



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ

«ΟΣΜΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΣΤΟ ΖΙΖΑΝΙΟ *Arabidopsis Thaliana*»

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ :

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ

«ΟΣΜΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΙΟΝΗΣΗ ΣΤΟ ΖΙΖΑΝΙΟ *Arabidopsis Thaliana*»

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ :

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΕΛΗΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Κωνσταντίνο Δελή, Επίκουρο Καθηγητή του εργαστηρίου Γενετικής του τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Πελοποννήσου, ο οποίος συνέβαλλε στην εκπόνηση της πτυχιακής αυτής εργασίας δίνοντας την απαραίτητη καθοδήγηση, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες για τη σωστή διεκπεραίωση και φυσικά, δείχνοντας υπομονή σε τυχούσες αποτυχίες.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.1 Εισαγωγή	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.2 Κιρκαδικοί ρυθμοί φυτών.....	8
1.3 Χαρακτηριστικά των κιρκαδικών ρυθμών	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.4 Η ιστορία της έρευνας του ρολογιού των φυτών	10
1.5 Δομή Κιρκαδικού ρολογιού.....	12
Κεφάλαιο 2	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
2.1 Οι κιρκαδικοί ρυθμοί στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
2.2 Η χρήση του ως φυτό-μοντέλο.....	14
2.3 Ανάπτυξη τεχνικών και μεθόδων.....	16
Κεφάλαιο 3	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
3.1 Εσπερίνη	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Κεφάλαιο 4	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
4.1 Αβιοτικές καταπονήσεις.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
4.2 Οσμωτική καταπόνηση	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Πειραματικό Μέρος.....	21
Σκοπός της εργασίας	21
1.1 Υλικά και Μέθοδοι	22
I. ΥΛΙΚΑ	22
II. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
Συμπεράσματα	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Βιβλιογραφία	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για να λύσουν το πρόβλημα του παγκόσμιου επισιτισμού, οι επιστήμονες κάνουν μελέτες εδώ και χρόνια, ώστε να μπορέσουν να βρουν τρόπο ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αγροτεμάχιο για καλλιέργεια. Οι πλημμύρες, η ξηρασία και οι ακραίες θερμοκρασίες, παράλληλα με την έλλειψη θρεπτικών συστατικών έχουν ως αποτέλεσμα την αφαίρεση ενός μεγάλου ποσοστού καλλιεργήσιμων εκτάσεων. Σαν αποτέλεσμα, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στη δημιουργία μεταλλαγμάτων, τα οποία να είναι πιο ανθεκτικά στις όποιες καταπονήσεις. Σε αυτή την εργασία θα μελετήσουμε την αποτελεσματικότητα του μεταλλάγματος Hesp 1-1 έναντι του αγρίου τύπου του *Arabidopsis thaliana* σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης και θα παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα του πειράματος.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Ο παγκόσμιος πληθυσμός προβλέπεται πως θα αυξηθεί από τα 7,2 δισεκατομμύρια στα 9,6 με 12,3 δισεκατομμύρια μέχρι το 2100, αυξάνοντας έτσι την παγκόσμια ανάγκη για παραγωγή τροφίμων (Gerland et al., 2014). Όμως, η ανεπάρκεια θρεπτικών ουσιών, η τοξικότητα των μετάλλων και η αλατότητα περιορίζουν δραστικά την ποσότητα της καλλιεργήσιμης γης που είναι διαθέσιμη για παραγωγή τροφίμων. Επίσης, οι απώλειες αγρών παγκοσμίως λόγω των ακραίων θερμοκρασιών, της ξηρασίας και των πλημμυρών, αναμένεται να αυξηθεί κατά 50% μέχρι το 2050 (Boyer, 1982). Έχει υπολογιστεί πως η Ευρώπη, ανάμεσα στο 1977 και στο 2007, έχει ζημιωθεί κατά 100 δισεκατομμύρια € λόγω της έλλειψης νερού (Ευρωπαϊκή Ένωση, 2007). Η ακραία ξηρασία του 2012 επηρέασε το 80% της καλλιεργούμενης επικράτειας των Η.Π.Α. (Hoerling et al., 2013) και προβλέπεται, ως συνέπεια του φαινομένου του θερμοκηπίου, να έχουμε όλο και πιο συχνά τέτοιες ξηρασίες (Hansen et al., 2010; Lawrimore et al., 2011; Lobell and Gourdji, 2012; Cook et al., 2015).

Υπάρχει άμεση ανάγκη για ανάπτυξη ποικιλιών καλλιέργειας με βελτιωμένη ανεκτικότητα στις αβιοτικές καταπονήσεις, όμως η ανάπτυξη τέτοιων βελτιωμένων ποικιλιών απαιτεί βαθύτατη κατανόηση των μηχανισμών που επηρεάζονται από αυτές τις συνθήκες, και το πως μπορούν να τους ανεχτούν. Οι αβιοτικές καταπονήσεις μπορούν να επηρεάσουν την κυτταρική ομοιόσταση μέσω μια ποικιλίας μηχανισμών. Οι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες προάγουν τον ενδο- και εξω- κυτταρικό σχηματισμό κρυστάλλων πάγου, οδηγώντας σε καταστροφή των κυττάρων, αφυδάτωση και διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης (Steponkus and Webb, 1992; Pearce, 2001; Yamazaki et al., 2008, 2009). Οι υψηλές θερμοκρασίες καταστρέφουν την πλασματική μεμβράνη αυξάνοντας τη ρευστότητά της, οδηγώντας σε διαρροή ιόντων. Η θερμική καταπόνηση μπορεί, επίσης, να έχει ως αποτέλεσμα την αναχαίτηση την ενζυματικής δραστηριότητας και της φωτοσύνθεσης (Salvucci and Crafts-Brandner, 2004; Sharkey, 2005; Wahid et al., 2007; Allakhverdiev et al., 2008). Οι καταπονήσεις υψηλών θερμοκρασιών, αλατότητας και ξηρασίας, συνοδεύονται συνήθως από παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS = Reactive Oxygen Species), τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε μετουσίωση λειτουργικών και δομικών πρωτεϊνών (Gill and Tuteja, 2010; Suzuki et al., 2012). Η σταδιακή έκθεση των φυτών σε αυτές τις

συνθήκες διαφορετικών καταπονήσεων, μπορεί να κάνει τα φυτά πιο ανθεκτικά, όπως επίσης και τα εγκλιματισμένα φυτά να επιβιώνουν σε πιο σκληρές συνθήκες από τα μη εγκλιματισμένα. Η διαδικασία εγκλιμάτισης περιλαμβάνει την έκφραση νέων αντίγραφων και πρωτεϊνών, και η συσσώρευση των μεταβολιτών που έχει ως αποτέλεσμα μία νέα ομοιοστατική κατάσταση, η οποία είναι πιο αρμονική με την αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών. Αυτό, επιτρέπει την εξισορρόπηση των πρωτεϊνών και των μεμβρανών, οσμωτική προσαρμογή και την αποκατάσταση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Krasensky and Jonak, 2012; Mittler and Blumwald, 2015).

Ένας αριθμός από διαγονιδιακές σειρές με βελτιωμένη ανθεκτικότητα σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, έχουν παραχθεί σε μια ποικιλία φυτικών ειδών, αλλά μόνο ελάχιστα έχουν εγκριθεί για εμποροποίηση (Lawlor, 2012; Cabello et al., 2014; Waltz, 2014). Αυτές οι διαγονιδιακές σειρές, εκμεταλλεύονται μια ποικιλία από δια-γονίδια, τα οποία δρουν για τη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Έχουν υπάρξει προσεγγίσεις που οδήγησαν σε σημαντικές βελτιώσεις, όμως ο γενετικός χειρισμός κύριων ρυθμιστών στην αντίδραση της καταπόνησης θα μπορούσε να είναι πιο δυναμικός εξαιτίας ενός ευρύτερου φάσματος μηχανισμών άμυνας, οι οποίοι θα μπορούσαν να πυροδοτηθούν από τέτοιες τροποποιήσεις. Ενώ, οι φυσιολογικές αντιδράσεις στις καταπονήσεις συχνά οδηγούν σε καταστολή της ανάπτυξης, οι τροποποιήσεις προκαλούν συχνά πλειοτροπικές επιδράσεις, οδηγώντας έτσι σε μειωμένες αποδόσεις κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Hussain et al., 2011). Αυτά τα προβλήματα μπορούν να ανακουφιστούν με τη χρήση επαγώγιμων προαγωγών καταπονήσεων, έτσι ώστε η γενετική τροποποίηση να εκφράζεται μόνο όταν είναι ωφέλιμη. Εναλλακτικά, η επιλογή των παραγόντων μεταγραφής που ελέγχουν συγκεκριμένα μονοπάτια με τις λιγότερες παρενέργειες, μπορούν να ελαχιστοποιήσουν τέτοια θέματα (Hussain et al., 2011). Παρ'όλα αυτά, η ιδανική προσέγγιση στη βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, θα ήταν η εκμετάλλευση ενός γενετικού μονοπατιού, το οποίο (α) θα συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα ενός μεγάλου εύρους περιβαλλοντικών καταπονήσεων και (β) θα μπορεί φυσικά να προσαρμόζεται στο να ενισχύει τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας καταπονήσεων, όταν τα φυτά εκτίθενται σε επιβλαβείς συνθήκες.

Τα κίρκαδικά ρολόγια είναι 24ωροι βιολογικοί ταλαντωτές, οι οποίοι επιτρέπουν στους οργανισμούς να προβλέπουν αναμενόμενες, καθημερινές αλλαγές, οι οποίες συνδέονται με την περιστροφή της Γης. Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν πως τα κίρκαδικά ρολόγια μπορεί να συνεισφέρουν στην ομαλή λειτουργία των φυτών, ενισχύοντας την ικανότητά τους να αντέχουν τις αβιοτικές καταπονήσεις.

1.2 Κιρκαδικοί ρυθμοί φυτών

Η Γη περιστρέφεται γύρω από τον άξονα της κάθε 24 ώρες, με αποτέλεσμα η επιφάνειά της να εναλλάσσει ως προς τον Ήλιο, η οποία γίνεται αντιληπτή με τη διαδοχή ημέρας/νύχτας. Ακόμα και για τον πιο απλό παρατηρητή, η εναλλαγή ημέρας/νύχτας σημαίνει αλλαγή στο μεταβολισμό, τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία κάθε οργανισμού. Αυτές οι βιολογικές αλλαγές είναι γνωστές ως 'ημερήσιος ρυθμός'. Ωστόσο, είναι λιγότερο αντιληπτό το καλά μελετημένο πια γεγονός ότι οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν την έμφυτη ικανότητα να μετρούν το χρόνο. Πράγματι, οι περισσότεροι οργανισμοί δεν ανταποκρίνονται στην αυγή, αντιθέτως, προσδοκούν τη δύση και προσαρμόζουν αναλόγως τη βιολογία τους. Όταν στερούνται τους εξωγενείς παράγοντες, πολλοί από τους ημερήσιους ρυθμούς συνεχίζουν να υπάρχουν, υποδεικνύοντας πως έχουν ένα ενδογενές, βιολογικό κιρκαδικό ρολόι. Μέχρι πρόσφατα, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους λειτουργούσαν οι οργανισμοί παρέμεναν ένα μυστήριο. Όμως, τα τελευταία 30 περίπου χρόνια, δυναμικές προσεγγίσεις της κυτταρικής γενετικής μας έδειξαν μοριακές βάσεις ενός κυτταρικού κιρκαδικού ρολογιού, τόσο περίπλοκου και όμορφου όσο τα χρονόμετρα που ανακαλύφθηκαν τον 18ο αιώνα. Τα κιρκαδικά ρολόγια παρατηρούνται σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, από μικροοργανισμούς όπως βακτήρια και μύκητες έως μεγαλύτερους οργανισμούς όπως φυτά, θηλαστικά και έντομα. Μετά από μελέτες αποδείχθηκε πως το κιρκαδικό ρολόι, ακόμα κι αν κάποια γονίδιά του δεν συντηρούνται, αυτό συντηρείται. Στις μέρες μας γνωρίζουμε ότι τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των γονιδίων ελέγχονται, όχι μόνο σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά και σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο, με φωσφορυλίωση, με αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, με ενδοκυτταρικό εντοπισμό και με αποικοδόμηση, γεγονότα που ρυθμίζονται και τα ίδια ρυθμικά (Baggs and Green, 2003).

1.3 Χαρακτηριστικά των κιρκαδικών ρυθμών

Οι κιρκαδικοί ρυθμοί είναι το υποσύνολο των βιολογικών ρυθμών που έχουν περιοδικότητα, το οποίο προσδιορίζεται ως ο χρόνος για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος 24 ωρών. Το προσδιοριστικό χαρακτηριστικό ενέπνευσε τον Franz Halberg το 1959 να επινοήσει τον όρο κιρκαδικό, από τις Λατινικές λέξεις '*circa*' (γύρω) και '*dies*' (μέρα). Ένα δεύτερο καθοριστικό χαρακτηριστικό των

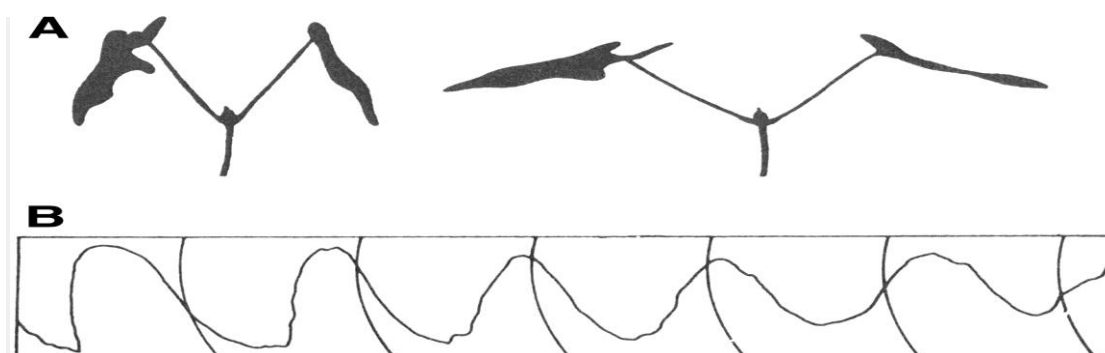
κίρκαδικών ρυθμών, είναι ότι παράγονται ενδογενώς και αυτοσυντηρούνται, έτσι ώστε να εξακολουθούν να λειτουργούν κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως συνεχές φως (ή σκοτάδι) και θερμοκρασία. Κάτω από αυτές τις ελεγχόμενες συνθήκες, ο οργανισμός στερείται εξωτερικές χρονικές υποδείξεις και τηρείται η περίοδος των 24 ωρών. Ένα τρίτο χαρακτηριστικό των κίρκαδικών ρυθμών είναι η θερμοκρασιακή συνοχή (η περίοδος παραμένει σχετικά σταθερή ακόμα και σε εύρος θερμοκρασιών). Συνεπώς, το ρολόι δεν επηρεάζεται από μεταβολές στον κυτταρικό μηχανισμό (Pittendrigh, 1954). Αυτή είναι μία όψη ενός γενικότερου μηχανισμού, ο οποίος ρυθμίζει το ρολόι ενάντια στις αλλαγές του κυτταρικού μεταβολισμού. Μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, όπως σε ένα εργαστήριο, εάν το φυτό διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα κάτω από τεχνητά σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτός, μπορεί να παρεκκλίνει από την 24ωρη περίοδο του κίρκαδικού κύκλου. Ο κίρκαδικός ρυθμός συνεχίζει να εκφράζεται τουλάχιστον για μια χρονική περίοδο ως ελευθέρως-τρέχουσα, η οποία μπορεί να κυμαίνεται από 21 έως 27 ώρες, ανάλογα με την απόκριση. Αυτό σημαίνει πως το φυτό αποσυγχρονίζεται όταν είναι αποκομμένο από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Όταν το ρολόι έχει απόκλιση από την περίοδο των 24 ωρών δε σημαίνει πως αποκλίνει και εσφαλμένα, διότι τα ρολόγια ελεύθερου ρυθμού κρατούν ακριβή ώρα αλλά δε συγχρονίζονται με τον εξωτερικό κόσμο. Με την επαναφορά του φυτού σε φυσιολογικές συνθήκες, επανασυγχρονίζεται. Τα φυτά χρειάζονται κάποια ερεθίσματα για να μπορέσουν να συγχρονίσουν το ρολόι με τον κύκλο ημέρας/νύχτας που διαρκεί 24 ώρες. Τα περιβαλλοντικά αυτά χρονικά ερεθίσματα (όπως το φως και η θερμοκρασία) ονομάζονται Zeitgebers (Γερμανική λέξη για τους χρονοδότες) τα οποία συγχρονίζουν το ενδογενές σύστημα χρόνου με μια περίοδο 24 ωρών, ανταποκρινόμενοι στην εξωγενή περίοδο της περιστροφής της Γης. Η ικανότητα ενός ερεθίσματος να επαναφέρει το ρολόι είναι μια λειτουργία που παρέχεται κατά τη διάρκεια της μέρας. Ένας παλμός φωτός πριν την αυγή θα επιταχύνει τη φάση του ρολογιού, όμως η ίδια ποσότητα φωτός πριν το σούρουπο θα καθυστερήσει τη φάση. Αν ο ίδιος παλμός φωτός δοθεί το μεσημέρι, δε θα έχει κανένα φυσιολογικό αποτέλεσμα. Από αυτό, συμπεραίνουμε πως το ρολόι ρυθμίζει την ευαισθησία του σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Αυτή η ποικίλη ευαισθησία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και να απεικονιστεί ως μια καμπύλη απόκρισης φάσης, στην οποία σχεδιάζεται η αλλαγή φάσης σε απόκριση ενός ερεθίσματος εφαρμοσμένου σε διαφορετικές χρονικές στιγμές του κίρκαδικού κύκλου (Dunlap et al., 2004).

1.4 Η ιστορία της έρευνας του ρολογιού των φυτών

Οι πρώτες αναγραφές που αναγνωρίζουν τους ημερήσιους ρυθμούς προέρχονται από τον 4ο αιώνα π.Χ. Ο Ανδροσθένης περιέγραψε την παρατήρηση της κίνησης των φύλλων του οξυφοίνικα, *Tamarindus indicus*, στο νησί της Τήλου στην Περσική Αυτοκρατορία κατά τη διάρκεια της πορείας του Μεγάλου Αλεξάνδρου. Δεν υπήρχε υπαινιγμός ότι είχαν υποψιαστεί την ενδογενή προέλευση αυτών των ρυθμών εκείνη την εποχή, και πήρε πάνω από δύο χιλιετίες για να μπορέσει να εξεταστεί πειραματικά. Η επιστημονική βιβλιογραφία των κιρκαδικών ρυθμών ξεκίνησε το 1729, όταν ο Γάλλος αστρονόμος de Mairan ανέφερε ότι η καθημερινή κίνηση των φύλλων του ευαίσθητου ηλιοτρόπιου εξακολουθεί να υπάρχει και σε συνεχές σκοτάδι, αποδεικνύοντας την ενδογενή της προέλευση. Τότε, ο de Mairan εισηγήθηκε ότι αυτοί οι ρυθμοί σχετίζονταν με τους ρυθμούς ύπνου των κατάκοιτων ανθρώπων. Πήρε 30 χρόνια μέχρι να επαναληφθούν οι παρατηρήσεις του. Αυτές οι μελέτες δεν περιλαμβάνουν τις μεταβολές θερμοκρασίας ως πιθανό παράγοντα για τις κινήσεις των φύλλων. Πέρασε σχεδόν ένας αιώνας μέχρι να μπορέσει να μετρηθεί με ακρίβεια η διάρκεια αυτών των κινήσεων και να αντιληφθούν ότι οι ρυθμοί ήταν μόνο 24 ωρών, κάνοντας τους ρυθμούς κιρκαδικούς και δηλώνοντας πως αυτοί οι ρυθμοί είναι ενδογενής και όχι απλή ανταπόκριση σε περιβαλλοντικές χρονικές υποδείξεις. Ο de Candolle (1832) υποστήριξε ότι η περίοδος του *Mimosa pudica* ήταν 22-23 ώρες, εμφανώς μικρότερη από 24 ώρες. Επίσης, απέδειξε ότι ο ρυθμός μπορεί να αντιστραφεί, εναλλάσσοντας το φως με το σκοτάδι. Ένα πλήθος από συγγραφείς επανέλαβαν και επέκτειναν αυτές τις παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια του 19ου αιώνα και στις αρχές του 20ου αιώνα, εκμεταλλευόμενοι τις κινήσεις των φύλλων των φυτών, τον μόνο γνωστό κιρκαδικό ρυθμό. Δεν αποτέλεσε έκπληξη το γεγονός ότι αμφισβητήθηκε η ενδογενής φύση των κιρκαδικών ρυθμών. Ο Pfeffer (1873), για παράδειγμα, υποπτεύθηκε πως το φως που διέρρεε στους σκοτεινούς θαλάμους που χρησιμοποιούνταν γι' αυτές τις μελέτες, δυσκόλευε την προσπάθεια να διατηρηθούν οι κατάλληλες συνθήκες και ακύρωνε τους ισχυρισμούς πως η προέλευση των κιρκαδικών ρυθμών ήταν ενδογενής. Όμως, οι κριτικοί τελικά πείστηκαν από τη συσσώρευση πληθώρας αποδείξεων. Ο ίδιος ο Pfeffer μελέτησε εκτενώς τις κινήσεις των φύλλων και έδωσε πολλά παραδείγματα περιόδων από ρυθμούς κινήσεων των φύλλων που διέφεραν από τις 24 ώρες. Το τρίτο κριτήριο των κιρκαδικών ρυθμών είναι η διακύμανση της θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας, χαρακτηριστικό που πήρε πολύ περισσότερο χρόνο στο να εκτιμηθεί. Η λογική του να εξετάζει κανείς την εξάρτηση της θερμοκρασίας της διάρκειας της περιόδου, αναδύθηκε από την προσδοκία ότι ο μηχανισμός τους ρολογιού

βασίζεται σε εναλλασσόμενες βιοχημικές διαδικασίες. Ήταν αναμενόμενο πως όπως και στις χημικές διαδικασίες, έτσι και στο ρολόι θα έπρεπε να επιδεικνύεται αξιοσημείωτη εξάρτηση από τη θερμοκρασία. Το ότι το ρολόι δεν είναι ανεξάρτητο της θερμοκρασίας, αντιθέτως, παρουσίασε λιγότερη εξάρτηση στη θερμοκρασία από όση αναμενόταν, στήριξε έντονα το γεγονός ότι ο μηχανισμός διακύμανσης της θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας ήταν ατελής. Ένας τέτοιος ατελής μηχανισμός θα μπορούσε να επιμηκύνει την περίοδο είτε ανεπαρκώς είτε εξαιρετικά πολύ σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ή, αντιστρόφως, να μικρύνει την περίοδο πολύ λίγο ή πάρα πολύ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Το 1880, ο Charles και ο Francis Darwin, υπαινίχθηκαν την κληρονομικότητα των κιρκαδικών ρυθμών (Darwin and Darwin, 1880), σε αντίθεση με την αποτύπωση μιας 24ωρης περιόδου με έκθεση στους ημερήσιους κύκλους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Αυτό εξερευνήθηκε αρχικά το 1930 με δύο στρατηγικές. Στην πρώτη, τα ζώα ή τα φυτά μεγάλωναν σε σταθερές συνθήκες για πολλαπλές γενιές. Μία από τις πιο εξαντλητικές ανάμεσα σε τέτοιες μελέτες, απέδειξε τη διατήρηση σταθερών ρυθμών ανάμεσα σε μύγες φρούτων που είχαν εκτραφεί σε σταθερές συνθήκες για 700 γενιές (επανεξετάστηκε από τον Johnson, 2005). Στη δεύτερη στρατηγική, σπορόφυτα ή ζώα εκτίθονταν σε κύκλους που διέφεραν από 24 ώρες, σε μια προσπάθεια να αποτυπώσουν νέες περιόδους. Τέτοιες μελέτες θα μπορούσαν να επιβάλλουν τη νέα διάρκεια περιόδου κατά τη διάρκεια νέων κύκλων, αλλά μόλις εκτίθονταν ξανά σε σταθερές συνθήκες, η ενδογενής κιρκαδική περίοδος επαναφερόταν (Bunning, 1973). Η κληρονομικότητα της διάρκειας της περιόδου μεταξύ των απογόνων από διασταυρώσεις γονέων με ξεχωριστές διάρκειες περιόδου αναφέρθηκε πρώτα σε υβρίδια του φυτού *Phaseolus*; όπου είχαν διάρκεια περιόδου ενδιάμεση από αυτή των γονιών (Bunning, 1932, 1935).



Εικόνα 1.

(Α) Οι κινήσεις των φύλλων του *Phaseolus coccineus*, αριστερά τη νύχτα και δεξιά την ημέρα

(B) Ο κίρκαδικός ρυθμός του φυτού σε κύκλους φως/σκοτάδι και η παρατήρηση σε συνεχές φως.

Πηγή: The Plant Cell, Vol. 18, Απρίλιος 2006.

Οι μετέπειτα γενετικές αναλύσεις που έγιναν για την αναγνώριση κάθε συνιστώσας του κίρκαδικού ρολογιού ξεκίνησαν το 1970. Παρότι τώρα φαίνεται αναμφισβήτητο το ότι τα κίρκαδικά ρολόγια αποτελούνται από προϊόντα γονιδίων, ακριβώς αυτό αποτέλεσε και πηγή αξιοσημείωτων αντιπαραθέσεων εκείνη την εποχή. Υποστηρίχθηκε πως οι μετέπειτα γενετικές προσπάθειες θα ήταν άκαρπες, επειδή τα ρολόγια ήταν αρκετά περίπλοκα ώστε να είναι εύλογα αναμενόμενο να παρουσιάσουν πολυγονική κληρονομικότητα (Bünning, 1935) και δε θα απέδιδαν εύκολα σε συνήθεις γενετικές προσεγγίσεις.

Στα φυτά, αντιλήφθηκαν πως ο ρυθμός κινήσεως των φύλλων ήταν μόνο ένας ανάμεσα σε τόσους ρυθμούς, οι οποίοι περιείχαν τη βλάστηση, την ανάπτυξη, τη δραστηριότητα των ενζύμων, την κίνηση των στομάτων και την ανταλλαγή αερίων, τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, το άνοιγμα των ανθέων και η εκπομπή αρωμάτων (Cumming and Wagner, 1968). Όμως, οι γενετικές αναλύσεις εξασθένησαν μετά τα πρώτα πειράματα του Bünning. Τα πράγματα άλλαξαν με δύο κρίσιμες ανακαλύψεις. Αρχικά, ο Kloppstech (1985) περιέγραψε έναν κίρκαδικό ρυθμό στο μπιζέλι στην αφθονία τριών πυρηνικά κωδικοποιημένων αντίγραφων, που κωδικοποιούσαν light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (CAB) και μια early light-induced πρωτεΐνη. Αυτή η παρατήρηση αναπαράχθηκε εκτενέστερα στο σιτάρι, όπου φάνηκε ότι ο ρυθμός μεταγραφής του Cab-1 γονιδίου ήταν κάτω από κίρκαδικό έλεγχο (Nagy et al., 1988). Ούτε το μπιζέλι, αλλά ούτε και το σιτάρι ήταν κατάλληλα για κλωνοποίηση γονιδίου θέσης, όμως το *Arabidopsis thaliana* ανερχόταν ως ένα δυναμικό σύστημα, στο οποίο συνδυάζονταν η γενετική ανάλυση με τις τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης των γονιδίων (Somerville and Koornneef, 2002).

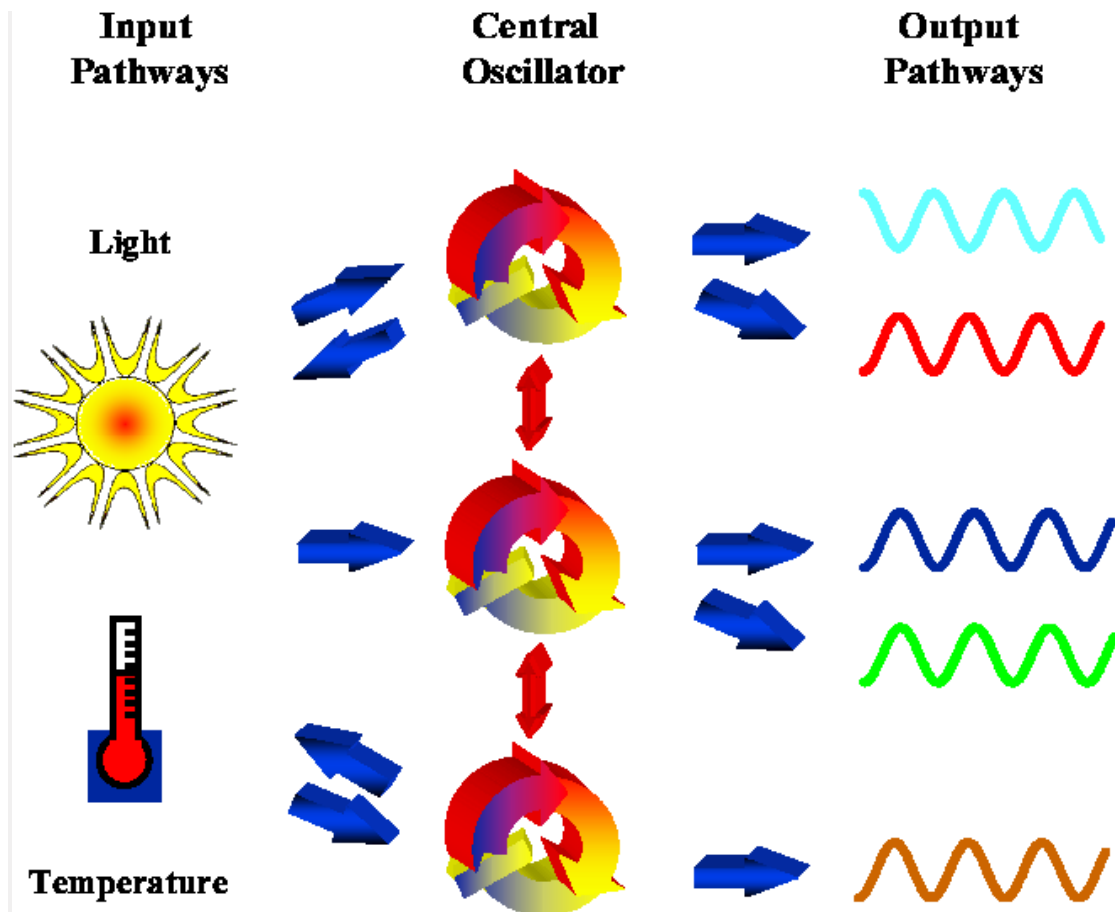
1.5 Δομή Κίρκαδικού ρολογιού

1) Μονοπάτια εισόδου (input pathways), αφορά το πως οι εξωτερικοί παράγοντες συντονίζουν το δεύτερο συστατικό με το περιβάλλον. Για τη σωστή λειτουργία του, το ρολόι θα πρέπει να διαθέτει ένα μηχανισμό, ο οποίος θα του επιτρέπει να συγχρονίζεται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και με βάση αυτές τις συνθήκες να αυτοσυντονίζεται. Για να το καταφέρει αυτό, συντονίζεται από συγκεκριμένους παράγοντες οι οποίοι αναμεταδίδουν πληροφορίες σχετικά με την ώρα της ημέρας. Οι χρονοδότες (Zeitgebers) αυτοί είναι οι κύκλοι ημέρας/νύχτας και οι κύκλοι της θερμοκρασίας. Το

καλύτερο ερέθισμα για το συντονισμό των φυτών είναι το φως. Τα φυτά μπορούν και αντιλαμβάνονται το φωτεινό σήμα μέσω των φωτουποδοχέων, που υπάγονται σε τρεις οικογένειες : α) τα φυτοχρώματα, β) τα κρυπτοχρώματα και γ) τις φωτοτροπίνες (Harmer et al., 2001).

2) Κεντρικός ταλαντωτής ή βηματοδότης (central oscillator), θα μπορούσαμε να πούμε πως αποτελεί την καρδιά του ρολογιού. Αποτελείται από αυτορυθμιζόμενους βρόγχους θετικής/αρνητικής επανατροφοδότησης, οι οποίοι αποτελούνται από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Στο *Arabidopsis thaliana* κάποιοι από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες είναι οι CCA1 (Circadian Clock Associated 1) και LHY (Late Elongated Hypocotyl) που αποτελούν τα αρνητικά στοιχεία του βρόγχου και ο APRR1/TOC1 (Arabidopsis Pseudo Response Regulator 1/Timing Of CAB expression 1) ή σκέτο, παράγοντας TOC1 ο οποίος αποτελεί το θετικό παράγοντα του βρόγχου. Οι CCA1 και LHY έχουν μέγιστα επίπεδα έκφρασης των mRNAs τους την αυγή (πρωινά γονίδια), ενώ ο TOC1 παρουσιάζει τα μέγιστα επίπεδα έκφρασής του κατά τη δύση (απογευματινό γονίδιο).

3) Μονοπάτια εξόδου (output pathways), είναι οι εκροές του κεντρικού ταλαντωτή, δηλαδή είναι οι εμφανείς ρυθμοί κάτω από τον έλεγχο του κίρκαδικού συστήματος. Τα μονοπάτια αυτά οδηγούν σε φυσιολογικούς και βιοχημικούς ρυθμούς των φυτών.



Εικόνα 2. Δομή κίρκαδικού ρολογιού.

Πηγή : Διαδίκτυο

Κεφάλαιο 2

2.1 Οι κίρκαδικοί ρυθμοί στο *Arabidopsis thaliana*

Στη Γη υπάρχουν εκατομμύρια φυτικά είδη, παρ' όλα αυτά, είναι ελάχιστα αυτά που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για βιολογική έρευνα. Ο λόγος που η επιστημονική κοινότητα επιλέγει ένα είδος για να μελετήσει ως αντιπροσωπευτικό μιας ευρύτερης ομάδας οργανισμών, είναι λόγω της ομοιότητας που υπάρχει ανάμεσα σε συγγενικούς οργανισμούς. Το είδος αυτό ονομάζεται 'μοντέλο' και οι πληροφορίες που προκύπτουν από τη μελέτη ενός τέτοιου είδους μπορούν να εφαρμοστούν με μικρές ή μεγαλύτερες παραλλαγές και στα συγγενικά του είδη. Το εκάστοτε μοντέλο επιλέγεται με βάση την ευκολία πρόσβασης στο είδος αυτό, την ανάπτυξη και το χειρισμό του, το κόστος του, καθώς και το πόσο καλά έχει μελετηθεί στο παρελθόν. Σημαντικά για τη βιολογική έρευνα είναι, επίσης, η απομόνωση και ο

χαρακτηρισμός των μεταλλαγμάτων τους. Είναι γνωστό πως κατά τη γενετική ανάλυση μεταλλαγμάτων είναι απαραίτητος μεγάλος αριθμός ατόμων και πληθυσμών, καθώς και η εξέταση πολλών γενεών απογόνων. Αυτό συνεπάγεται πως τα ιδανικά μοντέλα μελέτης, είναι οργανισμοί που έχουν μικρό μέγεθος, σύντομο βιολογικό κύκλο και μεγάλο αριθμό απογόνων. Στη μοριακή γενετική, το φυτό- μοντέλο που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι το *Arabidopsis thaliana*, της οικογένειας Brassicaceae. Στις μέρες μας, προστίθενται κάθε χρόνο χιλιάδες έρευνες με αυτό το φυτό.

2.2 Η χρήση του ως φυτό μοντέλο

Η χρήση του *Arabidopsis thaliana* ως φυτό-μοντέλο, ξεκίνησε το 1943 μετά από πρόταση του Friedrich Laibach. Η εισαγωγή του *Arabidopsis th.* στη γενετική ανάλυση άργησε να γίνει αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα παρά την πληθώρα ιδανικών χαρακτηριστικών, διότι δεν ήταν φυτό κάποιας ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας, είχε μικρό μέγεθος χρωμοσωμάτων, πράγμα που δυσκόλευε την κυτταρολογική του ανάλυση λόγω των διαθέσιμων μεθόδων της εποχής και, τέλος, οι δυσκολίες που υπήρχαν στην αναπαραγωγή φυτών σε συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα .

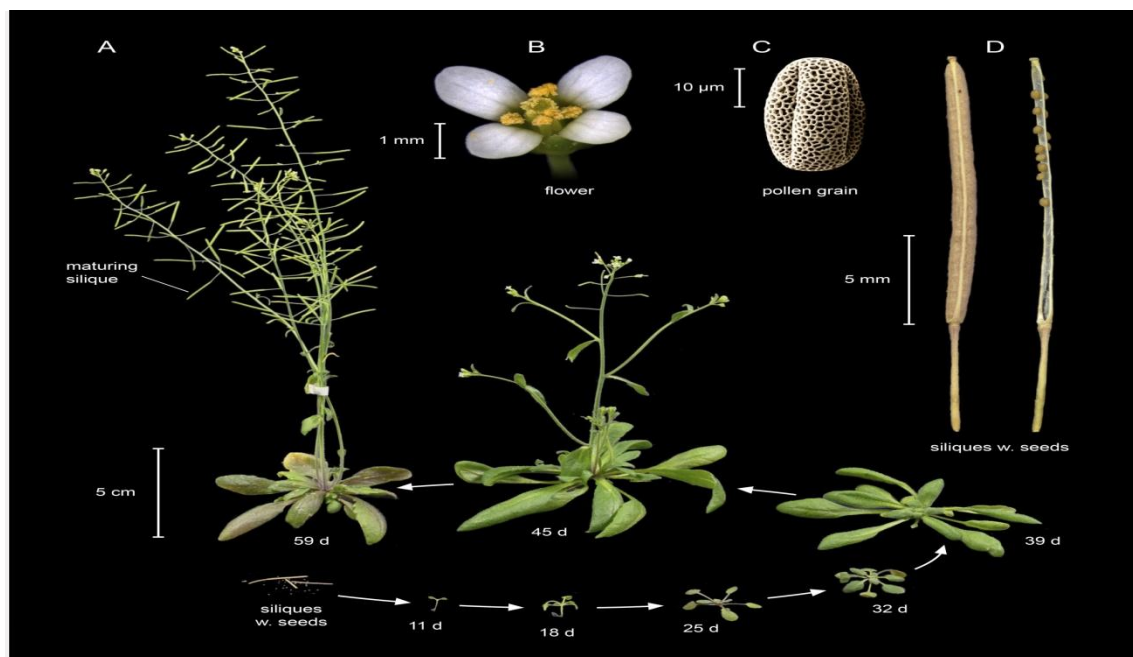
Το ενδιαφέρον των επιστημόνων της εποχής για το *Arabidopsis th.* αποκαταστάθηκε ύστερα από τρία σημαντικά επιτεύγματα στην έρευνα για το φυτό αυτό. Αυτό συνέβη στις αρχές του 1980, όταν ο Marteen Koornneef και οι συνεργάτες του δημιούργησαν τον πρώτο γενετικό χάρτη του γονιδιώματος του φυτού. Ύστερα, παρουσιάστηκαν οι δυνατότητες και η δυναμική της γενετικής ανάλυσης του *Arabidopsis* από τον Christopher Somerville, με τη χρήση μεταλλαγμάτων για τον χαρακτηρισμό βιοχημικών διεργασιών. Τέλος, ο Elliot Meyerowitz με τους συνεργάτες του, απέδειξαν ότι σε σχέση με κάθε άλλο φυτό που είχε χαρακτηριστεί μέχρι εκείνη την εποχή, το *Arabidopsis* έχει μικρότερη ποσότητα DNA στο γονιδίωμα του. Αυτά τα τρία κύρια επιτεύγματα, οδήγησαν όλο και περισσότερους ερευνητές να ασχοληθούν με αυτό το φυτό ως μοντέλο και έτσι συσσωρεύθηκε πληθώρα πληροφοριών για το *Arabidopsis* μέσα στις επόμενες δεκαετίες.

Ένα από τα χαρακτηριστικά που καθιστούν το *Arabidopsis* κατάλληλο για γενετική ανάλυση είναι το μικρό του μέγεθος. Μετά τη φύτευση, αναπτύσσει φύλλα σε περιορισμένο μέρος του βλαστού, κοντά στο χώμα, δημιουργώντας ροζέτα (ρόδακας). Με την άνθηση, παράλληλα με την επιμήκυνση του βλαστού δημιουργούνται και ταξιανθίες, οι οποίες αυτογονιμοποιούνται και παράγεται ένα κεράτιο. Ως προς την ανάπτυξη, η διάμετρος της ροζέτας είναι στα 4-6 εκατοστά και το ύψος της ταξιανθίας είναι περί τα 30-40 εκάτοστα. Το μικρό του μέγεθος, λοιπόν, αποτελεί πλεονέκτημα καθώς επιτρέπει την

ανάπτυξή του σε εργαστηριακού θαλάμους και θερμοκήπια, καθιστώντας μη αναγκαία τη χρήση αγροτεμαχίων για τη διεξαγωγή πειραμάτων.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα του *Arabidopsis* είναι ο μικρός βιολογικός του κύκλος. Ανθίζει σε ένα μήνα και έχει ώριμα σπέρματα σε δύο μήνες όταν υπάρχουν οι κανονικές συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας ($100\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ και 20 βαθμούς C). Αν βρεθεί σε περιβάλλον με συνεχές φωτισμό, οι χρόνοι αυτοί μειώνονται κατά δύο εβδομάδες.

Σημαντικό, επίσης, είναι το γεγονός ότι το φυτό αυτογονιμοποιείται και παράγει πολλούς απογόνους (>1000 σπέρματα ανά φυτό), πράγμα που απλοποιεί τις αναλύσεις κληρονομικότητας και τη διατήρηση γενετικών αποθεμάτων. Η εργασία και ο χρόνος που απαιτούνται για την κλωνοποίηση και μεταχείριση γονιδίων μειώνονται λόγω του μικρού διπλοειδούς γονιδιώματος (125 Mbp) και απλουστεύεται η γενετική χαρτογράφηση λόγω μικρού αριθμού χρωμοσωμάτων ($n=5$).



Εικόνα 3. Ο βιολογικός κύκλος του *Arabidopsis thaliana*.

Πηγή: Διαδίκτυο

2.3 Ανάπτυξη τεχνικών και μεθόδων

Οι αυξανόμενες έρευνες των τριών τελευταίων δεκαετιών στο *Arabidopsis*, το πιο μελετημένο πλέον είδος, οδήγησαν σε πληθώρα τεχνικών, που το κατέστησαν ακόμα πιο χρήσιμο στη μοριακή γενετική. (Koncz et al. 1992)

-Κατά τη δεκαετία του 1990, αναπτύχθηκε μια γρήγορη κι εύκολη μέθοδος για την εισαγωγή τροποποιημένων γονιδίων στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* (Clough & Bent 1998). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλα φυτικά είδη με τη ίδια αποτελεσματικότητα.

-Το έτος 2000, προσδιορίστηκε το πλήρες γονιδίωμα του *Arabidopsis*, δίνοντας ώθηση στη γονιδιωματική ανάλυση του φυτού και στον καθορισμό της λειτουργίας καθενός από τα περίπου 28.000 γονίδια που περιέχει.

-Σε κάθε γονίδιο του *Arabidopsis*, έχουν δημιουργηθεί μεταλλάξεις ένθεσης (δηλαδή τμήμα από ξένο DNA ενσωματώνονται σε ένα γονίδιο), επιτρέποντας τη λειτουργική ανάλυση οποιουδήποτε γονιδίου και καθιστώντας το γενετικό υλικό διαθέσιμο για τις επόμενες γενιές μοριακών γενετιστών.

Την τελευταία δεκαετία, έχει υπάρξει αξιοσημείωτη πρόοδος στην κατανόηση του κερκαδικού συστήματος των φυτών, ιδιαίτερα στο *Arabidopsis thaliana*. Είναι πλέον κατανοητό πως τα γονίδια του ρολογιού του *Arabidopsis* και τα προϊόντα πρωτεϊνών λειτουργούν μέσω αυτορυθμιζόμενων βρόχων ανατροφοδότησης, οι οποίοι προάγουν ρυθμικές ταλαντώσεις σε κυτταρικές, μεταβολικές και φυσιολογικές δραστηριότητες.

Κεφάλαιο 3

3.1 Εσπερίνη (At-HESP)

Η εσπερίνη-AtHESP είναι για τα φυτά ότι είναι και η νοκτουρνίνη (NOC) στα θηλαστικά. Η εσπερίνη είναι και αυτή μια αποαδενυλάση που εντοπίστηκε στο *Arabidopsis th.* και είναι ένα γονίδιο που παρουσιάζει ομοιότητες με τη νοκτουρνίνη, η οποία βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του κερκαδικού ρολογιού. Οι αποαδενυλάσες (deadenylases) είναι ένζυμα που εξαρτώνται από το Μαγνήσιο (Mg^{2+}) και μπορούν να αποικοδομούν την πολύ (A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→ 5', απελευθερώνοντας 5'- AMP. Οι αποαδενυλάσες παρατηρούνται όχι μόνο στον πυρήνα, αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Η υπερέκφραση της AtHESP στα φυτά επηρεάζει την έκφραση και τη ρυθμικότητα των δύο βασικών γονιδίων του κεντρικού

ταλαντωτή, TOC1 και CCA1. Μετά από μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι η αποαδενυλίωση σαν μηχανισμός εμπλέκεται στη ρύθμιση του κίρκαδικού ρολογιού. (Delis et al., 2015)

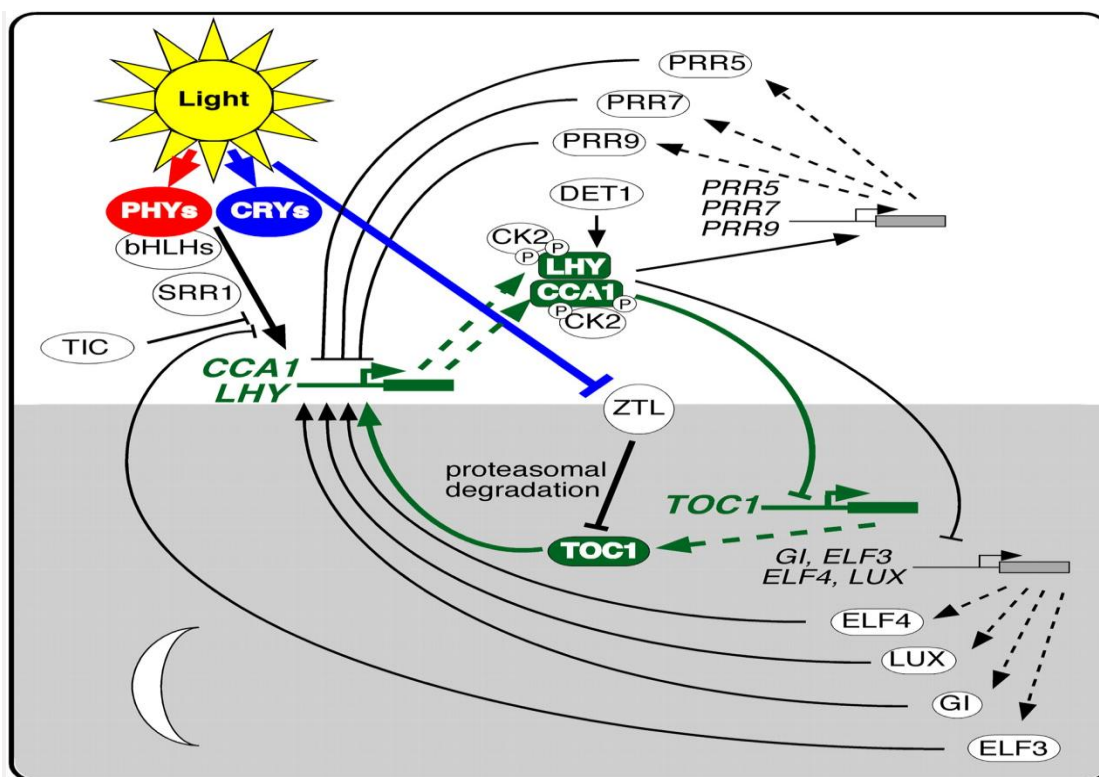
Το *Arabidopsis thaliana* ενώ έχει μελετηθεί αρκετά σαν φυτό και μπορεί να έχει έως 26 αποαδενυλάσες, το ένζυμο αποικοδόμησης της πολύ(A) ουράς εξακολουθεί να είναι ασαφές καθώς δεν έχουν μελετηθεί πλήρως στα φυτά η διαδικασία της αποαδενυλίωσης. Σε έρευνα εντοπίστηκε μια αποαδενυλάση, αντίστοιχη με αυτή της νοκτουρίνης των θηλαστικών, στο *Arabidopsis thaliana* η οποία μεταγράφεται πιο έντονα τις βραδινές ώρες. Εξαιτίας της νυχτερινής της έκφρασης, αναφέρεται ως *A.thaliana* Hesperin (AtHESP) από την ελληνική λέξη 'Έσπερος, που σημαίνει 'το αστέρι της νύχτας'. Η εσπερίνη, λοιπόν, είναι ένας νέος μεταγραφικός ρυθμιστής του κίρκαδικού ρυθμού και μπορεί και επηρεάζει την αποικοδόμηση της πολύ(A) ουράς και την έκφραση του πυρήνα του ταλαντωτή στα φυτά, όπως επίσης αποτελεί έναν αρνητικό ρόλο στην απόκριση των φυτών κατά της οξειδωτικής καταπόνησης.

Η AtHESP ανήκει στην υπεροικογένεια των EEP (Exonucleases-Endonucleases Phosphatase) των αποαδενυλασών και το γονίδιο κωδικοποιείται στο 3' άκρο πολύ(A) εξωριβονουκλεάσης. Η ρύθμιση του γονιδίου γίνεται από το κίρκαδικό ρολόι καθώς, επίσης, την ίδια στιγμή επηρεάζεται η μεταγραφή των κίρκαδικών ταλαντωτών που αναφέρονται στην αποαδενυλίωση και στην αλλαγή του mRNA ως μηχανισμό ρύθμισης του κίρκαδικού ρυθμού.

Η εσπερίνη, έχει αποδειχθεί ότι είναι ομόλογη της νοκτουρίνης, η οποία είναι κίρκαδικά ελεγχόμενη αποαδενυλάση, που απαντάται σε θηλαστικά και άλλους οργανισμούς, όπως και στα φυτά. Επιπλέον, δείχνει μια μεγάλη ομοιότητα με κάποιες αποαδενυλάσες της υπεροικογενείας των EEP, όπως την CNOT6 και CNOT6L.

Η αλλοστερική συμπεριφορά της AtHESP (που σχετίζεται με τη μεταβολή της δραστηριότητας ενός ενζύμου, μετά από επίδραση ενός μορίου σε μία πρωτεΐνη σε θέση διαφορετική από το ενεργό κέντρο) γίνεται πιο εύκολα κατανοητή αν λάβουμε υπόψη το ρόλο της πολύ(A) ουράς στη σταθερότητα του mRNA. Οι αποαδενυλάσες είναι ρυθμιζόμενα ένζυμα και η δραστηριότητά τους επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων, όπως ο υποκυτταρικός εντοπισμός, η μετά-μεταφραστική τροποποίηση, τα cis-δρώντα στοιχεία του στόχου mRNA και τα trans-δρώντα στοιχεία των ρυθμιστικών παραγόντων. Αποτελέσματα μιας έρευνας έδειξαν πως η AtHESP είναι ολιγομερές, πράγμα που ίσως αντιπροσωπεύει έναν ρυθμιστικό μηχανισμό. Κάτι ακόμα που έχει υπαινιχθεί, είναι πως οι αποαδενυλάσες δρουν παράλληλα με άλλες αποαδενυλάσες, και αυτό ίσως σημαίνει πως επιδρούν στο ίδιο mRNA με διακριτούς αλλά επικαλυπτόμενους τρόπους.

Η AtHESP συμβάλλει στον έλεγχο της κίρκαδικής γονιδιακής έκφρασης και έχει αποδειχθεί πως η αποαδενυλίωση και ο κύκλος εργασιών του mRNA επηρεάζουν του κίρκαδικούς ταλαντωτές μεταγραφής. Μεταλλαγμένα φυτά hesp που αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενους κύκλους φως/σκοτάδι, έχουν αρκετά διαταραγμένη τη ρύθμιση συσσώρευσης των γονιδίων του ρολογιού (TOC1, CCA1, LHY). Όπως και στη NOC των θηλαστικών, η ρυθμική έκφραση του γονιδίου μπορεί να είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει τον κίρκαδικό κανονισμό, αλλά και συστηματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η ανάπτυξη και η όποια καταπόνηση. Σε πείραμα υπερέκφρασης της AtHESP έχουν παρατηρηθεί τα επίπεδα έκφρασης των TOC1 και CCA1 σε περιβάλλον όπου τα επίπεδα της εσπερίνης ήταν αυξημένα. Σε αυτές τις διαγονιδιακές σειρές του φυτού διατηρήθηκε η κυκλική μορφή έκφρασης, παρόλο που ανηχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα των TOC1 και CCA1. Η έλλειψη αναστροφής φάσης της συσσώρευσης mRNA του TOC1 ή του CCA1 μας δείχνει, ότι κανένα από τα δύο αυτά γονίδια δεν αποτελεί στόχο της αποαδενυλάσης της AtHESP (Delis et al., 2015). Η AtHESP μπορεί να επηρεάσει τον κίρκαδικό ρυθμο του *Arabidopsis thaliana* με την αποαδενυλίωση ενός ή περισσότερων γονιδίων, επίσης, η υπερέκφρασή της ίσως να μην αρκεί για να διαταράξει τα σύμπλοκα που δημιουργούνται, γιατί όπως αποδείχθηκε και στο παραπάνω πείραμα, η εσπερίνη μπορεί να δρα και με άλλες αποαδενυλάσες για να ρυθμιστεί το κίρκαδικό ρολόι.



Εικόνα 4. Μοντέλο του Κίρκαδικού Ταλαντωτή του *Arabidopsis thaliana*.

Πηγή [The Plant Cell, Vlo. 18, Απρίλιος 2006]

Πιθανολογείται, πως η AtHESP μπορεί να παίζει ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες καταπονήσεων. Οι φαινότυποι με το μεταλλαγμένο γονίδιο HESP είναι πολύ πιο ανθεκτικοί και προστατεύονται καλύτερα στις οξειδωτικές καταπονήσεις. Πλέον, θεωρείται πως η AtHESP μπορεί να παίζει κύριο ρόλο στη ρύθμιση του κερκαδικού ρολογιού και στις διαδικασίες γύρω από τη λειτουργία του, όπως η απόκριση σε αβιοτικές, ή και βιοτικές καταπονήσεις. (Delis, et al., 2015)

Κεφάλαιο 4

4.1 Αβιοτικές καταπονήσεις

Οι ακραίες θερμοκρασίες, η ξηρασία και η αλατότητα έχουν δημιουργήσει διαδεδομένες απώλειες σε καλλιέργειες ανά τον κόσμο και πλέον υπάρχει πολύ περιορισμένη έκταση γης που να μπορεί να καλλιεργηθεί για γεωργικούς σκοπούς. Ως εκ τούτου, υπάρχει άμεση ανάγκη για ανάπτυξη αγροτεμαχίων που ανταποκρίνονται καλύτερα κάτω από αυτές τις συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Υπάρχουν πρόσφατες και πολύ ενδιαφέρουσες αποδείξεις ότι το κερκαδικό ρολόι συμβάλλει στην ικανότητα των φυτών να είναι πιο ανθεκτικά σε διαφορετικά είδη περιβαλλοντικών καταπονήσεων, και στο να τα εγκλιματίζει σε αυτές. Το ρολόι ελέγχει την έκφραση ενός μεγάλου κλάσματος γονιδίων που ανταποκρίνονται σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως επίσης μεταγενέστερα τη βιοσύνθεση και τη σηματοδότηση των ορμονών που είναι ευαίσθητες στις καταπονήσεις. Αντιστρόφως, τα αποτελέσματα αβιοτικών καταπονήσεων στην τροποποιημένη έκφραση και διαφοροποιημένη σύνδεση των γονιδίων του ρολογιού, οδηγούν σε altered oscillations of downstream stress-response μονοπάτια. Ωστόσο, υπάρχει ένα εύρος μηχανισμών από τους οποίους, αυτός ο οικείος δεσμός μεταξύ του κερκαδικού ρολογιού και των περιβαλλοντικών stress-response μονοπατιών, μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη και επιβίωση των φυτών κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων.

4.2 Οσμωτική καταπόνηση

Η εδαφική αλατότητα είναι μία σημαντική αβιοτική καταπόνηση, η οποία καταστέλλει την ανάπτυξη των φυτών και κατατάσσεται ανάμεσα στους πρωταρχικούς παράγοντες που μειώνουν την παραγωγικότητα της γεωργίας. Η φύση των φυτών έχει ευνοήσει την εξέλιξη μηχανισμών που να αντιμετωπίζουν ποικίλες συγκεντρώσεις αλατιού στο περιβάλλον. Το νάτριο (Na^+) δεν είναι ουσιώδες για την ανάπτυξη των φυτών, και κάτω από οσμωτική καταπόνηση, εμποδίζει την πρόσληψη του σημαντικού ανόργανου θρεπτικού υλικού καλίου (K^+) και ανταγωνίζεται για τη θέση δέσμευσης των ενζύμων του. Το να διατηρείς υψηλό κάλιο και χαμηλό νάτριο στο κυτόπλασμα είναι ουσιώδες για την ανθεκτικότητα του φυτού στην αλατότητα. Στο *Arabidopsis thaliana*, ενεργοποιήθηκε κάτω από συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης ένα ρυθμιστικό μονοπάτι ιοντικής ομοιόστασης και αναγνωρίστηκε μέσα από μοριακό και γενετικό χαρακτηρισμό από αρκετά μεταλλάγματα υπερευαίσθητα στο αλάτι (sos = salt overly sensitive), τα οποία είναι ελλιπή σε ομοιόσταση K^+/Na^+ (Liu and Zhu, 1998; Liu et al., 2000; Shi et al., 2000).

Το μονοπάτι SOS είναι γνωστό το ότι καθορίζεται από τρία πρωτεϊνικά συστατικά, SOS1, SOS2, SOS3. In vitro, η SOS3 διαδρά φυσικά και ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση SOS2. Το ασβέστιο δεν είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση της SOS2 με την SOS3, αλλά παρατηρήθηκε ότι ενισχύει τη φωσφορυλίωση του συνθετικού υποστρώματος p3 από το σύμπλοκο SOS2-SOS3 (Halfter et al., 2000).

Γενετικά αποδεικτικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι η SOS2 και η SOS3 λειτουργούν ενεργοποιώντας τη SOS1. Μεταλλάξεις στις SOS1, SOS2 και SOS3 μειώνουν την ανταλλακτική δραστηριότητα Na^+/H^+ (υδρογόνο) και μια συστατικά ενεργή SOS2 ενισχύει την ανταλλακτική δραστηριότητα Na^+/H^+ με ένα SOS2- εξαρτώμενο και SOS3- εξαρτώμενο τρόπο (Qui et al., 2002).

Η αναχαίτηση της ανάπτυξης των sos1 και sos2 μεταλλαγμάτων είναι δριμύτερη από αυτή του sos3 κάτω από ήπια οσμωτική καταπόνηση (Zhu et al., 1998). Η SOS1 και η SOS2 εκφράζονται σε ιστούς ριζών και βλαστών, προτείνοντας πως λειτουργούν σε διαφορετικούς τύπους ιστών (Liu et al., 2000; Shi et al., 2002). Όμως, έρευνες έδειξαν πως η SOS3 εκφράζεται κατά βάση στους ιστούς των ριζών. Φαίνεται, λοιπόν, εύλογο το γεγονός ότι μπορεί να υπάρχει επιπλέον αισθητήρας ασβεστίου, ο οποίος ρυθμίζει τη SOS2 στους βλαστούς.

Πειραματικό μέρος	
Σκοπός	της εργασίας
Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> σε εργαστηριακούς θαλάμους με ελεγχόμενες συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας. Σκοπός της πειραματικής μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανταπόκρισης του ζιζανίου σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης.	

1.1 Υλικά και μέθοδοι

ΥΛΙΚΑ

I. Φυτικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν 2 ειδών σπόροι του είδους *Arabidopsis thaliana*, ο αγρίου τύπου οικότυπος Columbia-0 και το μετάλλαγμα Hesp 1-1.

II. Θρεπτικό υλικό

- Agar

-MS (Murashige and Skoog Medium)

III. Συσκευές

-συσκευή υγρής αποστείρωσης

-ζυγός ακριβείας, τεσσάρων δεκαδικών

-όργανο μέτρησης pH

-θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας

-πιπέτες ακριβείας

-ποτήρια ζέσεως

-τρυβλία

-θάλαμος ανάπτυξης φυτών

-παραφίλμ (ένα εύκαμπτο πλαστικό, ανθεκτικό στην υγρασία που κρατάει έξω από το τρυβλίο τους διάφορους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα έκφυτα, κ.ά.)

ΜΕΘΟΔΟΙ

I. Αποστείρωση

Η αποστείρωση των σπόρων έγινε με την εξής διαδικασία:

- 2 λεπτά σε διάλυμα αιθανόλης (70% ethanol)
- 15 λεπτά σε διάλυμα υποχλωρίου του νατρίου (NaOCl με 5% χλωρίνη)
- ξέπλυμα με αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό για τουλάχιστον 5 φορές

*στο υποχλώριο του νατρίου (NaOCl) προσθέσαμε μια σταγόνα tween 20 για να μειωθεί η επιφανειακή τάση και να γίνει καλύτερη διαβροχή.

**Από επανάληψη σε επανάληψη, αφήνουμε περισσότερο χρόνο στο ξέπλυμα.

Ωσμωτική καταπόνηση

Σπορά

Η σπορά πραγματοποιήθηκε μετά από αποστείρωση σε τρυβλία Petri θρεπτικού διαλύματος και διαφορετικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου (NaCl).

1.	75	mM	NaCl
2.	100	mM	NaCl
3.	150	mM	NaCl
4.	200	mM	NaCl

Θρεπτικό διάλυμα

Το	θρεπτικό	διάλυμα	αποτελείται	από
(α)	MS	4,4	gr/lit	
(β)	Agar 1,3 %	(αντί για 1% , επειδή δε σταθεροποιούταν το gel)		
(γ)	τις παραπάνω συγκεντρώσεις	χλωριούχου νατρίου (NaCl)		.

Χρησιμοποιήθηκαν 6 μεγάλα τρυβλία Petri (500 ml διαλύματος)

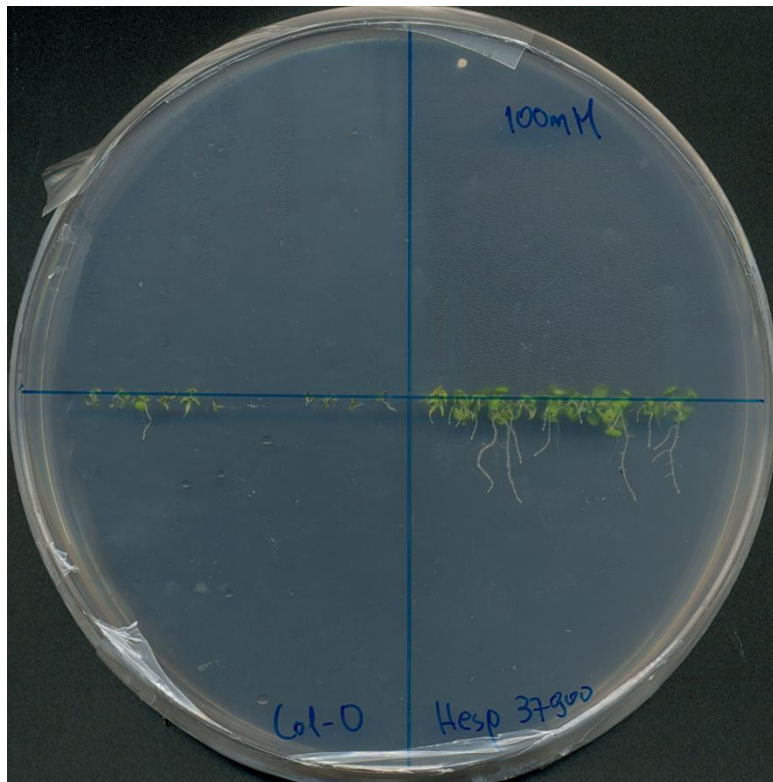
-4,4	gr/L	MS
-1,3	%	Agar
-	Σταθεροποίηση p,8 με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 1M(200μL)	
-2,2	gr	χλωριούχο νάτριο (NaCl) (75mM)
-3,0	gr	χλωριούχο νάτριο (NaCl) (100mM)

Τα τρυβλία αφήνονται στο θάλαμο σε φωτοπερίοδο 16/8 (16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι) για 7 ημέρες.

Δειγματοληψία

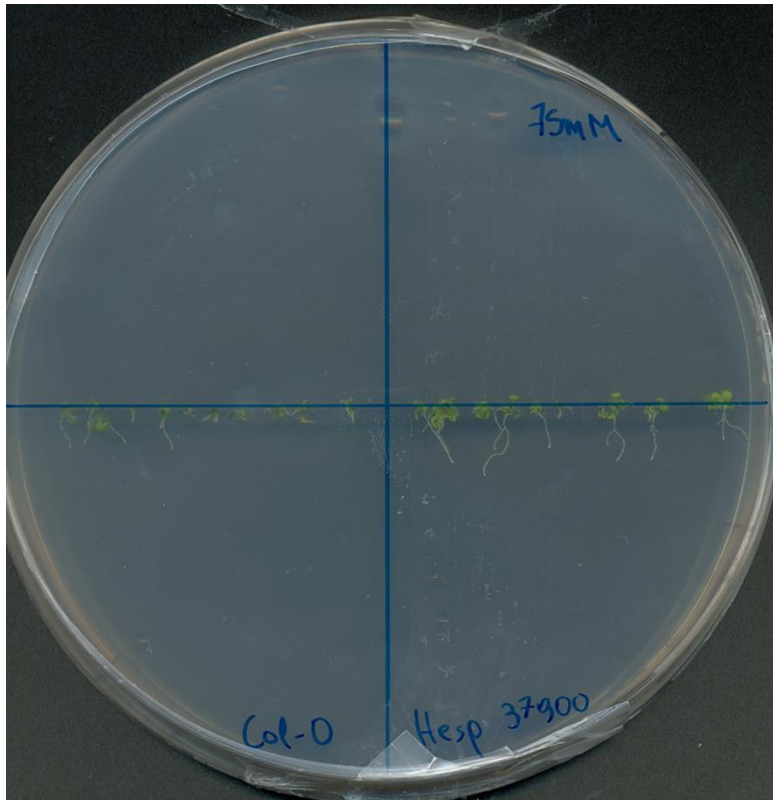
Έπειτα από 7 ημέρες, πραγματοποιούμε δειγματοληψία στο ριζικό σύστημα των φυτών. Αρχικά, κόβουμε τις ρίζες με ξυραφάκι και τις τοποθετούμε σε διάλυμα φορμόλης (37% φορμαλδευδη και νερό) για 15 λεπτά. Έπειτα τις ξεπλένουμε σε απιονισμένο νερό και τέλος, τις βάζουμε σε ερυθρό του ρουθινίου (χρωστική ουσία) για 10 λεπτά.

* Τα δείγματα με την περιεκτικότητα του χλωριούχου νατρίου σε 200mM δεν έδειξαν αξιοσημείωτα αποτελέσματα και απορρίφθηκαν.



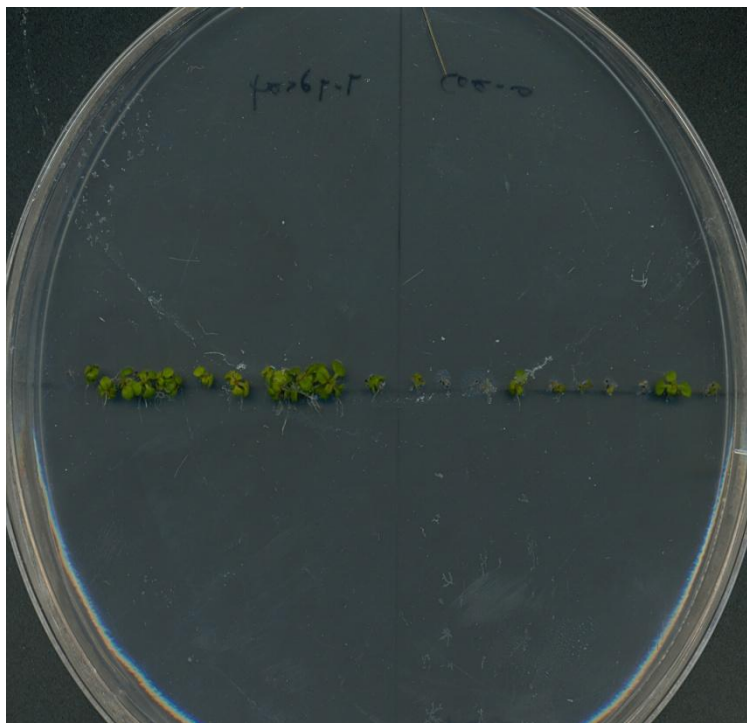
Αριστερά:
Σπορόφυτα αγρίου
τύπου *Arabidopsis
thaliana* σε 100 mM
χλωριούχου νατρίου.

Δεξιά: Σπορόφυτα
μεταλλάγματος Hesp
1-1 σε 100 mM
χλωριούχου νατρίου.



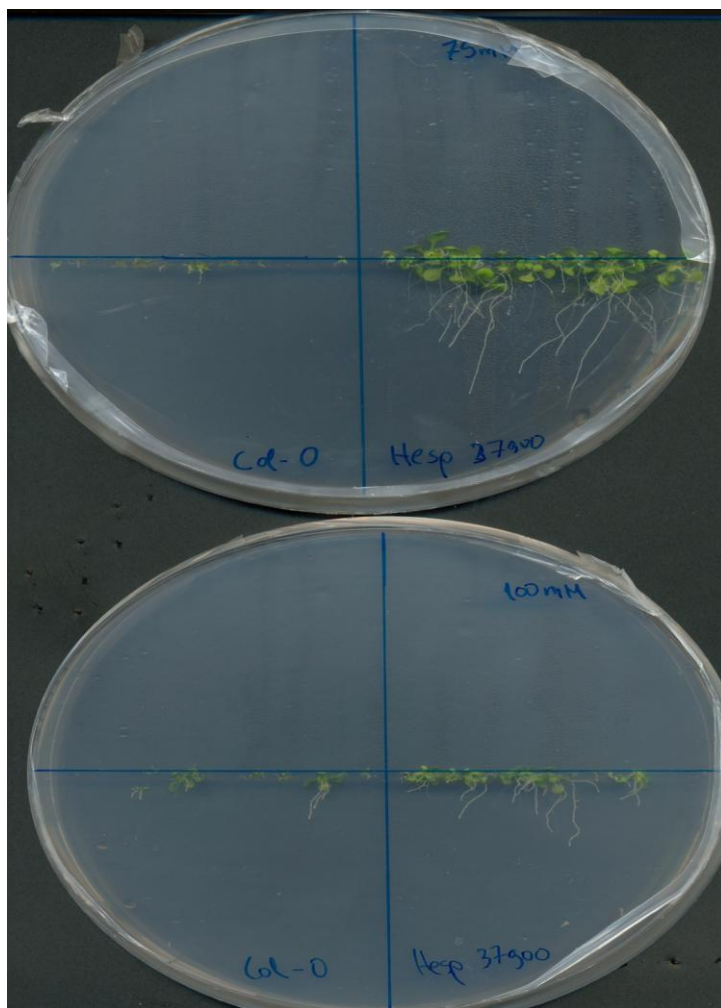
Αριστερά:
Σπορόφυτα αγρίου
τύπου *Arabidopsis*
thaliana σε 75 mM
χλωριούχου νατρίου.

Δεξιά: Σπορόφυτα
μεταλλάγματος Hesp
1-1 σε 75 mM
χλωριούχου νατρίου.



Αριστερά: Σπορόφυτα
μεταλλάγματος Hesp
1-1 σε 150 mM
χλωριούχου νατρίου.

Δεξιά: Σπορόφυτα
αγρίου τύπου
Arabidopsis thaliana σε
150 mM χλωριούχου
νατρίου.



Σύγκριση αγρίου τύπου(αριστερά) και μεταλλάγματος(δεξιά) σε 75mM(πάνω) και 100mM(κάτω)

Συμπεράσματα

Με τη διεκπεραίωση του πειράματος αυτού, καταλάβαμε πως με την απενεργοποίηση του γονιδίου έχουμε καλύτερα αποτελέσματα στην ανάπτυξη του φυτού κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, και συγκεκριμένα της οσμωτικής καταπόνησης. Οι ρίζες στα φυτά που αναπτύχθηκαν στις μικρότερες συγκεντρώσεις του χλωριούχου νατρίου ήταν πιο συνεκτικές από εκείνες στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Είναι, επίσης, οπτικά εμφανές το γεγονός ότι η ανάπτυξη σε όλες τις συγκεντρώσεις είναι καλύτερη στο μετάλλαγμα που χρησιμοποιήσαμε.

Οι κύριες παρατηρήσεις που κάναμε ήταν στα δείγματα με συγκέντρωση 75mM και 100mM , καθώς στα 150mM και στα 200mM ήταν πολύ ακραίες και δεν ήταν ιδιαίτερα εμφανής η διαφορά ανάμεσα στα δύο υποκείμενα.

Βιβλιογραφία

- Baggs, J. E. & Green, C. B., 2003. Nocturnin, a Deadenylase in *Xenopus levis* :A Mechanism for Posttranscriptional Control of Circadian-Related mRNA. *Current Biology*, 4 Φεβρουάριος, Issue 13, pp. 189-198.
- Delis, C. και συν ., 2015. AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly (A)-degrading activity in plants. *RNA Biology*, 30 Νοέμβριος, pp. 68-82.
- Harmer, S. L., Panda, S. & Kay, S. A., 2001. Molecular Bases of Circadian Rhythms. *S .I.: Annual Review of Cell and Developmental Biology*.
- Más, P., 2005. Circadian clock signaling in *Arabidopsis thaliana*: from gene expression to physiology and development. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 491-500
- McClung, C.R. (2006) Plant Circadian rhythms. *Plant Cell* 18, 792-803

- Gardner, M.J. et al. (2006) How plants tell the time. *Biochem. J.* 397, 15-24
- Harmer, S.L. et al. (2001) Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 215-253
- Brunner, M. and Schafmeier, T. (2006) Transcriptional and post-transcriptional regulation of the circadian clock of cyanobacteria and *Neurospora*. *Genes Dev.* 20, 1061-1074
- Schaffer, R. et al. (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93, 1219-1229
- Harmer, S.L. et al. (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290, 2110-2113
- Allakhverdiev, S. et al. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosyn. Res* 98, 541-550
- Boyer, J.S. (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218, 443-448
- Cabello, J.V. et al. (2014) Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 62-70
- Cook, B.I. et al. (2015) Unprecedented 21st century drought risk in the American Southwest and central Plains. *Sci. Adv* 1, e1400082.
- European Commission. (2007). Addressing the challenge of water scarcity and droughts in the European Union. Communication from the Commission to the European Parliament and the Council, COM (2007) 414, Brussels.
- Gerland, P. et al. (2014) . World population stabilization unlikely this century. *Science* 346, 234-237.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909-930.
- Hansen, J. et al. (2010). GLOBAL SURFACE TEMPERATURE CHANGE. *Rev. Geophys.* 48, RG4004
- Hoerling, M. et al. (2013). An interpretation of the origins of the 2012 central great plains drought. Assessment Report from the NOAA Drought Task Force Narrative Team.
- Hussain, S.S. et al. (2011). Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnol. Prog.* 27, 297-306.
- Krasensky, J., and Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangement and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 63, 1593-1608.
- Lawlor, D. W. (2012) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *J. Exp. Bot.* 64, 83-108.

- Lawrimore, J.H., et al. (2011). An overview of the Global Historical Climatology Network monthly mean temperature data set, version 3. *J. Geophys. Res. Atmos.* 116, D19121.
- Lobell, D.B., and Gourdji, S.M. (2012) The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiol.* 160, 1686-1697.
- Mittler, R. and Blimwald, E. (2015). The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell* 27, 64-70.
- Pearce, R.S. (2001). Plant freezing and damage. *Ann. Bot.* 87, 417-424.
- Salvucci, M. E., and Crafts-Brandner, S.J. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiol. Plant.* 120, 179-186.
- Sharkey, T.D. (2005) Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant Cell Environ.* 28, 269-277.
- Steponkus, P.L., and Webb, M. S. (1992). "Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants", in *Water and Life*, eds G. Somero, C. Osmond, and C. Bolis (Berlin: Springer), 338-362.
- Suzuki, N., et al. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 35, 259-270.
- Wahid, A. et al., (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199-223.
- Waltz, E. (2014). Beating the heat. *Nat. Biotechnol.* 32, 610-613
- Yamazaki, T., et al. (2009). Extracellular freezing- induced mechanical stress and surface area regulation on the plasma membrane in cold-acclimated plant cells. *Plant Signal. Behav.* 4, 231-133.
- Cumming, B.G., and Wagner, E. (1968). Rhythmic processes in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 19, 381-416
- Dunlap, J.C., et al. (2004). *Chronobiology: Biological Timekeeping*. (Sunderland, MA: Sinauer Associates).
- Nagy, F., et al. (1988). A circadian clock regulates transcription of the wheat Cab-1 gene. *Genes Dev.* 2, 376-382.
- Somerville, C., and Koornneef, M. (2002). A fortunate choice: The history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat. Rev. Genet.* 3, 883-889
- Halfter, U., et al. (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 3735-3740.
- Liu, J., et al. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 3730-3734

- Qiu, Q. S. , et al. (2004). Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the SOS pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 207-215.
- Shi, H., et al. (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* 14:465-477.
- Zhu, J.-K., et al., (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10: 1181-1192.