



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

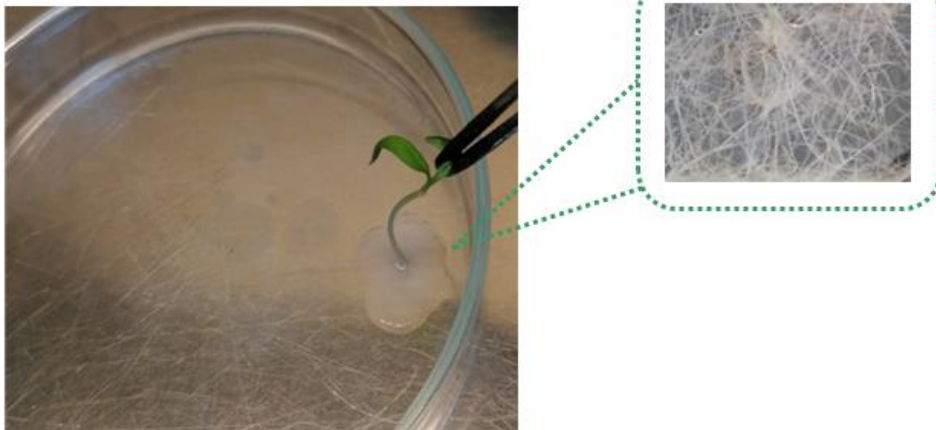
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της  
τομάτας μέσω του *Agrobacterium rhizogenes*»

Παπανικολάου Λυδία-Ευγενία



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

ΒΟΛΟΣ 2022

**«Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της  
τομάτας μέσω του *Agrobacterium rhizogenes*»**

**"Protocol optimization for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated  
transformation of tomato"**

**ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΛΥΔΙΑ ΕΥΓΕΝΙΑ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

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

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

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ κα. Ουρανία Παυλή, επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας, για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες γνώσεις, τις συμβουλές που μου προσέφερε, τις εύστοχες υποδείξεις και την υποστήριξή της όλο αυτό το διάστημα.

Ακόμα, δεν θα μπορούσα να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων την διδάσκουσα και μέλος του εργαστηριακού προσωπικού του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, κα. Ευαγγελία Παναγιωτάκη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο που αφιέρωσαν για τη διόρθωση της πτυχιακής μου διατριβής.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	vi
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Η Καλλιέργεια της Τομάτας.....	1
1.2. Ταξινόμηση της τομάτας ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	4
1.3. Βοτανική περιγραφή.....	5
1.4. Καλλιεργητικές απαιτήσεις.....	7
1.5. Διατροφική αξία .....	8
1.6. Χρήσεις της τομάτας.....	11
1.7. Η τομάτα στην Ελλάδα .....	12
1.8. Γενετική Βελτίωση της τομάτας .....	15
1.8.1 Ιστορική αναδρομή.....	15
1.8.2 Βελτιωτικοί στόχοι .....	16
1.8.3 Μέθοδοι βελτίωσης της τομάτας .....	18
1.9. Γενετική μηχανική.....	20
1.9.1 Γενετικός μετασχηματισμός .....	22
1.9.2. Μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού .....	23
1.10. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	29
1.10.1 Πλασμίδιο Ri.....	32
1.10.2 Γονίδια <i>rol</i> .....	35
1.10.3 Harpins.....	40
1.2 Σκοπός της Μελέτης.....	41
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>42</b>
2.1 Φυτικό υλικό.....	42
2.2 Βακτηριακά στελέχη <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	42
2.3 Διαδικασία μετασχηματισμού τομάτας μέσω του <i>A. rhizogenes</i> .....	43
2.4 Έλεγχος της ένθεσης του διαγονιδίου μέσω PCR.....	48
2.5 Καταπόνηση υψηλής αλατότητας και ποσοτικός προσδιορισμός προλίνης στις ρίζες διαγονιδιακών σπορόφυτων τομάτας .....	51
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	54
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>55</b>
3.1 Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών μετά των εμβολιασμό.....	55
3.2 Φαινοτυπικές διαφορές των ριζικών τριχιδίων .....	56
3.3 Αριθμός πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων.....	60

3.4	Μήκος πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων .....	62
3.5	Συχνότητα μετασχηματισμού .....	63
3.6	Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων .....	63
3.7	Αξιολόγηση των διαγονιδιακών ριζών υπό συνθήκες καταπόνησης .....	64
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	67
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	71
	Βιβλιογραφία .....	72

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στον κλάδο της Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια στρέφεται ολοένα και περισσότερο στην αξιοποίηση της γενετικής πληροφορίας που απαντάται στους φυτικούς οργανισμούς με τη χρήση καινοτόμων μεθόδων, συμπεριλαμβανομένων αυτών της γενετικής μηχανικής. Με δεδομένο ότι οι διαδικασίες του γενετικού μετασχηματισμού συχνά είναι επίπονες και χρονοβόρες, η ανάπτυξη πρωτοκόλλων που παρακάμπτουν τις δυσκολίες που συνοδεύουν το σταθερό μετασχηματισμό αποτελεί σπουδαίο πεδίο έρευνας. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας με την μεσολάβηση *Agrobacterium rhizogenes*, ως φορέα για την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών με αγρίου τύπου υπέργειο μέρος. Εξετάστηκαν δύο βακτηριακά στελέχη, τα R1000 και R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, ως προς την ικανότητα μετασχηματισμού τους αλλά και η αλληλεπίδρασή τους με την εμπορική ποικιλία τομάτας MITO. Τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα έφεραν θυσσανώδες ριζικό σύστημα με πλαγιοτροπική ανάπτυξη και διακλαδώσεις πλευρικών ριζών μεγαλύτερου μήκους συγκριτικά με τα μη-μετασχηματισμένα φυτά που αξιοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα πειραματικά αποτελέσματα εξάρουν την καταλληλότητα του *Agrobacterium rhizogenes* για την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών καθώς και τα δυο βακτηριακά στελέχη είχαν υψηλή συχνότητα μετασχηματισμού. Επιπλέον, υπογραμμίζεται ο κρίσιμος ρόλος της σύστασης των υποστρωμάτων, με την παρουσία της ακετοσυρινγκόνης και του MES να επιδρούν θετικά στη συχνότητα μετασχηματισμού. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο βακτηριακών στελεχών, σημειώνεται πως το R1000 οδήγησε σε σημαντικά υψηλό ποσοστό μετασχηματισμού στην τομάτα, αποδεικνύοντας την καταλληλότητα του για την επίτευξη του μετασχηματισμού, ενώ το R1000-hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> οδήγησε σε μειωμένη αλλά ικανοποιητική συχνότητα μετασχηματισμού. Η διαγονιδιακή φύση των ριζιδίων επιβεβαιώθηκε, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR, με την οποία διαπιστώθηκε η επιτυχής ένθεση των γονιδίων *rolB2* και *hprZ* για τα στελέχη R1000 και R1000-hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> αντίστοιχα. Στο πλαίσιο πρακτικής αξιοποίησης του πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού, τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα καθώς και οι μάρτυρες υποβλήθηκαν σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας και ακολούθησε η αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους βάσει της συμπτωματολογίας και της εκτίμησης της περιεχόμενης ποσότητας προλίνης. Παρά το γεγονός ότι το σύνολο των φυτών εμφάνισε συμπτώματα καταπόνησης, οι υπό μελέτη κατηγορίες φυτών διέφεραν ως

προς το χρόνο εμφάνισης και την ένταση των συμπτωμάτων, με τα R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σπορόφυτα να χαρακτηρίζονται από ηπιότερη συμπτωματολογία. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι το *A. rhizogenes*, και ειδικότερα το στέλεχος R1000, αποτελεί ένα αποτελεσματικό μέσο επαγωγής διαγονιδιακών ριζών στην τομάτα.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1. Η Καλλιέργεια της Τομάτας

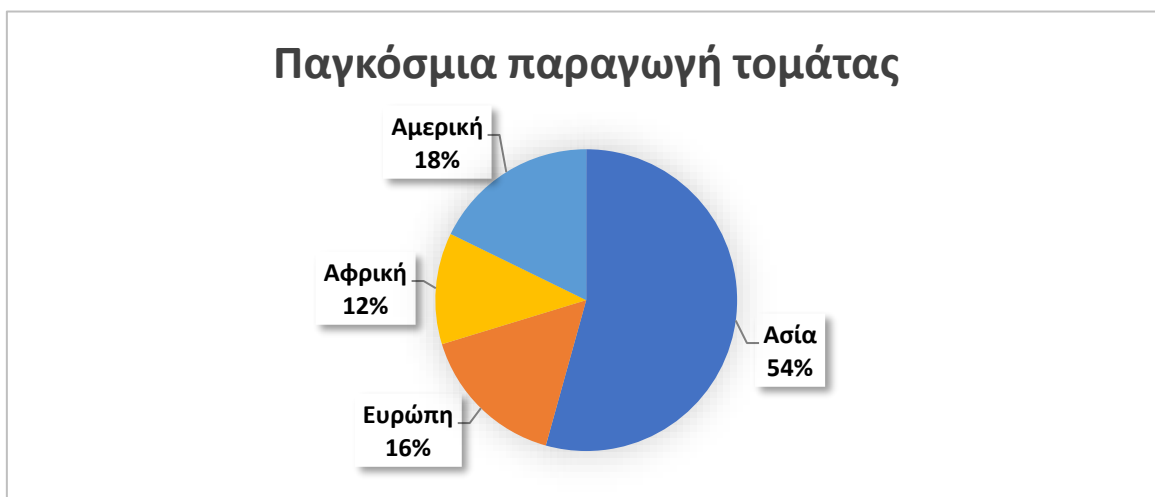
Η καλλιεργούμενη τομάτα (*Solanum lycopersicum L.*) ανήκει στην πολυπληθή και πολυποίκιλη οικογένεια των Σολανωδών (*Solanaceae*), στην οποία συγκαταλέγονται πάνω από 3000 είδη, με ιδιαίτερη οικονομική σημασία και φαρμακευτική αξία. Στην οικογένεια των Σολανωδών, περιλαμβάνονται σπουδαία εδώδιμα είδη (πατάτες, μελιτζάνες, πιπεριές) καθώς και γένη και είδη που παράγουν ουσίες με φαρμακευτικό ενδιαφέρον (γένος *Datura*, *Atropa belladonna*).

Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη ταξινόμηση του Angiosperm Phylogeny Group το 2016, τα *Solanaceae* αποτελούν μέλη των ανθοφόρων φυτών της κλάσης των Αστεριδών (*Asterids*) (The Angiosperm Phylogeny Group, 2016) και, βάσει μελετών, χρονολογούνται περίπου 49 εκατομμύρια χρόνια έως και 59 εκατομμύρια χρόνια πριν (Bell et al., 2010). Η τομάτα πιθανολογείται ότι καλλιεργήθηκε πρώτη φορά το 500 π.Χ. από τους Αζτέκους, ενώ στην Ευρώπη εισήχθη για πρώτη φορά τον 16<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ. από Ισπανούς εξερευνητές. Ωστόσο, η καλλιέργεια της τομάτας γνώρισε ευρεία εξάπλωση το 18<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ. αφού νωρίτερα επικρατούσε η άποψη πως οι καρποί τομάτας είναι τοξικοί, λόγω της ομοιότητας του φυτού με το συγγενικό τοξικό είδος *Atropa belladonna* (Χα & Πετρόπουλος, 2014).

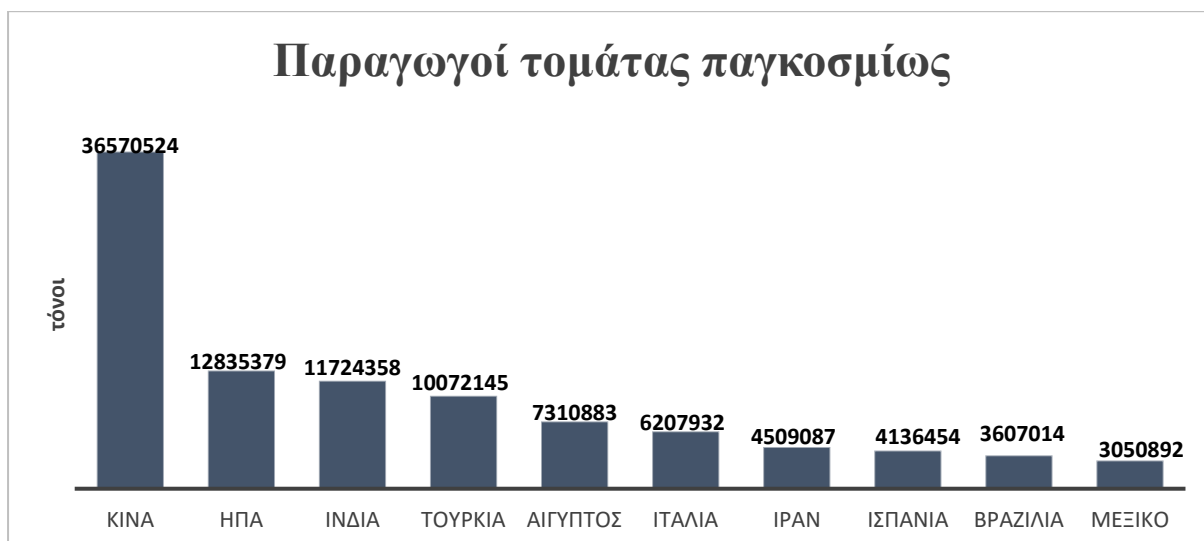
Στην Ελλάδα, η τομάτα εισήχθη το 1815 από τους Καθολικούς μοναχούς της Μονής των Καπουκίνων “carruccio”, σύμφωνα με τον διευθυντή της Βιβλιοθήκης Ιστορικών Μελετών, Δημήτριο Καμπούρογλου (Χαριζάνης, 2021), ενώ η ευρεία καλλιέργειά της ξεκίνησε από το 1825 (Χα & Πετρόπουλος, 2014). Στη χώρα μας το έτος 2016, η καλλιέργεια τομάτας κατέλαβε έκταση 156,4 χιλιάδων στρεμμάτων, αγγίζοντας παραγωγή 897,7 χιλιάδων τόνων, σημειώνοντας μια μικρή μείωση συγκριτικά με τα έτη 2015 και 2014 όπου παρήχθησαν 926,1 και 918,4 χιλιάδες τόνοι, αντίστοιχα (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σύνολο 681,8 στρεμμάτων, που αντιστοιχούν σε καλλιέργεια κηπευτικών κατά το έτος 2016, η καλλιέργεια της τομάτας κατέλαβε έκταση 156,4 χιλιάδων στρεμμάτων και τα λοιπά κηπευτικά αντιστοιχούν έκταση 525,4 χιλιάδων στρεμμάτων (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2016).



Σήμερα, η τομάτα καλλιεργείται παγκοσμίως καλύπτοντας 5.030.545 εκτάρια καλλιεργήσιμης γης, αποδίδοντας παραγωγή 180.766.329 τόνων (FAO, 2021). Αναφέρεται ότι από το 2003 έως το 2009 υπήρξε αύξηση στην καλλιέργεια της τομάτας κατά 427.253 εκτάρια και παρήχθησαν 39.494.604 περισσότεροι τόνοι προϊόντος, ενώ από το 2009 έως το 2019 σημειώθηκε αύξηση της τάξης των 612.487 εκταρίων. Κατά την τελευταία 20ετία, παρατηρήθηκε αύξηση της τάξης των 1.064.949 εκταρίων καλλιεργήσιμης γης τομάτας. Στην παγκόσμια κατάταξη, πρώτη παραγωγός χώρα είναι η Κίνα, με την παραγωγή της να αγγίζει τους 36.570.524,42 τόνους, ακολουθούν οι Η.Π.Α., που αποδίδουν το 17,7 % της παγκόσμιας παραγωγής αγγίζοντας τους 12.835.379,08 τόνους, και τρίτη είναι η Ινδία όπου παράγονται 11.724.358,08 τόνοι. Παρά την υψηλή παραγωγή, οι Η.Π.Α. κατέχουν την πρώτη θέση σε εισαγωγή τομάτας παγκοσμίως. Στις μεγαλύτερες εισαγωγείς τομάτας σε παγκόσμιο επίπεδο συγκαταλέγονται η Γερμανία, με εισαγωγή της τάξης των 657.224 τόνων, η Γαλλία με 452.613 τόνους εισαγωγών και ακολουθούν η Ρωσία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Σε επίπεδο εξαγωγικής δραστηριότητας, την πρώτη θέση καταλαμβάνει το Μεξικό, με 1.120.077 τόνους εξαγωγής, και έπονται η Ισπανία, η Ολλανδία, η Τουρκία και το Μαρόκο. Τα τελευταία χρόνια, ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξαγωγική δύναμη της Ισπανίας, που την καθιστά δεύτερη στην παγκόσμια κατάταξη εξάγοντας 873.085 τόνους, καθώς και το υψηλό παραγωγικό δυναμικό της που την τοποθετεί μεταξύ των 10 μεγαλύτερων παραγωγών παγκοσμίως, με 4.136.454 τόνους παραγωγής. Αντιστοίχως, η Τουρκία βρίσκεται στην τέταρτη θέση παραγωγής τομάτας σε παγκόσμιο επίπεδο, σημειώνοντας παραγωγή της τάξης των 10.072.145 τόνων, αλλά και μεταξύ των πέντε μεγαλύτερων εξαγωγέων παγκοσμίως (FAO, 2021).

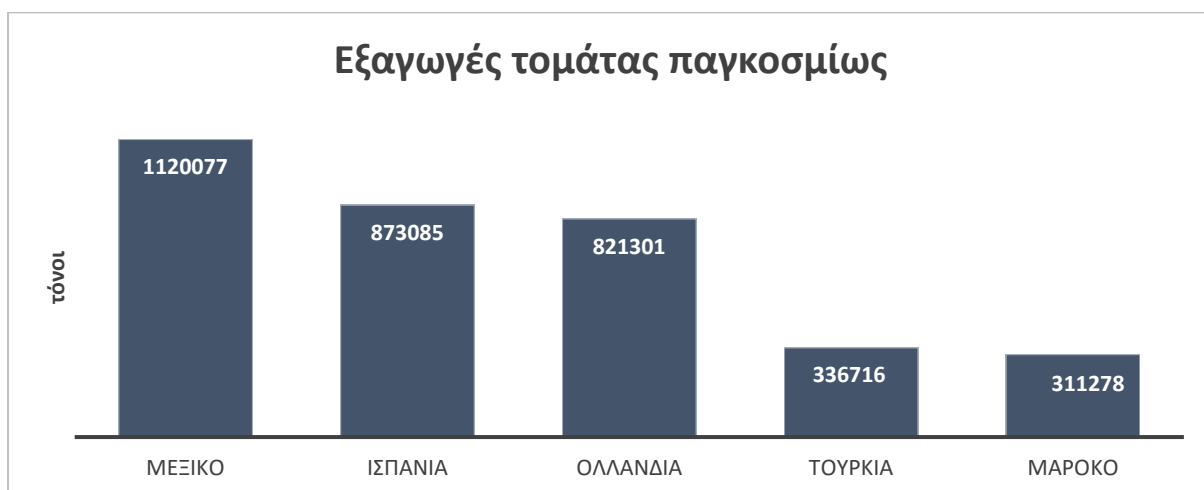


**Διάγραμμα 1:** Παγκόσμια παραγωγή τομάτας (Πηγή: (FAO, 2021))

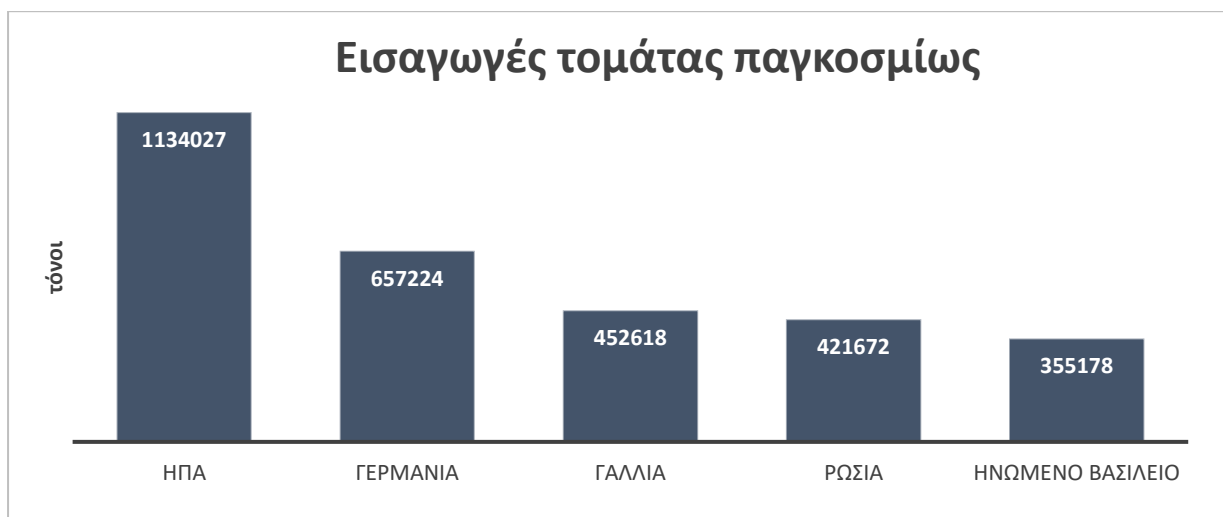


**Διάγραμμα 2:** Οι δέκα μεγαλύτεροι παραγωγοί τομάτας παγκοσμίως. Πηγή: (FAO, 2021)

Στην Ελλάδα, για το έτος 2019, η εξαγωγή τομάτας άγγιξε τους 35.465 τόνους, σημειώνοντας μια μικρή πτώση σε σχέση με το 2018. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι εξαγωγές το 2009 ήταν μόλις 2.639 τόνοι και έπειτα παρατηρήθηκε μια ραγδαία αύξηση, σημειώνοντας εξαγωγή της τάξης των 16.177 και 39.056 τόνων τα έτη 2012 και 2014, αντίστοιχα. Έκτοτε, τα ποσοστά εξαγωγών για την χώρα μας κυμαίνονται σε αντίστοιχα επίπεδα. Παράλληλα, οι εισαγωγές τομάτας το 2019 στην Ελλάδα ήταν 17.862, σημειώνοντας μεγάλη πτώση συγκριτικά με το 2018 (29.281 τόνοι). Από τις αρχές του 2000, έχει σημειωθεί εξίσου μεγάλη άνοδος στην εισαγόμενη ποσότητα τομάτας (FAO, 2019).



**Διάγραμμα 3:** Όγκος εξαγωγής τομάτας των πέντε μεγαλύτερων εξαγωγών παγκοσμίως. Πηγή: (FAO, 2019)



**Διάγραμμα 4:** Όγκος εισαγωγής τομάτας των πέντε μεγαλύτερων εισαγωγέων παγκοσμίως. Πηγή: (FAO, 2019)

## 1.2. Ταξινόμηση της τομάτας (*Solanum lycopersicum* L.)

Η τομάτα ή αλλιώς στρύχνον το λυκοπέρσικον είναι μέλος της οικογένειας των Σολανωδών (*Solanaceae*) και του γένους *Solanum*. Διαθέτει διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων με  $2n = 24$ . Τα συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα μοριακών αναλύσεων σχετικά με μία πληθώρα γονιδίων καταδεικνύουν την κατάταξη της τομάτας στο γένος *Solanum* (Knapp & Peralta, 2016). Αναφέρεται ότι το *Solanum* θεωρείται ένα από τα δέκα πιο πολυπληθή σε είδη, γένη των αγγειόσπερμων (Frodin, 2004).

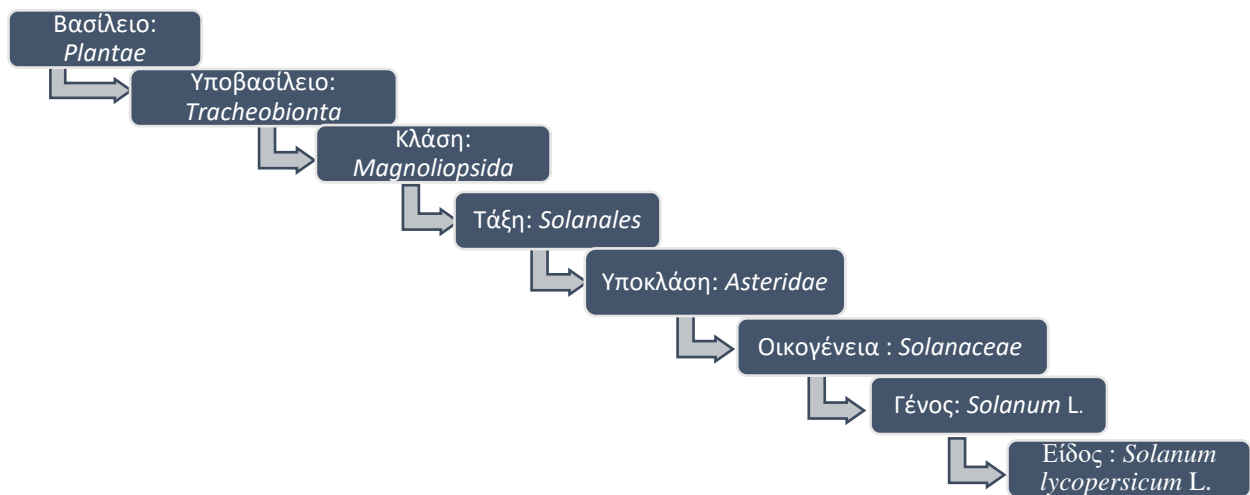
Η τομάτα ή *Solanum lycopersicum* υπάρχει μόνο ως εξημερωμένο ή άγριο φυτό ενώ έχουν βρεθεί 12 άγρια είδη (Πίνακας 1) (Knapp & Peralta, 2016).

**Πίνακας 1:** Άγρια συγγενικά είδη της τομάτας. Πηγή: (Knapp & Peralta, 2016)

<i>Solanum arcanum</i>	<i>Solanum cheesmaniae</i>
<i>Solanum chilense</i>	<i>Solanum chmielewskii</i>
<i>Solanum corneliomulleri</i>	<i>Solanum galapagense</i>
<i>Solanum habrochaites</i>	<i>Solanum huaylasense</i>
<i>Solanum neorickii</i>	<i>Solanum pennellii</i>
<i>Solanum peruvianum</i>	<i>Solanum pimpinellifolium</i>

Το όνομα *Lycopersicon* φαίνεται να είχε επινοηθεί από τον de Tournefort (1694), ενώ ο πρώτος που το χρησιμοποίησε ήταν ο Philip Miller στην πρώτη έκδοση του *The Gardener's Dictionary* (Miller, *The Gardener's dictionary*, 1731). Στο ίδιο έργο, το γένος *Solanum*

αναγνωρίστηκε από τον Miller και συμπεριλήφθηκε σε αυτό η μελιτζάνα και η πατάτα. Ο όρος (*Lycopersicon*), που σημαίνει «λυκόμορφο ροδάκινο», περιλάμβανε έναν αριθμό taxa με διάφορους καρπούς («στρογγυλά, σαρκώδη, μαλακά φρούτα»), συμπεριλαμβανομένων όλων των ποικιλιών καλλιεργούμενης τομάτας. Στο γένος *Solanum* κατέταξε τις τομάτες ο Linnaeus το 1753 στο βιβλίο του *Species Plantarum*. Η ίδια ταξινόμηση αναφέρεται και από τον Adrian de Jussieu (1789), ωστόσο ο Miller εξακολούθησε με τη χρήση της γενικής ονομασίας *Lycopersicon*. Ο εκδότης του Λεξικού του Κηπουρού και του Βοτανολόγου (Miller, 1807) Thomas Martyn, προχώρησε στην συγχώνευση των *Lycopersicon* και *Solanum* και στην αναγνώριση όλων των ειδών που αναφέρονται στο έργο του Miller ως μέλη του *Solanum*. Σήμερα, είναι ευρέως αποδεκτή η ταξινόμηση των τοματών ως μέλη του γένους *Solanum*, η οποία βασίστηκε σε πληθώρα μορφολογικών και μοριακών δεδομένων (Knapp & Peralta, 2016).



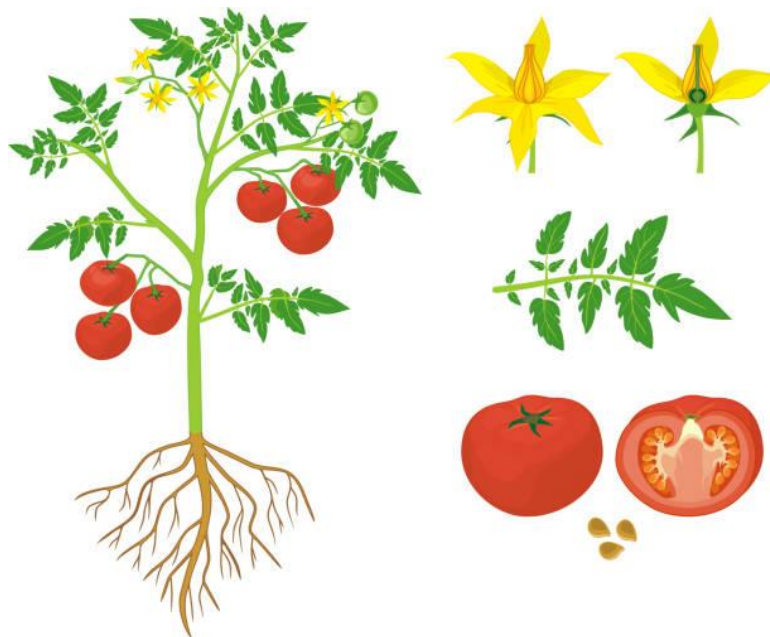
**Διάγραμμα 5:** Συστηματική ταξινόμηση της τομάτας (*Solanum lycopersicum* L.) Πηγή: (USDA)

### 1.3. Βοτανική περιγραφή

Η τομάτα είναι ένα ετήσιο φυτό που μπορεί να αποκτήσει ύψος που υπερβαίνει τα 2 μέτρα. Το υπόγειο τμήμα του φυτού χαρακτηρίζεται από ένα ισχυρό ριζικό σύστημα που μπορεί να αναπτυχθεί σε βάθος 50 cm ή περισσότερο. Σε περίπτωση απευθείας σποράς, αναπτύσσεται μια κύρια πασσαλώδης ρίζα που παράγει πυκνές πλευρικές δευτερεύουσες ρίζες και ριζικά τριχίδια (Naika, 2005). Αντίθετα, στην περίπτωση σποράς σε σπορείο ακολουθούμενης από μεταφύτευση παρατηρείται σπάσιμο της κεντρικής ρίζας και ανάπτυξη θυссανώδους ριζικού συστήματος (Χα & Πετρόπουλος, 2014).

Το υπέργειο τμήμα του φυτού αποτελείται από τον κεντρικό βλαστό, που χαρακτηρίζεται ως συμπαγής και φέρει φύλλα, ταξιανθίες καθώς και τριχίδια (Naika et al., 2005). Το φυτό σχηματίζει πολλούς πλευρικούς βλαστούς, με αποτέλεσμα να αποκτά θαμνώδη μορφή. Η ανάπτυξη του φυτού διακρίνεται σε ακαθόριστη (indeterminate growth) και καθορισμένη (determinate growth), με την πρώτη να ενδείκνυται για καλλιέργεια θερμοκηπίου καθώς αναρριχάται και τη δεύτερη για καλλιέργεια υπαίθρου αφού τα φυτά είναι ημιαναρριχώμενα ή αυτοκλαδευόμενα και δεν χρήζουν υποστήλωσης.

Τα φύλλα του φυτού είναι σπειροειδώς διατεταγμένα στο στέλεχος με φυλλοταξία 137,5°. Είναι σύνθετα, μήκους 15-50 εκατοστών και πλάτους 10-30 εκατοστών, και αποτελούνται από πέντε έως εννέα φυλλάρια. Τα φυλλάρια είναι οδοντωτά, ωσειδή έως επιμήκη και φέρουν τρίχες (Εικόνα 1). Μεταξύ των μεγαλύτερων φυλλαρίων υπάρχουν μικρά πτερύγια, ενώ κάθε φύλλο φέρει ένα επάκριο φυλλάριο (Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 7, 2017) (Χα & Πετρόπουλος, 2014).



**Εικόνα 1:** Μορφολογικά χαρακτηριστικά τομάτας. Πηγή: (<https://www.istockphoto.com/>)

Τα άνθη εμφανίζονται σε ταξιανθίες των 4-12 ανθέων, ενώ ο μίσχος είναι μεγέθους 3-6 cm. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, κατά κανόνα αυτογονιμοποιούμενα -κατά περίπτωση μπορεί να υπάρξει και ένα ποσοστό σταυρογονιμοποίησης- με διάμετρο 1,5-2 cm. Η ανάπτυξη τους είναι απέναντι ή μεταξύ των φύλλων. Ο κάλυκας είναι κοντός πράσινος και φέρει τρίχες, με πέντε ενωμένα σέπαλα. Τα άνθη αποτελούνται από 6 πέταλα, κίτρινου χρωματισμού και

μήκους έως 1 cm. Οι στήμονες είναι 5 ή περισσότεροι, κίτρινοι και ενωμένοι περιβάλλουν τον στύλο, ο οποίος είναι κοντύτερος και έτσι ευνοείται η αυτεπικονίαση. Η ωθήκη είναι πολύχωρη, αποτελούμενη 2-9 χώρους (Naika et al., 2005) (Χα & Πετρόπουλος, 2014).

Ο καρπός της τομάτας είναι μια σαρκώδης ράγα με 2-25 καρπόφυλλα. Είναι σφαιρικός ή ωοειδής με διάμετρο 2-15 cm (Εικόνα 2). Διαθέτει χοντρό περικάρπιο, λεπτή επιδερμίδα, πλακούντα και έναν ζελατινώδη χυμό που περιβάλλει τα σπέρματα. Το χρώμα του ώριμου καρπού ποικίλλει από κίτρινο, πορτοκαλί έως κόκκινο (Naika et al., 2005) (Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 7, 2017). Οι σπόροι έχουν σχήμα νεφρού ή αχλαδιού, φέρουν τρίχες, είναι ανοιχτόχρωμοι καστανοί, μήκους 3-5 mm και πλάτους 2-4 mm. Περιέχουν έμβρυο συσπειρωμένο μέσα στο ενδοσπέρμιο. Το βάρος 1000 σπόρων κυμαίνεται περί τα 2,5 - 3,5 g. Ο καρπός αναπτύσσεται από επτά έως εννέα εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (Naika et al., 2005).



**Εικόνα 2:** Ο καρπός της τομάτας. *Πηγή:*(M. Kumar et al., 2021)

#### **1.4. Καλλιεργητικές απαιτήσεις**

Η τομάτα είναι ένα θερμοαπαιτητικό φυτό με την ιδανική μέση ημερήσια θερμοκρασία ανάπτυξης να κυμαίνεται περί τους 18-25 °C και τη νυχτερινή τους 10-20 °C. Οι μεγάλες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις μεταξύ ημέρας και νύχτας δρουν δυσμενώς στην ανάπτυξη και απόδοση του φυτού. Το ίδιο συμβαίνει κατά την επικράτηση θερμοκρασιών άνω των 30 °C, ενώ παρατηρείται πλήρης ανασχεση της ανάπτυξης στους 35 °C. Η ανάπτυξη της τομάτας απαιτεί 90 έως 150 ημέρες, γεγονός που την κατατάσσει στις ταχέως αναπτυσσόμενες καλλιέργειες. Ταυτόχρονα, αποτελεί είδος ουδέτερο στη φωτοπερίοδο, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη αναπαραγωγικών οργάνων και η άνθηση να μην εξαρτώνται από το μήκος της ημέρας.

Επιπλέον, η καλλιέργεια επηρεάζεται δυσμενώς υπό την επικράτηση υψηλών θερμοκρασιών, της τάξεως των 25 °C, σε συνδυασμό με υψηλή υγρασία και άνεμο, επιδρώντας αρνητικά στην απόδοση. Παράλληλα, η επικράτηση υψηλής θερμοκρασίας νύχτας, άνω των 20 °C, σε συνδυασμό με υψηλή σχετική υγρασία και περιορισμένη ηλιοφάνεια προκαλούν υπέρμετρη βλαστική ανάπτυξη και κακή ανάπτυξη καρπών. Γενικά, υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας ευνοείται η ανάπτυξη μυκητολογικών ασθενειών, παρασίτων και σήψη καρπών, ενώ ως πλέον ενδεδειγμένες για την καλλιέργεια θεωρούνται οι περιοχές με ξηρό κλίμα (FAO, 2019).

Η τομάτα δύναται να καλλιεργηθεί σε ποικίλα εδάφη, όμως ως ιδανικά θεωρούνται τα ελαφριά εδάφη με καλή στράγγιση και σταθερή δομή, που είναι πλούσια σε οργανική ουσία και εμφανίζουν pH 5-7. Αναφέρεται ότι για την προώμιση της παραγωγής μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμμώδη εδάφη, ενώ τα βαριά πηλώδη εδάφη θεωρούνται ως ακατάλληλα για την καλλιέργεια της τομάτας (Χα & Πετρόπουλος, 2014). Αναφορικά με τη λίπανση, οι απαιτήσεις των υψηλοαποδοτικών ποικιλιών κυμαίνονται περί τα 10 - 15 kg N/στρέμμα, τα 6.5 - 11 kg P/στρέμμα και 16 - 24 kg K/στρέμμα (FAO, 2019).

## **1.5. Διατροφική αξία**

Η τομάτα αποτελεί κύριο συστατικό της δυτικής διατροφής, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στη διαθεσιμότητα σε υψηλής λειτουργικότητας συστατικά (Al Dairi et al., 2021) προσφέροντας το 80 % της ημερήσιας πρόσληψης σε λυκοπένιο, ασκορβικό οξύ, κάλιο, φλαβονοειδή (ρουτίνη και ναρινγενίνη), οφθαλμόλη και α-τοκοφερόλη (Willcox et al., 2003). Πολλές μελέτες έχουν εξάρει τη δράση της στη πρόληψη του καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων και άλλων χρόνιων ασθενειών (Erba et al., 2013), ενώ τα καροτενοειδή θεωρούνται τα ευεργετικά συστατικά στα οποία οφείλει τη δράση της έναντι της αρτηριοσκλήρυνσης, ορισμένων τύπων καρκίνου και του καταρράκτη (Agarwa & Rao, 2000). Η νωπή αλλά και η επεξεργασμένη τομάτα περιέχουν 9-20 καροτενοειδή, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται το λυκοπένιο, η λουτεΐνη, τα α- και β-καροτένιο, η β-κρυπτοξανθίνη και η ζεαξανθίνη (Erba et al., 2013). Ωστόσο τα δύο κύρια καροτενοειδή που εντοπίζονται στην τομάτα είναι το λυκοπένιο και το β-καροτένιο. Το πρώτο παρουσιάζει σοβαρή αντιοξειδωτική δράση όντας το ισχυρότερο αντιοξειδωτικό ανάμεσα στα καροτενοειδή (Dorais et al., 2008), εμφανίζοντας την πιο υψηλή σταθερά ρυθμού απόσβεσης με μονήρες οξυγόνο (Mascio et al., 1989), και το δεύτερο αποτελεί μια πρόδρομη ουσία της Βιταμίνης Α. Επιπρόσθετα, στην τομάτα

εντοπίζονται και άλλες ουσίες εξαιρετικά χρήσιμες για την υγεία, όπως ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C), φλαβονοειδή, βιταμίνη E και φαινολικές ενώσεις (Frusciante et al., 2007). Τα βασικά συστατικά της τομάτας περιγράφονται στους Πίνακες 2, 3 και 4.

Η περιεκτικότητα της τομάτας σε βιταμίνες, φυτικές ίνες, φαινόλες, σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμιδική προσφορά της, συνηγορούν στην σπουδαία λειτουργικότητα του τροφίμου, καθιστώντας την καίριο συστατικό στη διατροφή του ανθρώπου, καθώς καλύπτει ημερήσιες διατροφικές ανάγκες και προσφέρει πολλαπλά οφέλη (Dorais et al., 2008).

**Πίνακας 2:** Σύσταση θρεπτικών συστατικών ανά 100 g ωπών καρπών τομάτας. Πηγή: (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2020)

<b>Θρεπτικό στοιχείο</b>	<b>Ποσότητα θρεπτικού ανά 100g ωμών τοματών</b>	<b>Μονάδα μέτρησης</b>
Νερό	94,52	g
Ενέργεια	18	kcal
Πρωτεΐνη	0,88	g
Λιπαρά	0,2	g
Υδατάνθρακες	3,89	g
Φυτικές ίνες	1,2	g
Σάκχαρα	2,63	g

**Πίνακας 3:** Σύσταση ιχθών μετάλλων ανά 100 g ωπών καρπών τομάτας. Πηγή: (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2020)

<b>Θρεπτικό στοιχείο</b>	<b>Ποσότητα θρεπτικού ανά 100g ωμών τοματών</b>	<b>Μονάδα μέτρησης</b>
Σίδηρος (Fe)	0,27	mg
Μαγνήσιο (Mg)	11	mg
Φώσφορος (P)	24	mg
Κάλιο (K)	237	mg
Νάτριο (Na)	5	mg
Ψευδάργυρος (Zn)	0,17	mg
Χαλκός (Cu)	0,059	mg



<i>Ασβέστιο (Ca)</i>	10	mg
----------------------	----	----

**Πίνακας 4:** Σύσταση βιταμινών ανά 100 g νωπών καρπών τομάτας. Πηγή: (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2020)

<b>Θρεπτικό στοιχείο</b>	<b>Ποσότητα θρεπτικού ανά 100g ωμών τοματών</b>	<b>Μονάδα μέτρησης</b>
<i>Θειαμίνη (B1)</i>	0,037	mg
<i>Ριβοφλαβίνη (B2)</i>	0,019	mg
<i>Νικοτινικό οξύ (B3)</i>	0,594	mg
<i>Βιταμίνη B6</i>	0,08	mg
<i>Φυλλικό οξύ (B9)</i>	15	μg
<i>Χολίνη</i>	6,7	mg
<i>Βιταμίνη A, RAE</i>	42	μg
<i>Καροτίνη, βήτα</i>	449	μg
<i>Καροτίνη, άλφα</i>	101	μg
<i>Λυκοπένιο</i>	2573	μg
<i>Λουτεΐνη + ζεαξανθίνη</i>	123	μg
<i>Βιταμίνη E (άλφα-τοκοφερόλη)</i>	0,54	mg
<i>Βιταμίνη C</i>	13,7	mg
<i>Βιταμίνη K (φυλοκινόνη)</i>	7,9	μg

Σύμφωνα με αναφορές (Al-Wandawi et al., 1985), ο φλοιός της τομάτας περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε λυκοπένιο, συγκριτικά με τον πολτό και τους σπόρους, ενώ οι τελευταίοι είναι πλούσιοι σε ανόργανα στοιχεία, όπως Fe, Mn, Zn, Cu, και περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως λινολεϊνικό οξύ και ελαϊκό οξύ. Ακόμη οι σπόροι αλλά και η φλούδα περιέχουν απαραίτητα αμινοξέα. Η φλούδα περιέχει την πλειονότητα των φλαβονολών της τομάτας (Stewart et al., 2000), ενώ είναι αυτή που συνήθως αφαιρείται καθώς θεωρείται δύσπεπτη, ή απορρίπτεται (το 1/3 του βάρους της τομάτας με την μορφή φλούδας και σπόρων) κατά την μεταποίηση της σε πάστα (Al-Wandawi et al., 1985). Βάσει πειραματικών δεδομένων σχετικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά καρπών τομάτας, η φλούδα περιέχει πολλά συστατικά με σπουδαία διατροφική αξία, όπως αντιοξειδωτικά - φαινολικά οξέα, λυκοπένιο, ασκορβικό οξύ, φλαβονοειδή- και ανόργανα στοιχεία (Ca, Cu, Zn, Se, και Mn) (Elbadrawy & Sello, 2016).

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, έχει προταθεί ότι ο φλοιός της τομάτας μπορεί να αποτελέσει ένα συστατικό προστιθέμενης αξίας άλλων τροφίμων, εμπλουτίζοντας τα με αντιοξειδωτικές ουσίες (Elbadrawy & Sello, 2016).

Σχετικά με την θρεπτική σύσταση και αξία των καρπών τομάτας, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που την επηρεάζουν, μεταξύ των οποίων οι διαφορετικοί γονότυποι που εμφανίζουν διαφορετική σύσταση ως προς τα επίπεδα των φαινολικών ενώσεων και των καροτενοειδών καθώς και την περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ (Slimestad & Verheul, 2009). Επιπλέον, το στάδιο ωρίμανσης κατά τη συγκομιδή, δύναται να επηρεάσει θετικά τα επίπεδα των καροτενοειδών, ενώ η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή επιδρά θετικά στην περιεκτικότητα σε Βιταμίνη C και ορισμένες φαινολικές ενώσεις (Gautier et al., 2008). Στο πλαίσιο αυτό, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα κατέδειξαν ότι η ποικιλία καθώς και το στάδιο ωρίμανσης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την περιεκτικότητα σε καροτενοειδή, ανόργανα άλατα, φαινολικές ενώσεις Cand και βιταμίνες, ενώ η ανεπαρκής αζωτούχος λίπανση μπορεί να επιδράσει θετικά στα επίπεδα ορισμένων φαινολικών ενώσεων και βιταμίνης C (Erba et al., 2013).

Η τομάτα αποτελεί ευαίσθητο και κλιμακτικό καρπό που επηρεάζεται καθοριστικά από τις συνθήκες αποθήκευσης και τις διεργασίες που σχετίζονται με αυτή (Nur Kabir et al., 2020). Η γεύση της νωπής τομάτας σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε διαλυτά σάκχαρα και οργανικά οξέα, με τα τελευταία να επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από μετασυλλεκτικές εργασίες όπως η αποθήκευση και η μεταφορά (Al-Dairi et al., 2021). Ακόμα, η αποθήκευση μπορεί να επιφέρει μεταβολές στη θρεπτική αξία των καρπών, όπως και η μεγάλη διάρκεια μεταφοράς αλλά και η μη ορθή διαχείριση των θερμοκρασιών κατά την αποθήκευση, ενισχύοντας τη δραστηριότητα των ενζύμων και τη μεταβολική δραστηριότητα που σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά ποιότητας (Al-Dairi et al., 2021).

## **1.6. Χρήσεις της τομάτας**

Η τομάτα και τα προϊόντα αυτής έχουν μια σπουδαία οικονομική σημασία σε παγκόσμιο επίπεδο, με τους καρπούς να καταναλώνονται είτε ως νωποί είτε σε ποικίλες άλλες μορφές. Στις παρασκευές που έχουν ως βάση την τομάτα περιλαμβάνονται οι κονσέρβες, οι σάλτσες, οι πολτοί ή πάστες καθώς και οι τομάτες σε άλμη ή αποξηραμένη μορφή (Petro-TurzaC, 2009) (Χα & Πετρόπουλος, 2014). Περαιτέρω, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της τομάτας την καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστική ως πρόσθετο σε διάφορα παρασκευάσματα τροφίμων, ωμά ή/και μαγειρεμένα (Cámara et al., 2012). Είναι γνωστό ότι η τομάτα και τα

προϊόντα της είναι η κύρια πηγή πρόσληψης λυκοπενίου και άλλων αντιοξειδωτικών ενώσεων στην διατροφή του ανθρώπου, με τη βιοδιαθεσιμότητα του λυκοπενίου ωστόσο να είναι υψηλότερη στην ωμή τομάτα (Agarwal et al., 2001).

Οι καρποί της βιομηχανικής τομάτας βρίσκουν ποικιλία χρήσεων και μορφών στις οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν. Στο εμπόριο βρίσκονται με τη μορφή τουρσιού, συμπυκνωμένου χυμού, πελτέ, σε κονσέρβες, τεμαχισμένοι ή ολόκληροι. Σημειώνεται ότι ο συμπυκνωμένος χυμός τομάτας είναι φτωχότερος σε β-καροτένιο και βιταμίνη Α συγκριτικά με την αντίστοιχη περιεκτικότητα στους νωπούς καρπούς, που συγκεντρώνουν 449 μg β-καροτένιου και 833IU βιταμίνης Α ανά 100 g νωπού προϊόντος έναντι 235 μg και 392 IU που απαντώνται στο συμπυκνωμένο χυμό. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι ο συμπυκνωμένος χυμός τομάτας περιέχει περισσότερο λυκοπένιο συγκριτικά με το νωπό καρπό (10.921 μg και 2.573 μg λυκοπενίου ανά 100 g προϊόντος αντίστοιχα) (Χα & Πετρόπουλος, 2014).

## **1.7. Η τομάτα στην Ελλάδα**

Στη χώρα μας, η καλλιέργεια της τομάτας διακρίνεται σε τρεις κύριες κατηγορίες: i) την καλλιέργεια της βιομηχανικής τομάτας, ii) την καλλιέργεια της επιτραπέζιας τομάτας στην υπαίθρο και iii) τη θερμοκηπιακή καλλιέργεια. Στην Ελλάδα, το έτος 2019 καλλιεργήθηκαν συνολικά 132.153 στρέμματα και η ετήσια παραγωγή άγγιξε τους 753.279 τόνους (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2019). Για το έτος 2008, η μέση απόδοση βιομηχανικής τομάτας ήταν 5,63 τόνοι/στρέμμα, ενώ οι αντίστοιχες αποδόσεις για την επιτραπέζια τομάτα σε υπαίθρια και θερμοκηπιακή καλλιέργεια ήταν 2,81 τόνοι και 7,73 τόνοι/στρέμμα, αντίστοιχα. Βάσει των ανωτέρω, είναι σαφής η διάκριση στις αποδόσεις της υπαίθριας και θερμοκηπιακής καλλιέργειας (Χα & Πετρόπουλος, 2014).

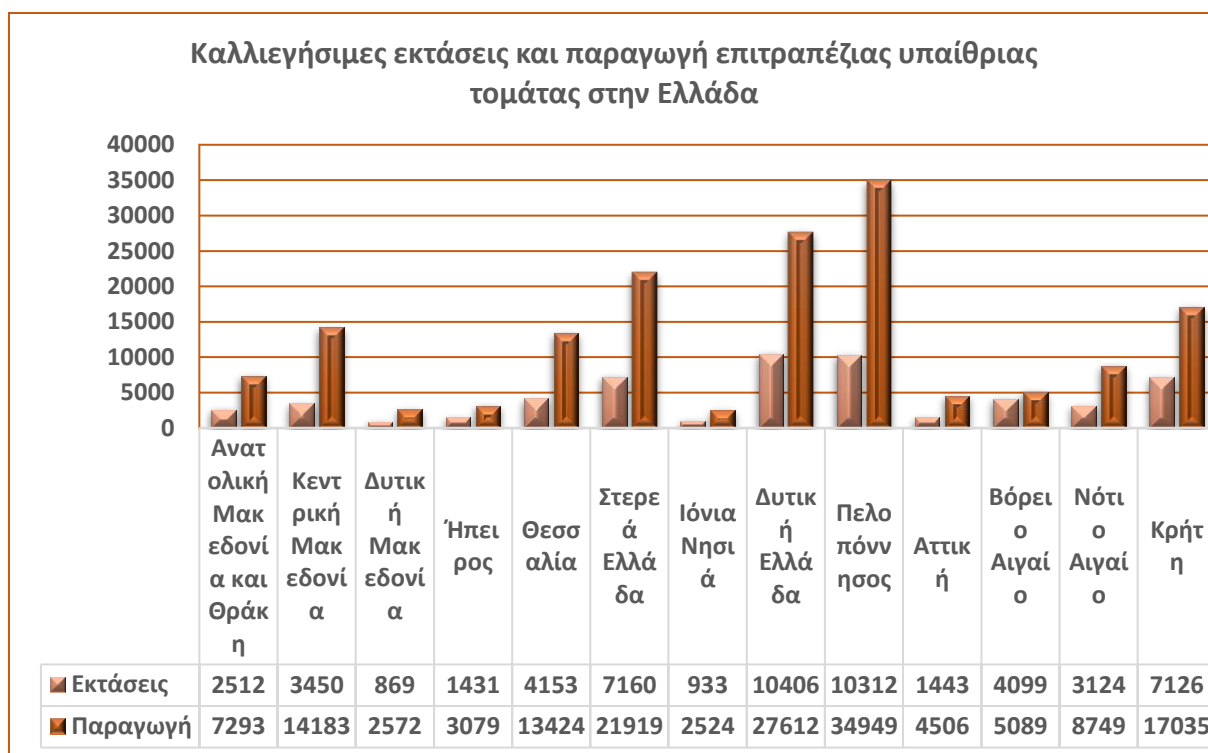
Η καλλιέργεια της βιομηχανικής τομάτας το 2019 άγγιξε τα 50.678 στρέμματα και η παραγωγή τους 354.747 τόνους (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2019). Καλλιεργείται κυρίως στην περιφέρεια της Θεσσαλίας (26.098 στρέμματα και 97.101 τόνοι παραγωγής), ιδιαίτερα στη Λάρισα με παραγωγή 142.571 τόνους, και ακολουθούν οι περιφέρειες της Δυτικής Μακεδονίας και του Νοτίου Αιγαίου (Διάγραμμα 6).



**Διάγραμμα 6:** Καλλιεργήσιμες εκτάσεις (σε στρέμματα) και παραγωγή (σε τόνους) βιομηχανικής τομάτας στην Ελληνική Περιφέρεια. Πηγή: (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2019)

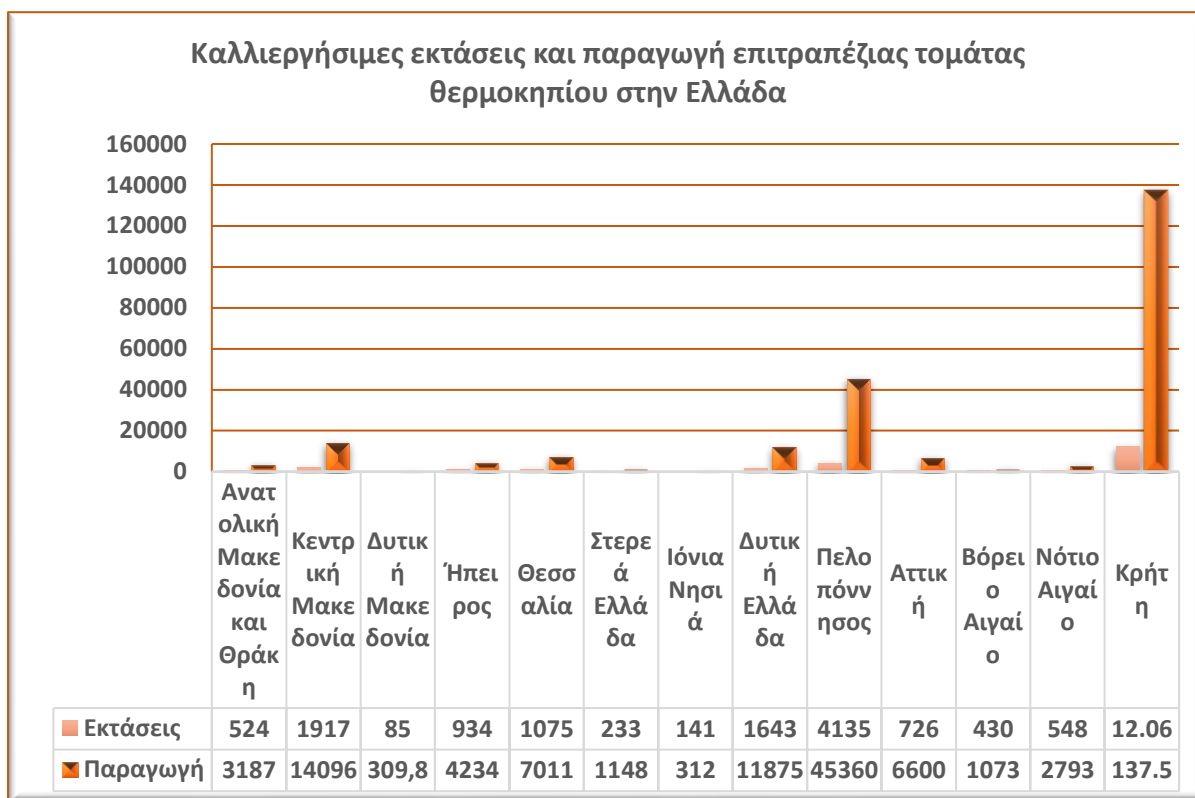
Η υπαίθρια καλλιέργεια επιτραπέζιας τομάτας το έτος 2019 κάλυψε συνολική έκταση 57.018 χιλιάδων στρεμμάτων, ενώ η ετήσια παραγωγή ανήλθε στους 162.934 τόνους. Μεταξύ των κύριων ζωνών παραγωγής, συγκαταλέγονται οι Περιφέρειες της Δυτικής Ελλάδας και της Πελοποννήσου και ακολουθεί η Στερεά Ελλάδα και η Κρήτη. Στην περιφέρεια της Δυτικής Ελλάδας, κύριος παραγωγός είναι ο Νομός της Αιτωλοακαρνανίας, με καλλιέργεια 5.967 στρεμμάτων και παραγωγή 8.579 τόνων για το 2019, και ακολουθούν οι Νομοί της Αχαΐας και της Ηλείας. Το ίδιο έτος, στην Περιφέρεια Πελοποννήσου καλλιεργήθηκαν 10.312 χιλιάδες στρέμματα και παρήχθησαν 34.949 τόνοι νωπής τομάτας, ενώ στην Περιφέρεια Στερεάς Ελλάδας μεγαλύτερο παραγωγή αποδίδει ο Νομός Ευβοίας με καλλιέργεια 4.268 στρεμμάτων και παραγωγή 11.010 τόνων. Τέλος, στην Κρήτη καλλιεργούνται συνολικά 7.126 χιλιάδες στρέμματα, εκ των οποίων τα 3.416 βρίσκονται στον νομό Ηρακλείου και αποδίδουν

παραγωγή της τάξεως των 8.350 χιλιάδων τόνων (Διάγραμμα 7) (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2019).



**Διάγραμμα 7:** Καλλιεργήσιμες εκτάσεις (σε στρέμματα) και παραγωγή (σε τόνους) επιτραπέζιας υπαίθριας τομάτας στην Ελληνική Περιφέρεια. Πηγή: (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2019)

Όσον αφορά την εγχώρια θερμοκηπιακή καλλιέργεια επιτραπέζιας τομάτας, το 2019 κατέλαβε συνολική έκταση 24.457 στρεμμάτων, αποδίδοντας παραγωγή 235.598 τόνων [31,28 % της συνολικής ετήσιας παραγωγής (753.279 τόνοι)]. Σε εγχώριο επίπεδο, πρώτη παραγωγός είναι η Περιφέρεια Κρήτης, όπου παράγονται συνολικά 137.599 τόνοι, με τον κύριο όγκο παραγωγής να εντοπίζεται στο Νομό Λασιθίου με 116.466 τόνους. Επίσης, σημαντική παραγωγή επιτραπέζιας τομάτας απαντάται και στις Περιφέρειες Πελοποννήσου, ιδιαίτερα στο Νομό Μεσσηνίας όπου παράγονται 35.445 τόνοι, και Κεντρικής Μακεδονίας, με κύριο παραγωγό το Νομό Πέλλας (Διάγραμμα 8) (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2019).



**Διάγραμμα 8:** Καλλιεργήσιμες εκτάσεις (σε στρέμματα) και παραγωγή (σε τόνους) επιτραπέζιας τομάτας θερμοκηπίου στην Ελληνική Περιφέρεια. Πηγή: (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2019)

## 1.8. Γενετική Βελτίωση της τομάτας

### 1.8.1 Ιστορική αναδρομή

Οι πρώτες ποικιλίες τομάτας που καλλιεργήθηκαν αποτελούσαν πληθυσμούς ελεύθερης επικονίασης, ενώ η επιλογή βασίστηκε στην πιστότητα αναπαραγωγής και σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα, καθώς και τη γεύση (Watson , 1996). Οι εν λόγω παραδοσιακές και ελεύθερα επικονιαζόμενες τοπικές ποικιλίες χρησιμοποιούνταν κυρίως στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Ωστόσο, η είσοδος στον 20<sup>ο</sup> αιώνα σηματοδότησε την επιστημονική βελτίωση, η οποία ξεκίνησε από ινστιτούτα και κέντρα του δημόσιου τομέα και επεκτάθηκε σε ιδιωτικούς φορείς που δραστηριοποιούνταν στην ανάπτυξη νέων ποικιλιών. Η εφαρμοσμένη βελτίωση στην τομάτα οδήγησε σε σταδιακή απομάκρυνση των καθαρών σειρών και τοπικών ποικιλιών και στην αντικατάστασή τους με υβρίδια, τα οποία εμφάνιζαν υπερέχουσα συμπεριφορά λόγω του φαινομένου της ετέρωσης. Τα υβρίδια πλεονεκτούν στο ότι συνδυάζουν τα θετικά γνωρίσματα από τους γονείς, που θα διασπαστούν στους απογόνους. Η διάθεση του πρώτου υβριδίου τομάτας, επωνομαζόμενου “Single Cross”

χρονολογείται το 1946, ενώ έκτοτε η αγορά και αξιοποίηση υβριδίουσπορου επικράτησε, παρά την υψηλότερη τιμή τους, τόσο στις ποικιλίες επιτραπέζιας όσο και βιομηχανικής τομάτας.

### 1.8.2 Βελτιωτικοί στόχοι

Οι βελτιωτικοί στόχοι στην τομάτα διαφοροποιούνται με βάση τον τύπο και την κατεύθυνση της καλλιέργειας, τους διαθέσιμους πόρους και την τοποθεσία της καλλιέργειας. Η διαμόρφωση των στόχων διαχρονικά αποτελεί μία δυναμική διαδικασία, επιφέροντας μεταβολές που σχετίζονται τόσο με τις τάσεις στη γεωργία όσο και με τις προτιμήσεις των καταναλωτών. Στο πλαίσιο αυτό, κατά τη δεκαετία του 1970 η βελτίωση της τομάτας αρχικά στόχευσε στην ενίσχυση της απόδοσης, ενώ κατά τη δεκαετία του 1980 η έμφαση δόθηκε στη βελτίωση της μετασυλλεκτικής διάρκειας ζωής. Αργότερα, από τη δεκαετία του 1990 και έπειτα, έγινε εστίαση στη βελτίωση των χαρακτηριστικών ποιότητας του καρπού, ιδιαίτερα της γεύσης και της θρεπτικής αξίας, που αποτελούν βασικό στόχο των προγραμμάτων βελτίωσης σε παγκόσμιο επίπεδο (Acquaah, 2019).

Πιο αναλυτικά οι βασικοί βελτιωτικοί στόχοι συνοψίζονται στα ακόλουθα γνωρίσματα:

- i. Απόδοση: παραδοσιακά αποτελεί θεμελιώδη στόχο των σχετικών προγραμμάτων βελτίωσης. Προς την κατεύθυνση αυτή, καθοριστική υπήρξε η αξιοποίηση του φαινομένου της ετέρωσης κατά την παραγωγή υβριδίων, η οποία συνέβαλε ουσιαστικά στην ενίσχυση της απόδοσης. Ειδικότερα, στη σύγχρονη γεωργική πρακτική η προτίμηση των υβριδίων έγκειται στην προστασία των δικαιωμάτων του βελτιωτή, στη γενετική και φαινοτυπική ομοιομορφία και στην αξιοποίηση της ετέρωσης που συμβάλλει στην επίτευξη ικανοποιητικών αποδόσεων (Acquaah, 2019- Bai, 2005).
- ii. Ποιότητα των καρπών: στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των καρπών συγκαταλέγονται το σχήμα, το χρώμα και το μέγεθος. Αναφορικά με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, το άρωμα και η γεύση διαμορφώνονται από την περιεκτικότητα σε οξέα, σάκχαρα αλλά και τριάντα περίπου πτητικές ενώσεις καθώς και τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Η αύξηση των σακχάρων και των οξέων μπορεί να επιφέρει ενίσχυση της γεύσης των καρπών, η οποία ωστόσο αποτελεί γνώρισμα με ιδιαίτερα σύνθετη γενετική βάση. Επιπλέον, σημαντικό πεδίο έρευνας αποτελεί η μεταβολή της περιεκτικότητας σε πτητικές ενώσεις. Πρόσφατα, με γονιδιωματικές προσεγγίσεις και στοχευμένους μεταβολίτες έχουν εντοπιστεί γενετικοί τόποι ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs), οι οποίοι

συμβάλλουν στη μεταβολή της σύστασης των πτητικών και μη ενώσεων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γεύση των καρπών (Bai, 2005).

- iii. Μετασυλλεκτική διάρκεια ζωής: η μακρά διάρκεια ζωής έχει κατακτηθεί χάρη στα μεταλλαγμένα γονίδια *nor-ripening(nor)* και *ripening inhibitor(nir)*. Το υβρίδιο “Daniela”, το οποίο αποτελεί προϊόν βελτίωσης της ομάδας BonTom (Hebrew University of Jerusalem, Ισραήλ), συνδυάζει το γονίδιο *rin* με γονίδια που συνεισφέρουν στη σταθερότητα και βραδεία ωρίμανση, επιτυγχάνοντας υψηλό παραγωγικό δυναμικό και ανάπτυξη καρπών που χαρακτηρίζονται από μεγάλο μέγεθος και υψηλή ποιότητα (Bai, 2005).
- iv. Θρεπτική αξία των καρπών: κυρίαρχο ρόλο στη διατροφική αξία της τομάτας διαδραματίζει η περιεκτικότητα σε λυκοπένιο και βιταμίνες C και E. Η ερευνητική τροχιά έχει προσανατολιστεί προς την αύξηση της περιεκτικότητας σε λυκοπένιο. Προς την κατεύθυνση αυτή, οι διαγονιδιακές προσεγγίσεις επιδεικνύουν ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα. Παράλληλα, υπάρχουν καταχωρήσεις άγριων τύπων που διαθέτουν υψηλή περιεκτικότητα σε λυκοπένιο, μεταξύ των οποίων είναι το *S. pimpinellifolium* που διαθέτει 5x μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λυκοπένιο συγκριτικά με τις καλλιεργούμενες ποικιλίες (Acquaah, 2019- Bai, 2005).
- v. Ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών και εχθρών: διαχρονικά αποτελεί έναν από τους βασικούς βελτιωτικούς στόχους καθώς αφενός μεν συμβάλλει στην αειφορία της καλλιέργειας και αφετέρου στην έμμεση ενίσχυση της απόδοσης, μέσω ελαχιστοποίησης των απωλειών που οφείλονται σε ασθένειες και εχθρούς. Σε πολλές περιπτώσεις, η ανθεκτικότητα των καλλιεργούμενων ποικιλιών προέρχεται από άγριους δότες. Η πρώτη αναφορά σχετικά με την αξιοποίηση άγριων ειδών για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας αφορά το *S. pimpinellifolium*, το οποίο παρείχε την ανθεκτικότητα έναντι του *Cladosporium fulvum* το έτος 1934. Ακόμη, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται προς την επίτευξη ανθεκτικότητας σημαντικών ασθενειών, όπως ο περονόσπορος, ο μαρασμός που προκαλείται από είδη του γένους *Fusarium*, ο ιός του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας κ.α. Ωστόσο, πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι δεν έχει βρεθεί μονογονιδιακή ανθεκτικότητα στους άγριους συγγενείς καθώς και ότι τα εν λόγω γονίδια ανθεκτικότητας δεν έχουν την επιθυμητή σταθερότητα της ανθεκτικότητας στο χρόνο (Acquaah, 2019- Bai, 2005).
- vi. Ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων: βασικό βελτιωτικό στόχο αποτελεί η ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι κύριων παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης, όπως οι ακραίες θερμοκρασίες (υψηλές ή χαμηλές), η ανεπάρκεια ή υπερεπάρκεια εδαφικής υγρασίας και η αλατότητα ή αλκαλικότητα του εδαφικού διαλύματος. Σημειώνεται ότι η



τομάτα, αν και προέρχεται από υποτροπική περιοχή, διαθέτει γονιδιακή δεξαμενή που είναι πλούσια σε πηγές ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, γεγονός που είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό ως προς τις προοπτικές βελτίωσης των εν λόγω γνωρισμάτων (Acquaah, 2019 - Bai, 2005).

### 1.8.3 Μέθοδοι βελτίωσης της τομάτας

#### Αξιοποίηση άγριου γενετικού υλικού

Στη βελτίωση της τομάτας σημαντικό ρόλο έχει παίξει η συλλογή, η περιγραφή και ο πολλαπλασιασμός του διαθέσιμου γενετικού υλικού. Η διασταύρωση καλλιεργούμενων πληθυσμών ή/και ποικιλιών τομάτας με άγριο γενετικό υλικό, ως μέσο δημιουργίας νέας γενετικής παραλλακτικότητας και διεύρυνσης της υπάρχουσας παραλλακτικότητας στην τομάτα εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Charlie Rick (Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνιας) το 1940. Μέσω διειδικών διασταυρώσεων, όπου αξιοποιήθηκαν καταχωρημένα δείγματα άγριου γενετικού υλικού, επετεύχθη η ενσωμάτωση πληθώρας επιθυμητών γνωρισμάτων στους καλλιεργούμενους τύπους τομάτας. Με τον τρόπο αυτό, κατέστη εφικτή η ενσωμάτωση πολύτιμων γονιδίων ανθεκτικότητας, κυρίως μονογονιδιακής φύσης, έναντι ποικίλων εχθρών και ασθενειών που προέρχονται από μύκητες, βακτήρια, ιούς και νηματώδεις (Bai, 2005).

Στο πλαίσιο ενσωμάτωσης του άγριου αλληλομόρφου, σημαντικότερη υπήρξε η συνεισφορά της MAS, ιδιαίτερα κατά την ενσωμάτωση ποσοτικών γνωρισμάτων και γονιδίων που εμφανίζουν στενή γενετική σύνδεση με ανεπιθύμητα γονίδια. Επιπλέον, η έρευνα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανασυνδυασμένων καθαρών σειρών (RILs) που φέρουν μία μεμονωμένη περιοχή παρεμβολής που προέρχεται από άγριο δότη, σε ομοζύγωτη κατάσταση, σε γενετικό υπόβαθρο καλλιεργούμενων τύπων τομάτας (Bai, 2005). Είναι δε αξιοσημείωτο ότι πληθώρα καταχωρημένων δειγμάτων φυλάσσονται και διατηρούνται σε ποικίλες συλλογές γενετικού υλικού παγκοσμίως. Μεταξύ αυτών, το Κέντρο Γενετικών Πόρων Τομάτας που εδρεύει στο Davis στην Καλιφόρνια διαθέτει μία πλούσια συλλογή δειγμάτων άγριου γενετικού υλικού του γένους *Solanum*, ενώ σπουδαίες συλλογές διατηρούνται και στο Ασιατικό Κέντρο Έρευνας και Ανάπτυξης Κηπευτικών στην Ταϊβάν. Επίσης, σημαντικό καταφύγιο γενετικού υλικού της οικογένειας *Solanaceae* αποτελεί ο Βοτανικός και Πειραματικός Κήπος στην Ολλανδία, όπου υπάρχει παράλληλα μια τεράστια *ex situ* συλλογή φυτών μη κονδυλωδών ειδών που ανήκουν στην οικογένεια *Solanaceae*. Τέλος, πρόσφατα έχει αναπτυχθεί το Δίκτυο Γονιδιώματος των *Solanaceae* (*Solanaceae Genome Network*), το οποίο

λειτουργεί ως αποθετήριο μεταλλαγμένων τύπων τομάτας που έχουν αναπτυχθεί και διατίθενται για ερευνητικούς σκοπούς (Acquaah, 2019).

#### Διαδικασία ανάπτυξης υβριδίων τομάτας

Η διαδικασία παραγωγής υβριδίων αφορά σε διασταυρώσεις μεταξύ γονέων-καθαρών σειρών σε διαλληλικό σχήμα ώστε να προσδιοριστεί ο πλέον ετερωτικός συνδυασμός. Η διαδικασία παραγωγής τους περιλαμβάνει τεχνητές διασταυρώσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:

- Αποστημόνωση σε διάστημα 55 έως 65 μέρες μετά την φύτευση (οφθαλμοί 2<sup>ης</sup> ταξιανθίας).
- Συλλογή γύρης πριν την απελευθέρωσή της – Απομάκρυνση ανθέρων, τοποθέτηση σε ειδικά σακουλάκια και ξήρανση στον ήλιο ή με χρήση τεχνητού φωτός (100 W) για 24 ώρες.
- Αποθήκευση της γύρης σε ψυγείο ή καταψύκτη.
- Επικονίαση των ανθέων εντός 2 ημερών από την αποστημόνωση - Εμβάπτιση δακτυλίου σε δοχείο που περιέχει τη γύρη και μεταφορά στο στίγμα (είναι επιδεκτικό όταν η στεφάνη έχει αποκτήσει έντονο κίτρινο χρώμα).
- Επανάληψη της επικονίασης 2-3 φορές / εβδομάδα για 3-5 εβδομάδες.
- Σε περίπτωση επιτυχούς επικονίασης, παρατηρείται μεγέθυνση των καρπών εντός μιας εβδομάδας.
- Μεγαλόκαρπες ποικιλίες: ανάπτυξη 30 καρπών/φυτό - Μικρόκαρπες ποικιλίες: ανάπτυξη 50 καρπών/φυτό.

#### Σύγχρονες μέθοδοι στη Βελτίωση της τομάτας

Τα τελευταία ένας αυξανόμενος αριθμός σύγχρονων τεχνολογιών προστίθενται στη φαρέτρα των βελτιωτών με στόχο τη δημιουργία νέας γενετικής παραλλακτικότητας και τη διεύρυνση της διαθέσιμης γονιδιακής δεξαμενής. Στην τομάτα, οι τεχνολογίες που έχουν βρει εφαρμογή για τον εμπλουτισμό του γονιδιακού αποθέματος με νέες γενετικές πηγές είναι οι ακόλουθες:

- Φθορίζων *in situ* υβριδισμός (Fluorescence *in situ* Hybridization-FISH): αξιοποιείται ως εργαλείο για την ανίχνευση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων μεταξύ των ειδών *Solanum*. Ο *in situ* υβριδισμός αποτελεί ένα διαγνωστικό εργαλείο που επιτρέπει τον εντοπισμό

χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, όπως οι αναστροφές και οι διπλοποιήσεις μεταξύ των συγγενικών ειδών (Tang et al., 2008).

- In vitro τεχνικές: έχουν αξιοποιηθεί ποικιλοτρόπως κατά τις διαδικασίες αναγέννησης φυτών τομάτας από ιστούς ή μεμονωμένα κύτταρα καθώς και κατά τις διαδικασίες εμβρυακής διάσωσης.
- Επιλογή με τη χρήση δεικτών (MAS): έχει αξιοποιηθεί ευρέως για την έμμεση επιλογή γνωρισμάτων ενδιαφέροντος που συνδέονται στενά με την αλληλουχία DNA του χρησιμοποιούμενου δείκτη. Τα τελευταία χρόνια, έχει κερδίσει έδαφος η αξιοποίηση των συστοιχιών μονονουκλειοτικών πολυμορφισμών SNP που μπορούν να ανιχνεύσουν σημειακούς πολυμορφισμούς σε όλο το γονιδίωμα στις φυσικές τους θέσεις.
- Τεχνικές σύντηξης: παρέχεται η δυνατότητα συνδυασμού κυττάρων μεταξύ ειδών που δεν είναι συμβατά σε διασταυρώσεις και προσφέρεται προς χρήση σε διαδικασίες μετασχηματισμού.
- Λειτουργικές μελέτες: προσφέρεται η δυνατότητα επαγωγής σημειακών μεταλλάξεων σε γονιδιώματα (όπως οι πληθυσμοί Targeting Induced Local Lesions in Genomes). Αξιοποιούνται για τη δημιουργία και την ανίχνευση ωφέλιμων μεταλλάξεων που οδηγούν σε επιθυμητούς φαινοτύπους. Επίσης, αξιοποιείται η τεχνολογία σίγασης γονιδίων ενδιαφέροντος που επάγονται από ιούς (πληθυσμοί Virus Induced Gene Silencing (Bai, 2005).
- Γενετική τροποποίηση: έχει αξιοποιηθεί ευρέως για την ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα της τομάτας γονιδίων ενδιαφέροντος με στόχο την έκφραση επιθυμητών γνωρισμάτων. Στην τομάτα, αξιοποιείται κατά κύριο λόγο ο γενετικός μετασχηματισμός μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* και η τεχνική του βομβαρδισμού μικροσωματιδίων.

## 1.9. Γενετική μηχανική

Τις τελευταίες δεκαετίες, η Γενετική Μηχανική αξιοποιείται ολοένα και περισσότερο ως ένα πολύτιμο εργαλείο στη φαρέτρα των βελτιωτών για την ενσωμάτωση και ετερόλογη έκφραση γονιδίων που προέρχονται είτε από φυτά είτε από άλλους οργανισμούς, όπως μύκητες, ιοί, βακτήρια, αλλά και για τη στοχευμένη σίγαση γονιδίων (Rivera et al., 2012a - Kumar et al., 2020). Επιπλέον, μέσω της γενετικής μηχανικής προσφέρεται η δυνατότητα εισαγωγής μεμονωμένων συστατικών σε σύνθετα μονοπάτια αλλά και η ρύθμιση της

έκφρασή τους. Σημαντικό περιοριστικό παράγοντα της τεχνολογίας βέβαια αποτελεί η τυχαία ένθεση των διαγονιδίων και, ανάλογα με το είδος και το γονότυπο, η συχνά χαμηλή συχνότητα μετασχηματισμού (Rivera et al., 2012a).

Ως γενετικά τροποποιημένες καλούνται οι ποικιλίες φυτών που το γονιδίωμα τους έχει υποστεί τροποποίηση με στόχο τη βελτίωση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ή τη στοχευμένη προσθήκη ενός γνωρίσματος που δεν εντοπίζεται φυσικά στο είδος με τη χρήσης της γενετικής μηχανικής. Οι γενετικά τροποποιημένες ποικιλίες φέρουν ένα ή περισσότερα επιθυμητά γνωρίσματα, όπως η αντοχή σε ζιζανιοκτόνα, η ανθεκτικότητα έναντι εχθρών και ασθενειών καθώς και η προηγμένη ανεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (Kumar et al., 2020). Οι πλέον αξιοποιούμενες τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα γονιδίων είτε με τη χρήση φορέα, κυρίως τα είδη του γένους *Agrobacterium*, ή με άμεση μεταφορά γονιδίων (Griffiths et al., 2004).

Λαμβάνοντας υπόψη τις ποικίλες εφαρμογές της γενετικής μηχανικής στη γεωργία, είναι προφανής η σημασία της ως μέσου δημιουργίας νέας γενετικής παραλλακτικότητας ανεξάρτητα από ταξινομικά εμπόδια. Μέσω της τεχνολογίας αυτής, έχει καταστεί εφικτή η ενίσχυση της απόδοσης, η βελτίωση της αειφορίας των καλλιέργειών και η παράλληλη ενίσχυση της οικονομικής βιωσιμότητάς τους, μέσω των μειωμένων εισροών και του μειωμένου κόστους της φυτικής παραγωγής. Παρά το αδιαμφισβήτητο μεγάλο εύρος εφαρμογών, οι τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής διαχρονικά συνοδεύονται από σκεπτικισμό έως και ολοκληρωτική άρνηση. Οι ανησυχίες εγείρονται λόγω των πιθανών επιπτώσεων στον άνθρωπο, τα ζώα, το περιβάλλον και τα οικοσυστήματα και περιλαμβάνουν την ενδεχομένη αλλεργιογόνο ή/και τοξική δράση των διαγονιδίων, την οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή/και ζιζανιοκτόνα σε οργανισμούς-μη στόχους, την ανάπτυξη οργανισμών με νέες λειτουργικές ιδιότητες (super weeds) καθώς και τη διατάραξη των οικοσυστημάτων. Για τους ανωτέρω λόγους, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον δικαιολογημένα στρέφεται προς την ελάφρυνση των σχετικών κινδύνων, η οποία προσεγγίζεται μέσω της ανάπτυξης νέων τεχνολογιών που ελαχιστοποιούν τους πιθανούς κινδύνους. Στο πλαίσιο αυτό, ως εναλλακτικές της συμβατικής γενετικής μηχανικής έχουν αναπτυχθεί οι τεχνολογίες «cisgenesis», «intragenesis» και «genome editing» (Kumar et al., 2020).

### 1.9.1 Γενετικός μετασχηματισμός

Η σύλληψη του γενετικού μετασχηματισμού χρονολογείται στα τέλη της δεκαετίας του 1920 και διατυπώθηκε από τον F. Griffith (Griffith, 1928). Οι πρώτες προσπάθειες γενετικού μετασχηματισμού φυτών έγιναν στον αραβόσιτο χωρίς επιτυχία (Coe Jr. & Sarkar, 1966), ενώ η πρώτη επιτυχής δημιουργία ανασυνδυασμένων μορίων DNA χρονολογείται στις αρχές της δεκαετίας του 1970, όταν επιτεύχθηκε η κοπή του DNA με τη βοήθεια του «βιοχημικού ψαλιδιού» που ονομάζεται ένζυμο περιορισμού. Κατά τη δεκαετία του 1980, παράχθηκαν για πρώτη φορά σταθερά μετασχηματισμένα φυτά (ρύζι σέλινο, αραβόσιτος, καπνός, τομάτα) (Rivera et al., 2012a).

Ο όρος «μετασχηματισμός» περιγράφει την εισαγωγή και ετερόλογη έκφραση ξένων μορίων σε βακτήρια, φυτικά κύτταρα και μύκητες (Rivera et al., 2012a). Από την πρώτη μεταφορά DNA σε φυτικά κύτταρα πριν 25 χρόνια, με την βοήθεια του *Agrobacterium tumefaciens*, η παγκόσμια παραγωγή γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών αυξάνεται με σταθερό ρυθμό, καθώς χάρη σε αυτές τις προσεγγίσεις εισήχθησαν χαρακτηριστικά στις καλλιέργειες που θα ήταν αδύνατο να εισαχθούν με συμβατικές βελτιωτικές μεθόδους (Anjanappa & Gruissem, 2021a).

Η Πράσινη Επανάσταση στις δεκαετίες των '60s και '70s απέτρεψε τρομερά δυσμενείς επιπτώσεις, όπως οι επισιτιστικοί λιμοί της Βεγγάλης το 1943 και της ιρλανδικής πατάτας το 1845-1849 που προκλήθηκαν από παθογόνα, καθώς οι καλλιέργειες χαρακτηρίζονταν από υψηλό παραγωγικό δυναμικό και ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών (Pingali, 2012). Έπειτα, τα επιτεύγματα της βελτίωσης, συχνά με την υποστήριξη των σύγχρονων προσεγγίσεων, επέτρεψαν την ανάπτυξη υψηλοαποδοτικών ποικιλιών που παράλληλα παράγουν προϊόντα υψηλού διατροφικού προφίλ. Σήμερα, στα πρόθυρα της δεύτερης Πράσινης Επανάστασης που θα οδηγήσει στην ανάπτυξη ποικιλιών που ανταποκρίνονται στις τρέχουσες ανάγκες, αναμένεται να είναι σημαντική η συμβολή των τεχνολογιών της γενετικής μηχανικής (Shepherd et al, 2018). Στο πλαίσιο αυτό, καθίσταται αναγκαία η απάντηση στις προκλήσεις της ασφάλειας και επάρκειας τροφίμων για 9,6 δισεκατομμύρια ανθρώπους με ταυτόχρονα μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Με την χρήση των ΓΤ καλλιεργειών, είναι εφικτή η αύξηση της αποδοτικότητας των καλλιεργειών με παράλληλη μείωση απωλειών από παθογόνα και κλιματικές συνθήκες, γεγονός βέβαιο που προϋποθέτει την ευρύτερη αποδοχή των ΓΤ καλλιεργειών (Anjanappa & Gruissem, 2021a).

Πέραν των πρακτικών εφαρμογών στη γεωργία, η γενετική μηχανική αξιοποιείται ευρέως για ερευνητικούς σκοπούς που, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνουν τη λειτουργική μελέτη

της έκφρασης γονιδίων, την μελέτη της αλληλεπίδρασης φυτών-παθογόνων οργανισμών ή/και συμβιωτών, με τις μελέτες να φορούν τόσο σε καλλιεργούμενα είδη όσο και σε φυτά-μοντέλα (*Arabidopsis*, καπνός, ρύζι) (Kumar et al., 2020).

### Εφαρμογές γενετικού μετασχηματισμού

Το 2006 καλλιεργήθηκαν 252 εκατομμύρια στρέμματα γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών σε 22 χώρες. Στην Ευρώπη δεν καλλιεργείται σχεδόν καμία ΓΤ καλλιέργεια, κυρίως λόγω του σκεπτικισμού που χαρακτηρίζει τα κράτη-μέλη της ΕΕ σχετικά με την ασφάλεια της χρήσης των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών αλλά και εξαιτίας της μη αποδοχής του κοινού. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες φέρουν γνωρίσματα αντοχής σε ζιζανιοκτόνα και ανθεκτικότητας σε έντομα και αφορούν τα σημαντικότερα καλλιεργούμενα είδη, όπως το καλαμπόκι, η σόγια (η ΓΤ καλλιέργειά της είναι το 87 % της συνολικής καλλιέργειας σόγιας στις ΗΠΑ) και η ελαιοκράμβη. Επιπλέον, στις ΗΠΑ περίπου το 80 % των επεξεργασμένων τροφίμων ενδέχεται να περιλαμβάνει κάποιο συστατικό από ΓΤ καλλιέργεια, αλλά ελάχιστα είναι τα αυτοτελή τρόφιμα που κυκλοφορούν στην αγορά (ονομάζονται Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί). Τα τελευταία χρόνια, έχουν εντατικοποιηθεί οι προσπάθειες για ανάπτυξη ΓΤ ποικιλιών που χαρακτηρίζονται από καλύτερη απόδοση και μειωμένες επιπτώσεις στο περιβάλλον. Παράλληλα, αναγνωρίζεται ότι οι προσεγγίσεις της Γενετικής Μηχανικής είναι λιγότερο ενεργοβόρες και χρονοβόρες, συγκριτικά με τις συμβατικές βελτιωτικές διαδικασίες, αλλά είναι πιο στοχευμένης κατεύθυνσης (Fraser et al., 2009). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι πλέον η τροποποίηση της περιεκτικότητας σε καροτενοειδή ενός φυτού δεν αποτελεί μια ακραία δύσκολη επιστημονική διαδικασία αλλά μια απλή εφαρμογή της τεχνολογίας. Στην τομάτα υπάρχουν σειρές και ποικιλίες με αυξημένα επίπεδα λυκοπενίου, β-καροτένιου, ζεαξανθίνης και λουτεΐνης (ξανθοφύλλες) (Fraser & Bramley, 2004).

### **1.9.2. Μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού**

Ανεξάρτητα από το φυτικό είδος και τους στόχους του μετασχηματισμού, η διαδικασία συνοδεύεται από ορισμένες προϋποθέσεις : α) κατάλληλους ιστούς-στόχους ή κύτταρα, β) χειρισμούς υπό ασηπτικές συνθήκες γ) μια αποτελεσματική μέθοδο εισαγωγής DNA στους ιστούς-στόχους ή στα κύτταρα δ) πρωτόκολλα που αφορούν την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων/ιστών και πρωτόκολλα αναγέννησης των διαγονιδιακών φυτών. Δύο σημαντικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επιτυχία και αποτελεσματικότητα

της ανάπτυξης εμβρύων από έκφυτα για μετασχηματισμό και αναγέννηση είναι η φύση των εκφύτων και οι χειρισμοί που θα δεχτούν (Anjanappa & Gruissem, 2021a).

Οι μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες που αφορούν στον άμεσο και στον έμμεσο μετασχηματισμό (Rao et al., 2009). Ο άμεσος μετασχηματισμός περιλαμβάνει φυσικές μεθόδους δηλαδή μεθόδους που βασίζονται στην διείσδυση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ ο έμμεσος αναφέρεται σε βιολογικές μεθόδους που συνήθως περιλαμβάνουν τη χρήση βακτηριακών φορέων.

Στις έμμεσες μεθόδους μετασχηματισμού γίνεται εισαγωγή πλασμιδίων σε κύτταρα στόχους. Το μέγεθος των πλασμιδίων είναι συνήθως 5-12 ζεύγη χιλιοβασικών βάσεων (kbp) (Bendich, 1987). Συνήθως οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι, τα εδαφογενή βακτήρια *Agrobacterium tumefaciens* και *Agrobacterium rhizogenes* (Rivera et al., 2012a).

#### Βομβαρδισμός σωματιδίων vs μετασχηματισμός με το *Agrobacterium*

Και οι δύο μέθοδοι είναι ευρέως γνωστές και αξιοποιούνται ως τα κύρια εργαλεία παραγωγής διαγονιδιακών φυτών στην πλειονότητα των φυτικών ειδών. Ως προς την χρηστικότητα και αποτελεσματικότητά τους, πλεονεκτούν σε διαφορετικά σημεία επί παραδείγματι, ο βομβαρδισμός με σωματίδια συχνά οδηγεί σε δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με υψηλότερο μέσο αριθμό αντιγράφων της κασέτας έκφρασης. Αντίθετα, ο μετασχηματισμός μέσω του *Agrobacterium* παρέχει μια πιο σταθερή έκφραση των διαγονιδίων και υψηλότερη συχνότητα ακέραιων μοναδικών αντιγράφων της εισαγόμενης κασέτας έκφρασης στα ανεξάρτητα συμβάντα μετασχηματισμού (Travella et al., 2005). Σημειώνεται ωστόσο ότι δεν έχουν όλα τα στελέχη του *Agrobacterium* την ίδια αποτελεσματικότητα και συχνότητα μετασχηματισμού. Ορισμένα στελέχη χαρακτηρίζονται ως πιο αποτελεσματικά σε ένα εύρος φυτικών ειδών, ενώ υπάρχουν και στελέχη που έχουν υποστεί ποικίλου τύπου τροποποιήσεις (προσθήκες, μεταλλάξεις, σιγήσεις γονιδίων) με στόχο την ενίσχυση της συχνότητας μετασχηματισμού (Nonaka et al., 2019). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι διατίθεται ένας μεγάλος αριθμός αποτελεσματικών πρωτοκόλλων μετασχηματισμού, τόσο μέσω του *Agrobacterium* όσο και μέσω της βιολιστικής μεταφοράς DNA, που βρίσκουν εφαρμογή σε φυτά-μοντέλα αλλά και σε καλλιεργούμενα είδη μεγάλης οικονομικής σημασίας, συμπεριλαμβανομένων των οπωροφόρων (Anjanappa & Gruissem, 2021a).

### Μετασχηματισμός με τη χρήση της βιολιστικής μεθόδου

Ο γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση βιολιστικού/σωματιδιακού όπλου, έχει αναδειχτεί ως ένα χρήσιμο εργαλείο σταθερού μετασχηματισμού (Sanford et al., 1987). Σχεδιάστηκε το 1987, στο Πανεπιστήμιο Cornell, για εφαρμογή γενετικού μετασχηματισμού στα δημητριακά (Sanford et al., 1987) και έκτοτε έχει τύχει εφαρμογής σε πληθώρα καλλιεργούμενων ειδών, συμπεριλαμβανομένης και της τομάτας (Rivera et al., 2012b). Ο βιολιστικός μετασχηματισμός εισάγει ξένα γονίδια σε άθικτα φυτικά κύτταρα και ιστούς με την χρήση μικροβλημάτων ταχύτητας (Klein et al., 1988). Γνωστός και ως «βομβαρδισμός σωματιδίων» ή «gene gun technique» (τεχνική γονιδιακού όπλου) συνίσταται στην επιτάχυνση σωματιδίων-φορέων χρυσού ή βολφραμίου υψηλής πυκνότητας, με διάμετρο μικρότερη από ένα φυτικό κύτταρο (περίπου 2 μικρομέτρων), επικαλυμμένων με DNA, τα οποία διέρχονται μέσα από τα κύτταρα και επιτυγχάνεται ενσωμάτωση του DNA στο φυτικό γονιδίωμα (Rivera et al., 2012b). Είναι μια μέθοδος που δρα ανεξάρτητα από τον γονότυπο, είναι γρήγορη και επιτυγχάνει εισαγωγή πολλαπλών γονιδίων, επιφέροντας περιορισμένες διαταραχές στον γονότυπο του αποδέκτη (Devi et al., 2009). Συγκριτικά με το *Agrobacterium*, με γνώμονα την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού, του αριθμού αντιγράφων του διαγονιδίου, της έκφρασης, της κληρονομικότητας, το *Agrobacterium* πλεονεκτεί σε αρκετά σημεία έναντι της βιολιστικής. Ωστόσο είναι μια μέθοδος άμεσου μετασχηματισμού που είναι ευρέως αποδεκτή και μπορεί να εφαρμοστεί για φυτικά είδη, βακτήρια, μύκητες ακόμα και ζωικά κύτταρα (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από μικρό κόστος, συντομία και απλότητα στη διαδικασία του μετασχηματισμού και δυνατότητα εισαγωγής πολλαπλών γονιδίων ή DNA από διαφορετικά είδη (Rivera et al., 2012b).

### Μετασχηματισμός με τη μέθοδο εμβάπτισης ανθέων (Floral dip transformation)

Η μέθοδος αφορά σε άμεσο μετασχηματισμό που αναπτύχθηκε στο είδος *Arabidopsis thaliana* (Clough & Bent, 1998). Πρόκειται για ένα πρωτόκολλο ευρέως χρησιμοποιούμενο, που έχει υιοθετηθεί σε αρκετές καλλιέργειες με ορισμένες τροποποιήσεις, όπως η εφαρμογή κενού, η ένεση των ανθέων, ο ψεκασμός των ανθέων. Η μέθοδος είναι αποτελεσματική για τα μέλη της οικογένειας Brassicaceae αλλά έχει εφαρμοστεί επιτυχώς και σε άλλα είδη, όπως το σιτάρι, το ρύζι και η τομάτα (Anjanappa & Gruissem, 2021a).

Η διαδικασία μετασχηματισμού με τη μέθοδο εμβάπτισης ανθέων περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα (Yasmeen et al., 2009):



- Γίνεται χρήση ανθέων που δεν έχουν ανοίξει, πριν την γονιμοποίηση, και άνθη που έχουν ανοίξει, μετά την γονιμοποίηση.
- Ως εμβόλιο χρησιμοποιείται ένα εναιώρημα βακτηριακών κυττάρων σε 30% σακχαρόζη, το οποίο, με χρήση σύριγγας, έρχεται σε επαφή με το στίγμα των ανθέων με τρόπο που δεν γίνεται διάρρηξη των ανθοφόρων οργάνων.
- Επανάληψη της διαδικασίας κάθε 24 ώρες για τρεις συνεχόμενες ημέρες.
- Σήμανση των ανθέων και παρακολούθηση έως την καρπόδεση – Χρήση μαρτύρων (διάλυμα 30 % σακχαρόζης).
- Συλλογή καρπών κατά την ωρίμανση - Απομόνωση των σπόρων.

### Ηλεκτροπόρωση

Η ηλεκτροπόρωση αποτελεί μια απλή, γρήγορη και αρκετά αποτελεσματική για πολλά είδη φυτικών ιστών τεχνική γενετικού μετασχηματισμού (Register 3rd & Beachy, 1988). Βρίσκει εφαρμογή συνήθως για την μεταφορά λιπιδίων, πρωτεϊνών, RNA, DNA στο εσωτερικό του κυττάρου. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, δημιουργείται ένα ηλεκτρικό πεδίο που προκαλεί αλλαγή της πολικότητας της μεμβράνης, επιφέροντας δημιουργία πόρων στην κυτταρική επιφάνεια. Όταν ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμοστεί σε ένα κυτταρικό εναιώρημα μπορεί να προκαλέσει διπολική ροπή στο εσωτερικό των κυττάρων και διαφορά δυναμικού μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Χάρη στην ηλεκτρική ανισορροπία στην πλασματική μεμβράνη, η επαγόμενη τάση μπορεί να προκαλέσει διαπερατότητα των κυττάρων, όταν η διαφορά δυναμικού είναι μεγαλύτερη από 0,5 V (σε κανονικές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας). Σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα της ηλεκτρικής αυτής ανισορροπίας μπορεί να είναι ανατρέψιμα μόνο όταν ο ηλεκτρικός παλμός έχει διάρκεια λιγότερο από 100s. Υπό αυτές τις συνθήκες, επιτυγχάνεται εισαγωγή του DNA στα κύτταρα χωρίς μεταβολές στις λειτουργίες της μεμβράνης ή στην ακεραιότητα της (Rivera et al., 2012b). Έχει εφαρμοστεί για τον μετασχηματισμό φυτικών πρωτοπλαστών διάφορων ειδών, συμπεριλαμβανομένης της τομάτας, αλλά με εξαιρετικά χαμηλή απόδοση (Rivera et al., 2012b). Στο καλαμπόκι, σημειώθηκε δημιουργία 90 διαγονιδιακών φυτών από 1440 έμβρυα αραβοσίτου, που αντιστοιχεί σε συχνότητα μετασχηματισμού 6,2 % (Halluin et al., 1992), ενώ στο σιτάρι η αντίστοιχη συχνότητα ήταν 0,3 % (3 φυτά από 1080 έμβρυα) (Sorokin et al., 2000). Η μέθοδος έχει χαμηλή απόδοση και μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε πρωτοπλάστες με τη χρήση εργαστηριακών πρωτοκόλλων για την αναγέννηση μετά από γενετικό μετασχηματισμό.

## Προκλήσεις και προβληματισμοί σχετικά με τις τεχνολογίες μετασχηματισμού

Οι πρωταρχικές προκλήσεις σχετικά με το μετασχηματισμό φυτών και την ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων φυτών αφορούν σε:

- Μεγάλης διάρκειας καλλιέργεια ιστών που απαιτούνται για την ανάκτηση διαγονιδιακών φυτών από μετασχηματισμένα κύτταρα και ιστούς.
- Η συχνότητα σταθερού μετασχηματισμού φυτών είναι χαμηλή.
- Κατά τη μεταφορά γονιδίων με τη μεσολάβηση του *Agrobacterium*, οι τίτλοι DNA που παρέχονται είναι χαμηλοί, και έτσι αδυνατούν να οδηγήσουν σε ομόλογο ανασυνδυασμό [homologous recombination (HR)] .
- Ο βομβαρδισμός χαρακτηρίζεται από χαμηλή ακρίβεια στη μεταφορά γονιδίων.
- Η μέθοδος μετασχηματισμού με εμβάπτιση ανθέων αποτελεί μια εναλλακτική, όχι λόγω υψηλών συχνοτήτων μετασχηματισμού, αλλά επειδή δεν απαιτείται ιστοκαλλιέργεια για αναγέννηση των μετασχηματισμένων φυτών. Ταυτόχρονα αποτελεί μια απλή μέθοδο (Altpeter et al., 2016).
- Η παραγωγή μετασχηματισμένων κάλλων από διάφορα φυτικά είδη εξακολουθεί να αποτελεί μία επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία.
- Έχει προταθεί ως ιδανική λύση η ανάπτυξη πρωτοκόλλων μετασχηματισμού που θα είναι απλουστευμένα, δεν θα απαιτούν την καλλιέργεια ιστών και θα βρίσκουν εφαρμογή σε διαφορετικά εργαστήρια (Altpeter et al., 2016).

Επιπλέον, ο μετασχηματισμός συνοδεύεται από βασικούς προβληματισμούς, οι οποίοι σχετίζονται με πιθανές επιπτώσεις τόσο σε επίπεδο συστημάτων παραγωγής και οικοσυστημάτων όσο και σε κοινωνικό επίπεδο (Anjanappa & Gruissem, 2021) :

- Υπάρχει αναγκαιότητα θέσπισης ενός τυποποιημένου και ευρέως αποδεκτού ρυθμιστικού πλαισίου για τον έλεγχο και την έγκριση των ΓΤ καλλιεργειών.
- Το θέμα της αποδοχής των ΓΤ καλλιεργειών από καταναλωτές και αγρότες. Αν και οι δεύτεροι φαίνεται πως έχουν αποδεχτεί τις ΓΤ καλλιεργείες, για το καταναλωτικό κοινό η χρήση τους αποτελεί ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα καθώς υπάρχουν έντονες ανησυχίες σχετικά με τις επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία.
- Σημαντικότετος προβληματισμός σχετικά με την καλλιέργεια ΓΤ φυτών εγείρεται από τις δυνατότητες συνύπαρξης των ΓΤ με συμβατικές και οργανικές καλλιεργείες, λαμβάνοντας

υπόψη ότι η απελευθέρωση της χρήσης τους δεν θα πρέπει να αποτελεί φραγμό στις καλλιέργειες των τελευταίων.

→ Περισσότερες επενδύσεις για την ανάπτυξη καινοτόμων και βελτιωμένων τεχνολογιών μετασχηματισμού θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη καλλιεργειών με σταθερότερη απόδοση και εξασφάλιση ενός ασφαλούς εφοδιασμού τροφίμων.

### Υφιστάμενη κατάσταση

Τα διαγονιδιακά φυτά έχοντας πολύτιμα χαρακτηριστικά και ιδιότητες έχουν απομακρύνει από το παρασκήνιο ποικιλίες που προέρχονται από συμβατικές μεθόδους (Charles Godfray et al., 2010). Ακόμα ένας κλάδος που επωφελήθηκε είναι αυτός της φαρμακευτικής βιομηχανίας όπου χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένα φυτά με γονίδια για την παραγωγή νέων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η γενετική μηχανική έχει παίξει σημαντικό ρόλο στον κλάδο παραγωγής βιοκαυσίμων (Rivera et al., 2012b). Σύμφωνα με αναφορές, ο μετασχηματισμός φυτών με τη μεσολάβηση του *Agrobacterium* στην βάση δεδομένων βιβλιογραφίας Web of Science το χρονικό διάστημα 1985 έως 1999 ήταν 1038, ενώ την δεκαετία 2000-2011 ήταν 3604 (Rivera et al., 2012b).

Σήμερα, από την πρώτη αναφορά μετασχηματισμένων φυτών με το *Agrobacterium tumefaciens*, στο χειμερινό συμπόσιο στο Μαϊάμι το 1983, οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες έχουν εξαπλωθεί σε 41 χώρες (English & Schreiber, 2020). Αξίζει να αναφερθεί ότι η διαγονιδιακή τομάτα είναι η πρώτη καλλιέργεια που πήρε έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και διατέθηκε στην αγορά των ΗΠΑ το 1994 (Herrera-Estrella et al., 2005). Η συγκεκριμένη ποικιλία τομάτας κυκλοφόρησε με την εμπορική ονομασία FLAVR SAVR™ και δημιουργήθηκε με στόχο την παράταση της διάρκειας ζωής των ώριμων καρπών. Η ωρίμανση αλλά και η σήψη συνδέονται με το γονίδιο του ενζύμου αποικοδόμησης της πηκτίνης πολυγαλακτουρονάση (PG). Τα γονίδια που προκαλούν επιβράδυνση στην ωρίμανση φαίνονται να συνδέονται στενά με ανεπιθύμητα γονίδια και για αυτόν τον λόγο δεν ήταν επιτυχής η χρήση τους για την βελτίωση της τομάτας με συμβατικές μεθόδους (Acquaah, 2019). Το 1987, με σκοπό την γενετική τροποποίηση της τομάτας με μειωμένη PG, το γονίδιο PG κλωνοποιήθηκε από την τομάτα “Caligrante” και κατασκευάστηκαν δύο γονιδιακές κασέτες, οι δυαδικοί πλασμιδιακοί φορείς αντινοσηματικής πολυγαλακτουρονάσης pCGN1416 και pCGN1436 που είχαν το γονίδιο FLAVR SAVR™ σε αντίστροφο προσανατολισμό με τον συστατικό υποκινητή CaMV 35S. Επίσης είχαν και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (*kan<sup>r</sup>*) ως δείκτη επιλογής. Εισήχθη η κατασκευή

pCGN1436 στην τομάτα με την βοήθεια του *Agrobacterium* και επειδή το γονίδιο FLAVR SAVR δεν μεταβάλλει την δομή του ενζύμου της PG που παράγεται στο διαγονιδιακό φυτό αλλά μειώνει μόνο την παραγόμενη ποσότητα, οι PG στα μετασηματισμένα και μη φυτά ήταν πανομοιότυπες (Acquaah, 2019). Η ποικιλία Flavr Savr δημιουργήθηκε το 1992 από την εταιρεία Calgene μετά από πολυετή έρευνα. Χαρακτηριστικό της ήταν ότι η σήψη καθυστερούσε να εμφανιστεί, όμως το ο φλοιός της ήταν μαλακός άρα και επιρρεπής σε τραυματισμούς κατά την αποθήκευση και μεταφορά. Επιπροσθέτως ήταν λιγότερο εύγεστη, καθώς η αρχική ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε για την γενετική τροποποίηση δεν υπερείχε έναντι άλλων ποικιλιών ως προς τη γεύση, με αποτέλεσμα το νέο προϊόν να μη γίνει ευρέως αποδεκτό από τους καταναλωτές σε σχέση με τις συμβατικές ποικιλίες (Acquaah, 2019).

Στις ΗΠΑ, οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες καλλιεργήθηκαν για πρώτη φορά το 1996, και πλέον πάνω από το 75 % των συνολικών καλλιεργειών καλαμποκιού, βαμβακιού, σόγιας και ζαχαρότευτλων είναι πλέον γενετικά τροποποιημένες με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα και έντομα (Economic Research Service, United States Department of Agriculture, 2020). Σύμφωνα με αναφορές, το 2020 στις ΗΠΑ η αγορά των ΓΤ καλλιεργειών και σπόρων κυμαινόταν γύρω στα 28 δισεκατομμύρια δολάρια και ως το 2027 αναμένεται να αγγίξει τα 45 δισεκατομμύρια δολάρια (Global Industry Analysts, 2020) (Anjanappa & Gruissem, 2021b).

Υπάρχουν κάποια σημεία που επιδέχονται βελτίωσης και εξέλιξης με σκοπό οι ΓΤ καλλιέργειες να ανταποκριθούν στις τεράστιες προκλήσεις που τίθενται σήμερα ενόψει της κλιματικής αλλαγής και της ασφάλειας και επάρκειας τροφίμων για την κάλυψη των επισιτιστικών αναγκών ενός συνεχώς αυξανόμενου ανθρώπινου πληθυσμού. Οι νέες μέθοδοι κλωνοποίησης γονιδίων και καλλιέργειας ιστών, ο αυξανόμενος ρυθμός αλληλούχισης φυτικών γονιδιωμάτων και οι πληροφορίες από δεδομένα λειτουργικής γονιδιοματικής για την κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων αναμένεται να συμβάλλουν καθοριστικά στην αντιμετώπιση των ανωτέρω προκλήσεων (Anjanappa & Gruissem, 2021).

### **1.10. *Agrobacterium rhizogenes***

Το *Agrobacterium rhizogenes* είναι ένας αρνητικός κατά Gram μικροοργανισμός που ζει στο έδαφος (Mauro & Bettini, 2021) και έχει την δυνατότητα να μολύνει πολλά είδη φυτών (Porter & Flores, 1991). Η αναγνώριση του πρώτη φορά έγινε την πρώτη φορά την δεκαετία του 1930 ως *Rhizobium rhizogenes* (Riker et al., 1930), όμως το κανονικό του όνομα τού δόθηκε το 1942. Προκαλεί το σύνδρομο της ριζομανίας («Hairy root»), στο οποίο

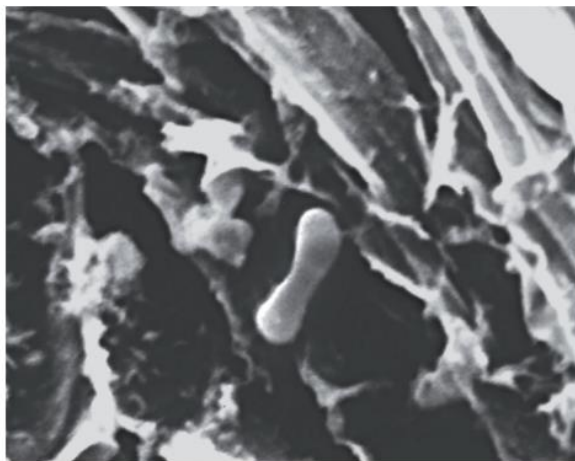
παρατηρείται υπερανάπτυξη της ρίζας στο σημείο της μόλυνσης (Mauro & Bettini, 2021) . Η ασθένεια προκαλείται εξαιτίας της ενσωμάτωσης του πλασμιδίου (τμήμα βακτηριακού DNA) Ri στο φυτικό γονιδίωμα (Chilton et al., 1982). Η μόλυνση των φυτών γίνεται μέσω των πλασμιδίων του βακτηρίου *Agrobacterium*, του Ti πλασμιδίου του *A. tumefaciens* (Watson, et al., 1975) και του Ri πλασμιδίου του *A. rhizogenes* (Moore et al., 1979). Η μόλυνση προκαλείται από τη μεταφορά του T-DNA που φέρει ογκογόνα γονίδια από το παθογόνο στα φυτικά κύτταρα και στη μετέπειτα ενσωμάτωσή τους στο φυτικό γονιδίωμα (Chilton et al., 1982). Η εν λόγω διεργασία προϋποθέτει την έκφραση γονιδίων μολυσματικότητας (*vir*) (Gelvin, 2003). Η ιδιότητα αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών, με την χρήση των πλασμιδίων ως βιολογικό φορέα. Σημειώνεται ωστόσο ότι τα ογκογόνα γονίδια έχουν απομακρυνθεί από τους φορείς, με αποτέλεσμα τα πλασμίδια να καθίστανται αφοπλισμένα (*disarmed*) (Rivera et al., 2012).



**Διάγραμμα 9:** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του γενετικού μετασχηματισμού με την μεσολάβηση του *Agrobacterium*. Πηγή: (Rivera et al., 2012)

Η ανακάλυψη της φυσικής ικανότητας του *A. tumefaciens* να εισάγει το Ti πλασμίδιο σε φυτικής προέλευσης γονιδίωμα έγινε το 1977 και έκτοτε προτάθηκε ως φορέας εισαγωγής ξένων γονιδίων σε φυτικά κύτταρα (Chilton et al., 1977). Το πρώτο έγγραφο που αναφέρει όγκους (*crown gall disease*) που προκαλούνται από το *Agrobacterium* χρονολογείται το 1679 (Malpighi, 1679- de Saeger et al., 2021). Το 1983 αναπτύχθηκαν τα πρώτα διαγονιδιακά φυτά

με γενετική ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, ο καπνός και η πετούνια, και σχεδόν 11 χρόνια μετά αναπτύχθηκε η διαγονιδιακή τομάτα “Flavor Savr” που έλαβε έγκριση από τον FDA (Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων) για καλλιέργεια στις ΗΠΑ (Kumar et al., 2020). Μέχρι σήμερα, έχουν προκύψει 525 συμβάντα γενετικού μετασχηματισμού σε 32 φυτικά είδη, μεταξύ των οποίων βρίσκεται ο αραβόσιτος, το βαμβάκι, η πατάτα, η σόγια και το γαρούφαλλο στα οποία απαντώνται 238, 61, 49, 41 και 19 επεμβάσεις, αντίστοιχα (ISAAA, 2019). Ο απολογισμός από την υιοθέτηση ΓΤ καλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο υπογραμμίζει ότι χάρη στην τεχνολογία της γενετικής μηχανικής επετεύχθη αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών κατά 22 % και συνεπακόλουθη αύξηση του γεωργικού εισοδήματος κατά 68 % (Kumar et al., 2020).



**Εικόνα 3.** Σαρωτική ηλεκτρονική μικρογραφία της προσκόλλησης του στελέχους R1000 του *Agrobacterium rhizogenes* στο στον ηλίανθο (*Helianthus annuus* L.) στο κύτταρο του κοτυληδονικού κόμβου. Πηγή:(Ozyigit, Dogan, & Artam Tarhan, 2013).

Ο όρος «**τριχωτή ρίζα**» ή αλλιώς «**ριζομανία**» ή αλλιώς “**hairy root**” χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την ασθένεια που προκαλείται από το *A. rhizogenes* για πρώτη φορά το 1900. Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα είναι η πλαγιότροπη ανάπτυξη των ριζών, κοντοί έσω ριζικοί κόμβοι, πολλές πλευρικές διακλαδώσεις, ζαρωμένα φύλλα, μειωμένη ανάπτυξη του κορυφαίου μεριστώματος, πλήθος ριζικών τριχιδίων, ανώμαλη παραγωγή ανθέων, υπερβολική ανθοφορία, αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης και μεταβαλλόμενη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών. Στη φύση όταν στα φυτά υπάρχουν πληγές, απελευθερώνονται φαινολικές ενώσεις, οι οποίες ελκύουν το *A. rhizogenes* και κινείται χημειοταξικά προς αυτές. Τότε ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA (T-DNA), από το πλασμίδιο

που επάγει την ανάπτυξη ριζών (Ri) των βακτηρίων (pRi), μετακινείται προς την περιοχή που φέρει την πληγή και την μολύνει. Οι ρίζες που μολύνονται από το *A. rhizogenes* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται *in vitro* χωρίς την συνέργεια εξωγενών ρυθμιστών αύξησης (Ozyigit et al., 2013).

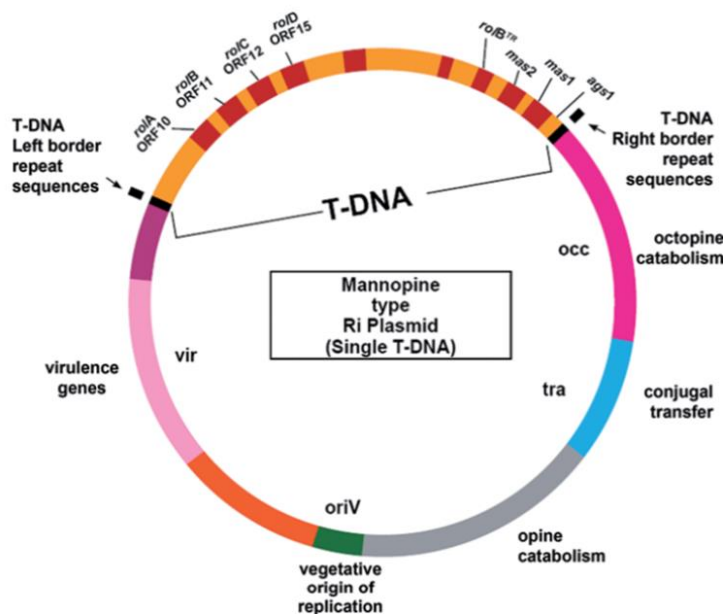
### 1.10.1 Πλασμίδιο Ri

Σε όλα τα στελέχη του *A. rhizogenes*, το πλασμίδιο Ri φέρει μια περιοχή που ονομάζεται T-DNA όπου εδράζουν τα γονίδια *rol*, που σχετίζονται με την έκπτυξη και την ανάπτυξη της ρίζας καθώς και γονίδια που είναι απαραίτητα για την βιοσύνθεση της οπίνης (Hansen et al., 1994a). Οι λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται το T-DNA, πέρα από την σύζευξη του πλασμιδίου Ti/Ri, περιλαμβάνουν τη σύνθεση της οπίνης και τον καταβολισμό, τη μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA. Το T-DNA είναι μια μικρή περιοχή των πλασμιδίων Ti/Ri, μεγέθους περίπου 200 kb (Ozyigit, 2012), που περιέχει γονίδια βακτηριακής προέλευσης που διαθέτουν ευκαρυωτικές ρυθμιστικές αλληλουχίες, γεγονός που επιτρέπει την έκφρασή τους στα φυτικά κύτταρα όπου ενσωματώνονται (Giri & Narasu, 2000). Όταν το T-DNA ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου, εκφράζει ένζυμα που ρυθμίζουν τη σύνθεση των οπινών, οι οποίες αποτελούν πηγή θρεπτικών για το *Agrobacterium* (Ozyigit, 2012- Petit et al., 1983- Gartland, 1995). Το T-DNA οριοθετείται μεταξύ του αριστερού (LB) και δεξιού ορίου (RB), αλληλουχίες μήκος 25 bp που εμφανίζουν ομολογία μεταξύ των πλασμιδίων Ri και Ti (Bahramnejad et al., 2019).

Οι οπίνες που παράγονται από τα στελέχη του *A. rhizogenes* μπορούν να διακριθούν σε τουλάχιστον 2 μεγάλες κατηγορίες: i) οπίνες της ομάδας των *αγροπινών* και ii) οπίνες της ομάδας των *αγροκινοπινών*. Τα περισσότερα στελέχη του *A. rhizogenes* δύνανται να παράξουν οπίνες της ομάδας αγροκινοπινών, και ορισμένα στελέχη οπίνες τύπου αγροπίνης. Οι οπίνες τύπου-αγροπίνης, συμπεριλαμβανομένων της αγροπίνης, της μαννοπίνης, του αγροπινικού οξέος και του μαννοπινικού οξέος, παράγονται από στελέχη τύπου-αγροπίνης, ενώ όλες οι οπίνες τύπου-αγροπίνης, εξαιρουμένης της αγροπίνης, παράγονται από στελέχη τύπου-μαννοπίνης (Gartland, 1995- Petit et al., 1983 - Ozyigit et al., 2013b). Τα πιο κοινά στελέχη *A. rhizogenes* είναι τα εξής:

- Τύπου-agropine: pRiA4, pRi1855, pRiHRI, pRi15834 και pRiLBA9402
- Τύπου-mannopine: pRi8196
- Τύπου-cucumopine: pRi2659

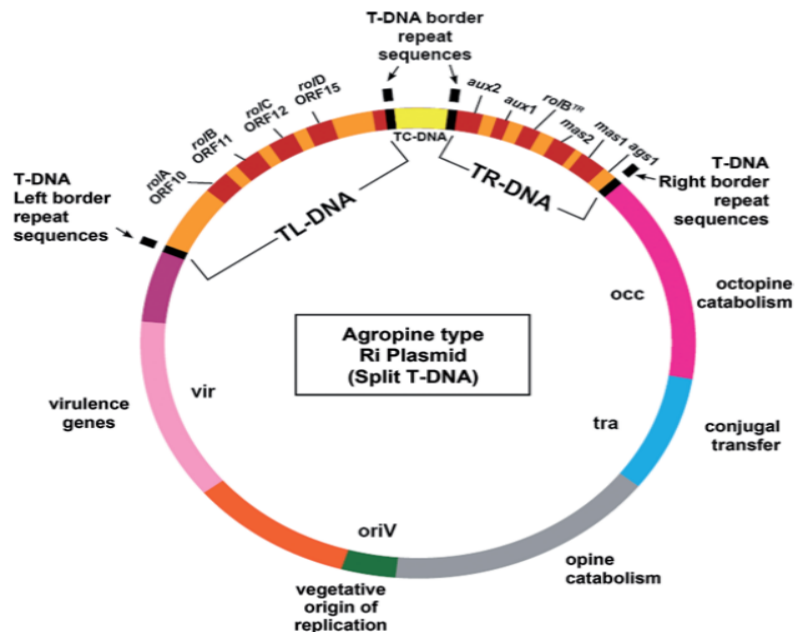
→ Τύπου-mikimopine pRi1724



**Εικόνα 4:** Σχηματική αναπαράσταση του Ri-πλασμιδίου τύπου-μαννοπίνης του *A. rhizogenes*.  
Πηγή:(Ozyigit et al., 2013b)

Κάποια από τα γνωστά στελέχη του *A. rhizogenes* είναι υπερ-ικά και είναι ικανά να μολύνουν μεγάλο φάσμα φυτικών ξενιστών. Αυτά είναι τα K47, K599 και HRI (Petit et al., 1983). Περαιτέρω, υπάρχουν ευρύματα που εντοπίζουν διαφορές μεταξύ των στελεχών του *A. rhizogenes*. Έτσι, τα στελέχη του *A. rhizogenes* ταξινομούνται σε πολικούς και μη πολικούς τύπους. Τα στελέχη τύπου-agropine χαρακτηρίζονται ως μη πολικά, ενώ όλα τα υπόλοιπα στελέχη ως πολικά. Ακόμα, τα στελέχη τύπου-agropine μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη ριζικών τριχιδίων, ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό του δίσκου της ρίζας, ενώ όλα τα υπόλοιπα στελέχη εκτός του τύπου-agropine επάγουν σχηματισμό ριζικών τριχιδίων όταν ο δίσκος της ρίζας τοποθετείται σε ανάποδο προσανατολισμό (Ozyigit et al., 2013b). Επίσης, στα διάφορα πλασμίδια Ri το T-DNA μπορεί να έχει μια ποικίλη φυσική δομή, και διακρίνεται σε συνεχές, όπως στα στελέχη τύπου-mannopine και -cucumopine, και μη συνεχές, όπως τα στελέχη τύπου-agropine. Το συνεχές T-DNA αποτελεί ένα αδιάκοπο τμήμα αλληλουχίας DNA που οριοθετείται από συνοριακές αλληλουχίες στα δύο άκρα, ενώ το μη συνεχές T-DNA χωρίζεται σε 2 τμήματα (το TL-DNA και το TR-DNA) που μεταξύ τους παρεμβάλλεται ένα μη μεταφερόμενο τμήμα μεγέθους 15 kb (Bahramnejad et al., 2019a).





**Εικόνα 5:** Σχηματική αναπαράσταση του Ri-πλασμιδίου τύπου-agropine του *A. rhizogenes*.  
 Πηγή:(Ozyigit et al., 2013b)

Στα γονίδια που συμμετέχουν ενεργά στο μετασηματισμό είναι τα γονίδια *vir* που βοηθούν στη μεταφορά και ενσωμάτωση της αλληλουχίας T-DNA. Το κρίσιμο μονοπάτι είναι ένα σύστημα μεταγωγής αισθητήρων-σημάτων δύο συστατικών, όπου το *virA* λειτουργεί ως φαινολικός υποδοχέας και το *virG* ως δέκτης σήματος (Winans, 1991). Παράλληλα, επικουρικά συνεργούν και άλλα 14 γονίδια *vir*. Η ανακάλυψη των γονιδίων αυτών έγινε αρχικά στο πλασμίδιο Ti, και έπειτα στο πλασμίδιο Ri (Bahramnejad et al., 2019a). Έχει διαπιστωθεί ότι 160 kb από τα 250 kb του πλασμιδίου pRiA4b έχουν ανιχνεύσιμη ομολογία με δύο Ti πλασμίδια, τα pTiA6 και pTiT37 (Huffman et al., 1984). Ως εκ τούτου, εξαιτίας της ομοιότητας στη γραμμική οργάνωση των γενετικών τόπων που είναι υπεύθυνα για ισοδύναμες λειτουργίες κατά τη μεταφορά T-DNA, τα Ri και Ti πλασμίδια είναι αρκετά όμοια ως προς τη δομή και λειτουργία όσον αφορά τη μεταφορά της T-DNA περιοχής (Huffman et al., 1984).

### 1.10.1.1 Πλασμίδιο Ti

Το *Agrobacterium*, που είτε ζει ελεύθερα στο έδαφος είτε δρα ως παθογόνο όταν υπάρχει διαθέσιμος ξενιστής, είναι αποδεδειγμένο πως είναι ικανό να μετασηματίζει φυτά εισερχόμενο από πληγές ή από στοματικά ανοίγματα (Subramoni et al., 2014 - Brenchic et al., 2005). Είναι επίσης γνωστό πως περιέχει το Ti πλασμίδιο, έχοντας την ικανότητα πρόκλησης

όγκων. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι φαινολικές ενώσεις, με πιο γνωστή την ακετοσυρινγόνη, εκλύονται από το φυτό και εντοπίζονται από την πρωτεΐνη VirA, που συμβάλλει στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της VirG, η οποία με την σειρά της επάγει την μεταγραφή άλλων γονιδίων *vir*. Τα γονίδια *vir* σχετίζονται με την επεξεργασία, μεταφορά και ενσωμάτωση του μεταφορικού T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα. Το T-DNA βρίσκεται στο πλασμίδιο Ti μεταξύ του αριστερού και του δεξιού ορίου, και διαθέτει γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αυξίνης, κυτοκινίνης, οπινών και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με τη μόλυνση. Όταν γίνει η ενσωμάτωση στο φυτικό ξενιστή, τα γονίδια προκαλούν τη δημιουργία όγκων και τη βιοσύνθεση οπινών που αποτελούν πηγές άνθρακα και συχνά αζώτου για το *Agrobacterium* (de Saeger et al., 2021). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, το *Agrobacterium* μπορεί να αναπρογραμματίσει τις λειτουργίες του ξενιστή έτσι ώστε να συσσωρεύσει άλλους μεταβολίτες προς όφελός του (Gonzalez-Mula et al., 2019).

### **1.10.2 Γονίδια *rol***

Η διαδικασία της μεταφοράς του T-DNA ρυθμίζεται από πολύπλοκα μοριακά μονοπάτια, όπου εμπλέκονται γονίδια του βακτηριακού χρωμοσώματος, του πλασμιδίου και του φυτικού γονιδιώματος (Zupan & Zambryski, 1995). Τη δεκαετία του 1980, εντοπίστηκαν τα γονίδια T-DNA που συμβάλλουν στην επαγωγή της ασθένειας “hairy root”, με κύρια τα *rolA*, *rolB*, *rolC* και *rolD* (Mauro & Bettini, 2021b). Οι εν λόγω γενετικοί τόποι εντοπίζονται στις περιοχές T-DNA του pRiA4 και έχουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ριζών του *A. rhizogenes* στο TL-DNA (White et al., 1985). Τα γονίδια *rol* που βρίσκονται στο TL-DNA του πλασμιδίου Ri συμβάλλουν στη βιοσύνθεση σημαντικών ορμονών, της αυξίνης και της κυτοκινίνης, στη ρύθμιση της συσσώρευσης ενδογενών ορμονών, ενώ η έκφραση τους επάγει τον σχηματισμό ριζών σε μετασχηματισμένους ιστούς (Bensadde et al., 2008).

Το ενδιαφέρον έχει στραφεί κυρίως στα γονίδια *rolA*, *rolB* και *rolC* καθώς θεωρείται ότι σχετίζονται άμεσα με την έναρξη του συνδρόμου “hairy root” (White et al., 1985). Ο ανεξέλεγκτος σχηματισμός ριζών από τα γονίδια *rolA*, *rolB* και *rolC* έχει παρατηρηθεί σε φύλλα καπνού, καλαντζόης και τομάτας (Ozyigit et al., 2013b), ενώ τα φυτά που εκφράζουν τα γονίδια αυτά είναι μορφολογικά όμοια με εκείνα που φέρουν ολόκληρο το TL-DNA (Spano et al., 1988). Τέλος, αναφέρεται πως η απενεργοποίηση ή υπερέκφραση γονιδίων *rol* σε σταθερές διαγονιδιακές σειρές ή σε καλλιέργειες «hairy root» παρουσιάζει διαφορές στους φαινότυπους των φυτών και στη μορφολογία των ριζών (Schmülling et al., 1988).

**Πίνακας 5:** Τα γονίδια *rol*, οι λειτουργίες τους και ο φαινότυπος που ελέγχουν σε φυτά ξενιστές.  
 Πηγή: (Ozyigit et al., 2013b)

<b>Γονίδιο</b>	<b>Λειτουργία</b>	<b>Φαινότυπος</b>
<i>rolA</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Αναστολή της επιμήκυνσης των κυττάρων μέσω διαχυτικού παράγοντα.</li> <li>→ Μείωση της περιεκτικότητας των ορμονών.</li> <li>→ Αύξηση της ευαισθησίας στη αυξίνη.</li> <li>→ Ρύθμιση της ορμονικής φυσιολογίας της GA.</li> <li>→ Παρεμβολή στο μεταβολισμό των πολυαμινών.</li> <li>→ Αντιστοιχεί με τη δραστηριότητα της H<sup>+</sup> ΑΤΡάσης της μεμβράνης του πλάσματος.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Καχεκτική ανάπτυξη.</li> <li>→ Σκούρο πράσινα ζαρωμένα φύλλα με διαφορετική αναλογία μήκους προς πλάτος.</li> <li>→ Συμπυκνωμένες ταξιανθίες.</li> <li>→ Καθυστέρηση στην έναρξη της ανθοφορίας.</li> <li>→ Μειωμένος αριθμός ανθέων.</li> </ul>
<i>rolB</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Μεταβολές στη λήψη/μεταγωγή του σήματος της αυξίνης.</li> <li>→ Διέγερση σχηματισμού νέων μεριστωμάτων.</li> <li>→ Επαγωγή δευτερογενούς μεταβολισμού.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Γρήγορη ανάπτυξη.</li> <li>→ Επαγωγή σχηματισμού ριζών.</li> <li>→ Υψηλή διακλάδωση και πλαγιοτροπισμός.</li> </ul>
<i>rolC</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Μείωση του μεγέθους των κυττάρων.</li> <li>→ Μείωση των επιπέδων αμπισισικού οξέος (ABA), πολυαμίνης και αιθυλενίου.</li> <li>→ Σχηματισμός βλαστικών μεριστωμάτων.</li> <li>→ Ρύθμιση του μεταβολισμού και της μεταφοράς σακχάρων.</li> <li>→ Πρόκληση της παραγωγής υψηλών επιπέδων δευτερογενών μεταβολιτών.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Αυξημένη διακλάδωση.</li> <li>→ Νάνα φυτά με κοντούς μεσογονάτιους κόμβους.</li> <li>→ Μικρότερο μέγεθος επιδερμικών κυττάρων στους μεσογονάτιους κόμβους.</li> <li>→ Λογχοειδή φύλλα.</li> <li>→ Πρώιμη ανθοφορία.</li> <li>→ Μειωμένο μέγεθος ανθέων και μειωμένη παραγωγή γύρης.</li> </ul>
<i>rolD</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Ανίκανο να προκαλέσει από μόνο του σχηματισμό ριζών.</li> <li>→ Παροχή αμυντικής αντίδρασης ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικού στρες.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Αυξημένη ανθοφορία.</li> <li>→ Λιγότερη ριζοβολία.</li> <li>→ Επιμήκυνση και επέκταση των ιστών κάθε οργάνου (αλλά όχι στο ακραίο μερίστωμα).</li> <li>→ Ανάπτυξη κάλου που επιφέρει την έναρξη του σχηματισμού όγκου.</li> </ul>

### 1.10.2.1 Γονίδιο *rolA*

Το γονίδιο *rolA* εντοπίζεται σε όλα τα Ri πλασμίδια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μικρής μοριακής μάζας, περίπου 11 kDa (Nilsson & Olsson, 1997). Επίσης, διαθέτει ένα συχνό μοτίβο αλληλουχίας κοινό σε πρωτεΐνες δέσμησης DNA (Suzuki, 1989) και έτσι δύναται να λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας μεταγραφής (Veena & Taylor, 2007). Η έκφραση του γονιδίου, στο *N. tabacum*, επιφέρει μειωμένα επίπεδα ορμονών, όπως της αυξίνης, της κυτοκινίνης, του γιββερελλικού οξέος και του αμπισισικού οξέος, με τη μείωση να εξαρτάται από τον τύπο του ιστού και το στάδιο ανάπτυξής του (Dehio et al., 1993). Τα διαγονιδιακά φυτά *N. tabacum* εμφανίζονται με καχεκτική ανάπτυξη, μαρασμό, σκουροπράσινο χρώμα και τροποποιημένη αναλογία μήκους-πλάτους, καθυστερημένη έναρξη ανθοφορίας, συμπυκνωμένες ταξιανθίες, μειωμένο αριθμό ανθέων. Παράλληλα, τα φύλλα *rolA*-διαγονιδιακών φυτών του *N. tabacum* χαρακτηρίζονται από 40-60 % μειωμένη περιεκτικότητα σε GA, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου-φύλλα, η οποία επιφέρει επιμήκυνση του στελέχους και επίπεδη ανάπτυξη του φύλλου (Dehio et al., 1993). Στην *Kalanchoe daigremontiana*, η σίγηση του *rolA* έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μακρών και ευθύγραμμων ριζών που οδηγούν σε μια λιγότερο συμπαγή εμφάνιση των φύλλων (Vilaine & Casse-Delbart, 1987).

Επίσης, οι ιστοί που έχουν προσβληθεί από το *A. rhizogenes* είναι 100 φορές πιο ευαίσθητοι στην αυξίνη, υποδεικνύοντας ότι η αυξημένη ευαισθησία των μετασχηματισμένων φυτών δεν οφείλεται σε μια συγκεκριμένη θέση του γονιδίου *rolA* στο φυτικό γονιδίωμα, αλλά στην επίδραση του γονιδιακού προϊόντος του. Η ευαισθησία στην αυξίνη μπορεί να έχει σχέση με την δράση της H<sup>+</sup> ATPάσης της πλασματικής μεμβράνης που εντοπίζεται σε διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το *rolA* (Vansuyt et al., 1992). Τέλος, σημειώνεται πως υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν πως υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των γονιδίων *rolA* και *rolB* (Ozyigit et al., 2013b).

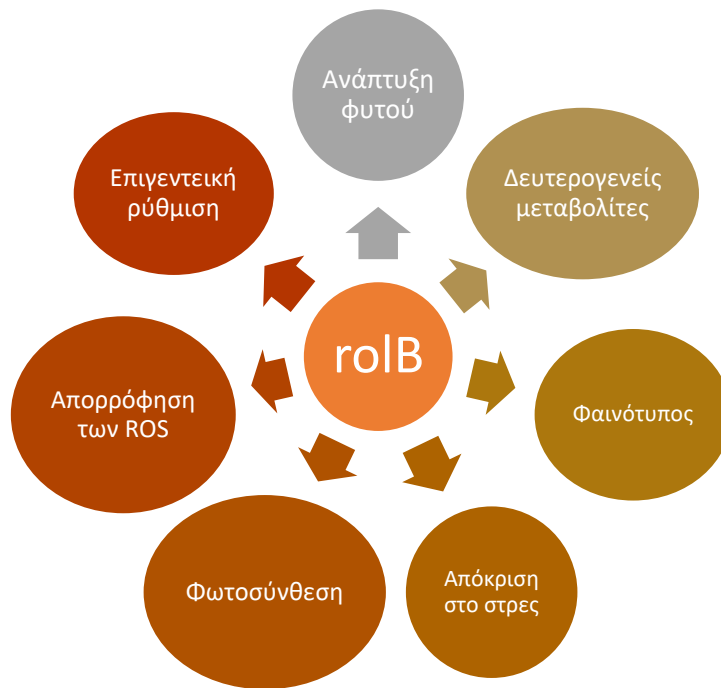
### 1.10.2.2 Γονίδιο *rolB*

Το γονίδιο *rolB* βρίσκεται στο T-DNA του Ri πλασμιδίου του *A. rhizogenes* και σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου “hairy root” ή «Ριζομανίας». Το γονίδιο αυτό διαθέτει την ικανότητα επαγωγής ριζών, ενώ ταυτόχρονα έχει συνδεθεί με την ευαισθησία στην αυξίνη. Προσδίδει στα φυτά έναν ιδιότυπο φαινότυπο και δύναται να τροποποιήσει το γενετικό πρόγραμμα των φυτών, επάγοντας την ανάπτυξη μεριστωματικών κυττάρων και συμβάλλοντας στη διαφοροποίησή τους σε ρίζες, άλλα κύτταρα, ιστούς ή όργανα. Η βασική

λειτουργία των γονιδίων *rolB* σχετίζεται με την παθογένεια, συμβάλλοντας παράλληλα και σε παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, αναστολή των ROS, ανοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και ενίσχυση της φωτοσύνθεσης. Οι μέχρι τώρα λειτουργικές αναλύσεις δεν κατάφεραν να εντοπίσουν κάποιο βιοχημικό προϊόν του γονιδίου *rolB*, αν και του έχουν αποδοθεί περισσότερες από μία ενζυμικές δραστηριότητες (Mauro & Bettini, 2021b).

Αξίζει δε να σημειωθεί ότι τα χαρακτηριστικά που φέρουν τα *rolB*-διαγονιδιακά φυτά διαφέρουν ανάλογα με το είδος. Στον καπνό, η έκφραση του *rolB* οδηγεί σε ανάπτυξη άφθονων ριζών, καχεκτικό φαινότυπο, μειωμένη γονιμότητα, μικρούς καρπούς, μεγάλο στίγμα και άνθη και διαφορετική μορφολογία φύλλων (Schmülling et al., 1988). Στο είδος *A. thaliana*, παρατηρείται αυξημένος αριθμός ταξιανθιών ανά ροζέτα, συγκριτικά με τον άγριο τύπο, καθώς και πρόωμη γήρανση/νέκρωση των βλαστικών οργάνων (Kodahl et al., 2016). Στην τομάτα, η έκφραση των γονιδίων *rolB* εκδηλώνεται με μείωση της κορυφογραμμής και του μήκους των μεσογονάτιων κόμβων (Arshad et al., 2014), και ταυτόχρονα η ιστική έκφραση του στην ωοθήκη επιφέρει παρθενοκαρπία (Carmi et al., 2003). Αναφέρεται ακόμα πως η έκφραση του *rolB* συμβαίνει κυρίως στο αγγειακό σύστημα των φυτών και στους ιστούς της ρίζας (Mauro & Bettini, 2021b). Τα διαγονιδιακά φυτά προερχόμενα από μετασχηματισμό με γονίδια *rol*, μπορούν να αποδώσουν μόρια όπως οι δευτερογενείς μεταβολίτες, που δεν υπάρχουν ή είναι σε πολύ μικρή συγκέντρωση στα άγριου τύπου φυτά. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παίζουν ζωτικό ρόλο στην άμυνα και στην αντίληψη με εξωτερικά ερεθίσματα (Bulgakov, 2008).

Στην τομάτα, η έκφραση του *rolB* συνοδεύεται από αυξημένη περιεκτικότητα των καρπών σε λυκοπένιο και φαινολικές ενώσεις, κατά 62 και 58 % αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα φυτά του μάρτυρα, έχοντας φυσικά αντίκτυπο στην διατροφική αξία του προϊόντος. Επιπλέον, στα *rolB*-φυτά παρατηρήθηκε ενίσχυση της άμυνας έναντι των μυκήτων *Fusarium oxysporum* και *Alternaria solani* (Arshad et al., 2014). Στη φάση της πρόωμης ανάπτυξης, η έκφραση του *rolB* είχε προστατευτική δράση στις υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς τα φυτά εμφάνισαν μεγαλύτερη απόδοση, αριθμό και βάρος καρπών και έλλειψη δυσμορφιών συγκριτικά με τους μάρτυρες (Shabtai et al., 2007). Τέλος, τα φυτά τομάτας που εκφράζουν το ογκογονίδιο, εμφανίζουν αυξημένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου (Mauro & Bettini, 2021b).



**Διάγραμμα 10:** Οι λειτουργίες που σχετίζονται με το γονίδιο *rolB*.

### 1.10.2.3 Γονίδιο *rolC*

Οι αλληλουχίες του γονιδίου *rolC* διαφέρουν ανάμεσα στα στελέχη και το μέγεθος τους κυμαίνεται μεταξύ 537 bp και 543 bp (Ozyigit et al., 2013b). Τα φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με το γονίδιο *rolC*, εμφανίζουν μειωμένη κορυφαία κυριαρχία, νανισμό, κοντά μεσογονάτια διαστήματα, φύλλα λογχοειδή, πρόωμη ανθοφορία, μικρότερο μέγεθος ανθέων και μειωμένη παραγωγή γύρης (Slimestad & Verheul, 2009).

Η έκφραση του γονιδίου *rolC* ποικίλλει και εξαρτάται από την ύπαρξη των πλήρων αλληλουχιών. Η παραγωγή ριζών σε *rolC*-μετασχηματισμένα φυτά ήταν αυξημένη, σε μικρότερο ωστόσο βαθμό σε σχέση με φυτά που εκφράζουν το σύνολο των γονιδίων *rol* (Palazon, et al., 1998). Το *rolC* παρουσιάζει μια ειδική έκφραση στη ρίζα, ενώ η έκφρασή του στα φύλλα είναι περιορισμένη έως και μηδενική στο άκρο του βλαστού (Schmülling, et al., 1988). Βέβαια, η έκφραση του *rolC* στα φύλλα είναι έντονη όταν υπάρχει ολόκληρο το T-DNA (Leach & Aoyagi, 1991). Αναφέρεται ότι οι συγκεντρώσεις του ασμικικού οξέος, της πολυαμίνης και του αιθυλενίου, μειώνονται με την έκφραση του γονιδίου *rolC*. Όπως και το *rolB*, το *rolC* δύναται να διεγείρει την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε διαγονιδιακά φυτά. Τέλος, ο υποκινητής *rolC* χρησιμοποιείται εκτενώς για την έκφραση γονιδίων ειδικών για το φλοιοειδές, κάτι που τον καθιστά εργαλείο σε βιοτεχνολογικά εφαρμογές σχετικά με την ανθεκτικότητα σε παθογόνα (Ozyigit et al., 2013b).

#### 1.10.2.4 Γονίδιο *rolD*

Το γονίδιο *rolD* είναι το μόνο που απαντάται μόνο στο TL-DNA των Ri πλασμιδίων αγροπίνης και είναι το μόνο που δεν μπορεί να προκαλέσει αυτόνομα το σχηματισμό ρίζας (Mauro, et al., 1996). Έχει μέγεθος 1.032 bp και κωδικοποιεί πρωτεΐνη 344 αμινοξέων (Ozyigit et al., 2013b). Η έκφραση του γονιδίου *rolD* προκαλεί αυξημένη ανθοφορία και μειωμένη ριζοβολία. Παρόλο που η παραγωγή ανθέων επιταχύνεται, η αυτογονιμοποίηση εμποδίζεται καθώς τα άνθη εμφανίζουν ετερομορφική ασυμβατότητα (Mauro et al., 1996).

Η δράση του *rolD* εντοπίζεται σε αναπτυσσόμενους επιμήκεις ιστούς κάθε οργάνου σε ενήλικα φυτά, αλλά όχι στα ακραία μεριστώματα. Στο στάδιο της ωρίμανσης, παρατηρείται μείωση και τελικά καταστολή της έκφρασης του *rolD*. Τέλος, οι μεταλλάξεις στο *rolD* επιτρέπουν την ανάπτυξη κάλου που προκαλεί το σχηματισμό όγκου, προσομοιάζοντας την μόλυνση με Ti-πλασμίδιο (Tronato et al., 1997).

#### 1.10.3 Harpins

Οι χαρπίνες (harpins) είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το σύστημα έκκρισης τύπου III (T3SS) από αρνητικά κατά Gram φυτοπαθογόνα βακτήρια (El-Saadony et al., 2021). Αν και αποκλίνουν σε αρκετά σημεία οι πρωτογενείς αλληλουχίες τους, οι χαρπίνες είναι όλες πλούσιες σε γλυκίνη, χωρίς κυστεΐνη, όξινης, θερμικά σταθερές, παρουσιάζουν ευαισθησία στις πρωτεάσες, και τέλος είναι ικανές να προκαλούν φυτικές αποκρίσεις, όπως η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) όταν διεισδύσουν στον αποπλάστη των φύλλων. Επιπρόσθετα, είναι σε θέση να επάγουν διάφορες αποκρίσεις σε κυτταρικό επίπεδο, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε διάφορα παθογόνα. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε όταν παράγονται ενδογενώς μετά από μετασχηματισμό, είτε όταν εφαρμοστούν εξωτερικά στα φυτά. Οι αποκρίσεις αυτές, αμυντικού χαρακτήρα, είναι τοπικές ή συστηματικές και μπορούν να οδηγήσουν στην απόκτηση διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (SAR) σε επίπεδο φυτού. Τέλος, πέρα από τον ρόλο τους στην άμυνα του φυτού, οι χαρπίνες έχουν συσχετιστεί και με την ανάπτυξη των φυτών καθώς πιθανώς ενισχύουν την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών και αυξάνουν την φωτοσυνθετική ικανότητα (Pavli et al., 2011).

## Σκοπός της Μελέτης

Μεγάλο ενδιαφέρον στον κλάδο της γενετικής βελτίωσης φυτών φαίνεται να υπάρχει στην ανάπτυξη αποτελεσματικών, σύντομων και εύχρηστων πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού. Το *A. rhizogenes* έχει αξιοποιηθεί στο παρελθόν με επιτυχία καθώς φαίνεται να είναι ένας αξιόπιστος φορέας μεταφοράς γονιδίων και επαγωγής της ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών. Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο τη βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας, παρακάμπτοντας τις πρακτικές δυσκολίες που συνοδεύουν το σταθερό μετασχηματισμό. Για την αποπεράτωση του μετασχηματισμού, χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη R1000 και R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> με στόχο την επισήμανση του αποτελεσματικότερου στελέχους για τον μετασχηματισμό της συγκεκριμένης ποικιλίας τομάτας. Ακόμα στο πλαίσιο περαιτέρω αξιοποίησης του πρωτοκόλλου, τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας με στόχο την αξιολόγηση τους ως προς την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε σύγκριση με μη-μετασχηματισμένα σπορόφυτα.

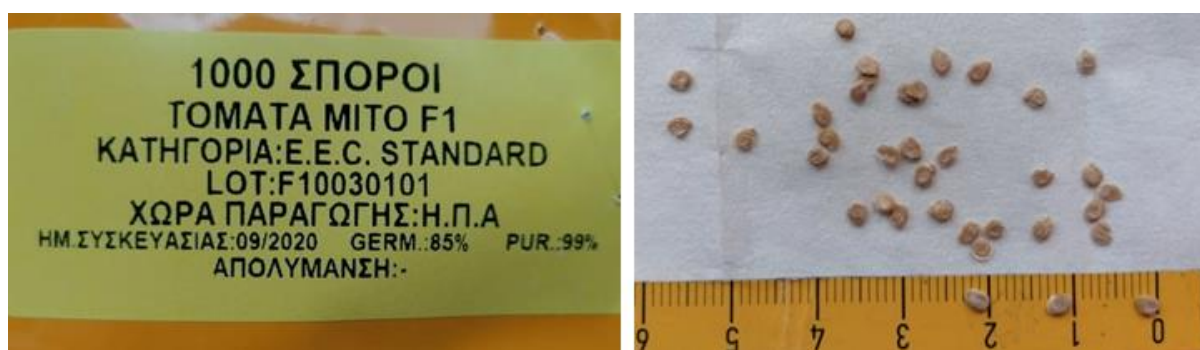


## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 Φυτικό υλικό

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων του γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας, αξιοποιήθηκε η εμπορική ποικιλία «ΜΙΤΟ», που αποτελεί υβρίδιο που προέρχεται από τις Η.Π.Α. Οι σπόροι της ποικιλίας είναι ωσειδείς, καστανού χρώματος και φέρουν υπόλευκο επίχρισμα. Το σχήμα τους παραπέμπει σε σταγόνα νερού και το μέγεθός τους είναι περίπου 0,3 cm (Εικόνα 6).

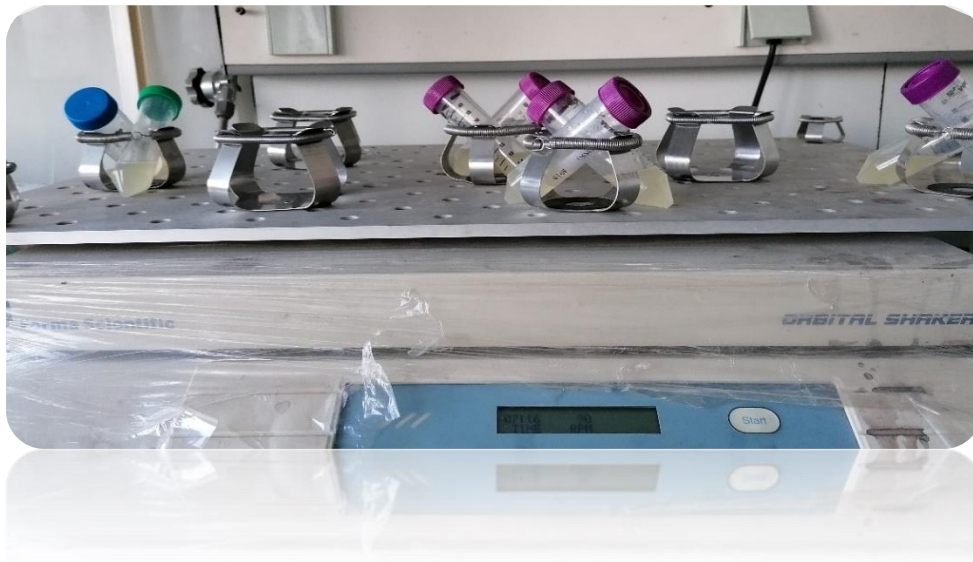


**Εικόνα 6:** Συσκευασία του εμπορικού υβριδίου ΜΙΤΟ (δεξιά). Σπόροι ποικιλίας ΜΙΤΟ F1 (αριστερά).

### 2.2 Βακτηριακά στελέχη *Agrobacterium rhizogenes*

Τα βακτηριακά στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* που χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για το μετασχηματισμό ήταν το *R1000* και *R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*. Το τελευταίο, έχει μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, όπου έχει ενσωματωθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί τη χαρπίνη HrpZ, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Tampakaki & Panopoulos, 2000- Pavli et al., 2011).

Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε 10 mL θρεπτικού μέσου (LB) που περιείχε τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής (*R1000*: 10 μL ναλιδιξικό οξύ, *R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*: 10 μL ναλιδιξικό οξύ και 5 μL καναμυκίνη), υπό ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα, για χρονικό διάστημα 2 ημερών στους 28 °C ή έως ότου αποκτήσουν OD<sub>600</sub> = 0.6-1 (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7:** Εγκατάσταση καλλιέργειας βακτηρίων, σε τράπεζα ανακίνησης.

Για τη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση σε 3.000 στροφές για 5 λεπτά, απόρριψη υπερκείμενου, προσθήκη 1 mL MS liquid και εκ νέου φυγοκέντριση. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε πάλι το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα (pellet) επαναδιαλύθηκε σε υγρό MS που περιείχε 1,5  $\mu$ L ακετοσυριγκόνης, και χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο του μετασχηματισμού των εκφύτων της τομάτας.

### **2.3 Διαδικασία μετασχηματισμού τομάτας μέσω του *A. rhizogenes***

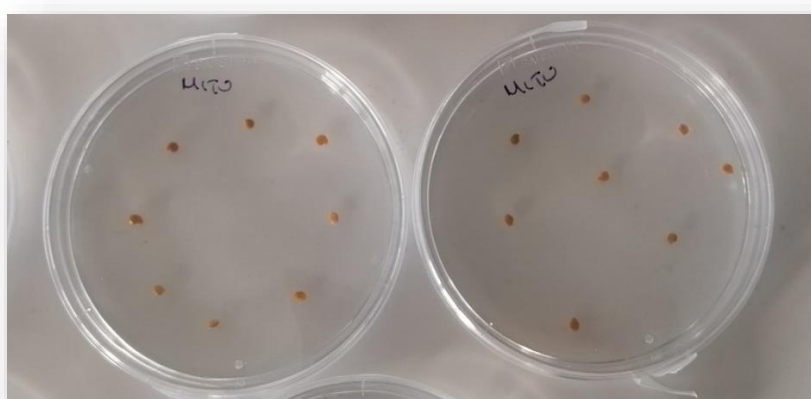
Για το γενετικό μετασχηματισμό της τομάτας ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Pavli and Skaracis (2010), με μικρές τροποποιήσεις που αφορούσαν την ηλικία των σποροφύτων, την μεθοδολογία μόλυνσης και τη σύσταση των θρεπτικών. Ως έκφυτα, χρησιμοποιήθηκε το υπέργειο σποροφύτων 7-ημερών. Ανάλογα με τη μεταχείριση, διαφοροποιούνται τα θρεπτικά υποστρώματα ως προς την προσθήκη των αντιβιοτικών υδρομυκίνη και καρβενικιλίνη. Στα φυτά του μάρτυρα καθώς και στα σπορόφυτα που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος R1000 το υπόστρωμα περιείχε 300 mg/L καρβενικιλίνης, ως βακτηριοστατικού παράγοντα, και 150  $\mu$ M ακετοσυριγκόνης. Στα σπορόφυτα που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> έγινε προσθήκη 300 mg/L καρβενικιλίνης, 150  $\mu$ M ακετοσυριγκόνης και 100 mg/L υδρομυκίνης-B για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Η σύσταση των θρεπτικών μέσων παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6:** Σύσταση των θρεπτικών μέσων για το γενετικό μετασχηματισμό της τομάτας με τη χρήση του *A. rhizogenes*.

Θρεπτικό υπόστρωμα	Σύσταση υποστρώματος
Υπόστρωμα βλάστησης	MS vitamins: 2,2 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 5 g/L
Υπόστρωμα συν-καλλιέργειας	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 10 g/L Agar: 9 g/L
Υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS/MES/vitamins: 2,45 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 9 g/L Ακετοσυριγκόνη: 150 μM Καρβενικιλίνη: 300 mg/L Υγρομυκίνη: 100 mg/L
MS	MS vitamins: 4,4 g/L Sucrose: 30 g/L

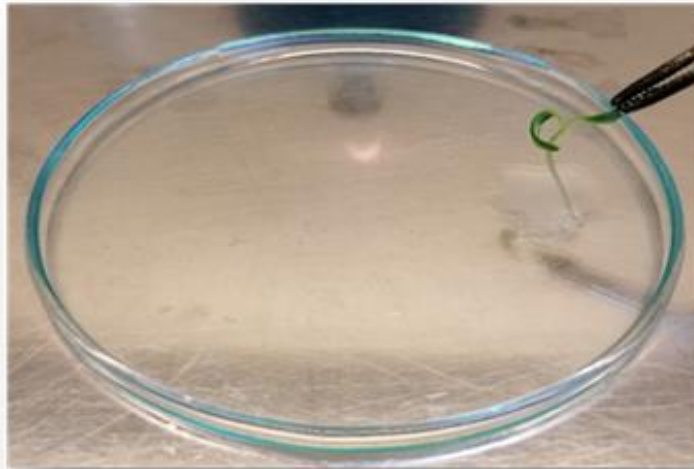
\* Σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα το pH είχε ρυθμιστεί στο  $5.7 \pm 0.1$ .

Αρχικά, έγινε απολύμανση των σπόρων με διάλυμα χλωρίνης 10 % για 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, και ακολούθησε πλύση τους με απιονισμένο νερό, και επανάληψη της διαδικασίας για 3 φορές. Στη συνέχεια, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τρυβλία -8 σπόροι ανά τρυβλίο- που περιείχε το θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης [ $\frac{1}{2}$  MS (βασικά άλατα) και 0.5 % άγαρ] (Εικόνα 8) (Πίνακας 6).



**Εικόνα 8:** Εγκατάσταση σπόρων σε θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης

Μετά το πέρας 7 ημερών, έγινε επιλογή υγιών σποροφύτων με φυσιολογικό φαινότυπο για τον μετασχηματισμό. Αρχικά, έγινε κοπή του σπορόφυτου στην ζώνη μεταχρωματισμού, απομάκρυνση της ρίζας του, και στη συνέχεια εμφύτευση του εκφύτου για 15-20 δευτερόλεπτα σε ίζημα των βακτηριακών κυττάρων που έχει τοποθετηθεί σε γυάλινο τρυβλίο (Εικόνα 9). Έπειτα τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα συγκαλλιέργειας (Πίνακας 6). Στη συνέχεια, τα τρυβλία έκλεισαν κατά τα 2/3 με τη χρήση parafilm, ώστε να επιτρέπεται ο αερισμός των σπορόφυτων και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες (25°C, 16/8 ώρες ημέρας/νύχτας) (Εικόνα 10).



**Εικόνα 9:** Έκφυτο την στιγμή της εμφύτευσης στη βακτηριακή καλλιέργεια

Μετά το πέρας 2 ημερών, έγινε μεταφορά των μετασχηματισμένων σποροφύτων σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ακετοσυριγκόνη και ενός αντιβιοτικού που δρα ως βακτηριοστατικός παράγοντας με στόχο την ανασχεση της ανάπτυξης βακτηριακών κυττάρων στο υπόστρωμα όπου αναπτύσσονταν τα φυτά. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό καρβενικιλίνη σε συγκέντρωση 300 mg/L. Τα σπορόφυτα που είχαν μετασχηματιστεί με το R1000-HrpZ<sub>Psph</sub> περιείχαν και υδρομυκίνη-B 100 mg/L. Τα τρυβλία που περιείχαν τα έκφυτα έκλεισαν με parafilm και τοποθετήθηκαν με κάθετη κλίση σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών.

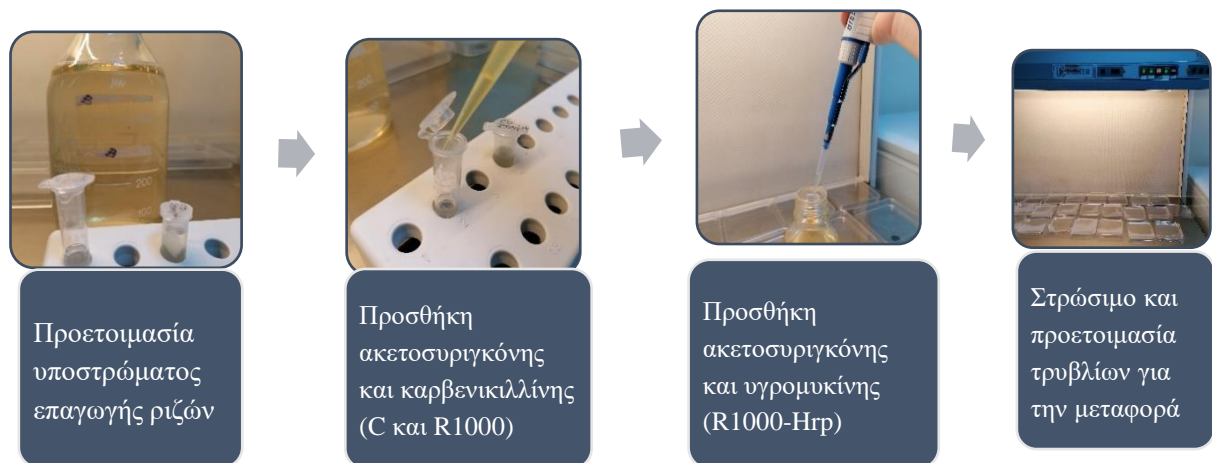


**Εικόνα 10:** Εξελικτική πορεία σποροφύτων με την πάροδο των ημερών. *Αριστερά:* σπόροι που έχουν τοποθετηθεί στο θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης την 4<sup>η</sup> ημέρα, όπου παρατηρείται έκπτυξη των νεαρών σποροφύτων. *Κέντρο:* νεαρά σποροφύτα ηλικίας 7 ημερών, πριν την διαδικασία του μετασχηματισμού. *Δεξιά:* έκφυτα που έχουν τοποθετηθεί σε υπόστρωμα συγκαλλιέργειας, έπειτα από κοπή στη ζώνη του υποκοτυλίου, απομάκρυνση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος και μετασχηματισμό μέσω εμφάνισης στη βακτηριακή καλλιέργεια. Στις μικρές φωτογραφίες παρουσιάζεται με την σειρά το θρεπτικό υπόστρωμα σε γυάλινα μπουκάλια, η τράπεζα νηματικής ροής και τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν.

Έπειτα μετά από 3 ημέρες, έγινε εκ νέου μεταφορά των σποροφύτων σε τετράγωνα τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής ανάπτυξης ριζών (Πίνακας 6). Το θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής ριζών περιείχε κατά περίπτωση αντιβιοτικά και ακετοσυριγκόνη κατά περίπτωση και ανάλογα με τη μεταχείριση: i) για τα φυτά του μάρτυρα και για τα φυτά που είχαν εμφανιστεί στο βακτηριακό στέλεχος R1000 έγινε προσθήκη 300 mg/L καρβενικιλίνης, ως βακτηριοστατικού παράγοντα με στόχο την ανασχεση της ανάπτυξης βακτηριακών κυττάρων, και 150 μM ακετοσυριγκόνης, ii) για τα φυτά που είχαν εμφανιστεί στο βακτηριακό στέλεχος R1000-HrpZ<sub>Psph</sub> έγινε προσθήκη 300 mg/L καρβενικιλίνης, 150 μM ακετοσυριγκόνης και 100 mg/L υγρομυκίνης, σύμφωνα με τη διαδικασία που απεικονίζεται στο Διάγραμμα 11. Τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία Petri, έκλεισαν με parafilm και τοποθετήθηκαν με κάθετη κλίση σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (Εικόνα 11).

Τέλος, μετά το πέρας 15 ημερών, τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής ριζών, όπου παρέμειναν έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε τράπεζα νηματικής ροής, προς αποφυγή επιμολύνσεων των εκφύτων και των θρεπτικών υποστρωμάτων. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν μάρτυρες, δηλαδή μη μετασχηματισμένα έκφυτα τομάτας (C, φυτά αγρίου τύπου) που δέχτηκαν τις ίδιες μεταχειρίσεις με τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα, εξαιρουμένης της διαδικασίας εμβολιασμού των εκφύτων με τη βακτηριακή καλλιέργεια.



**Διάγραμμα 11:** Η διαδικασία προσθήκης αντιβιοτικών στα θρεπτικά υποστρώματα για την ανάσχεση ανάπτυξης ανεπιθύμητων βακτηρίων.

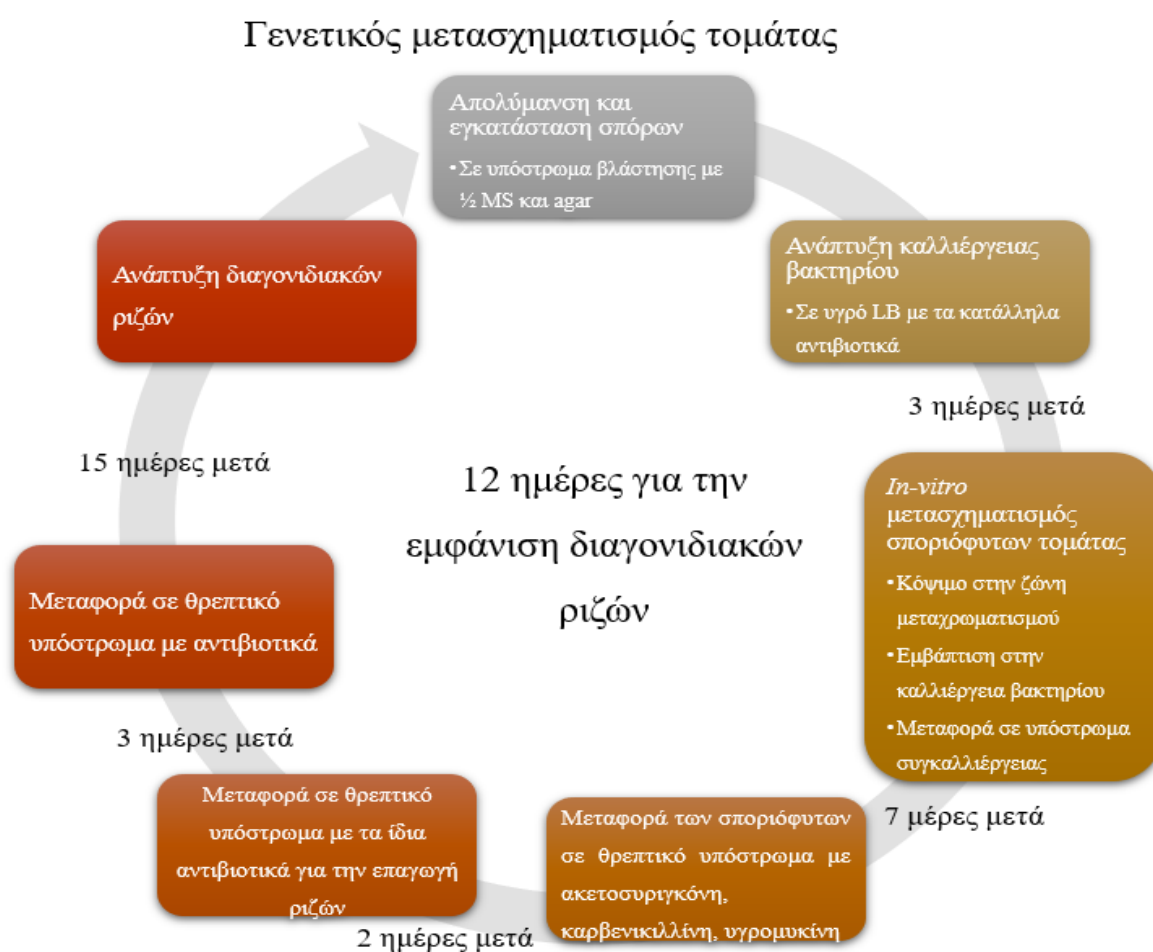


**Εικόνα 11:** Η διαδικασία της μεταφοράς των σποροφύτων στο θρεπτικό υπόστρωμα σε τετράγωνα τρυβλία Petri που περιείχαν τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής.

Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού αξιολογήθηκε με βάση φαινοτυπικές παρατηρήσεις σχετικά με την ανάπτυξη και τον αριθμό των ριζών που εκπύχθηκαν, συγκριτικά με τους μάρτυρες, τον έλεγχο για την επιτυχή ένθεση των διαγονιδίων, και τη συχνότητα εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών. Η συχνότητα μετασχηματισμού υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

$$\text{Συχνότητα μετασχηματισμού (\%)} = \frac{\text{αριθμός σποροφύτων που ανέπτυξαν διαγονιδιακές ρίζες}}{\text{συνολικός αριθμός εκφύτων}} \times 100$$

όπου μετασχηματισμένα θεωρήθηκαν τα φυτά με φαινότυπο θυσσανώδους ρίζας. Η διαδικασία του γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας περιγράφεται στην Εικόνα 12.

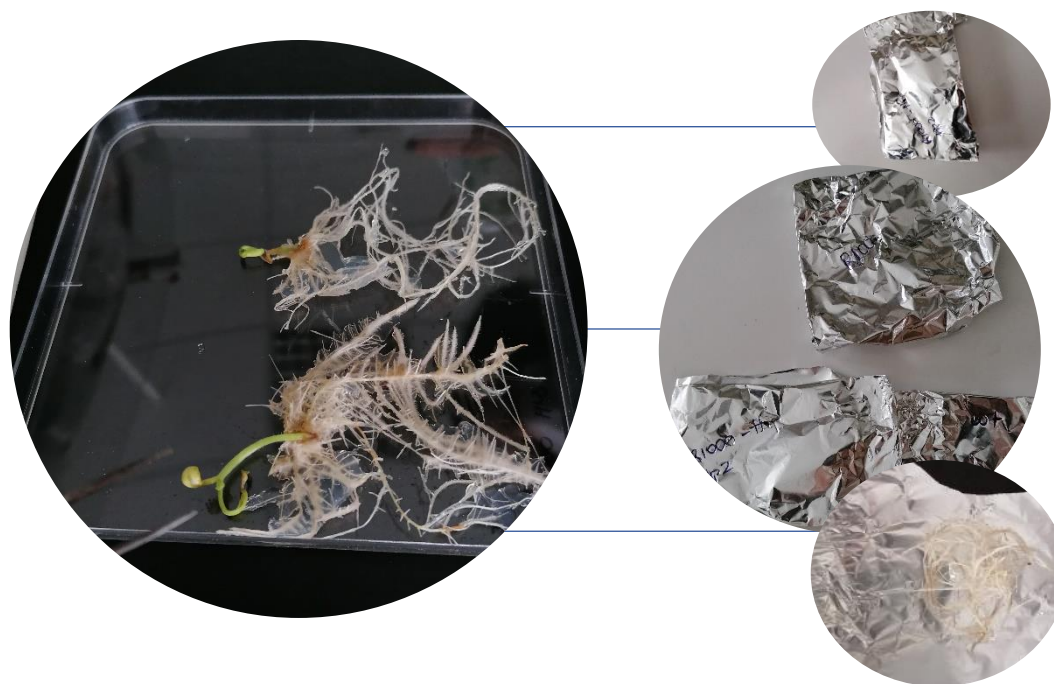


**Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας του γενετικού μετασχηματισμού.

## 2.4 Έλεγχος της ένθεσης του διαγονιδίου μέσω PCR

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε με αποκοπή ριζών από μετασχηματισμένα και αγρίου τύπου σπορόφυτα με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και τοποθέτησή τους σε

αλουμινόχαρτο πάνω στο οποίο σημειώθηκε το βακτηριακό στέλεχος και ο κωδικός αριθμός (Εικόνα 13). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν άμεσα σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης (-80 °C) ώστε να διατηρηθούν αναλλοίωτα.



**Εικόνα 13:** Η διαδικασία της συλλογής του ιστού.

Τα δείγματα λειοτριβήθηκαν με την χρήση γουδιών με κάψα από πορσελάνη και υγρού αζώτου έως ότου κονιορτοποιηθούν και έπειτα 100 mg ιστού ανά δείγμα τοποθετήθηκαν σε eppendorf. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του Kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, έγινε προσθήκη 400  $\mu$ L διαλύματος PL1, για να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων, και έπειτα από ανακίνηση έγινε προσθήκη 10  $\mu$ l RNase A και επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε νέο eppendorf με στήλη NucleoSpin® Plant II, και φυγοκεντρίθηκε στις 11000 rpm για 2 λεπτά. Έπειτα, έγινε προσθήκη 450  $\mu$ l buffer PC και μεταφορά των δειγμάτων στη στήλη NucleoSpin® Plant II, που διαθέτει την ικανότητα να συγκρατεί το DNA. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 11000 rpm για 1 λεπτό, προσθήκη 400  $\mu$ l διαλύματος έκπλυσης (PW1) και εκ νέου φυγοκέντριση στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υποκείμενο, έγινε προσθήκη 700  $\mu$ L διαλύματος έκπλυσης (PW2) και φυγοκέντριση στις 11000 rpm για 1 λεπτό και απόρριψη του υποκειμένου. Έγινε επανάληψη της διαδικασίας



έκπλυσης με 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος PW2, φυγοκέντριση και απόρριψη του υποκείμενου. Ακολούθησε τοποθέτηση της στήλης σε νέο erpendorf, προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος έκλουσης (PE), επώαση 5 λεπτών σε υδατόλουτρο στους 65 °C και φυγοκέντριση στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Ακολούθως, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα erpendorf και πραγματοποιήθηκε έκλυση του DNA με προσθήκη 30  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O. Έπειτα από επώαση για 1 λεπτό, έγινε φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 1 λεπτό και τοποθέτηση στους -20 °C. Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA, έγινε με χρήση φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού με απορρόφηση στα 260 nm, και η συγκέντρωση DNA μετρήθηκε σε ng/ $\mu\text{L}$ .

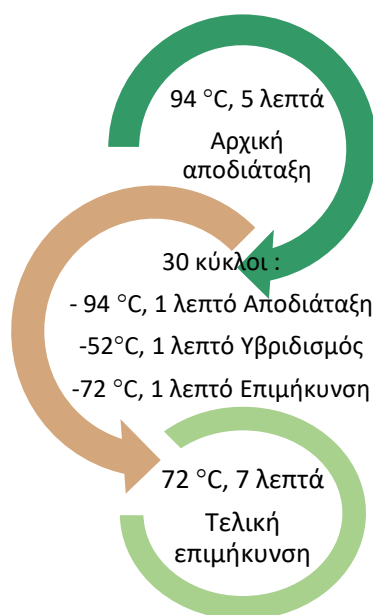
Ακολούθησε αντίδραση PCR για τον έλεγχο της ένθεσης του διαγονιδίου, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, ώστε να επαληθευτεί η ενσωμάτωση της T-DNA περιοχής στο φυτικό γονιδίωμα (Πίνακας 7). Στα Διαγράμματα 12 και 13 παρουσιάζονται η σύσταση του μείγματος και το πρόγραμμα της PCR.

**Πίνακας 7:** Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
rolB2-F	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT	52	423	Thilip et al., 2015
rolB2-R	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	52		
hrpZ-F	<i>CGAAAGCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG</i>	52	995	Tampakaki and Panoloulos, 2000
hrpZ-R	<i>CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG</i>	52		



**Διάγραμμα 12:** Η σύσταση του μίγματος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).



**Διάγραμμα 13:** Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

## 2.5 Καταπόνηση υψηλής αλατότητας και ποσοτικός προσδιορισμός προλίνης στις ρίζες διαγονιδιακών σπορόφυτων τομάτας

Στο πλαίσιο διερεύνησης των δυνατοτήτων πρακτικής αξιοποίησης των διαγονιδιακών ριζών, πραγματοποιήθηκε έκθεση των μετασχηματισμένων σποροφύτων σε καταπόνηση αλατότητας με σκοπό να εξεταστεί η απόκριση τους συγκριτικά με φυτά μάρτυρες. Τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας με τη χρήση NaCl. Ειδικότερα, τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε γυάλινους σωλήνες που περιείχαν υγρό θρεπτικό μέσο ½ MS (1,1 g MS σε dH<sub>2</sub>O) που περιείχε 150 mM NaCl σε τελικό όγκο 30 ml. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες φυτά που τοποθετήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο ½ MS, χωρίς την προσθήκη NaCl. Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για 15 ημέρες, και κατά το διάστημα αυτό λαμβάνονταν παρατηρήσεις σχετικά με την ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης. Στο πείραμα αξιοποιήθηκαν ως μάρτυρες αγρίου τύπου φυτά. Για κάθε συνδυασμό καταπόνησης - τύπου σποροφύτου (C, R1000, R1000-HrpZ<sub>Psph</sub>), χρησιμοποιήθηκαν 5 βιολογικές επαναλήψεις (ατομικά φυτά).

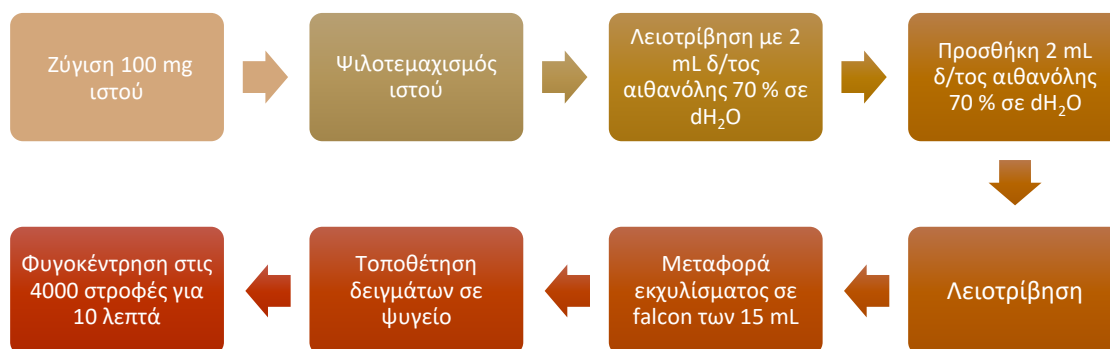
Πέραν των φαινοτυπικών παρατηρήσεων, έγινε εκτίμηση της περιεκτικότητας των ριζών σε προλίνη που έχει αναδειχθεί ως βασική ένωση κατά την επικράτηση συνθηκών καταπόνησης αλατότητας.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προλίνης αξιοποιήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Carillo and Gibon, 2011. Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε αποτυπώνεται στο Διάγραμμα 14.



**Διάγραμμα 14:** Εργαστηριακός εξοπλισμός για την πραγματοποίηση ποσοτικού προσδιορισμού προλίνης σε μετασχηματισμένα σπορόφυτα τομάτας.

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρίζες που προέρχονταν είτε από τα σπορόφυτα του μάρτυρα είτε αυτών που μετασχηματίστηκαν με τα στελέχη R1000 και R1000-HrpZ<sub>Psph</sub>. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από πρότυπη ένωση L-proline και για τις ανάγκες των μετρήσεων έγινε χρήση αιθανόλης καθαρότητας 99 %, οξικό οξύ και νυνιδρίνη. Για την εκχύλιση, ζυγίσθηκαν 100 mg ιστού, ακολούθησε ψιλοτεμαχισμός, και τοποθέτηση σε γουδί όπου προστέθηκαν 2 mL διαλύματος αιθανόλης 70 % σε dH<sub>2</sub>O. Ακολούθησε λειοτρίβηση, προσθήκη επιπλέον 2 mL διαλύματος αιθανόλης 70 % σε dH<sub>2</sub>O και εκ νέου λειοτρίβηση. Το εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε falcon (15 mL), όπου αναγράφονταν ο αριθμός του φυτού, η μεταχείριση και η ποικιλία. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ψυγείο και, έπειτα από λειοτρίβηση όλων των δειγμάτων, έγινε φυγοκέντριση στις 4000 στροφές για 10 λεπτά. Η διαδικασία αποτυπώνεται στο Διάγραμμα 15.



**Διάγραμμα 15:** Η διαδικασία εκχύλισης φυτικού ιστού για τον ποσοτικό προσδιορισμό προλίνης σε διαγονιδιακές ρίζες τομάτας.

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την εκτίμηση της απορρόφησης είχε ως εξής: παρασκευάστηκε διάλυμα νινυδρίνης 0,5 w/v όπου προστέθηκαν 0,5 gr νινυδρίνης σε 60 ml acetic acid και προστέθηκε καθαρή αιθανόλη μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Εν συνεχεία, σε νέους αριθμημένους γυάλινους σωλήνες έγινε προσθήκη 2 mL διαλύματος νινυδρίνης, και μεταφορά 1 mL του υπερκειμένου του φυτικού εκχυλίσματος. Στους σωλήνες προστέθηκε πώμα και έγινε ανακίνηση και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C, όπου και παρέμειναν για 25 λεπτά. Εν συνεχεία, τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο, και πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της απορρόφησης των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 520 nm.

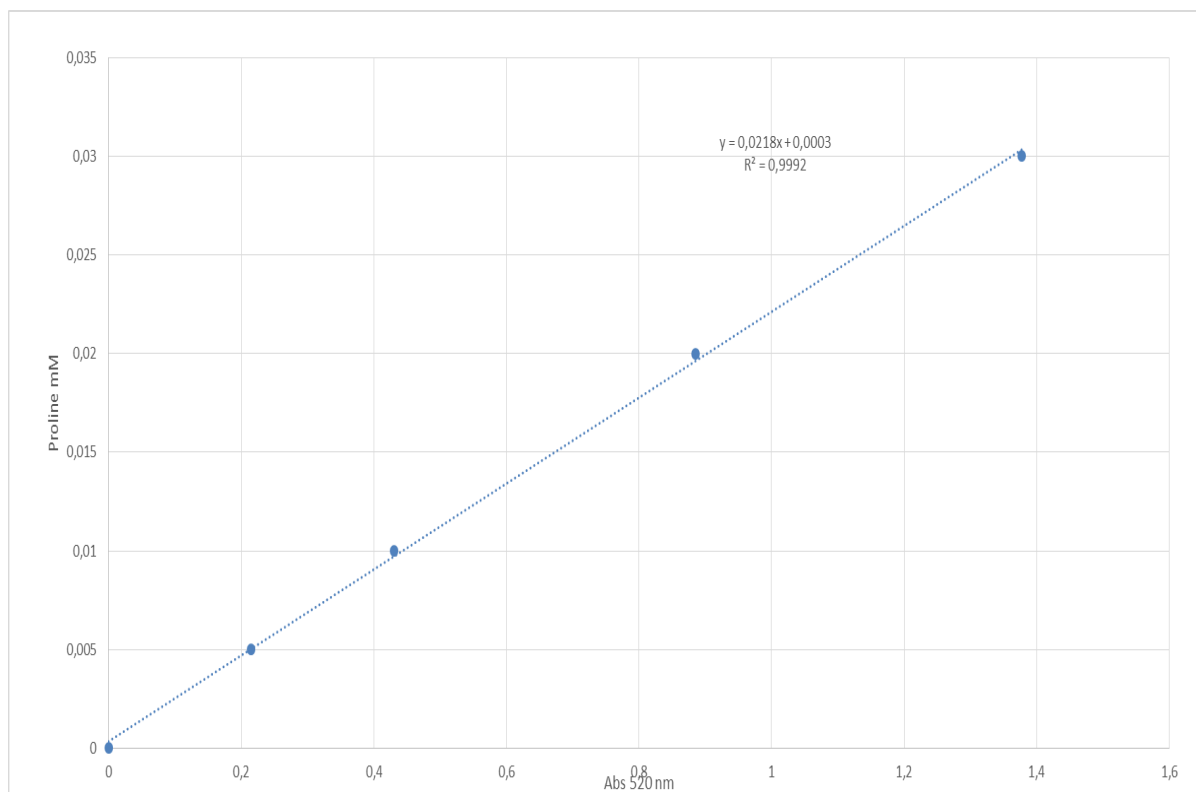
Με σκοπό την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, παρασκευάστηκε διάλυμα προλίνης 1 mM, με τη διάλυση 115,13 mg L-proline σε 100 mL διαλύματος αιθανόλης 70 % σε dH<sub>2</sub>O. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων προλίνης, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 8:** Παρασκευή διαλυμάτων προλίνης για κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

Όγκος (ml) από το αρχικό διάλυμα προλίνης (1 mM)	Προσθήκη όγκου (ml) διαλύματος αιθανόλης 70%	Τελική συγκέντρωση προλίνης (mM)
0	10	0
0,25	9,75	0,025
0,50	9,50	0,05
1	9	0,1
2	8	0,2
4	6	0,4
8	2	0,8

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων προλίνης, έγινε προσθήκη 2 mL διαλύματος νινυδρίνης, 0,8 mL διαλύματος αιθανόλης 40 % σε dH<sub>2</sub>O και 0,2 mL διαλύματος προλίνης από τα παραπάνω επιμέρους διαλύματα σε νέους γυάλινους σωλήνες. Κατά αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα προλίνης συγκέντρωσης 0 - 0,005 - 0,01 – 0,02 – 0,04 – 0,08 - 0,16. Στη συνέχεια, οι σωλήνες πωματίστηκαν και ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για τους φυτικούς ιστούς. Τέλος, έγινε προσδιορισμός της απορρόφησης των προτύπων σε φασματοφωτόμετρο στα 520 nm, επιτρέποντας τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης (Διάγραμμα 16).

Τέλος, από την πρότυπη καμπύλη και τη μαθηματική συνάρτηση που προέκυψε  $Y=0,0218x+0,0003$  μετατράπηκε η απορρόφηση με περιεχόμενη προλίνη. Οι τιμές της προλίνης που προσδιορίστηκαν αντιστοιχούν σε mM προλίνης.



**Διάγραμμα 16:** Πρότυπη καμπύλη για τη μετατροπή της απορρόφησης (520 nm) σε mM προλίνης.

## 2.6 Στατιστική ανάλυση

Το πειραματικό σχέδιο ήταν αυτό των πλήρως τυχαιοποιημένων ομάδων, με 7 επαναλήψεις ανά μεταχείριση (C, R1000, R1000-*hrpZ<sub>PspH</sub>*). Η συχνότητα μετασχηματισμού εκτιμήθηκε βάσει του ποσοστού των εκφύτων που εμφάνισαν ριζικά τριχίδια σε σχέση με το συνολικό αριθμό σποροφύτων που εμβολιάστηκαν. Δεδομένης της κανονικότητας των δεδομένων (W-test, Prob<0.115), εφαρμόστηκε ANOVA (ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου JMP (version 13.0).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

Με σκοπό τη βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*, αξιοποιήθηκε το στέλεχος R1000, σε μορφή αγρίου τύπου αλλά και ως μετασχηματισμένο με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί τη χαρπίνη HrpZ από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. Στα πειράματα του μετασχηματισμού, αξιοποιήθηκε η εμπορική ποικιλία ΜΙΤΟ, που αποτελεί υβρίδιο που προέρχεται από τις Η.Π.Α.

Για το μετασχηματισμό, χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα σπορόφυτα ηλικίας 7 ημερών, τα οποία είχαν αναπτυχθεί υπό ασηπτικές συνθήκες. Αρχικά, έγινε κοπή στην περιοχή του υποκοτυλίου, συγκεκριμένα στη ζώνη μεταχρωματισμού και απομάκρυνση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος. Ακολούθησε εμβάπτιση του σημείου κοπής σε βακτηριακά κύτταρα και τοποθέτηση των εκφύτων σε διαδοχικά υποστρώματα ως ακολούθως: i) υπόστρωμα συνκαλλιέργειας, ii) υπόστρωμα εμπλουτισμένο με βακτηριοστατικό παράγοντα για την ανάσχεση της ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων και iii) υπόστρωμα επαγωγής ανάπτυξης ριζών, που περιείχε ακετοσυρινγκόνη, βακτηριοστατικό παράγοντα και αντιβιοτικό επιλογής των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά που υπέστησαν τις ίδιες μεταχειρίσεις αλλά δεν εμβολιάστηκαν με βακτηριακά κύτταρα. Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού αξιολογήθηκε με βάση φαινοτυπικές παρατηρήσεις σχετικά με την ανάπτυξη, τον αριθμό και το χρόνο έκπτυξης των ριζών, σε σύγκριση με τους μάρτυρες, τη συχνότητα εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και την επιτυχή ένθεση των διαγονιδίων.

#### 3.1 Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών μετά των εμβολιασμό

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της επιτυχίας του μετασχηματισμού των σποροφύτων τομάτας, έγινε καταγραφή σε καθημερινή βάση του χρόνου που απαιτούνταν για την εμφάνιση των ριζών καθώς και τον αριθμό και το μήκος των ριζικών τριχιδίων που αναπτύχθηκαν στις διαφορετικές κατηγορίες σποροφύτων (C, R1000, R1000-hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>).

Στους μάρτυρες, δηλαδή στα σπορόφυτα αγρίου τύπου, η ανάπτυξη των πρώτων ριζών σημειώθηκε στις  $9 \pm 1$  ημέρες μετά την απομάκρυνση του υπάρχοντος ριζικού τους συστήματος. Αντίθετα, στα σπορόφυτα που είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί, τόσο με το

βακτήριο R1000 όσο και με το R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, η εμφάνιση των πρώτων ριζών σημειώθηκε σε διάστημα  $12 \pm 1$  ημερών.

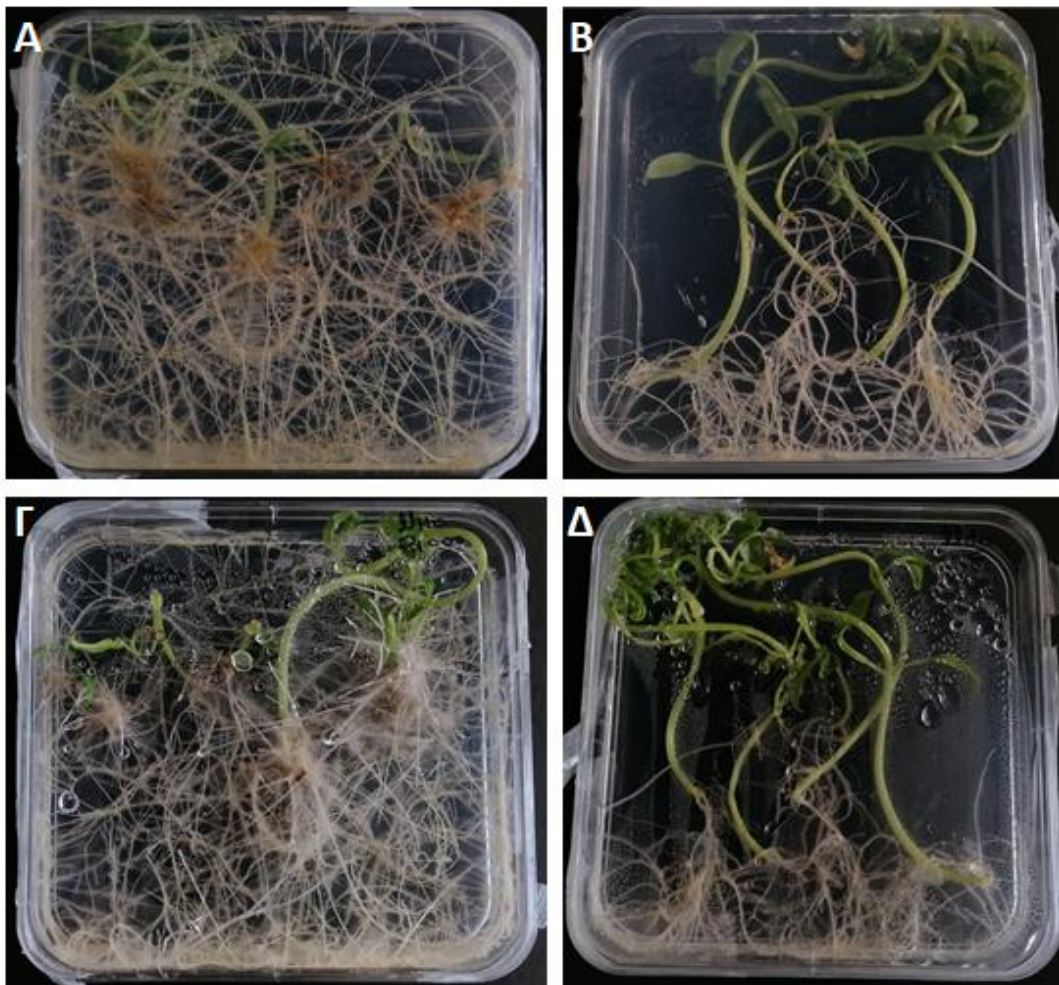


**Εικόνα 14:** Από δεξιά προς τα αριστερά: σπορόφυτο που εμβολιάστηκε με το βακτήριο R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, σπορόφυτο που εμβολιάστηκε με το βακτήριο R1000, σπορόφυτο αγρίου τύπου (μάρτυρας).

### 3.2 Φαινοτυπικές διαφορές των ριζικών τριχιδίων

Πέραν των διαφορών αναφορικά με το χρόνο έκπτυξης των ριζών, αξίζει να σημειωθεί ότι οι ρίζες των διαφορετικών κατηγοριών φυτών διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους σε φαινοτυπικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των διαγονιδιακών ριζών και των ριζών αγρίου τύπου που αναπτύχθηκαν στους μάρτυρες υπήρξαν ιδιαίτερα εμφανείς μετά το πέρας τριών εβδομάδων από τον εμβολιασμό. Οι διαφορές άπτονται της δομής και βιομάζας του ριζικού συστήματος αλλά και του ρυθμού ανάπτυξης του. Στα φυτά του μάρτυρα, αναπτύχθηκε ριζικό σύστημα χαρακτηριστικό του αγρίου τύπου, στερούμενου πολλών πλευρικών διακλαδώσεων και κατεύθυνση προς τα κάτω. Αντίθετα, τα εμβολιασμένα σπορόφυτα ανέπτυξαν ριζικό σύστημα που εμφάνισε πλαγιοτροπική ανάπτυξη και αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων, με τη μορφή ριζιδίων, που οδηγούν σε σχηματισμό θυσσανώδους

ριζικού συστήματος. Τα μετασχηματισμένα φυτά χαρακτηρίζονταν από την έκπτυξη πλήθους ριζιδίων, διαφορετικού πάχους και ακανόνιστης κατεύθυνσης. Οι ρίζες σε όλο το μήκος τους εμφανίζουν μικρά τριχίδια και ανά διαστήματα καστανόχρωμες περιοχές. Τέλος, τα έκφυτα που εμβολιάστηκαν με το R1000 χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερη ανάπτυξη, συγκριτικά με αυτά που εμβολιάστηκαν με το R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, τα οποία εμφάνισαν σχετικά καχεκτική ανάπτυξη. Στις Εικόνες 15-19 είναι ορατές οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των ριζών που αναπτύχθηκαν στα μετασχηματισμένα και μη- μετασχηματισμένα σπορόφυτα τομάτας.

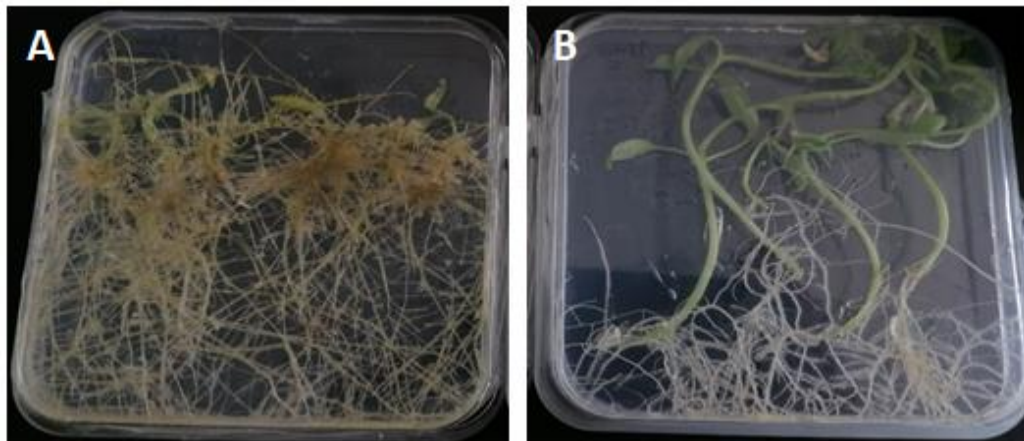


**Εικόνα 15:** Πάνω: (αριστερά) πίσω όψη τριβλίου των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000, (δεξιά) πίσω όψη τριβλίου των σποροφύτων αγρίου τύπου (μάρτυρας). Κάτω: (αριστερά) μπροστινή όψη τριβλίου των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το R1000 στέλεχος, (δεξιά) μπροστινή όψη τριβλίου των σποροφύτων αγρίου τύπου (μάρτυρας).

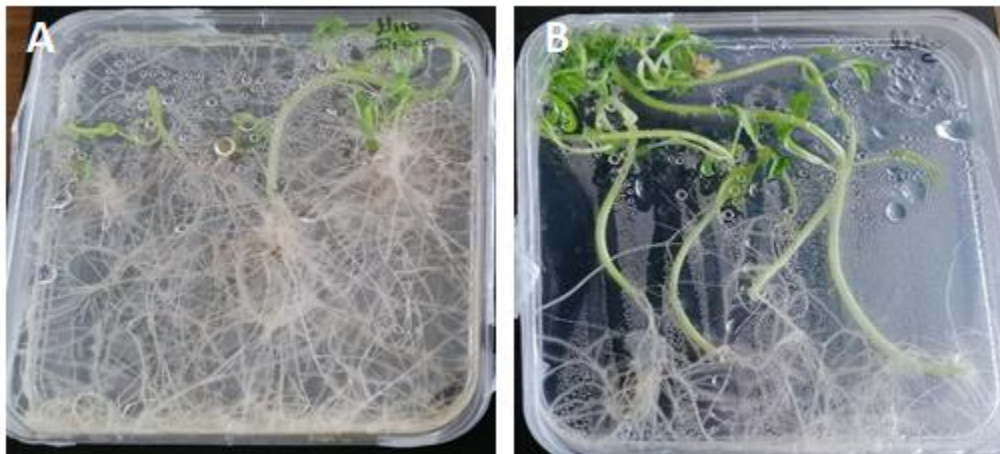




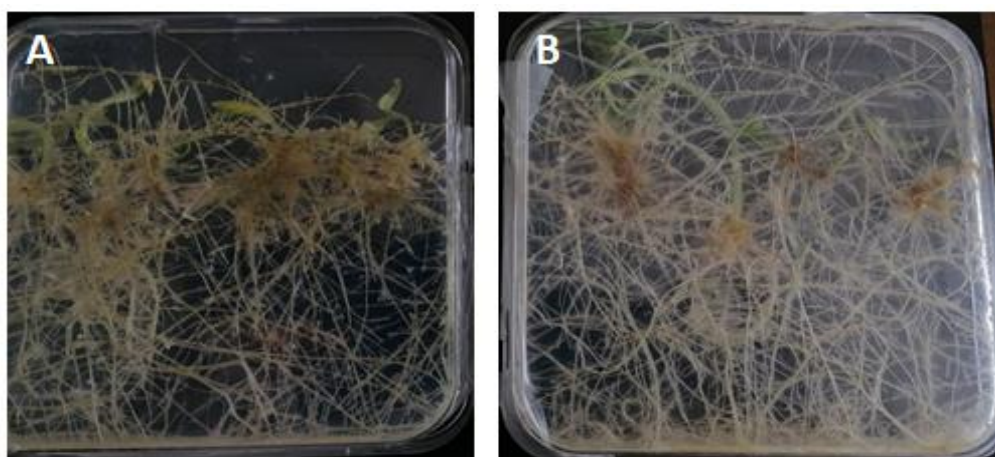
**Εικόνα 16:** Πάνω: (αριστερά) πίσω όψη τριβλίου των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000-*hrpZ<sub>Psph</sub>*, (δεξιά) πίσω όψη τριβλίου των σποροφύτων αγρίου τύπου (μάρτυρας). Κάτω: (αριστερά) μπροστινή όψη τριβλίου των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000-*hrpZ<sub>Psph</sub>*, (δεξιά) μπροστινή όψη τριβλίου των σποροφύτων αγρίου τύπου (μάρτυρας).



**Εικόνα 17:** Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000-*hrpZ<sub>sp</sub>* και των σποροφύτων αγρίου τύπου.



**Εικόνα 18:** Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000 και των σποροφύτων αγρίου τύπου.



**Εικόνα 19:** Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000-*hrpZ<sub>sp</sub>* (αριστερά) και R1000 (δεξιά).



**Εικόνα 20:** Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων αγρίου τύπου (πάνω), των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000-*hrpZ<sub>P<sub>spH</sub></sub>* (αριστερά) και το R1000 (δεξιά).

### 3.3 Αριθμός πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, οι υπό μελέτη κατηγορίες φυτών διέφεραν μεταξύ τους ως προς την συχνότητα του μετασχηματισμού, το μήκος και τον αριθμό των πλευρικών ριζών, υποδεικνύοντας τη διαφορετική ικανότητα μετασχηματισμού των στελεχών R1000 και R1000-*hrpZ<sub>P<sub>spH</sub></sub>* (Πίνακας 9).

Σχετικά με τον αριθμό των πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων ανά εμβολιασμένο έκφυτο την 10<sup>η</sup> ημέρα από τον εμβολιασμό, τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000 έφεραν τον μεγαλύτερο αριθμό ριζιδίων, ενώ τα R1000-*hrpZ<sub>P<sub>spH</sub></sub>*-σπορόφυτα και οι μάρτυρες εμφάνισαν μειωμένη και μεταξύ τους παρόμοια ικανότητα έκπτυξης ριζών. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου, τόσο κατά την 13<sup>η</sup> όσο και κατά την 15<sup>η</sup> ημέρα, οι διαφορές μεταξύ των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000 και R1000-*hrpZ<sub>P<sub>spH</sub></sub>* αμβλύνηκαν, εμφανίζοντας παρόμοιο αριθμό πλευρικών ριζιδίων. Αντίθετα, τα φυτά αγρίου τύπου χαρακτηρίζονταν από σημαντικά μειωμένο αριθμό ριζικών διακλαδώσεων (Πίνακας 9).

Αξίζει να σημειωθεί πως ο αριθμός των πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων στα έκφυτα του μάρτυρα γνώρισε μικρή αύξηση και παρέμενε σε χαμηλά επίπεδα, ενώ τα έκφυτα που είχαν εμβολιαστεί με το στέλεχος R1000 είχαν εμφανώς μεγαλύτερο αριθμό πλευρικών διακλαδώσεων από την αρχή και αυτός εξελίχθηκε σε σχεδόν τον διπλάσιο από αυτόν του μάρτυρα. Τα έκφυτα που είχαν εμβολιαστεί με το στέλεχος R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* αρχικά χαρακτηρίστηκαν από μικρό αριθμό πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων, παρόμοιο με αυτόν του μάρτυρα, ωστόσο κατά την 15<sup>η</sup> ημέρα σημειώθηκε σημαντική αύξηση.

**Πίνακας 9:** Αριθμός πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων στα σπορόφυτα αγρίου τύπου και σε αυτά που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000 και R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*.

Στελέχη <i>A. rhizogenes</i>	Αριθμός πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων ανά εμβολιασμένο έκφυτο
<b>10<sup>η</sup> ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό</b>	
C	2.4 b
R1000	3.9 a
R1000- <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	2.4 b
<b>Σημαντικότητα</b>	<b>***</b>
<b>13<sup>η</sup> ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό</b>	
C	2.7 b
R1000	4.6 a
R1000- <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	3.5 ab
<b>Σημαντικότητα</b>	<b>***</b>
<b>15<sup>η</sup> ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό</b>	
C	2.8 b
R1000	5.8 a
R1000- <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	5.3 a
<b>Σημαντικότητα</b>	<b>***</b>

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

### 3.4 Μήκος πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων

Αναφορικά με το μήκος των πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων, αρχικά δε σημειώθηκαν διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των σποροφύτων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000, ωστόσο αυτά διέφεραν σημαντικά με τα R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σπορόφυτα που εμφάνισαν σαφώς μειωμένο μήκος. Με την πάροδο του χρόνου, παρατηρήθηκε αύξηση του μήκους των ριζών στα R1000- και στα R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σπορόφυτα, ενώ αντίθετα δε σημειώθηκε μεταβολή στο μήκος των ριζών που αναπτύχθηκαν στους μάρτυρες. Παρά το γεγονός ότι αρχικά τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το R1000 είχαν μεγαλύτερο μήκος πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων, συγκριτικά με R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σπορόφυτα, με την πάροδο του χρόνου οι δύο κατηγορίες έφεραν παρόμοιου μήκους πλευρικές ριζικές διακλαδώσεις.

**Πίνακας 10:** Μήκος πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων στα σπορόφυτα αγρίου τύπου και σε αυτά που εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια R1000 και R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*.

Στελέχη <i>A. rhizogenes</i>	Μήκος πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων ανά εμβολιασμένο έκφυτο
<b>10<sup>η</sup> ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό</b>	
C	1.3 a
R1000	1.1 a
R1000- <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	0.4 b
<b>Σημαντικότητα</b>	***
<b>13<sup>η</sup> ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό</b>	
C	1.2 b
R1000	2 a
R1000- <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	2 a
<b>Σημαντικότητα</b>	***
<b>15<sup>η</sup> ημέρα από το γενετικό μετασχηματισμό</b>	
C	1.2 b
R1000	2.6 a
R1000- <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	2.6 a
<b>Σημαντικότητα</b>	***

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

### 3.5 Συχνότητα μετασχηματισμού

Σε σχέση με τη συχνότητα μετασχηματισμού, και τα δύο βακτηριακά στελέχη, R1000 και R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, αναδείχθηκαν ικανά για σχηματισμό διαγονιδιακών ριζών, εντούτοις σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η συχνότητα μετασχηματισμού κυμάνθηκε στο 83,3 % για το στέλεχος R1000, ενώ το R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> οδήγησε σε σχετικά μειωμένη συχνότητα εμβολιασμού (65,6 %) (Πίνακας 11). Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού αλλά και την ανάπτυξη των πλευρικών ριζών των R1000-hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> σημαντικό ρόλο παίζει η παρουσία υγρομυκίνης, η οποία επιδρά σημαντικά στο δυναμικό ανάπτυξης και επαγωγής διαγονιδιακών ριζών. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την καταλληλότητα του στελέχους R1000 ως μέσο μετασχηματισμού και επαγωγής διαγονιδιακών ριζών στην τομάτα.

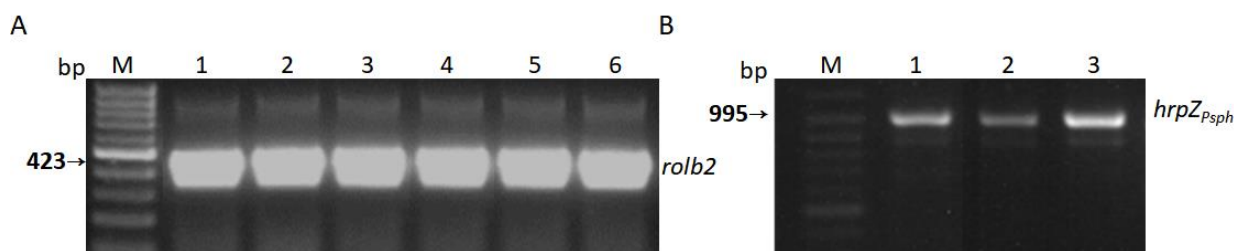
**Πίνακας 11:** Επίδραση του γενετικού μετασχηματισμού με τα βακτήρια R1000 και R1000-hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> του *A. rhizogenes* αναφορικά με τη συχνότητα μετασχηματισμού.

Ημέρα	Στέλεχος <i>A. rhizogenes</i>	Αριθμός εμβολιασμένων εκφύτων	Συχνότητα μετασχηματισμού (%)
20 <sup>n</sup>	R1000	60	83,3 a
	R1000-HrpZ <sub>P<sub>sph</sub></sub>	60	65,6 a

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

### 3.6 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων

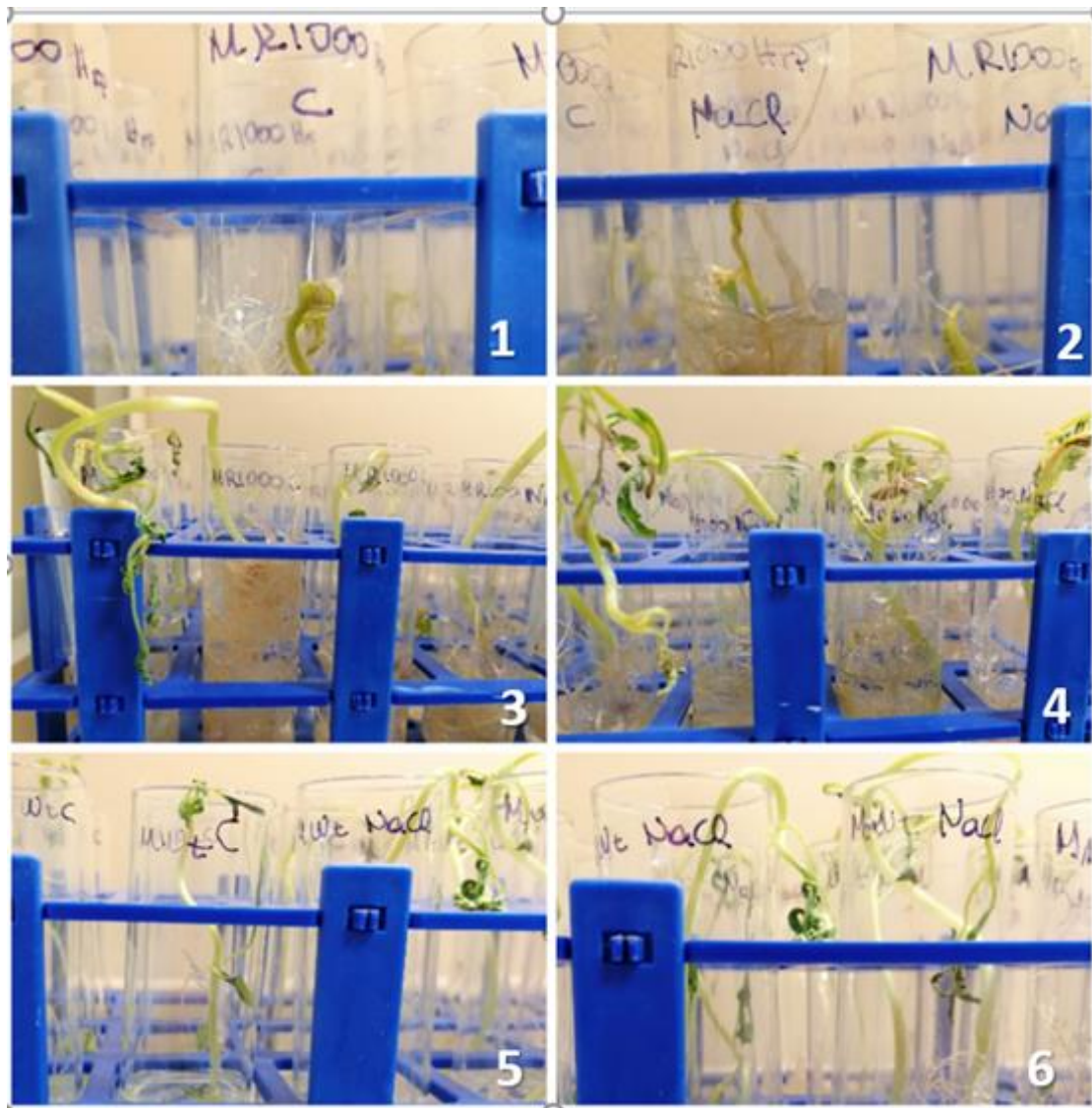
Με στόχο τον έλεγχο της ενσωμάτωσης του T-DNA του *A. rhizogenes* στις εκπτυχθείσες ρίζες των εμβολιασμένων σποροφύτων, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* και του γονιδίου *hrpZ*. Η επιτυχής ένθεση του γονιδίου *rolB2* (423 bp) επιβεβαιώθηκε στο σύνολο των ριζών που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη R1000 και R1000-hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, ενώ η ενσωμάτωση του *hprZ* (995 bp) επιβεβαιώθηκε σε όλες τις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000-hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> (Εικόνα 21). Στο σύνολό τους, τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν τη διαγονιδιακή φύση των ριζών που αναπτύχθηκαν.



**Εικόνα 21:** PCR προϊόντα για τον έλεγχο της ένθεσης των διαγονιδίων *rolB2* (423 bp) και *hrpZ* (995 bp). A, 1, 2: ρίζες που προέρχονται από σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000, 3, 4: ρίζες που προέρχονται από σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*, 5, 6: βακτηριακά κύτταρα των R1000 και R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*. B, 1, 2, 3: μετασηματισμένες ρίζες με το βακτήριο R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*. DNA Ladder: FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH.

### 3.7 Αξιολόγηση των διαγονιδιακών ριζών υπό συνθήκες καταπόνησης

Σε συνέχεια του επιτυχούς γενετικού μετασηματισμού, ερευνητικό στόχο αποτέλεσε η πρακτική αξιοποίηση των διαγονιδιακών ριζών για τη μελέτη της απόκρισής τους σε συνθήκες καταπόνησης, συγκριτικά με φυτά μάρτυρες. Για το σκοπό αυτό, τόσο τα R1000- και R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σπορόφυτα όσο και οι μάρτυρες υποβλήθηκαν σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας μέσω της προσθήκης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξής τους 150 mM NaCl, που έχει αναδειχθεί ως μία κρίσιμη συγκέντρωση σε ένα εύρος φυτικών ειδών. Η αξιολόγηση της απόκρισης των φυτών στην αλατότητα έγινε βάσει μακροσκοπικής αξιολόγησης των συμπτωμάτων καταπόνησης, για διάστημα 15 ημερών, καθώς και στον ποσοτικό προσδιορισμό της προλίνης στους ιστούς της ρίζας. Αναφορικά με την ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης, το σύνολο των φυτών εμφάνισε χλώρωση στα φύλλα και μαρασμό, που με την πάροδο του χρόνου εντάθηκε, και σε ορισμένες περιπτώσεις μεταχρωματισμό των ριζών. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ένταση και το χρόνο εκδήλωσης των συμπτωμάτων καταπόνησης. Στο πλαίσιο αυτό, οι μάρτυρες χαρακτηρίζονταν από περισσότερο εκτεταμένη χλώρωση και ταχύτερη εκδήλωση συμπτωμάτων μαρασμού, ενώ τα R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-σπορόφυτα εμφάνισαν σαφώς ηπιότερα συμπτώματα χλώρωσης και μαρασμού.



**Εικόνα 22:** Υποβολή των R1000-, R1000-*hrpZ<sub>PspH</sub>*-και αγρίου τύπου σποροφύτων σε καταπόνηση υψηλής αλατότητας (150 mM NaCl). (1) R1000-*hrpZ<sub>PspH</sub>*-σπορόφυτα, απουσία καταπόνησης, (2) R1000-*hrpZ<sub>PspH</sub>*-σπορόφυτα υπό συνθήκες καταπόνησης NaCl, (3) R1000-σπορόφυτα, απουσία καταπόνησης, (4) R1000-σπορόφυτα υπό συνθήκες καταπόνησης NaCl, (5) Σπορόφυτα αγρίου τύπου, απουσία καταπόνησης και (6) Σπορόφυτα αγρίου τύπου υπό συνθήκες καταπόνησης NaCl.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα σχετικά με την ποσότητα προλίνης στους ιστούς της ρίζας, τα αγρίου τύπου σπορόφυτα είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη απουσία καταπόνησης, ενώ αυτά που υποβλήθηκαν σε στρες της αλατότητας είχαν εμφανώς χαμηλότερη περιεκτικότητα (Πίνακας 12). Στα σπορόφυτα που είχαν εμβολιαστεί με το στέλεχος R1000 και δεν είχαν υποβληθεί σε καταπόνηση η περιεκτικότητα της προλίνης ήταν αρκετά χαμηλή, ενώ στα καταπονημένα σπορόφυτα σημειώθηκε μία πολύ μικρή αύξηση.



Τέλος, τα σπορόφυτα R1000-*hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>* εμφάνισαν χαμηλή περιεκτικότητα σε προλίνη τόσο απουσία όσο και παρουσία καταπόνησης.

**Πίνακας 12:** Προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ριζών σε προλίνη (mg/100g νωπού βάρους) ανά τύπο σποροφύτου και μεταχείριση.

Τύπος ριζών	C	NaCl
Μάρτυρας	1,8a	0.4a
R1000	0.1c	0.2c
R1000- <i>hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub></i>	0.4b	0.3b

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

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Η έρευνα και οι πρακτικές εφαρμογές που άπτονται της Βελτίωσης των Φυτών απαιτούν την εστίαση σε συστήματα και μεθόδους αξιοποίησης της τεράστιας γενετικής πληροφορίας που απαντάται στους φυτικούς οργανισμούς. Προς την κατεύθυνση αυτή, ιδιαίτερα σημαντική είναι η συνεισφορά των σύγχρονων μεθόδων που συμβάλλουν είτε στην εις βάθος κατανόηση της γονιδιακής λειτουργίας είτε στη δημιουργία νέας γενετικής παραλλακτικότητας μέσω στοχευμένων μεταλλάξεων ή/και άλλων προσεγγίσεων, συμπεριλαμβανομένων αυτών της γενετικής μηχανικής. Οι διαγονιδιακές προσεγγίσεις προσφέρουν δυνατότητες ουσιαστικής διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής, μέσω της αξιοποίησης γονιδίων από ποικίλες πηγές και ανεξαρτήτως ταξινομικών εμποδίων (Kumar et al., 2015). Παρά την ευρεία εφαρμογή τους σε ένα μεγάλο εύρος καλλιεργούμενων ειδών, οι προοπτικές που προσφέρονται από τις τεχνολογίες αυτές συχνά περιορίζονται από τις πρακτικές δυσκολίες που τις συνοδεύουν. Στο επίπεδο αυτό, ανασταλτικά λειτουργεί η δυστροπία που χαρακτηρίζει αρκετά καλλιεργούμενα είδη ως προς το μετασχηματισμό και την αναγέννηση ιστών και κυττάρων, η ανάγκη ανάπτυξης και βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων μετασχηματισμού, η σημαντική γονοτυπική εξάρτηση σε επίπεδο είδους αλλά και γονοτύπου εντός του ίδιου είδους αλλά και το γεγονός ότι η εφαρμογή τους συχνά απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό ή/και εκπαιδευμένο προσωπικό (Taylor and Fauquet, 2002). Ενόψει των δυσκολιών και περιορισμών που εγείρουν οι κλασικές διαδικασίες σταθερού μετασχηματισμού, η εναλλακτική αξιοποίηση του εδαφικού βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*, ως φορέα για την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών αποτελεί μία ελκυστική, σύντομη και αποτελεσματική προσέγγιση (Collier et al., 2005).

Το *Agrobacterium rhizogenes* και το συγγενικό του είδος *Agrobacterium tumefaciens* είναι φυσικά παθογόνα των φυτών που έχουν την ιδιότητα να μεταφέρουν T-DNA στο γονιδιωματικό DNA φυτικών οργανισμών. Η φύση της μόλυνσης που προκαλούν διαφέρει καθώς το *A. tumefaciens* προκαλεί την ασθένεια του κορωνοτού κάλλου, που οδηγεί σε ταχεία ανάπτυξη των φυτικών κυττάρων και σχηματισμό όγκων, ενώ το *A. rhizogenes* επάγει την ασθένεια της ριζομανίας, όπου εμφανίζονται νεοπλασματικές πλαγιοτροπικά μετασχηματισμένες ρίζες που χαρακτηρίζονται ως «τριχωτές» (Chilton et al., 1982). Οι δύο ασθένειες έχουν χαρακτηριστεί ως μια μορφή «γενετικού αποικισμού» (Schell et al. 1979), καθώς πραγματοποιείται μεταφορά και έκφραση των βακτηριακής προέλευσης γονιδίων στα φυτικά κύτταρα, επάγοντας κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ανεξέλεγκτο ρυθμό και σύνθεση θρεπτικών ενώσεων που είναι αξιοποιήσιμες από τα μολυσματικά βακτήρια (Escobar &

Dandekar, 2003). Αναφορικά με το *A. rhizogenes*, οι μετασχηματισμένες ρίζες αναπτύσσονται από φυτικά κύτταρα που έχουν μολυνθεί και τους έχει ενσωματωθεί το T-DNA που εδρεύει στο πλασμίδιο Ri (Chilton et al., 1982).

Ο γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση του *Agrobacterium* αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδο για την ευχερή παραγωγή διαγονιδιακών φυτών (Das et al., 2012). Ιδιαίτερα με τη χρήση του *A. rhizogenes*, είναι εφικτή η ταχεία παραγωγή μετασχηματισμένων ριζών, προσφέροντας δυνατότητες μεγάλης παραγωγής βιομάζας, αξιοποιήσιμης σε μελέτες γονιδιακής λειτουργίας ή/και σε πρακτικές εφαρμογές, όπως η παραγωγή και απομόνωση ουσιών ενδιαφέροντος με εφαρμογές για τη φαρμακευτική ή/και τη βιομηχανία. Σε ανάλογο πλαίσιο, εφαρμόζεται η παραγωγή βιομάζας σε βιοαντιδραστήρες που προσφέρει τη δυνατότητα σταθερής παραγωγής αιθέριων ελαίων, με σημαντικό αντίκτυπο στον κλάδο των καλλυντικών και της φαρμακευτικής. Ένα από τα πλεονεκτήματα της παραγωγής μετασχηματισμένων ριζών στον προαναφερθέντα κλάδο είναι ότι αμβλύνονται τα προβλήματα που σχετίζονταν με την εξάρτηση της παραγωγής των πρώτων υλών από το φυσικό περιβάλλον, ενώ παράλληλα διασφαλίζεται και η παραγωγή καθαρών πρώτων υλών, οδηγώντας σε μια λιγότερο δαπανηρή και επίπονη διαδικασία παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων (Sujatha et al., 2012). Πέραν των εφαρμογών στη φαρμακευτική, η παραγωγή μετασχηματισμένων ριζών βρίσκει εφαρμογές στην έρευνα που αφορά σε ανάλυση γονιδίων, παραγωγή σταθερά μετασχηματισμένων διαγονιδιακών φυτών, παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, μελέτη της αλληλεπίδρασης φυτών-παθογόνων κ.α. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι οι αρχικοί περιορισμοί στην τεχνολογία παραγωγής των μετασχηματισμένων «τριχωτών» ριζών, λόγω ανωμαλιών που σχετίζονταν με την ανάπτυξη και αναγέννηση ιστών, αμβλύθηκαν καθώς αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα που επιτρέπουν την ανάπτυξη «σύνθετων φυτών» *in vitro*, που αποτελούνται από υπέργειο μέρος αγρίου τύπου (βλαστό) και μετασχηματισμένο υπόγειο μέρος (διαγονιδιακές ρίζες) (Hansen et al., 1989-Collier et al., 2005).

Η συγκεκριμένη μελέτη εξέτασε την αποτελεσματικότητα δύο βακτηριακών στελεχών του *Agrobacterium rhizogenes*, τα R1000 και R1000-hrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, ως προς την ικανότητα επαγωγής διαγονιδιακών ριζών στην τομάτα, και ειδικότερα στην ποικιλία-υβρίδιο Mito. Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης, προκύπτει πως καταλληλότερο για τον γενετικό μετασχηματισμό της συγκεκριμένης ποικιλίας τομάτας είναι το στέλεχος R1000, λαμβάνοντας υπόψη τη συχνότητα μετασχηματισμού αλλά και τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των διαγονιδιακών ριζών. Αξίζει να σημειωθεί πως και τα δύο βακτηριακά στελέχη οδήγησαν σε

επιτυχή γενετικό μετασχηματισμό και παραγωγή διαγονιδιακών ριζών, εμφανίζοντας ωστόσο διαφορές αναφορικά με τη συχνότητα μετασχηματισμού, το μήκος αλλά και τον αριθμό πλευρικών ριζικών διακλαδώσεων ανά εμβολιασμένο έκφυτο.

Η συχνότητα μετασχηματισμού για το R1000 στέλεχος κυμάνθηκε στο 83,3 %, το οποίο θεωρείται ως ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό μετασχηματισμού, ενώ το στέλεχος R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> οδήγησε σε σχετικά μειωμένο ποσοστό μετασχηματισμού (65,3 %). Βάσει των ανωτέρω ευρημάτων, προκύπτει ότι -παρά τις παρατηρηθείσες διαφορές- και τα δύο στελέχη αναδεικνύονται ως αποτελεσματικά για το γενετικό μετασχηματισμό της τομάτας, μέσω του *A. rhizogenes*, με στόχο τη δημιουργία σύνθετων σποροφύτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι προηγούμενα αποτελέσματα πειραμάτων γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας, με τη χρήση του *A. rhizogenes*, υπογραμμίζουν περαιτέρω την καταλληλότητα των εν λόγω βακτηριακών στελεχών σε διαφορετικές ποικιλίες τομάτας. Ειδικότερα, στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης φυτών διεξήχθησαν πειράματα γενετικού μετασχηματισμού των ποικιλιών “Tropical Queen” και “Gigante” με τη χρήση των βακτηριακών στελεχών R1000 και R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>. Βάσει των συνολικών αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι τα εν λόγω στελέχη οδηγούν σε υψηλό ποσοστό μετασχηματισμού στο σύνολο των ποικιλιών που εξετάστηκαν: i) “MITO”, R1000: 83,3 % και R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>: 65,3 % ii) “Gigante”, R1000: 73,8 % και R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>: 59,5 % (Κοντοβά, 2020) και iii) “Tropical Queen”, R1000: 81,9 % και R1000-HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>: 73,6 % (Παπίτση, 2022). Παρά τις παρατηρηθείσες διαφορές, που προφανώς οφείλονται στην ύπαρξη γονοτυπικής εξάρτησης σε επίπεδο ποικιλίας, τα συνολικά ευρήματα παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την επιδεκτικότητα του είδους της τομάτας στο μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος R1000. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με προηγούμενες αναφορές σχετικά με την ικανότητα μετασχηματισμού ενός εύρους φυτικών ειδών, εν αντιθέσει με άλλα βακτηριακά στελέχη, όπως τα *K599* και *Arqua*, τα οποία χαρακτηρίζονται ως χαμηλής μολυσματικότητας (Collier *et al.*, 2005) και, συνεπώς, επιτυγχάνουν χαμηλές συχνότητες μετασχηματισμού είναι αρκετά μειωμένες (Foti & Pavli, 2020).

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν επιπλέον ενδείξεις ότι η χρήση ακετοσυριγκόνης, σε συνδυασμό με την χρήση του MES, επιδρούν θετικά στην επιτυχία του μετασχηματισμού, συμβάλλοντας στη δημιουργία σύνθετων σποροφύτων (Foti & Pavli, 2020). Η ακετοσυριγκόνη είναι μια φαινολική ουσία, η οποία δρα ως διεγέρτης κατά την ενσωμάτωση της T-DNA περιοχής του πλασμιδίου Ri, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στη μείωση του χρόνου που απαιτεί η έκπτυξη διαγονιδιακών ριζών. Το MES δρα θετικά στην δημιουργία ιδανικών

συνθηκών για τον μετασχηματισμό με διαμέσου του *Agrobacterium* καθώς εξισορροπεί το pH του θρεπτικού μέσου, το οποίο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο, ιδιαίτερα κατά τη φάση της συγκαλλιέργειας (Zhou et al., 2011; Kumar et al., 2006 ; Ogaki et al., 2008; Foti & Pavli, 2020).

Στο πλαίσιο της πρακτικής αξιοποίησης των αποτελεσμάτων του πειράματος, τόσο τα μετασχηματισμένα όσο και τα αγρίου τύπου σπορόφυτα υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας, η οποία επετεύχθη με τη χρήση NaCl (150 mM). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη διαφορετική απόκριση των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών, υπογραμμίζοντας την καταλληλότητα των διαγονιδιακών ριζών ως πλατφόρμας για τη μελέτη της έκφρασης διαγονιδίων. Η διαθεσιμότητα αποτελεσματικών και σύντομων πρωτοκόλλων για την ανάπτυξη διαγονιδιακών ιστών θα επιτρέψει την ευχερή διεξαγωγή μελετών που σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις φυτών - παθογόνων μικροοργανισμών ή/και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης, αξιοποιώντας κατάλληλες μεθόδους και δείκτες για την αξιολόγηση των υπό μελέτη φυτών.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα της μελέτης εξάρουν την καταλληλότητα χρήσης του *Agrobacterium rhizogenes* για την πραγματοποίηση γενετικού μετασχηματισμού στην τομάτα και με στόχο τη δημιουργία σύνθετων σποροφύτων, αποτελούμενων από διαγονιδιακό ριζικό σύστημα και αγρίου τύπου υπέργειο μέρος. Επιπλέον, παρέχονται ισχυρές ενδείξεις σχετικά με την καταλληλότητα του βακτηριακού στελέχους R1000 για το γενετικό μετασχηματισμό της τομάτας, με την παράλληλη συμβολή της ακετοσυριγκόνης και του MES στην επίτευξη ικανοποιητικής συχνότητας μετασχηματισμού. Τέλος, υπογραμμίζεται η επιδεκτικότητα της ποικιλίας ΜΙΤΟ, η οποία επέτρεψε την επίτευξη ανάλογων ή ακόμη και υψηλότερων συχνοτήτων μετασχηματισμού συγκριτικά με άλλες ποικιλίες τομάτας. Η επιτυχής διεξαγωγή του μετασχηματισμού και ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στην τομάτα θέτει τη βάση για τη διεξαγωγή μελετών σχετικών με την βιολογία της ρίζας, προσφέροντας παράλληλα τη δυνατότητα επίσπευσης των διαδικασιών μελέτης της γονιδιακής έκφρασης σε σύντομο χρόνο.

## Βιβλιογραφία

1. Acquaaah, G. (2019). *Principles of plant Genetics and Breeding*. (Β. Π. Π. Μπεμπέλη, Επιμ., & Α. Κ.-Ο. Κων/νος Δελής, Μεταφρ.) Utopia.
2. Agarwa, S., & Rao, A. (2000, Sep 19). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, σσ. 140-143.
3. Agarwal, A., Shen, H., & Rao, A. (2001, Jan 01). Lycopene Content of Tomato Products: Its Stability, Bioavailability and In Vivo Antioxidant Properties. *Journal of Medicinal Food*,. doi: 10.1089/10966200152053668
4. Al Dairi, M., Al-Mahdouri, A., & Pathare, P. (2021, January). Effect of storage conditions onpostharvest quality of tomatoes: a case study at market-level. *Journal of Agricultural and Marine Sciences 2021*, σσ. 13–20. doi::10.24200/jams.vol26iss1pp13-20
5. Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Neal Stewart, C. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*, 28(7), 1510–1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
6. Al-Wandawi, H., Abdul-Rahman, M., & Al-Shaikhly, K. (1985). Tomato processing wastes as essential raw materials source. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* .
7. Anjanappa, R. B., & Gruissem, W. (2021a). Current progress and challenges in crop genetic transformation. *Journal of Plant Physiology*, 261, 153411. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2021.153411>
8. Anjanappa, R. B., & Gruissem, W. (2021b). Current progress and challenges in crop genetic transformation. *Journal of Plant Physiology*, 261, 153411. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2021.153411>
9. Arshad, W., Haq, I., Tahir Waheed, M., Mysore, K., & Mirza, B. (2014). Agrobacterium-mediated transformation of tomato with rolB gene results in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens. *PLoS ONE*.
10. 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. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.06.004>

11. Bai Y, Lindhout P. New Challenges for Durable Resistance Breeding in Tomato. Proceedings of the XVth meeting of the Eucarpia Tomato Working Group; 20–23 September, 2005; Bari, Italy. 2005.
12. Bell, C., Soltis, D., & Soltis, P. (2010, August 01). The age and diversification of the angiosperms re-visited. *American Journal of Botany*. doi: <https://doi.org/10.3732/ajb.0900346>
13. Bendich, A. J. (1987, June). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *BioEssays*, σσ. 279-282. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1002/bies.950060608>
14. Bensaddek, L., Villarreal, M., & Fliniaux, M. (2008). Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electron J Integr Biosci*, σσ. 2–9.
15. Brencic, A., Angert, E., & Winans, S. (2005). Unwounded plants elicit *Agrobacterium vir* gene induction and T-DNA transfer: transformed plant cells produce opines yet are tumour free. *Mol. Microbiol.*, σσ. 1522–1531.
16. Bulgakov, V. (2008). Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.* 26, σσ. 318–324. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.001>
17. Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Redondo, D. F., Sánchez-Mata, Mc. C., & Torrecilla, J. S. (2012). Radial basis network analysis to estimate lycopene degradation kinetics in tomato-based products. *Food Research International*, 49(1), 453–458. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.07.030>
18. Carmi, N., Salts, Y., Dedicova, B., Shabtai, S., & Barg, R. (2003). Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the rolB gene in the ovary. *Planta* 217, σσ. 726–735. doi:<https://doi.org/10.1007/s00425-003-1052-1>
19. Charles Godfray , H., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., .Toulmin, C. (2010, Jan 28). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. doi:10.1126/science.1185383
20. Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977, Jul 11). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tum-origenesis. *Cell*, σσ. 263–271. doi:[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043)



21. Chilton, M.-D., Tepfer, D., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F., & Tempé, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*. doi:<https://doi.org/10.1038/295432a0>
22. Clough, S., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>.
23. Coe Jr., E. H., & Sarkar, K. R. (1966, September 1). Preparation of Nucleic Acids and a Genetic Transformation Attempt in Maize. *Crop Sciences*, σσ. 432-435.
24. Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Lutke, W., & Taylor, C. G. (2005, May 10). Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *The Plant Journal*, σσ. 449–457. doi:[10.1111/j.1365-313X.2005.02454.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02454.x)
25. Das, S.K., Shethi, K.J., Hoque, M.I. and Sarker, R.H. (2012). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of lentil (*Lens culinaris* Medik.) with chitinase gene followed by *in vitro* flower and pod formation. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29, 99-109
26. Dehio, C., Grossmann, K., Schell, J., & Schmülling, T. (1993). Phenotype and hormonal status of trans-genic tobacco plants overexpressing the rolA gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol Biol* 23, σσ. 1199–1210.
27. de Saeger, J., Park, J., Chung, H. S., Hernalsteens, J. P., van Lijsebettens, M., Inzé, D. Depuydt, S. (2021, December 1). *Agrobacterium* strains and strain improvement: Present and outlook. *Biotechnology Advances*, Vol. 53. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107677>
28. Devi, R., Kaur, A., Ruma, D., Dhaliwal, M. S., & Gosal, S. S. (2009). Transformation of tomato using biolistic gun for transient expression of the β-glucuronidase gene Molecular tagging of gene controlling resistance to leaf curl virus infection in chilli pepper View project Resistance Breeding View project Transformation of tomato using biolistic gun for transient expression of the β-glucuronidase gene. In *Article in Indian Journal of Biotechnology* (Vol. 8). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/261097415>
29. Dorais, M., Ehret, D. L., & Papadopoulos, A. P. (2008, July). Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: From the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, Vol. 7, pp. 231–250. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9085-x>

30. English, C., & Schreiber, K. (2020, April 28). *Where are GMO crops grown? GLP infographics document the global growth of agricultural biotechnology innovation*. Ανάκτηση από <https://geneticliteracyproject.org/2020/04/28/where-are-gmo-crops-grown-glp-infographics-document-the-global-growth-of-agricultural-biotechnology-innovation>
31. Elbadrawy, E., & Sello, A. (2016). Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1010–S1018. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2011.11.011>
32. El-Saadony, M. T., Abuljadayel, D. A., Shafi, M. E., Albaqami, N. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., ... Saad, A. M. (2021). Control of foliar phytoparasitic nematodes through sustainable natural materials: Current progress and challenges. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7314–7326. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.08.035>
33. Erba, D., Casiraghi, M. C., Ribas-Agustí, A., Cáceres, R., Marfà, O., & Castellari, M. (2013). Nutritional value of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) grown in greenhouse by different agronomic techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), 245–251. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2013.05.014>
34. FAO. (2019). “FAOSTAT database” Food and Agriculture Organization of the United Nations.
35. FAO. (2019). Tomato, Land and Water- Food and Agriculture Organization. Ανάκτηση από <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/tomato/en/>
36. FAO. (2021, 09 15). “FAOSTAT database” Food and Agriculture Organization of the United Nations.
37. Foti, C., & Pavli, O. (2020, August 10). High-Efficiency Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transgenic Hairy Root Induction of *Lens culinaris*. *Agronomy (Legume Breeding and Genetic Improvement for Adaptation of Climate Change)*. doi:10.3390/agronomy10081170
38. Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004, May). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, σσ. 228-265.
39. Fraser, P. D., Enfissi, E. M. A., & Bramley, P. M. (2009). Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and

- synthetic biology approaches. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 196–204. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2008.10.009>
40. Frodin, D. G. (2004, August). History and Concepts of Big Plant Genera. *Taxon*.
  41. Frusciante, L., Carli, P., Ercolano, M. R., Pernice, R., di Matteo, A., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2007). Antioxidant nutritional quality of tomato. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(5), 609–617. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600158>
  42. Gartland, J. (1995). *Agrobacterium virulence*. Στο *Methods in molecular biology 44 Agrobacterium protocols*. New Jersey: Humana Press.
  43. Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., . . . Génard, M. (2008, Feb 1). How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, σσ. 1241-50. doi:10.1021/jf072196t
  44. Gelvin, S. (2003, March). *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool*. *Microbiol Mol Biol Rev*.
  45. Giri , A., & Narasu, M. (2000). Research review paper transgenic hairy roots: recent trends and applica-tions. *Biotechnol Adv*, σσ. 1-22.
  46. Gonzalez-Mula, A., Lachat, J., Mathias, L., Naquin, D., Lamouche, F., Mergaert, P., & Faure, D. (2019). The biotroph *Agrobacterium tumefaciens* thrives in tumors by exploiting a wide spectrum of plant host metabolites. *New Phytol.*, σσ. 455–467.
  47. Griffith, F. (1928, Jan 27). The Significance of Pneumococcal Types. doi:10.1017/s0022172400031879
  48. Griffiths, A., AWessler, S., Lewontin, R., Gelbart, W., Suzuki , D., & Miller, J. (2004). *Introduction to genetic analysis* (8 εκδ.). New York.
  49. Halluin, K. D., Bonne, E., Bossut, M., De Beuckeleer, M., & Leemans, J. (1992, Dec). Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell*.
  50. Hansen , G., Das , A., & Chilton, M. (1994a). Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc Nat Acad Sci*, σσ. 7603–7607.
  51. Hansen, J., Jorgensen, J.E., Stougaard, J. and Marcker, K.A.(1989)Hairy roots – a short cut to transgenic root nodules.*Plant Cell Rep*.8, 12–15

52. Herrera-Estrella, L., Simpson, J., & Mart, M. (2005). Transgenic plants: an historical perspective. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. doi:10.1385/1-59259-827-7:003.
53. Huffman, G., White, F., Gordon, M., & Nester, E. (1984). Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. *J. Bacteriol.*, σσ. 269–276.
54. Industry., G. G. (2020). *Global Industry Analysts*. Ανάκτηση από [https://www.reportlinker.com/p05960955/Global-GMO-Crops-and-Seeds-Industry.html?utm\\_source=GNW](https://www.reportlinker.com/p05960955/Global-GMO-Crops-and-Seeds-Industry.html?utm_source=GNW).
55. Knapp, S., & Peralta, I. E. (2016). *The Tomato (Solanum lycopersicum L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives*. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2)
56. Klein, T. M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M., & Sanford, J. C. (1988, June). Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *PNAS*. doi: 10.1073/pnas.85.12.4305
57. Kodahl, N., Müller, R., & Lütke, H. (2016). The *Agrobacterium rhizogenes* oncogenes rolB and ORF13 increase formation of generative shoots and induce dwarfism in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Sci*. 252, σσ. 22–29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016>
58. Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A. K., Singh, A., Jha, A. K., Rakshit, S. (2020, April 1). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, Vol. 251. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>
59. Kumar, S., Rajendran, K., Kumar, J., Hamwieh, A., & Baum, M. (2015, February 23). Current knowledge in lentil genomics and its application for crop improvement. *Front. Plant Sci*. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00078>
60. Kumar, V., Sharma, A., Prasad, B., Gururaj, H.B. and Gokare, R. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4).
61. Leach, F., & Aoyagi, K. (1991). Promoter analysis of the highly expressed rolC and rolD root-inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated. *Plant Sci* 79, σσ. 69–76.
62. Malpighi, M. (1679). *Anatome Plantarum Pars Altera*. London: Johannis Martyn.

63. Mascio , P., Sies, H., & Kaiser, S. ( 1989, Nov 1). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. doi:10.1016/0003-9861(89)90467-0
64. Mauro, M. L., & Bettini, P. P. (2021a, August 1). Agrobacterium rhizogenes rolB oncogene: An intriguing player for many roles. *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 165, pp. 10–18. Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.037>
65. Mauro, M., Trovato, M., Paolis, A., Gallelli, A., Costantino, P., & Altamura, M. (1996). The plant onco-gene rolD stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Dev Biol* 180, σσ. 693–700.
66. Miller, P. (1731). *The Gardener's dictionary* (1st edn εκδ.). London: Published for the author.
67. Miller, P. (1807). *The gardener's and botanist's dictionary*, posthumous edition. Στο T. Martyn. London.
68. Moore, L., Warren, G., & Strobel, G. (1979). Involvement of a plasmid in the hairy rootdisease of plants caused by Agrobacterium rhizogenes. *Plasmid*, σσ. 617–626.
69. Naika, Shankara., Agromisa (Organization), & Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (Ede, N. (2005). *Cultivation of tomato : production, processing and marketing*. Agromisa Foundation and CTA.
70. Nilsson, O., & Olsson, O. (1997). Getting to the root: the role of the Agrobacterium rhizogenes rol genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plant*, σσ. 463–473.
71. Nonaka, S., Someya, T., Kadota, Y., Nakamura, K., & Ezura, H. (2019). Super-Agrobacterium ver. 4: Improving the Transformation Frequencies and Genetic Engineering Possibilities for Crop Plants. *Front Plant Sci*.
72. Nur Kabir, M., Rasool, K., Lee, W.-H., Cho , S.-I., & Chung, S.-O. (2020, June 18). Influence of delayed cooling on the quality of tomatoes (Solanum lycopersicum L.) stored in a controlled chamber. *AIMS Agriculture and Food*, σ. 272. doi:10.3934/agrfood.2020.2.272
73. Ogaki, M., Furuichi, Y., Kuroda, K., Chin, D.P., Ogawa, Y. and Mi, M. (2008). Importance of co-cultivation medium pH for successful Agrobacterium-mediated transformation of Lilium x formolongi. *Plant Cell Reports*, 27, 699-705

74. Ozyigit, I. (2012). *Agrobacterium tumefaciens* and its use in plant biotechnology. Στο *Crop production for agricultural improvement* (σσ. 317–361). The Netherlands: Springer.
75. Ozyigit, I. I., Dogan, I., & Artam Tarhan, E. (2013a). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and its biotechnological applications in crops. In *Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques* (pp. 1–48). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1_1)
76. Ozyigit, I. I., Dogan, I., & Artam Tarhan, E. (2013b). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and its biotechnological applications in crops. In *Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques* (pp. 1–48). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1_1)
77. Palazon, J., Cusido, R., Roig, C., & Pinol, M. (1998). Expression of the *rol* gene and nicotine production in transgenic hairy roots and their regenerated plants. . *Plant Cell Rep 17*, σσ. 384–90.
78. Pavli, O. I., Kelaidi, G. I., Tampakaki, A. P., & Skaracis, G. N. (2011). The *hrpZ* Gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Enhances Resistance to Rhizomania Disease in Transgenic *Nicotiana benthamiana* and Sugar Beet. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017306>
79. Pavli, O., & Skaracis, G. (2010). Fast and efficient genetic transformation of sugar beet by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*.
80. Pavli, O., Stevanato, P., Biancardi, E., & Skaracis, G. N. (2011, March 29). Achievements and prospects in breeding for rhizomania resistance in sugar beet. *Field Crops Research*.
81. Peralta, I., Spooner, D., & Knapp, S. (2008). *Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sections, Lycopersicon, Juglandifolia, Lycopersicon, Solanaceae)*.
82. Petit, A., David, C., Dahl, G., Ellis, J., Guyon, P., Casse-Delbart, F., & Tempe, J. (1983). Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol Gen Genet*, σσ. 204–214.
83. Petro-Turza, C. M. (2009, Nov 03). Flavor of tomato and tomato products. *Food Reviews International*.
84. Pingali, P. L. (2012, April 2). Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *PNAS*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>

85. Porter, J. R., & Flores, H. (1991). Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, σσ. 387–421.
86. Rakoczy-Trojanowska, M. (2002). Alternative methods of plant transformation--a short review. *Cell Mol Biol Lett*, σσ. 849-58.
87. Rao, A., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahza, K., Husnain, T., & Riazuddin, S. (2009, November–December). The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, σσ. 753-763.
88. Register 3rd, J. C., & Beachy, R. N. (1988, October). Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology*, σσ. 524-532.
89. Riker, A. J., Banfield, W., Wright, W., Keitt, G., & Sagen, H. (1930). Studies on Infectious Hairy Root of Nursery Apple Trees. *Journal of Agricultural Research*, σσ. 507-540.
90. Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 7. (2017). Στο O. C. Documents.
91. Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012a). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308–345. <https://doi.org/10.1016/J.PLREV.2012.06.002>
92. Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012b). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308–345. <https://doi.org/10.1016/J.PLREV.2012.06.002>
93. Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D., & Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*.
94. Schell, J. et al. (1979) Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti plasmid, and the plant host. *Proc.R. Soc. London Ser B* 204, 251 – 266
95. Schmülling, T., Schell, J., & Spena, A. (1988). Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J.* 7, σσ. 2621–2629. doi:<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03114.x>.

96. Shabtai, S., Salts, Y., Kaluzky, G., & Barg, R. (2007). Improved yielding and reduced puffiness under extreme temperatures induced by fruit-specific expression of rolB in processing tomatoes. *Theor. Appl. Genet.* 114, σσ. 1203–1209.
97. Shepherd, M., Turner, J. A., Small, B., & Wheeler, D. (2018, September 8). Priorities for science to overcome hurdles thwarting the full promise of the ‘digital agriculture’ revolution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
98. Slimestad, R., & Verheul, M. (2009, May 05). Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8), σσ. 1255-1270.
99. Sorokin, A., Ke, X., Chen, D., & Elliott, M. (2000, Jul). Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant Science*, σσ. 227-233. doi:10.1016/s0168-9452(00)00260-0
100. Spano, L., Mariotti, D., Cardarelli, M., Branca, C., & Costantino, P. (1988). Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA. *Plant Physiol*, σσ. 479–483.
101. Stewart, A., Bozonnet, S., Mullen, W., Jenkins, G., Lean, M., & Crozier, A. (2000, Jul). Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. doi:10.1021/jf000070p
102. Subramoni, D., Nathoo, N., Klimov, E., & Yuan, Z.-C. (2014). Agrobacterium tumefaciens responses to plant-derived signaling molecules. *Front. Plant Sci.*, σ. 322.
103. Sujathaa, G., Zdravkovic-Korac, S., Cali, D., Flamini, G., & Ranjitha Kumari, B. (2012, September 7 ). High-efficiency Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis. *Industrial Crops and Products*, σσ. 643-652
104. Suzuki, M. (1989). SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins. *J Mol Biol*, σσ. 61–84.
105. Tampakaki AP, Panopoulos NJ. Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZPsph produced in planta. *Mol Plant Microbe Interact*. 2000;13(12):1366–1374.
106. Tang, X., Szinay, D., Lang, C., Ramanna, M., A G van der Vossen, E., Datema, E., Bai, Y. (2008, Sept 14). Cross-species bacterial artificial chromosome-fluorescence in situ



- hybridization painting of the tomato and potato chromosome 6 reveals undescribed chromosomal rearrangements.
107. Taylor, N.J. and Fauquet, C.M.(2002) Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol.* 21, 963–977
  108. The Angiosperm Phylogeny Group. (2016, January 17). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, σσ. 1–20.
  109. Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J., & Harwood, W. A. (2005, March 25). A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep.* doi:10.1007/s00299-004-0892-x.
  110. Trovato, M., Mauro, M., Costantino, P., & Altamura, M. (1997). The rolD gene from *Agrobacterium rhizogenes* is developmentally regulated in transgenic tobacco. *Protoplasma* 197.
  111. U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (2020, 10 30). FoodData Central Search Results. Ανάκτηση 10 16, 2021, από <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1103276/nutrients>
  112. USDA.. United States Department of Agriculture: United States Department of Agriculture. Ανάκτηση από <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=SOLY2>
  113. Vansuyt, G., Vilaine, F., Tepfer, M., & Rossingnol, M. (1992). rolA modulates the sensitivity to auxin of the protontranslocation catalyzed by the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in transformed tobacco. *FEBS Lett* 298, σσ. 89–92.
  114. Veena, V., & Taylor, C. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* :43, σσ. 383–403.
  115. Vilaine, F., & Casse-Delbart, F. (1987). A new vector derived from *Agrobacterium rhizogenes* plasmids: a micro-Ri plasmid and its use to construct a mini-Ri plasmid. *Gene* 55, σσ. 105–14.
  116. Watson, B. (1996, February 1). Στο *Taylor's Guide to Heirloom Vegetables*. Houghton Mifflin Harcourt; FIRST EDITION.
  117. Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M. D., & Nester, E. W. (1975). Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*.

118. White, F., Taylo, B., Huffman, G., Gordon, M., & Nesterr, E. (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol*, σσ. 33–44.
119. Willcox, J., Catignan, G., & Sheryl , L. (2003). Tomatoes and cardiovascular heath. *FoodScience and Nutrition*.
120. Winans, S. (1991). An *Agrobacterium* two-component regulatory system for the detectionof chemicals released from plant wounds. *Mol. Microbiol*, σσ. 2345–2350.
121. Yasmeeen, A., Mirza, B., Inayatullah, S., Safdar, N., Jamil, M., Ali, S., & Choudhry, M. F. (2009). In planta transformation of tomato. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(1), 20–28.
122. Zhou, M.L., Zhu, X.M., Shao, J.R., Tang, Y.X. and Wu, Y.M. (2011). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1229-1239.
123. Zupan, J., & Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol*, σσ. 1041–1047. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1041>

#### Ελληνική Βιβλιογραφία

124. Ελληνική Στατιστική Αρχή. (2019). *ΕΛΣΤΑΤ*. Ανάκτηση από [https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPG06/-](https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPG06/)
125. Ετήσια Γεωργική Στατιστική Έρευνα (Οριστικά Αποτελέσματα) ( 2016 ). (n.d.).
126. Κοντοβά, Μ. (2020). «Γενετικός μετασχηματισμός της τομάτας μέσω του *Agrobacterium rhizogenes* ως εργαλείο για τη μελέτη της εξωγενούς έκφρασης γονιδίων». Πτυχιακή Διατριβή. Βόλος: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος.
127. Παπίτση, Λ. (2022). «Ανάπτυξη πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της τομάτας διαμέσου του *Agrobacterium rhizogenes*». Πτυχιακή Διατριβή. Βόλος: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος.
128. Χα, Ι.-Α., & Πετρόπουλος, Σ. (2014). Στο *Γενική Λαχανοκομία και Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών* (σσ. 217-226). Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
129. Χαριζάνης, Α. (2021, 07 08). Συμβατική και βιολογική παραγωγή τομάτας, από τον πρωτογενή τομέα έως την τυποποίηση. Διαφορές, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

κάθε δραστηριότητα. (Δ. Κ. Λαμπροπούλου, Επιμ., & Σ. Ε. Τροφίμων, Συντάκτης)  
Αιγάλεω, Ελλάδα. Ανάκτηση από  
[https://polynoe.lib.uniwa.gr/xmlui/bitstream/handle/11400/1218/Charizanis\\_19029.pdf  
?sequence=1&isAllowed=y](https://polynoe.lib.uniwa.gr/xmlui/bitstream/handle/11400/1218/Charizanis_19029.pdf?sequence=1&isAllowed=y)