).



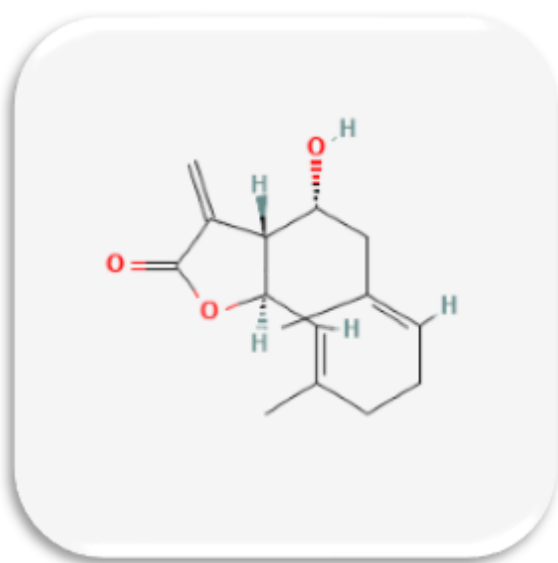
Εικόνα 1.7: Απεικόνιση χημικής δομής Αλαντολακτόνης (Πηγή: PubChem)



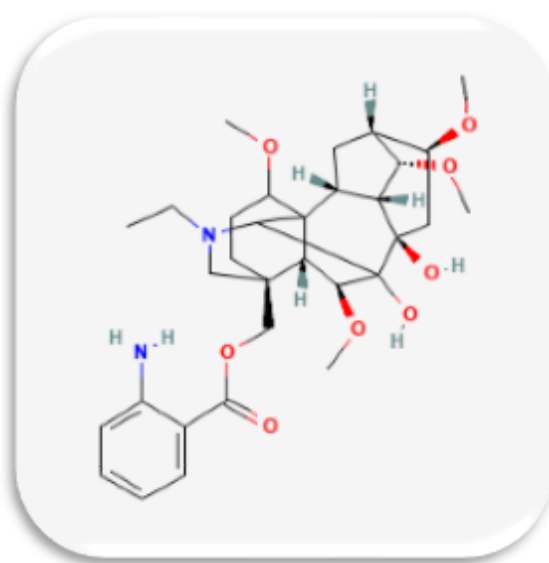
Εικόνα 1.8: Απεικόνιση χημικής δομής Ισοαλαντολακτόνης (Πηγή: PubChem)

Μία ακόμα σесκιτερπενική λακτόνη που έχει εντοπιστεί και απομονωθεί από την Ίνουλα είναι το **ευπατολίδιο**, το οποίο αποτελεί αντικείμενο συστηματικής μελέτης καθώς φέρει σημαντική αντικαρκινική δράση (Εικόνα 1.9).

Περαιτέρω, η Ίνουλα περιέχει **ινουλίνη**, ένα φυσικό πολυσακχαρίτη (Roberfroid, 2003) που εντάσσεται χημικά στις φρουκτάνες και η περιεκτικότητά της στο φυτό παρουσιάζει διακυμάνσεις, με τις υψηλότερες τιμές να εμφανίζονται το φθινόπωρο (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.9: Απεικόνιση χημικής δομής Ευπατολιδίου (Πηγή: PubChem)



Εικόνα 1.10: Απεικόνιση χημικής δομής Ινουλίνης (Πηγή: PubChem)

Κατά κανόνα, οι φυτικές ινουλίνες περιέχουν από 2 ως 70 μονάδες φρουκτόζης (Kays, 2007), σπάνια μπορεί να φτάσουν και τις 200 (Rauter *et al*, 2010), ενώ επιπλέον περιέχουν και γλυκόζη. Η ινουλίνη αποτελεί αποθήκη ενέργειας για μερικά φυτά και απαντάται συνήθως στη ρίζα, στην προκειμένη περίπτωση σε συγκέντρωση 44 %. Λόγω της δράσης της ως αποθησαυρικής ουσίας της, τα φυτά που παράγουν και αποθηκεύουν ινουλίνη δεν χρειάζονται άμυλο ή άλλες μορφές υδατανθράκων (Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων, 2018).

Άλλα παράγωγα που έχουν απομονωθεί από το είδος *I. helenium* είναι αυτά της ιβανγκουστίνης, του ινουβισκολιδίου, της καραμπρόνης, της κονφερτίνης, του κοστουνολιδίου και της τομεντοσίνης (Cantrell *et al.*, 1999).

1.2.5 Προοπτικές αξιοποίησης του είδους *Inula helenium*

Οι δραστικές ουσίες που περιέχει η Ίνουλα φέρουν αποδεδειγμένα πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων, μερικές εκ των οποίων την καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικό είδος προς αξιοποίηση στον τομέα της φαρμακευτικής αλλά και σε πρόσθετους κλάδους βελτίωσης της ποιότητας ζωής.

Συγκεκριμένα, το *ελένιο* έχει ισχυρή αντισηπτική, βακτηριοκτόνο, αντιμυκητιασική (Barreroa, 2000) και αντιμικροβιακή δράση (O'Shea, 2009). Μπορεί να ενεργοποιήσει την αναστολή ή/και την απόπτωση του κυτταρικού κύκλου σε πλακώδη καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα (Rasul *et al.*, 2013; Peng, 2015), ενώ παράλληλα συμβάλλει στην ενεργοποίηση του μετατροπέα σήματος 3 (STAT3) (Chun, 2015). Έχει επίσης την ικανότητα να καταπολεμά τις φλεγμονές, εμποδίζοντας την παραγωγή της χημειοκίνης και τη φωσφορυλίωση μέσω STAT1 με τα πτητικά έλαια που διαθέτει. Χάρη στις ιδιότητές της, αναφέρεται ότι η Ίνουλα μπορεί να αξιοποιηθεί για την αντιμετώπιση του άσθματος και του βρογχικού άσθματος, και γενικότερα όλων των λοιμώξεων του αναπνευστικού, καθώς λειτουργεί θερμαντικά και αποχρεμπτικά.

Η *ινουλίνη* είναι ένα άμυλο που καθίσταται μη αφομοιώσιμο από τον άνθρωπο και συνήθως διέρχεται απευθείας από το πεπτικό σύστημα. Οι φρουκτάνες τύπου ινουλίνης χρησιμοποιούνται κυρίως ως πρώτες ύλες για τη βιομηχανική παραγωγή φρουκτανών ως συστατικά τροφίμων (Meyer *et al.*, 2011). Η χρήση στη βιομηχανία τροφίμων βασίζεται στις θρεπτικές και τεχνολογικές ιδιότητες των φρουκτανών ως διαιτητικών ινών (Tungland, 2018) και έτσι, με επεξεργασία, γίνεται μετατροπή τους σε υποκατάστατο της ζάχαρης, το οποίο είναι κατάλληλο για βρώση από τους διαβητικούς. Εκτός του ότι είναι ένα ευπροσάρμοστο συστατικό, η ινουλίνη παρέχει θρεπτικά πλεονεκτήματα, έναντι της κρυσταλλικής ζάχαρης, συμβάλλοντας στην αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου και του μαγνησίου.

Σύμφωνα με μελέτες, η Ίνουλα συνολικά συμβάλλει στην αποκατάσταση της κανονικής λειτουργίας του οργανισμού, κυρίως μέσω της συνεισφοράς της στη βελτίωση της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών από τις τροφές. Παράλληλα, έχει αντιπαρασιτική, αντιμυκητιασική και ανθελμινθική δράση, καταστρέφοντας ή αποβάλλοντας τα σκουλήκια του εντέρου και τα παράσιτα. Τέλος, της αποδίδονται ιδιότητες ισχυρού βακτηριοκτόνου, προστατεύοντας τον οργανισμό από διάφορες μολύνσεις σε ελάχιστες ώρες, με κυριότερες αυτές που προέρχονται από το βάκιλο της φυματίωσης Tubercle, χρυσίζων σταφυλόκοκκο και τα παρασιτικά *ascaris* (Garhy και Mahmoud, 2002).

1.2.6 Έρευνα στο είδος *Inula helenium*

Το 2012, μετά από σχετική έρευνα, τεκμηριώθηκε η αντισταφυλοκοκκική δράση των ελαίων της ρίζας της Ίνουλας καθώς οι λακτόνες που περιέχονται στο φυτό (αλαντολακτόνη, ισοαλαντολακτόνη και διπλοφυλλίνη) είναι ικανές να περιορίσουν κατά πολύ την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* (Stojanović *et al.*, 2012). Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα ανέδειξε τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ικανότητες που έχουν τα εκχυλίσματα της *I. helenium* (Spiridon, 2013), ενώ νεότερες έρευνες απέδειξαν περαιτέρω ότι το δροαλκοολικό εκχύλισμα της Ίνουλας σε αρσενικούς αρουραίους, στην ενδεδειγμένη δοσολογία, φέρει αντιφλεγμονώδη αλλά και καταπραϋντική δράση (Fallahzadeh and Mohammadi, 2016).

1.3 Βελτίωση Φαρμακευτικών Φυτών

Η ανθρώπινη ζωή είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τα φυτά και τα παράγωγά τους, που βρίσκουν εφαρμογή σε ποικίλες εκφάνσεις αυτής, όπως στη διατροφή, το ρουχισμό, την παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων, τη δημιουργία πρώτων υλών παροχής ενέργειας για θέρμανση, κίνηση, κ.α.. Τα φαρμακευτικά φυτά συγκαταλέγονται στις πλέον σημαντικές “μηχανές παραγωγής” δευτερογενών μεταβολιτών, των οποίων η δράση είναι θεμελιώδους σημασίας στον τομέα της υγείας (Kumar, 2008). Με δεδομένη τη συνεχή αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, η καθολική κάλυψη των ανθρώπινων αναγκών, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), απαιτεί την αύξηση της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής κατά 70 % έως το 2050 (Laskar *et al.*, 2019). Η απάντηση στην πρόκληση αυτή, ωστόσο, δυσχεραίνεται περαιτέρω από παράλληλες μεταβολές που σχετίζονται τόσο με την κλιματική αλλαγή σε πολλές περιοχές παγκοσμίως όσο και με τη σταδιακή εξάντληση των φυσικών πόρων του πλανήτη. Παραδοσιακά, και πριν τη γέννηση της επιστήμης της Βελτίωσης των Φυτών, συνήθη πρακτική αποτελούσε η επιλογή από τους αγρότες των σπόρων που προέρχονταν από τα αποδοτικότερα φυτά για την επόμενη σπορά. Η πρακτική αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη ομοιόμορφων τύπων φυτών, δημιουργώντας ποικιλίες αναφερόμενες ως “τοπικές” ή “παραδοσιακές”. Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, έπειτα από τη θεμελίωση των νόμων της κληρονομικότητας από τον Gregor Mendel, ακολούθησε η σταδιακή εξέλιξη της Βελτίωσης των Φυτών ως επιστήμης που στοχεύει στην παραγωγή ποικιλιών με γενετική υπεροχή, προσαρμοστικότητα σε μεγαλύτερο εύρος περιοχών.

Επιπρόσθετα των κλασικών μεθόδων βελτίωσης, που έχουν οδηγήσει στη δημιουργία της πλειοψηφίας των εμπορικών ποικιλιών για το σύνολο των καλλιεργούμενων ειδών παγκοσμίως, τα τελευταία χρόνια κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος οι τεχνικές της Μοριακής Βελτίωσης. Ο όρος Μοριακή Βελτίωση περιγράφει έναν διεπιστημονικό κλάδο της βελτίωσης φυτών που ενσωματώνει τις τεχνολογίες της μοριακής βιολογίας και βιοτεχνολογίας φυτών, συμπληρωματικών των κλασικών βελτιωτικών προσεγγίσεων, ενισχύοντας τις προοπτικές ανάπτυξης νέων ποικιλιών που απαντούν στις τωρινές και μελλοντικές προκλήσεις.

1.3.1 Βελτιωτικοί στόχοι

Οι στόχοι βελτίωσης της Ίνουλας διαμορφώνονται σύμφωνα με τις απαιτήσεις και δυσκολίες της καλλιέργειας, τις ανάγκες των αγροτών αλλά και τις προτιμήσεις των καταναλωτικού κοινού στις περιοχές παραγωγής της καλλιέργειας. Είναι πλέον γεγονός πως η παραγωγή σύνθετων βιομηχανικών φαρμάκων γίνεται όλο και πιο χρονοβόρα, ενώ σημαντικό περιοριστικό παράγοντα αποτελεί το γεγονός ότι η χρήση τους συχνά συνοδεύεται από ποικίλες και σοβαρές παρενέργειες. Με δεδομένη την προτίμηση του καταναλωτικού κοινού προς τη χρήση φυτικών φαρμάκων, τα οποία θεωρούνται ως περισσότερο αγνά και συνεπώς αβλαβή, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την παραγωγή και αξιοποίηση φαρμάκων φυτικής προέλευσης (Sharma *et al.*, 2018). Ως κύριοι στόχοι παραγωγής των χωρών-εξαγωγέων του φυτού τίθενται η επίτευξη υψηλής στρεμματικής απόδοσης, η σταθερότητα σταθεροποίηση της απόδοσης, η ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών και η βελτίωση της ποιότητας των σπόρων. Επίσης, κρίνεται απαραίτητη η βελτίωση του φυτοχημικού προφίλ του φυτού, με καίριο στόχο την ενίσχυση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών που κρίνονται ως θεμελιώδους σημασίας για τη φαρμακοβιομηχανία (Sharma *et al.*, 2018).

1.3.2 Μοριακοί Δείκτες

Ως γενετικός δείκτης ορίζεται μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που εδρεύει σε γνωστή περιοχή ενός χρωμοσώματος και μπορεί να αξιοποιηθεί για την επαλήθευση μίας αλληλουχίας DNA σε έναν γονότυπο, ανεξαρτήτως αν εκφράζεται ή όχι στο φαινότυπο. Συνεπώς, ο

γενετικός δείκτης δρα ως αναγνωριστικό στοιχείο που καθιστά εφικτή την ταυτοποίηση ατόμων σε έναν πληθυσμό που φέρει παραλλακτικότητα. Συγκεκριμένα, οι μοριακοί δείκτες επιτρέπουν την ανίχνευση γενετικών ομοιοτήτων ή διαφορών μεταξύ διαφορετικών γονοτύπων, αξιοποιώντας φαινοτυπικά, βιοχημικά ή/και γονοτυπικά δεδομένα (Sharma *et al.*, 2018). Από την ανακάλυψή τους, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι δεικτών οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε μορφολογικούς, βιοχημικούς και μοριακούς:

Μορφολογικοί δείκτες: Βασίζονται στις φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού.

Βιοχημικοί δείκτες: Βασίζονται στην ανίχνευση διαφορών που σχετίζονται με το μέγεθος ή το φορτίο των πρωτεϊνών ή/και στο βιοχημικό περιεχόμενων των ατόμων. Τέτοιου τύπου δείκτες είναι τα ισοένζυμα, πρωτεϊνικά ένζυμα ικανά να αναγνωρισθούν από την κινητικότητα της γέλης τους, μέσω ηλεκτοφόρησης (Winterand Kahl, 1995; Jinek *et al.*, 2012 ; Manzo-Sanchez *et al.*, 2015). Τα ισοένζυμα δεν είναι πολλά σε αριθμό, η δράση τους είναι στενά συνδεδεμένη με τον τύπο του φυτικού ιστού και την ηλικία του αλλά, ανεξαρτήτως της ενζυμικής τους δράσης, η διαφοροποίησή τους γίνεται βάσει του μεγέθους και του φορτίου τους (Yang *et al.*, 2015) .

Μοριακοί δείκτες: Οι δείκτες αυτοί λειτουργούν αξιολογώντας διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ διαφορετικών ειδών ή μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Σε σύγκριση με άλλους τύπους δεικτών, πλεονεκτούν καθώς δεν υπάρχει εξάρτηση από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, την ηλικία ή άλλους εξωτερικούς παράγοντες, εξασφαλίζοντας υψηλότερη σταθερότητα και αξιοπιστία (Balasubramani *et al.*, 2010; Manokar *et al.*, 2017). Ο εντοπισμός οποιασδήποτε γενετικής παραλλαγής γίνεται με υβριδισμό DNA-DNA, όπου η αναγνώριση γίνεται βάσει του μήκους ή της εξειδίκευσης, ή με PCR, όπου χρησιμοποιούνται εξειδικευμένοι ή τυχαίοι εκκινητές (Graham *et al.*, 2010). Παραδείγματα τέτοιων μοριακών δεικτών αποτελούν οι RFLP, STS, EST, RAPD και AFLP(Sharma *et al.*, 2018).

1.3.3 Γενετική Μηχανική

Η Γενετική Μηχανική αφορά σε επεξεργασία του γενετικού υλικού, μέσω της προσθήκης, αφαίρεσης ή σύγχισης γονιδίων στον οργανισμό ενδιαφέροντος, στοχεύοντας στη δημιουργία οργανισμών με βελτιωμένες ή/και καινοφανείς ιδιότητες. Η τροποποίηση του γονιδιώματος,

που περιλαμβάνει μεταφορά γενετικής πληροφορίας είτε τυχαία είτε σε κύτταρα-στόχους, του ξενιστή, επιτυγχάνεται είτε άμεσα με ποικίλες μεθόδους, όπως η μικροέγχυση, η ηλεκτροπόρωση, και η βιολιστική, είτε έμμεσα με τη χρήση φορέων. Το προς μεταφορά γονίδιο ονομάζεται διαγονίδιο, ενώ ο οργανισμός που έχει υποστεί την τροποποίηση καλείται γενετικά τροποποιημένος (Babich *et al.*, 2020). Στην ομάδα των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών, κύρια μέθοδο γενετικής τροποποίησης αποτελεί η χρήση ειδικών φορέων, με κυριότερους τα βακτηριακά είδη *Agrobacterium tumefaciens* και *Agrobacterium rhizogenes* που ανήκουν στην οικογένεια *Rhizobiaceae*. Ο γενετικός μετασχηματισμός προϋποθέτει αρχικά τη μόλυνση των τραυματισμένων ιστών του φυτού, ακολουθεί η παραγωγή σηματοδοτικών ενώσεων από μέρους του φυτού, οι οποίες ενεργοποιούν τη χημειοτακτική κίνηση και, εν συνεχεία, την αποίκιση του βακτηρίου. Τη διαδικασία αναγνώρισης και αποίκισης του βακτηρίου ακολουθεί η μεταφορά του T-DNA στα φυτικά κύτταρα, μέσω μεμβρανικού συστήματος έκκρισης, και η μετέπειτα μεταφορά του T-DNA στον πυρήνα, όπου γίνεται ενσωμάτωση στην χρωματίνη μέσω ανασυνδυασμού. Το πλασμίδιο Ti που απαντάται στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* λειτουργεί ως επαγωγέας όγκων, ενώ το αντίστοιχο Ri πλασμίδιο στο *Agrobacterium rhizogenes* δρα ως επαγωγέας ριζών (Zarate *et al.*, 2007). Η γενετική μηχανική υπερτερεί έναντι άλλων μεθόδων βελτίωσης ως προς τη δυνατότητα στενευμένου χειρισμού του γονιδιώματος, καθιστώντας παράλληλα εφικτή την επιτάχυνση της βελτιωτικής διαδικασίας (Babich *et al.*, 2020). Εν συγκρίσει με την γενετική τροποποίηση *in vitro*, η προσέγγιση αυτή καθιστά εφικτή την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών (Halder *et al.*, 2021).

Στην κατηγορία των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών, έχει αναφερθεί πληθώρα συμβάντων επιτυχούς γενετικού μετασχηματισμού σε ένα εύρος ειδών, όπως *Catharanthus roseus* (Lorence και Verpoorte, 2004), *Scopolia lurida* (Zhao *et al.*, 2017), *Atropa belladonna* (Zhao *et al.*, 2020), *Daturainnoxia* (Li *et al.*, 2020) *Papaver bracteatum* (Sharafi *et al.*, 2013), *Rauwolfia serpentina* (Mehrotra *et al.*, 2013), κ.α..

1.3.4 Μετασχηματισμός *in vitro*

Η διαδικασία της καλλιέργειας φυτικών ιστών εντάσσεται στα πλαίσια των τεχνικών *in vitro* αποσκοπώντας στη στοχευμένη παραγωγή μεγάλης ποσότητας συγκεκριμένων ιστών, κυττάρων ή/και οργάνων. Κατά κανόνα, η *in vitro* καλλιέργεια περιλαμβάνει την προσθήκη

στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, υγρό η στερεό, κατάλληλων ρυθμιστών αύξησης και την ανάπτυξη των ιστών / κυττάρων / οργάνων υπό ασηπτικές συνθήκες (Halder *et al.*, 2021).

Οι τεχνικές ιστοκαλλιέργειας βρίσκουν εύρος εφαρμογών, όπως η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, η ασφαλής μεταφορά γενετικού υλικού, η απαλλαγή των σπόρων από το λήθαργο, όταν αυτό είναι επιθυμητό, αλλά και η ποιοτική αξιολόγηση των σπόρων (Singh and Singh, 2021). Μέσω της ιστοκαλλιέργειας, συχνά παρατηρείται η εμφάνιση τυχαίων μεταλλάξεων, διαδικασία γνωστή ως σωματοκλωνική παραλλακτικότητα, η οποία έχει οδηγήσει στην απομόνωση και αξιοποίηση επιθυμητών γονοτύπων (Ahloowalia *et al.*, 1998).

Τα βασικά στάδια ανάπτυξης για τη γενετική τροποποίηση *in vitro* των περισσότερων φυτικών ειδών περιλαμβάνουν την επιλογή του κατάλληλου φυτικού ιστού ή οργάνου (εκφύτου), την εγκατάστασή στο χώρο ανάπτυξης ή του (συνήθως τρυβλίο *petri*), την επαγωγή της βλαστογένεσης και ακολούθως της ριζογένεσης και τέλος τη διαδικασία της αναγέννησης ολόκληρου φυτού.

Ως προς τον τύπο του εκφύτου, εξαρτάται κυρίως από το είδος αλλά και το γονότυπο ενός είδους, ενώ έχουν αναφερθεί επιτυχείς διαδικασίες αναγέννησης μέσω της καλλιέργειας εμβρύων (Garro-Monge *et al.*, 2008), ανθέρων (Rout *et al.*, 2000), πρωτοπλαστών (Razdan, 1996), εναιωρήματος, κάλλου, βλαστικών ή/και μεριστωματικών ιστών (Singh and Singh, 2021) (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Φαρμακευτικά είδη στα οποία επιχειρήθηκε γενετική τροποποίηση *in vitro* και τύπος εκφύτου που χρησιμοποιήθηκε (Πηγή:Singh and Singh, 2021).

Φυτικό είδος	Τύπος εκφύτου
<i>Aloe vera</i>	Τμήμα βλαστού, άνθος
<i>Attropabelladonna</i>	Μερίστωμα μασχάλης
<i>Azadirachta indica</i>	Τμήμα βλαστού ή ρίζας
<i>Catharanthus roseus</i>	Τμήμα βλαστού
<i>Centella asiatica</i>	Τμήμα βλαστού, φύλλα
<i>Plantago ovata</i>	Τμήμα βλαστού
<i>Rauwolfia seperntina</i>	Τμήμα φύλλων
<i>Valerianawallichii</i>	Κορυφαίο μερίστωμα
<i>Withaniasomnifera</i>	Τμήμα γονάτου

Γενική άποψη αποτελεί πως η γενετική τροποποίηση και καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών *in vitro* είναι ακριβή εξαιτίας των εξαντλητικών δοκιμών στο πλαίσιο βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων αλλά και των απαιτήσεων ανάπτυξης σε ασηπτικές συνθήκες (Cardoso *et al.*, 2018). Ωστόσο, τα συγκριτικά πλεονεκτήματα της μεθόδου, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι επιτακτική η αύξηση της παραγωγής βιοδραστικών ουσιών για την κάλυψη των αναγκών παραγωγής φυτικών φαρμάκων, την καθιστά μια από τις πλέον ελκυστικές και υποσχόμενες προσεγγίσεις για την απάντηση στις προκλήσεις που θέτει η εμπορική αξιοποίηση των φαρμακευτικών φυτών

Πίνακας 1.2: Προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής για την υπερέκφραση αλκαλοειδών σε φαρμακευτικά φυτά.(Πηγή:Mora-Vásquez *et al.*, 2022)

Μοριακή προσέγγιση	Τύπος αλκαλοειδούς	Κύριος δευτερογενής μεταβολίτης (άλλοι)	Χρονική Αύξηση (έως)	Πριν/μετά την απόδοση (mg/gDW)	Γονίδιο(α)	Είδη φυτών	Περιοχή Παραγωγής
Υπερέκφραση ενδογενών ενζύμων	ινδόλη	Serpentine (ajmalicine)	5	0,76/3,7	CrPrx	<i>Catharanthus roseus</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Σερπεντίνη (βινδολίνη, καθαρανθίνη, βινκριστίνη)	3.5	0,017/0,060	CrMPK3	<i>Catharanthus roseus</i>	φύλλα (παροδικά)

Υπερέκφραση ξένων ενζύμων	ινδόλη	Καθαρανθίνη (βινδολίνη)	3	–	CrGES	<i>Catharanthus roseus</i>	φύλλα (παροδικά)
	ινδόλη	Καμποθεκίνη (secologanin)	3	0,80/2,8	NnCYP72A1	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	φύλλα (παροδικά)
	ινδόλη	Καθαρανθίνη (βινδολίνη, βινβλαστίνη)	3	–	CrGGPPS	<i>Catharanthus roseus</i>	Ολόκληρο φυτό
	ινδόλη	Βινδολίνη	2.4	1,15/2,72	CrDAT	<i>Catharanthus roseus</i>	Ολόκληρο φυτό
	τροπάνιο	Σκοπολαμίνη	9	0,060/0,54	DiH6H	<i>Datura innoxia</i>	τριχωτές ρίζες
	τροπάνιο	Υοσκυαμίνη (σκοπολαμίνη)	3	0,20/0,63	SITRI	<i>Scopolia lurida</i>	τριχωτές ρίζες
	τροπάνιο	Υοσκυαμίνη (πουτρεσκίνη, N- μεθυλοπουτρεσκίνη, ανισοδαμίνη)	2	3,0/6,5	AbODC	<i>Atropa belladonna</i>	Τριχωτές ρίζες
	βενζυλισο- κινολίνη	Berberine	3	0,68/1,8	Cj4'OMT	<i>Coptis japonica</i>	Ολόκληρο φυτό
	βενζυλισο- κινολίνη	(S)- τετραϋδροκολουμπαμίνη ((S)-νορκοκλαουρίνη, (S)-κοκλαουρίνη, (S)-N- cis-μεθυλκοκλαουρίνη, (S)-ρετικουλίνη)	74	0,0030/0,23	McBBE	<i>Macleaya cordata</i>	Ολόκληρο φυτό
	βενζυλισο- κινολίνη	Κωδεΐνη (θηβαΐνη, μορφίνη)	13	0,03/0,4	PsCodR	<i>Papaver bracteatum</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Ρεζερπίνη (ajmalicine)	2	0,60/1,2	CrTDC	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Καμποθεκίνη	2	1.1/2.1	NfSTR	<i>Ophiorrhiza rugosa</i>	Ολόκληρο φυτό
	τροπάνιο	Σκοπολαμίνη (ανισοδαμίνη)	10	0,10/1,2	HnH6H	<i>Scopolia lurida</i>	Τριχωτές ρίζες
	τροπάνιο	Σκοπολαμίνη	6	0,042/0,26	ODC ποντικίου	<i>Datura innoxia</i>	Ολόκληρο φυτό
	τροπάνιο	Σκοπολαμίνη (υοσκυαμίνη)	5	0,060/0,30	VHb	<i>Hyoscyamus niger</i>	Τριχωτές ρίζες
Υπερέκφραση μεταγραφικού παράγοντα	πυριδίνη	Αναβασίνη (πτωματικό)	3	5,0/15 (ng/mg FW)	LcL/ODC	<i>Nicotiana tabacum</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Ταμπερσονίνη (ajmalicine, catharanthine)	40	0,050/2,1	ORCA4	<i>Catharanthus roseus</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Βινδολίνη (καθαρανθίνη)	4	0,030/0,14	ORCA2	<i>Catharanthus roseus</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Βινδολίνη (καθαρανθίνη)	4	0,040/0,16	ORCA3	<i>Catharanthus roseus</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Οφιοειδής	3	0,13/0,39	CrWRKY1	<i>Catharanthus roseus</i>	Τριχωτές ρίζες

Γονιδιακή σίγηση	ινδόλη	Βινβλαστίνη (καθαρανθίνη)	3	0,80/2,2	<i>CrMYC1</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	φύλλα (παροδικά)
	ινδόλη	Καμπτοθεκίνη	3	1.1/3.8	<i>OpWRKY2</i>	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Ανυδροβινβλαστίνη (βινβλαστίνη, αζμαλικίνη, βινδολίνη, καθαρανθίνη)	1.7	0,10/0,17 (FW)	<i>CrERF5</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	πέταλα (παροδικά)
	ινδόλη	Καμπτοθεκίνη	1.5	1.1/1.7	<i>ORCA3</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Καμπτοθεκίνη (τρυπταμίνη, λογανίνη)	1.4	0,50/0,70	<i>OpWRKY3</i>	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Τριχωτές ρίζες
	τροπάνιο	Σκοπολαμίνη (υοσκυαμίνη, ανισοδαμίνη)	3	6,2/20 (mg/φυτό)	<i>AbSAUR1</i>	<i>Atropa belladonna</i>	Ολόκληρο φυτό
	βενζυλισο- κινολίνη	Χελερυθρίνη (σαγκουιναρίνη, χηλερυθρίνη)	4	0,10/0,35 (mg/g FW)	<i>CjWRKY1</i>	<i>Eschscholzia californica</i>	Εναιωρήματα κυττάρων
	πυριδίνη	Αναταβίνη (νικοτίνη, νορνικοτίνη, αναβασίνη)	4	0,48/2,0	<i>Nterf91</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Ολόκληρο φυτό
	ινδόλη	Βινδολίνη (σερπεντίνη)	3	0,046/0,15 (nmol/L)	<i>CR1</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Ολόκληρο φυτό
	τροπάνιο	Σκοπολαμίνη	6	1.4/8.8	<i>QPT</i>	<i>Duboisialeichhardtii</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Akuammicine (23 άλλες MIA)	14	–	<i>BIS1, ORCA3, CrMYC2a</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Πέταλα (παροδικά)
	ινδόλη	Βινβλαστίνη (βινδολίνη, καθαρανθίνη)	5	0,030/0,14	<i>CrTDC, CrSTR</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Ολόκληρο φυτό
	ινδόλη	Catharanthine (βινδολίνη, ajmalicine)	6	0,19/1,2	<i>G10H, ORCA3</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Βινδολίνη (καθαρανθίνη, αϊμαλικίνη)	4	0,70/3,0	<i>ORCA3, G10H</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	ολόκληροφυτό
	ινδόλη	Καθαρανθίνη (secologanin, vindoline, ajmalicine, vinblastine)	2	–	<i>ΓΤΠΠΣ, ΓΕΣ</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	ολόκληροφυτό
	ινδόλη	Ολικά αλκαλοειδή (βινκαμίνη)	2	1.1/2.1	<i>CrTDC, CrSTR</i>	<i>Vinca minor</i>	Εναιωρήματα κυττάρων
	ινδόλη	Καμπτοθεκίνη	2.4	0,68/1,6	<i>CrG10H, CrSTR</i>	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Serpentine (καθαρανθίνη, ajmalicine, tabersonine)	1.5	1,0/1,5	<i>ORCA3, CrSDG</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Τριχωτές ρίζες
	ινδόλη	Hörhammericine (lochnericine, tabersonine)	1.3	0,80/1,0	<i>ASA/DXS</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Τριχωτές ρίζες
	τροπάνιο	Σκοπολαμίνη (ανισοδίνη, ανισοδαμίνηυοσκυαμίνη)	11	0,011/0,12	<i>AaPMT, AaTRI</i>	<i>Anisodusacutangulus</i>	Τριχωτές ρίζες

τροπάνιο	Ανισοδίνη (σκοπολαμίνη, ανισοδαμίνηυοσκαμίνη)	19	0,053/0,98	AaTri, AaH6H	Anisodusacutangulus	Τριχωτές ρίζες
τροπάνιο	Σκοπολαμίνη (ανισοδαμίνηυοσκαμίνη)	12	0,40/5,2	NtPMT, HnH6H	Atropa belladonna	Ολόκληρο φυτό
τροπάνιο	Υοσκαμίνη (σκοπολαμίνη)	11	0,20/2,2	NtPMT, HnH6H	Atropa belladonna	Τριχωτές ρίζες
τροπάνιο	Σκοπολαμίνη	7	0,16/1,2	NtPMT, HnH6H	Atropa belladonna	Ολόκληρο φυτό
τροπάνιο	Σκοπολαμίνη	3	1.1/3.4	SpPMT, SpH6H	Scopolia parviflora	Τριχωτές ρίζες
τροπάνιο	Σκοπολαμίνη	2.5	0,24/0,60	NtPMT, HnH6H	Atropa bellad	

1.4 Το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*

Το *Agrobacterium rhizogenes* (πλέον *Rhizobium rhizogenes*) είναι βακτήριο που ανήκει στο φύλο των Pseudomonadota και συγκεκριμένα στην οικογένεια των Rhizobiaceae. Πρόκειται για είδος αρνητικό κατά Gram που αναπτύσσεται στο έδαφος και είτε παρασιτεί φυτά ξενιστές είτε τρέφεται σαπροφυτικά από αυτά (Εικόνα 1.11). Το βακτήριο *A. rhizogenes* αποτελεί το παθογόνο αίτιο για την νέο πλαστική ασθένεια «hairy root», ενώ η παθογένειά του οφείλεται στην κατοχή του πλασμιδίου Ri, το οποίο φέρει την ικανότητα μεταφοράς και ενσωμάτωσης στο φυτικό γονιδίωμα της περιοχής T-DNA (Chilton *et al.*, 1982). Κατά την ενσωμάτωση της T-DNA περιοχής, μέσω πηλγών ή τομών, εκδηλώνεται η παθογένεια του βακτηρίου, η οποία, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τη σύνθεση αυξινών και κυτοκινών. Η ανωτέρω διαδικασία οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, οδηγώντας τελικά στην ανάπτυξη νέο πλαστικών δομών, προκαλώντας την ασθένεια των “τριχωτών ριζών” (Gelvin, 2009; Gutierrez-Valdes *et al.*, 2020). Τα χαρακτηριστικά της ασθένειας αφορούν σε προαγωγή της ανάπτυξης των ριζών, πλαγιοτροπική ανάπτυξη της ρίζας, αυξημένη πλευρική διακλάδωση, αφθονία τριχών και ενισχυμένου ρυθμό ανάπτυξης, αντίστοιχο του αδιαφοροποίητου τύλου, αν και ο ιστός διατηρεί ένα εξαιρετικά διαφοροποιημένο λειτουργικό όργανο ρίζας, καθώς και αλλοίωση της μορφολογίας των φύλλων (Cardarelli *et al.*, 1987; Flores *et al.*, 1999).

Χάρη στο φαινότυπο “hairy root”, τα στελέχη του *A. rhizogenes* αξιοποιούνται ευρέως σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, ειδικότερα στις τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής, με στόχο την ανάπτυξη διαγονιδιακών ιστών. Σε ερευνητικό επίπεδο, οι διαγονιδιακές ρίζες

αξιοποιούνται σε μελέτες που άπτονται της φυσιολογίας, βιολογίας και βιοχημείας των ριζών, της αλληλεπίδρασης των ριζών με μικροοργανισμούς καθώς και των επιδράσεων που φέρει η έκφραση γονιδίων ενδιαφέροντος. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι, τα τελευταία χρόνια, η έμφαση δίνεται και στην πρακτική αξιοποίηση των διαγονιδιακών ριζών για παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ή/και εξαγωγή συστατικών ενδιαφέροντος, κύρια αυτά που ανήκουν στην ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών (Ono *et al.*, 2011).

Πιο συγκεκριμένα, το *A. rhizogenes* χρησιμοποιείται ευρέως ως εργαλείο για τον προσδιορισμό των χωρικών και χρονικών πτυχών της γονιδιακής έκφρασης στα φυτά, αναλύοντας τη συνεισφορά τους σε μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην άμυνα έναντι παθογόνων. Στο πλαίσιο αυτό, αναφέρεται η μελέτη της έκφρασης γονιδίων σε ρίζες τομάτας και πατάτας ως προς το ρόλο τους κατά την αλληλεπίδραση με τον κυστογόνο νηματώδη *Globodera rostochiensis* (Wiśniewska *et al.*, 2013). Αντιστοίχως, στην τομάτα προσεγγίστηκε ο εντοπισμός γονιδίων του φυτού που έχουν την ικανότητα καταστολής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου καθώς και αντοχής στη φουμονισίνη 1 (Harvey *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.11: Απεικόνιση του *Agrobacterium rhizogenes* στο φυτό *Eurycoma longifolia* (Πηγή: Danial *et al.*, 2012)

1.4.1 Πλασμίδιο Ri

Η ανάλυση των γονιδιωματικών αλληλουχιών και ο ορισμός των χρωμοσωμάτων, με βάση την παρουσία αλληλουχιών ριβοσωμικού RNA (rRNA) σε ένα μεγάλο τμήμα DNA, αποκαλύπτει ότι η ταξινόμηση βιοτύπων είναι πιθανώς το καλύτερο μέσο οργάνωσης της ομάδας αγροβακτηρίων. Όλα τα στελέχη του *A. rhizogenes* χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός μεγάλου πλασμιδίου που είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση της νεοπλαστικής δομής των ριζών (Ri) (Veena and Taylor, 2007).

Ορισμένα από τα στελέχη του *A. rhizogenes* προκαλούν ανάπτυξη ριζών μόνο στην κορυφαία επιφάνεια των δίσκων της ρίζας καρότου και η ανάπτυξη στις βασικές επιφάνειες δεν είναι εύκολα αντιληπτή, ενώ άλλα προκαλούν πολλαπλασιασμό των ριζών τόσο κατά τον εμβολιασμό της κορυφαίας όσο και της βασικής επιφάνειας (Cardarelli *et al.*, 1985; Ryder *et al.*, 1985). Τα συνηθέστερα στελέχη του *A. rhizogenes* είναι τα τύπου αγροπίνης (που αντιπροσωπεύονται από τα πλασμίδια *RipRiA4*, *pRi1855*, *pRiHRI*, *pRi15834* και *pRiLBA9402*), κουκουμοπίνης (*pRi2659*), μαννοπίνης (*pRi8196*) και καμικιμοπίνης (*pRi724*) (Petit *et al.* 2001).

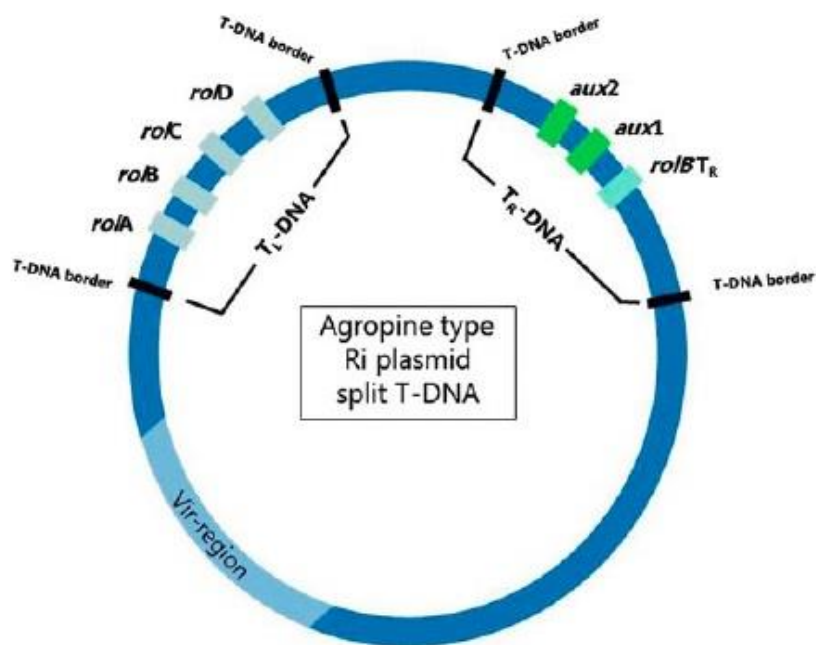
Τα διάφορα στελέχη του *A. rhizogenes*, βάσει της ανάλυσης δεδομένων, ταξινομήθηκαν σε πολικούς και μη πολικούς τύπους. Τα μη πολικά στελέχη (πχ τύπου Agropine), προκαλούν το σχηματισμό τριχωτών ριζών, ανεξαρτήτως από τον προσανατολισμό του δίσκου, ενώ τα πολικά στελέχη (όλα τα άλλα) σχηματίζουν πολλές ρίζες μόνο όταν ο δίσκος τοποθετείται με ανεστραμμένο προσανατολισμό (Meyer *et al.*, 2000).

Γενικότερα, ο σχηματισμός τριχωτών ριζών μπορεί να αναλυθεί σε τέσσερα στάδια: την ενεργοποίηση, την επεξεργασία, την ενσωμάτωση του T-DNA από το βακτήριο στο φυτικό γονιδίωμα και την επακόλουθη εκδήλωση ασθένειας, που περιλαμβάνει ταχεία ανάπτυξη ιστών ρίζας. Παρά την επισταμένη έρευνα στις διαδικασίες που οδηγούν στην ανάπτυξη των νέο πλαστικών δομών, σημειώνεται ότι τα τρία πρώτα στάδια είναι καλύτερα κατανοητά, ενώ το τελευταίο δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως (Veena και Taylor, 2007).

Όλα τα στελέχη του *A. rhizogenes* περιέχουν το πλασμίδιο Ri που περιλαμβάνει μια περιοχή T-DNA όπου εδράζουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έναρξη και ανάπτυξη της ρίζας (γονίδια *rol*) (Hansen *et al.*, 1994). Στο πλασμίδιο Ri, που αποτελείται από μία μονή περιοχή T-DNA, περιλαμβάνονται τα γονίδια *rolA*, *rolB* και *rolC*, τα οποία αποδείχθηκε ότι είναι επαρκή και αναγκαία για την παραγωγή του φαινοτύπου των τριχωτών ριζών (Christey, 2001)

(Εικόνα 1.13). Τέτοια πλασμίδια παράγουν τα στελέχη κουκουμποπίνης, μαννοπίνης και μικιμοπίνης.

Αντίθετα, τα στελέχη τύπου αγροπίνης φέρουν πλασμίδιο Ri, το οποίο έχει περιοχή με δύο T-DNA, ένα από την αριστερή και ένα από τη δεξιά πλευρά (T_L και T_R αντίστοιχα), και ονομάζεται «διαιρεμένο» T-DNA. Αρκετοί τόποι στο T_L -DNA των πλασμιδίων Ri έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητοι για την επαγωγή τριχωτών ριζών, καθώς περιέχουν τα γονίδια *rolA*, *B*, *C*, ομοίως με το μονό T-DNA, αλλά και το γονίδιο *rolD* (Slightom *et al.*, 1986). Το T_R -DNA αποτελείται από γονίδια που ελέγχουν τη βιοσύνθεση της οπίνης και της αυξίνης και είναι τα *aux1* και *aux2*, τα *mas 1* και *mas 2*, το *ags* αλλά και το *RolBT_R* (Christey, 2001) (Εικόνα 1.12). Το γεγονός ότι η ρύθμιση της σύνθεσης αυξίνης αποτελεί προϋπόθεση για την παραγωγή των τριχωτών ριζών (Lima *et al.*, 2009) συμβαδίζει με την άποψη πως τα γονίδια *aux* παίζουν βοηθητικό αλλά όχι καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή τριχωτών ριζών (Vilaine *et al.*, 1987). Στο σύνολό τους, τα δεδομένα τεκμηριώνουν την άποψη ότι, αν και το T_L -DNA και το T_R -DNA μεταφέρονται και ενσωματώνονται ανεξάρτητα στο γονιδίωμα του φυτού ξενιστή, η μεταφορά του T_L -DNA είναι απαραίτητη για την επαγωγή του συνδρόμου των τριχωτών ριζών (Sevon and Oksman-Caldentey, 2002).



Εικόνα 1.12: Απεικόνιση του πλασμιδίου Ri (στέλεχος αγροπίνης) που εδρεύει στο βακτήριο *A. rhizogenes* (Πηγή: Lütken *et al.*, 2017)

Κατά τη διαδικασία φυσικής μόλυνσης του φυτού από το βακτήριο *A. rhizogenes* λαμβάνει χώρα σύνθεση από μέρους του φυτού χημικών ενώσεων, μεταξύ άλλων ακετοσυριγκόνης, στο σημείο τραυματισμού, η οποία συμβάλλει στη χημειοτακτική κίνηση του βακτηρίου, κυρίως στα δικοτυλήδονα είδη. Κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, μέσω του *A. rhizogenes*, η αποτελεσματικότητα επηρεάζεται από τη συγκέντρωση της συνθετικής ακετοσυριγκόνης, η οποία συμβάλλει στην επαγωγή των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά της T-DNA περιοχής (Nakano, 2017). Επιπλέον, ο τύπος του στελέχους *Agrobacterium* αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη συχνότητα μετασχηματισμού, καθώς τα διαφορετικά στελέχη παρουσιάζουν διαφορετική μολυσματική ικανότητα στο φυτό ξενιστή (Bahramnejad *et al.*, 2019). Παράλληλα, σημαντικότατο ρόλο παίζει και ο τύπος του ιστού που χρησιμοποιείται ως έκφυτο κατά το μετασχηματισμό, καθώς τα διαφορετικά είδη ιστών και κυττάρων φέρουν ποικίλη ικανότητα ανάκαμψης και αναγέννησης (Koetle *et al.*, 2015).

1.4.2 Μετασχηματισμός φυτικών ειδών μέσω του *A. rhizogenes*

Τα τελευταία χρόνια, συνεχώς αυξάνεται ο κατάλογος των ειδών όπου έχει αναφερθεί επιτυχής γενετικός μετασχηματισμός μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*. Στο πλαίσιο αυτό, έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα γενετικού μετασχηματισμού για αγρωστώδη, κηπευτικά, ανθοκομικά και άλλα καλλιεργούμενα είδη, ωστόσο οι σχετικές αναφορές για αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά είναι σαφώς περιορισμένες. Πρόσφατη έρευνα οδήγησε στην ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου για τον μετασχηματισμό του είδους *Crocus sativus* L., του γνωστού κρόκου, μέσω του στελέχους *Arqua 1* του *Agrobacterium rhizogenes*, ο οποίος οδήγησε σε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό μετασχηματισμού, της τάξης του 78,51 % (Sharma *et al.*, 2021).

Ως προς την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού, μία σειρά ερευνών καταδεικνύει την θετική επίδραση της συνδυασμένης χρήσης υπερ-μολυσματικών στελεχών του *Agrobacterium* και της προσθήκης φαινολικών ενώσεων, όπως η ακετοσυριγγόνη που συμβάλλει στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *vir*. Μάλιστα, αναφέρεται ότι η προσέγγιση αυτή οδηγεί σε ικανοποιητική συχνότητα μετασχηματισμού ακόμη και σε μονοκοτυλήδονα είδη, τα οποία είναι κοινώς αποδεκτό ότι είναι λιγότερα επιδεκτικά σε διαδικασίες μετασχηματισμού συγκριτικά με τα δικοτυλήδονα είδη (Hayta *et al.*, 2019). Η πρώτη αναφορά επιτυχούς μετασχηματισμού σε μονοκοτυλήδονο, αφορά στο είδος *Pinus halepensis* (Tzfira *et al.*, 1996),

ενώ, έκτοτε, έχουν προστεθεί στον σχετικό κατάλογο για μονοκοτυλήδονα πρωτόκολλα για τα είδη *Alstroemeria aurea* (Akutsu *et al.*, 2004), *Chlorophytum borivillianum* (Bathoju *et al.*, 2017), *Zea mays* (Daspute *et al.*, 2019), κ.λπ.

1.5 Σκοπός της Μελέτης

Είναι πλέον ευρέως γνωστό ότι, τις τελευταίες δεκαετίες, παρατηρείται μία στροφή του καταναλωτικού κοινού προς την αξιοποίηση προϊόντων φυτικής προέλευσης με υψηλό βιοδραστικό δυναμικό. Στο πλαίσιο αυτό, μία πληθώρα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον, στοχεύοντας στην αξιοποίησή τους για παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών ή/και συμπληρωμάτων διατροφής. Με δεδομένες τις ευεργετικές ιδιότητες των φαρμακευτικών φυτών αλλά και την υφιστάμενη αδυναμία κάλυψης των αυξανόμενων αναγκών για βιοδραστικά συστατικά, η έρευνα επικεντρώνεται στην ανάπτυξη μεθόδων που δύνανται να συμβάλλουν στην αυξημένη παραγωγή συστατικών ενδιαφέροντος. Προς την κατεύθυνση αυτή, συνήθη πλέον προσέγγιση αποτελεί η αξιοποίηση των τεχνολογιών γενετικής μηχανικής για τη στοχευμένη ενίσχυση της φυτικής βιομάζας που συνιστά εργοστάσιο παραγωγής βιοδραστικών συστατικών. Ο γενετικός μετασχηματισμός μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes* βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε μελέτες που επικεντρώνονται στην ενίσχυση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών στις ρίζες των φυτών-στόχου. Η *Inula helenium* αποτελεί ένα φαρμακευτικό είδος που παραδοσιακά αξιοποιείται σε τομείς της φαρμακοβιομηχανίας, κυρίως λόγω της ικανότητας σύνθεσης ελένιου και η ινουλίνης. Αντικείμενο της μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Inula helenium* L., χρησιμοποιώντας το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* για τη δημιουργία σύνθετων σποροφύτων που αποτελούνται από διαγονιδιακό ριζικό σύστημα και μη μετασχηματισμένο υπέργειο μέρος. Απώτερο σκοπό της μελέτης αποτελεί η αυξημένη παραγωγή ριζών με στόχο την αξιοποίησή τους σε διαδικασίες εξαγωγής πολύτιμων συστατικών ενδιαφέροντος.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1Φυτικό Υλικό

Στο πλαίσιο ανάπτυξης και βελτιστοποίησης ενός αποτελέσματος του πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Inula helenium*, με κοινή ονομασία Ίνουλα, έγινε προμήθεια πιστοποιημένου γενετικού υλικού από την εταιρεία Pharmasaat (<https://www.pharmasaat.de>), εταιρεία εμπορίας σπόρων που ειδικεύεται στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Το είδος *Inula helenium* αποτελεί πολυετές βότανο με βάρος 1000 σπόρων 5 γραμμάρια, ενώ ο σπόρος έχει ελλειπτικό σχήμα και χρώμα σκούρο καφέ (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1:Σπόροι Ίνουλας που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της μελέτης.

2.2 Στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes*- Συνθήκες ανάπτυξης

Για το γενετικό μετασχηματισμό της Ίνουλας, μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*, αξιοποιήθηκαν τα στελέχη *Arqua* και *R1000*. Για τις ανάγκες εφαρμογής του πρωτοκόλλου, αρχικά έγινε ανάπτυξη των βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (10 ml), εμπλουτισμένου με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, έγινε προσθήκη στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των αντιβιοτικών σπεκτινομυκίνη ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) και ναλιδιξικό οξύ ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) για το *Arqua* και το *R100*), αντίστοιχα. Για την ανάπτυξη των καλλιεργειών βακτηρίων έγινε επώαση σε θερμοκρασία 28°C για διάστημα 2 ημερών.

Για την προετοιμασία του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό, έγινε φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας (10 ml) για 5 λεπτά στις 3000 στροφές, ώστε να γίνει διαχωρισμός υπερκειμένου από το ίζημα. Έπειτα από απομάκρυνση του υπερκειμένου, έγινε συλλογή των βακτηριακών κυττάρων, μέσω επαναδιάλυσης του ιζήματος σε 1 ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MS, το οποίο αποτέλεσε και το εμβόλιο για τον εμβολιασμό των σποροφύτων Ίνουλας.

2.3 Απολύμανση σπόρων Ίνουλας– Προετοιμασία εκφύτων

Αρχικά, έγινε απολύμανση των σπόρων σε διάλυμα χλωρίνης 20 % που περιείχε Tween-20 (1 %) για 5 λεπτά και ακολούθως πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με αποστειρωμένο dH₂O. Οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν προς βλάστηση σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1 Σύνθεση υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το γενετικό μετασχηματισμό του είδους *Inula helenium* 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

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 10 τριβλία, όπου τοποθετήθηκαν 10 σπόροι Ίνουλας. Έπειτα από την τοποθέτηση των σπόρων, τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm προς αποφυγή μολύνσεων και διατήρησης υψηλών επιπέδων υγρασίας. Τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο

ανάπτυξης φυτών με σταθερές και ελεγχόμενες συνθήκες για χρονικό διάστημα 1 εβδομάδας. Συγκεκριμένα, τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες θερμοκρασίας 22 °C και φωτοπεριόδου 16 ωρών φωτός και 8 ωρών σκοτάδι.

2.4 Γενετικός μετασχηματισμός σποροφύτων Ίνουλας μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*

Για το γενετικό μετασχηματισμό της Ίνουλας, χρησιμοποιήθηκε ως βάση το πρωτόκολλο των Pavli και Skaracis (2010), ενώ πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις με στόχο την προσαρμογή και βελτιστοποίησή του για το συγκεκριμένο είδος.

Ως έκφυτα για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα Ίνουλας, ηλικίας 1 εβδομάδας, τα οποία είχαν φυσιολογικό φαινότυπο και ήταν απαλλαγμένα από οποιουδήποτε τύπου συμπτώματα. Για τον εμβολιασμό των σποροφύτων με το κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος, αρχικά έγινε τομή στην περιοχή του υποκοτυλίου, με χρήση αποστειρωμένων εργαλείων (λαβίδα και νυστέρι) και ακολούθησε απομάκρυνση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος. Εν συνεχεία, έγινε εμβάπτιση της τραυματισμένης περιοχής στο εμβόλιο που αφορούσε βακτηριακά κύτταρα *Arqua* και *R1000*. Τα εμβολιασμένα σπορόφυτα τοποθετήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα συν-καλλιέργειας (Πίνακας 2.1). Μετά τη σφράγιση των τριβλίων με parafilm, έγινε μεταφορά τους σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με σταθερές και ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22 °C, 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι). Η διάρκεια συν-καλλιέργειας ήταν 3 ημέρες.

Μετά την περίοδο επώασης, ακολούθησε μεταφορά των εκφύτων σε τετράγωνα τριβλία που περιείχαν υπόστρωμα επαγωγής ριζών (Πίνακας 2.1). Ακολούθησε σφράγιση των τριβλίων με parafilm και τοποθέτησή τους σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C, 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι). Τα τριβλία παρέμειναν στο υπόστρωμα επαγωγής ριζών για διάστημα 2 εβδομάδων. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, ακολούθησε εκ νέου μεταφορά τους σε τριβλία με φρέσκο υπόστρωμα. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης με κατακόρυφη κλίση.

Σε όλες τις περιπτώσεις, για λόγους ελέγχου του πειράματος και συγκριτικής αξιολόγησης των μετασχηματισμένων σποροφύτων με μάρτυρα, στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν και μη εμβολιασμένα σπορόφυτα. Για την προετοιμασία των μαρτύρων, ακολουθήθηκαν οι ίδιες

μεταχειρίσεις, με τη διαφορά ότι δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των σποροφύτων με βακτηριακά κύτταρα. Τα φυτά αυτά αναμένεται να σχηματίσουν ριζικό σύστημα αγρίου τύπου.

2.5 Αξιολόγηση των μετασχηματισμένων σποροφύτων Ίνουλας

Η αξιολόγηση των μετασχηματισμένων φυτών, συγκριτικά με μάρτυρες, βασίστηκε τόσο στα φαινοτυπικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των νέο-εκπυσσόμενων ριζών όσο και στον έλεγχο της ένθεσης του διαγονιδίου *rolB2* ως μέσου επιβεβαίωσης της ενσωμάτωσης της περιοχής T-DNA του *A. rhizogenes* στο φυτικό γονιδίωμα.

2.5.1 Φαινοτυπική αξιολόγηση

Η φαινοτυπική αξιολόγηση των μετασχηματισμένων σποροφύτων βασίστηκε στα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά και στη μορφολογία των ριζών που εκπτύχθηκαν έπειτα από την αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος και τον εμβολιασμό του υποκοτυλίου με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*. Ειδικότερα, ως παράμετροι αξιολόγησης χρησιμοποιήθηκαν:

- Μορφολογία των ριζών
- Μορφολογία του υπέργειου μέρους
- Χρόνος έκπτυξης νέων ριζών
- Αριθμός διακλαδώσεων
- Συχνότητα μετασχηματισμού

2.5.2 Έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού μέσω PCR

Προκειμένου να ελεγχθεί η διαγονιδιακή φύση των ριζών που εκπτύχθηκαν έπειτα από τον εμβολιασμό με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με στόχο τον έλεγχο της ένθεσης του διαγονιδίου *rolB2*. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σχετικά με την παρουσία της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes*

ώστε να διαπιστωθούν τυχόν υπολείμματα του βακτηρίου στις ρίζες των μετασχηματισμένων φυτών.

2.5.2.1 Εξαγωγή DNA

Αρχικά πραγματοποιήθηκε συλλογή ιστού από τα μετασχηματισμένα φυτά που ανέπτυξαν πλούσιο ριζικό σύστημα που ταυτόχρονα ήταν απαλλαγμένο από συμπτώματα ή/και παρουσία μικροοργανισμών. Επίσης, για τις ανάγκες του πειράματος έγινε συλλογή ιστού ρίζας και από τα μη-μετασχηματισμένα φυτά, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν τοποθετήθηκαν σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης (-80 °C) ώστε να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις του ιστού.

Για την εξαγωγή DNA από τον ιστό των ριζών Ίνουλας, αρχικά έγινε τοποθέτηση 200 mg ιστού σε αποστειρωμένο erppendorf και ακολούθησε προσθήκη 200 μl CTAB, το οποίο είχε προηγουμένως τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο για ένα τέταρτο, και ομογενοποίηση. Έπειτα από την προσθήκη 25 mg PVP 25, έγινε εκ νέου ομογενοποίηση και ακολούθησε προσθήκη 200 μl CTAB και ομογενοποίηση. Εν συνεχεία, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 25 °C, όπου επώαστηκαν για διάστημα 25 λεπτών. Έπειτα από ανακίνηση των δειγμάτων (Vortex), έγινε προσθήκη 200 μl φαινόλης, προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιου και ανάδευση των δειγμάτων. Μετά από φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 rpm για 5 λεπτά, έγινε μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erppendorf, προσθήκη 200 μl NaCl 5M και ανάδευση. Ακολούθησε προσθήκη 800 μl αιθυλικής αλκοόλης 95 %, εν συνεχεία ανάδευση και τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20 °C για 12 ώρες (overnight). Μετά το πέρας του διαστήματος επώασης, έγινε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά, απόρριψη της αλκοόλης και διατήρηση του ιζήματος. Ακολούθησε εκ νέου καθαρισμός, μέσω προσθήκης 1 mL αιθυλικής αλκοόλης 70 % και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά και απόρριψη της αλκοόλης. Έπειτα από ολιγόλεπτη παραμονή σε Θ_{δωματίου}, έγινε διάλυση του ιζήματος σε 50 μl ddH₂O.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ποσότητας και ποιότητας του γονιδιωματικού DNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους/ορατού με απορρόφηση στα 260 nm, όπου η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/μL.

2.5.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Με στόχο τον έλεγχο της διαγονιδιακής φύσης των ριζών πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για το γονίδιο *rolB2* και την περιοχή *virCD* του *A. rhizogenes* (Πίνακας 2.2).

Το μείγμα των αντιδράσεων PCR περιείχε 10 ng γονιδιωματικού DNA, 0.25 μM από κάθε εκκινητή, 200 μM dNTPs, 1.25 mM MgCl₂, 1× Taq buffer και 1.25 u πολυμεράση Taq (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega) σε τελικό όγκο 25 μL. Το πρόγραμμα της PCR περιλάμβανε έναν αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 °C για 5 λεπτά, ακολουθούμενο από 30 κύκλους: 94 °C για 1 λεπτό, 52 °C για 1 λεπτό και 72 °C για 1 λεπτό, καθώς και έναν τελικό κύκλο ενίσχυσης στους 72 °C για 7 λεπτά.

Πίνακας 2.2 Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* και της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes*.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Tm (°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		

2.5.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % με ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1X) στα 60 V. Ακολούθησε χρώση της πηκτής σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 mgL⁻¹) και οπτικοποίηση των προϊόντων PCR παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάπτυξη του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού της Ίνουλας

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου που επιτρέπει τον ευχερή γενετικό μετασχηματισμό του είδους *I. helenium* προκειμένου να επιτευχθεί ο σχηματισμός μεγάλης βιομάζας διαγονιδιακού ριζικού συστήματος. Απώτερο σκοπό αποτελεί η ενίσχυση της παραγωγής βιοδραστικών συστατικών στις διαγονιδιακές ρίζες του φυτού ώστε να καταστεί εφικτή η κάλυψη των αναγκών της φαρμακοβιομηχανίας.

Για το γενετικό μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκε ως φορέας το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*, το οποίο έχει αναδειχθεί ότι αποτελεί κατάλληλο επαγωγέα της παραγωγής διαγονιδιακών ριζών σε ένα εύρος διαφορετικών φυτικών ειδών. Για τις ανάγκες βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού της Ίνουλας χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του προαναφερόμενου βακτηρίου, τα *Arqua* και *R1000*, και αξιολογήθηκε συγκριτικά η ικανότητά τους να τροποποιήσουν γενετικά τα φυτά της Ίνουλας.

Η γενετική τροποποίηση επιτεύχθηκε με χρήση σποροφύτων Ίνουλας, ηλικίας μίας εβδομάδας, τα οποία αναπτύχθηκαν σε πλήρως ασηπτικές συνθήκες. Ειδικότερα, αποκόπηκε από αυτά το υπάρχον ριζικό σύστημα, στο ύψος του υποκοτυλίου, και ακολούθησε εμβολιασμός των σποροφύτων με τα βακτηριακά στελέχη *Arqua* και *R1000*. Για την αξιολόγηση του μετασχηματισμού, μέρος των ανεπτυγμένα σποροφύτων αφέθηκαν άθικτα, και αξιοποιήθηκαν ως μάρτυρες σχετικά με τη φυσιολογική ανάπτυξη του ριζικού συστήματος.

3.1.1 Χρόνος έκπτυξης ριζών μετά των εμβολιασμό

Έπειτα από τον εμβολιασμό των σποροφύτων του είδους *I. helenium* με τα βακτηριακά στελέχη *Arqua* και *R1000*, πραγματοποιήθηκε τακτικός έλεγχος σχετικά με την έκπτυξη νέων ριζών και καταγραφή των ημερών που παρήλθαν από τον εμβολιασμό μέχρι και την έκπτυξη των πλευρικών ριζών.

Σχετικά με το χρόνο έκπτυξης νέων ριζών, τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Arqua* εμφάνισαν νέες ρίζες 15 με 17 μέρες έπειτα από τον εμβολιασμό,

ενώ σε αυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *R1000* καταγράφηκε σχηματισμός ριζών σε μικρότερο χρονικό διάστημα, το οποίο κυμάνθηκε μεταξύ 13 και 15 ημερών.

Σχετικά με το φαινότυπο των ριζών, τα μη-μετασχηματισμένα σπορόφυτα ανέπτυξαν ριζικό σύστημα αγρίου τύπου, το οποίο εξάλλου αξιοποιήθηκε ως μάρτυρας για τη συγκριτική τους αξιολόγηση με τα αντίστοιχα μετασχηματισμένα σπορόφυτα. Τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *R1000* σχημάτισαν ριζικό σύστημα που είναι χαρακτηριστικό των μετασχηματισμένων φυτών με τη χρήση του βακτηρίου *A. rhizogenes*. Συγκεκριμένα, στα εν λόγω σπορόφυτα ήταν εμφανής η ανάπτυξη θυσανώδους ριζικού συστήματος, γεγονός που επέτρεψε την ευχερή διάκρισή τους από τις μη-μετασχηματισμένες ρίζες αλλά και την εκτίμηση της συχνότητας του μετασχηματισμού. Τέλος, τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Arqua* δεν διαμόρφωσαν το τυπικό θυσανώδες ριζικό σύστημα αλλά, αντίθετα, ανέπτυξαν ρίζες παρόμοιες με αυτές του μάρτυρα.

Πίνακας 3.1 Αριθμός ημερών που παρήλθαν από τον εμβολιασμό με τα βακτηριακά στελέχη *Arqua* και *R1000* έως και την έκπτυξη νέων ριζών.

Στελέχη <i>A.rhizogenes</i>	Χρόνος εμφάνισης ριζών
<i>R1000</i>	14 ± 1
<i>Arqua</i>	16 ± 1

3.1.2 Αξιολόγηση φαινοτύπου του διαγονιδιακού ριζικού συστήματος

Οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των τριών κατηγοριών σποροφύτων άρχισαν να εντοπίζονται αφότου πέρασαν τέσσερεις εβδομάδες από τον εμβολιασμό τους, με τις διαφορές να αφορούν πρωτίστως στο αναπτυχθέν ριζικό σύστημα και δευτερευόντως στο υπέργειο τμήμα. Συγκεκριμένα, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *R1000* εμφάνισαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο του θυσανώδους ριζικού συστήματος, ο οποίος συχνά συνοδεύονταν από σχηματισμό κάλλου στο σημείο του εμβολιασμού. Η βιομάζα που προέκυψε ήταν εμφανώς μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτήν του μάρτυρα, ως αποτέλεσμα των

έντονων διακλαδώσεων που σχημάτισαν οι διαγονιδιακές ρίζες των μετασχηματισμένων σποροφύτων.

Αντίθετα, τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Arqua* σχημάτισαν ρίζες, οι οποίες δεν ήταν εμφανώς διακριτές από τις ρίζες αγρίου τύπου. Ειδικότερα, στις ρίζες αυτές απουσίαζε τόσο ο θυσσανώδης φαινότυπος όσο και οποιαδήποτε άλλη φαινοτυπική διαφορά σε σύγκριση με τις ρίζες των μαρτύρων. Παρά το γεγονός ότι τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα με το στέλεχος *Arqua* χαρακτηρίζονταν συχνά από αυξημένη βιομάζα ριζών, συγκριτικά με το μάρτυρα, εμφάνιζαν λιγότερο ανεπτυγμένο υπέργειο τμήμα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά του μάρτυρα. Βάσει των ανωτέρω, στα εν λόγω σπορόφυτα δεν κατέστη εφικτή η φαινοτυπική αξιολόγηση της συχνότητας μετασχηματισμού.

Με δεδομένο ότι ο φαινότυπος των ριζών δεν θεωρείται ότι αποτελεί αξιόπιστο κριτήριο ανεπιτυχούς μετασχηματισμού, η διαγονιδιακή φύση των ριζών που αναπτύχθηκαν έπειτα από τον εμβολιασμό εξετάστηκε μέσω αντιδράσεων PCR που στοχεύουν στον έλεγχο της ένθεσης του διαγονιδίου *rolB2*.





Εικόνα 3.1 Σπορόφυτα Ίνουλας που εμβολιάστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*, 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό.

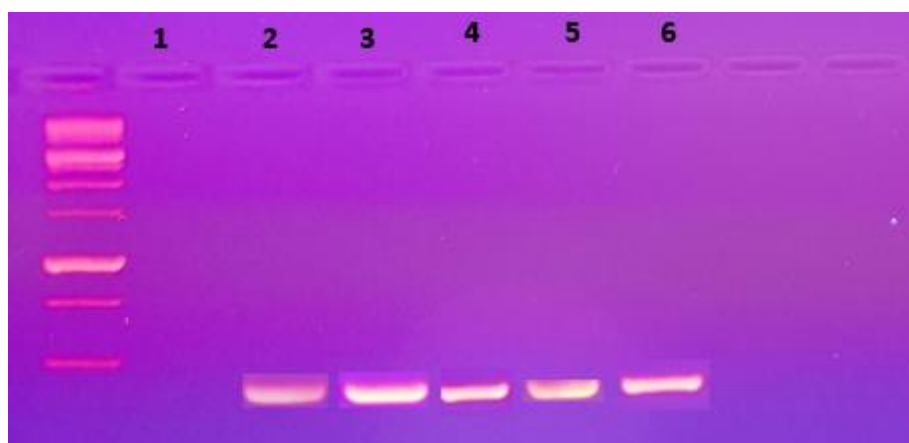


Εικόνα 3.2 Συγκριτική απεικόνιση των μη-μετασχηματισμένων φυτών και των μετασχηματισμένων με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*, 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό.

3.2 Επιβεβαίωση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων την αναπτυγμένων φυτών

Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του γενετικού μετασχηματισμού των φυτών της Ίνουλας, εφαρμόστηκε PCR προκειμένου να ελεγχθεί η ενσωμάτωση του T-DNA του *A. rhizogenes* στα φυτά, ενισχύοντας την αλληλουχία του γονιδίου *rolB2*. Παράλληλα, στόχο αποτέλεσε η εφαρμογή PCR για την ανίχνευση της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης υπολειμμάτων του αγροβακτηρίου στις ρίζες των μετασχηματισμένων σποροφύτων.

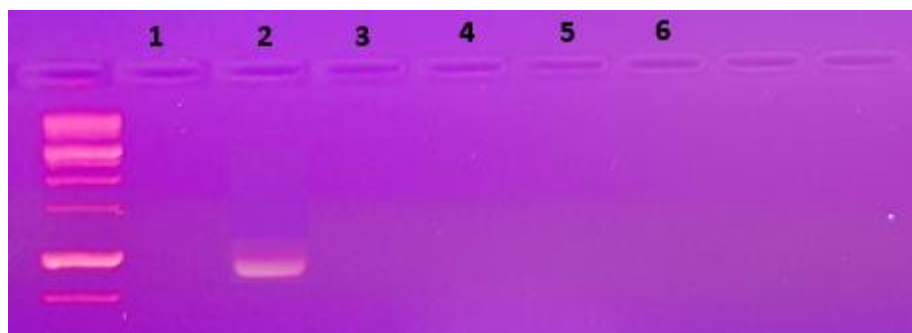
Το γονίδιο *rolB2* εντοπίστηκε σε όλες τις ρίζες που εξετάστηκαν και προέρχονταν από τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*, επαληθεύοντας τη διαγονιδιακή φύση των ανεπτυγμένων ριζών. Αντίθετα, στις ρίζες των μη-μετασχηματισμένων σποροφύτων δεν κατέστη εφικτή η ενίσχυση του προϊόντος που αντιστοιχεί στο γονίδιο *rolB2*. Επιπλέον, όπως αναμενόταν, η παρουσία του γονιδίου *rolB2* επαληθεύτηκε στα βακτηριακά κύτταρα των στελεχών *R1000* και *Arqua* του *A. rhizogenes* (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τον έλεγχο του μετασχηματισμού. Τα αποτελέσματα αφορούν στον εντοπισμό του γονιδίου *rolB2* σε δείγματα ριζών της ίνουλας, μετασχηματισμένων και μη. M: DNA Ladder (Fast Gene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH). 1: Δείγμα ρίζας που προέρχεται από φυτά-μάρτυρες (μη μετασχηματισμένα φυτά ίνουλας). 2: Δείγμα κυττάρων του βακτηρίου *Agrobacterium*. 3 και 4: Δείγματα ρίζας που προέρχονται από φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*. 5 και 6: Δείγματα ρίζας που προέρχονται από φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος

Arqua. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την παρουσία του γονιδίου *rolB2* στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua* καθώς και στα βακτηριακά κύτταρα. Αντίθετα, δεν κατέστη εφικτή η ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* στις ρίζες των μη μετασχηματισμένων σποροφύτων. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη διαγονιδιακή φύση των ριζών που ανέπτυξαν τα σπορόφυτα που μετασχηματίστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*.

Σχετικά με την περιοχή *virCD* του *A. rhizogenes*, η ενίσχυση του σχετικού προϊόντος κατέστη εφικτή στα κύτταρα του *A. rhizogenes*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο της επιτυχίας του μετασχηματισμού. Η αδυναμία ενίσχυσης του σχετικού προϊόντος στις ρίζες όλων των κατηγοριών σποροφύτων επιβεβαιώνει την απουσία υπολειμμάτων βακτηριακού DNA στις ρίζες των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη *R1000* και *Arqua* (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Απεικόνιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τον έλεγχο του μετασχηματισμού. Τα αποτελέσματα αφορούν στον ενίσχυση της περιοχής *virCD* σε δείγματα ριζών της ίνουλας, μετασχηματισμένων και μη. M: DNA Ladder (Fast Gene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH). 1: Δείγμα ρίζας που προέρχεται από φυτά-μάρτυρες (μη μετασχηματισμένα φυτά ίνουλας). 2: Δείγμα κυττάρων του βακτηρίου *Agrobacterium*. 3 και 4: Δείγματα ρίζας που προέρχονται από φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*. 5 και 6: Δείγματα ρίζας που προέρχονται από φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Arqua*. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ενίσχυση της περιοχής *virCD* αποκλειστικά στα βακτηριακά κύτταρα και την ταυτόχρονη απουσία της τόσο στους μάρτυρες όσο και τις ρίζες των φυτών που εμβολιάστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την απουσία υπολειμμάτων του βακτηρίου στις μετασχηματισμένες ρίζες, επιβεβαιώνοντας τη διαγονιδιακή φύση των ριζών που ανέπτυξαν τα σπορόφυτα που μετασχηματίστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *Arqua*.

3.3 Επίδραση βακτηριακού στελέχους

Λαμβάνοντας υπόψη τα συνολικά αποτελέσματα, συμπεραίνεται πως το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* είναι ικανό να επάγει την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στην ίνουλα, γεγονός το οποίο προκύπτει τόσο βάσει των φαινοτυπικών δεδομένων όσο και της επιτυχούς ένθεσης του διαγονιδίου *rolB2* στο σύνολο των ριζών που εξετάστηκαν. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι αναδείχθηκε η ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των βακτηριακών στελεχών *R1000* και *Arqua* αναφορικά με το φαινότυπο των νέων ριζών, το χρόνο έκπτυξής τους, τον αριθμό των ριζικών διακλαδώσεων αλλά και τη συχνότητα του μετασχηματισμού. Βάσει των αποτελεσμάτων, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το βακτηριακό στέλεχος επιδρά σημαντικά στην αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού αλλά και στα χαρακτηριστικά του διαγονιδιακού ριζικού συστήματος.

Σχετικά με την επίδραση του βακτηριακού στελέχους στο φαινότυπο των ριζών, που αποτελεί κριτήριο για την εκτίμηση της συχνότητας μετασχηματισμού, εντοπίστηκαν αρκετές διαφορές. Στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *R1000* εντοπίστηκε η ανάπτυξη του χαρακτηριστικού θυσσανώδους ριζικού συστήματος, που φέρει πλήθος ριζικών διακλαδώσεων. Αντίθετα, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Arqua* στερούνταν του εν λόγω φαινότυπου, εμφανίζοντας ανάλογο φαινότυπο με του αγρίου τύπου, αν και η διαγονιδιακή τους φύση επιβεβαιώθηκε μέσω της επιτυχούς ένθεσης του γονιδίου *rolB2*. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν ότι η δομή, ο αριθμός των ριζών και η βιομάζα τους υπόκεινται σε σημαντική εξάρτηση από το βακτηριακό στέλεχος (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2 Η επίδραση του βακτηριακού στελέχους του *A. rhizogenes* αναφορικά με το χρόνο εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και την αποτελεσματικότητα του γενετικού μετασχηματισμού.

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

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

^b Αδυναμία εκτίμησης της συχνότητας μετασχηματισμού, λόγω αδυναμίας φαινοτυπικής διάκρισης του ριζικού συστήματος από το αντίστοιχο των φυτών του μάρτυρα.

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

Συνολικά, τα ευρήματα καταδεικνύουν τη σημαντική επίδραση του βακτηριακού στελέχους για το γενετικό μετασχηματισμό και την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών στο είδος *Inula*. Συνεκτιμώντας τη συχνότητα του μετασχηματισμού και το φαινότυπο των διαγονιδιακών ριζών, αναδεικνύεται ως καταλληλότερο το στέλεχος *R1000* του *A. rhizogenes*. Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζεται η προτεινόμενη μεθοδολογία μετασχηματισμού του είδους *Inula*.

Πίνακας 3.3 Μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Inula helenium* με χρήση του στελέχους *R1000* του *A. rhizogenes*.

Ημέρα	Διαδικασία	Θρεπτικό υπόστρωμα
1	Απολύμανση σπόρων & Τοποθέτηση των σπόρων σε υπόστρωμα βλάστησης	MS/Basal salt: 2,2 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 5 g/L
3	Προετοιμασία των βακτηριακών καλλιεργειών που αποτελούν το εμβόλιο για το μετασχηματισμό	LB, προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών
7	Προετοιμασία του εμβολίου για το μετασχηματισμό	MS: 4,4 g/L Sucrose: 30 g/L Ακετοσυριγκόνη: 100 μM
	Μετασχηματισμός με το βακτηριακό στέλεχος <i>R1000</i> του <i>A. rhizogenes</i> & τοποθέτηση των εκφύτων σε υπόστρωμα συν-καλλιέργειας	MS//vitamins: 2,2 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 5 g/L Ακετοσυριγκόνη: 100 μM
9	Μεταφορά των εκφύτων σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/vitamins: 2,2 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 5 g/L Σεφοταξίμη: 250 mg/L
23	Μεταφορά σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/vitamins: 2,2 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 5 g/L Σεφοταξίμη: 250 mg/L
40	Εκτίμηση της συχνότητας του μετασχηματισμού & Έλεγχος για την ένθεση και έκφραση των διαγονιδίων	PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Διαχρονικά, οι άνθρωποι προσπαθούν να καλύψουν τις ανάγκες τους σε ποικίλες πτυχές της ζωής τους, τόσο στην υγεία και τη διατροφή τους όσο και στον καλλωπισμό τους, μέσω της αξιοποίησης κατάλληλων κατά περίπτωση φυτικών ειδών. Ιδιαίτερα στον τομέα της ιατρικής, έχει καταδειχθεί, εδώ και αιώνες, η σημαντικότερη συνεισφορά των φυτών στην ίαση ποικίλων ασθενειών, με τις βιολογικές τους ιδιότητες να οφείλονται κατά βάση στη σύνθεση πληθώρας δευτερογενών μεταβολιτών (Rahmat and Kang, 2019). Σε πρακτικό επίπεδο, τα φαρμακευτικά φυτά αξιοποιούνται για παραγωγή φαρμάκων είτε στην αυτούσια μορφή τους είτε στη μορφή προϊόντων που παράγονται από αυτά. Ως εκ τούτου, τα φαρμακευτικά φυτά αποτελούν αντικείμενο συστηματικής μελέτης σχετικά με τη δράση τους, το φυτοχημικό τους περιεχόμενο αλλά και την ανάπτυξη μεθόδων που επιτρέπουν την αξιοποίηση των βιοδραστικών ιδιοτήτων τους.

Στη ευρεία κατηγορία των φαρμακευτικών φυτών, φυτό καίριας σημασίας αποτελεί η Ίνουλα καθώς το λάδι της έχει ισχυρή αντιελμινθική δράση (Stojakowska *et al.*, 2010), ενώ τα εκχυλίσματα από τη ρίζα φέρουν αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντιελμινθική δράση (Konishi, *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2010; Stojanović-Radić *et al.*, 2010). Επιπλέον, οι ενώσεις που περιέχονται στην ίνουλα έχουν κυτταροτοξική δράση και συμβάλλουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε σειρές καρκινικών κυττάρων (Lawrence *et al.*, 2001; Konishiet *al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007). Οι ήδη γνωστές ιδιότητες της ίνουλας έχουν αποτελέσει τη βάση για τη διεξαγωγή ερευνών σχετικά με το φυτοχημικό περιεχόμενο του είδους, οι οποίες εξάλλου έχουν συμβάλει στην ταυτοποίηση πληθώρας ενώσεων με βιοδραστικό δυναμικό.

Αν και είναι ευρέως αποδεκτή η συνεισφορά των φαρμακευτικών φυτών στην παραγωγή φαρμάκων ή/και συμπληρωμάτων διατροφής, η ευχερής αξιοποίησή τους περιορίζεται σημαντικά από την έλλειψη της απαιτούμενης ποσότητας βιομάζας με υψηλό βιοδραστικό δυναμικό, η οποία με τη σειρά της περιορίζεται λόγω της έλλειψης μεθόδων και πρωτοκόλλων καλλιέργειας των εν λόγω ειδών, συμπεριλαμβανομένης και της Ίνουλας. Τα τελευταία χρόνια, ένα πλήθος μελετών εστιάζει στην ανάπτυξη βελτιστοποιημένων μεθόδων για την ενίσχυση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών με βιοδραστικές ιδιότητες. Στο πλαίσιο αυτό, η επιστήμη της βελτίωσης φυτών, συμπεριλαμβανομένων των τεχνολογιών της γενετικής μηχανικής, προσφέρουν ολοένα και περισσότερες δυνατότητες για την ενίσχυση της βιομάζας

με υψηλό βιοδραστικό δυναμικό ή/και τη στοχευμένη ενίσχυση της παραγωγής συγκεκριμένων βιοδραστικών ενώσεων (Rahmat and Kang, 2019)

Η βελτιστοποίηση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μία προσέγγιση που χρησιμοποιείται εκτεταμένα από τα παλαιά χρόνια, κυρίως μέσω των *in vitro* μεθόδων και της γενετικής μηχανικής, η οποία συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση του αγροβακτηρίου ως φορέα ενσωμάτωσης της επιθυμητής γενετικής πληροφορίας. Έως και σήμερα, έχει καταγραφεί πλήθος μελετών που εστιάζει στην εφαρμογή των ανωτέρω μεθόδων σε φαρμακευτικά φυτά. Παρά το γεγονός ότι έχει αναδειχθεί η αποτελεσματικότητα και των δύο μεθόδων για παραγωγή μεγάλης ποσότητας δευτερογενών μεταβολιτών (Babich *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2022), οι προσεγγίσεις της γενετικής μηχανικής εμφανίζουν συγκριτικά πλεονεκτήματα καθώς επιτρέπουν σε πιο σύντομο χρόνο την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών (Halder *et al.*, 2021).

Αναφορικά με τις μεθόδους της γενετικής μηχανικής, η πλέον συνήθης διαδικασία αφορά στη χρήση βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Agrobacterium* ως φορείς μεταφοράς και ενσωμάτωσης στο φυτικό γονιδίωμα των γονιδίων στόχων. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αξιοποιηθεί ευρέως το είδος *A. rhizogenes* με στόχο την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών που φέρουν υψηλό βιοδραστικό δυναμικό είτε λόγω της αυξημένης βιομάζας των ριζών, συγκριτικά με τις αντίστοιχες αγρίου τύπου, είτε λόγω της λειτουργικής τροποποίησής τους για παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας βιοδραστικών συστατικών, όπως οι δευτερογενείς μεταβολίτες (Hussain *et al.*, 2022). Η εξαγωγή της απαιτούμενης ποσότητας ουσιών στόχων από διαγονιδιακές ρίζες, μέσω των τεχνολογιών της γενετικής μηχανικής, έχει ήδη επιτευχθεί σε ένα εύρος φαρμακευτικών φυτών (Tusevski *et al.* 2017), χωρίς ωστόσο να αναφέρονται αντίστοιχες διαδικασίες στην Ίνουλα.

Με δεδομένη της έλλειψη ερευνών σχετικά με τις δυνατότητες αξιοποίησης των βιοδραστικών συστατικών που παράγει η ίνουλα, αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *I. helenium* με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*. Βάσει της προτεινόμενης μεθοδολογίας, τα φυτά που προκύπτουν χαρακτηρίζονται ως σύνθετα καθώς αποτελούνται από διαγονιδιακές ρίζες και αγρίου τύπου υπέργειο μέρος. Απώτερο στόχο αποτελεί η χρήση των διαγονιδιακών ριζών για απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών με βιοδραστικές ιδιότητες. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, χρησιμοποιήθηκαν δύο βακτηριακά στελέχη του *A. rhizogenes*, τα *Arqua* και *R1000*.

Τα αποτελέσματα της έρευνας υποδηλώνουν τον καθοριστικό ρόλο που παίζει το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται ως φορέας του μετασχηματισμού αλλά και η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των μετασχηματισμένων φυτών. Ειδικότερα, οι υπό μελέτη κατηγορίες σποροφύτων διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους τόσο ως προς τη δομή όσο και ως προς τη συνολική βιομάζα του ριζικού συστήματος. Όπως αναμενόταν, τα μη μετασχηματισμένα φυτά ανέπτυξαν ριζικό σύστημα που στερούνταν ριζικών τριχιδίων και πλαγιοτροπικής ανάπτυξης, ενώ τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα ανέπτυξαν διαφοροποιημένο ριζικό σύστημα, η εμφάνιση και δομή του οποίου εμφάνισε σημαντικότητα εξάρτηση από το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στο μετασχηματισμό.

Η χρήση του βακτηριακού στελέχους *R1000* για τον εμβολιασμό των εκφύτων αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική συγκριτικά με το στέλεχος *Arqua*. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από το γεγονός ότι τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *R1000* ανέπτυξαν πιο πλούσιο ριζικό σύστημα, αποτελούμενο από περισσότερες πλευρικές διασταυρώσεις και, γενικά, αυξημένη βιομάζα εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα που εμβολιάστηκαν με το *Arqua*. Επιπλέον, τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος *R1000*, σχημάτισαν κάλλο και δημιούργησαν μακριές προεκτάσεις ριζικών τριχιδίων στην περιοχή του υποκοτυλίου. Αντίθετα, τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Arqua*, αν και ανέπτυξαν διαγονιδιακό ριζικό σύστημα όπως προκύπτει από την επιτυχή ένθεση του διαγονιδίου *rolB2*, εμφάνισαν φαινότυπο αντίστοιχο με αυτόν των φυτών αγρίου τύπου (μη-μετασχηματισμένων). Ειδικότερα, στην εν λόγω κατηγορία φυτών απαιτήθηκε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την έκπτυξη νέων ριζών, οι οποίες ταυτόχρονα εμφάνισαν μειωμένο αριθμό πλευρικών διασταυρώσεων και μειωμένη συνολική ποσότητα βιομάζας ριζών. Γενικά, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το *Arqua*, σχημάτισαν ρίζες που δε διέφεραν σημαντικά από αυτές των μη μετασχηματισμένων φυτών, καθιστώντας συνολικά μη εφικτή τη σαφή διάκριση των μετασχηματισμένων ριζών από τις αντίστοιχες αγρίου τύπου. Ως εκ τούτου, στην εν λόγω κατηγορία φυτών δεν κατέστη εφικτή η εκτίμηση της συχνότητας μετασχηματισμού, η οποία βασίζεται στη φαινοτυπική αξιολόγηση των νεοεκπτυσσόμενων ριζών.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την καταλληλότητα των στελεχών του *A. rhizogenes* για επαγωγή ριζικών τριχιδίων υποστηρίζονται και από ευρήματα προηγούμενων ερευνών σε φαρμακευτικά φυτά. Σχετικά με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*, έχει μετασχηματίσει επιτυχώς τα είδη *Astragalus membranaceus*, *Gentiana macrophylla* και *Eruca sativa* (Xue *et al.*, 2008), *Artemisia vulgaris* (Sujatha *et al.*, 2013) και *Withaniasom nifera* (Thilip *et al.*,

2015), ενώ το στέλεχος *Arqua* έχει αναδειχθεί ως ικανό να μετασχηματίζει τα είδη *Lycium ruthenicum*, *Lycium barbarum* και *Glycyrrhiza uralensis* (Chahel, 2019; Chahel *et al.*, 2019). Η ενίσχυση της συχνότητας μετασχηματισμού, λόγω της χρήσης του στελέχους *R1000*, οφείλεται στην υψηλή εγγενή αποδοτικότητα του πλασμιδίου Ri του *R1000* για μεταφορά του Ri T-DNA στα κύτταρα ξενιστές των φυτών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης (Mariashibu *et al.*, 2013).

Ο γενετικός μετασχηματισμός των φυτών πραγματοποιήθηκε με εισαγωγή, μέσω του Ri-T-DNA, του γονιδίου *rolB2*, το οποίο διαδραματίζει καίριο ρόλο στην επαγωγή ριζικών τριχιδίων. Το *A. rhizogenes* είναι ικανό να μεταφέρει δύο ανεξάρτητα T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού ξενιστή, τα TL-DNA και TR-DNA. Το πρώτο περιλαμβάνει τα γονίδια *rolA*, *rolB*, *rolC* και *rolD*, τα οποία αποτελούν βασική προϋπόθεση για τον σχηματισμό ριζικών τριχιδίων (Faraz *et al.*, 2020). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, το σύνολο των δειγμάτων ριζών που εξετάστηκαν είχε ενσωματωμένο στο γονιδίωμα το γονίδιο *rolB2*, παρέχοντας την επιβεβαίωση σχετικά με τη διαγονιδιακή φύση των ριζών στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη *Arqua* και *R1000*. Περαιτέρω, η μετασχηματισμένη φύση των ριζών επιβεβαιώθηκε και από την αδυναμία ενίσχυσης της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* στις ρίζες των εμβολιασμένων φυτών.

Ως προς τη σύσταση των θρεπτικών μέσων, τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν ότι η αυξημένη ποσότητα σουκρόζης, σε περιεκτικότητα 3 %, δρα θετικά στη διαδικασία του μετασχηματισμού, γεγονός που σχετίζεται τόσο με την ανάπτυξη του *Agrobacterium* (Leth and Mc Donald, 2017) όσο και με την αυξημένη παραγωγή βιομάζας, όπως εξάλλου έχει αναφερθεί και σε άλλα φυτικά είδη, όπως η ίσατις η βαφική (*Isatis tinctoria* L.) (Gai *et al.*, 2015). Σε συμφωνία με σχετικές αναφορές σε άλλα φυτικά είδη, τα ευρήματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις ότι η αυξημένη ποσότητα ακετοσυρινγκόνης συμβάλλει θετικά στη συχνότητα μετασχηματισμού αλλά και στην ταχύτητα ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών (Saranya Krishnan & Siril, 2016; Niazian *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020). Η ακετοσυρινγκόνη είναι μία φαινόλη που απαντάται σε φυσική μορφή και είναι ευρέως γνωστή για την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *vir* κατά τη διαδικασία φυσικής μόλυνσης με το βακτήριο *Agrobacterium* (Stachel *et al.*, 1985). Η έκφραση των γονιδίων *vir* ενεργοποιείται έπειτα από την παραγωγή φαινολικών ενώσεων στους τραυματισμένους ιστούς, μέσω της VirG πρωτεΐνης, η οποία επάγει την έκφραση των υπολοίπων γονιδίων *vir* (Tzfira and Citovsky, 2000), συνεισφέροντας στη μεταφορά του Ri T-DNA στα φυτικά κύτταρα. Βάσει της δράσης της, η προσθήκη της

ακετοσυριγκόνης στο μέσο του εμβολιασμού και στο θρεπτικό μέσο συγκαλλιέργειας οδηγεί σε ενίσχυση της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού (Du *et al.*, 2022). Επιπλέον, καθοριστικό ρόλο στην απόδοση του μετασχηματισμού παίζει και το 2- αιθανοσουλφονικό οξύ, γνωστό με την κοινή ονομασία MES, που αποτελεί ένα ρυθμιστικό παράγοντα εξισορρόπησης της τιμής του pH στα θρεπτικά υποστρώματα. Η εν λόγω ιδιότητα καθιστά το MES κατάλληλο ρυθμιστή σε καλλιέργειας φυτικών κυττάρων, ιδιαίτερα όπου απαιτείται η δράση των φορέων του γένους *Agrobacterium* κατά τις διαδικασίες του μετασχηματισμού (Iwakawa *et al.*, 2021).

Συμπερασματικά, η προτεινόμενη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού της Ίνουλας προσφέρει δυνατότητες ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών, επιτυγχάνοντας υψηλή συχνότητα μετασχηματισμού, ιδιαίτερα με τη χρήση του βακτηριακού φορέα *R1000*. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποτελούν τη βάση για την περαιτέρω βελτίωση του πρωτοκόλλου, αποσκοπώντας στην ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς του για επαγωγή διαγονιδιακών ριζών ίνουλας. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτά, δημιουργούνται σημαντικές προοπτικές αξιοποίησης των διαγονιδιακών ριζών για παραγωγή και απομόνωση βιοδραστικών συστατικών, αξιοποιήσιμων στη φαρμακοβιομηχανία, σε ποσότητα ικανή να καλύψει τις αυξανόμενες απαιτήσεις ζήτησης. Συμπληρωματικά θα λειτουργήσει και η σταδιακή εξέλιξη των τεχνολογιών καλλιέργειας φυτικών κυττάρων σε βιοαντιδραστήρες που θα δημιουργήσουν το έδαφος για ταχεία και ανεξάρτητη από τις περιβαλλοντικές συνθήκες παραγωγή της απαιτούμενης ποσότητας βιομάζας για τις ανάγκες της βιομηχανίας.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη υποδηλώνουν τη δυνατότητα γενετικού μετασχηματισμού του είδους *I. helenium*, μέσω του βακτηριακού φορέα *A. Rhizogenes*, για αυξημένη παραγωγή διαγονιδιακών ριζών που αποτελούν εργοστάσια παραγωγής βιοδραστικών συστατικών τους. Βάσει των αποτελεσμάτων, αναδείχθηκε ως καταλληλότερο για το σκοπό αυτό το βακτηριακό στέλεχος *R1000*, καθώς επέτρεψε την ανάπτυξη ριζικού συστήματος που ήταν ευχερώς διακριτό φαινοτυπικά από τις αντίστοιχες ρίζες αγρίου τύπου καθώς χαρακτηρίζονταν από αυξημένη βιομάζα, μεγαλύτερο αριθμό πλευρικών διασταυρώσεων, οι οποίες εμφάνιζαν ταυτόχρονα μεγαλύτερο μήκος. Αντίθετα, το βακτηριακό στέλεχος *Arqua* οδήγησε σε ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών, οι οποίες ωστόσο δε διακρίνονταν σαφώς, ως προς τη δομή και αύξησή τους από τις αντίστοιχες αγρίου τύπου.

Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για τη διεξαγωγή εντατικών ερευνών στο πλαίσιο της βελτίωσης του πρωτοκόλλου ώστε να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητά του για ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών Ίνουλας. Η επίτευξη του στόχου αυτού θα επιτρέψει την παραγωγή της απαιτούμενης ποσότητας βιομάζας ώστε να καταστεί εφικτή η εξαγωγή βιοδραστικών ουσιών, χωρίς να υφίσταται εξάρτηση από περιβαλλοντικούς ή άλλους παράγοντες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

Ahloowalia B. S., Maluszynski M., Nichterlein K., VanZanten L., & Weck E. (1998). Induced mutations and in vitro culture techniques for the improvement of horticultural plants. In *Proc. Second International Crop Science congress. Crop Productivity and sustainability, Shaping the future*. V. L. Chopra., R. B. Singh and Anupam Varma (eds) (pp. 405-412).

Akutsu M, Ishizaki T, Sato H (2004) Transformation of the monocot *Alstroemeria* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Mol Breed* 13:69–78.

Alejandro, Barrero A (2000). «New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones». *Fitoterapia* 66 (71): 60–64.

Argyropoulos D, Carmody K, Cogliandro A, Cortegano M, Jongh W, & Paoli A. (2019). EIP-AGRI Focus Group plant-based medicinal and cosmetic products.

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.

Bahramnejad B, Naji M, Bose R, Jha S (2019) A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnol Adv* 37:107405.

Balasubramani, S. P., Murugan, R., Ravikumar, K., & Venkatasubramanian, P. (2010). Development of ITS sequence based molecular marker to distinguish, *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) from its adulterants. *Fitoterapia*, 81(6), 503-508.

Bathoju G, Rao K, Giri A (2017) Production of sapogenins (stigmasterol and hecogenin) from genetically transformed hairy root cultures of *Chlorophytum borivillanum* (*Safed musli*). *Plant Cell Tiss Org (PCTOC)* 131:369–376.

Bhojwani SS, Razdan MK. (1996) *Plant tissue culture: Theory and Practice: developments in crop science*. Elsevier, Amsterdam 5.

Bilińska E., Buchwald W., (2015) Biology of germination of medicinal plant seeds. Part XIXb. Diaspores of *Inula helenium* L. from Asteraceae family, Department of Botany, Breeding and Agricultural Technology of Medicinal Plants Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants, Vol. 61

Bojadzievski P. (1992). The health services in Bitola through the centuries. Bitola: Society of science and art; pp. 15–27

Cantrell, C.L., Fischer, N.H., Urbatsch, L., McGuire, M.S., Franzblau, S.G., (1998). Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central and North America. *Phytomedicine*, vol. 5, pp. 137-145

Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spanò L, Capone I, Costantino P. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Molecular and General Genetics* 209(3):475-480.

Cardarelli, M., Spano, L., De Paolis, A., Mauro, M. L., Vitali, G., & Costantino, P. (1985). Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant molecular biology*, 5, 385-391.

Cardoso, JC; Sheng G., LT; SILVA, JAT. (2018). Micropropagation in the twentyfirst century. In: LOYOLA-VARGAS, V, OCHOA-ALEJO, N (org). *Methods in molecular biology*. 4th ed. New York: Springer. 1815: 17-46.

Celakoski N. (1997) Saint Naum of Ohrid Miracle worker. Prilep: Raster;. pp. 85–6

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.

Chen SL, Yu H, Luo HM, Wu Q, Li C F, Steinmetz A. (2016) Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects *Chin Med* 11 ,37.

Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., CasseDelbart, F., Tempé, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295, 432–434. doi: 10.1038/295432a0

Chisholm, Hugh, ed. (1911). *Elecampane*, *Encyclopædia Britannica*. Vol. 9 (11th ed.). Cambridge University Press. p. 169.

Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37, 687-700.

Culpeper, Nicholas (1814). Culpeper's Complete Herbal. No. 8, White's Row, Spitalfields: Richard Evans. p. 70

Danial M., Keng C.L., Shahrul S., Alwee R.S. and Subramaniam S., (2012) Hairy roots induction from difficult-to-transform pharmacologically important plant *Eurycoma longifolia* using wild strains of *Agrobacterium rhizogenes*, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(3), pp. 479-487, 23

Daspute AA, Yunxuan X, Gu M et al (2019) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy roots transformation as a tool for exploring aluminum-responsive genes function. *Fut Sci OA*.

Dervendzi V. (1992) Contemporary treatment with medicinal plants. Skopje: Tabernakul

El Garhy MF, Mahmoud LH. (2002) Anthelmintic efficacy of traditional herbs on *Ascaris lumbricoides*. *J Egypt Soc Parasitol*. Dec;32(3):893-900.

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

Erich Oberdorfer(2001) *Pflanzen soziologische Exkursions flora für Deutschland und angrenzende Gebiete*. Unter Mitarbeit von Angelika Schwabe und Theo Müller. p. 921.

Fallahzadeh A, Mohammadi S, (2016) An Investigation of the Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of *Inula Helenium* on Male Rats. *J BabolUniv Med Sci*; 18 (12) :57-63

Faraz, R., Gokhale, M., & Gothalwa, R. (2020). Hairy Root Culture Through *Agrobacterium rhizogenes* for Enhancement of Secondary Metabolites Production in Medicinal Plants: A Review.

Flores, H.E.; Vivanco, J.M.; Loyola-Vargas, V.M. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci* 4:220–226; 1999

Garro-Monge G, Gatica-Arias AM, Valdez-Melara. (2008) Somatic embryogenesis, plant regeneration and acemannan detection in Aloe (*Aloe barbadensis* M.). *AgronomiaCostarricense*;32:41-52.

Gelvin, S. B. (2009). *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant physiology*, 150(4), 1665-1676

Gerhard Wagenitz(1979) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Pteridophyta, Spermatophyta..* Band VI. Teil 3: Angiospermae, Dicotyledones 4 (Compositae 1, Allgemeiner Teil, Eupatorium – Achillea)., p 166–168

Gershenson J, Ullah C (January 2022). "Plants protect themselves from herbivores by optimizing the distribution of chemical defenses". *Proc Natl Acad Sci USA*. 119 (4).

Giacomo Nicolini(1960) *Enciclopedia Botanica Motta*, Milano, Federico p 537

Greer, John Michael (2017). *The Encyclopedia of Natural Magic* (First ed.). Woodbury, Minnesota: Llewellyn. p. 101

Greene M, Depew D J, (2004) *The philosophy of biology: an episodic history*Cambridge University Press

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.

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.

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.

Hamilton AC. (2004) Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodivers Conserv.*;13:1477–517.

Hanen Najjaa, Sami Zouari, Ingrid Arnault, Jacques Auger, Emna Ammar & Mohamed Neffati, « *Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre Allium, Allium roseum L. et Allium ampeloprasum L.* », *Acta Botanica Gallica*, vol. 158, n° 1, 2011, p. 112

Hansen, J., Jørgensen, J. E., Stougaard, J., & Marcker, K. A. (1989). Hairy roots—a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Reports*, 8, 12-15.

Harvey JJ Lincoln JE Gilchrist DG (2008) Programmed cell death suppression in transformed plant tissue by tomato cDNAs identified from an Agrobacterium rhizogenes-based functional screen. *Mol Genet Genomics* 279: 509–521

Hayta S, Smedley MA, Demir SU, Blundell R, Hinchliffe A, Atkinson N, Harwood WA (2019) An efficient and reproducible Agrobacterium-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods* 15:121.

Howard, Michael (1987). Traditional Folk Remedies. *Century*. p. 135

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.

Kays, Stanley J.; Nottingham, Stephen F. (2007). Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke: *Helianthus tuberosus* L. *CRC* p 58

Kelly K. History of medicine. New York: Facts on file; 2009. pp. 29–50

Koetle MJ, Finnie JF, Balázs E, Van Staden J (2015) A review on factors affecting the Agrobacterium-mediated genetic transformation in ornamental monocotyledonous geophytes. *South Afr J Bot* 98:37–44.

Köhler F.E., (1897) Köhler's Medizinal-Pflanzen

Kumar, J., Gupta, P.K. (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnol Rep* 2, 93–112

Laskar, R. A., Khan, S., Deb, C. R., Tomlekova, N., Wani, M. R., Raina, A., & Amin, R. (2019). Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Diversity, Cytogenetics and Breeding. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes*(pp. 319-369). Springer, Cham.

Lim HS, Jin SE, Kim OS, Shin HK, JeongSJ.(2015) Alantolactone from Saussurealappa Exerts Antiinflammatory Effects by Inhibiting Chemokine Production and STAT1 Phosphorylation in TNF- α and IFN- γ -induced in HaCaT cells. *Phytother Res.* (7):1088-96. doi: 10.1002/ptr.5354

Lima JE Benedito VA Figueira A Peres LE (2009) Callus, shoot and hairy root formation in vitro as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants. *Plant Cell Rep* 28: 1169–1177

Lorence A, Verpoorte R (2004) Gene transfer and expression in plants. In: Balbás P, Lorence A (eds) *Methods in molecular biology*, vol 267, recombinant gene expression. Reviews and protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ; USA, pp. 329–350

Ma J, Rong K, Cheng K. (2012) Research and practice on biodiversity in situ conservation in China: progress and prospect. *Sheng Wu Duo Yang Xing*.;20:551–8.

Manokar, J., Balasubramani, S. P., & Venkatasubramanian, P. (2017). Nuclear ribosomal DNA e ITS region based molecular marker to distinguish the medicinal plant *Gmelina arborea* Roxb. Ex Sm. from its substitutes and adulterants. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 2017, 1–4.

Manzo-Sanchez, G., Buenrostro-Nava, M. T., Guzman-Gonzalez, S., Orozco-Santos, M., Youssef, M., & Escobedo-Gracia, M. R. M. (2015). *Genetic diversity in bananas and plantains (Musa spp.)*.

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.

Meyer D, Bayarri S, Tárrega A, Costell E. (2011). Inulin as texture modifier in dairy products. *Food Hydrocolloids*. 25 years of Advances in Food Hydrocolloid Research. **25**

Meyer, A., Tempe, J., & Costantino, P. (2000). Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *Plant-microbe interactions*, 5, 93-139.

Nakano Y (2017) Effect of acetosyringone on *agrobacterium*-mediated transformation of *Eustoma grandiflorum* leaf disks. *JARQ* 51:351–355.

Ono, N. N., & Tian, L. (2011). The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant Science*, 180(3), 439-446.

O'Shea, S (2009). In vitro activity of *Inula helenium* against clinical *Staphylococcus aureus* strains including MRSA. *British Journal of Medical Science* **66** (4): 186–9

Pešić M, (2015) Development of natural product drugs in a sustainable manner, Department of Neurobiology, Institute for Biological Research Siniša Stanković, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., & Tempé, J. (1983). Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Molecular and General Genetics MGG*, 190(2), 204-214.

Petrovska BB. (2012) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* (11):1-5. doi: 10.4103/0973-7847.95849. PMID: 22654398; PMCID: PMC3358962.

Pimm S, Russell G, Gittleman J, Brooks T.(1995) The future of biodiversity. *Science*. 269:347

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.

Rasul A, Khan M, Ali M, Li J, Li X. (2013) Targeting apoptosis pathways in cancer with alantolactone and isoalantolactone. *ScientificWorldJournal*.

Rauter A P, Vogel P, Queneau Y,(2010). Carbohydrates in Sustainable Development I. Springer. P. 17

Roberfroid, M. B. (2003). Introducing inulin-type fructans. *Br. J. Nutr.* **93**: 13–26

Roques, Alain (2015). Processionary moths and climate change : an update. Dordrecht: Springer. p. 1.

Rout GR, Samantary S, Das P. (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* ;18:91-120.

Ryder, M. H., Tate, M. E., & Kerr, A. (1985). Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs. *Plant physiology*, 77(1), 215-221.

Sanderson H, Renfrew J M ,Prance G, Nesbitt M. (2005). *The Cultural History of Plants*. Routledge. p. 102

Sandro P. (1982) *Flora d'Italia. Volume terzo*, Edagricole, p. 44

Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S., (2015), Metabolomic profile of the genus *Inula*. *Chem. Biodivers.*12,859-906

Sevón, N., &Oksman-Caldentey, K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, 68(10), 859-868.

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

Sharma, A., Kumar, N., Mishra, I.G. (2018). Role of Molecular Marker in the Genetic Improvement of the Medicinal and Aromatic Plants. In: Kumar, N. (eds) *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Singapore.

Sharma, S., Satardekar, K.V., Barve, S.S. (2018). Genetic Improvement of Medicinal and Aromatic Plants Through Haploid and Double Haploid Development. In: Kumar, N. (eds) Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants. Springer, Singapore.

Sharma, S., Singh, Y., Verma, P.K., Vakhlu J, (2021) Establishment of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of *Crocus sativus* L.. *3 Biotech* **11**, 82

Singh P.R. and Singh L.J. (2021) In vitro propagation for improvement of medical plants: A review. *J Pharmacogn Phytochen* ; 10(1) 1484-1489

Slightom, J. L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., & Tepfer, D. (1986). Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *Journal of Biological Chemistry*, 261(1), 108-121.

Soledad Mora-Vásquez, Guillermo Gael Wells-Abascal, Claudia Espinosa-Leal, Guy A. Cardineau, Silverio García-Lara, (2022) «Application of metabolic engineering to enhance the content of alkaloids in medicinal plants» 14 e00194

Spiridon I., Nechita C.B., Niculau M, Silion M, Armatu A, Teaca C.A. (2013). Antioxidant and chemical properties of *Inula helenium* root extracts. *cent.eur.j.chem.* **11**, 1699–1709

Stojanović-Radić Z., Čomić L., Radulović N, Blagojević P, Denić M, Miltojević A, Rajković J, Mihajilov-Krstev T (2012). Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 1015–1025

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.

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.

Tucakov, J. (1971). Healing with plants—phytotherapy. *Beograd: Culture*, 180, 90.

Tungland B, (2018), "Chapter 8 - Nondigestible Fructans as Prebiotics", *Human Microbiota in Health and Disease*, Academic Press, pp. 349–379

Upreti Y, Asselin H, Dhakal A, Julien N. (2012) Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *J Ethnobiol Ethnomed.*;8:1–14.

Veena, V., Taylor, C.G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* **43**, 383–403

Vilaine, F., Charbonnier, C., & Casse-Delbart, F. (1987). Further insight concerning the TL region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4: transfer of a 1.9 kb fragment is sufficient to induce transformed roots on tobacco leaf fragments. *Molecular and General Genetics MGG*, *210*, 111-115.

Walter M. Hill, (1936) *Apicius: De ReCoquinaria* p48

Wiat, C. (2007). *Ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific*. Springer Science & Business Media.

Winter, P., & Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *11*(4), 438–448.

Wiśniewska A Dąbrowska-Bronk J Szafrński K Fudali S Świąćicka M Czarny M Wilkowska AMorgiewicz K Matusiak J Sobczak M et al. (2013) Analysis of tomato gene promoters activated in syncytia induced in tomato and potato hairy roots by *Globoderarostochiensis*. *Transgenic Res* *22*: 557–569

Xu J (2022) *Medicinal Plant Analysis: A Historical and Regional Discussion of Emergent Complex Techniques* China Academy of Chinese Medical Sciences

Xu R (2014). Pharmacokinetic Comparison of Isoalantolactone and Alantolactone in Rats after Administration Separately by Optimization of an UPLC-MS2 Method». *Journal of Chemistry* *2014*: 1-8

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

Yang, H., Jian, J., Li, X., Renshaw, D., Clements, J., Sweetingham, M. W., Tan, C., & Li, C. (2015). Application of whole genome re-sequencing data in the development of diagnostic DNA markers tightly linked to a disease-resistance locus for marker-assisted selection in lupin (*Lupinus angustifolius*). *BMC Genomics*, 16(1), 660.

Zárate, R., Verpoorte, R. (2007) Strategies for the genetic modification of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochem Rev* 6, 475–491.

Zhao P (2015). "Alantolactone Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest on Lung Squamous Cancer SK-MES-1 Cells". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 29 (5): 199–226

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΕΙΑ

Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων. 14 Ιουνίου 2018

Βλαχοστέργιος, Δ. Ν. (2009). Μελέτη συστημάτων επιλογής ποικιλιών φακής (*Lensculinaris* Medik.) κατάλληλων στην οργανική γεωργία (No. GRI-2009-2461). Aristotle University of Thessaloniki.

INTERNET

<https://www.agriamanitaria.gr/inula-helenium-%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%85%CE%BB%CE%B1/>

<https://botanologia.gr/inula-helenium-ena-polytimo-votano-gia-tis-pathiseis-ton-pneymonon-kai-tis-anapneystikis-odoy/>

http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=200024054

<https://www.gardenia.net/plant/inula-helenium>

<https://www.greekflora.gr/el/flowers/2202/Inula-helenium>

<https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/colored-set-of-medicinal-plants-in-hand-drawn-vector-20865030>

<https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/set-of-colored-medicinal-plants-vector-18568565>