



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**“Ανάπτυξη πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althea rosea* L.
μέσω του φορέα *A. rhizogenes*”**

ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : ΠΑΥΛΗ ΟΥΡΑΝΙΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΠΘ

ΒΟΛΟΣ 2023

**“Ανάπτυξη πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althea rosea* L.
μέσω του φορέα *A. rhizogenes*”**

**“Protocol development for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic
transformation of *Althea rosea* L.”**

ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Παναγιώτης Μαδέσης, Επίκουρος 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

*Στον πατέρα μου,
Άκη*

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 επιβλέπουσα της πτυχιακής μου διατριβής, κα. Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ για την πρόταση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος, την καθοδήγησή της, τις συμβουλές, τις εύστοχες υποδείξεις και την κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Μαδέση, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, καθώς και τον κ. Κυριάκο Γιαννούλη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, για την κριτική ανάγνωση του κειμένου της πτυχιακής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κα. Παναγιωτάκη Ευαγγελία, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών για την βοήθεια της και τις χρήσιμες συμβουλές καθώς και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Τούμπου Χριστίνα που με υπομονή και προθυμία κατέβαλε την κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς και άρτια η έρευνα.

Ακόμη, ευχαριστώ τους φίλους μου που μου έδιναν κουράγιο και ήταν διαρκώς δίπλα μου. Φυσικά το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένεια μου, τους γονείς μου Άκη και Τάνια και την αδελφή μου Μάνια που μου δίνουν δύναμη και με στηρίζουν σε κάθε μου εγχείρημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά είναι φυσικοί πόροι υψηλής αξίας και λειτουργούν ως εργοστάσια παραγωγής βιοδραστικών ενώσεων. Εκεί οφείλουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες, οι οποίες προσελκύουν το ενδιαφέρον πληθώρας καταναλωτών. Τα βιοδραστικά συστατικά αποτελούν τη βάση για παραγωγή φαρμάκων, συμπληρωμάτων διατροφής και καλλυντικών. Απότοκος των παραπάνω είναι η ολοένα και αυξανόμενη ζήτηση για φαρμακευτικά είδη, η οποία σαφώς δεν μπορεί να καλυφθεί από τις υφιστάμενες ποσότητες παραγωγής αυτών. Πιο συγκεκριμένα, η συστηματική καλλιέργεια αφορά σε περιορισμένα φυτικά είδη και συναντάται σε περιορισμένες εκτάσεις. Ταυτόχρονα, η ανεξέλεγκτη συλλογή άγριων πληθυσμών δεν αποτελεί σε καμία περίπτωση μακροπρόθεσμη λύση, διότι θέτει σε κίνδυνο τη βιοποικιλότητα, μειώνοντας σταδιακά τα φυσικά αποθέματα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας υπογραμμίζει την αναγκαιότητα διασφάλισης του ποιοτικού ελέγχου των φαρμακευτικών φυτικών προϊόντων με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών. Η γενετική μηχανική προσφέρει ένα νέο εργαλείο για την ενίσχυση της απόδοσης πολύτιμων φαρμακευτικών ενώσεων. Το είδος *Althea rosea* L., με κοινό όνομα δενδρομολόχα, αποτελεί φαρμακευτικό φυτό που συνθέτει δευτερογενείς μεταβολίτες σε όλους τους φυτικούς ιστούς και όργανα, με κύριο αυτό της ρίζας. Ως είδος, διαθέτει πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων, όπως αντιοξειδωτικές, αντιβηχικές, αντιμικροβιακές, καταπραϋντικές και σημαντική διουρητική δράση. Η παρούσα έρευνα εξετάζει τη δυνατότητα ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althea rosea* L. με φορέα το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*, με σκοπό τη δημιουργία διαγονιδιακών ριζών, οι οποίες δυνητικά παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες βιοδραστικών ενώσεων. Για τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος R1000 και εφαρμόστηκαν δυο πρωτόκολλα με διαφορετική σύσταση υποστρωμάτων, συγκεκριμένα διέφεραν ως προς την παρουσία MES και τη συγκέντρωση σουκρόζης και ακετοσυρινγκόνης. Τα συνολικά αποτελέσματα αξιολογήθηκαν βάσει παραμέτρων, όπως ο χρόνος εμφάνισης νέων ριζών, η δομή και μορφολογία των ριζών και η συχνότητα του μετασχηματισμού. Τα ευρήματα της μελέτης επιβεβαιώνουν την καταλληλότητα του στελέχους R1000 για την γενετική τροποποίηση του είδους αλθέα, καθώς οι νεοεκπτυσσόμενες ρίζες εμφάνισαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των θυσσανωδών ριζών. Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων, αναδείχθηκε η υπεροχή του Πρωτοκόλλου 2, το οποίο οδήγησε σε υψηλότερη συχνότητα μετασχηματισμού. Συνεπώς, προκύπτει η θετική επίδραση τόσο της παρουσίας MES όσο και

των υψηλότερων συγκεντρώσεων ακετοσυρινγκόνης και σουκρόζης. Ο έλεγχος της διαγονιδιακής φύσης των ριζών πραγματοποιήθηκε μέσω αντιδράσεων PCR. Με τον τρόπο αυτό, επαληθεύτηκε η επιτυχής ένθεση του γονιδίου *rolB2* και, παράλληλα, η απουσία της αλληλουχίας *virCD* του *A. rhizogenes*. Εν κατακλείδι, τα συνολικά ευρήματα αποδεικνύουν την καταλληλότητα του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου για τη δημιουργία διαγονιακού ριζικού συστήματος στο είδος *Althea rosea* L. με στόχο την αυξημένη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, μέσω της αυξημένης βιομάζας ριζών. Η προσέγγιση αυτή αναμένεται να προσφέρει μία εναλλακτική λύση στην αδυναμία κάλυψης των αναγκών της βιομηχανίας για φαρμακευτικά είδη που φέρουν υψηλό βιοδραστικό δυναμικό.

SUMMARY

Medicinal and aromatic plants are highly valuable natural resources as they produce bioactive compounds. Owing to their bioactive potential, medicinal plants are highly appealing to a plethora of consumers. Such compounds are routinely used for the production of medicines, cosmetics and food supplements. Given the increasing demands for these products, however, their current production does not meet consumers' needs. Only a few plant species are being systematically cultivated and found in limited areas. At the same time, harvesting wild populations may not be viewed as a long-term solution as it progressively leads to the reduction of natural stocks and jeopardizes biodiversity. The World Health Organisation highlights the importance of using modern techniques to ensure quality control of medicinal plant products. Genetic engineering is considered as a valuable tool that may increase the yield of valuable pharmaceutical compounds. *Althea rosea* L., also known as hollyhock, is a medicinal plant that produces secondary metabolites in all plant tissues and organs, especially roots. The species has many beneficial properties such as antioxidant, antitussive, antimicrobial, antiseptic, soothing, and significant diuretic activity. The present research investigates the feasibility of developing a protocol for the genetic transformation of *Althea rosea* L., using the bacterium *Agrobacterium rhizogenes* as a vector, to create transgenic roots that can produce larger quantities of bioactive compounds. In the framework of optimizing the method employed, the bacterial strain R1000 was used, as well as two protocols with different substrate compositions, specifically differing in the presence of MES and the concentration of sucrose and acetosyringone. Overall findings were evaluated on the basis of various parameters, such as the time of new root emergence, root structure and morphology, and transformation frequency. The suitability of R1000 strain for the genetic modification of althea was confirmed as the newly developing roots showed the characteristic phenotype of adventitious roots. Regarding the efficacy of the protocols under study, *Protocol 2* yielded a higher transformation frequency. Therefore, it is concluded that the presence of MES as well as the increased concentration of acetosyringone and sucrose positively affect transformation. PCR reactions verified the successful insertion of the *rolB2* gene and the absence of the *virCD* sequence of *A. rhizogenes*, proving the transgenic nature of roots. In conclusion, overall findings demonstrate the suitability of this protocol for the establishment of a transgenic root system in *Althea rosea* L. to increase the synthesis of secondary metabolites, through the increased root biomass. Such approach is anticipated to provide an

attractive alternative solution to meet the industrial needs for medicinal plants with a high bioactive potential.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Φαρμακευτικά Φυτά.....	12
1.1.1 Αξία και χρήση των φαρμακευτικών φυτών.....	13
1.1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	15
1.1.3 Κατάσταση Φαρμακευτικών Φυτών στην Ελλάδα.....	16
1.1.4 Προβλήματα και Προκλήσεις.....	17
1.2 Το είδος <i>Althaea rosea</i>	19
1.2.1 Βοτανική Περιγραφή.....	20
1.2.2 Αύξηση και ανάπτυξη.....	21
1.2.3 Χημικές ουσίες.....	22
1.2.4 Χρήσεις - Προοπτικές.....	25
1.3 Βελτίωση Φαρμακευτικών Φυτών.....	26
1.3.1 Μοριακές μέθοδοι βελτίωσης.....	27
• Ιστοκαλλιέργεια.....	27
• Μοριακοί Δείκτες.....	28
1.4 Γενετική Μηχανική.....	29
1.5 Το <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	31
1.5.1 Πλασμίδιο Ri.....	32
1.5.2 Φαινότυπος Ri.....	34
1.5.3 Αξιοποίηση του <i>Agrobacterium rhizogenes</i> για μετασχηματισμό φαρμακευτικών φυτών.....	35
1.6 Σκοπός της Μελέτης.....	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
2.1 Φυτικό υλικό.....	38
2.2 Στέλεχος του <i>Agrobacterium rhizogenes</i> - Συνθήκες ανάπτυξης.....	38
2.3 Διαδικασία μετασχηματισμού σπορόφυτων αλθέας μέσω του βακτηρίου <i>A. rhizogenes</i>	39
2.3.1 Πρωτόκολλο 1.....	39
2.3.1.1 Προετοιμασία εκφύτων αλθέας.....	40
2.3.1.2 Μετασχηματισμός σπορόφυτων αλθέας.....	40
2.3.2 Πρωτόκολλο 2.....	42
2.4 Εξαγωγή DNA.....	42
2.5 Έλεγχος επιτυχούς ενσωμάτωσης του διαγονιδίου μέσω PCR.....	44
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	46
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
3.1 Χρόνος έκπτυξης διαγονιδιακών ριζών.....	47
3.2 Φαινοτυπική αξιολόγηση διαγονιδιακού ριζικού συστήματος.....	48
3.3 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων.....	51
3.4 Επίδραση πρωτοκόλλου - Συχνότητα μετασχηματισμού.....	53
3.5 Προτεινόμενη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού με το βακτηριακό στέλεχος	

R1000.....	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φαρμακευτικά Φυτά

Η χλωρίδα αποτελεί έναν παγκόσμιο πόρο και η εκμετάλλευση της ανέκαθεν διευκόλυνε την επιβίωση του ανθρώπου, καθώς μέσω των φυτών και των προϊόντων τους προσφέρονται δυνατότητες κάλυψης βασικών αναγκών του. Ο άνθρωπος οδηγούμενος από τα ένστικτα, τις αισθήσεις και την εμπειρία γρήγορα αντιλήφθηκε την δυνατότητα ορισμένων φυτών να θεραπεύουν ασθένειες. Συνεπώς, η ιστορία των φαρμακευτικών φυτών είναι τόσο μεγάλη όσο και η ιστορία του ανθρώπου (Singh *et al.*, 2018). Κατά κανόνα, τα φαρμακευτικά φυτά συνδέονται με μια μακροχρόνια εμπειρική χρήση και λαϊκή παράδοση (Μαλούπα κ.α., 2013). Καθίσταται λοιπόν σαφές πως με τον όρο φαρμακευτικά εννοούνται τα φυτά που σε ένα ή περισσότερα όργανα περιέχουν συστατικά, τα οποία χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς ή αποτελούν πρώτη ύλη για φαρμακευτικά παρασκευάσματα. Όλα τα αρωματικά φυτά είναι και φαρμακευτικά σε αντίθεση με τα φαρμακευτικά που δεν είναι πάντα αρωματικά (Κουτσός, 2006).

Αρχαιολογικά ευρήματα αποδεικνύουν πως η χρήση των συγκεκριμένων φυτών ξεκίνησε στην Παλαιολιθική Εποχή, ενώ οι πρώτες ιστορικές πηγές που βρέθηκαν και χρονολογούνται πάνω από 5000 χρόνια, ανήκουν στους Σουμέριους. Πρόκειται για συνταγές βοτάνων που απαιτούν πάνω από 250 φυτά. Επίσης, αναφορές και μελέτες για την αξία των φαρμακευτικών φυτών έχουν βρεθεί σε αιγυπτιακούς παπύρους, βιβλία Αρχαίων Ελλήνων και έργα Ρωμαίων (Kušan, 1956). Τέλος, τα φαρμακευτικά φυτά συνέβαλαν στη φιλοσοφία της Αγιουβέρδα, που αναπτύχθηκε στην Ινδία και θεωρείται ένα από τα παλαιότερα συστήματα παραδοσιακής ιατρικής.

Μέχρι και σήμερα τα φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση ασθενειών και τη θωράκιση του ανοσοποιητικού. Σύμφωνα με μελέτη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, 4 δισεκατομμύρια άνθρωποι (σχεδόν 80 % του πληθυσμού) κάνουν χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης (Shakya, 2016). Μάλιστα το τελευταίο διάστημα, στο πλαίσιο ευαισθητοποίησης των πολιτών για την προστασία των φυσικών πόρων και αποφυγή της κατανάλωσης συνθετικών σκευασμάτων, παρατηρήθηκε μια στροφή σε έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής. Παράλληλα, στην αύξηση ζήτησης φαρμακευτικών προϊόντων συνέβαλαν οι

συστηματικές έρευνες που πραγματοποιούνται σε αυτόν τον τομέα και παρουσιάζουν συνεχώς νέα στοιχεία.

1.1.1 Αξία και χρήση των φαρμακευτικών φυτών

Η αναζήτηση και η αξιοποίηση των θεραπευτικών ιδιοτήτων από συγκεκριμένα φυτά είναι μια πρακτική χιλιάδων χρόνων. Τα φαρμακευτικά φυτά διαχρονικά αποτελούν μέρος της ζωής όλων των λαών (Hotwani *et al.*, 2014). Μάλιστα, από τα αρχαία χρόνια αναπτύχθηκε το εμπόριο τους, επιφέροντας σημαντικά οικονομικά οφέλη. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος των καταναλωτών σε προϊόντα φυτικής προέλευσης, η οποία επιβεβαιώνεται από την αύξηση των κερδών στην παγκόσμια αγορά βοτάνων. Αναφορικά, το 2015 η εμπορία των συγκεκριμένων σκευασμάτων εκτιμήθηκε γύρω στα 108 δισεκατομμύρια δολάρια, εκ των οποίων το 48 % ήταν φυτικά φάρμακα, το 35 % συμπληρώματα διατροφής και το 17 % καλλυντικά (Ditz *et al.*, 2017).

Αναλυτικότερα, στις αναπτυγμένες χώρες η αυξημένη ζήτηση των φαρμακευτικών προϊόντων φυτικής προέλευσης και, κατ' επέκταση, η ζήτηση φαρμακευτικών φυτών και των συστατικών τους από βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών οφείλεται στους εξής λόγους: αρχικά, στο πλαίσιο υιοθέτησης ενός πιο υγιεινού τρόπου ζωής, οι καταναλωτές αναζητούν μια διαφορετική ή συμπληρωματική φαρμακευτική κάλυψη από τα συνήθη φάρμακα. Παράλληλα, στη γρήγορη αύξηση της καταναλωτικής ζήτησης σημαντικό ρόλο έπαιξε η συστηματική προβολή των ιδιοτήτων τους, μέσω δημοσίευσης σχετικών ερευνών αλλά και διαφημίσεων. Τέλος, οι σημερινές απαιτήσεις για την ασφάλεια και την ποιότητα οδήγησαν στην ανάπτυξη της έρευνας αφενός για υψηλής ποιότητας πρώτες ύλες και τυποποίηση αυτών και αφετέρου προς ανακάλυψη νέων σχετικών προϊόντων (Κατσιώτης και Χατζόπουλος, 2019).

Σε αντίθεση με τις ανεπτυγμένες χώρες, στις αναπτυσσόμενες η χρήση φυτικών φαρμάκων αποτελεί περισσότερο ανάγκη παρά επιλογή. Αναμφίβολα, τα φαρμακευτικά φυτά συμβάλλουν ουσιαστικά στην υγειονομική περίθαλψη, παρέχοντας το μόνο αποτελεσματικό φάρμακο για τον μεγάλο πληθυσμό καθώς οποιαδήποτε άλλη μορφή φαρμάκων είτε δεν είναι διαθέσιμη είτε είναι δαπανηρή. Κατά συνέπεια, πλέον η συλλογή και η εμπορία αυτοφυών φαρμακευτικών φυτών αποτελεί σημαντική πηγή εσόδων για τους άπορους αυτών των χωρών (Hishe *et al.*, 2016). Επιπρόσθετα, ένα ακόμα κίνητρο που οδηγεί τους ανθρώπους στην εκτεταμένη χρήση των βοτάνων είναι η εξοικείωση τους με αυτά καθώς αποτελούν

μέρος της κουλτούρας και της ιστορία τους. Βέβαια αυτό σταδιακά δημιούργησε την εσφαλμένη άποψη πως τα φυτικά προϊόντα έχουν λιγότερες παρενέργειες και έτσι παρατηρείται μια διστακτικότητα απέναντι στη συμβατική ιατρική (Andel and Carvalho, 2013).

Όσον αφορά τη χρήση τους, τα φαρμακευτικά φυτά ανάλογα την επεξεργασία, προετοιμασία και μεταποίηση που δέχονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τους εξής τρόπους :

- A. Χλωρό φυτικό υλικό : ολόκληρο, κομμένο ή μόνο επιλεγμένα μέρη του φυτού
- B. Ξηρό φυτικό υλικό : ολόκληρο ή επιλεγμένα μέρη του φυτού
- C. Αιθέριο έλαιο : προϊόν που προέρχεται από απόσταξη
- D. Φυτικό εκχύλισμα : προκύπτει από την διάλυση και εκχύλιση των δραστικών ουσιών (Grigoriadou *et al.*, 2019)

Περαιτέρω, μερικά προϊόντα φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται πλέον εκτεταμένα από ευρύ καταναλωτικό κοινό είναι τα παρακάτω:

- **Καλλυντικά**
- **Βιολειτουργικά τρόφιμα** : τρόφιμα και ποτά που, εκτός από τη θρέψη, μπορούν να βελτιώσουν τη διανοητική και φυσική υγεία και να μειώσουν τον κίνδυνο ασθενειών
- **Συμπληρώματα διατροφής** : προϊόντα κυρίως φυτικής προέλευσης που δρουν ως συμπλήρωση της συνήθους δίαιτας και αποτελούν συμπυκνωμένες πηγές θρεπτικών συστατικών ή άλλων ουσιών με θρεπτικές ή φυσιολογικές επιδράσεις
- **Ροφήματα**
- **Φυτικά φάρμακα** : φυτικής βάσης φαρμακευτικά προϊόντα με προσδιορισμένη χημική σύσταση και αποδεδειγμένες φαρμακευτικές ιδιότητες, που έχουν συνήθως υποστεί λεπτομερή τοξικολογικό και κλινικό έλεγχο και διατίθενται με συνταγή
- **Αρωματοθεραπευτικά έλαια** : κύριος στόχος είναι η θεραπεία και όχι η αρωματοποίηση

1.1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Τα φαρμακευτικά φυτά λειτουργούν ως εργοστάσια βιοσύνθεσης βιοδραστικών ενώσεων, κυρίως δευτερογενών μεταβολιτών, που αποτελούν την βάση για παραγωγή φαρμάκων, συμπληρωμάτων διατροφής, ενώ παράλληλα κατέχουν σημαντική θέση στις βιομηχανίες αρωμάτων, καλλυντικών και αγροχημικών (Li *et al.*, 2019). Τα διαφορετικά χημικά συστατικά των φυτών αυτών δύναται να βελτιώσουν την ανθρώπινη υγεία καθώς χαρακτηρίζονται από αντιβιοτικές, αντιμυκητιακές και αντικές ιδιότητες. Αναφορικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία ή πρόληψη σοβαρών ασθενειών ή συνδρόμων όπως φυματίωση, έλκη, άσθμα, καρκίνο, νόσο του Αλτσχάιμερ, καρδιαγγειακές παθήσεις, νόσο του Πάρκινσον κ.α. (Pant *et al.*, 2021).

Η γνώση της χημικής σύστασης των φαρμακευτικών φυτών οδηγεί σε καλύτερη κατανόηση της πιθανής φαρμακευτικής τους αξίας. Συνεπώς, αναλύοντας περισσότερο τους δευτερογενείς μεταβολίτες, πρόκειται για προϊόντα που δεν εμπλέκονται στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών αλλά επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες, όπως παροχή προστασίας έναντι περιβαλλοντικών καταπονήσεων καθώς και άμυνας έναντι παθογόνων και φυτοφάγων (Rahmat and Kang, 2019). Επιπρόσθετα, οι ενώσεις είναι κατανεμημένες σε διαφορετικά κύτταρα, ιστούς και όργανα όπως ρίζες, βλαστό, φύλλα, άνθος, καρπό, σπόρο. Είναι λογικό η παραγωγή και η τελική συγκέντρωση των δευτερογενών μεταβολιτών να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Μερικοί από αυτούς είναι : το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, το τμήμα του φυτού που γίνεται η σύνθεση, προσαρμογή του φυτού αλλά και εξωτερικοί, περιβαλλοντικοί λόγοι, όπως η θερμοκρασία, η ξηρασία και το φως (Li *et al.*, 2019).

Ακολούθως, η κατηγοριοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού γίνεται με βάση την χημική τους δομή. Οι τρεις βασικές ομάδες είναι τα αλκαλοειδή, τα φαινολικά και τα τερπενοειδή. Πιο συγκεκριμένα, τα αλκαλοειδή χαρακτηρίζονται από αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντική δράση, ενώ ορισμένα παραδείγματα αλκαλοειδών είναι η βινβλαστίνη, η μορφίνη και η χιτίνη. Συνεχίζοντας, τα φαινολικά, όπως η τανίνη, και τα τερπενοειδή διαθέτουν αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τέλος, ορισμένες ακόμη σημαντικές ομάδες είναι οι σαπωνίνες, τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες (Builders, 2019).

1.1.3 Κατάσταση Φαρμακευτικών Φυτών στην Ελλάδα

Παγκοσμίως, υπάρχουν 33 θερμά σημεία (hotspots) βιοποικιλότητας και η Μεσόγειος βρίσκεται στην 3η θέση (Λάζαρη, 2016). Επομένως, η γεωγραφική θέση της Ελλάδας, σε συνδυασμό με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες που επικρατούν, δημιουργούν τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη πολλών φυτικών ειδών, ενώ μάλιστα παρατηρούνται και φαινόμενα ενδημισμού. Τα φαρμακευτικά φυτά στην Ελλάδα είναι ένας αναξιοποίητος πλούτος, παρόλο που υπάρχει μεγάλη εξάπλωση αυτοφυών ειδών και ενδείκνυται η καλλιέργεια τους. Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικά από τα κύρια φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά (ΦΑΦ) που εντοπίζονται στην Ελλάδα.

Πίνακας 1.1. Λίστα με τα κύρια ΦΑΦ που απαντώνται στον ελληνικό χώρο

Κοινή Ονομασία	Επιστημονική Ονομασία	Κατάσταση
1. Δίκταμος	<i>Origanum dictamnus</i>	Καλλιεργούμενο/ Αυτοφυές
2. Θυμάρι	<i>Thymus capitatus</i>	Αυτοφυές
3. Κρόκος	<i>Crocus sativus</i>	Καλλιεργούμενο
4. Κόλιανδρος	<i>Coriandrum sativum</i>	Καλλιεργούμενο
5. Λεβάντα	<i>Lavandula angustifolia</i>	Καλλιεργούμενο
6. Μελισσόχορτο	<i>Melissa officinalis</i>	Καλλιεργούμενο
7. Ρίγανη	<i>Origanum vulgare</i>	Καλλιεργούμενο/ Αυτοφυές
8. Τσάι του βουνού	<i>Sideritis spp.</i>	Καλλιεργούμενο/ Αυτοφυές
9. Φασκόμηλο	<i>Salvia fruticosa</i>	Αυτοφυές
10. Χαμομήλι	<i>Matricaria recutita</i>	Καλλιεργούμενο/ Αυτοφυές

Σαφώς η Ελλάδα εξαιτίας της θέσης της, έχει την δυνατότητα να παράξει υψηλής ποιότητας προϊόντα. Παράλληλα, οφείλει να εκμεταλλευτεί το ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τοπικές και ξένες εταιρείες για τις ιδιότητες των φαρμακευτικών φυτών της ελληνικής χλωρίδας με απώτερο σκοπό την ενίσχυση της διεθνούς ανταγωνιστικότητάς της στον συγκεκριμένο κλάδο. Έτσι, μπορεί να ενισχυθεί η αγροτική οικονομία και να ευνοηθεί η γεωργική διαφοροποίηση (Κατσιώτης και Χατζόπουλος, 2019). Ήδη τα τελευταία χρόνια παρατηρείται

στροφή προς τις συγκεκριμένες καλλιέργειες, γεγονός που επιβεβαιώνεται μέσω της ετήσιας γεωργικής στατιστικής έρευνας της ΕΛΣΤΑΤ. Συγκεκριμένα, το 2019 σε 79.000 στρ. καλλιεργήθηκαν φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά, ενώ το 2018 ήταν 64.100 στρ. Πρόκειται για αύξηση 24,2 % (ΕΛΣΤΑΤ, 2021). Ωστόσο, μέχρι σήμερα η Ελλάδα αδυνατεί να εκδηλώσει τη δυναμικότητά της, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην απουσία οργανωμένων συλλογικών σχημάτων και κοινής στρατηγικής (εξάριση αποτελεί ο κρόκος Κοζάνης). Επομένως, είναι επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας ενός αειφόρου σχεδίου που θα περιλαμβάνει παραμέτρους όπως, τη βελτίωση, καλλιέργεια, πιστοποίηση, μεταποίηση και εμπορία φαρμακευτικών φυτών (Μαλούπα κ.α., 2012).

1.1.4 Προβλήματα και Προκλήσεις

Οι αιτίες που δυσχεραίνουν την άνθιση αυτού του κλάδου είναι αρκετές. Η απότομη στροφή και η αυξημένη ζήτηση που εντοπίζεται τα τελευταία χρόνια τόσο από καταναλωτές όσο και από συναφείς βιομηχανίες δημιουργούν κενά και σημαντικά προβλήματα αναφορικά με την διάθεση και την προστασία των φαρμακευτικών φυτών.

Είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό το γεγονός ότι αυτοφυή είδη συλλέγονται σε διάφορες περιοχές του κόσμου σχεδόν ανεξέλεγκτα και ληστρικά και μαζί με την υπερβόσκηση, η εκάστοτε τοπική χλωρίδα βρίσκεται συχνά σε κίνδυνο. Στην όξυνση του προβλήματος πλέον συντελούν και οι βιομηχανίες που προτιμούν να προμηθεύονται αυτοφυή φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά, οδηγώντας τους αυτοφυείς πληθυσμούς σε σταδιακή εξαφάνιση. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την Διεθνή Ένωση Προστασίας της Φύσης (IUCN), υπάρχουν περίπου 50.000-80.000 φυτικά είδη που αξιολογούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς σε όλο τον κόσμο. Δυστυχώς μεταξύ αυτών, 15.000 κινδυνεύουν να εξαφανιστούν εξαιτίας της συχνής συγκομιδής και της καταστροφής βιοτόπων και, κατ' επέκταση, φημολογείται πως έτσι χάνεται κάθε 2 χρόνια ένα πιθανό φάρμακο. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως στην Κίνα, Κένυα, Ινδία, Νεπάλ, Ουγκάντα και Τανζανία (Yu *et al.*, 2016).

Δεδομένης της μεγάλης ζήτησης για συνεχή και ενιαία παροχή φαρμακευτικών φυτών, σε συνδυασμό βέβαια με την επιταχυνόμενη εξάντληση των δασικών πόρων, η αύξηση των φυτικών ειδών που θα μπορούσαν να καλλιεργηθούν θα αποτελούσε μια ελκυστική λύση για την αποτελεσματική κάλυψη των αναγκών. Ωστόσο, μέχρι σήμερα αυτό το μέτρο δεν έχει εφαρμοστεί ευρέως αφού τα καλλιεργούμενα είδη υστερούν σε ποσότητα συγκριτικά με αυτά

που συλλέγονται απευθείας από την φύση (Hishe *et al.*, 2016). “Το πιο σημαντικό συστατικό που απαιτείται για να επιτευχθεί μια πραγματικά βιώσιμη χρήση των πόρων είναι η πληροφορία” (Peters 1994). Οι παραγωγοί εκφράζουν διστακτικότητα στο να επιχειρήσουν να καλλιεργήσουν φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά διότι υπάρχει έλλειψη επαρκών γνώσεων και εμπειρίας σχετικά με τεχνικά θέματα του τρόπου καλλιέργειάς τους. Ελάχιστοι είναι οι εξειδικευμένοι επιστήμονες που είναι σε θέση να προωθήσουν την καταλληλότερη μέθοδο καλλιέργειας. Επιπρόσθετα, χαρακτηριστικό είναι πως η πλειοψηφία των δημοσιευμένων επιστημονικών εργασιών επικεντρώνεται στα αιθέρια έλαια, ενώ σπάνια αγγίζουν άλλα ζητήματα που σχετίζονται τόσο με την καλλιεργητική πρακτική όσο και το γενετικό υλικό καθώς και τις δυνατότητες βελτίωσης αυτού (Στεφάνου κ.α., 2016). Απόρροια της συγκεκριμένης κατάστασης είναι η έλλειψη πρωτοκόλλων και πρακτικών για την καλλιέργεια αλλά και η περιορισμένη οργανωμένη σποροπαραγωγή. Η χρήση σπόρου που έχει συλλεχθεί από την φύση ενέχει τον κίνδυνο περιορισμένης φυτρωτικής ικανότητας και ληθάργου (Μαλούπα κ.α., 2013).

Περαιτέρω, στο πλαίσιο καλλιέργειας φαρμακευτικών φυτών, συχνά εκφράζονται αμφιβολίες για την ποιότητα του προϊόντος που προκύπτει, η οποία σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα και την ποιότητα βιοδραστικών ενώσεων. Φυσικά οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης των τελευταίων σε συνθήκες στρες και ανταγωνισμού. Όταν τα φαρμακευτικά φυτά που λαμβάνονται από τη φύση καλλιεργούνται υπό «βέλτιστες» συνθήκες ανάπτυξης, οι φυσικοί στρεσογόνοι παράγοντες του φυτού απομακρύνονται και επομένως, η περιεκτικότητα σε δευτερογενείς μεταβολίτες και, κατά συνέπεια, η θεραπευτική δράση των φυτών μειώνεται σημαντικά (Gorelick and Bernstein, 2014). Επιπλέον, η ποιότητα επηρεάζεται αρνητικά από τη χρήση χημικών και την ύπαρξη μεγάλων ποσοτήτων βαρέων μετάλλων στο έδαφος. Αναντίρρητα λοιπόν τα φαρμακευτικά φυτά μπορούν εύκολα να μολυνθούν κατά την ανάπτυξη, συγκομιδή και επεξεργασία (Shakya, 2016).

Συνοψίζοντας, παρόλο που υπάρχει πληθώρα φυτών με σπουδαίες θεραπευτικές ιδιότητες, η πλειονότητά τους δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα αφού δεν υπάρχει μια στρατηγική που να στοχεύει στην διατήρηση των φυσικών αποθεμάτων αλλά και την αειφόρο καλλιέργεια και αξιοποίηση φαρμακευτικών φυτών (Gorelick and Bernstein, 2014). Στην αλλαγή της συγκεκριμένης κατάστασης ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η συνεισφορά των γεωπονικών επιστημών, συμπεριλαμβανομένων των κλάδων της βιοτεχνολογίας και της

γενετικής βελτίωσης, όπου μέσω εκπόνησης πειραμάτων και μελετών θα δημιουργηθούν οι βάσεις για καλύτερη εκμετάλλευση.

1.2 Το είδος *Althaea rosea*

Βοτανική Ταξινόμηση

Βασίλειο	: Planta
Φύλο	: Tracheophyta
Κλάση	: Magnoliopsida
Τάξη	: Malvales
Οικογένεια	: Malvaceae
Γένος	: <i>Althaea</i>
Είδος	: <i>Althaea rosea</i>

Το είδος *Althaea rosea* ή *Alcea rosea*, με κοινό όνομα αλθέα ή δενδρομολόχα είναι φαρμακευτικό φυτό της οικογένειας Malvaceae και συγγενικό με τη μολόχα. Πρόκειται για ένα εντυπωσιακό καλλωπιστικό φυτό που παράγει μονά, ημίδιπλα ή διπλά άνθη πολλών χρωμάτων. Εντοπίζεται συχνά σε πάρκα, κήπους, όχθες ποταμών και βάλτους (Ma *et al.*, 2019). Όλα τα μέρη του φυτού -ρίζα, βλαστός, φύλλα, άνθη, σπόρος- περιέχουν ενώσεις με φαρμακευτικές ιδιότητες (Fahamiya *et al.*, 2016). Συνεπώς, η αλθέα μπορεί να χρησιμοποιηθεί εξ ολοκλήρου και γι' αυτό είναι βασικό συστατικό πολλών βιομηχανικών σκευασμάτων, όπως τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα.

Με καταγωγή την Κίνα, το είδος ενώ σήμερα παρουσιάζει μεγάλη διασπορά καθώς εντοπίζεται στην νότια Ευρώπη, τη Μέση και Εγγύς Ανατολή, τη Μεσόγειο την Ασία και την Αυστραλία (Al.-Snafi, 2013).

Η αλθέα οφείλει το επιστημονικό της όνομα στην αρχαία ελληνική λέξη «ἄλθειν» που σημαίνει θεραπεύω, υποδηλώνοντας την πληθώρα θεραπευτικών ιδιοτήτων έναντι διαφόρων ασθενειών (Amini, 2019). Παράλληλα, και η λέξη *rosea*, που αναφέρεται στο είδος, έχει ελληνική ρίζα μιας και προέρχεται από την λέξη ρόδο που σημαίνει τριαντάφυλλο. Επιπρόσθετα, υπάρχουν αναφορές για χρήση της αλθέας στην Αρχαία Ελλάδα. Ενδεικτικά, ο Ιπποκράτης πρότεινε ρόφημα από την ρίζα της αλθέας για την αντιμετώπιση μολώπων. Ο Διοσκουρίδης ονόμασε το φυτό “ἄλκαία” και το χαρακτήρισε ως ένα είδος άγριας μολόχας. Έκανε χρήση της ρίζας του φυτού για ανακούφιση από τσιμπήματα εντόμων και έδινε αφέψημα αλθέας για τον εμετό και τον πονόδοντο, ενώ ο Θεόφραστος ανέφερε πως η ρίζα αλθέας καταναλωνόταν με ανάμειξη οίνου για την αντιμετώπιση του βήχα. Τέλος, η αλθέα ήταν ευρέως διαδεδομένη κατά τον Μεσαίωνα.

1.2.1 Βοτανική Περιγραφή

Η αλθέα είναι βολβώδες φυτό που αναπτύσσει πλούσιο και βαθύ ριζικό σύστημα, το οποίο προσφέρει στήριξη και προστασία από τους ανέμους. Οι ρίζες είναι παχιές, εύκαμπτες με διακλαδώσεις. Εξωτερικά έχουν ανοιχτό καστανό χρώμα, ενώ εσωτερικά είναι λευκές.



Εικόνα 1.1: Ρίζα από *Althea rosea*

(Πηγή: <https://www.gardenloversclub.com/ornamental./flowers/hollyhock/bare-roots/>)

Πρόκειται για ορθοστάελο φυτό που το ύψος του κυμαίνεται από 0,5 έως 2 m, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και περισσότερο. Διαθέτει κυλινδρικό βλαστό που φέρει τρίχες. Κατά μήκος του βλαστού εκφύονται εναλλάξ τα φύλλα. Τα φύλλα είναι μεγάλα με διάμετρο 7-12 cm, έχουν γκριζοπράσινο χρώμα και χνουδωτή υφή. Είναι καρδιόσχημα ή ωοειδή και οδοντωτά με 5-7 λοβούς (Fahamiya *et al.*, 2016).

Τα άνθη σχηματίζονται κατά μήκος του βλαστού μεμονωμένα ή σε συστάδες και εμφανίζουν ποικιλία χρωμάτων, όπως κόκκινο, μωβ, ροζ, κίτρινο και λευκό. Το κάθε χρώμα ευδοκimei σε διαφορετικό τύπο εδάφους (Hanif *et al.*, 2019). Συμπληρωματικά, τα άνθη είναι σχετικά μεγάλα, με διάμετρο έως 10 cm και έχουν σχήμα χωνιού. Είναι ερμαφρόδιτα και αποτελούνται από 6-9 πέταλα, 5 σέπαλα, κοντό στήμονα με ανθήρες κίτρινου χρώματος και πολυκύτταρη ωοθήκη (Fahamiya *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2012).

Ο καρπός έχει μορφή δίσκου και αποτελείται από πολυάριθμα καρπόφυλλα. Ο σπόρος έχει καστανόμαυρο χρώμα, σχήμα νεφρού, τρίχες περιφερειακά και μικρό μέγεθος (6 mm) (Fahamiya *et al.*, 2016).



Εικόνα 1.2: Μορφολογία φυτού *Althaea rosea* (Πηγή : Köhler, 1887)

1.2.2 Αύξηση και ανάπτυξη

Η αλθέα έχει πολυετή κύκλο ανάπτυξης (συνήθως διετή). Γενικά, αναπτύσσεται σε εύκρατα κλίματα και σχετικά υγρά περιοχές. Μπορεί να αναπτυχθεί σε αρκετούς τύπους εδαφών αλλά προτιμάει τα αργιλώδη και ελαφρώς αλκαλικά. Ακόμη, είναι σημαντικό το έδαφος να είναι καλά αποστραγγιζόμενο και γόνιμο. Αντεχει την αλατότητα καθώς αυτοφύεται και σε παραθαλάσσιες περιοχές. Τέλος, έχει μεγάλες απαιτήσεις σε ήλιο (Fahamiya *et al.*, 2016; Mabey *et al.*, 1999).

Σχετικά με τον πολλαπλασιασμό της αλθέας, μπορεί να γίνει απευθείας με σπόρο και σπορόφυτα ή να χρησιμοποιηθούν μοσχεύματα βλαστού ή ρίζας. Η σπορά γίνεται την άνοιξη σε αποστάσεις περίπου 60 cm x 60 cm και απαιτείται άρδευση (Fahamiya *et al.*, 2016). Η περίοδος της ανθοφορίας είναι από Απρίλιο μέχρι Αύγουστο. Η συγκομιδή των φύλλων και των ανθέων πραγματοποιείται αργά το καλοκαίρι, ενώ η ρίζα συγκομίζεται το φθινόπωρο από φυτά ηλικίας τουλάχιστον δύο ετών (Σκρουμπής, 1998). Πρόκειται για ένα γενικά

ανθεκτικό φυτό. Οι εχθροί που ίσως συναντήσει είναι τα σαλιγκάρια και οι γυμνοσάλιαγκες που απειλούν κυρίως νεαρά φυτά. Το φύλλωμα μπορεί να προσβληθεί από μύκητες που προκαλούν σκωριάσεις.

1.2.3 Χημικές ουσίες

Η αλθέα ως φαρμακευτικό φυτό έχει αντιμικροβιακές, αντιακές, αντιβηχικές, αντιμυκητιακές και καταπραϋντικές ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται στην παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων. Συνθέτει πληθώρα ουσιών σε όλα τα μέρη της, με σημαντικότερες αυτές που παράγονται στην ρίζα (Fahamiya *et al.*, 2016).

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως τα χημικά συστατικά του φυτού επηρεάζονται από το είδος, το περιβάλλον και τις συνθήκες καλλιέργειας, όπως τον τύπο του εδάφους, την άρδευση και τις καλλιεργητικές τεχνικές (Shehzad *et al.*, 2019). Συνεπώς, το πλήρες φάσμα των δευτερογενών μεταβολιτών μπορεί να μην έχει ακόμα μελετηθεί πλήρως.

Μέχρι στιγμής, το φυσικοχημικό προφίλ του φυτού, που συμπεριλαμβάνει τη χημική σύσταση, τη δομική ανάλυση, τα χαρακτηριστικά των μακρομορίων, την αντιοξειδωτική δραστηριότητα και τη θερμική συμπεριφορά των συστατικών του, περιγράφει τα παρακάτω. Πρώτον, η αλθέα συνθέτει γλίσχρασμα που αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες, όπως πηκτίνες και γαλακτόζη. Επιπλέον, αυτή η φυτική κόλλα παρατηρείται στην ρίζα σε ποσοστό έως 35 % (η υψηλότερη περιεκτικότητα είναι τον χειμώνα) και στα φύλλα περίπου έως 10 % (Mabey *et al.*, 1999). Έπειτα, μερικά ακόμη χημικά συστατικά που εντοπίζονται στο φυτό είναι τα φλαβονοειδή, που είναι δευτερογενείς μεταβολίτες γνωστοί για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, οι ανθοκυανίνες, που προσδίδουν το χαρακτηριστικό χρώμα στο άνθος, καθώς και μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, σακχαρόζη, ταννίνες, ασπαραγίνες, άμυλο, αλκοόλες, κουμαρίνες και ορισμένα ιχνοστοιχεία (Al.-Snafi, 2013; Fahamiya *et al.*, 2016). Ανακεφαλαιώνοντας, στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται αναλυτικά οι δευτερογενείς μεταβολίτες που συνθέτει η αλθέα καθώς και τα φυτικά τμήματα στα οποία συντίθενται.

Πίνακας 1.2 : Οι δευτερογενείς μεταβολίτες της αλθέας (*Althea rosea*) και το είδος του φυτικού ιστού όπου λαμβάνει χώρα η σύνθεσή τους.

Χημική Ομάδα	Μεταβολίτης	Τμήμα φυτού
Υδατάνθρακες	Άμυλο	Σπόρος, Ρίζα, Φύλλα
	Αραβίνη	Βλαστός
	Αραβινογαλακτάνη	Ρίζα
	Γαλακτόζη	Σπόρος, Ρίζα, Φύλλα
	Γλίσχρασμα	Ρίζα, Φύλλα
	Γλυκάνη	Ρίζα
	Γλυκόζη	Άνθος, Φύλλα, Καρπός, Ρίζα, Σπόρος
	Λακτόζη	Σπόρος
	Μαννόζη	Καρπός, Φύλλα, Σπόρο
	Ξυλόζη	Ρίζα
	Ραμνόζη	Άνθος, Ρίζα
Τερπενοειδή-Ισοπρενοειδή	Κιτράλη	Σπόρος
	Λιμονένιο	Σπόρος
	Τερπινεόλη	Σπόρος
	Φελλανδρένιο	Σπόρος
Φαινολικά οξέα	Καφεϊκό οξύ	Ρίζα, Φύλλα, Άνθος
	Κινναμικό οξύ	Άνθος
	Πολυφαινολικό οξύ	Ρίζα
	Φερουλικό οξύ	Ρίζα, Φύλλα
Φλαβονοειδή	Καμφερόλη	Ρίζα, Φύλλα
	Κερσετίνη	Ρίζα, Φύλλα
Φυτοστερόλες	β-Σιτοστερόλη	Φύλλα, Σπόρος
	Στιγμαστερόλη	Φύλλα
Αρωματικές οργανικές ενώσεις	Κουμαρίνη	Φύλλα

	Σκοπολετίνη	Φύλλα
	4-μεθυλοβενζαλδεϋδη	Σπόρος
Βιταμίνες	Βιταμίνη C	Φύλλα
	Βιταμίνη E	Φύλλα, Άνθος
Καρβοξυλικά οξέα	Γαλακτουρονικό οξύ	Ρίζα, Φύλλα
Φωσφολιπίδια	Λεκιθίνη	Ρίζα
Αλκοόλες	Κυκλοεξανόλη	Φύλλα, Καρπός
	Ισοβουτυλική αλκοόλη	Σπόρος
Λιπαρά οξέα	Ελαϊκό οξύ	Άνθος, Φύλλα, Σπόρος
	Λινολενικό οξύ	Άνθος, Φύλλα, Σπόρος
	Λινολεϊκό οξύ	Άνθος, Φύλλα, Σπόρος
	Μυριστικό οξύ	Άνθος, Φύλλα, Σπόρος
	Παλαμικό οξύ	Άνθος, Φύλλα, Σπόρος
	Στεαρικό οξύ	Άνθος, Φύλλα, Σπόρος
Αμινοξέα	Αργινίνη	Ρίζα, Βλαστός
	Βαλίνη	Ρίζα, Βλαστός
	Θρεονίνη	Ρίζα, Βλαστός
	Ισολευκίνη	Ρίζα, Βλαστός
	Ιστιδίνη	Ρίζα, Βλαστός
	Λευκίνη	Ρίζα, Βλαστός
	Λυσίνη	Ρίζα, Βλαστός
	Μεθειονίνη	Ρίζα, Βλαστός
	Φαινυλαλανίνη	Ρίζα, Βλαστός
Ιχνοστοιχεία-Μέταλλα	Ασβέστιο	Φύλλα
	Σίδηρος	Φύλλα
	Φώσφορος	Φύλλα
	Χαλκός	Φύλλα
	Ψευδάργυρος	Φύλλα

Άλλες ενώσεις	Ασπαραγίνη	Ρίζα
	Γλυκοσίδες	Ρίζα
	Ταννίνες	Ρίζα

1.2.4 Χρήσεις - Προοπτικές

Η αλθέα είναι γνωστό καλλωπιστικό φυτό που συχνά επιλέγεται για να διακοσμήσει κήπους, παρτέρια και περιφράξεις. Σαφώς προτιμάται λόγω των ανθέων που διαθέτει σε ποικίλα χρώματα και του ύψους της (Shehzad *et al.*, 2019). Παράλληλα, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν την δυνατότητα της αλθέας να χρησιμοποιηθεί ως φυτό βιοδείκτης για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων στο έδαφος. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να συσσωρεύει βαρέα μέταλλα και κυρίως να λειτουργεί ως υπερσυσσωρευτής καδμίου (Cakaj *et al.*, 2023). Φυσικά, η εδαφοαποκατάσταση μέσω αλθέας είναι ακόμα σε πειραματικό στάδιο. Στο πλαίσιο αυτό, έχει προταθεί η χρήση της αλθέας ως διακοσμητικό φυτό, δρώντας παράλληλα ως ανιχνευτής βαρέων μετάλλων και συμβάλλοντας στην άμβλυνση των περιβαλλοντικών πιέσεων.

Περαιτέρω, η χρήση της αλθέας για φαρμακευτικούς σκοπούς είναι διαχρονικά ευρύτατη αφενός μεν λόγω των ιδιοτήτων της και αφετέρου λόγω της απουσίας παρενεργειών στον ανθρώπινο οργανισμό. Αρχικά αποτελεί φυσική πηγή αντιοξειδωτικών εξαιτίας της περιεκτικότητας σε φαινόλες. Βέβαια, η πιο σημαντική δραστηριότητα του φυτού έχει αποδοθεί στις διουρητικές του επιδράσεις. Συχνά λοιπόν επιλέγεται για την θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού, όπως δυσουρία (Hanif *et al.*, 2019). Ενδεικτικά, εκχυλίσμα ρίζας έχει την δυνατότητα να μειώσει την ουρολιθίαση καθώς μειώνει τις εναποθέσεις οξαλικού ασβεστίου στο νεφρό (Kianitalaei *et al.*, 2019; Ahmadi *et al.*, 2012). Εν συνεχεία, τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες που υπάρχουν στην αλθέα απομονώνονται και χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φυσικών φαρμάκων με αντιφλεγμονώδη και αντιβακτηριακή δράση που συμβάλλουν στην προστασία του γαστρεντερικού σωλήνα. Άρα, καθίσταται σαφές πως μπορεί να γίνει χρήση αλθέας για την αντιμετώπιση παθήσεων όπως ίκτερος, γαστρεντερίτιδα και δυσπεψία (Hanif *et al.*, 2019).

Μελέτες έδειξαν ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα της αλθέας μπορούν να εφαρμοστούν ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες καθώς τα εκχυλίσματα κατέστειλαν αξιοσημείωτα τον μετασχηματισμό των νεοπλασματικών κυττάρων, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της

κινάσης του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και προάγοντας την απόπτωση σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα (Hashemi *et al.*, 2021)

Επίσης, η αλθέα δύναται να λειτουργήσει για την καταπολέμηση συμπτωμάτων κρυολογήματος, όπως βήχα, πονόλαιμο, πυρετό, αλλά και ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος, όπως βρογχίτιδα και άλλες φλεγμονές. Το τσάι από το συγκεκριμένο φυτό είναι τονωτικό, καταπραυντικό και έχει μαλακτικές και αντιβηχικές δράσεις (Ammar *et al.*, 2013). Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ακόμη και στις βιομηχανίες καλλυντικών καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κατάπλασμα για ερεθισμούς του δέρματος, εγκαύματα και μώλωπες, ενώ διαθέτει και αντιπυριδικές ιδιότητες (Shehzad *et al.*, 2019).

Τέλος, τα ποικιλόχρωμα άνθη της αλθέας, έπειτα από διαδικασίες εκχύλισης, μπορεί να αξιοποιηθούν για την παρασκευή φυσικών βαφών για χρώση υφασμάτων, όπως μαλλί, μετάξι ή βαμβάκι. Γενικά, έχει αποδειχθεί πως η βαφή από αλθέα είναι ικανοποιητική συγκριτικά με παραδοσιακές βαφές. Ακόμη, με προσθήκη 2 %-4 % προστύμματος, το χρώμα που προκύπτει κυμαίνεται από πράσινο μέχρι καφέ (Hamdy *et al.*, 2021).

1.3 Βελτίωση Φαρμακευτικών Φυτών

Αναντίρρητα η ζήτηση φαρμακευτικών προϊόντων φυτικής προέλευσης θα αυξάνεται σημαντικά μέσα στα επόμενα χρόνια. Αδιαμφισβήτητα η εισαγωγή των φαρμακευτικών φυτών στην καλλιέργεια αποτελεί λύση στο πρόβλημα διαθεσιμότητά τους. Παρόλα αυτά, μέχρι και σήμερα η αξιοποίησή τους για θεραπευτικούς λόγους απέχει πολύ από το ιδανικό καθώς υπάρχουν αρκετά ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Επιγραμματικά, παρατηρείται υποβάθμιση φυσικών οικοσυστημάτων, συχνά χαμηλή συγκέντρωση επιθυμητών ουσιών στους εκάστοτε φυτικούς ιστούς, ενώ αναφορικά με την καλλιέργειά τους, πέραν των τεχνικών δυσκολιών, δυσχεραίνεται περαιτέρω λόγω της έλλειψης ποικιλιών για την πλειοψηφία των ειδών (Kumar and Gupta, 2008). Ακόμη, τα φαρμακευτικά φυτά έχουν στερηθεί το σύνδρομο εξημέρωσης, με αποτέλεσμα η επιστήμη να καλείται να αντισταθμίσει τις σχετικές ελλείψεις, συχνά αξιοποιώντας τις σύγχρονες και ταχύτερες βιοτεχνολογικές μεθόδους. Συνεπώς, για την επίτευξη βιώσιμης εκμετάλλευσής τους, το τρέχον πρότυπο παραγωγής πρέπει να τροποποιηθεί και να αναζητηθούν εναλλακτικές στρατηγικές μέσω των βιοτεχνολογικών μεθόδων που προσφέρει η επιστήμη της βελτίωσης των φυτών (Iannicelli *et al.*, 2019).

Γενικά, ως βασικός στόχος των προγραμμάτων βελτίωσης τίθεται η ενσωμάτωση επιθυμητών χαρακτηριστικών στους απογόνους μέσω επαναλαμβανόμενων διασταυρώσεων και κύκλων επιλογής έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή ομοιομορφία και σταθερότητα (Κατσιώτης και Χατζόπουλος, 2019). Σχετικά με τη βελτίωση των φαρμακευτικών φυτών, πρωταρχικό μέλημα αποτελεί η αύξηση της παραγωγής και ποιότητας των δευτερογενών μεταβολιτών καθώς σε αυτούς αποδίδονται οι φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Επιπλέον, η γενετική και η βιοτεχνολογία συμβάλλουν στην ταχύτερη βελτίωση καθώς επιτρέπουν την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας, την τροποποίηση της δραστηριότητας ή τοξικότητας των ενώσεων τους καθώς και την διατήρηση και των πολλαπλασιασμό ειδών (Niazian, 2019). Ταυτόχρονα, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών, στο έργο του βελτιωτή εντάσσονται χαρακτηριστικά, όπως η σταθερότητα και η αύξηση της απόδοσης, η αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και η ομοιομορφία του φυτρώματος. Φυσικά, οι βελτιωτικοί στόχοι διαμορφώνονται ανάλογα με την κατεύθυνση χρήσης του παραγόμενου προϊόντος. Για παράδειγμα, για τα φυτά που προορίζονται για την βιομηχανία αιθέριων ελαίων, σημαντικότερο είναι να επιτευχθεί η επιθυμητή περιεκτικότητα αιθέριου ελαίου παρά η αυξημένη παραγωγή βιομάζας (Κατσιώτης και Χατζόπουλος, 2019).

1.3.1 Μοριακές μέθοδοι βελτίωσης

Ο όρος «Μοριακή Βελτίωση» περιγράφει το διεπιστημονικό κλάδο της σύγχρονης βελτίωσης φυτών που συνδέει τεχνικές και μεθόδους της μοριακής βιολογίας με συμβατικές βελτιωτικές προσεγγίσεις για την παραγωγή σύγχρονων ποικιλιών (Τσαυτάρης κ.α., 2012).

- **Ιστοκαλλιέργεια**

Η καλλιέργεια φυτικών ιστών αναφέρεται στην *in vitro* μέθοδο καλλιέργειας ολόκληρων φυτών, οργάνων, ιστών ή κυττάρων υπό ελεγχόμενες και ασηπτικές συνθήκες. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται προμηθεύει το φυτό ή το έκφυτο με τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά και ρυθμιστές ανάπτυξης. Οι κλώνοι που προκύπτουν είναι πανομοιότυποι με το μητρικό υλικό (Oseni *et al.*, 2018 ; Phillips and Garda, 2019). Μικρά τμήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παραχθούν εκατοντάδες ή και χιλιάδες φυτά σε μια συνεχή διαδικασία.

Η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται ευρέως στα φαρμακευτικά φυτά. Εκτός από τη χρήση της ως εργαλείο έρευνας, πλέον αποκτά μεγάλη βιομηχανική σημασία στον τομέα του

πολλαπλασιασμού των φυτών. Συνεπώς, επιτρέπει στην *in situ* και *ex situ* διατήρηση των ειδών, ιδιαίτερα αυτών που απειλούνται, συμβάλλοντας στη διατήρηση της βιοποικιλότητας. Επίσης, επιτρέπει τη δημιουργία πολλαπλασιαστικού υλικού από άγριους πληθυσμούς και τη μαζική παραγωγή του (Canter *et al.*, 2005). Περαιτέρω, δρα επικουρικά με τεχνικές βελτίωσης φαρμακευτικών φυτών, όπως ο μετασχηματισμός μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium*, συμβάλλοντας σε ενισχυμένη *in vitro* παραγωγή πολύτιμων φυτικών ενώσεων. Τέλος, αποτελεί απαραίτητο στάδιο αξιολόγησης της επίδρασης διαφορετικών πειραματικών συνθηκών για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Η ιστοκαλλιέργεια μπορεί να συμβάλει στην παραγωγή νέων μορφών δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και προσαρμοσμένων φαρμακευτικών φυτών, πολύτιμων για τα τρόφιμα, τα φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες βιομηχανίες (Niazian, 2019).

- **Μοριακοί Δείκτες**

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA συγκεκριμένης αλληλουχίας που προκύπτουν από την επεξεργασία του γονιδιώματος. Στα πλεονεκτήματά τους συγκαταλέγεται το γεγονός ότι δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, είναι φαινοτυπικά ουδέτεροι και δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας τόσο σε διαπληθυσμιακό όσο και σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο.

Οι μοριακοί δείκτες βρίσκουν ευρεία χρήση στα φαρμακευτικά φυτά καθώς το πρώτο βήμα για τη βελτίωση της ποιότητας και της επάρκειάς τους είναι η χαρτογράφηση του DNA που επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης μοριακών δεικτών (Sharma *et al.*, 2018). Αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για την ακριβή γενετική ταυτοποίηση ειδών επιταχύνοντας την διαδικασία επιλογής (Κατσιώτης και Χατζόπουλος, 2019). Εν συνεχεία, χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλότητας αλλά και για τον έλεγχο της αυθεντικότητας φυτικού υλικού που προορίζεται για την παρασκευή φαρμάκων (Kumar and Gupta, 2008). Ακόμη, μέσω των δεικτών δύναται να μειωθεί σημαντικά ο χρόνος που απαιτείται για την αναπαραγωγή ειδών (Yu *et al.*, 2016). Ένας τεράστιος αριθμός μοριακών δεικτών είναι πλέον διαθέσιμος προς χρήση, με την καταλληλότητά τους να έγκειται στους στόχους του βελτιωτή. Μεταξύ των πλέον χρησιμοποιούμενων μοριακών δεικτών συγκαταλέγονται οι AFLP, RFLP, RAPD, SSRs, ISSR και ο πρόσφατης ανάπτυξης NGS (Ganie *et al.*, 2015). Αναφορικά, οι δείκτες AFLP συνέβαλαν στην ταυτοποίηση δύο ειδών του γένους *Zanthoxylum* ώστε να ελεγχθεί η νοθεία που παρατηρείται σε φαρμακοβιομηχανίες που

χρησιμοποιούν τα εν λόγω είδη. Επίσης, οι δείκτες AFLP αξιοποιήθηκαν σε προγράμματα βελτίωσης της ρίγανης (Sharma *et al.*, 2018). Οι δείκτες RAPD χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της γενετικής ομοιότητας των ειδών *Eucalyptus urophylla* και *Eucalyptus grandis* (Joshi *et al.*, 2004). Φυσικά υπάρχει πληθώρα παραδειγμάτων χρήσης μοριακών δεικτών προς όφελος της έρευνας σε φαρμακευτικά είδη.

1.4 Γενετική Μηχανική

Η γενετική μηχανική αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές και αμφιλεγόμενες πλευρές της γενετικής έρευνας. Ορίζεται η διαδικασία τροποποίησης κυττάρων ή οργανισμών με τη χρήση του ανασυνδυασμένου DNA. Περιλαμβάνει ουσιαστικά τις τεχνικές με τις οποίες μεταφέρεται γενετικό υλικό από έναν οργανισμό σε έναν άλλο με σκοπό την ανάπτυξη νέων προϊόντων. Το κύτταρο στο οποίο έχει εισαχθεί κάποιο γονίδιο με τεχνητά μέσα ονομάζεται διαγονιδιακό κύτταρο (transgenic cell), ενώ το εξωγενές γονίδιο ονομάζεται διαγονίδιο (transgene) (Russell, 2006). Τέλος ο οργανισμός και στην συγκεκριμένη περίπτωση το φυτό, θεωρείται γενετικά τροποποιημένο.

Η μεταφορά μπορεί να γίνει αφενός άμεσα με μεθόδους, όπως η μικροέγχυση, η ηλεκτροδιηθήση και η βιολιστική, και αφετέρου έμμεσα με την χρήση φορέων. Ενδεικτικά, βιολιστική είναι η τεχνική που “πυροβολεί” το γονίδιο ενδιαφέροντος στο δυνητικό κύτταρο - ξενιστή. Φυσικά, η διαδικασία για να θεωρηθεί επιτυχής, πρέπει τα μικροσκοπικά σωματίδια και το DNA να εισέλθουν στους πυρήνες των κυττάρων και να ενσωματωθούν στο φυτικό γονιδίωμα. Εν συνεχεία, βακτήρια και ιοί μπορούν επίσης να μεταφέρουν γονιδιακά τμήματα σε ένα νέο κύτταρο. Οι πιο συνήθεις φορείς για μεταφορά σε φυτά είναι το *Agrobacterium tumefaciens* και το *Agrobacterium rhizogenes*. Στο έδαφος, τα βακτήρια μολύνουν τα φυτά με το δικό τους πλασμίδιο, μεταφέροντας το επιθυμητό γονίδιο που τοποθετήθηκε στο DNA των βακτηρίων. Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης το T-DNA, το μεταφερόμενο τμήμα του Ti ή του πλασμιδίου Ri, ενσωματώνεται στο φυτικό χρωμόσωμα. Γενικά, η μεταφορά γονιδίων με φορέα είναι μια προτιμώμενη μέθοδος μετασχηματισμού, δεδομένου ότι αυτή η τροποποίηση συμβαίνει ήδη με φυσικό τρόπο στο περιβάλλον (Kumar and Kumar, 2015). Επιπρόσθετα, ο μετασχηματισμός με την χρήση του αγροβακτηρίου παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους. Αρχικά προσφέρει τη δυνατότητα μεταφοράς ενός ή λίγων αντιγράφων τμημάτων DNA με τα επιθυμητά γονίδια αλλά και την μεταφορά μεγάλων τμημάτων με ελάχιστη αναδιάταξη σε υψηλότερες

αποδόσεις και χαμηλότερο κόστος. Παρατηρείται σταθερότερη ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του φυτού (Tripathi and Tripathi 2005). Επίσης, στα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά η ανάπτυξη αποτελεσματικών πρωτοκόλλων μετασχηματισμού με την μεσολάβηση του αγροβακτηρίου συχνά οδηγεί σε αύξηση της περιεκτικότητας σε δευτερογενείς μεταβολίτες. Υπάρχει πληθώρα παραδειγμάτων επιτυχούς γενετικού μετασχηματισμού με αυτόν τον τρόπο, όπως στα είδη: *Atropa belladonna*, *Echinacea purpurea*, *Artemisia sp*, *Scrophularia sp* κ.α. (Siahshar *et al.*, 2011).

Η καλλιέργεια και η συλλογή φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών αντιμετωπίζουν σοβαρές προκλήσεις, όπως έχει προαναφερθεί. Η γενετική μηχανική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των εν λόγω φυτών σε ασθένειες, έντομα και ζιζανιοκτόνα, καθώς και για τη βελτίωση της απόδοσής τους και την αύξηση της περιεκτικότητας σε δραστικές ουσίες. Έτσι, η βιοτεχνολογία δύναται να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο τόσο στη διατήρηση και προστασία όσο και στην καλλιέργεια φαρμακευτικών φυτών σε μεγάλες εκτάσεις. Φυσικά, κατά την ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ασφάλεια των διαγονιδιακών φαρμακευτικών φυτών. Για το λόγο αυτό, καθίσταται αναγκαίο να θεσπιστεί ένα σύνολο προτύπων επιστημονικής αξιολόγησης και κρίσης της ασφάλειας με βάση την αναγνώριση της ιδιαιτερότητάς τους (Teng and Shen, 2015).

Σαφώς, η γενετική τροποποίηση παρέχει πολλά οφέλη στην κοινωνική, οικονομική και περιβαλλοντική ευημερία. Ωστόσο οι οικολογικοί κίνδυνοι είναι αναπόφευκτοι, ακόμη και υπό συστηματική παρακολούθηση. Αναλυτικότερα, συχνά εκφράζονται ανησυχίες για γενετική διάβρωση και μείωση της φυτικής ποικιλομορφίας. Η εισαγωγή ενός νέου γονιδίου σε ένα υπάρχον γονιδίωμα μπορεί να θεωρηθεί ότι αυξάνει την βιοποικιλότητα. Όμως, λόγω του ανταγωνισμού που δημιουργείται μεταξύ των αρχικών και των γενετικά τροποποιημένων φυτών, ελλοχεύουν κίνδυνοι εξαφάνισης των πρώτων κατά την φυσική επιλογή. Ταυτόχρονα, μπορεί σταδιακά να αυξηθεί η ανθεκτικότητα των εντόμων αλλά και να αναπτυχθούν νέα φυτοπαθογόνα, με αποτέλεσμα το έργο της αντιμετώπισής τους να γίνει πιο δύσκολο (Kumar and Kumar, 2015)

Όπως με κάθε νέα τεχνολογία, ο κόσμος είναι επιφυλακτικός με τις αλλαγές. Αναλογιζόμενοι τους παραπάνω κινδύνους αλλά και θέματα ασφάλειας, όπως ο δυνητικός αντίκτυπος που προκύπτει από τη χρήση των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων στην υγεία, οι άνθρωποι είναι συχνά διστακτικοί στη χρήση τους. Ωστόσο, καλώς ή κακώς, οι αναδυόμενες

τεχνολογίες δεν μπορούν να αγνοηθούν και χρήζουν σοβαρής προσοχής από τους επιστήμονες, την πολιτική και τους εκπροσώπους του κοινού (Vergragt and Brown, 2008). Συνεπώς, η διστακτικότητα του κοινού και οι πιθανοί κίνδυνοι μπορούν να περιοριστούν μόνο με προσεκτικό σχεδιασμό, δημιουργία νομοθετικού πλαισίου που θα προστατεύει από αλόγιστες χρήσεις και σίγουρα ενδεδειγμένη έρευνα πριν το προϊόν διατεθεί στην αγορά.

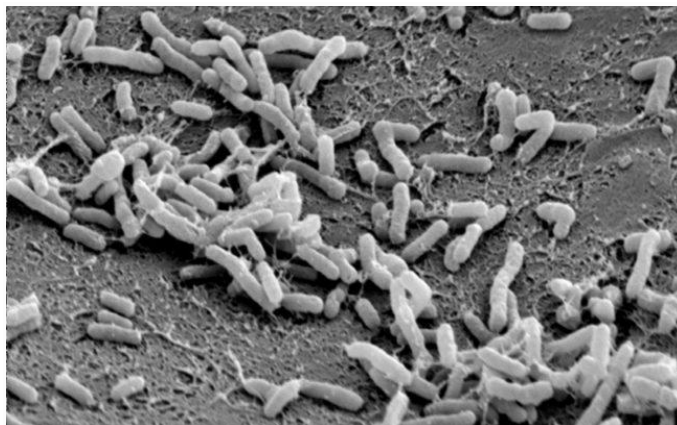
1.5 Το *Agrobacterium rhizogenes*

Το γένος *Agrobacterium* της οικογένειας Rhizobiaceae περιλαμβάνει αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα, αερόβια, εδαφογενή βακτήρια, σαπρόφυτα και παράσιτα, που προσβάλλουν μεγάλο εύρος ξενιστών και προκαλούν υπερπλασίες, όπως όγκους ή ανώμαλο πολλαπλασιασμό ριζών (Τζάμος, 2017). Αντιπροσωπευτικά είδη αποτελούν τα είδη *Agrobacterium tumefaciens* (πλέον *Rhizobium radiobacter*) και το *Agrobacterium rhizogenes* (πλέον *Rhizobium rhizogenes*). Και τα δύο μπορούν να μολύνουν, μέσω πληγών, κυρίως δικοτυλήδονα και ορισμένα μονοκοτυλήδονα είδη, μεταφέροντας γονίδιά τους στο φυτό-ξενιστή (Nilsson and Olsson, 1997).

Η ασθένεια της τριχωτής ρίζας («hairy root») οφείλεται στο βακτήριο *A. rhizogenes* και χαρακτηρίζεται από τον άφθονο πολλαπλασιασμό των τυχαίων ριζών στα σημεία της βακτηριακής μόλυνσης (Cardarelli et al., 1987). Αναλυτικότερα, όταν το βακτήριο μολύνει το φυτό, το T-DNA μέσω του Ri πλασμιδίου του *A. rhizogenes* μεταφέρεται και ενσωματώνεται στο πυρηνικό γονιδίωμα του φυτού - ξενιστή. Ο μετασχηματισμός παράγει ένα πολύτιμο υποπροϊόν, την τριχωτή ρίζα, η οποία σχηματίζεται στο σημείο της μόλυνσης ή κοντά σε αυτό. Επιπλέον, παράγονται οπίνες που χρησιμεύουν ως ειδική τροφή για το βακτήριο. Συγκεκριμένα, οι οπίνες είναι παράγωγα σακχάρων και αμινοξέων, δεν μεταβολίζονται από το φυτό, αλλά χρησιμοποιούνται από το *Agrobacterium*. Οι τριχωτές ρίζες αναπτύσσονται ταχέως, παρουσιάζουν πλαγιοτροπική ανάπτυξη και φέρουν έντονες διακλαδώσεις (Hu and Du 2006; Nilsson and Olsson 1997).

Ο όρος "τριχωτή ρίζα" εμφανίστηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία το 1900, όταν ο Stewart (1900) τον εισήγαγε για να περιγράψει μολυσμένες σπυροφόρες καλλιέργειες. Η φράση, "σύνδρομο τριχωτής ρίζας", χρησιμοποιήθηκε από τον Hildebrandt (1934) για να περιγράψει ένα σύνολο συμπτωμάτων της ασθένειας που περιλαμβάνουν την εμφάνιση μιας μικροσκοπικής, τριχωτής μάζας ριζών λόγω βακτηριακής μόλυνσης. Παρ' όλα αυτά, ήταν οι

Riker *et al.* (1930) που αναγνώρισαν, προσδιόρισαν και χαρακτήρισαν την αιτιολογική οντότητα ως *A. rhizogenes*, και ο Ackermann (1977) που κατέδειξε τη δυνητική του χρήση στον μετασχηματισμό φυτών (Shilpha *et al.*, 2022).



Εικόνα 1.3: Μορφολογία *Agrobacterium rhizogenes*

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

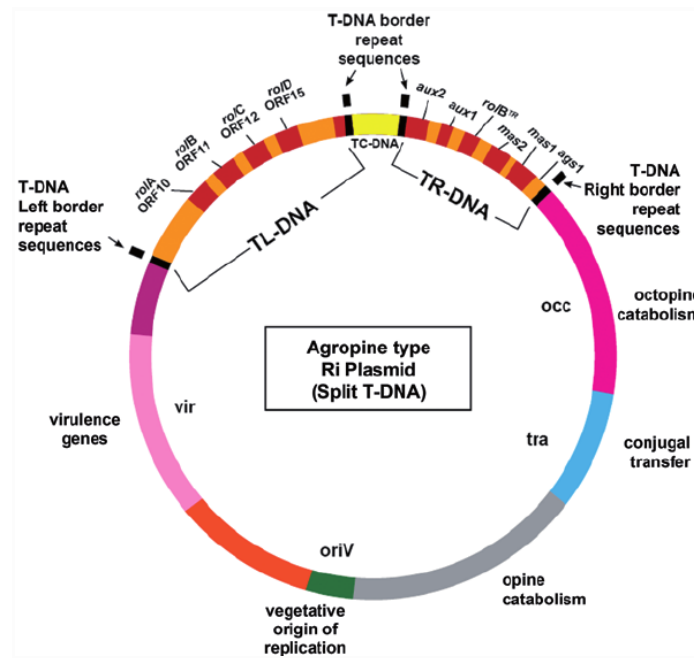
1.5.1 Πλασμίδιο Ri

Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια της οικογένειας Rhizobiaceae περιέχουν μεγάλα πλασμίδια που είναι απαραίτητα για τον παρασιτισμό ή τη συμβίωση με τα φυτά-ξενιστές τους. Στην περίπτωση του *A. Rhizogenes*, το πλασμίδιο Ri είναι υπεύθυνο για την ασθένεια των τριχωτών ριζών (Moriguchi *et al.*, 2001). Η διαδικασία της μόλυνσης περιλαμβάνει τέσσερα διαδοχικά στάδια: την ενεργοποίηση, την απελευθέρωση της μονόκλωνης περιοχής T-DNA από το πλασμίδιο Ri και τη μεταφορά του στα φυτικά κύτταρα, την ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα και τέλος την έκφραση των γονιδίων. Τα συμπτώματα της ασθένειας εκδηλώνονται μέσα σε 1 με 4 εβδομάδες και αποτελούν απόδειξη του τροποποιημένου φαινότυπου του φυτού-ξενιστή (Kassab B, *et al.*, 2022)

Το πλασμίδιο Ri είναι κυκλική δομή DNA μεγέθους 180-250 Kbp. Τα στελέχη του *A. rhizogenes* μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε διάφορες υποομάδες με βάση τον τύπο των οπινών που παράγουν. Έχουν καταγραφεί τέσσερις τύποι οπινών και Ri πλασμιδίου: i) το agropine (αντιπροσωπεύεται από τα πλασμίδια Ri pRiA4, pRi1855, pRiHRI, pRi15834 και pRiLBA9402), ii) το mannopine (pRi8196), iii) το cucumopine (pRi2659), iv) το mikimopine (pRi1724) (Veena and Taylor 2007). Το T-DNA, το οποίο είναι το τμήμα του Ri πλασμιδίου που μεταφέρεται, φέρει γονίδια υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση των οπινών,

ογκογονίδια (γονίδια *rol*) και γονίδια άγνωστης λειτουργίας (ORFs). Τα συγκεκριμένα γονίδια κωδικοποιούνται κατά την ενσωμάτωση, με αποτέλεσμα την παραγωγή αυξίνης και κυτοκινινών, προκαλώντας την ανάπτυξη εκβλαστήσεων από τις πληγείσες περιοχές. Επιπλέον, όλα τα γονίδια *rol* (*rolA*, *rolB* και *rolC*) έχουν συγκεκριμένο ρόλο και είναι γνωστό ότι αποτελούν βασικούς διεγέρτες της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης των φυτικών κυττάρων. Ενδεικτικά, το *rolA* ελέγχει τον σχηματισμό των ριζών και την ανάπτυξή τους, το *rolB* αποτελεί καίριο ρυθμιστή της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, καταστέλλοντας ωστόσο την αύξηση των κυττάρων και επιδρώντας στην ανάπτυξη κάλου, το γονίδιο *rolC* είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη της ρίζας και την παραγωγή νικοτίνης (Shilpha et al., 2022).

Ακόμη, τα στελέχη του *A. rhizogenes* διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά την πολικότητα της μόλυνσης του φυτικού ιστού. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη τύπου agropine είναι μη πολικά, καθώς προκαλούν το σχηματισμό τριχωτών ριζών ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό του δίσκου, ενώ όλα τα άλλα στελέχη είναι πολικά, καθώς προκαλούν το σχηματισμό πολυάριθμων ριζών μόνο όταν ο δίσκος τοποθετείται σε ανάστροφο προσανατολισμό. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση στην πολικότητα της μόλυνσης ενδεχομένως οφείλεται στην παρουσία ενός δεύτερου T-DNA. Άρα στα στελέχη του τύπου agropine το T-DNA διακρίνεται σε TL-DNA και TR-DNA. Η μεταφορά του TL-DNA είναι απαραίτητη για την επαγωγή του συνδρόμου της τριχωτής ρίζας. Αντιθέτως, το TR-DNA αποτελείται από τα γονίδια *aux1* και *aux2*, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση αυξίνης και θεωρείται ότι παίζουν επικουρικό ρόλο στην επαγωγή των τριχωτών ριζών. Σαφώς, τα υπόλοιπα στελέχη (mannopine, cucumopine, mikimopine) διαθέτουν ένα T-DNA.



Εικόνα 1.4 : Απεικόνιση του Ri-πλασμιδίου τύπου-agropine του *A. rhizogenes*. (Πηγή: Ozyigit et al., 2013)

1.5.2 Φαινότυπος Ri

Με την ενσωμάτωση του T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού παρατηρούνται αλλαγές στον φαινότυπο εξαιτίας των γονιδίων που προέρχονται από το πλασμίδιο Ri, με τα γονίδια *rol* να ελέγχουν κατά βάση τις μορφολογικές μεταβολές (Giardi *et al.*, 2010). Η παρουσία αυτού του εξωγενούς τμήματος DNA δεν εμποδίζει την αναγέννηση φυτών από τις «τριχωτές ρίζες» (Cardarelli *et al.*, 1987). Προκύπτουν λοιπόν φυτά με αλλοιωμένο φαινότυπο, τον επονομαζόμενο φαινότυπο-Ri ή φαινότυπο-HR (Hairy Root). Συνεπώς, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται είναι τα εξής: αρχικά το φυτό παρουσιάζει συμπαγή ανάπτυξη που προκαλείται από την μειωμένη κυριαρχία της κορυφής και τα μικρότερα σε μήκος μεσογονάτια διαστήματα. Επίσης, προκαλείται κατσάρωμα φύλλων, καθυστερημένη ανθοφορία και μειώνεται η γονιμότητα. Τέλος, οι τριχωτές ρίζες που δημιουργούνται χαρακτηρίζονται από ταχεία ανάπτυξη, αυξημένες πλάγιες διακλαδώσεις και τροποποιημένο γεωτροπισμό (Roychowdhury *et al.*, 2013). Βέβαια, αναμένεται να υπάρχει ένα εύρος διακύμανσης στα παραπάνω γνωρίσματα καθώς διαφορετικά βακτηριακά στελέχη οδηγούν σε διαφορετική μορφολογία (Giri and Narasu, 2000).

1.5.3 Αξιοποίηση του *Agrobacterium rhizogenes* για μετασχηματισμό φαρμακευτικών φυτών

Οι καλλιέργειες τριχωτών ριζών διαθέτουν διάφορες ιδιότητες, που έχουν προωθήσει τη χρήση τους για βιοτεχνολογικές εφαρμογές φυτών. Η ταχεία ανάπτυξή τους, ο σύντομος χρόνος πολλαπλασιασμού, η ευκολία συντήρησης, το χαμηλό κόστος και η ικανότητά τους να συνθέτουν μια σειρά χημικών ενώσεων και πρωτεϊνών είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα. Επιπρόσθετα, έχουν συνήθως την ικανότητα σύνθεσης των ίδιων ενώσεων με τις ρίζες άγριου τύπου του μητρικού φυτού, χωρίς τις απώλειες που συχνά παρατηρούνται με χρήση άλλων μεθόδων. Μέχρι σήμερα, ο μετασχηματισμός μέσω του *A. rhizogenes* έχει χρησιμοποιηθεί σε περισσότερα από 100 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων αρκετών απειλούμενων φαρμακευτικών φυτών (Veena and Taylor 2007).

Βάσει των ανωτέρω, ο γενετικός μετασχηματισμός, μέσω του *A. rhizogenes*, συνεισφέρει στη βελτιωτική διαδικασία, προσφέροντας δυνατότητες ενίσχυσης της παραγωγής φαρμακευτικών ουσιών. Στα φαρμακευτικά φυτά, ο μετασχηματισμός μέσω του *A. rhizogenes* έχει ως κύριο στόχο την παραγωγή και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών. Οι τριχωτές ρίζες που σχηματίζονται *in vitro* χαρακτηρίζονται από βιοχημική και γενετική σταθερότητα, καθώς και ταχεία ανάπτυξη χωρίς τη χρήση φυτοορμονών και συνεπώς μπορούν παραδείγματος χάριν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για τη σύνθεση υψηλότερων επιπέδων φλαβονοειδών (Faraz *et al.*, 2020).

Ενδεικτικά, ο μετασχηματισμός του είδους *Levisticum officinale* με το στέλεχος A4 του *A. Rhizogenes*, που φέρει το πλασμίδιο pRiA4::70GUS, οδήγησε στην δημιουργία φυτών με αυξημένη βιομάζα, ενώ παράλληλα η σύνθεση του ελαίου δεν έδειξε καμία ποιοτική αλλαγή (Santos *et al.*, 2005). Κατά τον μετασχηματισμό του είδους *Atropa belladonna* με τα στελέχη A4 και 8196 παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των αλκαλοειδών (Jung and Terper 1987). Επιπλέον, οι Ionkova και Alfermann (1994) μελέτησαν τις δυνατότητες των τριχωτών ριζών της *Althea officinalis*, που αποτελεί συγγενικό είδος με την *Althea rosea*, έπειτα από μετασχηματισμό με τη χρήση του *A. rhizogenes*. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος LBA 9402, το οποίο φέρει το πλασμίδιο pRi 1855, και τα ευρήματα ανέδειξαν ότι οι διαγονιδιακές ρίζες εμφανίζουν σταθερότητα ως προς τον ρυθμό ανάπτυξής τους και την παραγωγή πολυσακχαριτών για διάστημα άνω των 2 ετών. Εν συνεχεία, σε πιο πρόσφατη έρευνα, φυτά του είδους *Althea officinalis* μετασχηματίστηκαν με 4 διαφορετικά στελέχη του *A. Rhizogenes*, τα A4, A13, ATCC15834, ATCC15834GUS. Τα ευρήματα της μελέτης, τα

διαφορετικά στελέχη επάγουν με διαφορετικό τρόπο τον σχηματισμό τριχωτών ριζών, οι οποίες εμφανίστηκαν 5-12 μέρες μετά τον εμβολιασμό. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και флаβονοειδή παρατηρήθηκε σε μετασχηματισμένα φυτά με τα στελέχη A13 και A4 (Tavassoli and Safipour Afshar 2018).

1.6 Σκοπός της Μελέτης

Η τάση για αναζήτηση προϊόντων φυτικής προέλευσης αδιαμφισβήτητα πρόκειται να αυξηθεί μέσα στα επόμενα χρόνια. Οι αυξανόμενες απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού αλλά και των φαρμακοβιομηχανιών δημιουργεί δυσκολίες αναφορικά με την άμεση διάθεση φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών και των συστατικών τους. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η αξιοποίηση βελτιωτικών μεθόδων, που θα συνεισφέρουν στην προσπάθεια για επιτάχυνση παραγωγής βιοδραστικών ενώσεων. Ενόψει της υφιστάμενης κατάστασης, ο γενετικός μετασχηματισμός με φορέα το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* εφαρμόζεται σε ολόένα και περισσότερα φαρμακευτικά φυτά (κυρίως σε αυτά που συνθέτουν πολύτιμες ενώσεις στις ρίζες), διότι οδηγεί επιτυχώς στην αύξηση παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών. Η αλθέα είναι ένα αναξιοποίητο φαρμακευτικό φυτό με σπουδαίες ιδιότητες. Ωστόσο, η αξιοποίησή της σε μεγάλη κλίμακα περιορίζεται σημαντικά αφενός μεν λόγω της ανεπαρκούς διαθέσιμης βιομάζας των ριζών και αφετέρου λόγω της περιορισμένης σύνθεσης βιοδραστικών ενώσεων. Παράλληλα, η αλθέα ως είδος δεν έχει δεχτεί συστηματική έρευνα γενετικής τροποποίησης μέχρι σήμερα, με αποτέλεσμα να είναι περιορισμένες οι σχετικές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Αντικείμενο της μελέτης, ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althea rosea* L. με φορέα το *A. rhizogenes*. Τα προσδοκώμενα αποτελέσματα ήταν η δημιουργία σπορόφυτων με διαγονιδιακές ρίζες, από τις οποίες μεταγενέστερα θα γίνει εξαγωγή των συστατικών ενδιαφέροντος. Ως βακτηριακό στέλεχος επιλέχθηκε το R1000, ενώ ταυτόχρονα εξετάστηκαν δύο πρωτόκολλα μετασχηματισμού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Για την επίτευξη ανάπτυξης πρωτοκόλλου για το γενετικό μετασχηματισμό του είδους *Althaea rosea* L., με κοινό όνομα αλθέα ή δενδρομολόχα, χρησιμοποιήθηκαν πιστοποιημένοι σπόροι από την εταιρεία Pharmasaat (<https://pharmasaat.de/en/>), που έχει ειδικευση στην προμήθεια γενετικού υλικού φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών. Το συγκεκριμένο είδος είναι πολυετές βότανο με βάρος 1000 σπόρων 10 γραμμάρια. Ο σπόρος είναι ελλειπτικός και χρώματος καφέ (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 : Σπόροι *Althaea rosea*

2.2 Στέλεχος του *Agrobacterium rhizogenes* - Συνθήκες ανάπτυξης

Για τον μετασχηματισμό της αλθέας έγινε χρήση του βακτηριακού στελέχους **R1000** του *Agrobacterium rhizogenes*. Στην αρχή, το βακτήριο αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (LB) ποσότητας 10 ml, στο οποίο είχε προστεθεί το αντιβιοτικό ναλιδιξικό οξύ σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g ml}^{-1}$. Το βακτήριο παρέμεινε στο υπόστρωμα σε θερμοκρασία 28°C για δύο ημέρες ή μέχρι να αποκτήσει $\text{OD}_{600} = 0,6-1,0$. Έπειτα, με στόχο την προετοιμασία εμβολίου, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων. Για το

σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση 10 ml της καλλιέργειας για 5 λεπτά στις 3000 στροφές. Στην συνέχεια, αφού έγινε προσθήκη 1 ml MS, έγινε εκ νέου φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml MS, το οποίο αποτέλεσε εν τέλει το εμβόλιο για τον μετασχηματισμό των σπορόφυτων.

2.3 Διαδικασία μετασχηματισμού σπορόφυτων αλθέας μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*

Η διαδικασία του γενετικού μετασχηματισμού της αλθέας στηρίχθηκε στο πρωτόκολλο των Pavli και Skaracis (2010), ενώ έγιναν ορισμένες αλλαγές για την καλύτερη προσαρμογή στο είδος. Εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα (Πίνακας 2.1 - Πίνακας 2.2), τα οποία διέφεραν ως προς τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος.

2.3.1 Πρωτόκολλο 1

Πίνακας 2.1: Σύνθεση υποστρωμάτων πρωτοκόλλου 1 που εφαρμόστηκε για τον γενετικό μετασχηματισμό του είδους *Althaea rosea* μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΣΥΝΘΕΣΗ
Υπόστρωμα Βλάστησης	MS/Vitamins: 2,2g/L Sucrose: 10g/L Agar: 5g/L
Υπόστρωμα Συν-καλλιέργειας	MS/Vitamins: 2,2g/L Sucrose: 10g/L Agar: 5g/L Ακετοσυριγκόνη: 100μM
Υπόστρωμα Επαγωγής Ριζών	MS/Vitamins: 2,2g/L Sucrose: 10g/L Agar: 5g/L Σεφοταξίμη: 250mg/L
MS	MS: 4,4g/L Sucrose: 30g/L Ακετοσυριγκόνη: 100μM

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

2.3.1.1 Προετοιμασία εκφύτων αλθέας

Πρώτα διεξήχθη η επιφανειακή απολύμανση των σπόρων με την τοποθέτησή τους σε διάλυμα χλωρίνης 20 %, που περιείχε Tween-20 (1 %), για 5 λεπτά και έπειτα έγιναν τρεις πλύσεις με αποστειρωμένο dH₂O. Μετά την απολύμανση οι σπόροι μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί ώστε να απορροφηθεί η περίσσεια υγρασία. Στην συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης (Εικόνα 2.2). Χρησιμοποιήθηκαν 15 τρυβλία και το καθένα είχε από 10 σπόρους. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm για αποφυγή εξάτμισης και πιθανών μολύνσεων και τέλος μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με σταθερές και ελεγχόμενες συνθήκες (22 °C, 16 h φωτός, 8 h σκοτάδι) για 1 εβδομάδα, έως ότου εκπτυχθεί στέλεχος και ρίζες.



Εικόνα 2.2: Αποστειρωμένοι σπόροι αλθέας σε τρυβλίο με υπόστρωμα βλάστησης.



Εικόνα 2.3: Βλάστηση σπόρων ύστερα από 3 ημέρες.

2.3.1.2 Μετασχηματισμός σπορόφυτων αλθέας

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό υγιή σπορόφυτα αλθέας με φυσιολογικό φαινότυπο και ηλικίας 1 εβδομάδας. Τα σπορόφυτα κόπηκαν με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού και αποστειρωμένης λαβίδας στην περιοχή του υποκοτυλίου, απομακρύνοντας με αυτόν τον τρόπο τις ρίζες που είχαν αναπτυχθεί. Το τμήμα που δέχτηκε την τομή εμβαιπίστηκε για μερικά δευτερόλεπτα εντός της καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων (εμβόλιο). Ακολούθως, τα εμβολιασμένα σπορόφυτα τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία Petri που περιείχαν υπόστρωμα συγκαλλιέργειας. Σφραγίστηκαν

παραμετρικά με parafilm και μεταφέρθηκαν για 3 ημέρες στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών όπου επικρατούσαν ελεγχόμενες και σταθερές συνθήκες (22 °C, 16 h φωτός, 8 h σκοτάδι). Στην συνέχεια, προκειμένου να ανακοπεί η ανάπτυξη του βακτηρίου, τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία που περιείχαν υπόστρωμα επαγωγής ριζών, εμπλουτισμένο με το αντιβιοτικό σεφοταξίμη, και παρέμειναν για 15 μέρες. Στο διάστημα αυτό, λήφθηκαν παρατηρήσεις που αφορούσαν στο χρόνο έκπτυξης μετασχηματισμένων ριζών. Με το πέρας των 15 ημερών, ακολούθησε μεταφορά των εκφύτων σε τρυβλία με φρέσκο υπόστρωμα, τα οποία τοποθετήθηκαν στον θάλαμο με κατακόρυφη κλίση. Σε όλα τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν, τοποθετήθηκε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, πάνω στο οποίο ακουμπούσαν οι ρίζες, με στόχο την προστασία των σπορόφυτων από τραυματισμό των ριζών κατά την μεταφορά.

Προκειμένου να αξιολογηθεί συγκριτικά η επιτυχία του μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν φυτά - μάρτυρες. Πρόκειται για μη εμβολιασμένα σπορόφυτα που για την δημιουργία τους ακολουθήθηκαν οι ίδιες μεταχειρίσεις εκτός του εμβολιασμού.



Εικόνα 2.4: Μετασχηματισμένα σπορόφυτα αλθέας

Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε τράπεζα νηματικής ροής, προς αποφυγή επιμολύνσεων στα φυτά και τα υποστρώματα.

2.3.2 Πρωτόκολλο 2

Η διαφορά συγκριτικά με το πρωτόκολλο 1 έγκειται στη σύνθεση των υποστρωμάτων που αξιοποιήθηκαν κατά τις διαδικασίες συγκαλλιέργειας και επαγωγής ριζών. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις σουκρόζης, αντιβιοτικού και θρεπτικών στοιχείων, ενώ παράλληλα στα θρεπτικά υποστρώματα προστέθηκε ο παράγοντας MES. Κατά τα άλλα, η διαδικασία επαγωγής διαγονιδιακών ριζών η παρέμεινε ίδια.

Πίνακας 2.2: Σύνθεση υποστρωμάτων πρωτοκόλλου 2 που εφαρμόστηκε για τον γενετικό μετασχηματισμό του είδους *Althaea rosea* μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΣΥΝΘΕΣΗ
Υπόστρωμα Βλάστησης	MS/Basal. salt: 2,15g/L Sucrose: 20g/L Agar: 5g/L
Υπόστρωμα Συν-καλλιέργειας	MS/MES/Vitamins: 2,45g/L Sucrose: 20g/L Agar: 8g/L Ακετοσυριγκόνη: 150μM
Υπόστρωμα Επαγωγής Ριζών	MS/MES/Vitamins: 2,45g/L Sucrose: 30g/L Agar: 8g/L Σεφοταξίμη: 250mg/L
MS	MS/MES/vit: 4,9g/L Sucrose: 30g/L Ακετοσυριγκόνη: 150μM

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

2.4 Εξαγωγή DNA

Με σκοπό την απομόνωση DNA, πραγματοποιήθηκε πρωτίστως συλλογή δειγμάτων. Ειδικότερα, αποκόπηκαν ρίζες στην ζώνη του υποκοτυλίου, με αποστειρωμένο νυστέρι από μετασχηματισμένα και αγρίου τύπου (μάρτυρες) φυτά αλθέας. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αλουμινόχαρτο και ύστερα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο βαθείας κατάψυξης (-80 °C) προκειμένου να προστατευθούν από τυχόν αλλοιώσεις έως ότου διεξαχθεί η εξαγωγή DNA.



Εικόνα 2.5: Διαγονιδιακές ρίζες (δεξιά) και αγρίου τύπου (αριστερά) που αποκόπηκαν για εξαγωγή DNA

Για την εξαγωγή DNA ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο: αρχικά ζυγίστηκαν 200 mg ιστού και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο eppendorf. Έπειτα έγινε προσθήκη 200 μ l CTAB, το οποίο προηγουμένως είχε τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά. Μετά την ομογενοποίηση των παραπάνω, προστέθηκαν 25 mg PVP25 και ακολούθησε εκ νέου ομογενοποίηση, προσθήκη 200 μ l CTAB και ξανά ομογενοποίηση με στόχο τη δημιουργία αιωρήματος και όχι ιζήματος. Ύστερα τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο, όπου παρέμειναν για 25 λεπτά στους 60 °C. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος έγινε ανακίνηση των δειγμάτων σε Vortex. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 200 μ l φαινόλης και 200 μ l χλωροφορμίου. Αφού έγινε ανάδευση με αναστροφή για να προκύψει γαλάκτωμα, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά. Μετέπειτα, έγινε μεταφορά υπερκειμένου σε νέα eppendorf, προσθήκη 200 μ l NaCl 5 M και ανάδευση, προσθήκη 800 μ l αιθυλική αλκοόλης 95 % και ξανά ανάδευση. Τοποθετήθηκαν τα δείγματα στους -20 °C για χρονικό διάστημα 12 ωρών. Κατόπιν, έγινε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά, απόρριψη της αλκοόλης και διατήρηση του συσσωματώματος. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου καθαρισμός με προσθήκη 1 mL αιθυλικής αλκοόλης 70 %, φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά, απόρριψη της αλκοόλης και διατήρηση του ιζήματος. Χρησιμοποιήθηκε πιπέτα για την απομάκρυνση τυχόν σταγονιδίων. Τέλος, μετά από παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια υγρασία, έγινε διάλυση του συσσωματώματος DNA σε 50 μ l dH₂O.



Εικόνα 2.6: Δείγμα έπειτα από την πρώτη φυγοκέντρηση, όπου το DNA βρίσκεται στο υπερκείμενο.

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του DNA χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού με απορρόφηση στα 260 nm και η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/μL.

2.5 Έλεγχος επιτυχούς ενσωμάτωσης του διαγονιδίου μέσω PCR

Για τον έλεγχο επιτυχίας του μετασχηματισμού εφαρμόστηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Στόχος ήταν να επαληθευτεί η ύπαρξη της T-DNA περιοχής στο γονιδίωμα του φυτού και ταυτόχρονα η απουσία βακτηριακών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 2.3) για το γονίδιο *rolB2* και την περιοχή *virCD* που απαντάται στο βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*. Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζεται η σύσταση του μείγματος που δημιουργήθηκε για την PCR.

Πίνακας 2.3: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση επιλεγμένων αλληλουχιών.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
<i>rolB2</i> -F	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT	52	423	Thilip et al., 2015
<i>rolB2</i> -R	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	52		
<i>virCD</i> -F	CTCATCAGGCACGCTTG	52	1074	Pavli and Scarakis 2010
<i>virCD</i> -R	GCGGATGCTTCAAATGG	52		

Πίνακας 2.4: Σύσταση μείγματος για PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα (5x)	5
MgCl ₂ (25mM)	1
dNTPs (10mM)	0,5
Εκκινητές (10mM)	1
Taq polymerase (5u/μl)	0,25
DNA (20 ng/μl)	1,5
H ₂ O	14,75
Τελικός όγκος	25



Εικόνα 2.7: Εκκινητές *virCD*-R & *virCD*-F **Εικόνα 2.8:** Εκκινητές *rolB2*-R & *rolB2*-F.

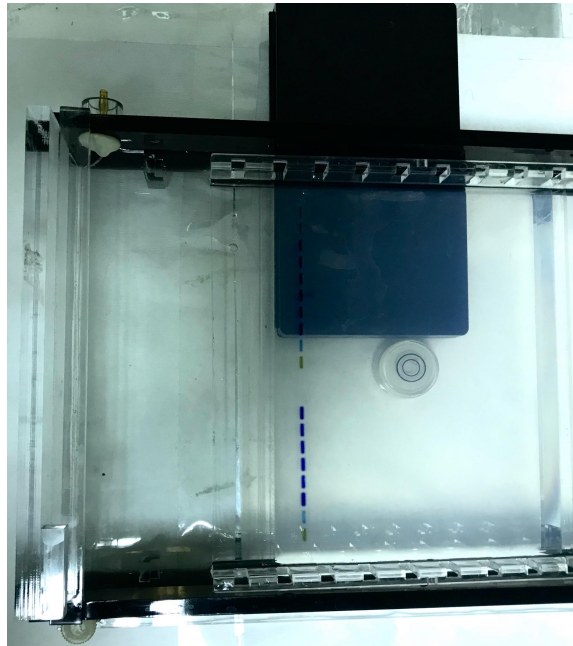


Εικόνα 2.9: Αντιδραστήρια για το μείγμα της PCR.

Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: πρώτα πραγματοποιήθηκε ένας κύκλος στους 94 °C για 5 λεπτά για την αρχική αποδιάταξη του DNA, στη συνέχεια έγιναν 30 κύκλοι: 94 °C για 1 λεπτό (αποδιάταξη), 52 °C για 1 λεπτό (υβριδισμός) και 72 °C για 1 λεπτό (επιμήκυνση) και ακολούθησε ένας κύκλος στους 72 °C για 7 λεπτά (τελική επιμήκυνση).

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αгарόζης 1,5 % με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) στα 60 V για περίπου 2 ώρες. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, έγινε προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και παρατήρηση σε τράπεζα UV ακτινοβολίας.



Εικόνα 2.10: Λουτρό ηλεκτροφόρησης

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η παρούσα διατριβή στόχευε στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althaea rosea* μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*. Πρωταρχικός σκοπός ήταν η δημιουργία διαγονιδιακού ριζικού συστήματος που θα οδηγούσε στην αύξηση της βιομάζας των ριζών και κατ' επέκταση σε αυξημένη παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων. Για τις ανάγκες εύρεσης κατάλληλου πρωτοκόλλου μετασχηματισμού έγινε χρήση του βακτηριακού στελέχους R1000 και εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα που εμφάνιζαν διαφορές στα συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων. Οι διαφορές αφορούσαν στην παρουσία MES και στη συγκέντρωση σουκρόζης και ακετοσυριγκόνης.

Για τον επιτυχή εμβολιασμό χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα αλθέας ηλικίας 7 ημερών, που αναπτύχθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, έγινε τομή στη ζώνη του υποκυτηλίου, αφαιρέθηκε το υπάρχον ριζικό σύστημα και ακολούθησε εμφύτευση στο βακτηριακό στέλεχος R1000. Στο πλαίσιο αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της τροποποίησης, προσδιορίστηκε ο χρόνος έκπτυξης διαγονιδιακών ριζών, η συχνότητα μετασχηματισμού και ο φαινότυπος συγκριτικά με τα φυτά – μάρτυρες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε PCR για της επαλήθευση της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου *rolB2*.

3.1 Χρόνος έκπτυξης διαγονιδιακών ριζών

Ύστερα από τον εμβολιασμό των σποροφύτων του είδους *Althaea rosea* με το βακτηριακό στέλεχος R1000, ακολούθησε καθημερινή λήψη παρατηρήσεων ώστε να καταγραφεί το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για την εμφάνιση νέων ριζών για το εκάστοτε πρωτόκολλο.

Στα φυτά αλθέας, που ο μετασχηματισμός έγινε σύμφωνα με το Πρωτόκολλο 1, η έκπτυξη των πρώτων διαγονιδιακών ριζών σημειώθηκε 15 ± 1 μέρες μετά τον εμβολιασμό. Οι ρίζες που παρατηρήθηκαν παρουσίαζαν τον αναμενόμενο φαινότυπο που προκαλεί ο μετασχηματισμός με το βακτήριο *A. rhizogenes*. Ειδικότερα, ήταν εμφανής η υποτυπώδης ανάπτυξη θυσσανώδους ριζικού συστήματος, γεγονός που επιβεβαίωνε τον επιτυχή

μετασχηματισμό. Στο παραπάνω διάστημα, τα μη-μετασχηματισμένα σπορόφυτα ανέπτυξαν ρίζες αγρίου τύπου.

Κατά το *Πρωτόκολλο 2*, τα μετασχηματισμένα φυτά αλθέας εμφάνισαν διαγονιδιακές ρίζες σε διάστημα 10 ± 1 μέρες από τον εμβολιασμό, δηλαδή γρηγορότερα συγκριτικά με το πρώτο πρωτόκολλο. Ομοίως με τις παρατηρήσεις που αφορούσαν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου 1, το νέο ριζικό σύστημα διέθετε το χαρακτηριστικό φαινότυπο του μετασχηματισμού, ενώ τα φυτά - μάρτυρες ανέπτυξαν ρίζες αγρίου τύπου.

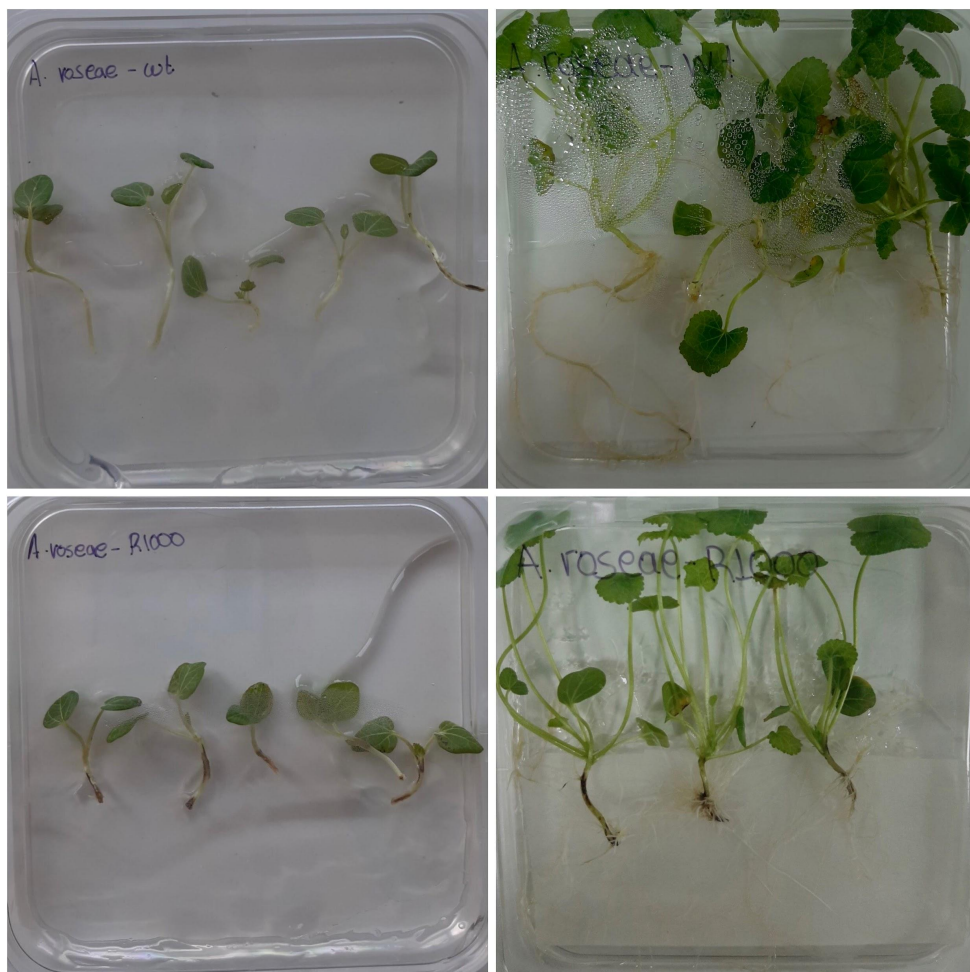
Πίνακας 3.1: Αριθμός ημερών που απαιτήθηκαν από τον εμβολιασμό με το βακτηριακό στέλεχος R1000 μέχρι την εμφάνιση νέων ριζών στα δύο πρωτόκολλα

Στέλεχος <i>A. rhizogenes</i>	Χρόνος έκπτυξης ριζών	
	Πρωτόκολλο 1	Πρωτόκολλο 2
R1000	15 ± 1	10 ± 1

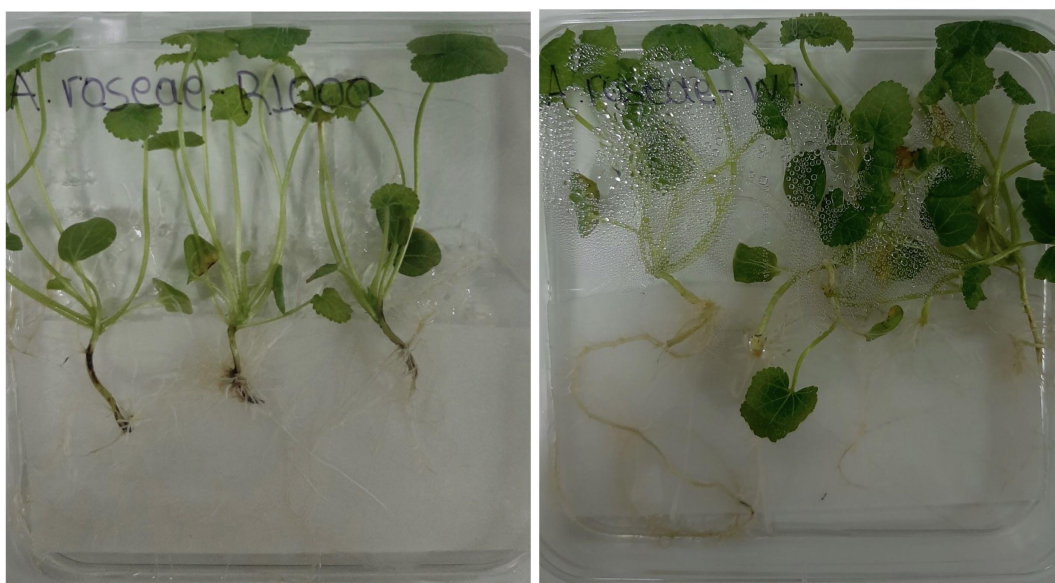
3.2 Φαινοτυπική αξιολόγηση διαγονιδιακού ριζικού συστήματος

Οι φαινοτυπικές αποκλίσεις ανάμεσα στις διαγονιδιακές ρίζες και στις ρίζες αγρίου τύπου που ανήκαν στους μάρτυρες έγιναν ιδιαίτερα σαφείς μετά το πέρας των 4 εβδομάδων από τον εμβολιασμό. Οι διαφορές έγκεινται κυρίως στην δομή και βιομάζα του ριζικού συστήματος και δευτερευόντως στο υπέργειο τμήμα. Αναλυτικότερα, τα φυτά αλθέας που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος R1000 σχημάτισαν κάλλο στο σημείο εμβολιασμού και ανέπτυξαν ριζικό σύστημα θυσσανώδους μορφής. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε η έκπτυξη πολλών μικρών ριζικών τριχιδίων. Γενικά, οι μετασχηματισμένες ρίζες περιγράφονται από έντονες διακλαδώσεις και ενίοτε πλαγιοτροπική ανάπτυξη, ενώ άξιο αναφοράς είναι η αυξημένη συνολική βιομάζα του ριζικού συστήματος. Αντιθέτως, στα φυτά - μάρτυρες αναπτύχθηκαν ρίζες αγρίου τύπου, μεγαλύτερες σε μέγεθος, χωρίς πολλές πλευρικές διακλαδώσεις και με κατεύθυνση προς τα κάτω. Αναφορικά με το υπέργειο τμήμα, τα φυτά που δεν εμβολιάστηκαν εμφάνισαν μεγαλύτερη ζωηρότητα, ενώ τα μετασχηματισμένα ήταν πιο καχεκτικά με μειωμένη ανάπτυξη και ελάχιστη χλώρωση σε μερικά σημεία.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως τα φυτά που μετασχηματίστηκαν σύμφωνα με το *Πρωτόκολλο 2* ανέπτυξαν μεγαλύτερη βιομάζα ριζικού συστήματος συγκριτικά με το *Πρωτόκολλο 1*.



Εικόνα 3.1: Σπορόφυτα αλθέας την ημέρα του εμβολιασμού και 4 εβδομάδες μετά - *Πρωτόκολλο 1*.



Εικόνα 3.2: Συγκριτική απεικόνιση σποροφύτων αλθέας που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000 (αριστερά) και σποροφύτων αλθέας ως μάρτυρες (δεξιά) 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό - *Πρωτόκολλο 1*.



Εικόνα 3.3: Σποροφύτα αλθέας την ημέρα του εμβολιασμού και 4 εβδομάδες μετά - *Πρωτόκολλο 2*.



Εικόνα 3.4: Συγκριτική απεικόνιση σποροφύτων αλθέας που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000 (αριστερά) και σποροφύτων αλθέας ως μάρτυρες (δεξιά) 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό - *Πρωτόκολλο 2*.



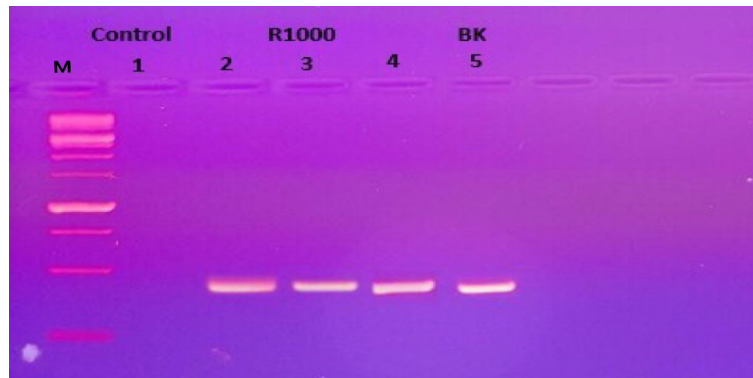
Εικόνα 3.5: Συγκριτική απεικόνιση των δυο πρωτοκόλλων. Παρουσιάζονται για το κάθε πρωτόκολλο μετασχηματισμένα φυτά αλθέας αλλά και φυτά μάρτυρες 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό.

3.3 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων

Η φαινοτυπική αξιολόγηση των ριζών δεν αποτελεί αξιόπιστο παράγοντα επιβεβαίωσης της διαγονιδιακής φύσης των ριζών. Συνεπώς, για τον έλεγχο ένθεσης του διαγονιδίου στα εμβολιασμένα σπορόφυτα αλθέας πραγματοποιήθηκε PCR. Απώτερος σκοπός ήταν αφενός η ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου *rolB2*, και αφετέρου η αδυναμία ενίσχυσης της αλληλουχίας *virCD* που υποδηλώνει την απουσία υπολειμμάτων βακτηρίου στις νεοεκπτυσσόμενες ρίζες.

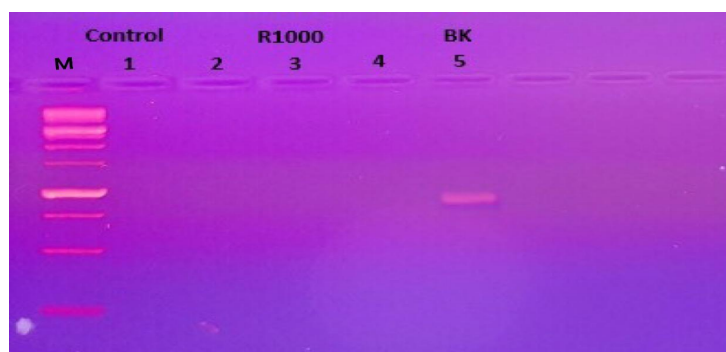
Το γονίδιο *rolB2* (423 bp) βρέθηκε σε όλα τα δείγματα ριζών που προήλθαν από φυτά αλθέας, που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος R1000. Σαφώς, το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε τη διαγονιδιακή φύση των τριχωτών ριζών και των μετασχηματισμένων

κάλλων. Επιπλέον το γονίδιο *rolB2* ήταν παρών στα βακτηριακά κύτταρα του στελέχους του *A. rhizogenes*, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο δεν ενισχύθηκε στα δείγματα ριζών από μη μετασχηματισμένα φυτά (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR για την επιβεβαίωση επιτυχίας του μετασχηματισμού. Στόχο αποτέλεσε η ενίσχυση του γονιδίου *rolB2*, που βρίσκεται στην T-DNA του *A. rhizogenes*, με την βοήθεια ειδικών εκκινήτων. **M:** DNA Ladder (FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH) **1:** Δείγμα ρίζας αγρίου τύπου από μη μετασχηματισμένα φυτά αλθέας **2 - 4:** Δείγματα ριζών από φυτά αλθέας εμβολιασμένα με R1000 **5:** Δείγμα κυττάρων από *A. rhizogenes*. Η ενίσχυση του γονιδίου στις θέσεις 2-5 και η απουσία του στη θέση 1 επαληθεύει την διαγονιδιακή φύση των μετασχηματισμένων ριζών.

Όσον αφορά την περιοχή *virCD* του *A. rhizogenes*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενίσχυση του συγκεκριμένου προϊόντος ήταν εφικτή μόνο στα βακτηριακά κύτταρα του *Agrobacterium*, τα οποία μάλιστα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τον έλεγχο επιτυχίας της γενετικής τροποποίησης. Παράλληλα, το γεγονός ότι το συγκεκριμένο προϊόν δεν ενισχύθηκε στα δείγματα ριζών από φυτά μάρτυρες και μετασχηματισμένα δείχνει την απουσία βακτηριακού DNA σε αυτά.



Εικόνα 3.7: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR για την επιβεβαίωση επιτυχίας του μετασχηματισμού. Στόχο αποτέλεσε η ενίσχυση της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* (1074 bp) με τη βοήθεια

ειδικών εκκινητών. **M:**DNA Ladder (FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH)

1: Δείγμα ρίζας από μη μετασχηματισμένα φυτά αλθέας **2-4:** Δείγματα ριζών που προέρχονται από φυτά αλθέας εμβολιασμένα με το στέλεχος R1000. **5:** Δείγμα κυττάρων του βακτηρίου *Agrobacterium*. Η ενίσχυση του γονιδίου στη θέση 5 και η απουσία του στις θέσεις 1-4 επαληθεύει την διαγονιδιακή φύση των μετασχηματισμένων ριζών.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω ευρήματα αποδεικνύουν την απουσία βακτηριακών υπολειμμάτων στις μετασχηματισμένες ρίζες και συγχρόνως επαληθεύεται η διαγονιδιακή τους φύση.

3.4 Επίδραση πρωτοκόλλου - Συχνότητα μετασχηματισμού

Κρίνοντας με βάση τα συνολικά αποτελέσματα, αποδείχθηκε πως το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* οδηγεί σε επιτυχή μετασχηματισμό του φυτού αλθέα. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος R1000, που εφαρμόστηκε και στα δύο πρωτόκολλα, διαθέτει την ικανότητα να αναπτύσσει νέα σπορόφυτα, τα οποία αποτελούνται από διαγονιδιακό ριζικό σύστημα και υπέργειο τμήμα αγρίου τύπου. Φυσικά, μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων προέκυψαν αξιοσημείωτες διαφορές που σχετίζονται με τον φαινότυπο, τον χρόνο έκπτυξης ριζών καθώς και τη συχνότητα του μετασχηματισμού.

Πίνακας 3.2: Η επίδραση των διαφορετικών πρωτοκόλλων στο χρόνο εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και στην αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού.

Στέλεχος <i>A. rhizogenes</i>	Αριθμός εμβολιασμένων εκφύτων		Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών (dpt)		Συχνότητα Μετασχηματισ μού (%) ^a		M.O. (S)	PCR - θετικά	
	1 ^b	2	1	2	1	2		1	2
R1000	13	17	15 ± 1	10 ± 1	54	88	71	+	+

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

^b Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε.

Συνεπώς, στο *Πρωτόκολλο 1* η συχνότητα μετασχηματισμού ανήλθε σε ποσοστό 54 %. Στο *Πρωτόκολλο 2*, όπου χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα με διαφορετική σύσταση θρεπτικών, υπήρξε σημαντική αύξηση της συχνότητας μετασχηματισμού που έφτασε σε ποσοστό 88 %.

Καθίσταται λοιπόν σαφές πως η προσθήκη MES και η αυξημένη συγκέντρωση σουκρόζης στα θρεπτικά μέσα ενίσχυσε την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού.

3.5 Προτεινόμενη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού με το βακτηριακό στέλεχος R1000

Συνολικά, τα ευρήματα καταδεικνύουν την ιδιαίτερα σπουδαία επιρροή του βακτηριακού στελέχους, της σύνθεσης των υποστρωμάτων αλλά και την συνεργιστική τους δράση για την γενετική τροποποίηση και την επαγωγή διαγονιδιακού ριζικού συστήματος στο είδος *Althaea rosea*. Αποδείχθηκε λοιπόν με βάση τον φαινότυπο των μετασχηματισμένων ριζών και τη συχνότητα μετασχηματισμού, πως το βακτηριακό στέλεχος R1000 του *A. rhizogenes* σε συνδυασμό με το Πρωτόκολλο 2, επιφέρουν τα καλύτερα αποτελέσματα. Συνεπώς, στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζεται η προτεινόμενη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althaea rosea*.

Πίνακας 3.3: Προτεινόμενη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althaea rosea* με χρήση του στελέχους R1000 του *A. rhizogenes*

Ημέρα	Διαδικασία	Θρεπτικό Υπόστρωμα
1	Απολύμανση σπόρων & Τοποθέτησή τους σε υπόστρωμα βλάστησης	MS/Basal. salt: 2,15 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 5 g/L
3	Προετοιμασία των βακτηριακών καλλιεργειών που αποτελούν το εμβόλιο για τον μετασχηματισμό	LB, προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών επιλογής
7	Προετοιμασία του εμβολίου για το μετασχηματισμό	MS/MES/vit: 4,9 g/L Sucrose: 30 g/L Ακετοσυριγκόνη: 150 μM
	Μετασχηματισμός με το βακτηριακό στέλεχος R1000 του <i>A. rhizogenes</i> & Τοποθέτηση των εκφύτων σε υπόστρωμα συν-καλλιέργειας	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 8 g/L Ακετοσυριγκόνη: 150 μM
9	Μεταφορά των εκφύτων σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 30 g/L Agar: 8 g/L Σεφοταξίμη: 250 μM

23	Μεταφορά σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 30 g/L Agar: 8 g/L Σεφοταξίμη: 250 μM
40	Εκτίμηση της συχνότητας του μετασχηματισμού & Έλεγχος για την ένθεση και έκφραση των διαγονιδίων	PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναζήτηση και η αξιοποίηση των θεραπευτικών ιδιοτήτων από συγκεκριμένα φυτά είναι μια τακτική χιλιάδων χρόνων. Τα φαρμακευτικά φυτά ήταν πάντα μέρος της ζωής όλων των λαών και όλων των εποχών (Hotwani *et al.*, 2014). Οι σπουδαίες δυνατότητες τους οφείλονται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στα διάφορα φυτικά τμήματα (Rahmatand Kang, 2019). Οι πρόσφατες πρόοδοι στην έρευνα της γονιδιωματικής των φυτών δημιούργησαν γνώσεις που οδηγούν σε καλύτερη κατανόηση της πολύπλοκης γενετικής και βιοχημείας που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών (Kumar and Gupta, 2008). Η βαθμιαία εξέλιξη των νέων ασθενειών ως απόρροια του σημερινού τρόπου ζωής και η αυξανόμενη ζήτηση των φαρμακοβιομηχανιών, αλλά και των βιομηχανιών τροφίμων και καλλυντικών για υψηλής ποιότητας πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης έχουν ενθαρρύνει την έρευνα με στόχο τη βελτιστοποίηση της φυτικής παραγωγής και την ανάλυση των βιοδραστικών ενώσεων που περιέχονται σε λιγότερο κοινά φυτικά είδη (Stasińska-Jakuba *et al.*, 2023).

Στην παραπάνω κατηγορία ανήκει είδος *Althaea rosea* L., με κοινό όνομα αλθέα ή δενδρομολόχα. Ως φαρμακευτικό φυτό έχει αντιμικροβιακές, αντιαλβινικές, αντιβηχικές, αντιμυκητιακές και καταπραϋντικές ιδιότητες, που οφείλονται στην παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων. Συνθέτει πληθώρα ουσιών σε όλα τα μέρη της, με σημαντικότερες αυτές στην ρίζα (Fahamiya *et al.*, 2016). Βέβαια, η μειωμένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στο συγκεκριμένο φυτό καθιστούν δύσκολη την εκμετάλλευση του σε μεγάλη κλίμακα. Ταυτόχρονα, δεν εφαρμόζεται συστηματική καλλιέργεια αλθέας ώστε να καλυφθούν οι υπάρχουσες ανάγκες. Συνεπώς, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών στρατηγικών για αύξηση της παραγωγής.

Σε αυτό το πλαίσιο, τα βιοτεχνολογικά εργαλεία είναι σημαντικά για την επιλογή, τον πολλαπλασιασμό, και τη γενετική βελτίωση των φαρμακευτικών φυτών με την υιοθέτηση τεχνικών όπως η *in vitro* αναγέννηση και ο γενετικός μετασχηματισμός (Siahsar *et al.*, 2011). Μέχρι σήμερα, σε μεγάλο αριθμό φαρμακευτικών φυτών έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα βελτίωσης με τις παραπάνω μεθόδους, επιβεβαιώνοντας την αύξηση παραγωγής χρήσιμων ουσιών (Babich *et al.*, 2020). Η γενετική μηχανική υπερτερεί ως μέθοδος βελτίωσης καθώς οδηγεί σε ταχύτερη και μεγαλύτερη ποσότητα αξιοποιήσιμης βιομάζας (Halder *et al.*, 2021).

Η προτιμότερη βελτιωτική μέθοδος, που έγκειται στον κλάδο της γενετικής μηχανικής, είναι η τροποποίηση με τη μεσολάβηση του βακτηρίου του γένους *Agrobacterium*. Με αυτόν τρόπο, προσβάλλεται το ριζικό σύστημα του εκάστοτε φυτού, προκύπτουν διαγονιδιακές ρίζες, οι οποίες δύνανται να συνθέσουν μεγαλύτερες ποσότητες βιοδραστικών ουσιών. Η γενετική τροποποίηση σε φαρμακευτικά φυτά έχει πλέον εφαρμοστεί σε περισσότερα από εκατό είδη (Veena and Taylor, 2007). Αναφορικά με την αλθέα, οι μελέτες είναι ελάχιστες και συγκεκριμένα για το είδος *Althaea rosea* L. οι σχετικές αναφορές εκλείπουν παντελώς από τη διεθνή βιβλιογραφία (Ionkova 1992; Drake *et al.*, 2013; Tavassoli & Safipour Afshar, 2018).

Με δεδομένη λοιπόν την έλλειψη έρευνας για καλύτερη αξιοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν στην αλθέα, στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Althaea rosea* L. με φορέα το βακτήριο *A. rhizogenes*. Στόχο αποτέλεσε η ανάπτυξη σύνθετων σποροφύτων, που φέρουν διαγονιδιακές ρίζες και υπέργειο τμήμα αγρίου τύπου, προκειμένου να μπορούν να αξιοποιηθούν για εξαγωγή ουσιών ενδιαφέροντος από το διαγονιδιακό ριζικό σύστημα. Για την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος R1000 και εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα δυο διαφορετικών πρωτοκόλλων με διαφορές ως προς τη σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις διαδικασίες του μετασχηματισμού.

Το σύνολο των ευρημάτων επιβεβαίωσε την επίδραση του βακτηριακού στελέχους αλλά και της σύστασης των θρεπτικών υποστρωμάτων στην επιτυχία της τροποποίησης στην αλθέα. Ανάμεσα στα δύο πρωτόκολλα, το Πρωτόκολλο 2 απέδωσε καλύτερα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίστηκαν ταχύτερα διαγονιδιακές ρίζες και επιπλέον το ποσοστό μετασχηματισμού ήταν μεγαλύτερο και ιδιαίτερα ικανοποιητικό (88 %). Τα θρεπτικά υποστρώματα στο Πρωτόκολλο 2 περιλάμβαναν μεγαλύτερη ποσότητα σουκρόζης και ακετοσυριγκόνης, ενώ ήταν επίσης εμπλουτισμένα με το ρυθμιστή MES.

Η σουκρόζη είναι δισακχαρίτης που το *Agrobacterium* μπορεί να χρησιμοποιήσει ως πηγή θρεπτικών ουσιών (Lager *et al.*, 2006). Όπως και στην συγκεκριμένη έρευνα, η προσθήκη 3 % σακχαρόζης στο μέσο συγκαλλιέργειας έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερες συχνότητες μετασχηματισμού και σε άλλα είδη, όπως το *Beta vulgaris* L. (Gurel *et al.*, 2019). Επιπλέον, η ακετοσυριγκόνη είναι φαινολική ένωση που εκκρίνεται από τραυματισμένους φυτικούς ιστούς και είναι γνωστό ότι δρα ως ισχυρός επαγωγέας του βακτηριακού είδους *Agrobacterium*. Επάγει την έκφραση των γονιδίων *vir* και συμβάλλει στην μεταφορά του Ri

T-DNA στα φυτικά κύτταρα. Υπάρχουν αρκετές αναφορές που υποδηλώνουν ότι η αυξημένη ποσότητα ακετοσυριγκόνης στο υπόστρωμα συγκαλλιέργειας δύναται να ενισχύει σημαντικά το ποσοστό μετασχηματισμού και να επάγει την εμφάνιση ριζικών τριχιδίων σε μικρότερο χρονικό διάστημα (Kumar *et al.*, 2006 ; Afolabi-Balogun *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2011). Ενδεικτικά, η έρευνα των Godwin *et al.* (1991) που περιλάμβανε τη μελέτη της επίδρασης της ακετοσυριγκόνης σε πέντε φυτικά είδη, τα *Allium cepa*, *Antirrhinum majus*, *Brassica campestris*, *Glycine max*, και *Nicotiana tabacum*, ανέδειξε ότι οι μεγαλύτερες ποσότητες αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού. Περαιτέρω, το υψηλότερο ποσοστό μετασχηματισμού που παρατηρήθηκε στο Πρωτόκολλο 2 οφείλεται και στην παρουσία του ρυθμιστή MES, με κοινό όνομα 2- αιθανοσουλφονικό οξύ. Στο MES έχει αποδοθεί ο ρόλος του ρυθμιστικού παράγοντα, εξισορροπώντας το pH και μειώνοντας την υπερβολική οξίνιση των θρεπτικών μέσων. Συνεπώς, συμβάλλει έμμεσα στην αύξηση της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού με φορείς βακτήρια του γένους *Agrobacterium* (Foti and Pavli, 2020 ; Iwakawa *et al.*, 2021)

Σχετικά με το βακτηριακό στέλεχος R1000, κρίνεται κατάλληλο για την επαγωγή ριζικών τριχιδίων και ριζών που εμφανίζουν το χαρακτηριστικό φαινότυπο της διαγονιδιακής φύσης, καθώς εφαρμόστηκε και στα δυο πρωτόκολλα δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αυτά τα ευρήματα συνάδουν και με προηγούμενες αναφορές που περιγράφουν τον επιτυχή γενετικό μετασχηματισμό φαρμακευτικών φυτών με τη χρήση του στελέχους R1000, όπως το είδος *Echinacea purpurea* (Wang *et al.*, 2006), *Artemisia vulgaris* (Sujatha *et al.*, 2013), *Papaver somniferum* L. (Park and Faccini, 2000). Η ενίσχυση της συχνότητας μετασχηματισμού, με τη χρήση του βακτηρίου R1000, αποδίδεται στην υψηλή εγγενή δυνατότητα του πλασμιδίου Ri του R1000 για μεταφορά του Ri T-DNA στα κύτταρα ξενιστές των φυτών (Mariashibu *et al.*, 2013).

Όπως ήταν αναμενόμενο, υπήρξαν φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των μετασχηματισμένων ριζών και των αντίστοιχων αγρίου τύπου. Τα σπορόφυτα που δεν εμβολιάστηκαν δημιούργησαν ριζικό σύστημα απαλλαγμένου από ριζικά τριχίδια και πλαγιότροπη ανάπτυξη. Τα φυτά που μετασχηματίστηκαν μέσω του στελέχους R1000 ανέπτυξαν θυσσανώδες ριζικό σύστημα και μάλιστα μεταξύ των δυο πρωτοκόλλων στο Πρωτόκολλο 2, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη βιομάζα. Ο γενετικός μετασχηματισμός των σποροφύτων αλθέας έγινε 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 των ριζών (Faraz *et al.*, 2020). Ακόμη, η επιτυχία του μετασχηματισμού επιβεβαιώθηκε από την απουσία της αλληλουχίας *virCD* του *A. rhizogenes* στα ριζικά τριχίδια των εμβολιασμένων φυτών καθώς με τον τρόπο αυτό επαληθεύεται η απουσία υπολειμμάτων του βακτηρίου στις νεοεκπτυσσόμενες ρίζες.

Το σύνολο των ευρημάτων αποδεικνύει πως η συγκεκριμένη μεθοδολογία γενετικού μετασχηματισμού οδηγεί στην ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών. Δημιουργεί λοιπόν τις προοπτικές για περαιτέρω βελτίωση του πρωτοκόλλου με απώτερο σκοπό την αξιοποίηση των ριζών της αλθέας για απομόνωση βιοδραστικών συστατικών που θα καλύψουν τις ανάγκες των φαρμακοβιομηχανιών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποδεικνύουν τη δυνατότητα γενετικής τροποποίησης του ριζικού συστήματος του είδους *Althea rosea* L. μέσω του φορέα *A. rhizogenes*. Λόγω της αυξημένης βιομάζας τους, οι διαγονιδιακές ρίζες μπορούν να αξιοποιηθούν ως εργοστάσιο παραγωγής βιοδραστικών ενώσεων. Βάσει των ευρημάτων, ως καθοριστικοί παράγοντες για την αύξηση του ποσοστού μετασχηματισμού κρίθηκαν ο εμπλουτισμός των θρεπτικών υποστρωμάτων με MES και η αύξηση της συγκέντρωσης ακετοσυριγκόνης και σουκρόζης. Παράλληλα, επιβεβαιώνεται η καταλληλότητα του βακτηριακού στελέχους R1000, που ανήκει στο *A. rhizogenes*, για τον μετασχηματισμό της αλθέας καθώς οδήγησε στην δημιουργία φαινοτυπικά διακριτών διαγονιδιακών ριζών.

Τα παραπάνω ευρήματα μπορούν αρχικά να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω έρευνα βελτίωσης του πρωτοκόλλου ώστε να επιτευχθεί περαιτέρω αύξηση της συχνότητας μετασχηματισμού αλλά και ενίσχυση της βιομάζας του διαγονιδιακού ριζικού συστήματος στην αλθέα. Με αυτόν τον τρόπο αναμένεται να αυξηθεί η παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων και συνεπώς να καλυφθούν οι ανάγκες των φαρμακοβιομηχανιών χωρίς να υπόκεινται σε κίνδυνο εξαφάνισης τα φυσικά αποθέματα του είδους. Επίσης, η συγκεκριμένη μελέτη θέτει τα θεμέλια για τον γενετικό μετασχηματισμό κι άλλων φαρμακευτικών φυτών καθώς θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να εφαρμοστεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο και σε άλλα φαρμακευτικά φυτικά είδη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία:

Ahmadi, M., Rad, A. K., Rajaei, Z., Mohammadian, N., & Tabasi, N. S. (2012). *Alcea rosea* root extract as a preventive and curative agent in ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(3), 304.

Afolabi-Balogun N., Inuwa H. M., Ishiyaku M. F. Bakare-Odunola M. T., Nok A. J, Adebola P. A. (2014). Effect of acetosyringone on *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*.

Al.-Snafi, A. E. (2013). The pharmaceutical importance of *Althaea officinalis* and *Althaea rosea*: A review. *Int J Pharm Tech Res*, 5(3), 1387-1385.

Amini, M. (2019). Proteomics and Biological. Evaluation of Marshmallow (*Althaea officinalis*) Seeds (Doctoral. dissertation, Chapman University).

Ammar, N. M., El-Kashoury, E. S. A., Abou El-Kassem, L. T., & Abd El-Hakeem, R. E. (2013). Evaluation of the phenolic content and antioxidant potential. of *Althaea rosea* cultivated in Egypt. *Journal. of The Arab Society for Medical. Research*, 8(2), 48-52.

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).

Builders Ph.,(2019), *Herbal Medicine*, BoD, London, 2: 11-26.

Cakaj, A., Lisiak-Zielińska, M., Hanć, A., Małecka, A., Borowiak, K., & Drapikowska, M. (2023). Common weeds as heavy metal bioindicators: a new approach in biomonitoring. *Scientific Reports*, 13(1).

Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*, 23(4), 180-185.

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

- Ditz R., Clausthal. T., Gerard/Flavex D., Hagels/Boehringer I., Schäffler M., Tropitsch O., Schulz H., (2017), Phytoextracts Proposal towards a new comprehensive. Research Focus, 10-25
- Drake, P. M., de Moraes Madeira, L., Szeto, T. H., & Ma, J. K. (2013). Transformation of *Althaea officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* for the production of transgenic roots expressing the anti-HIV microbicide cyanovirin-N. Transgenic research, 22(6), 1225-1229.
- Fahamiya, N., Shiffa, M., & Aslam, M. (2016). A comprehensive review on *Althaea rosea* Linn. Journal of Pharmaceutical. Research, 6(11).
- Faraz, R., Gokhale, M., & Gothalwa, R. (2020). Hairy Root Culture Through *Agrobacterium rhizogenes* for Enhancement of Secondary Metabolites Production in Medicinal Plants: A Review. JAM, 4, 45-58.
- Foti, C., & Pavli, O. I. (2020). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root induction of *Lens culinaris*. Agronomy, 10(8), 1170.
- Ganie, S. H., Upadhyay, P., Das, S., & Sharma, M. P. (2015). Authentication of medicinal plants by DNA markers. Plant Gene, 4, 83-99.
- Giardi, M. T., Rea, G., & Berra, B. (Eds.). (2011). Bio-farms for nutraceuticals: Functional food and safety control by biosensors (Vol. 698). Springer Science & Business Media.
- Giri, A., & Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology advances, 18(1), 1-22.
- Gorelick, J., & Bernstein, N. (2014). Elicitation: an underutilized tool in the development of medicinal. plants as a source of therapeutic secondary metabolites. Advances in agronomy, 124, 201-230.
- Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B., & Newbury, H. J. (1991). The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. Plant Cell Reports, 9, 671-675.
- Gürel, S., OĞUZ, M. Ç., Turan, F., Kazan, K., Özmen, C. Y., Gürel, E., & Ergül, A. (2019). Utilization of sucrose during cocultivation positively affects *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 43(6), 509-517.

Grigoriadou K., Moré Palos E., Primavera A., Nicola S., Fernandez Moya J., (2020), EIP-AGRI Focus Group Plant-based medicinal and cosmetic products. Final Report, 3: 4-7.

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.

Hamdy D., Hassabo A. G., & Othman, H. A. (2021). Various natural dyes using plant palette in coloration of natural fabrics. Journal of Textiles, Coloration and Polymer Science, 18(2), 121-141.

Hanif M., Mehmood M. H., Ishrat G., Virji S. N., Malik A., Ahmed, M., & Gilani, A. H. (2019). Pharmacological basis for the medicinal use of *Alcea rosea* in airways disorders and chemical characterization of its fixed oils through GC-MS. Pak. J. Pharm. Sci, 32(5), 2347-2355.

Hashemi, Z., Shirzadi-Ahoodashti, M., & Ebrahimzadeh, M. A. (2021). Antileishmanial and antibacterial activities of biologically synthesized silver nanoparticles using *Alcea rosea* extract (AR-AgNPs). Journal of Water and Environmental Nanotechnology, 6(3), 265-276.

Hishe, M., Asfaw, Z., & Giday, M. (2016). Review on value chain analysis of medicinal plants and the associated challenges. Journal of Medicinal. Plants Studies, 4(3), 45-55.

Hotwani, K., Baliga, S., & Sharma, K. (2014). Phytodentistry: use of medicinal. plants. Journal of Complementary and Integrative Medicine, 11(4), 233-251.

Hu, Z. B., & Du, M. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of integrative plant biology, 48(2), 121-127.

Iannicelli, J., Guariniello, J., Tossi, V. E., Regalado, J. J., Di Ciaccio, L., Van Baren, C. M., ... & Escandón, A. S. (2019). The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. Scientia Horticulturae, 260.

Ionkova, I. (1992). Alternative ways for the production of biological.ly active substances from *Althaea officinalis*, var. Russal.ka. Dokladi na B lgarskata akademiâ na naukite, 45(9), 137-140.

- Iwakawa, H., Melkonian, K., Schlüter, T., Jeon, H. W., Nishihama, R., Motose, H., & Nakagami, H. (2021). *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Marchantia* liverworts. *Plant and Cell Physiology*, 62(11), 1718-1727.
- Joshi, K., Chavan, P., Warude, D., & Patwardhan, B. (2004). Molecular markers in herbal drug technology. *Current science*, 159-165.
- Jung, G., & Tepfer, D. (1987). Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown in vitro. *Plant science*, 50(2), 145-151.
- Kassab, B. B. Z. (2022). Engineering of high production of salicylic acid in transgenic hairy roots of Marigold *Calendula officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 13332. *African Journal. of Biotechnology*, 21(12), 571-578.
- Kianitalaei, A., Feyzabadi, Z., Hamed, S., & Qaraaty, M. (2019). *Althaea officinalis* in Traditional. Medicine and modern phytotherapy. *Journal. of Advanced Pharmacy Education & Research*, 9(S2), 155.
- Köhler H., (1887), *Planche botanique n° I-19 de l'Atlas des Plantes médicinales de Köhler en images réalistes avec brèves notes explicatives* consacrée à la rose trémière.
- Kumar, J., & Gupta, P. K. (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports*, 2: 93-112.
- Kumar, V., Sharma, A., Narasimha Prasad, B. C., Bhaskar Gururaj, H., & Aswathanarayana Ravishankar, G. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal. of Biotechnology*, 9(4).
- Kumar, S., & Kumar, A. (2015). Role of genetic engineering in agriculture. *Plant Archives*, 15(1), 1-6.
- Kušan F. (1956). Medicinal and other useful herbs (Ljekovito i drugo korisno bilje), Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.
- Lager, I., Looger, L. L., Hilpert, M., Lalonde, S., & Frommer, W. B. (2006). Conversion of a putative *Agrobacterium* sugar-binding protein into a FRET sensor with high selectivity for sucrose. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41).

- Li, Q., Ruan, C. J., Teixeira da Silva, J. A., & Wang, X. Y. (2012). Floral morphology and mating system of *Alcea rosea* (Malvaceae). *Plant Ecology and Evolution*, 145(2), 176-184.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2019). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89.
- Ma, F., Cui, Q., & Bai, G. (2019). Combining UPLC/Q-TOF-MS/MS with biological evaluation for NF- κ B inhibitors in uyghur medicine *Althaea rosea* flowers. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Mabey R., McIntyre M., Michael P, Duff G., Stevens J., (1999). Πλήρης Οδηγός για τα Βότανα, pp 274-277.
- Mariashibu, T. S., Subramanyam, K., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Thebora, J., ... & Ganapathi, A. (2013). Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 41-54.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka, M., Tanaka, N., & Yoshida, K. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *Journal of molecular biology*, 307(3), 771-784.
- Niazian, M. (2019). Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249, 953-973.
- Nilsson, O., & Olsson, O. (1997). Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiologia plantarum*, 100(3), 463-473.
- Oseni, O. M., Pande, V., & Nailwal, T. K. (2018). A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 7(7), 3778-3786.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., & Artam Tarhan, E. (2013). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and its biotechnological applications in crops. In *Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques* Springer US pp. 1–48.

- Pant, P., Pandey, S., & Dall' Acqua, S. (2021). The influence of environmental. conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11).
- Park, S. U., & Facchini, P. J. (2000). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *Journal of Experimental Botany*, 51(347), 1005-1016.
- Peters, C.M., (1994). Sustainable harvest of non-timber plant resources in tropical. moist forest: an ecological primer. Biodiversity Support Program, Washington.
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental. Biology-Plant*, 55, 242-257.
- Rahmat, E., & Kang, Y. (2019). Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *Journal of Plant Biotechnology*, 46(3), 143- 157.
- Roychowdhury, D., Majumder, A., & Jha, S. (2013). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal. plants: prospects and challenges. *Biotechnology for medicinal. plants: Micropropagation and improvement*, 29-68.
- Russell J.P., (2006), *iGenetics: A Mentelian Approach*, published by Pearson Education, London.
- Santos, P. A., Figueiredo, A. C., Oliveira, M. M., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Deans, S. G., & Scheffer, J. J. (2005). Growth and essential. oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* WDJ Koch (lovage). *Plant science*, 168(4), 1089-1096.
- 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. *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization*, 557-567.
- Shehzad, M. R., Hanif, M. A., Rehman, R., Bhatti, I. A., & Hanif, A. (2019). Hollyhock. *In Medicinal. plants of South Asia* pp. 381-391.

- Shilpha, J., Largia, M. J. V., Kumar, R. R., Satish, L., Swamy, M. K., & Ramesh, M. (2022). Hairy Root Cultures: A Novel Way to Mass Produce Plant Secondary Metabolites. In *Phytochemical. Genomics: Plant Metabolomics and Medicinal Plant Genomics* Singapore: Springer Nature Singapore pp. 417-445.
- Siahsar, B., Rahimi, M., Tavassoli, A., & Raissi, A. (2011). Application of biotechnology in production of medicinal plants. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 11(3), 439-444.
- Singh, R. S., Chattopadhyay, T., Thakur, D., Kumar, N., Kumar, T., & Singh, P. K. (2018). Hairy root culture for *in vitro* production of secondary metabolites: a promising biotechnological approach. *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization*, 235-250.
- Stasińska-Jakubas, M., Hawrylak-Nowak, B., Wójciak, M., & Dresler, S. (2023). Comparative Effects of Two Forms of Chitosan on Selected Phytochemical Properties of *Plectranthus amboinicus* (Lour.). *Molecules*, 28(1), 376.
- Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Čalić, D., Flamini, G., & Kumari, B. R. (2013). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: hairy root production and essential. oil analysis. *Industrial Crops and Products*, 44, 643-652.
- Tavassoli, P., & Safipour Afshar, A. (2018). Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *Biotech*, 8(8), 351.
- Teng, Z. Q., & Shen, Y. (2015). Research progress of genetic engineering on medicinal plants. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 40(4), 594-601.
- Tripathi, L., & Tripathi, J. N. (2005). Role of biotechnology in medicinal. plants. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 2(2), 243-253.
- Van Andel, T., & Carvalheiro, L. G. (2013). Why urban citizens in developing countries use traditional. medicines: the case of Suriname. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 383-403.

Vergragt, P. J., & Brown, H. S. (2008). Genetic engineering in agriculture: New approaches for risk management through sustainability reporting. *Technological. Forecasting and Social Change*, 75(6), 783-798.

Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L., & Zhang, Y. (2006). Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(1), 101-104.

Yu H., Chen, S. L., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal. plants: problems, progress, and prospects. *Chinese medicine*, 11, 1-10.

Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM (2011) Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(4):1229-1239.

Ελληνική Βιβλιογραφία

ΕΛΣΤΑΤ., 2021. Ανακτήθηκε 28 Ιούνιος 2022, από Ετήσια Γεωργική Στατιστική Έρευνα.

Κατσιώτης Σ, Χατζοπούλου Π. (2019), Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια, Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Κουτσός Θ., (2006), Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Λάζαρη Δ.,(2016), Ιδιότητες και Αξιοποίηση Ελληνικών Αρωματικών- Φαρμακευτικών Φυτών, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.

Μαλούπα Ε., Γρηγοριάδου Κ., Λάζαρη Δ., Κρίγκας Ν., (2013),:Καλλιέργεια, Μεταποίηση και Διασφάλιση ποιότητας των ελληνικών Αρωματικών - Φαρμακευτικών Φυτών: Βασικές Αρχές Καθετοποιημένης Παραγωγής, Εκδόσεις ΓΕΩΡΓΙΟΣ Κ. ΛΟΥΠΕΛΗΣ, Καβάλα, 2: 15-21.

Μαλούπα Ε., Γρηγοριάδου Κ., Λάζαρη Μ., (2012) Στοιχεία καλλιέργειας αξιοποίησης ελληνικών αρωματικών/φαρμακευτικών ειδών, ΓΕΩΤΕΕ Παράρτημα Ανατολικής Μακεδονίας.

Σκρουμπής Β., (1998), Αρωματικά, Φαρμακευτικά και Μελισσοτροφικά Φυτά της Ελλάδας, pp36, Εκδόσεις ΑγροΤύπος, Αθήνα.

Στεφάνου, Π., Μπαλούτας, Δ., Κατσινίκας, Δ., Αβραάμ, Ε. Μ., Κυριαζόπουλος, Α. Π., Παρίση, Ζ. Μ., & Αραμπατζής, Γ. (2015): Η καλλιέργεια των αρωματικών φυτών στην Ελλάδα: παρούσα κατάσταση, δυνατότητες και προοπτικές.

Τζάμος Ε., (2017), Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.

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

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία:

<https://pharmasaat.de/>

<https://www.gardenloversclub.com/ornamental./flowers/hollyhock/bare-roots/>

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