

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΙΚΗΣ
ΛΙΠΑΝΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ
ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΗΣ ΡΟΚΑΣ
(*Eruca sativa*)

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

2011-2012

ΤΣΟΥΚΑΤΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσίκου Δανιέλα

Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 Βιοτεχνολογίας Φυτών, Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Φυσιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της επίκουρου καθηγήτριας Παπαδοπούλου Καλλιόπης.

Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμές ευχαριστίες μου πρωτίστως στην κα. Παπαδοπούλου που με δέχτηκε στο εργαστήριο, για την εμπιστοσύνη για τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας καθώς και για τις γνώσεις, τη βοήθεια και το επιστημονικό υλικό που μου διέθεσε, αλλά κυρίως για την άριστη συνεργασία καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο και της συγγραφής της διπλωματικής. Ακόμα, θέλω να της εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στο προσωπικό του εργαστηρίου, για την καθοδήγηση τους και την βοήθεια σε οποιοδήποτε θέμα υπήρξε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη που μου πρόσφεραν σε όλα τα επίπεδα.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ	4
1.1 Η ρόκα (<i>Eruca sativa</i>) και η οικογένεια των Brassicaceae	4
1.2 Τα γλυκοσινολικά οξέα	5
1.3 Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων	6
1.4 Η υδρόλυση των γλυκοσινολικών οξέων	14
1.5 Η επίδραση της θειικής λίπανσης στην συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων	16
1.6 Σκοπός της εργασίας	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
2.1 Φυτικός ιστός και πειραματικό σχέδιο	19
2.2. Μοριακή μελέτη	21
2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA	21
2.2.2 Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτή αγαρόζης	22
2.2.3. Υδρόλυση του γονιδιωματικού DNA με τη χρήση του ενζύμου DNase	24
2.2.4. Σύνθεση cDNA	25
2.2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, Πραγματικού Χρόνου (Real time PCR)	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
3.1 Η επίδραση της λίπανσης θείου στην έκφραση των γονιδίων <i>MAM</i> , <i>CYP79F1</i> και <i>CYP83A1</i>	30
3.2 Συζήτηση	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

1.1 Η ρόκα (*Eruca sativa*) και η οικογένεια των Brassicaceae

Η ρόκα (*Eruca sativa*) ανήκει στην οικογένεια των φυτών *Brassicaceae*. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν φυτά του γένους *Brassica* (ελαιοκράμβη, μπρόκολο, κουνουπίδι, λάχανο και άλλα) συνεπώς είναι εμφανές ότι το καλλιεργητικό ενδιαφέρον για την οικογένεια αυτή είναι μεγάλο. Το πιο γνωστό μέλος όμως αποτελεί το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*. Όπως και το *Arabidopsis*, έτσι και η ρόκα χαρακτηρίζεται από σύντομο βιολογικό κύκλο των 6-9 εβδομάδων, μικρό γονιδίωμα, της τάξης των 560 Mb, μεγάλη παραγωγή σπόρων και μικρό μέγεθος αποτελώντας έτσι ιδανικό φυτό για εργαστηριακή μεταχείριση (Yaniv et al., 1998; Mahran et al. 1991; Slater et al, 2003).

Ένα βασικό γνώρισμα των φυτών της οικογένειας των *Brassicaceae* είναι η πικρή γεύση τους και η χαρακτηριστική οσμή τους. Οι ενώσεις που ευθύνονται για τα χαρακτηριστικά αυτά είναι γνωστές ως έλαια της μουστάρδας και αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται στα φυτά αυτά. Οι μεταβολίτες αυτοί ονομάζονται γλυκοσινολικά οξέα και η παρουσία τους στην οικογένεια των *Brassicaceae* αποτελεί ένα σημαντικό γνώρισμα τους.



Εικόνα 1: Φυτό ρόκας (*Eruca sativa*)

1.2 Τα γλυκοσινολικά οξέα

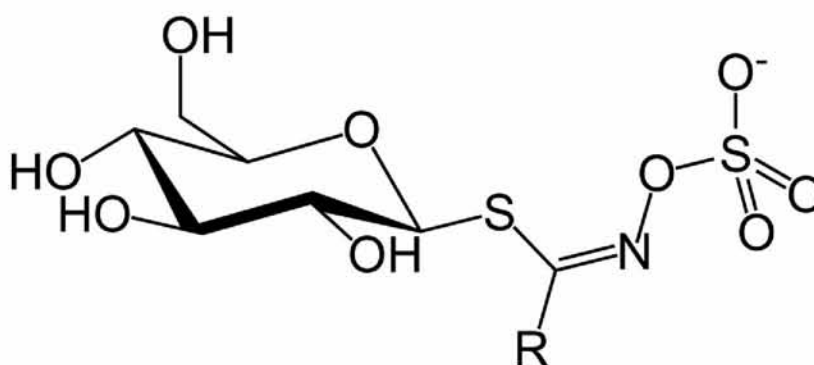
Τα γλυκοσινολικά οξέα αποτελούν ενώσεις που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών είναι κυρίως φυτοπροστατευτικός, προσδίδοντας ιδιότητες κατά του αβιοτικού στρες, των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών και κατά της βοράς (Τσέκος, 2004). Αντίθετα με άλλες κατηγορίες φυτικών προϊόντων, τα γλυκοσινολικά οξέα αποτελούν μία μικρή αλλά ανομοιομορφη ομάδα θειούχων και αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών. Η ποικιλομορφία που παρουσιάζουν οφείλεται στα διαφορετικά πρόδρομα μόρια από τα οποία προέρχονται, το μήκος της πλευρικής τους αλυσίδας και από τους διαφορετικούς τύπους δευτερογενούς εστεροποίησης και οξειδωσης που υπόκεινται.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία όσο αφορά της χημική τους σύνθεση, αλλά μπορούν να διαχωριστούν σύμφωνα με αυτή, σε τρεις κύριες διακριτές ομάδες: τις φαινολικές ενώσεις, τα τερπένια και τις ενώσεις που περιέχουν άζωτο.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι αρωματικές ουσίες σχηματιζόμενες μέσω της διαδρομής του μηλονικού ή του σικιμικού οξέως, τα τερπένια αποτελούν λιπίδια σχηματιζόμενα από το Ακέτυλο συνένζυμο Α ή από ενδιάμεσες ενώσεις την γλυκολυτικής οδού και οι ενώσεις που περιέχουν άζωτο σχηματίζονται από αμινοξέα. Στην ομάδα αυτή, των αζωτούχων ενώσεων, ανήκουν και τα γλυκοσινολικά οξέα.

Τα γλυκοσινολικά οξέα αποτελούνται από (Z)-(ή cis)- N-υδροξυιμινοθειικούς εστέρες, μία πλευρική αλυσίδα (R) καθώς και ένα τμήμα β-D-γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένο με το μόριο μέσω ενός ατόμου θείου, στο οποίο και οφείλεται το χαμηλό pKa που χαρακτηρίζει τα γλυκοσινολικά οξέα. Ανάλογα με το αμινοξύ από το οποίο παράγονται, και κατ'επέκταση την πλευρική αλυσίδα του κάθε μορίου, τα γλυκοσινολικά οξέα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα ινδολικά, τα αλειφατικά και τα αρωματικά (Wittstock and Halkier, 2002). Οι πολικότητα και η πτητικότητα του κάθε προκύπτοντος μορίου εξαρτάται από τον τύπο και το μήκος της πλευρικής αλυσίδας, την τυχόν παρουσία αρωματικού δακτυλίου ή άλλων ετεροκυκλικών δομών άνθρακα (Fahey et al., 2001; Textor et al., 2004).

Όσο αφορά το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, την παραγωγή των γλυκοσινολικών οξέων, αξίζει να σημειωθεί ότι συγκριτικά με άλλα καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες, η ρόκα εμφανίζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκοσινολικών οξέων τόσο στο φύλλωμα όσο και στο ριζικό της σύστημα.



Εικόνα 2: Βασική δομή γλυκοσινολικών οξέων

1.3 Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων

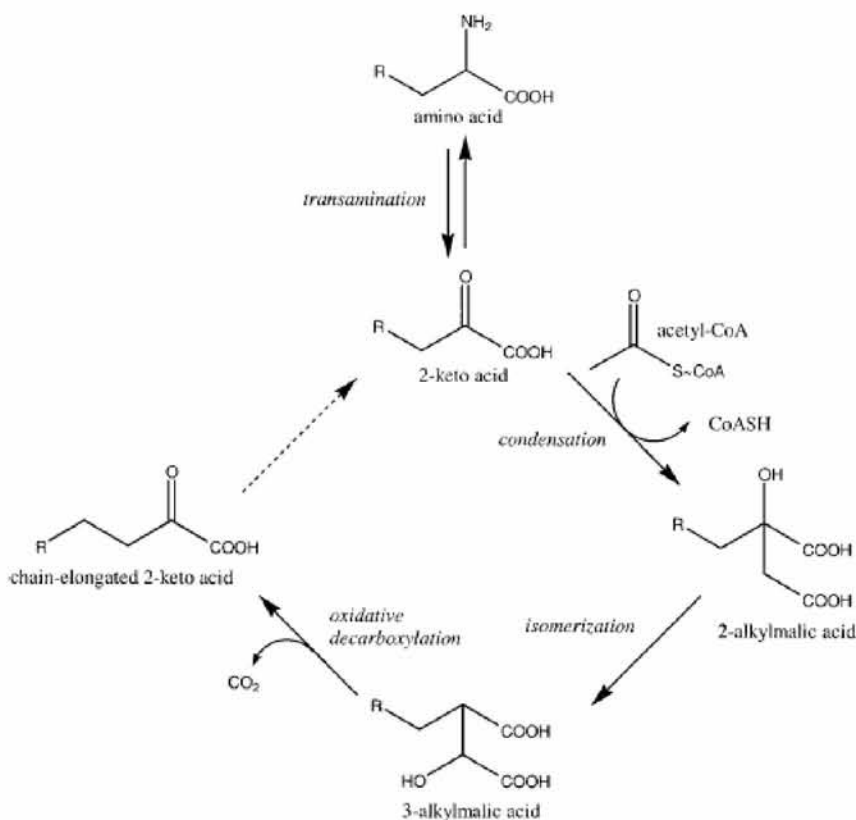
Ως πρόδρομα μόρια για την βιοσύνθεση των πλευρικών αλυσίδων των γλυκοσινολικών οξέων χρησιμοποιούνται τα αμινοξέα μεθειονίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη, στην περίπτωση των αλιφατικών γλυκοσινολικών οξέων, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη, στα αρωματικά και τρυπτοφάνη στα ινδολικά γλυκοσινολικά οξέα, καθώς και μόρια ανάλογα της μεθειονίνης και της φαινυλαλανίνης.

Κατά την βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων παρατηρούνται τρία στάδια.

- i. Το στάδιο της επιμήκυνσης της αλυσίδας του πρόδρομου αμινοξέος
- ii. Τον σχηματισμό της κύριας δομής του μορίου με την μετατροπή των αμινοξέων σε πρόδρομα γλυκοσινολικά οξέα, και
- iii. Την τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας.

Το **πρώτο βιοσυνθετικό στάδιο** λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες και περιλαμβάνει την προσθήκη ατόμων άνθρακα στο μόριο της μεθειονίνης με την μορφή μεθυλενικών ομάδων.

Η διαδικασία της επιμήκυνσης ξεκινά με την απαμίνωση της μεθειονίνης και ακολουθούν τρεις αντιδράσεις. Το προϊόν της απαμίνωσης είναι το 2-όξο οξύ, το οποίο θα συμπυκνωθεί με ένα μόριο ακέτυλο συνένζυμου Α, θα υποστεί μια αντίδραση ισομερισμού και μία αντίδραση οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης (Wittstock and Halkier, 2002; Mikkelsen et al, 2002; Graser et al, 2000). Το προϊόν της τελευταίας αντίδρασης αυτής είναι ένα 2-όξο οξύ που έχει μία μεθυλενική ομάδα παραπάνω από το αρχικό. Το επιμηκυμένο 2-όξο οξύ μπορεί να τρανσαμινωθεί και να περάσει στο επόμενο στάδιο της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων, διαφορετικά μπορεί να εισέρθει ξανά στον κύκλο επιμήκυνσης των τριών αντιδράσεων, ώστε να προστεθούν και άλλες μεθυλενικές ομάδες στο μόριό του. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφτεί έως και οκτώ φορές.



Εικόνα 3: Το πρώτο βιοσυνθετικό στάδιο των γλυκοσινολικών οξέων

Στο *Arabidopsis*, η αντίδραση της συμπύκνωσης του ακέτυλο συνένζυμου A με το 2-όξο οξύ καταλύεται από τα ένζυμα της οικογένειας MAM (μεθυλθειοαλκυμικές συνθάσες), τα οποία είναι υπεύθυνα για τις παραλλαγές του μήκους της πλευρικής αλυσίδας των γλυκοσινολικών οξέων που προέρχονται από μεθειονίνη (Textor et al., 2004; Falk et al., 2004; Field et al., 2004). Ο σχηματισμός αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων με τρεις ή τέσσερις ανθρακικές πλευρικές αλυσίδες, καταλύεται από το ένζυμο MAM1 που δρα κατά τις συμπυκνώσεις του πρώτου και του δεύτερου κύκλου επιμήκυνσης της μεθειονίνης. Το ένζυμο MAM2 καταλύει την πρώτη αντίδραση συμπύκνωσης προς σχηματισμό ομομεθειονίνης, ενώ το ένζυμο MAM3 έχει βρεθεί ότι είναι ενεργό στις αντιδράσεις παραγωγής πλευρικών αλυσίδων μεθειονίνης τόσο μεγάλου όσο και μικρού μεγέθους.

Μη νοηματικές μεταλλάξεις στο MAM1 παρουσιάζουν φυτά στα οποία τα επίπεδα των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων με βασικές αλυσίδες επτά και οκτώ ομάδων μεθυλενίου είναι ανεπηρέαστα, αλλά τα επίπεδα των οξέων μικρής αλυσίδας είναι εμφανώς μειωμένα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι τα παράγωγα της μεθειονίνης με μικρές αλυσίδες συντίθενται από ένα μονοπάτι ανεξάρτητο από αυτό της βιοσύνθεσης των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων με επτά και οκτώ ομάδες μεθυλενίου (Kroymann et al., 2001).

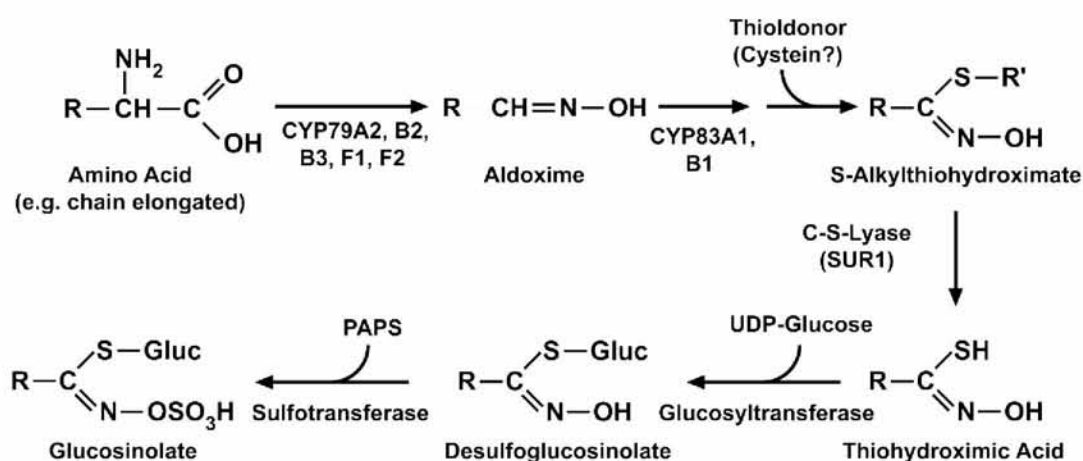
Κατά το **δεύτερο βιοσυνθετικό στάδιο** παρατηρείται ο σχηματισμός της κύριας δομής των γλυκοσινολικών οξέων, μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Το στάδιο αυτό ξεκινά με τα πρόδρομα αμινοξέα ή τα επιμηκυμένα μόρια μεθειονίνης να οξειδώνονται προς την αντίστοιχη αλδοξίμη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή ανήκει στην οικογένεια CYP79 και είναι μία εξειδικευμένη μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450. Το βήμα αυτό δεν είναι απαραίτητο στην περίπτωση των γλυκοσινολικών οξέων που προέρχονται από τρυπτοφάνη καθώς η τρυπτοφάνη οξειδώνεται κατά την βιοσύνθεση του ινδολυλ-οξικού οξέος και της καμαλεξίνης στην αντίστοιχη αλδοξίμη. Στην

συνέχεια οι αλδοξίμες οξειδώνονται από την μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας CYP83 προς σχηματισμό νιτρονικού οξέος .

Ακολουθεί ο σχηματισμός S-αλκυλοϋδροξιμικών ενώσεων, καθώς το νιτρονικό οξύ αντιδρά άμεσα με θειόλες (πιθανότατα με κυστεΐνη *in vivo*) (Hansen et al., 2001; Bak and Feyereisen, 2001; Bak et al., 2001). Τα δύο ένζυμα που έχουν παρατηρηθεί στο *Arabidopsis* στην οξείδωση των αλδοξιμών είναι τα CYP83A1 και CYP83B1, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις αλειφατικές και τις αρωματικές αλδοξίμες αντιστοίχως (Naur et al., 2003; Hemm et al., 2003).

Στο επόμενο βήμα, τα σύμπλοκα των S-αλκυλοϋδροξιμικών ενώσεων με την κυστεΐνη διασπώνται από μια C-S λυάση, δίνοντας θειοϋδροξιμικό οξύ, πυρουβικό οξύ και αμμωνία (Mikkelsen et al., 2004). Το παραγόμενο θειοϋδροξιμικό οξύ, είναι τοξικό για τα φυτικά κύτταρα, συνεπώς οι αντιδράσεις που ακολουθούν, είναι αντιδράσεις αποτοξικοποίησης και περιλαμβάνουν την γλυκοσυλίωση του οξέως από την UGT74B1, μια UDP-γλυκοσυλ-τρανσφεράση εξαρτώμενη από τη γλυκόζη, προς ένα μόριο αποθειωμένου γλυκοσινολικού οξέως (Grubb et al., 2004). Η βιοσύνθεση των πρωτογενών γλυκοσινολικών οξέων ολοκληρώνεται με την θείωση των μορίων αυτών (Piotrowski et al., 2004).

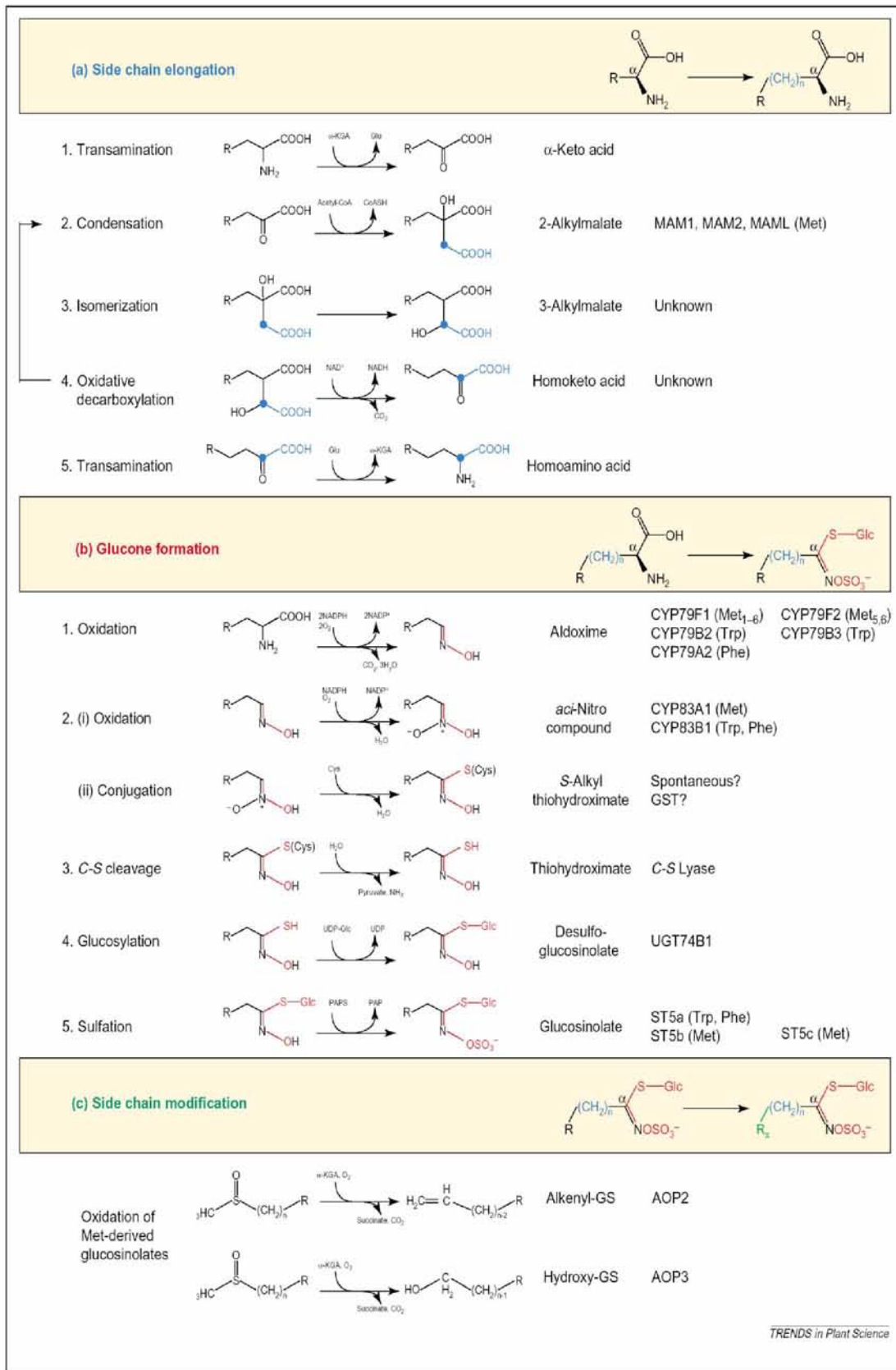


Εικόνα 4: Το δεύτερο βιοσυνθετικό στάδιο των γλυκοσινολικών οξέων

Κατά το **τρίτο στάδιο της βιοσύνθεσης** των γλυκοσινολικών οξέων, οι πλευρικές αλυσίδες των γλυκοσινολικών οξέων τροποποιούνται μέσω διαφόρων αντιδράσεων.

Στην περίπτωση των αλειφατικών γλυκοσινολικών, η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό αλκενυλ-γλυκοσινολικών και υδροξυαλκυλ-γλυκοσινολικών οξέων και έχει βρεθεί ότι τα ένζυμα AOP2 και AOP3 είναι υπεύθυνα για την κατάλυση των αντιδράσεων τροποποίησης τους .

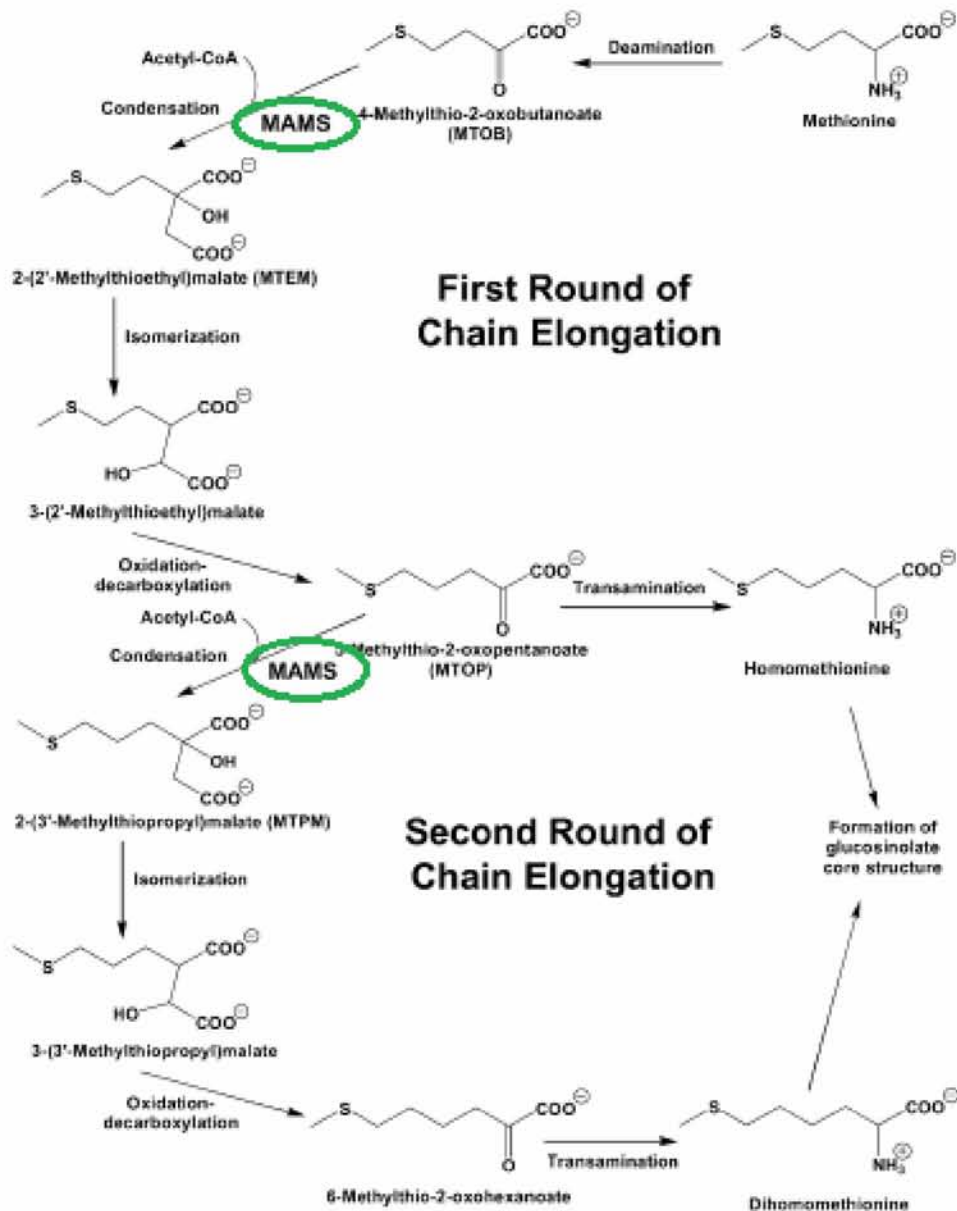
Γενικά, οι αντιδράσεις τροποποίησης της πλευρικής αλυσίδας αυτές μπορεί να είναι αντιδράσεις υδροξυλίωσης, εστεροποίησης, αλκυλίωσης, οξειδωσης και θεωρούνται το τελευταίο στάδιο της τροποποίησης των γλυκοσινολικών οξέων (Kliebenstein et al., 2005; Wittstock and Halkier, 2002; Mikkelsen et al., 2002).



Εικόνα 5: Οι αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων και τα ένζυμα που εμπλέκονται σε κάθε στάδιο στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Grubb and Abel, 2006)

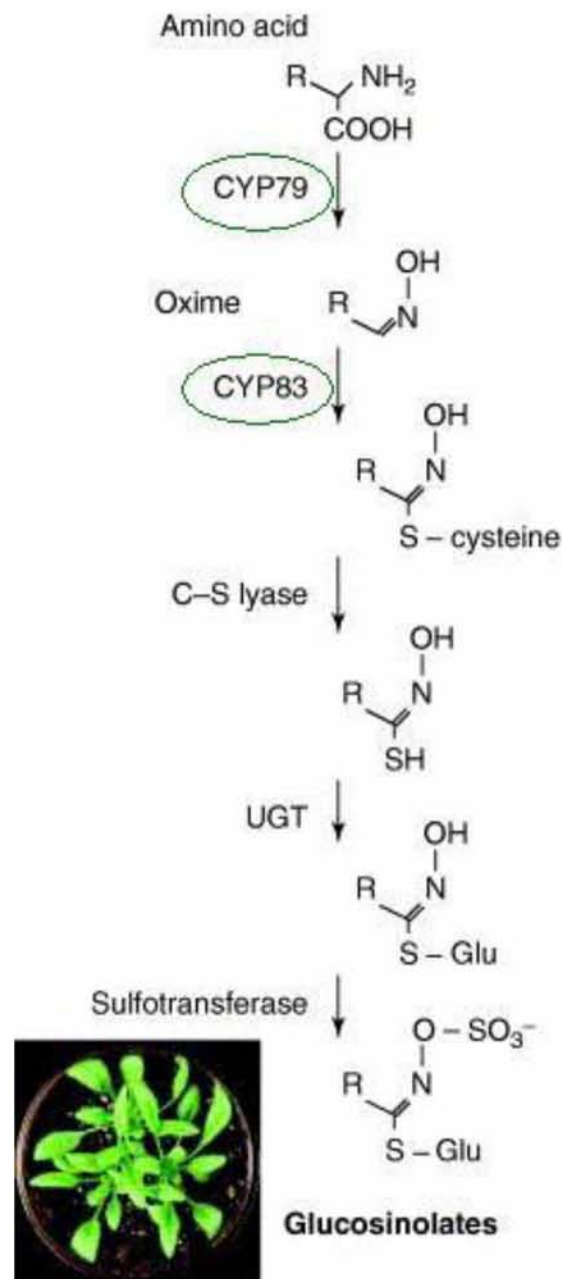
1.3.1 Η δράση των ενζύμων MAM, CYP79F1 και CYP83A1 στην βιοσύνθεση των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων

Στην ρόκα, η δράση των MAM εντοπίζεται κατά το πρώτο βιοσυνθετικό στάδιο των γλυκοσινολικών οξέων που έχουν πρόδρομο μόριο την ομομεθειονίνη, όπου καταλύει το βήμα της συμπύκνωσης του ακέτυλο συνένζυμου Α με το 2-όξο οξύ στους δύο κύκλους επιμήκυνσης που απαιτούνται.



Εικόνα 6 : Συμβολή των ενζύμων MAM κατά το πρώτο βιοσυνθετικό στάδιο των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων

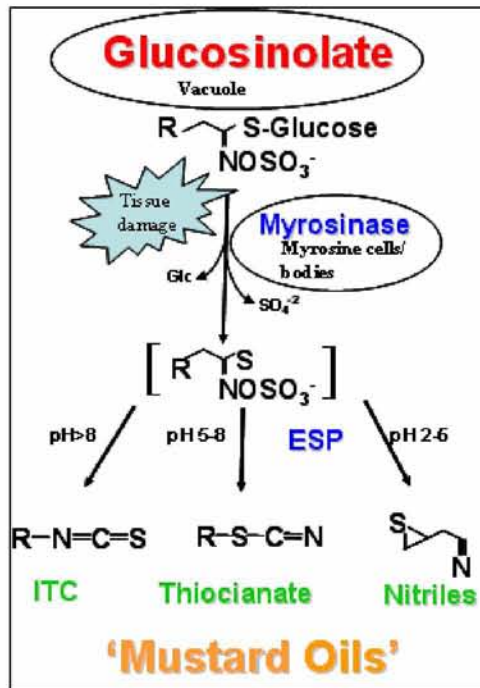
Τα ένζυμα CYP79F1 και CYP83A1 εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της βασικής δομής κατά το δεύτερο βιοσυνθετικό στάδιο των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων. Το CYP79F1 συμβάλλει στην μετατροπή παραγώγων μεθειονίνης μικρής αλυσίδας στις αντίστοιχες αλδοξίμες (Mikkelsen et al., 2000; Hull et al., 2000) ενώ το CYP83A1 συμβάλλει στην οξειδωση της αλειφατικής αλδοξίμης σε οξο-νιτρο ενώσεις.



Εικόνα 7 : Συμβολή των ενζύμων CYP79F1 και CYP83A1 κατά το δεύτερο βιοσυνθετικό στάδιο των αλειφατικών οξέων

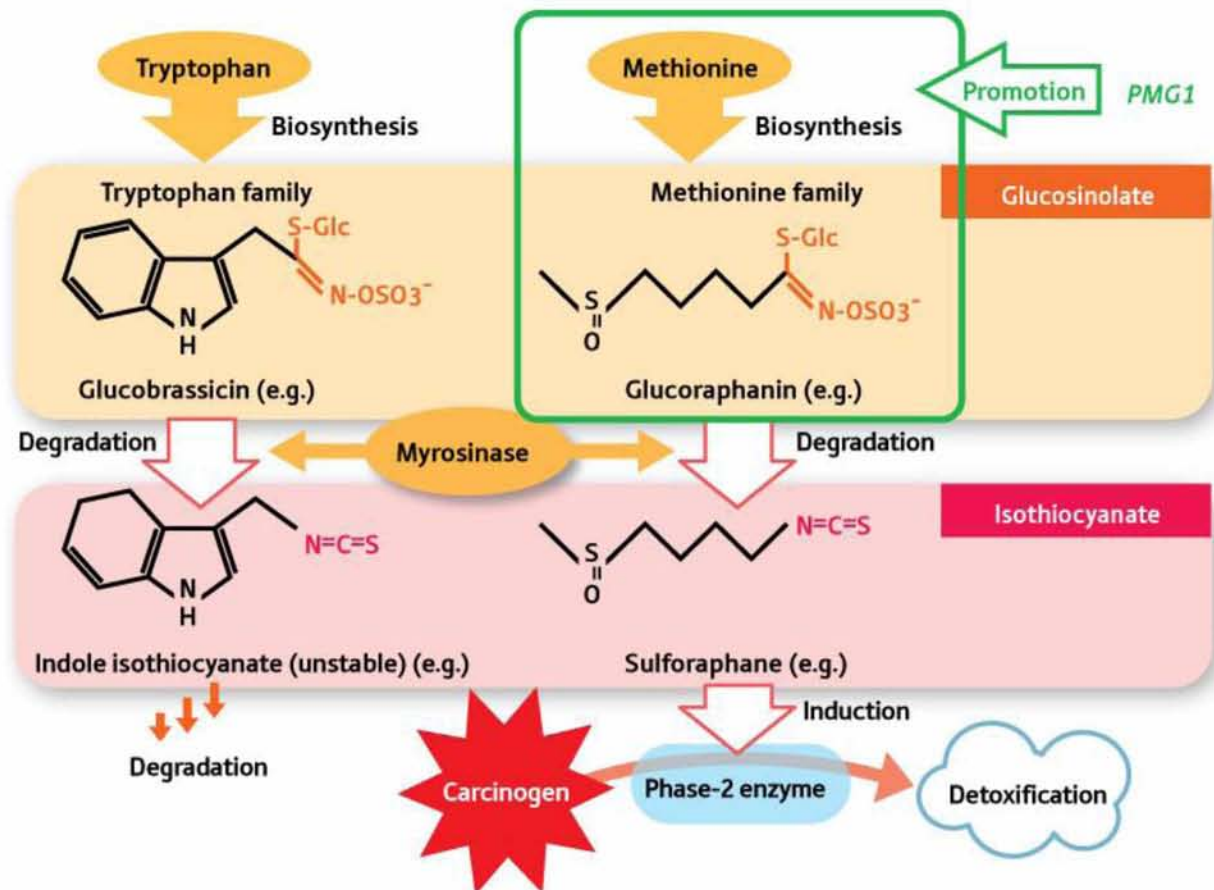
1.4 Η υδρόλυση των γλυκοσινολικών οξέων

Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση των γλυκοσινολικών οξέων ονομάζεται μυροσινάση, μία θειογλυκοϋδρολάση, που εντοπίζεται στο χυμοτόπιο ή σε εξειδικευμένα κύτταρα μυροσίνης στα οποία δεν εντοπίζονται γλυκοσινολικά (Kelly et al., 1998). Ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και αύξηση της διαπερατότητάς τους, φέρει σε επαφή τα γλυκοσινολικά με την μυροσινάση και έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυσή τους. Το διμερές σύστημα αυτό της μυροσινάσης – γλυκοσινολικού οξέος είναι και αυτό που λειτουργεί φυτοπροστατευτικά εναντίον παθογόνων και κατά τις βοράς (Brader et al., 2001; Tierens et al., 2001; Lambrix et al. 2001, Kliebenstein et al., 2002; Agrawal and Kurashige, 2003; Luthy and Matile, 1984; Ratzka et al., 2002). Τα προϊόντα της υδρόλυσης του διμερούς μπορεί να είναι γλυκόζη, θειικά ιόντα και διάφοροι άλλοι μεταβολίτες όπως νιτρίλια, επιθειονιτρίλια, θειοκυανούχες και ισοθειοκυανούχες ενώσεις. Το ποιό θα είναι το προϊόν της υδρόλυσης εξαρτάται από τον τύπο του γλυκοσινολικού οξέος που υδρολύεται, το pH, την παρουσία μεταλλικών ιόντων και πρωτεϊνών (Kliebenstein et al., 2005; Woodward and Bartel 2005, Mithen et al., 2000; Talalay and Fahey 2001; Keum et al., 2004; Wittstock and Halkier, 2002; Kelly et al., 1998).



Εικόνα 8: Η υδρόλυση των γλυκοσινολικών οξέων από την μυροσινάση και οι προκύπτουσες ενώσεις ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος.

Εάν στο περιβάλλον που λαμβάνει χώρα η υδρόλυση παρουσιάζεται χαμηλό pH και μία επιθειοειδική πρωτεΐνη θα έχουμε σχηματισμό νιτριλίων. Σε περίπτωση που υπάρχει διπλός δεσμός στο τέλος της πλευρικής αλυσίδας του γλυκοσινολικού οξέος, το άτομο του θείου που απελευθερώνεται κατά τον σχηματισμό του νιτριλίου θα προσληφθεί από τον διπλό δεσμό αυτό προς σχηματισμό επιθειονιτριλίου. Σε περιβάλλον με ουδέτερο pH (και παρουσία ασκορβικού οξέος), θα παρατηρηθεί σχηματισμός ισοθειοκυανούχων ενώσεων. Οι θειοκυανιούχες ενώσεις, πιθανώς να σχηματίζονται μετά την δράση της μυροσινάσης και μίας ισομεράσης στις ισοθειοκυανούχες ενώσεις μετασχηματίζοντάς τες σε θειοκυανούχες. Με την υδρόλυση των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων, παράγονται ισοθειοκυανούχες ενώσεις οι οποίες είναι ασταθείς και μετασχηματίζονται σε ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου. Οι ινδολικές αυτές ενώσεις που παράγονται κατά την υδρόλυση των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για τον άνθρωπο καθώς έχουν μεγάλη χημειοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση. (Τσέκος, 2004)



Εικόνα 9: Συνοπτική απεικόνιση βιοσύνθεσης και υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων.

1.5 Η επίδραση της θειικής λίπανσης στην συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων

Παρατηρώντας την δομή των γλυκοσινολικών οξέων, είναι φανερό ότι το άζωτο και το θείο παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιοσύνθεσή τους. Σε ένα μόριο γλυκοσινολικού οξέος, βρίσκονται τουλάχιστον δύο άτομα θείου, ένα από το μόριο της κυστεΐνης και ένα από την θειική ομάδα, ενώ σε περίπτωση που το πρόδρομο αμινοξύ είναι η μεθειονίνη, στο γλυκοσινολικό οξύ θα περιέχεται και ένα τρίτο άτομο θείου.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η χορήγηση θείου με την λίπανση, προκαλεί αύξηση στην συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων, με περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε αύξηση στην συγκέντρωση των αλειφατικών γλυκοσινολικών

έως και δέκα φορές συγκριτικά με αυτή των φυτών όπου η λίπανση με θείο είχε διακοπεί μετά από τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας. Πειράματα σε κάποια φυτά, όπως το μπρόκολο όμως, έδειξαν ότι η λίπανση με θείο δεν έχει πάντα αποτελέσματα τέτοιας φύσεως, έχοντας περιπτώσεις όπου παρουσιάστηκε έως και μείωση της συγκέντρωσης των γλυκοσινολικών στους φυτικούς ιστούς.

Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες ρυθμίζουν τον μεταβολισμό 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. Επίσης, η αξιοποίηση του θείου από την λίπανση, εξαρτάται και από το είδος του εδάφους καλλιέργειας. Μετά από θειούχο λίπανση, φυτά που μεγαλώνουν σε έδαφος με ήδη υπάρχουσα επάρκεια θείου δεν παρουσιάζουν την ίδια αύξηση στην συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων σε σύγκριση με φυτά καλλιεργούμενα σε έδαφος με έλλειψη θείου (Withers and O'Donnell, 1994; Falk et al., 2007).

1.5.1. Μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των γλυκοσινολικών οξέων

Όσο αφορά την ρύθμιση των βιοσυνθετικών μονοπατιών των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο *HAG1* (High Aliphatic Glycosinolate 1) αναφερόμενο και ως *MYB28*, αποτελεί θετικό ρυθμιστή καθώς ενεργοποιεί τα γονίδια που εμπλέκονται στον σχηματισμό γλυκοσινολικών οξέων από μεθειονίνη. Εκτός από τον *HAG1/MYB28*, η δράση άλλων δύο μεταγραφικών παραγόντων, των *HAG2/MYB76* και *HAG3/MYB29*, έχει αποδειχθεί ότι έχει θετική επίδραση στην βιοσύνθεση των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων (Gigolashvili et al., 2007b ; Hirai et al., 2007).

Για την ρύθμιση των γλυκοσινολικών οξέων που προέρχονται από το αμινοξύ της τρυπτοφάνης, οι μεταγραφικοί παράγοντες *ATR1/MYB34* και *HIG/MYB51* έχουν ταυτοποιηθεί ως θετικοί ρυθμιστές της βιοσύνθεσης των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Κατά την παρούσα εργασία, εξετάστηκαν ιστοί από φυτά ρόκας που είχαν υποστεί διαφορετική μεταχείριση όσο αφορά την παροχή θείου κατά την ανάπτυξή τους. Με την ανάλυση των ιστών αυτών και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, γίνεται μία προσπάθεια να χαρακτηριστεί η οποιαδήποτε σχέση ανάμεσα στην συγκέντρωση των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων και στην ποσότητα του θείου που παρέχεται στα φυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικός ιστός και πειραματικό σχέδιο

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ιστοί φυτού ρόκας, *Eruca sativa*. Οι σπόροι των φυτών ξεπλένονται με χλωρίνη και υπόκεινται σε προβλάστηση σε τριβλία για δυο μέρες. Στην συνέχεια, τα φυτά μεταφέρονται σε 60 γλάστρες με αποστειρωμένο περλίτη και τοποθετούνται 50 φυτά σε κάθε γλάστρα.



Εικόνα 10: Σπόροι φυτού ρόκας

Για την διεξαγωγή του πειράματος, τα δείγματα χωρίζονται σε τρεις σειρές, όπου στην καθεμία αντιστοιχούν 20 γλάστρες. Οι μεταχειρίσεις αυτές αποτελούν το θετικό control, το αρνητικό control και την σειρά της επέμβασης, διαχωρισμένες ανάλογα με την σύσταση της λίπανσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία.

ml/L	Control (+)	Control (-)	treatment/after 9 days (+)
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	7	7	7
KNO ₃	5	5	5
KH ₂ PO ₄	2	2	2
MgSO ₄ 7H ₂ O	2	0.2	1.8
Trace Elements	1	1	1
Fe (EDTA)	1	1	1
MgCl ₂ 6H ₂ O		1.6	0.25

Πίνακας 1: Σύσταση λίπανσης των τριών μεταχειρίσεων

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τέσσερις δειγματοληψίες, στις 9, 12, 20 και 30 ημέρες μετά την φύτευση των σποριόφυτων. Σε κάθε δειγματοληψία, συλλέχθηκε ιστός από τα φύλλα και από τις ρίζες των δειγμάτων, και στην συνέχεια διατηρήθηκε σε δοχεία falcon με υγρό άζωτο έως την μεταφορά του στον χώρο του εργαστηρίου.



Εικόνα 11: Φυτό ρόκας 40 ημερών

2.2. Μοριακή μελέτη

2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ιστός από βλαστούς, φύλλα και ρίζες που συλλέχθηκαν κατά τις δειγματοληψίες και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80 °C. Μετά από ομογενοποίηση του φυτικού ιστού σε γουδί λειοτρίβησης με υγρό άζωτο χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Plant Mini Kit της Qiagen ώστε να γίνει απομόνωση του RNA, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας :

- Ζύγιση 100 mg φυτικού ιστού για κάθε δείγμα και τοποθέτηση σε σωλήνα erpendorf .
- Προσθήκη β-Μερκαπτοαιθανόλης στο buffer RLT (παρέχεται στο kit) σε τελική συγκέντρωση 5%.
- Προσθήκη 450 μl του ανωτέρω διαλύματος στο σωλήνα erpendorf 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 erpendorf
- 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 μ l 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 μ l RNase free water
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 στροφές

Το RNA που παραλαμβάνεται μετά τη φυγοκέντρηση αποθηκεύεται στους -80°C

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

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η κύρια μέθοδος διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και απομόνωσης μορίων DNA, καθώς είναι γρήγορη απλή και ικανή στον διαχωρισμό μιγμάτων τμημάτων DNA που δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν με κάποια άλλη τεχνική. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται συνήθως σε οριζόντιο επίπεδο υπό ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης. Η ηλεκτροφοριστική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα της αγαρόζης καθορίζεται κυρίως από το μέγεθός του, την στερεοδιάταξή του, την ένταση του ρεύματος και την συγκέντρωση της αγαρόζης. Το μόριο του DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο σε περιβάλλον ουδέτερου pH, θα πρέπει να διατρέξει, μέσω των πόρων του πυκτώματος προς το θετικό ηλεκτρόδιο της συσκευής. Τα μικρότερα μόρια θα συναντήσουν μικρότερη αντίσταση από τους πόρους, συνεπώς θα κινηθούν με μεγαλύτερη ταχύτητα από τα μεγαλύτερα μόρια DNA. Με αυτόν τον τρόπο, σχηματίζονται στο πύκτωμα ζώνες από τα μόρια διαφορετικού μεγέθους, οι οποίες είναι εύκολα διακριτές με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου και υπεριώδους φωτός. Το εύρος των μεγεθών που είναι δυνατόν να διαχωρισθούν σε μία τυπική συγκέντρωση αγαρόζης 0.8% είναι ανάμεσα σε 1 έως 12 kb.

Υλικά

Αγαρόζη: Ανάλογα με την συγκέντρωση της αγαρόζης, το πήκτωμα αποκτά διαφορετική διαχωριστική ικανότητα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογη με την κινητικότητα ενός κομματιού DNA.

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x: 24,2%(w/v) Tris, 57,1 ml/lit acetic acid, 100 ml 0,5M EDTA Σε ορισμένο όγκο διαλύματος 1xTAE προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση του πηκτώματος, 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 αγαρόζης 1% προστίθεται 1g αγαρόζης σε 100 gr διαλύματος 1xTAE.

Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10x: περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανού του ξυλενίου και 35% γλυκερόλη. Φορτώνεται μαζί με το DNA για να διευκολύνει την καθίζησή του και για να προσφέρει μία ένδειξη του που βρίσκεται το DNA ανά πάσα στιγμή στο πήκτωμα.

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): Χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR σε ορατές ζώνες. Έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA και φθορίζει σε ανοιχτό κόκκινο με την ακτινοβολία υπεριώδους φωτός. Παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης 0.5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C.

Μάρτυρας (Ladder): Χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μεγέθους DNA αντιστοιχώντας τη ζώνη που βρίσκεται προς εξέταση με ζώνες του μάρτυρα.

Μέθοδος

- Ζυγίζουμε την απαιτούμενη ποσότητα σκόνης αγαρόζης ώστε να παρασκευάσουμε πήκτωμα με την επιθυμητή συγκέντρωση.
- Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε την αγαρόζη και το ρυθμιστικό διάλυμα TAE.

- Το υλικό θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί εντελώς η αγαρόζη. Στην συνέχεια, κατεβάζουμε την θερμοκρασία μέχρι τους 50 °C περίπου.
- Προστίθεται 0,007 % v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αναμιγνύεται καλά.
- Το διάλυμα μεταφέρεται στην βάση της ηλεκτροφοριστικής συσκευής όπου εφαρμόζεται η ειδική «χτένα» ώστε να δημιουργηθούν υποδοχείς για τοποθέτηση των δειγμάτων.
- Γίνεται έλεγχος του διαλύματος για τυχών ύπαρξη φυσαλίδων και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σταθεροποιηθεί για περίπου 30 λεπτά.
- 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 τοποθετείται ο μάρτυρας.
- Εφαρμόζεται η επιθυμητή τάση ρεύματος στη συσκευή και τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/ cm.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης μπορούμε να παρατηρήσουμε το διαχωρισμό των ζωνών του DNA, με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης, χρησιμοποιώντας υπεριώδες φως μπορούμε να φωτογραφήσουμε το πηκτώμα.

2.2.3. Υδρόλυση του γονιδιωματικού DNA με τη χρήση του ενζύμου DNase

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να απομακρυνθεί τυχόν γονιδιωματικό DNA που ίσως να έχει απομείνει μαζί με τον RNA που έχει απομονωθεί από τον ιστό του δείγματος. 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 °C
 - Προστίθενται 170 μl ddH₂O 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 CH₃COONa 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 ddH₂O
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση 1 μl κάθε δείγματος σε πηκτική αгарόζης συγκέντρωσης 1,5%.

2.2.4. Σύνθεση cDNA

- Σε σωλήνα erpendorf τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά :
 - Ολικό RNA 10 μl
 - ddH₂O 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 errendorf αφήνεται για 10 λεπτά στους 25 °C, ακολουθεί επώαση στους 65 °C για 60 λεπτά και στους 70 °C για 15 λεπτά.

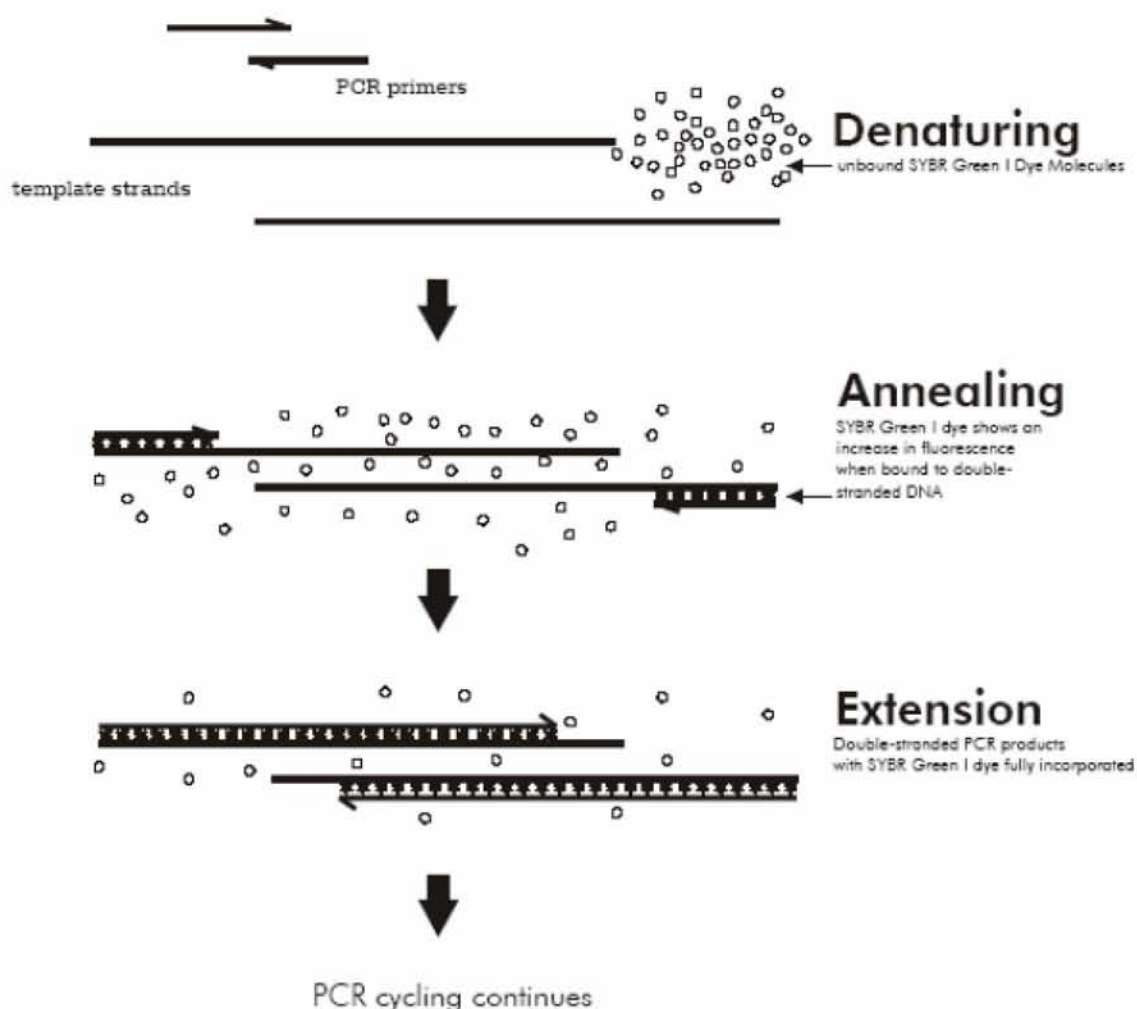
2.2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, Πραγματικού Χρόνου (Real time PCR)

Η μέθοδος της PCR πραγματικού χρόνου είναι μία μέθοδος ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA που μας επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη την διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα της παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης δίνεται λόγω της χρήσης μιας χρωστικής της οποίας το επίπεδο φθορισμού είναι μετρήσιμο από ένα ειδικό φωτόμετρο στα 520 nm, και αυξάνεται ανάλογα με την πρόσδεσή της στα δίκλινα μόρια του DNA. Με αυτόν τον τρόπο, στο τέλος του κάθε κύκλου της αντίδρασης, το επίπεδο φθορισμού μετρείται από έναν ρομποτικό σαρωτή με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) από την οποία λαμβάνονται ποσοτικά αποτελέσματα σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η αύξηση του σήματος του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του DNA που χρησιμοποιείται κατά την έναρξη της PCR.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (όπως είναι τα dNTPs, οι εκκινητές και η πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (δίνοντας έτσι 100%

αποδοτικότητα). Κατά την γραμμική φάση, κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στην φάση αυτή, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau).

Για την σωστή διεκπεραίωση της Real Time PCR απαιτείται προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινιτών και προσεκτικός χειρισμός των αντιδραστηρίων κατά την διάρκεια των πειραμάτων καθώς η χρωστική που χρησιμοποιείται παράγει φθορισμό όταν προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA.



Εικόνα 12 : Σχηματική απεικόνιση της πρόσδεσης της χρωστικής SYBR Green στο δίκλωνο DNA κατά την αντίδραση Real Time PCR.

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ήταν :

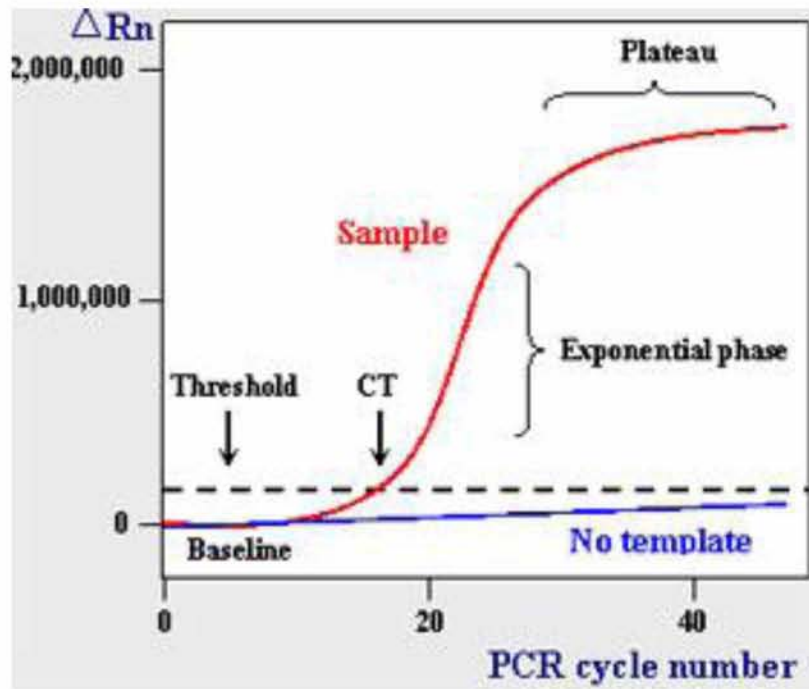
ΖΕΥΓΗ ΕΚΚΙΝΙΤΩΝ
UBQ.RTF/UBQ.RTR 5'-CCG ACA CCA TTG ACA ACG-3'/ 5'-TCC AGC GAA GAT GAG ACG-3'
RtCYP79F1.F/RtCYP79F1.R 5'-AAG AGG AGA GGG TGA GAG-3'/5'-CGT ATC AAT CCA ATC TTC AAC-3'
RtCYP83A1.F / RtCYP83A1.R 5' –CGA GAG ATA AGG AAG ATG-3'/5'- CCA CTA CAA TAT CCA AGA-3'
MAM1.RTF/MAM1.RTR 5'-ACT CCA CCG CAG AAG ATT G-3'/ 5'-CCT CAT CCA CCT CGT TTC C-3'

Πίνακας 2 : Ζεύγη εκκινιτών των προς μελέτη γονιδίων για την αντίδραση της Real Time PCR

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. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).



Εικόνα 63 : Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μετρήθηκε η σχετική έκφραση τριών γονιδίων σε ιστούς των φύλλων φυτών ρόκας (*Eruca sativa*). Τα συγκεκριμένα φυτά έχουν αναπτυχθεί σε περιβάλλον ελεγχόμενης παροχής θείου μέσω της λίπανσης η οποία περιγράφηκε στον Πίνακα 1.

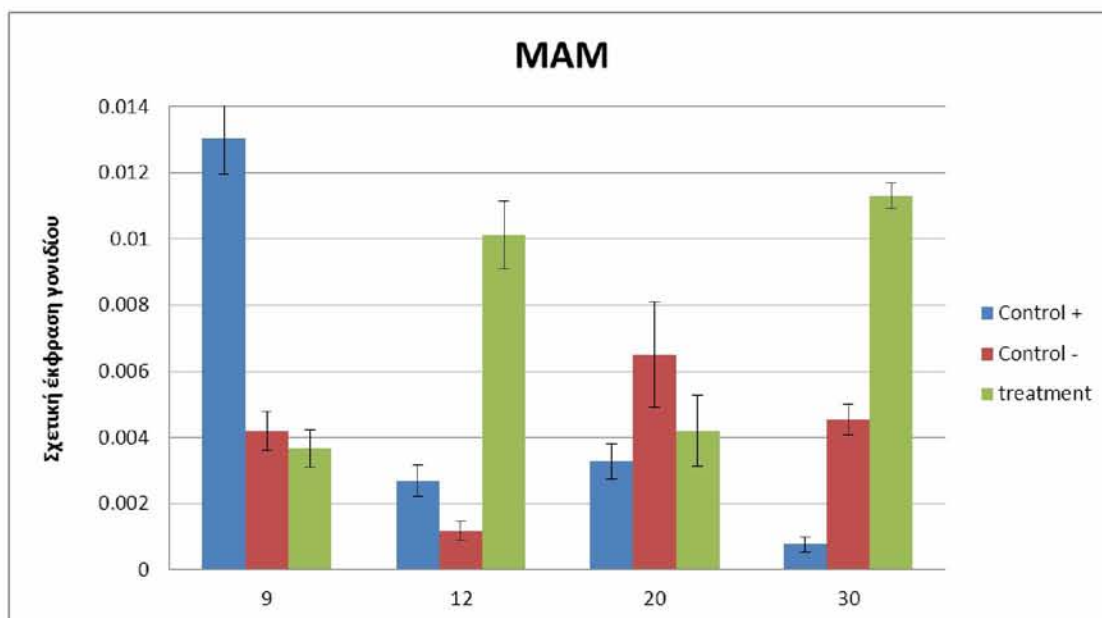
Τα τρία γονίδια που μελετήθηκαν είναι αυτά που κωδικοποιούν τα ένζυμα της συνθάση του μεθυλθειοαλκυλμηλικού (*MAM*), του *CYP79F1* και του *CYP83A1*. Τα ένζυμα αυτά, παίζουν ρόλο στην βιοσύνθεση των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων.

Κατά την διάρκεια προηγούμενων πειραμάτων στο εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματός Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, οι αλληλουχίες πλήρους μήκους που σχετίζονται με τα γονίδια αυτά απομονώθηκαν με επιτυχία. Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα αυτά, επιλέχθηκαν οι εκκινητές που αναγράφονται στον Πίνακα 2, για την μελέτη της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στα φυτά που καλλιεργήθηκαν κατά την διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος. Με την μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου, προσδιορίσθηκε ποσοτικά η συσσώρευση των μεταγραφημάτων των τριών αυτών γονιδίων. Η κανονικοποίηση του ολικού RNA για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη εφαρμογή της μεθόδου για το γονίδιο σταθερής έκφρασης της ουβικουΐίνης του φυτού *Arabidopsis thaliana*.

3.1 Η επίδραση της λίπανσης θείου στην έκφραση των γονιδίων *MAM*, *CYP79F1* και *CYP83A1*

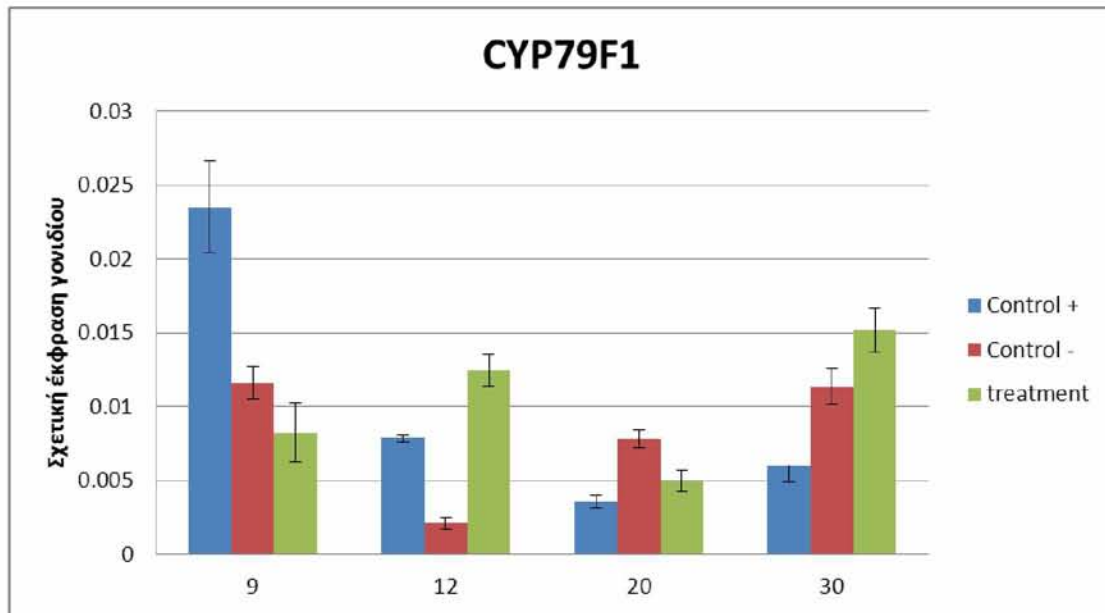
Παρατηρώντας το Διάγραμμα 1 όπου απεικονίζεται η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τα ένζυμα *MAM*, φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην η έκφρασή του και στην συγκέντρωση του θείου, ιδιαίτερα κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών. Κάτι τέτοιο υποστηρίζεται από την μεγάλη διαφορά ανάμεσα στο θετικό και αρνητικό control στα αποτελέσματα

της πρώτης δειγματοληψίας και από τον τριπλασιασμό της σχετικής έκφρασης του *MAM* μετά την 9^η ημέρα στην σειρά της επέμβασης, όπου η αύξηση της έκφρασης συμπίπτει με την εκκίνηση της θειικής λίπανσης.



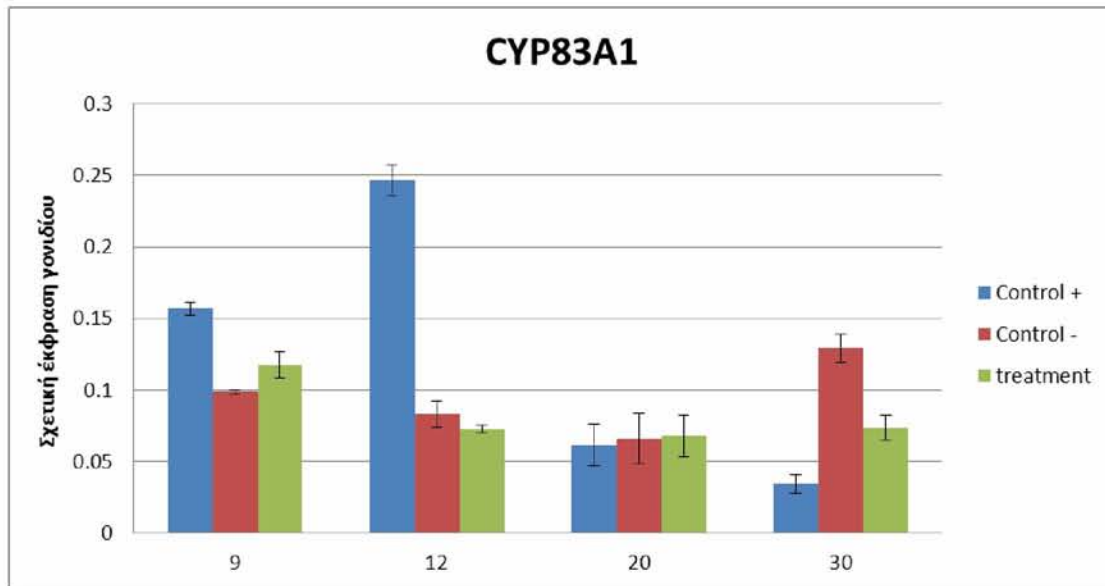
Διάγραμμα 1 : Η μεταβολή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *MAM* στο Θετικό Control , το Αρνητικό Control και την επέμβαση (treatment/after 9 days +). Στον οριζόντιο άξονα αναγράφονται οι μέρες των δειγματοληψιών (9^η, 12^η, 20^η και 30^η)

Όσο αφορά την έκφραση του γονιδίου *CYP79F1* (Διάγραμμα 2), υπάρχει κάποια ομοιότητα με αυτή του γονιδίου *MAM* κατά το διάστημα των πρώτων 12 ημερών, με την συγκέντρωση του θείου στην λίπανση να φαίνεται ότι επηρεάζει την ποσότητα του ενζύμου. Στα αποτελέσματα της δειγματοληψίας που έγινε την 20^η ημέρα καλλιέργειας όμως, παρατηρείται μείωση της έκφρασης του γονιδίου στις σειρές που υπήρχε παροχή θείου και μετέπειτα αύξησή τους στο διάστημα των 20 με 30 ημερών.



Διάγραμμα 2 : Η μεταβολή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *CYP79F1* στο Θετικό Control , το Αρνητικό Control και την επέμβαση (treatment/after 9 days +). Στον οριζόντιο άξονα αναγράφονται οι μέρες των δειγματοληψιών (9η, 12η, 20η και 30η)

Στο Διάγραμμα 3 φαίνονται τα αποτελέσματα που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *CYP83A*. Στην περίπτωση αυτή, η μεγαλύτερη μεταβολή στην σχετική έκφραση παρατηρείται στο διάστημα των 9 έως 12 ημερών όπου η ποσότητα του *CYP83A1* στο θετικό control εμφανίζει σημαντική αύξηση. Όσο αφορά την έκφραση στην επέμβαση, μετά την μείωση που παρατηρείται στην δειγματοληψία των 12 ημερών τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζουν μικρή μεταβολή έως τις 30 ημέρες.



Διάγραμμα 3 : Η μεταβολή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *CYP83A1* στο Θετικό Control , το Αρνητικό Control και την επέμβαση (treatment/after 9 days +). Στον οριζόντιο άξονα αναγράφονται οι μέρες των δειγματοληψιών (9η, 12η, 20η και 30η)

3.2 Συζήτηση

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα των θετικών και αρνητικών control, παρατηρούμε ότι η έκφραση των γονιδίων *MAM*, *CYP79F1* και *CYP83A1* επηρεάζεται από την συγκέντρωση του θείου στην λίπανση. Και για τα τρία γονίδια, η έκφρασή τους εμφανίζεται μειωμένη στα φυτά των σειρών που στερούνταν θείο χωρίς όμως αυτό να συνεχίζεται καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων.

Ανάμεσα στην 12^η και την 20^η μέρα της καλλιέργειας, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στα φυτά που καλλιεργήθηκαν υπό έλλειψη θείου σε σχέση με αυτά στα οποία παρέχόταν σταθερά μέσω της λίπανσης, με την έκφραση των *CYP79F1* και *CYP83A1* να αυξάνεται και μετά την 20^η ημέρα στο αρνητικό control. Αυτό ίσως οφείλεται στην διαφορετική αξιοποίηση των θρεπτικών στοιχείων ανάλογα με την πάροδο του χρόνου και τις ανάγκες του φυτού. Διαφορετικά, η αύξηση αυτή θα μπορούσε να αιτιολογηθεί με την προσαρμοστικότητα που εμφανίζουν τα φυτά στο περιβάλλον με χαμηλή συγκέντρωση θείου, αυξάνοντας την αποδοτικότητα της απορρόφησης του ή μειώνοντας τον ρυθμό καταβολισμού των γλυκοσινολικών οξέων.

Στην σειρά των φυτών των οποίων η λίπανση περιείχε θείο μετά την 9^η ημέρα καλλιέργειας, εμφανίζεται αύξηση της έκφρασης στα γονίδια *MAM* και *CYP79F1* στο χρονικό διάστημα ανάμεσα στην 9^η και την 12^η ημέρα αλλά κάτι τέτοιο δεν ισχύει και για την έκφραση του γονιδίου *CYP83A1*. Και στα τρία γονίδια όμως υπάρχει αύξηση της έκφρασης από την 20^η έως την 30^η ημέρα καλλιέργειας.

Μελετώντας την βιοσυνθετική πορεία των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων, είναι αναμενόμενη η συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων. Σε γενικές γραμμές, μία τέτοια αναλογική σχέση παρατηρείται στα παρόντα αποτελέσματα, με την έκφραση των γονιδίων των δύο πρώτων βιοσυνθετικών βημάτων να μεταβάλετε με παρόμοιο τρόπο ανά δειγματοληψία και ανά σειρά. Στις περιπτώσεις που δεν παρατηρείται κάτι τέτοιο θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται στον σχηματισμό των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων όπως το πως επηρεάζεται η κατανομή του θείου στους διάφορους μεταβολίτες από την γενική κατάσταση θρέψης του φυτού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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., Tokuhsa, 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.
- Bustin, S. A.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-193.

- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W.** (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**, 597-601.
- 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., Merrih, 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.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., et al.** (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**, 95-125.128
- 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 Elolemy, 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.
- Skiryecz, 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 Tokuhiya, 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.