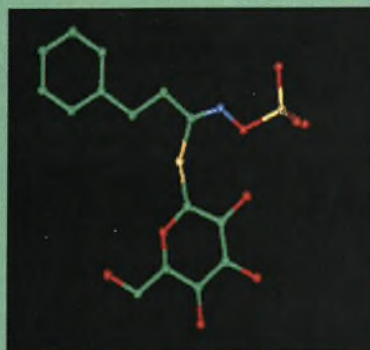


# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»



**Δήμητρα Κ. Κατσαρού**

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Απομόνωση και χαρακτηρισμός γονιδίων που  
συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων  
στη ρόκα  
(*Eruca sativa*)**

Λάρισα 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6995/1  
Ημερ. Εισ.: 09-09-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
572.865  
ΚΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087199

Απομόνωση και χαρακτηρισμός γονιδίων που συμμετέχουν  
στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων στη ρόκα  
(*Eruca sativa*)

**Τριμελής Επιτροπή**

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επιβλέπουσα**  
*Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών*  
*Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Καρπούζας Δημήτριος, Μέλος**  
*Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών*  
*Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Μέλος**  
*Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας*  
*Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη, επιβλέπουσα και εισηγήτρια του θέματος της μεταπτυχιακής μου διατριβής, για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου, καθώς και τα υπόλοιπα δύο μέλη της επιτροπής, κύριο Καρπούζα Δημήτριο και κύριο Δελή Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθειά τους. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερος τον υποψήφιο διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Ομήρου Μιχάλη για τη άψογη συνεργασία μας και την καθοριστική για την εκπόνηση αυτής της εργασίας συμβολή του. Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την ευχάριστη και δημιουργική συνύπαρξή μας και κυρίως την υποψήφια διδάκτορα Κροκιδά Αφροδίτη για τη συνεισφορά της στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι ενώσεις που προέρχονται από αμινοξέα, εντάσσονται στη γενικότερη κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και απαντώνται κυρίως σε φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*. Τα προϊόντα της υδρόλυσής τους εμφανίζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως αμυντικές εναντίον εχθρών στους φυτικούς οργανισμούς και χημειοπροφυλακτικές στον άνθρωπο.

Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων και τα εμπλεκόμενα γονίδια έχουν μελετηθεί στο *Arabidopsis thaliana*. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να απομονωθούν αλληλουχίες των γονιδίων της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων στο φυτό *Eruca sativa* (ρόκα). Επίσης, με τη μέθοδο της *pcr* πραγματικού χρόνου (*real time pcr*) εξετάστηκε η έκφραση των γονιδίων σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης και συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση των τελικών μεταβολιτών στις ίδιες συνθήκες.

Απομονώθηκαν με επιτυχία αλληλουχίες που σχετίζονται με τα γονίδια *MAM2*, *MAM3* (*MAML*), *CYP79F1*, *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP83A1* και *CYP83B1* του *Arabidopsis thaliana*. Τα δύο πρώτα συμμετέχουν στο πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης, όπου γίνεται η επιμήκυνση του βασικού σκελετού της μεθειονίνης. Τα υπόλοιπα συμμετέχουν στο δεύτερο στάδιο, όπου πραγματοποιείται η βιοσύνθεση της βασικής δομής των γλυκοσινολικών οξέων.

Η χορήγηση θείου και αζώτου ασκεί επίδραση στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων, αλλά και στην έκφραση των βιοσυνθετικών τους γονιδίων. Βρέθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *CYP79F1* μειώνεται όταν το άζωτο δεν παρέχεται στα φυτά επαρκώς, ωστόσο η συγκέντρωση των αλειφατικών γλυκοσινολικών παραμένει σταθερή. Αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας του αζώτου, όταν η ποσότητα του θείου είναι σε επάρκεια, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της έκφρασης και των δύο γονιδίων *CYP79B2* και *CYP79B3* και αυτό ανταποκρίνεται στις συγκεντρώσεις των τελικών μεταβολιτών.

Γενικά δεν παρατηρήθηκε πλήρης συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων με τις συγκεντρώσεις των διαφορετικών κατηγοριών γλυκοσινολικών οξέων.

## ABSTRACT

Glucosinolates are amino acid-derived compounds belonging to the general category of plant secondary metabolites. They can be found mainly in the order Caparrales. Their hydrolysis products have some interesting properties, ranging from antimicrobial and cancer-preventing to inflammatory activities. The genetic and molecular basis underlying glucosinolate biosynthesis have been studied in *Arabidopsis thaliana*. In this project genes involved in the glucosinolate biosynthetic pathway in the plant *Eruca sativa* (rocket salad) have been isolated. The expression of the genes in plants grown under different nutrition conditions was also studied using the method of real time pcr and was correlated with the concentration of final metabolites in the same conditions.

Sequences related to *MAM2*, *MAM3 (MAML)*, *CYP79F1*, *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP83A1* and *CYP83B1* genes of *Arabidopsis* were successfully isolated. The two first genes take part in the first phase of biosynthesis, that is the methionine chain elongation while the rest take part in the second phase that is the glucosinolate core structure synthesis.

Nitrogen and sulphur supply affect the concentration of the glucosinolates as well as the expression of the biosynthetic genes. We found that the expression of *CYP79F1* gene is decreased when nitrogen is not provided sufficiently in the plants, however the concentration of aliphatic glucosinolates remains constant. An increase of the nitrogen quantity supplied, when the quantity of sulphur is in sufficiency, resulted in an increase of both *CYP79B2* and *CYP79B3* gene expression and this is depicted to the concentrations of the final metabolites. In general, correlation between the expression of biosynthetic genes and the concentration of different categories of glucosinolates was not observed.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	3
<b>1. Η οικογένεια Brassicaceae και τα είδη της</b> .....	3
1.1. Γενικά.....	3
1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	4
1.3. <i>Eruca sativa</i> .....	5
1.4. <i>Brassica napus</i> .....	6
1.5. <i>Brassica rapa</i> .....	7
<b>2. Δευτερογενείς μεταβολίτες και γλυκοσινολικά οξέα</b> .....	7
2.1. Γενικά - ιδιότητες.....	7
2.2. Κατηγορίες.....	8
2.2.α. Κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στο <i>Arabidopsis</i> .....	9
2.3. Τα γλυκοσινολικά οξέα-υδρόλυση και προϊόντα.....	9
2.3.α Κατηγορίες γλυκοσινολικών οξέων.....	13
2.3.β. Ποικιλομορφία.....	14
<b>3. Βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων</b> .....	14
3.1. Γενικά.....	14
3.2. Πρώτο στάδιο.....	15
3.3. Δεύτερο στάδιο.....	16
3.4. Τρίτο στάδιο.....	19
3.5. Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων στην <i>Eruca sativa</i> .....	21
<b>4. Επίδραση της λίπανσης με θείο και άζωτο στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στους φυτικούς ιστούς</b> .....	23
<b>5. Ρύθμιση και μεταγραφικοί παράγοντες</b> .....	24
5.1. Γενικά.....	24
5.2. Μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων.....	25
5.3. Μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων.....	26
<b>6. Σκοπός της εργασίας</b> .....	27
<b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	28
<b>1. Φυτικό υλικό</b> .....	28
1.1 Καλλιεργητικές φροντίδες.....	28
1.2 Πειραματικό Σχέδιο.....	28
1.3 Δειγματοληψία – Επεξεργασία Δείγματος.....	28
<b>2. Μοριακή μελέτη</b> .....	29
2.1. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων.....	29
2.1.α. Απομόνωση ολικού RNA.....	29
2.1.β. Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτική αгарόζης.....	30
2.1.γ. Υδρόλυση του γονιδιωματικού DNA με τη χρήση του ενζύμου DNase.....	31
2.1.δ. Σύνθεση cDNA.....	32
2.1.ε. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	33
2.1.στ. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτική αгарόζης (gel extraction kit της Qiagen).....	34
2.2. Χειρισμός πλασμιδίων.....	35
2.2.α. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό (competent cells).....	35
2.2.β. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς.....	36



2.2.γ. Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης (Ligation)	37
2.2.δ. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων E. coli (Transformation)	38
2.2.ε. Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	39
2.2.στ. Μέθοδος του βρασμού (Boiling method, Holmes and Quigley 1981)	39
2.2.ζ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA - Πρωτόκολλο Miniprep (Qiagen)	40
2.2.η. Διατήρηση κλώνων που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια	41
2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, Πραγματικού Χρόνου (Real time PCR)	42
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	44
<b>1. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες</b>	44
1.1. Ομολογίες αλληλουχιών με αντίστοιχα γνωστά γονίδια άλλων φυτών	45
1.1.α. Γονίδια MAM	45
1.1.β. Γονίδια CYP	47
<b>2. Επίδραση της λίπανσης αζώτου και θείου στην έκφραση των γονιδίων της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων στη ρόκα</b>	49
2.1. Επίδραση της λίπανσης αζώτου και θείου στην έκφραση του γονιδίου <i>CYP79F1</i>	51
2.2. Επίδραση της λίπανσης αζώτου και θείου στην έκφραση των γονιδίων <i>CYP79B2</i> και <i>CYP79B3</i>	52
2.3. Επίδραση της λίπανσης αζώτου και θείου στην έκφραση των <i>MAM</i> γονιδίων	55
2.4. Συγκεντρωτικά	55
<b>3. Συμπεράσματα</b>	56
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	57
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	60

## Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Η οικογένεια Brassicaceae και τα είδη της

#### 1.1. Γενικά

Η οικογένεια φυτών Brassicaceae ανήκει στην τάξη Capparales στην οποία περιλαμβάνεται μεγάλος αριθμός φυτικών ειδών. Τα φυτικά είδη που ανήκουν στην οικογένεια είναι συνήθως ποώδη, μονοετή ή πολυετή και πολλά από αυτά καλλιεργούνται. Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνει φυτά σημαντικών καλλιεργειών, που παρουσιάζουν τόσο οικονομικό όσο και διατροφικό ενδιαφέρον. Στην οικογένεια Brassicaceae ανήκουν λαχανικά του γένους *Brassica* όπως λάχανο, μπρόκολο, κουνουπίδι (*Brassica oleraceae*), η ελαιοκράμβη (*Brassica napus*), το *Brassica rapa*, καθώς και το ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο-φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η παλιότερη ονομασία της οικογένειας ήταν Σταυρανθή (Cruciferae) και οφείλεται στη χαρακτηριστική ιδιότητα των τεσσάρων πετάλων του άνθους να διατάσσονται σε ορθή γωνία μεταξύ τους. (Εικόνα 1)



Εικόνα 1. Άνθος Brassicaceae

Βασικό χαρακτηριστικό των φυτών της οικογένειας είναι η ιδιαίτερη οσμή και η πικρή γεύση τους λόγω συγκεκριμένων ενώσεων που περιέχουν. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές ως έλαια της μουστάρδας (mustard oils) και αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν τα φυτά αυτά. Οι μεταβολίτες αυτοί ονομάζονται γλυκοσινολικά οξέα (βλεπε και παρακάτω). Η παρουσία των ενώσεων αυτών στα Σταυρανθή είναι τόσο σημαντικό γνώρισμα της οικογένειας, όσο και τα σχηματίζοντα σταυρό πέταλά τους. Τα γλυκοσινολικά οξέα

έχουν βρεθεί μόνο σε οικογένειες δικοτυλήδων φυτών που ανήκουν στην τάξη Capparales. Αυτές οι συγγενείς μεταξύ τους οικογένειες είναι οι : Brassicaceae, Moringaceae, Capparaceae, Resedaceae, Tovariaceae, Akariaceae, Bataceae, Caricaceae, Koeberlinaceae, Limnanthaceae, Morginaceae, Pentadiplandraceae, Salvadoraceae και Trophaeolaceae. Επίσης γλυκοσινολικά οξέα έχουν εντοπιστεί και στην οικογένεια Euphorbiaceae του γένους *Drypetes*. Ωστόσο συγκεκριμένες υποκατηγορίες γλυκοσινολικών οξέων περιορίζονται σε μικρό αριθμό οικογενειών. Για παράδειγμα τα ινδολικά γλυκοσινολικά εντοπίζονται στις οικογένειες Brassicaceae, Bataceae, Capparaceae, Resedaceae, και Trophaeolaceae. (Griffiths et al., 2001; Rodman et al., 1998; Fahey et al., 2001; Wittstock and Halkier, 2002; Abrol and Ahmad, 2003).

### 1.2. *Arabidopsis thaliana*

Το σημαντικότερο από επιστημονική άποψη μέλος της οικογένειας των Brassicaceae αποτελεί το *Arabidopsis thaliana* (Εικόνα 2) το οποίο αποτελεί το φυτό μοντέλο για σχεδόν όλα τα θέματα της βιολογίας των φυτών. Είναι ένα μικρό δικοτυλήδο σταυρανόθεο φυτό, το οποίο παρότι είναι ένα ζιζάνιο χωρίς εμπορική σημασία, διαθέτει μια σειρά χαρακτηριστικών που το καθιστούν το ιδανικό πειραματικό φυτό. Έχει μικρό βιολογικό κύκλο, μικρό μέγεθος και παράγει μεγάλο αριθμό σπερμάτων, που το κάνουν ιδανικό για αναλύσεις γενετικής και μεταλλάξεων. Επίσης, μπορεί εύκολα να μεταλλαχθεί και το γονιδιώμα του είναι ένα από τα μικρότερα μεταξύ των ανώτερων φυτών (125Mb), κάτι ιδιαίτερος σημαντικό για πρωταρχικές γονιδιωματικές αλληλουχίσεις. Ως εκ τούτου, το *Arabidopsis* ήταν η επιλογή για να αποτελέσει το πρώτο φυτό στο οποίο θα γινόταν αλληλούχιση του πλήρους γενώματός του. Έτσι το Δεκέμβριο του 2000 δημοσιεύτηκε η αλληλουχία ολόκληρου του γενώματός του, σαν κορύφωση της προσπάθειας ετών μιας διεθνούς ομάδας. (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)

Παρόλο που το *Arabidopsis* δεν είναι καλλιεργούμενο φυτό, πολλές από τις διεργασίες που ενδιαφέρουν τους βιοτεχνολόγους (για παράδειγμα ασθένειες, αντίσταση στους εχθρούς και ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης) έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τα καλλιεργούμενα φυτά. Έτσι το *Arabidopsis* προσφέρεται ως το ιδανικό εργαλείο για τους επιστήμονες που ασχολούνται με τη μελέτη των φυτικών οργανισμών ώστε να καταλάβουν αυτές τις διεργασίες. (Slater et al, 2003)



Εικόνα 2. Φυτά *Arabidopsis thaliana*

### 1.3. *Eruca sativa*

Στην ίδια οικογένεια ανήκει και η ρόκα (*Eruca sativa*), γνωστή και ως rocket salad (Εικόνα 3). Είναι φυτό μονοετές και εδώδιμο, που προέρχεται από την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Καταναλώνεται ως φυλλώδες λαχανικό. Τα φύλλα του χρησιμοποιούνται είτε από μόνα τους είτε ως συστατικό μαζί με άλλα λαχανικά σε σαλάτες. Επίσης χρησιμοποιούνται σε θεραπείες με βότανα και έχει αναφερθεί αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική, διουρητική, αφροδισιακή και διεγερτική δράση. (Yaniv et al., 1998; Mahran et al. 1991). Επιπλέον, αποτελεί ιδανικό φυτό για βιομηχανική καλλιέργεια καθώς τα σπέρματα του περιέχουν ειδικά έλαια, όπως το ερουκικό οξύ σε ποσοστό >45-50%, τα οποία θεωρούνται προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Η ρόκα είναι ένα μικρό σε μέγεθος φυτό με μικρό βιολογικό κύκλο (6-9 εβδομάδες), μεγάλη παραγωγή σπόρων και μικρό γονιδίωμα (560Mb). Επομένως, φέρει πολλά από τα χαρακτηριστικά των φυτών-μοντέλων και θα μπορούσε να προταθεί ως ένα καλλιεργούμενο φυτό-μοντέλο για τη μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των Brassicaceae. (Yaniv et al., 1998; Mahran et al. 1991).



Εικόνα 3. Φυτά ρόκας

#### 1.4. *Brassica napus*

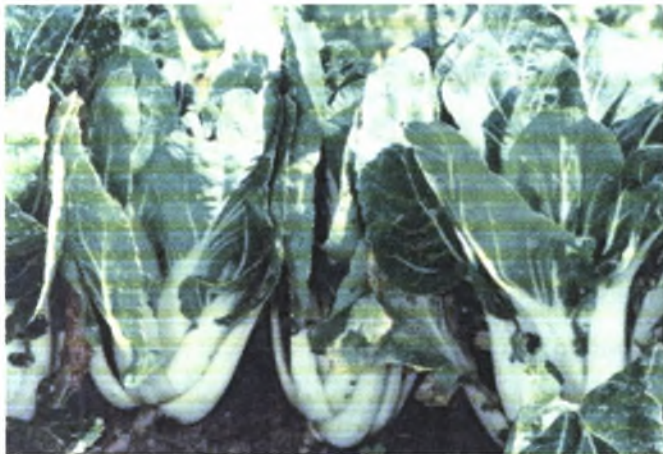
Η ελαιοκράμβη (*Brassica napus*, Εικόνα 4), που επίσης ανήκει στην οικογένεια των Brassicaceae, είναι ένα αμφιδιπλοειδές είδος που προέρχεται από αυθόρμητη διασταύρωση του *Brassica oleraceae* και του *Brassica rapa* (κινέζικο λάχανο). Είναι φυτό που καλλιεργείται κυρίως για τον ελαιούχο σπόρο του, του οποίου η περιεκτικότητα σε λάδι ανέρχεται στο 40%. Αποτελεί την τρίτη μεγαλύτερη καλλιέργεια για παραγωγή ελαιούχων σπόρων στον κόσμο, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 13% της παγκόσμιας παραγωγής φυτικού ελαίου. (Norton and Harris, 1975; Murphy et al., 1989; Schwender and Ohlrogge, 2002). Επίσης ο σπόρος είναι πλούσιος σε πρωτεΐνη με ποσοστό περίπου ίσο με 15%. (Gunstone et al., 1995).



Εικόνα 4. Φυτό ελαιοκράμβης

### 1.5. *Brassica rapa*

Πρόκειται για ένα φυτό με μεγάλη συγγένεια με το *Arabidopsis thaliana* που χρησιμοποιείται σαν φυτό μοντέλο για τη μελέτη της εξέλιξης του γενώματος μέσω πολυπλοειδιών (Chang Pyo Hong et al., 2007). Επίσης, το υποείδος *pekinensis* (Εικόνα 5), που αναφέρεται και με την ονομασία κινέζικο λάχανο, καλλιεργείται για την κατανάλωσή του ως φυλλώδες λαχανικό. Είναι μία από τις πιο διαδεδομένες καλλιέργειες λαχανικών στη βορειοανατολική Ασία. (Fahey, J; Talalay 1995).



Εικόνα 5. Φυτά *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*

## 2. Δευτερογενείς μεταβολίτες και γλυκοσινολικά οξέα

### 2.1. Γενικά - ιδιότητες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν μια μεγάλη, ποικίλη τάξη οργανικών ενώσεων, οι οποίες παράγονται από τα φυτά και εμφανίζονται να μην έχουν άμεση λειτουργική δράση στην αύξηση και ανάπτυξή τους. Σε αντίθεση προς τους πρωτογενείς μεταβολίτες όπως χλωροφύλλη, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, απλοί υδατάνθρακες ή μεμβρανικά λιπίδια, οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν έχουν γενικά αναγνωρισμένους ρόλους στις διαδικασίες της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής, της μεταφοράς διαλυμένων ουσιών, της αφομοίωσης θρεπτικών ουσιών και της διαφοροποίησης, εκτός ελάχιστων περιπτώσεων όπως π.χ. τα καροτενοειδή. Οι ιδιότητές τους ποικίλουν και σχετίζονται κυρίως με μηχανισμούς της φυτικής άμυνας. Έτσι οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να λειτουργήσουν ως αναστολείς στη βορά, προσελκυστικές ουσίες για τους επικονιαστές, δηλητήρια ή αλληλοπαθητικές ουσίες. Κυρίαρχη μεταξύ των λειτουργιών είναι η προστασία έναντι της βοράς από φυτοφάγα ζώα και της προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς. Όπως

φαίνεται οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να χαρακτηριστούν ως “οικολογικά δραστικές ουσίες”, λόγω των σημαντικών οικολογικών ιδιοτήτων που έχουν στα φυτά. Με βάση νέα δεδομένα βρέθηκε ότι εμπλέκονται και σε πρωτογενείς διαδικασίες αύξησης, ανάπτυξης και αντίστασης στο αβιοτικό στρες. (Τσέκος, 2004)

Τα φυτά συνθέτουν σχεδόν αμέτρητο αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών. Περισσότεροι από 100000 έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής, οι οποίοι μάλλον αντιπροσωπεύουν μόνο το 10% του πραγματικού συνόλου στη φύση.

Χαρακτηριστικό των δευτερογενών μεταβολιτών είναι η εξαιρετικά μεγάλη χημική τους ποικιλότητα, η οποία δεν πρέπει να μας εκπλήσσει, αν αναλογιστούμε το πολύπλευρο των οικολογικών ρόλων, το μεγάλο αριθμό των ελκυσόμενων ή απωθούμενων ζωικών και φυτικών οργανισμών και τη διαρκούσα εξελικτική μεταβολή. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό τους είναι η περιορισμένη κατανομή που έχουν στο φυτικό βασίλειο. Δηλαδή ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες απαντώνται συχνά μόνο σε ένα φυτικό είδος ή σε μια ομάδα ειδών ταξινομικά συγγενών μεταξύ τους. Έτσι σε ένα συγκεκριμένο είδος μπορεί να απαντώνται πολλαπλοί τύποι δευτερογενών μεταβολιτών και πολλοί αντιπρόσωποι ενός απλού τύπου (Τσέκος, 2004)

Για παράδειγμα στο *Arabidopsis* αναφέρεται ότι παράγονται πάνω από 170 δευτερογενείς μεταβολίτες, όπου συμπεριλαμβάνονται περίπου 50 τερπένια, 25 βενζενοειδή και 20 φαινυλπροπανοειδή (D’Auria and Gershenzon, 2005). Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές έχουν ξεκινήσει να αναγνωρίσουν τη βιοχημική βάση αυτής της ποικιλότητας. Σε κάποιες περιπτώσεις βιοσυνθετικά ένζυμα καταλύουν πολλαπλούς σχηματισμούς προϊόντων (Kollner et al., 2004; Tholl et al., 2005) ή έχουν ευρεία ειδικότητα υποστρώματος (Wan and Wilkins, 1994; Gang et al., 2002).

## 2.2. Κατηγορίες

Οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις βασικά χημικά διακριτές ομάδες : τερπένια, φαινολικές ενώσεις και ενώσεις που περιέχουν άζωτο. Τα τερπένια είναι λιπίδια που συντίθενται από το ακετυλο-συνένζυμο Α ή από βασικές ενδιάμεσες ενώσεις της γλυκόλυσης. Οι φαινολικές ενώσεις είναι αρωματικές ουσίες που σχηματίζονται διαμέσου της διαδρομής του σικιμικού οξέος ή της διαδρομής του μηλονικού οξέος. Τα περιέχοντα άζωτο προϊόντα, όπως τα αλκαλοειδή, βιοσυντίθενται κατά κύριο λόγο από τα αμινοξέα.

Στην τελευταία ομάδα περιλαμβάνονται πολύ γνωστές αντιφυτοφάγες αμυντικές ουσίες, όπως τα αλκαλοειδή και οι κυανογόνοι γλυκοζίτες, που είναι σημαντικού ενδιαφέροντος εξαιτίας της τοξικότητάς τους στον άνθρωπο και των ιατρικών τους ιδιοτήτων (Τσέκος, 2004). Εδώ ανήκει και η κατηγορία των γλυκοσινολικών οξέων τα οποία θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία.

### 2.2.α. Κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στο *Arabidopsis*

Όσον αφορά στο *Arabidopsis thaliana*, οι κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν βρεθεί και λειτουργίες στις οποίες φαίνεται να εμπλέκεται κάθε κατηγορία είναι (Auria et al, 2005) :

1. Ινδολικές ενώσεις - Άμυνα εναντίον παθογόνων.
2. Γλυκοσινολικά οξέα - Άμυνα εναντίον παθογόνων και εχθρών.
3. Φαινυλπροπανοειδή - Προστασία από UV ακτινοβολία, άμυνα εναντίον παθογόνων.
4. Βενζενοειδή - Προσελκυστικά επικονιαστών., άμυνα εναντίον παθογόνων.
5. Φλαβονοειδή - Προστασία από UV ακτινοβολία, μεταφορά αυξίνης, λήθαργος σπόρων, άμυνα εναντίον παθογόνων.
6. Τερπένια - Αποτρεπτικά φυτοφάγων, αντίσταση στο οξειδωτικό στρες, άμυνα εναντίον παθογόνων.
7. Παράγωγα λιπαρών οξέων - Άμυνα εναντίον παθογόνων.

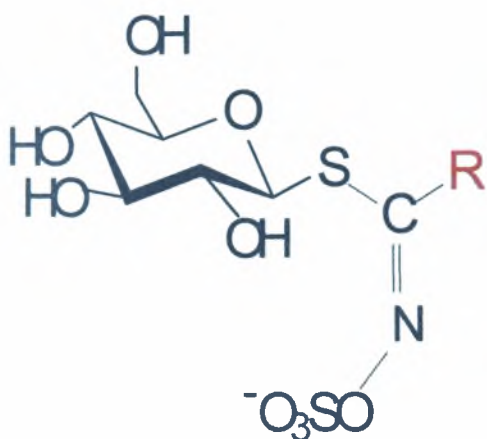
Η κατηγορία των γλυκοσινολικών οξέων αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες στο *Arabidopsis* και την πιο χαρακτηριστική, με 35 αντιπροσώπους (Reichelt et al., 2002).

### 2.3. Τα γλυκοσινολικά οξέα-υδρόλυση και προϊόντα

Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι ενώσεις που προέρχονται από αμινοξέα. Είναι (Z)-(ή cis)-N-υδροξυαμινοθειικοί εστέρες με μια πλευρική αλυσίδα ( R ) που μπορεί να ποικίλλει (Εικόνα 6), και ένα τμήμα β-D-γλυκοπυρανόζης που συνδέεται στο μόριο με ένα άτομο θείου. Αυτό το τμήμα, η γλυκόνη, αποτελεί την κεντρική δομή ή αλλιώς τον πυρήνα των γλυκοσινολικών οξέων.

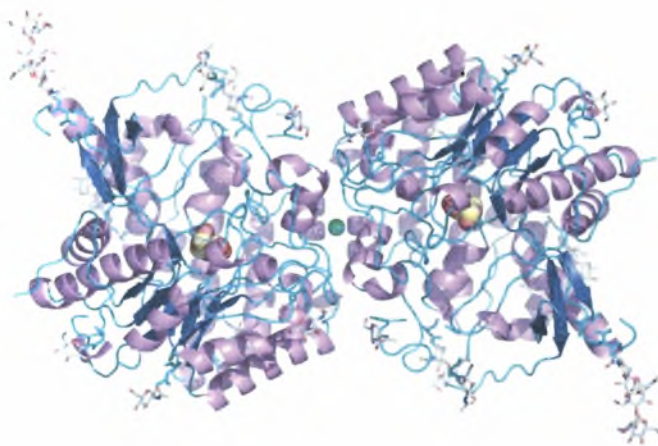
Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί πάνω από 120 διαφορετικές δομές γλυκοσινολικών οξέων. Για αυτή τη χημική ποικιλομορφία ευθύνονται τόσο οι εκτεταμένες τροποποιήσεις που υφίσταται η πλευρική αλυσίδα όσο και η επιμήκυνση των πρόδρομων αμινοξέων (Fahey et al., 2001)





Εικόνα 6. Δομή μορίου γλυκοσινολικού οξέος

Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι βιολογικώς μη ενεργά μόρια, αλλά με καταστροφή του ιστού (για παράδειγμα μετά από κόψιμο ή μάσηση) έρχονται σε επαφή με το ένζυμο μυροσινάση, υδρολύονται προς ασταθείς αγλυκόνες και αποδίδουν ένα μίγμα προϊόντων υδρόλυσης με ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων (Wittstock and Halkier, 2002). Τα γλυκοσινολικά οξέα βρίσκονται στους ιστούς όλων των φυτικών οργάνων. Η μυροσινάση εντοπίζεται σε διασκορπισμένα εξειδικευμένα κύτταρα (κύτταρα μυροσίνης) τα οποία δεν περιέχουν γλυκοσινολικά (Kelly et al., 1998).

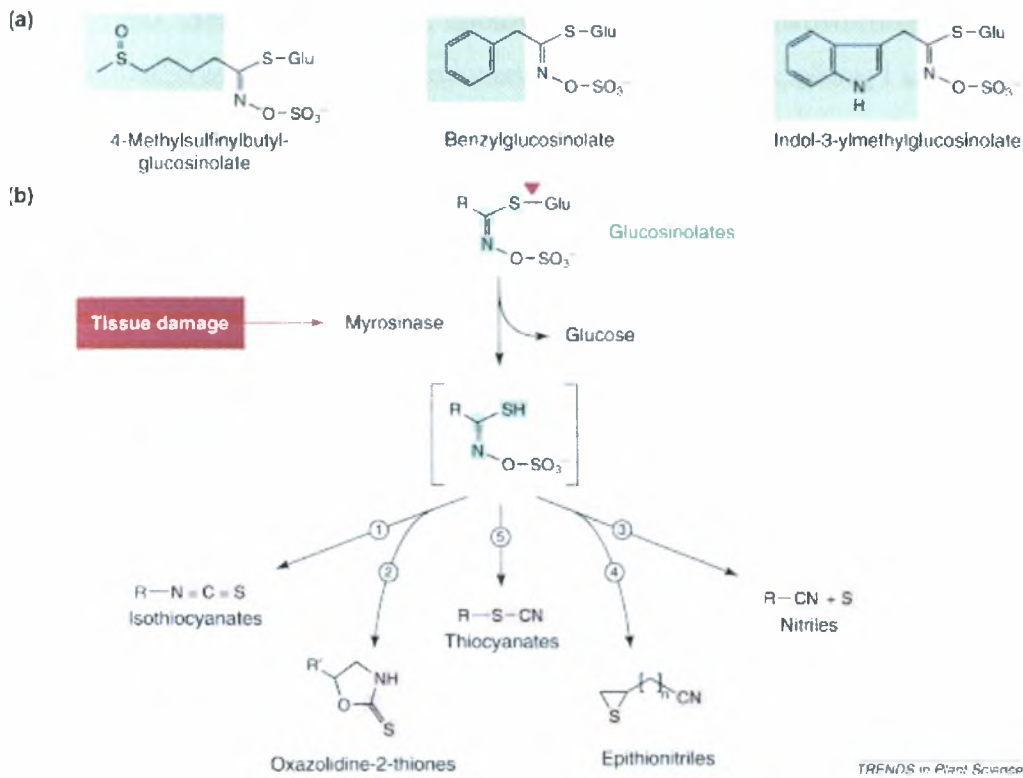


Εικόνα 7. Απεικόνιση του ενζύμου μυροσινάση

Η απώλεια της κυτταρικής ακεραιότητας σηματοδοτεί την έναρξη της αποικοδόμησης των γλυκοσινολικών οξέων, μέσω της υδρόλυσης του γλυκοσιδικού δεσμού που καταλύεται από τη μυροσινάση (Andreasson et al., 2001; Husebye et al., 2002). Η ενεργοποίηση αυτή του διμερούς συστήματος γλυκοσινολικών –

μυροσινάσης (Εικόνα 8), οδηγεί σε ταχεία γένεση ασταθών ενδιάμεσων προϊόντων. Με επακόλουθη μη ενζυματική αφαίρεση της θειικής ομάδας και αυθόρμητη ανακατάταξη της απομένουσας κεντρικής δομής σχηματίζεται μια ποικιλία βιοενεργών προϊόντων. Έτσι το σύστημα γλυκοσινολικών – μυροσινάσης είναι αυτό που εφοδιάζει τα φυτά με έναν αποτελεσματικό αμυντικό μηχανισμό εναντίον των φυτικών εχθρών και πιθανώς εναντίον παθογόνων. (Luthy and Matile, 1984; Ratzka et al., 2002)

Τα προϊόντα της υδρόλυσης των γλυκοσινολικών χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες : Ισοθειοκυανικά οξέα, Οξαζολιδινο-2-θειόνες, Θειοκυανικά οξέα, Επιθειονιτρίλια και Νιτρίλια (Εικόνα 8). Χημικές συνθήκες όπως το pH, η διαθεσιμότητα ιόντων σιδήρου και η παρουσία πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη μυροσινάση καθορίζουν την τελική σύσταση του παραγόμενου μίγματος. (Mithen et al., 2000; Wittstock and Halkier, 2002). Σε ουδέτερο pH οι ασταθείς αγλυκόνες αναδιατάσσονται για να σχηματίσουν ισοθειοκυανικά οξέα. Αν η πλευρική αλυσίδα υδροξυλιωθεί στον άνθρακα 3, η αυθόρμητη κυκλοποίηση του ισοθειοκυανικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας Οξαζολιδινο-2-θειόνης. Παρουσία ενός θειοειδικού παράγοντα που μοιάζει με πρωτεΐνη σχηματίζονται νιτρίλια. Αν υπάρχει διπλός δεσμός στο τέλος της πλευρικής αλυσίδας, το άτομο θείου που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του νιτρίλιου προσλαμβάνεται από τον διπλό δεσμό, σχηματίζοντας έτσι επιθειονιτρίλια. Τέλος, μερικά γλυκοσινολικά μπορούν να υδρολυθούν προς θειοκυανικά. (Wittstock and Halkier, 2002)



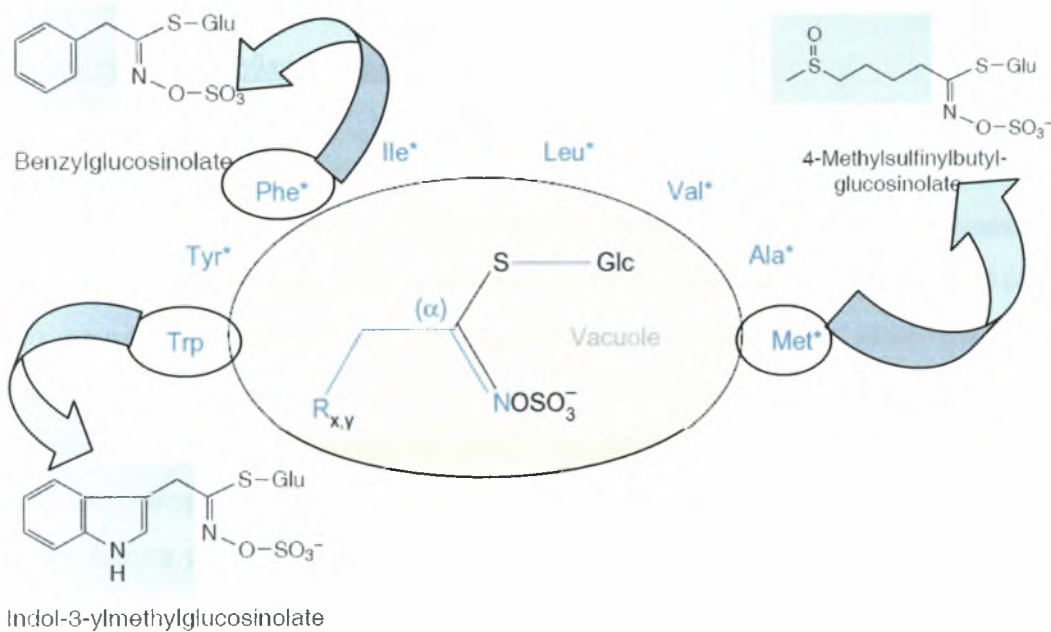
Εικόνα 8. α) αντιπροσωπευτικά γλυκοσινολικά οξέα της κάθε κατηγορίας (αλειφατικό, αρωματικό, ινδολικό) και (β) Η υδρόλυσή τους στα εξής προϊόντα 1) Ισοθειοκυανικά οξέα, 2)Οξαζολιδινο-2-θειόνες, 3)Νιρίλια, 4)Επιθειονιρίλια και 5)Θειοκυανικά οξέα (Wittstock and Halkier, 2002).

Τα διάφορα προϊόντα της αποικοδόμησής τους, αρχικά αναφερθέντα ως έλαια της μουστάρδας (Bussy, A., 1840) έχουν επί μακρόν προκαλέσει την ανθρώπινη περιέργεια. Είναι γεγονός ότι όχι μόνο συνεισφέρουν πάρα πολύ στη χαρακτηριστική γεύση και το άρωμα των σταυρανθών λαχανικών και καρυκευμάτων αλλά έχουν και διάφορες βιολογικές ιδιότητες. Αυτές ποικίλλουν και περιλαμβάνουν τη συμμετοχή στην άμυνα του φυτού εναντίον παθογόνων και εχθρών (Brader et al., 2001; Tierens et al., 2001; Lambrix et al. 2001, Kliebenstein et al., 2002; Agrawal and Kurashige, 2003). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι έχει πλέον καλά εδραιωθεί πως οι ισοθειοκυανιούχες ενώσεις οι οποίες προέρχονται από την υδρόλυση γλυκοσινολικών οξέων που προέρχονται από την μεθειονίνη, μπορούν να προσφέρουν αξιόλογη προστασία εναντίον του καρκίνου. (Kliebenstein et al., 2005; Woodward and Bartel 2005, Mithen et al., 2000; Talalay and Fahey 2001; Keum et al., 2004). Τα προϊόντα της αποικοδόμησης των ινδολικών γλυκοσινολικών και της γλυκοναστουρτίνης μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο καρκινογένεσης. Για παράδειγμα το 2-

φαινυλαιθυλ ισοθειοκυανικό οξύ, προϊόν υδρόλυσης της γλυκοναστουρτίνης, μπορεί να προφυλάξει από τον καρκίνο ανακόπτοντας τα ένζυμα της φάσης I και μειώνοντας τα ένζυμα της φάσης II. (Hecht, S. S et al., 1999; Engelen-Eigles et al., 2006; Talalay and Fahey, 2001).

### 2.3.α Κατηγορίες γλυκοσινολικών οξέων

Τα γλυκοσινολικά οξέα γενικά διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, τα αλειφατικά, τα αρωματικά και τα ινδολικά και η διάκριση γίνεται με βάση τα αμινοξέα από τα οποία προκύπτουν (Εικόνα 9). Δηλαδή εξαρτάται από το εάν προέρχονται από αλειφατικά αμινοξέα (μεθειονίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη), αρωματικά αμινοξέα (τυροσίνη, φαινυλαλανίνη) ή τρυπτοφάνη αντίστοιχα (Wittstock and Halkier, 2002).



Εικόνα 9: Η βιοσύνθεση των τριών κατηγοριών γλυκοσινολικών οξέων έχει ως πρόδρομα μόρια αμινοξέα: τα αλειφατικά προκύπτουν κυρίως από μεθειονίνη, τα αρωματικά κυρίως από φαινυλαλανίνη και τα ινδολικά από τρυπτοφάνη.

Τα ινδολικά γλυκοσινολικά οξέα εντοπίζονται κυρίως στα βλαστητικά μέρη του φυτού, τα φύλλα και τις ρίζες, ενώ τα αρωματικά βρίσκονται στους σπόρους και τα άνθη (Brown et al., 2003)

### 2.3.β. Ποικιλομορφία

Σε αντίθεση με άλλες σημαντικές κατηγορίες φυτικών φυσικών προϊόντων, τα γλυκοσινολικά οξέα συνιστούν μια σχετικά μικρή αλλά ανομοιόμορφη ομάδα αζωτούχων και θειούχων δευτερογενών μεταβολιτών. Η δομική ποικιλομορφία των γλυκοσινολικών οξέων οφείλεται στα διαφορετικά πρόδρομα αμινοξέα, παραλλαγές στο μήκος της πλευρικής αλυσίδας και σε διαφορετικούς τύπους δευτερογενούς οξειδωσης και εστεροποίησης (Textor et al., 2004).

Η πιο πλούσια ομάδα γλυκοσινολικών οξέων στο *Arabidopsis* αποτελείται από εκείνα που προέρχονται από τη μεθειονίνη. Αυτά βιοσυντίθενται με επιμήκυνση της αλυσίδας της μεθειονίνης, ακολουθούμενη από την βιοσύνθεση της βασικής δομής του γλυκοσινολικού σκελετού και των τροποποιήσεων της πλευρικής αλυσίδας (Wittstock and Halkier, 2002; Halkier and Gershenzon, 2006).

## 3. Βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων

### 3.1. Γενικά

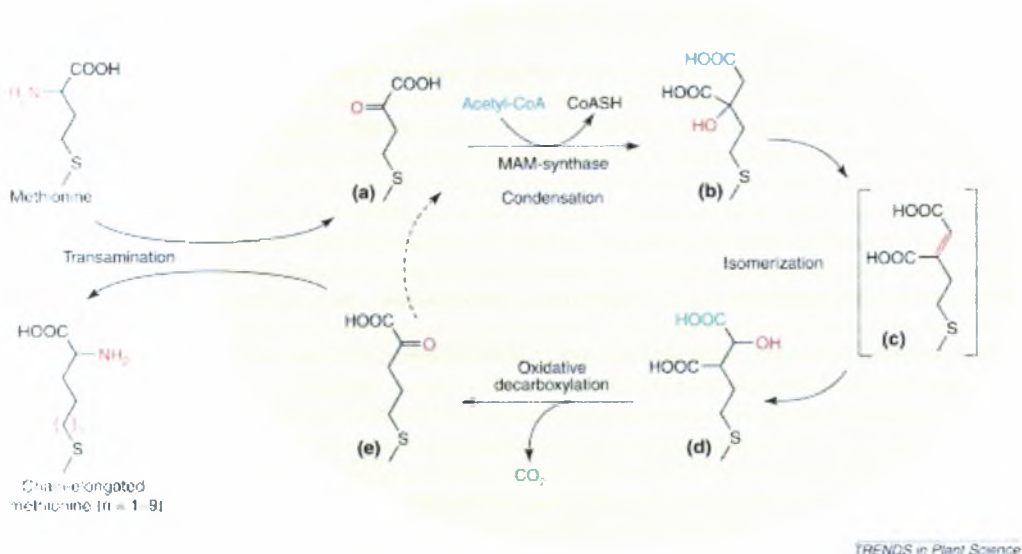
Είναι γνωστό εδώ και καιρό ότι το *Arabidopsis* περιέχει αλειφατικά, αρωματικά και ινδολικά αμινοξέα (Hogge et al., 1988) και ως εκ τούτου προσφέρεται σαν πολύτιμο φυτό μοντέλο για την έρευνα της βιοσύνθεσης και των τριών κατηγοριών των γλυκοσινολικών οξέων.

Τα τελευταία χρόνια η εκτεταμένη χρήση του *Arabidopsis* ως φυτού μοντέλου έχει συντελέσει στην κατανόηση της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων. Η χαρτογράφηση των γενετικών τόπων που προσδιορίζουν το γλυκοσινολικό προφίλ, η λειτουργική γονιδιωματική και η αντίστροφη γενετική, δεν έχουν απλώς συμπληρώσει τη βιοχημική έρευνα, αλλά σε μεγάλη έκταση αποτέλεσαν κινητήριο δύναμη για την ταχεία πρόοδο στο συγκεκριμένο πεδίο. Η ταυτότητα των πρώτων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων δημοσιεύτηκε το 2000. Μέχρι σήμερα 21 βιοσυνθετικά γονίδια στο *Arabidopsis* έχουν προσδιοριστεί ότι ρυθμίζουν αντιδράσεις των τριών κύριων φάσεων της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών και έχουν χαρακτηριστεί τα αντίστοιχα ένζυμα (Wittstock and Halkier, 2002; D'Auria and Gershenzon, 2005; Textor et al., 2004; Halkier and Gershenzon, 2006). Η Εικόνα 13 δείχνει συγκεντρωτικά όλα τα στάδια και τα βήματα αυτής της διαδικασίας, τα οποία αναλύονται παρακάτω.

### 3.2. Πρώτο στάδιο

Στο πρώτο στάδιο γίνεται η επιμήκυνση της αλυσίδας του αμινοξέος. Το μονοπάτι αυτό είχε προταθεί για πρώτη φορά στη δεκαετία του '60 (Chisholm and Wetter, 1964) και επιβεβαιώθηκε πρόσφατα με πειράματα θρέψης στη ρόκα (Graser et al, 2000) και στο *Arabidopsis* (Graser et al., 2001). Το στάδιο αυτό είναι ανάλογο της μετατροπής της βαλίνης σε λευκίνη και περιλαμβάνει πέντε βήματα που συνίστανται σε μια αρχική αντίδραση απαμίνωσης και μία τελική αντίδραση τρανσαμίνωσης, μία αντίδραση συμπύκνωσης, μια αντίδραση ισομερισμού και μια οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση (Wittstock and Halkier, 2002; Mikkelsen et al, 2002).

Συγκεκριμένα στο *Arabidopsis* αλλά και στη ρόκα, με αρχικό αμινοξύ τη μεθειονίνη (Εικόνα 10), αρχική αντίδραση είναι η απαμίνωση της μεθειονίνης προς σχηματισμό του επαγόμενου 2-οξο οξέος. Όπως και στη βιοσύνθεση της λευκίνης, το 2-οξο οξύ επεκτείνεται από μια ομάδα μεθυλενίου σε έναν κύκλο τριών βημάτων, που αποτελείται από μια αντίδραση συμπύκνωσης με ακετυλο-συνένζυμοΑ, μια αντίδραση ισομερισμού και μια οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση (Graser et al, 2000). Το νεοσχηματισθέν 2-οξο οξύ μπορεί να τρανσαμινωθεί στο επαγόμενο παράγωγο μεθειονίνης ή μπορεί να υποστεί περαιτέρω επιμηκύνσεις της αλυσίδας.



Εικόνα 10. επιμήκυνση της αλυσίδας της μεθειονίνης α)μετατροπή της μεθειονίνης σε 2-οξο-οξύ με αντίδραση απαμίνωσης, ακολουθούν τρία βήματα επέκτασης της αλυσίδας με b)αντίδραση συμπύκνωσης, c)αντίδραση ισομερισμού d)οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση και τέλος e)αντίδραση απαμίνωσης και σχηματισμός παραγώγου μεθειονίνης (Grubb and Abel, 2006)

Η συνθάση του μεθυλθειοαλκυμηλικού οξέος (MAM) καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης (Textor et al., 2004; Falk et al., 2004; Field et al., 2004). Στο *Arabidopsis* τρία MAM γονίδια ελέγχουν τις παραλλαγές στο μήκος της πλευρικής αλυσίδας των γλυκοσινολικών που είναι παράγωγα της μεθειονίνης.

Φυτά με μη νοηματικές μεταλλάξεις στο MAM1 έχουν δραματικά διαφοροποιημένα επίπεδα των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων μικρής αλυσίδας, ενώ τα επίπεδα των αλειφατικών γλυκοσινολικών με βασική αλυσίδα εφτά και οχτώ ομάδων μεθυλενίου είναι σε μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστα (Kroymann et al., 2001). Αυτό το μη αναμενόμενο εύρημα δείχνει ότι τα παράγωγα της μεθειονίνης με εφτά και οχτώ ομάδες μεθυλενίου συντίθενται από ένα μονοπάτι που είναι τουλάχιστον ανεξάρτητο από αυτό που συνθέτει αλειφατικά γλυκοσινολικά μικρής αλυσίδας.

Στο *Arabidopsis thaliana* το ένζυμο MAM1 καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης στον πρώτο και δεύτερο κύκλο της επιμήκυνσης της αλυσίδας της μεθειονίνης με μία ή δύο ομάδες μεθυλενίου για να σχηματιστεί διομομεθειονίνη και να παραχθούν αλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα με τρεις ή τέσσερις ανθρακικές πλευρικές αλυσίδες, αντιστοίχως (Kroymann et al., 2001). Το ένζυμο MAM2 καταλύει μόνο την πρώτη αντίδραση συμπύκνωσης για να παραχθεί ομομεθειονίνη (Kroymann et al., 2003). Το ένζυμο MAM3 καταλύει και τους έξι κύκλους της επιμήκυνσης της αλυσίδας της μεθειονίνης και παράγονται τόσο μικρής όσο και μεγάλης πλευρικής αλυσίδας μεθειονίνες (Textor et al., 2007).

### 3.3. Δεύτερο στάδιο

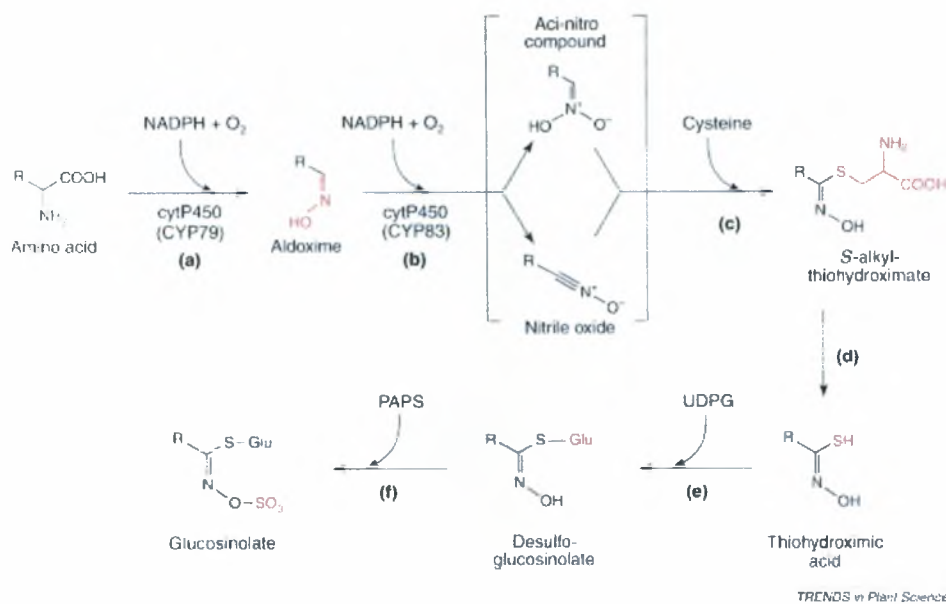
Στο δεύτερο στάδιο τα πρόδρομα αμινοξέα μετατρέπονται στα πρόδρομα γλυκοσινολικά οξέα, με τη βιοσύνθεση της γλυκόνης, της κεντρικής δομής των γλυκοσινολικών οξέων (Εικόνα 11).

Η σύνθεση των πρόδρομων γλυκοσινολικών, επιτελείται σε πέντα βήματα και αρχίζει με την οξειδωση του πρόδρομου αμινοξέος στην αντίστοιχη αλδοξίμη. Η αντίδραση καταλύεται από μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450, της οικογένειας CYP79, που παρουσιάζουν εξειδίκευση στην πλευρική αλυσίδα. Εφτά CYP79s κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* (CYP79C1, CYP79C2, CYP79F1, CYP79F2, CYP79A2, CYP79B2, CYP79B3), ενώ είναι γνωστή η εξειδίκευση των πέντε τελευταίων ( Wittstock and Halkier, 2002; Mikkelsen et al., 2002). Η αρχική οξειδωση δεν είναι αποκλειστικό βήμα της βιοσύνθεσης γλυκοσινολικών, επειδή η

αλδοξίμη που προέρχεται από την τρυπτοφάνη είναι επίσης προϊόν στη σύνθεση του ινδολυλοξικού οξέος (IAA) και της καμαλεξίνης (Glawischnig et al., 2004; Hansen and Halkier, 2005).

Το υπόστρωμα του CYP79A2 είναι η φαινυλαλανίνη (Wittstock and Halkier, 2000), τα CYP79B2 και CYP79B3 μετατρέπουν την τρυπτοφάνη σε ινδολο-3-ακεταλδοξίμη (Mikkelsen et al., 2000; Hull et al., 2000), ενώ τα CYP79F1 και CYP79F2 μεταβολίζουν παράγωγα μεθειονίνης που έχουν υποστεί επιμήκυνση αλυσίδας (Εικόνα 12) (Hansen et al., 2001; Reintanz et al., 2001).

Αρχικά είχε προταθεί ότι το CYP79F1 μετατρέπει μόνο παράγωγα μεθειονίνης μικρής αλυσίδας στις αντίστοιχες αλδοξίμες (Reintanz et al., 2001), αλλά μετέπειτα έρευνες έχουν δείξει ότι στην πραγματικότητα το CYP79F1 μπορεί επίσης να μεταβολίσει πενταομο- και εξαομο-μεθειονίνη (Chen et al., 2003). Αντίθετα η καταλυτική δραστηριότητα του CYP79F2 περιορίζεται στην πενταομο- και εξαομο-μεθειονίνη. Επίσης το CYP79F1 έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης στις κοτυληδόνες, τα φύλλα, τους μίσχους, ενώ το CYP79F2 εκφράζεται περισσότερο στο υποκοτύλιο και τις ρίζες (Chen et al., 2003). Τα ομόλογα CYP79 που μεταβολίζουν το ίδιο υπόστρωμα μπορεί να ρυθμίζονται διαφορετικά (Wittstock and Halkier, 2002).

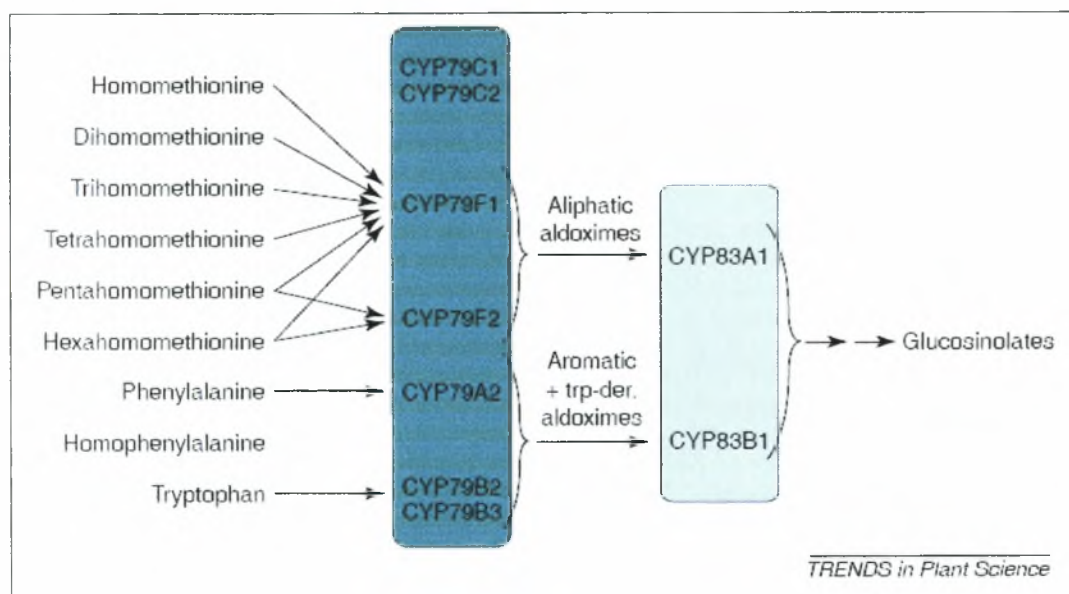


Εικόνα 11. Η βιοσύνθεση της κεντρική δομής των γλυκοσινολικών οξέων α) οξείδωση αμινοξέος προς αλδοξίμη, β) οξείδωση αλδοξίμης προς οξο-νιτρο ενώσεις ή οξειδία του νιτριλίου, γ) σχηματισμός S-αλκυλοϋδροξιμικών ενώσεων, δ) διάσπαση και σχηματισμός θειοϋδροξιμικών οξέων, ε) γλυκοσυλίωση προς αποθειωμένα γλυκοσινολικά και f) θείωση και σχηματισμός πρωτογενών γλυκοσινολικών οξέων (Wittstock and Halkier, 2002).



Το δεύτερο βήμα του σταδίου είναι η οξείδωση της αντίστοιχης αλδοξίμης από την οικογένεια CYP83 του κυτοχρώματος P450 σε οξο-νιτρο ενώσεις ή οξείδια του νιτριλίου. Τα προϊόντα αυτά είναι ισχυρά ηλεκτρόφιλα που αντιδρούν αυθόρμητα με θειόλες για να σχηματίσουν στη συνέχεια S-αλκυλοϋδροξιμικές ενώσεις (Hansen et al., 2001; Bak and Feyereisen, 2001; Bak et al., 2001). Στο *Arabidopsis*, τα δυο ένζυμα που οξειδώνουν τις αλδοξίμες είναι τα CYP83A1 και CYP83B1, με το πρώτο να έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τις αλειφατικές (από μεθειονίνη) και το δεύτερο με τις αρωματικές (από τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη) αλδοξίμες (Naur et al., 2003; Hemm et al., 2003). Η κυστεΐνη φαίνεται να είναι ο δότης θειολών *in vivo*, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο αν σε αυτή η σύζευξη μεσολαβεί κάποιο ένζυμο.

Με διάσπαση των S-αλκυλοϋδροξιμικών ενώσεων από μια C-S λυάση παράγονται θειοϋδροξιμικά οξέα (Mikkelsen et al., 2004), τα οποία γλυκοσυλιώνονται από την UGT74B1, μια UDP-γλυκοσυλτρανσφεράση εξαρτώμενη από τη γλυκόζη προς αποθειωμένα γλυκοσινολικά (Grubb et al., 2004). Η θείωση ολοκληρώνει τη σύνθεση των πρωτογενών γλυκοσινολικών (Piotrowski et al., 2004).



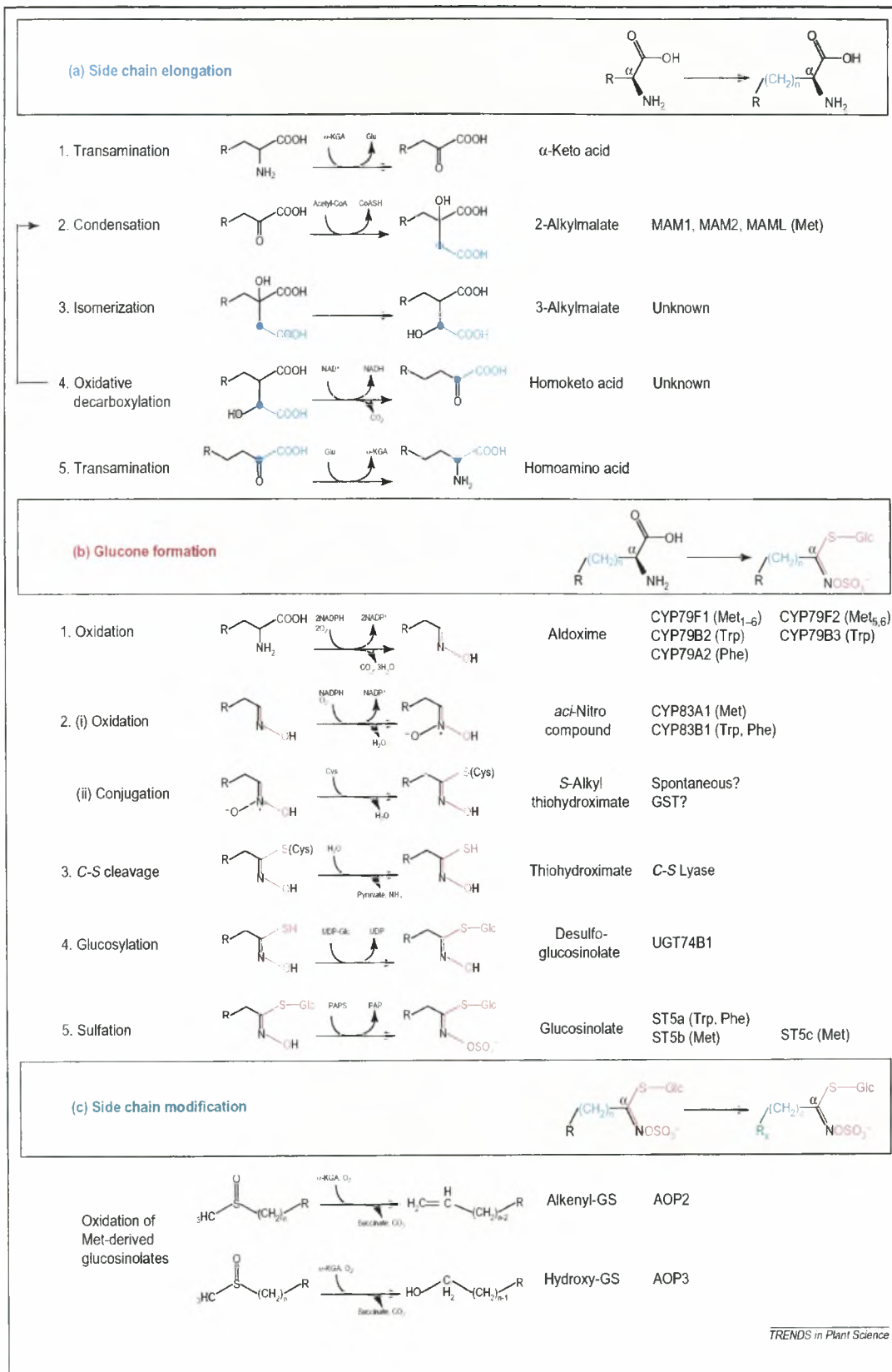
Εικόνα 12. Τα ένζυμα της οικογένειας CYP79 (καταλύουν αντιδράσεις στο πρώτο βήμα του σταδίου της βιοσύνθεσης της γλυκόνης) και CYP83 (καταλύουν αντιδράσεις στο δεύτερο βήμα του σταδίου της βιοσύνθεσης της γλυκόνης), καθώς και τα υποστρώματά τους (Wittstock & Halkier, 2002).

### 3.4. Τρίτο στάδιο

Στο τρίτο στάδιο τα μητρικά γλυκοσινολικά οξέα μπορούν να υποστούν δευτερογενείς τροποποιήσεις της πλευρικής αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει μέσω αντιδράσεων οξείδωσης, υδρόλυσης, αλκυλίωσης και εστεροποίησης (Kliebenstein et al., 2005; Wittstock and Halkier, 2002; Mikkelsen et al., 2002). Οι δευτερογενείς τροποποιήσεις της πλευρικής αλυσίδας θεωρούνται γενικά ως το τελικό στάδιο, ωστόσο σημειώνεται ότι τα αποθειωμένα γλυκοσινολικά μπορούν να είναι τα πραγματικά υποστρώματα σε κάποιες περιπτώσεις (Ratzka et al., 2002; Graser et al., 2001; Brudenell et al., 1999).

Τα γλυκοσινολικά που προέρχονται από τη μεθειονίνη εμφανίζουν εκτεταμένες τροποποιήσεις. Στο *Arabidopsis* αυτή η δομική ποικιλία δημιουργείται από τέσσερις πολυμορφικούς γενετικούς τύπους (Kliebenstein et al., 2001). Η σημαντική αυτή φυσική παραλλαγή των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων έχει διευκολύνει την ταυτοποίηση των δύο α-κετογλουταρικών διοξυγενασών, που κωδικοποιούνται από τα στενά συνδεδεμένα και διπλασιασμένα γονίδια *AOP2* και *AOP3*, τα οποία ελέγχουν την παραγωγή αλκενυλο- και υδροξυαλκυλο- γλυκοσινολικών οξέων αντίστοιχα (Kliebenstein et al., 2001).

Απομένει να αναγνωριστούν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη θεική οξείδωση όπως επίσης και για τις μεθοξυλιώσεις των ινδολικών γλυκοσινολικών, κάτι που φαίνεται να προάγεται με συγκριτική QTL (Quantitative trait locus) χαρτογράφηση.



Εικόνα 13. Οι αντιδράσεις των τριών σταδίων της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων και τα εμπλεκόμενα γονίδια στο *Arabidopsis* (Grubb and Abel, 2006)

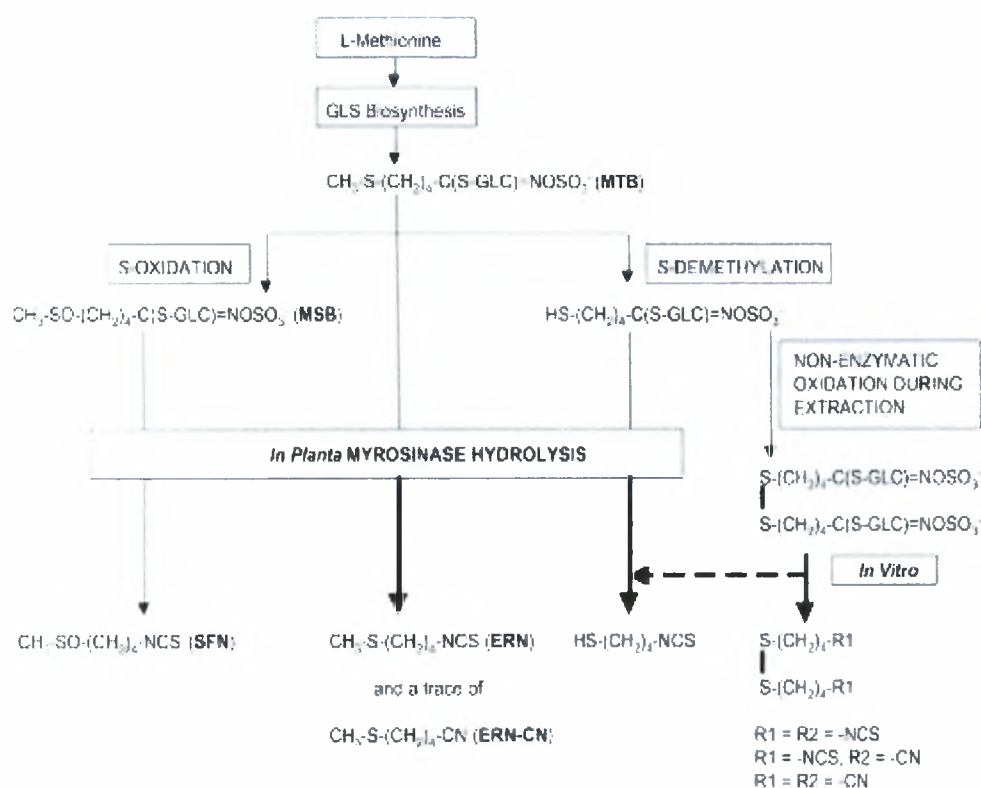
### 3.5. Η βιοσύνθεση των γλυκοσιδικών οξέων στην *Eruca sativa*

Στον παρακάτω Πίνακα 1 φαίνονται γλυκοσιδικά οξέα που έχουν απομονωθεί από φύλλα και σπόρους ρόκας και έχουν ταυτοποιηθεί με τη μέθοδο LC/ESI-MS (Cataldi et al., 2007).

Structure of R <sup>1</sup>	R - name	Common name	Elemental composition	Molecular mass (Da)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Occurrence <sup>1</sup>
	4-methylsulfinylbutyl	Glucoraphanin	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	437.05	436	LEs/SEs
	(R,S)-2-hydroxy-3-butenyl	Progoitrin/epiprogoitrin	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	389.04	388	LEs/CRM
	2-propenyl	Sinigrin	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	359.03	358	LEs
	4-hydroxy-3-indolylmethyl	4-Hydroxyglucobrassicin	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	464.06	463	LEs/CRM
	3-hydroxy-3-indolylmethyl	3-Hydroxyglucobrassicin	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	464.06	463	LEs
	4-mercaptobutyl (MB)	MB-GLS	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	437.04	436	LEs
	4-methylthiobutyl (MTB)	Glucoracem	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	421.05	420	LEs/SEs
	4-methoxy-3-indolylmethyl	4-Methoxyglucobrassicin	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	478.49	477	LEs/SEs
	4-methylpentyl (logP = 2.9)	Methylpentyl-GLS <sup>2</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	403.46	402	LEs
	n-hexyl (logP = 3)	n-Hexyl-GLS <sup>2</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	403.46	402	LEs
	Dimeric 4-mercaptobutyl	DMB-GLS	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	612.06	611	LEs
	4-(D-glucopyranosylsulfanyl)butyl	4-DB-GLS <sup>4</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>6</sub> S <sub>3</sub>	603.06	603	LEs
	5-methylsulfanylpropyl	Glucosylsin	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	451.51	450	CRM
	2-hydroxy-4-pentenyl	Glucosinapoleitrin	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	403.06	402	CRM
	3-butenyl	Glucosinapin	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	373.38	372	CRM
	4-pentenyl	Glucobrassicinapin	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	387.41	386	CRM
	3-indolylmethyl	Glucobrassicin	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	448.45	447	CRM
	2-phenylethyl	Glucosinastatin	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	423.44	422	CRM
	N-methoxy-3-indolylmethyl	N-methylglucobrassicin	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	476.49	477	CRM
	4-methylsulfonobutyl	Glucosynolin <sup>3</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	453.04	452	—

Πίνακας 1. Γλυκοσιδικά οξέα που έχουν απομονωθεί από φύλλα και σπόρους ρόκας

Τα περισσότερα γλυκοσινολικά που έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί από τη ρόκα είναι αλειφατικά και παράγονται από μεθειονίνη. Το κυριότερο είναι το 4-μερκαπτοβουτυλ-γλυκοσινολικό οξύ (MTB)-(γλυκοερουσίνη), όπως φαίνεται και στην εικόνα 14. Μέχρι σήμερα, όμως, δεν έχουν χαρακτηριστεί γονίδια βιοσύνθεσης αυτών των γλυκοσινολικών οξέων. Επιπλέον, στη ρόκα ανιχνεύονται μοναδικά στη χημική σύσταση αλειφατικά γλυκοσινολικά τα οποία δεν έχουν περιγραφεί σε άλλα είδη, όπως η γλυκοσατιβίνη (Glucosativin, 4-mercaptobutyl GSL) και το διμερές 4-μερκαπτοβουτυλ-γλυκοσινολικό οξύ (4-β-glucopyranosyldisulfanylbutyl GSL). Η παραγωγή του ως κύριο πτητικό από φρέσκους ιστούς είναι πιθανώς υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική γεύση και μυρωδιά της ρόκας (Bennett et al., 2002).



Εικόνα 14. Διαγραμματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων και της υδρόλυσής τους in planta και in vitro στη ρόκα (Bennett et al.)

#### 4. Επίδραση της λίπανσης με θείο και άζωτο στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στους φυτικούς ιστούς

Δύο από τα στοιχεία που σχετίζονται άμεσα με τα γλυκοσινολικά, όπως φαίνεται άλλωστε και από τη δομή του μορίου τους είναι το άζωτο (N) και το θείο (S). Κάθε μόριο γλυκοσινολικού οξέος περιέχει τουλάχιστον δύο άτομα θείου. Το ένα προέρχεται από τηθεική ομάδα, ενώ το άλλο από την κυστεΐνη. Επίσης, πολλά από τα γλυκοσινολικά συνθέτονται από τη μεθειονίνη και έτσι μπορεί να περιέχουν και τρίτο άτομο θείου στη δομή τους. Η χορήγηση θείου και αζώτου ασκεί επίδραση στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στα λαχανικά της οικογένειας Brassicaceae, αλλά οι συνέπειες στη συγκέντρωση των παραγώγων που απελευθερώνονται μετά από την αποσύνθεση των γλυκοσινολικών από τη μυροσινάση έχουν ελάχιστα μελετηθεί (Siemens et al., 2008).

Η χορήγηση θείου οδηγεί σε αυξήσεις στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στις περισσότερες περιπτώσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί δεκαπλάσιες, όπως για παράδειγμα σε πείραμα με *Brassica napus*, όπου παρουσιάστηκαν 15 έως 20 φορές αυξημένα επίπεδα αλειφατικών γλυκοσινολικών σε φύλλα φυτών από υδροπονική καλλιέργεια στα οποία χορηγούνταν 1 mM θειικού, συγκρινόμενα με αποτελέσματα από φυτά στα οποία χορηγήθηκε μόνο στα αρχικά στάδια θειικό και στη συνέχεια διακόπηκε η χορήγησή του (Matallana et al., 2006; Blake-Kalff et al., 1998). Τα αποτελέσματα τέτοιων πειραμάτων δείχνουν ότι υπάρχουν σημαντικές δυνατότητες να μεταβληθούν τα επίπεδα των γλυκοσινολικών οξέων σε καλλιεργούμενα φυτά, ώστε να αυξηθούν οι οργανοληπτικές καθώς και οι θετικές για την υγεία ιδιότητές τους ή η αξία τους ως βιοαπολυμαντικά. Ωστόσο η λίπανση με θείο δεν οδηγεί πάντα σε αύξηση της συγκέντρωσης. Σε πειράματα με μπρόκολο (*Brassica oleraceae* var. *italica*) παρατηρήθηκε ότι σε κάποια φυτά η λίπανση με θείο οδήγησε σε ελάχιστη αύξηση της συγκέντρωσης στις ανθοκεφαλές, ενώ σε άλλα δεν είχε καμία επίδραση ή ακόμη και μείωση (Vallejo et al., 2003a, b; Rangkadilok et al., 2004). Η ικανότητα της λίπανσης με θείο να αυξάνει την συγκέντρωση ολικών γλυκοσινολικών ποικίλλει με το αναπτυξιακό στάδιο της άνθησης, με την εφαρμογή να είναι πιο αποτελεσματική στα ενδιάμεσα στάδια της ανάπτυξης των ανθοκεφαλών. Περαιτέρω ένδειξη ότι η διαθεσιμότητα του θείου σχετίζεται με τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών προέρχεται από έρευνες σε φυτά που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικούς τύπους εδάφους (Withers and O'Donnell,

1994). Λίπανση με θείο σε φυτά που καλλιεργούνται σε εδάφη με έλλειψη θείου οδήγησε σε δραματική αύξηση των γλυκοσινολικών από ότι η λίπανση σε φυτά που μεγαλώνουν σε εδάφη με επαρκές θείο (Falk et al., 2007).

Η χορήγηση θείου μπορεί να επηρεάσει διαφορετικά τη συγκέντρωση συγκεκριμένων γλυκοσινολικών. Στην ελαιοκράμβη, εφαρμογή θείου σε φυτά με έλλειψη θείου προκάλεσε μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των αλειφατικών από ότι των ινδολικών γλυκοσινολικών (Withers and O'Donnell, 1991).

Αλληλεπίδραση μεταξύ συγκέντρωσης γλυκοσινολικών οξέων και χορήγησης θείου, που επηρεάζεται μερικώς από το περιεχόμενο του φυτού σε άζωτο έχει αναφερθεί για κάποια είδη Brassicaceae όπως το μπρόκολο και η ελαιοκράμβη (Schonhof et al., 2007; Schnug et al., 1995; Kim et al., 2002). Ωστόσο τα αποτελέσματα είναι μερικώς αντιφατικά. Η συγκέντρωση στην ελαιοκράμβη μειώθηκε με αύξηση του χορηγούμενου αζώτου υπό απουσία χορήγησης θείου, αλλά αυξήθηκε με επιπρόσθετη χορήγηση θείου (Zhao et al., 1993). Ομοίως, η χορήγηση αζώτου τείνει να μειώσει, να αυξήσει ή να μην έχει καμία επίδραση στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών στα είδη του γένους Brassica. (Zimmermann et al., 2005; Zhao et al., 1993). Στη ρόκα δεν έχουν πραγματοποιηθεί ανάλογα πειράματα.

## **5. Ρύθμιση και μεταγραφικοί παράγοντες**

### **5.1. Γενικά**

Υπάρχουν πολλαπλές ενδείξεις που δείχνουν ότι ο μεταβολισμός των γλυκοσινολικών οξέων ανταποκρίνεται σε περιβαλλοντικά σήματα και βιολογικώς ενεργά μόρια (Kutz et al., 2002; Maruyama-Nakashita et al., 2003; Mikkelsen et al., 2003; Mewis et al., 2005; Felice et al., 2006). Επίσης, πρόσφατες έρευνες έχουν αρχίσει να επεξηγούν τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων αλλαγές στη χορήγηση του θείου ρυθμίζουν το μεταβολισμό των γλυκοσινολικών οξέων.

Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες ρυθμίζουν το προφίλ των γλυκοσινολικών οξέων στα φύλλα και τους σπόρους, όπως η προσβολή από παθογόνα, η καταστροφή από εχθρούς, ο μηχανικός τραυματισμός και η θρέψη των φυτών (Wittstock and Halkier, 2002; Mikkelsen et al., 2002; Mewis et al., 2005; Hirai et al., 2005; Maruyama-Nakashita et al., 2003). Από μελέτες παράλληλα σε μεταβολίτες και μεταγραφήματα έχει καταδειχθεί συντονισμένη καταστολή των περισσότερων γονιδίων του μονοπατιού ως ανταπόκριση στην έλλειψη του θείου στα φυτά (Hirai et

al., 2005). Δεν είναι γνωστό με ποιο τρόπο η διαθεσιμότητα του θείου ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του γλυκοσινολικού μονοπατιού. Ωστόσο, είναι εδραιωμένο ότι η επαγόμενη από παθογόνα και εχθρούς παραγωγή γλυκοσινολικών οξέων και η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεσή τους ρυθμίζεται, έστω και μερικώς, από ιασμονικά οξέα, σαλικυλικό οξύ και αιθυλένιο, δηλαδή τις κυριότερες φυτικές ορμόνες που σχετίζονται με ειδικές και ευρέος φάσματος αμυντικές αποκρίσεις (Brader et al., 2001; Agrawal and Kurashige, 2003; Kliebenstein et al., 2002; Mewis et al., 2005; Reymond et al., 2004; Mikkelsen et al., 2003). Μεταχείριση με ιασμονικό οξύ το οποίο επάγει αποκρίσεις σε επίθεση εντόμων και νεκροτροφικών παθογόνων οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις τόσο ινδολικών όσο και ειδικών αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων (Brader et al., 2001; Mewis et al., 2005; Mikkelsen et al., 2003), πιθανώς μέσω πολλαπλών μονοπατιών σήματος (Kliebenstein et al., 2002).

## 5.2. Μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων

Ο *ATR1*, ένας MYB μεταγραφικός παράγοντας, που αναγνωρίστηκε σε σάρωση για μεταλλάγματα με τροποποίηση στη ρύθμιση τρυπτοφάνης, ελέγχει την παραγωγή ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων. Υπερέκφραση του *ATR1* δεν τροποποιεί την περιεκτικότητα σε αλειφατικά γλυκοσινολικά αλλά αντ'αυτού προκαλεί δεκαπλάσια συσσώρευση ινδολικών γλυκοσινολικών σε σχέση με τον άγριο τύπο, όπως επίσης και διπλασιασμό των επιπέδων του ινδολιλοξικού οξέος (IAA) (Celenza et al., 2005). Ωστόσο, η έκφραση του *ATR1/MYB34* εμφανίζεται να είναι σχεδόν απύουσα στα φύλλα, την κύρια θέση συσσώρευσης των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων. Επιπλέον, υπερέκφραση του *ATR1/MYB34* οδήγησε σε φαινότυπο ανάπτυξης υψηλής αυξίνης (Gigolashvili et al., 2007).

Ο *HIG/MYB51* μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιεί τους υποκινητές των βιοσυνθετικών γονιδίων των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων, οδηγώντας σε αυξημένη συσσώρευση των τελευταίων. Υπερέκφραση του *HIG/MYB51* είχε ως αποτέλεσμα ειδική συσσώρευση ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων χωρίς να επηρεάζεται ο μεταβολισμός της αυξίνης και η μορφολογία του φυτού. Μηχανικό ερέθισμα όπως άγγιγμα ή τραύμα αύξησε πρόσκαιρα την έκφραση του *HIG/MYB51* αλλά όχι του *ATR1/MYB34*. Υπερέκφραση του *HIG/MYB51* μείωσε την



επιθετικότητα των εντόμων, όπως φαίνεται από δοκιμές διπλής επιλογής με το λεπιδόπτερο *Spodoptera exigua* (Gigolashvili et al., 2007).

Ο έλεγχος της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων είναι ελάχιστα κατανοητός, και μόλις πρόσφατα έχουν περιγραφεί οι πρώτες ρυθμιστικές συνιστώσες του βιοσυνθετικού μονοπατιού στο *A.thaliana*. Μια νέα πυρηνική πρωτεΐνη που συνδέεται στην καλμοδουλίνη, η IQD, φαίνεται να είναι θετικός ρυθμιστής του σχηματισμού των αλειφατικών και ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων (Levy et al., 2005). Επίσης, ο μεταγραφικός παράγοντας AtDof1.1 έχει ταυτοποιηθεί ως τμήμα ενός ρυθμιστικού δικτύου που ελέγχει τη δραστηριότητα του CYP83B1 και του γλυκοσινολικού σχηματισμού (Skirycz et al., 2006).

### 5.3. Μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων

Το γονίδιο *HAG1* (HIGH ALIPHATIC GLUCOSINOLATE 1), το οποίο επίσης αναφέρεται και ως *MYB28* έχει ταυτοποιηθεί ως θετικός ρυθμιστής των γλυκοσινολικών οξέων που προέρχονται από τη μεθειονίνη. Φάνηκε πως το *HAG1* ενεργοποιεί τα γονίδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων (Gigolashvili et al., 2007).

Η περιεκτικότητα σε αλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα καθώς και τα μεταγραφικά επίπεδα των βιοσυνθετικών τους γονιδίων εμφάνισαν αύξηση σε μεταλλάγματα υπερέκφρασης, ενώ μείωση παρατηρήθηκε σε μεταλλάγματα στα οποία έγινε σίγηση του *HAG1* με μηχανισμό RNAi. Με ανάλυση έκφρασης GUS αποκαλύφθηκε ισχυρή δραστηριότητα υποκινητή του *HAG1* σε αναπαραγωγικά όργανα και φύλλα του *Arabidopsis thaliana*, τμήματα που αποτελούν και τις κύριες θέσεις συσσώρευσης των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων. Μηχανικό ερέθισμα όπως άγγιγμα ή τραύμα αύξησε πρόσκαιρα την έκφραση του *HAG1/MYB28* σε ανθοταξίες ανθισμένων φυτών. Υπερέκφραση του *HAG1/MYB28* μείωσε τη δραστηριότητα εντόμων, όπως φάνηκε σε πείραμα με το λεπιδόπτερο *Spodoptera exigua*. Επίσης, σε πείραμα όπου μελετήθηκε η επίδραση της γλυκόζης και των φυτικών ορμονών φάνηκε πως οι τελευταίες δεν επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη που προκάλεσε αύξηση της έκφρασης (Gigolashvili et al., 2007).

Άλλοι δύο μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην ίδια κατηγορία με τον *HAG1/MYB28* και πιο συγκεκριμένα στην υποομάδα 12 της ομάδας R2R3-MYB είναι οι *HAG2/MYB76* και *HAG3/MYB29*. Οι τελευταίοι είχαν πρόσφατα

(Gigolashvili et al., 2007a) ταυτοποιηθεί ως πιθανοί ρυθμιστές της βιοσύνθεσης των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων. Ακολούθησε μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός των λειτουργιών τους και φάνηκε να είναι και οι δύο θετικοί ρυθμιστές της βιοσύνθεσης των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων.

Οι HAG1/MYB28, HAG2/MYB76 και HAG3/MYB29 φαίνεται να συνιστούν μια δεύτερη υποκατηγορία μέσα στην υποομάδα 12 των μεταγραφικών παραγόντων με τον HAG1/MYB28 να αποτελεί το ρυθμιστή-κλειδί της βιοσύνθεσης των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων μικρής και μεγάλης αλυσίδας, όπως πρόσφατα προσδιορίστηκε (Gigolashvili et al., 2007b ; Hirai et al., 2007). Οι HAG2/MYB76 και HAG3/MYB29 έχουν επικαλυπτόμενες αλλά συγκεκριμένες λειτουργίες στη βιοσύνθεση των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων.

## **6. Σκοπός της εργασίας**

Η αποσαφήνιση της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων και ο έλεγχός της θα καταστήσει εφικτή τη βελτίωση της θρεπτικής αξίας και της γεύσης των εδώδιμων καλλιεργειών. Πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση των βιοσυνθετικών γονιδίων, γεγονός που παρέχει σημαντικά εργαλεία στον τομέα της μεταβολικής μηχανικής. Ο χαρακτηρισμός πολλών από τα βιοσυνθετικά γονίδια έχει αποκαλύψει νέες πλευρές των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν εντός του δικτύου του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σχέση μεταξύ των βιοσυνθετικών μονοπατιών των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων και της φυτικής ορμόνης αυξίνης. Στην παρούσα εργασία καταβλήθηκε προσπάθεια όχι μόνο να απομονωθούν κάποια από τα βιοσυνθετικά γονίδια των γλυκοσινολικών οξέων στη ρόκα, αλλά και να διερευνηθεί η σχέση της έκφρασής τους με τη θρέψη των φυτών σε άζωτο και θείο.

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. Φυτικό υλικό**

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν φύλλα του φυτού *Eruca sativa* (ρόκα).

#### **1.1 Καλλιεργητικές φροντίδες**

Για την εκτέλεση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα ρόκας (*Eruca sativa*) σε γλάστρες των 12L. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα αδρανούς άμμου (ποταμίσια) στην οποία είχε πραγματοποιηθεί χημική ανάλυση ως προς την περιεκτικότητα της σε θείο και άζωτο και η οποία κρίθηκε κατάλληλη για χρήση σε πειράματα θρέψης. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε ψυχρό θερμοκήπιο, συνολικής έκτασης 700m<sup>2</sup> στον Πειραματικό Σταθμό του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών, στο Ζύγι, Κύπρος.

#### **1.2 Πειραματικό Σχέδιο**

Σε πλήρως τυχαίοποιημένο σχέδιο εξετάστηκαν οι δυο παράγοντες (N και S) σε 2 δόσεις και σχεδιάστηκαν 3 μεταχειρίσεις των 4 επαναλήψεων. Κάθε μεταχείριση αποτελούνταν από 10 γλάστρες σε κάθε μια από την οποία υπήρχαν δέκα φυτά ρόκας. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι: α)για το άζωτο 50 και 250 kg/ha εφεξής N50, N250 και για το θείο 10 και 150 kg/ha εφεξής S10 και S150. Ο υπολογισμός των λιπασμάτων που χορηγήθηκε υπολογίστηκε σύμφωνα με την επιφάνεια της γλάστρας αφού το ύψος των γλαστρών ήταν μεγαλύτερο από τα 25cm. Τα υπόλοιπα θρεπτικά στοιχεία χορηγήθηκαν στα φυτά σύμφωνα με του κώδικες ορθής γεωργικής πρακτικής, που ακολουθούνται κατά την καλλιέργεια των ειδών αυτών. Το N χορηγήθηκε με τη μορφή NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> και το θείο με την μορφή K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Η εξισορρόπηση της ποσότητας του K πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση ανάλογης ποσότητας, KCl.

#### **1.3 Δειγματοληψία – Επεξεργασία Δείγματος**

Στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου και στην περίοδο της φυσιολογικής ωρίμανσης των βρώσιμων τμημάτων πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των φυτικών ιστών που εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητα τους σε N, S και γλυκοσινολικά οξέα. Συγκεκριμένα από κάθε μεταχείριση, συλλέγονταν ολόκληρα τα φυτά και τυχαία απομακρύνονταν 15 πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα (ίδιου μεγέθους),

χωρίς προσβολές και μηχανικούς τραυματισμούς. Τα φύλλα τοποθετούνταν αμέσως σε δοχεία πολυστερίνης με ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.

## **2. Μοριακή μελέτη**

### **2.1. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων**

#### **2.1.α. Απομόνωση ολικού RNA**

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ιστός από βλαστούς και φύλλα που συγκομίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$ . Έγινε ομογενοποίηση του φυτικού ιστού σε γουδί λειοτρίβησης με υγρό άζωτο και στη συνέχεια με τη χρήση του RNeasy Plant Mini Kit της Qiagen έγινε η απομόνωση του RNA, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας :

- Ζύγιση 100 mg φυτικού ιστού για κάθε δείγμα και τοποθέτηση σε σωλήνα eppendorf.
- Προσθήκη β-Μερκαπτοαιθανόλης στο buffer RLT (παρέχεται στο kit) σε τελική συγκέντρωση 5%.
- Προσθήκη 450 μl του ανωτέρω διαλύματος στο σωλήνα eppendorf που περιέχει το φυτικό ιστό.
- Καλή ανάδευση με τη χρήση vortex για μερικά δευτερόλεπτα.
- Μεταφορά του υλικού στην ειδική στήλη του kit και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13000 στροφές.
- Μεταφορά του απορρέοντος υγρού σε νέους σωλήνες eppendorf
- Προσθήκη 100% αιθανόλης και ανάδευση
- Μεταφορά του υλικού στη ροζ στήλη του kit και φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 12000 στροφές
- Άδειασμα του διερχόμενου από το φίλτρο υγρού
- Προσθήκη 700 μl buffer RW1 (παρέχεται στο kit) και φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 12000 στροφές
- Άδειασμα του διερχόμενου από το φίλτρο υγρού
- Προσθήκη 500 μl buffer RPE (παρέχεται στο kit) και φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 12000 στροφές
- Άδειασμα του διερχόμενου από το φίλτρο υγρού
- Προσθήκη 500 μl buffer RPE και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12000 στροφές

- Τοποθέτηση στηλών σε νέους σωλήνες των 2 ml και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13000 στροφές.
- Τοποθέτηση στηλών σε νέους σωλήνες erpendorf του 1,5 ml και προσθήκη 50 μl RNase free water
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 στροφές

Το RNA που παραλαμβάνεται μετά τη φυγοκέντρηση αποθηκεύεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$

Ακολουθεί έλεγχος της ποιότητας και ποσότητας του RNA με ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αгарόζης.

### 2.1 β. Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτή αгарόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλιωνα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αгарόζη, για παράδειγμα σε 0,8% συγκέντρωση αгарόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb (Χατζόπουλος, 2001). Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

- Σε ορισμένο όγκο διαλύματος 1xTAE προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα αгарόζης, ώστε να εξασφαλισθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηκτής, με βάση το εύρος διαχωρισμού που χρειάζεται για κάθε περίπτωση και ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Για παράδειγμα για προετοιμασία πηκτής αгарόζης 1% προστίθεται 1g αгарόζης σε 100 gr διαλύματος 1xTAE.
- Το υλικό θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί εντελώς η αгарόζη.
- Το διάλυμα κρύνει μέχρι τους  $50^{\circ}\text{C}$  περίπου, προστίθεται 0,007 % v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αναμιγνύεται καλά.

- Το διάλυμα αδειάζεται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, εφαρμόζεται η ειδική «χτένα» ώστε να δημιουργηθούν υποδοχείς για τοποθέτηση των δειγμάτων και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
  - Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων στα οποία προστίθεται loading buffer 10x.
  - Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή αφαιρείται προσεκτικά η «χτένα» και τοποθετείται στο δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE. Σε κάθε μία από τις θέσεις που δημιουργήθηκαν στην πηκτή τοποθετείται με πιπέτα η επιθυμητή ποσότητα δείγματος, ενώ σε κάποια από αυτές
  - Εφαρμόζεται η επιθυμητή τάση ρεύματος στη συσκευή και τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/ cm.
- *50x TAE : 24,2%(w/v) Tris, 57,1 ml/lit acetatic acid, 100 ml 0,5M EDTA*
  - *Βρωμιούχο αιθίδιο : παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C. Η συγκέντρωσή του στην πηκτή της αγαρόζης είναι 0,5 µg/ml.*
  - *Loading buffer 10x : 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 35% γλυκερόλη*

### 2.1.γ. Υδρόλυση του γονιδιωματικού DNA με τη χρήση του ενζύμου DNase

Με αυτή τη μέθοδο απομακρύνεται το γονιδιωματικό DNA που ίσως συνυπάρχει με το RNA που απομονώθηκε από τον ιστό. Ακολουθούνται τα εξής βήματα :

- Λαμβάνεται δείγμα RNA 25,5 µl και μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf στον οποίο έχουν προστεθεί :
  - 3 µl ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης
  - 1 µl DNase I
  - 0,5 µl RNase inhibitor (παρεμποδιστή ριβονουκλεασών)
- Ακολουθεί επώαση στους 37<sup>0</sup> C
- Προστίθενται 170 µl ddH<sub>2</sub>O και 200 µl φαινόλης, ακολουθεί ανάδευση με χρήση vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf. Η ίδια διαδικασία γίνεται και

κατά την ανάμιξη με φαινόλη/χλωροφόρμιο σε αναλογία 1:1 και σε ανάμιξη με ίσο όγκο χλωροφόρμιο.

- Η κατακρήμνιση του RNA γίνεται με προσθήκη 1/20 του όγκου του διαλύματος CH<sub>3</sub>COONa pH=5,3 και προσθήκη 2,5 όγκων αιθανόλης. Το δείγμα διατηρείται στους -20°C για 12 ώρες τουλάχιστον. Το RNA κατακρημνίζεται και με διατήρηση του δείγματος στους -80°C για 30 λεπτά.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 20 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 200 μl 70% αιθανόλης
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 20 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και οι σωλήνες με το ίζημα αφήνονται να στεγνώσουν αφού τοποθετηθούν σε πάγο
- Τέλος γίνεται επαναδιάλυση σε 20 μl ddH<sub>2</sub>O

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση 1 μl κάθε δείγματος σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 1,5%.

#### 2.1.δ. Σύνθεση cDNA

- Σε σωλήνα erppendorf τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά :
  - Ολικό RNA 10 μl
  - ddH<sub>2</sub>O 4,7 μl
  - τυχαίοι εκκινητές oligodT 1 μl

Το μίγμα που προκύπτει θερμαίνεται στους 65 ° C για 5 λεπτά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

- Στη συνέχεια προστίθεται το μίγμα της αντίστροφης μεταγραφάσης αποτελούμενο από :
  - 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφάσης
  - 0,8 μl μίγμα dNTPs
  - 0,5 μl RNase inhibitor (παρεμποδιστής ριβονουκλεασών)
  - 1 μl αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase)
- Έπειτα ο σωλήνας erppendorf αφήνεται για 10 λεπτά στους 25<sup>0</sup> C, ακολουθεί επώαση στους 65<sup>0</sup> C για 60 λεπτά και στους 70<sup>0</sup> C για 15 λεπτά.

### 2.1.ε. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR – εκτός του στόχου DNA – είναι οι εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει :

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step).
- Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ένας τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ . Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης.
- Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (extention step). Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25 – 35 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφήση (Reverse transcriptase), όπως επίσης και η ποσοτική ή αλλιώς real time PCR.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής :

- Σε σωλήνα φυγοκέντρησης προστίθενται τα παρακάτω, σε τελικό όγκο 20 μl :
  - 12 μl αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O
  - 1 μl μίγμα των 10mM dNTPs
  - 2 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNAzyme
  - 2 μl εκκινητής έμπροσθεν



- 2 μl εκκινητής ανάστροφος
- 0,5 μl DNA πολυμεράση (5 U/μl).
- Το μίγμα αναμιγνύεται πολύ καλά και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα :

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. Κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	2 λεπτά	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	94 °C	1 λεπτό	35
Υβριδισμός εκκινητών	54-59 °C	1 λεπτό	
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72 °C	1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 λεπτά	1

Με τη χρήση H/Y και του προγράμματος Beacon Designer 7, σχεδιάστηκαν τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών :

- CYP79F1.F / CYP79F1.R

5'-TTG ATG GTC AAG AGG AGA GGG-3' / 5'-CGT CCC GAC TTT AAC ACC-3'

- CYP83A1.F / CYP83A1.R

5'-GAA GTA CAA TGA AGA TGG AGA AG-3' / 5'-TAA CTA AGG CTC TGA AGT AAG G-3'

- CYP83B1.F / CYP83B1.R

5'-TAG ACG AGA CTC TTG ACC-3' / 5'-GAG AAG GTT AGC GAA AGG-3'

- MAMDG.F / MAMDG.R

5'-TMT TMG AYA CDA CKC TCC GWG ACG-3' / 5'-GCR TTB CCA SYT CTT TCR CC-3'

- CYP79DG.F / CYP79DG.R

5'-CGG MTA CAA AAC MTG CGT G-3' / 5'-TTG ATG GRT TGT CTG GCG-3'

#### 2.1.στ. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτική αγαρόζης (gel extraction kit της Qiagen)

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης απομονώνεται από την πηκτική με νυστέρι το τμήμα που περιέχει το DNA που μας ενδιαφέρει.

- Ζυγίζεται το κομμάτι της πηκτής σε erpendorf και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα QG σε αναλογία 3:1.
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 10 λεπτά ώστε να λιώσει πλήρως η πηκτή. Γι' αυτό γίνεται ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex) κάθε 2-3 λεπτά της επώασης. Στο τέλος της επώασης το χρώμα του μίγματος γίνεται κίτρινο.
- Προστίθεται ίσος όγκος, με την πηκτή, ισοπροπανόλη και αναδεύεται καλά.
- Προσαρμόζεται η στήλη, που διατίθεται στο kit, στο erpendorf ώστε να συλλεχθεί το DNA και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και αυτό ξαναπροσαρμόζεται στη στήλη.
- Προστίθενται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος QG και επαναλαμβάνεται η διαδικασία.
- Για να ξεπλυθεί το DNA προστίθενται 0,75 ml ρυθμιστικού διαλύματος PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
- Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και φυγοκεντρείται πάλι για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.
- Η στήλη προσαρμόζεται σε νέο erpendorf, προστίθενται 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 15.000 rpm, προκειμένου να συλλεχθεί το DNA.

## 2.2. Χειρισμός πλασμιδίων

### 2.2.α. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό (competent cells)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εισαχθούν σε εργαστηριακά στελέχη τα επιθυμητά πλασμίδια, έτσι ώστε πολλαπλασιαζόμενα τα βακτηριακά κύτταρα να παράγουν σε μεγάλη ποσότητα το πλασμίδιο μας.

Τα στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E.coli*) που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών κυττάρων για μετασχηματισμό ήταν τα DH5α. Η διαδικασία ήταν η παρακάτω :

- 200 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζονται με 2 ml υγρής καλλιέργειας του στελέχους που επιλέχθηκε.
- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση μέχρι η οπτική πυκνότητα του αιωρήματος να φτάσει την τιμή  $O.D_{600}=0,2-0,3$ .

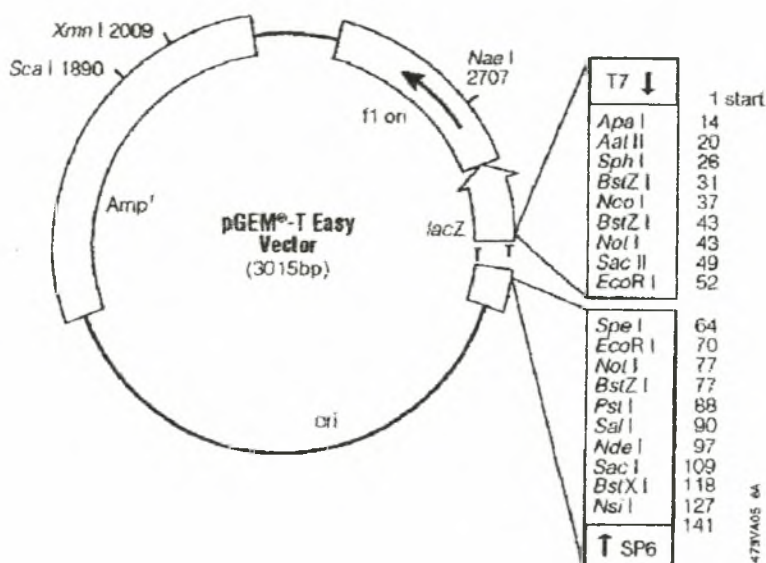
- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος 25mM παγωμένου CaCl<sub>2</sub>.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 5 ml διαλύματος 75 mM CaCl<sub>2</sub> και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιασπείρονται σε 9,6 ml διαλύματος 0,1M CaCl<sub>2</sub>, το οποίο βρίσκεται στον πάγο.
- Η αποθήκευση των δεκτικών κυττάρων γίνεται στους -80°C με την προσθήκη 2,4 ml γλυκερόλης.

### 2.2.β. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το πλασμίδιο pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector. Τα χαρακτηριστικά αυτού του φορέα, που τον κάνουν επιθυμητό προς χρήση είναι τα εξής :

- Ο υψηλός αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο.
- Το γονίδιο amp<sup>r</sup> που του προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη.
- Οι προαγωγείς που αναγνωρίζονται από τις SP6 και T7 RNA πολυμεράσες βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής υποκλωνοποίησης.
- Φέρει τμήμα του γονιδίου lacZ' που κωδικοποιεί για τα πρώτα 146 αμινοξέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, το οποίο χρησιμοποιείται για την επιλογή τωναασυνδυασμένων κλώνων μέσω του μηχανισμού της α-συμπληρωματικότητας.
- Φέρει στα άκρα πολύT, ώστε να διευκολύνεται η σύνδεση με κατάλληλα διαμορφωμένα προϊόντα της αντίδρασης της PCR.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων RT-PCR των γονιδίων που κωδικοποιούν τη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων στη ρόκα υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα φαίνεται στην εικόνα 15.



εικόνα 15. ο φορέας pGem

➤ Αντιβιοτικά

Αμπικιλίνη : Μητρικό διάλυμα : 100 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Τελική συγκέντρωση : 100 μg/ml θρεπτικού διαλύματος.

2.2.γ. Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης (Ligation)

Στηρίζεται στην ικανότητα της λιγάσης να καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού με κατανάλωση ενέργειας. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η T-4 λιγάση (Promega) που έχει απομονωθεί από ανασυνδυασμένο *E.coli*.

Η αντίδραση της DNA λιγάσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl και περιέχει τα παρακάτω συστατικά (Promega, pGem kit):

- 2X ρυθμιστικό διάλυμα 5 μl
- T4 DNA λιγάση (1 unit/ μl) 1 μl
- pGEM T-Easy φορέα 0,5 μl
- Ένθετο DNA 1 μl
- ddH<sub>2</sub>O 2,5 μl

Προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία άκρων φορέα προς ένθετο DNA θα πρέπει να είναι 1:3. Το δείγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 25°C ή στους 4°C για 14-16 ώρες.

#### 2.2.δ. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων E.coli (Transformation)

Τα δεκτικά κύτταρα που βρίσκονται στο υποτονικό διάλυμα CaCl<sub>2</sub>, είναι σε μορφή σφαιροπλαστών, καθώς νερό διέρχεται από τον εξωκυττάριο χώρο προς αυτά. Με την προσθήκη DNA, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου, που είναι ανθεκτικό στη δράση DNAσών. Το σύμπλοκο αυτό προσκολλάται στην επιφάνεια των σφαιροπλαστών. Με σύντομη έκθεση των κυττάρων στους 42 ° C, τα βακτηριακά τοιχώματα γίνονται παροδικά διαπερατά και προσλαμβάνουν το σύμπλοκο. Μετά από επώαση των κυττάρων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα επανακάμπουν και αναπτύσσουν την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό που τους προσδίδει το νεοεισαχθέν πλασμίδιο. Η διαδικασίες που ακολουθούνται έχουν ως εξής :

- Σε σωλήνα erpendorf τοποθετημένου σε πάγο, που περιέχει 80 μl δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a τα οποία μόλις έχουν ξεπαγώσει, μεταφέρονται 2 μl πλασμιδίου.
- Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά.
- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση 42 ° C για 45 δευτερόλεπτα, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου και τοποθετούμε στον πάγο για 2 λεπτά.
- Προστίθενται 200 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται για επώαση στους 37°C για 40-50 λεπτά.
- Τα κύτταρα στρωματώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- Μετά, γίνεται επώαση των τρυβλίων για όλο το βράδυ στους 37°C.
- Η φύλαξη των τρυβλίων γίνεται στο ψυγείο στους 4°C.

Στην περίπτωση που πρέπει να επιλέξουμε τις αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προσθέτουμε στα κύτταρα – πριν αυτά απλωθούν στο τρυβλίο – 10 μl 100mM IPTG και 50 μl 2% X-Gal. Οι αποικίες που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται μπλε, λόγω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης. Αντίθετα, οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται λευκές.

- LB : Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος προστίθενται : 10 g Casein, 5 gr yeast extract, 5 gr NaCl. Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου τρυβλίων προστίθενται στα παραπάνω 15 gr άγαρ. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C.
- 100 mM IPTG : 0,238 gr IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 10 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα 2% X-Gal : 0,02 g X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιου. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

#### 2.2.ε. Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι πέψεις δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιούνται σε όγκους που κυμαίνονται από 20 μl έως 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα του DNA που υποβάλλεται σε πέψη.

- Σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου, Rνάση A αν το δείγμα περιέχει RNA και, τέλος, dH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μια τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 20 μl περιλαμβάνει :
  - Δείγμα DNA 5 μl
  - 10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 2 μl
  - Rνάση A (2,5 mg/ml) 0,5 μl
  - dH<sub>2</sub>O 11,5 μl
- Προστίθεται 1 μl ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA.
- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3 με 4 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία.
- Μετά το πέρας της διαδικασίας τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

#### 2.2.στ. Μέθοδος του βρασμού (Boiling method, Holmes and Quigley 1981)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιούνταν κατά κόρον από τους ερευνητές πριν την αυτοματοποιημένη μέθοδο απομόνωσης πλασμιδίου με kit. Οδηγεί στην απομόνωση πλασμιδίου που όμως περιέχει και ποσότητα RNA, καθώς διέρχεται και αυτό από τους πόρου που δημιουργεί η λυσοζύμη στο βακτηριακό τοίχωμα. Για το λόγο αυτό

απαιτείται η κατεργασία του απομονωμένου πλασμιδίου με RNase. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδίου από μεγάλο αριθμό διαφορετικών κλώνων από το μετασχηματισμό, έτσι ώστε μετά από την πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού να βρεθεί ο επιθυμητός κλώνος. Στηρίζεται στην ικανότητα της λυσοζύμης να διασπά τον β-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό του βακτηριακού τοιχώματος και να δημιουργεί μικρούς πόρους από τους οποίους μπορεί και διέρχεται το πλασμίδιο, όχι όμως το χρωμοσωμικό DNA. Η διαδικασία έχει ως εξής :

- 5 ml υγρής καλλιέργειας LB, που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων E.coli. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για 12-16 ώρες.
- Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1,5 ml σε σωλήνα eppendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό.
- Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται όσο το δυνατόν περισσότερο, γιατί το ίζημα πρέπει να παραμείνει όσο το δυνατόν στεγνό.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl STET και προστίθενται 2 μl λυσοζύμη (50 mg/ml).
- Στη συνέχεια, γίνεται επώαση στους 100°C για 45sec και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 λεπτά.
- Το ίζημα απομακρύνεται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα, καθώς αποτελείται από βακτηριακά υπολείμματα.
- Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται 180 μl ισοπροπανόλης, ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 7 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 70 % v/v αιθανόλη.
- Αφού στεγνώσει το ίζημα, επαναδιαλύεται σε 30 μl ddH<sub>2</sub>O.

➤ διάλυμα STET : 8% sucrose, 5% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA

➤ Λυσοζύμη : 50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

### 2.2.ζ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA - Πρωτόκολλο Miniprep (Qiagen)

- Μετά από φυγοκέντρηση 1,5 ml υγρής καλλιέργειας, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα P1 που περιέχει Rnάση A.

- Προστίθενται 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα P2 και γίνεται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (ependorf).
- Προστίθενται επιπλέον 350 μl ρυθμιστικό διάλυμα N3 και αμέσως αναποδογυρίζεται το ependorf 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λευκό ίζημα.
- Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε μια στήλη Qiaprep.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60 sec και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο.
- Η στήλη ξεπλένεται με 0,75 ml ρυθμιστικό διάλυμα PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60 sec.
- Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξεπλύματος. Εάν παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα PE ίσως παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Η στήλη Qiaprep τοποθετείται σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 ml. Προκειμένου να ληφθεί το DNA, προστίθεται διάλυμα 50 μl EB (10mM Tris-HCl, pH=8,5) ή νερό. Το διάλυμα έκλουσης αφήνεται για 1 λεπτό και, τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε και λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης (sequencing) των δειγμάτων του πλασμιδιακού DNA μας κάνουν γνωστή την αλληλουχία των βάσεων του τμήματος που ενισχύσαμε με την PCR.

#### 2.2.η. Διατήρηση κλώνων που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια

- Μέθοδος των παράλληλων γραμμών (stricking) : Πυρακτωμένος μικροβιολογικός κρίκος εμβαπτίζεται σε υγρή καλλιέργεια και ακολουθούν διαδοχικά περάσματα σε τριβλίο με κατάλληλο αντιβιοτικό, έτσι ώστε να καταλήξουμε σε μοναδιαίες αποικίες. Τα τριβλία μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων διαηρούνται στους 4<sup>0</sup> C για χρονικό διάστημα 15-20 ημερών, μετά το οποίο οι καλλιέργειες πρέπει να ανανεώνονται.
- Stock γλυκερόλης : Η γλυκερόλη έχει την ιδιότητα να μπορεί να βοηθά τα κύτταρα να διατηρούν την ακεραιότητα των μεμβρανών τους κάτω από συνθήκες εξαιρετικά χαμηλής θερμοκρασίας. Σε 900 μl «φρέσκιας» βακτηριακής



καλλιέργειας προστίθενται 180 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε vortex και τα stock διατηρούνται σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  για διάστημα 6 μηνών, μετά το οποίο πρέπει να ανανεώνονται.

### 2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, Πραγματικού Χρόνου (Real time PCR)

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ήταν :

- **UBQ.RTF/UBQ.RTR**  
5'-CCG ACA CCA TTG ACA ACG-3'/ 5'-TCC AGC GAA GAT GAG ACG-3'
- **MAM1.RTF/MAM1.RTR**  
5'-ACT CCA CCG CAG AAG ATT G-3'/ 5'-CCT CAT CCA CCT CGT TTC C-3'
- **CYP79B2.RTF/CYP79B2.RTR**  
5'-CTA TGT TTG AAG CAT TAG GGT TTA CG-3'/5'-ACT TGT CCA TAA TCG CAC TAG AAT C-3'
- **RtCYP79B3.F/RtCYP79B3.R**  
5'-CAA GAA GAT GAG GAA AGT GAT TAT GAC-3'/ 5'-TGT AAA GCC AAG CGG TTA GAT G-3'
- **RtCYP79F1.F/RtCYP79F1.R**  
5'-AAG AGG AGA GGG TGA GAG-3'/5'-CGT ATC AAT CCA ATC TTC AAC-3'

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Mx3005P (Stratagene). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και καταγράφονταν για 45 κύκλους. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθούσε η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης, βάση της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδραση.

Σε όλες τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάζονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Roche Applied Science), ενώ στην τελική αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς ROX.

Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξάχθηκαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάζονταν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα των εκκινητών (efficiency) της κάθε αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού.

### Στατιστική Επεξεργασία

Για κάθε μία από τις βιολογικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις και ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο των Livak και Schmittgen (2001).

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες

Από φύλλα φυτών ρόκας, τα οποία είχαν αναπτυχθεί υπό την παρουσία διαφορετικών επιπέδων λίπανσης αζώτου και θείου, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2, απομονώθηκε ολικό RNA και δημιουργήθηκε το αντίστοιχο cDNA.

	επίπεδο N	επίπεδο S
1 <sup>η</sup> μεταχείριση	χαμηλό (50)	υψηλό (150)
2 <sup>η</sup> μεταχείριση	υψηλό (250)	χαμηλό (10)
3 <sup>η</sup> μεταχείριση	υψηλό (250)	υψηλό (150)

Πίνακας 2. Οι διαφορές μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων στα επίπεδα της λίπανσης σε άζωτο (N) και θείο (S)

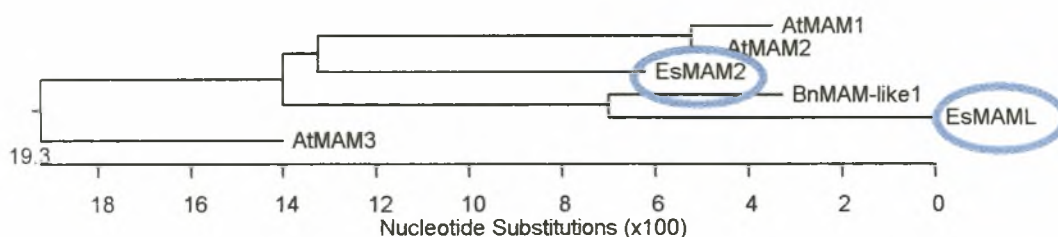
Για την ενίσχυση cDNA τμημάτων τα οποία να κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές με ομοπαράθεση των χαρακτηρισμένων αντίστοιχων γονιδίων από τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa* και *Brassica napus*. Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων αυτών τμημάτων cDNA έδειξε ομολογία με τα γονίδια-στόχους της αντίδρασης ενίσχυσης και συγκεκριμένα με τα γονίδια *MAM2*, *MAM3* (*MAML*), *CYP79F1*, *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP83A1* και *CYP83B1*. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από τα φύλλα ρόκας και συμμετέχουν στη βιοσυνθετική πορεία των γλυκοσινολικών παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα.

Τα ένζυμα *MAM1*, *MAM3*, *CYP79F1* και *CYP83A1* συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αλειφατικών γλυκοσινολικών ενώ τα άλλα δύο, *CYP79B2* και *CYP79B3* συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ινδολικών γλυκοσινολικών. Το *CYP83B1* συμμετέχει στη βιοσύνθεση των ινδολικών αλλά και των αρωματικών γλυκοσινολικών οξέων.

## 1.1 Ομολογίες αλληλουχιών με αντίστοιχα γνωστά γονίδια άλλων φυτών

### 1.1 α. Γονίδια MAM

Στο *Arabidopsis thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί 3 MAM γονίδια (*MAM1*, *MAM2* και *MAM3* ή *MAML*), των οποίων ο ρόλος στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων έχει αναγνωριστεί, όπως προαναφέρθηκε. Όσον αφορά στην *Eruca sativa*, οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνεται να έχουν σχέση με τα αντίστοιχα *MAM2* και *MAM3* (*MAML*) γονίδια του *Arabidopsis thaliana*. Σύμφωνα και με το παρακάτω Σχήμα 1, οι αλληλουχίες τους έχουν σε μεγάλο βαθμό ομολογία με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των φυτών *Arabidopsis thaliana* και *Brassica napus*. Τα ακριβή ποσοστά της ομολογίας μεταξύ των γονιδίων φαίνονται στο Σχήμα 2.



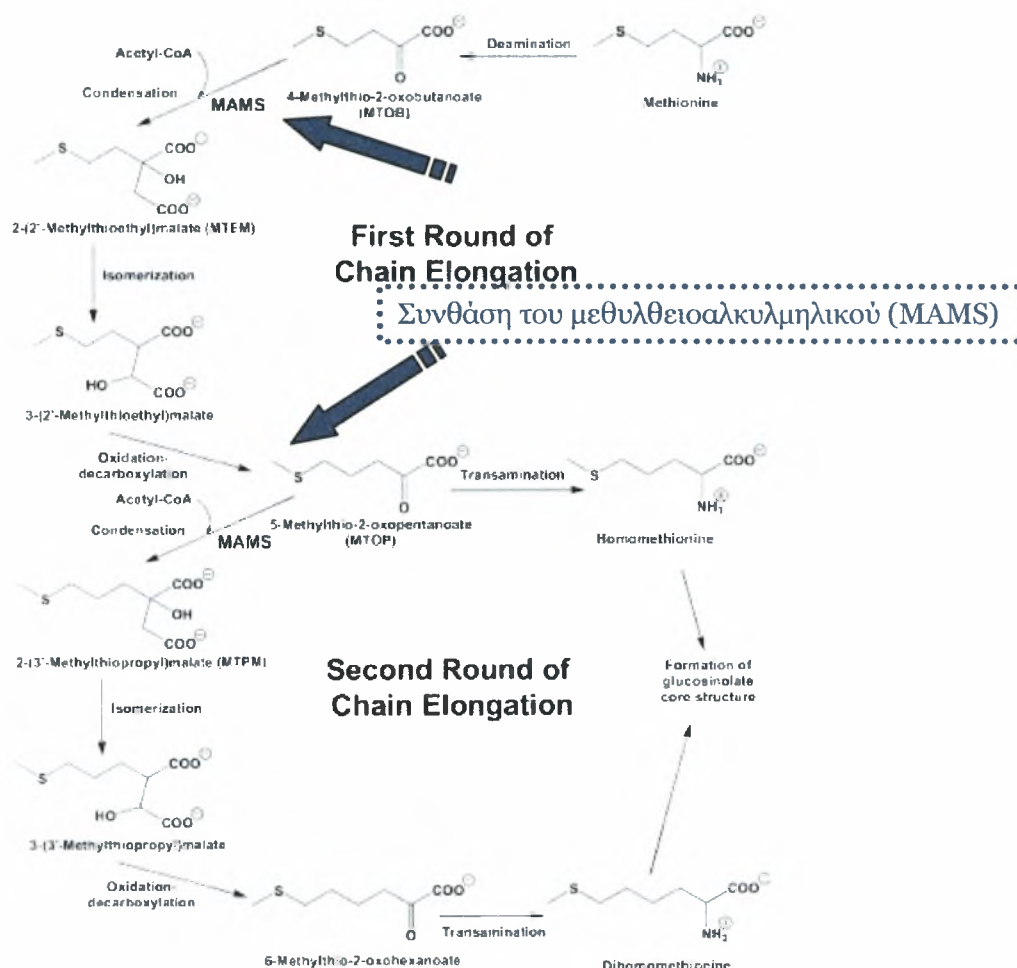
Σχήμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση που δείχνει τις σχέσεις ομολογίας των MAM αλληλουχιών που απομονώθηκαν από τα φύλλα των φυτών της ρόκας (*EsMAM2*, *EsMAML*) με τα MAM γονίδια του *Arabidopsis thaliana* (*AtMAM1*, *AtMAM2*, *AtMAM3*) και του *Brassica napus* (*BnMAM-like1*)

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6		
1	█	97.8	82.6	81.4	78.9	84.5	1	<i>AtMAM1.seq</i>
2	2.3	█	82.3	81.9	80.2	86.5	2	<i>AtMAM2.seq</i>
3	20.0	20.3	█	80.7	80.0	83.6	3	<i>AtMAM3.seq</i>
4	21.5	20.8	22.3	█	90.1	84.9	4	<i>BnMAM-like1.seq</i>
5	24.9	23.2	23.4	10.7	█	80.5	5	<i>EsMAML.seq</i>
6	17.6	14.9	18.6	17.0	22.9	█	6	<i>EsMAM2.seq</i>
	1	2	3	4	5	6		

Σχήμα 2. Απεικόνιση του ποσοστού της ομολογίας μεταξύ των MAM αλληλουχιών που απομονώθηκαν από τα φύλλα των φυτών της ρόκας (*EsMAM2*, *EsMAML*), των MAM γονιδίων του *Arabidopsis thaliana* (*AtMAM1*, *AtMAM2*, *AtMAM3*) και του *Brassica napus* (*BnMAM-like1*)

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά και από δικές μας παρατηρήσεις (Ομήρου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), στη ρόκα τα πλέον σύνηθη και σε μεγαλύτερη ποσότητα παραγόμενα γλυκοσινολικά, είναι τα αλειφατικά με πρόδρομο μόριο την ομομεθειονίνη. Αυτό σημαίνει ότι συμβαίνουν δύο κύκλοι επιμήκυνσης του βασικού σκελετού της μεθειονίνης (Εικόνα 16)



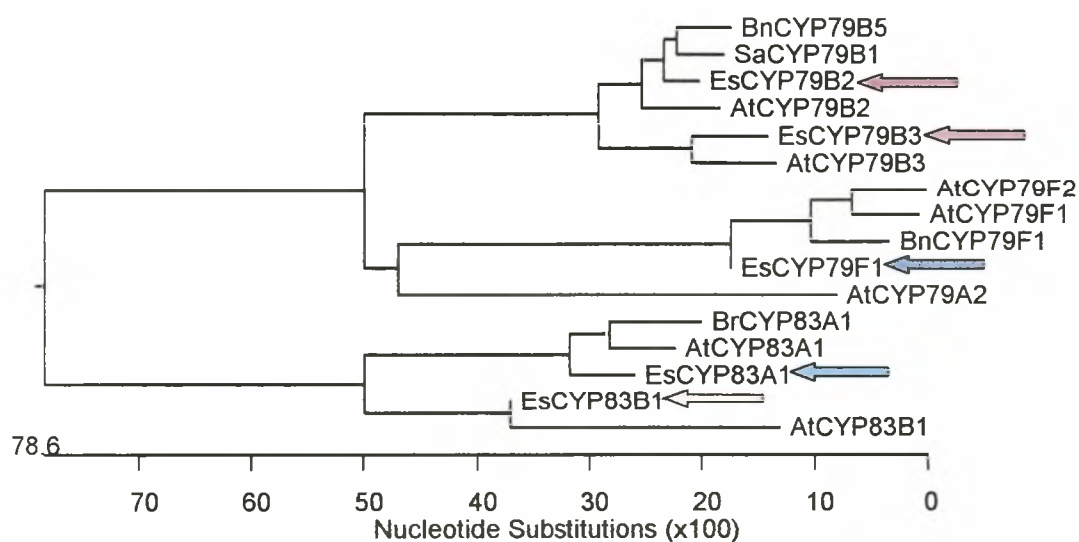
Εικόνα 16. Οι δύο κύκλοι επιμήκυνσης του βασικού σκελετού της μεθειονίνης.

Όπως βλέπουμε και στην παραπάνω εικόνα, στον πρώτο κύκλο η μεθειονίνη μετά από μία σειρά αντιδράσεων απαμίνωσης, συμπύκνωσης, ισομερισμού και οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης μετατρέπεται σε 5-μεθυλθειο-οξοπεντανοϊκό και είτε καταλήγει σε ομομεθειονίνη μετά από αντίδραση τρανσαμίνωσης, είτε εισέρχεται σε δεύτερο κύκλο επιμήκυνσης και μετά από μια σειρά αντιδράσεων όπως αυτές που προαναφέρθηκαν καταλήγει σε διομομεθειονίνη.

### 1.1.β. Γονίδια CYP

Οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν και αφορούν τα CYP γονίδια φαίνεται να έχουν σχέση με τα γονίδια *CYP79F1*, *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP83A1* και *CYP83B1* του *Arabidopsis thaliana*, *CYP79F1* και *CYP79B5* του *Brassica napus*, και το *CYP83A1* του *Brassica rapa*.

Σύμφωνα και με το παρακάτω Σχήμα 3, οι αλληλουχίες τους έχουν σε μεγάλο βαθμό ομολογία με τις αντίστοιχες αλλά και με άλλες σχετικές αλληλουχίες των φυτών *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Brassica rapa* και *Sinapis alba*. Τα ακριβή ποσοστά της ομολογίας μεταξύ των γονιδίων φαίνονται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 3. Διαγραμματική απεικόνιση που δείχνει τις σχέσεις ομολογίας των CYP αλληλουχιών που απομονώθηκαν από τα φύλλα των φυτών της ρόκας (*EsCYP79B2*, *EsCYP79B3*, *EsCYP79F1*, *EsCYP83A1*, *EsCYP83B1*) με τα CYP γονίδια του *Arabidopsis thaliana* (*AtCYP79B2*, *AtCYP79B3*, *AtCYP79F1*, *AtCYP79F2*, *AtCYP79A2*, *AtCYP83A1*, *CYP83B1*), του *Brassica napus* (*BnCYP79B5*, *BnCYP79F1*) του *Brassica rapa* (*BrCYP83A1*) και του *Sinapis alba* (*SaCYP79B1*).

## Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1	█	51.2	41.5	40.1	79.2	57.5	43.5	49.7	92.3	40.4	40.9	48.8	75.8	86.1	54.2	49.9	1	BnCYP79B5.seq
2	80.0	█	38.8	37.3	51.9	93.9	41.7	45.0	52.0	39.7	39.8	83.7	52.7	52.1	50.9	85.8	2	BnCYP79F1.seq
3	115.8	131.8	█	30.8	40.2	41.3	85.0	67.6	41.0	65.4	87.4	40.5	41.2	40.9	38.1	39.9	3	BrCYP83A1.seq
4	123.8	138.1	205.3	█	41.7	36.5	32.5	33.8	39.6	33.3	33.3	35.4	40.1	39.9	34.6	35.7	4	EsCYP79B2.seq
5	24.6	78.7	121.4	113.9	█	53.2	41.0	39.1	79.4	39.3	41.8	52.8	87.5	78.6	49.5	52.6	5	EsCYP79B3.seq
6	63.8	6.3	116.9	146.4	74.6	█	40.8	44.5	58.8	41.8	43.6	85.5	59.4	58.4	56.3	86.1	6	EsCYP79F1.seq
7	108.0	117.7	17.0	176.3	117.6	120.3	█	69.3	42.9	67.3	86.2	41.5	44.1	42.9	39.4	40.7	7	EsCYP83A1.seq
8	84.2	99.5	42.6	172.5	125.5	101.5	40.1	█	49.2	90.3	67.6	46.0	48.4	49.3	43.1	44.4	8	EsCYP83B1.seq
9	8.1	77.7	118.0	127.4	24.3	60.6	109.8	85.5	█	40.4	40.0	49.1	76.2	87.4	54.3	50.6	9	SaCYP79B1.seq
10	121.2	123.6	46.7	180.8	126.7	113.0	43.5	10.4	120.7	█	60.8	38.7	41.0	40.7	39.3	38.7	10	AtCYP83B1.seq
11	117.0	125.2	13.9	168.5	113.2	106.5	15.4	42.7	121.3	55.7	█	40.0	40.5	41.1	38.9	39.6	11	AtCYP83A1.seq
12	87.2	18.5	122.3	154.4	75.7	16.2	117.4	95.9	86.2	129.2	123.3	█	49.5	49.8	51.5	88.4	12	AtCYP79F2.seq
13	29.4	76.0	116.2	126.8	13.8	59.2	104.2	88.9	28.7	116.9	118.3	84.9	█	76.9	54.5	49.9	13	AtCYP79B3.seq
14	15.5	77.5	118.8	126.3	25.3	61.8	110.0	85.1	13.8	119.2	115.8	84.3	27.7	█	54.3	49.6	14	AtCYP79B2.seq
15	71.0	81.8	133.5	171.0	85.4	67.7	132.0	109.7	70.8	126.4	129.0	79.5	70.5	71.0	█	51.9	15	AtCYP79A2.seq
16	83.7	15.9	124.8	152.5	76.8	15.5	121.1	102.2	81.4	128.6	124.1	12.7	84.4	84.5	78.4	█	16	AtCYP79F1cdna.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

Σχήμα 4. Απεικόνιση του ποσοστού της ομολογίας μεταξύ των CYP αλληλουχιών που απομονώθηκαν από τα φύλλα των φυτών της ρόκας (*EsCYP79B2*, *EsCYP79B3*, *EsCYP79F1*, *EsCYP83A1*, *EsCYP83B1*) των CYP γονιδίων του *Arabidopsis thaliana* (*AtCYP79B2*, *AtCYP79B3*, *AtCYP79F1*, *AtCYP79F2*, *AtCYP79A2*, *AtCYP83A1*, *CYP83B1*), του *Brassica napus* (*BnCYP79B5*, *BnCYP79F1*) του *Brassica rapa* (*BrCYP83A1*) και του *Sinapis alba* (*SaCYP79B1*).

Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της βασικής δομής των γλυκοσινολικών οξέων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αναμένεται το *EsCYP79F1* να μετατρέπει κυρίως παράγωγα μεθειονίνης μικρής αλυσίδας στις αντίστοιχες αλδοξίμες ενώ τα *EsCYP79B2* και *EsCYP79B3* μετατρέπουν την τρυπτοφάνη σε ινδολο-3-ακεταλδοξίμη (Mikkelsen et al., 2000; Hull et al., 2000). Στο επόμενο βιοσυνθετικό βήμα της κεντρικής δομής της γλυκόνης, τα *EsCYP83A1* και *EsCYP83B1* πραγματοποιούν την οξείδωση της αλειφατικής ή αρωματικής αλδοξίμης, αντιστοίχως, σε οξο-νιτρο ενώσεις.

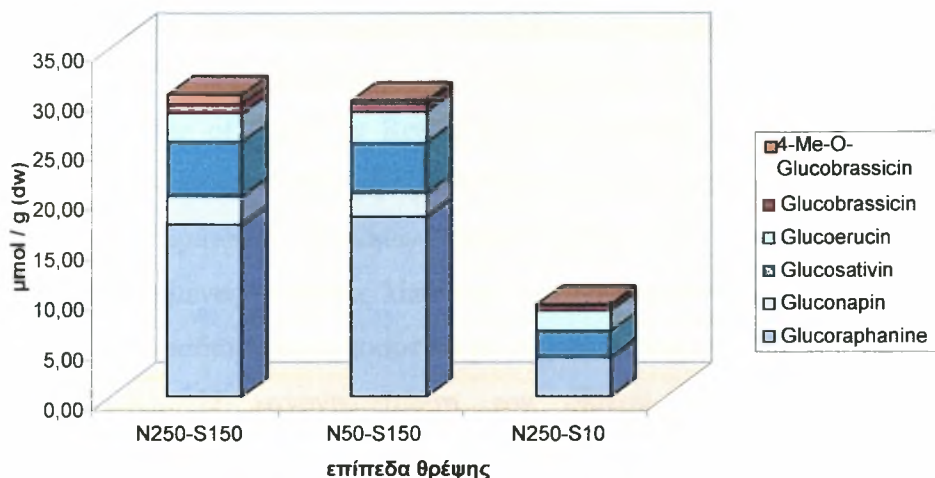
Η απομόνωση αυτών των βιοσυνθετικών γονιδίων αποτελεί την πρώτη προσπάθεια χαρακτηρισμού του βιοσυνθετικού μονοπατιού γλυκοσινολικών στη ρόκα. Ωστόσο μένει να διαπιστωθεί με περαιτέρω έρευνα ποια είναι η ακριβής λειτουργία των συγκεκριμένων γονιδίων και αν όντως παίζουν τον ίδιο ρόλο στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων με τα ομόλογα χαρακτηρισμένα γονίδια από άλλα φυτά.

## 2. Επίδραση της λίπανσης αζώτου και θείου στην έκφραση των γονιδίων της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων στη ρόκα

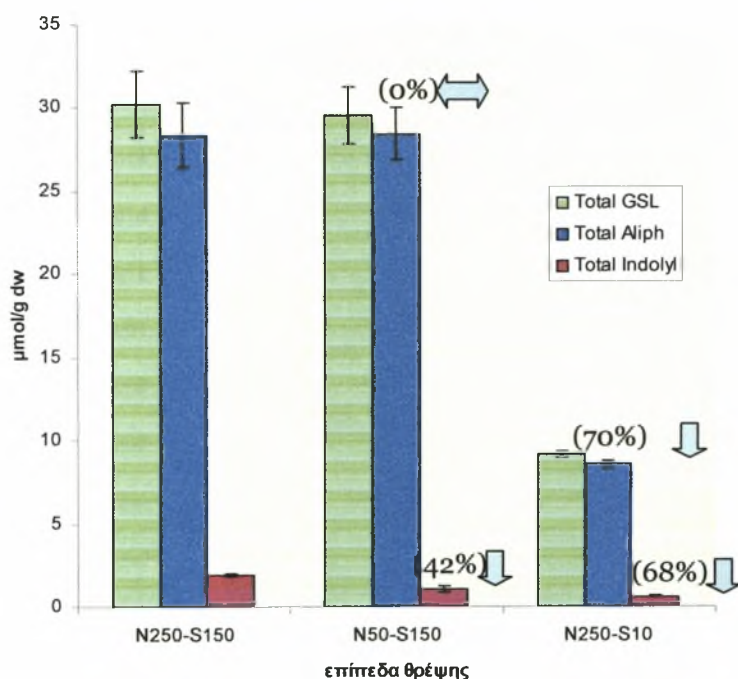
Η χορήγηση αζώτου και θείου είναι αναμενόμενο να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων στα φύλλα της ρόκας. Το γεγονός αυτό συνδέεται με τη χημική σύσταση των δύο αυτών θρεπτικών στοιχείων στους τελικούς μεταβολίτες που είναι οι διάφοροι τύποι των γλυκοσινολικών οξέων.

Στα παρακάτω σχήματα 5 και 6 παρουσιάζεται η επίδραση των επιπέδων λίπανσης σε άζωτο και θείο στη συγκέντρωση των τελικών μεταβολιτών στα φύλλα της ρόκας. Από τα ίδια φυτά ρόκας από τα οποία απομονώθηκε ολικό RNA, έγινε απομόνωση και προσδιορισμός των γλυκοσινολικών (Ομήρου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση των αλειφατικών και των ινδολικών γλυκοσινολικών. Είναι φανερό πως το θείο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη σύνθεση των γλυκοσινολικών που μελετήθηκαν, καθώς η συγκέντρωσή τους υπό συνθήκες μειωμένης χορήγησης θείου μειώνεται δραματικά σε σχέση με τη συγκέντρωση υπό συνθήκες πλήρους χορήγησης. Αυτό ισχύει τόσο για το σύνολο των αλειφατικών γλυκοσινολικών όσο και για το σύνολο των ινδολικών γλυκοσινολικών, η συγκέντρωση των οποίων μειώνεται περίπου 70% σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους σε φυτά που έχουν δεχθεί πλήρη λίπανση θείου. Αντιθέτως, η μείωση του επιπέδου λίπανσης του αζώτου δε φαίνεται να επηρεάζει τη συγκέντρωση των αλειφατικών γλυκοσινολικών ενώ οδηγεί σε μια μείωση της συγκέντρωσης των ινδολικών κατά 42% σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους σε φυτά που έχουν δεχθεί πλήρη λίπανση αζώτου.





Σχήμα 5 . Συγκέντρωση έξι διαφορετικών αλειφατικών και ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων (4-Me-O-Glucobrassicin, Glucobrassicin, Glucoerucin, Glucosativin, Gluconapin, Glucoraphanine) στα φύλλα φυτών ρόκας σε τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ως προς τη θρέψη σε άζωτο και θείο –πλήρες θρεπτικό διάλυμα (N250-S150)-μειωμένη χορήγηση αζώτου (N50-S150)-μειωμένη χορήγηση θείου (N250-S10). (Ομήρου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα)

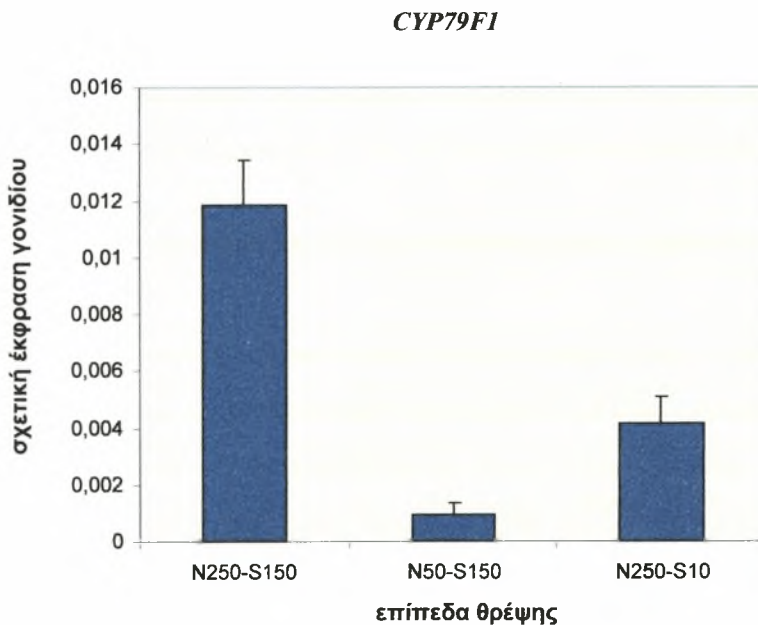


Σχήμα 6. Συγκέντρωση των ολικών, των αλειφατικών και των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων στα φύλλα φυτών ρόκας σε τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ως προς τη θρέψη σε άζωτο και θείο –πλήρες θρεπτικό διάλυμα (N250-S150)-μειωμένη χορήγηση αζώτου (N50-S150)-μειωμένη χορήγηση θείου (N250-S10). Σημειώνεται επίσης το ποσοστό της μείωσης της συγκέντρωσης στις δύο τελευταίες μεταχειρίσεις ως προς τη συγκέντρωση υπό πλήρη λίπανση (Ομήρου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα)

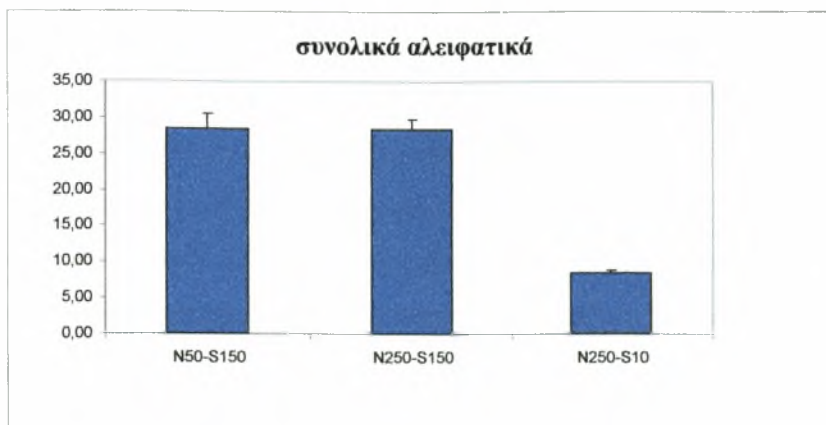
## 2.1. Επίδραση της λίπανσης αζώτου και θείου στην έκφραση του γονιδίου *CYP79F1*

Μετά την *in silico* διερεύνηση των γονιδίων με τον αλγόριθμο BLAST του TIGR (The Institute of Genomic Research) στις διεθνείς γονιδιακές βάσεις δεδομένων, ακολούθησε εκ νέου επιλογή εξειδικευμένων εκκινητών για τη μελέτη της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων φυτών ρόκας που είχαν αναπτυχθεί υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες λίπανσης. Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων των 5 γονιδίων προσδιορίστηκε ποσοτικά με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR). Η κανονικοποίηση του ολικού RNA για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη εφαρμογή της μεθόδου PCR για το γονίδιο σταθερής έκφρασης της ουβικουΐτινης του φυτού *Arabidopsis thaliana*.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η έκφραση του γονιδίου *CYP79F1* μειώνεται όταν το άζωτο δεν παρέχεται στα φυτά επαρκώς (Σχήμα 7). Παρόλα αυτά όμως αυτό δεν φαίνεται στη συγκέντρωση των τελικών προϊόντων του βιοσυνθετικού μονοπατιού των αλειφατικών γλυκοσινολικών. Στα φύλλα της ρόκας, όταν το άζωτο δεν είναι σε επάρκεια αλλά το θείο είναι διαθέσιμο, η συγκέντρωση των αλειφατικών γλυκοσινολικών παραμένει σταθερή (Σχήμα 8).



Σχήμα 7. Σχετική έκφραση του γονιδίου *CYP79F1* ως προς την ουβικουΐτινη, σε τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ως προς τη θρέψη σε άζωτο και θείο –πλήρες θρεπτικό διάλυμα (N250-S150)-μειωμένη χορήγηση αζώτου (N50-S150)-μειωμένη χορήγηση θείου (N250-S10).



Σχήμα 8. Συγκέντρωση ολικών αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων σε τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ως προς τη θρέψη σε άζωτο και θείο –πλήρες θρεπτικό διάλυμα (N250-S150)-μειωμένη χορήγηση αζώτου (N50-S150)-μειωμένη χορήγηση θείου (N250-S10). (Ομήρου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα)

Παρατηρούμε ότι σε συνθήκες έλλειψης αζώτου και επάρκειας θείου, το *CYP79F1* δεν αποτελεί το περιοριστικό βήμα στη βιοσύνθεσης των αλειφατικών γλυκοσινολικών με αποτέλεσμα να προσδιορίζονται υψηλές τιμές μεταβολιτών με πολύ μικρή έκφραση του γονιδίου.

Στην περίπτωση κατά την οποία τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θείου και επάρκειας αζώτου, η έκφραση του γονιδίου *CYP79F1* μειώνεται δραματικά (Σχήμα 7) και αυτή η μείωση αντικατοπτρίζεται και στη συγκέντρωση των αλειφατικών γλυκοσινολικών όταν το άζωτο βρίσκεται σε επάρκεια (Σχήμα 8).

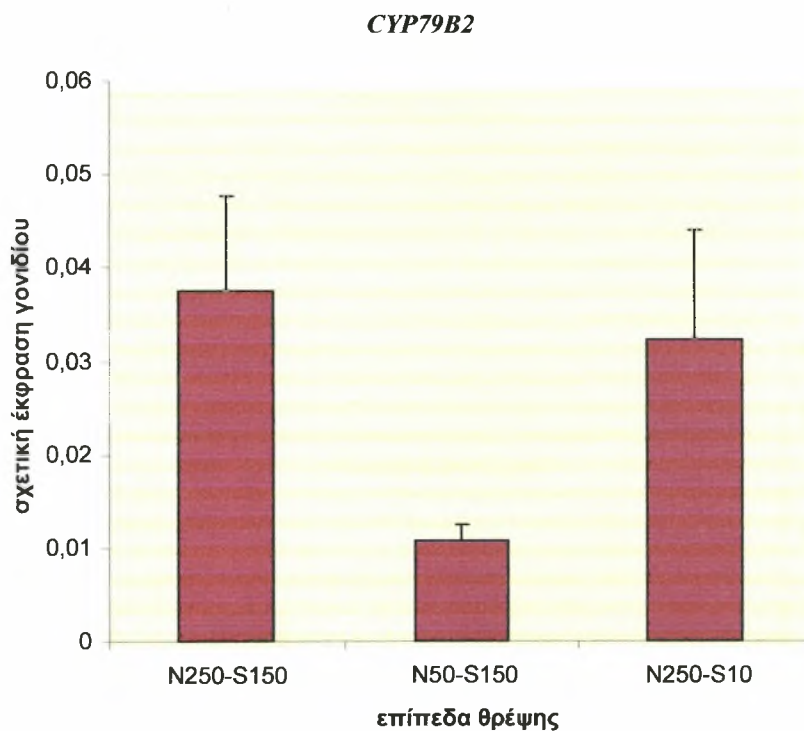
## 2.2. Επίδραση της λίπανσης αζώτου και θείου στην έκφραση των γονιδίων *CYP79B2* και *CYP79B3*

Τα δύο αυτά γονίδια συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ινδολικών γλυκοσινολικών. Σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία το ένζυμο *CYP79B3* συμμετέχει στη βιοσύνθεση και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως οι καμαλεξίνες . Από τα δεδομένα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι, το γονίδιο *CYP79B2* είναι αυτό που ενεργοποιεί ουσιαστικά το ενζυμικό σύμπλοκο, *CYP79B2/CYP79B3* για τη βιοσύνθεση των ινδολικών γλυκοσινολικών

Αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας του αζώτου, όταν η ποσότητα του θείου είναι σε επάρκεια, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της έκφρασης και των δύο γονιδίων (Σχήμα 9 και 10) και αυτό ανταποκρίνεται στις συγκεντρώσεις των τελικών μεταβολιτών δηλαδή των ινδολικών γλυκοσινολικών (Σχήμα 11) . Αντίθετα, όταν η

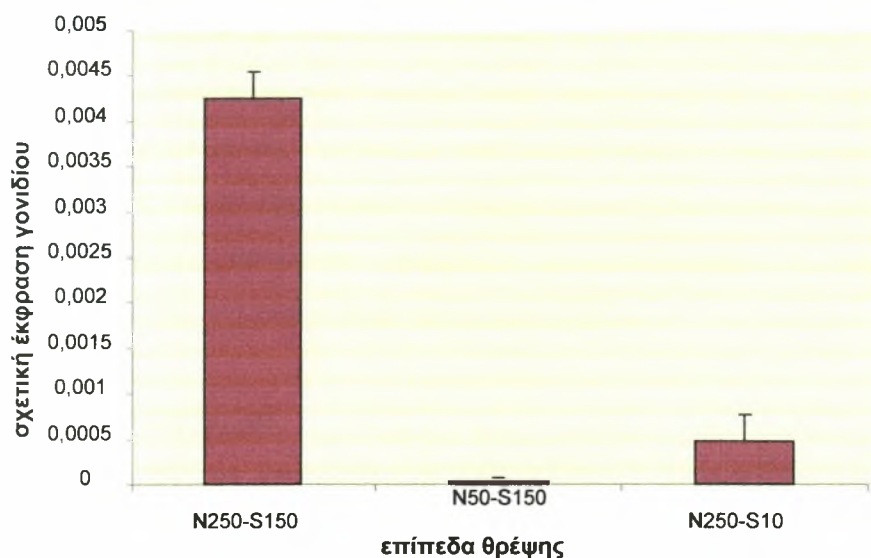
ποσότητα του χορηγούμενου θείου, ήταν χαμηλή τότε η έκφραση των γονιδίων αυτών μειώθηκε αν και η έκφραση του γονιδίου *CYP79B2* ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του γονιδίου *CYP79B3*. Η μείωση αυτή αποτυπώνεται και στη συγκέντρωση των ινδολικών γλυκοσινολικών στα φύλλα της ρόκας.

Υπό συνθήκες μειωμένης χορήγησης αζώτου η έκφραση και των δύο γονιδίων μειώνεται δραματικά και μάλιστα φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από την έλλειψη αζώτου και λιγότερο από την έλλειψη θείου. Όσον αφορά τη συγκέντρωση των παραγόμενων ινδολικών γλυκοσινολικών, η μείωση αυτή αποτυπώνεται εν μέρει στη συγκέντρωσή τους.

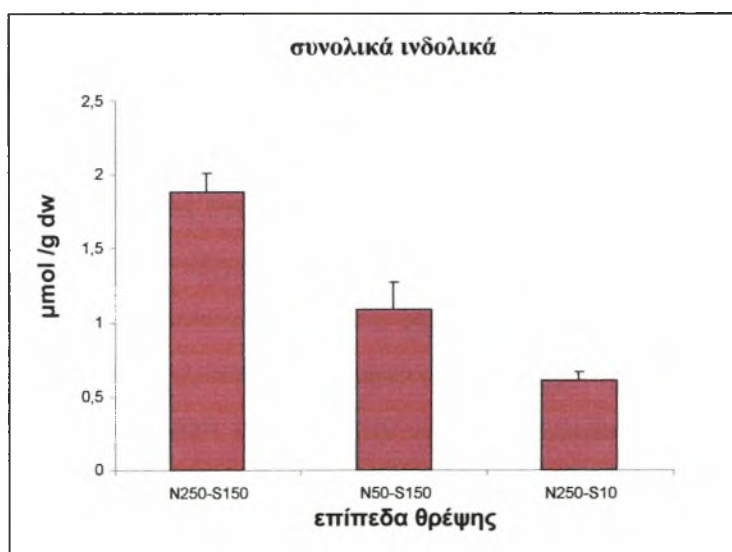


Σχήμα 9. Σχετική έκφραση του γονιδίου *CYP79B2* ως προς την ουβικουΐτινη, σε τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ως προς τη θρέψη σε άζωτο και θείο –πλήρες θρεπτικό διάλυμα (N250-S150)-μειωμένη χορήγηση αζώτου (N50-S150)-μειωμένη χορήγηση θείου (N250-S10).

### CYP79B3



Σχήμα 10. Σχετική έκφραση του γονιδίου CYP79B3 ως προς την ουβικουΐνη, σε τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ως προς τη θρέψη σε άζωτο και θείο –πλήρες θρεπτικό διάλυμα (N250-S150)-μειωμένη χορήγηση αζώτου (N50-S150)-μειωμένη χορήγηση θείου (N250-S10).



Σχήμα 11. Συγκέντρωση ολικών ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων σε τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ως προς τη θρέψη σε άζωτο και θείο –πλήρες θρεπτικό διάλυμα (N250-S150)-μειωμένη χορήγηση αζώτου (N50-S150)-μειωμένη χορήγηση θείου (N250-S10). (Ομήρου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα)

### 2.3. Επίδραση της λίπανσης αζώτου και θείου στην έκφραση των MAM γονιδίων

Τα γονίδια που εκφράζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων MAMs φαίνεται ότι επηρεάζονται και αυτά από την επίδραση τόσο του αζώτου όσο και του θείου. Παρόλα αυτά όμως η παραλλακτικότητα στις βιολογικές επαναλήψεις της παρούσας εργασίας είναι πάρα πολύ υψηλή. Αυτό υποδηλώνει ότι τα γονίδια αυτά είναι πάρα πολύ ευαίσθητα σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Σημειώνεται ότι οι ιστοί που λήφθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα είχαν δεχθεί μεγάλης διάρκειας καταπόνηση από έλλειψη θρεπτικών στοιχείων με αποτέλεσμα να παρατηρείται υψηλή παραλλακτικότητα στην έκφραση των γονιδίων.

### 2.4. Συγκεντρωτικά

Γενικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν παρατηρείται πλήρης συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων, που καθορίζουν σημεία κλειδιά στις βιοσυνθετικές πορείες παραγωγής με τις συγκεντρώσεις των διαφορετικών κατηγοριών γλυκοσινολικών οξέων που απομονώθηκαν και προσδιορίστηκαν στα φυτά ρόκας. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν προκύψει σε μια μελέτη όπου το επίπεδο των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν σε φυτά *Arabidopsis* σε συνθήκες έλλειψης θείου δεν συμφωνούσε με τα επίπεδα των μεταγραφημάτων (ως ποσοστά μεταβολής σε σχέση με τα φυτά ελέγχου). Μάλιστα, μεγάλη μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων συνέβαινε όχι μόνο ανάλογα με την έλλειψη ενός θρεπτικού στοιχείου αλλά και ανάλογα με τη χρονική διαφοροποίηση της έλλειψης αυτής. Αντιθέτως, τα επίπεδα των μεταβολιτών παρέμειναν σχετικά σταθερά. Αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι το φυτό αντιλαμβάνεται νωρίς την έλλειψη του θρεπτικού στοιχείου και αυτό οδηγεί σε μία άμεση ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τελικά μια εξισορρόπηση των μεταβολιτών, δηλαδή γρήγορα προκύπτει μια νέα ομοιόσταση. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να εξηγήσει και την παρατηρούμενη στην παρούσα μελέτη σταθερή συγκέντρωση αλειφατικών γλυκοσινολικών παρά τις συνθήκες έλλειψης αζώτου. Είναι ενδιαφέρον να προσδιορισθεί η ποσοτική έκφραση των CYP79F1 και η συγκέντρωση των ολικών αλειφατικών γλυκοσινολικών όταν τα φυτά ρόκας αναπτύσσονται για διαφορετικές χρονικές περιόδους καταπόνησης έλλειψης θρεπτικών στοιχείων.

### 3. Συμπεράσματα

- Η επάρκεια θείου και αζώτου επηρεάζουν σε μεταγραφικό επίπεδο την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης τόσο των αλειφατικών όσο και των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων.
- Η έλλειψη επάρκειας αζώτου έχει μεγαλύτερη επίδραση στη μεταγραφή των βιοσυνθετικών γονιδίων.
- Η επίδραση της λίπανσης στη μεταγραφή των βιοσυνθετικών γονιδίων μόνο μερικώς συμφωνεί με τα τελικά επίπεδα των μεταβολιτών καθώς τα αλειφατικά γλυκοσινολικά παραμένουν σε υψηλά επίπεδα παρά την έλλειψη επάρκειας αζώτου. Άρα ο έλεγχος της βιοσύνθεσης των αλειφατικών γλυκοσινολικών από τη χορήγηση αζώτου πραγματοποιείται σε άλλο στάδιο από το καθοριστικό στάδιο παραγωγής γλυκοσινολικών μέσω της βιοσύνθεσης αλδοζιμών.
- Τα γονίδια *MAM* που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνεται ότι είναι πολύ ευαίσθητα σε συνθήκες παρατεταμένης έλλειψης θρεπτικών στοιχείων και ως εκ τούτου απαιτούνται πειράματα μικρότερης διάρκειας και μεγαλύτερης ακρίβειας έτσι ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### Αλληλουχίες των cDNA κλώνων

- MAM genes

#### MAM1 :

AAACGCTCCGTGACGGCGAACAAATCTCCCGGTGCAGCACTTACTCCACCA  
CATAAGATAGAGATTGCCTGGCAGCTCGCT  
AAGCTGCGAGTAGACATCATGGAAGTTGGTTTCCCTGCGTCTTCAGAGGA  
AGAGTTTGAAACCATCAAAACCATCGCCAA  
GACCGTGGGGAATGAGGTGGATGAGGAAACAGGCTATATCCCAGTGATA  
TGCGTCATCGCACGAAGCAAAGAAAGAGATA  
TTAAAGCGGCTTGGGAGTCAGTGAAGTACGCAAAGAGGCCGAGGATACT  
CATATTCACTTCTACTAGTGACATCCACTTG  
AAATATAAGTTGAAAATGAATAGGGATGAAGTCCTCGAGATGGTCGTACG  
TACCATTAAGTTTGCTAAAAGTTTAGGTTT  
CCAAGACATCGAATTTGGTTGTGAAGATGGCGGCCGGTTCGGACAAGGATT  
ATATATGCAAGGTCTTTGAAGAAGTATCA  
AAGCGGGTGCACCACCCTGGCCTGCCCGGACACAGTGGGGATCAACATG  
CCCCGAACATACGGGAGAACTTTTGAGATAC  
GTCAAAGCCAACACTCCTGGAATTGATGATGTAATCTTGAACACTCATTGT  
CACAAATGACCCTTGGTGTGCTACCCGC  
CACACCAATCACCGGTAA

#### MAM2 :

TAGATACAACGCTCCGAGACGGTGAACAAGCTCCTGGTGGAGCTCTTACT  
CCACCGCAGAAGATCGAGATTGCAAGACAG  
CTCGCAAAACTCCGAGTAGACATCATGGAAGTTGGTTTTCCTGTGTGCTCT  
GAAGAAGAGTTCGAAACTGTCAAAACCAT  
CGCCAAGACCGTGGGAAACGAGGTGGATGAGGAAACAGGTTACGTCCCA  
GTGATATGCGCCATCGCACGAAGCAAACCAG  
AAGACGTTAAGGCGGCATGGGAGGCGGTGAAATACGCGAAGAGACCTAA  
GATACTCATATTCACATCTACCAGTGACATT  
CATATGAAATACAAGTTGAAAAAGACTCAAGAAGAAGTCGTTGAGATGG  
CCGCGAGTAGTGTCAGGTTTGCTAAAAGCTT  
AGGCTTCGTTGACGTTCAATTTGGTTGCGAAGATGGCGGCAGGTCGGATA  
AGGACTTTCTATGCAAGATTCTAGGAGAAT  
CGATAAAAGCTGGTGCACCACGGTCAACGTGGCGGACACTGTTGGAATC  
AACATGCCGGAAGAATACGGGAGAACTCGTG  
AGCTACGTCAAAGCAAATACTCCTGGAATTGATGATATTATCTTCAGTGTT  
CATTGTCACAACGACCTTGGTGTGCTAC  
CGCCAACACAATTGCCGGTGTATGTGCTGGAGCACGACAAGTCGAAGTAA  
CAGTTAACGGAATAGGCGAAAGAAGTGGCA  
A



▪ CYP genes

CYP79F1 :

TTGATGGTCAAGAGGAGAGGGTGAGAGTGTATTGTAATAAAGTTCGAAGT  
TACAACAATCCGATCATTGACGAGAGGGTC  
GCGTTATGGAGGGAGAAAGGTGGTAAGGCAGCTGTTGAAGATTGGATTGA  
TACGTTTCATTACGCTAAAAGATGAAAATGG  
AAAGTATTATATCACGGCTGATGAAATCAAGGCTCAATGCGTTGAATTTT  
GTATAGCAGCGATCGATAACCCGGCAAATA  
ACATAGAATGGACTTGC GGAAATGTTAAAGAATCCGGAGATTTACAAA  
AAAGCTTTGAAGGAGTTAGACGAAGTGGTG  
GGAAAAGACAGGCTTGTTCAAGAATCAGACATAACCAAATCTGAACTACTT  
AAAGGCTTGTTGCAGAGAAACATTCAGGAT  
TCACCCAAGTGCTCATTATGTTCTCTCATGTGGCTCGTCAAGATAACCAC  
CCTCGGGGGTTATTTTCATTCCCAAAGGTA  
GCCACATTCATGTTCGGCCGTCCTGGAATAGGCCGGAGCTCCAAAGTATGG  
AAAAATCCATTGGTATACAAACCAGAGCGT  
CACCTCGAAGGAGATGGACTCTCGAAGGAGCTTTCGCTGGTTCGAGTCTGA  
ATTGCGTTTCGTGTCGTTTGGTACTGGTCG  
GCGTGGCTGCGTCGGTGTTAAAGTCGGGACGAATCA

CYP79B2 :

TTTATGGGTTGTCTGGCGCCGCCATCACAAAGCTCCTTAATGGTGGGTTTGA  
TTTCATCGGCGGTAAGCAAAGGGTTTCCT  
TCTTCATCTTTGATCGAAATGAAAATATCTAGAAAATCTTCTATTTGAGTT  
CTCTTTCCTTCTCCCCACATCTTGATCCT  
TGCATCAATGATAGGATCATGATACTTGTCCGTAATCGCACTAGAATCTCT  
CATGATCTTCTCGTGGCCGTTAAGATCAA  
GTCCCGTGAGCATAGGTAGATAATCAGAGATGCAAAAAGGCGAACGTAAA  
CCCTAATGCTTCAAACATGGCTTCCATATGC  
TCGATATCCTCCGCGGTTGGTCCACCGTCAGGTGCAGTATTTTGAGAGAAC  
GTTCTTGTCCCGAACATAAGTTTCTTGAT  
AGCATTGCCGCAGTAGTGTCTTGTTCATGAACCGGAAATCGACTGAGTCCG  
AGTTCTTAACCATGTTGTATACCCATGCGG  
TTAAATGATCGTTCTCTTCAGCTCTCTTCTGGTGGAGCCACCTGTGTCTCG  
CGGGACAAACGAGTTCAGTCATCACGACT  
TTCTCATTTTCTTGAAGTGTTCACCGAAGGGAGTGATCACGCATGTTTTGT  
ATCCG

CYP79B3 :

CGGCTACAAAACATGCGTGATCACACCCTTCGGTGAGCAATTCAAGAAGA  
TGAGGAAAGTGATTATGACGGAGATAGTTT  
GCCCCGCAAGGCACCGATGGCTACATGACAATAGAGCTGAAGAAACCGA  
TCATCTAACCGCTTGGCTTTACAACATGGTT  
AAAAACTCTGAACCGGTCGATCTCCGCTTTGTTACAAGGCATTAAGTGTGGT  
AATGCTATTAAGAGGCTTATGTTTGGAAC

GAGGACGTTCTCGGGGAAACTAAAGCCGATGGTGGGCCAACCATCGAA  
GATATTGAGCATATGGAGGCTATGTTTGAGG  
GGTTAGGGTTTACGTTTTCGTTTTGTGTATCGGATTATCTACCCATGCTTAC  
GGGATTGGATCTAAACGGACATGAGAAG  
ATCATGAGAGAAGCTAGTGCAGTTATGGATAAATATCATGATCCTATTATT  
GATGAGAGGATTAATAATGTGGAGAGAAGG  
AAAAAGAACTCAGATTGAAGATTTTCTAGACATTTTTATCTCTATCAAGGA  
CGCAGATGGCCAGCCTTTGCTTACCGCTG  
ATGAAATCAAACCGACCATTAAGGAACCTTGTGATGGCGGCGCCAGACAAC  
CCATCAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCG  
CCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCT

CYP83A1 :

GAAGTCAATGAAGATGGAGAAGAGATGAAGAGATTTATCCAGATTCTTTA  
TGCCACTCAAAGCGTTTTGGGGAAGATTTT  
TTTCTCTGATTTTTTCCCCTTTTTTGGATTTTATAGATGATTGGACAGGCCTC  
ACAGCTTATATGAAGGAGTGTTTCGAAA  
GGCAAGACACTTATATAACAAGAGATCATCGATGAGACACTTGACCCCAAC  
AGGGCCAGGCCAGAACTGAGAGCATGATC  
GATCTCTTGATGGAGATTTATAAAGATCAACCTTTCGCCTCCAAGTTTACT  
TTAGAGAATGTCAAGGGCGTGGTTTTGAA  
TATAGTGGTTGCGGGAAGTACACGGCGGCTGCCGCGGTTGTCTGGGGGA  
TGACGTATTTGATGAAGTTTCCTCAAGTGA  
TGAAGAAAGCTCAAGCAGAAGTGAGAGAGTATGCAAGAGAGAATGGTTC  
AACGTTTATTACCGAAGACGACGTCAAGAAC  
CTTCCTTACTTCAGAGCCTTAGTTAAA

CYP83B1 :

GAGACTCTTGACCCTAACCGTCCTAAACCCGAGACAGAGAGTTTCATTGA  
TCTTTTGATGCAGATCTATAAAGATCAACC  
TTTCTCCATCAAATTCACCCACGAAAATGTCAAGGCCATGATTTTGGATAT  
TGTTGTACCCGGGACTGACACAGCAGCTG  
CAGTAGTGGTATGGGCCATGACATACCTTATAAAGAACCCTGAAGCAATG  
AAGAAAGCTCAAGACGAAGTGAGGAATGTG  
GTAGGAGACAAAGGACACGTCTCGGAAGAAGACATCCCCAATCTCCCTTA  
CCTAAAGGCAGTCATCAAGGAGTCTCTCCG

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrol and Ahmad**, Sulphur in plants, Kluwer Academic Publishers (2003)
- Agrawal, A.A., and Kurashige, N.S.** (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 1403-1415.
- Andreasson, E., Jorgensen, L.B., Hoglund, A.S., Rask, L., and Meijer, J.** (2001). Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology* **127**, 1750-1763.
- Bak, S., Tax, F.E., Feldmann, K.A., Galbraith, D.W., and Feyereisen, R.** (2001). CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 101-111.
- Bak, S., and Feyereisen, R.** (2001). The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiology* **127**, 108-118.
- Bennett, R.N., Mellon, F.A., Botting, N.P., Eagles, J., Rosa, E.A.S., and Williamson, G.** (2002). Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. (salad rocket). *Phytochemistry* **61**, 25-30.
- Blake-Kalff, M.M.A., Harrison, K.R., Hawkesford, M.J., Zhao, F.J., and McGrath, S.P.** (1998). Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiology* **118**, 1337-1344.
- Brader, G., Tas, E., and Palva, E.T.** (2001). Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology* **126**, 849-860.
- Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M., and Gershenzon, J.** (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **62**, 471-481.
- Brudenell, A.J.P., Griffiths, H., Rossiter, J.T., and Baker, D.A.** (1999). The phloem mobility of glucosinolates. *Journal of Experimental Botany* **50**, 745-756.
- Cataldi, T.R.I., Rubino, A., Lelario, F., and Bufo, S.A.** (2007). Naturally occurring glucosinolates in plant extracts of rocket salad (*Eruca sativa* L.) identified by liquid chromatography coupled with negative ion electrospray ionization and quadrupole ion-trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 2374-2388.
- Celenza, J.L., Quiel, J.A., Smolen, G.A., Merrikkh, H., Silvestro, A.R., Normanly, J., and Bender, J.** (2005). The *Arabidopsis* ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiology* **137**, 253-262.
- Chang Pyo Hong, Soo-Jin Kwon, Jung Sun Kim, Tae-Jin Yang, Beom-Seok Park, and Yong Pyo Lim** (2008) Progress in Understanding and Sequencing the Genome of *Brassica rapa*. *J Plant Genomics*. 2008; 2008: 582837
- Chen, S.X., Glawischnig, E., Jorgensen, K., Naur, P., Jorgensen, B., Olsen, C.E., Hansen, C.H., Rasmussen, H., Pickett, J.A., and Halkier, B.A.** (2003). CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **33**, 923-937.
- D'Auria, J.C., and Gershenzon, J.** (2005). The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology*

8, 308-316.

- Engelen-Eigles, G., Holden, G., Cohen, J.D., and Gardner, G.** (2006). The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 328-334.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., and Talalay, P.** (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**, 5-51.
- Fahey, J.; Talalay, P.** The role of crucifers in cancer chemoprotection. In: Gustine DL, Florens HE. , editors. *Phytochemicals and Health*. Rockvill, Md, USA: American Society of Plant Physiologists; 1995. pp. 87-93.
- Falk, K.L., Vogel, C., Textor, S., Bartram, S., Hick, A., Pickett, J.A., and Gershenzon, J.** (2004). Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*. *Phytochemistry* **65**, 1073-1084.
- Falk, K.L., Tokuhisa, J.G., and Gershenzon, J.** (2007). The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: Physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology* **9**, 573-581.
- Field, B., Cardon, G., Traka, M., Botterman, J., Vancanneyt, G., and Mithen, R.** (2004). Glucosinolate and amino acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 828-839.
- Gang, D.R., Beuerle, T., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., and Pichersky, E.** (2002). Differential production of meta hydroxylated phenylpropanoids in sweet basil peltate glandular trichomes and leaves is controlled by the activities of specific acyltransferases and hydroxylases. *Plant Physiology* **130**, 1536-1544.
- Gerendas, J., Zhu, Z., and Sattelmacher, B.** (1998). Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **49**, 1545-1554.
- Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H.P., Muller, C., Weisshaar, B., and Flugge, U.I.** (2007). The transcription factor HAG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **50**, 886-901.
- Gigolashvili, T., Yatusевич, R., Berger, B., Muller, C., and Flugge, U.I.** (2007). The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **51**, 247-261.
- Gigolashvili, T., Engqvist, M., Yatusевич, R., Muller, C., and Flugge, U.I.** (2008). HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **177**, 627-642.
- Glawischnig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E., and Halkier, B.A.** (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8245-8250.
- Graser, G., Schneider, B., Oldham, N.J., and Gershenzon, J.** (2000). The methionine chain elongation pathway in the biosynthesis of glucosinolates in *Eruca sativa* (Brassicaceae). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **378**, 411-419.
- Graser, G., Oldham, N.J., Brown, P.D., Temp, U., Temp, U., and Gershenzon, J.**

- (2001). The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **57**, 23-32.
- Griffiths, D.W., Birch, A.N.E., and Hillman, J.R.** (1998). Antinutritional compounds in the Brassicaceae: Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **73**, 1-18.
- Grubb, C.D., Zipp, B.J., Ludwig-Muller, J., Masuno, M.N., Molinski, T.F., and Abel, S.** (2004). *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant Journal* **40**, 893-908.
- Grubb, C.D., and Abel, S.** (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* **11**, 89-100.
- Halkier, B.A., and Gershenzon, J.** (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 303-333.
- Hansen, C.H., Wittstock, U., Olsen, C.E., Hick, A.J., Pickett, J.A., and Halkier, B.A.** (2001). Cytochrome P450CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 11078-11085.
- Hansen, C.H., Du, L.C., Naur, P., Olsen, C.E., Axelsen, K.B., Hick, A.J., Pickett, J.A., and Halkier, B.A.** (2001). CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 24790-24796.
- Hansen, B., and Halkier, B.** (2005). New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **221**, 603-606.
- Hecht, S.S.** (1999). Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *Journal of Nutrition* **129**, 768S-774S.
- Hemm, M.R., Ruegger, M.O., and Chapple, C.** (2003). The *Arabidopsis* *ref2* mutant is defective in the gene encoding CYP83A1 and shows both phenylpropanoid and glucosinolate phenotypes. *Plant Cell* **15**, 179-194.
- Hirai, M.Y., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Yamazaki, Y., Kanaya, S., Nakamura, Y., Kitayama, M., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., Papenbrock, J., and Saito, K.** (2005). Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 25590-25595.
- Hirai, M.Y., Sugiyama, K., Sawada, Y., Tohge, T., Obayashi, T., Suzuki, A., Araki, R., Sakurai, N., Suzuki, H., Aoki, K., Goda, H., Nishizawa, O.I., Shibata, D., and Saito, K.** (2007). Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 6478-6483.
- Hogge, L.R., Reed, D.W., Underhill, E.W., and Haughn, G.W.** (1988). Hplc Separation of Glucosinolates from Leaves and Seeds of *Arabidopsis-Thaliana* and Their Identification Using Thermospray Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **26**, 551-556.
- Hull, A.K., Vij, R., and Celenza, J.L.** (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2379-2384.
- Husebye, H., Chadchawan, S., Winge, P., Thangstad, O.P., and Bones, A.M.** (2002). Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside

- glucohydrolase 1 (myrosinase) in Arabidopsis. *Plant Physiology* **128**, 1180-1188.
- Kelly, P.J., Bones, A., and Rossiter, J.T.** (1998). Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta* **206**, 370-377.
- Keum, Y.S., Jeong, W.S., and Kong, A.N.T.** (2004). Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **555**, 191-202.
- Kim, S.J., Matsuo, T., Watanabe, M., and Watanabe, Y.** (2002). Effect of nitrogen and sulphur application on the glucosinolate content in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* **48**, 43-49.
- Kliebenstein, D.J., Gershenzon, J., and Mitchell-Olds, T.** (2001). Comparative quantitative trait loci mapping of aliphatic, indolic and benzylic glucosinolate production in *Arabidopsis thaliana* leaves and seeds. *Genetics* **159**, 359-370.
- Kliebenstein, D., Pedersen, D., Barker, B., and Mitchell-Olds, T.** (2002). Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **161**, 325-332.
- Kliebenstein, D.J., Figuth, A., and Mitchell-Olds, T.** (2002). Genetic architecture of plastic methyl jasmonate responses in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **161**, 1685-1696.
- Kliebenstein, D.J., Kroymann, J., and Mitchell-Olds, T.** (2005). The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 264-271.
- Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C., and Denby, K.J.** (2005). Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant Journal* **44**, 25-36.
- Kollner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J., and Degenhardt, J.** (2004). The variability of sesquiterpenes cultivars is controlled by allelic emitted from two *Zea mays* variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell* **16**, 1115-1131.
- Kroymann, J., Textor, S., Tokuhsa, J.G., Falk, K.L., Bartram, S., Gershenzon, J., and Mitchell-Olds, T.** (2001). A gene controlling variation in *Arabidopsis* glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. *Plant Physiology* **127**, 1077-1088.
- Kroymann, J., Donnerhacke, S., Schnabelrauch, D., and Mitchell-Olds, T.** (2003). Evolutionary dynamics of an *Arabidopsis* insect resistance quantitative trait locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14587-14592.
- Kutz, A., Muller, A., Hennig, P., Kaiser, W.M., Piotrowski, M., and Weiler, E.W.** (2002). A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **30**, 95-106.
- Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D.J., and Gershenzon, J.** (2001). The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell* **13**, 2793-2807.
- Levy, M., Wang, Q.M., Kaspi, R., Parrella, M.P., and Abel, S.** (2005). *Arabidopsis* IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant Journal* **43**, 79-96.
- Luthy, B., and Matile, P.** (1984). The Mustard Oil Bomb - Rectified Analysis of the

Subcellular Organization of the Myrosinase System. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen* **179**, 5-12.

- Mahran, G.H., Kadry, H.A., Isaac, Z.G., Thabet, C.K., Alazizi, M.M., and Elosemy, M.M.** (1991). Investigation of Diuretic Drug Plants .1. Phytochemical Screening and Pharmacological Evaluation of *Anethum-Graveolens* L, *Apium-Graveolens* L, *Daucus-Carota* L and *Eruca-Sativa* Mill. *Phytotherapy Research* **5**, 169-172.
- Maruyama-Nakashita, A., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Yarnaya, T., and Takahashi, H.** (2003). Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology* **132**, 597-605.
- Matallana, L., Kleinwachter, M., and Selmar, D.** (2006). Sulfur is limiting the glucosinolate accumulation in nasturtium in vitro plants (*Tropaeolum majus* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik* **80**, 1-5.
- Mewis, I., Appel, H.M., Hom, A., Raina, R., and Schultz, J.C.** (2005). Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiology* **138**, 1149-1162.
- Mikkelsen, M.D., Hansen, C.H., Wittstock, U., and Halkier, B.A.** (2000). Cytochrome P450CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 33712-33717.
- Mikkelsen, M.D., Petersen, B.L., Olsen, C.E., and Halkier, B.A.** (2002). Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids* **22**, 279-295.
- Mikkelsen, M.D., Petersen, B.L., Glawischnig, E., Jensen, A.B., Andreasson, E., and Halkier, B.A.** (2003). Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiology* **131**, 298-308.
- Mikkelsen, M.D., and Halkier, B.A.** (2003). Metabolic engineering of valine- and isoleucine-derived glucosinolates in *Arabidopsis* expressing CYP79D2 from cassava. *Plant Physiology* **131**, 773-779.
- Mikkelsen, M.D., Naur, P., and Halkier, B.A.** (2004). *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant Journal* **37**, 770-777.
- Mithen, R.F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S., and Johnson, I.T.** (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 967-984.
- Murphy, D.J., and Cummins, I.** (1989). Purification and Immunogold Localization of the Major Oil-Body Membrane-Protein of Oilseed Rape. *Plant Science* **60**, 47-54.
- Naur, P., Petersen, B.L., Mikkelsen, M.D., Bak, S., Rasmussen, H., Olsen, C.E., and Halkier, B.A.** (2003). CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**, 63-72.
- Norton, G., and Harris, J.F.** (1975). Compositional Changes in Developing Rape Seed (*Brassica-Napus* L). *Planta* **123**, 163-174.
- Piotrowski, M., Schemenewitz, A., Lopukhina, A., Muller, A., Janowitz, T., Weiler, E.W., and Oecking, C.** (2004). Desulfoglucosinolate

sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 50717-50725.

- Rangkadilok, N., Nicolas, M.E., Bennett, R.N., Eagling, D.R., Premier, R.R., and Taylor, P.W.J.** (2004). The effect of sulfur fertilizer on glucoraphanin levels in broccoli (*B-oleracea* L. var. *italica*) at different growth stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 2632-2639.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Olds, T., and Kroymann, J.** (2002). Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11223-11228.
- Reichelt, M., Brown, P.D., Schneider, B., Oldham, N.J., Stauber, E., Tokuhsa, J., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Olds, T., and Gershenzon, J.** (2002). Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **59**, 663-671.
- Reintanz, B., Lehnen, M., Reichelt, M., Gershenzon, J., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Godde, M., Uhl, R., and Palme, K.** (2001). Bus, a bushy *arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* **13**, 351-367.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M.P., Krishnamurthy, V., Dicke, M., and Farmer, E.E.** (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* **16**, 3132-3147.
- Rodman, J.E., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Sytsma, K.J., and Karol, K.G.** (1998). Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies. *American Journal of Botany* **85**, 997-1006.
- Schnug, E., Haneklaus, S., Borchers, A., and Polle, A.** (1995). Relations between Sulfur Supply and Glutathione and Ascorbate Concentrations in *Brassica-Napus*. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **158**, 67-69.
- Schonhof, I., Blankenburg, D., Muller, S., and Krumbein, A.** (2007). Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **170**, 65-72.
- Schwender, J., and Ohlrogge, J.B.** (2002). Probing in vivo metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiology* **130**, 347-361.
- Siemens, J., Glawischnig, E., and Udwig-Muller, J.L.** (2008). Indole glucosinolates and camalexin do not influence the development of the clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Phytopathology* **156**, 332-337.
- Skirycz, A., Reichelt, M., Burow, M., Birkemeyer, C., Rolcik, J., Kopka, J., Zanor, M.I., Gershenzon, J., Strnad, M., Szopa, J., Mueller-Roeber, B., and Witt, I.** (2006). DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **47**, 10-24.
- Slater, Scott and Fowler**, *Plant biotechnology*, Oxford (2003)
- Talalay, P., and Fahey, J.W.** (2001). Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *Journal of Nutrition* **131**, 3027S-3033S.
- Textor, S., Bartram, S., Kroymann, J., Falk, K.L., Hick, A., Pickett, J.A., and Gershenzon, J.** (2004). Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of



methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta* **218**, 1026-1035.

- Textor, S., de Kraker, J.W., Hause, B., Gershenzon, J., and Tokuhsa, J.G.** (2007). MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in arabidopsis. *Plant Physiology* **144**, 60-71.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., and Pichersky, E.** (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant Journal* **42**, 757-771.
- Tierens, K.F.M.J., Thomma, B.P.H., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., Mauch-Mani, B., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F.** (2001). Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of arabidopsis to microbial pathogens. *Plant Physiology* **125**, 1688-1699.
- Τσέκος, Φυσιολογία Φυτών** 543-557 (2004)
- Vallejo, F., Tomas-Barberan, F.A., Benavente-Garcia, A.G., and Garcia-Viguera, C.** (2003). Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilisation conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 307-313.
- Wan, C.Y., and Wilkins, T.A.** (1994). A Modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality Rna from Cotton (*Gossypium-Hirsutum* L). *Analytical Biochemistry* **223**, 7-12.
- Wittstock, U., and Halkier, B.A.** (2000). Cytochrome P450CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 14659-14666.
- Wittstock, U., and Halkier, B.A.** (2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* **7**, 263-270.
- Woodward, A.W., and Bartel, B.** (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735.
- Yaniv, Z., Schafferman, D., and Amar, Z.** (1998). Tradition, uses and biodiversity of rocket (*Eruca sativa*, Brassicaceae) in Israel. *Economic Botany* **52**, 394-400.
- Zhao, F.J., Bilsborrow, P.E., Evans, E.J., and Syers, J.K.** (1993). Sulfur Turnover in the Developing Pods of Single and Double Low Varieties of Oilseed Rape (*Brassica-Napus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**, 111-119.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Genevestigator, G.W.** (2004). *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox (vol 136, pg 2621, 2004). *Plant Physiology* **136**, 4335-4335.

