



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Γενετικός μετασχηματισμός της τομάτας μέσω του *Agrobacterium*
rhizogenes ως εργαλείο για τη μελέτη της εξωγενούς έκφρασης
γονιδίων»

ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΒΑ



Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια, Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ 2020

«Γενετικός μετασχηματισμός της τομάτας μέσω του *Agrobacterium rhizogenes* ως εργαλείο για τη μελέτη της εξωγενούς έκφρασης γονιδίων»

ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΒΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παυλή Ουρανία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ, Καθηγητής, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

Μαδέσης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλλαν με το δικό τους τρόπο σε αυτή την προσπάθεια.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, κα. Ουρανία Παυλή, για την καθοδήγηση και συνεχή στήριξη της προσπάθειάς μου, τις υποδείξεις της, και την πολύτιμη βοήθεια της σε όλες τις δυσκολίες που προέκυψαν.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Παναγιωτάκη Ευαγγελία, μέλος ΕΔΙΠ για τη στήριξή και την υπομονή και την ενθάρρυνσή της σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου, που είναι δίπλα μου και με στηρίζει σε κάθε μου βήμα αλλά και στους φίλους μου που μου παρείχαν ψυχολογική συμπαράσταση.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Καταγωγή και εξάπλωση της καλλιέργειας.....	1
1.2 Βοτανική ταξινόμηση.....	3
1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	4
1.4 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις.....	7
1.5 Θρεπτική αξία.....	8
1.6 Χρήσεις.....	9
1.7 Γενετική βελτίωση τομάτας.....	10
1.8 Μέθοδοι Βελτίωσης.....	12
1.8.1 Κλασικές μέθοδοι βελτίωσης.....	12
1.8.2 Μοριακές μέθοδοι βελτίωσης.....	15
1.9 Συμβολή της Γενετικής Μηχανικής στη βελτίωση της τομάτας.....	18
1.10 Το βακτήριο <i>Agrobacterium rhizogenes</i> – Εφαρμογές στη βελτίωση της τομάτας.....	19
Σκοπός της μελέτης.....	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1 Φυτικό υλικό.....	23
2.2 Τα στελέχη του βακτηρίου <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	23
2.3 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων – Δημιουργία εκφύτων.....	24
2.4 Διαδικασία του μετασχηματισμού μέσω του <i>A. rhizogenes</i>	25
2.5 Έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού μέσω PCR.....	27
2.5.1 Απομόνωση DNA.....	27
2.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης - PCR.....	28
2.5.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων.....	30
2.6 Αξιοποίηση των σύνθετων σποροφύτων σε πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.....	30
2.7 Στατιστική ανάλυση.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1 Συχνότητα μετασχηματισμού και χρόνος εμφάνισης μετασχηματισμένων ριζών.....	32

3.2 Ανάπτυξη πλευρικών διακλαδώσεων.....	33
3.3 Φαινοτυπική αξιολόγηση των διαγονιδιακών ριζών.....	35
3.4 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων.....	37
3.5 Φαινοτυπική αξιολόγηση των διαγονιδιακών ριζών υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης.....	38
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση της γενετικής μηχανικής τόσο στο πλαίσιο βασικής έρευνας όσο και σε εφαρμοσμένο επίπεδο για την ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών με βελτιωμένα γνωρίσματα. Οι σχετικές ερευνητικές προσπάθειες έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού σε πολυάριθμα φυτικά είδη. Πέραν των μεθόδων σταθερού μετασχηματισμού, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών εστιάζει στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων επαγωγής διαγονιδιακών ριζών, μέσω του φορέα *A.rhizogenes*, ως μία εναλλακτική λύση για την επιτάχυνση των διαδικασιών μετασχηματισμού και αναγέννησης. Με δεδομένο ότι η τομάτα αποτελεί ένα σημαντικό καλλιεργούμενο είδος και ταυτόχρονα αξιοποιείται ως φυτό-μοντέλο, στόχο της διατριβής αποτέλεσε η βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας για την αποτελεσματική και σε σύντομο χρόνο παραγωγή διαγονιδιακών ριζών. Ο μετασχηματισμός έγινε με τη χρήση των βακτηριακών στελεχών R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}, το οποίο εκφράζει το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Ως γενετικό υλικό αξιοποιήθηκε η εμπορική ποικιλία τομάτας Gigante, ενώ ο μετασχηματισμός επετεύχθη με κοπή των σποροφύτων στην περιοχή του υποκοτυλίου, αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος και εμφύτευση των σποροφύτων στις καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων. Επιπλέον, στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες φυτά που υπέστησαν τις ίδιες μεταχειρίσεις, χωρίς ωστόσο να γίνει εμβολιασμός με βακτήριο. Τα εμβολιασμένα σπορόφυτα αρχικά τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα συγκαλλιέργειας και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών, που περιείχε τα κατάλληλα αντιβιοτικά για την αναστολή ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων και την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων. Τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα χαρακτηρίζονταν από την ανάπτυξη πολυάριθμων, ακανόνιστων πλευρικών διακλαδώσεων, που συχνά εμφάνιζαν πλαγιότροπη ανάπτυξη, καθώς και την ύπαρξη των χαρακτηριστικών ριζικών τριχιδίων. Αντίθετα, οι μάρτυρες ανέπτυξαν αγρίου τύπου ριζικό σύστημα, με σαφώς λιγότερες διακλαδώσεις. Μεταξύ των R1000- και R1000-HrpZ_{P_{sph}}-εμβολιασμένων σποροφύτων, μεγαλύτερη συχνότητα μετασχηματισμού εμφάνισαν τα πρώτα, παρέχοντας επιπλέον ενδείξεις σχετικά με την υψηλή ικανότητα του βακτηριακού στελέχους R1000 για επαγωγή διαγονιδιακών

ριζών. Σημειώνεται ωστόσο ότι η μειωμένη συχνότητα μετασχηματισμού και η μειωμένη ανάπτυξη των ριζών στα R1000-HrpZ_{P_{sph}}-σπορόφυτα πιθανώς αποδίδεται στην ανάπτυξή τους παρουσία του αντιβιοτικού υγρομυκίνη, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι δρα ως αναστολέας ανάπτυξης των φυτικών ιστών. Αναφορικά με τα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των ριζών, το μεγαλύτερο αριθμό ριζών ανά σπορόφυτο εμφάνισαν τα R1000-εμβολιασμένα σπορόφυτα, ενώ το μεγαλύτερο μήκος ριζών εμφάνισαν τα σπορόφυτα αγρίου τύπου. Επιπλέον, στα μετασχηματισμένα σπορόφυτα επαληθεύτηκε η ένθεση των διαγονιδίων *rolb2* και *hrpZ_{P_{sph}}*, μέσω PCR, επιβεβαιώνοντας τη διαγονιδιακή φύση των ριζών που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες επιλογής. Στοχεύοντας στη διερεύνηση της δυνατότητας πρακτικής αξιοποίησης των διαγονιδιακών ριζών σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης, τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση και ακολούθησε αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους, συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου. Για το σκοπό αυτό, οι τρεις κατηγορίες φυτών (C, R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}) τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS που περιείχε D-μαννιτόλη, ως παράγοντα υδατικής καταπόνησης. Το σύνολο των φυτών εμφάνισε συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων και μαρασμού καθώς και σποραδικά μεταχρωματισμό των ριζών, ωστόσο τα R1000-HrpZ_{P_{sph}}-σπορόφυτα χαρακτηρίζονταν από ηπιότερη συμπτωματολογία. Τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την καταλληλότητα του στελέχους R1000 του *A. rhizogenes* για το μετασχηματισμό της τομάτας καθώς και τη δυνατότητα αξιοποίησης των σύνθετων σποροφύτων για μελέτες γονιδιακής έκφρασης αναφορικά με την ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γενικά

Η καλλιέργεια της τομάτας κατέχει κύρια θέση σε παγκόσμιο επίπεδο, τόσο επειδή καταναλώνεται ευρέως ως νωπός καρπός όσο και γιατί αποτελεί συστατικό πολλών βιομηχανικά μεταποιημένων τροφίμων, που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Οι ώριμοι καρποί και οι σπόροι διαθέτουν υψηλή διατροφική αξία, καθώς έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε βιταμίνες, κυρίως βιταμίνη C, μέταλλα και πρωτεΐνες (Πετρόπουλος και Χα, 2014). Παράλληλα, λόγω της οικονομικής σημασίας της καλλιέργειας σε παγκόσμιο επίπεδο, η τομάτα αποτελεί ένα είδος που έχει τύχει ευρείας μελέτης και συστηματικής προσπάθειας για τη βελτίωση και ανάπτυξη σύγχρονων ποικιλιών αξιοποιώντας ποικίλες προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένων αυτών της γενετικής μηχανικής και μοριακής βιολογίας (Hobson and Grierson, 1993).

1.1 Καταγωγή και εξάπλωση της καλλιέργειας

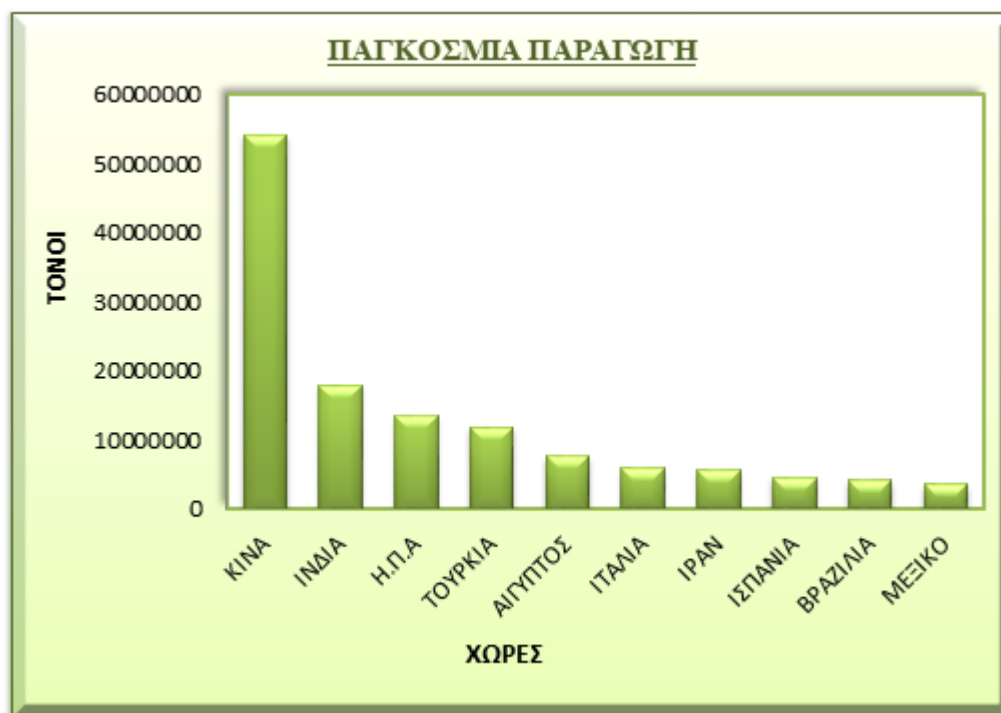
Η τομάτα προέρχεται από τη νότια Αμερική, πιο συγκεκριμένα από τα υψίπεδα του Περού, περιοχές κατά μήκος των Άνδεων και το Εκουαδόρ, ενώ βρέθηκαν και άγρια είδη στο Μεξικό. Υποστηρίζεται ότι, καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά από τους Αζτέκους το 500 π.Χ., που της απέδωσαν την ονομασία «xitomate» ή «zitotomate» (Guld, 1992). Το φυτό περιγράφεται ως "ζιζάνιο" με μικρούς κίτρινους καρπούς (Liang et. al, 2017). Πρόγονος της καλλιεργούμενης τομάτας θεωρείται το *Solanum lycopersicum cerasiforme*, το οποίο διακρινόταν για το μικρό μέγεθος του στύλου (Hancock, 1992). Φαίνεται να εισήχθη στην Ευρώπη από τους Ισπανούς το 1521 μ.Χ., μετά την κατάληψη του Τενοτσιτλάν, της σημαντικότερης πόλης των Αζτέκων. Έπειτα, ο καρπός έγινε γνωστός στην Ιταλία, ειδικότερα στη Νάπολη, που ήταν υπό ισπανική κατάκτηση (McCue, 1952). Έτσι, έγινε δημοφιλής με το όνομα «pommo d'oro» (χρυσό μήλο), ενώ μετέπειτα στη Γαλλία ονομάστηκε «pomme d'amour» (μήλο της αγάπης) (Guld, 1992).

Παρά τη διάδοση του είδους, η κατανάλωση τομάτας καθυστέρησε καθώς συγγεόταν και με άλλα επιβλαβή είδη της ίδιας οικογένειας, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε σολανίνη (Πετρόπουλος και Χα, 2014). Μεταξύ άλλων, η τομάτα εμφάνιζε παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά με το φυτό μπελαντόνα, το

οποίο ήταν γνωστό για την τοξικότητά του. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε αρχικά κυρίως για διακοσμητικούς σκοπούς, ενώ η αξιοποίησή της στην τοπική ιταλική κουζίνα χρονολογείται περί τα τέλη του 17^{ου} ή αρχές 18^{ου} αιώνα (Bergougnoux, 2014). Από αυτήν την περίοδο και έπειτα, η καλλιέργειά της εξαπλώθηκε με ταχύτατους ρυθμούς, με αποτέλεσμα την είσοδό της στη βιομηχανική παραγωγή το 1847 (Guld, 1992). Η εισαγωγή της τομάτας στην Ελλάδα συνέπεσε με αυτή της πατάτας το 1818, ενώ άρχισε να αποκτά εμπορική αξία από το 1825 (Πετρόπουλος και Χα, 2014).

Στη σύγχρονη εποχή, η καλλιέργεια της τομάτας απαντάται σχεδόν σε ολόκληρο τον κόσμο και πιο συγκεκριμένα σε πάνω από 169 χώρες (FAO, 2019). Σύμφωνα με το FAOSTAT (2019), η παγκόσμια παραγωγή τομάτας αγγίζει τους 180.766.329 τόνους σε συνολική έκταση 3.593.370 στρεμμάτων. Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία, τα τελευταία 40 χρόνια η μεγαλύτερη παραγωγή συγκεντρώνεται στην Ασία σε ποσοστό 49.3 %, ακολουθεί η Ευρώπη (19,6 %), με μικρή διαφορά από την Αμερική (19 %), και τέλος η Αφρική (11,7 %) και η Ωκεανία (0,4 %) (FAO, 1980-2019). Είναι παράλληλα αξιοσημείωτο ότι τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ετήσια αύξηση της κατανάλωσης κατά 3 % (Xinhua, 2007). Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή τομάτας για το χρονικό διάστημα 2010-2019 ήταν η Κίνα, με συνολική παραγωγή 541.849.635 τόνους, έπειτα η Ινδία και ακολούθως η Η.Π.Α (FAO, 2010-2019) (Εικόνα 1.1).

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία για το έτος 2019, η παραγωγή ανήλθε στους 808.670 τόνους σε συνολική έκταση 5.387.540 στρεμμάτων (FAO, 2019). Οι μεγαλύτερες ποσότητες αφορούν σε παραγωγή βιομηχανικής τομάτας, η οποία καλλιεργείται κυρίως στις Περιφέρειες Θεσσαλίας (Ν. Λαρίσης), Δυτικής Ελλάδας (Ν. Ηλείας), Στερεάς Ελλάδας (Ν. Βοιωτίας) και Κεντρικής Μακεδονίας (Ν. Σερρών). Μετά τη βιομηχανική τομάτα, ακολουθεί η παραγωγή επιτραπέζιας τομάτας-θερμοκηπίου, η οποία καλλιεργείται κατά κύριο λόγο στην περιοχή της Κρήτης και συγκεκριμένα στο Νομό Λασιθίου. Σε μικρότερες ποσότητες, απαντάται η τομάτα υπαίθριας καλλιέργειας που προορίζεται για νωπή κατανάλωση και καλλιεργείται κυρίως στο Νομό Μεσσηνίας (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2018).



Εικόνα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή τομάτας κατά τη δεκαετία 2010-2019 (FAO, 2019).

1.2 Βοτανική ταξινόμηση

Η τομάτα ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae* και αντιστοιχεί στο τμήμα *Lycopersicon* του γένους *Solanum*, το οποίο αποτελείται από την καλλιεργούμενη τομάτα (*Solanum lycopersicum*) και 12 άγρια είδη (Peralta et al., 2008). Το γένος *Solanum* περιλαμβάνει περισσότερα από 3000 είδη, συμπεριλαμβανομένων της πατάτας, της μελιτζάνας, του καπνού, της πιπεριάς (*Capsicum*) και άλλων σημαντικών οικονομικά ειδών (Bergougnoux, 2014). Η ταξινόμηση της τομάτας αποτελούσε για πάρα πολλά χρόνια ένα αμφιλεγόμενο θέμα και αντικείμενο συστηματικής μελέτης. Από την είσοδο της στην Ευρώπη τον 16ο αιώνα θεωρήθηκε ότι άνηκε με βάση τα χαρακτηριστικά της στο γένος *Solanum*, όπου πήρε την επιστημονική ονομασία *Solanum pomiferum*. Ωστόσο, ο Tournefort (1694) βασιζόμενος στον αριθμό των κοιλοτήτων που περιέχουν τους σπόρους (πολύχωρη), κατέταξε την τομάτα στο γένος *Lycopersicon*, διαφοροποιώντας το από το *Solanum* (δίχωρη). Έπειτα, το 1753 ο Linnaeus κατηγοριοποίησε την τομάτα στο γένος *Solanum* και περιέγραψε δύο είδη το *S. lycopersicum* (καλλιεργούμενη τομάτα) και το *S. peruvianum*. Παράλληλα, ο Miller το 1754, βάσει της θεωρίας του Tournefort, διατύπωσε επισήμως τα χαρακτηριστικά του γένους *Lycopersicon* και

καθιέρωσε το όνομα *Lycopersicon esculentum* για την καλλιεργούμενη τομάτα, ενώ στην άγρια μορφή έδωσε την ονομασία *L. pimpinellifolium* (Kalloo, 2012).

Σήμερα, με τη φυλογενετική ανάλυση και συστηματική μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών αποδείχτηκε ότι η τομάτα ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae* και το γένος *Lycopersicon* ταξινομήθηκε στο γένος *Solanum* (Razdan and Mattoo, 2007). Η ομαδοποίηση εντός του γένους προτάθηκε από τον Müller (1940), ο οποίος υποστήριζε ότι στο γένος περιλαμβάνονται έξι είδη και διακρίνονται δύο υπογένη, τα *Eriopercicon* και *Eulycopercicon*. Στο *Eriopercicon* ταξινομήθηκαν τα είδη *L. peruvianum*, *L. cheesmaniae*, *L. hirsutum*, *L. glandulosum*, ενώ το *Eulycopercicon* περιλαμβάνει τα είδη *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*. Τέλος, σύμφωνα με έρευνα που βασίστηκε στη μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου *GBSSI* (συνθετάση αμύλου), το γένος *Lycopersicon* περικλείει τρία υπογένη τα *Eriopercicon* (πράσινος καρπός), *Eulycopercicon* (κόκκινος καρπός) και το *Neolycopersicon* (Peralta and Spooner, 2001).

1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά

Η τομάτα είναι ένα ποώδες λαχανικό με βιολογικό κύκλο που διαφέρει ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειάς της. Κατά την καλλιέργειά της σε εύκρατες και ηπειρωτικές περιοχές παρουσιάζει μονοετή κύκλο, ενώ όταν αναπτύσσεται σε τροπικά κλίματα καλλιεργείται ως πολυετές. Το υπόγειο τμήμα του φυτού απαρτίζεται από μία κεντρική πασσαλώδη ρίζα, που μπορεί να φτάσει σε βάθος 3 μέτρων. Όταν πραγματοποιείται απευθείας σπορά δημιουργούνται δευτερεύουσες ρίζες και ριζικά τριχίδια. Ωστόσο, στην πλειονότητα των περιπτώσεων το φυτό υπόκεινται σε πολλές μεταφυτεύσεις, οι οποίες λόγω τραυματισμών της ρίζας οδηγούν σε ανάπτυξη θυσσανώδους ριζικού συστήματος. Αυτό το γεγονός καθιστά την τομάτα ως ένα από τα πιο ιδανικά φυτά για μεταφύτευση, καθώς το ριζικό σύστημα αναπτύσσεται με ταχύτατο ρυθμό και οι τραυματισμένες ρίζες έχουν τη δυνατότητα να προσροφούν νερό και θρεπτικά στοιχεία και να ανακάμπτουν γρήγορα από το μεταφυτευτικό στρες (Ολύμπιος, 2015).

Επί του βλαστού φύονται τα φύλλα και οι ταξιανθίες. Τα φύλλα στις μασχάλες διαθέτουν οφθαλμούς, οι οποίοι εκπτύσσονται και δίνουν πλευρικούς βλαστούς

(Εικόνα 1.2). Το φυτό έχει την ικανότητα να δημιουργεί πολυάριθμους πλευρικούς βλαστούς, με αποτέλεσμα να γίνεται θαμνώδης, αν δεν δεχτεί κατάλληλο κλάδεμα. Ο βλαστός είναι κυλινδρικός, συμπαγής και εύθραυστος, ενώ σταδιακά σκληραίνει χωρίς να ξυλοποιείται, προσδίδοντας την μηχανική αντοχή που απαιτείται ώστε να σηκώσει το βάρος των καρπών. Το ύψος των βλαστών επηρεάζεται κυρίως από γενετικούς παράγοντες και διακρίνονται τρεις κατηγορίες: i) οι βλαστοί απεριόριστης ανάπτυξης, που μπορεί να φτάσουν έως και 10 μέτρα, ii) οι βλαστοί περιορισμένης ανάπτυξης, που συνήθως έχουν θαμνώδη μορφή και iii) οι βλαστοί ημιπεριορισμένης ανάπτυξης που διακρίνονται από την έκπτυξη μιας ταξιανθίας στην κορυφή.

Τα φύλλα είναι σύνθετα και είναι τοποθετημένα ελικοειδώς επάνω στο φυτό. Κάθε φύλλο περιλαμβάνει ζεύγη φυλλαρίων και παράφυλλων, που καταλήγουν σε ένα φυλλάριο στην κορυφή (Εικόνα 1.2). Η άνω επιφάνεια των φύλλων εμφανίζει σκούρο πράσινο χρώμα ενώ η κάτω επιφάνεια παρουσιάζει ανοιχτές αποχρώσεις του πράσινου. Ο αριθμός των φυλλαρίων εξαρτάται από τη θέση τους πάνω στο φυτό αλλά και από την ποικιλία, ενώ το μέγεθος των φύλλων καθορίζεται επίσης από την ποικιλία αλλά και από τις καλλιεργητικές πρακτικές. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οι μεγαλόκαρπες ποικιλίες χαρακτηρίζονται από μακριά και πλατιά φύλλα σε αντίθεση με τις μικρόκαρπες. Όλα τα πράσινα μέρη του φυτού φέρουν αδενώδεις τρίχες, από τις οποίες εκκρίνει ουσία με την ιδιαίτερη μυρωδιά της τομάτας.

Τα άνθη της τομάτας εμφανίζονται σε ταξιανθίες που περιέχουν 4 έως 12 άνθη, ανάλογα με την ποικιλία, συναντώνται όμως και ταξιανθίες που φέρουν και περισσότερα άνθη (έως 30) όπως στις μικρόκαρπες ποικιλίες, στα υβρίδια και στις ποικιλίες τύπου cherry. Οι ταξιανθίες είναι τοποθετημένες πάνω στο βλαστό αντίθετα από τα φύλλα και είναι διακλαδισμένες συμμετρικά ή ασύμμετρα. Μορφολογικά τα άνθη απαρτίζονται από έναν πράσινο δερματώδη κάλυκα με 5 ή περισσότερα σέπαλα, 5 ή περισσότερα πέταλα ενωμένα στη βάση μεταξύ τους, μια κίτρινου χρώματος στεφάνη και 5 στήμονες ενωμένους μεταξύ τους που σχηματίζουν κωνικό σχήμα γύρω από τον στύλο, ο οποίος είναι συνήθως κοντύτερος σε σχέση με τους ανθήρες (Εικόνα 1.2). Με αυτόν τον τρόπο υποβοηθάται η αυτεπικονίαση, καθώς τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα και αυτογονιμοποιούμενα, ενώ σε ελάχιστες περιπτώσεις μπορεί να πραγματοποιηθεί σταυρογονιμοποίηση. Η ωοθήκη είναι πολύχωρη, περιλαμβάνοντας 2-7 ή περισσότερους χώρους και κάθε χώρος περιέχει πολυάριθμα ωάρια. Έχει παρατηρηθεί ότι η άνθηση πραγματοποιείται το πρωί με το άνοιγμα των ανθέων και

έπειτα ακολουθεί η διάρρηξη των ανθών. Ο πιο συνήθης αριθμός καρπών που προκύπτουν από την επικονίαση είναι περίπου 2 με 8, ενώ στις ποικιλίες με περισσότερα άνθη ανά ταξιανθία δημιουργούνται περισσότεροι.

Ο καρπός είναι πολύχωρη ράγα. Χαρακτηρίζεται από παχύ περικάρπιο, αδύνατη επιδερμίδα απουσίας στομάτων και κηρώδη εφυμενίδα. Περιλαμβάνονται συνήθως 2 με 25 καρπόφυλλα, τα οποία αποτελούνται από τον πλακούντα εντός ενός ζελατινώδους υγρού που περιλαμβάνει τα σπέρματα. Το σχήμα και το μέγεθος του καρπού εξαρτάται από τον αριθμό των κοιλοτήτων που περιέχονται. Αν ο καρπός περιέχει δύο χώρους (δίχωρος) είναι συνήθως στρογγυλός, ενώ αν έχει περισσότερους χώρους είναι ακανόνιστος ή πεπλατυσμένος (Πετρόπουλος και Χα, 2014). Το κόκκινο χρώμα των ώριμων καρπών οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση λυκοπενίου, η οποία εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (φως, θερμοκρασία), την ποικιλία και τις καλλιεργητικές πρακτικές (Dumas et al., 2003) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Μορφολογικά χαρακτηριστικά τομάτας. (Πηγή: www.meteofarm.gr).

Οι σπόροι είναι μικρού μεγέθους, με διάμετρο 3-5 χιλιοστά και εύθραυστοι. Το σχήμα τους είναι ωοειδές, ελαφρώς πεπλατυσμένο και το χρώμα τους κυμαίνεται από κίτρινο έως ανοιχτό καστανό. Το χαρακτηριστικό που τους κάνει να διαφέρουν από αυτούς της μελιτζάνας και της πιπεριάς είναι ότι εμφανίζουν μεταξωτή όψη, η οποία οφείλεται στις τριχοειδείς προεκβολές. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις για εμπορικούς σκοπούς οι τρίχες αφαιρούνται. Εσωτερικά, δομείται από ένα έμβρυο που εμφανίζει κυρτότητα και καλύπτεται από το ενδοσπέρμιο (Ολύμπιος, 2015). Μετά τη συγκομιδή, η βλαστικότητα του σπόρου μπορεί να διατηρηθεί μέχρι και 10 χρόνια, εφόσον συντηρείται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (5-10 °C) και κατάλληλες συνθήκες σχετικής υγρασίας (20 %) και υγρασίας σπόρου (5-8 %) (Robertson and Labate, 2006).

1.4 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις

Η τομάτα ανήκει στην κατηγορία των ειδών θερμής εποχής, γεγονός που την καθιστά ευαίσθητη στις χαμηλές θερμοκρασίες και τον παγετό κατά την ανάπτυξή της. Η άριστη εδαφική θερμοκρασία για βλάστηση του σπόρου είναι 20 °C, ενώ σε θερμοκρασίες κάτω από 16 °C μειώνεται ο ρυθμός βλάστησης (Hartz et al., 2008). Οι απαιτήσεις σε θερμοκρασία ημέρας για την ανάπτυξη και εύρυθμη λειτουργία του φυτού είναι 25 - 30°C, ενώ η θερμοκρασία νύχτας πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 16 – 20 °C, σε συνδυασμό με χαμηλές τιμές υγρασίας. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι διαφορά θερμοκρασίας 5 - 7 °C μεταξύ μέρας και νύχτας, δρα ευεργετικά στην άνθιση, καρπόδεση και ανάπτυξη του φυτού. Γενικότερα, οι θερμοκρασίες άνω των 35 °C ή κάτω των 12 °C επηρεάζουν δυσμενώς τον κύκλο ζωής του φυτού, ενώ οι παρατεταμένη θερμοκρασία κάτω από 10 °C οδηγεί σε αδυναμία επιβίωσης. Άριστη θερμοκρασία καρπόδεσης είναι 18 - 24 °C (Ολύμπιος, 2015). Αντίθετα, οι θερμοκρασίες κάτω από 16 °C, και ιδιαίτερα κάτω από 13 °C, δρουν επιζήμια καθώς επιφέρουν μειωμένη παραγωγή γύρης. Επιπλέον, η γύρη παρουσιάζει μειωμένη γονιμότητα έως και αγονία σε θερμοκρασίες κάτω από 10 °C (Charles and Harris, 1972). Παράλληλα, μειωμένη καρπόδεση εντοπίζεται και σε θερμοκρασίες άνω των 31 °C. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο, ότι η κάθε ποικιλία ανταποκρίνεται διαφορετικά στις διάφορες κλιματολογικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να συνιστάται προσεκτική επιλογή

της ποικιλίας, σύμφωνα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή καλλιέργειας (Ολύμπιος, 2015).

Η τομάτα μπορεί να καλλιεργηθεί σε ένα εύρος εδαφικών τύπων και συνθηκών. Ως ιδανικότερα έχουν αποδειχθεί τα αμμοπηλώδη και πηλοαμμώδη πλούσια σε οργανική ουσία εδάφη (Hartz et al., 2008). Συνήθως, τα αμμώδη εδάφη ενδείκνυνται για πρώιμη σπορά, καθώς θερμαίνονται πιο εύκολα. Αντιθέτως, τα αργιλώδη και αργιλοπηλώδη εδάφη δεν προτιμώνται, γιατί παρουσιάζουν μειωμένη στράγγιση, συσσώρευση αλάτων και ευνοούν την ανάπτυξη ασθενειών. Ωστόσο, μπορεί να αξιοποιηθούν εφόσον δεν νεροκρατούν και αρδεύονται προσεκτικά. Το άριστο pH για την ανάπτυξη της τομάτας είναι 6 - 6.5, ενώ μπορεί να προσαρμοστεί και σε υψηλότερες τιμές έως 7.5 (Zsilinszky, 2005). Έχει παρατηρηθεί ευαισθησία στην υψηλή συγκέντρωση αλάτων, η οποία οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό φωτοσύνθεσης, μειωμένη αγωγιμότητα των στομάτων και μείωση του ξηρού βάρους των φυτών (Ors et al., 2021).

1.5 Θρεπτική αξία

Σήμερα, η τομάτα αποτελεί πλέον ένα από τα βασικά στοιχεία της διατροφής του ανθρώπου. Παρουσιάζει υψηλή θρεπτική αξία, καθώς πέρα από το ότι περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια και σάκχαρα διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά, μέταλλα (K και Fe) και βιταμίνες. Πιο συγκεκριμένα, οι αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχονται είναι τα καροτενοειδή, με πιο σημαντικά το λυκοπένιο και το β-καροτένιο, βιταμίνες, όπως οι C και E, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα (Colak et al., 2020). Έχει αποδειχτεί, ότι η συχνή κατανάλωση τομάτας μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο χρόνιων καρδιαγγειακών και νευρολογικών παθήσεων, διάφορων μορφών καρκίνου, ενώ παράλληλα προσδίδουν αντιφλεγμονώδη δράση (Willcox et al., 2004). Ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην αλληλεπίδραση των συστατικών της με τις μεταβολικές οδούς που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απόκριση και το οξειδωτικό στρες. Δύο πολύτιμες ενώσεις που αποτελούν συστατικά του καρπού είναι το κουμαρικό οξύ και το χλωρογενικό οξύ, τα οποία δρουν ως παρεμποδιστικοί παράγοντες των νιτροζαμίνων. Οι εν λόγω ενώσεις παράγονται στο ανθρώπινο σώμα και αποτελούν συστατικά του καπνού, ενισχύοντας την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα (Bhowmik et al., 2012). Παράλληλα, το περίβλημα παρουσιάζει σημαντική διατροφική αξία, είναι πλούσιο σε

φυτικές ίνες (41 %), πρωτεΐνες (14 %) και μικρή ποσότητα λιπαρών (3 %) (Del Valle et al., 2005).

Όσον αφορά τους σπόρους, εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες, λιπαρά οξέα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες και μέταλλα. Τα κυριότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι, το λινολεϊκό οξύ το οποίο συνοδεύεται από το ελαϊκό οξύ και το παλμιτικό οξύ. Αξίζει να σημειωθεί, η υψηλή συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικές ουσίες και το γεγονός ότι αποτελεί πηγή φαινολικών ενώσεων, οι οποίες λειτουργούν ως πάροχοι δευτερευόντων μεταβολιτών που δρουν ευεργετικά στην υγεία του ανθρώπου μέσω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Gonzalez et al. 2011).

Πίνακας 1.1. Συστατικά ώριμου καρπού ανά 100 γραμμάρια νωπού προϊόντος.

Συστατικό	Περιεκτικότητα	Μονάδες μέτρησης	Συστατικό	Περιεκτικότητα	Μονάδες μέτρησης
Νερό	94.52	g	Zn	0.17	mg
Θερμίδες	18	Kcal	Cu	0.059	mg
Πρωτεΐνες	0.88	g	Se	0	μg
Λίπη	0.20	g	Θειαμίνη	0.037	mg
Υδατάνθρακες	3.89	g	Βιταμίνη Α	42	μg
Ίνες	1.2	g	Βιταμίνη Β6	0.08	mg
Σάκχαρα	2.63	g	Βιταμίνη C	13.7	mg
Ca	10	mg	Βιταμίνη E	0.54	mg
Fe	0.27	mg	Βιταμίνη K	7.9	mg
Mg	11	mg	α-καροτένιο	102	μg
P	24	mg	β-καροτένιο	450	μg
K	237	mg	Λυκοπένιο	2574	μg
Na	5	mg			

(Πηγή: USDA: National Nutrient Database for Standard Reference, 2020.)

1.6 Χρήσεις

Η τομάτα είναι ένα από τα βασικά στοιχεία της καθημερινής διατροφής του ανθρώπου, γιατί αποτελεί συστατικό πληθώρας προϊόντων που καταναλώνονται ημερησίως. Μία μορφή είναι ο νωπός καρπός, ο οποίος χρησιμοποιείται για βρώση

μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλα λαχανικά σε σαλάτες ή η κερασόμορφη για μικρά γεύματα ή ως διακοσμητικό. Επιπλέον, η τομάτα που προορίζεται για νωπή χρήση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μαγειρεμένη μορφή όπως, ψημένες, σάλτσες, σε κοκκινιστά φαγητά κ.α. (Ολύμπιος, 2015). Έχει παρατηρηθεί ότι το λυκοπένιο λόγω της υδρόφοβης φύσης του, αν μαγειρευτεί με λάδι ή άλλο έλαιο απελευθερώνεται μεγαλύτερη ποσότητα αυτού και απορροφάται καλύτερα από τον ανθρώπινο οργανισμό (Bhowmik et al., 2012).

Ένας από τους λόγους διάδοσης της τομάτας παγκοσμίως είναι η ευρεία παραγωγή μεταποιημένων προϊόντων. Τα μεταποιημένα προϊόντα απαιτούν ποικιλίες που η διαδικασία καλλιέργειάς τους πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις, όπως αυτές ορίζονται για την παραγωγή βιομηχανικής τομάτας (Ολύμπιος., 2015). Στην κατηγορία των προϊόντων αυτών ανήκουν οι αποφλοιωμένες τομάτες, πολτός, χυμός, πουρές τομάτας, σκόνη, νιφάδες, αποξηραμένες, σάλτσες με πρόσθετα συστατικά όπως ketchup, πίκλες, τουρσί τομάτας κ.α. Υποστηρίζεται ότι έπειτα από θερμική επεξεργασία, πέρα από μείωση της συγκέντρωσης της βιταμίνης C, ενισχύεται η θρεπτική αξία της τομάτας γιατί αυξάνεται η αντιοξειδωτική της δράση, η ποσότητα του αφομοιώσιμου λυκοπενίου, ενώ δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στα ολικά φαινολικά και στα φλαβονοειδή (Dewanto et al., 2002). Μετά τη μεταποίηση τα απόβλητα που προκύπτουν περιέχουν υψηλές ποσότητες σπόρων και εξωτερικών φλοιών (Giuffre et al., 2016). Οι σπόροι αποτελούν το 72 % των κατάλοιπων και δεν ενδείκνυνται για ανθρώπινη βρώση, αλλά χρησιμοποιούνται ως τροφή για τα ζώα και ως λίπασμα (Al-Betawi, 2005). Το έλαιο των σπόρων απαντάται σε περιεκτικότητα 24 % και δεν καταναλώνεται, λόγω υψηλής οξύτητας, αλλά αξιοποιείται ως βιοντίζελ (Karami et al., 2018.). Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ότι οι φυτικές ίνες (λιγνίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη κ.α.) που περιέχονται στα υπολείμματα επιδρούν θετικά στην υγεία του ανθρώπου και μπορούν να ενταχθούν ως πρόσθετη πηγή ινών σε διάφορα τρόφιμα ή ως συμπληρώματα διατροφής (Larrauri, 1999; Mongeau, 2003).

1.7 Γενετική βελτίωση τομάτας

Τα τελευταία χρόνια, η αύξηση του πληθυσμού έχει οδηγήσει σε αντίστοιχη αύξηση της παραγωγής τομάτας σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με το FAOSTAT (2019), σε χρονικό διάστημα είκοσι ετών έχει σημειωθεί αύξησης της απόδοσης κατά

40 % παγκοσμίως, με την αύξηση να αποδίδεται τόσο στην εφαρμογή εγγειοβελτιωτικών πρακτικών όσο και στη διάθεση και αξιοποίηση νέων βελτιωμένων ποικιλιών (Grandillo et al., 1999).

Οι προσπάθειες για τη βελτίωση και τη δημιουργία νέων ποικιλιών τομάτας ξεκίνησε τουλάχιστον πριν δύο αιώνες. Σε ερευνητικό επίπεδο, οι προσπάθειες βελτίωσης του είδους έλαβαν χώρα στην Ευρώπη και επεκτάθηκαν στην Αμερική. Μεταξύ των χωρών που εστίασαν στην υλοποίηση σχετικών βελτιωτικών προγραμμάτων για την σύγχρονων υψηλοαποδοτικών ποικιλιών, είναι ο Καναδάς, η Βουλγαρία, η Ιαπωνία, η Ολλανδία κ.α. Από το 1925, εφαρμόστηκαν κλασσικές μέθοδοι επιλογής υπέρτερων γονοτύπων από την ήδη υπάρχουσα γενετική παραλλακτικότητα, ενώ αργότερα ακολούθησε η εφαρμογή ποικίλων σχημάτων υβριδισμού με επιλογή ενισχύοντας τη διαδικασία αυτή (Kalloo, 2012). Έπειτα, η ανάπτυξη της τεχνολογίας και της ευρείας χρήσης μοριακών δεικτών για τον προσδιορισμό κατάλληλων γονοτύπων από το 1980 οδήγησε στην αναβάθμιση των βελτιωτικών διαδικασιών που στοχεύουν στην ενσωμάτωση επιθυμητών γνωρισμάτων (Rodríguez et al, 2011). Στους βασικούς βελτιωτικούς στόχους, συγκαταλέγονται η αύξηση της ποιότητας και της απόδοσης, η πρωίμιση της παραγωγής, η αντοχή σε προσβολές από ασθένειες και η ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων.

Πέραν της εφαρμοσμένης έρευνας με στόχο τη δημιουργία βελτιωμένων ποικιλιών, η τομάτα έχει αξιοποιηθεί ευρέως ως φυτό μοντέλο στη βασική έρευνα που μεταξύ άλλων, στοχεύει στην ανάπτυξη τεχνολογιών και μεθόδων, στη μελέτη της βιολογία των φυτών αλλά και στις αλληλεπιδράσεις των φυτών με άλλους οργανισμούς. Η αξιοποίηση της για τους ανωτέρω σκοπούς σχετίζεται με το γεγονός ότι, η τομάτα παρουσιάζει μια σειρά πλεονεκτημάτων που την καθιστούν ιδανικό ερευνητικό εργαλείο. Ένα από τα βασικά συγκριτικά χαρακτηριστικά, έναντι άλλων ειδών, είναι ο μικρής διάρκειας βιολογικός κύκλος, που διαρκεί περίπου 2 - 5 μήνες (Ολύμπιος, 2015). Επίσης, στην τομάτα απαντώνται ορισμένα επιθυμητά μορφολογικά γνωρίσματα, όπως η μαλακή σάρκα, τα σύνθετα φύλλα και ο συμποδιακός βλαστός που άλλα πρότυπα φυτά (*Oryza sativa*, *Arabidopsis*) δεν παρουσιάζουν και συνεπώς χαρακτηρίζονται από απουσία ευρείας γενετικής βάσης (Kimura and Sinha, 2008). Σε πρακτικό επίπεδο, η τομάτα παρουσιάζει επίσης το πλεονέκτημα ότι η γονιμοποίηση πραγματοποιείται με αυτεπικονίαση, συμβάλλοντας στην φαινοτυπική έκφραση

υπολειπόμενων μεταλλάξεων. Παράλληλα, λόγω της άμεσης και εύκολης συλλογής της γύρης είναι δυνατή η ελεγχόμενη υβριδοποίηση (Fentik, 2017). Άλλο ένα προτέρημα είναι η αναγεννητική πλαστικότητα, γεγονός που προσδίδει ταχύτατη προσαρμοστικότητα.

Σύμφωνα με το πρόγραμμα Tomato Genome Consortium (2012), που διεξήχθη με σκοπό την αποκρυπτογράφηση του DNA της ποικιλίας Heinz 1706, αποδείχτηκε ότι ανήκει στα διπλοειδή είδη και περιέχει 12 ζεύγη χρωμοσωμάτων ($2n = 2x = 24$). Παρουσιάζει μικρό σχετικά μέγεθος γονιδιώματος, 950 Mb, το οποίο αποτελείται από 25 % ευχρωματίνη (6.7 kb/γονίδιο) και 75 % περικεντρική ετεροχρωματίνη. Συνήθως, τα ανασυνδυασμένα γονίδια και οι μεταγραφές απαντώνται στην ευχρωματίνη, ενώ η είσοδος χλωροπλαστών και οι miRNA αλληλουχίες διατάσσονται ισομορφικά στο γονιδίωμα. Η αλληλούχιση του γονιδιώματός της τομάτας επέτρεψε τον εντοπισμό σημαντικών ομοιοτήτων με άλλα σημαντικά οικονομικά είδη της οικογένειας *Solanaceae*, γεγονός που καθιστά το γονιδίωμα της μια βάση δεδομένων για περαιτέρω εξέλιξη. Ο υψηλός βαθμός παραλλακτικότητας συναντάται κυρίως στα άγρια είδη (Nakazato et al., 2010). Παράλληλα, η αλληλούχιση του γονιδιώματός της και η σύγκριση της καλλιεργούμενης τομάτας με άγρια είδη επέτρεψε τον εντοπισμό πολυμορφισμών που δύνανται να αξιοποιηθούν για την εισαγωγή νέων επιθυμητών γνωρισμάτων αλλά και τη δημιουργία μοριακών ανιχνευτών (Jiménez-Gómez, 2009). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η έρευνα στην τομάτα μπορεί να διευκολυνθεί σημαντικά από την εφαρμογή των τεχνικών της γενετικής μηχανικής (Rick and Yoder, 1988), αφενός μεν λόγω της διαθεσιμότητας αποτελεσματικών πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού και αφετέρου λόγω των υψηλών συχνοτήτων, έως και 80 %, μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*, που κατά κύριο λόγο οφείλονται στην υψηλή επιδεκτικότητα των κυττάρων της τομάτας στη μόλυνση με το βακτηριακό φορέα.

1.8 Μέθοδοι βελτίωσης

1.8.1 Κλασσικές μέθοδοι βελτίωσης

Η διαδικασία παραγωγής βελτιωμένων ποικιλιών χρονολογείται πριν από 200 χρόνια στην Ευρώπη, ενώ χρειάστηκε περίπου ένας αιώνας για την επέκταση των σχετικών προσπαθειών στην Αμερική. Τα θεμέλια της βελτίωσης της τομάτας τέθηκαν

το 1870 από τον Alexander W. Livingston, ο οποίος έπειτα από πέντε χρόνια συνεχούς καλλιέργειας και επιλογής επιθυμητών φαινοτύπων κατόρθωσε τη δημιουργία της ποικιλίας Paragon, η οποία χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερο μέγεθος καρπών με έντονα σαρκώδη όψη, συμβάλλοντας στην εμπορική αξία που απέκτησε αργότερα ο καρπός (Smith, 1998). Αξίζει να σημειωθεί ότι, σημαντική συμβολή στην εξέλιξη του είδους είχε η εξημέρωση και η εξάπλωσή της από την Αμερική στην Ευρώπη. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που προσδόθηκε στο είδος ήταν το μεγάλο μέγεθος του καρπού της καλλιεργούμενης τομάτας, γεγονός που αντιτίθεται με τους μικρούς καρπούς των άγριων τύπων. Οι μικροί μεγέθους καρποί λειτουργούσαν ως εργαλεία υποβοήθησης της εξάπλωσης αλλά δεν εξυπηρέτησαν στην ανθρώπινη βρώση (Fentik, 2017). Με την πάροδο του χρόνου, τόσο η σταδιακή συσσώρευση επιθυμητών μεταλλάξεων όσο και η διενέργεια τεχνητών επιλογών οδήγησαν στην αύξηση του βάρους του καρπού κατά 30 % (Fragey et al., 2000). Παράλληλα, κατέστη εφικτή η ενίσχυση της αυτογονιμοποίησης, μέσω της εντατικής επιλογής φαινοτύπων με κοντότερο στύλο που συνέβαλαν στην μετατόπιση του στίγματος εντός του σωλήνα των ανθών, συντελώντας στην μείωση της πιθανότητας σταυρογονιμοποίησης (Rick, 1983). Λόγω του αυξημένου ποσοστού αυτεπικονίασης, οι απόγονοι αυτογονιμοποίησης των επιλεγμένων φυτών παρουσίαζαν πανομοιότυπο φαινότυπο με τους γονείς. Το γεγονός αυτό επέτρεψε τη δημιουργία και διατήρηση καθαρών σειρών (heirloom) που εμφανίζουν ομοζυγωτία και έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά ως προς το μέγεθος, το χρώμα και το σχήμα τους (Bai et al., 2007). Έως το 1950, η βελτίωση για δημιουργία νέων ποικιλιών στόχευε στην καλύτερη προσαρμογή στην περιοχή καλλιέργειας αλλά και τη συμμόρφωση με τις ανάγκες της αγοράς και τα πρότυπα για νοπή κατανάλωση ή βιομηχανική επεξεργασία.

Τις τελευταίες δεκαετίες και κυρίως τον 20^ο αιώνα, οι προϋπάρχουσες ποικιλίες αντικαταστάθηκαν σε μεγάλο βαθμό από τα υβρίδια, τα οποία επεκταθήκαν και εδραιώθηκαν ταχύτατα στην παγκόσμια αγορά. Τα υβρίδια συνδυάζουν επιθυμητά χαρακτηριστικά δύο γονέων, αυξάνοντας τις δυνατότητες επίτευξης των βελτιωτικών στόχων σχετικά με την έκφραση των επιθυμητών ποσοτικών και ποιοτικών γνωρισμάτων (Bergougnoux, 2014). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι, σημαντικό μειονέκτημα για τους παραγωγούς αποτελεί η αναγκαιότητα προμήθειας σπόρου σε κάθε καλλιεργητική περίοδο από τις εταιρείες σποροπαραγωγής (Bai and Lindhout, 2007). Η πρώτη ποικιλία-υβρίδιο που δημιουργήθηκε ονομάστηκε «Single Cross» και

διατέθηκε προς καλλιέργεια το 1946 (Dorst, 1946). Η παραγωγή υβριδίων μπορεί να επιτευχθεί με τρεις διαδικασίες, η πρώτη περιλαμβάνει τον ευνουχισμό των θηλυκών γονέων και την επικονίαση τεχνητά, η δεύτερη βασίζεται στην αρρενοστεριότητα και την τεχνητή επικονίαση και τέλος η τρίτη μέθοδος περιλαμβάνει την αρρενοστεριότητα σε συνδυασμό με τη φυσική επικονίαση (Cheema and Dhaliwai, 2005). Ο υβριδισμός ακολουθείται από ένα εύρος σχημάτων επιλογής, όπως η γενεαλογική επιλογή, η καταγωγή από μεμονωμένους σπόρους ή συνδυασμός αυτών. Στα σχήματα υβριδισμού, η δημιουργία υπέρτερων απογονικών γονοτύπων βασίζεται στο φαινόμενο της ετέρωσης, κατά το οποίο τα ετεροζύγωτα άτομα της F_1 γενιάς υπερέχουν των γονέων, που είναι καθαρές σειρές, ως προς ένα ή/και περισσότερα γνωρίσματα (Birchler et al., 2006). Η τομάτα εμφανίζει αυξημένη πιθανότητα έκφρασης της ετέρωσης ως προς την πρωιμότητα, τη στρεμματική απόδοση, το μέγεθος του καρπού, την ανθεκτικότητα σε διάφορους παράγοντες καταπόνησης και την ομοιομορφία (Ahmad et al., 2011). Σύμφωνα με αναφορές, η ετέρωση στην τομάτα έχει οδηγήσει σε αύξηση του δυναμικού απόδοσης της καλλιέργειας, έως και κατά 300% (Cheema and Dhaliwai, 2005).

Η προσφορά των υβριδίων στη βελτίωση είναι ανεκτίμητη, καθώς έδωσε νέες δυνατότητες στην παραγωγή. Αξίζει να αναφερθούν μερικά παραδείγματα υβριδίων, όπως τα Florida 7547, Florida 7481, που διατέθηκαν προς καλλιέργεια το 1994, από το University of Florida, τα οποία παρέχουν αντοχή στη φουζαρίωση (φυλή 3) λόγω της κατοχής του γονιδίου ανθεκτικότητας *I-3* έναντι του παθογόνου μύκητα (Scott, 1998). Στα σημαντικά υβρίδια συγκαταλέγεται επίσης το Pusa Hybrid 4, το οποίο δημιουργήθηκε από τον οργανισμό Indian Agricultural Research Institute (1997) και χαρακτηρίζεται από αντοχή στους κομβοηματοδείς. Μεγάλη συνεισφορά έχουν και τα υβρίδια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε ιολογικές ασθένειες, όπως το Hisar Anmol με ανθεκτικότητα έναντι του ιού του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλλων (TYCV) (CCS Haryana Agricultural University). Περαιτέρω, σημαντικό πλεονέκτημα της παραγωγής και καλλιέργειας υβριδικών ποικιλιών είναι η δυνατότητα ανάπτυξης σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ποικιλίες υβρίδια Solar Set (1989) και Pusa Hybrid 1, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ικανότητα ανάπτυξης σε περιοχές όπου επικρατούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες ημέρας και νύχτας αντίστοιχα (Scott 1998, Indian Agricultural Research Institute). Τέλος, σημαντικότετη υπήρξε η συνεισφορά των ποικιλιών υβριδίων στη βελτίωση της ποιότητας των καρπών

αναφορικά με το χρόνο ωρίμανσης. Η ποικιλία Daniela που παράχθηκε από την ερευνητική ομάδα BonTom εκφράζει το γονίδιο *rin*, το οποίο δρα ως αναστολέας ωρίμανσης με επιλεγμένους πολυγονιδιακούς παράγοντες που προσδίδουν σταθερότητα και αργή ωρίμανση (Bai, 2007).

1.8.2 Μοριακές μέθοδοι βελτίωσης

Η χρήση των κλασικών μεθόδων βελτίωσης τις προηγούμενες δεκαετίες συντέλεσε σημαντικά στην αύξηση της παραγωγής και την ενίσχυση της ποιότητας. Ως σημαντικό μειονέκτημα των κλασικών βελτιωτικών διαδικασιών ωστόσο θεωρείται το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη δημιουργία μιας νέας ποικιλίας, καθώς κατά μέσο όρο απαιτούνται 10-15 χρόνια για την υλοποίηση ενός προγράμματος βελτίωσης που βασίζεται σε σχήματα υβριδισμού με επιλογή (Foolad, 2007). Η πολυετής φύση των εν λόγω διαδικασιών, λειτουργεί σαφώς ανασταλτικά ως προς την ανταγωνιστικότητα των ποικιλιών αλλά και τη δυνατότητα κάλυψης των αναγκών της παραγωγής ενόψει της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού. Στο πλαίσιο αυτό, τα επιτεύγματα στους τομείς της γενετικής, της μοριακής βιολογίας και βιοτεχνολογίας προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες και προοπτικές στη δημιουργία βελτιωμένων ποικιλιών που εμφανίζουν επιθυμητά γνωρίσματα.

Η μοριακή βελτίωση βασίζεται στη χρήση μοριακών δεικτών, οι οποίοι αποτελούν τμήματα DNA που λειτουργούν ως σημαντές πολυμορφισμών μεταξύ των ατόμων. Οι πολυμορφισμοί μπορεί να αφορούν είτε σε σημειακές μεταλλάξεις είτε σε εισαγωγές, διαγραφές, μετατοπίσεις, διπλοποιήσεις, επαναλήψεις συγκεκριμένων βάσεων. Οι μοριακοί δείκτες είναι φαινοτυπικά ουδέτεροι, δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, παρέχουν την δυνατότητα εφαρμογής σε οποιαδήποτε θέση του γονιδιώματος, έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν πολυμορφισμούς που δεν συνδέονται με φαινοτυπικές αλλαγές και δεν σχετίζονται με φαινόμενα επίστασης ή πλειοτροπισμού. Με την πάροδο των χρόνων πολυάριθμοι μοριακοί δείκτες έχουν δημιουργηθεί και αξιοποιηθεί σε προγράμματα που στοχεύουν στη δημιουργία νέων ποικιλιών. Κατά κανόνα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες μοριακών δεικτών: i) οι δείκτες που βασίζονται στον υβριδισμό, ii) οι δείκτες που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και iii) οι δείκτες που βασίζονται σε μικρά αλληλουχημένα τμήματα. Στην πρώτη κατηγορία, ανήκουν οι RFLPs (Restriction

Fragment Length Polymorphisms). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους δείκτες RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSRs (Simple Sequence Repeats), CAPs (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) και στην τρίτη κατηγορία κατατάσσονται οι SNPs (Single Nucleotides Polymorphisms) (Mondini et al., 2009).

Οι μοριακοί δείκτες συνέβαλαν στη δημιουργία γενετικών χαρτών. Ο πρώτος χάρτης κατασκευάστηκε το 1986 και αποτελούνταν από 18 ισοένζυμα και 94 DNA δείκτες (Bernatzky et al., 1986). Τα επόμενα χρόνια συνεχίστηκαν οι προσπάθειες κατασκευής γενετικών χαρτών, χρήσης εξελιγμένων μοριακών δεικτών, οι οποίοι χρησιμοποίησαν ως γενετικό υλικό απογόνους που προέκυψαν από τη διασταύρωση της καλλιεργούμενης τομάτας με άγρια είδη. Στην τομάτα, πληθώρα μοριακών δεικτών διαφόρων τύπων έχουν επίσης αξιοποιηθεί για την εκτίμηση της γενετικής απόστασης σε ενδο- ή διαπληθυσμιακό επίπεδο, ενώ ως πλέον σημαντική θεωρείται η εφαρμογή τους σε σχήματα υποβοηθούμενης από δείκτες επιλογής επιθυμητών γενοτύπων (MAS, Marker Assisted Selection) (Osei et al., 2018). Η τελευταία πρόσφερε τη δυνατότητα εντοπισμού γενετικών τόπων που ελέγχουν ποσοτικούς χαρακτήρες ενδιαφέροντος (QTL, Quantitative Trait Loci) (Osei et al., 2018).

Η γενετική μηχανική, που κατατάσσεται στις μοριακές βελτιωτικές μεθόδους, προσφέρει τη δυνατότητα διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής της τομάτας, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην κατανόηση ποικίλων λειτουργιών και διεργασιών σε φυσιολογικό και βιοχημικό επίπεδο (Kalloo, 2012). Η τεχνολογία της γενετικής μηχανικής περιλαμβάνει μία σειρά από μεθόδους γενετικής τροποποίησης, που στοχεύουν στην αλλαγή της σύνθεσης του γενετικού υλικού ενός φυτού με την ενσωμάτωση γονιδίων που ελέγχουν γνωρίσματα ενδιαφέροντος, χωρίς τη φυλετική διαμεσολάβηση (Ξυνιάς, 2014).

Τα βασικά στάδια της γενετικής τροποποίησης είναι η επιλογή και απομόνωση του γονιδίου-στόχου και η ένθεσή του στο φυτικό γονιδίωμα. Η μεταφορά του γονιδίου-στόχου μπορεί να πραγματοποιηθεί κυρίως με τους εξής τρόπους: i) απευθείας μεταφορά με ηλεκτροδιήθηση, όπου η ενσωμάτωση γίνεται σε πρωτοπλάστες υπό την εφαρμογή υψηλής τάσης μικρής διάρκειας. Παρά την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, ωστόσο η χρήση της περιορίζεται λόγω της

αδυναμίας μερικών ειδών στην αναγέννηση φυτικών ιστών από πρωτοπλάστες ii) βιοβαλιστική μέθοδος μεταφοράς γονιδίων, η οποία βασίζεται στην επικάλυψη σωματιδίων βολφραμίου ή χρυσού με το μεταφερθέν DNA και την ενσωμάτωσή του στο φυτικό ιστό υπό συνθήκες κενού αέρος και iii) μικροέγχυση, η οποία αφορά σε έγχυση του γονιδίου στα κύτταρα ώστε ένας αριθμός εξ αυτών να προσλάβει αποτελεσματικά το DNA, iv) χρήση φορέων που χαρακτηρίζονται από την κατοχή μηχανισμών μεταφοράς του επιθυμητού γονιδίου στον οργανισμό-λήπτη (National Research Council (US) Committee on Identifying and Assessing Unintended Effects of Genetically Engineered Foods, 2004).

Στο πλαίσιο δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών, ως σημαντικότερος φορέας που τυγχάνει ευρείας εφαρμογής σε πληθώρα φυτικών ειδών θεωρείται το αγροβακτήριο και ειδικότερα το είδος *Agrobacterium tumefaciens*. Το αγροβακτήριο προσβάλλει τα φυτικά κύτταρα, προκαλώντας ανεξέλεγκτη διαίρεση με αποτέλεσμα τη δημιουργία χαρακτηριστικών όγκων (Tzifira and Citovsky, 2006). Ο παράγοντας που συμβάλλει στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων είναι το πλασμίδιο Ti, τμήμα του οποίου (T-DNA) ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των φυτικών κυττάρων, συμβάλλοντας στην ογκογένεση. Κατά τις εφαρμογές της γενετικής μηχανικής, η μέθοδος μεταφοράς έχει ως βάση το δυαδικό σύστημα στο οποίο αξιοποιούνται δύο πλασμίδια, το ένα αποτελεί τον δυαδικό φορέα και περιέχει μόνο τις αλληλουχίες του T-DNA που είναι κατάλληλες για την αφαίρεση και ενσωμάτωση σε συνδυασμό με τα επιθυμητά γονίδια. Το δεύτερο πλασμίδιο λειτουργεί βοηθητικά, καθώς αποτελείται από τους παράγοντες του Ti που είναι σημαντικοί για τη διαδικασία της μεταφοράς. Παράλληλα, ενσωματώνονται και ορισμένοι δείκτες επιλογής, με συνηθέστερους αυτούς όπου η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων βασίζεται στην ανθεκτικότητα σε κατάλληλα αντιβιοτικά. Σε τελικό στάδιο, τα επιλεγμένα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα υπόκεινται σε κλασικές διαδικασίες ιστοκαλλιέργειας προκειμένου να επιτευχθεί η αναγέννηση ολόκληρων φυτών (Watson et al., 2007).

1.9 Συμβολή της Γενετικής Μηχανικής στη βελτίωση της τομάτας

Η γενετική μηχανική έχει συντελέσει στην στοχευμένη και ταχεία δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με κύριο χαρακτηριστικό την εκδήλωση ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων που δρουν ως περιοριστικοί παράγοντες στην ανάπτυξη και αποδοτικότητα της καλλιέργειας. Στο πλαίσιο δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών τομάτας, το 1989 εφαρμόστηκε επιτυχώς η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης σε πρωτοπλάστες με στόχο την εισαγωγή του γονιδίου που κωδικοποιεί την ακετυλοτρανσεράση της χλωραμφενικόλης (CAT) (Tsukada et al., 1989). Επίσης, έχει αναφερθεί επιτυχής σταθερός μετασχηματισμός με την εφαρμογή της βιοβαλλιστικής μεθόδου σε καλλιέργειες κυττάρων των ειδών *L. esculentum* cv. VFNT Cherry και *L. pennellii*, με σκοπό την εισαγωγή του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β-γλυκουρονιδάση (GUS) και του γονιδίου *nptII*, που κωδικοποιεί την φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης και δρα ως παράγοντας επιλογής, με τη χρήση των πλασμιδίων pBI121 και pBI410 (van Eck et al., 1995). Επιτυχώς έχει επίσης εφαρμοστεί η μέθοδος της μικροέγχυσης, η οποία ωστόσο ήταν πιο αποδοτική όταν εφαρμόστηκε σε κύτταρα κάλου (Toyoda et al., 1988).

Ωστόσο, ο πλέον αποτελεσματικός και ευρέως χρησιμοποιούμενος τρόπος για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών τομάτας είναι ο μετασχηματισμός διαμέσου του *Agrobacterium tumefaciens*. Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου αφορά στο μετασχηματισμό και στη μετέπειτα αναγέννηση φυτών από τμήματα φύλλων, η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη του πρώτου αποδοτικού πρωτοκόλλου μετασχηματισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μετασχηματισμός μέσω του *Agrobacterium tumefaciens* επέτρεψε τη δημιουργία της πρώτης γενετικά τροποποιημένης ποικιλίας που διατέθηκε προς καλλιέργεια στις 21 Μαΐου το 1994, τη FLAVR SAVR™. Η παραγωγή της ποικιλίας βασίστηκε στην τεχνολογία εισαγωγής, του αντισημαίνοντος RNA του ενζύμου πολυγαλακτουρονάση (PG), το οποίο ρυθμίζει την ωρίμανση του καρπού (Kramer and Redenbaugh, 1994).

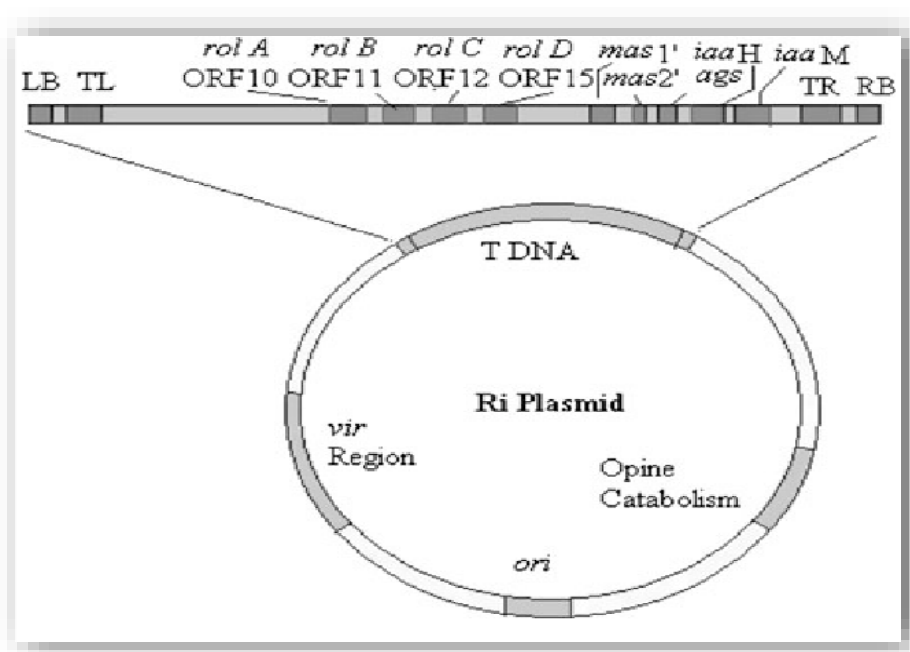
Σήμερα υπάρχει συνεχής εξέλιξη στην παραγωγή διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών σε καταπονήσεις. Το 2004 το γονίδιο που κωδικοποιεί την καμψιδιακή πρωτεΐνη (CP) του ιού TLCV εισήχθη στο *A. tumefaciens* και, έπειτα από συγκαλλιέργειά του, με έκφυτα της ποικιλίας Pusa Ruby κατέστη εφικτή η δημιουργία

διαγονιδιακών φυτών με μερική ή ολική ανθεκτικότητα στον ιό (Raj et al., 2004). Επίσης, ο μετασχηματισμός νεαρών βλαστών με το στέλεχος EHA-105 του *A. tumefaciens* επέτρεψε την παραγωγή φυτών που φέρουν το γονίδιο *DREB1A*, με εκκινητή το Lip9, και χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Shah et al., 2015). Ένας επιπλέον επιτυχής μετασχηματισμός, ήταν η τροποποίηση κοτυληδόνων με την ενσωμάτωση του γονιδίου *BcZAT12*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη C2H2 (δακτύλιος ψευδαργύρου) που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις. Η ενσωμάτωση του γονιδίου έγινε με τη χρήση του στελέχους GV3101 του *A. tumefaciens*, που φέρει το πλασμίδιο pBinar, και οδήγησε στην ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών με υψηλή ανθεκτικότητα σε συνθήκες ξηρασίας (T₂ γενιά) (Rai et al., 2013). Αξίζει να αναφερθεί ότι, πέραν της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων, η εφαρμογή των τεχνολογιών της γενετικής μηχανικής επέφερε σημαντική πρόοδο και στη βελτίωση της ποιότητας. Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί η μέσω του *Agrobacterium* ενσωμάτωση του γονιδίου που κωδικοποιεί την θαυματίνη, η οποία είναι γλυκαντική ουσία που περιέχεται στο φυτό *Thaumatococcus daniellii*, με αποτέλεσμα οι διαγονιδιακές σειρές να χαρακτηρίζονται από αυξημένη γλυκύτητα συγκριτικά με το μάρτυρα (Bartoszewski et al., 2008).

1.10 Το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* – Εφαρμογές στη βελτίωση της τομάτας

Το *Agrobacterium rhizogenes* (ή *Rhizobium rhizogenes*) ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και αποτελεί ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο εδάφους. Είναι υπεύθυνο για την ασθένεια των «τριχωτών ριζών», κυρίως στα δικότυλα είδη (Nartop, 2018). Η επίδρασή του οφείλεται στην ενσωμάτωση του τμήματος T-DNA, του πλασμιδίου Ri (επαγωγέας ριζών), στο φυτικό γονιδίωμα έπειτα από μόλυνση των τραυματισμένων ιστών (Muroanaka and Saito, 2010). Η περιοχή του T-DNA έχει μέγεθος 200 bp και όταν εισέρχεται στο φυτικό γονιδίωμα κωδικοποιεί ένζυμα που επάγουν την παραγωγή οπινών, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως πηγή ανάπτυξης από το *Agrobacterium* (Chandra, 2011). Ανάλογα με το είδος των οπινών που συντίθεται, τα στελέχη του *A. rhizogenes* διακρίνονται σε διαφορετικούς τύπους. Οι τύποι που αναφέρονται είναι τα στελέχη που βιοσυνθέτουν την ομάδα agropine, τα στελέχη τύπου cucumopine και mannopine. Μερικά από τα στελέχη τύπου agropine είναι τα

pRiA4, pRi1855, pRiHRI, pRi15834 και pRiLBA9402. Αντίστοιχα, το pRi8196 ανήκει στον τύπο mannopine, ενώ στον τύπο cucumopine περιλαμβάνεται το pRi2659 (Veena et al., 2007). Τα στελέχη τύπου agropine απαρτίζονται από δύο περιοχές τις TR (right T-DNA) και TL (left T-DNA), με τη δεύτερη περιοχή παρουσιάζει ομολογία με τα στελέχη του τύπου manopine και cucumopine. Η περιοχή TL είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των γονιδίων *rol*, ενώ η περιοχή TR ρυθμίζει την παραγωγή των αυξινών (γονίδια *iaaM*, *iaaH*) και των οπινών mannopine (*mas 1'*, *mas 2'*) και agropine (*ags*) (Vladimirov et al., 2015). Τα γονίδια *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*) επάγουν τη δημιουργία διαγονιδιακών ριζών και δευτερευόντων μεταβολιτών (Bulgakov, 2008) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας του πλασμιδίου Ri (Πηγή: Chandra, 2011).

Η είσοδος του *Agrobacterium rhizogenes* στο DNA των φυτών-ξενιστών οδηγεί στη δημιουργία των νεοπλαστικών «τριχωτών ριζών». Κύρια χαρακτηριστικά του φαινότυπου της προσβολής είναι οι έντονες ακανόνιστες πλαγιότροπες διακλαδώσεις, η υψηλή πυκνότητα των ριζών, η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων βιομάζας, η ταχύτατη ανάπτυξη και η παρουσία συστροφής στα φύλλα (Nartop, 2018).

Η ικανότητα επαγωγής της *in vitro* ανάπτυξης ριζών του *A. rhizogenes*, απουσία εξωγενών ρυθμιστών ανάπτυξης, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα αποτελεσματικού και σε σύντομο χρόνο μετασχηματισμού ενός εύρους φυτικών ειδών, το καθιστούν ιδανικό εργαλείο για έρευνες τόσο σε βασικό όσο και σε εφαρμοσμένο επίπεδο. Προς την κατεύθυνση αυτή, ο γενετικός μετασχηματισμός μέσω του *A. rhizogenes* έχει τύχει εφαρμογής σε μελέτες της βιολογίας των φυτών, της έκφρασης γονιδίων ενδιαφέροντος, της αλληλεπίδρασης φυτών με άλλους οργανισμούς αλλά και για περισσότερο πρακτικές εφαρμογές, όπως είναι η παραγωγή δευτερευόντων μεταβολιτών ή/και άλλων ουσιών ενδιαφέροντος (Rao and Ravinshankar , 2002).

Η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών μέσω του *A. rhizogenes* έχει αποτελέσει ερευνητικό στόχο σε περισσότερα από 100 φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένης της τομάτας. Οι αρχικές σχετικά με την αξιοποίηση του *A. rhizogenes* για το μετασχηματισμό φυτών τομάτας, αφορούσαν στον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων ανθεκτικότητας. Το 1987, κατασκευάστηκε ο φορέας pAMNeo10, που προσέδιδε ανθεκτικότητα στην καναμικίνη και εισήχθη μέσω του στελέχους A4T (pRiA4, pAMNeo10) σε βλαστούς των ειδών *L. esculentum* και *L. peruvianum*. Ως απόρροια της διαγονιδιακής τους φύσης, οι ρίζες εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην καναμικίνη, ενώ εντυπωσιακή ήταν η δεκαπλάσια αντίσταση που έδειξαν τα μετασχηματισμένα φυτά που αναγεννήθηκαν από τις ρίζες (Morgan et al., 1987). Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί η συμβολή των γονιδίων *rol* στην εκδήλωση επιθυμητών χαρακτηριστικών μετά τον μετασχηματισμό. Το γονίδιο *rolB* έπειτα από την ενσωμάτωσή του στο φυτικό γονιδίωμα, συνέβαλε στην αύξηση της συγκέντρωσης του λυκοπενίου, του ασκορβικού οξέος και των φαιολικών ενώσεων, ενώ παράλληλα ενίσχυσε την ανθεκτικότητα έναντι των παθογόνων *A. solani* και *F. oxysporum* (Arshad et al., 2014). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η προσπάθεια ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι μυκητολογικών προσβολών, μέσω της ένθεσης του γονιδίου *p35* του baculovirus, που καταστέλλει τη δράση της μυκοτοξίνης AAL, σε κοτυληδόνες (Lincoln et al., 2002.) Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις κρυσταλλικές πρωτεΐνες του *Bacillus thuringiensis* αξιοποιήθηκαν στην ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών με σκοπό την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι της προσβολής από τον νηματώδη *Meloidogyne incognita* (Li et al., 2007).

Σκοπός της μελέτης

Τα τελευταία χρόνια, ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός μελετών εστιάζει στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού, με το ενδιαφέρον να στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την αξιοποίηση του *A. rhizogenes* ως φορέα μεταφοράς γονιδίων ενδιαφέροντος. Με δεδομένο ότι το *A. rhizogenes* έχει αξιοποιηθεί επιτυχώς για την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών σε ένα εύρος φυτικών ειδών, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας για την αποτελεσματική και σε σύντομο χρόνο παραγωγή διαγονιδιακών ριζών. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των βακτηριακών στελεχών R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}, το οποίο εκφράζει το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Περαιτέρω, με στόχο τη διερεύνηση της δυνατότητας πρακτικής αξιοποίησης των διαγονιδιακών ριζών σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης και βιολογίας των ριζών, τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση και ακολούθησε αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους, συγκριτικά με μη-μετασχηματισμένα φυτά που εξυπηρέτησαν ως μάρτυρες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Στα πειράματα γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας, χρησιμοποιήθηκε η εμπορική ποικιλία-υβρίδιο GIGANTE F1. Αποτελεί μια σταθερή και παραγωγική ποικιλία που παράγει συμπαγή φυτά με ανθεκτικότητα στη βακτηριακή κηλίδωση. Οι καρποί της ποικιλίας GIGANTE προορίζονται για νωπή κατανάλωση αλλά και μεταποίηση, ενώ οι σπόροι είναι λεπτοί πεπλατυσμένοι και ωοειδείς, καφέ χρώματος.

2.2 Τα στελέχη του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*

Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}, το οποίο φέρει το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ_{P_{sph}} (Tampakaki and Panopoulos, 2000). Στο εν λόγω πλασμίδιο είναι ενσωματωμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}, που προέρχεται από το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, στην εκκρινόμενη μορφή της ώστε να κατευθύνεται η έκφραση της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά.

Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε 10 ml θρεπτικού μέσου LB που περιείχε το αντιβιοτικό ναλιδιξικό οξύ (nalidixic acid, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$), ενώ για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων του R1000-HrpZ_{P_{sph}} προστέθηκε επιπλέον το αντιβιοτικό καναμικίνη (kanamycin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων έγινε στους 28 °C, υπό ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα σε 90 rpm, για δύο ημέρες ή έως ότου η οπτική πυκνότητα ισούται με OD₆₀₀ = 0.6–1.0. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, στις 3000 rpm για 5 λεπτά, και έπειτα από απόρριψη του υπερκείμενου έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος με την προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου MS. Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml θρεπτικού μέσου MS και το αιώρημα βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο για το γενετικό μετασχηματισμό.



Εικόνα 2.1: Καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών σε μηχανικό αναδευτήρα.

2.3 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων - Δημιουργία εκφύτων

Η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που παρασκευάστηκαν για το γενετικό μετασχηματισμό των σποροφύτων τομάτας περιγράφεται στον Πίνακα 2.1:

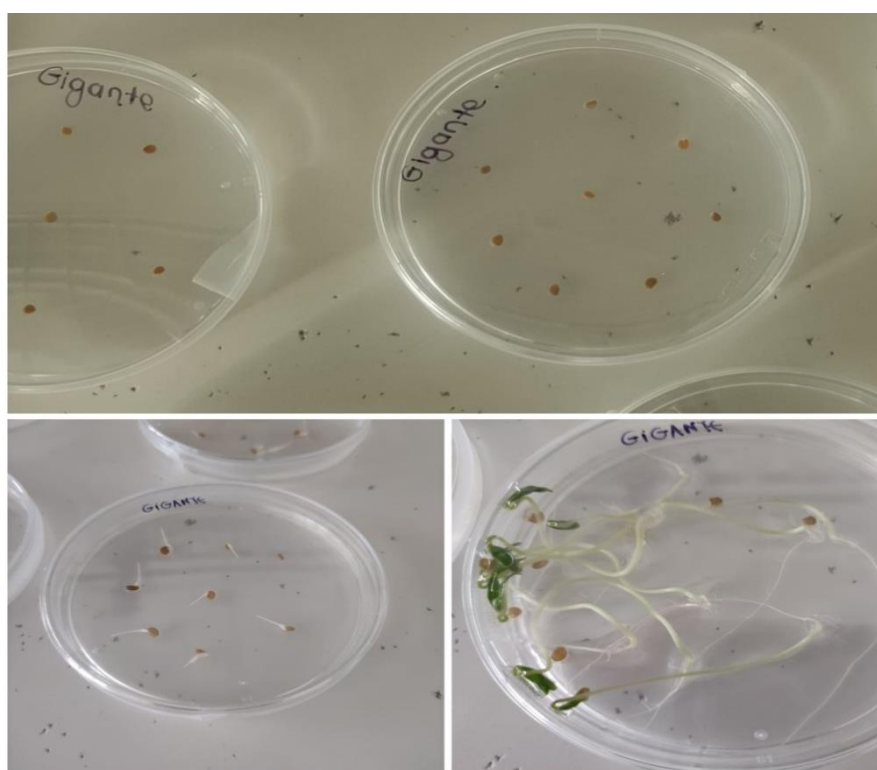
Πίνακας 2.1 Σύνθεση υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό σποροφύτων τομάτας, μέσω του *A. rhizogenes*.

Θρεπτικό υπόστρωμα	Σύσταση
A: Υπόστρωμα βλάστησης και ανάπτυξης	MS-vitamin: 2.2 g/L Sucrose (1 %): 10 g/L Agar: 5 g/L
B: Υπόστρωμα συγκαλλιέργειας	MS/MES/vitamins: 2.45 g/L Sucrose (1 %): 10 g/L Agar: 9 g/L
Γ-Δ: Υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/MES/vitamins: 2.45 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 9 g/L

* Σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα το pH είχε ρυθμιστεί στο 5.6 ± 0.1 .

Για την ανάπτυξη των σποροφύτων, που χρησιμοποιήθηκαν ως εκφύτα για το μετασχηματισμό, έγινε διαλογή 150 σπόρων και τοποθέτησή τους σε σωλήνες Falcon. Ακολούθησε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων, με τοποθέτησή τους σε διάλυμα χλωρίνης 10 %, που περιείχε Tween-20, υπό συνθήκες ανάδευσης για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, έγιναν τρεις πλύσεις για 5 λεπτά σε αποστειρωμένο dH₂O, υπό ανάδευση.

Οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα A. Ακολούθως, τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι για 7 ημέρες.



Εικόνα 2.2 Ανάπτυξη σποροφύτων τομάτας για τη δημιουργία των εκφύτων για το γενετικό μετασχηματισμό μέσω του *A. rhizogenes*.

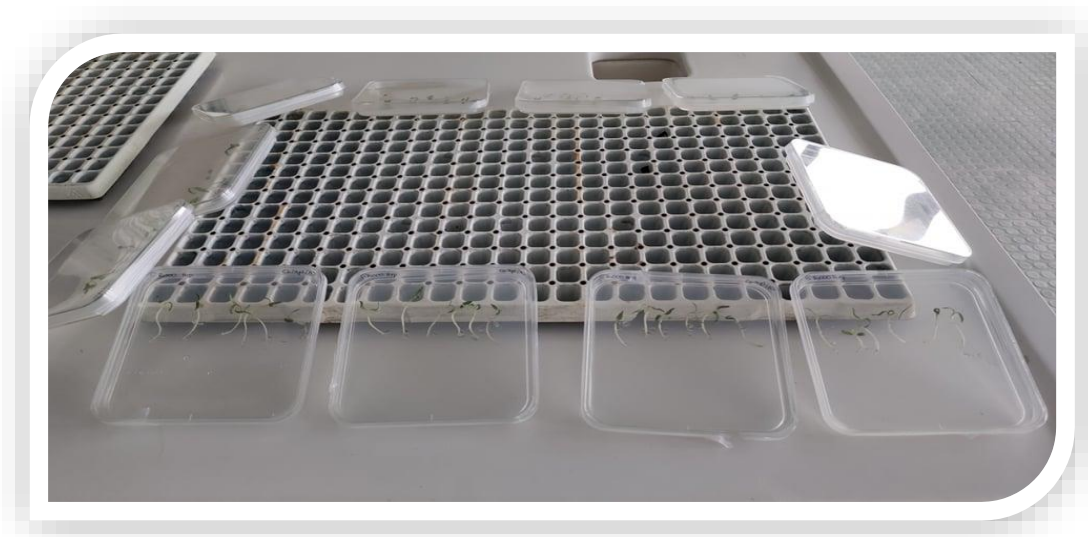
2.4 Διαδικασία του μετασχηματισμού μέσω του *A. rhizogenes*

Από τα σπορόφυτα που προέκυψαν επιλέχθηκαν τα πιο υγιή και εύρωστα για το μετασχηματισμό. Αρχικά, έγινε κοπή των σποροφύτων, με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, στην περιοχή του υποκοτυλίου, που θεωρείται ως ζώνη του μετασχηματισμού. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η εμφύτευση των εκφύτων, στην

περιοχή του υποκοτυλίου, στην καλλιέργεια των βακτηρίων (R1000, R1000-HrpZ_{P_{sph}}) για 10 s. Ακολούθησε τοποθέτηση των εμβολιασμένων σποροφύτων σε τετράγωνα τριβλία Petri (6-7 σπορόφυτα/τριβλίο) που περιείχαν το υπόστρωμα συγκαλλιέργειας (B). Ακολούθησε σφράγισμα των τριβλίων με parafilm και τοποθέτηση σε θερμοκρασία δωματίου και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, σε επικλινή θέση, για διάστημα 3 ημερών (Εικόνα 2.3). Στο πείραμα, συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες σπορόφυτα που δεν εμβολιάστηκαν με βακτηριακά κύτταρα, ωστόσο υπέστησαν τις ίδιες μεταχειρίσεις με τα εμβολιασμένα σπορόφυτα. Τα εν λόγω σπορόφυτα αναφέρονται ως μάρτυρες (C) ή αγρίου τύπου.

Έπειτα από επώαση 3 ημερών, έγινε μεταφορά των εμβολιασμένων σποροφύτων (R1000, R1000-HrpZ_{P_{sph}}) σε τριβλία που περιείχαν το υπόστρωμα επαγωγής ριζών (Γ), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με σεφοταξίμη (cefotaxime, 250 mg/l) προκειμένου να ανασταλεί η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων. Τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος που φέρει το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ_{P_{sph}} τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα που επιπλέον περιείχε υγρομυκίνη (hygromycin, 15 mg/l), ώστε να καταστεί εφικτή η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, σε επικλινή θέση, για διάστημα 15 ημερών. Μετά το διάστημα αυτό, πραγματοποιήθηκε εκ νέου μεταφορά των σποροφύτων σε φρέσκο θρεπτικό επαγωγής ριζών (Δ), το οποίο περιείχε σεφοταξίμη ή σεφοταξίμη και υγρομυκίνη, στις συγκεντρώσεις που προαναφέρθηκαν. Ακολούθως, τα τριβλία σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν υπό κλίση σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, για διάστημα 15 ημερών.

Κατά το διάστημα επώασης των σποροφύτων στο υπόστρωμα επαγωγής ριζών, λαμβάνονταν παρατηρήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα (3 ημέρες) που αφορούσαν σε φαινοτυπική αξιολόγηση των μετασχηματισμένων σποροφύτων και προσδιορισμό της συχνότητας μετασχηματισμού. Ειδικότερα, έγινε καταγραφή του ρυθμού έκπτυξης νέων ριζών και ανάπτυξή τους, του αριθμού νέων ριζών, του μήκους των ριζών και της ύπαρξης πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων. Το πείραμα περιελάμβανε συνολικά τρεις μεταχειρίσεις (C, R1000, R1000-HrpZ_{P_{sph}}) που εξετάστηκαν σε 7 βιολογικές επαναλήψεις (τριβλία), οι οποίες αφορούσαν σε 6 ατομικά σπορόφυτα.



Εικόνα 2.3 Τοποθέτηση μετασχηματισμένων σπορόφυτων σε τριβλία που περιέχουν υπόστρωμα συγκαλλιέργειας.

2.5 Έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού μέσω PCR

2.5.1 Απομόνωση DNA

Προκειμένου να γίνει έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού, μέσω PCR, αρχικά έγινε απομόνωση DNA από τις ρίζες που αναπτύχθηκαν στα σπορόφυτα που είχαν εμβολιαστεί με τα βακτήρια (R1000, R1000-HrpZ_{P_{sph}}) καθώς και από τα σπορόφυτα αγρίου τύπου (C). Για τη δειγματοληψία έγινε αποκοπή των ριζών, στη ζώνη του υποκοτυλίου, με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και τοποθέτηση των δειγμάτων ριζών σε αλουμινόχαρτο, το οποίο σημάνθηκε καταλλήλως για την εκάστοτε μεταχείριση. Ακολούθησε τοποθέτηση των δειγμάτων σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης (-80 °C), προκειμένου να αποφευχθούν αλλοιώσεις έως ότου πραγματοποιηθεί η εξαγωγή DNA.

Η εξαγωγή DNA από τα δείγματα ριζών εκτελέστηκε με τη χρήση του Kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, έγινε λειοτριβήση του φυτικού ιστού σε γουδιά πορσελάνης, παρουσία υγρού αζώτου. Ακολούθησε τοποθέτηση 100 mg ομογενοποιημένου φυτικού ιστού σε Eppendorf και προσθήκη 400 μl διαλύματος PL1, ώστε να επιτευχθεί λύση

των κυττάρων. Μετά από ανακίνηση, έγινε προσθήκη 10 µl RNase A ώστε να καταλυθεί η διαδικασία αποδόμησης του RNA στα δείγματα γονιδιωµατικού DNA. Έπειτα από οµογενοποίηση, τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 65°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό τοποθετήθηκε σε νέο eppendorf που περιείχε τη στήλη του NucleoSpin® Plant II (silica membrane) και έγινε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 2 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 450 µl buffer PC και τοποθέτηση των δειγµάτων στη στήλη NucleoSpin® Plant II ώστε να επιτευχθεί η συγκράτηση του DNA στη στήλη. Μετά από φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό, έγινε προσθήκη 400 µl διαλύµατος έκπλυσης PW1 και εκ νέου φυγοκέντρηση, σύµφωνα µε τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Μετά την απόρριψη του υποκείμενου, προστέθηκαν 700 µl διαλύµατος έκπλυσης PW2 και έγινε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Έπειτα από την απομάκρυνση του υποκείμενου, η διαδικασία έκπλυσης επανλήφθηκε µε την προσθήκη 200 µl διαλύµατος PW2 και εκ νέου φυγοκέντρηση, στις 11000 rpm για 1 λεπτό, και απόρριψη του υποκείμενου.

Το τελευταίο στάδιο περιλάμβανε, την τοποθέτηση της στήλης σε νέο eppendorf, την προσθήκη 50 µl διαλύµατος έκπλυσης PE και την επώαση των δειγµάτων στους 65 °C, σε υδατόλουτρο, για 5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό και έπειτα από τοποθέτηση της στήλης σε νέο eppendorf, έγινε εκ νέου έκπλυση του DNA µε την προσθήκη 30 µl ddH₂O. Ακολούθησε επώαση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Τα δείγµατα που λήφθηκαν τοποθετήθηκαν στους -20 °C.

Ακολούθησε ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισµός του DNA µε τη χρήση φασματοφωτόµετρου υπεριώδους/ορατού µε απορρόφηση στα 260 nm, όπου η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/µl.

2.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυµεράσης - PCR

Για τον έλεγχο της επιτυχίας του µετασχηµατισµού πραγµατοποιήθηκε αντίδραση PCR προκειµένου να επιβεβαιωθεί η ένθεση του διαγονιδίου *hrpZ_{PspH}* στις ρίζες των σποροφύτων. Η PCR έγινε µε τη χρήση εξειδικευµένων εκκινητών για τα γονίδια *rolb2* και *hrpZ_{PspH}* (Πίνακας 2.2).

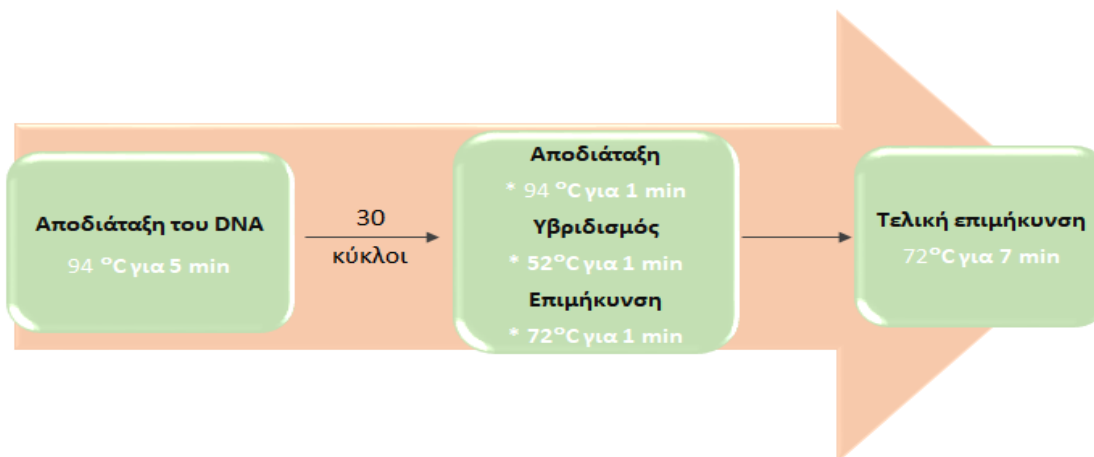
Πίνακας 2.2: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της διαγονιδιακής φύσης των εμβολιασμένων σποροφύτων, μέσω PCR για την ενίσχυση των διαγονιδίων *rolb2* και *hrpZ_{P_{sph}}*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
<i>hrpZ_{P_{sph}}</i> -F	CGAAAGCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG
<i>hrpZ_{P_{sph}}</i> -F	CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG
<i>rolb2</i> -F	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT
<i>rolb2</i> -R	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον Πίνακα 2.3, ενώ το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR περιγράφεται στην Εικόνα 2.4.

Πίνακας 2.3: Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για τον έλεγχο του μετασχηματισμού.

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητα (μl)
DNA	20 ng/μl	1
Ρυθμιστικό διάλυμα (5x)	1x	5
MgCl ₂ (25 mM)	1.25 mM	1.25
Εκκινητές (10 mM)	0.25 μM	0.625
dNTPs (10 mM)	200 μM	0.5
Taq polymerase (5u/μl)	1.25 u	0.25
H ₂ O		15.75
Τελικός όγκος		25



Εικόνα 2.4: Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για τον έλεγχο του μετασχηματισμού.

2.5.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων

Τα προϊόντα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Τα δείγματα προστέθηκαν στα βοθρία του πηκτώματος αγαρόζης 1.5 % με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) και ηλεκτροφορήθηκαν για 2 ώρες στα 60 V. Στο διάλυμα της αγαρόζης έγινε προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου προκειμένου να καταστεί εφικτός ο φθορισμός των βάσεων υπό την επίδραση της ακτινοβολίας UV, προσφέροντας τη δυνατότητα οπτικοποίησης των PCR προϊόντων .

2.6 Αξιοποίηση των σύνθετων σποροφύτων σε πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων

Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα πρακτικής αξιοποίησης των διαγονιδιακών ριζών, τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση και ακολούθησε φαινοτυπική αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους, συγκριτικά με μη-μετασχηματισμένα φυτά που εξυπηρέτησαν ως μάρτυρες. Για το σκοπό αυτό, τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε γυάλινους σωλήνες που περιείχαν υγρό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS (1,1 g MS σε dH₂O) και 150 mM D-μαννιτόλης σε τελικό όγκο 30 ml. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες φυτά που τοποθετήθηκαν υγρό σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS, απουσία του παράγοντα καταπόνησης.

Το πείραμα περιελάμβανε συνολικά τρεις μεταχειρίσεις σποροφύτων (C, R1000, R1000-HrpZ_{Psph}) που εξετάστηκαν σε 5 βιολογικές επαναλήψεις (ατομικά φυτά).

Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας λήφθηκαν παρατηρήσεις που αφορούσαν στο φαινότυπο των φυτών και την ανάπτυξη συμπτωμάτων της καταπόνησης.

2.7 Στατιστική ανάλυση

Το πειραματικό σχέδιο ήταν των πλήρων τυχαιοποιημένων ομάδων, 7 επαναλήψεις (τριβλία), των 6 ατομικών σποροφύτων για κάθε μία από τις 3 επεμβάσεις (C, R1000, R1000-HrpZ_{Psph}). Η συχνότητα μετασχηματισμού εκφράστηκε ως ποσοστό των εκφύτων που εμφάνισαν ριζικά τριχίδια, ενώ δεδομένης της κανονικότητας των δεδομένων (W-test, Prob<0.115), εφαρμόστηκε ANOVA (ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου JMP (version 13.0).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έχοντας ως σκοπό τη δημιουργία σύνθετων σπορόφυτων τομάτας, που φέρουν διαγονιδιακό ριζικό σύστημα και υπέργειο μέρος αγρίου τύπου, νεαρά φυτάρια της ποικιλίας Gigante εμβολιάστηκαν με τα στελέχη του *A. rhizogenes* R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}. Το τελευταίο, φέρει το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ_{P_{sph}}, το οποίο εκφράζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη. Ο γενετικός μετασχηματισμός επετεύχθη με εμβολιασμό των σποροφύτων στην περιοχή του υποκοτυλίου (ζώνη μετασχηματισμού).

Σύντομα μετά τον εμβολιασμό, παρατηρήθηκε η εμφάνιση πλευρικών ριζών στην περιοχή του υποκοτυλίου ως απόκριση στην αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος. Στο πλαίσιο αξιολόγησης του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, προσδιορίστηκε η συχνότητα του μετασχηματισμού και ο χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών καθώς και ο φαινότυπος των μετασχηματισμένων φυτών αναφορικά με τον αριθμό ριζών που εκπτύχθηκαν ανά εμβολιασμένο έκφυτο, το μήκος των ριζών και την εμφάνιση πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων.

3.1 Συχνότητα μετασχηματισμού και χρόνος εμφάνισης μετασχηματισμένων ριζών

Αναφορικά με τη συχνότητα μετασχηματισμού έπειτα από εμβολιασμό με τα βακτήρια R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}} παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την ικανότητα επαγωγής διαγονιδιακών ριζών. Ειδικότερα, σημαντικά αυξημένη συχνότητα μετασχηματισμού σημειώθηκε έπειτα από εμβολιασμό με το στέλεχος R1000 (73.8 %), ενώ αντίθετα ο εμβολιασμός με το βακτήριο R1000-HrpZ_{P_{sph}} οδήγησε σε σημαντικά μειωμένη συχνότητα (59.5 %) (Πίνακας 3.1). Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι τα R1000-HrpZ_{P_{sph}}-εμβολιασμένα σπορόφυτα αναπτύχθηκαν παρουσία υγρομυκίνης, γεγονός που επηρεάζει σημαντικό το δυναμικό ανάπτυξή τους και επαγωγής διαγονιδιακών ριζών.

Πίνακας 3.1: Η επίδραση του γενετικού μετασχηματισμού με τα βακτήρια R1000 και R1000-HrpZ_{PspH} του *A. rhizogenes* αναφορικά με το χρόνο εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και τη συχνότητα μετασχηματισμού.

Στελέχη <i>A. rhizogenes</i>	Αριθμός εμβολιασμένων έκφυτων	Συχνότητα Μετασχηματισμού (%)*	Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών (dpt)		
			1 ^{ης} τάξης	2 ^{ης} τάξης	3 ^{ης} τάξης
C	36	-	7 ± 1	10 ± 1	-
R1000	42	73.8 a	6 ± 1	10 ± 1	13 ± 1
R1000-HrpZ_{PspH}	42	59.5 b	7 ± 1	11 ± 1	15 ± 1

*Ποσοστό μετασχηματισμού (%) = αριθμός έκφυτων φακής που εμφάνισαν τριχωτές ρίζες / συνολικός αριθμός έκφυτων φακής × 100.

Προκειμένου να αξιολογηθεί συγκριτικά το ριζικό σύστημα των τριών κατηγοριών σποροφύτων (C, R1000, R1000-HrpZ_{PspH}), έγινε καταγραφή αναφορικά με το χρόνο εμφάνισης ριζικών τριχιδίων ως αποτέλεσμα του μετασχηματισμού. Η εμφάνιση των πρώτων διαγονιδιακών ριζών στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος R1000 παρατηρήθηκε σε διάστημα 6 ± 1 ημερών μετά τον εμβολιασμό. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000-HrpZ_{PspH} και αναπτύχθηκαν παρουσία υγραμκίνης εμφάνισαν τις πρώτες ρίζες σε διάστημα 7 ± 1 ημερών μετά τον εμβολιασμό, διάστημα που συμπίπτει με την εμφάνιση των πρώτων ριζών στα μη-εμβολιασμένα σπορόφυτα (αγρίου τύπου) (Πίνακας 3.1).

3.2 Ανάπτυξη πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των σποροφύτων, παρατηρήθηκε η εμφάνιση πλευρικών διακλαδώσεων. Κατά το διάστημα των 15 ημερών μετά το μετασχηματισμό σημειώθηκε έντονη ανάπτυξη πλευρικών διακλαδώσεων στα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000, καθώς το 64,5 % εμφάνισε 1 έως 15 διακλαδώσεις. Αντίθετα, κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, ένας περιορισμένος αριθμός σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000-HrpZ_{PspH} εμφάνισε μία μόνο πλευρική διακλάδωση (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Συγκριτική απεικόνιση της ανάπτυξης και δημιουργίας πλευρικών διακλαδώσεων στους μάρτυρες (C, αγρίου τύπου) και στα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000, R1000-HrpZ_{P_{sph}}, 15 ημέρες μετά το γενετικό μετασχηματισμό.

Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι, παρά τον αργό ρυθμό ανάπτυξης πλευρικών διακλαδώσεων στα R1000-HrpZ_{P_{sph}}-σπορόφυτα, στις 30 ημέρες μετά το μετασχηματισμό τα R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}-φυτά εμφάνιζαν ανάλογα πολυάριθμες πλευρικές διακλαδώσεις (Εικόνα 3.2). Αναφορικά με τους μάρτυρες, χαρακτηρίζονταν από αγρίου τύπου ριζικό σύστημα μεγάλου μήκους, το οποίο ωστόσο εμφάνιζε μειωμένο αριθμό πλευρικών διακλαδώσεων.



Εικόνα 3.2: Συγκριτική απεικόνιση της ανάπτυξης και δημιουργίας πλευρικών διακλαδώσεων στους μάρτυρες (C, αγρίου τύπου) και στα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000, R1000-HrpZ_{P_{sph}}, 30 ημέρες μετά το γενετικό μετασχηματισμό.

3.3 Φαινοτυπική αξιολόγηση των διαγονιδιακών ριζών

Αναφορικά με το φαινότυπο των ριζών, οι διαφορετικές κατηγορίες φυτών (C, R1000, R1000-HrpZ_{P_{sph}}) διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους τόσο ως προς τον αριθμό των ριζών όσο και ως προς το μήκος τους (Πίνακας 3.2). Οι διαφορές ήταν ήδη έκδηλες από την 9^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό και μεγιστοποιήθηκαν με την πάροδο του χρόνου. Ως προς τον αριθμό των ριζών ανά σπορόφυτο, εξαρχής ήταν εμφανής η υπεροχή των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000, ενώ τα σπορόφυτα αγρίου τύπου και αυτά που εμβολιάστηκαν με το R1000-HrpZ_{P_{sph}} εμφάνισαν σημαντικό μειωμένο και παρόμοιο αριθμό ριζών (Πίνακας 3.2). Με την πάροδο του χρόνου, δε διαφοροποιήθηκε η κατάταξη των φυτών ως προς τον αριθμό των ριζών που αναπτύχθηκαν ενώ, όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 3.2, τα εμβολιασμένα σπορόφυτα χαρακτηρίζονταν από την παρουσία ακανόνιστων

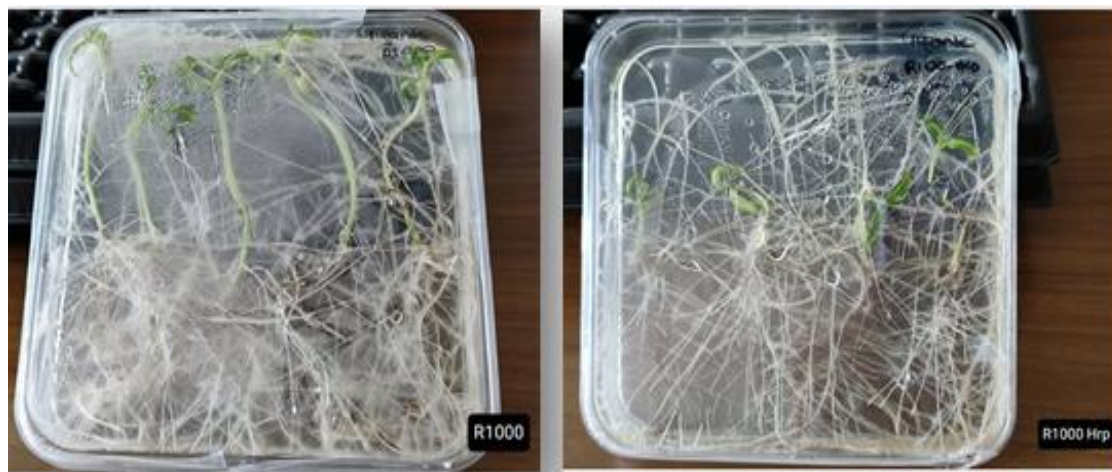
πολλαπλών διακλαδώσεων με μερικώς πλαγιότροπη ανάπτυξη και μικρή απώλεια του γεωτροπισμού (Εικόνα 3.3).

Πίνακας 3.2: Η επίδραση του γενετικού μετασχηματισμού με τα βακτήρια R1000 και R1000-HrpZ_{PspH} του *A. rhizogenes* αναφορικά με τον αριθμό ριζών ανά εμβολιασμένο έκφυτο και το μήκος των ριζών.

Στελέχη <i>A. rhizogenes</i>	Αριθμός ριζών ανά εμβολιασμένο έκφυτο	Μήκος ριζών (cm)
9 ^η ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό		
C	3.09 b	1.30 a
R1000	5.22 a	0.74 b
R1000-HrpZ_{PspH}	1.97 b	0.49 b
12 ^η ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό		
C	3.43 b	2.08 a
R1000	7.65 a	1.46 b
R1000-HrpZ_{PspH}	2.63 b	0.46 c
15 ^η ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό		
C	3.95 b	3.17 a
R1000	8.95 a	2.52 a
R1000-HrpZ_{PspH}	3.53 b	0.85 b

Επίσης, σημαντικές ήταν οι διαφορές των σποροφύτων και ως προς το μήκος των εκπτυχθέντων ριζών. Στο επίπεδο αυτό, οι μάρτυρες (αγρίου τύπου) εμφάνισαν το μεγαλύτερο μήκος ριζών καθόλη τη διάρκεια λήψης παρατηρήσεων. Κατά την 9^η ημέρα, τα εμβολιασμένα σπορόφυτα εμφάνισαν παρόμοιο μήκος ριζών, ενώ κατά την 12^η ημέρα η κατάταξη των σποροφύτων σε φθίνουσα σειρά ήταν ως εξής: C, R1000 και R1000-HrpZ_{PspH}. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου (15^η ημέρα), οι μάρτυρες και τα R1000-σπορόφυτα εμφάνισαν παρόμοιο μήκος ριζών, το οποίο διέφερε από το σημαντικά μειωμένο μήκος των R1000-HrpZ_{PspH}-σποροφύτων (Πίνακας 3.2, Εικόνα 3.3).

Όπως προαναφέρθηκε, το μειωμένο μήκος ριζών των R1000-HrpZ_{P_{sph}}-σπορόφυτων πιθανότατα αποδίδεται στο γεγονός ότι αναπτύχθηκαν παρουσία υγρομυκίνης, η οποία επηρεάζει σημαντικά το δυναμικό ανάπτυξης των ριζών.

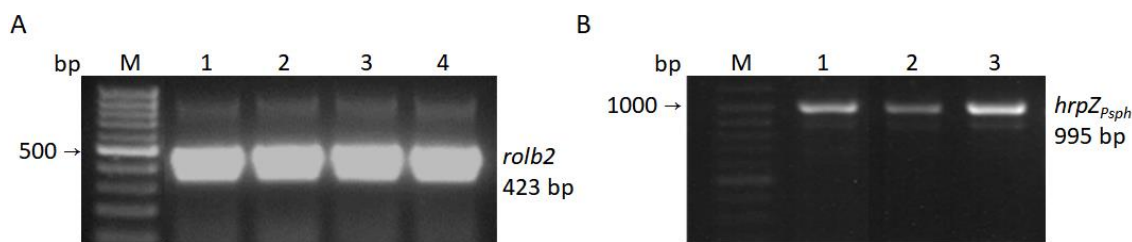


Εικόνα 3.3: Συγκριτική απεικόνιση της ανάπτυξης και δημιουργίας πλευρικών διακλαδώσεων στα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}, 30 ημέρες μετά το γενετικό μετασχηματισμό.

3.4 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της επιτυχίας του μετασχηματισμού, ελέγχθηκε περαιτέρω η ένθεση του διαγονιδίου στις ρίζες των εμβολιασμένων σποροφύτων τομάτας. Για το σκοπό αυτό, έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA σε δείγματα ριζών και ακολούθησε PCR για την ενίσχυση των διαγονιδίων *rolB2* και *hrpZ_{P_{sph}}*, με χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

Η παρουσία του γονιδίου *rolB2* (423 bp) επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα ριζών που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}. Επίσης, η παρουσία του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp) επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα ριζών που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000-HrpZ_{P_{sph}}. Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τη διαγονιδιακή φύση των ριζικών τριχιδίων (Εικόνα 3.4).

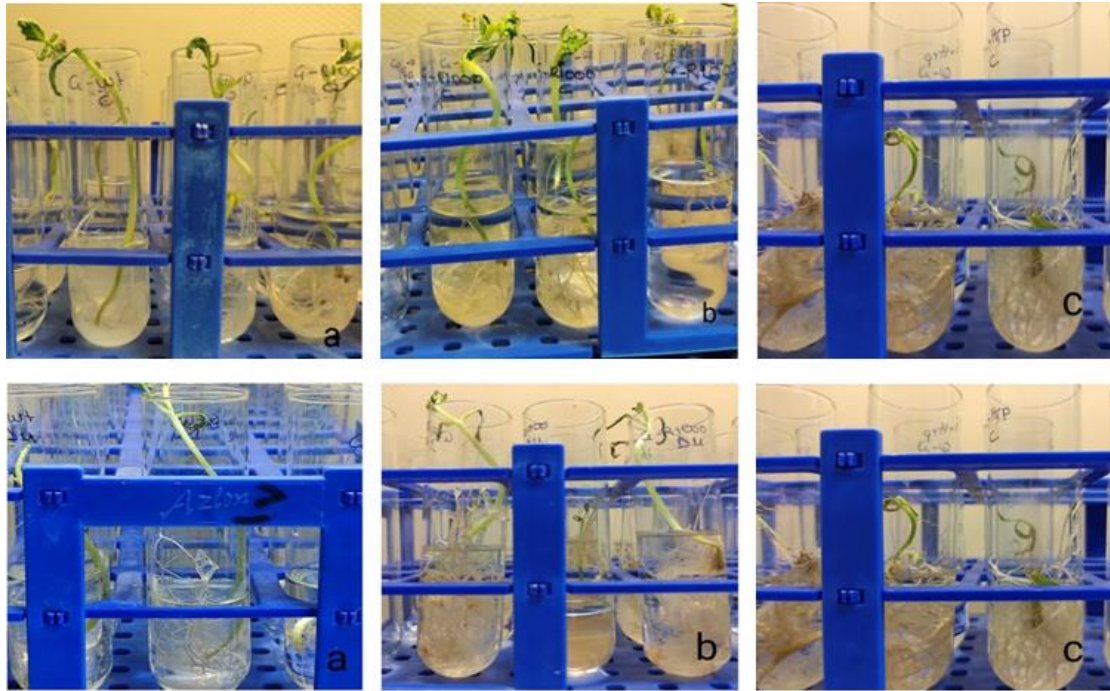


Εικόνα 3.4 Προϊόντα της PCR για τον έλεγχο της ένθεσης των γονιδίων *rolb2* και *hrpZ_{P_{sph}}* προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διαγονιδιακή φύση των ριζών που σχηματίστηκαν στα εμβολιασμένα σπορόφυτα τομάτας με τα βακτήρια R1000 και R1000-*HrpZ_{P_{sph}}*. **A.** 1, 2: μετασχηματισμένες ρίζες με το βακτήριο R1000, που φέρουν το γονίδιο *rolb2* (423 bp). 3, 4: μετασχηματισμένες ρίζες με το βακτήριο R1000-*HrpZ_{P_{sph}}*, που φέρουν το γονίδιο *rolb2* (423 bp). **B.** 1, 2, 3: μετασχηματισμένες ρίζες με το βακτήριο R1000-*HrpZ_{P_{sph}}*, που φέρουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp). DNA Ladder (FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH).

3.5 Φαινοτυπική αξιολόγηση των διαγονιδιακών ριζών υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης

Η αξιολόγηση της απόκρισης των διαφορετικών κατηγοριών σποροφύτων (C, R1000 και R1000-*HrpZ_{P_{sph}}*) στην υδατική καταπόνηση βασίστηκε σε μακροσκοπικές παρατηρήσεις σχετικά με την ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης. Η μελέτη της συμπτωματολογίας των φυτών έγινε για διάστημα 15 ημερών, μετά την τοποθέτηση των φυτών σε θρεπτικό μέσο που περιείχε D-μαννιτόλη. Το σύνολο των φυτών εμφάνισε συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων και μααρασμού καθώς και σποραδικά μεταχρωματισμό των ριζών (καφέτιασμα).

Παρά το γεγονός ότι, τα μετασχηματισμένα και τα αγρίου τύπου σπορόφυτα δε διέφεραν ως προς τη συμπτωματολογία, παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ένταση των συμπτωμάτων καταπόνησης. Έτσι, τα R1000-σπορόφυτα καθώς και οι μάρτυρες εμφάνισαν όμοια συμπτωματολογία, τα R1000-*HrpZ_{P_{sph}}*-σπορόφυτα χαρακτηρίζονταν από ηπιότερη συμπτωματολογία, η οποία αφορούσε σε περιορισμένη χλώρωση και ήπιο μααρασμό.



Εικόνα 3.5: Υποβολή των μετασχηματισμένων και των αγρίου τύπου σποροφύτων σε υδατική καταπόνηση και φαινοτυπική αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Πάνω: (a) Σπορόφυτα αγρίου τύπου (wt), απουσία καταπόνησης (b) Σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000, απουσία καταπόνησης, (c) Σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000-HrpZ_{P_{sph}}, απουσία καταπόνησης. Κάτω: (a) Σπορόφυτα αγρίου τύπου (wt), υπό συνθήκες καταπόνησης D-μαννιτόλης (150 mM), (b) Σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000, υπό συνθήκες καταπόνησης D-μαννιτόλης (150 mM), (c) Σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000-HrpZ_{P_{sph}}, υπό συνθήκες καταπόνησης D-μαννιτόλης (150 mM).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο γενετικός μετασχηματισμός των φυτών αδιαμφισβήτητα αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στις έρευνες που στοχεύουν στη μελέτη της βιολογίας των φυτών και της επίδρασης της έκφρασης γονιδίων ενδιαφέροντος αλλά και στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών ή άλλων βιοδραστικών ουσιών. Με δεδομένο το εύρος εφαρμογών της γενετικής μηχανικής τόσο στη βελτίωση των φυτών όσο και στη βασική έρευνα, η δημιουργία πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού για ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών έχει προσεγγιστεί σε περισσότερα από 120 φυτικά είδη (Birch., 1997).

Μεταξύ των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί στο πλαίσιο ανάπτυξης διαγονιδιακών φυτών, μία από τις πλέον σημαντικές και αποτελεσματικές προσεγγίσεις σταθερού μετασχηματισμού αφορά στη χρήση του *Agrobacterium* spp. ως φορέα για τη μεταφορά γονιδίων ενδιαφέροντος στο φυτικό γονιδίωμα. Η χρήση του αγροβακτηρίου για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών, έχει μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, έχοντας ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη πρωτοκόλλων σταθερού μετασχηματισμού τόσο καλλιεργούμενων ειδών όσο και φυτών-μοντέλων (Krenek et al., 2015).

Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αναπτυχθεί για τη χρήση του *A. rhizogenes* ως μέσου μετασχηματισμού ποικίλων φυτικών ειδών, ο οποίος επιτυγχάνεται λόγω της κατοχής των γονιδίων *rol* που επηρεάζουν τη μορφολογική ανάπτυξη των φυτών, επάγοντας την έκπτυξη των χαρακτηριστικών ριζικών τριχιδίων. Το *A. rhizogenes* έχει αποδειχθεί ότι, παρέχει τη δυνατότητα ταχύτατης ενσωμάτωσης γονιδίων για την παραγωγή διαγονιδιακών ιστών και την βλαστική αναγέννηση (Christey, 2020). Η πρώτη αναφορά σχετικά με την αξιοποίηση του βακτηρίου *A. rhizogenes*, προήλθε από τον Ackermann C. και χρονολογείται το 1973, αφορούσε στο μετασχηματισμό φυτών καπνού (*Nicotiana tabacum*) με στόχο την αναγέννησή τους από κάλλους που δημιουργήθηκαν, έπειτα από τη μόλυνση με το φορέα (Terfer, 1990). Η προσπάθεια αυτή αποτέλεσε την απαρχή για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων και σε άλλα είδη της οικογένειας *Solanaceae* και ειδικότερα της τομάτας, η οποία μεταξύ άλλων τυγχάνει ευρείας αξιοποίησης ως φυτό-μοντέλο. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι εφαρμογές των πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού, μέσω του *Agrobacterium*

rhizogenes, ποικίλουν και εκτείνονται από έρευνες που στοχεύουν στην απόκτηση ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων, όπως το *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, καθώς και αβιοτικών καταπονήσεων, όπως αυτή της υψηλής αλατότητας, αλλά τη μελέτη των συμβιωτικών σχέσεων με μυκκόριζες (Talano et al., 2006; Bettini et al., 2015; Ho-Plagaro et al., 2018).

Με βάση την υπάρχουσα διαθεσιμότητα αλλά και συνεχή ανάπτυξη νέων πρωτοκόλλων μετασχηματισμού στην τομάτα, στόχος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, μέσω του *A. rhizogenes*, για τη δημιουργία σύνθετων σποροφύτων, αποτελούμενων από διαγονιδιακό ριζικό σύστημα και υπέργειο μέρος αγρίου τύπου. Η προσέγγιση αυτή μπορεί αξιοποιηθεί σε πλήθος εφαρμογών που σχετίζονται με τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και βιολογίας των μετασχηματισμένων ριζών. Στο πλαίσιο βελτιστοποίησης, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους Pavli and Skaracis (2010) με τροποποιήσεις που αφορούσαν κυρίως στην ηλικία των εκφύτων και τη μέθοδο εμβολιασμού με το βακτήριο. Για το μετασχηματισμό, χρησιμοποιήθηκαν τα του *A. rhizogenes* R1000 και R1000-HrpZ_{P_{sph}}. Το τελευταίο, φέρει το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ_{P_{sph}}, το οποίο εκφράζει το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό υδρομυκίνη. Ο γενετικός μετασχηματισμός επετεύχθη με εμβολιασμό των σποροφύτων στην περιοχή του υποκοτυλίου και ακολούθησε η αξιολόγηση των μετασχηματισμένων σποροφύτων, συγκριτικά με τους μάρτυρες, ως προς το χρόνο έκπτυξης ριζών, τον αριθμό ριζών ανά εμβολιασμένο σπορόφυτο, το μήκος των ριζών και τη συχνότητα μετασχηματισμού.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την ικανότητα του βακτηριακού στελέχους R1000 να επάγει την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στην τομάτα, όπως αποδείχθηκε τόσο από την υψηλή συχνότητα μετασχηματισμού όσο και από τις διαφορές στο φαινότυπο του ριζικού συστήματος. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές σχετικά με την υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού του R1000, όπως έχει αποδειχθεί σε ένα πλήθος ερευνών με αντικείμενο πολυάριθμα φυτικά είδη (Tao and Li, 2006; Pavli and Skaracis, 2010; Plina et al., 2012; Sahayarayan et al., 2020). Αυτό πιθανότατα έγκειται στο γεγονός ότι, το Ri-πλασμίδιο του στελέχους εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα εισαγωγής του T-DNA στα φυτικά κύτταρα και η συγκεκριμένη ποικιλία είναι πιο ευαίσθητη στη μόλυνση

αυτή (Tao and Li, 2006; Sahayarayan et al. 2020). Στην παρούσα μελέτη, τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το R1000 χαρακτηρίζονταν από μεγάλο αριθμό ριζών με έντονη διακλάδωση και συχνά πλαγιοτροπική ανάπτυξη. Αντίθετα, τα σπορόφυτα αγρίου τύπου και αυτά που εμβολιάστηκαν με το R1000-HrpZ_{P_{sph}} εμφάνισαν σημαντικά μειωμένο και παρόμοιο αριθμό ριζών. Τόσο ο μειωμένος αριθμός ριζών όσο και η χαμηλότερη συχνότητα μετασχηματισμού των R1000-HrpZ_{P_{sph}} σποροφύτων, συγκριτικά με τα R1000-σπορόφυτα, πιθανών να οφείλεται στη δράση του αντιβιοτικού υδρομυκίνη, το οποίο δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των σποροφύτων και στην ικανότητα έκπτυξης νέων ριζών. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι, παρά την ταχεία ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των εμβολιασμένων σποροφύτων, το μεγαλύτερο μήκος ριζών εμφάνισαν τα φυτά μάρτυρες, γεγονός που εν μέρει αποδίδεται στην περιορισμένη ανάπτυξη πλευρικών διακλαδώσεων.

Ένας πρόσθετος παράγοντας που επιδρά στη συχνότητα μετασχηματισμού είναι η σύσταση του υποστρώματος συγκαλλιέργειας. Στο επίπεδο αυτό, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία MES λειτούργησε βοηθητικά, καθώς εξισορροπεί το pH δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον για το μετασχηματισμό από τα βακτηριακά στελέχη (Ogaki et al., 2008). Σύμφωνα με μελέτες κυρίως το όξινο pH επηρεάζει την ικανότητα και τη συχνότητα μετασχηματισμού, διότι είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των γονιδίων *vir* (Ogaki et al., 2008; Singh and Dixit, 2009).

Με δεδομένο ότι η διαγονιδιακή φύση του ριζικού συστήματος των εμβολιασμένων σποροφύτων επιβεβαιώθηκε μέσω της επιτυχούς ένθεσης των γονιδίων *rolb2* και *hrpZ_{P_{sph}}*, περαιτέρω στόχος αποτέλεσε η διερεύνηση της δυνατότητας πρακτικής αξιοποίησής τους σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση και ακολούθησε αξιολόγηση της απόκρισής τους, συγκριτικά με μη-μετασχηματισμένα φυτά που εξυπηρέτησαν ως μάρτυρες. Ειδικότερα, στόχος αποτέλεσε η μελέτης επίδρασης του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι της καταπόνησης που προκαλείται από την ανάπτυξη των φυτών παρουσία D-μαννιτόλης. Τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα καθώς και φυτά αγρίου τύπου τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε D-μαννιτόλη και αξιολογήθηκε η φαινοτυπική απόκρισή τους βάσει της συμπτωματολογίας τους. Το σύνολο των φυτών εμφάνισε συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων και μαρασμού καθώς και σποραδικά μεταχρωματισμό των ριζών, ωστόσο τα R1000-HrpZ_{P_{sph}}-σπορόφυτα

χαρακτηρίζονταν από ηπιότερη συμπτωματολογία. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές σχετικά με το γεγονός ότι η έκφραση του γονιδίου οδήγησε σε εκδήλωση ανθεκτικότητας έναντι του ιού της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων αλλά και σε προηγμένη ανεκτικότητα έναντι της ξηρασίας και της αλατότητας στο είδος *N.benthamiana* (Pavli et al. 2011; Pavli and Skaracis, 2016).

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υπογραμμίζουν την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου καθώς και την καταλληλότητα του βακτηριακού στελέχους R1000 για το γενετικό μετασχηματισμό της τομάτας μέσω του *A. rhizogenes*. Επιπλέον, παρέχουν ενδείξεις σχετικά με τη δυνατότητα αξιοποίησης των σύνθετων σποροφύτων για μελέτες γονιδιακής έκφρασης αναφορικά με την ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων. Προς την κατεύθυνση αυτή, η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας, πέραν της συμπτωματολογίας των φυτών, μπορεί να βασιστεί σε πρόσθετες παραμέτρους, όπως είναι η συσσώρευση προλίνης, φαινολικών ενώσεων, αντιοξειδωτικών ουσιών κ.α. Η προσέγγιση αυτή είναι ουσιαστικής σημασίας για την ευχερή και σε σύντομο χρόνο μελέτη της έκφρασης γονιδίων ενδιαφέροντος, χωρίς να απαιτείται η χρονοβόρα και με χαμηλή αποτελεσματικότητα διαδικασία του σταθερού μετασχηματισμού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A

Ábrahám E., Hourton-Cabassa C., Erdei L., Szabados L., 2010. Methods for Determination of Proline in Plants, Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology, p.p. 317-331.

Ahmad S., Quamruzzaman A., Islam, M., 2011. Estimate Of Heterosis In Tomato(*Solanum lycopersicum* L.). Bangladesh Journal of Agriculture Research, vol.36, p.p. 521-527.

Al-Betawi, 2005. Preliminary study on tomato pomace as unusual feedstuff in broiler diets, Pakistan Journal of Nutrition, vol. 4, issue 1.

Arshad W., Haq IU., Waheed MT., Mysore KS., Mirza B., 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with rolB gene in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens, PLoS one, vol.9 (5).

B

Bai Y. and Lidhout P., 2007. Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future?, Annals of botany, vol. 100 (5).

Bartoszewski G., Niedziela A., Szwacka M., Niemirowicz-Szczytt K., 2008. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth, Plant Breeding, vol.122(4), p.p. 347-351.

Bettini P.P., Santangelo E., Rapparini F., Mosconi P., Crino P., Mauro M.L., 2015. *Agrobacterium rhizogenes* rolA gene promotes tolerance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, vol. 25, p.p. 225-233.

Bergougnoux V., 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming, Biotechnology Advances, vol. 32, issue 1, p.p. 170-189.

Bernatzky R. and Tanksley SD., 1986. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences, Genetics, vol 112(4), p.p. 887-98.

Birch R.G., 1997. Plant Transformation: Problems and strategies for Practical Application, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, vol. 48(1), p.p. 297-326.

Birchler J.A, Yao H., Chudalayandi S., 2006. Unraveling the genetic basis of hybrid vigor, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 103, p.p. 12957-12958.

<https://www.pnas.org/content/103/35/12957.short>

Bhowmik D., Kumar K.P.S., Paswan S., Srivastava S., 2012. Tomato-A Natural Medicine and Its Health Benefits. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, vol 1, No 1, p.p 33-34.

Bulkalov V.P., 2008. Functions of rol genes in plant secondary metabolism, Biotechnology Advances, vol.26, p.p. 318-324.

C

Carillo P. and Gibon Y., 2011. Protocol: Extraction and determination of proline, PrometheusWiki.

CCS Haryana Agricultural University, Hisar, 2021.

<http://admissions.hau.ac.in/>

Chandra S., 2011. Natural plant genetic engineer Agrobacterium rhizogenes: role of T-DNA in plant secondary metabolism, Biotechnology Letters, vol.34(3), p.p. 407-415.

Charles W.B and Harris R.E., 1972. Tomato fruit-set at high and low temperatures, Canadian Journal of Plant Science, vol 52.

Cheema D.S. and Dhaliwai M.S., 2005. Hybrid Tomato Breeding, Journal of New Seeds, vol 6, p.p. 1-14.

Chen J., Liang S., Xiao K., Yang W., May 2017. Origin of Domesticated Horticultural Species and Molecular Bases of Fruit Shape and Size Changes during the Domestication, Horticultural Plant Journal, vol 3 , issue 3, pp 125-132.

Colak N.G, Eken N.T., Ülger M., Frary A., Doğanlar S., 2020. Mapping of quantitative trait loci for antioxidant molecules in tomato fruit: Carotenoids, vitamins C and E, glutathione and phenolic acids, Plant Science.

Christey M.C., 2020. Transgenic Crop Plants Using *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation, Environment and Agriculture, Botany, Hairy Roots, CRC Press.

D

Dimilioglu G., Das Z.A., Bor M., Ozdemir F., Turkan I., 2015. The impact of GABA in harpin-elicited biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*, Journal of Plant Physiology, vol.188, p.p. 51-57.

Del Valle, Cámara M.M, Torija M.E., 2005. Aprovechamiento de residuos vegetales: subproducto de tomate, Alimentacion, Equipos y Tecnologia, p.p. 87-93.

Dewanto V., Wu X., Adom K.K. and Liu R.H., 2002. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomato Increasing Total Antioxidant Activity, Journal Agricultural Food Chemistry.

Dorst JCEA (VW), 1946. Een en twintigste beschrijvende rassenlijst voor landbouwgewassen. Wageningen, Rijkscommissie voor de samenstelling van de rassenlijst voor landbouwgewassen, p.p. 221.

Dumas Y., Dadomo M., Di Lucca G., Grolier P., 2003. Effects of Environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 83, issue 5, p.p 369-382.

F

Fentik D.A., 2017. Review on Genetics and Breeding of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), OMICS Publishing Group in Advances in Crop Science and Technology, vol.5, p.p 1-6.

Foolad M.R., 2007. Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato, International Journal of Plant Genomics, Hindawi Publishing Corporation.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021. FAOSTAT database. <http://www.fao.org/faostat>

Frary A., Nesbitt T.C., Grandillo S., Knaap E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., Alpert K.B., Tanksley S.D., 2000. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size, Science.

G

Gonzalez M., Cid M.C., Lobo M.G., 2011. Usage of Tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Seeds in Health, Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention, p.p.1123-1132.

Graham B. Seymour, Gregory A. Tucker, Jane E. Taylor, 1993. Biochemistry of Food Ripening, Chapman and Hall, London, New York, pp 405-442.

Giuffre A.M, Sicari V., Capocasale M., Zappia C., Pellicano T.M and Poiana M., 2016. Physico-chemical composition of tomato seed oil for an edible use: the effect of cultivar, International Food Research Journal, p.p. 583-591.

Grandillo S., Zamir D., Tanksley S.D., 1999. Genetic Improvement of Processing Tomatoes: A 20 years perspective, Euphytica, Kluwer Academic Publishers, p.p. 85-97.

Guld W.A., 1992. Tomato Production, Processing and Technology, City Publications Inc, Baltimore, Maryland.

H

Hancock J.F., 1992. Plant Evolution and the Origin of Crop Species. Cabi Publishing Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ., p.p. 275-276.

Hartz T., Miyao G., Mickler J., Lestrangle M., Stoddard S., Nunez J., Aegerter B., 2008. Processing Tomato Production in California, UC Agriculture and Natural Resources.

Ho-Plagaro T., Huertas R., Tamayo-Navarrete M.I., Ocampo J.A., Garcia-Garrido J.M., 2018. An improved method for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of tomato suitable for the study of arbuscular mycorrhizal symbiosis, Plant Methods.

I

Ilina E.L., Logachov A.A., Laplaze L., Demchenko N.P., Pawlowski K., Demchenko K.N., 2012. Composite *Curcubita pepo* plants with transgenic roots as a tool to study root development, Annals of Botany, vol. 110, issue 2, p.p. 479-489.

Indean Agricultural Research Institute, 2021. IARI varieties.

<https://www.iari.res.in>

J

Jiménez-Gómez J.M. and Maloof J.N, 2009. Sequence diversity in three tomato species: SNPs, markers, and molecular evolution, BMC Plant Biology, vol.8.

K

Kalloo G., 2012. Genetic Improvement of Tomato, Monographs on Theoretical and Applied Genetics 14, Springer Science and Business Media, p.p. 1-5.

Karami R., Kamgar S., Karparvarfard S.H., Rasul M.G. and Khan M.M.K., 2018. Biodiesel production from tomato seed and its engine emission test and simulation using Artificial Neural Network, Journal Oil Gas Petrochemical Technology, p.p. 41-62.

Kimura S. and Sinha N., 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop, Cold Spring Harbor Protocols.

Kramer M. and Redenbaugh K., 1994. Commercialization of tomato with an antisense polygalacturonase gene, The FLAVR SAVR™ tomato story, Euphytica, vol.79(3), p.p. 293-297.

Krenek P., Samajova O., Luptovciak I., Doskocilova A., Komis G, Samaj J., 2015. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications, Biotechnology Advances, vol.33 (6), p.p. 1024-1042.

L

Larrauri J.A., 1999. New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products, Trends in Food Science and Technology, p.p. 3-8.

Li XQ., Wei JZ., Tan A., Aroian R.V., 2007. Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematicidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein, Plant Biotechnolgy Journal, vol.5(4), p.p. 455-464.

Lincoln J.E., Richael C., Overduin B., Sith K., Bostock R., Gilchrist D.G., 2002. Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease, Proceedings of the National Academy of Sciences, vol.99(23).

M

McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R., 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Cell Reports, vol.5(2), p.p. 81-84.

McCue G.A 1952. Annals of the Missouri Botanical Garden, Missouri Botanical Garden Press, p.p. 289-348.

Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A, 2009. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools., Diversity, vol 1(1), p.p. 19-35.

Mongeau R., 2003. Dietary fibre, Encyclopaedia of food science and nutrition, Academic Press, New York, p.p. 1362-1387.

Morgan A.J., Cox P.N., Turner D.A., Peel E., Davey M.R., Gartland K.M.A., Mulligan B.J., 1987. Transformation of tomato using an Ri plasmid vector, Plant Science, vol. 49(1), p.p. 37-49.

Müller C.H. 1940. A revision of the genus *Lycopersicon*, United States Department of Agriculture, Miscellaneous, Publication, p.p 1-28.

Muranaka T. and Saito K., 2010. Production of Pharmaceuticals by Plant Tissue Cultures, Comprehensive Natural Products II, p.p. 615-628.

N

Nartop P., 2018. Engineering of Biomass Accumulation and Secondary Metabolite Production in Plant Cell and Tissue Cultures, Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress, p.p. 169-194.

National Research Council (US) Committee on Identifying and Assessing Unintended Effects of Genetically Engineered Foods, 2004). Approaches to Unintended Health Effects, National Academies Press (US), Washington.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215771/>

Nakazato T., Warren D.L., Moyle L.C. , 2010. Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes, American Journal of Botany, p.p. 680-693.

O

Ors S., Ekinci M., Yildirim E., Sahin U., Turan M., Dursun A., 2021. Interactive Effects of salinity and drought stress on photosynthetic characteristics and physiology of

tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings, South African Journal of Botany, vol. 137, p.p. 335-339.

Osei M.K., Prempeh R., Adjebeng-Danquah J., Opoku J.A., Danquah A., Danquah E., Blay E., Adu-Dapaah H., 2018. Marker-Assisted Selection (MAS): A Fast-Track Tool in Tomato Breeding, Advances in tomato breeding and production.

P

Pavli, O.I. and Skaracis, G.N., 2010. Fast and efficient genetic transformation of sugar beet by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols, Protocols Network*. 10.1038.

Pavli O.I., Keladidi G.I., Tampakaki A.P., Skaracis G.N., 2011. The hrpZ Gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* Enhances Resistance to Rhizomania Disease in Transgenic *Nicotiana benthamiana* and Sugar Beet, PLoS ONE, vol.6, issue 3.

Pavli O.I. and Skaracis G.N., 2016. Engineering Transgenic Rhizomania Resistance. *Rhizomania*, p.p. 221-231.

Peralta I.E. and Spooner D.M., 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *lycopersicon* [Mill.] Wettst. Subsection *Lycopersicon*) p.p 1888-1902.

Peralta, I.E. and Spooner, D.M., 2007. History, origin and early cultivation of tomato (*solanaceae*), Genetic Improvement of Solanaceous Crops, A.K editors, Enfield, USA, Science Publishers, vol 2, p.p. 1-27.

Peralta I.E. and Spooner D.M., 2008. Taxonomy of Wild Tomatoes and Their Relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*, *Solanaceae*), Systematic Botany Monographs, p.p. 1-186.

R

Rai A.C., Singh M., Shah K., 2013. Engineering drought tolerant tomato plant over-expressing *BcZAT12* gene encoding a C2H2 zinc finger transcription factor, *Phytochemistry*, vol.85, p.p. 45-50.

Raj S.K., Sing R., Pandey S.K., Singh B.P., 2004. *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing Tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection, *Molecular Virology*, National Botanical Research Institute, Lucknow, India, vol.88(10).

Rao SR. and Ravinshankar G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, vol.20(2), p.p. 101-153.

Razdan M.K. and Mattoo A.K., 2007. Genetic Improvement of Solanaceous Crops: Tomato, Science Publishers, USA, vol 2, p.p. 1-25.

Rick and Yoder, 1988. Classical and Molecular Genetics of Tomato Highlights and Perspectives, *Annual Review of Genetics*, p.p. 281-282.

Rick C.M., 1983. Tomato (*Lycopersicon*), *Developments in Plant Genetics and Breeding*, vol. 1, p.p. 147-165.)

Robetrson L.D. and Labate JA, 2006. Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild relatives, *Genetic Improvement of Solanaceae crops*, In: Razdan MK, Mattoo AK (eds), vol. 2, p.p. 285-313.

Rodriguez G., Munos S., Anderson C., Sim S., Michel A., Causse M., Gardener B.B.M, Francis D., Knaap E., 2011. Distribution of sun, ovate, lc, and fas in the Tomato Germplasm and the Relationship to Fruit Shape Diversity, *Genetics Genomis and Molecular Evolution, Plant Physiology*, vol. 156.

S

Sahayarayan J.J., Udayakumar R., Arun M., Ganapathi A., Alwahibi M.S., Aldosari N.S., Morgan A.M.A., 2020. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains for in-vitro hairy root induction, total phenolic, flavonoids contents, antibacterial and antioxidant activity of (*Cucumis anguria L.*), *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 27, issue 11, p.p. 2972-2979.

Sato et al., 2012. The Tomato Genome Consortium, The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution, Kazusa, DNA Research Institute, *Nature*, vol. 485, p.p. 635-641.

Scott J.W., 1998. University of Florida Tomato Breeding Accomplishment and Future Directions, *Soil and Crop Sciences of Florida, Proceedings*, vol.68.

Shah S.H., Ali S., Jan S.A., Din J., Muhammad Ali G., 2015. Piercing and incubation method of in planta transformation producing stable transgenic plants by overexpressing DREB1A gene in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.), *Plant Cell Tissue Organ Cult*, vol. 120, p.p. 1139-1157.

Singh K.V. and Dixit VK., 2009. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Genetic transformation of *Abrus precatorius L.*, Pharmacognosy Magazine, Bangalore, vol.5, issue 20, p.p. 336-342.

Smith A.F., 1998. Livingston and the tomato, Ohio State University Press Collumbus.

T

Tampakaki A.P. and Panopoulos N.J., 2000. Elicitation of Hypersensitive Cell Death by Extracellularly Targeted HrpZPsph Produced *in planta*, Moleculat-Plant-Microbe Interactions, vol.13(12), p.p. 1366-1374.

Tao J., Li L., 2006. Genetic transformation of *Torenia fournieri L.* mediated by *Agrobacterium rhizogenes*, South African Journal of Botany, vol. 72, issue 2, p.p. 211-216.

Talano M.A., Agostini E., Medina M., Reinoso H., Tordale M., Tigier H.A., Milrad de Forchetti S., 2006. Changes in lingo-suberizatiom of cell walls of tomato hairy roots produced by salt treatment, The relationship with the release of a basic peroxidase, Journal of Plant Physiology, vol.163, issue 7, p.p. 740-749.

Tepfer D., 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*, Physiologia Plantarum, Copenhagen, vol.79, p.p. 140-146.

Toyoda H., Matsuda Y., Utsumi R., Ouchi S., 1988. Intranuclear microinjection for transformation of tomato callus cells, Plant Cell Reports, vol.7(5), p.p. 293-296.

Tsukada M., Kusano T., Kitagawa Y., 1989. Introduction of Foreign Genes into Tomato Protoplasts by Electroporation, Plant and Cell Physiology, vol.30(4), p.p. 599-603.

Tzfira T., Citovsky V., 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology, Current Opinion in Biotechnology, vol. 17 issue 2, p.p.147-154.

V

Van Eck J.M., Blowers A.D., Earle E.D., 1995. Stable transformation of tomato cell after bombadement with plasmid and YAC DNA, Plant Cell Reports, vol.14(5), p.p. 299-304.

Veena V. and Taylor C.G., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications, *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, vol.43(5), p.p. 383-403.

Vladimirov I.A., Matveeva T.V., Lutova L.A., 2015. Opine biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*, *Russian Journal of Genetics*, vol.51(2), p.p. 121-129.

W

Watson J.D., Myers R.M., Caudy A.A., Witkowski J.A, 2007. *Recombinant DNA (Genes and Genomes-A Short Course)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, W.H. Freeman and Company, New York, p.p. 196-198.

Wei ZM. And Beer S.V., 1996. Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance, *ISHS Acta Horticulturae*, (411), p.p. 223-226
https://www.actahort.org/books/411/411_45.htm .

Willcox J.K., Ash S.L., Catignani G.L., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p.p. 275-295.

Z

Zsilinszky A.A., 2005. Tomatoes Crop Production Science in Horticulture, Production in the open field, In: Heuvelink, E. (ed.). CABI Publishing, Oxford, UK, p.p. 237-256.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ε

Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2021, Λαχανικά, Εκτάσεις και παραγωγή κατά Περιφέρεια και Περιφερειακή Ενότητα. <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication>

Ξ

Ξυνιάς Ι.Ν., 2014. Βελτίωση φυτών, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Ο

Ολύμπιος Χ.Μ., 2015. Η Τεχνική της Καλλιέργειας των Υπαίθριων Κηπευτικών, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε, Αθήνα, σελ.86-124.

Π

Πετρόπουλος Σ., Χα Ι., 2014. Γενική Λαχανοκομία και Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Βόλος, σελ 217-240.