

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

**Σχολή Εφαρμοσμένης Βιολογίας και
Βιοτεχνολογίας**



Τμήμα Βιοτεχνολογίας

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

**ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ HSP90
ΚΑΙ ΜΠΡΑΣΣΙΝΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΤΟΥ ARABIDOPSIS THALIANA.**

Μεταπτυχιακή Διατριβή
που υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας του
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών ως μέρος των
απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού
Διπλώματος Ειδίκευσης στην Βιολογία Συστημάτων

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΜΗΛΙΩΝΗ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**ΦΟΙΤΗΤΗΣ
ΧΡΗΣΤΟΣ Π. ΚΙΝΟΠΟΥΛΟΣ**

Αθήνα
2020

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ποσοτική ανάλυση της επίδρασης των HSP90 και μπρασσινοστεροειδών
στην ανάπτυξη του Arabidopsis Thaliana»

«Quantitative analysis of the effect of HSP90 and brassinosteroids on the
development of Arabidopsis Thaliana»

ΧΡΗΣΤΟΣ Π. ΚΙΝΟΠΟΥΛΟΣ

Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή

Μηλιώνη Δήμητρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Παπαδόπουλος Γιώργος, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (Μέλος)

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 29/11/2018, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής.

Περίληψη

Οι μοριακοί συνοδοί αποτελούν βασικά στοιχεία συμβολής στην κυτταρική ομοιόσταση και βρίσκονται σε προκαρυωτικά κύτταρα, στο κυτταρόπλασμα και τα οργανίδια ευκαρυωτικών κυττάρων. Παράλληλα, οι μοριακοί συνοδοί βρίσκονται σε αφθονία στα κύτταρα, είναι πολυπληθέστεροι στους ευκαρυώτες και παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας. Μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα, διακρίνονται μοριακοί συνοδοί που είτε υποβοηθούν άλλες πρωτεΐνες για να τη σωστή αναδίπλωσή τους και τη διατήρηση της σωστής λειτουργίας τους είτε ενεργοποιούνται σε συνθήκες βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων. Η οικογένεια θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών HEAT SHOCK PROTEINS 90 (HSP90) υπάρχει στα κύτταρα ακόμα και όταν δεν υπάρχουν καταπονήσεις και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μορφογένεση, στην ανάπτυξη και την ορθή διαμόρφωση των κυττάρων όταν επικρατούν αντίξοες συνθήκες στον οργανισμό.

Το μπρασσινολίδιο BL αποτελεί το βιο-ενεργό μέλος της οικογένειας των φυτικών μπρασσινοστεροειδών ορμονών (BR). Τα μπρασσινοστεροειδή εμπλέκονται σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η κυτταρική επιμήκυνση και διαίρεση. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της BIN2 πρωτεΐνης, μιας κινάσης που ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασσινοστεροειδών και των HSP90. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του μπρασσινολιδίου και του θερμικού στρες στην ανάπτυξη του μεγέθους του υποκοτύλιου του φυτού *Arabidopsis thaliana* στο σκοτάδι σε φυτά αγρίου τύπου και σε μεταλλάγματα *hsp90*.

Λέξεις-κλειδιά: *αραβιδόψις, θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες, HSP90, μπρασσινοστεροειδή, μπρασσινολίδιο, υποκοτύλιο, HSP90.1, HSP90.3*

Abstract

The molecular chaperones are major contributors to cellular cell homology and they are found in prokaryotic cells, in the cytoplasm and organoids of eukaryotic ones. At the same time, molecular chaperones are abundant in cells, are more populous in eukaryotes and have a high degree of homology. Within eukaryotic cells, the molecular chaperones are distinguished into those that either assist other proteins to properly fold and maintain their proper function either are activated under conditions of biotic and / or abiotic stress. The family of HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) is essential because it is present in the cells even when they are not stressed and plays a role in the morphogenesis, the growth and the proper conformation of cells when unfavorable conditions take place.

Brassinolide (BL) is the bioactive member of the family of the plant hormones, brassinosteroids (BR). These types of steroids show structural similarities to animal and insect steroid hormones and are involved in numerous developmental processes such as cellular elongation and division. Recent experimental data have shown that there is a physical interaction between BIN2 protein and HSP90, implicating the later in the BR signal transduction pathway. The present study has evaluated the effect of brassinolide and temperature on the size of the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl in the dark in wild type and in *hsp90* mutants.

Key-words: *arabidospis thaliana*, *heat shock proteins*, *HSP90*, *brassinosteroids*, *brassinolide*, *hypocotyl*, *HSP90.1*, *HSP90.3*

Πίνακας περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Μοριακοί Συνοδοί	1
1.2 Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (<i>Heat Shock Proteins</i>)	2
1.2.1 Κατηγοριοποίηση των Θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών	4
1.2.2 Η οικογένεια HSP100	4
1.2.3 Η οικογένεια HSP70	5
1.2.4 Η οικογένεια HSP60/chaperonines (τσαπερονίνες)	6
1.2.5 Η οικογένεια HSP10-30 (small HSPs)	6
1.2.6 Η οικογένεια HSP90	7
1.3 Μπρασσινοστεροειδή (<i>BRassinosteroids</i>)	10
1.4 Αλληλεπίδραση των <i>Hsp90</i> και των Μπρασσινοστεροειδών στο <i>Arabidopsis Thaliana</i>	12
1.5 Οργανισμός - Μοντέλο <i>Arabidopsis Thaliana</i>	13
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1 Εισαγωγή	16
2.2 Υλικά	17
2.3 Μέθοδοι	19
2.3.1 Καλλιέργεια σπορόφυτων <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.3.2 Επαγωγική Στατιστική	19
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	21
3.1 Φαινοτυπική απεικόνιση	21
3.2 Περιγραφική και Επαγωγική Στατιστική	23
3.2.1 Φυτά πέντε ημερών μετά την φύτευση (5dag)	24
3.2.2 Φυτά επτά ημερών μετά την φύτευση (7dag)	34
3.2.3 Έλεγχοι μέσων μηκών των γενοτύπων ανά ποσότητα ορμόνης	44
3.2.4 Απόκριση διάμεσου μήκους υποκοτυλίου στο μπρασσινολίδιο	50
3.2.5 Έλεγχοι μέσων αποκρίσεων με δύο παράγοντες	53
3.2.6 Μοντέλο Ανάλυσης Παλινδρόμησης	55
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	66

*Στην οικογένειά μου,
Και στους Γιώργο και Εμμανουέλα*

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ εκ βάθους καρδίας την Καθηγήτριά μου, κυρία Μηλιώνη Δήμητρα, η οποία με αφοσίωση με καθοδήγησε σ' όλη την διάρκεια της συγγραφικής μου προσπάθειας στη διπλωματική μου εργασία. Ευχαριστώ επίσης την Ρόκα Λουκία, την Παναγιώτα Πλίτση, τον κύριο Χατζόπουλο Πολυδεύκη και την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου της Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για το δείγμα που παραχωρήθηκε προς μελέτη.

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μοριακοί Συνοδοί

Όταν απελευθερώνονται από τα ριβοσώματα καινούργια, νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια, χρειάζεται να αποκτήσουν τη σωστή δομή τους, την οποία θα διατηρήσουν σε όλη την μετέπειτα ζωή τους για να παραμείνουν λειτουργικά. Κατά κύριο λόγο, το ρόλο αυτό αναλαμβάνουν οι μοριακοί συνοδοί. Ως μοριακοί συνοδοί ορίζεται μία ομάδα διαφορετικών πρωτεϊνών που έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τη σταθεροποίηση άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται σε ασταθείς, μη φυσιολογικές δομικές καταστάσεις. Αυτή η σταθεροποίηση επιτυγχάνεται μέσω της ελεγχόμενης δέσμησης και αποδέσμησης της πρωτεΐνης υποστρώματος (Liang & MacRae, 1997).

Οι μοριακοί συνοδοί, ως βασικά συστατικά που συμβάλλουν στην κυτταρική ομοιόσταση των κυττάρων, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και σε οργανίδια του κυττάρου όπως τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες και τέλος, το ενδοπλασματικό δίκτυο. Φαίνεται ότι διαφορετικές ομάδες μοριακών συνοδών δεσμεύουν συγκεκριμένες δομές και υποστρώματα. (Wang *et al.*, 2004).

Οι μοριακοί συνοδοί αλληλοεπιδρούν με τις πρωτεΐνες – στόχους και έχουν την ικανότητα (α) να αναδιπλώνουν ορθά πρωτεΐνες που έχουν μετουσιωθεί λόγω συνθηκών πίεσεως, για παράδειγμα, θερμικό σοκ (β) να αποικοδομούν πρωτεΐνες (Lindquist & Craig, 1988) (γ) να μεταφέρουν πρωτεΐνες δια μέσω μεμβρανών σε συγκεκριμένα οργανίδια του κυττάρου και (δ) να αναδιπλώνουν πρωτεΐνες προκειμένου να αποκτήσουν την τριτοταγή δομή για να είναι λειτουργικά σωστές (Boston *et al.*, 1996).

Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι μοριακοί συνοδοί βρίσκονται σε αφθονία στα κύτταρα. Παράλληλα, οι συνοδοί που βρίσκονται στους ευκαρυώτες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας και είναι πολυπληθέστεροι από τους συνοδούς που βρίσκονται στους προκαρυώτες. Επιπλέον μία αντίθεση των δύο Βασιλείων είναι πως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι συνοδοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και κατηγοριοποιούνται σε (α) μοριακούς συνοδούς που σχετίζονται με την παραγωγή και ωρίμανση των πρωτεϊνών (β) μοριακούς συνοδούς που είναι ενεργοί σε συνθήκες καταπόνησης (Albenese *et al.*, 2006).

1.2 Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat Shock Proteins)

Οι οργανισμοί που υπάρχουν μέχρι σήμερα, από τους ευκαρυωτικούς μέχρι τα αρχαιοβακτήρια και από τα ποντίκια μέχρι τα φασόλια σόγιας, έχουν αναπτύξει σχέδια άμυνας και προστασίας για να επιβιώσουν στις αντίξοες συνθήκες και τις αλλαγές του περιβάλλοντος. Έτσι, όταν υπάρχει πίεση ή σύνολο πιέσεων αβιοτικού χαρακτήρα, τα γονίδια αυτά εκφράζονται και οι πρωτεΐνες που παράγονται προστατεύουν την λειτουργία των κυττάρων, των ιστών και εν τέλει του οργανισμού ολόκληρου.

Πιο συγκεκριμένα, όταν ένας οργανισμός εκτίθεται σε αυξημένες θερμοκρασίες, αρχίζουν να συντίθενται ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνών, υψηλά συντηρημένων, που ονομάζονται θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (HEAT SHOCK PROTEINS, HSP). Αυτή η σύνθεση και παραγωγή γίνεται σε όλους τους ιστούς και κατά επέκταση σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά ομολογίας μεταξύ των ευκαρυωτών, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις έχουν αναγνωρισθεί ομόλογες πρωτεΐνες και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Το ποσοστό ομολογίας μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών είναι της τάξης του 50% (Emelyanov, 2002).

Ο Ferruccio Ritossa ήταν ο πρώτος που περιέγραψε ένα χαρακτηριστικό μοτίβο των χρωμοσωμάτων σε πειράματα στην *Drosophila busckii* όταν υπήρχε ο παράγοντας θερμότητα και δημοσίευσε την έρευνα του το 1962 (Ritossa, 1962). Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην αναγνώριση των πρωτεϊνών heat shock και η πρώτη δημοσίευση περί αυτών ανήλθε το 1974 (Tissieres *et al.*, 1974).

Είναι αποδεκτό ότι κάθε ζωντανός οργανισμός έχει μία θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται φυσιολογικά τα κύτταρά του και μπορούν να λειτουργήσουν ορθά. Η άνοδος της προκαλεί σε σύντομο χρονικό διάστημα την ενεργοποίηση γονιδίων όπου ύστερα από τις διαδικασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης, υπάρχουν πια σε αφθονία οι αποτελεσματικές θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Όσο τα κύτταρα απέχουν από το εύρος των κανονικών θερμοκρασιών τους, τόσο η προτεραιότητα τους είναι η παραγωγή HSPs για να μην επέλθει η δυσλειτουργία και τελικά, ο θάνατός τους (Lindquist S. , 1986). Η μέγιστη παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών δεν σημαίνει δε ότι είναι η καταλληλότερη για το κύτταρο και τον οργανισμό, αντιθέτως, η αλόγιστη παραγωγή τους πιθανόν να είναι τοξική. Για αυτό το λόγο υπάρχει πάντα μια αυτορρύθμιση στους οργανισμούς για την παραγόμενη ποσότητα των HSP (Kalmar & Greensmith, 2009).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες υψηλής «πίεσης» δεν αντιμετωπίζουν καταστάσεις μόνο θερμικού σοκ. Λόγου χάριν, αντιμετωπίζουν καταπονήσεις που ασκούνται από το εξωτερικό περιβάλλον, όπως υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και καταστάσεις παθοφυσιολογίας όπως νευροορμονικό σοκ και υπερτροφία. Επιπροσθέτως, είναι παρούσες ακόμα και όταν δεν υπάρχει καμία καταπόνηση, όπως σε κυτταρικό κύκλο και ανάπτυξη του κυττάρου (Morimoto, 1998) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Συνθήκες που προκαλούν την παραγωγή των HSP.

Καταπόνηση από το περιβάλλον

Θερμικό Σοκ	Αναστολείς Ενέργειας- Μεταβολισμού
Ανάλογα Αμινοξέα	Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου
Βαρέα Μέταλλα	

Κατάσταση παθοφυσιολογίας

Πυρετός και Φλεγμονή	Βακτηριακή Μόλυνση
Νευροορμονικό Σοκ	Τραυματισμός ιστού και επιδιόρθωση
Υπερτροφία	Γήρανση
Τραυματισμός νευρώνων	Ισχαιμία
Οξειδωτικός Τραυματισμός	

Μη εμφάνιση καταπόνησης

Κυτταρικός Κύκλος	Παράγοντες Ανάπτυξης και Διαφοροποίησης του κυττάρου
-------------------	---

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, για την παραγωγή των πρωτεϊνών HSP υπάρχει ένας μεταγραφικός παράγοντας θερμικού σοκ (*Heat Shock Factor, HSF*) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα και είναι ανίκανος να δεσμευτεί στο DNA. Υπό συνθήκες καταπόνησης, η ροή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών οδηγεί σε τριμερισμό του HSF. Έπειτα, τα τριμερή μετατοπίζονται προς τον πυρήνα και δεσμεύονται στον υποκινητή των *HSP* γονιδίων για να ακολουθήσει η μεταγραφή τους (Morimoto, 1993).

Γενικά, έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί σχετικά με τον τρόπο που οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες προστατεύουν τα κύτταρα (Parsell & Lindquist, 1993). Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, οι HSPs παρεμποδίζουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων από αδρανείς πρωτεΐνες και επάγουν την πρωτεόλυσή τους. Σύμφωνα με τον δεύτερο μηχανισμό, οι HSPs λειτουργούν και ως μοριακοί συνοδοί

υποβοηθώντας άλλες πρωτεΐνες είτε για να αναδιπλωθούν σωστά είτε για να διατηρήσουν την ορθή τους διαμόρφωση σταθεροποιώντας τις μετουσιωμένες μορφές αυτών. Κοινό γνώρισμα των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών είναι η αναγνώριση και η αλληλεπίδραση με την υδροφοβική περιοχή πολυπεπτιδίων είτε μετά από αποδιοργάνωση της πρωτεΐνης λόγω περιβαλλοντικών πιέσεων είτε κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και αναδίπλωσης των πρωτεϊνικών αλυσίδων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (Ellis & Hartl, 1999).

1.2.1 Κατηγοριοποίηση των Θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών.

Τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν περιγράψει διαφορετικές οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών. Αυτές κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος (kDa) (Al-Whaibi, 2011). Έτσι, οι πιο σημαντικές οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών με το μοριακό βάρος τους και την περιοχή του κυττάρου όπου βρίσκονται και δρουν, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Κατηγοριοποίηση των HSPs με βάση το μοριακό τους βάρος.

<u>Πρωτεΐνες θερμικού σοκ</u>	<u>Μοριακό Βάρος (kDa)</u>	<u>Κυτταρικές Περιοχές</u>
HSP100	80-115	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο και κυτταρόπλασμα
HSP90	82-96	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρόπλασμα
HSP70	67-76	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρόπλασμα
HSP60	58-65	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρόπλασμα
Small HSPs	12-40	Κυτταρόπλασμα

1.2.2 Η οικογένεια HSP100

Η οικογένεια των πρωτεϊνών HSP100 αποτελεί μέλος μίας μεγαλύτερης υπεριοικογένειας, της AAA ATP-άσης με ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών λειτουργικών ιδιοτήτων. Αυτές οι HSPs παίρνουν μέρος σε διαδικασίες όπως : (α) η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, (β) η αντιγραφή του DNA, (γ) η αναδίπλωση των πρωτεϊνών, (δ) η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και (ε) η μεταφορά πρωτεϊνών δια μέσω των μεμβρανών.

Οι HSP100 διακρίνονται για την ικανότητα τους να διαταράσσουν πρωτεϊνικά συσσωματώματα με έναν ATP- εξαρτώμενο μηχανισμό (Hartl & Hayer-Hartl, 2002)

Η οικογένεια απαρτίζεται από δύο σημαντικές τάξεις και οχτώ διακριτές υποομάδες μέσα σε αυτές τις τάξεις. Τα μέλη της πρώτης τάξης (A, B, C, D) περιέχουν δύο περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίων για το ATP ενώ τα μέλη της δεύτερης (M, N, X, Y) έχουν μόνο μία περιοχή δέσμευσης.

Οι εν λόγω πρωτεΐνες έχουν καταγραφεί σε πολλά είδη του φυτικού βασιλείου όπως στο ρύζι, στον καπνό, το *Arabidopsis*, στη σόγια, στο μπιζέλι, στο καλαμπόκι και στο σιτάρι. Επίσης, η οικογένεια συνοδών HSP100 εκφράζεται σταδιακά στα φυτά αφού η ένταση της έκφρασης ρυθμίζεται από τις περιβαλλοντικές καταστάσεις σοκ, για παράδειγμα, τη ζέστη, το κρύο, την αλατότητα και την αφυδάτωση (Wang, Vinocur, Shoseyov, & Altman, 2004).

1.2.3 Η οικογένεια HSP70

Πρόκειται επίσης για μία από τις συντηρημένες οικογένειες πρωτεϊνών. Το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των ευκαρυωτικών αναλόγων κυμαίνεται μεταξύ 50% με 98% ενώ μεταξύ των προκαρυωτικών μελών είναι της τάξης του 50% (Craig *et al.*, 1993). Σε επίπεδο αμινοξικό υπάρχει ομοιότητα 76% ανάμεσα στα κυτταροπλασματικά μέλη της ντομάτας και του ανθρώπου, ενώ μεταξύ *Saccharomyces cerevisiae* και ντομάτας υπάρχει 72% ομοιότητα (Becker & Craig, 1994).

Τα μέλη της οικογένειας αυτής συναντώνται σε διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια και για αυτό υπάρχουν τρεις διαιρέσεις: (α) Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει μέλη που βρίσκονται σε μιτοχόνδρια, και αν πρόκειται για φυτικούς οργανισμούς, και σε χλωροπλάστες. (β) Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει μέλη που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και διακρίνεται σε δύο υποδεέστερες ομάδες. Τις HSC70 που εκφράζονται συνέχεια σε φυσιολογικές συνθήκες και τις HSP70 πρωτεΐνες που η έκφρασή τους επάγεται κάτω από συνθήκες καταπόνησης (Parsell & Lindquist, 1993) και (γ) μέλη που υπάρχουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπως οι BiP πρωτεΐνες που ρυθμίζουν άλλες πρωτεΐνες ή οι GRP78 πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από την γλυκόζη (Anderson *et al.*, 1994).

Οι HSP70 περιλαμβάνουν δύο διακριτές περιοχές, μία πολύ συντηρημένη αμινοτελική περιοχή στην οποία υπάρχει μία θέση δέσμευσης για ATP και μία λιγότερο

συντηρημένη καρβοξυ-τελική περιοχή μέσω της οποίας οι πρωτεΐνες αυτές αλληλοεπιδρούν με τα υποστρώματά τους (Schlesinger, 1990).

Τέλος, στις λειτουργίες των HSP70 συμπεριλαμβάνονται (α) η παρεμπόδιση συσσωμάτωσης πρωτεϊνών, (β) η συγκρότηση των ριβοσωμάτων (γ) η μεταφορά των πρωτεϊνών από και προς τον πυρήνα (δ) η μεταγραφή (ε) η βοήθεια στο σωστό δίπλωμα των πρωτεϊνών και (στ) ο ποιοτικός έλεγχος κάτω από φυσιολογικές και στρεσογόνες συνθήκες (Becker & Craig, 1994; Schlesinger, 1990).

1.2.4 Η οικογένεια HSP60/chaperonines (τσαπερονίνες)

Οι HSP60 πρωτεΐνες εντοπίζονται στους ευκαρωτικούς οργανισμούς, στη μήτρα των μιτοχονδρίων (μιτοχονδριακή Cnp60) και στο στρώμα των χλωροπλαστών (πλαστιδιακή Cnp60), και στο κυτταρόπλασμα του *Escherichia coli*. (Parsell & Lindquist, 1993).

Η οικογένεια αυτή αποτελείται από δύο ομάδες μορίων : Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις TRiC/CCT πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρωτικών οργανισμών και εμπλέκονται στις διαδικασίες αναδίπλωσης πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες GroEL/GroES (HSP60/HSP10), όπου εμπλέκονται στα βακτήρια και στα κυτταρικά οργανίδια των θηλαστικών (Nover & Scharf, 1997).

1.2.5 Η οικογένεια HSP10-30 (small HSPs)

Πρόκειται για την λιγότερη συντηρημένη και την πιο ασαφή λειτουργικά οικογένεια των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Vierling, 1991) και χαρακτηρίζονται από μικρό ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους που κυμαίνεται περίπου στο 30% σε αμινοξικό επίπεδο. Επιπροσθέτως, η οικογένεια αυτή συναντάται τόσο στους ευκαρωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (Boston *et al.*, 1996).

Οι πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν κυρίως ως συν-τσαπερόνια αφού δεν είναι ικανές μόνες τους να επάγουν αναδίπλωση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, παρά μόνο με τη βοήθεια κάποιου συστήματος τσαπερονίων, όπως, για παράδειγμα, το DnaK (HSP70) σύστημα (Ehrnsperger *et al.*, 1997).

Στα ανώτερα φυτά έχουν περιγράψει έξι οικογένειες γονιδίων που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες . Έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια αυτά δεν εκφράζονται μόνο σε

συνθήκες καταπόνησης αλλά και σε φυσιολογικές συνθήκες σε αναπαραγωγικά όργανα του φυτού στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης (Waters *et al.*, 1996).

1.2.6 Η οικογένεια HSP90

Οι HSP90 ανιχνεύονται σε πολλή μεγάλη αφθονία στα κύτταρα των οργανισμών, καθώς αποτελούν το 1-2% των συνολικών κυτταρικών πρωτεϊνών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (Lai *et al.*, 1984). Συνιστούν μία πολύ συντηρημένη οικογένεια μοριακών «συνοδών», η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά συντήρησης μεταξύ εξελικτικά απομακρυσμένων ειδών και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 82 μέχρι 96 KD. Μεταξύ των ευκαρυωτικών μελών, τα επίπεδα ομοιότητας σε αμινοξικό επίπεδο είναι της τάξης του 70%.

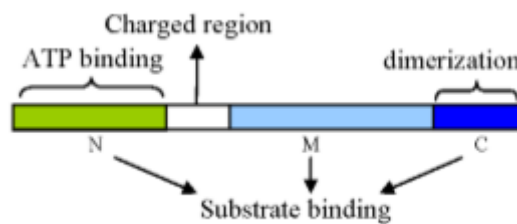
1.2.6.1 Χαρακτηριστικά και μηχανισμοί των HSP90

Τα επίπεδα τους αυξάνονται σε καταστάσεις θερμικής καταπόνησης, με αποτέλεσμα να αποτελούν το 4%-6% των κυτταρικών πρωτεϊνών στο κύτταρο (Wegele *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2001). Διαφέρει από άλλους μοριακούς συνοδούς όπως οι HSP70 και GroEL/ES, στο ότι δεν απαιτείται στην *de novo* αναδίπλωση των περισσότερων πρωτεϊνών και διευκολύνει την τελική ωρίμανση συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Nathan *et al.*, 1997).

Εκτός από το βασικό τους ρόλο δηλαδή την εμπλοκή τους στην απόκριση των οργανισμών σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις μέσω του ελέγχου της ορθής διαμόρφωσης ή αποικοδόμησης των πρωτεϊνών (Lu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Samakovli *et al.*, 2007; Jarosz & Lindquist, 2010), οι HSP90 φαίνεται ότι εμπλέκονται σε ποικίλους μοριακούς μηχανισμούς που είναι καθοριστικοί για την μορφογένεση και την ανάπτυξη. Έχει αποδειχθεί ότι οι HSP90 εμπλέκονται και σε καταπονήσεις, σε ελεγκτικούς μηχανισμούς διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης καθώς και σε πλήθος αναπτυξιακών διαδικασιών ρυθμίζοντας τοπικά, χρονικά και ποσοτικά τη «σταθερότητα» και λειτουργικότητα των πρωτεϊνών-στόχων τους (Tairale *et al.*, 2010; Samakovli *et al.*, 2014; Samakovli *et al.*, 2007). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πρωτεϊνών-στόχων είναι οι κινάσες, οι υποδοχείς ορμονών, μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται σε μονοπάτια μετάδοσης σήματος και αποτελούν βασικά συστατικά ποικίλων κυτταρικών διεργασιών και της εξελικτικής διαδικασίας (Tairale *et al.*, 2010).

Η δομή

Η θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη 90 ανιχνεύεται σαν ένα ομοδιμέρες και αποτελείται από τρεις συνδεδεμένες περιοχές, την N-τελική περιοχή που περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του ATP (ATP-περιοχή δέσμευσης), μία ενδιάμεση περιοχή (M) και μία C-τελική περιοχή διμερισμού (C περιοχή) (Li *et al.*, 2012).



Εικόνα 1: Το δομικό μοντέλο των *HSP90*
(Xu *et al.*, 2012)

Πιο συγκεκριμένα η αμινοτελική περιοχή (N) είναι η περιοχή δέσμευσης ATP και είναι υπεύθυνη για την ενδογενή ενεργότητα ATPάσης του μορίου. Έχει δειχθεί ότι η υδρόλυση του ATP συνοδεύεται από αλλαγές στη διαμόρφωση και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων (Ali *et al.*, 2006).

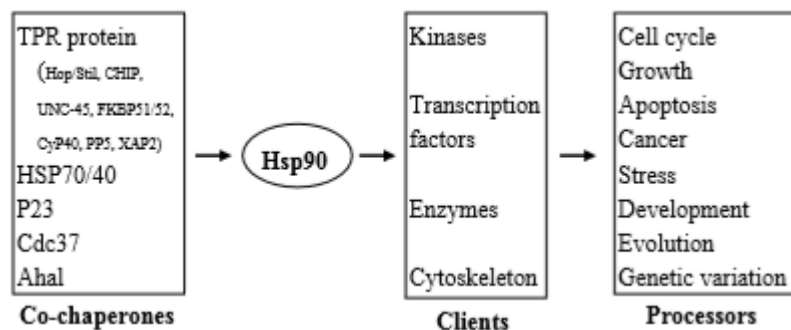
Η ενδιάμεση περιοχή (M) συνδέεται με την αμινοτελική περιοχή με μία φορτισμένη περιοχή-σύνδεσμο (linker) πενήντα αμινοξέων που παίζει σημαντικό ρόλο στην δέσμευση των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων (Pearl & Prodromou, 2000). Η περιοχή αυτή δεν είναι απαραίτητη για Hsp90 και βοηθά κυρίως σε ομοιοπολικούς δεσμούς, συντονίζοντας την N και την M περιοχή για να διατηρήσει τη διαμόρφωση της σύνδεσης Hsp90 με ATP (Xu *et al.*, 2012). Η δομική ομολογία μεταξύ των HSP90 και της γυράσης B του DNA (GyrB) δείχνει την M-περιοχή σαν την πρωταρχική θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Η περιοχή M περιέχει ένα καταλυτικό δακτύλιο που μπορεί να αντιληφθεί την παρουσία της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP και να συνδυαστεί με αυτό (Xu *et al.*, 2012).

Η καρβοξυ-τελική περιοχή (C) έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητη για τον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης. Επίσης τα κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας χαρακτηρίζονται από την παρουσία του πενταπεπτιδίου MEEVD (Gurta, 1995), το

οποίο θεωρείται απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με πρωτεϊνικά μόρια που φέρουν επαναλήψεις τετρατρικοπεπτιδίων (TPR) (Xu *et al.*, 2012).

Οι Βοηθητικές πρωτεΐνες

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες συμμετέχουν έμμεσα στην μεταγωγή σήματος, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες που αλληλοεπιδρούν με τις HSP90 θα μπορούσαν να χωριστούν σε τρεις ομάδες: α) τις βοηθητικές πρωτεΐνες (co-chaperones), β) τους ρυθμιστικούς παράγοντες (ρυθμιστές) και γ) τις πρωτεΐνες υποστρώματος. Οι βοηθητικές πρωτεΐνες βοηθούν τις HSP90 να συνδέονται με τις πρωτεΐνες υποστρώματος για να διατηρήσουν τη σταθερότητά τους. Οι ευκαρυωτικές πρωτεΐνες HSP90 απαιτούν βοηθητικές πρωτεΐνες και ρυθμιστικούς παράγοντες για να ρυθμίσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ τους και των πρωτεϊνών υποστρώματος, οι οποίες μαζί παρέχουν τις διάφορες φυσιολογικές δραστηριότητες των HSP90 (Xu, *et al.*, 2012).



Εικόνα 2: Οι λειτουργίες των *HSP90* και των βοηθητικών τους πρωτεϊνών (co-chaperones) διασαφηνίστηκαν μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με ποικίλα υποστρώματα (clients) σε διαφορετικές αναπτυξιακές φάσεις στα κύτταρα (Xu *et al.*, 2012).

Γονίδια που κωδικοποιούν για τις HSP90 στο *Arabidopsis thaliana*

Στον οργανισμό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν επτά γονίδια που κωδικοποιούν για τις HSP90 πρωτεΐνες (Πίνακας 4). Ειδικότερα συμπεριλαμβάνει α) τέσσερα κυτταροπλασματικά μέλη (*HSP90.1*, *HSP90.2*, *HSP90.3* και *HSP90.4*) που σε αμινοξικό επίπεδο παρουσιάζουν ομολογία της τάξης του 85%, β) ένα χλωροπλαστικό (*HSP90.5*) (Cao *et al.*, 2003), γ) ένα μιτοχονδριακό (*HSP90.6*) (Prassinos *et al.*, 2008) και δ) ένα που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό (*HSP90.7*) (Ishiguro *et al.*, 2008).

Πίνακας 3: *HSP90* γονίδια του *Arabidopsis thaliana*

Όνομα Γονιδίου	Αριθμός Αμινοξέων	Χρωμόσωμα
<i>AtHSP90.5</i>	780	II
<i>AtHSP90.6</i>	799	III
<i>AtHSP90.7</i>	823	IV
<i>AtHSP90.1</i>	705	V
<i>AtHSP90.4</i>	699	V
<i>AtHSP90.3</i>	668	V
<i>AtHSP90.2</i>	728	V

Παρόλο που τα κυτταροπλασματικά μέλη παρουσιάζουν εκτεταμένες ομολογίες, τα τέσσερα γονίδια μπορούν να διακριθούν σε δύο ομάδες: α) το *HSP90.1* που αποτελείται από τέσσερα εξόνια και β) τα *HSP90.2, -3, -4* που αποτελούνται από τρία εξόνια, με σχεδόν συστατική έκφραση και εξαιρετικά μεγάλη ομολογία μεταξύ τους (Milionis & Hatzopoulos, 1997). Βιοπληροφορική ανάλυση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών *HSP90* πρωτεϊνών υποδεικνύει ότι όλα τα μέλη περιέχουν σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signals) και πυρηνικές αλληλουχίες εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear Export Sequences). Μια σαφής διαφορά μεταξύ της *HSP90.1* πρωτεΐνης και των άλλων κυτταροπλασματικών μελών είναι η παρουσία ενός πρόσθετου μοτίβου NLS.

1.3 Μπρασσινοστεροειδή (BRassinosteroids)

Τα μπρασσινοστεροειδή (BRs) αποτελούν μία κατηγορία φυτικών πολύ-υδροξυστεροειδών που είναι δομικά όμοια με τις στεροειδείς ορμόνες των ζώων και των εντόμων. Εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς του φυτικού βασιλείου και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως είναι η κυτταρική επιμήκυνση και διαίρεση, η φωτομορφογένεση, η γήρανση, η διαφοροποίηση του αγγειακού συστήματος, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και η άμυνα εναντίον παθογόνων οργανισμών (Clouse S. , 2002; Krishna, 2003).

Μεταλλάγματα στα οποία έχει διαταραχθεί η ομαλή λειτουργία του μονοπατιού των BR ορμονών χαρακτηρίζονται από δραματικές μορφολογικές αλλαγές όπως μικρότερο μήκος υποκοτυλίου και μίσχων λόγω ελαττωματικής επιμήκυνσης των κυττάρων σε αυτά τα όργανα. Επιπροσθέτως, παρατηρούνται πιο σκούρα πράσινα φύλλα, μειωμένη κυριαρχία κορυφής, καθυστερημένη γήρανση και αλλοιώσεις στο σχηματισμό του αγγειακού ιστού (Clouse *et al.*, 1996; Haubrick & Assmann, 2006;

Nemhauser & Chory, 2004). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι ορμόνες BR ενισχύουν την άμυνα του φυτικού οργανισμού ενάντια σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Müssig *et al.*, 2006).

Το μπρασσινολίδιο (Brassinolide, BL) αποτελεί το πλέον βιο-ενεργό μέλος της οικογένειας των φυτικών μπρασσινοστεροειδών ορμονών (Clouse *et al.*, 1996). Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο χειρισμός με επι-μπρασσινολίδιο (epibrassinolide) βελτίωσε την ανθεκτικότητα του *Brassica napus* σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης αυξάνοντας την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω της προστασίας του μεταφραστικού μηχανισμού και επάγοντας τη συσσώρευση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Dhaubhadel *et al.*, 2002).

Τα φυτά χρησιμοποιούν ένα μεγάλο αριθμό κινασών-υποδοχέων και κινασών μεταγωγής σήματος ώστε να προκαλέσουν τις αποκρίσεις των κυττάρων στόχων σε εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα. Το σηματοδοτικό μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών διαμεσολαβείται από κινάσες σερίνης/θρεονίνης τύπου υποδοχέα (RLK) και συνδυάζει στρατηγικές ενίσχυσης του σήματος και απενεργοποίησης ενός καταστολέα για τη μεταγωγή ενός εξωκυτταρικού σήματος για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Η πρόσδεση των BRs στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης BRI1 κινάση (Brassinosteroid Insensitive 1) και BAK1 κινάση (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1) σταθεροποιεί/προάγει το σχηματισμό ετεροδιμερών BRI1/BAK1 συμπλόκων και οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινασών των δύο υποδοχέων μέσω αμοιβαίων φωσφορυλιώσεων. Η BIN2 πρωτεΐνη, μία πρωτεΐνη ομόλογη με την GSK3-β των ζωικών συστημάτων αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του σηματοδοτικού μονοπατιού των μπρασσινοστεροειδών. Απουσία BRs, η BIN2 κινάση διατηρεί το μονοπάτι μεταγωγής σήματος σε καταστολή φωσφορυλιώνοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες BES1 (BRI1-EMS-suppressor1) και την BZR1 (brassinazole-resistant 1), σε πολλαπλές ρυθμιστικές περιοχές αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους (He *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005). Έχει παρατηρηθεί ότι οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες BZR1 και BES1/BZR2 παρουσιάζουν μειωμένη σταθερότητα (He *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002) και ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Gampal *et al.*, 2007; Vert *et al.*, 2005).

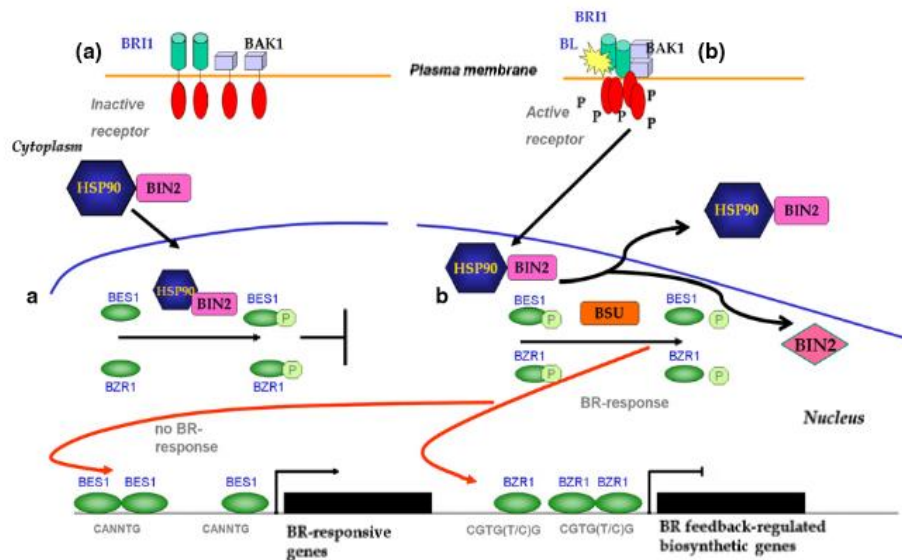
Οι φωσφορυλιωμένοι BES1 και BZR1 μεταγραφικοί παράγοντες αλληλοεπιδρούν με τις 14-3-3 πρωτεΐνες, οι οποίες τις κρατούν στο κυτταρόπλασμα παρεμποδίζοντας έτσι την τοποθέτησή τους στον πυρήνα (Gampala *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2007). Σήμερα είναι γνωστό ότι οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες BZR1 και BES1

σημαίνονται με την ουμπικουϊτίνη ώστε να αναγνωριστούν από το πρωτεάσωμα προκειμένου να αποικοδομηθούν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διακοπή της σηματοδότησης των μπρασσινοστεροειδών και την καταστολή της κυτταρικής επιμήκυνσης.

Παρουσία BRs, ενεργοποιείται το μονοπάτι το οποίο περιλαμβάνει την καταστολή της δράσης της BIN2 κινάσης από τη φωσφατάση BSU1 (BRI1 Suppressor Protein-1) μέσω αποφωσφορύλωσης και ενισχύει την αποδόμηση της BIN2 από το πρωτεάσωμα, παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση της (Peng *et al.*, 2008; Kim, *et al.*, 2009). Η καταστολή της δράσης του BIN2 επιτρέπει την αποφωσφορύλωση και ενεργοποίηση των BES1 και BZR1 παραγόντων από την φωσφατάση PP2A στο κυτταρόπλασμα. και στη συνέχεια τη μεταφορά τους στον πυρήνα των κυττάρων όπου ελέγχουν (επαγωγή/καταστολή) την έκφραση γονιδίων- στόχων του μονοπατιού των μπρασσινοστεροειδών (Belkhadir & Jaillais, 2015).

1.4 Αλληλεπίδραση των *Hsp90* και των Μπρασσινοστεροειδών στο *Arabidopsis Thaliana*.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της BIN2 πρωτεΐνης και των HSP90 (Samakovli *et al.*, 2014). Φαίνεται ότι οι HSP90 ρυθμίζουν την υποκυτταρική τοποθέτηση της BIN2 και συνεπώς ελέγχουν χωρικά τη δραστηριότητα της κινάσης επηρεάζοντας έτσι την εξέλιξη σηματοδότησης του BR μονοπατιού. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ενεργή μορφή των HSP90 είναι απαραίτητη για την πυρηνική τοποθέτηση της BIN2 κινάσης (Samakovli *et al.*, 2014). Παρεμπόδιση της δημιουργίας του BIN2/HSP90 συμπλόκου καθιστά την κινάση BIN2 ανίκανη να δράσει σαν αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού σηματοδότησης των μπρασσινοστεροειδών στον πυρήνα (Samakovli *et al.*, 2014).



Εικόνα 3: Ο ρόλος των HSP90 πρωτεϊνών στο σηματοδοτικό μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών υπό την απουσία του BR (α) και υπό την παρουσία του BR (β) (Samakovli *et al.*, 2014).

Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι οι HSP90 αλληλοεπιδρούν τόσο με τις φωσφορυλιωμένες όσο και με τις ενεργές μορφές των BES1 και BZR1 μεταγραφικών παραγόντων (Lachowiec *et al.*, 2013; Shigeta *et al.*, 2014). Επιπλέον έχει δειχθεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης των *HSP90.1* και *HSP90.3* με την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα BRI1 (πειραματικά δεδομένα εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, ΓΠΑ) (Samakovli *et al.*, 2014).

1.5 Οργάνισμός - Μοντέλο *Arabidopsis Thaliana*

Το *Arabidopsis thaliana* αποτελεί έναν ευκαρυωτικό οργανισμό, που ανήκει στο Βασίλειο των Φυτών και ευδοκμεί κυρίως στην Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική (Hoffmann, 2002). Είναι μέλος της οικογένειας *Brassicaceae* και υπό φυσιολογικές συνθήκες μεγαλώνει τον χειμώνα. Πλεονεκτεί για εργαστηριακές μελέτες αφού έχει σύντομο χρόνο ζωής και η ανάπτυξή του από το στάδιο της βλάστησης μέχρι το στάδιο παραγωγής ώριμων σπόρων διαρκεί γύρω στις έξι εβδομάδες. Το κεντρικό στέλεχος που παράγει άνθη αυξάνεται μετά από τρεις εβδομάδες περίπου και τα άνθη αυτόγονιμοποιούνται φυσικά.

Το ύψος του *Arabidopsis* δεν υπερβαίνει τα 20 με 25 εκατοστά (Krämer, 2015) και τα φύλλα του σχηματίζουν μία ροζέτα στη βάση του φυτού, ενώ λίγα φύλλα υπάρχουν και πάνω στο ανθοφόρο στέλεχος. Τα βασικά φύλλα είναι πράσινα σε χρώμα

με μήκος από 1,5 έως 5 εκατοστά και πλάτος από 2 έως 10 χιλιοστά. Σε αντίθεση, τα φύλλα του στελέχους είναι μικρότερα. Όλα τα φύλλα του όμως επικαλύπτονται από μικρές μονοκύτταρες τρίχες, τα τριχώματα. Όσον αφορά τον καρπό έχει εύρος μήκους από 5 έως 20 χιλιοστά και σε καθέναν εμπεριέχονται 20 με 30 σπόρους. Οι ρίζες είναι απλές δομικά, με μία μόνο βασική ρίζα που αναπτύσσεται κατακόρυφα προς τα κάτω, και παράγει αργότερα μικρότερες πλευρικές ρίζες (Blamey & Grey-Wilson, 1989). Λόγω του μικρού μεγέθους του καλλιεργείται εύκολα σε εργαστήρια και σε περιορισμένους όμως χώρους, όπως σε γλάστρες, σε θερμοκήπια, σε τρυβλία Petri και σε υδροπονικές καλλιέργειες.

Το συγκεκριμένο ζιζάνιο είναι ευρέως γνωστό για την συμβολή του στην μελέτη της βιολογίας των φυτών και την γενετική. Ήταν το πρώτο φυτό, του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε και έχει χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση της μοριακής βιολογίας άλλων φυτών, την άνθιση, την ευαισθησία στο φως, τα επίπεδα ανάπτυξης. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε εν έτει 2000 από το Arabidopsis Genome Initiative (Nature 14 Dec. 2000). Στις μέρες μας, οι αναβαθμίσεις του γονιδιώματος γίνονται από την Arabidopsis Information Resource (TAIR).

Το *Arabidopsis Thaliana* έχει ένα από τα μικρότερα γονιδιώματα σε όλο το Φυτικό Βασίλειο. Αρκετή προσπάθεια γίνεται για την κατανόηση των 27 χιλιάδων γονιδίων και των 35 χιλιάδων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται. Περιέχει συνολικά 5 χρωμοσώματα και το μήκος του δεν ξεπερνάει τα 135 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων (Mbp) (BENNETT *et al.*, 2003).

Πίνακας 4: Τα μήκη των χρωμοσωμάτων του *Arabidopsis thaliana* σύμφωνα με την TAIR.

Χρωμοσώματα	Μήκος χρωμοσωμάτων
Χρωμόσωμα 1	34,964,571 bp
Χρωμόσωμα 2	22,037,565 bp
Χρωμόσωμα 3	25,499,034 bp
Χρωμόσωμα 4	20,862,711 bp
Χρωμόσωμα 5	31,270,811 bp
Σύνολο	134,634,692 bp



Εικόνα 4: Το φυτό *Arabidopsis thaliana*.
(Φωτογραφία της Nicole Hanley Markelz στο Πανεπιστήμιο Cornell)

Κεφάλαιο 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εισαγωγή

Η πηγή εκ της οποίας προέκυψαν τα δεδομένα και ύστερα χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική και ποσοτική ανάλυση προέρχεται από πειράματα φυσιολογίας που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στα πλαίσια των συγκεκριμένων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί γενότυποι : α) ο άγριος τύπος (*Columbia*) , β) ο 90.1 (*SALK 007614*) όπου τα μεταλλαγμένα φυτά δεν εκφράζουν το γονίδιο *HSP90.1*, και γ) ο 90.3 (*SALK 038646*) όπου τα μεταλλαγμένα φυτά δεν εκφράζουν το γονίδιο *HSP90.3*. Οι γενότυποι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί η απόκρισή τους σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης όπως η έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσία ή απουσία ορμονικών χειρισμών. Στα αρτίβλαστα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του μήκους του υποκοτυλίου κάθε φυτού κατά την πέμπτη (5dag) και έβδομη ημέρα (7dag) της ανάπτυξής τους.

Πίνακας 5: Μεταβλητές της έρευνας όπου όλα τα φυτά αφήθηκαν να αναπτυχθούν σε συνεχές σκοτάδι.

Γενότυποι		
<i>Mutant hsp90.1</i>	<i>Mutant hsp90.3</i>	<i>Columbia</i> (Control group)
Θερμοκρασίες		
22		37
Ημέρες ανάπτυξης		
5		7

Τα αρτίβλαστά αναπτύχθηκαν είτε σε στερεό θρεπτικό ορμόνης (MS) είτε παρουσία μπρασινολιδίου (BL) σε τελική συγκέντρωση ορμόνης 1nM , 10nM, 100nM ή 1000nM.

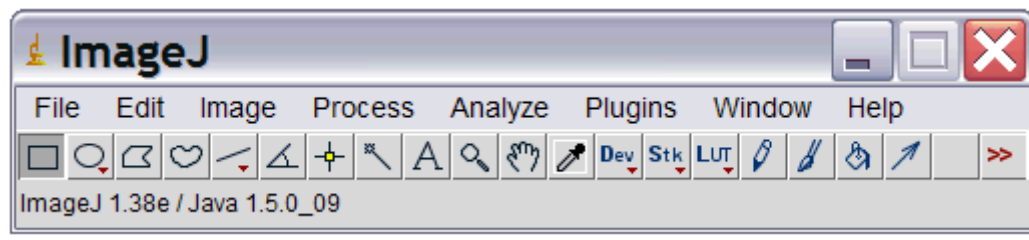
2.2 Υλικά

Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS

Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος ήταν αναγκαία α) 0,44% MS (Murashige και Skoog medium), β) 2% sucrose, γ) 0.05% MES και δ) 0.3% phytigel ή 0.6% agarose. Η αгарόζη χρησιμοποιείται ως στερεοποιητικός παράγοντας όταν προστίθενται στο θρεπτικό μέσο αντιβιοτικά ή ορμόνες. Στα τρυβλία που προορίζονται για την ανάπτυξη των φυτών χρησιμοποιείται το phytogel ως στερεοποιητικός παράγοντας.

Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας και εξόρυξη δεδομένων

Η μέτρηση του μήκους των υποκοτυλίων έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας, το ImageJ. Το ImageJ αποτελεί ένα πρόγραμμα βασισμένο στη Java και δημιουργήθηκε από τα Εθνικά Ινστιτούτα της Υγείας σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο του Ουισκόνσιν.



Εικόνα 5: Εργαλειοθήκη του Προγράμματος ImageJ
(Από τον επίσημο ιστότοπο του ImageJ)

Η διαδικασία μέτρησης των υποκοτυλίων κάθε φωτογραφίας επετεύχθη ως εξής: (α) Έναρξη το προγράμματος ImageJ και μέσω της οδού File - > Open, επιλεγόταν η εκάστοτε φωτογραφία. (β) Σε κάθε φωτογραφία, με τη βοήθεια Straight line, σχεδιαζόταν ένα ευθύγραμμο τμήμα όσο το μήκος των 0.5 εκατοστών που έδειχνε η φωτογραφία. (γ) Ακολουθώντας την οδό Analyze - > Set scale οριζόταν το συγκεκριμένο μήκος του ευθύγραμμου τμήματος ως 0.5 εκατοστά. (δ) Σύμφωνα με την καινούργια κλίμακα πια, μετριούνταν τα μήκη των υποκοτυλίων χειρωνακτικά με τη βοήθεια Freehand line. Στους παρακάτω πίνακες, υπάρχουν οι αποστάσεις σε pixels όπου θεωρήθηκαν ότι αντιστοιχούν με πέντε χιλιοστά.

Πίνακας 6: Αποστάσεις που θεωρούνται πέντε χιλιοστά στις φωτογραφίες Genotype *Columbia*

Ύπαρξη Θερμικού σοκ	Ημέρες Ανάπτυξης	Απόσταση σε pixels
Ναι	5	64
Όχι	5	64.2756
Ναι	7	62.4962
Όχι	7	63

Πίνακας 7: Αποστάσεις που θεωρούνται πέντε χιλιοστά στις φωτογραφίες Genotype *90.1*

Ύπαρξη Θερμικού σοκ	Ημέρες Ανάπτυξης	Απόσταση σε pixels
Ναι	5	65.1891
Όχι	5	62.1664
Ναι	7	63.6808
Όχι	7	62.9408

Πίνακας 8: Αποστάσεις που θεωρούνται πέντε χιλιοστά στις φωτογραφίες Genotype *90.3*

Ύπαρξη Θερμικού σοκ	Ημέρες Ανάπτυξης	Απόσταση σε pixels
Ναι	5	64.3463
Όχι	5	62.2080
Ναι	7	62.3939
Όχι	7	63.1882

Πίνακας 9: Αποστάσεις που θεωρούνται πέντε χιλιοστά στις φωτογραφίες με 60nM

Ημέρες Ανάπτυξης	Απόσταση σε pixels
5	62.3692
7	63.1450

Όταν τελείωναν οι μετρήσεις των υποκοτυλίων κάθε φωτογραφίας, περνούσαν σε ένα αρχείο Excel. Στο τέλος, όταν τελείωσαν όλες οι μετρήσεις και οι μεταφορές, δημιουργήθηκε ένα αρχείο Excel με πέντε στήλες (Genotype, Quantity of BL, HS, Days, Hypocotyl length) και 3327 γραμμές. Τέλος, για την ανάλυση των παραπάνω δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 24, η γλώσσα προγραμματισμού ανοιχτού κώδικα R και το πρόγραμμα οπτικοποίησης Microsoft Power BI.

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Καλλιέργεια σπορόφυτων *Arabidopsis thaliana*

Πρώτα από όλα πραγματοποιείται η παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος MS. Στη συνέχεια, γίνεται η αποστείρωση του υποστρώματος για 20 λεπτά στους 120°C και αφήνεται να κρυώσει στους 55°C περίπου. Το επόμενο στάδιο είναι να τοποθετηθεί το υγρό θρεπτικό στα τρυβλία, με δοσολογία 20ml ανά τρυβλίο στο θάλαμο νηματικής ροής (Laminair flow) με τον οποίο επιταχύνονται αποστειρωμένες συνθήκες. Τα τρυβλία αφήνονται μέχρι να στερεοποιηθούν και στη συνέχεια κλείνονται και διατηρούνται στους 4°C. Η εκβλάστηση των σπερμάτων των *A. thaliana* προϋποθέτει την επιτυχημένη έξοδό τους από την κατάσταση λήθαργου. Για να συμβεί αυτό, τα σπέρματα τοποθετούνται σε ddH₂O για μία μέρα ακριβώς στους 4°C. Η διαδικασία γίνεται μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, ο οποίος έχει αρχικά απολυμανθεί με αιθανόλη για να εξασφαλιστούν οι ασηπτικές συνθήκες. Έπειτα γίνεται απολύμανση των σπερμάτων με 70% αιθανόλη για 15 δευτερόλεπτα και αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη προστίθεται διάλυμα χλωρίνης 30% για ένα λεπτό. Αφού απομακρυνθεί το διάλυμα της χλωρίνης γίνεται ξέπλυμα των σπερμάτων 5 φορές με ddH₂O. Σαν τελευταίο στάδιο, τα σπέρματα επιστρώνονται στα τρυβλία που περιέχουν τα θρεπτικά υποστρώματα. Στην παρούσα διπλωματική μετά την απολύμανση και επίστρωση των σπόρων σε τρυβλία, αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε συνεχές σκοτάδι μέχρι την ημέρα την λήψης φωτογραφιών. Επιπροσθέτως, τα τρυβλία στα οποία εφαρμόστηκε θερμική καταπόνηση, αυτή έγινε με τη μεταφορά των τρυβλίων για 90 λεπτά στους 37° C ανά 24 ώρες και πάλι σε σκοτάδι.

2.3.2 Επαγωγική Στατιστική

Όταν υπάρχει ένα σύνολο δεδομένων – δειγμάτων που πρόκειται να επεξεργαστούν, υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι διαχωρισμού τους που ονομάζονται Παραμετρικοί και Μη Παραμετρικοί Μέθοδοι (Γαλάνης, 2013). Προϋπόθεση των παραμετρικών μεθόδων είναι η κατανομή των δεδομένων να τείνει να ακολουθεί την κανονική κατανομή, ελέγχοντας μέσω των τεστ Kolmogorov-Smirnov και των Shapiro-Wilk. Όταν το δείγμα τμηματοποιείται σε δύο μικρότερα, τα οποία είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους είναι σύνηθες να διερευνάται αν πληθυσμιακοί μέσοι αυτών δειγμάτων διαφέρουν στατιστικώς. Ο έλεγχος που χρησιμοποιείται είναι ο Independent – Samples T test ή ο Mann-Whitney U test. Περαιτέρω για διερεύνηση συντελεστών γραμμικής συσχέτισης χρησιμοποιούνται οι συντελεστές του Pearson, του Spearman ή του Kendall.

Η μέθοδος ANOVA ή αλλιώς μέθοδος ανάλυσης διακύμανσης αποτελεί παραμετρική μέθοδο και είναι η περίπτωση ελέγχου δύο ή περισσότερων πληθυσμιακών μέσων προς έναν παράγοντα (One - Way ANOVA), προς δύο παράγοντες (Two – Way ANOVA) κλπ. Όταν πληρούνται οι προϋποθέσεις One-Way ANOVA μπορούν να γίνουν ύστερα έλεγχοι πολλαπλών συγκρίσεων μέσω της διόρθωσης του Bonferroni και του τεστ Tukey. Όταν δεν πληρείται η κανονικότητα γίνεται χρήση του τεστ Kruskal-Wallis έναντι της παραμετρικής μεθόδου και ύστερα έλεγχοι πολλαπλών συγκρίσεων μέσω της διόρθωσης του Bonferroni. Αν πληρείται η κανονικότητα αλλά όχι η ομοσκεδαστικότητα σύμφωνα με το τεστ του Levene, γίνεται η χρήση των τεστ Brown-Forsythe και Welch και έπειτα για τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί το τεστ Dunnett 's T3 (Γναρδέλλης, 2013).

Τέλος, υπάρχει το μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης όπου όταν ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις χρήσης του, γίνεται προσπάθεια πρόβλεψης της εξαρτημένης μεταβλητής από τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Εν συνεχεία, της υλοποίησης και της αξιολόγησης του μοντέλου παλινδρόμησης, είναι απαραίτητη η κατασκευή του συντελεστή πολλαπλού προσδιορισμού (R^2). Όσο ο συντελεστής πλησιάζει στον αριθμό 1 τόσο καλύτερο είναι το μοντέλο και αντιστρόφως.

Κεφάλαιο 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

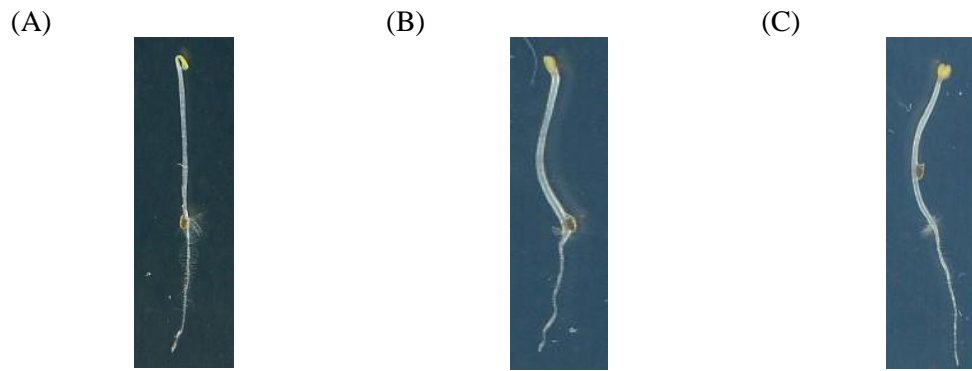
Όπως αναφέρθηκε, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υπέδειξαν τη συμμετοχή των θερμοεπαγόμενων (Heat Shock Protein) 90 (HSP90) στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος του μονοπατιού των μπρασσινοστεροειδών (BR) σε πολλαπλά επίπεδα (Samakovli, et al., 2020; Samakovli, Margaritopoulou, Prassinou, Milioni, & Hatzopoulos, 2014; Lachowiec, et al., 2013). Επιπρόσθετα, είναι γνωστή η αυξητική επίδραση των μπρασσινοστεροειδών στην κυτταρική επέκταση (Oh, et al., 2014; Bai, et al., 2012). Έτσι, στην παρούσα εργασία αποφασίστηκε να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της έλλειψης δύο κυτταροπλασματικών μελών της οικογένειας των φυτικών HSP90 στην επιμήκυνση του υποκοτυλίου του φυτού *Arabidopsis thaliana* στο σκοτάδι κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις μπρασσινολιδίου (BL), σε δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, των πέντε και επτά ημερών μετά τη φύτευση. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση θερμικής καταπόνησης στις ίδιες συνθήκες, δεδομένης της συμμετοχής των HSP90 στην απόκριση των οργανισμών στο θερμικό στρες.

3.1 Φαινοτυπική απεικόνιση

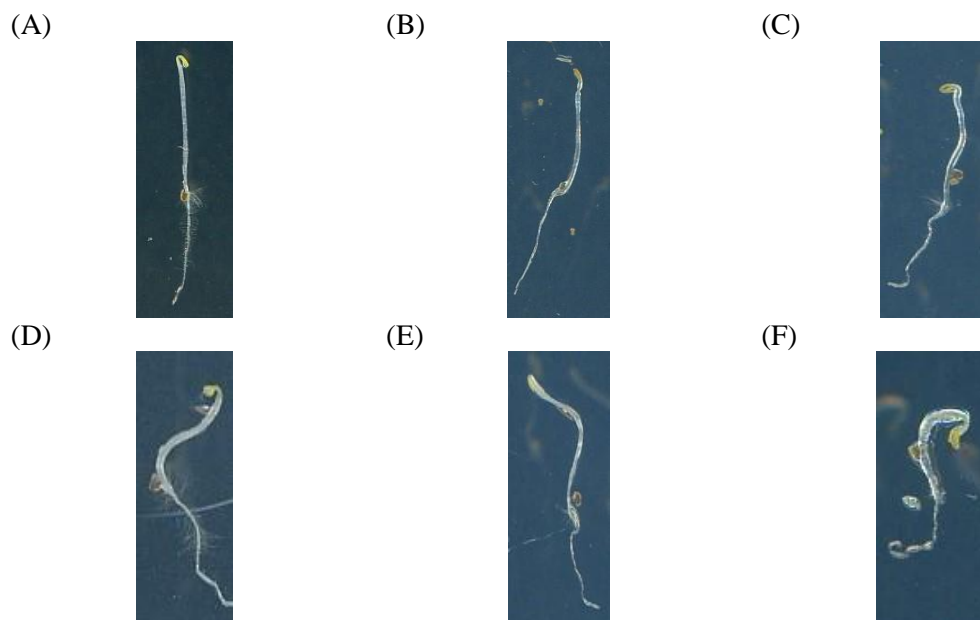
Τα αρτίβλαστα των *A. thaliana* ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες αναπτύχθηκαν όπως την παρουσία θερμικού σοκ, τον γενότυπο, την παρουσία του και ποσότητα BL παρουσίασαν διαφορές στον φαινότυπο τους.

Στις Εικόνες 6 έως 8 παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες του αγρίου τύπου με στόχο την εκ πρώτης όψεως παρατήρηση της απόκρισης των φυτών στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και στους διαφορετικούς χειρισμούς.

Στην Εικόνα 6, παρουσιάζεται ο φαινότυπος της κάθε φυτικής σειράς μεγαλωμένης σε συνθήκες ελέγχου (control), δηλαδή χωρίς της παρουσία BL στο μέσο ανάπτυξης. Στην Εικόνα 7 παρατηρείται η επίδραση στο φαινότυπο του αγρίου τύπου (Col-0) των έξι διαφορετικών συγκεντρώσεων ορμόνης BL που χρησιμοποιήθηκαν (1nM, 10nM, 60nM, 100nM, 1μM), ενώ στην Εικόνα 8 παρατηρείται η επίδραση της θερμοκρασίας (22°C και 37°C).



Εικόνα 6: Ενδεικτικές φωτογραφίες του φαινοτύπου των τριών γενοτύπων (*Columbia* (A), *hsp90.1* (B) και *hsp90.3* (C)) αναπτυγμένων σε συνεχές σκοτάδι με απουσία ορμόνης BL (MS) και πέντε ημέρες μετά τη φύτευση στους 22°C.



Εικόνα 7: Ενδεικτικές φωτογραφίες της φαινοτυπικής επίδρασης της ορμόνης (*OnM* (A), *1nM* (B), *10nM* (C), *60nM* (D), *100nM* (E), *1μM* (F)). Τα άγρια τύπου φυτά έχουν αναπτυχθεί στις πέντε μέρες στους 22°C.

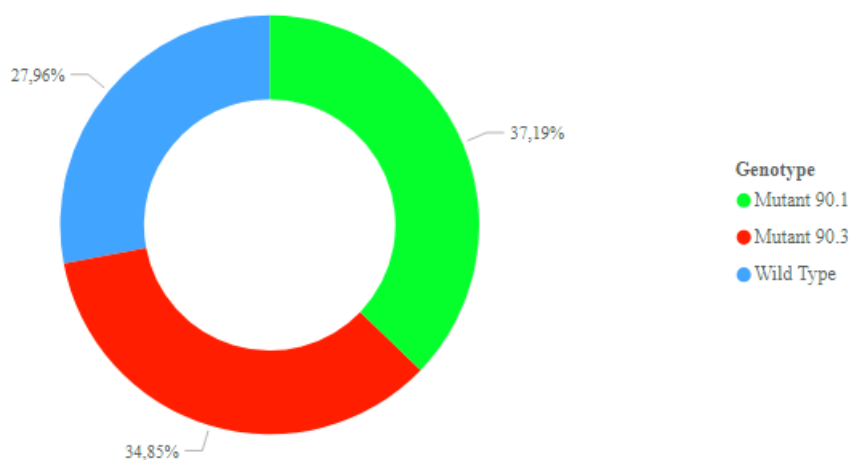


Εικόνα 8: Ενδεικτικές φωτογραφίες της επίδρασης της θερμοκρασίας (22°C (A) , 37°C (B)) σε φυτά άγριου τύπου που έχουν αναπτυχθεί απουσία BL πέντε ημέρες μετά την φύτευση.

Στο Παράρτημα υπάρχουν όλες οι φωτογραφίες των τρυβλίων όπως εξήχθησαν από το εργαστήριο και είναι αυτές που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άντλησης των πρωτογενών δεδομένων. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο «Μέθοδοι και Υλικά», οι μετρήσεις των υποκοτυλίων πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος ImageJ και ύστερα εισήχθησαν σε ένα αρχείο Excel. Τα γραφήματα και η εξαγωγή στατιστικών αποτελεσμάτων έγιναν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου IBM SPSS Statistics 24, του προγράμματος οπτικοποίησης Microsoft Power BI και της γλώσσας προγραμματισμού R (έκδοση 3.4.3).

3.2 Περιγραφική και Επαγωγική Στατιστική

Συνολικά μετρήθηκαν 3326 υποκοτύλια από τρεις διαφορετικούς γενοτύπους, τον άγριο τύπο *Columbia* (*Col-0*), το μετάλλαγμα *hsp90.1* (*SALK_007614*) όπου τα φυτά δεν παράγουν την πρωτεΐνη *HSP90.1* και το μετάλλαγμα *hsp90.3* (*SALK_038646*) όπου τα φυτά δεν παράγουν την πρωτεΐνη *HSP90.3*.



Γράφημα 1 : Ποσοστό των φυτών ανά γενότυπο στην έρευνα ανεξαρτήτως συνθηκών.

Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 1 το μικρότερο ποσοστό του δείγματος της έρευνας αναφέρεται στον άγριο τύπο (*Col-0*) όπου το 27.96% αντιστοιχεί σε συνολικά 930 μετρήσεις (413 φυτάρια 5dag και 499 φυτάρια 7dag). Αντιθέτως, οι μετρήσεις του γενοτύπου *hsp90.3* αποτελούν το 34.85% του δείγματος ή 1159 μετρήσεις (568 φυτάρια 5 dag και 591 φυτάρια 7dag) και του γενοτύπου *hsp90.1* αποτελούν το 37.19% ή συνολικά 1237 μετρήσεις (608 φυτάρια 5dag και 629 φυτάρια 7dag). Καλό είναι να

τονιστεί πως οι διαλογές των σπόρων στα τρυβλία Πέτρι ήταν τυχαίες και όλα τα τρυβλία είχαν την ίδια αντιμετώπιση και μεθοδολογία (ανά ομάδα).

3.2.1 Φυτά πέντε ημέρων μετά την φύτευση (5dag)

Τα 608 φυτάρια του γενοτύπου *hsp90.1* (*SALK_007614*) αριθμούνται σε 304, εκείνα που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογική θερμοκρασία, και 304, σε εκείνα που αναπτύχθηκαν υπό θερμική καταπόνηση. Τα 568 φυτάρια του γενοτύπου *hsp90.3* (*SALK_007614*) αριθμούνται εξίσου σε 306, εκείνα που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογική θερμοκρασία, και σε 262, εκείνα που αναπτύχθηκαν υπό θερμική καταπόνηση. Τέλος, ο άγριος τύπος που αριθμεί σε 413 φυτάρια, διακρίνεται σε 247 που αναπτύχθηκαν στους 22°C, και 184 που αναπτύχθηκαν στους 37°C (Πίνακας 11).

Πίνακας 10: Αριθμός υποκοτυλίων ανά γενότυπο και θερμοκρασία σε διάρκεια 5 ημερών.

Γενότυπος	Απουσία Θερμικού Στρες	Παρουσία Θερμικού Στρες
<i>hsp90.1</i> (<i>SALK_007614</i>)	304	304
<i>hsp90.3</i> (<i>SALK_038646</i>)	306	262
<i>Columbia</i> (<i>Col-0</i>)	247	184

Η περίπτωση του αγρίου τύπου (*Col-0*)

Η απόκριση του αγρίου τύπου (*Col-0*) στην ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BL στις πέντε ημέρες μετά τη φύτευση, παρουσιάζεται στους Πίνακες 12 και 13, και στα Γραφήματα 2, 3, 4 και 5.

Πίνακας 11: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών αγρίου τύπου (*Columbia*) ηλικίας πέντε ημερών (5dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

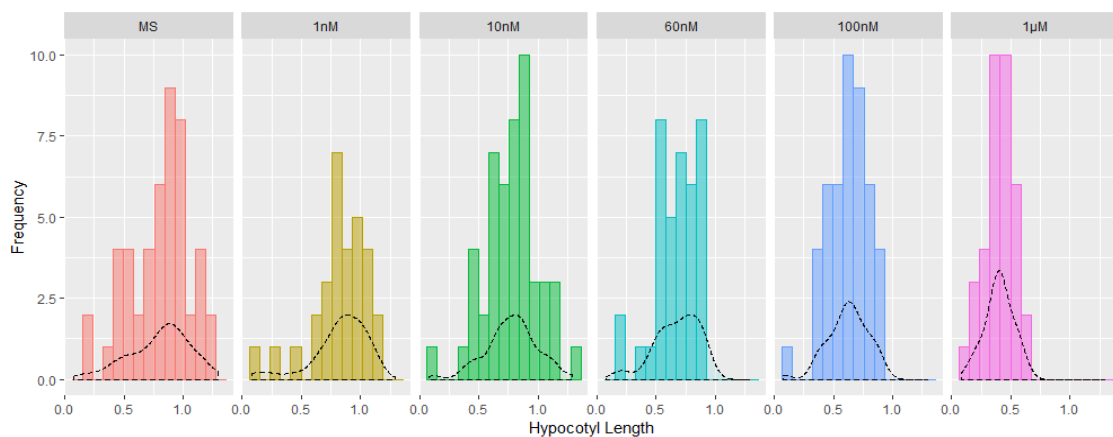
Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	48	0,800333	0,25195	0,8565	1.041
1nM	30	0,824467	0,242949	0,855	1.042
10nM	49	0,777939	0,223044	0,782	1.171
60nM	38	0,676289	0,18391	0,722	0.729
100nM	46	0,620391	0,170781	0,626	0.824
1μM	36	0,400861	0,120265	0,4065	0.524

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 12 και στο Γράφημα 2, στους 22°C επικρατεί αρνητική ασυμμετρία στις κατανομές του μεγέθους των υποκοτυλίων και είναι περισσότερο ευδιάκριτη στις κατανομές των MS, 1nM και 60nM. Αν παρατηρήσει

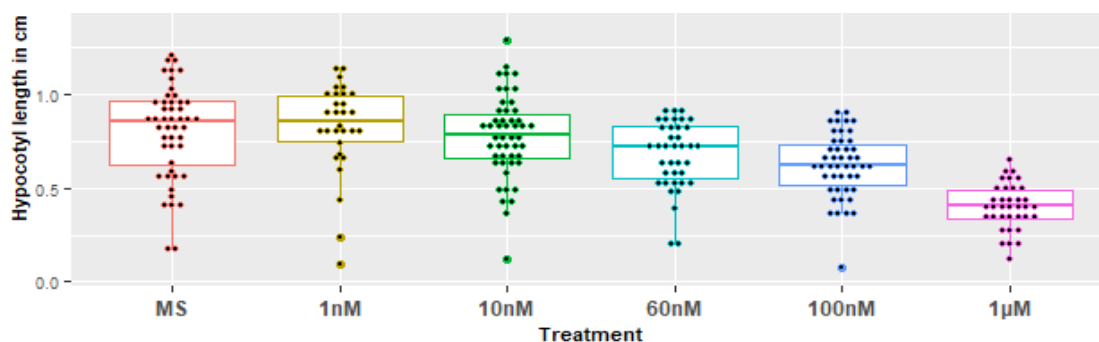
κανείς και το εύρος του μήκους σε κάθε ποσότητα μπρασσινολιδίου, θα διαπιστώσει πως είναι μεγάλο μέχρι τα 10nM και ύστερα μειώνεται, όπως και η διασπορά.

Στο Γράφημα 3 απεικονίζονται με μορφή θηκογραμμάτων η διακύμανση του μέσου μήκους του υποκοτυλίου του αγρίου τύπου, *Col-0*, στις διαφορετικές συγκεντρώσεις BL. Το τεστ Kruskal - Wallis αποδεικνύει ότι διαφέρουν μεταξύ τους κάποια από τα δείγματα των πέντε συγκεντρώσεων ορμόνης. Ειδικότερα, η ομάδα των 1μM διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες ομάδες και η ομάδα των 100nM από τις εκείνες των 10nM και 1nM ($p < 0.05$).

Πέρα από αυτά, η παρουσία BL στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επηρεάζει σημαντικά το μέσο μήκος του υποκοτυλίου, το οποίο παρουσιάζει τάση αύξησης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου στη μικρότερη συγκέντρωση (1nM BL, Γράφημα 2) η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική ενώ αυτή η τάση αναστρέφεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BL (Γράφημα 2). Στη συγκέντρωση των 10nM το μέσο μήκος εξισώνεται με αυτό στις συνθήκες ελέγχου ενώ οι επόμενες συγκεντρώσεις προκαλούν στατιστικά σημαντική μείωση του μέσου μήκους του υποκοτυλίου σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιώντας ελέγχους T-test υπάρχουν στατιστικές διαφοροποιήσεις μεταξύ του MS και των ποσοτήτων άνω των 60nM ($p < 0.05$). Παράλληλα, η παρουσία της ορμόνης στο θρεπτικό συσχετίζεται γραμμικά με τη μείωση μήκους των υποκοτυλίων και σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson χαρακτηρίζεται ως αρνητικά μικρή σχέση για 60nM ($r = -0.267$, $p < 0.05$), 100nM ($r = -0,388$, $p < 0.05$) και αρνητικά ισχυρή σχέση για 1μM ($r = -0.696$, $p < 0.05$).



Γράφημα 2: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *Columbia*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.



Γράφημα 3: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *Columbia*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

Στον Πίνακα 13 και στα γραφήματα 4 και 5, παρατηρείται ότι στους 37°C υπάρχει ποικίλη συμπεριφορά των μηκών των υποκοτυλίων ανάλογα με την συγκέντρωση BL στην οποία αναπτύσσονται. Στο Γράφημα 4, παρατηρείται ότι τα μεγέθη των υποκοτυλίων είναι πιο διασκορπισμένα σε μικρές ποσότητες συγκέντρωσης και στην απουσία BL. Η διασπορά μειώνεται στα δείγματα που αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις άνω των 60nM.

Πίνακας 12: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών αγρίου τύπου (*Columbia*) ηλικίας πέντε ημερών (5dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

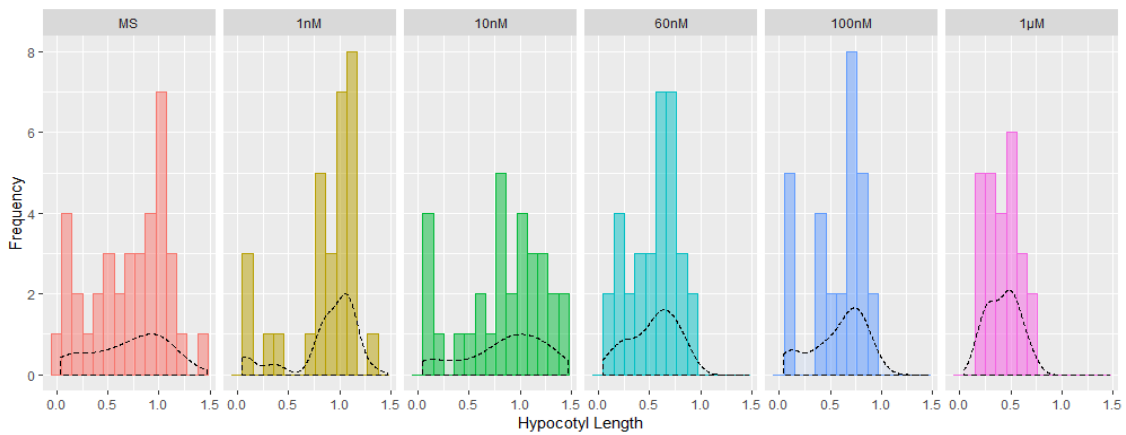
Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	37	0,696189189	0,375184979	0,78	1,345
1nM	30	0,8648	0,336492496	0,983	1,245
10nM	31	0,837290323	0,411332566	0,898	1,41
60nM	33	0,53230303	0,23416387	0,575	0,846
100nM	28	0,568464286	0,265634876	0,6885	0,813
1µM	25	0,42252	0,156463553	0,433	0,572

Από το MS έως το 1µM, το μέσο μήκος δεν διατηρεί μία ξεκάθαρη πορεία. Φαίνεται ότι υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης σε χαμηλές συγκεντρώσεις BL (1 και 10nM) το μέσο μήκος του υποκοτυλίου αυξάνεται σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (MS) (Γράφημα 5) ενώ μετά τα 60nM το μέσο μήκος μειώνεται. Για αυτό το λόγο έγινε διερεύνηση ποια από τα 5 δείγματα συγκεντρώσεων διαφέρουν με τη μέθοδο Kruskal – Wallis και αποδεικνύεται πως τα δείγματα των 1nM και 10nM διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από εκείνα των 60nM, 100nM και 1000nM ($p < 0.05$).

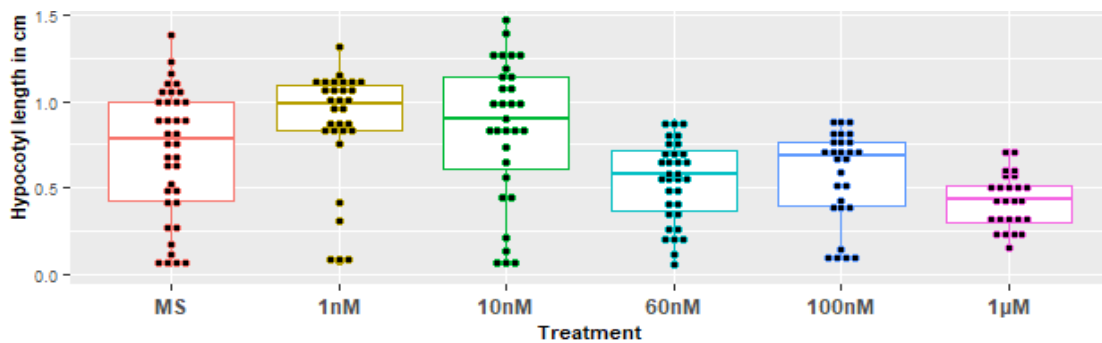
Επίσης, διαφορετικό από το δείγμα ελέγχου είναι όταν γίνει προσθήκη εξωγενούς ορμόνης σε συγκέντρωση 1nM σύμφωνα με τον μη παραμετρικό έλεγχο Mann–Whitney U test ($p < 0.05$). Επιπροσθέτως, η γραμμική συσχέτιση μπρασσινολιδίου και μήκος

υποκοτυλίου θεωρείται θετικώς μικρή ($r = +0.251, p < 0.05$) σύμφωνα με τον συντελεστή συσχέτισης του Spearman.

Πιο ξεκάθαρο είναι όμως πως άνω των 60nM, τα μήκη βρίσκονται περισσότερο γύρω από την μέση τιμή. Η διερεύνηση που έγινε αποδεικνύει πως τα δείγματα των 60nM και 1000nM διαφέρουν στατιστικώς από το MS δείγμα σύμφωνα με τον έλεγχο T-test και Mann-Whitney U test αντίστοιχα ($p < 0.05$). Επιπλέον, η γραμμική συσχέτιση μπρασσινολιδίου και μήκος υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται αρνητικά μικρή ($r = -0.253, r = -0.389, p < 0.05$) στην περίπτωση εφαρμογής ορμόνης σε συγκεντρώσεις 60nM και 1000nM αντίστοιχα σύμφωνα με τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson και του Spearman.



Γράφημα 4: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *Columbia*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.



Γράφημα 5: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *Columbia*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

Η περίπτωση του μεταλλάγματος *hsp90.1* (SALK_007614)

Η απόκριση του μεταλλάγματος *hsp90.1* (SALK_007614) στην ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BL στις πέντε ημέρες μετά τη φύτευση, παρουσιάζεται στους Πίνακες 14 και 15, και στα Γραφήματα 6, 7, 8 και 9.

Στον Πίνακα 14 και στο Γράφημα 6 φαίνεται ότι στους 22°C για μικρές ποσότητες BL οι τιμές των μεγεθών των υποκοτυλίων είναι πιο διασκορπισμένες, ειδικότερα των 10nM. Αντίθετα, άνω των 100nM τα μεγέθη βρίσκονται κοντινότερα στο μέσο μήκος.

Πίνακας 13: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του γενοτύπου *hsp90.1* ηλικίας πέντε ημερών (5dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

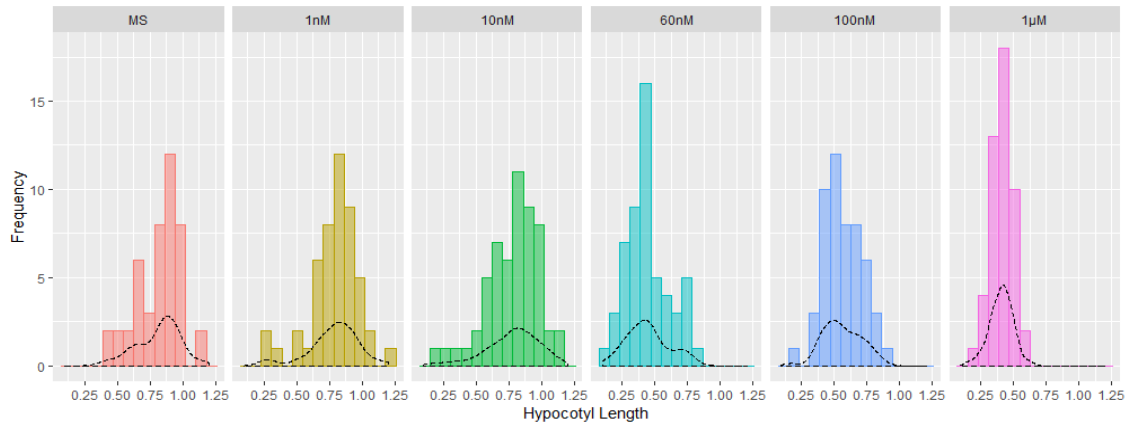
Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	45	0,815577778	0,165119721	0,856	0,732
1nM	49	0,787653061	0,193454619	0,816	0,955
10nM	56	0,780696429	0,20402762	0,804	0,963
60nM	54	0,441981481	0,163896941	0,4385	0,711
100nM	52	0,560346154	0,144620516	0,541	0,694
1μM	48	0,405083333	0,087531352	0,4145	0,455

Στο Γράφημα 7 απεικονίζονται με μορφή θηκογραμμάτων τα ίδια δεδομένα. Το τεστ Kruskal - Wallis αποδεικνύει ότι διαφέρουν στατιστικώς κάποια από τα δείγματα των πέντε συγκεντρώσεων ορμόνης. Ειδικότερα, αποδεικνύεται ότι μόνο δύο ομάδες δεν διαφέρουν μεταξύ τους, εκείνη των 10nM και 1nM και εκείνη των 60nM και 1000nM ($p > 0.05$).

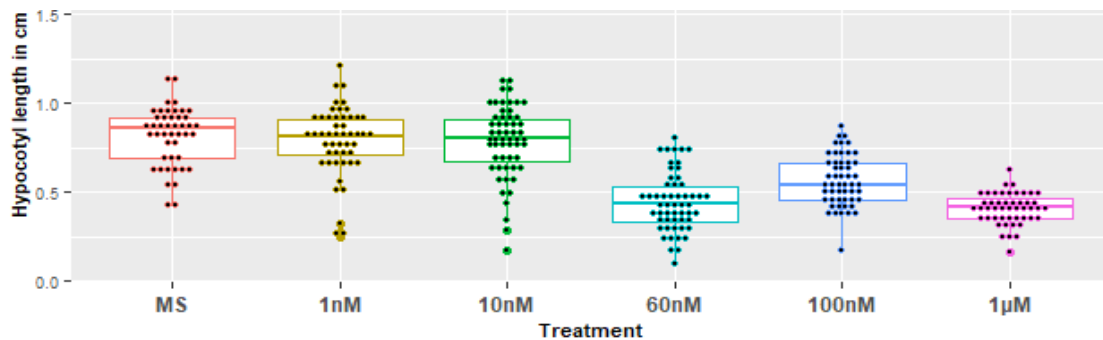
Μια επιπλέον παρατήρηση θα μπορούσε να είναι ότι το μέσο φυτό γίνεται κοντότερο όσο αυξάνεται η ποσότητα BL. Στα 100nM όμως διαπιστώνεται επιμήκυνση του φυτού και ύστερα μειώνεται πάλι. Η διαφορά μήκους των 100nM είναι στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου ($p < 0.05$) σύμφωνα με τον μη παραμετρικό έλεγχο του Mann-Whitney U test, χαρακτηρίζοντας την αλληλεπίδραση μήκους και ποσότητας BL αρνητικά ισχυρή σχέση ($r = -0.645$, $p < 0.05$) σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Spearman.

Παρόμοιες συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν και με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις της ορμόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αποδεικνύεται ότι τα μέση μεγέθη υποκοτύλιων διαφέρουν στην εφαρμογή ορμόνης σε συγκεντρώσεις 60nM ($p < 0.05$) και 1μM ($p < 0.05$) μπρασσινολιδίου χρησιμοποιώντας τον μη παραμετρικό έλεγχο του Mann-Whitney U test. Σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του

Spearman, ο χειρισμός με ορμόνη στο μήκος του υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται αρνητικά ισχυρή σχέση ($r = -0.749$, $p < 0.05$) στα 60nM και αρνητικά πολύ ισχυρή σχέση στα 1μM ($r = -0.826$, $p < 0.05$).



Γράφημα 6: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.



Γράφημα 7: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

Τα δείγματα που δεν εκφράζουν το γονίδιο *HSP90.1*, αναπτυγμένα στους 37° C διάρκειας 5 ημερών (Πίνακας 15, Γραφήματα 8 και 9), ακολουθούν μια αξιοπερίεργη συμπεριφορά.

Πίνακας 14: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του γενοτύπου *hsp90.1* ηλικίας πέντε ημερών (5dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

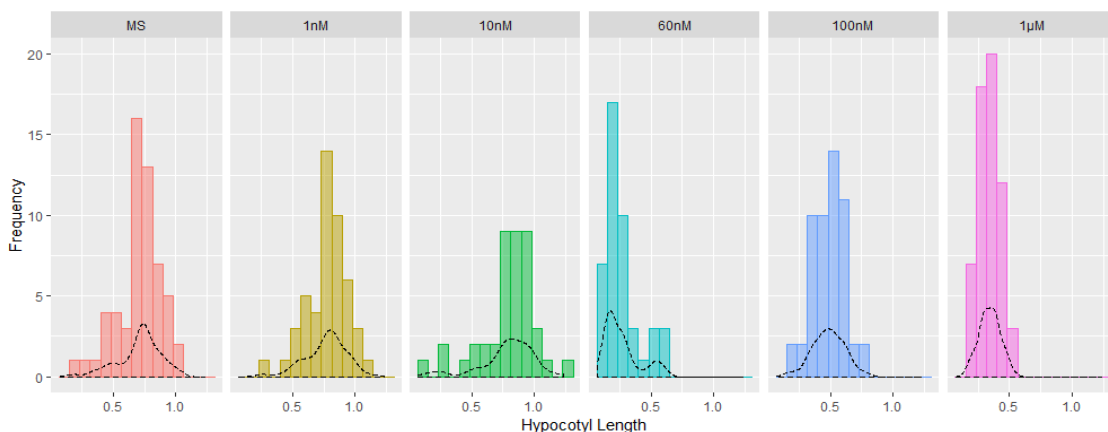
Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	57	0,710122807	0,174267556	0,729	0,849
1nM	48	0,76675	0,163585816	0,79	0,842
10nM	42	0,7885	0,222057809	0,8155	1,096
60nM	44	0,26325	0,141207603	0,214	0,543
100nM	53	0,485754717	0,126814963	0,485	0,599

1μM	60	0,3408	0,083128204	0,344	0,365
-----	----	--------	-------------	-------	-------

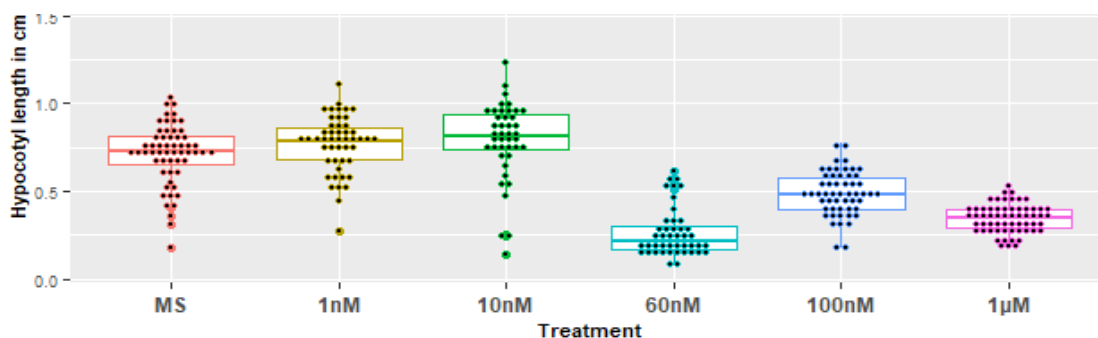
Φαίνεται ότι σε μικρές συγκεντρώσεις μπρασσινολιδίου τα μήκη πρώτον, επεκτείνονται σε όλο το εύρος τιμών με αποτέλεσμα είναι πιο διασκορπισμένα και δεύτερον το μέσο μέγεθος του φυτού έχει αυξητική τάση σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Το δείγμα των 1nM δεν είναι στατιστικά διαφορετικό από το MS οριακά, ενώ το αντίστοιχο των 10nM είναι στατιστικά διαφορετικό ($p < 0.05$) εκτέλωντας μη παραμετρικούς ελέγχους Mann–Whitney U test. Εν συνεχεία σύμφωνα με τον συντελεστή συσχέτισης του Spearman, η γραμμική συσχέτιση της ορμόνης (MS - 10nM) με το μήκος του υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται ως θετικά μικρή σχέση ($r = +0.271$, $p < 0.05$).

Σε ποσότητες συγκέντρωσης άνω των 60nM, η διασπορά των τιμών είναι μικρότερη και για αυτό το λόγο είναι στενότερες οι κατανομές. Παρατηρείται επίσης πως το μέσο μήκος μειώνεται δραματικά από τα 10nM στα 60nM. Ύστερα όσο αυξάνεται η δοσολογία, υπάρχει επιμήκυνση του φυτού στα 100nM και στο τέλος υπάρχει πάλι συρρίκνωση. Τα εν λόγω τρία δείγματα είναι στατιστικώς διαφορετικά από εκείνο του MS ($p < 0.05$) εκτέλωντας μη παραμετρικούς ελέγχους Mann–Whitney U test και σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Spearman, η συσχέτιση της ορμόνης με το μήκος του υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται ως αρνητικά ισχυρή ($r = -0.795$, $p < 0.05$) για 60nM, ($r = -0,613$, $p < 0.05$) για 100nM και ($r = -0,789$, $p < 0.05$) για 1μM.

Επίσης, σύμφωνα με το τεστ Kruskal – Wallis κάποια από τα δείγματα των 5 συγκεντρώσεων ορμόνης είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$). Με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων αποδεικνύεται πως όλα τα ζεύγη ποσοτήτων διαφέρουν εκτός από εκείνα των 1nM και 10nM, και 60nM και 1000nM.



Γράφημα 8: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.



Γράφημα 9: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

Η περίπτωση του μεταλλάγματος *hsp90.3* (SALK_038646)

Η απόκριση του μεταλλάγματος *hsp90.3* (SALK_038646) στην ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BL στις πέντε ημέρες μετά τη φύτευση, παρουσιάζεται στους Πίνακες 16 και 17, και στα Γραφήματα 10, 11, 12 και 13.

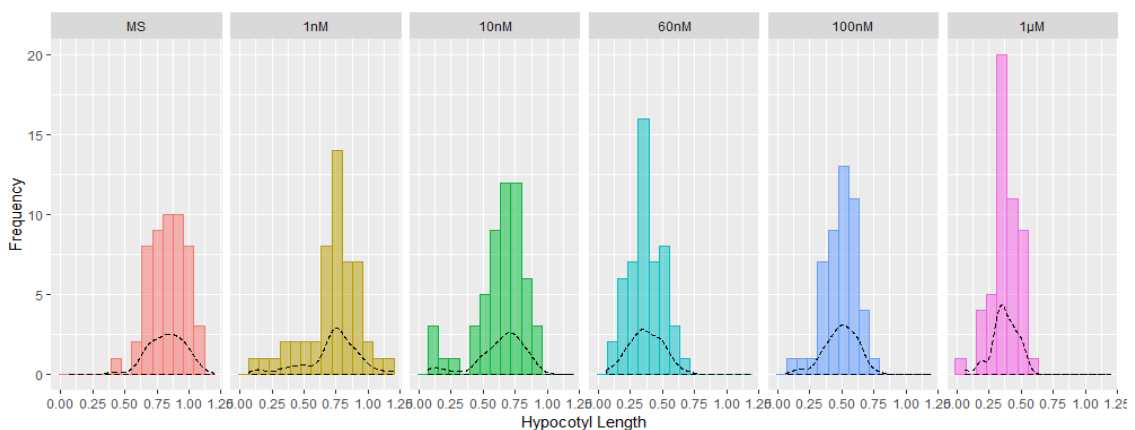
Στους 22° C παρατηρείται σύμφωνα με τα Γραφήματα 10 και 11 και τον Πίνακα 16 ότι όσο αυξάνεται η δοσολογία της ορμόνης μειώνεται και η διακύμανση των τιμών γύρω από το μέσο μήκος κάθε κατανομής. Με άλλα λόγια, η συμπεριφορά του μήκους των υποκοτυλίων είναι δύσκολο να καθοριστεί σε μικρές συγκεντρώσεις ορμόνης. Αντιπροσωπευτική αντίθεση αποτελεί η κατανομή των 1nM, όπου οι τιμές των μετρήσεων απεκτείνονται σε όλο τον οριζόντιο άξονα, και των 1000nM, όπου τα μήκη των υποκοτυλίων βρίσκονται πλησιέστερα στο μέσο μήκος.

Πίνακας 15: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του γενοτύπου *hsp90.3* ηλικίας πέντε ημερών (5dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

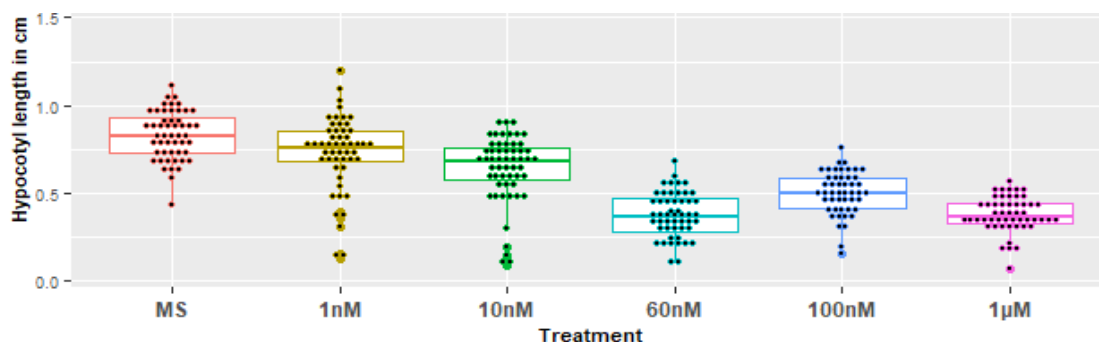
Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	51	0,827901961	0,137903626	0,82	0,682
1nM	51	0,728019608	0,212523833	0,758	1,072
10nM	55	0,6358	0,191849517	0,682	0,824
60nM	50	0,372	0,12883275	0,362	0,582
100nM	48	0,493875	0,124533107	0,4945	0,611
1µM	51	0,373117647	0,100607683	0,36	0,494

Παράλληλα παρατηρείται πως και σε αυτή την περίπτωση, ενώ το μέσο μήκος έχει φθίνουσα τάση όσο αυξάνεται η δοσολογία (ειδικά στα 60nM όπου το μέσο μήκος μειώνεται στο δείγμα κατά 0.3 εκατοστά περίπου από το μέσο μήκος στα 10nM) στα 100nM υπάρχει μία ασθενής επιμήκυνση του φύτου και ύστερα πάλι μείωση μήκους. Το τεστ Kruskal - Wallis αποδεικνύει ότι διαφέρουν στατιστικώς κάποια από τα δείγματα των 5 συγκεντρώσεων ορμόνης. Ειδικότερα, αποδεικνύεται ότι μόνο δύο ομάδες δεν διαφέρουν μεταξύ τους, εκείνο των 10nM και 1nM και εκείνο των 60nM και 1000nM ($p > 0.05$).

Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι υπάρχει διαφοροποίηση του μέσου μήκους των δειγμάτων με συγκεντρώσεις BL σε σύγκριση πάντα με το δείγμα ελέγχου. Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και στατιστικώς ($p < 0.05$) χρησιμοποιώντας κάθε φορά το κατάλληλο παραμετρικό ή μη παραμετρικό εργαλείο. Επιπροσθέτως, η εισχώρηση των ποσοτήτων της ορμόνης συσχετίζεται με τη μείωση μήκους των υποκοτυλίων και χαρακτηρίζεται, σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Spearman, αρνητικά μικρή σχέση ($r = -0.253$, $p < 0.05$) για τον χειρισμό με ορμόνη στα 1nM και αρνητικά μέτρια στα 10nM ($r = -0.513$, $p < 0.05$). Εν συνεχεία, σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson χαρακτηρίζεται ως αρνητικά πολύ ισχυρή σχέση στα 60nM ($r = -0.865$, $p < 0.05$), αρνητικά ισχυρή σχέση στα 100nM ($r = -0.788$, $p < 0.05$) και αρνητικά πολύ ισχυρή σχέση στα 1μM ($r = -0.885$, $p < 0.05$).



Γράφημα 10: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γεινοτύπου *hsr90.3*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.



Γράφημα 11: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενότυπου *hsp90.3* μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

Ύστερα, τα αναπτυγμένα υποκοτύλια στους 37° C (Πίνακας 17, Γραφήματα 12 και 13) δεν ακολουθούν μία καθορισμένη πορεία. Η διασπορά από ότι φαίνεται είναι μεγάλη σε μικρές συγκεντρώσεις BL αλλά με την αύξηση της δόσολογίας η εικόνα για το μέσο μήκος γίνεται πιο ξεκάθαρη.

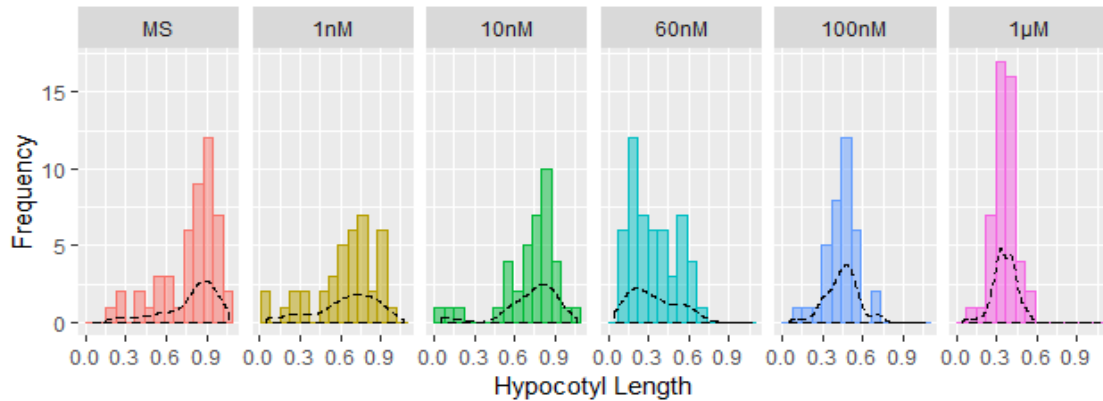
Πίνακας 16: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του γενότυπου *hsp90.3* ηλικίας πέντε ημερών (5dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	49	0,783265306	0,212638168	0,848	0,86
1nM	39	0,637717949	0,238778244	0,693	0,901
10nM	38	0,718789474	0,217644411	0,7665	0,951
60nM	52	0,336173077	0,172972935	0,307	0,627
100nM	36	0,440833333	0,123348403	0,4565	0,604
1µM	48	0,358479167	0,085506996	0,3485	0,439

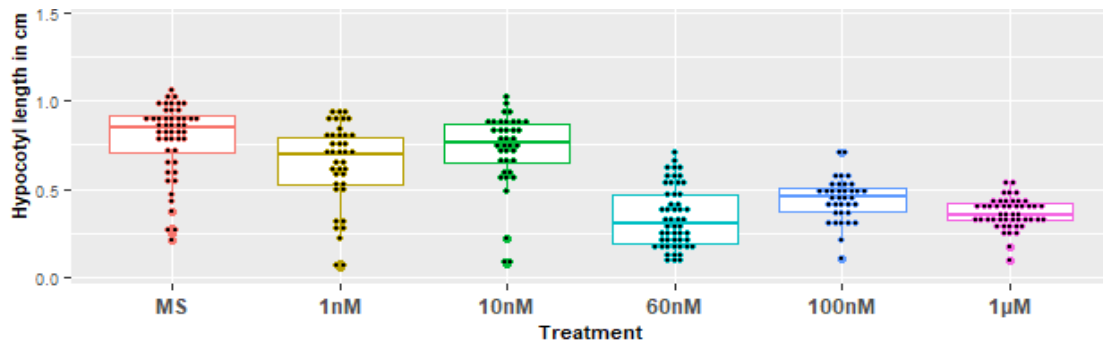
Το μέσο μέγεθος των φυτών παρατηρείται περιγραφικώς ότι ασθενώς επιμηκύνεται στα 10nM και στα 100nM. Σύμφωνα με το τεστ Kruskal – Wallis κάποια από τα δείγματα των 5 συγκεντρώσεων ορμόνης είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$). Με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων αποδεικνύεται πως τα ζεύγη ποσοτήτων που δεν διαφέρουν είναι εκείνα των 1nM και 10nM, 100nM και 1000nM, 60nM και 100nM και 60nM και 1000nM ($p > 0.05$).

Αν συγκριθούν όμως τα δείγματα με το MS τότε παρατηρείται σίγουρη σμίκρυνση του μέσου μεγέθους. Αυτές οι σμικρύνσεις είναι στατιστικά σημαντικές, σύμφωνα με τον μη παραμετρικό έλεγχο Mann–Whitney U test ($p < 0.05$). Περαιτέρω, σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Spearman, η συσχέτιση της ορμόνης με το μήκος του υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται ως αρνητικά μικρή σχέση ($r = -0.340$ και $r = -0.215$, $p < 0.05$) για 1nM και 10nM αντίστοιχα, αρνητικά ισχυρή ($r = -$

0.743, $p < 0.05$) για 60nM, ($r = -0,676$, $p < 0.05$) για 100nM και ($r = -0,742$, $p < 0.05$) για 1 μ M.



Γράφημα 12: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *hsp90.3*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.



Γράφημα 13: Θηκόγραμμα συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας πέντε ημερών (5dag) του γενοτύπου *hsp90.3*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

3.2.2 Φυτά επτά ημερών μετά την φύτευση (7dag)

Τα 629 φυτάρια του γενοτύπου *hsp90.1* (*SALK_007614*) αριθμούνται σε 322, εκείνα που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογική θερμοκρασία, και σε 307, εκείνα που αναπτύχθηκαν υπό θερμική καταπόνηση. Τα 591 φυτάρια του γενοτύπου *hsp90.3* (*SALK_038646*) αριθμούνται εξίσου σε 296, εκείνα που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογική θερμοκρασία, και σε 295, εκείνα που αναπτύχθηκαν υπό θερμική καταπόνηση. Τέλος, ο άγριος τύπος (*Col-0*) που αριθμεί σε 499 φυτάρια, διακρίνεται σε 262 που αναπτύχθηκαν στους 22°C, και 237 που αναπτύχθηκαν στους 37°C (Πίνακας 12).

Πίνακας 17: Αριθμός υποκοτυλίων ανά γενότυπο και θερμοκρασία σε διάρκεια 7 ημερών.

Γενότυπος	Απουσία Θερμικού Στρες	Παρουσία Θερμικού Στρες
<i>hsp90.1 (SALK_007614)</i>	322	307
<i>hsp90.3 (SALK_038646)</i>	296	295
<i>Columbia (Col-0)</i>	262	237

Η περίπτωση του άγριου τύπου (*Col-0*)

Η απόκριση του αγρίου τύπου (*Col-0*) στην ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BL στις επτά ημέρες μετά τη φύτευση, παρουσιάζεται στους Πίνακες 19 και 20, και στα Γραφήματα 14, 15, 16 και 17.

Τα δείγματα που εκφράζουν και τα δύο γονίδια *HSP90.3* και *HSP90.1* υπό συνθήκες φυσιολογικής θερμοκρασίας και διάρκειας 7 ημερών, φαίνονται στον Πίνακα 19 και στα Γραφήματα 14 και 15.

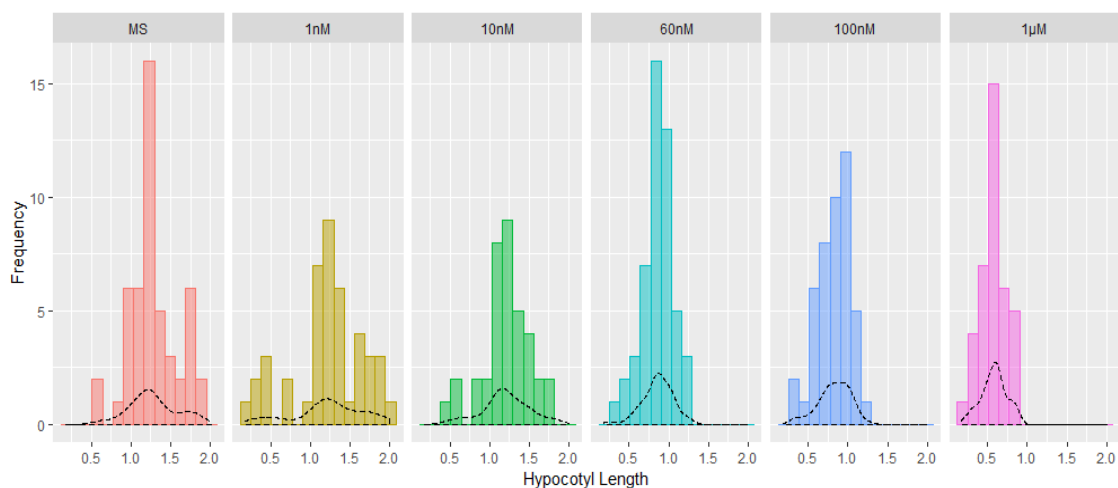
Πίνακας 18: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του άγριου τύπου *Columbia* ηλικίας επτά ημερών (7dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	49	1,277367347	0,303265677	1,222	1,253
1nM	43	1,216651163	0,452389628	1,202	1,83
10nM	37	1,204810811	0,30176461	1,197	1,335
60nM	50	0,86002	0,194251834	0,867	1,023
100nM	45	0,824933333	0,203094291	0,859	0,908
1μM	38	0,580052632	0,159941703	0,5995	0,656

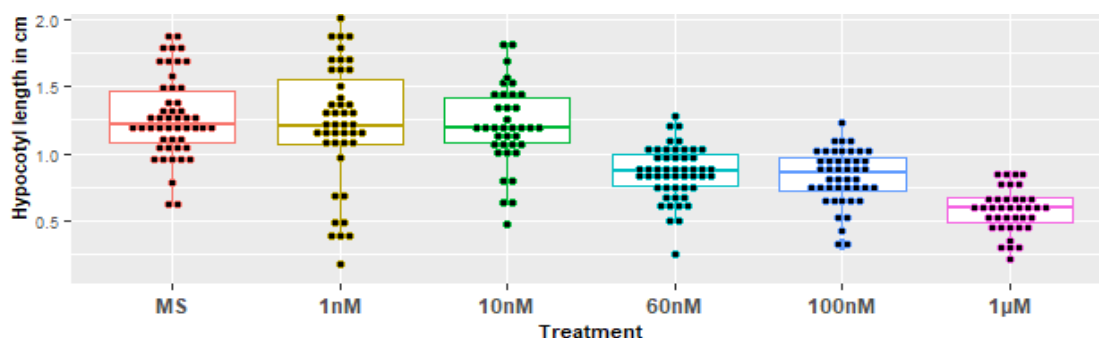
Για μικρές ποσότητες ορμόνης και MS παρουσιάζεται ποικιλία φαινοτύπων προς το μέγεθος, για αυτό και οι αποκρίσεις έχουν μεγάλη μεταβλητότητα. Η υψηλότερη διασπορά αποκρίσεων παρατηρείται στα 1nM και ύστερα φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η ποσότητα συγκέντρωσης, μειώνεται η διασπορά. Παρόμοιο περιγραφικό συμπέρασμα περί αντίστροφων μεγεθών ποσότητας και μήκους υποκοτυλίων θα μπορούσε να ειπωθεί και για το μέσο μέγεθος. Σύμφωνα με το τεστ Kruskal – Wallis κάποια από τα δείγματα των πέντε συγκεντρώσεων ορμόνης είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$). Με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων αποδεικνύεται πως τα ζεύγη ποσοτήτων που δεν διαφέρουν είναι εκείνα των 1nM και 10nM, και 60nM και 100nM ($p > 0.05$).

Για τα δείγματα άνω των 60nM αποδεικνύεται επίσης ότι διαφέρουν εξίσου στατιστικώς σε σύγκριση με το δείγμα MS ($p < 0.05$). Για την απόδειξη χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος του Mann–Whitney U test. Ταυτόχρονα, σύμφωνα με τον

συντελεστή συσχέτισης του Spearman, η γραμμική συσχέτιση του χειρισμού με ορμόνη με το μήκος του υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται αρνητικά ισχυρή ($r = -0.68$, $p < 0.05$) για 60nM, ($r = -0,704$, $p < 0.05$) για 100nM και αρνητικά πολύ ισχυρή ($r = -0,831$, $p < 0.05$) για 1μM.



Γράφημα 14: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *Columbia*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.



Γράφημα 15: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *Columbia*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

Με τη βοήθεια του Πίνακα 20 και των Γραφημάτων 16 και 17 απεικονίζεται η φθίνουσα πορεία της διακύμανσης των αποκρίσεων όσο αυξάνεται η ποσότητα BL σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης.

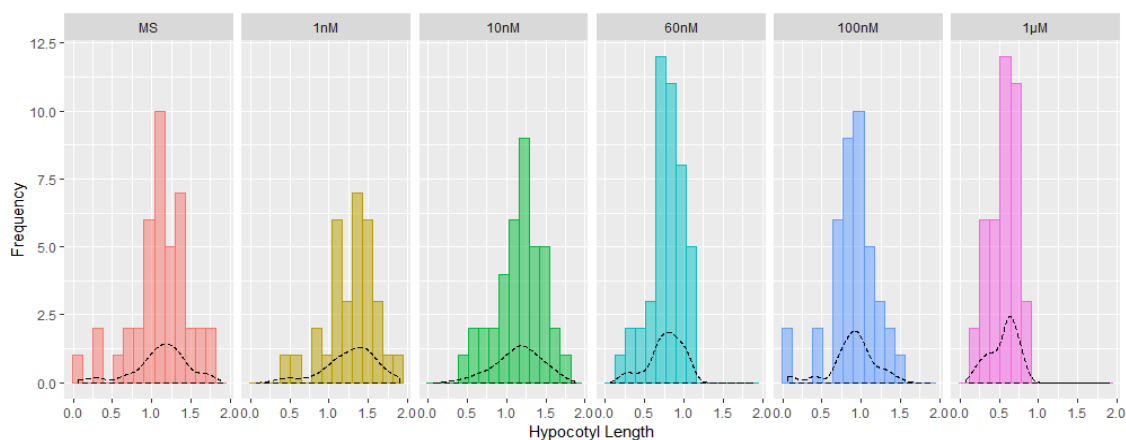
Πίνακας 19: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του άγριου τύπου *Columbia* ηλικίας επτά ημερών (7dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	42	1,114785714	0,357625675	1,146	1,661

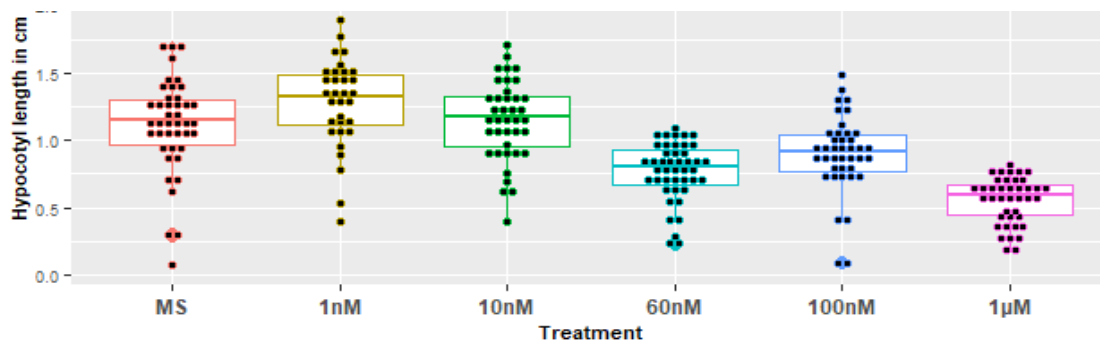
1nM	32	1,28034375	0,330409971	1,3305	1,499
10nM	39	1,151358974	0,294387454	1,173	1,308
60nM	44	0,769068182	0,219232318	0,809	0,879
100nM	40	0,897625	0,291502095	0,913	1,416
1μM	40	0,5521	0,175847516	0,6	0,659

Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα των 100nM όπου η διακύμανση είναι παρόμοια με αυτήν του δείγματος των 10nM. Σύμφωνα με το τεστ Kruskal – Wallis κάποια από τα δείγματα των πέντε συγκεντρώσεων ορμόνης είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$). Με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων αποδεικνύεται πως τα ζεύγη ποσοτήτων που δεν διαφέρουν είναι εκείνα των 1nM και 10nM, και 60nM και 100nM ($p > 0.05$).

Όσον αφορά τη μέση απόκριση των φυτών στην θερμική καταπόνηση, το δείγμα των 1nM παρουσιάζει αυξητική πορεία, στατιστικά διαφορετική από το δείγμα MS, σύμφωνα με τον παραμετρικό έλεγχο T test ($p < 0.05$). Όλα τα υπόλοιπα δείγματα υποκοτυλίων μειώνονται και είναι στατιστικώς διαφορετικά από το δείγμα MS, σύμφωνα με τον παραμετρικό έλεγχο T test για 60nM και σύμφωνα με τον μη παραμετρικό έλεγχο Mann–Whitney U test για 100nM και 1000nM ($p < 0.05$). Σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson, η συσχέτιση μεταξύ ποσότητας μπρασσινολιδίου και μήκους του υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται ως θετικά μικρή σχέση ($r = +0.234$, $p < 0.05$) για 1nM και αρνητικά μέτρια σχέση για 60nM ($r = -0.510$, $p < 0.05$). Παράλληλα, με τη βοήθεια του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Spearman, η συσχέτιση μπρασσινολιδίου και μεγέθους υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται ως αρνητικά μικρή σχέση για 100nM ($r = -0.383$, $p < 0.05$) και τέλος αρνητικά ισχυρή σχέση για 1μM ($r = -0.717$, $p < 0.05$).



Γράφημα 16: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *Columbia*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.



Γράφημα 17: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *Columbia*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

Η περίπτωση του μεταλλάγματος *hsp90.1* (SALK_007614)

Η απόκριση του μεταλλάγματος *hsp90.1* (SALK_007614) στην ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BL στις επτά ημέρες μετά τη φύτευση, παρουσιάζεται στους Πίνακες 21 και 22, και στα Γραφήματα 18, 19, 20 και 21.

Στον Πίνακα 21 και στα Γραφήματα 18 και 19, σε φυσιολογική θερμοκρασία φαίνεται ότι οι διακυμάνσεις των φαινοτύπων δεν είναι μεγάλες και σε συγκεντρώσεις άνω των 10nM είναι κοντινότερες στη μέση απόκριση.

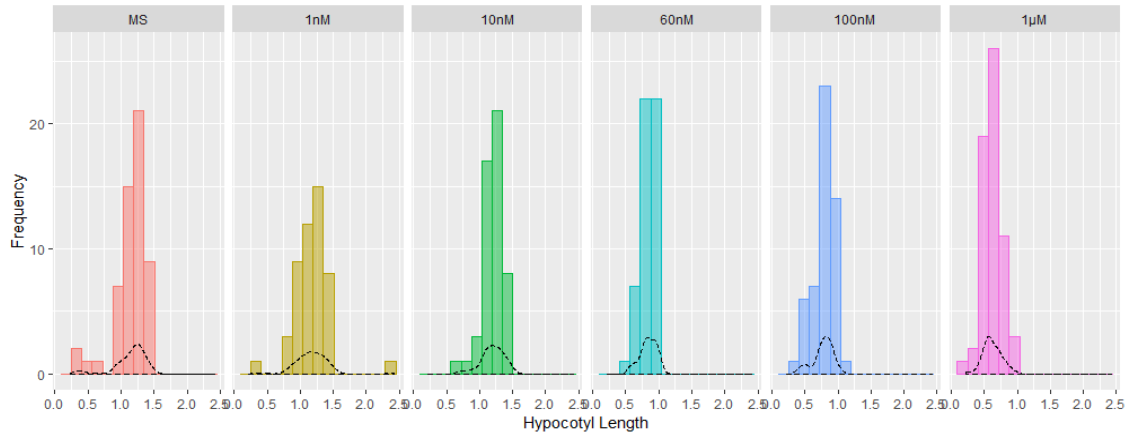
Πίνακας 20: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του γενοτύπου *hsp90.1* ηλικίας επτά ημερών (7dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	56	1,144428571	0,245760405	1,207	1,179
1nM	49	1,182979592	0,273186024	1,184	2,015
10nM	51	1,196823529	0,172650364	1,209	0,815
60nM	52	0,838826923	0,123345795	0,8375	0,477
100nM	52	0,770423077	0,150927894	0,7935	0,641
1µM	62	0,619419355	0,141545746	0,5925	0,742

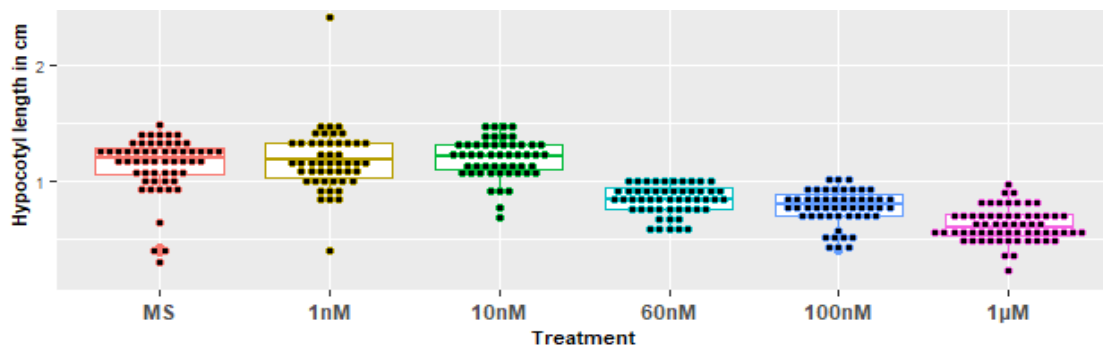
Σύμφωνα με το τεστ Kruskal – Wallis κάποια από τα δείγματα των 5 συγκεντρώσεων ορμόνης είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$). Με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων αποδεικνύεται πως τα ζεύγη ποσοτήτων που δεν διαφέρουν είναι εκείνα των 1nM και 10nM, και 60nM και 100nM ($p > 0.05$).

Απεικονίζεται επίσης ότι το μέσο μέγεθος αυξάνεται στα δείγματα των 1nM και 10nM σε σχέση με το δείγμα MS αλλά αυτές οι διαφοροποιήσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Εν συνεχεία, πραγματοποιώντας ελέγχους Mann–Whitney U test υπάρχουν στατιστικές διαφοροποιήσεις μεταξύ του θρεπτικού και των ποσοτήτων άνω των 60nM

($p < 0.05$). Η συγκέντρωση ορμόνης συσχετίζεται γραμμικά με τη μείωση μήκους των υποκοτυλίων και σύμφωνα με τον έλεγχο του Spearman οι αλληλεπιδράσεις των τριών ποσοτήτων στο μήκος του υποκοτυλίου χαρακτηρίζονται ως αρνητικά ισχυρές, αφού για 60nM το $r = -0.692$, για 100nM το $r = -0.728$ και για 1μM το $r = -0.760$ ($p < 0.05$).



Γράφημα 18: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.



Γράφημα 19: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

Στον Πίνακα 22 και στα Γραφήματα 20 και 21, απεικονίζεται η πορεία της μέσης απόκρισης των υποκοτυλίων σε θερμική καταπόνηση. Τα μεγέθη των φαινοτύπων σε κάθε συγκέντρωση δεν βρίσκονται πολύ κοντά στη μέση απόκριση, κάνοντας δύσκολη την εύρεση ενός εκ πρώτης όψεως μοτίβου συμπεριφοράς.

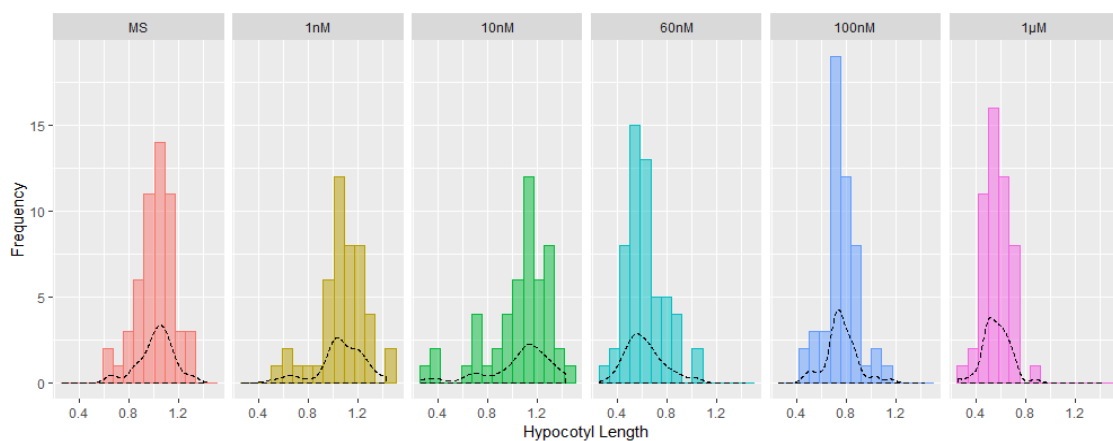
Πίνακας 21: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του γενοτύπου *hsp90.1* ηλικίας επτά ημερών (7dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	54	1,017740741	0,145075411	1,0335	0,707
1nM	46	1,067369565	0,193657012	1,059	0,916

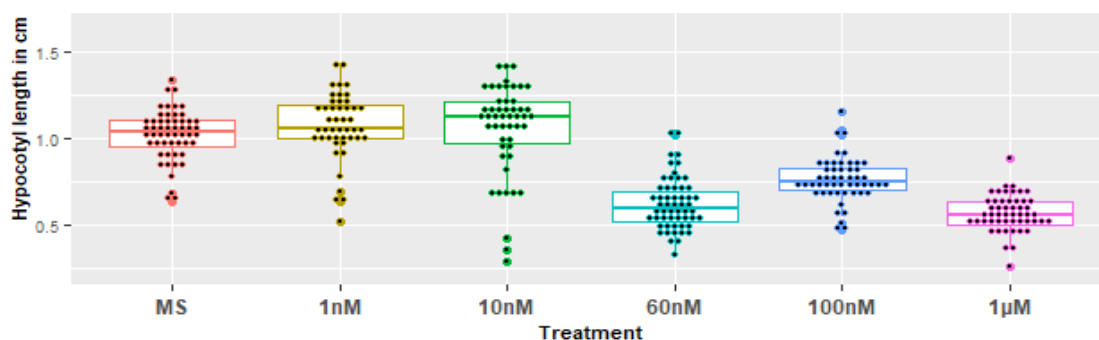
10nM	50	1,0544	0,263050938	1,127	1,138
60nM	55	0,619236364	0,152845597	0,594	0,708
100nM	51	0,757568627	0,127871225	0,745	0,693
1μM	51	0,563392157	0,106175153	0,557	0,624

Σύμφωνα με το τεστ Kruskal – Wallis κάποια από τα δείγματα των πέντε συγκεντρώσεων ορμόνης είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$). Με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων αποδεικνύεται πως τα ζεύγη ποσοτήτων που δεν διαφέρουν είναι εκείνα των 1nM και 10nM, και 60nM και 1000nM ($p > 0.05$).

Τα εν λόγω δείγματα που δεν εκφράζουν το γονίδιο *HSP90.1*, αναπτυγμένα στους 37° C, είναι στατιστικώς διαφορετικά όταν αναπτυχθούν σε μπρασσιολίδιο σε συγκέντρωση άνω των 10nM σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (ανάπτυξη σε MS) ($p < 0.05$) χρησιμοποιώντας κάθε φορά το κατάλληλο παραμετρικό ή μη παραμετρικό εργαλείο. Σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Spearman, η συσχέτιση μπρασσιολιδίου και μήκος υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται θετικά μικρή σχέση ($r = +0.235$, $p < 0.05$) για τον χειρισμό με ορμόνη στα 10nM, ενώ χρησιμοποιώντας τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson, η συσχέτιση μπρασσιολιδίου και μεγέθους υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται ως αρνητικά ισχυρή ($r = -0.803$, $p < 0.05$) για τον χειρισμό με ορμόνη στα 60nM, ($r = -0,692$, $p < 0.05$) στα 100nM και ($r = -0,874$, $p < 0.05$) στα 1μM.



Γράφημα 20: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσιολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.



Γράφημα 21:Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

Η περίπτωση του μεταλλάγματος *hsp90.3* (SALK_038646)

Η απόκριση του μεταλλάγματος *hsp90.3* (SALK_038646) στην ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BL στις επτά ημέρες μετά τη φύτευση, παρουσιάζεται στους Πίνακες 23 και 24, και στα Γραφήματα 22, 23, 24 και 25.

Στον Πίνακα 23 και στα Γραφήματα 22 και 23, τα δείγματα των συγκεντρώσεων μέχρι τα 10nM που δεν εκφράζουν το γονίδιο *HSP90.3*, αναπτυγμένα στους 22°C, έχουν περίπου την ίδια μέση απόκριση με το δείγμα ελέγχου MS και οι όποιες διαφοροποιήσεις δεν αποτελούν στατιστικής σημασίας ευρήματα.

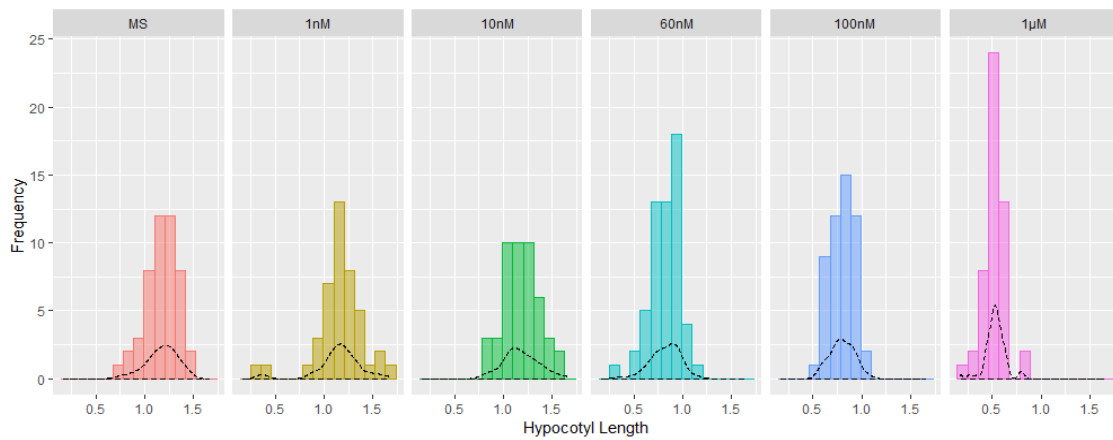
Πίνακας 22: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του γενοτύπου *hsp90.3* ηλικίας επτά ημερών (7dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	48	1,172708333	0,159415683	1,195	0,71
1nM	43	1,153627907	0,240842077	1,176	1,3
10nM	47	1,181702128	0,179695021	1,157	0,802
60nM	57	0,822157895	0,151749769	0,846	0,806
100nM	51	0,797784314	0,121448642	0,796	0,509
1µM	50	0,52852	0,104048897	0,5275	0,633

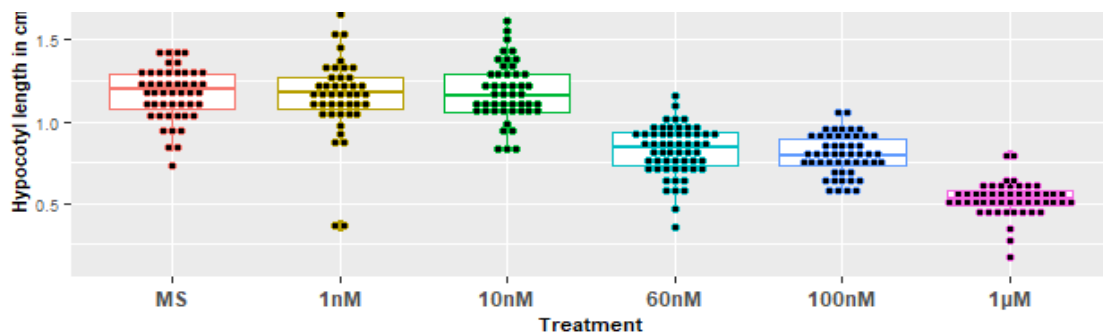
Άνω των 60nM υπάρχει μικρότερη διακύμανση και τα μέσα μεγέθη έχουν ελαττωθεί. Οι ελαττώσεις αυτές είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$) εκτελώντας ελέγχους T-test. Σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson, η αλληλεπίδραση της ορμόνης με το μήκος του υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται αρνητικά ισχυρή ($r = -0.75$, $p < 0.05$) για 60 nM, ($r = -0,802$, $p < 0.05$) για 100nM και αρνητικά πολύ ισχυρή ($r = -0,925$, $p < 0.05$) για 1µM.

Καλό είναι να τονισθεί πως σύμφωνα με το τεστ Kruskal – Wallis κάποια από τα δείγματα των πέντε συγκεντρώσεων ορμόνης είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$).

Με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων αποδεικνύεται πως τα ζεύγη ποσοτήτων που δεν διαφέρουν είναι εκείνα των 1nM και 10nM, και 60nM και 100nM ($p > 0.05$).



Γράφημα 22: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *hsp90.3*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.



Γράφημα 23: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *hsp90.3*, μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 22°C.

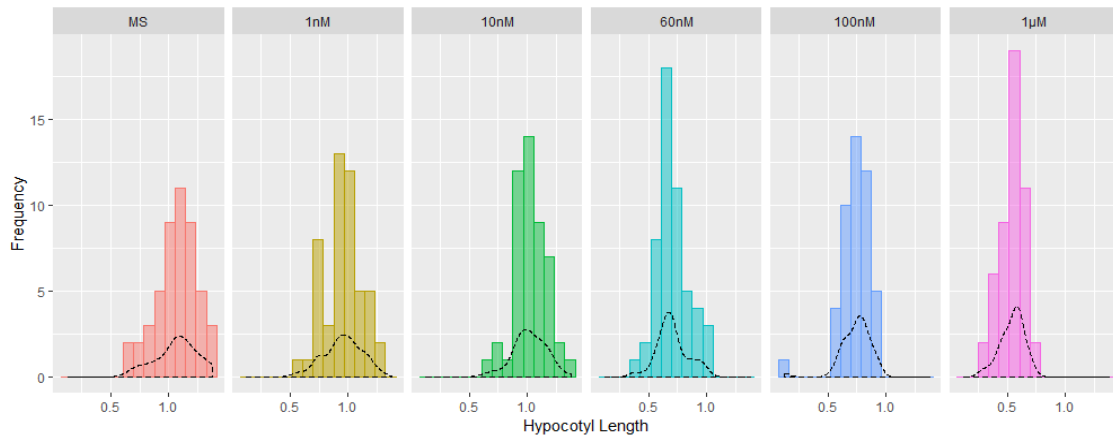
Τέλος, στο Πίνακα 24 και στα Γραφήματα 24 και 25, απεικονίζεται η διακύμανση των τιμών του υποκοτυλίου του μεταλλάγματος *hsp90.3* στους 37°C (Γράφημα 24) και η συμπεριφορά της διαμέσου του στις διαφορετικές συγκεντρώσεις BL (Γράφημα 25). Παρατηρείται πως αυξάνοντας την ποσότητα της ορμόνης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (37°C), το μέσο μήκος υποκοτυλίου παραμένει περίπου σταθερό στις μικρότερες συγκεντρώσεις. Στις συγκεντρώσεις άνω των 60nM όμως, το μέσο μήκος μειώνεται και η εξάπλωση των μετρήσεων δείχνει να συγκεντρώνονται περισσότερο γύρω από το μέσο μήκος.

Πίνακας 23: Περιγραφικά στοιχεία του μήκους του υποκοτυλίου φυτών του γενοτύπου *hsp90.3* ηλικίας επτά ημερών (7dag) μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

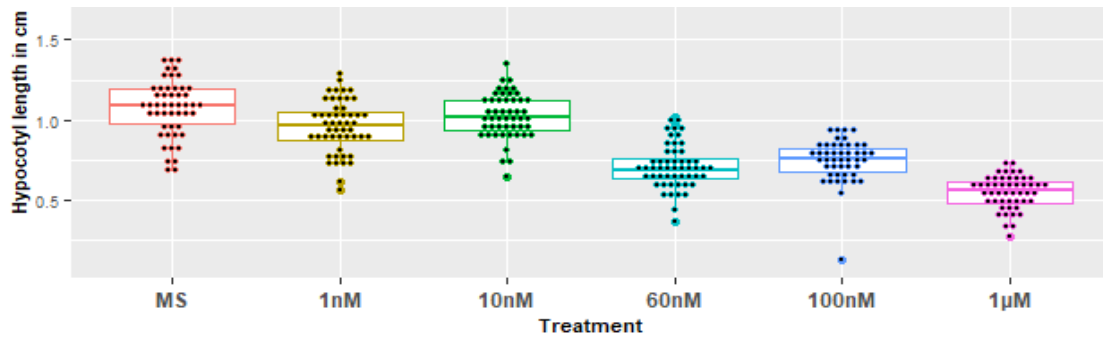
Quantity BL	n	Mean	SD	Median	Range
MS	49	1,068816327	0,179565642	1,085	0,693
1nM	50	0,95568	0,163673697	0,9645	0,729
10nM	49	1,021122449	0,140601925	1,015	0,704
60nM	52	0,703769231	0,134995224	0,6875	0,652
100nM	46	0,740108696	0,135317442	0,762	0,817
1μM	49	0,54344898	0,101584952	0,562	0,461

Σύμφωνα με τη μέθοδο One-Way ANOVA κάποια από τα δείγματα των πέντε συγκεντρώσεων ορμόνης είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$). Με τη διόρθωση πολλαπλών συγκρίσεων του Bonferroni αποδεικνύεται πως τα ζεύγη ποσοτήτων που δεν διαφέρουν είναι εκείνα των 1nM και 10nM, και 60nM και 100nM ($p > 0.05$).

Τα δείγματα στους 37°C είναι στατιστικώς διαφορετικά για όλες τις ποσότητες μπρασσινολιδίου εκτός των 10nM σε σύγκριση με το δείγμα του θεραπευτικού, σύμφωνα με τον παραμετρικό έλεγχο T test ($p < 0.05$). Σύμφωνα με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson, η συσχέτιση μεταξύ ποσότητας μπρασσινολιδίου και μήκους του υποκοτυλίου χαρακτηρίζεται ως αρνητικά μικρή σχέση ($r = -0.316$, $p < 0.05$) για 1nM και αρνητικά ισχυρή σχέση για 60nM ($r = -0.759$, $p < 0.05$) και 100nM ($r = -0.721$, $p < 0.05$) και τέλος αρνητικά πολύ ισχυρή σχέση για 1μM ($r = -0.876$, $p < 0.05$).



Γράφημα 24: Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *hsp90.3* μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.



Γράφημα 25: Θηκόγραμμα του μήκους του υποκοτυλίου ανά ποσότητα μπρασσινολιδίου (BL) φυτών ηλικίας επτά ημερών (7dag) του γενοτύπου *hsp90.3* μεγαλωμένων σε συνεχές σκοτάδι στους 37°C.

3.2.3 Έλεγχοι μέσων μηκών των γενοτύπων ανά ποσότητα ορμόνης.

Σε αυτήν την ενότητα συγκρίνεται η απόκριση του μέσου μήκους του υποκοτυλίου σε κάθε ποσότητα ορμόνης μεταξύ των τριών διαφορετικών γενοτύπων. Η συμπερασματολογία προκύπτει από τη σύγκριση των δειγμάτων που έχουν αναπτυχθεί σε παρόμοιες συνθήκες και ημέρες. Το επίπεδο σημαντικότητας και σε αυτήν την περίπτωση είναι 5%.

Στα δείγματα πέντε ημερών σε φυσιολογική θερμοκρασία (Γράφημα 26) φαίνεται ότι οι μέσες αποκρίσεις του γενοτύπου *hsp90.3* είναι ελαφρώς ψηλότερες έναντι των άλλων δύο ομάδων στο δείγμα MS. Οι όποιες διαφορές όμως είναι περιγραφικές και μη στατιστικά σημαντικές σύμφωνα με τη μέθοδο Brown- Forsythe ($p > 0.05$).

Όταν γίνει προσθήκη μπρασσινολιδίου σε συγκέντρωση 1nM, τα μεταλλαγμένα υποκοτύλια έχουν μικρότερο μέγεθος σε σχέση με το *Col-0*. Χρησιμοποιώντας τον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis, αποδεικνύεται ότι οι διαφορές στο μέγεθος είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$). Εκτενέστερα, διαπιστώνεται ότι σύμφωνα με τη διόρθωση του Bonferroni ($p < 0.05$), τα δείγματα του άγριου τύπου και του μεταλλάγματος *hsp90.3* διαφέρουν στατιστικά.

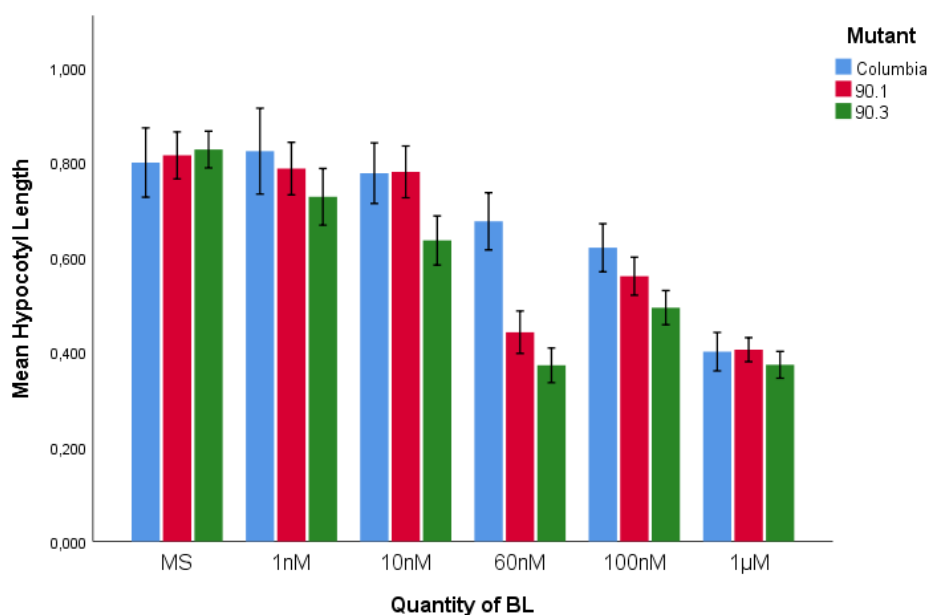
Όταν πραγματοποιηθεί προσθήκη 10nM, παρατηρήθηκε ότι το μέσο υποκοτύλιο αυξήθηκε, στο μετάλλαγμα *hsp90.1* ενώ μειώθηκε στο μετάλλαγμα *hsp90.3*. Εφόσον τα δείγματα δεν τείνουν να ακολουθούν την κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis, το οποίο απέδειξε ότι τα δείγματα είναι στατιστικώς διαφορετικά ($p < 0.05$). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη διόρθωση του Bonferroni μόνο οι αλλαγές στο μέγεθος των άγριου τύπου – μεταλλάγματος *hsp90.3* ($p < 0.05$) και των μεταλλαγμάτων ($p < 0.05$), θεωρούνται στατιστικά σημαντικές και η αύξηση μήκους

μεταξύ άγριου τύπου- μεταλλάγματος *hsp90.1* οφείλεται στην τυχαιότητα σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στην περίπτωση των 60nM, φαίνεται ότι υπάρχει δραματική μείωση του μέσου μεγέθους του υποκοτυλίου των μεταλλαγμάτων σε σχέση με τον τύπο *Columbia*. Τα τρία δείγματα τείνουν να ακολουθούν κανονική κατανομή και αφού οι διακυμάνσεις είναι επίσης ίσες ($p > 0.05$), χρησιμοποιείται η μέθοδος One-Way ANOVA η οποία συμφωνεί ότι τα τρία δείγματα διαφέρουν στατιστικά ($p < 0.05$). Αναλυτικότερα σύμφωνα με το κριτήριο Tukey HSD και τη διόρθωση του Bonferroni, ο άγριος τύπος διαφέρει στατιστικά από το μετάλλαγμα *hsp90.1* ($p < 0.05$) και το μετάλλαγμα *hsp90.3* ($p < 0.05$) ενώ τα δύο μεταλλάγματα μεταξύ τους δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$).

Όσον αφορά τα 100nM, παρατηρείται κυρίως ότι το μετάλλαγμα *hsp90.3* έχει μέσο μήκος πολύ χαμηλότερο από εκείνο του άγριου τύπου. Αυτή η διαφορά είναι η μόνη που θεωρείται στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) σύμφωνα με τη διόρθωση του Bonferroni. Να ληφθεί υπόψη ότι λόγω κανονικότητας και ισότητας διακυμάνσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος One-Way ANOVA και τα δείγματα παρουσίασαν διαφορές ($p < 0.05$).

Τέλος στην προσθήκη εξωγενούς ορμόνης σε συγκέντρωση 1 μ M, φαίνεται στο διάγραμμα ότι τα τρία δείγματα δεν έχουν στατιστικά διαφορές στο μέσο μήκος. Αυτό επιβεβαιώνεται με τη χρήση του One-Way ANOVA ($p > 0.05$). Εννοείται ότι τα τρία δείγματα ακολουθούν κανονική κατανομή και έχουν ίσες διακυμάνσεις ($p > 0.05$).



Γράφημα 26: Μέσα μήκη υποκοτυλίων των γενοτύπων αναπτυγμένα στους 22°C στις πέντε ημέρες.

Με την αύξηση της θερμοκρασίας (Γράφημα 27), φαίνεται ότι οι μέσες αποκρίσεις του γενοτύπου *hsp90.3* είναι ψηλότερες έναντι των άλλων δύο ομάδων στο δείγμα MS. Με τη χρήση του μη παραμετρικού τεστ Kruskal-Wallis, επειδή δεν ικανοποιείται η προϋπόθεση της κανονικότητας, υπάρχουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των συγκεκριμένων δειγμάτων ($p < 0.05$). Ειδικότερα με την διόρθωση του Bonferroni, αποδεικνύεται ότι μόνο τα δείγματα *hsp90.1* και *hsp90.3* διαφέρουν στατιστικά ($p < 0.05$).

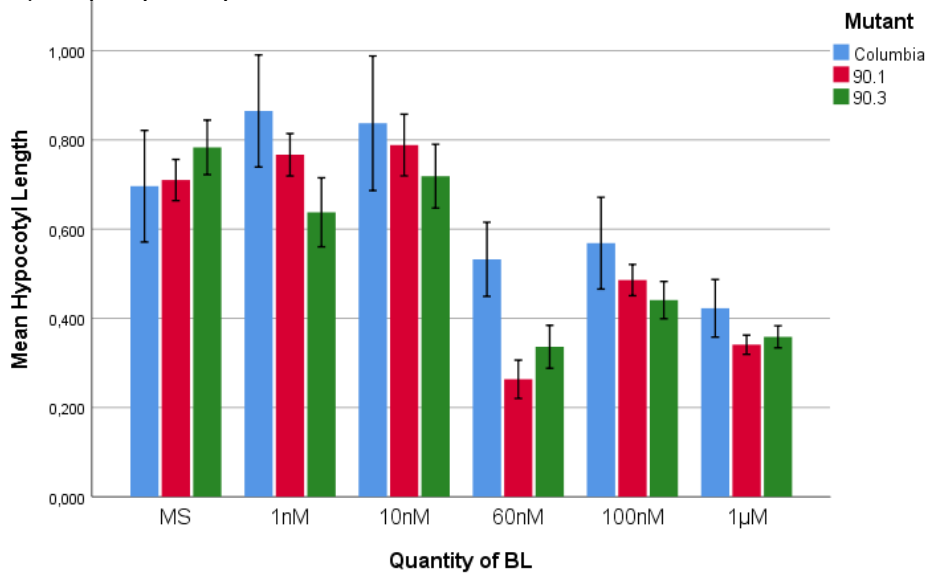
Όταν γίνει εφαρμογή μπρασσινολιδίου σε συγκέντρωση 1nM, τα μεταλλαγμένα υποκοτύλια έχουν μικρότερο μέγεθος. Χρησιμοποιώντας τον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis, αποδεικνύεται ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέσο μέγεθος των υποκοτυλίων ($p < 0.05$). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την διόρθωση του Bonferroni, τα δείγματα του άγριου τύπου και του μεταλλάγματος *hsp90.3* διαφέρουν ως προς το μέγεθος του υποκοτυλίων τους ($p < 0.05$) όπως και τα δείγματα του άγριου τύπου και του μεταλλάγματος *hsp90.1* ($p < 0.05$).

Παράλληλα φαίνεται ότι όταν γίνει προσθήκη μπρασσινολιδίου 10nM, τα μεταλλαγμένα *hsp90.3* υποκοτύλια παρουσιάζουν μία εντονότερη μείωση στο μήκος τους. Για τον έλεγχο των μέσων τιμών χρησιμοποιείται το τεστ Kruskal-Wallis αφού ένα μόνο από τα τρία δείγματα μοιάζει να ακολουθεί την κανονική κατανομή. Ο έλεγχος αυτός εγκρίνει ότι δύο τουλάχιστον από τους τρεις γενοτύπους διαφέρουν στατιστικά ($p < 0.05$). Έτσι σύμφωνα με την διόρθωση του Bonferroni μόνο τα δείγματα του *Columbia* και του *hsp90.3* διαφέρουν στατιστικά ($p < 0.05$).

Όσον αφορά τα 60nM, παρατηρείται κυρίως ότι το μετάλλαγμα *hsp90.1* έχει μέσο μήκος αρκετά χαμηλότερο και από εκείνο του άγριου τύπου και από το μετάλλαγμα *hsp90.3*. Όπως είναι λογικό η μη παραμετρική μέθοδος Kruskal-Wallis πιστοποιεί και πάλι την διαφορετικότητα των τριών δειγμάτων ($p < 0.05$). Από τον έλεγχο του Bonferroni επίσης συμπεραίνεται ότι ο άγριος τύπος διαφέρει στατιστικά από το μετάλλαγμα *hsp90.1* ($p < 0.05$) και από το δεύτερο μετάλλαγμα ($p < 0.05$).

Στην περίπτωση των 100nM, φαίνεται ότι υπάρχει έντονη μείωση του μέσου μεγέθους του υποκοτυλίου των μεταλλαγμάτων σε σχέση με τον τύπο *Columbia*. Τα δείγματα μοιάζουν να μην ακολουθούν όλα την κανονική κατανομή και έτσι χρησιμοποιείται και πάλι ο έλεγχος Kruskal-Wallis όπου αποδεικνύει ότι κάποια από τα τρία δείγματα διαφέρουν στατιστικά ($p < 0.05$). Αναλυτικότερα, το μετάλλαγμα *hsp90.3* και *Columbia* διαφέρουν ($p < 0.05$), σύμφωνα με τη διόρθωση του Bonferroni.

Τέλος στον χειρισμό με ορμόνη σε 1 μ M, φαίνεται στο διάγραμμα ότι το μετάλλαγμα *hsp90.1* έχει μέσο μέγεθος ελαφρώς μικρότερο από τα άλλα δύο δείγματα. Λόγω της μη κανονικότητας χρησιμοποιείται και πάλι ο έλεγχος Kruskal-Wallis όπου αποδεικνύει ότι κάποια από τα τρία δείγματα διαφέρουν στατιστικώς ($p < 0.05$). Αναλυτικότερα, μόνο το μετάλλαγμα *hsp90.1* και *Columbia* διαφέρουν ($p < 0.05$), σύμφωνα με τη διόρθωση του Bonferroni



Γράφημα 27: Μέσα μήκη υποκοτυλίων των γενοτύπων αναπτυγμένα στους 37°C στις πέντε ημέρες.

Στα δείγματα επτά ημερών σε φυσιολογική θερμοκρασία (Γράφημα 28), φαίνεται ότι οι μέσες αποκρίσεις του άγριου τύπου είναι ψηλότερες έναντι των άλλων δύο ομάδων στο δείγμα MS. Σύμφωνα με τη μέθοδο Kruskal – Wallis όμως, οι όποιες διαφορές στο μέσο μήκος μεταξύ των δειγμάτων δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p > 0.05$).

Όταν γίνει προσθήκη μπρασσινολιδίου 1nM, τα μεταλλαγμένα υποκοτύλια έχουν ελαφρώς μικρότερο μέγεθος. Χρησιμοποιώντας τον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis, αποδεικνύεται ότι οι διαφορές στο μέγεθος δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p > 0.05$).

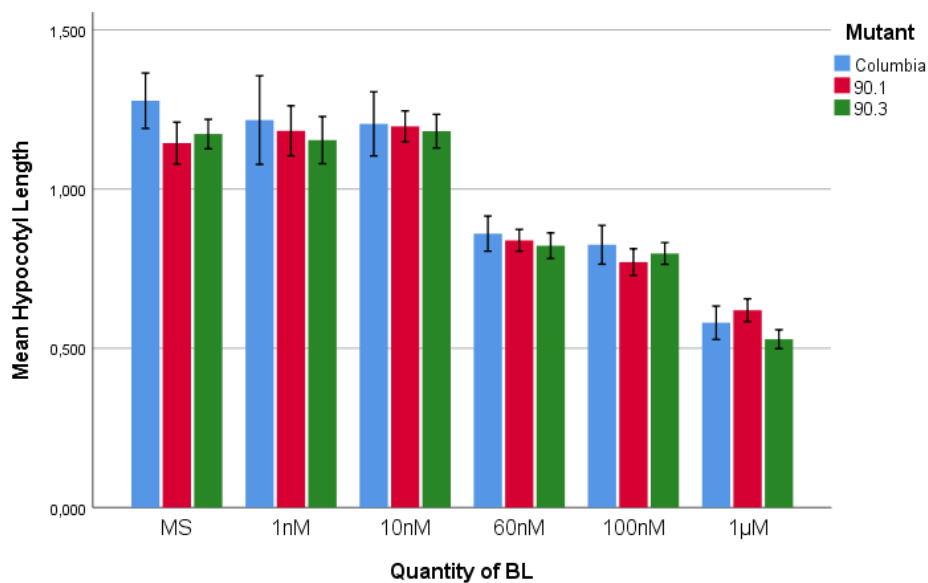
Παράλληλα, φαίνεται ότι όταν γίνει εφαρμογή μπρασσινολιδίου σε συγκέντρωση 10nM, τα μεταλλαγμένα υποκοτύλια παρουσιάζουν περίπου το ίδιο μέγεθος. Τα δείγματα μοιάζουν να ακολουθούν την κανονική κατανομή αλλά δεν έχουν ίσες διακυμάνσεις ($p < 0.05$). Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται το test Brown-Forythe όπου τα τρία δείγματα δεν διαφέρουν στατιστικώς ($p > 0.05$).

Στην περίπτωση των 60nM, φαίνεται ότι δεν υπάρχει έντονη μείωση του μέσου μεγέθους του υποκοτυλίου των μεταλλαγμάτων σε σχέση με τον τύπο *Columbia*. Τα

δείγματα μοιάζουν να ακολουθούν την κανονική κατανομή ($p < 0.05$) και έχουν ίσες διακυμάνσεις ($p > 0.05$). Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται η μέθοδος One-Way ANOVA όπου τα τρία δείγματα δεν διαφέρουν στατιστικώς ($p > 0.05$).

Όσον αφορά τα 100nM, παρατηρείται κυρίως ότι το μετάλλαγμα *hsp90.1* έχει μέσο μήκος χαμηλότερο από εκείνο του άγριου τύπου ενώ φαίνεται ότι το μετάλλαγμα *hsp90.3* να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα. Παρόλα αυτά, οι όποιες διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές σύμφωνα με το τεστ Kruskal-Wallis ($p > 0.05$).

Τέλος στον χειρισμό του 1μM, φαίνεται στο διάγραμμα ότι το μετάλλαγμα *hsp90.1* έχει μέσο μέγεθος μεγαλύτερο από τους άλλους δύο γενότυπους. Λόγω της κανονικότητας και της ισότητας διακυμάνσεων των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος One-Way ANOVA όπου συμφωνεί περί της μη ισότητας των μέσων μηκών των γενοτύπων ($p < 0.05$). Λεπτομερέστερα, με το τεστ Tukey HSD και τη διόρθωση του Bonferroni μόνο τα μέσα μήκη των μεταλλαγμάτων διαφέρουν στατιστικά ($p < 0.05$).



Γράφημα 28: Μέσα μήκη υποκοτυλίων των γενοτύπων αναπτυγμένα στους 22°C στις επτά ημέρες.

Στα δείγματα επτά ημερών σε φυσιολογική θερμοκρασία (Γράφημα 29), φαίνεται ότι οι μέσες αποκρίσεις του άγριου τύπου είναι ψηλότερες έναντι των άλλων δύο ομάδων στο δείγμα MS. Σύμφωνα με τη μέθοδο Brown - Forsythe όμως, οι όποιες διαφορές στο μέσο μήκος μεταξύ των δειγμάτων δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p > 0.05$).

Με την άνοδο της θερμοκρασίας, στην περίπτωση των 1nM, παρατηρείται ότι υπάρχει έντονη μείωση του μέσου μεγέθους του υποκοτυλίου των μεταλλαγμάτων σε σχέση με τον τύπο *Columbia*. Τα δείγματα δεν μοιάζουν να ακολουθούν όλα την κανονική κατανομή οπότε χρησιμοποιείται το τεστ Kruskal-Wallis όπου τα τρία

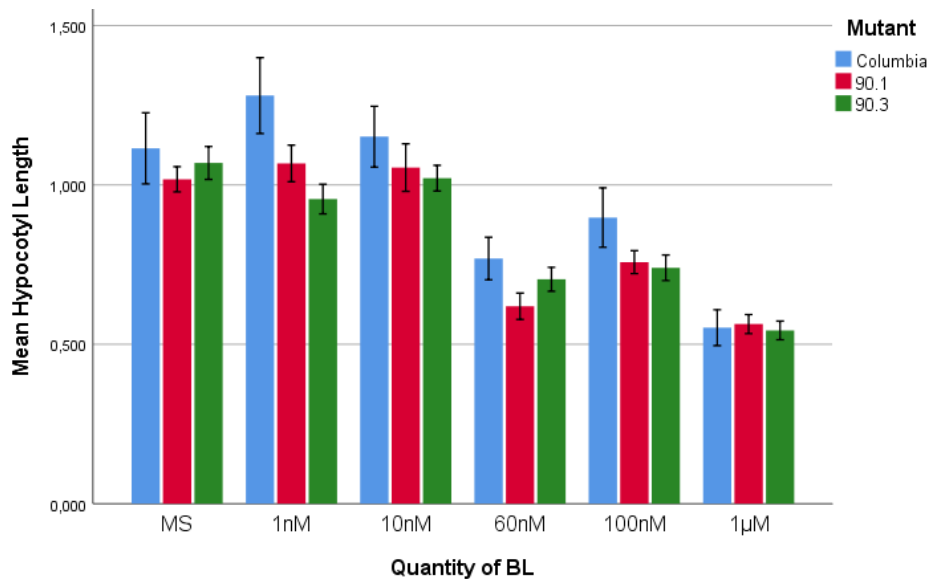
δείγματα διαφέρουν στατιστικώς ($p < 0.05$). Πιο συγκεκριμένα, τα ζευγάρια μετάλλαγμα *hsp90.3-Columbia*, μεταλλάγματα *90.1-90.3* και μετάλλαγμα *hsp90.1-Columbia* διαφέρουν στατιστικώς ($p < 0.05$) σύμφωνα με τη διόρθωση του Bonferroni .

Στα δείγματα φαίνεται ότι όταν γίνει προσθήκη εξωγενούς ορμόνης σε συγκέντρωση 10nM, τα μεταλλαγμένα *hsp90.3* υποκοτύλια έχουν εντονότερο μικρότερο μέγεθος. Χρησιμοποιώντας τον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis, αποδεικνύεται ότι οι διαφορές στο μέγεθος των τριών δειγμάτων είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$). Παρόλα αυτά μόνο το δείγμα του μεταλλάγματος *hsp90.3* και του άγριου τύπου διαφέρουν στατιστικώς ($p < 0.05$), σύμφωνα με τη διόρθωση του Bonferroni .

Όσον αφορά τα 60nM, παρατηρείται κυρίως ότι το μετάλλαγμα *hsp90.1* έχει μέσο μήκος χαμηλότερο και από εκείνο του άγριου τύπου και από το μετάλλαγμα *hsp90.3*. Λόγω κανονικότητας αλλά μη ισότητας διακυμάνσεων ($p < 0.05$) των τριών δειγμάτων χρησιμοποιείται το τεστ Brown-Forythe που εγκρίνει την απόρριψη της ισότητας των τριών δειγμάτων ($p < 0.05$). Περαιτέρω κάνοντας χρήση του τεστ Dunnett 's T3, αποδεικνύεται ότι το μέσο μήκος του άγριου τύπου με το μετάλλαγμα *hsp90.1* διαφέρει σημαντικά ($p < 0.05$) και ότι το μέσο μήκος του μεταλλάγματος *hsp90.1* διαφέρει στατιστικώς με το μέσο μήκος του μεταλλάγματος *90.3* ($p < 0.05$).

Όσον αφορά τα 100nM, παρατηρείται ότι τα μεταλλάγματα έχουν μέσα μήκη χαμηλότερα από εκείνο του άγριου τύπου. Αυτό αποδεικνύεται και στατιστικά μέσω του τεστ Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Πιο συγκεκριμένα με τη διόρθωση του Bonferroni, το μέσο μήκος του άγριου τύπου διαφέρει στατιστικώς και με το μετάλλαγμα *hsp90.1* ($p < 0.05$) και με το *hsp90.3* ($p < 0.05$).

Τέλος στον χειρισμό με ορμόνη σε συγκέντρωση 1μM, φαίνεται στο διάγραμμα ότι το μετάλλαγμα *hsp90.1* έχει μέσο μέγεθος ελαφρώς μεγαλύτερο από τον άγριο τύπο ενώ το μετάλλαγμα *hsp90.3* έχει μέσο μέγεθος ελαφρώς μικρότερο. Λόγω της μη κανονικότητας χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική μέθοδος Kruskal-Wallis όπου αποδεικνύει ότι οι μικρές αυτές διαφορές στο μέγεθος δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



Γράφημα 29: Μέσα μήκη υποκοτυλίων των γενοτύπων αναπτυγμένα στους 37°C στις επτά ημέρες.

3.2.4 Απόκριση διάμεσου μήκους υποκοτυλίου στο μπρασσινολίδιο

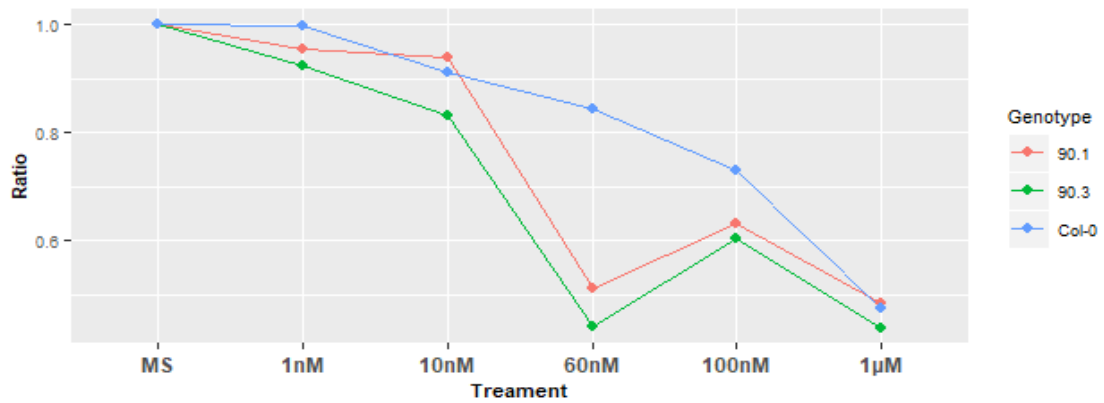
Στην παρούσα ενότητα, γίνεται προσπάθεια περαιτέρω αναλυτικής και περιγραφικής απεικόνισης των δεδομένων. Έτσι, μετρήθηκε η διάμεσος ως απόκριση του μήκους του υποκοτυλίου σε κάθε συγκέντρωση για κάθε γενότυπο και θερμοκρασία, ώστε να υπολογιστεί η σχετική ευαισθησία του κάθε γενοτύπου στο BL και να συγκριθεί με αυτή των υπολοίπων. Η απόκριση υπολογίστηκε από τον ακόλουθο τύπο:

$$Ratio = \text{Διάμεσος του μήκους σε } XnM \text{ BL} / \text{Διάμεσος του μήκους σε MS},$$

όπου $X = 1, 10, 60, 100, 1000$.

Τονίζεται πως επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η διάμεσος διότι είναι το μέτρο θέσης που δεν επηρεάζεται από ακραίες μετρήσεις και έτσι αποτελεί αντιπροσωπευτικότερη εικόνα των δεδομένων.

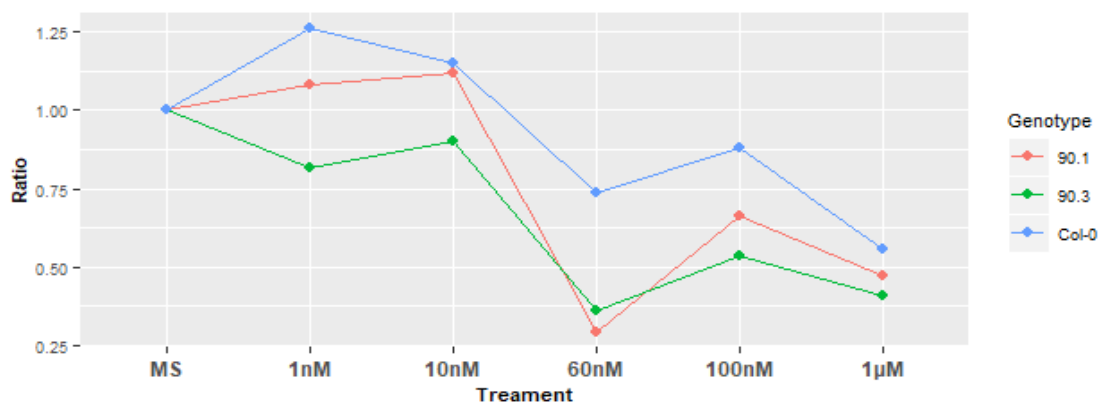
Στο Γράφημα 30 απεικονίζεται η απόκριση των υποκοτυλίων στις 5dag και σε φυσιολογική θερμοκρασία. Θα μπορούσε να ειπωθεί ότι υπάρχουν δύο ομάδες απόκρισης. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τον τρόπο που αποκρίνονται τα μεταλλάγματα και η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τον τρόπο απόκρισης του άγριου τύπου. Περισσότερη εντύπωση προκαλείται στο στάδιο από τα 10nM στα 60nM της ομάδας A διότι το ποσοστό μειώνεται δραματικά, ύστερα αυξάνεται και τέλος πάλι μειώνεται. Αντίθετα, οι δείκτες της ομάδας B ακολουθούν μια αρκετά διαφορετική συμπεριφορά, να μεν φθίνουσα, δε καμπυλωτή κατανομή.



Γράφημα 30: Γράφημα γραμμής δεικτών των διαμέσων ανά ποσότητα ορμόνης και γενότυπο στους 22°C σε διάρκεια πέντε ημερών.

Περιγραφικά, φαίνεται πως οι επιπτώσεις της ανόδου της θερμοκρασίας στον άγριο τύπο δεν είναι τόσο σοβαρές σε σχέση με τις επιπτώσεις στα μεταλλάγματα (Γράφημα 31). Παρόλα αυτά, το *Columbia* επιδέχεται την μεγαλύτερη μείωση απόκρισης στα 1µM όπου χάνεται άνω του 40% της μέσης απόκρισης του θρεπτικού. Επιπροσθέτως παρατηρείται αυξητική τάση του δείκτη του μήκους στα 1nM και 10nM επί του MS στους γενοτύπους *Columbia* και *90.1*.

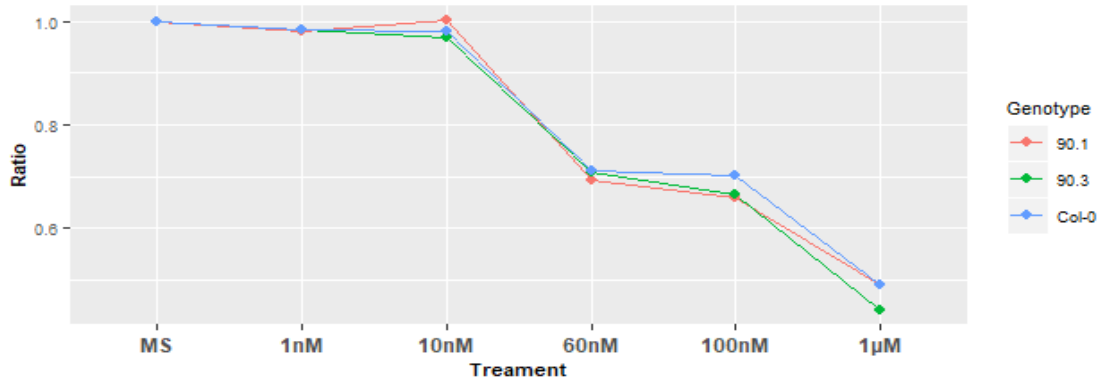
Αντίθετα με τον άγριο τύπο, η επίδραση της θερμοκρασίας είναι εντονότερη στις αποκρίσεις των μεταλλαγμάτων. Υπάρχουν μεγάλες μειώσεις στις αποκρίσεις του μέσου φυτού ειδικά στο στάδιο από 10nM σε 60nM.



Γράφημα 31: Γράφημα γραμμής δεικτών των διαμέσων ανά ποσότητα ορμόνης και γενότυπο στους 37°C σε διάρκεια πέντε ημερών.

Στις 7 ημέρες δίχως την επίδραση της θερμικής καταπόνησης, οι κατανομές των δεικτών των τριών γενοτύπων φαίνονται να είναι αρκετά κοντά σαν είναι όμοιες. Στο Γράφημα 32, οι αποκρίσεις των υποκοτυλίων του γενοτύπου *90.1* έχουν αυξητική τάση στα 10nM και μεγαλύτερη φθίνουσα έναντι των άλλων γενοτύπων στα 60nM και σε

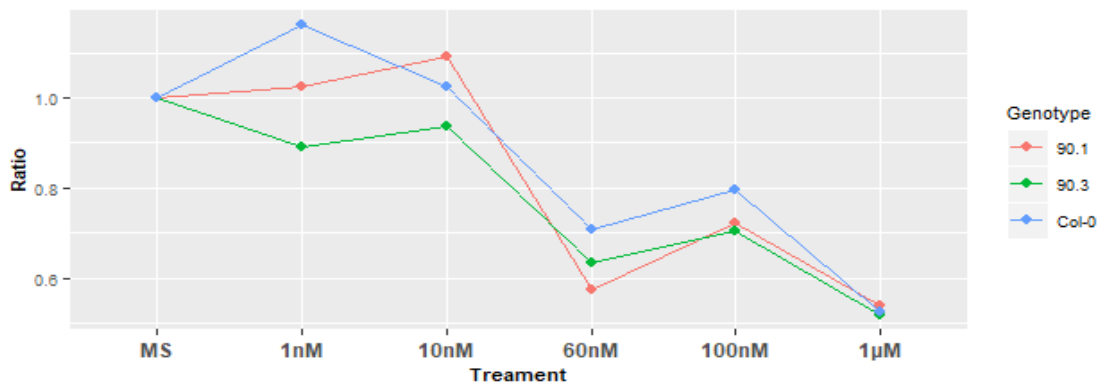
σχέση με το MS. Η μεγαλύτερη σμίκρυνση που δέχονται τα μήκη των υποκοτυλίων είναι εκεί όπου οι δείκτες των τριών κατανομών μειώνονται δραματικά. Αυτή η μείωση κατά 30% περίπου, αφορά τις αποκρίσεις από τα 10nM στα 60nM.



Γράφημα 32: Γράφημα γραμμής δεικτών των διαμέσων ανά ποσότητα ορμόνης και γενότυπο στους 22°C σε διάρκεια επτά ημερών.

Η αύξηση της θερμοκρασίας στις 7dag επηρεάζει ιδιαίτερα την απόκριση των φυτών σε μικρές συγκεντρώσεις BL σύμφωνα με το Γράφημα 33. Μέχρι τα 10nM, κάθε γενότυπος δείχνει διαφορετικό τρόπο απόκρισης στο BL. Μετά τα 60nM, ο τρόπος απόκρισης των τριών γενοτύπων συμπίπτει και όπως φαίνεται από τους δείκτες υπάρχει μεγάλη μείωση του μήκους, στη συνέχεια υπάρχει μία μικρή αύξηση στα 100nM και τέλος πάλι μείωση.

Παρόλο που το γράφημα δεν απεικονίζει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των αποκρίσεων, εμφανίζει καλύτερη εικόνα με μικρότερη απόσταση των τριών γενοτύπων έναντι του αντίστοιχου γραφήματος στις πέντε ημέρες.

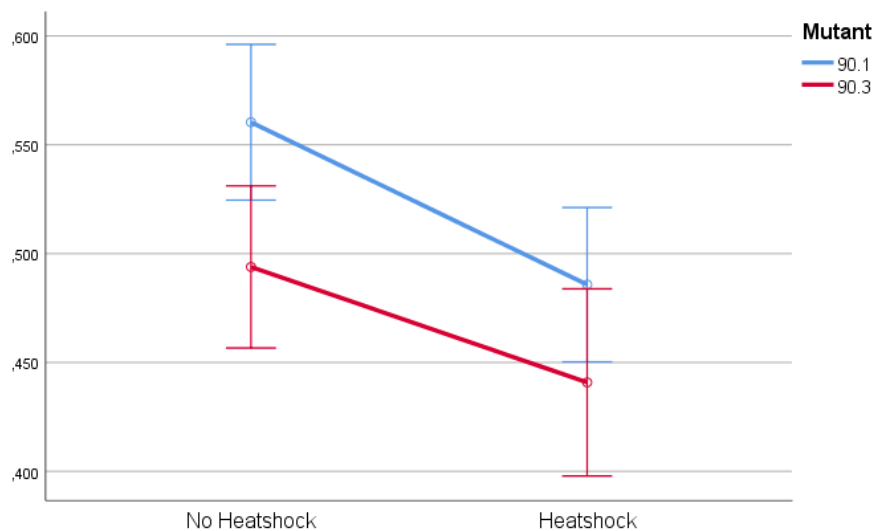


Γράφημα 33: Γράφημα γραμμής δεικτών των διαμέσων ανά ποσότητα ορμόνης και γενότυπο στους 37°C σε διάρκεια επτά ημερών.

3.2.5 Έλεγχοι μέσω αποκρίσεων με δύο παράγοντες

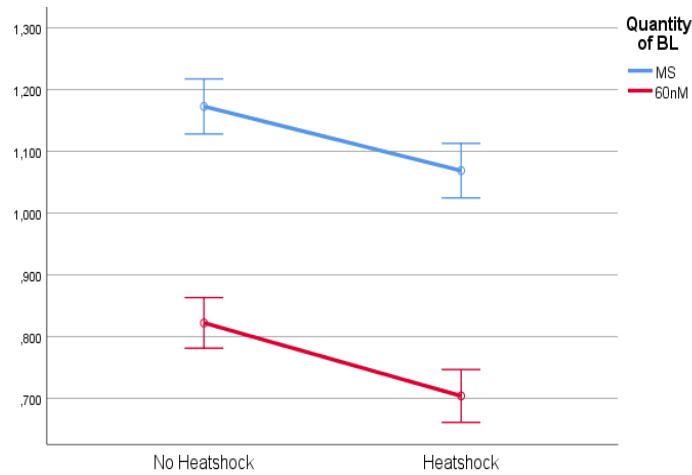
Η παρούσα ενότητα στόχο έχει να αποδείξει την επίδραση δύο τουλάχιστον παραγόντων (θερμοκρασία, ποσότητα συγκέντρωσης BL, γενότυπος, διάρκεια σε ημέρες) στην απόκριση του μέσου υποκοτυλίου. Έχουν ελεγχθεί πιθανοί συνδυασμοί παραγόντων αλλά μόνο οι παρακάτω πληρούσαν τα κριτήρια για να εφαρμοστεί η μεθοδος Two – way ANOVA, όπως αναφέρονται στο υποκεφάλαιο 2.3.9.

Στο Γράφημα 34 απεικονίζεται η πορεία της μέσης απόκρισης σε φαινοτύπους των μεταλλαγμάτων όπου έχει γίνει προσθήκη εξωγενούς ορμόνης σε συγκέντρωση 100nM, αναπτυγμένα σε φυσιολογική θερμοκρασία ή θερμική καταπόνηση σε διάρκεια πέντε ημερών. Σαφώς η πορεία είναι φθίνουσα σε τέτοια συγκέντρωση μπρασσινολιδίου, όμως υπό θερμική καταπόνηση η διασπορά των αποκρίσεων των δύο μεταλλαγμάτων είναι αρκετά παρόμοιες. Η απουσία σημαντικής αλληλεπίδρασης θερμοκρασίας και γενοτύπου ($p > 0.05$) σημαίνει ότι οι δύο μεταβλητές, επιδρούν ανεξάρτητα η μία της άλλης στα μεγέθη του υποκοτυλίου.



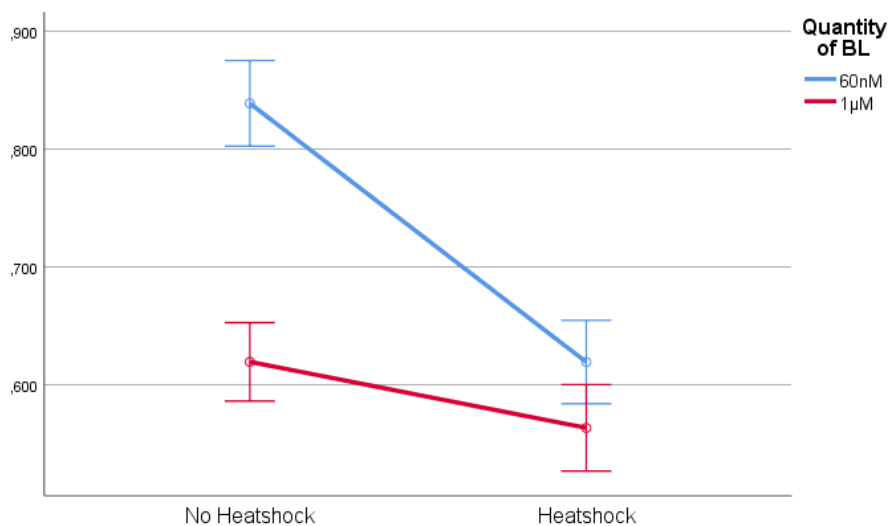
Γράφημα 34: Επίδραση της θερμοκρασίας και γενοτύπου στην απόκριση του μέσου μήκους των υποκοτυλίων, μεγαλωμένων με 100nM BL στις πέντε ημέρες.

Στο Γράφημα 35 απεικονίζεται η πορεία της μέσης απόκρισης σε φαινοτύπους του τύπου *hsp90.3* στα δείγματα MS και 60nM, αναπτυγμένα σε φυσιολογική θερμοκρασία ή θερμική καταπόνηση σε διάρκεια επτά ημερών. Υπάρχει απουσία στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης θερμοκρασίας και συγκέντρωσης ορμόνης ($p > 0.05$) που σημαίνει ότι οι δύο παράγοντες επιδρούν ανεξάρτητα ο ένας του άλλου στη μέση απόκριση.



Γράφημα 35: Επίδραση της θερμοκρασίας και συγκέντρωσης BL (MS, 60nM) στην απόκριση του μέσου μήκους των υποκοτυλίων του γενοτύπου *hsp90.3*, μεγαλωμένων στις επτά ημέρες.

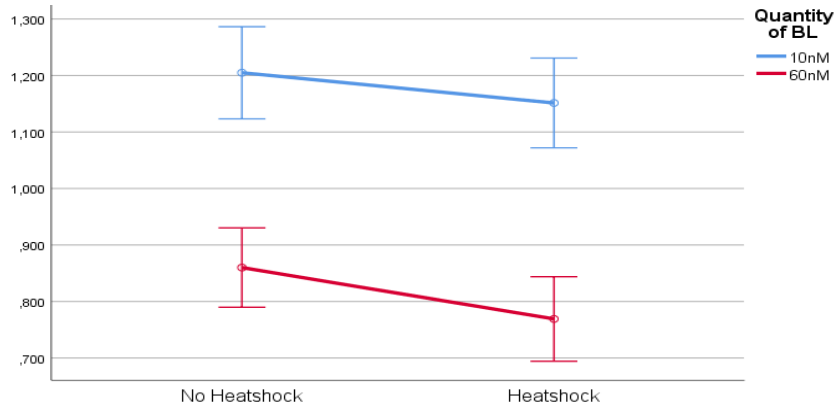
Στο Γράφημα 36 απεικονίζεται η πορεία της μέσης απόκρισης σε φαινοτύπους του γενοτύπου *hsp90.1* όπου έχει γίνει προσθήκη ορμόνης σε συγκεντρώσεις 60nM ή 1000nM, αναπτυγμένα σε φυσιολογική θερμοκρασία ή θερμική καταπόνηση σε διάρκεια 7 ημερών. Παρατηρείται ότι η μεταβολή της θερμοκρασίας επηρεάζει εντονότερα την απόκριση στα 60nM και παράλληλα γίνεται αρκετά ξεκάθαρος ο διαχωρισμός των μεγεθών στις δύο συγκεντρώσεις. Έτσι, η μέθοδος Two – way ANOVA αποδεικνύει την ύπαρξη σημαντικής αλληλεπίδρασης θερμοκρασίας και συγκέντρωσης μπρασσινολιδίου ($p < 0.05$) στο μήκος του υποκοτυλίου.



Γράφημα 36: Επίδραση της θερμοκρασίας και συγκέντρωσης BL (60nM, 1000nM) στην απόκριση του μέσου μήκους των υποκοτυλίων του γενοτύπου *hsp90.1*, μεγαλωμένων στις επτά ημέρες.

Στο Γράφημα 37 απεικονίζεται η πορεία της μέσης απόκρισης σε φαινοτύπους του άγριου τύπου όπου έχει γίνει προσθήκη μπρασσινολιδίου 10nM ή 60nM, αναπτυγμένα σε φυσιολογική θερμοκρασία ή θερμική καταπόνηση σε διάρκεια επτά ημερών. Υπάρχει

απουσία στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης θερμοκρασίας και συγκέντρωσης ορμόνης ($p > 0.05$) διότι ο παράγοντας της θερμοκρασίας δεν επιδρά στατιστικώς στο μέγεθος του υποκοτυλίου.



Γράφημα 37: Επίδραση της θερμοκρασίας και συγκέντρωσης BL (10nM, 60nM) στην απόκριση του μέσου μήκους των υποκοτυλίων του άγριου τύπου, μεγαλωμένων στις επτά ημέρες.

3.2.6 Μοντέλο Ανάλυσης Παλινδρόμησης

Είναι πρόσφορο για την έρευνα η προσπάθεια μοντέλου πρόβλεψης του μήκους του υποκοτυλίου. Σε αυτήν την υποπαράγραφο, επιδιώκεται μέσω της πολλαπλής ανάλυσης παλινδρόμησης να οριστεί μία εξίσωση η οποία θα εκτιμάει το μήκος από τον αριθμό ημερών, την θερμοκρασία ανάπτυξης, την ποσότητα μπρασσινολιδίου και τον τύπο του γενοτύπου. Παράλληλα, προκειμένου για την ορθή αποτελεσματικότητα του μοντέλου χρειάζεται τα δεδομένα να πληρούν τις προϋποθέσεις του μοντέλου πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης.

Οι προϋποθέσεις, ωστόσο, πληρούνται όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στους 22°C κι με συγκεκριμένες ποσότητες της ορμόνης. Επομένως, παρακάτω αποτυπώνεται το μοντέλο πρόβλεψης με συντελεστή πολλαπλού προσδιορισμού $R^2 = 0.545$:

$$Hypocotyl\ Length = - 0.094 + 0.137 * Days - 0.00189 * Quantity_BL - 0.051 * Mutant$$

όπου η μεταβλητή *Mutant* διακρίνεται στον άγριο τύπο με κωδικό μηδέν (0), στο μετάλλαγμα *hsp90.1* με κωδικό ένα (1) και στο μετάλλαγμα *hsp90.3* με κωδικό δύο (2).

Κεφάλαιο 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι HSP90 συνιστούν μια πολύ συντηρημένη οικογένεια μοριακών «συνοδών» θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών και ανιχνεύονται τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Αποτελούν το 1-2% των συνολικών κυτταρικών πρωτεϊνών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (Lai et al., 1984) και τα επίπεδα τους αυξάνονται σε καταστάσεις θερμικής καταπόνησης, με αποτέλεσμα να αποτελούν το 4%-6% των κυτταρικών πρωτεϊνών στο κύτταρο (Wegele et al., 2004; Young et al., 2001).

Είναι γνωστό ότι οι HSP90 εμπλέκονται και σε μηχανισμούς απόκρισης σε καταπονήσεις, σε μηχανισμούς ελέγχου-διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης καθώς και σε πλήθος αναπτυξιακών διαδικασιών ρυθμίζοντας τοπικά, χρονικά και ποσοτικά τη «σταθερότητα» και λειτουργικότητα των πρωτεϊνών-στόχων τους (Tairale et al., 2010; Samakovli et al., 2014; Samakovli et al., 2007).

Τα μπρασισινοστεροειδή είναι στεροειδείς ορμόνες που ρυθμίζουν αναπτυξιακές διεργασίες στα φυτά όπως η κυτταρική διαίρεση και η επιμήκυνση. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι στο σηματοδοτικό μονοπάτι των BR υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της BIN2 πρωτεΐνης και των HSP90 (Samakovli et al., 2014). Οι HSP90 ρυθμίζουν την υποκυτταρική τοποθέτηση της κινάσης BIN2 και συνεπώς ελέγχουν χωρικά τη δραστηριότητά της, επηρεάζοντας έτσι την εξέλιξη σηματοδότησης του BR μονοπατιού. Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι οι HSP90 αλληλοεπιδρούν τόσο με τις φωσφορυλιωμένες όσο και με τις ενεργές μορφές των BES1 και BZR1 μεταγραφικών παραγόντων (Samakovli et al., 2020; Shigeta et al., 2014; Lachowiec et al., 2013). Πρόσφατα, δείχθηκε η ύπαρξη αλληλεπίδρασης των HSP90.1 και HSP90.3 με την κυτταροπλασματική περιοχή του BRI1 υποδοχέα (πειραματικά δεδομένα εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, ΓΠΑ).

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας διερευνήθηκε η πιθανή διαφορική απόκριση στα μπρασισινοστεροειδή των HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεϊνών, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε συνθήκες καταπόνησης. Ως εκ τούτου έγινε προσδιορισμός της σχέσης μεταξύ της ποσοτικής δόσης (συγκέντρωση BL) και της αντίδρασης (επιμήκυνση του υποκοτυλίου) των αναπτυσσόμενων φυταρίων σε διαφορετικά *hsp90* γενετικά υπόβαθρα. Οι μετρήσεις που έγιναν αφορούσαν στην μεταβολή του μήκους του

υποκοτυλίου του οργανισμού *Arabidopsis thaliana*, καθώς είναι γνωστό ότι τα υποκοτύλια έχει απλή ανατομία και χρησιμοποιείται ως μοντέλο για τη μελέτη της κυτταρικής επέκτασης (Boron and Vissenberg, 2014).

Είναι γνωστό ότι υψηλές συγκεντρώσεις μπρασσινοστεροειδών (BRs) καταστέλλουν την επιμήκυνση του υποκοτυλίου και ελαττώνουν την καμπυλότητα του ακίστρου, όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες σκότους (Vert et al., 2005). Από την ανάλυση των πειραματικών μας δεδομένων ήταν προφανές ότι τα μπρασσινοστεροειδή έχουν κατασταλτική δράση στην ανάπτυξη όλων των γενοτύπων που μελετήθηκαν όταν η συγκέντρωση της εξωγενούς ορμόνης που εφαρμόζεται ξεπεράσει μια συγκεκριμένη τιμή (60nM). Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν, επίσης, με την αναφορά που καταδεικνύει ότι η εξωγενής εφαρμογή της ορμόνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις προωθεί, και αντίστοιχα σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει την επιμήκυνση των κυττάρων στο ρύζι (Tong et al., 2014).

Η εφαρμογή χαμηλών συγκεντρώσεων μπρασσινοστεροειδών (έως 10nM BL) σε φυτάρια 5 ημερών αγρίου τύπου και *hsp90.1* γενετικού υπόβαθρου, που αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συνθήκες, δεν οδηγεί σε αλλαγές του μήκους του υποκοτυλίου. Αντίθετα παρατηρήθηκε ότι τα φυτάρια *hsp90.3* υπόβαθρου παρουσιάζουν υπερευαισθησία στην ορμόνη σε σχέση με τα φυτάρια αγρίου τύπου, καθώς το μήκος του υποκοτυλίου αρχίζει να ελαττώνεται όταν η συγκέντρωση του εξωγενούς BL είναι της τάξης των 10nM. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ενδεχομένως τα επίπεδα των μπρασσινοστεροειδών στα αγρίου τύπου και *hsp90.1* φυτάρια δεν είναι σε επίπεδο κορεσμού όπως στα *hsp90.3*, και έτσι δεν επηρεάζεται η επιμήκυνση.

Όμως η διαφορετικότητα της απόκρισης των *hsp90.3* φυταρίων ήταν πρόδηλη και κάτω από συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Ειδικότερα, ενώ στα αγρίου τύπου και στα *hsp90.1* φυτάρια, το υποκοτύλιο επιμηκύνεται παρουσία BL (έως 10nM), στα *hsp90.3* φυτάρια το μήκος του υποκοτυλίου ελαττώνεται παρουσία ακόμη χαμηλότερων συγκεντρώσεων της ορμόνης (1nM). Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η HSP90.3 θα μπορούσε να αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του μονοπατιού των μπρασσινοστεροειδών, ρυθμίζοντας ποσοτικά αυτό το μονοπάτι σηματοδότησης και κατ' επέκταση την έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται από τα μπρασσινοστεροειδή.

Έχει προταθεί ότι τα μπρασσινοστεροειδή προωθούν την κυτταρική επέκταση στο υποκοτύλιο μέσω ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων με άλλες φυτικές ορμόνες όπως οι γιββεριλλίνες (Gallego-Bartolomé, et al., 2012; Ross & Quittenden, 2016) των οποίων ενδεχομένως επηρεάζουν τον μεταβολισμό (Tong, et al., 2014). Φαίνεται λοιπόν πως

απουσία των HSP90.3 πρωτεϊνών, τα BRs αποκτούν κατασταλτική δράση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις BL (1nM, 10nM). Είναι γνωστό ότι η ενεργή μορφή των HSP90 είναι απαραίτητη για την πυρηνική τοποθέτηση της BIN2 κινάσης (Samakonli et al., 2014). Παρεμπόδιση της δημιουργίας του BIN2/HSP90 συμπλόκου καθιστά την κινάση BIN2 ανίκανη να δράσει σαν αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού σηματοδότησης των μπρασσινοστεροειδών στον πυρήνα (Samakonli et al., 2014), με ενδεχόμενο αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού. Αυτή η ανώμαλα συνεχής ενεργότητα του μονοπατιού των μπρασσινοστεροειδών θα μπορούσε να οδηγεί σε καταστολή της βιοσύνθεσης των γιββεριλλινών και ως εκ τούτου σε καταστολή της κυτταρικής επιμήκυνσης.

Τα δεδομένα αυτής της μελέτης καταδεικνύουν τη διαφορετικότητα στην απόκριση των γενετικών υποβάθρων *hsp90.1* και *hsp90.3* στην εξωγενή εφαρμογή μπρασσινοστεροειδών, υποδεικνύοντας έτσι τους πιθανώς διακριτούς ρόλους ή την διαφορετική συμμετοχή των HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεϊνών στο μονοπάτι αντίληψης και σηματοδότησης των μπρασσινοστεροειδών.

Κεφάλαιο 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albenese, V., Yam, A.-W., Baughman, J., Parnot, C., & Frydman, J. (2006). Systems Analyses Reveal Two Chaperone Networks with Distinct Functions in Eukaryotic Cells. *Cell*, 124:75-78.
- Ali, M., & et al. (2006). Crystal Structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperonecomplex. *Nature*, 440:1013-1017.
- Al-Whaibi, M. (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University – Science*, 23:139-150.
- Anderson, J., Li, Q., Haskell, D., & Guy, C. (1994). Structural Organization of the Spinach Endoplasmic Reticulum-Luminal 70-Kilodalton Heat-Shock Cognate Gene and Expression of 70-Kilodalton Heat-Shock Genes during Cold Acclimation. *Plant Physiology*, 104:1359-1370.
- Becker, J., & Craig, E. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *European Journal of Biochemistry*, 219:11-23.
- Belkhadir, Y., & Jaillais, Y. (2015). The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytologist*, 206:522-540.
- Bennett, M., Leitch, I., Price, H., & Johnston, J. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) Using Flow Cytometry Show Genome Size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25 % Larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative Estimate of ~125 Mb. *Annals of Botany*, 91:547-557.
- Blamey, M., & Grey-Wilson, C. (1989). *Illustrated flora of Britain and Northern Europe*.
- Boston, R., Viitanen, P., & Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, 32:191-222.

- Cao, D., Froehlich, J., Zhang, H., & Cheng, C. (2003). The chlorate-resistant and photomorphogenesis-defective mutant *cr88* encodes a chloroplast-targeted HSP90. *The Plant Journal*, *33*:107-118.
- Chen, B., Zhong, D., & Monteiro, A. (2006). Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics*, *7*:156.
- Clouse, S. (2002, November). Brassinosteroid Signal Transduction: Clarifying the Pathway from Ligand Perception to Gene Expression. *Molecular Cell*, *10*:973-982.
- Clouse, S., Langford, M., & McMorris, T. (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology*, *111*:671-678.
- Craig, E., Gambill, B., & Nelson, R. (1993). Heat shock proteins: Molecular chaperons of protein biogenesis. *Microbiology Reviews*, *57*:402-414.
- Dhaubhadel, S., Browning, K., Gallie, D., & Krishna, P. (2002). Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *The Plant Journal*, *29*:681-691.
- Ehrensperger, M., Gräber, S., Gaestel, M., & Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO Journal*, *16*:221-229.
- Ellis, R., & Hartl, F. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, *9*:102-110.
- Emelyanov, V. (2002). Phylogenetic relationships of organellar Hsp90 homologs reveal fundamental differences to organellar Hsp70 and Hsp60 evolution. *Gene*, *299*:125-133.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E.G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S.G., Alabadí, D., Blázquez, M.A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *PNAS*, *109*:13446–13451.

- Gampala, S., & et al. (2007). An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 13:177-189.
- Gupta, R. (1995). Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequence and an examination of the relationship among animals, plants and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 12:1063-1073.
- Hartl, F., & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science*, 295:1852-1858.
- Haubrick, L., & Assmann, S. (2006). Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant, Cell & Environment*, 29:446-457.
- He, J.-X., Gendron, J., Yang, Y., Li, J., & Wang, Z.-Y. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *PNAS*, 99:10185-10190.
- Hoffmann, M. (2002). Biogeography of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Journal of Biogeography*, 29:125-134.
- Ishiguro, S., & et al. (2008). SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *The EMBO Journal*, 21:898-908.
- Jarosz, D., & Lindquist, S. (2010). Hsp90 and Environmental Stress Transform the Adaptive Value of Natural Genetic Variation. *Science*, 330:1820-1824.
- Kalmar, B., & Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61:310-318.
- Kim, T.-W., & et al. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology*, 11:1254-1260.
- Krämer, U. (2015). The Natural History of Model Organisms: Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana. *eLife*, 4:e06100
- Krishna, P. (2003). Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22:289-297.

- Lachowiec , J., Lemus, T., Thomas, J., Murphy, P., Nemhauser , J., & Queitsch , C. (2013). The Protein Chaperone HSP90 Can Facilitate the Divergence of Gene Duplicates. *Genetics*, *193*:1269-1277.
- Lai, B., Chin, N., Stanek, A., Keh, W., & Lanks, K. (1984). Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Molecular and Cellular Biology*, *4*:2802-2810.
- Li, Q.-F., Wang, C., Jiang, L., Shuo, L., Sun, S., & He, J.-X. (2012). An Interaction Between BZR1 and DELLAs Mediates Direct Signaling Crosstalk Between Brassinosteroids and Gibberellins in Arabidopsis. *Science Signaling*, *5*:ra72.
- Liang, P., & MacRae, T. (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, *110*:1431-1440.
- Lindquist, S. (1986). The Heat-Shock Response. *Annual Review of Biochemistry*, *55*:1151-1191.
- Lindquist, S., & Craig, E. (1988). The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics*, *22*:631-677.
- Liu, Y., Burch-Smith, T., Schiff, M., Feng, S., & Dinesh-Kumar, S. (2004). Molecular Chaperone Hsp90 Associates with Resistance Protein N and Its Signaling Proteins SGT1 and Rar1 to Modulate an Innate Immune Response in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, *16*:2101-2108.
- Lu, R., & et al. (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *The EMBO Journal*, *22*:5690-5699.
- Milioni, D., & Hatzopoulos, P. (1997). Genomic organization of hsp90 gene family in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, *35*:955-961.
- Morimoto, R. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, *259*:1409-1410.
- Morimoto, R. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, *12*:3788-3796.

- Müssig, C., Lisso, J., Coll-Garcia, D., & Altmann, T. (2006). Molecular analysis of brassinosteroid action. *Plant Biology*, 8:291-296.
- Nathan, D., Vos, M., & Lindquist, S. (1997). In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90. *PNAS*, 94:12949-12956.
- Nemhauser, J., & Chory, J. (2004). BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *Journal of Experimental Botany*, 55:265-270.
- Nover, L., & Scharf, K.-D. (1997). Heat stress proteins and transcription factors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53:80-103.
- Oh, E., Zhu, J. Y., Bai, M. Y., Arenhart, R. A., Sun, Y., & Wang, Z. Y. (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. *eLife*, 3:e03031.
- Parsell, D., & Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, 27:437-496.
- Pearl, L., & Prodromou, C. (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology*, 10:46-51.
- Peng, P., Zhenyan, Y., Yongyou, Z., & Jianming, L. (2008). Regulation of the *Arabidopsis* GSK3-like Kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through Proteasome-Mediated Protein Degradation. *Molecular Plant*, 1:338-346.
- Prassinos, C., Haralampidis, K., Mlioni, D., Samakovli, D., Krambis, K., & Hatzopoulos, P. (2008). Complexity of Hsp90 in organelle targeting. *Plant Molecular Biology*, 67:323-334.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18:571-573.
- Ross, J.J. (2016) Interactions between Brassinosteroids and Gibberellins: Synthesis or Signaling? *The Plant Cell*, 28: 829–832.

- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S., & Hwang, I. (2007). Nucleocytoplasmic Shuttling of BZR1 Mediated by Phosphorylation Is Essential in Arabidopsis Brassinosteroid Signaling. *The Plant Cell*, *19*:2749-2762.
- Samakovli, D., Roka, L., Plitsi, P.K., Kaltsa, I., Daras, G., Milioni, D., and Hatzopoulos, P. (2020). Active BR signalling adjusts the subcellular localisation of BES1/HSP90 complex formation. *Plant Biology*, *22*:129-133.
- Samakovli, D., Margaritopoulou, T., Prassinos, C., Milioni, D., & Hatzopoulos, P. (2014). Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity. *New Phytologist*, *203*:743-757.
- Samakovli, D., Thanou, A., Valmas, C., & Hatzopoulos, P. (2007). Hsp90 canalizes developmental perturbation. *Journal of Experimental Botany*, *58*:3513-3524.
- Schlesinger, M. (1990, July 25). Heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *265*:12111-12114.
- Shigeta, T., & et al. (2014). Molecular evidence of the involvement of heat shock protein 90 in brassinosteroid signaling in Arabidopsis T87 cultured cells. *Plant Cell Reports*, *33*:499-510.
- Taipale, M., Jarosz, D., & Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*:515-528.
- Tong, H., Xiao, Y., Liu, D., Gao, S., Liu, L., Yin, Y., Jin, Y., Qian, Q., and Chu, C. (2014). Brassinosteroid regulates cell elongation by modulating gibberellin metabolism in rice. *The Plant Cell*, *26*: 4376–4393.
- Tissieres, A., Mitchell, H., & Tracy, U. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, *84*:389-398.
- Vert, G., Nemhauser, J., Geldner, N., Hong, F., & Chory, J. (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*:177-201.
- Vierling, E. (1991). The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *42*:579-620.

- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9:244-252.
- Waters, E., Lee, G., & Vierling, E. (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47:325-338.
- Wegele, H., Müller, L., & Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 151:1-44.
- Xu, Z.-S., Li, Z.-Y., Chen, Y., Chen, M., Li, L.-C., & Ma, Y.-Z. (2012). Heat Shock Protein 90 in Plants: Molecular Mechanisms and Roles in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 13:15706-15723.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2005). A New Class of Transcription Factors Mediates Brassinosteroid-Regulated Gene Expression in Arabidopsis. *Cell*, 120:249-259.
- Yin, Y., Wang, Z.-Y., Santiago, M.-G., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2002). BES1 Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation. *Cell*, 109:181-191.
- Young, J., Moarefi, I., & Hartl, F. (2001, July 23). Hsp90 a specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology*, 154:267-274.
- Γαλάνης, Π. (2013). Εφαρμογές της Στατιστικής στα ερευνητικά άρθρα. *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*, 30:491-498.
- Γναρδέλλης, Χ. (2013). *Ανάλυση δεδομένων με το IBM SPSS Statistics 21*. Παπαζήση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

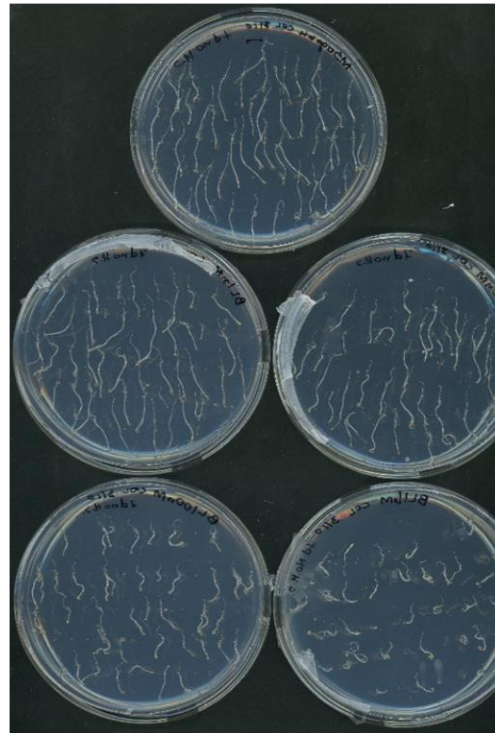
Η εξόρυξη των δεδομένων – μετρήσεων των υποκοτυλίων πραγματοποιήθηκε από τις κάτωθι φωτογραφίες.

1. Στις φωτογραφίες *1A*, *1B*, *1C*, *1D* φαίνονται τα υποκοτύλια άγριου τύπου με την απουσία και την παρουσία της θερμικής καταπόνησης, με θρεπτικό, 1nM, 10nM, 100nM και 1000nM μπρασσινολιδίου στις πέντε και επτά ημέρες αντίστοιχα.



No Heatshock in 5 days

(1A)



No Heatshock in 7 days

(1B)



Heatshock in 5 days
(1C)



Heatshock in 7 days
(1D)

2. Στις φωτογραφίες 2A, 2B, 2C, 2D φαίνονται τα υποκοτύλια μεταλλάγματος *hsp90.1* με την απουσία και την παρουσία της θερμικής καταπόνησης, με θρεπτικό, 1nM, 10nM, 100nM και 1000nM μπρασσινολιδίου στις πέντε και επτά ημέρες αντίστοιχα.



No Heatshock in 5 days
(2A)



No Heatshock in 7 days
(2B)



Heatshock in 5 days
(2C)



Heatshock in 7 days
(2D)

3. Στις φωτογραφίες 3A, 3B, 3C, 3D φαίνονται τα υποκοτύλια μεταλλάγματος *hsp90.3* με την απουσία και την παρουσία της θερμικής καταπόνησης, με θρεπτικό, 1nM, 10nM, 100nM και 1000nM μπρασσινολιδίου στις πέντε και επτά ημέρες αντίστοιχα.



No Heatshock in 5 days
(3A)



No Heatshock in 7 days
(3B)



Heatshock in 5 days
(3C)



Heatshock in 7 days
(3D)

4. Στις φωτογραφίες 4A και 4B φαίνονται τα υποκοτύλια των τριών γενοτύπων με την απουσία και την παρουσία της θερμικής καταπόνησης, στα 60nM μπρασσινολιδίου στις πέντε και επτά ημέρες αντίστοιχα.



60nM BL in 5 days
(4A)



60nM BL in 7 days
(4B)