



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

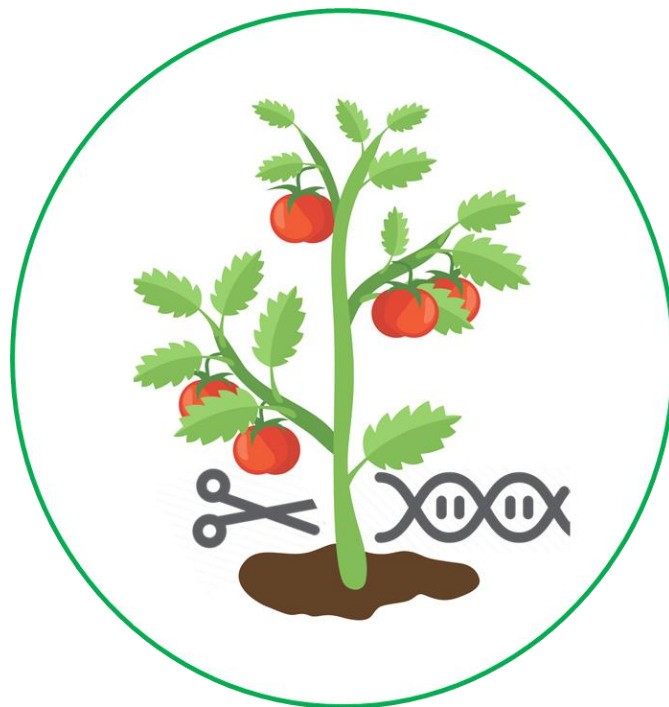
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ανάπτυξη πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας
διαμέσου του *Agrobacterium rhizogenes*»

ΛΥΔΙΑ ΠΑΠΙΤΣΗ



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

ΒΟΛΟΣ 2022

Ανάπτυξη πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας
διαμέσου του *Agrobacterium rhizogenes*

Λυδία Παπίτση

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παυλή Ουρανία, Επικ. Καθηγήτρια, Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα, Καθηγητής, Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σπυρίδων Πετρόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Λαχανοκομίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής διατριβής, η οποία συμπίπτει και με την ολοκλήρωση της φοίτησής μου στο ΤΓΦΠΑΠ, οφείλω να ευχαριστήσω όσους συντέλεσαν στην διεξαγωγή και ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω την κα. Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας, για την στήριξή της τόσο στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή, καθώς και την καθοριστική συμβολή της στην κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ευαγγελία Παναγιωτάκη, Ε.ΔΙ.Π., για την πολύτιμη συνεισφορά της κατά τη διεξαγωγή και περάτωση της διαδικασίας, καθώς και για τη βοήθειά που μου προσέφερε στην εκμάθηση όλων των τεχνικών και μεθόδων που χρειάστηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ. Αβραάμ Χα και κ. Σπυρίδων Πετρόπουλο, για την κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους στήριξαν την προσπάθειά μου αυτή, την οικογένειά μου και τους φίλους μου.

Περίληψη

Η τομάτα αποτελεί έναν από τους πλέον δημοφιλείς καρπούς, με συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση, που αποτελεί ολοένα και περισσότερο έναυσμα για την εντατικοποίηση των προσπαθειών βελτίωσής της. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας διαμέσου του *Agrobacterium rhizogenes*, με σκοπό τη δημιουργία σύνθετων φυτών τομάτας με διαγονιδιακό ριζικό σύστημα και υπέργειο τμήμα αγρίου τύπου.

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν σπόροι ντομάτας της ποικιλίας Tropical Queen οι οποίοι μετά από επιφανειακή απολύμανση τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο βλάστησης. Επιλέχθηκαν όλα τα υγιή σπορόφυτα τομάτας ηλικίας 7 ημερών και χωρίστηκαν σε τρεις ισάριθμες κατηγορίες. Για το σκοπό του μετασχηματισμού τα σπορόφυτα κόπηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι στην περιοχή του υποκοτυλίου. Το σημείο τομής εμβαπτίσθηκε σε καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων (εμβόλιο) των βακτηριακών στελεχών R1000 και R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* του *Agrobacterium rhizogenes*. Για τα σπορόφυτα της τρίτης κατηγορίας φυτών που αποτέλεσαν το μάρτυρα το σημείο τομής εμβαπτίσθηκε σε αποστειρωμένο νερό. Μετά τον εμβολιασμό τα σπορόφυτα τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα τριβλία που περιείχε υπόστρωμα συγκαλλιέργειας. Ακολούθησαν διαδοχικές μεταφορές των σποροφύτων σε νέα θρεπτικά υποστρώματα συγκεκριμένης σύστασης που περιείχαν τα κατάλληλα αντιβιοτικά με σκοπό της ριζογένεση.

Για την αξιολόγηση του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού προσδιορίσθηκε η συχνότητα μετασχηματισμού, ο χρόνος έκπτυξης διαγονιδιακών ριζών και ο αριθμός πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων. Η διαγονιδιακή φύση των ριζών επιβεβαιώθηκε με τον έλεγχο της ένθεσης των διαγονιδίων στις ρίζες των εμβολιασμένων σποροφύτων που εμφάνισαν μετασχηματισμένο φαινότυπο μέσω PCR.

Η συχνότητα εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών σε φυτά εμβολιασμένα με το στέλεχος R1000 πλησίασε το 80%, ενώ σε φυτά εμβολιασμένα με το στέλεχος R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* δεν ξεπέρασε κατά πολύ το 50%. Στο στέλεχος R1000 εκτός της μεγαλύτερης συχνότητας μετασχηματισμού παρατηρήθηκε και επαγωγή διαγονιδιακών ριζών σε συντομότερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με το στέλεχος R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*. Ωστόσο και τα δύο στελέχη έδωσαν ικανό αριθμό φυτών με διαγονιδιακές ρίζες. Η διαγονιδιακή φύση των

ριζών επιβεβαιώθηκε με την παρουσία των γονιδίων *rolB2* και *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. στα προϊόντα της PCR.

Τα ευρήματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι η διαδικασία της επαγωγής διαγονιδιακών ριζών σε σπορόφυτα τομάτας με τη χρήση στελεχών του *Agrobacterium rhizogenes* επιτεύχθηκε με σχετική ευκολία γεγονός που σημαίνει ότι ο μετασχηματισμός διαμέσου του *A. rhizogenes* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών τομάτας.

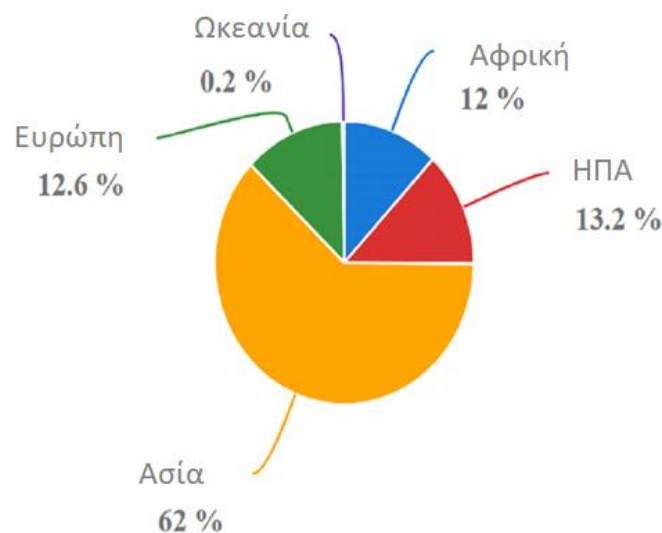
Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή	6
1.1. Οικονομική σημασία της τομάτας	1
1.2. Εξάπλωση και ταξινόμηση της τομάτας	3
1.3. Βοτανικά χαρακτηριστικά	3
1.4. Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις	5
1.5. Διατροφική αξία	6
1.6. Βελτίωση της τομάτας	8
1.6.1. Κλασικές βελτιωτικές διαδικασίες	9
1.6.2. Βελτίωση τομάτας με μεθόδους ιστοκαλλιέργειας	12
1.7. Γενετική Μηχανική	18
1.7.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
1.7.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	21
2. Υλικά και Μέθοδοι	27
2.1. Φυτικό Υλικό	27
2.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	27
2.3. Ανάπτυξη των στελεχών του <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	28
2.4. Προετοιμασία των εκφύτων για το μετασχηματισμό	29
2.5. Προετοιμασία του εμβολίου για το μετασχηματισμό	30
2.6. Μετασχηματισμός σπορόφυτων τομάτας	30
2.7. Έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού	31
2.8. Στατιστική ανάλυση	32
3. Αποτελέσματα	33
3.1. Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών	33
3.2. Διαφορές στο φαινότυπο των ριζών	33
3.3. Φαινοτυπική αξιολόγηση των διαγονιδιακών ριζών	35
3.4. Συχνότητα μετασχηματισμού	36
3.5. Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων	37
4. Συζήτηση	39
5. Συμπεράσματα	42
6. Βιβλιογραφία	43

1. Εισαγωγή

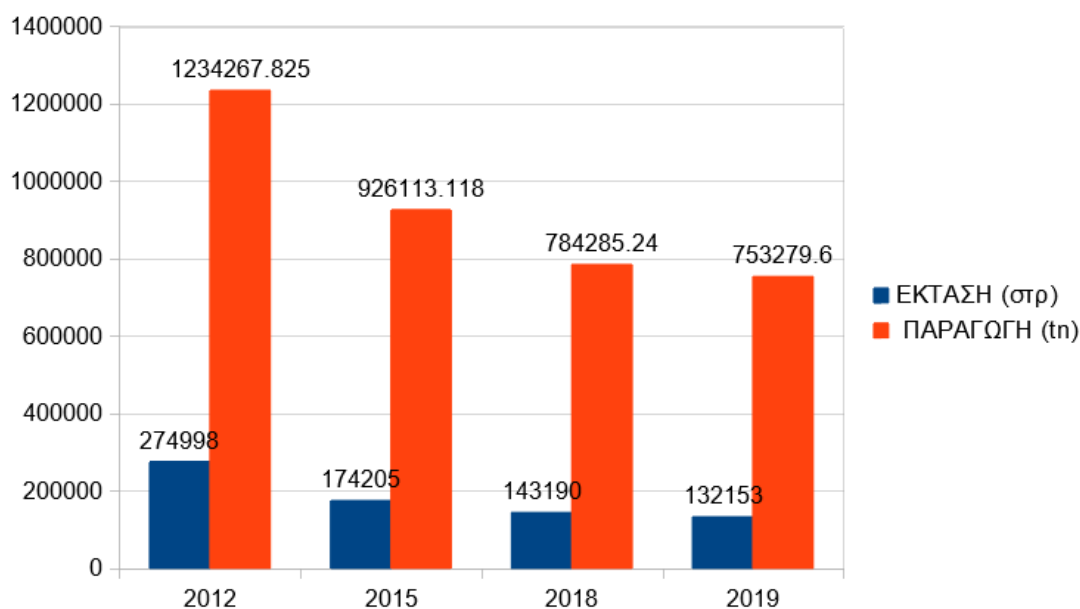
1.1. Οικονομική σημασία της τομάτας

Η τομάτα (*Solanum lycopersicum* L. συν. *Lycopersicon esculentum*) είναι ένα από τα λαχανικά που καταναλώνονται περισσότερο στον κόσμο, πρωτίστως ως νωπό προϊόν αλλά και σε άλλες μορφές, όπως χυμός, πολτός, αποξηραμένοι καρποί, σάλτσα, σκόνη. Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες, καθώς καταλαμβάνει την έβδομη σε συνολική επιφάνεια έκταση στον κόσμο μετά τα σιτηρά, το ρύζι την πατάτα και τη σόγια, με την παγκόσμια παραγωγή να ξεπερνά τους 180 εκατομμύρια τόνους το 2019 και την καλλιεργούμενη έκταση να ξεπερνά τα 50 εκατομμύρια στρέμματα. Στην Ελλάδα, το ίδιο έτος, η συνολική παραγωγή ήταν 754.000 τόνοι και η συνολική καλλιεργούμενη έκταση αφιερωμένη στην παραγωγή τομάτας ήταν 132.000 στρέμματα. Η παραγωγή βιομηχανικής τομάτας ήταν 354.000 τόνοι, σε συνολική έκταση 51.000 στρεμμάτων, με μέση απόδοση τους 6.94 τόνους ανά στρέμμα. Η υπαίθρια παραγωγή επιτραπέζιας τομάτας ήταν 163.000 τόνοι σε 57.000 στρέμματα, με μέση απόδοση τους 2.86 τόνους ανά στρέμμα και η παραγωγή θερμοκηπιακής ήταν 236.000 τόνοι σε 24.000 στρέμματα συνολικά, με μέση απόδοση τους 9,83 τόνους ανά στρέμμα.



Εικόνα 1.1 Παγκόσμια παραγωγή τομάτας (πηγή FAO, 2021).

Σήμερα, η Ασία είναι η κυρίαρχη δύναμη στην παραγωγή τομάτας, παράγοντας πάνω από το 60 % της παγκόσμιας παραγωγής (112 εκατομμύρια τόνους το έτος 2019), με την Κίνα να βρίσκεται στην πρώτη θέση με συνολική παραγωγή 63 εκατομμύρια τόνους. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί, ότι οι χώρες της Βόρειας Ευρώπης (Ολλανδία, Βέλγιο, Νορβηγία), όπου η καλλιέργεια της τομάτας γίνεται υπό ελεγχόμενες συνθήκες σε θερμοκήπια, παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη απόδοση παραγωγής ανά στρέμμα, παρόλο που οι κλιματικές συνθήκες δεν είναι οι κατάλληλες. Παράλληλα, στις εν λόγω χώρες επιτυγχάνεται υψηλή παραγωγή σε σημαντικά μειωμένες εκτάσεις, συγκριτικά με την Ασία. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στην Κίνα, που βρίσκεται στην πρώτη θέση σε συνολική παραγωγή τομάτας σε παγκόσμιο επίπεδο, παράγονται 5,8 τόνοι ανά στρέμμα σε μία καλλιεργούμενη έκταση 10,86 εκατομμυρίων στρεμμάτων, ενώ στην Ολλανδία παράγονται 50,6 τόνοι ανά στρέμμα και η συνολική καλλιεργούμενη έκταση είναι μόλις 18.000 στρέμματα. Η κατανάλωση τομάτας το 2009 κατά μέσο όρο ήταν 20.5 kg κατά κεφαλήν ανά έτος και οι χώρες με τη μεγαλύτερη κατανάλωση είναι οι χώρες που βρίσκονται στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, με τρεις πρώτες τη Λιβύη, την Αίγυπτο και την Ελλάδα, που ξεπερνούν τα 100 kg κατά κεφαλήν ετησίως.



Εικόνα 1.2 Καλλιεργούμενη έκταση και παραγωγή τομάτας στην Ελλάδα (πηγή ΕΛΣΤΑΤ, 2021).

1.2. Εξάπλωση και ταξινόμηση της τομάτας

Η τομάτα ανήκει στο γένος *Solanum*, υποοικογένεια Solanoideae και οικογένεια των στρυγνοειδών (Solanaceae) που περιλαμβάνει πολλά φυτά οικονομικής σημασίας όπως η πατάτα, η μελιτζάνα, ο καπνός, οι πιπεριές. Από τα πρώτα κιόλας χρόνια της εισαγωγής της τομάτας στην Ευρώπη, συσχετίστηκε με το γένος *Solanum* και αρχικά ονομάστηκε *Solanum pomiferum*. Έπειτα, ο Λινναίος ταξινόμησε τις τομάτες στο γένος *Solanum* προσδίδοντας το όνομα *Solanum lycopersicum*.

Ιστορικά, η τομάτα εμφανίζεται ήδη από το 700 μ.Χ. στη Νότια Αμερική, ενώ στην Ευρώπη εισήχθη μόλις τον 16^ο αιώνα, χωρίς σημαντική απήχηση στους καταναλωτές έως και τα μέσα του 18^{ου} αιώνα. Η μη προτίμηση των καταναλωτών, αρχικά οφείλονταν στο γεγονός ότι οι τομάτες θεωρούνταν τοξικές σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης (Ιταλία, Αγγλία), λόγω της ομοιότητας τους με τον καρπό του φυτού *Atropa belladonna* που είναι παραισθησιογόνο και τοξικό, ενώ αν καταναλωθεί σε μεγάλες ποσότητες αποβαίνει θανατηφόρο. Το παράδοξο στην εξάπλωση της τομάτας είναι ότι η εισαγωγή της στη Βόρεια Αμερική έγινε μέσω των Ευρωπαίων αποικιστών και όχι απευθείας από τη Νότια Αμερική. Στην Ελλάδα, η τομάτα εισήχθη το 1818 και μερικά χρόνια αργότερα ξεκίνησε η καλλιέργεια της. Η ονομασία της τομάτας έλκει την καταγωγή της από τη λέξη *tomatl* των Αζτέκων που ήταν και οι πρώτοι που καλλιεργήσαν το φυτό. Οι καρποί των πρώτων καλλιεργούμενων φυτών διέφεραν τόσο σε μέγεθος όσο και σε χρώμα από τη σημερινή τομάτα, ήταν μικρότεροι σε μέγεθος και το χρώμα τους ήταν κίτρινο-πορτοκαλί, εξ' ου και η ονομασία "romo d' oro" που σημαίνει χρυσό μήλο.

1.3. Βοτανικά χαρακτηριστικά

Η τομάτα είναι ποώδες κηπευτικό που καλλιεργείται για τον καρπό του. Συχνά χρησιμοποιείται για την διεξαγωγή ερευνών στα πεδία της γενετικής μηχανικής, μοριακής βιολογίας και μοριακής γενετικής γιατί έχει σχετικά μικρό σε μέγεθος γονιδίωμα ($2n = 24$), το οποίο αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σε ποσοστό περίπου 30 %, έχει μικρό κύκλο ζωής και η καλλιέργειά της είναι σχετικά εύκολη. Βοτανικά, ο καρπός της τομάτας ανήκει στα φρούτα και όχι στα λαχανικά,

όμως λόγω της χρήσης τους, οι καρποί έχει καθιερωθεί να θεωρούνται λαχανικά. Στις περιοχές όπου είναι αυτοφυής, η τομάτα καλλιεργείται ως πολυετές φυτό, ενώ στα ηπειρωτικά και εύκρατα κλίματα καλλιεργείται ως ετήσιο (Χα και Πετρόπουλος, 2014).

Ο σπόρος της τομάτας είναι ωσειδής, και συνήθως είναι πεπλατυσμένος, έχει μικρό μέγεθος, με διάμετρο μεταξύ 3-5 mm. Συνήθως διατίθενται στο εμπόριο κουφετοποιημένοι σπόροι, επικαλυμμένοι με μυκητοκτόνα. Η επιφάνεια των σπόρων της τομάτας συνήθως καλύπτεται από τριχοειδείς αποφύσεις, η οποίες δίνουν στο σπόρο μια χαρακτηριστική “μεταξένια” υφή, χάρη στην οποία ξεχωρίζουν από τους σπόρους των υπόλοιπων φυτών της οικογένειας Solanaceae, ωστόσο στο εμπόριο διατίθενται ύστερα από επεξεργασία χωρίς τριχοειδείς αποφύσεις.

Στο φυτό της τομάτας η ρίζα είναι κεντρική, πασσαλώδης, που φτάνει σε βάθος 50 cm ή και βαθύτερα, και σχηματίζει δευτερεύουσες ρίζες και ριζικά τριχίδια. Κατά τη μεταφύτευση στον αγρό, συχνά σπάει η κεντρική ρίζα και το φυτό διαμορφώνει θυссανώδες ριζικό σύστημα.

Ο βλαστός του φυτού αποτελείται από έναν κεντρικό άξονα και πολλούς πλευρικούς. Μπορεί να φτάσει έως και τα 3 μέτρα σε ύψος, όμως δεν ξυλοποιείται, γεγονός που καθιστά την υποστύλωση απαραίτητη κατά την καλλιέργεια. Έχει κυλινδρικό σχήμα και στην επιφάνειά του φύονται αδενώδεις τρίχες που αφήνουν μία χαρακτηριστική μυρωδιά.

Τα φύλλα διατάσσονται εναλλάξ γύρω από τον βλαστό και ποικίλουν σε αριθμό και μέγεθος, ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες που επικρατούν κατά την καλλιέργεια. Μπορεί να είναι έλλοβα ή σύνθετα, συνήθως αποτελούμενα από 5-9 φυλλάρια. Όλα τα φύλλα καλύπτονται από αδενώδεις τρίχες και έχουν βαθύ πράσινο χρώμα στην επάνω επιφάνεια και ελαιώδες στην κάτω (Εικόνα 1.3).

Το φυτό της τομάτας έχει ερμαφρόδιτα άνθη, τα οποία συνήθως είναι αυτογονιμοποιούμενα και σπανιότερα σταυρογονιμοποιούμενα. Τα άνθη είναι κατανεμημένα σε ταξιανθίες, αποτελούμενες από 4-12 άνθη ανά ταξιανθία. Μετά τη γονιμοποίηση, προκύπτουν 2-8 καρποί ανά ταξιανθία (Εικόνα 1.3).

Ο καρπός της τομάτας είναι σφαιρικός ή ωσειδής. Τα βοτανικά χαρακτηριστικά του καρπού είναι αυτά του καρπού ράγα. Έχει λεπτή επιδερμίδα και χονδρό περικάρπιο,

αποτελείται συνήθως από 2-25 καρπόφυλλα, στο εσωτερικό των οποίων υπάρχουν τα σπέρματα. Τα σπέρματα περιβάλλονται από ένα ζελατινώδες υγρό, και κάθε καρπός μπορεί να περιέχει 50-200 σπέρματα (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά τομάτας (Πηγή: www.meteofarm.gr).

1.4. Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις

Η τομάτα είναι ένα φυτό που συνήθως καλλιεργείται ως μονοετές και ο κύκλος της καλλιέργειάς του περιλαμβάνει συνήθως μία άνοιξη και ένα καλοκαίρι. Η αύξηση και ανάπτυξη της τομάτας απαιτεί θερμό κλίμα καθώς συγκαταλέγεται στα φυτικά είδη που δεν είναι καθόλου ανθεκτικά στο κρύο και τους παγετούς. Το θερμοκρασιακό εύρος που απαιτείται για την απρόσκοπτη ανάπτυξη και εύρυθμη λειτουργία του φυτού κυμαίνεται μεταξύ 21-25 °C για την ημέρα και 13-16 °C για τη νύχτα. Σε θερμοκρασίες

κάτω των 12 °C και μέχρι 2 °C το φυτό μπορεί να επιβιώσει, αλλά για την ομαλή αύξηση και ανάπτυξή του είναι απαραίτητες θερμοκρασίες άνω των 18 °C. Επίσης, κατά την επικράτηση πολύ υψηλών θερμοκρασιών, άνω των 30 °C, παρατηρείται καθυστέρηση στην ανάπτυξη του φυτού ή ακόμα και διακοπή της σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 35 °C.

Η τομάτα μπορεί να καλλιεργηθεί σε ένα εύρος εδαφικών τύπων και συνθηκών, ωστόσο οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη και απόδοσή της περιλαμβάνουν την καλλιέργειά σε βαθιά και με καλή αποστράγγιση εδάφη καθώς και υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία. Γενικά, ως ιδανικά για την καλλιέργεια της τομάτας θεωρούνται τα αμμοπηλώδη εδάφη. Αντιστοίχως, ως άριστο για την ανάπτυξη της καλλιέργειας θεωρείται το εύρος pH 6 - 6.5, ενώ και τιμές pH έως 7.5 δεν επιφέρουν προβλήματα στην καλλιέργεια.

1.5. Διατροφική αξία

Η τομάτα αποτελεί πλέον ένα από τα βασικά στοιχεία της διατροφής του ανθρώπου. Οι καρποί της παρουσιάζουν υψηλή θρεπτική αξία καθώς είναι πλούσιοι σε πρωτεΐνες, λιπίδια σάκχαρα, διαθέτοντας παράλληλα υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά, μέταλλα (K και Fe) και βιταμίνες (Πίνακας 1). Οι καρποί της τομάτας είναι πλούσιοι σε βιταμίνες (βιταμίνη C, βιταμίνη A, βιταμίνες του συμπλέγματος B, βιταμίνη K), ιχνοστοιχεία και αποτελούν την κύρια πηγή λυκοπενίου, το οποίο ανήκει στα καροτενοειδή και φέρει πολλά οφέλη για την υγεία (Πίνακες 2 και 3). Υπάρχουν ενδείξεις ότι περιορίζει την πιθανότητα εμφάνισης διάφορων τύπων καρκίνων και ιδιαίτερα του καρκίνου του προστάτη, καθώς επίσης, αναφέρεται ότι περιορίζει τον κίνδυνο εμφάνισης διάφορων καρδιαγγειακών νόσων.

Το λυκοπένιο (ψ , ψ -καροτένιο) είναι η ουσία που προσδίδει το κόκκινο χρώμα στις τομάτες, ενώ αντίστοιχα το β -καροτένιο είναι υπεύθυνο για το χρώμα στις κίτρινες. Ένα σημαντικό ποιοτικό χαρακτηριστικό αποτελεί η περιεκτικότητα του καρπού σε σάκχαρα και οργανικά οξέα, καθώς και η μεταξύ τους αναλογία, από την οποία εξαρτάται η γεύση της τομάτας.

Πίνακας 1.1. Θρεπτική αξία τομάτας (πηγή USDA, 2021).

Κύρια Συστατικά	Περιεκτικότητα / 100g
Νερό	94.7 g
Ενέργεια	19 kcal
Άζωτο	0.11 g
Πρωτεΐνες	0.7 g
Λιπαρά	0.42 g
Υδατάνθρακες	3.9 g
Φυτικές ίνες	1.2 g
Σάκχαρα	2.6 g

Πίνακας 1.2. Σύσταση τομάτας σε μικροστοιχεία (πηγή USDA, 2021).

Μέταλλα	Περιεκτικότητα / 100g
Ασβέστιο (Ca)	10 mg
Σίδηρος (Fe)	0.1 mg
Μαγνήσιο	8.1 mg
Φώσφορος	19 mg
Κάλιο	193 mg
Νάτριο	<2.5 mg
Ψευδάργυρος	0.08 mg
Σελίνιο	<2.5 μg

Πίνακας 1.3. Περιεκτικότητα τομάτας σε βιταμίνες (πηγή USDA, 2021).

Βιταμίνες και άλλα συστατικά	Περιεκτικότητα / 100g
Ασκορβικό οξύ (βιτ. C)	17.8 mg
Βιταμίνη Β6	0.079 mg
Βιταμίνη Α	24 μg
β-καροτένιο	276 μg
α-καροτένιο	1 μg

γ-καροτένιο	2 μg
Θιαμίνη (B1)	0.056 mg
Ριβοφλαβίνη (B2)	<0,1 mg
Νιασίνη (B3)	0.533 mg
Λυκοπένιο	2860 μg
Λουτεΐνη	56 μg

1.6. Βελτίωση της τομάτας

Το φυτό της τομάτας εδώ και πάνω από δύο αιώνες υφίσταται βελτιωτικές διαδικασίες που προσβλέπουν πρωτίστως στην αναβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του καρπού αλλά και στην ενίσχυση της απόδοσης και βελτίωση των αγρονομικών χαρακτηριστικών της καλλιέργειας. Πέραν των ανωτέρω γενικών βελτιωτικών στόχων, σημαντικό ρόλο ως προς τους στόχους που τίθενται στο εκάστοτε πρόγραμμα βελτίωσης έχει η χρήση της νέας ποικιλίας και η κατεύθυνση της παραγωγής. Στη βιομηχανική τομάτα, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καρπών, όπως η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και διαλυτά στερεά συστατικά. Κατ' αντιστοιχία, στις επιτραπέζιες τομάτες κύριο βελτιωτικό στόχο αποτελεί η αναβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του καρπού, με κυριότερα το μεγάλο μέγεθος, την ομοιομορφία σε χρώμα και μέγεθος και τη διάρκεια ζωής στο ράφι. Στο πλαίσιο αυτό, τα προγράμματα βελτίωσης της τομάτας έχουν συμβάλλει στην ανάπτυξη ποικιλιών με διαφορετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως σχήμα, μέγεθος, χρώμα, πολλές από τις οποίες καλλιεργήθηκαν για πολλά χρόνια και ορισμένες καλλιεργούνται μέχρι σήμερα. Πέραν των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των καρπών, οι πλέον διαδεδομένες ποικιλίες έχουν διακριθεί για την ιδιαίτερη γεύση τους και είναι ευρέως γνωστές ως “τομάτες κειμήλια” (heirloom tomatoes).

Η τομάτα είναι διπλοειδής οργανισμός με αριθμό χρωμοσωμάτων $2n = 24$. Το γονιδίωμα της τομάτας αποτελείται από 950 Mb, από το οποίο περίπου το 75 % αποτελείται από ετεροχρωματίνη και στερείται γονιδίων (Diez and Nuez, 2008). Η τομάτα αποτελεί ιδανικό υλικό για έρευνα στους τομείς της μοριακής γενετικής και της φυσιολογίας χάρη στην ευκολία της αναπαραγωγής της και στο ότι παράγει πολλούς

σπόρους ανά φυτό. Επιπλέον, αποτελεί φυτικό είδος που είναι σχετικά επιδεκτικό σε ποικίλους χειρισμούς, όπως οι εμβολιασμοί (Bebeli and Mazzucato, 2008). Το σύνολο αυτών των χαρακτηριστικών της την έχουν αναδείξει ως είναι είδος που χρησιμοποιείται ευρέως ως «φυτό-μοντέλο» σε έρευνες της γενετικής και της βελτίωσης φυτών.

1.6.1. Κλασικές βελτιωτικές διαδικασίες

Η διαδικασία βελτίωσης μέσω της φυσικής επιλογής ήταν συνήθης πρακτική ήδη πριν το 1925. Αργότερα, η έρευνα για τη βελτίωση της τομάτας βασίστηκε στη διεξαγωγή ελεγχόμενων διασταυρώσεων, οι οποίες εξάλλου οδήγησαν στην πλειονότητα των καλλιεργούμενων ποικιλιών-υβριδίων. Στις καλλιεργούμενες ποικιλίες τομάτας, η γενετική παραλλακτικότητα είναι πολύ μικρή, μικρότερη του 5 %, ωστόσο η διασταύρωση καθαρών σειρών με γενετική ανομοιότητα και καλή μεταξύ τους συνδυαστική ικανότητα προσφέρει δυνατότητες δημιουργίας ετέρωσης. Η ετέρωση σημειώνεται συχνότερα στην ευρωστία, στην ανάπτυξη, στην πρωιμότητα, στην παραγωγικότητα, στην ομοιομορφία και στην προσαρμοστικότητα σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Με τη συμβολή της ετέρωσης, οι διαδικασίες υβριδισμού έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη πληθώρας υβριδίων που εμφανίζουν αυξημένη απόδοση, βελτιωμένη ποιότητα καρπών και γνωρίσματα ανθεκτικότητας, ενώ παράλληλα δημιουργήθηκαν αρρενόστερες σειρές που συμβάλλουν στη βελτιωτική διαδικασία και διατήρηση της καθαρότητας των ποικιλιών. Σήμερα, τα προγράμματα βελτίωσης στοχεύουν στην ανάπτυξη ποικιλιών κατάλληλων για συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας ή/και κατεύθυνση χρήσης, όπως μηχανική συγκομιδή, θερμοκηπιακή καλλιέργεια, μετασυλλεκτική επεξεργασία για παραγωγή μεταποιημένων προϊόντων.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση της τομάτας είναι οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε όλα τα αυτογονιμοποιούμενα είδη, οι οποίες περιλαμβάνουν τη γενεαλογική μέθοδο, την αναδιασταύρωση, τη μαζική επιλογή και την καταγωγή από μεμονωμένους σπόρους (Traka-Mavroua et al., 2000). Η κλασική διαδικασία περιλαμβάνει οπτική αξιολόγηση και επιλογή βάσει φαινοτυπικών δεδομένων, γεγονός που δεν την καθιστά εύχρηστη, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για γνωρίσματα που έχουν χαμηλό ή ακόμα και μέτριο συντελεστή κληρονομικότητας. Αντίστοιχα, η μέθοδος της

μαζικής επιλογής έχει αποδειχθεί αποτελεσματικότερη για την ανάπτυξη ποικιλιών με καλύτερη σταθερότητα απόδοσης. Η αποτελεσματικότερη μέθοδος για την ταυτόχρονη βελτίωση πολλών γνωρισμάτων στις πρώτες γενιές στην τομάτα είναι η γαμετική επιλογή (Traka-Mavrona et al., 2000).

Μία από τις πλέον σημαντικές διαδικασίες ωστόσο συνιστά η υβριδοποίηση, μέσω διασταύρωσης μεταξύ διαφορετικών σειρών με συμπληρωματικά χαρακτηριστικά, για τη δημιουργία διασπώμενων πληθυσμών που αποτελούν πληθυσμούς-πηγές για την παραγωγή υβριδίων ή ημισυγγενικών σειρών με τη γενεαλογική μέθοδο. Τέλος, η αναδιασταύρωση έχει συμβάλει επιτυχώς στην ανάπτυξη ποικιλιών με την ενσωμάτωση συγκεκριμένων επιθυμητών γνωρισμάτων, συνήθως μονογονιδιακών, σε μία κατά τα άλλα καλή σειρά (elite). Για την ενσωμάτωση πολυγονιδιακών γνωρισμάτων, όπως η αντοχή στις αβιοτικές, με τη μέθοδο της αναδιασταύρωσης προϋποθέτει διαδικασίες αυτογονιμοποίησης έπειτα από κάθε γενεά, γεγονός που οφείλεται στο μειωμένο βαθμό έκφρασης των εν λόγω γνωρισμάτων και της δυσκολίας του γενετικού ελέγχου τους (Diez and Nuez, 2008). Η μέθοδος της καταγωγής από μεμονωμένους σπόρους είναι η συνηθέστερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ημισυγγενικών σειρών που χρησιμοποιούνται ως μητρικές σειρές για τη δημιουργία υβριδίων.

Η βελτίωση των ποσοτικών γνωρισμάτων, που εμφανίζουν πιο σύνθετη γενετική βάση, λόγω του πολυγονιδιακού τους χαρακτήρα αλλά της σημαντικής περιβαλλοντικής επίδρασης, αξιοποιεί κατά κύριο λόγο τα σχήματα επαναλαμβανόμενης επιλογής που στοχεύουν στη συστηματική αύξηση της συχνότητας των υπέρτερων αλληλομόρφων ώστε να αναβαθμισθεί ο μέσος όρος του πληθυσμού προς την επιθυμητή κατεύθυνση. Η επαναλαμβανόμενη επιλογή περιλαμβάνει τη δημιουργία οικογενειών, την απογονική αξιολόγηση και το μετέπειτα ανασυνδυασμό των επιλεγέντων με στόχο τη δημιουργία πληθυσμών από όπου μπορούν να προκύψουν οι ημισυγγενικές σειρές με τη μέθοδο της γενεαλογικής επιλογής.

Περαιτέρω, η ανάπτυξη υπέρτερων σειρών έχει προσεγγιστεί μέσω μεθόδων ιστοκαλλιέργειας, συμπεριλαμβανομένων της καλλιέργειας εμβρύων και ανθέρων. Τέλος, τα τελευταία χρόνια, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει εστιάσει στην αξιοποίηση των μοριακών δεικτών με στόχο την αναβάθμιση και επιτάχυνση των διαδικασιών επιλογής ανθεκτικών γονοτύπων, υπό την προϋπόθεση της

διαθεσιμότητας δεικτών που εμφανίζουν στενή γενετική σύνδεση με το προς επιλογή γνώρισμα (Diez and Nuez, 2008).

Γενεαλογική Μέθοδος Επιλογής

Η γενεαλογική μέθοδος αποτελεί μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους στα αυτογονιμοποιούμενα είδη για την ανάπτυξη βελτιωμένων σειρών. Η εφαρμογή της μεθόδου σε αυτογονιμοποιούμενα και σε σταυρογονιμοποιούμενα είδη δεν παρουσιάζει διαφορές, με εξαίρεση ότι στα πρώτα η συγγενική αναπαραγωγή προκύπτει φυσικά, ενώ στα τελευταία γίνεται τεχνητά (Fehr, 1980).

Η μέθοδος της γενεαλογικής επιλογής εφαρμόστηκε αρχικά σε αυτογονιμοποιούμενα είδη με στόχο την επιλογή και απομόνωση υπέρτερων καθαρών σειρών. Η γενεαλογική επιλογή έχει εφαρμογή σε όλα τα κύρια καλλιεργούμενα είδη, όμως ευνοεί τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και όχι τόσο τα ποσοτικά (Stoskopf et al., 1999). Τα στάδια για την εφαρμογή της γενεαλογικής μεθόδου είναι η επιλογή ατομικών φυτών, η δημιουργία απογονικών οικογενειών και η αξιολόγηση βάσει των χαρακτηριστικών των απογόνων. Ο σπόρος κάθε φυτού συλλέγεται ατομικά και συνιστά μία ξεχωριστή οικογένεια που σπέρνεται σε μία γραμμή εναλλάξ με το σπόρο που αποτελεί τον μάρτυρα. Όλα τα φυτά κωδικοποιούνται και για κάθε φυτό καταγράφεται το σύνολο της γενεαλογικής πληροφορίας σε όλες τις γενεές.

Οι διαδικασίες που ακολουθούνται για την εφαρμογή της γενεαλογικής επιλογής είναι σαφώς πολυπλοκότερες, συγκριτικά με τις αντίστοιχες της μαζικής επιλογής, ωστόσο η πρώτη εξασφαλίζει μεγαλύτερη γενετική πρόοδο στις απογονικές σειρές. Στα αυτογονιμοποιούμενα είδη, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επίτευξη ομοζυγωτίας, έπειτα από ορισμένες γενεές αυτογονιμοποίησης. Η αποφυγή πρώιμης επιλογής, ιδιαίτερα για γνωρίσματα με χαμηλό συντελεστή κληρονομικότητας, και η διενέργεια επιλογών σε μεταγενέστερο χρόνο εξασφαλίζει τη διατήρηση της γενετικής παραλλακτικότητας και ενισχύει την αξιοπιστία των επιλογών σε φυτά όπου έχει επιτευχθεί ένα ικανοποιητικό επίπεδο ομοζυγωτίας. αξιολόγηση και επιλογή, επειδή οι πληθυσμοί των φυτών αυτών αποτελούνται από ομόζυγους γονότυπους, δεν απαιτούνται πολλές διασταυρώσεις ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ομοζυγωτία.

Η μέθοδος της γενεαλογικής επιλογής προφέρει πλεονεκτήματα όπως η δυνατότητα απομάκρυνσης των μη επιθυμητών, εμφανώς υστερούντων, γονότυπων σε πρώιμα στάδια, μειώνοντας σημαντικά το κόστος διαχείρισης ενός μεγάλου αριθμού

γονοτύπων για αρκετές γενεές επιλογής. Η αποτελεσματικότητα των επιλογών μπορεί να ενισχυθεί καθώς όλα τα φυτά σε κάθε γενεά βρίσκονται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και έτσι δίνεται η δυνατότητα να εκφραστεί στο μέγιστο βαθμό η υπάρχουσα γενετική παραλλακτικότητα. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι γενετικές σχέσεις μεταξύ των σειρών είναι γνωστές, επιτρέπει την ποσοτικοποίηση αλλά και τη μεγιστοποίηση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των σειρών που επιλέγονται (Fehr, 1980).

Κυψελωτή Μέθοδος Επιλογής

Η κυψελωτή μέθοδος επιλογής περιλαμβάνει πειραματικά σχέδια επιλογής όπου τα μητρικά φυτά σπέρνονται με μικρή πυκνότητα σποράς, σε μοτίβο ισόπλευρου τριγωνικού πλέγματος, έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα εξάγωνο, στο κέντρο του οποίου υπάρχει πάντα ένα φυτό (Fasoulas, 1973). Η συγκεκριμένη διάταξη καθιστά εφικτή την παράκαμψη των συνθηκών ανταγωνισμού που μπορεί να δημιουργηθούν μεταξύ των φυτών, οδηγώντας σε μεγιστοποίηση της έκφρασης της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας και ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα των επιλογών. Η απόδοση του κάθε φυτού αξιολογείται συγκριτικά με τις αποδόσεις των γειτονικών φυτών και τελικά επιλέγονται τα φυτά που υπερτερούν ως προς την απόδοση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα φυτά που βρίσκονται στο ίδιο εξάγωνο. Η κυψελωτή μέθοδος επιλογής θεωρείται αποτελεσματικότερη σε σχέση με άλλες μεθόδους (Vlachostergios et al., 2011) και είναι ιδανική για την επίτευξη σταθερής απόδοσης, αντοχής στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και προσαρμοστικότητας σε συνθήκες χαμηλών εισροών.

1.6.2. Βελτίωση τομάτας με μεθόδους ιστοκαλλιέργειας

Ως ιστοκαλλιέργεια, ή εναλλακτικά *in vitro* καλλιέργεια, καλείται η διαδικασία ανάπτυξης οργάνων, φυτικών ιστών ή ακόμη και κυττάρων σε συνθετικά υποστρώματα υπό ελεγχόμενες ασηπτικές συνθήκες. Σε πρακτικό επίπεδο, στον γεωργικό τομέα, η ιστοκαλλιέργεια βρίσκει εφαρμογή στη δημιουργία πολλαπλασιαστικού υλικού. Η ιστοκαλλιέργεια αφορά την καλλιέργεια ενός συγκεκριμένου είδους εκφύτου, το οποίο πρακτικά συνιστά το φυτικό μέρος που τοποθετείται προς καλλιέργεια εντός ή επι των

υποστρωμάτων. Με τον όρο ιστοκαλλιέργεια καλύπτεται ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που περιλαμβάνουν την καλλιέργεια πρωτοπλαστών, κάλων, κυτταρικών εναιωρημάτων, ανθήρων, οργάνων και μεριστωμάτων.

Η ιστοκαλλιέργεια, πέραν της δυνατότητας για μαζική παραγωγή φυτικού υλικού, έχει πλήθος εφαρμογών, όπως η επιλογή κυτταρικών σειρών με γενετική ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων, η ανάπτυξη απλοειδών φυτών, ο *in vitro* πολλαπλασιασμός γενετικά όμοιων φυτών και η δημιουργία σωματικών υβριδίων (Bhatia et al., 2004). Αξίζει δε να σημειωθεί ότι η ιστοκαλλιέργεια αποτελεί βασικό στάδιο του συνόλου των πρωτοκόλλων γενετικής τροποποίησης, είτε με την χρήση άμεσων μεθόδων μετασχηματισμού, όπως η ηλεκτροδιάτρηση και ο σωματιδιακός βομβαρδισμός, είτε με τη χρήση φορέων, με κυριότερο το αγροβακτήριο. Η ιστοκαλλιέργεια αξιοποιείται επίσης για την παράκαμψη προβλημάτων που σχετίζονται με την ριζογένεση των μοσχευμάτων, την αδυναμία βλάστησης των σπόρων καθώς και την ανάπτυξη άνοσου πολλαπλασιαστικού υλικού. Ως εκ τούτου, η ιστοκαλλιέργεια αναγνωρίζεται και αξιοποιείται ως ένα βασικό εργαστηριακό μέσο, αξιοποιούμενο τόσο στο πλαίσιο ανάπτυξης επιλεγμένου κυτταρικού υλικού όσο και μελέτης ανατομικών, φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των φυτών.

Σημαντικότερη προϋπόθεση για την επιτυχή εφαρμογή οποιουδήποτε συστήματος ιστοκαλλιέργειας είναι η χρήση κατάλληλου τύπου εκφύτου και θρεπτικού υποστρώματος. Με τον όρο θρεπτικό υπόστρωμα νοείται το υλικό στο οποίο μέσα ή στην επιφάνεια του περιέχεται το έκφυτο περιέχοντας όλα τα μακροστοιχεία, βιταμίνες και μικροστοιχεία, τους ρυθμιστές αύξησης και ανάπτυξης και τα σάκχαρα που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη του εκφύτου. Το πλέον πολυχρησιμοποιούμενο υπόστρωμα για καλλιέργεια τομάτας είναι το MS (Murashige and Skoog, 1962) ή τροποποιημένο MS, που αφορά σε ποικίλες τροποποιήσεις της αρχικής σύνθεσης (Chandel and Katiyar, 2000; Park et al., 2001). Τα θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται είτε στην υγρή τους μορφή, ως διαλύματα, είτε στη στερεή τους μορφή που αφορά σε γέλη που στερεοποιείται με την προσθήκη άγαρ. Οι ρυθμιστές αύξησης ποικίλουν και είναι ανάλογοι με τον σκοπό της *in vitro* καλλιέργειας αλλά και παράγοντες που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με το φυτικό είδος. Σε κάθε περίπτωση, η διαδικασία περιλαμβάνει τοποθέτηση των εκφύτων σε κατάλληλα δοχεία ιστοκαλλιέργειας και ανάπτυξη σε θαλάμους ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού.

In vitro αναγέννηση φυτών

Η βάση των περισσότερων συστημάτων αναγέννησης των *in vitro* καλλιεργειών αποτελεί η πλαστικότητα και η ολοδυναμία των φυτικών κυττάρων (Hansen & Wright, 1999). Ως πλαστικότητα ορίζεται η δυνατότητα προσαρμογής του μεταβολισμού των φυτών αλλά και της αύξησης και ανάπτυξής τους, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, η οποία οδηγεί σε μεταβολή της κυτταρικής διαίρεσης, στο σύνολο σχεδόν των φυτικών ιστών, με τρόπο που εκτρέπει την αναπτυξιακή πορεία από τη φυσιολογική. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα έκφυτα δημιουργούν κάλο έχοντας επανέλθει σε μεριστωματική κατάσταση και, σε συνάντηση με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα που είναι εμπλουτισμένο με ρυθμιστές αύξησης, σχηματίζουν νέο φυτικό όργανο ή ολοκληρωμένο φυτό, διερχόμενα από διαδικασίες αναγέννησης. Ωστόσο, διαφοροποίηση των ιστών μπορεί να συμβεί και απουσία καλογένεσης, μέσω αναγέννησης ιστών από βλαστικούς οφθαλμούς, ρίζες ή σωματικά έμβρυα.

Ως ολοδυναμία ορίζεται η ικανότητα των φυτικών κυττάρων, υπό κατάλληλες συνθήκες, να εκφράσουν το μητρικό γενετικό δυναμικό τους και να παράγουν μέσω αναγέννησης όλους τους τύπους φυτικών ιστών και οργάνων (Slater et al., 2003). Εξαιτίας των δύο αυτών φαινομένων, της πλαστικότητας και της ολοδυναμίας, τα κύτταρα των φυτών έχουν την ικανότητα να επανέρχονται στην μεριστωματική τους κατάσταση με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε διαφορετικά μεταβολικά-αναπτυξιακά μονοπάτια με την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, υπό την προϋπόθεση ότι παραμένει ακέραιη η κυτταροπλασματική τους μεμβράνη.

Η *in vitro* αναγέννηση περιλαμβάνει 3 διαφορετικές προσεγγίσεις, τη σωματική εμβρυογένεση, την οργανογένεση και τη ριζογένεση, των οποίων η καταλληλότητα ορίζεται κατά βάση από το φυτικό είδος. Παρά τα οφέλη του *in vitro* πολλαπλασιασμού, η διαδικασία εμπεριέχει ορισμένες δυσκολίες που σχετίζονται κυρίως με την επιδεκτικότητα των κυττάρων, η οποία καθορίζεται τόσο σε επίπεδο είδους όσο και γονοτύπου. Για το λόγο αυτό, η επιτυχής εφαρμογή οποιουδήποτε πρωτοκόλλου *in vitro* καλλιέργειας, αρχικά προϋποθέτει τη βελτιστοποίηση των συνθηκών σύμφωνα με το είδος, με τα ποσοστά επιτυχούς αναγέννησης συχνά να κυμαίνονται σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Περαιτέρω, μία δυσκολία που συχνά συνοδεύει τις διαδικασίες αναγέννησης ιστών είναι η υαλοποίηση (hyperhydricity ή

vitrification), η οποία αφορά σε δυσμορφία των ιστών που αποκτούν διάφανη και εύθραυστη εμφάνιση με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, οδηγώντας σε σημαντική μείωση της ικανότητας αναγέννησης ιστών. Η έκταση της υαλοποίησης εξαρτάται από το υδατικό δυναμικό αλλά και την ενδογενή κατανομή θρεπτικών και άλλων στοιχείων αφομοίωσης.

Στο είδος της τομάτας, η *in vitro* αναγέννηση φυτών αποτελεί αντικείμενο πολυετούς έρευνας λόγω της εμπορικής αξίας της καλλιέργειας αλλά και των δυνατοτήτων που προσφέρονται για βελτίωσή της μέσω γενετικών χειρισμών (Evans, 1989). Ως εκ τούτου, έχει επιδιωχθεί η αναγέννηση φυτών τομάτας, χρησιμοποιώντας ως έκφυτα ποικίλους ιστούς και όργανα (Bhatia et al., 2004).

Με δεδομένο ότι η τομάτα αποτελεί αυτογονιμοποιούμενο είδος, η παραγωγή σπόρου υβριδίου καθίσταται κοστοβόρα και πολύπλοκη, καθώς απαιτείται ακριβής έλεγχος της γονιμοποίησης και παραγωγής σπόρου που συνιστά προϊόν υβριδοποίησης. Η διαδικασία παραγωγής σπόρου υβριδίου δυσχεραίνεται περαιτέρω από τις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες, με κυριότερους περιοριστικούς παράγοντες τις βροχές και τους ανέμους, με να αυξάνεται το κόστος και παραγωγής του υβριδίοσπορου. Βάσει των ανωτέρω, η ιστοκαλλιέργεια προβάλλεται ως μία εναλλακτική προσέγγιση για μαζική παραγωγή φυταρίων υψηλής ποιότητας. Για το σκοπό αυτό, έχουν αξιοποιηθεί διάφορες μέθοδοι, όπως η καλλιέργεια πρωτοπλαστών, η σωματική εμβρυογένεση (Kararakis and Anderson, 2008) και η άμεση οργανογένεση (Ichimura and Oda, 1998). Για την τομάτα ωστόσο, ως πλέον αποδοτική αναδείχθηκε η μέθοδος της οργανογένεσης, χρησιμοποιώντας ως έκφυτα φύλλα, υποκότυλα ή κοτυληδόνες ή κάνοντας απευθείας από μίσχους και στελέχη μέσω ενός λεπτού στρώματος εκ των δύο. Η βλαστογένεση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω κάλων ή άμεσα, καθώς και η δύο τύποι ιστών μπορούν να εμφανιστούν ταυτόχρονα στην τομάτα (Bhatia et al., 2004). Σημειώνεται ωστόσο ότι η αποτελεσματικότητα των διαδικασιών αναγέννησης στην τομάτα σημαντική γονοτυπική εξάρτηση, ενώ επηρεάζεται ταυτόχρονα από τον τύπο του εκφύτου που χρησιμοποιείται καθώς και τους ρυθμιστές αύξησης που προστίθενται στο θρεπτικό υπόστρωμα (Εικόνα 1.4) (Bhatia et al., 2004).



Εικόνα 1.4 Παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η αποτελεσματικότητα των διαδικασιών αναγέννησης ιστών και οργάνων στην τομάτα.

→ Γονότυπος: Οι γονότυποι της τομάτας αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στους ρυθμιστές αύξησης που προστίθενται στα θρεπτικά υποστρώματα κατά την αναγέννηση ιστών και οργάνων. Η απόκριση του γονοτύπου στους ρυθμιστές αύξησης αποτελούν κληρονομήσιμα γνωρίσματα που ελέγχονται από πυρηνικά αλλά και κυτοπλασματικά γονίδια. Ο γονότυπος επιδρά σημαντικά και στην καταλληλότητα του είδους του εκφύτου, με αποτέλεσμα η ιστοκαλλιέργεια στην τομάτα να καθίσταται δύσκολη αφού ο κάθε γονότυπος μελετάται ξεχωριστά (Bhatia et al., 2004)

→ Είδος εκφύτου: Ο τύπος του εκφύτου, η ηλικία, ο τρόπος χειρισμού και το μέγεθός του επηρεάζουν την αύξηση και ανάπτυξη των οργάνων που αναγεννούνται. Σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση διαδραματίζει η εποχή του έτους αλλά και το περιβάλλον στο οποίο το πατρικό φυτό έχει αναπτυχθεί. Η ανταπόκριση εκφύτων τομάτας προερχόμενων από σπορόφυτα τα οποία έχουν αναπτύσσονται σε

θερμοκήπιο διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τα αντίστοιχα που αναπτύσσονται σε *in vitro* συνθήκες (Frankenberger et al., 1981a,b)

Για την αναγέννηση στην τομάτα, έχει επιχειρηθεί η αξιοποίηση πληθώρας εκφύτων διαφορετικού τύπου, όπως κοτυληδόνες, υποκότυλα, τμήματα φύλλων, βλαστών και ανθέων (Bertram and Lercari, 2000; Kararakis and Alderson, 2002; Velcheva et al., 2005) και παρατηρήθηκε η διαφορετική αποτελεσματικότητά τους. Η καταλληλότητα του εκφύτου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την επιδεκτικότητα του στην αναγέννηση ιστών και γενικά με την ικανότητα να αποκρίνεται θετικά στην ιστοκαλλιέργεια. Ανάλογα με την ικανότητα βλαστογένεσης, τα διαφορετικά έκφυτα κατατάσσονται, ανάλογα με την επιδεκτικότητα και αποτελεσματικότητά τους, ως εξής: υποκότυλα > κοτυληδόνες > φύλλα (Plastira and Perdikaris, 1997). Ωστόσο, η κατάταξη αυτή διαφωνεί με άλλες αναφορές, όπου ως πλέον κατάλληλα αναδεικνύονται τα έκφυτα που προέρχονται από κοτυληδόνες, οι οποίες φαίνεται να υπερτερούν έναντι των υποκότυλων (Wu et al., 2006).

- Ηλικία εκφύτου: Η ηλικία του εκφύτου είναι παράγοντας επηρεασμού της επιτυχίας της ιστοκαλλιέργειας, με τους ιστούς νεαρών και τρυφερών τμημάτων να επηρεάζουν θετικά την αποτελεσματικότητα σε σχέση με τους γηραιότερους. Ωστόσο, επίσης έχει αναφερθεί πως η αναγεννητική ικανότητα της τομάτας αυξάνεται με αύξηση της ηλικίας του εκφύτου (Bhatia et al., 2004).
- Μέγεθος εκφύτου: Το μέγεθος του εκφύτου είναι αρκετά σημαντικό για την αποτελεσματική αναγέννηση. Οι περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο σχηματίζονται με χρήση μικρού μεγέθους εκφύτων παρά με μεγαλύτερα (Chandel and Katiyar, 2000)
- Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος: Το πιο διαδεδομένο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην ιστοκαλλιέργεια τομάτας είναι το MS ή διάφορες παραλλαγές αυτού όπως για παράδειγμα το MS με την προσθήκη 100 mg/l μυο-ινοσιτόλης (Chandel & Katiyar, 2000; Park et al., 2001). Η ικανότητα αναγέννησης στην τομάτα εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών, αντιοξειδοτικών ουσιών, σακχάρων και οργανικών και ανόργανων ενώσεων που απαντώνται στα υποστρώματα καλλιέργειας.

→ Ρυθμιστές αύξησης: Η μορφογενετική ανταπόκριση επηρεάζεται από τους ρυθμιστές αύξησης, οι οποίοι επηρεάζουν σημαντικά και τροποποιούν ένα εύρος φυσιολογικών διαδικασιών. Η συγκέντρωση και ο τύπος των φυτορμονών που περιέχονται στο θρεπτικό υπόστρωμα αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς παράγοντες κατά την αναγέννηση των εκφύτων (El-Bakry, 2002). Στην τομάτα, έχει αξιοποιηθεί μία πληθώρα διαφορετικών ρυθμιστών αύξησης και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκέντρωση των ρυθμιστών αύξησης επιδρά στο χρόνο που απαιτεί η οργανογένεση αλλά στον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (Costa et al., 2000; Venkatachalam et al., 2000).

1.7. Γενετική Μηχανική

Στο παρελθόν, ακόμη και πριν την απόκτηση γνώσης σχετικά με τους φορείς και τη ροή της γενετικής πληροφορίας καθώς και τον έλεγχο κληρονομής των γνωρισμάτων, τέθηκαν τα θεμέλια της Βελτίωσης Φυτών, με την ασυνείδητη έστω επιλογή και, μετέπειτα, διασταύρωση φυτών που συγκεντρώνουν επιθυμητά χαρακτηριστικά. Οι μέθοδοι της κλασικής βελτίωσης, μιμούμενες τη φύση, αξιοποιούν τα σχήματα υβριδισμού, μέσω διασταυρώσεων και άλλων τεχνικών, προκειμένου να επιτευχθεί ανασυνδυασμός και ενσωμάτωση γονιδίων που ελέγχουν την έκφραση επιθυμητών γνωρισμάτων μεταξύ φυτών του ίδιου είδους ή ακόμη και διαφορετικών ειδών που ανήκουν στο ίδιο ή σε συγγενικά γένη. Η τεχνολογία της γενετικής μηχανικής άρχισε να αναπτύσσεται σημαντικά έπειτα από την ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών από τους Smith και Wilcox το 1970, ενώ οι προοπτικές αυτής ενισχύθηκαν περαιτέρω έπειτα από την ανακάλυψη της μεθόδου προσδιορισμού της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων της αλυσίδας του DNA από τον Sanger το 1977.

Η γενετική μηχανική προσφέρει δυνατότητες αναγνώρισης, επιλογής και στοχευμένης ενσωμάτωσης γονιδίων ενδιαφέροντος από οποιονδήποτε οργανισμό-δότη σε έναν οργανισμό-δέκτη, με στόχο την ανάπτυξη νέων ποικιλιών με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Πέραν της επιτάχυνσης της βελτιωτικής διαδικασίας, η γενετική μηχανική προσφέρει διευρυμένες δυνατότητες και στο εύρος της βελτίωσης των φυτών, καθώς μέσω αυτής μπορούν να προσδοθούν στα φυτά γονίδια ανθεκτικότητας

σε ασθένειες, παράσιτα, χημικές ουσίες που προέρχονται από την εφαρμογή ζιζανιοκτόνων, αλλά και γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, η διαδικασία της ενσωμάτωσης γονιδίων ενδιαφέροντος συχνά προσβλέπει στη βελτίωση ποιοτικών γνωρισμάτων, όπως η γεύση, το άρωμα, το χρώμα, η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά, αλλά και μετασυλλεκτικών χαρακτηριστικών, όπως για παράδειγμα η αύξηση του χρόνου διατήρησης μετασυλλεκτικά.

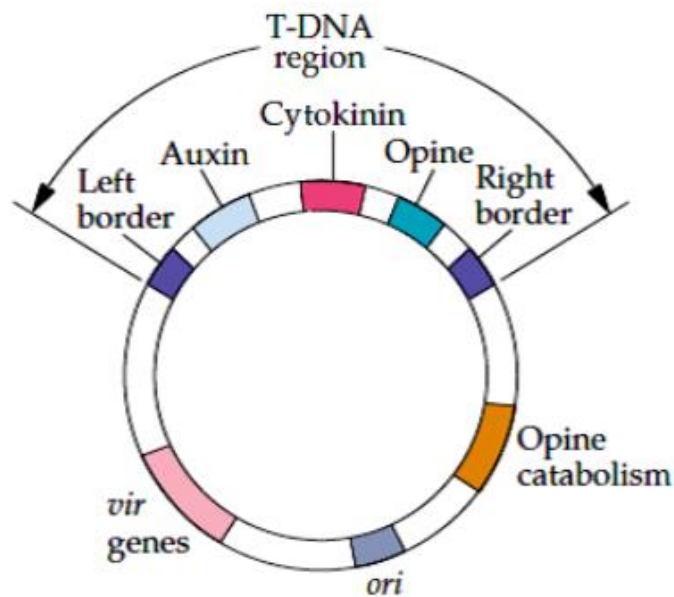
Η γενετική μηχανική αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στον ευρύτερο τομέα της φυτοπροστασίας. Στη φύση, απαντάται πληθώρα συστατικών που εμφανίζουν προστατευτική δράση έναντι διαφόρων οργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες, έντομα και φυτά. Με τη συμβολή των τεχνολογιών της γενετικής μηχανικής, έχει καταστεί εφικτή η απομόνωση και κλωνοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν προστατευτικών ουσιών και ουσιών που επάγουν αμυντικούς μηχανισμούς στα φυτά, με αποτέλεσμα η ενσωμάτωσή τους σε διαγονιδιακά φυτά να οδηγεί σε προηγμένη ανθεκτικότητα απέναντι έναντι ασθενειών και εχθρών. Το πλέον κλασικό παράδειγμα επιτυχούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας αποτελεί η αξιοποίηση του γονιδίου που προέρχεται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*. Ειδικότερα, η έκφραση του γονιδίου *Bt* που παράγει την δ-ενδοτοξίνη επιφέρει θανατηφόρα δράση στα έντομα. Η τοξίνη αυτή αρχικά εφαρμόζονταν στα φυτά μέσω ψεκασμών, με την απομόνωση του γονιδίου *cry*, μετέπειτα ωστόσο επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση και ενδογενής έκφραση της τοξίνης σε φυτά τομάτας, καλαμποκιού, βαμβακιού, καπνού και άλλων ειδών με αποτέλεσμα την προστασία αυτών από τις προνύμφες των λεπιδόπτερων και των υμενόπτερων. Στο πλαίσιο αυτό, πειράματα που διεξήχθησαν στην Ινδία σε γενετικά τροποποιημένο βαμβάκι, ώστε να εκφράζει ενδογενώς το γονίδιο *cry* που κωδικοποιεί την παραγωγή της ενδοτοξίνης, κατέδειξαν αύξηση στη μέση απόδοση των *Bt* υβριδίων, η οποία υπερέβαινε της αντίστοιχης απόδοσης, κατά 80 %, συγκριτικά με μη γενετικά τροποποιημένα φυτά. Επιπλέον, τα γενετικά τροποποιημένα υβρίδια ψεκαστηκαν 3 φορές λιγότερο από τα μη τροποποιημένα, επιφέροντας μείωση του κόστους παραγωγής κατά 70 % (Qaim and Zilberman, 2003).

1.7.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Τα είδη του γένους *Agrobacterium* άρχισαν να προκαλούν το ενδιαφέρον για την μεταφορά γονιδίων σε φυτικά είδη ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του 1980. Πλέον, τα διάφορα στελέχη του αγροβακτηρίου χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες για τη μεταφορά γονιδίων σε φυτά και στη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. τα πλεονεκτήματα της χρήσης του αγροβακτηρίου ως φορέα συνδέονται με την ευκολία μεταφοράς γονιδίων, την αποτελεσματικότητα και υψηλή συχνότητα μετασχηματισμού σε ποικίλα φυτικά είδη, την ταχεία ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων ιστών και οργάνων και το γεγονός ότι η μέθοδος είναι οικονομικά βιώσιμη (Pinar Nartop, 2018). Το *Agrobacterium tumefaciens* αποτελεί Gram-αρνητικό βακτήριο που ζεί στο έδαφος, ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και προσβάλλει κυρίως δικοτυλήδονα φυτά της οικογένειας Solanaceae. Η μόλυνση των φυτών γίνεται μέσω πληγών και οδηγεί στη δημιουργία νεοπλασματικών υπερπλασιών, δηλαδή καρκίνου στα σημεία προσβολής. Η εν λόγω ικανότητα του αγροβακτηρίου οφείλεται στο πλασμίδιο Ti του βακτηρίου.

Το πλασμίδιο Ti είναι ένα μικρό κυκλικό μόριο DNA, αποτελούμενο από 4 περιοχές. Η περιοχή T-DNA έχει μέγεθος 20 Kb και εκατέρωθεν αυτής, αριστερά και δεξιά, υπάρχουν δύο περιοχές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που αποτελούνται από 25 ζεύγη βάσεων έκαστην. Η δεξιά αλληλουχία είναι απαραίτητη για την παθογένεση καθώς η μεταφορά του DNA του πλασμιδίου είναι πολική, από δεξιά προς τα αριστερά. Το πλασμίδιο Ti περιλαμβάνει γονίδια τοξικότητας (*vir* operons), γονίδια σύζευξης (*con*), γονίδια καταβολισμού οπινών και γονίδια σύνθεσης της αυξίνης, της κυτοκινίνης και των οπινών (Εικόνα 1.6).

Το DNA που υπάρχει ανάμεσα στις δύο αυτές αλληλουχίες δεν συμμετέχει στη μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA στο γονιδίωμα των φυτών. Η ιδιότητα αυτή δίνει τη δυνατότητα αντικατάστασής του με οποιοδήποτε γονίδιο ενδιαφέροντος προς μεταφορά στα φυτικά κύτταρα, γεγονός που καθιστά το αγροβακτήριο έναν ελκυστικό φορέα που αποτελεί το πλέον διαδεδομένο εργαλείο στις διαδικασίες γενετικής μηχανικής. Στην T-DNA περιοχή, εδράζουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των οπινών, με κάθε είδος αγροβακτηρίου να χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα παραγωγής διαφορετικών οπινών (Petit et al. 1970). Οι οπίνες είναι ουσίες που μπορούν να απορροφηθούν μόνο από τα αγροβακτήρια, ως πηγή αζώτου.



Εικόνα 1.5 Το πλασμίδιο T_i που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*.

Η διαδικασία της μόλυνσης γίνεται σε δύο στάδια (Matthysse and Wagner, 1994). Στο πρώτο στάδιο, το αγροβακτήριο συνδέεται χαλαρά με την επιφάνεια του ξενιστή, ενώ στο δεύτερο ξεκινάει η παραγωγή κυτταρίνης και η σύνδεση γίνεται πιο σταθερή. Τα οπερόνια της μολυσματικής περιοχής είναι έξι, τα *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* και είναι απαραίτητα προκειμένου να είναι μολυσματικός ο βακτηριακός φορέας. Όλα τα οπερόνια είναι φυτοεπαγόμενα. Σύμφωνα με τους Stachel et al. (1986), μικρές φαινολικές ενώσεις που εκκρίνονται κατά τον τραυματισμό των φυτικών κυττάρων όπως για παράδειγμα η ακετοσυριγκόνη, επάγουν την έκφραση των γονιδίων *virA* και *virG*, τα προϊόντα των οποίων ακολούθως επάγουν την έκφραση των υπολοίπων *vir* γονιδίων (Winans et al., 1994).

1.7.2. *Agrobacterium rhizogenes*

Το *Agrobacterium rhizogenes* ανήκει στην οικογένεια *Rhizobiaceae*, όπως και το *A. tumefaciens*, και αποτελεί ένα Gram-αρνητικό βακτήριο που ζει στο έδαφος και προσβάλλει τα δικοτυλήδονα κυρίως φυτά. Μολύνει τα φυτά μέσα από πληγές και ένα μέρος του γενετικού του υλικού μεταφέρεται στο φυτό-ξενιστή, όπου και ενσωματώνεται στο γονιδίωμά του. Το *A. rhizogenes* έχει τη δυνατότητα να μολύνει

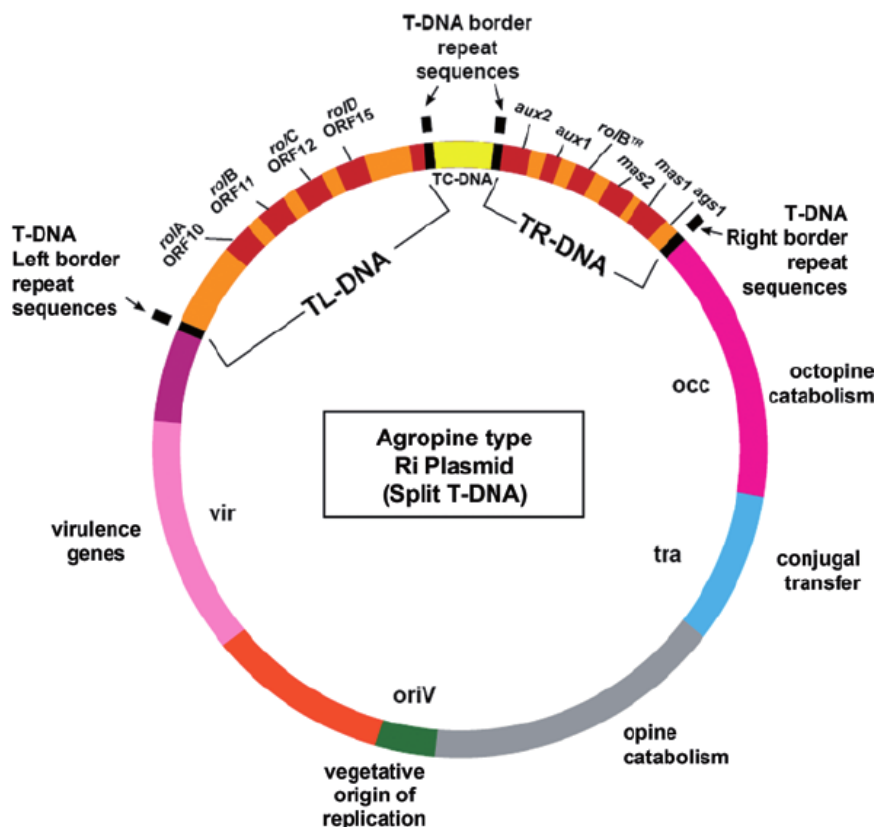
μεγάλο αριθμό φυτών που ανήκουν σε περισσότερες από 450 διαφορετικές οικογένειες και προκαλεί την ασθένεια των «τριχωτών ριζών», η οποία εκδηλώνεται μέσω συμπτωμάτων, όπως ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τυχαίων ριζών στη θέση της βακτηριακής προσβολής (Cardarelli et al., 1987). Οι «τριχωτές ρίζες» συνθέτουν και εκκρίνουν οπίνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την παραγωγή θρεπτικών για το αγροβακτήριο.

Το πλασμίδιο Ri

Το *A. rhizogenes* έχει διαφορετικό πλασμίδιο από το *A. tumefaciens*, το πλασμίδιο Ri, το οποίο δεν κωδικοποιεί τη δημιουργία κάλων, αλλά προάγει την παραγωγή μεγάλου αριθμού ριζών. Παρά την ύπαρξη διαφορών μεταξύ των πλασμιδίων Ti και Ri, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες τόσο ως προς τη δομή όσο και ως προς τη λειτουργία τους. Κατά τη μόλυνση, πραγματοποιείται μεταφορά του T-DNA του πλασμιδίου του *A. rhizogenes* στα κύτταρα του ξενιστή, η οποία επάγει τη διαδικασία της ενσωμάτωσης των γονιδίων του T-DNA στο πυρηνικό DNA του φυτού-ξενιστή. Μόλις ολοκληρωθεί επιτυχώς η διαδικασία αυτή, το φυτό-ξενιστής αρχίζει να εμφανίζει συμπτώματα που οφείλονται στην προσβολή από ξένο DNA με κυριότερο και πιο χαρακτηριστικό τον πολλαπλασιασμό ριζών στο σημείο της προσβολής.

Το πλασμίδιο Ri είναι μία κυκλική δομή DNA, με μέγεθος 180-250 kbp, που υπάρχει στα στελέχη του *A. rhizogenes* και είναι αυτό που του προσδίδει τη δυνατότητα της παθογένεσης, καθώς αποτελεί προϋπόθεση για την παθογένεια του βακτηριακού στελέχους (Bahramnejad et al., 2019). Ανάλογα με τον τύπο της οπίνης που παράγουν οι μετασχηματισμένοι ιστοί, διακρίνονται οι διαφορετικοί τύποι οπινών (Moore et al., 1997). Έχουν καταγραφεί τέσσερις τύποι οπινών και Ri πλασμιδίου (pRi): i) το agropine (pRiA4 του στελέχους A4), ii) το cucumopine (pRi2659 του στελέχους NCPPB2659), iii) το mannopine (pRi8196 του στελέχους NCIB8196) και iv) το mikimopine (pRi1724 του στελέχους MAFF301724) (Estrada-Navarrete et al., 2006). Τα μέρη του πλασμιδίου που δεν μεταφέρονται στο φυτό-ξενιστή περιλαμβάνουν την μολυσματική περιοχή, την περιοχή έναρξης της αντιγραφής και την περιοχή καταβολισμού των οπινών. Το μέρος του πλασμιδίου που μεταφέρεται στον ξενιστή, το T-DNA, περιλαμβάνει γονίδια για τη βιοσύνθεση των οπινών, ογκογονίδια για την επαγωγή των «τριχωτών ριζών» (γονίδια rol) και άλλα γονίδια άγνωστης λειτουργίας

(ORFs). Στα στελέχη του τύπου agropine, το T-DNA διακρίνεται σε δύο είδη T-DNA, το TL-DNA και το TR-DNA. Το TL-DNA παρουσιάζει ομολογία με αυτό των στελεχών cucumopine, mannopine, mikimopine που αποτελεί ένα απλό T-DNA. Αντίστοιχα, το TR-DNA είναι ομόλογο με το pTi-DNA σε περιοχές υπεύθυνες για τη σύνθεση της αγροπίνης και τη βιοσύνθεση αυξίνης, ενώ τα γονίδια *aux1* και *aux2* (pRi) είναι ομόλογα των *tms1* και *tms2* (pTi) (Camilleri and Jouanin, 1991) (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6 Το πλασμίδιο Ri που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*.

Ο φαινότυπος των Ri-φυτών

Με τη μεταφορά και την έκφραση του T-DNA στα φυτικά κύτταρα, παρατηρούνται αλλαγές στο φαινότυπο των σειρών που προκύπτουν, που φέρουν τα γονίδια του πλασμιδίου Ri (Costantino et al., 1994). Πολλά από τα γονίδια T-DNA και ORFs προκαλούν μεταβολές στον μεταβολισμό των ορμονών των φυτών, με αποτέλεσμα να προκαλούνται έντονες μορφογενετικές αλλαγές. Τις τελευταίες δεκαετίες, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει στραφεί στη μελέτη των φαινοτύπων *rol* και ORF,

καθώς και στις μορφολογικές αλλαγές που παρουσιάζουν τα μετασχηματισμένα φυτά. Ωστόσο, ο μηχανισμός και η λειτουργία των πρωτεϊνών παραμένουν άγνωστα ως προς το μεγαλύτερο κομμάτι (Desmet et al., 2020). Το γονίδιο *rolB* αποτελεί ένα από τα γονίδια που έχουν μελετηθεί περισσότερο και είναι σημαντικός συντελεστής στην επαγωγή της παραγωγής των ριζών και στην ανάπτυξη του ανθικού μεριστωματικού ιστού. Επίσης, έχει βρεθεί πως το γονίδιο *rolD* κωδικοποιεί μία λειτουργική κυκλοδεαμινάση, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της ονιθίνης σε προλίνη και περιγράφεται ως οσμωπροστατευτικό σε συνθήκες στρες (Trovato et al., 2001). Επομένως, είναι εμφανές ότι τα γονίδια *rol* και τα ORF έχουν συνεργιστική δράση και προκαλούν αλλαγές στο φαινότυπο των μετασχηματισμένων φυτών (Sprena et al., 1987, White et al., 1985).

Τα φυτά που αναγεννούνται από τις «τριχωτές ρίζες» έχουν διαφορετικό φαινότυπο που ονομάζεται φαινότυπος-Ri ή φαινότυπος-HR (Hairy Root) (Christey, 2001). Ο Tepfer (1984) ήταν ο πρώτος που κατέγραψε μία λίστα με τα χαρακτηριστικά που φέρει ο φαινότυπος-Ri και περιλαμβάνει κατσάρωμα φύλλων, αυξημένη ικανότητα ριζοβολίας, μειωμένη κυριαρχία κορυφής και αλλαγές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ανθέων.

Το πιο εμφανές χαρακτηριστικό που παρουσιάζει ο φαινότυπος Ri είναι η συμπαγής ανάπτυξη που προκαλείται από πολλές μορφολογικές αλλαγές. Για παράδειγμα, φυτά με μικρού μήκους μεσογονάτια διαστήματα παρουσιάζουν χαμηλότερο ύψος συνολικά. Επιπλέον, χαρακτηριστικά όπως οι αυξημένες διακλαδώσεις και η αυξημένη ανάπτυξη των οφθαλμών της μασχάλης συνδυαστικά με τη μειωμένη κυριαρχία κορυφής συμμετέχουν στην ανάπτυξη φυτών μικρού μεγέθους. Το δεύτερο σε συχνότητα χαρακτηριστικό είναι οι αλλαγές στη μορφολογία των φύλλων, με πιο συνηθισμένες το κατσάρωμα των φύλλων που συνεπάγεται αλλαγές στο μέγεθος των φύλλων, όπως επίσης και αλλαγές στο χρώμα του φυλλώματος, είτε πιο σκούρο πράσινο χρώμα είτε κιτρινωπό χρωματισμό. Παρόλα αυτά, η περιεκτικότητα των φύλλων των μετασχηματισμένων φυτών σε χλωροφύλλη δε διαφέρει σημαντικά συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου (Rugini et al., 2015). Το τρίτο και πιο εμφανές χαρακτηριστικό αποτελεί η αλλαγή στη μορφολογία των ριζών. Το χαρακτηριστικό αυτό σχετίζεται με τη βιολογική φύση του συνδρόμου των «τριχωτών ριζών» (Nester, 2015). Οι τριχωτές ρίζες χαρακτηρίζονται από ταχεία ανάπτυξη, μεγάλο αριθμό πλευρικών διακλαδώσεων και πλαγιοτροπική ανάπτυξη (Christey, 2001, Tepfer, 2016).

Έτσι, τα φυτά που φέρουν το φαινότυπο-Ri παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα ριζοβολίας τόσο σε συνθήκες αγρού όσο και *in vitro*. Η αυξημένη ικανότητα ριζοβολίας προάγει καλύτερη προσαρμοστικότητα σε συνθήκες *ex vitro* και αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό αγενή πολλαπλασιασμό (Casanova et al., 2005). Επιπλέον, τα μετασχηματισμένα φυτά που παρουσιάζουν καλύτερη ανάπτυξη του ριζικού τους συστήματος συνιστούν ένα σημαντικό εργαλείο για τις βιώσιμες καλλιέργειες, καθώς παρουσιάζουν καλύτερη διαχείριση του νερού και των θρεπτικών στοιχείων υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Terfer, 2016). Επίσης, συχνά παρατηρείται αύξηση της βιομάζας των ριζών, χαρακτηριστικό που είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην καλλιέργεια βολβωδών λαχανικών ή φυτών των οποίων οι ρίζες αξιοποιούνται για την παραγωγή ορισμένων μεταβολιτών (Chaudhuri et al. 2006; Gangopadhyay et al. 2010; Majumdar et al. 2011; Pérez de la Torre et al. 2018; Sevón et al. 1997).

1.7.3. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*

Η χρήση του *A. rhizogenes* για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών αποτελεί μια τεχνική που συνεχώς γίνεται δημοφιλέστερη, με τα κυριότερα πλεονεκτήματα που προσφέρει να συνίστανται στο σύντομο χρόνο εκτέλεσης και στην ευκολία που παρουσιάζουν τα πρωτόκολλα μετασχηματισμού στην εφαρμογή τους.

Το *A. rhizogenes* χρησιμοποιείται για την απόκτηση φυτών με διαφορετικό φαινότυπο από του αγρίου τύπου και με επιθυμητά γνωρίσματα. Η δημιουργία φυτών με μετασχηματισμένο μόνο το ριζικό σύστημα και όχι το εναέριο μέρος αποτελεί μία σύντομη οδό για τη μελέτη της βιολογίας του ριζικού συστήματος καθώς και της αλληλεπίδρασης των φυτών με βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Η αναγέννηση φυτών από μετασχηματισμένους ιστούς έπαιξε πολύ σημαντικό ρόλο στην δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καθώς οδήγησε στην ανάπτυξη πλήρως μετασχηματισμένων φυτών, τα οποία δύνανται να μεταβιβάσουν την έκφραση των διαγονιδίων και των επιθυμητών γνωρισμάτων στις επόμενες γενιές (Costantino et al., 1984, Terfer, 1984, Ooms, 1985).

Σε πρακτικό επίπεδο, οι διαγονιδιακές ρίζες που προκύπτουν από τον μετασχηματισμό φυτών με τη χρήση του *A. rhizogenes* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και δευτερογενών μεταβολιτών, τη μεταβολική μηχανική, τη λειτουργική ανάλυση γονιδίων και τη φυσιολογική και

βιοχημική ανάλυση της ριζόσφαιρας. Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από το ριζικό σύστημα μετασχηματισμένων φυτών, αποτελεί μία πρακτική που έχει γνωρίσει ιδιαίτερη απήχηση, χάρη στην αξιοπιστία της μεθόδου αλλά και λόγω του ότι είναι μία διαδικασία που δεν απαιτεί πολύ χρόνο για να ολοκληρωθεί και συνάμα παρουσιάζει χαμηλό κόστος. Η μελέτη των ριζών μπορεί να αποτελέσει χρήσιμη μέθοδο για την ανάλυση της έκφρασης και λειτουργίας των γονιδίων, την ανάλυση της φυσιολογίας της ρίζας σχετικά με την επάρκεια θρεπτικών, την τοξικότητα ουσιών, τη σταθεροποίηση του αζώτου και την αλληλεπίδραση με παθογόνους οργανισμούς (Chen et al., 2018).

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Φυτικό Υλικό

Για τη διεξαγωγή του περάματος χρησιμοποιήθηκαν σπόροι τομάτας σειράς fl της ποικιλίας «TROPICAL QUEEN». Η ποικιλία είναι κατάλληλη για θερμοκηπιακές αλλά και υπαίθριες καλλιέργειες. Οι καρποί της εν λόγω ποικιλίας είναι κόκκινου χρώματος και έχουν μέσο βάρος 250-280 g. Σε 1 g σπόρου, περιέχονται περίπου 400 σπέρματα.

2.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Για τη δημιουργία 500 ml υποστρώματος βλάστησης, προστέθηκαν 1.1 g θρεπτικού μέσου MS-vitamin, 5 g σουκρόζη, 2,5 g άγαρ και αποστειρωμένο dH₂O έως τελικού όγκου 500 ml. Το pH ρυθμίστηκε στο 5,6.

Για τη δημιουργία 500 ml υποστρώματος συγκαλλιέργειας, προστέθηκαν 1.225 g θρεπτικού μέσου MS-vitamin-MES, 5 g σουκρόζη, 4,5 g άγαρ και αποστειρωμένο dH₂O έως τελικού όγκου 500 ml. Το pH στο υπόστρωμα ρυθμίστηκε στο 5,6.

Για τη δημιουργία 500 ml υποστρώματος ριζοβολίας, προστέθηκαν 1,225 g θρεπτικού μέσου MS-vitamin-MES, 10 g σουκρόζη, 4,5 g άγαρ και αποστειρωμένο dH₂O έως τελικού όγκου 500 ml. Το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε στο 5,6.

Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος MS, προστέθηκαν 2,2 g θρεπτικού μέσου MS-vitamin, 15 g σουκρόζη και αποστειρωμένο dH₂O έως τελικού όγκου 500 ml.

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου LB, προστέθηκαν 1,5 g LB και αποστειρωμένο dH₂O έως τελικού όγκου 100 ml.

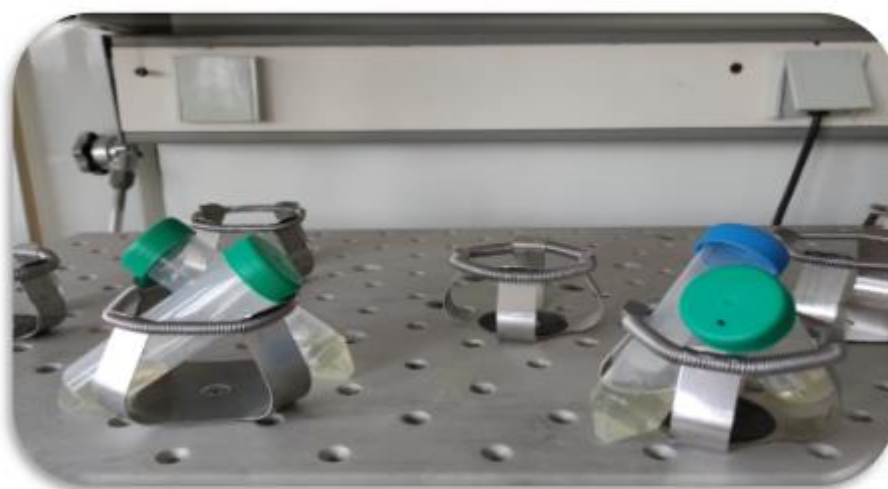
Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώθηκαν στον αυτόκαυστο κλίβανο στους 121 για 20 λεπτά.

2.3. Ανάπτυξη των στελεχών του *Agrobacterium rhizogenes*

Για τον μετασχηματισμό των φυτών της τομάτας χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη R1000 και R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*. Το τελευταίο, φέρει το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, στην εκκρινόμενη μορφή του ώστε να κατευθύνεται η έκφραση της πρωτεΐνης HrpZ εξωκυτταρικά (*SP/hrpZ_{P_{sph}}*) (Tampakaki and Panopoulos, 2000; Pavli et al., 2011).

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο LB, το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό ναλιδικό οξύ (nalidixic acid). Για τη δημιουργία 10 ml καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων, έγινε προσθήκη 50 μl το εμβόλιο των βακτηρίων, 10 μl ναλιδιξικού οξέος ((nalidixic acid, 25 μg ml⁻¹) και υγρό θρεπτικό μέσο (LB) έως τελικού όγκου 10 ml. Για την ανάπτυξη της καλλιέργειας των βακτηριακών κυττάρων R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*, προστέθηκαν επιπλέον 5 μl του αντιβιοτικού καναμυκίνη (kanamycin, 50 μg ml⁻¹).

Τα falcon τοποθετήθηκαν σε τράπεζα μηχανικής ανάδευσης, στις 160 rpm για 96 ώρες. Μετά το πέρας των 96 ωρών, έγινε μεταφορά της καλλιέργειας των βακτηρίων σε νέα falcon και έγινε επανάληψη της αρχικής διαδικασίας με μόνη διαφορά ότι η προσθήκη των βακτηρίων έγινε από την καλλιέργεια. Τα falcon τοποθετήθηκαν ξανά στην τράπεζα μηχανικής ανάδευσης στις 160 rpm για 48 ώρες (Εικόνα 2.1).

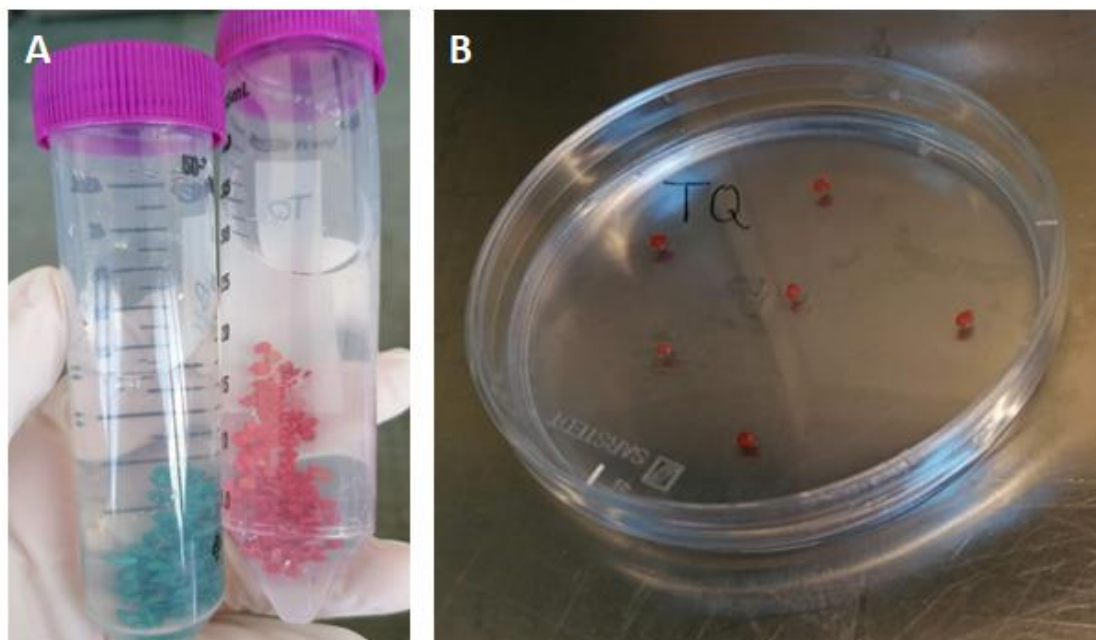


Εικόνα 2.1: Ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων, υπό συνθήκες μηχανικής ανάδευσης.

2.4. Προετοιμασία των εκφύτων για το μετασχηματισμό

Αρχικά, έγινε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων τομάτας, με τοποθέτησή τους σε διάλυμα χλωρίνης 10 %, που περιείχε Tween-20, υπό συνθήκες ανάδευσης για 5 λεπτά (Εικόνα 2.2). Ακολούθησαν, τρεις πλύσεις για 5 λεπτά σε αποστειρωμένο dH₂O, υπό ανάδευση.

Μετά την απολύμανση, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί με στόχο την απορρόφηση της περίσσειας υγρασίας. Ακολούθησε τοποθέτηση των σπόρων σε τριβλία petri, που περιείχαν θρεπτικό μέσο βλάστησης. Σε κάθε τριβλίο, τοποθετήθηκαν 8 σπόροι με ίσες αποστάσεις μεταξύ τους (2-2.5 cm). Τα τριβλία σφραγίστηκαν με παραφίλμ, προς αποφυγή εξάτμισης, και αφήθηκαν για 7 ημέρες, έως ότου επιτευχθεί βλάστηση των σπόρων και ανάπτυξη των σποροφύτων, ώστε να μπορούν να εξαχθούν κατάλληλα έκφυτα για το μετασχηματισμό μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes* (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Διαδικασία προετοιμασίας των εκφύτων για το μετασχηματισμό φυτών τομάτας. A. Απολύμανση των σπόρων με διάλυμα χλωρίνης 10 %. B. Τοποθέτηση των απολυμασμένων σπόρων σε θρεπτικό μέσο βλάστησης για τη βλάστηση των σπόρων και ανάπτυξη των σποροφύτων.

2.5. Προετοιμασία του εμβολίου για το μετασχηματισμό

Για την προετοιμασία του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε στο μετασχηματισμό, αρχικά έγινε φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας, στις 3000 rpm για 5 λεπτά και ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου υγρού. Στο ίζημα, που περιείχε τα βακτηριακά κύτταρα, έγινε προσθήκη 2 ml υγρού MS και εκ νέου φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 3 λεπτά. Έπειτα από απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, έγινε μεταφορά των βακτηριακών κυττάρων σε erpendorff tube των 1,5ml και προσθήκη 1 ml υγρού MS. Έπειτα από φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 3 λεπτά, έγινε απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 100 μl υγρού MS που περιείχε ακετοσυριγκόνη (100 μg/ml).

2.6. Μετασχηματισμός σπορόφυτων τομάτας

Για τον μετασχηματισμό των σπορόφυτων με τα στελέχη του βακτηρίου επιλέχθηκαν υγιή σπορόφυτα τομάτας 7 ημερών από τα τριβλία, τα οποία χωρίστηκαν σε τρεις ισάριθμες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορούσε σε φυτά που αξιοποιήθηκαν ως μάρτυρες και συνεπώς δεν εμβολιάστηκαν με βακτήριο. Η δεύτερη κατηγορία αφορούσε σε φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000, ενώ τα φυτά της τρίτης κατηγορίας εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*.

Τα σπορόφυτα κόπηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι στην περιοχή του υποκοτυλίου, στη ζώνη αποχρωματισμού, και το σημείο όπου έγινε η τομή εμβαπτίστηκε για 20 δευτερόλεπτα στην καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων (εμβόλιο). Μετά τον εμβολιασμό, τα σπορόφυτα τοποθετούνταν σε τετράγωνο τριβλίο που περιείχε υπόστρωμα συγκαλλιέργειας. Σε κάθε τριβλίο, τοποθετήθηκαν 6 σπορόφυτα και δημιουργήθηκαν 6 τριβλία για κάθε κατηγορία (μάρτυρας, R1000, R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*). Τα τριβλία σφραγίστηκαν περιμετρικά με παραφίλμ, προς αποφυγή εξάτμισης, και έγινε ανάπτυξη των φυτών για διάστημα 3 ημερών. Ακολούθως, τα έκφυτα μεταφέρθηκαν εκ νέου σε τριβλία που περιείχαν υπόστρωμα, εμπλουτισμένου με το αντιβιοτικό σεφοταξίμη, συγκέντρωσης 250 μg/ml, και επώαστηκαν για διάστημα 3 ημερών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η τελευταία μεταφορά των εκφύτων σε θρεπτικό μέσο

ρίζογένεσης που περιείχε σεφοταξίμη (250 µg/ml) και για τα δύο στελέχη, ενώ τα σπορόφυτα που είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με το βακτήριο R1000-*hrpZ_{PspH}* ανπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που πειρείχε επιπλέον υγρομυκίνη (10 µg/ml).

2.7. Έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού

Ο έλεγχος της ένθεσης του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) των διαγονιδίων *rolb2* και *hrpZ_{PspH}*. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά έγινε απομόνωση DNA από τις ρίζες που εκπτύχθηκαν έπειτα από τον εμβολιασμό με τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη (R1000, R1000-*HrpZ_{PspH}*) καθώς και τα σπορόφυτα αγρίου τύπου, που εξυπηρέτησαν ως μάρτυρες (C). Στο πλαίσιο αυτό, έγινε αποκοπή των ριζών, στη ζώνη του υποκοτυλίου, με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και τοποθέτηση των δειγμάτων ριζών σε θάλαμο βαθείας κατάψυξης (-80 °C), προς αποφυγή αλλοιώσεων 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. Ακολούθησε ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου με απορρόφηση στα 260 nm, όπου η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/µl.

Για τον έλεγχο της ένθεσης των διαγονιδίων *rolb2* και *hrpZ_{PspH}* στις ρίζες των εμβολιασμένων σποροφύτων, έγινε PCR έγινε με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών: *hrpZ_{PspH}*-F: CGAAAGCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG και *hrpZ_{PspH}*-R: CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG και των εκκινητών *rolb2*-F: GCTCTTGCAGTGCTAGATTT και *rolb2*-R: GAAGGTGCAAGCTACCTCTC για την ενίσχυση αλληλουχιών μεγέθους 423 και 995 bp, που αντιστοιχούν στα γονίδια *hrpZ_{PspH}* και *rolb2*, αντίστοιχα.

Το μίγμα της PCR περιείχε 1 µl DNA ως μήτρα, 1.25 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.5 µM από κάθε εκκινητή, 1.25 u Taq πολυμεράση (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega) 1x ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο 20 µl. Το πρόγραμμα ενίσχυσης περιλάμβανε ένα αρχικό κύκλο στους 94°C για 3 min και στη συνέχεια 30 κύκλους των 30 sec στους 94°C, 1 min στους 50°C, 1 min στους 72°C και ένα τελικό κύκλο επιμήκυνσης στους 72°C για 5 min.

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηχτή αγαρόζη 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X), η οποία περιείχε 1% βρωμιούχο αιθίδιο. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 2 ώρες στα 60 V. Ακολούθησε η οπτικοποίηση των προϊόντων ενίσχυσης σε ακτινοβολίας UV.

2.8. Στατιστική ανάλυση

Το πειραματικό σχέδιο ήταν των πλήρων τυχαιοποιημένων ομάδων, με 6 επαναλήψεις (τριβλία), αποτελούμενων από 6 ατομικά σπορόφυτα για κάθε κατηγορία φυτών (C, R1000, R1000-HgrZ_{psph}). Η συχνότητα μετασχηματισμού εκφράστηκε ως ποσοστό των εκφύτων που εμφάνισαν ριζικά τριχίδια. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου JMP (version 13.0).

3.Αποτελέσματα

Με στόχο την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας, διαμέσου του *Agrobacterium rhizogenes*, νεαρά φυτά της ποικιλίας Tropical Queen εμβολιάστηκαν με τα στελέχη R1000 και R1000-*hrpZ_{Psph}*. Προκειμένου να επιτευχθεί ο εμβολιασμός σπορόφυτα ηλικίας 7 ημερών, εμβολιάστηκαν στην περιοχή του υποκοτυλίου, έπειτα από αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος. Απώτερο σκοπό αποτέλεσε η δημιουργία σύνθετων σποροφύτων, αποτελούμενων από γενετικά τροποποιημένο ριζικό σύστημα και υπέργειο μέρος αγρίου τύπου.

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας του πρωτοκόλλου, προσδιορίστηκε η συχνότητα μετασχηματισμού, ο χρόνος έκπτυξης διαγονιδιακών ριζών και ο αριθμός πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων. Περαιτέρω, για τον έλεγχο της επιτυχίας του πρωτοκόλλου έγινε επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζών μέσω PCR.

3.1. Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών

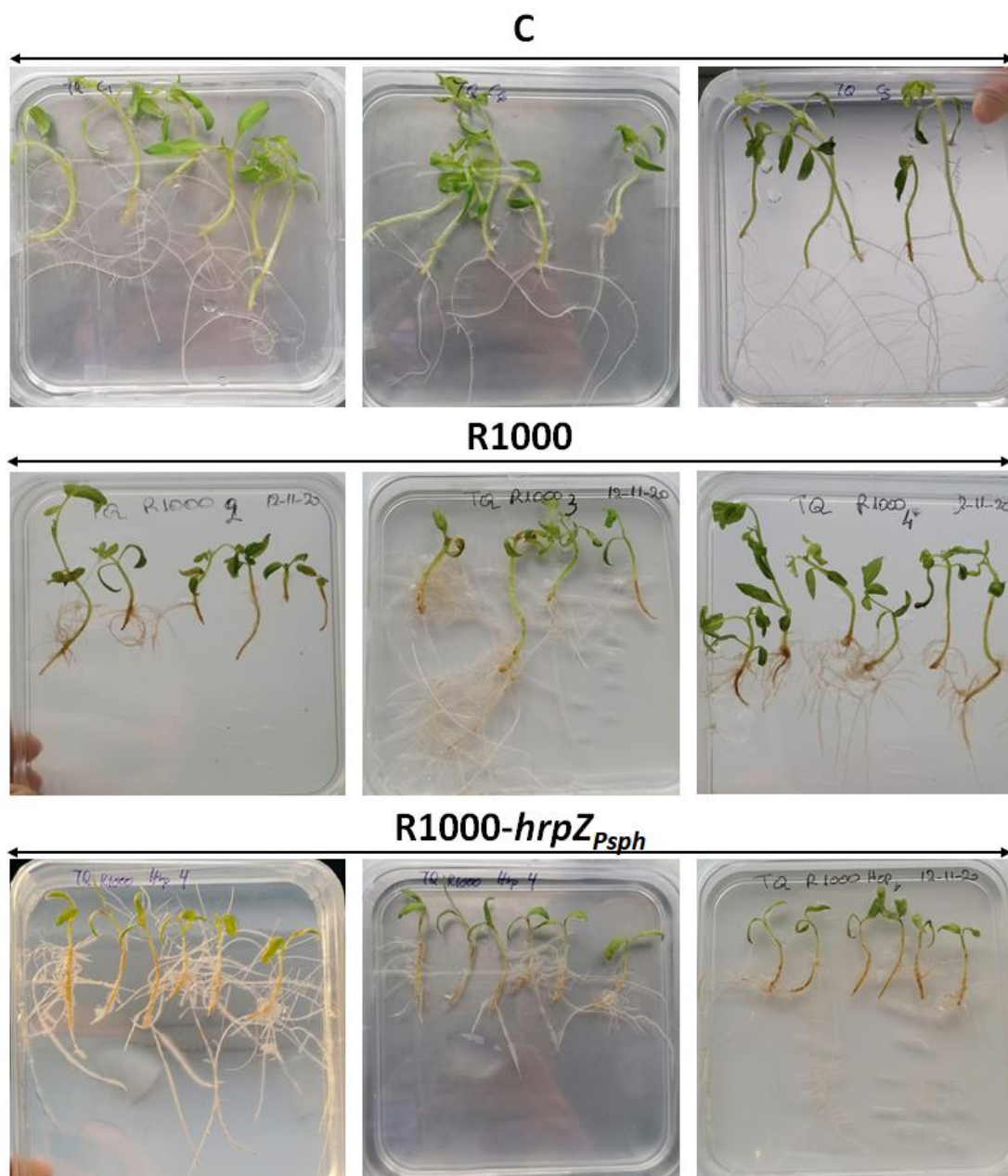
Μετά τον εμβολιασμό των σποροφύτων με τα δύο υπό μελέτη στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* ακολούθησε καθημερινή καταγραφή της ανάπτυξης τους με σκοπό τον ακριβή προσδιορισμό του χρονικού διαστήματος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών.

Η εμφάνιση των πρώτων διαγονιδιακών ριζών στα φυτά που εμβολιάστηκαν τόσο με το στέλεχος R1000 όσο και με το στέλεχος R1000-*hrpZ_{Psph}* του αγροβακτηρίου σημειώθηκε σε διάστημα 11 ημερών μετά τον εμβολιασμό.

3.2. Διαφορές στο φαινότυπο των ριζών

Δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό, ο φαινότυπος των εμβολιασμένων σποροφύτων διέφερε εμφανώς σε σχέση με τον αντίστοιχο των φυτών-μαρτύρων που δεν είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με κάποιο βακτηριακό στέλεχος. Συγκεκριμένα, τα εμβολιασμένα σπορόφυτα ανέπτυξαν ριζικό σύστημα που διέφερε σαφώς από το ριζικό

σύστημα αγρίου τύπου τόσο ως προς το φαινότυπο όσο και την ταχύτητα ανάπτυξης ριζών. Οι μετασχηματισμένες ρίζες ήταν θυσσανώδεις και εμφάνισαν μεγαλύτερο αριθμό διακλαδώσεων, ενώ οι ρίζες των φυτών-μαρτύρων εμφάνιζαν ριζικό σύστημα μεγάλου μήκους που χαρακτηρίζονταν ωστόσο από περιορισμένο αριθμό πλευρικών διακλαδώσεων (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Συγκριτική απεικόνιση της ανάπτυξης των ριζών των φυτών αγρίου τύπου (μη-εμβολιασμένα), που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (C), και των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη R1000 και R1000-*hrpZ*_{P_{sph}}, την 15^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό.

3.3. Φαινοτυπική αξιολόγηση των διαγονιδιακών ριζών

Σε ότι αφορά το φαινότυπο των διαγονιδιακών ριζών, πραγματοποιήθηκε καταγραφή του μήκους των ριζών τόσο των φυτών του μάρτυρα όσο και των εμβολιασμένων φυτών. Επίσης καταγράφηκε ο αριθμός των πλευρικών ριζών την 11^η και 15^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό.

Αναφορικά με το μήκος ριζών, τα φυτά του μάρτυρα εμφάνισαν το μεγαλύτερο μήκος ριζών. Στα εμβολιασμένα σπορόφυτα, το μήκος των ριζών ήταν εμφανώς μικρότερο από αυτό του μάρτυρα αλλά χαρακτηρίζονταν από την παρουσία πολλαπλών διακλαδώσεων. Από τα εμβολιασμένα έγκφυτα, μικρότερο μήκος ριζών εμφάνισαν τα σπορόφυτα που είχαν εμβολιασθεί με το στέλεχος R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*, γεγονός που πιθανότατα αποδίδεται στο γεγονός ότι τα τελευταία αναπτύχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού υγρομυκίνη, το οποίο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα ως προς την επιμήκυνση των ιστών (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Συγκριτική απεικόνιση του μήκους των ριζών που αναπτύχθηκαν στα φυτά μάρτυρες (C) και στα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη R1000 και R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*.

Αναφορικά με τον αριθμό των πλευρικών ριζών, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* εμφάνισαν μεγαλύτερο αριθμό πλευρικών ριζών τόσο κατά την 11^η όσο και κατά την 15^η ημέρα συγκριτικά με αυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000. Επίσης, η πάροδος του χρόνου δεν επηρέασε σημαντικά τον αριθμό

των πλευρικών ριζών ανά έκφυτο στις δύο διαφορετικές κατηγορίες εμβολιασμένων φυτών (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Αριθμός πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων ανά εμβολιασμένο έκφυτο.

Στελέχη <i>A. rhizogenes</i>	Αριθμός πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων ανά εμβολιασμένο έκφυτο
11^η ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό	
R1000	5.8 a
R1000-<i>hrpZ</i>_{P_{sph}}	6.0 b
15^η ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό	
R1000	6.3 a
R1000-<i>hrpZ</i>_{P_{sph}}	6.7 b

*Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά, σύμφωνα με LSD ($p \leq 0.05$).

3.4. Συχνότητα μετασχηματισμού

Και τα δύο βακτηριακά στελέχη προκάλεσαν την εμφάνιση διαγονιδιακών ριζών στα φυτά της τομάτας. Την 11^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό, η συχνότητα μετασχηματισμού στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000 ήταν 52,7 % και η αντίστοιχη για τα εμβολιασμένα με το στέλεχος R1000-*hrpZ*_{P_{sph}} φυτά ήταν 44,4 %. Την 13^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό, οι συχνότητες μετασχηματισμού των σποροφύτων διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Στο στέλεχος R1000, η συχνότητα μετασχηματισμού ήταν 81,9 %, ενώ στο R1000-*hrpZ*_{P_{sph}} κυμάνθηκε σε χαμηλότερο επίπεδο, 50 %. Ωστόσο, την 20^η ημέρα, τα στελέχη δε διέφεραν σημαντικά ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού. Το στέλεχος R1000 προκάλεσε μετασχηματισμό των ριζών σε ποσοστό 81.9 %, ενώ στο στέλεχος R1000-*hrpZ*_{P_{sph}} το αντίστοιχο ποσοστό έφτασε το 73,6 %.

Στο σύνολό τους, τα ανωτέρω δεδομένα υποδεικνύουν ότι τόσο το στέλεχος R1000 όσο και το R1000-*hrpZ*_{P_{sph}} είναι κατάλληλα για την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών στην τομάτα. Λαμβάνοντας ωστόσο υπόψη τη συχνότητα μετασχηματισμού, το στέλεχος

R1000 υπερέχει έναντι του R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*, ενώ παράλληλα η αποτελεσματικότητά του είναι εμφανής και ως προς το χρόνο εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Επίδραση του γενετικού μετασχηματισμού με τα βακτήρια R1000 και R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* του *A. rhizogenes* αναφορικά με το χρόνο εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και τη συχνότητα μετασχηματισμού.

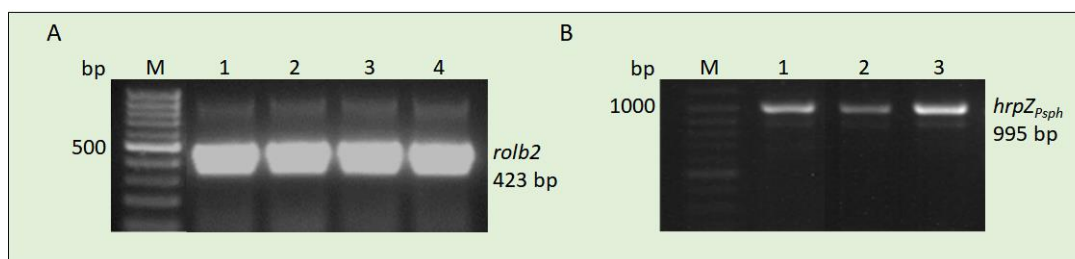
Ημέρα	Στέλεχη <i>A. Rhizogenes</i>	Αριθμός Εμβολιασμένων Εκφύτων	Συχνότητα μετασχηματισμού (%)
11 ^η	R1000	54	52,7b
	R1000- <i>hrpZ_{P_{sph}}</i>	54	44,4b
13 ^η	R1000	54	81,9a
	R1000- <i>hrpZ_{P_{sph}}</i>	54	50b
15 ^η	R1000	54	81,9a
	R1000- <i>hrpZ_{P_{sph}}</i>	54	70,8ab
20 ^η	R1000	54	81,9a
	R1000- <i>hrpZ_{P_{sph}}</i>	54	73,6ab
Σημαντικότητα	Χρόνος		**
	Στέλεχος Βακτηρίου		*
	Χρόνος * Στέλεχος Βακτηρίου		NS

*Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά, σύμφωνα με LSD ($p \leq 0.05$).

3.5. Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επιτυχία του μετασχηματισμού πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ένθεσης του διαγονιδίου στις ρίζες των εμβολιασμένων σποροφύτων τομάτας. Για το σκοπό αυτό, λήφθηκαν δείγματα ριζών από τα εμβολιασμένα σπορόφυτα των οποίων οι ρίζες εμφάνισαν μετασχηματισμένο φαινότυπο. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση των διαγονιδίων *rolB2* και *hrpZ_{P_{sph}}*, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

Η παρουσία του γονιδίου *rolB2* επιβεβαιώθηκε, μέσω της ενίσχυσης προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους (423 bp) σε όλα τα δείγματα ριζικού ιστού που λήφθηκαν έπειτα από εμβολιασμό με τα βακτήρια R1000 και R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*. Αντίστοιχα, η παρουσία του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* επιβεβαιώθηκε, μέσω της ενίσχυσης προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους (995 bp), ριζικού ιστού που λήφθηκαν έπειτα από εμβολιασμό με τα βακτήρια R1000 και R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*. Η επιβεβαίωση της παρουσίας των ανωτέρω γονιδίων καταδεικνύουν τη διαγονιδιακή φύση των ριζών (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.4 Προϊόντα PCR για τον έλεγχο της ένθεσης των γονιδίων *rolB2* και *hrpZ_{P_{sph}}* σε γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από το ριζικό σύστημα των σποροφύτων τομάτας που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000 και R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*. A. 1, 2: ρίζες που αναπτύχθηκαν σε σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000, όπου επιβεβαιώνεται η ένθεση του διαγονιδίου *rolB2* (423 bp). 3, 4: ρίζες που αναπτύχθηκαν σε σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*, όπου επιβεβαιώνεται η ένθεση του διαγονιδίου *rolB2* (423 bp). B. 1, 2, 3: ρίζες που αναπτύχθηκαν σε σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000-*hrpZ_{P_{sph}}*, όπου επιβεβαιώνεται η ένθεση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp). DNA Ladder (FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH).

4. Συζήτηση

Από την ανακάλυψη της τον 16^ο αιώνα έως και την ένταξή της στην ανθρώπινη διατροφή, η τομάτα έχει εξελιχθεί σε μία από της σημαντικότερες καλλιέργειες στον κόσμο και η σημασία της ως καλλιέργεια αυξάνεται με την προοδευτική αύξηση του πληθυσμού (Bergougnoux, 2014). Η τομάτα αποτελεί έναν από τους πλέον δημοφιλείς καρπούς, με την αύξηση της ζήτησής της να αποτελεί ολόένα και περισσότερο έναυσμα για την εντατικοποίηση των προσπαθειών βελτίωσής της.

Παρά το γεγονός ότι η βελτίωση μέσω κλασικών διαδικασιών υβριδισμού και επιλογής των υπέρτερων γονοτύπων αποτελεί τη συνηθέστερη οδό ανάπτυξης βελτιωμένων ποικιλιών με επιθυμητά χαρακτηριστικά (Kuligowska et al., 2016), ενέχει σημαντικούς περιορισμούς και δυσκολίες. Ένας από τους πλέον σημαντικούς περιορισμούς είναι ο χρόνος, ο οποίος προφανώς είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το κόστος, που απαιτείται για την ανάπτυξη βελτιωμένων ποικιλιών. Επιπλέον, οι προοπτικές επίτευξης ικανοποιητικού γενετικού κέρδους περιορίζονται σημαντικά συναρτήσει της διαθέσιμης γενετικής παραλλακτικότητας. Προς την ίδια κατεύθυνση, οι δυνατότητες διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής με κλασικές μεθόδους σαφώς περιορίζεται λόγω των σχετικών ταξινομικών εμποδίων (Horn, 2002; Long et al., 2018). Αντίθετα, το σύνολο των τεχνολογιών της γενετικής μηχανικής προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες διεύρυνσης του γονιδιακού αποθέματος, γεγονός που είναι τεράστιας σημασίας ιδιαίτερα για φυτικά είδη που χαρακτηρίζονται από στενή γενετική βάση (Casanova et al., 2005).

Ο γενετικός μετασχηματισμός μέσω του *Agrobacterium* επηρεάζεται από το γονότυπο και τη δομή του βακτηρίου καθώς και περιβαλλοντικούς και φυσικούς παράγοντες που επιδρούν στην ικανότητα και επιδεκτικότητα των φυτικών κυττάρων στο μετασχηματισμό. Επιπλέον, σημαντική είναι και η επίδραση του βακτηριακού στελέχους, όπως έχει αναδειχθεί για τα διαφορετικά στελέχη του *A. rhizogenes* που επιφέρουν διαφορετική αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού (Kumar et al., 1991; Giri et al., 1997). Στην παρούσα μελέτη, ως μέσο μετασχηματισμού αξιοποιήθηκε το στέλεχος R1000 του *A. rhizogenes*, που φέρει είτε το πλασμίδιο αγρίου τύπου, είτε το βακτήριο R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* που φέρει το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ_{P_{sph}}* που εκφράζει το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* στην εκκρινόμενη μορφή του ώστε να επιτυγχάνεται παραγωγή της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά (Tampakaki and Panopoulos, 2000; Pavli et

al., 2011). Στο σύνολό τους, τα ευρήματα της μελέτης κατέδειξαν ότι τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη χαρακτηρίζονται από εμφανή διαφορά ως προς την αποτελεσματικότητά τους για επαγωγή διαγονιδιακών ριζών σε σπορόφυτα τομάτας. Η διαφορική απόκριση των σποροφύτων στα βακτηριακά στελέχη πιθανόν αποδίδεται στα διαφορετικά πλασμίδια που φέρουν τα στελέχη R1000 και R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* (Nguyen et al, 1992), και ειδικότερα τα διαφορετικά γονίδια που ελέγχουν τη σύνθεση αυξίνης, η οποία αποτελεί ρυθμιστικό μόριο της ανάπτυξης των τριχωτών ριζών (Tao and Li, 2006). Στο πλαίσιο αυτό, τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη διέφεραν σημαντικά ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού, με το στέλεχος R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* να εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα συγκριτικά με το R1000. Επίσης, σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν ως προς τον αριθμό και το μήκος των πλευρικών ριζών, με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000-*hrpZ_{P_{sph}}* να εμφανίζουν το μεγαλύτερο αριθμό και το μικρότερο μήκος των πλευρικών ριζών. Αντίθετα, ο χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών δε διέφερε μεταξύ των διαφορετικών στελεχών.

Ένας πρόσθετος παράγοντας που παίζει καθοριστικό ρόλο στη συχνότητα του μετασχηματισμού είναι η συγκέντρωση των βακτηρίων που αξιοποιούνται ως εμβόλιο. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις βακτηριακών κυττάρων γενικά οδηγούν σε μειωμένη συχνότητα μετασχηματισμού, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση, πέραν της βέλτιστης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ανταγωνισμού μεταξύ των βακτηρίων και των φυτών (Kumar et al, 1991). Αντίστοιχα, καθοριστικής σημασίας κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού είναι η συγκαλλιέργεια των εκφύτων με τα βακτηριακά κύτταρα που συνιστούν τους φορείς για το μετασχηματισμό. Κατά τη διάρκεια της συγκαλλιέργειας επιτυγχάνεται μεταφορά των επιθυμητών γονιδίων και ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα. Εάν η διάρκεια της περιόδου συγκαλλιέργειας είναι σύντομη, δεν συντελείται επιτυχής μετασχηματισμός, ενώ η μεγαλύτερης διάρκειας συγκαλλιέργεια επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα είτε λόγω μείωσης της δυνατότητας των βακτηρίων να προσβάλλουν τα φυτικά κύτταρα, είτε λόγω της αύξησης του μεταξύ τους ανταγωνισμού (Tao and Li, 2006).

Ως προς τη σύσταση του θρεπτικού μέσου επιλογής, η προσθήκη ακετοσυριγκόνης έχει παρατηρηθεί ότι βελτιώνει την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού σε πληθώρα φυτικών ειδών, έπειτα από εμβολιασμό με στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* (Hu and Alfermann, 1993). Η ακετοσυριγκόνη λειτουργεί ως ενισχυτικός παράγοντας που προάγει τη διαδικασία της μόλυνσης των φυτικών κυττάρων από το

βακτήριο, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις η ακετοσυριγκόνη έχει παρατηρηθεί ότι έχει περιορισμένη αποδοτικότητα (Lin et al, 2003). Οι αναφορές αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου η προσθήκη ακετοσυριγκόνης στο θρεπτικό μέσο συνέβαλε στην επίτευξη υψηλής συχνότητας μετασχηματισμού και με τα δύο στελέχη.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου καθώς και την καταλληλότητα του βακτηριακού στελέχους R1000 για το γενετικό μετασχηματισμό της τομάτας με τη χρήση του φορέα *A. rhizogenes*. Το εν λόγω πρωτόκολλο μπορεί να αξιοποιηθεί για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων ενδιαφέροντος, παρακάμπτοντας τις χρονοβόρες και επίπονες διαδικασίες του σταθερού μετασχηματισμού.

5. Συμπεράσματα

Η διαδικασία της επαγωγής διαγονιδιακών ριζών σε σπορόφυτα τομάτας με τη χρήση στελεχών του *A. rhizogenes* επιτεύχθηκε με σχετική ευκολία. Με βάση τα ευρήματα της μελέτης η συχνότητα εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών σε φυτά εμβολιασμένα με το στέλεχος R1000 πλησίασε το 80%, ενώ σε φυτά εμβολιασμένα με το στέλεχος R1000Hrp δεν ξεπέρασε κατά πολύ το 50%. Το γεγονός αυτό καθιστά επομένως σαφές ότι το στέλεχος R1000 του *A. rhizogenes* αποτελεί κατάλληλο υλικό για το γενετικό μετασχηματισμό της τομάτας και την ανάπτυξη φυτών με διαγονιδιακές ρίζες.

6. Βιβλιογραφία

Ξένη βιβλιογραφία

Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., & Jha, S. (2019). A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology advances*, 37(7), 107405.

Bebeli P.J., and Mazzucato, A., 2009. “The Solanaceae – A Review of Recent Research on Genetic Resources and Advances in the Breeding of Tomato , Pepper and Eggplant.” *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2 pp. 3-30

Bergougoux V., 2013, ‘The history of tomato: From domestication to biopharming’, *Biotechnology Advances*, 32(1), pp. 170-189.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>

Bertram L., Lercari B., 2000, “Phytochrome A and phytochrome B1 control the acquisition of competence for shoot regeneration in tomato hypocotyl.” *Plant Cell Reports* 19 pp.604-609

Bhatia P., Ashwath N., 2008, “Improving the quality of in vitro cultured shoots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Red Coat)”. *Biotechnology* 7 pp.188-193

[10.3923/biotech.2008.188.193](https://doi.org/10.3923/biotech.2008.188.193)

Bhatia P., Ashwath N., Senaratna T., Midmore D., 2004, “Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*)”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78 pp.1-21

Camilleri C., L. Jouanin, 1991, “The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants”. *Mol Plant Microbe Interact.*, 4(2), pp.155-162.

[10.1094/mpmi-4-155](https://doi.org/10.1094/mpmi-4-155)

Camilleri C, Jouanin L (1991) The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. *Mol Plant-Microbe Interact* 4 pp.155–162

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

Casanova E, Trillas MI, Moysset L, Vainstein A (2005) Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnol Adv* 23pp.3–39.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.06.002>

Chandel G., Katiyar SK., 2000, “Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.)”. *Adv Plant Sci* 13: 11-17

Chaudhuri KN, Ghosh B, Tepfer D, Jha S (2006) Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 25pp.1059–1066.

<https://doi.org/10.1007/s00299-006-0164-z>

Chen L., Cai Y., Liu X., Guo C., Sun S., Wu, C., and Hou W., 2018, “Soybean hairy roots produced in vitro by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Transformation”. *The Crop Journal*, 6(2) pp.162-171.

Christey MC (2001) Invited review: use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 37 pp.687–700.

<https://doi.org/10.1079/IVP2001203>

Costa M.G.C., Nogueira F.T.S., Figueira M.L., Otoni W.C., Brommonschenkel S.H., Cecon P.R., 2000, “Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars”. *Plant Cell Reports* 19 pp.327-332

Costantino P, Capone I, Cardarelli M, De Paolis A, Mauro ML, Trovato M (1994) Bacterial plant oncogenes: the rol genes' saga. *Genetica* 94 pp.203–211.

<https://doi.org/10.1007/BF01443434>

Desmet S, De Keyser E, Van Vaerenbergh J, Baeyen S, Van Huylenbroeck J, Geelen D, Dhooghe E (2019) Differential efficiency of wild type rhizogenic strains for rol gene transformation of plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 103 pp.6657–6672.

<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10003-0>

Desmet, S., Dhooghe E., De Keyser E., Van Huylbroeck J., Muller R., Geelen D., and Lutken H., 2020, “Rhizogenic agrobacteria as an innovative tool for plant breeding: current achievements and limitations.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 104, 2435–2451.

<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10403-7>

Díez M.J., Nuez F., 2008, Tomato. In: Prohens J., Nuez F. (eds) *Vegetables II. Handbook of Plant Breeding*, vol 2. Springer, New York, NY.

https://doi.org/10.1007/978-0-387-74110-9_7

El-Bakry A.A., 2002, “Effect of genotype, growth regulators, carbon source, and pH on shoot induction and plant regeneration in tomato”. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 38 pp.501-507

Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., ... & Li, D. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1385-1393.

Fasoula, V. A., & Fasoula, D. A. (2002). Principles underlying genetic improvement for high and stable crop yield potential. *Field Crops Research*, 75(2-3), 191-209.

Fasoulas, A. C. (1981). Principles and methods of plant breeding. Publ. 11. *Arist. Univ., Thessaloniki*, 147.

Fehr W. R., Henry H. H., 1980, “Hybridisation of Crop Plants.”, American Society of Agronomy and Science of America, New York

Gangopadhyay M, Chakraborty D, Bhattacharyya S, Bhattacharya S (2010) Regeneration of transformed plants from hairy roots of *Plumbago indica*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 102pp.109–114.

<https://doi.org/10.1007/s11240-010-9702-z>

Hansen G., Wright M.S., 1999, “Recent advances in the transformation of plants”. *Trends in Plant Science*, 4 pp.226-231

[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01412-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01412-0)

Horn, W. (2002). Breeding methods and breeding research. In *Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches* (pp. 47-83). Springer, Dordrecht.

Hu Z.B., A.W. Alfermann, 1993, "Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*", *Phytochemistry*, 32 (3), pp. 699-703.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95156-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95156-2)

Ichimura K., Oda M., 1998, "Stimulation of Phenotypically Normal Shoot Regeneration of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by Commercial Filter Paper Extract". *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 67 pp.378-380

Kuligowska, K., Lütken, H., & Müller, R. (2016). Towards development of new ornamental plants: status and progress in wide hybridization. *Planta*, 244(1), 1-17.

Kumar V., Jones B., M.R. Davey, 1991, "Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycine argyria*", *Plant Cell Reports*, 10, pp. 135-138

<https://doi.org/10.1007/BF00232044>

Kaparakis G., Alderson P.G., 2002, "Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper". *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77 pp.186-190

Kaparakis G., Alderson P.G., 2008, "Role for cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.)", *Journal of Plant Growth Regulation* 27 pp.110-114

Long, C., Chen, Z., Zhou, Y., & Long, B. (2018). The role of biodiversity and plant conservation for ornamental breeding. In *Ornamental Crops* (pp. 1-12). Springer, Cham.

Majumdar S, Garai S, Jha S (2011) Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant Cell Rep* 30 pp.941–954.

<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1035-9>

Matthysse A.G. and Wagner V.T. 1994. Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to host cells. In *Developments in Plant Pathology* (Kado C.L. and Crosa J.H. eds) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 79-92.

Moore LW, Chilton WS, Canfield ML, 1997 “Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors.” *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1), pp.201–207.

<https://doi.org/10.1128/aem.63.1.201-207.1997>

Naika S., Lidt J., Goffau M., Hilmi M. and Dam B., 2005, ‘Cultivation of Tomato: production, processing and marketing’, *Agrodok*, 17.

http://test.agromisa.org/wp-content/uploads/Agrodok-17-Cultivation-of-tomato_sample.pdf

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

Nester E.W. (2015) *Agrobacterium*: nature’s genetic engineer. *Front Plant Sci* 5:1–16.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>

Nguyen, C., Bourgaud, F., Forlot, P. et al.,1992, “Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species”, *Plant Cell Reports* ,11, pp. 424–427.

<https://doi.org/10.1007/BF00234375>

Ooms G., Karp A., Burrell M.M., Twell D. and Roberts J., 1985, “Genetic modification of potato development using Ri T-DNA.” *Theoretical and Applied Genetics*, 70(4) pp.440-446.

Park J., Yi B., Lee C., 2001, “Effects of plant growth regulators, bud length, donor plant age, low temperature treatment and glucose concentration on callus induction and plant regeneration in anther culture of cherry tomato 'Mini-carol'”. *J. Korean Soc. Hortic. Sci.* 42 pp.32-37

Park S.H., Morris J.L., Park J.E., Hirschi K.D., Smith R.H., 2003, “Efficient and genotype-independent *Agrobacterium* - Mediated tomato transformation”. *Journal of Plant Physiology* 160 pp.1253- 1257

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.

Pérez de la Torre MC, Fernández P, Greppi JA, Coviella MA, Fernández MN, Astigueta F, Mata DA, Trupkin SA (2018) Transformation of *Mecardonia* (Plantaginaceae) with wild-type *Agrobacterium rhizogenes* efficiently improves compact growth, branching and flower related ornamental traits. *Sci Hortic (Amsterdam)* 234pp.300–311.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.047>

Petit A., Delhaye S., Temple J. and Morel G., 1970, “Recherches sur les quanidines des tissues de Crown Gall. Mise en evidence d’une relation biochimique specifique entre les souches d’ *Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu’elles induisent” *Physiol. Veg.* 8: 205-213.

Qaim M., Zilberman D., 2003, "Yield Effects of Genetically Modified Crops in Developing Countries", *Science*, 299 (5608), pp. 900-902.

<https://doi.org/10.1126/science.1080609>

Rugini E, Silvestri C, Cristofori V, Brunori E, Biasi R (2015) Ten years field trial observations of ri-TDNA cherry Colt rootstocks and their effect on grafted sweet cherry cv Lapins. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 123pp.557–568.

<https://doi.org/10.1007/s11240-015-0860-x>

Sevón N, Dräger B, Hiltunen R, Oksman-Caldentey KM (1997) Characterization of transgenic plants derived from hairy roots of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Rep* 16pp.605–611.

<https://doi.org/10.1007/s002990050287>

Slater A., Scott N.W., Fowler M.R., 2003, “Plant Tissue Culture.” *Plant Biotechnology, the Genetic Manipulation of Plants* pp.35-53

Stachel S.E., Timmerman B., and Zambryski P. 1986. Generation of single stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 322 pp. 706 – 712

Spena A, Schmülling T, Koncz C, Schell JS, Kayani WK (1987) Independent and synergistic activity of rol A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J* 6:3891–3899

Stachel S.E., Timmerman B., and Zambryski P. 1987. Activation of *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5' virD gene products. *EMBO J.* 6 pp.857-863

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

Tao J., L. Li, 2006, "Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*", *South African Journal of Botany*, 72 (2), pp. 211-216

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.07.010>

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

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90430-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90430-6)

Tepfer D. (2016) DNA transfer to plants by *Agrobacterium rhizogenes*: a model for genetic communication between species and biospheres. In: Jha S (ed) *Transgenesis and secondary metabolism*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–41

Trovato M, Maras B, Linhares F, Costantino P (2001) The plant oncogene rolD encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 pp.13449–13453.

<https://doi.org/10.1073/pnas.231320398>

Velcheva M., Faltin Z., Flaishman M., Eshdat Y., Perl A., 2005, "A liquid culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.)". *Plant Science* 168 pp.121-130

Venkatachalam P., Geetha N., Priya P., Rajaseger G., Jayabalan N., 2000, "High frequency plantlet regeneration from hypocotyl explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via organogenesis". *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 1 pp.95-100

Vlachostergios, D. N., Lithourgidis, A. S., & Roupakias, D. G. (2011). Effectiveness of single-plant selection at low density under organic environment: A field study with lentil. *Crop Science*, 51(1), 41-51.

White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1985) Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol* 164 pp.33–44

Winans S.C., Mantis N.J., Chen C.Y., Chang C.H., and Han D.C. 1994. Host recognition by the VirA, VirG2-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens* Res. In *Microb.* 145 (5-6) pp.461-473

Wu Y.F., Chen Y., Liang X.M., Wang X.Z., 2006, “An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium*- mediated transformation in tomato.” *Russian Journal of Plant Physiology* 53 pp. 252-256

Ελληνική Βιβλιογραφία

Χα Ι., Πετρόπουλος Σ., 2014, «Γενική Λαχανοκομία & Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών»