

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΑΤΣΑΡΟΥ



**ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ  
ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *Eruca sativa***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΑΤΣΑΡΟΥ**

**ΓΕΩΠΟΝΟΣ, MSc**

**ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΩΝ  
ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *Eruca sativa***

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2013**

**ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ  
ΦΥΤΟ *Eruca sativa***

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **Παπαδοπούλου Καλλιόπη (επιβλέπουσα)**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος**

Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους,  
Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Γεωπονικό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

### **Χαραλαμπίδης Κοσμάς**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών,  
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **Καρπούζας Δημήτριος**

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Λιαδάκη Καλλιόπη**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος**

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους,  
Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Γεωπονικό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

### **Ομήρου Μιχάλης**

Ερευνητής, Λειτουργός Πρώτης Βαθμίδας-Κλάδου Αγροβιοτεχνολογίας,  
Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών Κύπρου

### **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Χαραλαμπίδης Κοσμάς**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών,  
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΑΤΣΑΡΟΥ**

**ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ  
ΦΥΤΟ *Eruca sativa***

*Στους γονείς και την αδερφή μου*

*Σε όσους επιμένουν στην αναζήτηση της γνώσης,  
με την ελπίδα να νιώσουν κάποτε αληθινά ελεύθεροι*

*«γνώσεσθε τὴν ἀλήθειαν καὶ ἡ ἀλήθεια ἐλευθερώσει ὑμᾶς» (Ἰωάν. η´ 32)*

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΑΤΣΑΡΟΥ**

**2013**

**ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ  
ΦΥΤΟ *Eruca sativa***

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 23

Συνολικός αριθμός σελίδων: 310

Αριθμός πινάκων: 21

Αριθμός εικόνων: 89

Αριθμός παραρτημάτων: 4

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 345

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το φυτό *Eruca sativa* (ρόκα) αποτελεί μέλος της οικογένειας των Brassicaceae, που μεταξύ άλλων έχουν ως χαρακτηριστικό την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που ονομάζονται γλυκοσινολικά οξέα (glucosinolates) (ΓΚΣ). Οι ενώσεις αυτές έχουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες που εκτείνονται από την άμυνα των φυτών έναντι διαφόρων εχθρών και παθογόνων μικροοργανισμών, μέχρι τη χημειοπροφύλαξη στον άνθρωπο.

Το μονοπάτι της βιοσύνθεσής τους είναι γνωστό στο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, το οποίο ανήκει στην παραπάνω οικογένεια. Η πλειοψηφία των αλληλουχιών των γονιδίων που συμμετέχουν έχει αποκαλυφθεί, όπως επίσης και ο ρόλος τους.

Στην παρούσα διατριβή απομονώθηκαν αλληλουχίες γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ στο φυτό *Eruca sativa*. Αυτό κατέστη δυνατό με *in silico* διερεύνηση των διαθέσιμων αλληλουχιών από άλλα φυτά της ίδιας οικογένειας με σκοπό το σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών και τη χρήση τους σε αντίδραση PCR. Η τεχνική 5'/3' RACE ολοκλήρωσε το αποτέλεσμα και έτσι εν τέλει απομονώθηκαν 15 αλληλουχίες, 12 από αυτές πλήρους μήκους (full-length) που σχετίζονται με βιοσυνθετικά γονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων. Στη συνέχεια έγινε κατασκευή φυλογενετικών δέντρων στα οποία χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική ακολουθία, όπου οι απομονωθείσες αλληλουχίες συγκρίνονται με άλλες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια γονιδίων. Τρεις από τις αλληλουχίες πλήρους μήκους κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης με σκοπό την απομόνωση της πρωτεΐνης που προκύπτει. Παρατηρήθηκε μεγάλη ομοιότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των γονιδίων που απομονώθηκαν και των αντιστίχων τους από άλλα φυτά με τα οποία συγκρίθηκαν. Οι ομοιότητες φτάνουν ακόμα και το 95%, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό είναι πάνω από 85%, ενισχύοντας την υπόθεση για την ταυτότητα των γονιδίων που απομονώθηκαν. Ενδιαφέρον είναι ότι τα ποσοστά ομοιότητας είναι πάντα μεγαλύτερα όταν οι αλληλουχίες με τις οποίες γίνεται η σύγκριση προέρχονται από φυτά του γένους *Brassica*. Επίσης, από τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν φαίνεται η ομαδοποίηση των γονιδίων μαζί με τα υπόλοιπα της ίδιας οικογένειας στην οποία κατά περίπτωση ανήκουν. Τέλος, η υπερέκφραση των γονιδίων και η απομόνωση της αντίστοιχης πρωτεΐνης δείχνει τη λειτουργικότητα των γονιδίων που απομονώθηκαν.

Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ σχεδιάστηκαν δύο πειραματικές προσεγγίσεις που αφορούν στη χορήγηση αζώτου και θείου (βασικά δομικά στοιχεία των ΓΚΣ) στα φυτά. Στην πρώτη στόχος ήταν να εξεταστεί η περίπτωση που α)το άζωτο, β)το θείο και γ)και τα δυο μαζί είναι μειωμένα καθ'όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών. Στη δεύτερη μελετήθηκε η περίπτωση της συνθήκης μειωμένου θείου μόνο κατά τις πρώτες μέρες της ανάπτυξης των φυτών. Συλλέχθηκαν ιστοί φύλλων και ρίζας από όλες τις περιπτώσεις για εξαγωγή ολικού RNA και κατασκευή cDNA αλυσίδας και



μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων με PCR πραγματικού χρόνου (real-time). Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν έδειξαν να επηρεάζουν σημαντικά το μεταγραφικό προφίλ. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό έδειξε συσχέτιση με αντίστοιχα δεδομένα μεταβολικού προφίλ.

Εκχυλίσματα από τους ιστούς των φυτών που αναπτύχθηκαν υπό διαφορετικά επίπεδα λίπανσης δοκιμάστηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση στην ανάπτυξη καρκινικών κύτταρων των σειρών HeLa, MCF7 και HepG2. Τα περισσότερα εκχυλίσματα παρουσίασαν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και καταγράφηκε διαφοροποίηση της βιολογικής δράσης των εκχυλισμάτων ανάλογα με τα επίπεδα λίπανσης. Επιπλέον, έγινε κλασμάτωση των εκχυλισμάτων με σκοπό τον εμπλουτισμό τους σε γλυκοσινολικά οξέα και εκ νέου επώαση με κύτταρα των προαναφερθέντων κυτταρικών σειρών. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα εκχυλίσματα διατήρησαν ή αύξησαν την ικανότητα αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας από το Μάιο του 2009 υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Βιοτεχνολογίας Φυτών και Καλλιότης Παπαδοπούλου. Εστιάστηκε κυρίως στην απομόνωση γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων στο φυτό *Eruca sativa* και μελέτη της έκφρασής τους σε φυτά που αναπτύσσονται σε διαφορετικές συνθήκες χορήγησης αζώτου και θείου. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση εκχυλισμάτων από τα ίδια φυτά σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα.

Η ρόκα (*Eruca sativa*) είναι ένα γηγενές μεσογειακό φυτό μεγάλης οικονομικής σημασίας, που καλλιεργείται σχεδόν παγκοσμίως με προοπτικές βελτίωσης, εξάπλωσης και υιοθέτησής του ως εναλλακτική καλλιέργεια. Η όσο το δυνατόν ολοκληρωμένη γνώση για τα βασικά θέματα της φυσιολογίας του φυτού και ο χαρακτηρισμός της γενετικής σύστασης του φυτογενετικού υλικού, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη νέων εργαλείων συγκριτικής μελέτης γονιδιωμάτων μπορούν να επιτρέψουν τη διαμόρφωση των αρχικών συνιστωσών που απαιτούνται προς μια τέτοια κατεύθυνση. Η ρόκα είναι φυτό πλούσιο σε γλυκοσινολικά οξέα αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει διερευνηθεί το κομμάτι της βιοσύνθεσής τους. Η κατανόηση των αναπτυξιακών, ρυθμιστικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που διέπουν την παραγωγή γλυκοσινολικών οξέων σε συνδυασμό με την πραγματοποίηση βιοδοκιμών για τη βιολογική δράση των βιοδραστικών αυτών μορίων, θα επιτρέψει όχι μόνο τη βελτίωση της παραγωγής αλλά και των ποιοτικών χαρακτηριστικών πολύτιμων μεταβολιτών των φυτών. Το τελευταίο, είναι και το ζητούμενο σε ότι αφορά την αύξηση της διατροφικής αξίας φυτών όπως η *Eruca sativa*, που προάγουν την ανθρώπινη υγεία. Επίσης, τα βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά μεταβολιτών αποτελούν σημαντική παράμετρο για την αποδοτικότερη χρήση τους από τη βιομηχανία που μερικώς ή αποκλειστικώς χρησιμοποιεί δευτερογενείς μεταβολίτες στη σειρά των προϊόντων τους, πράγμα που απαιτεί τεχνογνωσία για την ανάπτυξη της καινοτομίας τους και της ανταγωνιστικότητάς τους στο επίπεδο των διαδικασιών κλίμακας που τις αφορούν. Ξεκινώντας μια τέτοια έρευνα, ήταν απαραίτητο να απομονωθούν αρχικά κάποιες αλληλουχίες (ESTs) που να

σχετίζονται με βιοσυνθετικά γονίδια, ώστε στη συνέχεια να μελετηθούν εκτενώς και να απομονωθεί η πρωτεΐνη που κωδικοποιούν, ώστε να ακολουθήσει ο βιοχημικός χαρακτηρισμός τους. Το γονιδίωμα της ρόκας δεν είναι γνωστό, ωστόσο αλληλουχίες βιοσυνθετικών γονιδίων του γλυκοσινολικού μονοπατιού άλλων φυτών είναι διαθέσιμες σε γονιδιακές βάσεις δεδομένων. Η *in silico* μελέτη τους αποτέλεσε τη βάση για την απομόνωση των αντίστοιχων γονιδίων στη ρόκα.

Σημαντικό σε μια τέτοια μελέτη είναι η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους γίνεται ο έλεγχος του μεταβολισμού. Δεδομένης της γνώσης ότι τα στοιχεία άζωτο και θείο επηρεάζουν το μεταβολικό προφίλ έγινε προσπάθεια αυτό να συσχετιστεί και με το μεταγραφικό προφίλ. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η έκφραση των βιοσυνθετικών γονιδίων σε διαφορετικές συνθήκες χορήγησης αζώτου και θείου. Επιπλέον, για να υπάρχει ολοκληρωμένη εικόνα, η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά στο υπέργειο από το υπόγειο τμήμα του φυτού.

Λόγω των ιδιοτήτων των προϊόντων της υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων που σχετίζονται με τον καρκίνο, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η δράση των εκχυλισμάτων σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές κυττάρων. Τα εκχυλίσματα απομονώθηκαν από φύλλα και ρίζες φυτών που μεγάλωσαν σε διαφορετικές συνθήκες χορήγησης θείου και αζώτου και διερευνήθηκε η επίδρασή τους στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων σε κάθε περίπτωση.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διατριβής, αναπληρώτρια καθηγήτρια Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να κάνω κοντά της αυτό το επιπλέον βήμα στις σπουδές μου. Όλα αυτά τα χρόνια που είχα τη χαρά να δουλεύω μαζί της, υπήρξε για μένα όχι μόνο δασκάλα και σύμβουλος, αλλά και πρότυπο εργατικότητας, επιστήμονα και ανθρώπου. Με τίμησε με την εμπιστοσύνη της, η οποία όντας αμοιβαία συνετέλεσε στο να αναπτυχθεί μια σχέση αγαστής συνεργασίας και ειλικρινούς ενδιαφέροντος. Την ευχαριστώ για τη συνεχή καθοδήγηση, την ανεκτίμητη επιστημονική βοήθεια, αλλά και την αμέριστη συμπαράσταση σε ανθρώπινο επίπεδο.

Ευχαριστώ θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή Κωνσταντίνο Οιχαλιώτη και τον επίκουρο καθηγητή Κοσμά Χαραλαμπίδη, μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, για τις χρήσιμες συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους. Επίσης, ευχαριστώ τον καθηγητή Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο για τη συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή, καθώς και όλα τα μέλη της επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση του έργου μου. Μεταξύ αυτών, ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Δημήτρη Καρπούζα για την πολύχρονη και εποικοδομητική συνεργασία μας στον εργαστηριακό χώρο και τη συνεχή του παρουσία σε αυτόν.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον διδάκτορα Μιχάλη Ομήρου, ερευνητή στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών της Κύπρου για τη βοήθεια στην ανάλυση των μεταβολιτών που έγινε στο εργαστήριό του αλλά και όλη την υπόλοιπη υποστήριξη. Εξίσου χρήσιμη αποδείχτηκε και η επιστημονική συνδρομή της επίκουρου καθηγήτριας Καλλιόπης Λιαδάκη, στην πραγματοποίηση ενός αρκετά ενδιαφέροντος τμήματος των πειραμάτων που έγινε στο εργαστήριο κυτταροκαλλιεργειών του τμήματος. Τους ευχαριστώ ολόψυχα και τους δύο για την υπομονή και το χρόνο τους, την ενθάρρυνση, τις γνώσεις που μου μετέδωσαν και την ευχάριστη εμπειρία της συνεργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον καθηγητή εφαρμογών στο ΤΕΙ Πελοποννήσου και πρώην μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου Κώστα Δελη για την καθοριστική συνεισφορά του στη διεξαγωγή των πρώτων πειραμάτων και

τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Επίσης, ευχαριστώ τη διδάκτορα Δανιέλα Τσίκου για τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθειά της, αλλά και τη διδάκτορα Ζωή Καρούλια για την καθοδήγηση και τις υποδείξεις της στα πειράματα που αφορούσαν στην υπερέκφραση και τον καθαρισμό πρωτεϊνών.

Κι επειδή ένα διδακτορικό είναι μεν μοναχικός δρόμος αλλά πολλά πράγματα στην καθημερινότητα του εργαστηρίου απαιτούν ομαδική προσπάθεια, θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την πολύχρονη και δημιουργική συνύπαρξή μας. Ιδιαίτερα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω τη «συνοδοιπόρο» διδάκτορα Αφροδίτη Κροκιδά για την άψογη συνεργασία, τη συνεννόηση, αλλά και τη σχέση αλληλοβοήθειας που αναπτύχθηκε μεταξύ μας, η οποία έκανε αρκετές φορές τη ζωή μου πιο εύκολη. Ευχαριστώ και τα μέλη των υπόλοιπων εργαστηρίων του τμήματος για την προθυμία να βοηθήσουν όποτε χρειάστηκε.

Σημαντική όλα αυτά τα χρόνια υπήρξε η παρουσία στη ζωή μου ανθρώπων που με τη φιλία και την κατανόησή τους βοηθούσαν να ξεπερνάω τις διάφορες δυσκολίες που προέκυπταν. Θέλω από καρδιάς να ευχαριστήσω τον «αδερφό» Θεόφιλο Δάτσιο, που στάθηκε δίπλα μου ακόμα και σε δύσκολες γι'αυτόν συγκυρίες, δίνοντάς μου κουράγιο και δύναμη να συνεχίσω, αλλά και την πολύτιμη φίλη και συνάδελφο Ζωή Καρούλια, που με βοήθησε και με στήριξε όσο κανείς, ακόμα κι όταν αυτό γινόταν υπερατλαντικά. Επίσης, ευχαριστώ για την υποστήριξή τους τα ξαδέρφια μου Γιώργο Κατσαρό και Χριστίνα Χρυσάκη, τις φίλες μου Αγγελική και Αναστασία, τον Δημήτρη, καθώς και όλη τη «φτελιοπαρέα».

Όσα ευχαριστώ και να πω θα είναι λίγα για τους γονείς μου Κωνσταντίνο κι Ευαγγελία, αλλά και την αδερφή μου Χαρούλα. Εκτός του ότι οικονομικά υπήρξαν οι «χορηγοί» της προσπάθειάς μου, χωρίς την ηθική υποστήριξη και την αγάπη τους δε θα είχα καταφέρει τίποτα. Τους χρωστάω απέραντη ευγνωμοσύνη για όλα.

Δήμητρα Κ. Κατσαρού

Κρασιά Ελασσόνας, Νοέμβριος 2013

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |           |
|---|-----------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....  | V         |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....  | VIII      |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....   | X         |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....   | XVI       |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....   | XVIII     |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.</u></b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1. Η ρόκα και τα είδη της</b> .....  | <b>2</b>  |
| 1.1. Γενικά.....  | 2         |
| 1.2. Είδη.....  | 2         |
| <b>2. Η οικογένεια Brassicaceae και τα μέλη της</b> .....   | <b>6</b>  |
| 2.1. Γενικά.....  | 6         |
| 2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 6         |
| 2.3. <i>Brassica rapa</i> .....   | 8         |
| 2.4. <i>Brassica napus</i> .....  | 9         |
| <b>3. <i>Eruca sativa</i></b> .....   | <b>9</b>  |
| 3.1. Ταξινόμηση.....  | 10        |
| 3.2. Βοτανικά χαρακτηριστικά.....   | 11        |
| 3.3. Ιδιότητες .....  | 12        |
| <b>4. Δευτερογενείς μεταβολίτες</b> .....   | <b>13</b> |
| 4.1. Γενικά - ιδιότητες.....  | 13        |
| 4.2. Διάκριση δευτερογενών μεταβολιτών .....  | 15        |
| <b>5. Γλυκοσινολικά οξέα</b> .....  | <b>16</b> |
| 5.1. Δομή .....   | 16        |
| 5.2. Κατηγορίες Γλυκοσινολικών Οξέων.....   | 18        |
| 5.3. Υδρόλυση ΓΚΣ .....   | 19        |
| 5.4. Ιδιότητες των γλυκοσινολικών οξέων και των προϊόντων υδρόλυσής τους .....                              | 22        |
| 5.4.1. Στα φυτά .....   | 22        |
| 5.4.2. Στον άνθρωπο.....  | 24        |
| <b>6. Βιοσύνθεση και βιοσυνθετικά γονίδια</b> .....   | <b>27</b> |
| 6.1. Ταυτοποίηση βιοσυνθετικών γονιδίων στο <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                               | 27        |
| 6.2. Γενικά.....  | 28        |
| 6.3. Πρώτο βιοσυνθετικό στάδιο .....  | 29        |
| 6.3.1. Απαμίνωση και τρανσαμίνωση (πρώτο και πέμπτο βήμα) .....   | 31        |
| 6.3.2. Συμπύκνωση με ακετυλο-συνένζυμοΑ (δεύτερο βήμα) .....  | 31        |
| 6.3.3. Ισομερισμός (τρίτο βήμα).....  | 32        |
| 6.3.4. Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση (τέταρτο βήμα).....   | 32        |
| 6.3.5. Διαμερισματοποίηση και ανάγκη μεταφορέων των ενδιάμεσων προϊόντων .....                              | 33        |
| 6.4. Δεύτερο βιοσυνθετικό στάδιο.....   | 34        |
| 6.4.1. Οξείδωση (πρώτο και δεύτερο βήμα) .....  | 35        |
| 6.4.2. Σχηματισμός S-αλκυλ-θειοϋδροξυμικών ενώσεων και θειοϋδροξυμικών οξέων (τρίτο και τέταρτο βήμα) ..... | 37        |
| 6.4.3. Γλυκοσυλίωση και θείωση (πέμπτο και έκτο βήμα) .....   | 38        |
| 6.5. Τρίτο βιοσυνθετικό στάδιο.....   | 40        |
| 6.5.1. Δευτερογενείς τροποποιήσεις αλειφατικών .....  | 40        |
| 6.5.2. Δευτερογενείς τροποποιήσεις ινδολικών .....  | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.6. Βιοσυνθετικά γονίδια στο <i>Brassica rapa</i> .....  | 42        |
| <b>7. Ρύθμιση του μεταβολισμού των γλυκοσινολικών οξέων.....</b>  | <b>44</b> |
| 7.1 Γενικά.....   | 44        |
| 7.2. Μεταγραφικοί παράγοντες .....  | 46        |
| 7.2.1. Μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων .....   | 47        |
| 7.2.2. Μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των αλειφατικών γλυκοσινολικών οξέων ..... | 48        |
| <b>8. Επίδραση της λιπάνσης στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στους φυτικούς ιστούς .....</b>    | <b>50</b> |
| 8.1. Γενικά.....  | 50        |
| 8.2. Επίδραση του θείου .....   | 51        |
| 8.3. Επίδραση του αζώτου.....   | 53        |
| <b>9. Γλυκοσινολικά οξέα στο φυτό <i>Eruca sativa</i> .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. ....</b>   | <b>56</b> |
| <b>ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>1. Φυτικό υλικό-Πειράματα θρέψης.....</b>  | <b>57</b> |
| 1.1. Προετοιμασία των σπόρων .....  | 57        |
| 1.2. Πειραματικό σχέδιο - Λιπάνσεις .....   | 57        |
| 1.2.1 Πρώτο πείραμα (long-term starvation) .....  | 57        |
| 1.2.1.α Δειγματοληψία.....  | 59        |
| 1.2.2 Δεύτερο πείραμα (short-time starvation) .....   | 60        |
| 1.2.2.α. Δειγματοληψία.....   | 62        |
| <b>2. Μοριακή μελέτη .....</b>  | <b>62</b> |
| 2.1. Απομόνωση γονιδίων .....   | 62        |
| 2.1.1. Απομόνωση ολικού RNA.....  | 63        |
| 2.1.2. Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτή αγαρόζης.....   | 64        |
| 2.1.3. Υδρόλυση του γονιδιωματικού DNA με τη χρήση του ενζύμου DNaseI .....                             | 65        |
| 2.1.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....                               | 66        |
| 2.1.5. Σύνθεση cDNA - αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης.....    | 66        |
| 2.1.6. Αντίδραση PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA. ....   | 67        |
| 2.1.7. Επιλογή εκκινητών για την ενίσχυση γονιδίων της ρόκας .....                                      | 69        |
| 2.1.8. PCR για την ενίσχυση γονιδίων της ρόκας .....  | 69        |
| 2.1.9. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης .....   | 70        |
| 2.1.10 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμίδια.....   | 70        |
| 2.1.10.α. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό (competent cells).....               | 71        |
| 2.1.10.β. Κλωνοποίηση στο φορέα pGEM.....   | 72        |
| 2.1.10.γ. Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης (Ligation).....                           | 73        |
| 2.1.10.δ. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> (Transformation) .....                | 73        |
| 2.1.10.ε. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού (Boiling method) .....                    | 74        |
| 2.1.10.στ. Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού .....   | 75        |
| 2.1.10.ζ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....  | 76        |
| 2.1.11. Rapid Amplification of cDNA ends (3'/5' RACE) .....   | 76        |
| 2.1.11.α. 3' RACE .....   | 77        |
| 2.1.11.β. 5' RACE .....   | 78        |
| 2.1.12. Ανάλυση αλληλουχιών .....   | 81        |
| 2.1.13 Κατάθεση αλληλουχιών σε βάση δεδομένων .....   | 81        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.1.14. Διατήρηση κλώνων που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια .....                                   | 82         |
| 2.2. Κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορείς έκφρασης .....   | 82         |
| 2.2.1. Προετοιμασία των ενθεμάτων για κλωνοποίηση στο φορέα pGEM <sup>®</sup> -T Easy vector ..... | 83         |
| 2.2.2. Κλωνοποίηση στους φορείς pET49b και pGEX-4T-2 .....   | 83         |
| 2.2.3. Υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....   | 85         |
| 2.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) .....                                    | 86         |
| 2.2.4.α. Προετοιμασία της πηκτής .....   | 87         |
| 2.2.4.β. Προετοιμασία δειγμάτων .....  | 88         |
| 2.2.4.γ. Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου .....   | 89         |
| 2.2.5. Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....   | 89         |
| 2.2.5.α. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ιόντων νικελίου .....            | 89         |
| 2.2.5.β. Απομόνωση πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας αγκιστείας με γλουταθειόνη .....              | 91         |
| 2.3. Αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) .....  | 92         |
| 2.3.1. Γενικά .....  | 92         |
| 2.3.2. Επιλογή εκκινήτων .....   | 93         |
| 2.3.3. Η αντίδραση .....   | 94         |
| 2.3.4. Πειραματική διαδικασία .....  | 94         |
| <b>3. Μελέτη δράσης εκχυλισμάτων σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα .....</b>                          | <b>96</b>  |
| 3.1. Διαδικασία απομόνωσης των φυτικών εκχυλισμάτων .....  | 96         |
| 3.2. Καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών .....  | 99         |
| 3.2.1. Γενικά .....  | 99         |
| 3.2.2. Συντήρηση κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια .....  | 100        |
| 3.2.3. Πάγωμα και ξεπάγωμα των κυττάρων .....  | 101        |
| 3.3. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο ΧΤΤ .....                                   | 102        |
| 3.3.1. Αρχή της μεθόδου .....  | 102        |
| 3.3.2. Υπολογισμός αριθμού κυττάρων .....  | 103        |
| 3.3.3. Πειραματική διαδικασία .....  | 104        |
| 3.4. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....  | 106        |
| <b>4. Ανάλυση μεταβολιτών .....</b>  | <b>107</b> |
| 4.1 Φυτικό υλικό .....   | 107        |
| 4.2. Προσδιορισμός γλυκοσινολικών οξέων .....  | 107        |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.</u> .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>Εισαγωγικά .....</b>  | <b>110</b> |
| <b>1. Αποτελέσματα .....</b>   | <b>111</b> |
| 1.1. Απομόνωση γονιδίων .....  | 111        |
| 1.1.1. Οικογένεια γονιδίων <i>MAM</i> .....  | 112        |
| 1.1.2. Οικογένεια γονιδίων <i>CYP79</i> .....  | 115        |
| 1.1.3. Οικογένεια γονιδίων <i>CYP83</i> .....  | 117        |
| 1.1.4. Γονίδιο <i>SUR1</i> .....   | 119        |
| 1.1.5. Οικογένεια γονιδίων <i>FMOGSox</i> .....  | 121        |
| 1.1.6. Μεταγραφικοί παράγοντες <i>MYB</i> .....  | 122        |
| 1.2. Απομόνωση πρωτεϊνών .....   | 124        |
| 1.2.1. <i>EsCYP79B2</i> .....  | 125        |
| 1.2.2. <i>EsCYP83A1</i> και <i>EsCYP83B1</i> .....   | 131        |
| <b>2. Συζήτηση .....</b>   | <b>133</b> |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ.</u> .....</b>  | <b>145</b> |



|   |            |
|---|------------|
| <b>1<sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑ ΘΡΕΨΗΣ.....</b>  | <b>145</b> |
| <b>Εισαγωγικά.....</b>  | <b>146</b> |
| <b>1. Επίδραση της παροχής N και S στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των ΓΚΣ .....</b> | <b>147</b> |
| <b>1.1. Αποτελέσματα .....</b>  | <b>147</b> |
| 1.1.1. Έκφραση βιοσυνθετικών και ρυθμιστικών γονιδίων στα φύλλα.....  | 149        |
| 1.1.2. Έκφραση βιοσυνθετικών και ρυθμιστικών γονιδίων στις ρίζες .....                                      | 154        |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I - Μεταβολίτες.....  | 158        |
| 1.1.3. Συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων και των επιπέδων των μεταβολιτών....                             | 162        |
| 1.1.3.α Συσχέτιση στα φύλλα .....   | 163        |
| 1.1.3.β. Η περίπτωση του γονιδίου <i>EsFMO<sub>GS-OX5</sub></i> .....                                       | 165        |
| 1.1.3.γ. Συσχέτιση στις ρίζες.....  | 168        |
| <b>1.2. Συζήτηση.....</b>   | <b>170</b> |
| <b>2. Επίδραση εκχυλισμάτων ρόκας σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα .....</b>                                  | <b>189</b> |
| <b>2.1. Αποτελέσματα .....</b>  | <b>190</b> |
| 2.1.1. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa.....                                       | 190        |
| 2.1.2. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2.....                                      | 193        |
| 2.1.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF7 .....                                      | 195        |
| 2.1.4. Παρατηρήσεις.....  | 198        |
| <b>2.2. Συζήτηση.....</b>   | <b>201</b> |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε.....</u></b>   | <b>206</b> |
| <b>2ο ΠΕΙΡΑΜΑ ΘΡΕΨΗΣ .....</b>  | <b>206</b> |
| <b>1. Αποτελέσματα .....</b>  | <b>207</b> |
| 1.1. Έκφραση βιοσυνθετικών και ρυθμιστικών γονιδίων στα φύλλα .....   | 208        |
| 1.2. Έκφραση βιοσυνθετικών και ρυθμιστικών γονιδίων στις ρίζες .....  | 217        |
| <b>2. Συζήτηση.....</b>   | <b>224</b> |
| <b>ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>   | <b>230</b> |
| <b>Ζ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>   | <b>264</b> |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II - Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν .....   | 265        |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III - Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.....   | 269        |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV - DNA αλληλουχίες των γονιδίων που απομονώθηκαν .....  | 272        |
| <b><u>ABSTRACT .....</u></b>  | <b>285</b> |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|  |     |
|--|-----|
| Πίνακας Β1. Συστατικά των θρεπτικών διαλυμάτων πρώτου πειράματος και συγκεντρώσεις.....  | 58  |
| Πίνακας Β2. Συστατικά και συγκεντρώσεις stock διαλύματος ιχνοστοιχείων.....  | 59  |
| Πίνακας Β3. Συστατικά των θρεπτικών διαλυμάτων δεύτερου πειράματος και συγκεντρώσεις.....  | 61  |
| Πίνακας Β4. Πρόγραμμα PCR με KapaTaq πολυμεράση.....   | 68  |
| Πίνακας Β5. Πρόγραμμα PCR με Phusion High-Fidelity πολυμεράση.....   | 70  |
| Πίνακας Β6. Πρόγραμμα PCR πραγματικού χρόνου.....  | 94  |
| Πίνακας Β7. Τα δείγματα της κάθε μεταχείρισης, οι αρχικές τους ποσότητες και οι τελικές συγκεντρώσεις μετά την αποξήρανση.....   | 97  |
| Πίνακας Γ1. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου <i>EsMAM-1</i> που απομονώθηκε στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών του γονιδίων της οικογένειας <i>MAM</i> από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica oleracea</i> (πρόγραμμα BLAST).....  | 114 |
| Πίνακας Γ2. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου <i>EsMAM-2</i> που απομονώθηκε στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών του γονιδίων της οικογένειας <i>MAM</i> από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica oleracea</i> (πρόγραμμα BLAST).....  | 115 |
| Πίνακας Γ3. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων <i>EsCYP79F1</i> , <i>EsCYP79B2</i> και <i>EsCYP79B3</i> που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Sinapis alba</i> (πρόγραμμα BLAST)..... | 117 |
| Πίνακας Γ4. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων <i>EsCYP83A1</i> και <i>EsCYP83B1</i> που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica oleracea</i> (πρόγραμμα BLAST).....  | 119 |
| Πίνακας Γ5. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου <i>EsSUR1</i> που απομονώθηκε στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών του γονιδίων από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> και <i>Brassica rapa</i> (πρόγραμμα BLAST).....   | 120 |
| Πίνακας Γ6. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων της οικογένειας <i>FMOGS<sub>ox</sub></i> που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων της οικογένειας <i>FMOGS<sub>ox</sub></i> από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> και <i>Brassica rapa</i> (πρόγραμμα BLAST).....   | 122 |
| Πίνακας Γ7. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων <i>EsMYB34-1</i> , <i>EsMYB34-2</i> και <i>EsMYB34-3</i> που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων της οικογένειας <i>MYB34</i> από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> και <i>Brassica rapa</i> (πρόγραμμα BLAST).....   | 123 |
| Πίνακας Γ8. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων <i>EsMYB51-1</i> και <i>EsMYB51-2</i> που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων της οικογένειας <i>MYB51</i> από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> και <i>Brassica rapa</i> (πρόγραμμα BLAST).....  | 124 |
| Πίνακας Δ1. Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων γλυκοσινολικών σε φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε $\mu\text{mol/g dw}$ .....  | 159 |
| Πίνακας Δ2. Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων γλυκοσινολικών σε ρίζες των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε $\mu\text{mol/g dw}$ .....  | 159 |

|   |     |
|---|-----|
| Πίνακας Δ3. Συσχέτιση σχετικής έκφρασης γονιδίων και συγκέντρωσης μεταβολιτών στα φύλλα.....                  | 164 |
| Πίνακας Δ4. Συσχέτιση σχετικής έκφρασης γονιδίων και συγκέντρωσης μεταβολιτών στις ρίζες.....                 | 169 |
| Πίνακας Δ5. Συσχέτιση του ποσοστού αναστολής της κυτταρικής αύξησης με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα.....  | 200 |
| Πίνακας Δ6. Συσχέτιση του ποσοστού αναστολής της κυτταρικής αύξησης με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στις ρίζες..... | 201 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Εικόνα A1. <i>Eruca sativa</i> .....  | 3  |
| Εικόνα A2. <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (biolib.de).....  | 4  |
| Εικόνα A3. <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (biolib.de).....  | 5  |
| Εικόνα A4. Φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i> .....   | 7  |
| Εικόνα A5. Φυτό <i>Brassica rapa ssp. pekinensis</i> .....  | 8  |
| Εικόνα A6. Φυτό ελαιοκράμβης.....   | 9  |
| Εικόνα A7. Άνθος, φύλλα, λοβοί και σπέρματα <i>Eruca sativa</i> .....   | 11 |
| Εικόνα A8. Γενική δομή μορίου γλυκοσινολικού οξέος.....   | 17 |
| Εικόνα A9. Η βιοσύνθεση των τριών κατηγοριών γλυκοσινολικών οξέων έχει ως πρόδρομα μόρια αμινοξέα: τα αλειφατικά προκύπτουν κυρίως από μεθειονίνη (Met), τα αρωματικά κυρίως από φαινυλαλανίνη (Phe) και τα ινδολικά από τρυπτοφάνη (Trp).....  | 18 |
| Εικόνα A10. Απεικόνιση δομής μυροσινάσης από φυτό <i>Sinapis alba</i> (Protein Data Bank).....  | 20 |
| Εικόνα A11. (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)Νιτρίλια, 4)Επιθειονιτρίλια και 5)Θειοκυανικά οξέα (προσαρμογή από Wittstock & Halkier, 2002).....   | 21 |
| Εικόνα A12. Τα πέντε βήματα επιμήκυνσης της αλυσίδας της μεθειονίνης (α) μετατροπή της μεθειονίνης σε 2-οξο-οξύ με αντίδραση απαμίνωσης, ακολουθούν τρία βήματα επέκτασης της αλυσίδας με (β) αντίδραση συμπύκνωσης, (γ) αντίδραση ισομερισμού (δ) οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση και τέλος (ε) αντίδραση απαμίνωσης και σχηματισμός παραγώγου μεθειονίνης (προσαρμογή από Wittstock & Halkier, 2002).....  | 30 |
| Εικόνα A13. Οι αντιδράσεις του πρώτου βιοσυνθετικού σταδίου των αλειφατικών με τα εμπλεκόμενα ένζυμα στο <i>Arabidopsis thaliana</i> . Με κόκκινο χρώμα τα ένζυμα που αναλύθηκαν πρόσφατα ένζυμα, με μπλε τα παλιότερα, * = μερικώς χαρακτηρισμένα ένζυμα, ** = προβλεπόμενα ένζυμα (προσαρμογή από Sønderby et al., 2010).....   | 33 |
| Εικόνα A14. Τα βήματα της βιοσύνθεσης της κεντρική δομής των γλυκοσινολικών οξέων (α) οξειδωση αμινοξέος προς αλδοξίμη, (β) οξειδωση αλδοξίμης προς οξο-νιτρο ενώσεις ή οξειδία του νιτριλίου, (γ) σχηματισμός S-αλκυλ-θειοϋδροξιμικών ενώσεων, (δ) διάσπαση και σχηματισμός θειοϋδροξιμικών οξέων, (ε) γλυκοσυλίωση προς αποθειωμένα γλυκοσινολικά και (στ) θείωση και σχηματισμός πρωτογενών γλυκοσινολικών οξέων (προσαρμογή από Wittstock & Halkier, 2002)..... | 35 |
| Εικόνα A15. 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 (προσαρμογή από Wittstock & Halkier, 2002).....  | 36 |
| Εικόνα A16. Οι αντιδράσεις του δεύτερου βιοσυνθετικού σταδίου των αλειφατικών (δεξιά) και των ινδολικών (αριστερά) με τα εμπλεκόμενα ένζυμα στο <i>Arabidopsis thaliana</i> . Με κόκκινο χρώμα τα ένζυμα που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα, με μπλε τα παλιότερα, * = μερικώς χαρακτηρισμένα ένζυμα, ** = προβλεπόμενα ένζυμα, ? = άγνωστα ένζυμα (προσαρμογή από Sønderby et al., 2010).....  | 39 |
| Εικόνα A17. Οι αντιδράσεις του τρίτου βιοσυνθετικού σταδίου των αλειφατικών (δεξιά) και των ινδολικών (αριστερά) με τα εμπλεκόμενα ένζυμα στο <i>Arabidopsis thaliana</i> . Με κόκκινο χρώμα τα πιο πρόσφατα ανακαλυφθέντα ένζυμα, με μπλε τα παλιότερα, * = μερικώς χαρακτηρισμένα ένζυμα, ** = προβλεπόμενα ένζυμα, ? = άγνωστα ένζυμα (Sønderby et al., 2010).....   | 40 |

|  |     |
|--|-----|
| Εικόνα A18. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των τριών κατηγοριών γλυκοσινολικών οξέων στο <i>Brassica rapa</i> , τα εμπλεκόμενα σε κάθε βήμα γονίδια και ο αριθμός των αντιγράφων τους σε παρένθεση (Zang et al., 2009).....   | 43  |
| Εικόνα A19. Οι χημικές δομές των κυριότερων ΓΚΣ που ανιχνεύονται στο φυτό <i>Eruca sativa</i> : glucoraphanin (GRA), glucoerucin (GER), gluconarin (GNA), glucosativin (GSV), glucobrassicin (GBS) και 4-methoxy-glucobrassicin (4-MeO-GBS).....   | 55  |
| Εικόνα B1. Φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος την ημέρα της δειγματοληψίας.....  | 60  |
| Εικόνα B2. Χρονοδιάγραμμα 2ου πειράματος θρέψης.....   | 61  |
| Εικόνα B3. Χάρτης του φορέα pGEM <sup>®</sup> -T Easy vector .....   | 72  |
| Εικόνα B4. Σχηματική επισκόπηση της μεθόδου 3' RACE (Roche).....   | 78  |
| Εικόνα B5. Σχηματική επισκόπηση της μεθόδου 5' RACE (Roche).....   | 80  |
| Εικόνα B6. Χάρτης του φορέα pET49b.....  | 84  |
| Εικόνα B7. Χάρτης του φορέα pGEX-4T-2.....   | 84  |
| Εικόνα B8. Ιστός φύλλων πριν και μετά την αποξηήρανση.....   | 96  |
| Εικόνα B9. Συμπυκνωμένα εκχυλίσματα.....   | 97  |
| Εικόνα B10. Τα τέσσερα διαδοχικά κλάσματα μετά τις εκλούσεις από τη στήλη Sephadex G50.....  | 98  |
| Εικόνα B11. Δομή τετραζολίου ΧΤΤ και φορμαζάνης.....   | 103 |
| Εικόνα Γ1. Εικόνα Γ1. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων <i>MAM</i> (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica oleracea</i> , ενώ σε μαύρο πλαίσιο τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή.....                | 113 |
| Εικόνα Γ2. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων <i>CYP79</i> (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Brassica oleracea</i> , ενώ σε μαύρο πλαίσιο τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή..... | 116 |
| Εικόνα Γ3. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων <i>CYP83</i> (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica oleracea</i> , ενώ σε μαύρο πλαίσιο τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή.....                         | 118 |
| Εικόνα Γ4. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων <i>SUR1</i> (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> , <i>Brassica rapa</i> , ενώ σε μαύρο πλαίσιο το γονίδιο που απομονώθηκε στην παρούσα διατριβή.....  | 120 |
| Εικόνα Γ5. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων <i>FMOGS<sub>ox</sub></i> (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> και <i>Brassica rapa</i> , ενώ σε μαύρο πλαίσιο τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή.....   | 121 |
| Εικόνα Γ6. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων <i>MYB</i> (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη <i>Arabidopsis thaliana</i> και <i>Brassica rapa</i> , ενώ σε μαύρο πλαίσιο τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή.....  | 123 |
| Εικόνα Γ7. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής διαφορετικών συνθηκών υπερέκφρασης της πρωτεΐνης EsCYP79B2 με χρήση του φορέα pET49b. Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....   | 125 |

|  |     |
|--|-----|
| Εικόνα Γ8. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής διαφορετικών συνθηκών υπερέκφρασης της πρωτεΐνης EsCYP79B2 με χρήση του φορέα pET49b μετά από έλεγχο στο ίζημα (μη διαλυτές πρωτεΐνες). Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....   | 126 |
| Εικόνα Γ9. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται ξεχωριστά για το διαλυτό τμήμα και το ίζημα τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (EsCYP79B2) με χρήση του φορέα pET49b στις ιδανικές συνθήκες που καθορίστηκαν μετά από τις δοκιμές (1mM IPTG, 28°C, 12 ώρες, 125 στροφές/λεπτό). Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....   | 127 |
| Εικόνα Γ10. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται τα κλάσματα που προέκυψαν μετά τη διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης CYP79B2 με χρήση στήλης νικελίου. Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....   | 128 |
| Εικόνα Γ11. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνεται η σύγκριση διαλυτού τμήματος και ιζήματος μετά από υπερέκφραση της πρωτεΐνης EsCYP79B2 με χρήση του φορέα pGEX4T-2 και σε συνθήκες που καθορίστηκαν μετά από δοκιμές (1mM IPTG, 37°C, 3 ώρες, 200 στροφές/λεπτό). Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....   | 129 |
| Εικόνα Γ12. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνεται η σύγκριση διαλυτού τμήματος και ιζήματος μετά από υπερέκφραση της πρωτεΐνης EsCYP79B2 με χρήση του φορέα pGEX4T-2 σε συνθήκες που καθορίστηκαν μετά από δοκιμές (1mM IPTG, 37°C, 3 ώρες, 200 στροφές/λεπτό) και μετά από χειρισμό με lauryl sarcosine. Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....   | 130 |
| Εικόνα Γ13. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται τα κλάσματα που προέκυψαν μετά από τη διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης EsCYP79B2 με χρήση στήλης GST. Φορέας pGEX4T-2. Συνθήκες: 1mM IPTG, 37°C, 3 ώρες, 200 στροφές/λεπτό. Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....  | 131 |
| Εικόνα Γ14. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται τα κλάσματα που προέκυψαν μετά από τη διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης EsCYP83A1 με χρήση στήλης GST. Φορέας pET49b. Συνθήκες: 1mM IPTG, 28°C, 12 ώρες, 125 στροφές/λεπτό. Αναμενόμενη ζώνη στα 81 kDa (MW EsCYP83A1: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....   | 132 |
| Εικόνα Γ15. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται τα κλάσματα που προέκυψαν μετά από τη διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης EsCYP83B1 με χρήση στήλης GST. Φορέας pET49b. Συνθήκες: 1mM IPTG, 28°C, 12 ώρες, 125 στροφές/λεπτό. Αναμενόμενη ζώνη στα 81 kDa (MW EsCYP83A1: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa).....   | 133 |
| Εικόνα Γ16. Οι αντιδράσεις των τριών σταδίων της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ με τα βιοσυνθετικά γονίδια που απομονώθηκαν στην <i>Eruca sativa</i> . (MTAGSL methyl thioalkyl GSL, 4-MSB-GSL 4-methyl sulfinyl butyl GSL, 4-OHB-GSL 4-hydroxy butyl GSL, 3-but-GSL 3-butenyl GSL, 2-OH-3-but-GSL 2-hydroxy-3-butenyl GSL, I3M indol-3-yl-methyl GSL, 1-OH-I3M 1-hydroxy I3M, 4-OH-I3M 4-hydroxy I3M, 1-M-I3M 1-methoxy I3M, 4-M-I3M 4-methoxy I3M)..... | 142 |
| Εικόνα Δ1. Μέση τιμή νωπού βάρους (σε γραμμάρια) των φυτικών ιστών της κάθε ομάδας-μεταχείρισης.....   | 148 |
| Εικόνα Δ2. Σχετική έκφραση (α) των αλειφατικών και (β) των ινδολικών γονιδίων σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....   | 151 |
| Εικόνα Δ3. Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>EsSUR1</i> σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....   | 152 |
| Εικόνα Δ4. Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>EsFMOGS<sub>0x-5</sub></i> σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....   | 153 |
| Εικόνα Δ5. Σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων <i>EsMYB34-1</i> και <i>EsMYB51-1</i> σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....  | 153 |
| Εικόνα Δ6. Σχετική έκφραση (α) των αλειφατικών και (β) των ινδολικών γονιδίων σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....   | 155 |

|   |     |
|---|-----|
| Εικόνα Δ7. Σχετική έκφραση γονιδίου <i>EsSUR1</i> σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....  | 157 |
| Εικόνα Δ8. Σχετική έκφραση γονιδίου <i>EsFMOGS<sub>OX-5</sub></i> σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....  | 157 |
| Εικόνα Δ9. Σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων <i>EsMYB34-1</i> και <i>EsMYB51-1</i> σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....   | 159 |
| Εικόνα Δ10. Οι συγκεντρώσεις όλων των γλυκοσινολικών που ανιχνεύτηκαν σε φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε $\mu\text{mol/gdw}$ .....   | 160 |
| Εικόνα Δ11. Οι συγκεντρώσεις των αλειφατικών και ινδολικών γλυκοσινολικών χωριστά σε φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC .....  | 160 |
| Εικόνα Δ12. Οι συγκεντρώσεις όλων των γλυκοσινολικών που ανιχνεύτηκαν σε ρίζες των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε $\mu\text{mol/g dw}$ .....  | 161 |
| Εικόνα Δ13. Οι συγκεντρώσεις των αλειφατικών και ινδολικών γλυκοσινολικών χωριστά σε ρίζες των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC.....   | 161 |
| Εικόνα Δ14. Οι συγκεντρώσεις του κάθε τύπου ΓΚΣ από αυτά που ανιχνεύτηκαν α) σε φύλλα και β) σε ρίζες των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε $\mu\text{mol/g dw}$ .....   | 162 |
| Εικόνα Δ15. Η αναλογία συγκεντρώσεων GER/GRA σε κάθε τύπο ιστού και μεταχείρισης.....   | 162 |
| Εικόνα Δ16. Η συγκέντρωση της GRA στα φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος..   | 166 |
| Εικόνα Δ17. Η σχετική έκφραση του γονιδίου <i>EsFMO<sub>GS-OX5</sub></i> στα φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος.....   | 166 |
| Εικόνα Δ18. Η έκφραση του <i>EsFMO<sub>GS-OX5</sub></i> προς το λόγο GRA/GER.....   | 167 |
| Εικόνα Δ19. Η συγκέντρωση της GER ως προς την έκφραση του <i>EsFMO<sub>GS-OX5</sub></i> και η συγκέντρωση της GRA ως προς την έκφραση του <i>EsFMO<sub>GS-OX</sub></i> .....  | 167 |
| Εικόνα Δ20. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στα φύλλα της μεταχείρισης -N/+S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). (Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε- αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή)..... | 179 |
| Εικόνα Δ21. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στα φύλλα της μεταχείρισης +N/-S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). (Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε- αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή)..... | 180 |
| Εικόνα Δ22. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στα φύλλα της μεταχείρισης -N/-S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). (Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε-αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή).....  | 181 |
| Εικόνα Δ23. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στις ρίζες της μεταχείρισης -N/+S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). (Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε-αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή)..... | 184 |
| Εικόνα Δ24. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στις ρίζες της μεταχείρισης -N/+S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της   |     |

|   |     |
|---|-----|
| συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). (Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε-αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή).....   | 185 |
| Εικόνα Δ25. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στις ρίζες της μεταχείρισης -N/+S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). (Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε-αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή).....   | 186 |
| Εικόνα Δ26. Τα μονοπάτια της βιοσύνθεσης ινδολικών ΓΚΣ και ινδολυλοξικού οξέος (IAA).....   | 188 |
| Εικόνα Δ27. (α) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων HeLa μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων από φυτά των διαφορετικών μεταχειρίσεων. (β) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων HeLa μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . (γ) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων HeLa μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με μεθανόλη.....  | 191 |
| Εικόνα Δ28. (α) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων από φυτά των διαφορετικών μεταχειρίσεων. (β) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . (γ) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με μεθανόλη.....   | 194 |
| Εικόνα Δ29. (α) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων MCF7 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων από φυτά των διαφορετικών μεταχειρίσεων. (β) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων MCF7 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . (γ) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων MCF7 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με μεθανόλη.....  | 197 |
| Εικόνα E1. Σχετική έκφραση των αλειφατικών γονιδίων σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων (n=3) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.....                   | 210 |
| Εικόνα E2. Σχετική έκφραση των ινδολικών γονιδίων σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων (n=3) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.....                     | 212 |
| Εικόνα E3. Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>EsSUR1</i> σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων (n=3) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.....                 | 213 |
| Εικόνα E4. Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>EsFMOGS<sub>0x-5</sub></i> σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων (n=3) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών..... | 214 |
| Εικόνα E5. Σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων <i>EsMYB34-1</i> και <i>EsMYB51-1</i> σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων   |     |



|   |     |
|---|-----|
| της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.....  | 216 |
| Εικόνα Ε6. Σχετική έκφραση των αλειφατικών γονιδίων σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.....   | 218 |
| Εικόνα Ε7. Σχετική έκφραση των ινδολικών γονιδίων σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.....   | 219 |
| Εικόνα Ε8. Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>EsSUR1</i> σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.....   | 220 |
| Εικόνα Ε9. Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>EsFMOGS<sub>OX-5</sub></i> σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.....                         | 221 |
| Εικόνα Ε10. Σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων <i>EsMYB34-1</i> και <i>EsMYB51-1</i> σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD, $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών..... | 223 |
| Εικόνα Ε11. Απεικόνιση του βαθμού αλλαγής (fold change) της έκφραση των γονιδίων σε σχέση με την έκφραση στην κατάσταση πλήρους θρέψης. Οι διαβαθμίσεις στο χρωματισμό υποδηλώνουν το βαθμό αύξησης ή μείωσης (με πράσινο η αύξηση, με κίτρινο η μείωση).....   | 224 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## **1. Η ρόκα και τα είδη της**

### **1.1. Γενικά**

Η ονομασία «ρόκα» υποδηλώνει διάφορα είδη μέσα στην οικογένεια Brassicaceae, των οποίων τα φύλλα χαρακτηρίζονται από περισσότερο ή λιγότερο πικάντικη γεύση. Στις περισσότερες ευρωπαϊκές γλώσσες η λέξη που χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει αυτά τα είδη μάλλον φαίνεται να προέρχεται από τη ρίζα *roc*, που στα πρώιμα λατινικά σήμαινε «τραχύς, δριμύς», με πιθανή αναφορά στην πικρή γεύση των φύλλων, και από την οποία προήλθε το λατινικό όνομα *eruca* (Pignone, 1997). Αναφορές συναντάμε στην αρχαία ακόμα βιβλιογραφία και δη στην ελληνική, όπου χρησιμοποιείται το όνομα «εύζωμον» (Yaniv et al., 1998).

Τα φύλλα της ρόκας έχουν χρησιμοποιηθεί για χιλιάδες χρόνια ως βρώσιμα ή για την παραγωγή λαδιού, αποσμητικών και καλλυντικών, αλλά και για φαρμακευτικούς σκοπούς (Blangiforti & Venora 1997, Pratar & Gupta 2009). Θεωρείται πως έχει θεραπευτικές ιδιότητες και έχει αναφερθεί ότι διαθέτει αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική, διουρητική, αφροδισιακή και διεγερτική δράση. (Yaniv et al., 1998; Mahran et al., 1991).

Τα τελευταία χρόνια και κυρίως από το τελευταίο τέταρτο του προηγούμενου αιώνα και μετά, η ρόκα άρχισε να αναπτύσσεται ως ελκυστική εναλλακτική φυλλώδης καλλιέργεια. Αυτό συνέβη διότι αναπτύχθηκαν τα προϊόντα προστιθέμενης αξίας και παρουσιάστηκαν στην αγορά νέα φυλλώδη είδη, κυρίως καλλιέργειες που τα φύλλα τους συγκομίζονται νεαρά. Επίσης, συνετέλεσε το γεγονός ότι οι καταναλωτές όλο και περισσότερο άρχισαν να εστιάζουν τις προτιμήσεις τους στη θρεπτική αξία και ποιότητα των καλλιεργειών που καταναλώνουν (Ryder, 2002).

### **1.2. Είδη**

Ανάλογα με το είδος, την ποικιλία και το περιβάλλον παρατηρούνται παραλλαγές στη γεύση και στην οξύτητα της ρόκας. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Pignatti

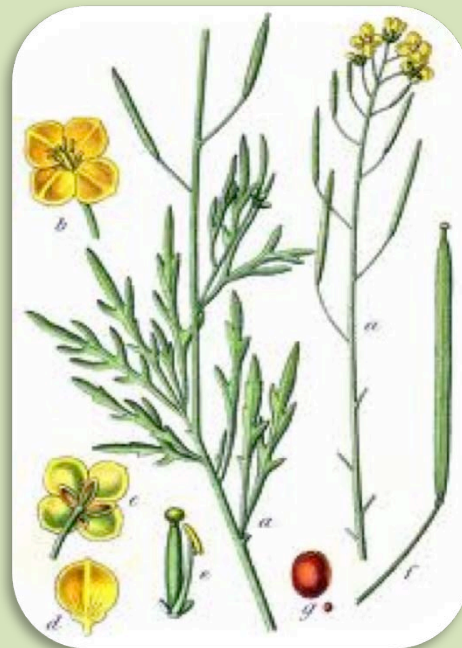
(Flora of Italy, 1982), στη λεκάνη της Μεσογείου απαντώνται κυρίως τα τρία παρακάτω είδη που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση (Pignone, 1997).

***Eruca sativa* Miller:** διπλοειδές, ετήσιο είδος, που ανθίζει την άνοιξη και του οποίου οι σπόροι είναι έτοιμοι για συγκομιδή αργά την άνοιξη (εικόνα A1). Φαίνεται να προτιμά μάλλον πλούσια εδάφη, ωστόσο φύεται μαζί με άλλα φυτά και σε περιθωριακές περιοχές. Συχνά καλλιεργείται, παρόλο που η διαδικασία της εξημέρωσης δεν μπορεί να θεωρηθεί ολοκληρωμένη. Ένας άγριος τύπος γνωστός σαν *Eruca vesicaria* (L.) Cav. απαντάται επίσης στη μεσογειακή χλωρίδα. Κάποιοι βοτανολόγοι δεν κάνουν διαχωρισμό μεταξύ των δύο, ή θεωρούν το *sativa* ως υποείδος του *vesicaria*.



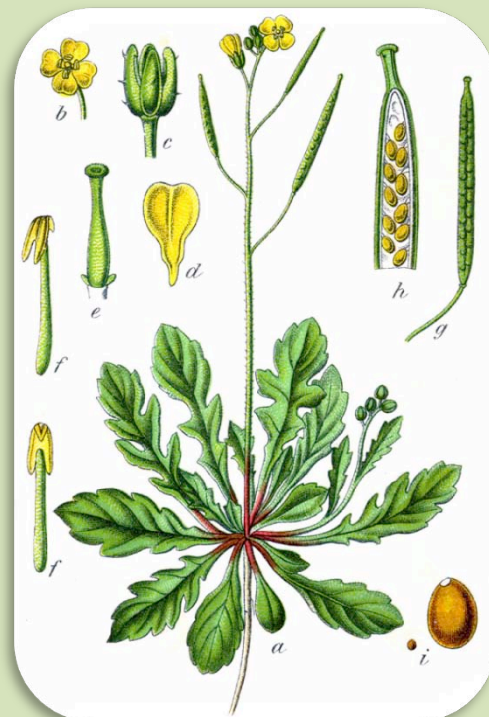
Εικόνα A1. *Eruca sativa*

***Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.** : διπλοειδές, πολυετές είδος, αφού από το ριζικό σύστημα του φυτού που έχει την ικανότητα να παραμένει λειτουργικό κατά την περίοδο του χειμώνα, παράγονται νέοι βλαστοί την επόμενη άνοιξη (εικόνα Α2). Ανθίζει προς το τέλος της άνοιξης ως το φθινόπωρο και οι σπόροι είναι γενικά έτοιμοι για συγκομιδή το φθινόπωρο. Φαίνεται ότι έχει προσαρμοστεί πολύ καλά σε φτωχά εδάφη και συχνά ανταγωνίζεται αποτελεσματικά άλλα φυτικά είδη σε ασβεστολιθικά, αβαθή εδάφη. Σε κάποιες περιοχές της Ιταλίας καλλιεργείται, αλλά περισσότερο συλλέγεται ως άγριο.



Εικόνα Α2. *Diplotaxis tenuifolia* (biolib.de)

*Diploaxis muralis* (L.) DC. : πολυπλοειδές, πολυετές είδος, όπως και το *D. tenuifolia* (εικόνα A3). Ανθίζει από το καλοκαίρι ως το φθινόπωρο και οι σπόροι συγκομίζονται το φθινόπωρο. Αναπτύσσεται σε παρόμοια περιβάλλοντα με το *D. tenuifolia* και συλλέγεται και αυτό ως άγριο. Η συστηματική καλλιέργειά του δεν είναι αποδοτική, λόγω της έρπουσας ανάπτυξής του, κύριο χαρακτηριστικό που το διαχωρίζει από το *D. tenuifolia*.



Εικόνα A3. *Diploaxis muralis* (biolib.de)

## **2. Η οικογένεια Brassicaceae και τα μέλη της**

### **2.1. Γενικά**

Η οικογένεια φυτών Brassicaceae ανήκει στην τάξη Brassicales και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών. Αυτή τη στιγμή αριθμεί 3709 είδη και 338 γένη (Rich, 1991; Warwick *et al.* 2006, 2009). Τα είδη αυτά είναι συνήθως ποώδη, μονοετή ή πολυετή και αποτελούν σημαντικές συστηματικές καλλιέργειες από τις οποίες παράγονται προϊόντα όπως ίνες, λάδια, καρκεύματα, λαχανικά ή σαλάτες (Gómez-Campo, 1980, 1999; Gómez-Campo & Prakash 1999).

Συγκεκριμένα στην οικογένεια Brassicaceae ανήκουν λαχανικά του γένους *Brassica* με κυριότερους αντιπρόσωπους το λάχανο, το μπρόκολο, το κουνουπίδι (*Brassica oleraceae*), την ελαιοκράμβη (*Brassica napus*), το κινέζικο λάχανο (*Brassica rapa*), καθώς και το ευρέως χρησιμοποιούμενο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana* (Halkier, 1999). Η παλιότερη ονομασία της οικογένειας ήταν Cruciferae και οφείλεται στη χαρακτηριστική διάταξη των τεσσάρων πετάλων του άνθους να τοποθετούνται σε ορθή γωνία μεταξύ τους (Σταυρανθή).

Βασικό χαρακτηριστικό των φυτών της οικογένειας αυτής 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 υδρόλυσης συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν τα φυτά αυτά. Οι μεταβολίτες αυτοί ονομάζονται γλυκοσινολικά οξέα. Η παρουσία των ενώσεων αυτών στα Σταυρανθή είναι τόσο σημαντικό γνώρισμα της οικογένειας, όσο και τα σχηματίζοντα σταυρό πέταλά τους.

### **2.2. *Arabidopsis thaliana***

Το σημαντικότερο από επιστημονική άποψη μέλος της οικογένειας των Brassicaceae αποτελεί το *Arabidopsis thaliana* (εικόνα A4) το οποίο αποτελεί το φυτό μοντέλο για σχεδόν όλα τα θέματα της βιολογίας των φυτών.

Είναι ένα μικρό δικοτυλήδονο σταυρανθές 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 τροποποιηθεί γενετικά και το γονιδίωμά του είναι ένα από τα μικρότερα μεταξύ των ανώτερων φυτών (125Mb), κάτι ιδιαίτερος σημαντικό για πρωταρχικές γονιδιωματικές αλληλουχίσεις. Ως εκ τούτου, το *A. thaliana* ήταν η επιλογή για να αποτελέσει το πρώτο φυτό στο οποίο θα γινόταν αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματός του. Έτσι το Δεκέμβριο του 2000 δημοσιεύτηκε η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματός του, σαν κορύφωση της προσπάθειας ετών μιας διεθνούς ομάδας (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).



Παρόλο που το *A. thaliana* δεν είναι καλλιεργούμενο φυτό, πολλές από τις διεργασίες (για παράδειγμα ασθένειες, αντίσταση στους εχθρούς και ανθεκτικότητα σε συνθήκες καταπόνησης) έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τα καλλιεργούμενα φυτά. Έτσι το *A. thaliana* προσφέρεται ως το ιδανικό εργαλείο για τους επιστήμονες που ασχολούνται με τη μελέτη των φυτικών οργανισμών για την κατανόηση αυτών των διεργασιών. (Slater et al., 2003).



### 2.3. *Brassica rapa*

Πρόκειται για ένα φυτό με μεγάλη συγγένεια με το *A. thaliana* που χρησιμοποιείται σαν φυτό μοντέλο για τη μελέτη της εξέλιξης του γονιδιώματος μέσω πολυπλοειδιών (Chang Pγο Hong et al., 2008). Το 2011 δημοσιεύτηκε η αλληλουχία του γονιδιώματός του (The Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium, 2011).



Εικόνα A5. Φυτά *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*

Το *B.rapa* περιλαμβάνει διάφορα υποείδη. Το *Brassica rapa* ssp. *rapa* ή *rapifera* που αναφέρεται με την ονομασία turnip (γογγύλι) καλλιεργείται στη Ευρώπη και την Ασία για ανθρώπινη κατανάλωση. Εδώδιμο είναι το υπόγειο τμήμα του φυτού (Kim et al., 2007). Το υποείδος *pekinensis* (εικόνα A5), που αναφέρεται και με την ονομασία κινέζικο λάχανο, καλλιεργείται για την κατανάλωσή του ως φυλλώδες λαχανικό και είναι μία από τις πιο διαδεδομένες καλλιέργειες λαχανικών στη βορειοανατολική Ασία (Fahey & Talalay, 1995).

#### 2.4. *Brassica napus*

Η ελαιοκράμβη (*Brassica napus*, εικόνα Α6), που επίσης ανήκει στην οικογένεια των Brassicaceae, είναι ένα αμφιδυπλοειδές είδος που προέρχεται από φυσική διασταύρωση του *Brassica oleracea* και του *Brassica rapa*.



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 & Harris, 1975; Murphy & Cummins 1989; Schwender & Ohlrogge, 2002). Επίσης ο σπόρος του είναι πλούσιος σε πρωτεΐνη με ποσοστό περίπου ίσο με 15%. (Gunstone et al., 1995).

#### 3. *Eruca sativa*

Είναι το φυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Ακολουθεί περιγραφή των χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων του.

### 3.1. Ταξινόμηση

Το φυτό ταξινομικά ανήκει:

- Βασίλειο Plantae
- Υποβασίλειο Tracheobionta
- Υπερσυνομοταξία Spermatophyta
- Συνομοταξία Magnoliophyta
- Ομοταξία Magnoliopsida
- Υφομοταξία Dilleniidae
- Τάξη Capparales
- Οικογένεια Brassicaceae
- Γένος *Eruca* Mill.



Υπάρχει διαφωνία για τον αριθμό των ειδών του γένους, η οποία βασίζεται στην ευκολία με την οποία τα μέλη μπορούν να διασταυρωθούν. Κάποιοι δέχονται μόνο ένα είδος, ενώ κάποιοι άλλοι μέχρι τέσσερα διαφορετικά (D'Antuono et al., 2008). Η μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα εμφανίζεται στο Μαρόκο και την Ισπανία (Pratap & Gupta 2009).

Το γένος είναι αυτόχθονο της λεκάνης της Μεσογείου (Pignone 1997, Pratap & Gupta 2009) και η μονοετής ρόκα (*Eruca sativa*) καλλιεργείται ως σαλάτα ή μπαχαρικό σε περιοχές της νοτίου Ευρώπης και της κεντρικής Ασίας για αιώνες (Ryder 2002, Pratap & Gupta 2009). Είναι το πιο γνωστό είδος του γένους και καλλιεργείται σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, την κεντρική Ευρώπη, το Αφγανιστάν, τη βόρεια Ινδία, την ηπειρωτική Αμερική, τη νότια Αφρική και την Αυστραλία (Pratap & Gupta 2009).

### 3.2. Βοτανικά χαρακτηριστικά

Είναι ποώδες φυτό, χαμηλής βλάστησης, που φτάνει τα 40 εκατοστά σε ύψος, και τα φύλλα του διατάσσονται σε ροζέττα (Pratar & Gurta 2009). Έχει λεπτό ριζικό σύστημα και άκαμπτο, σε μεγάλο βαθμό ευθύ στέλεχος. Τα φύλλα έχουν σκούρο πράσινο χρώμα και είναι μικρότερα από 20 εκατοστά. Ποικίλλουν στο σχήμα, από ομαλά και στρογγυλεμένα, έως αρκετά λοβωτά ή και οδοντωτά. Τα άνθη είναι μεγαλύτερα από ότι αυτά του γένους *Diplotaxis* και έχουν λευκό ως απαλό κίτρινο χρώμα με μωβ νευρώσεις. Έχουν τέσσερα πέταλα μήκους 15 έως 20 χιλιοστών σε διάταξη σταυρού και έξι στήμονες. Οι καρποί είναι λοβοί, ωοειδείς επιμήκεις ή επιμήκεις και φτάνουν τα 2 με 3 εκατοστά (Bianco, 1995). Τα σπέρματα είναι συνήθως καφέ αλλά μπορεί να συναντήσουμε από καφεκίτρινο μέχρι πράσινο της ελιάς (De Leonardis et al., 1997).



Το είδος παρουσιάζει 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).

### 3.3. Ιδιότητες

Στην αρχαιότητα υπήρξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις αφροδισιακές ιδιότητες της ρόκας (Hall et al., 2012), οι οποίες εξακολουθούν μέχρι και σήμερα να θεωρούνται άριστες (Pratap & Gupta 2009). Από την εποχή του Μεσαίωνα χρησιμοποιείται σε θεραπείες με βότανα λόγω της περιεκτικότητας της σε ενώσεις που διαθέτουν διουρητική, στυπτική, ενυδατική, αποτοξινωτική, αφροδισιακή και διεγερτική δράση (Urhof, 1968; Perry & Metzger, 1978; Yaniv et al., 1998).

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός μελετών εστιάζεται στις θεραπευτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες της ρόκας. Έχει αναφερθεί ότι αποτελεί σημαντική πηγή φλαβονοειδών, πολυφαινόλων και ασκορβικού οξέος, ενώσεων με πιθανή χημειοπροστατευτική δράση (Bennett et al., 2002, 2006, 2007; Barillari et al., 2005; Kim & Ishii, 2006; Heimler et al., 2007; Sarwar Alam et al., 2007). Μια μελέτη έδειξε ότι το εκχύλισμα αιθανόλης των σπόρων της ρόκας διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και επιδρά προστατευτικά στη νεφροτοξικότητα (Sarwar et al., 2007), ενώ πιθανή είναι η προστατευτική δράση στο έλκος στομάχου (Alqasoumi et al., 2009).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναφερθεί στις αντιβακτηριακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των σπερμάτων και του ελαίου που προκύπτει από την επεξεργασία τους (Khoobhandani et al., 2010; Gulfranz et al., 2011), που πιθανόν οφείλονται στο ερουκικό οξύ (Alam et al., 2007) και σε μια ομάδα ισοθειοκυανικών οξέων που βρίσκονται στα σπέρματα (Yehuda et al., 2009).

Υπάρχουν επίσης μελέτες που αποδίδουν στην *Eruca sativa* πιθανή προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου. Μια *in vitro* μελέτη έδειξε ότι εκχυλίσματα ρόκας προκαλούν αναστολή της ογκογένεσης σε ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα (HepG2) (Lamy et al., 2008). Άλλες *in vitro* μελέτες χρησιμοποιώντας ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα παρέχουν σημαντική

προστασία στο οξειδωτικό στρες των κυττάρων. Τέλος, το έλαιο των σπόρων ανέστειλλε την ανάπτυξη μελανώματος σε πειράματα *in vivo* (Khoobhandani et al. 2011).

#### **4. Δευτερογενείς μεταβολίτες**

##### **4.1. Γενικά - ιδιότητες**

Ως πρωτογενής μεταβολισμός ορίζεται η μεταβολική δραστηριότητα που οδηγεί στη σύνθεση των συστατικών που είναι απαραίτητα για τη συγκρότηση της θεμελιώδους δομής και διαμόρφωσης του τρόπου λειτουργίας των φυτικών κυττάρων. Ωστόσο, υπάρχουν μεταβολικά προϊόντα που προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και παράγονται μόνο σε επιμέρους ιστούς και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης. Αυτά τα βιομόρια συντίθενται μέσω βιοχημικών οδών που στο σύνολό τους συνιστούν το δευτερογενή μεταβολισμό (Καραμπουρνιώτης, 2003).

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 με τους πρωτογενείς μεταβολίτες που περιλαμβάνουν τη χλωροφύλλη, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, απλούς 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. Υπάρχουν βέβαια κάποιες εξαιρέσεις, όπου δευτερογενείς μεταβολίτες όπως για παράδειγμα τα καροτενοειδή, αποτελούν αναπόσπαστα συστατικά θεμελιωδών λειτουργιών. Γενικά πάντως, λόγω της μη αναγκαιότητάς τους στη διεξαγωγή των βασικών φυσιολογικών λειτουργιών που είναι κοινές για όλα τα φυτά, είχε θεωρηθεί ότι αποτελούν απόβλητα ή παραπροϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού. Σήμερα όμως είναι αποδεκτό πως η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται στενά με την ύπαρξη και λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών, αναγκαίων για την επιβίωση των φυτικών ειδών. (Καραμπουρνιώτης, 2003; Τσέκος, 2003).

Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στους φυτικούς οργανισμούς ποικίλλει και βασίζεται στις ιδιότητες τους. Συγκεκριμένα, η παρουσία τους συνεισφέρει στη διαμόρφωση της γεύσης των καρπών και στο χρώμα των ανθέων προσελκύοντας έτσι τους επικονιαστές. Επίσης προσδίδουν στα φυτά προστατευτικές ιδιότητες στα διάφορα παθογόνα, εχθρούς και ασθένειες ενώ ταυτόχρονα παρέχουν προστασία σε διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (Vogt 2010; Vranova et al. 2012). Επιπλέον, έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί από τον άνθρωπο ως πηγή φυσικών αρωμάτων και σύνθεσης φαρμακευτικών παρασκευασμάτων (He and Giusti 2010; Kroymann 2011; Duan et al. 2012).

Χαρακτηριστικό των δευτερογενών μεταβολιτών είναι η εξαιρετικά μεγάλη χημική τους ποικιλότητα. Περισσότερα από 36000 τερπενοειδή, 12000 αλκαλοειδή, και 10000 φλαβονοειδή έχουν βρεθεί, παρόλο που αυτό αντιπροσωπεύει μόνο ένα μικρό τμήμα αυτών που υπάρχουν στη φύση (Chen et al. 2007; Fang 2011). Η ποικιλότητα αυτή είναι αναμενόμενη αφού οι ενώσεις αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οικολογία και προσαρμογή των φυτών στα διάφορα περιβάλλοντα και αρκετές φορές είναι το αποτέλεσμα της εξέλιξης των φυτικών οργανισμών. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό τους που τους ξεχωρίζει από τους πρωτογενείς μεταβολίτες, 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, ενώ βασικοί πρωτογενείς μεταβολίτες απαντώνται σε ολόκληρο το φυτικό βασίλειο (Τσέκος, 2003).

Για παράδειγμα στο *Arabidopsis* παράγονται πάνω από 170 δευτερογενείς μεταβολίτες, όπου συμπεριλαμβάνονται περίπου 50 τερπένια, 25 βενζοειδή και 20 φαινυλπροπανοειδή (D'Auria and Gershenzon, 2005). Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές έχουν ξεκινήσει να αποκαλύψουν 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).

#### 4.2. Διάκριση δευτερογενών μεταβολιτών

Δομικά και βιοσυνθετικά οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κύριες ομάδες : τερπένια, φαινολικές ενώσεις και ενώσεις που περιέχουν άζωτο (Croteau et al., 2000).

Τα τερπένια είναι μια ομάδα που περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, των οποίων η δομή περιλαμβάνει μία ή περισσότερες C5 μονάδες ισοπρενίου. Συντίθενται διαμέσου δύο πιθανών μονοπατιών, του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (MEV-mevalonate) ή του μονοπατιού της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (MEP- methylerythritol phosphate) (Rohmer, 1999).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι πανταχού παρούσες στο φυτικό βασίλειο και συντίθενται από πρόδρομες ενώσεις οι οποίες παράγονται από το μονοπάτι των φαινυλπροπανοειδών. Δομικά, περιλαμβάνουν ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο συζευγμένο με μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Σαν ομάδα είναι πολυποίκλη και συμπεριλαμβάνει φαινυλπροπανοειδή, κουμαρίνες, φλαβονοειδή, στυλβένια και ταννίνες (Bowsher & Tobin, 2008).

Οι αζωτούχες ενώσεις είναι επίσης πολυποίκλη ομάδα και συμπεριλαμβάνει αλκαλοειδή, μη πρωτεϊνικά αμινοξέα και αμίνες. Τα αμινοξέα αποτελούν τις κύριες πρόδρομες ενώσεις βιοσύνθεσης αυτού του τύπου των δευτερογενών μεταβολιτών ενώ τα βιοσυνθετικά τους μονοπάτια συνήθως έχουν πολλαπλές διαδρομές (Chen et al. 2007; Fang 2011). Το άτομο του αζώτου είναι συνήθως μέλος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου, ενός δακτυλίου δηλαδή που περιέχει τόσο το άτομο του αζώτου όσο και άτομα άνθρακα, και προέρχεται από την αμινομάδα των αμινοξέων, από τα οποία συντίθενται οι αζωτούχες ενώσεις. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα αλκαλοειδή, γνωστά για τις εντυπωσιακές φαρμακολογικές δράσεις τους στα σπονδυλωτά ζώα και οι κυανογόνοι γλυκοζίτες, γνωστές αντιφυτοφάγες αμυντικές ουσίες (Τσέκος, 2003). Εδώ ανήκει και η κατηγορία των γλυκοσινολικών οξέων τα οποία θα μας απασχολήσουν στην παρούσα διατριβή.

Στη συνέχεια αναφέρονται οι κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών για το *A. thaliana* και οι λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται κάθε κατηγορία (D'Auria & Gershenzon, 2005) :



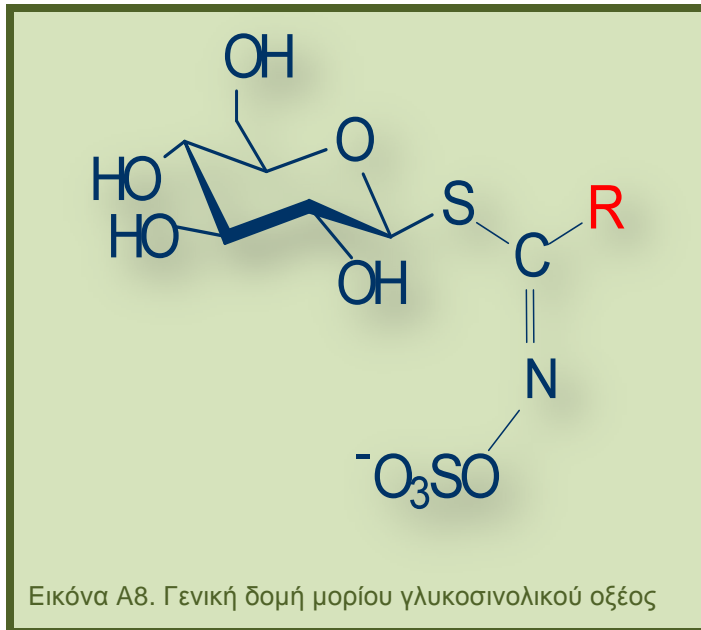
- Ινδολικές ενώσεις - Άμυνα εναντίον παθογόνων.
- Γλυκοσινολικά οξέα - Άμυνα εναντίον παθογόνων και εχθρών.
- Φαινυλπροπανοειδή - Προστασία από υπεριώδη ακτινοβολία, άμυνα εναντίον παθογόνων.
- Βενζενοειδή - Προσελκυστικά επικονιαστών, άμυνα εναντίον παθογόνων.
- Φλαβονοειδή - Προστασία από υπεριώδη ακτινοβολία, μεταφορά αυξίνης, λήθαργος σπόρων, άμυνα εναντίον παθογόνων.
- Τερπένια – Εντομοαπωθητικά, προστασία στην οξειδωτική καταπόνηση, άμυνα εναντίον παθογόνων.
- Παράγωγα λιπαρών οξέων - Άμυνα εναντίον παθογόνων.

Η κατηγορία των γλυκοσινολικών οξέων αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες και την πιο χαρακτηριστική στο *A.thaliana* (Reichelt et al., 2002). Περιλαμβάνει 36 διαφορετικές ενώσεις και έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων μελετών ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία (Rask et al., 2000; Wittstock & Halkier, 2002; Kliebenstein et al., 2005; Halkier & Gershenzon, 2006; Søndersby et al., 2010).(Søndersby et al. 2010)

## **5. Γλυκοσινολικά οξέα**

### **5.1. Δομή**

Τα γλυκοσινολικά οξέα (ΓΚΣ) συνιστούν μια ξεχωριστή ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών με χαρακτηριστική δομή και βιοχημεία (Agerbirk & Olsen, 2012). Δομικά, είναι (Z)-(ή cis)-N-υδροξυαμινοθεικοί εστέρες με μια πλευρική αλυσίδα (R) που μπορεί να ποικίλλει και ένα τμήμα β-D-γλυκοκυρανόζης που συνδέεται στο μόριο με ένα άτομο θείου (εικόνα A8). Η πλευρική αλυσίδα έχει αμινοξική προέλευση και αποτελεί την κεντρική δομή ή αλλιώς τον πυρήνα των γλυκοσινολικών οξέων (γλυκόνη) (Fahey et al., 2001).



Η παρουσία των γλυκοσινολικών οξέων στο φυτικό βασίλειο είναι μοναδική σε οικογένειες δικοτυλήδων φυτών που ανήκουν στην τάξη *Capparales*, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων (Halkier & Gershenzon, 2006). Αυτές οι συγγενείς μεταξύ τους οικογένειες είναι οι : *Brassicaceae*, *Moringaceae*, *Capparaceae*, *Resedaceae*, *Tovariaceae*, *Akariaceae*, *Bataceae*, *Caricaceae*, *Koeberlinaceae*, *Limnanthaceae*, *Morginaceae*, *Pentadiplandraceae*, *Salvadoraceae* και *Tropaeolaceae*. Επίσης γλυκοσινολικά οξέα έχουν εντοπιστεί και στην οικογένεια *Euphorbiaceae* του γένους *Drypetes*. Ωστόσο συγκεκριμένες υποκατηγορίες ΓΚΣ περιορίζονται σε μικρό αριθμό οικογενειών. Για παράδειγμα τα ινδολικά ΓΚΣ εντοπίζονται στις οικογένειες *Brassicaceae*, *Bataceae*, *Capparaceae*, *Resedaceae*, και *Tropaeolaceae*. (Griffiths et al., 2001; Rodman et al., 1998; Fahey et al., 2001; Wittstock and Halkier, 2002; Abrol & Ahmad, 2003). Η έκφρασή τους στα φυτά προέκυψε 10 με 15 εκατομμύρια χρόνια πριν, σαν αποτέλεσμα εξελικτικών πιέσεων (Windsor et al. 2005, Wheat et al. 2007).

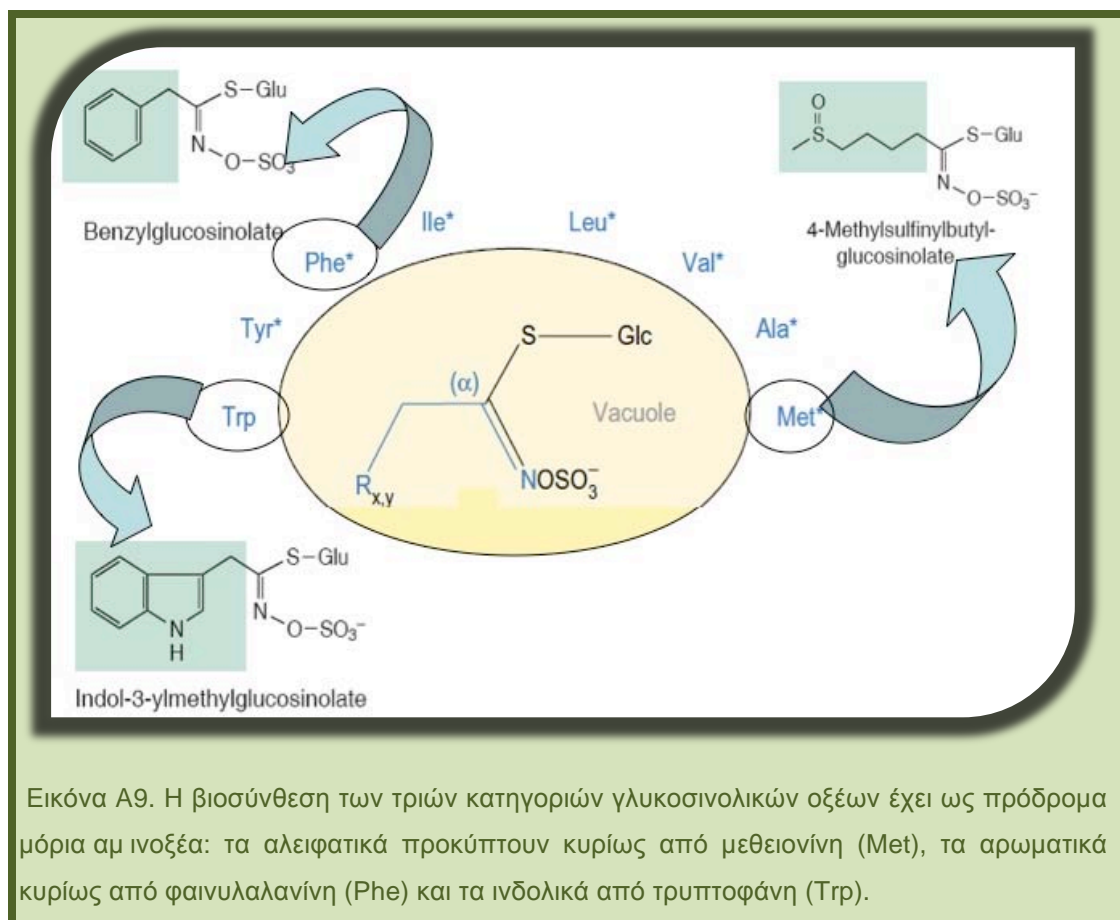
Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σ' αυτή τη σχετικά μικρή ομάδα αζωτούχων και θειούχων δευτερογενών μεταβολιτών έχουν καταγραφεί πάνω από 130 διαφορετικές δομές. Ο αριθμός φαίνεται να φτάνει τις 132, τουλάχιστον μέχρι και το 2011, με τις 26 να έχουν αναφερθεί μετά το 2001 (Agerbirk and Olsen, 2012). Η χημική και δομική ποικιλομορφία οφείλεται τόσο στα διαφορετικά πρόδρομα αμινοξέα και στην επιμήκυνση που υφίστανται, όσο και στις εκτεταμένες

τροποποιήσεις που δέχεται η πλευρική αλυσίδα (Fahey et al., 2001; Tokuhisa et al., 2004; Agerbirk & Olsen, 2012).

## 5.2. Κατηγορίες Γλυκοσινολικών Οξέων

Τα ΓΚΣ κατηγοριοποιούνται σε τρεις τύπους (εικόνα Α9), με βάση την προέλευσή τους από τα πρόδρομα αμινοξέα με τα οποία ξεκινά η βιοσύνθεσή τους (Wittstock & Halkier, 2002) :

- Αλειφατικά, προερχόμενα από αλανίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη και κυρίως μεθειονίνη
- Αρωματικά, προερχόμενα από φαινυλαλανίνη και τυροσίνη
- Ινδολικά, προερχόμενα από τρυπτοφάνη

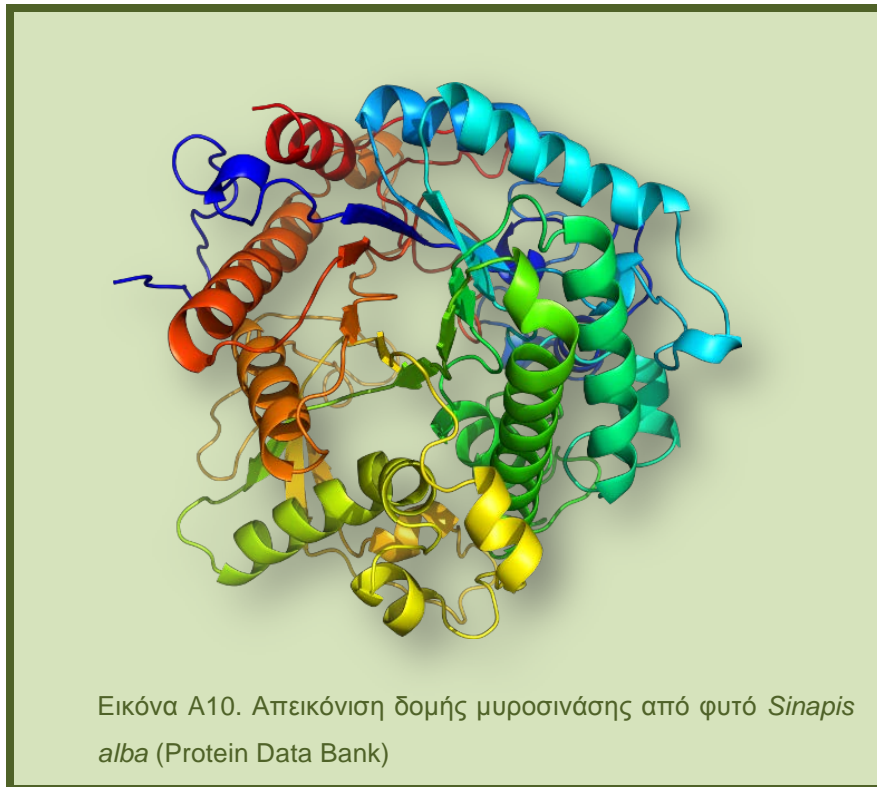


Τα περισσότερα ΓΚΣ που έχουν βρεθεί στο *A. thaliana* είναι παράγωγα της μεθειονίνης και της τρυπτοφάνης (Kliebenstein, et al. 2001). Η συγκέντρωσή τους ρυθμίζεται τόσο από αναπτυξιακούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για παράδειγμα το αναπτυξιακό στάδιο, η φωτοπερίοδος και ο τύπος του ιστού μπορούν να καθορίσουν τον τύπο των ΓΚΣ και τα επίπεδά τους. Το φάσμα ποικίλλει ανάμεσα στα είδη, ακόμα και μεταξύ των οργάνων του κάθε φυτού, εξαρτώμενο από τις παραπάνω παραμέτρους. Όσον αφορά στο *A.thaliana*, αλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα υπάρχουν στα περισσότερα φυτικά όργανα, ινδολικά εντοπίζονται κυρίως στις ρίζες και τα ώριμα φύλλα, ενώ τα αρωματικά βρίσκονται κυρίως στους σπόρους και τα άνθη (Brown et al., 2003).

### 5.3. Υδρόλυση ΓΚΣ

Τα ΓΚΣ είναι υδρόφιλες και σταθερές ενώσεις, που φυσιολογικά βρίσκονται απομονωμένες στα χυμοτόπια των περισσότερων φυτικών ιστών που τα περιέχουν (Kelly et al., 1998). Πρόκειται για βιολογικώς μη ενεργά μόρια, αλλά με μηχανική καταστροφή του ιστού έρχονται σε επαφή με το ένζυμο μυροσινάση, υδρολύονται προς ασταθείς αγλυκόνες και αποδίδουν ένα μίγμα προϊόντων υδρόλυσης με ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων (Wittstock & Halkier, 2002).

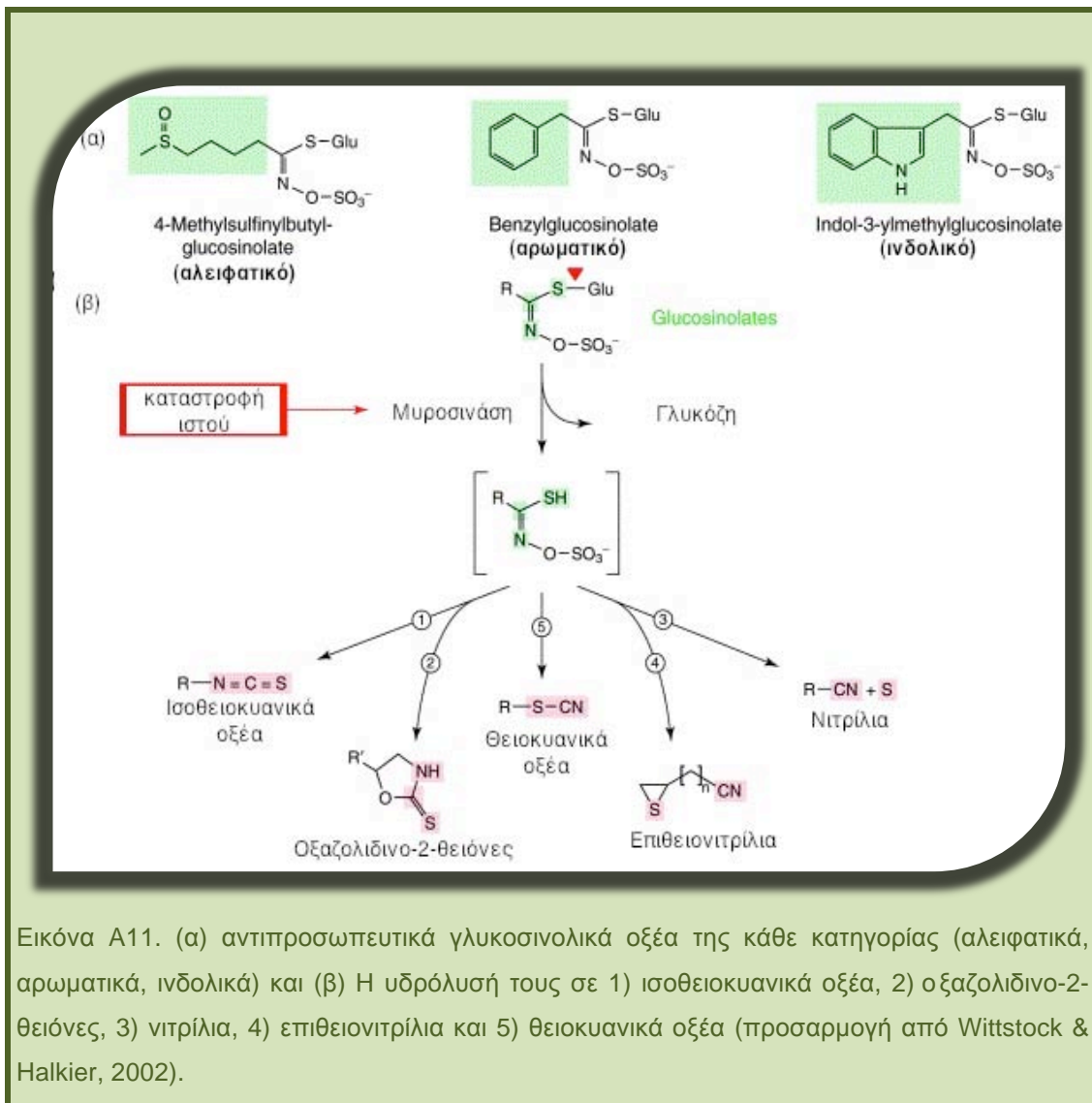
Η μυροσινάση (εικόνα A10) είναι μία β-θειογλυκοσιδάση και εντοπίζεται σε εξειδικευμένα κύτταρα του φυτού (ιδιόβλαστα). Τα τελευταία λέγονται και κύτταρα μυροσίνης, βρίσκονται διασκορπισμένα μέσα στους ιστούς των περισσότερων φυτών που τα παράγουν και φαίνεται πως δεν περιέχουν ΓΚΣ (Kelly et al., 1998; Andreasson et al., 2001; Husebye et al., 2002).



Ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών στα φυτά μπορεί να συμβεί μετά από προσβολή από εχθρούς και ασθένειες, κόψιμο, ή από πάγωμα και ξεπάγωμα των φυτικών ιστών. Αυτή η απώλεια της κυτταρικής ακεραιότητας προκαλεί την απελευθέρωση τόσο των ΓΚΣ, όσο και της μυροσινάσης από τα οργανίδια στα οποία περικλείονται. Σηματοδοτεί έτσι την έναρξη της αποικοδόμησής τους, μέσω της υδρόλυσης του γλυκοσιδικού δεσμού που καταλύεται από τη μυροσινάση (Andreasson et al., 2001; Husebye et al., 2002; Wittstock and Halkier, 2002; Song et al., 2007).

Πρόκειται για ένα πολύπλοκο φαινόμενο αλληλεπίδρασης που πυροδοτείται από βιοτικό ή αβιοτικό στρες και οδηγεί σε ταχεία γένεση ασταθών ενδιάμεσων προϊόντων. Η μη ενζυματική απομάκρυνση της θειικής ομάδας και η αυθόρμητη ανακατάταξη της απομένουσας κεντρικής δομής οδηγεί στο σχηματισμό μιας ποικιλίας βιο-ενεργών προϊόντων. (Luthy & Matile, 1984; Ratzka et al., 2002)

Τα προϊόντα της υδρόλυσης των ΓΚΣ διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες: ισοθειοκυανικά οξέα, οξαζολιδινο-2-θειόνες, θειοκυανικά οξέα, επιθειονιτρίλια και νιτρίλια (εικόνα A11).



Εικόνα A11. (α) αντιπροσωπευτικά γλυκοσινολικά οξέα της κάθε κατηγορίας (αλειφατικά, αρωματικά, ινδολικά) και (β) Η υδρόλυσή τους σε 1) ισοθειοκυανικά οξέα, 2) οξαζολιδινο-2-θειόνες, 3) νιτρίλια, 4) επιθειονιτρίλια και 5) θειοκυανικά οξέα (προσαρμογή από Wittstock & Halkier, 2002).

Χημικές συνθήκες όπως το pH, η διαθεσιμότητα ιόντων σιδήρου και η παρουσία πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη μυροσινάση καθορίζουν την τελική σύσταση των παραγόμενων προϊόντων υδρόλυσης (Mithen et al., 2000; Wittstock & Halkier, 2002). Πιο αναλυτικά (Wittstock & Halkier, 2002; Kissen & Bones, 2009):

- Σε ουδέτερο pH οι ασταθείς αγκυκόνες 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.

- Η αλληλεπίδραση της μυροσινάσης με πρωτεΐνες ESP (epithiospecifier protein) και NSP (nitrile-specifier protein) οδηγεί στο σχηματισμό νιτριλίων. Νιτρίλια συνήθως σχηματίζονται σε συνθήκες χαμηλού pH.
- Αν υπάρχει διπλός δεσμός στο τέλος της πλευρικής αλυσίδας, το άτομο θείου που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του νιτριλίου προσλαμβάνεται από τον διπλό δεσμό, σχηματίζοντας έτσι επιθειονιτρίλια.
- Τέλος, μερικά γλυκοσινολικά μπορούν να υδρολυθούν προς θειοκυανικά.

#### 5.4. Ιδιότητες των γλυκοσινολικών οξέων και των προϊόντων υδρόλυσής τους

Οι πρώτες έρευνες ξεκίνησαν από το 19<sup>ο</sup> αιώνα, όπου συναντάμε τον όρο «έλαια της μουστάρδας» (Bussy, 1840). Οι ενώσεις αυτές έχουν επί μακρόν προκαλέσει το ανθρώπινο ενδιαφέρον όχι μόνο γιατί συνεισφέρουν πάρα πολύ στη χαρακτηριστική γεύση και το άρωμα των σταυρανθών λαχανικών και καρυκευμάτων (Drewnowski et al., 2000), αλλά γιατί έχουν και διάφορες βιολογικές ιδιότητες.

##### 5.4.1. Στα φυτά

Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει το ρόλο τόσο των ΓΚΣ όσο και των προϊόντων υδρόλυσής τους ως σημαντικούς παράγοντες στην αλληλεπίδραση φυτών-ξενιστών (Hopkins et al., 2009; Agerbirk et al., 2009). Ο βιολογικός τους ρόλος εστιάζεται στην αποτροπή τόσο των εντόμων όσο και των παθογόνων μικροοργανισμών να προσβάλλουν τα φυτά, καθιστώντας τις ενώσεις αυτές ένα σημαντικό τμήμα του αμυντικού μηχανισμού των φυτών (Brader et al., 2001; Tierens et al., 2001; Lambrix et al., 2001; Kliebenstein et al., 2002; Agrawal and Kurashige, 2003).

Τα φυτοφάγα έντομα χωρίζονται σε πολυφάγα, που τρέφονται από φυτά διαφόρων οικογενειών και σε μονοφάγα, που τρέφονται από φυτά αποκλειστικά ενός είδους ή μιας οικογένειας (ολιγοφάγα). Στην περίπτωση των πολυφάγων εντόμων, τα ΓΚΣ έχουν τοξική ή απωθητική δράση, ενώ στην περίπτωση των μονοφάγων/ολιγοφάγων δρουν ως προσελκυστικές ή διεγερτικές ενώσεις για

τροφή ή απόθεση των αυγών τους (Baskar et al., 2012).

Πολλές αναφορές έχουν καταδείξει τον αμυντικό ρόλο του συστήματος γλυκοσινολικών-μυροσινάσης έναντι των πολυφάγων φυτοφάγων εντόμων (Reese et al., 1958; Agerbirk et al., 2009). Έναντι αυτών των εχθρών φαίνεται πως τα ισοθειοκυανικά είναι πιο τοξικά σε σχέση με τα νιτρίλια (Giamoustaris & Mithen, 1995; Wittstock et al., 2003). Όταν τα φυτά δέχονται επίθεση από φυτοφάγα έντομα οι συγκεντρώσεις των αλειφατικών και των ινδολικών δείχνουν να αυξάνονται, με τα επίπεδα των δεύτερων να παρουσιάζουν μεγαλύτερη αύξηση (Kos et al., 2012). Επίσης, σε πειράματα με φυτά ελαιοκράμβης (*Brassica napus*) παρατηρήθηκε μειωμένη ζημιά στην καλλιέργεια από πολυφάγους ζωικούς οργανισμούς όπως τα περιστέρια όταν τα επίπεδα των ΓΚΣ ήταν αυξημένα και το αντίστροφο (Giamoustaris & Mithen, 1995).

Στην ίδια έρευνα, όταν τα επίπεδα των ΓΚΣ ήταν αυξημένα, παρατηρήθηκε αυξημένη ζημιά από τα έντομα *Psylliodes chrysocephala* (μονοφάγο, έχει ως αποκλειστικό ξενιστή την ελαιοκράμβη) και *Pieris rapae* (ολιγοφάγο, προσβάλλει αποκλειστικά φυτά της οικογένειας Brassicaceae). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τα ΓΚΣ και τα ισοθειοκυανικά χρησιμοποιούνται από ορισμένα έντομα ως χημικά σήματα για να αναγνωρίσουν το φυτό-ξενιστή τους. Τα προϊόντα υδρόλυσης των ΓΚΣ και συγκεκριμένα οι ισοθειοκυανιούχες ενώσεις δεν παρουσιάζουν τοξική δράση σε αυτά τα έντομα (Wittstock et al., 2004; Sun et al., 2010). Αυτό οφείλεται στην βιοσύνθεση εξειδικευμένων ενζύμων που αποτοξικοποιούν τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών ή πιθανώς σε μηχανισμούς αποθήκευσης τους στους ιστούς τους και μετέπειτα χρησιμοποίησή τους ως παράγοντες αυτοπροστασίας (Muller et al., 2001; Bridges et al., 2001; Ratzka et al., 2002; Aliabadi et al., 2002).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εργασίες που δείχνουν ότι προϊόντα της υδρόλυσης των ΓΚΣ, όπως τα νιτρίλια, μπορούν να παρέχουν προστασία σε ένα φυτό-ξενιστή εμμέσως, δια της προσέλκυσης ενδοπαρασίτων των εχθρών του (Mumm et al., 2008). Φαίνεται λοιπόν πως ρόλος των ΓΚΣ στην άμυνα των φυτών σε ότι αφορά τα έντομα είναι διπλός: παρέχουν αντίσταση άμεσα κατά των φυτοφάγων εντόμων και έμμεσα μέσω της αύξησης της αποδοτικότητας των παρασίτων τους (Kos et al.,



2012).

Πολλές μελέτες έχουν δημοσιευτεί για την *in vitro* τοξικότητα των προϊόντων υδρόλυσης των ΓΚΣ ενάντια σε παθογόνα (Mari et al., 2002; Smolinska et al., 2003), ενώ αντίθετα πολύ λίγες είναι αυτές που παρέχουν άμεση απόδειξη για το ρόλο των προϊόντων της υδρόλυσης στην ανοχή σε αυτά (Li et al., 1999; Aires et al., 2011). Σε μια μελέτη όπου φυτά Brassicaceae μολύνθηκαν με το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του γλυκοσινολικού προφίλ και της αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου. Τα φυτά που επιλέχτηκαν ήταν το κάρδαμο (*Lepidium sativum*), η ρόκα (*Eruca sativa*), το μπρόκολο (*Brassica oleracea* L. var. *italica* cv. Marathon) και δύο διαφορετικές ποικιλίες λάχανου (*B. oleracea* L. var. *capitata* cv. Coração de boi και *B. oleracea* L. var. *tranchuda* cv. Tranchuda Portuguesa) (Aires et al., 2011). Σε άλλη έρευνα μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση υδατικού εκχυλίσματος από *A.thaliana* και αναφέρεται ότι σε ένα ευρύ φάσμα μυκήτων και βακτηρίων παρατηρήθηκε 50% αναστολή της ανάπτυξης *in vitro* (Tierns et al., 2001). Είναι ενδιαφέρον ότι κάποια παθογόνα, όπως και κάποια έντομα, μπορούν να ανέχονται ή να αποτοξινώνουν τα προϊόντα υδρόλυσης των ΓΚΣ (Rouxel et al., 1991; Fan et al., 2011).

Επίσης έχει αναφερθεί ότι τα ΓΚΣ έχουν την ικανότητα να θέσουν υπό έλεγχο μια ποικιλία ζιζανίων (Vig et al., 2009). Μετά από πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από φυτά Brassicaceae, φαίνεται πως οι αλεσμένοι σπόροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο κάποιων ζιζανίων (Handiseni et al., 2011). Τα προϊόντα της υδρόλυσης των ΓΚΣ και ιδιαιτέρως τα ισοθειοκυανικά οξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση παρασίτων του εδάφους και ζιζανίων, μέσω της ενσωμάτωσης στο έδαφος φυτικού υλικού που τα περιέχει. Η πρακτική αυτή είναι γνωστή ως βιοαπολύμανση (Gimsing et al., 2008).

#### 5.4.2. Στον άνθρωπο

Οι ιδιότητες των γλυκοσινολικών οξέων δεν περιορίζονται στην άμυνα των φυτών. Από τη δεκαετία του '70 έχουν γίνει μελέτες που εστιάζουν στα ευεργετικά βιολογικά αποτελέσματα που έχουν τα ΓΚΣ και τα προϊόντα υδρόλυσής τους στον

άνθρωπο (Cartea & Velasco, 2008). Θεωρούνται τα βασικά ενεργά συστατικά των σταυρανθών λαχανικών, γεγονός που καθιστά τα τελευταία λειτουργικά τρόφιμα (Baskar et al., 2012).

Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν περιγράψει τις λειτουργίες των ΓΚΣ και τους τρόπους δράσης τους (Traka and Mithen, 2009; Zhang, 2012). Τα ισοθειοκυανικά οξέα αποτελούν μεταβολικά ενδιάμεσα των γλυκοσινολικών που μπορούν να στοχεύσουν σε ένα εύρος πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τον καρκίνο (Tseng, 2002; Ji, 2005). Πολλές έρευνες έχουν αναδείξει τη χημειοπροστατευτική δράση των ισοθειοκυανικών οξέων (Mithen et al., 2000; Fahey et al., 2001; Keum et al., 2004; Kliebenstein et al., 2005; Woodward & Bartel 2005). Σε αρκετές από αυτές, η χορήγηση ισοθειοκυανικών (ΙΣΘ) σε ζώα-μοντέλα εμπόδισε το σχηματισμό όγκων σε πολλές περιοχές του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του στήθους, του στομάχου, του εντέρου και των πνευμόνων (Zhang et al., 1994; Sugie et al., 1994; Gerhauser et al., 1997; Chung et al., 2000; Fahey et al., 2002; Conaway et al., 2005).

Οι περισσότερες έρευνες υποδεικνύουν ότι τα ΙΣΘ εμπλέκονται στην αναστολή των μεταβολικών ενζύμων της φάσης I, όπως τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, και στην επαγωγή των προστατευτικών ενζύμων της φάσης II, όπως την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Verhoeven et al., 1997; Hecht, et al., 1999; Talalay & Fahey, 2001; Engelen-Eigles et al., 2006; Juge et al., 2007). Ο μεταβολισμός των ΙΣΘ γίνεται μέσω του μεταβολικού μονοπατιού του μερκαπτουρικού οξέος και ξεκινά με μια αντίδραση μεταξύ της ομάδας N=C=S των ΙΣΘ και της σουλφυδρυλικής ομάδας της γλουταθειόνης. Η αντίδραση γίνεται με τη βοήθεια της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των αντίστοιχων ενώσεων. Μια σειρά ενζυμικών τροποποιήσεων στην υποομάδα της γλουταθειόνης αυτών των ενώσεων οδηγεί στη σύνθεση ενώσεων N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC), που αποβάλλονται μέσω των ούρων (Zhang, 2012). Έχει αποδειχτεί σε ζωικά μοντέλα ότι τα ΙΣΘ ή οι NAC ενώσεις τους εμπλέκονται στην αναστολή ανάπτυξης όγκων μέσω επαγωγής της απόπτωσης (Yang et al., 2002; Konaway et al., 2005; Khor et al., 2006; 2008).

Από όλα τα ΙΣΘ, αυτό που έχει μελετηθεί εκτενέστερα είναι ένα παράγωγο του μπρόκολου, η σουλφοραφάνη (ΣΦ) ενώ κάποιες αναφορές υπάρχουν και σε άλλα,

όπως το Phenethyl isothiocyanate (PEITC), το Benzyl isothiocyanate (BITC), και το Allyl isothiocyanate (AITC) (Traka & Mithen, 2009; Zhang, 2012). Σε *in vitro* πειράματα η χορήγηση PEITC σε ηπατικά μικροσωμάτια αρουραίου προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αναστολή της δραστηριότητας διαφόρων ενζύμων της φάσης I, όπως το CYP1A1, CYP1A2 και CYP2B1 (Tharpliyal et al., 2001). Παρομοίως, η επώαση ηπατοκυττάρων ανθρώπου και αρουραίου με ΣΦ οδήγησε σε αναστολή της δραστηριότητας πολλών ενζύμων της οικογένειας CYP (Barcelo et al., 1996; Maheo et al., 1997; Juge et al., 2007). Επίσης, η χορήγηση PEITC σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MCF-7 προκάλεσε την καταστολή του όγκου και την απόπτωση, μέσω επαγωγής των γονιδίων p53, Kip2, p53, BRCA2, IL-2 και ATF-2, καταδεικνύοντας το ρόλο του PEITC στην πρόληψη της καρκινογένεσης (Moon et al., 2011). Παρόμοια δράση παρατηρήθηκε και για το 3,3'-diindolylmethane (DIM), μια ένωση που αποτελεί μεταβολίτη του Indole-3-carbinol (I3C), το οποίο προέρχεται από την υδρόλυση της GBS (glucobrassicin). Σε πειράματα *in vitro* και *in vivo* παρουσίασε αντιλευχαιμική δράση (Gao et al., 2012). Το DIM έχει επίσης αναφερθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της δράσης των υποδοχέων των οιστρογόνων με αγωνιστικές και ανταγωνιστικές ιδιότητες (Riby et al., 2000). Τέλος, τα BITC και AITC δρουν προστατευτικά σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη και παχέος εντέρου μέσω επαγωγής της απόπτωσης και μείωσης των επιπέδων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Patten & DeLong, 1999; Xiao et al., 2003).

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρονται στην δόσοεξαρτώμενη δράση εκχυλισμάτων που προέρχονται από λαχανικά του γένους *Brassica*. Τα εκχυλίσματα αυτά παρουσίασαν δράση αντι-οιστρογόνων όταν χορηγήθηκαν σε χαμηλές δόσεις (5–25 ng/mL), ενώ σε υψηλές δόσεις (50 ng/mL–25 µg/mL) λειτούργησαν ως ενεργοποιητές οιστρογόνων (Ju et al., 2000). Παρομοίως, η χορήγηση SF και PEITC προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη μείωση στην ικανότητα πολλαπλασιασμού και ανάσχεση στο σχηματισμό τριχοειδών σε κύτταρα HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) (Asakage et al., 2006). Επίσης, χορήγηση BITC σε αρουραίους ανά δόσεις των 10, 100 και 1000 ppm στη διατροφή τους, μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης καρκινώματος, λειτουργώντας με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Okazaki et al., 2002). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στην προαναφερθείσα μελέτη και σε άλλη

(Akagi et al., 2003), ανιχνεύτηκε καρκινογόνος δράση των BITC και PEITC και φαινόμενα επαγωγής όγκων σε δόσεις 0.1% της συνολικής διατροφής των αρουραίων.

Μια επισκόπηση των ερευνών που εστιάζουν στις αντικαρκινικές δράσεις των ΓΚΣ και των προϊόντων υδρόλυσής τους καταδεικνύει πολλά σημεία στα οποία οι διάφορες μελέτες διαφωνούν, ειδικά όσον αφορά στο φάσμα των δράσεων αυτών. Τα επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι με την κατανάλωση λαχανικών που περιέχουν συγκεκριμένο τύπο και ποσότητα φυτοχημικών υπάρχουν γενικώς οφέλη για την υγεία, παρά μια συγκεκριμένη δράση. Συγκεκριμένη δράση έχει αποδειχτεί μόνο για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, όχι για όλους. Επίσης, δίνεται έμφαση στον ανθρώπινο παράγοντα, λόγω εμφάνισης πολυμορφισμού στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τα ένζυμα GST (S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης). Αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν στη διαδικασία αποτοξίνωσης από καρκινογόνους παράγοντες, που με τη σειρά της μειώνει τον κίνδυνο καρκινογένεσης. Υπάρχουν διαφορές στο επίπεδο έκφρασης των παραπάνω γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών ατομών. (Kim & Park, 2009).

Τέλος, στα ΓΚΣ έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις (Brown et al., 2009), αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες (Shishu et al., 2003; Murugan et al., 2007; Mandelova et al., 2007), καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις (Cornelis et al., 2007), καθώς και προστασία κατά του *Helicobacter pylori*, που αποτελεί την κύρια αιτία πρόκλησης έλκους και καρκίνου του στομάχου (Fehey et al., 2002; Haristoy et al., 2003).

## **6. Βιοσύνθεση και βιοσυνθετικά γονίδια**

### **6.1. Ταυτοποίηση βιοσυνθετικών γονιδίων στο *Arabidopsis thaliana***

Είναι γνωστό ότι το *Arabidopsis thaliana* περιέχει αλειφατικά, αρωματικά και ινδολικά ΓΚΣ (Hogge et al., 1988) και ως εκ τούτου προσφέρεται σαν πολύτιμο φυτό-μοντέλο για την έρευνα της βιοσύνθεσης και των τριών κατηγοριών των ΓΚΣ. Η εκτεταμένη χρήση του ως φυτού-μοντέλου έχει συντελέσει στην κατανόηση της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ. Η χαρτογράφηση των γονιδιακών τόπων που προσδιορίζουν

το γλυκοσινολικό προφίλ, η λειτουργική γονιδιωματική και η ανάστροφη γενετική, δεν έχουν απλώς συμπληρώσει τη βιοχημική έρευνα, αλλά σε μεγάλη έκταση αποτέλεσαν κινητήριο δύναμη για την ταχεία πρόοδο στο συγκεκριμένο πεδίο (Wittstock & Halkier, 2002). Η ταυτότητα των πρώτων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων δημοσιεύτηκε το 2000. Πρόκειται για τα *CYP79A2* (Wittstock & Halkier, 2000) και *CYP79B2* (Mikkelsen et al., 2000).

Οι επιστήμονες έχουν επιτύχει να ταυτοποιήσουν τα βιοσυνθετικά γονίδια χρησιμοποιώντας εργαλεία βιολογίας συστημάτων, συλλογές μεταλλαγμάτων και φυσικές ποικιλίες του *A.thaliana* (Sønderby et al., 2010). Στην πραγματικότητα, εξαιτίας του σημαντικού αριθμού ήδη γνωστών ενζύμων, το μονοπάτι των ΓΚΣ αντιπροσωπεύει ένα εξαιρετο παράδειγμα του πώς γονίδια που δεν είναι γνωστά σε ένα μεταβολικό μονοπάτι, μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω της συν-έκφρασής τους με άλλα ήδη γνωστά (Gachon et al., 2005; Hirai et al., 2005; 2007; Sønderby et al., 2007; Sawada et al., 2009; Geu-Flores et al., 2009; Knill et al., 2008; He et al., 2009; Clay et al., 2009; Hansen et al., 2007). Επίσης, βιοσυνθετικά γονίδια ανακαλύφθηκαν μέσω κλωνοποίησης ήδη ταυτοποιημένων γενετικών τόπων (Sønderby et al., 2007; Hansen et al., 2007; Kroymann et al., 2001; Pfalz et al., 2009; Kliebenstein et al., 2001; Hansen et al., 2008). Τέλος, η βιοχημική γνώση για τη βιοσύνθεση της λευκίνης και η ομοιότητα των αντιδράσεων με αυτές των πρώτων βημάτων της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ, βοήθησε στο να προστεθούν και άλλα γονίδια στον κατάλογο αυτών που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι (Knill et al., 2008; 2009; He et al., 2009; Schuster et al., 2006). Συμπερασματικά, ένας εντυπωσιακός αριθμός των είκοσι και πλέον εμπλεκόμενων γονιδίων στο *A.thaliana* έχει ανακαλυφθεί από το 2007 και μετά (Sønderby et al., 2010).

## 6.2. Γενικά

Όπως προαναφέρθηκε, τα ΓΚΣ έχουν ως πρόδρομο μόριο κάποιο αμινοξύ, από το οποίο ξεκινά η βιοσύνθεσή τους. Βάσει αυτού κατηγοριοποιούνται σε αλειφατικά (μεθειονίνη), ινδολικά (τρυπτοφάνη) και αρωματικά (φαινυλαλανίνη).

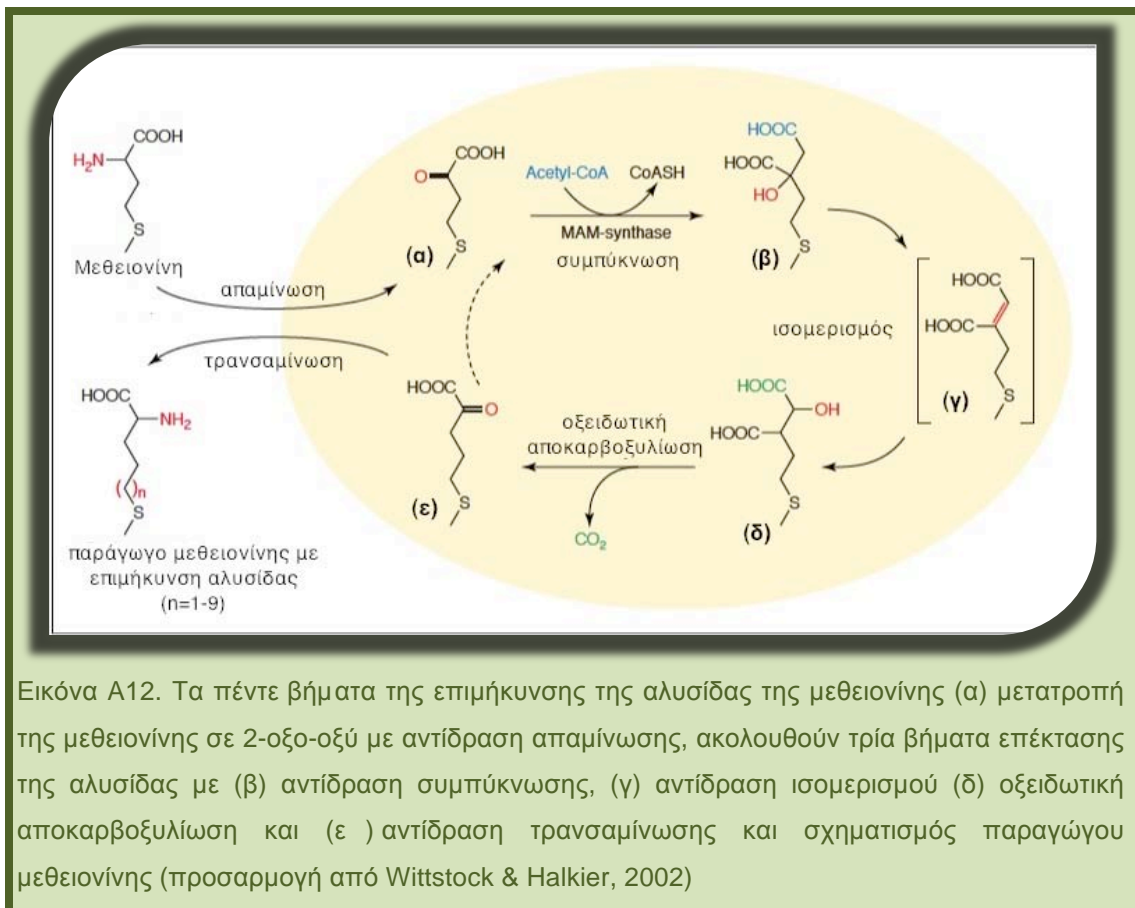
Η βιοσύνθεση εξελίσσεται σε τρία ανεξάρτητα και αλληλένδετα στάδια:

- I. Επιμήκυνση της αλυσίδας του αμινοξέος (μόνο στην περίπτωση που το αμινοξύ αυτό είναι η μεθειονίνη ή η φαινυλαλανίνη)
- II. Σχηματισμός του πυρήνα των γλυκοσινολικών οξέων (γλυκόνη)
- III. Δευτερογενείς τροποποιήσεις της πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων

Η ταυτοποίηση των γονιδίων στο *A.thaliana*, ακολουθούμενη από τον *in vitro* και *in vivo* χαρακτηρισμό των προϊόντων τους επιβεβαίωσε τα τρία στάδια της βιοσυνθετικής διαδικασίας, που είχαν διατυπωθεί μετά από πρώιμες βιοχημικές μελέτες (Underhill et al., 1980; Poulton, & Møller, 1993; Mikkelsen et al., 2002; Wittstock & Halkier, 2002; Grubb & Abel, 2006; Sønderby et al., 2010).

### 6.3. Πρώτο βιοσυνθετικό στάδιο

Πριν εισέλθει στο μονοπάτι του σχηματισμού της γλυκόνης, η μεθειονίνη υφίσταται επιμήκυνση της αλυσίδας της, σε μια διαδικασία παρόμοια με αυτήν της μετατροπής του αμινοξέος βαλίνη σε λευκίνη. Το μονοπάτι αυτό είχε προταθεί για πρώτη φορά στη δεκαετία του '60 (Chisholm & Wetter, 1964) και επιβεβαιώθηκε αργότερα με πειράματα θρέψης στην *Eruca sativa* (Graser et al., 2000) και στο *Arabidopsis* (Graser et al., 2001). Περιλαμβάνει πέντε βήματα (εικόνα A12) που αποτελούνται από μια αρχική αντίδραση απαμίνωσης και μία τελική αντίδραση τρανσαμίνωσης, ενώ ενδιάμεσα υπάρχει ένας κύκλος τριών αντιδράσεων (συμπύκνωσης, ισομερισμού και οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης κατά σειρά), που μπορεί να επαναλαμβάνεται (Wittstock & Halkier, 2002; Mikkelsen et al, 2002).



Εικόνα A12. Τα πέντε βήματα της επιμήκυνσης της αλυσίδας της μεθειονίνης (α) μετατροπή της μεθειονίνης σε 2-οξο-οξύ με αντίδραση απαμίνωσης, ακολουθούν τρία βήματα επέκτασης της αλυσίδας με (β) αντίδραση συμπύκνωσης, (γ) αντίδραση ισομερισμού (δ) οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση και (ε) αντίδραση τρανσαμίνωσης και σχηματισμός παραγώγου μεθειονίνης (προσαρμογή από Wittstock & Halkier, 2002)

Η διαδικασία ξεκινά με την απαμίνωση της μεθειονίνης από μια αμινοτρανσφεράση (BCAT) προς σχηματισμό του επαγόμενου 2-οξο οξέος. Ακολουθεί ένας κύκλος τριών βημάτων, που αποτελείται από μια αντίδραση συμπύκνωσης με ακετυλο-συνένζυμοΑ, μια αντίδραση ισομερισμού και μια οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση (Graser et al, 2000). Μία συνθάση του μεθυλθειοαλκυλομηλικού οξέος (MAM) καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης (Textor et al., 2004; Falk et al., 2004; Field et al., 2004), ενώ τις επόμενες δύο αντιδράσεις καταλύουν κατά σειρά μια ισομεράση του ισοπροπυλομηλικού οξέος (IPMI) και μια αφυδρογονάση του ισοπροπυλομηλικού οξέος (IPM-DH) (Sønderby et al., 2010).

Όπως συμβαίνει και στη βιοσύνθεση της λευκίνης, το 2-οξο οξύ έχει επεκταθεί κατά μία ομάδα μεθυλενίου (-CH<sub>2</sub>-). Στη συνέχεια το μόριο μπορεί είτε να τρανσαμινωθεί από μια αμινοτρανσφεράση (BCAT) στο επαγόμενο παράγωγο της μεθειονίνης (ομομεθειονίνη) το οποίο θα εισέλθει στο δεύτερο στάδιο της

βιοσύνθεσης, είτε να υποστεί περαιτέρω επιμηκύνσεις μέσω ενός νέου γύρου αντιδράσεων (εικόνα A13). Σαν αποτέλεσμα, η όλη διαδικασία μπορεί να παράγει όχι μόνο ομομεθειονίνη, αλλά μία σειρά παραγώγων της μεθειονίνης με επιμήκυνση της αλυσίδας της. Μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να πραγματοποιηθούν μέχρι εννιά γύροι αντιδράσεων (Falk et al., 2004).

### 6.3.1. Απαμίνωση και τρανσαμίνωση (πρώτο και πέμπτο βήμα)

Για να βρεθεί ποιες αμινοτρανσφεράσες (BCATs) του *A.thaliana* συμμετέχουν στις εν λόγω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν πειράματα γενετικής συμπληρωματικότητας σε ζύμες, και στη συνέχεια πειράματα σίγησης των εμπλεκόμενων γονιδίων. Βρέθηκε ότι η BCAT4 καταλύει τουλάχιστον την πρώτη αντίδραση απαμίνωσης (Schuster et al., 2006), ενώ η BCAT3 φαίνεται ότι παίζει πρωταρχικό ρόλο στη βιοσύνθεση της λευκίνης εκτός από το να καταλύει την αντίδραση της τρανσαμίνωσης. Ανάλυση μεταλλαγμάτων με ταυτόχρονη σίγηση των δύο γονιδίων *bcat3* και *bcat4* αποκάλυψε επιστατική επίδραση των δύο γονιδίων τόσο στο προφίλ των αμινοξέων όσο και στο προφίλ των ΓΚΣ, υποδηλώνοντας ότι τα BCAT3 και BCAT4 έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενη δράση (Knill et al., 2008). Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για να αποσαφηνιστεί το επίπεδο εμπλοκής των δύο αυτών ενζύμων στις αντιδράσεις απαμίνωσης και τρανσαμίνωσης (Sønderby et al., 2010).

### 6.3.2. Συμπύκνωση με ακετυλο-συνένζυμοΑ (δεύτερο βήμα)

Έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια υπεύθυνα για τον έλεγχο των παραλλαγών στην πλευρική αλυσίδα των αλειφατικών γλυκοσινολικών, τα *MAM1*, *MAM2*, και *MAM3* (παλιά αναφερόταν και ως *MAM-L*) (Kroymann et al., 2001; 2003). *In vitro* το *MAM1* μπορεί να καταλύει τις αντιδράσεις συμπύκνωσης στους τρεις πρώτους γύρους επιμήκυνσης, το *MAM2* μόνο τον πρώτο και το *MAM3* τους πρώτους έξι (Kroymann et al., 2001; Textor et al., 2004; 2007). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε πειράματα με σίγηση γονιδίων. 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 ΓΚΣ 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 συμμετέχει στη σύνθεση όλων των αλειφατικών ΓΚΣ, αλλά κυρίως αυτών που προέρχονται από ένα, πέντε ή έξι κύκλους της επιμήκυνσης της αλυσίδας της μεθειονίνης, παράγοντας έτσι τόσο μικρής όσο και μεγάλης πλευρικής αλυσίδας μεθειονίνη (Textor et al., 2007; Field et al., 2004). Αυτή η διαφοροποίηση στο γλυκοσινολικό προφίλ που προκαλείται από πολυμορφισμό στο γενετικό τόπο MAM φαίνεται να αντιπροσωπεύει μια προσαρμογή σε οικολογικές αλλαγές (Benderoth et al., 2006).

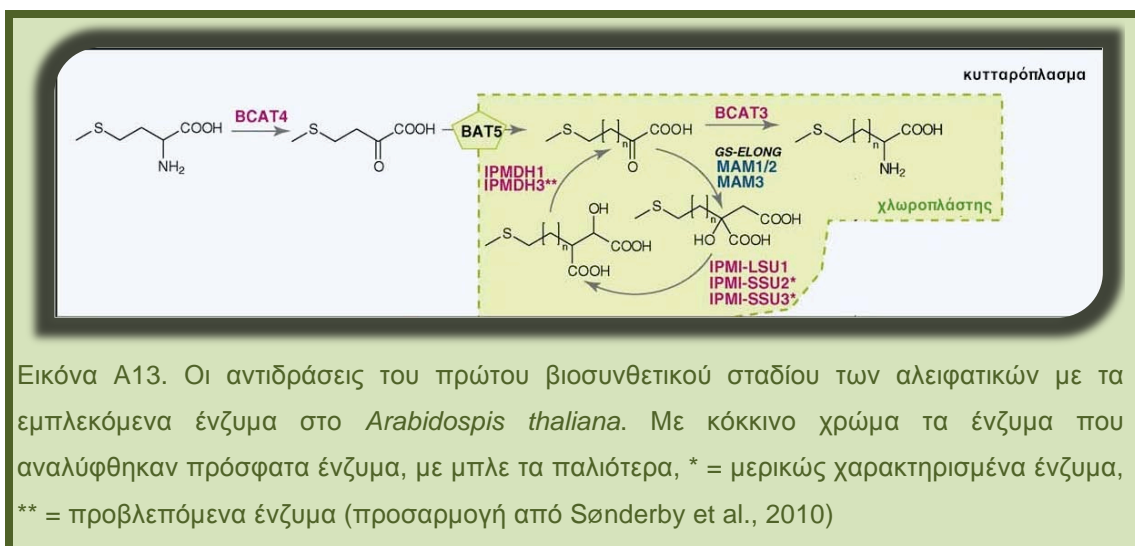
### 6.3.3. Ισομερισμός (τρίτο βήμα)

Οι ισομεράσες του ισοπροπυλομηλικού οξέος (IPMIs) που καταλύουν την αντίδραση του ισομερισμού αποτελούνται από μια μικρή και μια μεγάλη υπομονάδα. Μεταλλάγματα σίγησης στο μοναδικό γονίδιο που κωδικοποιεί τη μεγάλη υπομονάδα (*IPMI-LSU1*) έδειξαν ότι το *IPMI-LSU1* όχι μόνο συμμετέχει στη βιοσύνθεση της λευκίνης, αλλά και στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ (Sawada et al., 2009, Knill et al., 2009). Η μικρή υπομονάδα κωδικοποιείται από τρία γονίδια. Ο φαινότυπος του μεταλλάγματος στο οποίο είχε γίνει σίγηση του *ipmi-ssu1* είναι η θνησιμότητα σπόρου, γεγονός που κάνει επικρατέστερη την εμπλοκή του γονιδίου αυτού στη βιοσύνθεση της λευκίνης. Πειράματα σίγησης και στα άλλα δύο, *IPMI-SSU2* και *IPMI-SSU3* αποκάλυψαν μικρές μόνο αλλαγές στα επίπεδα των αμινοξέων και των ΓΚΣ σε σπόρους και φύλλα *A.thaliana* (Knill et al., 2009). Ωστόσο, από τη στενή συν-έκφρασή τους με βιοσυνθετικά γονίδια των γλυκοσινολικών διαφαίνεται ένας ρόλος στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ (Sawada et al., 2009, Knill et al., 2009).

### 6.3.4. Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση (τέταρτο βήμα)

Το *IPMDH1* ταυτοποιήθηκε με βάση τις προϋπάρχουσες γνώσεις για τη

βιοσύνθεση της λευκίνης και την ισχυρή συν-έκφρασή του με βιοσυνθετικά γονίδια των γλυκοσινολικών (Hirai et al., 2007; Sewada et al., 2009; He et al., 2009). Όντως, μετάλλαγμα σίγησης του *ipmdh1* εμφάνισε μείωση στη συγκέντρωση των ΓΚΣ σε φυτά *A.thaliana* (Sawada et al., 2009; He et al., 2009). *In vitro*, το IPMDH1 ήταν ενεργό απέναντι στο 3-ισοπροπυλομηλικό οξύ, το ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση της λευκίνης (He et al., 2009). Αναμένεται να εξεταστεί η δραστηριότητά του χρησιμοποιώντας υποστρώματα που εμπλέκονται ευθέως στη βιοσύνθεση των αλειφατικών (Sønderby et al., 2010).



### 6.3.5. Διαμερισματοποίηση και ανάγκη μεταφορών των ενδιάμεσων προϊόντων

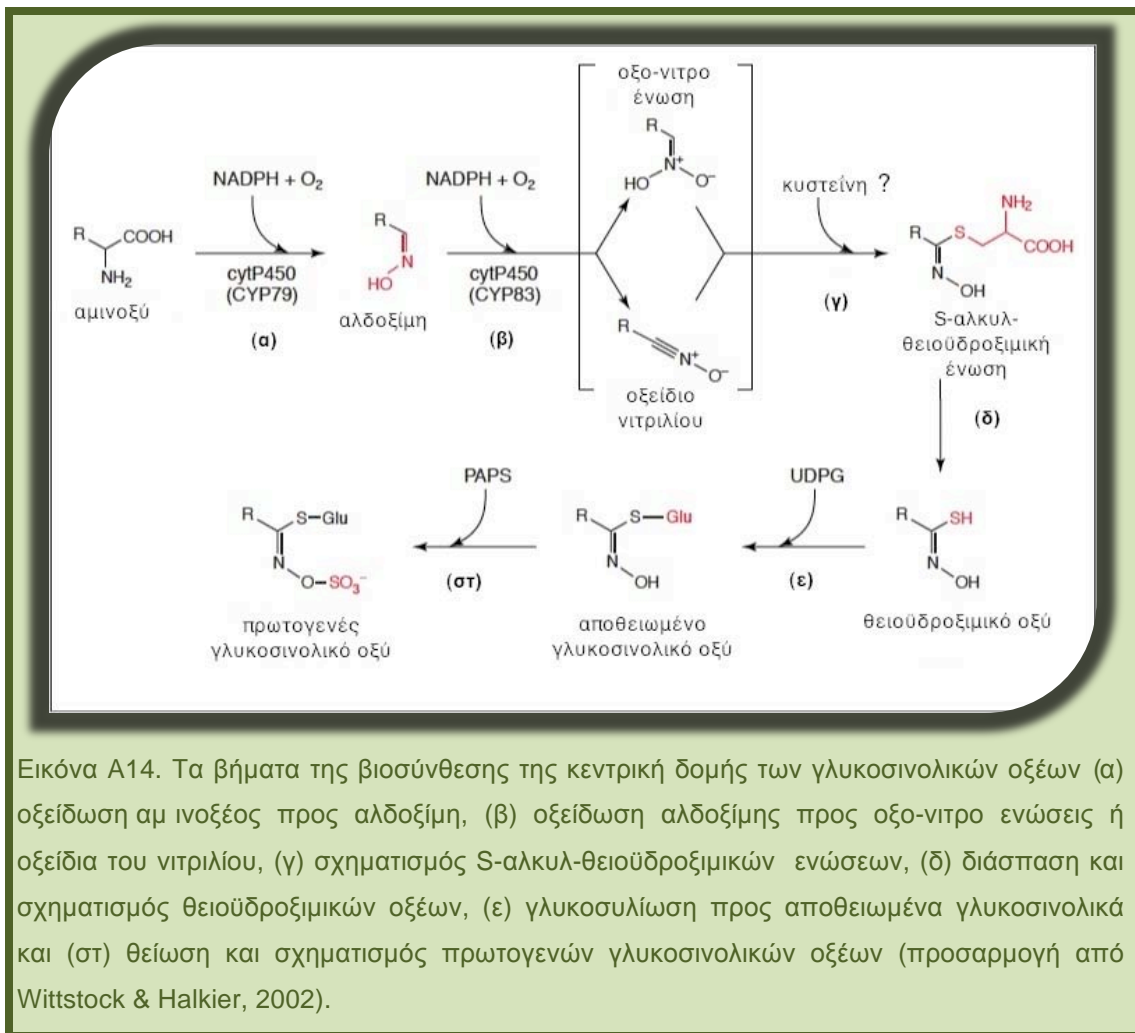
Το πρώτο βήμα πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, όπου βρίσκεται το BCAT4 (Schuster et al., 2006) ενώ τα υπόλοιπα ένζυμα που εμπλέκονται στην επιμήκυνση της αλυσίδας εντοπίζονται στο χλωροπλάστη (εικόνα A13) (Sawada et al., 2009; He et al., 2009; Knill et al., 2009; Textor et al., 2007; Falk et al., 2004; Gigolashvili et al., 2009). Αυτό δείχνει την ανάγκη εισόδου των 2-οξο οξέων στο χλωροπλάστη και εξόδου των επιμηκυσμένων αμινοξέων στο κυτταρόπλασμα, όπου πιστεύεται ότι λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός της κεντρικής δομής των γλυκοσινολικών οξέων (Halkier & Gershenzon, 2006). Ο μεταφορέας του χολικού οξέος BAT5 έχει προταθεί ως υποψήφιος, αλλά αναμένεται βιοχημικός χαρακτηρισμός για την οριστική

απόδειξη του ρόλου του (Gigolashvili et al., 2009).

#### 6.4. Δεύτερο βιοσυνθετικό στάδιο

Στο δεύτερο στάδιο τα πρόδρομα αμινοξέα μετατρέπονται στα πρόδρομα ΓΚΣ, με τη βιοσύνθεση της γλυκόνης, της κεντρικής δομής των ΓΚΣ (εικόνα A14). Η διαδικασία σχηματισμού της έχει αποσαφηνιστεί στο μεγαλύτερο μέρος της. Ενδεικτικά, 13 από τα ένζυμα που συμμετέχουν στα πέντε διαφορετικά βιοχημικά βήματα χαρακτηρίστηκαν μέχρι το 2006 (Grubb and Abel, 2006).

Πρώτο βήμα είναι η οξείδωση του πρόδρομου αμινοξέος στην αντίστοιχη αλδοξίμη. Η αντίδραση καταλύεται από μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450, της οικογένειας CYP79, που παρουσιάζουν εξειδίκευση στην πλευρική αλυσίδα. Ακολουθεί η οξείδωση της αλδοξίμης από ένζυμα της οικογένειας CYP83 του κυτοχρώματος P450 σε ενεργές ενώσεις (οξο-νιτρο ενώσεις ή οξείδια του νιτριλίου). Τα προϊόντα αυτά είναι ισχυρά ηλεκτρόφιλα που αντιδρούν αυθόρμητα με θειόλες για να σχηματίσουν στη συνέχεια S-αλκυλ-θειοϋδροξιμικές ενώσεις (Hansen et al., 2001; Bak & Feyereisen, 2001; Bak et al., 2001). Η διάσπαση των S-αλκυλ-θειοϋδροξιμικών ενώσεων από μια C-S λύαση οδηγεί στην παραγωγή θειοϋδροξιμικών οξέων (Mikkelsen et al., 2004), τα οποία στη συνέχεια γλυκοσυλιώνονται από γλυκοσυλτρανσφεράσες της οικογένειας UGT74 προς αποθειωμένα ΓΚΣ (Grubb et al., 2004). Η θείωσή τους από σουλφοτρανσφεράσες (SOT) ολοκληρώνει τη σύνθεση των πρωτογενών ΓΚΣ (Piotrowski et al., 2004).

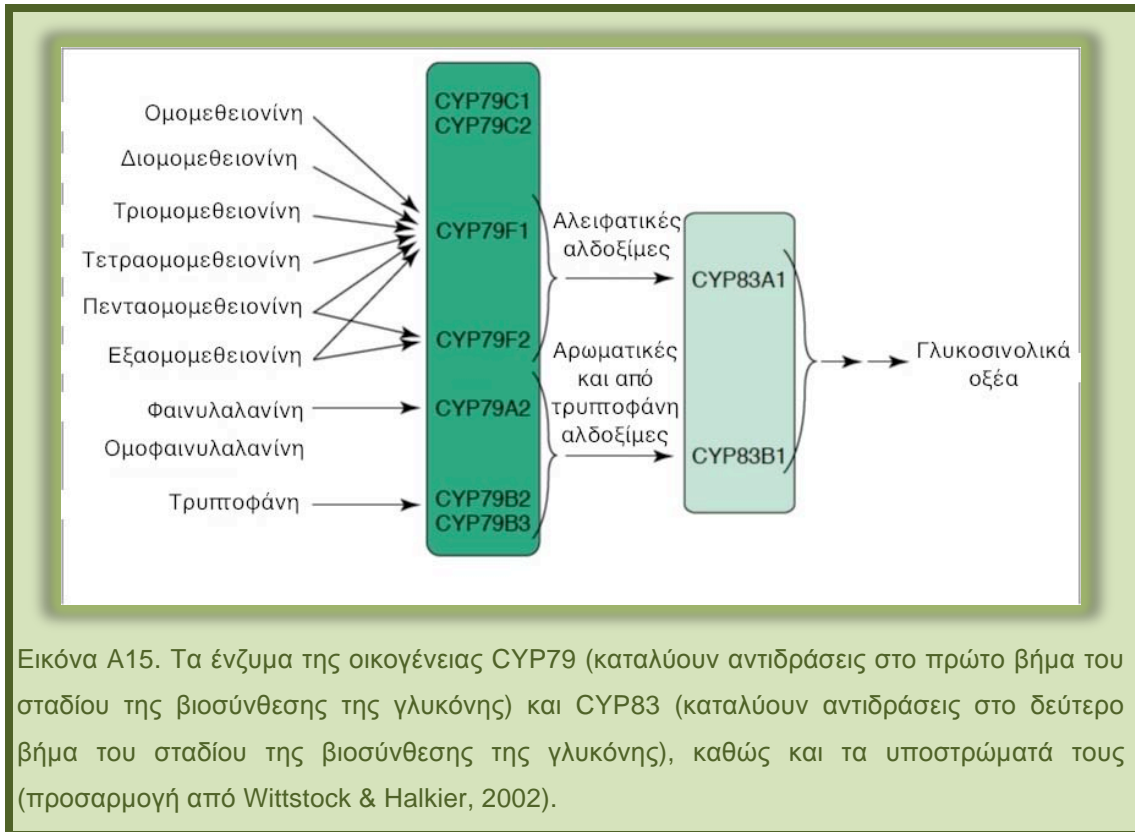


#### 6.4.1. Οξείδωση (πρώτο και δεύτερο βήμα)

Η αρχική οξείδωση δεν είναι αποκλειστικό βήμα της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ, 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 & Halkier, 2005). Επτά CYP79s κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του *A.thaliana* (CYP79C1, CYP79C2, CYP79F1, CYP79F2, CYP79A2, CYP79B2, CYP79B3), ενώ είναι γνωστή η εξειδίκευση των πέντε τελευταίων (Wittstock & Halkier, 2002; Mikkelsen et al., 2002).

Το υπόστρωμα του CYP79A2 είναι η φαινυλαλανίνη (Wittstock & 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 A15) (Hansen et al., 2001; Reintanz et al., 2001).



Εικόνα A15. 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 (προσαρμογή από Wittstock & Halkier, 2002).

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 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 ένζυμα CYP79 που μεταβολίζουν το ίδιο υπόστρωμα μπορεί να ρυθμίζονται διαφορετικά (Wittstock & Halkier, 2002).

Στο *A.thaliana*, τα δυο ένζυμα που οξειδώνουν τις αλδοξίμες είναι τα CYP83A1 και CYP83B1, με το πρώτο να έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τις αλειφατικές (από

μεθειονίνη) και το δεύτερο για τις ινδολικές και αρωματικές (από τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη) αλδοξίμες (Naur et al., 2003; Hemm et al., 2003).

#### 6.4.2. Σχηματισμός S-αλκυλ-θειοϋδροξιμικών ενώσεων και θειοϋδροξιμικών οξέων (τρίτο και τέταρτο βήμα)

Δεν είναι ξεκάθαρο αν μεσολαβεί κάποιο ένζυμο για τη μετατροπή της οξειδωμένης αλδοξίμης σε S-αλκυλ-θειοϋδροξιμικές ενώσεις ή αν η αντίδραση μπορεί να γίνει χωρίς ενζυμική παρέμβαση. Με βάση *in vivo* μελέτες, η κυστεΐνη είχε θεωρηθεί ως δότης θείου σε αυτή η σύζευξη (Wetter et al., 1968). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν τη γλουταθειόνη ως τον πιο πιθανό δότη θείου. Οι πρώτες ενδείξεις ότι η γλουταθειόνη και όχι η κυστεΐνη είναι ο δότης θείου, προήλθαν μετά από ανάλυση των αλληλόμορφων μεταλλαγμάτων *rad2* και *cad2*. Στα μεταλλάγματα αυτά έγινε σίγηση στο γονίδιο της συνθετάσης της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης, του πρώτου ενζύμου στη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης. Παρόλο που δεν υπήρχε αλλαγή στα επίπεδα ΓΚΣ, τα δύο μεταλλάγματα εμφάνισαν μειωμένη επαγωγή ινδολικών ΓΚΣ μετά από προσβολή από έντομα και μύκητες (Bednarek et al., 2009; Schlaerpi et al., 2008). Δεδομένου ότι με παροχή γλουταθειόνης αποκαταστάθηκε η επαγωγή (Schlaerpi et al., 2008), και ότι και τα δύο μεταλλάγματα περιέχουν μικρότερες συγκεντρώσεις γλουταθειόνης και περισσότερες κυστεΐνης από τους άγριους τύπους (Schlaerpi et al., 2008; Cobbett et al., 1998), τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η γλουταθειόνη είναι πιο πιθανόν να αποτελεί τον δότη ανηγμένου θείου αντί της κυστεΐνης (Sønderby et al., 2010).

Με την κυστεΐνη ως δότη θα εκπληρωνόταν η ανάγκη της λυάσης SUR1 να έχει μια ελεύθερη αμινομάδα στη δομή της (Mikkelsen et al., 2000; Schwimmer & Kjaer, 1960). Ωστόσο με τη γλουταθειόνη, θα ήταν απαραίτητο ένα επιπλέον βήμα στη βιοσύνθεση, στο οποίο να υδρολύεται το γ-γλουταμυλικό κατάλοιπο της σύνδεσης μεταξύ γλουταθειόνης και ενεργής αλδοξίμης. Πειράματα παραγωγής ΓΚΣ σε ετερόλογο σύστημα (*Nicotiana bethamiana*) έδειξαν την ύπαρξη αυτού του βήματος μεταξύ της θειϊκής σύζευξης και της επόμενης αντίδρασης που δίνει θειοϋδροξιμικά οξέα. Πέντε γνωστά γονίδια της βιοσύνθεσης αρωματικών ΓΚΣ

(*CYP79A2*, *CYP83B1*, *SUR1*, *UGT74B1* και *SOT16*) συνεκφράστηκαν παροδικά στο *Nicotiana bethamiana*. Αυτό οδήγησε σε παραγωγή χαμηλών επιπέδων αρωματικών ΓΚΣ, αλλά με επακόλουθη συσσώρευση γλουταθειόνης συζευγμένης με την ενεργή αλδοξίμη. Μετά από ανάλυση σε βάσεις δεδομένων συνέκφρασης εντοπίστηκε το γονίδιο *GGP1* (*γ-Glutamyl Peptidase1*), του οποίου η εισαγωγή μαζί με τα υπόλοιπα στο *Nicotiana bethamiana* μετρίασε τη μεταβολική συμφόρηση, μειώνοντας τα επίπεδα της συζευγμένης γλουταθειόνης και αυξάνοντας την παραγωγή αρωματικών ΓΚΣ. Επιπλέον, η ανασυνδυασμένη *GGP1* έδειξε να μεταβολίζει την ένωση που προκύπτει με τη σύζευξη της γλουταθειόνης (Geu-Flores et al., 2009). Απομένει να γίνει ανάλυση *in planta* για να επιβεβαιωθεί παρόμοιος ρόλος στο *A.thaliana* (Sønderby et al., 2010).

Θεωρώντας τη γλουταθειόνη ως το δότη θείου, αυξάνεται η πιθανότητα οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) να καταλύουν την αντίδραση σύζευξης με την ενεργή αλδοξίμη (Dixon et al., 2010). Από κοινού ρύθμιση των GST γονιδίων και γνωστών γονιδίων της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών έχει παρατηρηθεί και παλιότερα (Hirai et al., 2005), ωστόσο ο ρόλος τους στη βιοσύνθεση του γλυκοσινολικού δακτυλίου αναμένει πειραματική επικύρωση (Sønderby et al., 2010).

Οι S-αλκυλθειοϋδροξιμικές ενώσεις μετατρέπονται σε θειοϋδροξιμικά οξέα από το ένζυμο *SUR1*, το οποίο είναι μια C-S λυάση και δε διαθέτει εξειδίκευση στην πλευρική αλυσίδα (Mikkelsen et al., 2004).

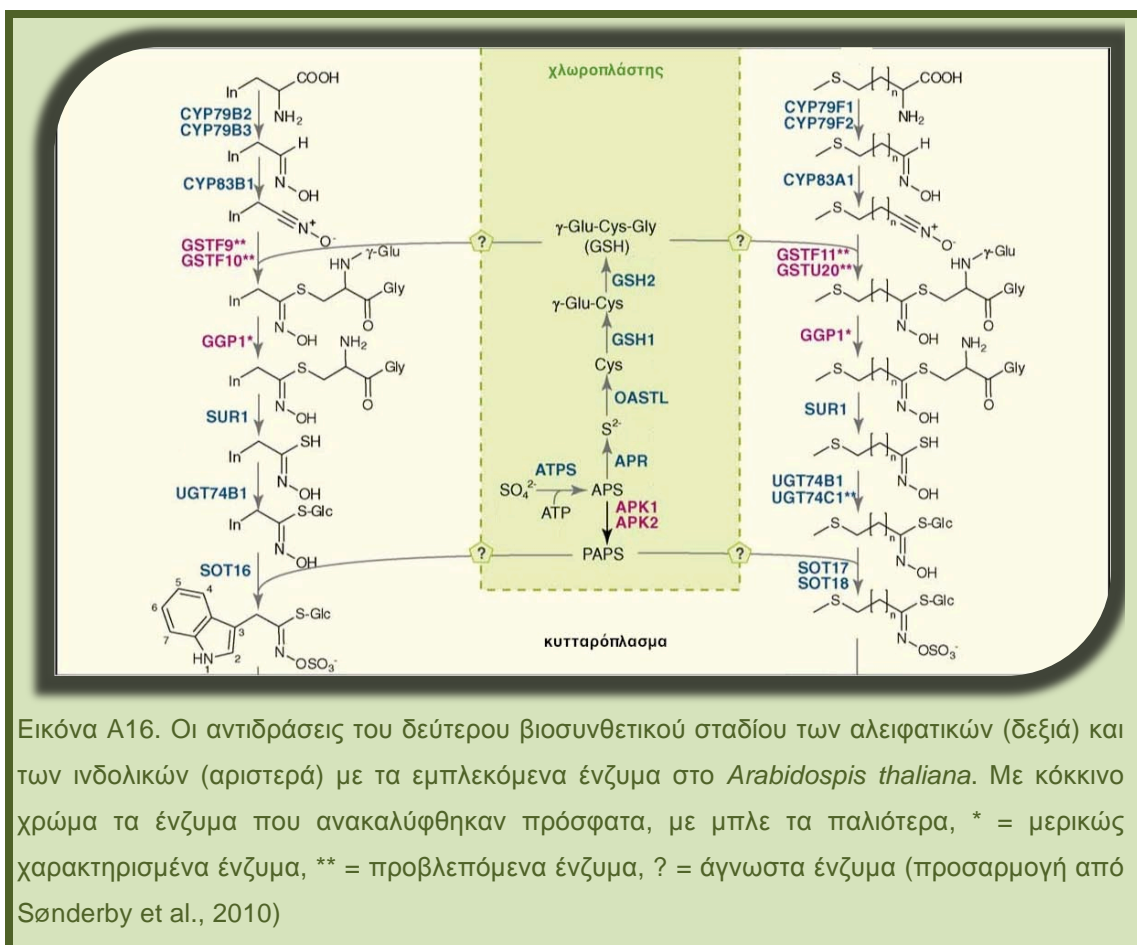
#### 6.4.3. Γλυκοσυλίωση και θείωση (πέμπτο και έκτο βήμα)

Από τις γλυκοσυλτρανσφεράσες της οικογένειας *UGT74*, η *UGT74B1* έδειξε να μεταβολίζει τα θειοϋδροξιμικά οξέα προερχόμενα από τη φαινυλαλανίνη, ενώ η *UGT74C1* έχει προταθεί ως υπεύθυνη για τη γλυκοσυλίωση υποστρωμάτων που προέρχονται από τη μεθειονίνη (Gachon et al., 2005).

Όσον αφορά στις σουλφοτρανσφεράσες, η *SOT16* μεταβολίζει τα αποθειωμένα γλυκοσινολικά που προέρχονται από την τρυπτοφάνη και τη φαινυλαλανίνη, ενώ οι

SOT17 και SOT18 παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση στα αλειφατικά υποστρώματα μακριάς αλυσίδας (Piotrowski et al., 2004).

Για την τελευταία αντίδραση απαιτείται παροχή θειικής ομάδας, με δότη το 3'-φωσφοαδενοσινο-5'-φωσφοθειικό (PAPS), που σχηματίζεται μέσω δύο αντιδράσεων, με ενδιάμεσο το αδενοσινο-5'-φωσφοθειικό (APS). Οι αντιδράσεις καταλύονται από τα ένζυμα ATP σουλφουρυλάση (ATPS) και APS κινάση (APK). Το APS μπορεί επίσης να μεταβολιστεί σε κυστεΐνη και μετέπειτα σε γλουταθειόνη, γεγονός που τοποθετεί την APK κομβικό ένζυμο στο μονοπάτι αφομοίωσης του θείου. Τα ένζυμα APK1 και APK2 εντοπίζονται στο χλωροπλάστη (Mugford et al., 2009), ενώ οι σουλφοτρανσφεράσες στο κυτταρόπλασμα (Klein et al., 2006), άρα υπάρχει η ανάγκη του μεταφορέα PAPS για την ολοκλήρωση της βιοσύνθεσης (Sønderby et al., 2010).

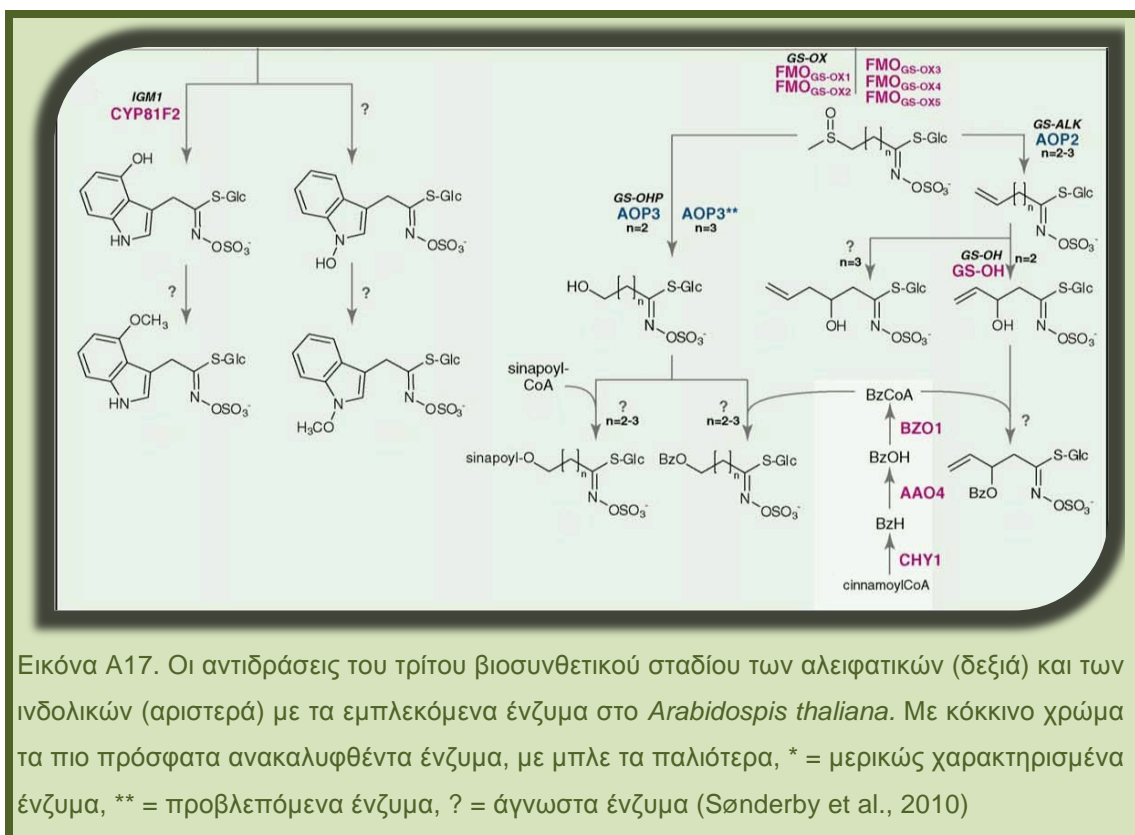


Εικόνα A16. Οι αντιδράσεις του δεύτερου βιοσυνθετικού σταδίου των αλειφατικών (δεξιά) και των ινδολικών (αριστερά) με τα εμπλεκόμενα ένζυμα στο *Arabidopsis thaliana*. Με κόκκινο χρώμα τα ένζυμα που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα, με μπλε τα παλιότερα, \* = μερικώς χαρακτηρισμένα ένζυμα, \*\* = προβλεπόμενα ένζυμα, ? = άγνωστα ένζυμα (προσαρμογή από Sønderby et al., 2010)



## 6.5. Τρίτο βιοσυνθετικό στάδιο

Στο τρίτο στάδιο τα μητρικά γλυκοσινολικά οξέα υπόκεινται σε δευτερογενείς τροποποιήσεις της πλευρικής αλυσίδας (εικόνα A17). Αυτό συμβαίνει μέσω αντιδράσεων οξυγόνωσης, υδροξυλίωσης, αλκυλίωσης και βενζοϋλίωσης για τα αλειφατικά ΓΚΣ, ενώ τα ινδολικά ΓΚΣ υφίστανται υδροξυλίωσεις και μεθοξυλίωσεις (Kliebenstein et al., 2005; Wittstock & Halkier, 2002; Mikkelsen et al., 2002; Sønderby et al., 2010).



### 6.5.1. Δευτερογενείς τροποποιήσεις αλειφατικών ΓΚΣ

Στο *A.thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις γενετικοί τύποι ως υπεύθυνοι για τις παραλλαγές στην πλευρική αλυσίδα των αλειφατικών ΓΚΣ. Έχουν ονομαστεί *GS-ELONG* (σχετίζεται με την επιμήκυνση της αλυσίδας της μεθειονίνης στο πρώτο βιοσυνθετικό στάδιο), *GS-OX*, *GS-AOP* και *GS-OH* (Kliebenstein et al., 2001).

Οι μονοξυγενάσες FMO που εμπλέκονται στο τρίτο στάδιο βιοσύνθεσης των αλειφατικών ΓΚΣ στο *A.thaliana* καταλύουν την αντίδραση S-οξυγόνωσης για τη μετατροπή από MT (methylthioalkyl) σε MS (methylsulfinylalkyl) ΓΚΣ (Li et al., 2008). Η μονοξυγενάση  $FMO_{GS-OX1}$  που εντοπίζεται στον γενετικό τόπο *GS-OX* ταυτοποιήθηκε ως υποψήφια για την αντίδραση S-οξυγόνωσης (Hansen et al., 2007). Φυλογενετική ανάλυση αποκάλυψε μια υποομάδα *FMO* γονιδίων, ειδικά για την οικογένεια Brassicaceae, που ονομάστηκε  $FMO_{GS-OX}$  και αριθμεί πέντε μέλη (Hansen et al., 2007; Li et al., 2008). Πειράματα ενζυμικών δοκιμών έδειξαν ότι τα τέσσερα πρώτα μέλη της ομάδας ( $FMO_{GS-OX1-4}$ ) έχουν δράση σε υποστρώματα μικρής και μεγάλης πλευρικής αλυσίδας, αλλά διαθέτουν διαφορετική ειδίκευση ανάλογα με το μήκος της. Το πέμπτο μέλος της ομάδας ( $FMO_{GS-OX5}$ ) έδειξε εξειδικευμένη δράση στη μετατροπή του 8-MTO (8-methylthiooctyl GSL), που έχει πλευρική αλυσίδα μεγάλου μήκους (Li et al., 2008). Τα παραπάνω γονίδια έχουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, γιατί οι αντικαρκινικές ιδιότητες που αποδίδονται στα σταυρανθή λαχανικά συνδέονται με τα οξυγονωμένα αλειφατικά ΓΚΣ (Juge et al., 2007).

Ο γενετικός τόπος *GS-AOP* περιλαμβάνει τους στενά συνδεδεμένους *GS-ALK* και *GS-OHP*, αντιπροσωπεύοντας ένα σημείο διακλάδωσης στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο διοξυγενάσες, η *AOP2* που εντοπίστηκε στον *GS-ALK* και η *AOP3* στον *GS-OHP*. Η *AOP2* καταλύει τη μετατροπή οξυγονωμένων ΓΚΣ σε αλκενυλο-ΓΚΣ, ενώ η *AOP3* καταλύει τη μετατροπή σε υδροξυαλκυλο-ΓΚΣ (Kliebenstein et al., 2001). Στο γενετικό τόπο *GS-OH* υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση υδροξυλιωμένων αλκενυλο-ΓΚΣ, έχει ταυτοποιηθεί η διοξυγενάση *GS-OH*, και η λειτουργία του γονιδίου επιβεβαιώθηκε *in planta* (Hansen et al., 2008).

#### 6.5.2. Δευτερογενείς τροποποιήσεις ινδολικών

Το *A.thaliana* συνήθως περιέχει τέσσερα ινδολικά ΓΚΣ, το I3M (ινδολουλ-3-μεθυλ γλυκοσινολικό οξύ), και τα συγγενή του 4-υδροξυ I3M (4OH-I3M), 4-μεθοξυ (I3M 4M-I3M) και 1-μεθοξυ I3M (1M-I3M)). Το γονίδιο *CYP81F2* έχει ταυτοποιηθεί για

την κατάλυση της αντίδρασης υδροξυλίωσης του I3M, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με ανάλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (Pfalz et al., 2009).

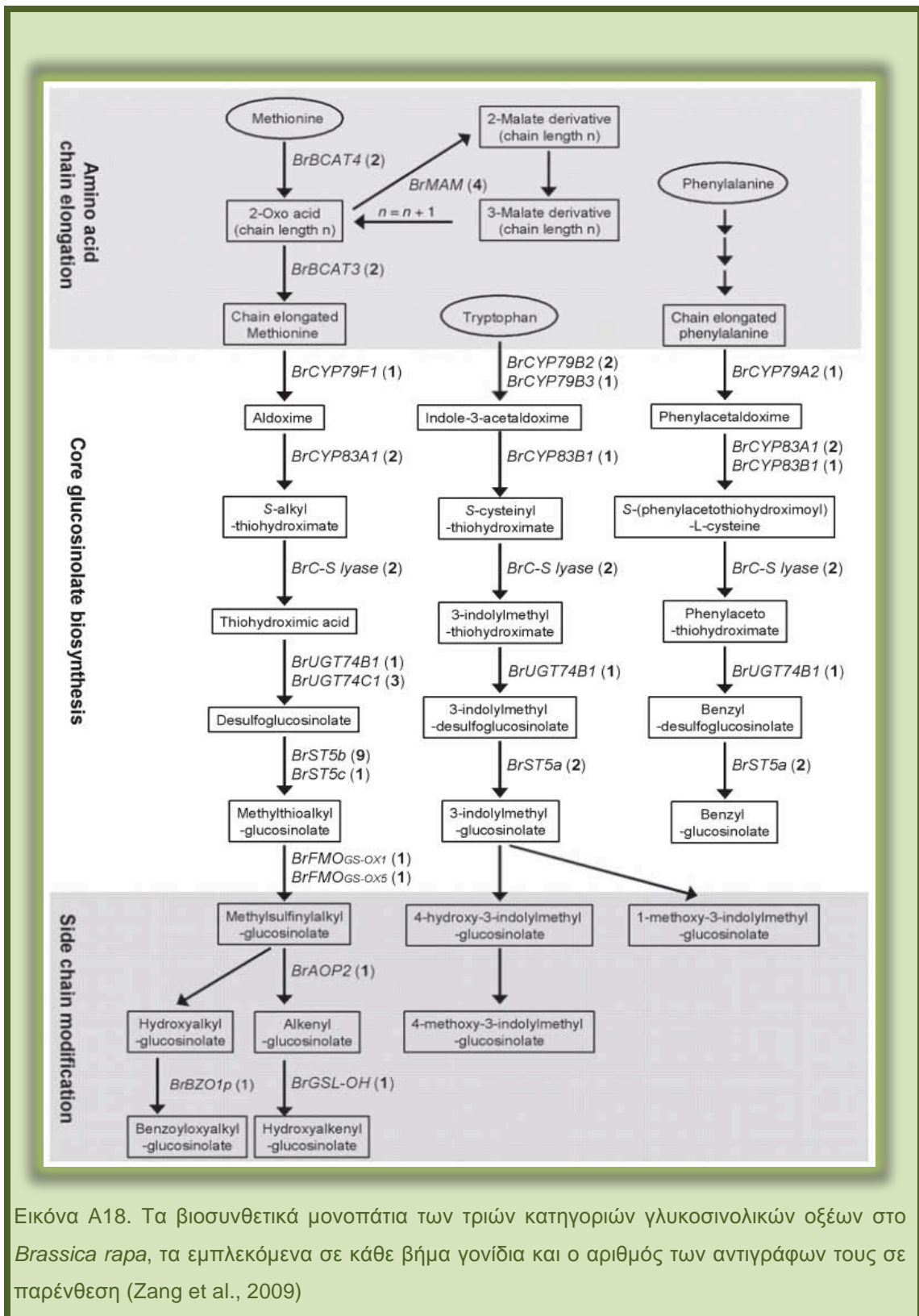
#### 6.6. Βιοσυνθετικά γονίδια στο *Brassica rapa*

Μελέτες συγκριτικής γονιδιωματικής με το *A.thaliana* οδήγησαν στην αναγνώριση μεγάλου αριθμού γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων και στο *Brassica rapa* (Zang et al., 2009; Wang et al., 2011).

Αρχικά αναγνωρίστηκαν 56 γονίδια που θεωρούνται πως εμπλέκονται στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ (Zang et al., 2009). Στη συνέχεια και αφού εντωμεταξύ ολοκληρωνόταν η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος του φυτού (The Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium, 2011), τα γονίδια που αναγνωρίστηκαν ως ορθόλογα των 52 γλυκοσινολικών γονιδίων του *A.thaliana* έφτασαν τα 102 (Wang et al., 2011).

Από τις μελέτες αυτές προέκυψε πως η ομοιότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε σχέση με τα γονίδια του *A.thaliana* κυμαίνεται από 59%-91%. Τα περισσότερα από τα γονίδια υπήρχαν σε περισσότερα από ένα αντίγραφα και το 93% εμφάνισε συνταινιακότητα μεταξύ του *B. rapa* και του *A. thaliana*. Επιπλέον, η παραλλαγή στον αριθμό των αντιγράφων των βιοσυνθετικών γονιδίων συσχετίζεται με ένα φαινόμενο τριπλοειδίας που παρατηρείται στο *B. rapa*, καθώς η δομή και η διεύθυνση των γονιδίων συμφωνούν με την απόκλιση του είδους που είναι γνωστό πως συνέβη εξελικτικά. Το περιεχόμενο σε βιοσυνθετικά γονίδια μπορεί να εξηγήσει και το προφίλ των ΓΚΣ και τη συσσώρευσή τους στο *B. rapa*.

Συνολικά και τα τρία στάδια της βιοσύνθεσης και τα γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε βήμα φαίνονται στην εικόνα A18.



Εικόνα A18. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των τριών κατηγοριών γλυκοσινολικών οξέων στο *Brassica rapa*, τα εμπλεκόμενα σε κάθε βήμα γονίδια και ο αριθμός των αντιγράφων τους σε παρένθεση (Zang et al., 2009)

## **7. Ρύθμιση του μεταβολισμού των γλυκοσινολικών οξέων**

### 7.1 Γενικά

Στο *A.thaliana* μελετήθηκε το προφίλ των ΓΚΣ κατά την διάρκεια ανάπτυξης του φυτού και βρέθηκε ότι ποικίλλει σημαντικά μεταξύ ιστών και οργάνων (Brown et al., 2003; Petersen et al., 2002). Δεδομένης της γνωστής λειτουργίας τους στην άμυνα των φυτών, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ΓΚΣ εντοπίζονται στα αναπαραγωγικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των σπερμάτων, λοβών, ανθέων και αναπτυσσόμενων ταξιανθιών, ενώ ακολουθούν τα νεαρά φύλλα, το ριζικό σύστημα και ακολούθως τα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα (Grubb & Abel, 2006).

Υπάρχουν πολλές 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). Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, όπως η προσβολή από εχθρούς και παθογόνα, ο μηχανικός τραυματισμός και η θρέψη των φυτών ρυθμίζουν το προφίλ των ΓΚΣ στα φύλλα και στους σπόρους (Wittstock & Halkier, 2002; Mikkelsen et al., 2002; Mewis et al., 2005; Hirai et al., 2005; Maruyama-Nakashita et al., 2003).

Παράλληλα, μελέτες σε μεταβολίτες και μεταγραφήματα καταδεικνύουν ότι υπάρχει 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.

Η επαγόμενη από παθογόνα και εχθρούς παραγωγή ΓΚΣ και η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεσή τους ρυθμίζεται, έστω και μερικώς, από το ιασμονικό οξύ, το σαλικυλικό οξύ και το αιθυλένιο, δηλαδή τις κυριότερες φυτικές ορμόνες που σχετίζονται με ειδικές και ευρέος φάσματος αμυντικές αποκρίσεις (Brader et al., 2001; Agrawal & Kurashige, 2003; Kliebenstein et al., 2002; Mewis et al., 2005; Reymond et al., 2004; Mikkelsen et al., 2003). Η μεταχείριση με ιασμονικό οξύ, το οποίο επάγει αποκρίσεις σε επίθεση εντόμων και νεκροτροφικών παθογόνων, οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις τόσο ινδολικών όσο και

συγκεκριμένων αλειφατικών ΓΚΣ (Brader et al., 2001; Mewis et al., 2005; Mikkelsen et al., 2003), πιθανώς μέσω πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης (Kliebenstein et al., 2002). Ανάλυση μεταλλαγμάτων χωρίς ικανότητα σύνθεσης ή σηματοδότησης ορμονών έδειξε ότι η παραγωγή συγκεκριμένων ινδολικών ΓΚΣ ρυθμίζεται από το σαλικυλικό οξύ, και επίσης ανέδειξε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις σηματοδότησης του ιασμονικού και του σαλικυλικού οξέος σε διαφορετική συγκέντρωση ΓΚΣ (Kliebenstein et al., 2002; Mewis et al., 2005; Mikkelsen et al., 2003; Cipollini et al., 2004; Traw et al., 2003).

Τα γονίδια *AOP2/AOP3* παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αλειφατικών ΓΚΣ. Απουσία τροποποιήσεων της πλευρικής αλυσίδας σε σειρές φυτών στις οποίες είχε γίνει σίγηση των *AOP2/AOP3* οδήγησε σε σημαντική μείωση των ΓΚΣ που προέρχονται από τη μεθειονίνη, σε σχέση με φυτά σειρών στις οποίες ήταν λειτουργικό το ένα *AOP2* αλληλόμορφο. Αυτό εξηγείται με τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης μέσω ενός μηχανισμού επανατροφοδότησης από τα διάφορα τελικά προϊόντα (Kliebenstein et al., 2001).

Διάφορες μεταλλάξεις που αναστέλλουν ή περιορίζουν τη σύνθεση μιας κατηγορίας ΓΚΣ αλλά προκαλούν αντισταθμιστική αύξηση μιας άλλης, δείχνουν αλληλοεξαρτώμενο μεταβολικό έλεγχο των διαφόρων τύπων ΓΚΣ (Hemm et al., 2003; Reintanz et al., 2001; Zhao et al., 2002; Tantikanjana et al., 2001;2004). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ομοιοστατικό έλεγχο της γλυκοσινολικής σύνθεσης, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής επανατροφοδότησης μεταξύ των δύο κατηγοριών ΓΚΣ, ο οποίος χρησιμοποιεί ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα ως αναστολείς (Hemm et al., 2003).

Μία εναλλακτική εξήγηση είναι ο ανταγωνισμός των μονοξυγενασών του κυτοχρώματος P450 για ηλεκτρόνια, κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων αναγωγής ενός ατόμου μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η παροχή των ηλεκτρονίων αυτών γίνεται από το NADPH μέσω της αναγωγάσης του κυτοχρώματος P450. Η συνολική παροχή του NADPH σε μη φωτοσυνθετικές καταστάσεις ελέγχεται από τη ροή διαμέσου του οξειδωτικού μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Ως εκ τούτου, η μειωμένη παροχή NADPH θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την αλληλεξάρτηση της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ, επειδή η αναστολή της μίας

κατηγορίας ΓΚΣ θα αυξήσει τη διαθεσιμότητα NADPH για την άλλη, με αποτέλεσμα τη συνολική διατήρηση των ΓΚΣ σε κάποιο βαθμό. Αυτή η υπόθεση εξηγεί και την επίδραση των MAM γονιδίων στη συγκέντρωση ολικών ΓΚΣ. Σειρές φυτών *A.thaliana* που συνθέτουν αλειφατικά ΓΚΣ κυρίως από διομο-μεθειονίνη συγκεντρώνουν 20% περισσότερα συνολικά ΓΚΣ, σε σχέση με σειρές που χρησιμοποιούν ως πρόδρομο την ομομεθειονίνη. Ο επιπλέον γύρος στην επιμήκυνση της αλυσίδας δίνει NADH, σε αντιδράσεις ανάλογες του κύκλου του κιτρικού οξέος, που μπορεί να μετατραπεί σε NADPH από την αφυδρογονάση του μηλικού οξέος και να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, το NADPH παρέχεται ανεξάρτητα στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και μ'αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η συνολική παραγωγή ΓΚΣ. Το μοντέλο αυτό συμφωνεί και με διαθέσιμα στοιχεία για τη ρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν για την αφυδρογονάση που καταλύει το πρώτο βήμα στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, αλλά και την αναγωγή του κυτοχρώματος P450. Τα γονίδια που κωδικοποιούν και για τα δύο αυτά ένζυμα επάγονται από τραυματισμό, αντιμετώπιση παθογόνου ή κάποιας άλλης καταπόνησης (Wakao & Benning, 2005; Mizutani & Ohta, 1998), συνθήκες υπό τις οποίες αυξάνει η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών όπως τα ΓΚΣ (Grubb & Abel, 2006).

## 7.2. Μεταγραφικοί παράγοντες

Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες με εξειδίκευση αλληλουχίας που προσδένονται στο DNA, αλληλεπιδρώντας με τις ρυθμιστικές περιοχές (συχνά προαγωγείς) των γονιδίων-στόχων, καθορίζοντας με αυτόν τον τρόπο το βαθμό έναρξης της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση (Vom Endt et al., 2002). Μπορούν να ενσωματώσουν εσωτερικά (συχνά αναπτυξιακά) και εξωτερικά (περιβαλλοντικά) σήματα για τη ρύθμιση των ενζύμων γονιδιακής έκφρασης, ελέγχοντας έτσι τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών. Τα γονίδια που συνθέτουν δευτερογενείς μεταβολίτες ρυθμίζονται σε μεταγραφικό επίπεδο από πολλαπλούς μεταγραφικούς παράγοντες. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές οικογένειες

μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στον έλεγχο της βιοσύνθεσης και τη συσσώρευση των δευτερογενών μεταβολιτών (Yang et al., 2012).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες MYB, αποτελούνται από μέχρι και τέσσερις επαναλαμβανόμενες ατελείς αλληλουχίες (R) 52 αμινοξέων (Dubos et al., 2010; Feller et al. 2011). Διακρίνονται σε τέσσερις οικογένειες και αρκετά μέλη της R2R3-MYB οικογένειας έχουν αναφερθεί ως ρυθμιστές πολλών βιοσυνθετικών μονοπατιών σε διάφορα φυτικά είδη, μεταξύ αυτών και του μονοπατιού της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ (Celenza et al. 2005; Gigolashvili et al. 2007;2008; Yang et al., 2012).

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

Έχουν αναγνωριστεί έξι R2R3-MYB μεταγραφικοί παράγοντες ως ρυθμιστές της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών. Από αυτούς, οι MYB34/ATR1 (AtMYB34), MYB51/HIG1 (AtMYB51) και MYB122/HIG2 (AtMYB122) ρυθμίζουν θετικά τη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ (Celenza et al., 2005; Gigolashvili et al., 2007a).

Ο ATR1, MYB μεταγραφικός παράγοντας που αναγνωρίστηκε σε σάρωση για μεταλλάγματα με τροποποίηση στη ρύθμιση τρυπτοφάνης, ελέγχει την παραγωγή ινδολικών ΓΚΣ (Smolen & Bender, 2002; Celenza et al., 2005). Η υπερέκφραση του ATR1 δεν τροποποιεί την περιεκτικότητα του ριζικού συστήματος σε αλειφατικά ΓΚΣ, αλλά αντ'αυτού προκαλεί δεκαπλάσια συσσώρευση ινδολικών ΓΚΣ 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 απύσα στα φύλλα, την κύρια θέση συσσώρευσης των ινδολικών ΓΚΣ. Επιπλέον, η υπερέκφραση του ATR1/MYB34 οδηγεί σε φαινότυπο ανάπτυξης υψηλής αυξίνης (Gigolashvili et al., 2007).

Μελέτες μεταλλαγμάτων έδειξαν ότι ο ATR1 ρυθμίζει το μεταβολισμό της αυξίνης μέσω του IAOx, ενδιάμεσου του IAA (Smolen & Bender, 2002; Celenza et al., 2005). Επιπλέον προκαλείται αναδραστική αναστολή της έκφρασης του ATR1 από ινδολικά ΓΚΣ ή τα ενδιάμεσά τους προϊόντα (Smolen & Bender, 2002). Η ρύθμιση της



ανάδρασης της έκφρασης του *ATR1* είναι πιθανό να περιλαμβάνει πολύπλοκα κυκλώματα σηματοδότησης, δεδομένου ότι τα επίπεδα μεταγραφής του *ATR1* μεταβάλλονται διαφορετικά από μεταλλάξεις στη σηματοδότηση ορμονών και από την εφαρμογή διαφόρων φυτικών ορμονών (Smolen & Bender, 2002; Celenza et al., 2005).

Ο μεταγραφικός παράγοντας *HIG/MYB51* ενεργοποιεί τους υποκινητές των βιοσυνθετικών γονιδίων των ινδολικών ΓΚΣ, οδηγώντας σε αυξημένη συσσώρευση των τελευταίων. Η υπερέκφραση του *HIG/MYB51* είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ινδολικών ΓΚΣ, χωρίς εντούτοις να επηρεάζεται ο μεταβολισμός της αυξίνης και η μορφολογία του φυτού. Παρουσία μηχανικού ερεθίσματος (άγγιγμα ή τραύμα) αυξάνεται πρόσκαιρα η έκφραση του *HIG/MYB51* αλλά όχι του *ATR1/MYB34*. Η υπερέκφραση του *HIG/MYB51* μείωσε την επιθετικότητα των εντόμων, όπως φαίνεται από δοκιμές διπλής επιλογής με το λεπιδόπτερο *Spodoptera exigua* (Gigolashvili et al., 2007).

Παρόλο που ο *ATR1* ενεργοποιεί συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με την τρυπτοφάνη και τη σύνθεση ινδολικών ΓΚΣ, άλλοι ρυθμιστές μεταγραφικοί παράγοντες του πυρήνα των κυττάρων που επηρεάζουν την ομοιόσταση των ΓΚΣ είναι πιθανό να εξυπηρετούν ευρύτερες λειτουργίες. Μια πυρηνική πρωτεΐνη που συνδέεται στην καλμοδουλίνη, η *IQD1*, φαίνεται ότι δρα ως θετικός ρυθμιστής της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ. Η *IQD1* μπορεί να ενισχύσει και να τελειοποιήσει μια σειρά από συντονισμένες αμυντικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένης της υπερπαραγωγής ΓΚΣ, παρόλο που η έκφρασή της δεν ρυθμίζεται αισθητά από φυτικές αμυντικές ορμόνες, αλλά επάγεται από μηχανικά ερεθίσματα (Levy et al., 2005). Επίσης, ο μεταγραφικός παράγοντας *AtDof1.1* έχει ταυτοποιηθεί ως τμήμα ενός ρυθμιστικού δικτύου που ελέγχει τη δραστηριότητα του *CYP83B1* και κατ'έπекταση της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ (Skirycz et al., 2006).

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

Οι μεταγραφικοί παράγοντες *MYB28/PMG1/HAG1* (*AtMYB28*),

MYB29/PMG2/HAG3 (AtMYB29) και MYB76/HAG3 (AtMYB76) ελέγχουν τη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ (Gigolashvili et al., 2007b, 2008; Hirai et al., 2007; Sønderby et al., 2007, 2010a).

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

Η περιεκτικότητα σε αλειφατικά ΓΚΣ καθώς και τα μεταγραφικά επίπεδα των βιοσυνθετικών τους γονιδίων εμφανίζουν αύξηση σε μεταλλάγματα υπερέκφρασης, ενώ μείωση παρατηρείται σε μεταλλάγματα στα οποία έγινε σίγηση του *HAG1* με μηχανισμό RNAi. Με ανάλυση έκφρασης GUS ισχυρή δραστηριότητα του υποκινητή του *HAG1* αποκαλύπτεται σε αναπαραγωγικά όργανα και φύλλα του *A.thaliana*, τμήματα που αποτελούν και τις κύριες θέσεις συσσώρευσης των αλειφατικών ΓΚΣ. Η παρουσία μηχανικού ερεθίσματος (άγγιγμα ή τραύμα) προκάλεσε παροδική αύξηση της έκφρασης του *HAG1/MYB28* σε ανθοταξίες ανθισμένων φυτών. Επίσης, η υπερέκφραση του *HAG1/MYB28* προκαλεί μείωση στη δραστηριότητα εντόμων, όπως φάνηκε σε πείραμα με το λεπιδόπτερο *Spodoptera exigua*. Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει ότι η γλυκόζη προκαλεί αύξηση της έκφρασης του *HAG1/MYB28*, ενώ οι φυτικές ορμόνες δεν επηρεάζουν την έκφρασή του (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. Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμό των λειτουργιών τους έδειξε ότι και οι δύο αποτελούν θετικούς ρυθμιστές της βιοσύνθεσης των αλειφατικών ΓΚΣ.

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 ΓΚΣ μικρής και μεγάλης αλυσίδας, όπως προσδιορίστηκε πρόσφατα

(Gigolashvili et al., 2007b ; Hirai et al., 2007). Οι HAG2/MYB76 και HAG3/MYB29 έχουν επικαλυπτόμενες αλλά συγκεκριμένες λειτουργίες στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ.

## **8. Επίδραση της λίπανσης στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στους φυτικούς ιστούς**

### **8.1. Γενικά**

Η λίπανση των καλλιεργειών και ιδιαίτερα η αζωτούχα, έχει διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στην αύξηση της αγροτικής παραγωγής ανταποκρινόμενη στην ολοένα και μεγαλύτερη αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι υπάρχουν επιβλαβείς επιδράσεις των αυξανόμενων ποσοτήτων ενεργού αζώτου στο περιβάλλον (Vitousek et al., 1997; Howarth, 2004). Τα προβλήματα που παρουσιάζονται είναι: οξίνιση των εδαφών και των υδάτινων πόρων, ευτροφισμός των παράκτιων θαλάσσιων οικοσυστημάτων, απώλεια της βιοποικιλότητας σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα, αυξημένα επίπεδα αερίων του θερμοκηπίου που οφείλονται στις εκπομπές N<sub>2</sub>O και μείωση του όζοντος της στρατόσφαιρας (Galloway & Cowling, 2002). Επίσης, η επιβάρυνση των επιφανειακών και υπογείων υδάτων λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων εγκυμονεί κινδύνους για τη δημόσια υγεία (Spalding & Exner, 1993).

Το άζωτο φαίνεται ότι ασκεί σημαντική επίδραση όχι μόνο στην ποσότητα παραγωγής, αλλά και στην ποιότητα των προϊόντων. Επηρεάζει επίσης και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στους διάφορους ιστούς (Gerson & Kelsey, 1999; Custic et al., 2002; Kopsell et al., 2007; Medina-Lara et al., 2008; Ibrahim et al., 2011, 2012). Γενικότερα, ενώσεις που σχετίζονται με το δευτερογενή μεταβολισμό παρουσιάζουν αρκετά ευαίσθητη απόκριση ως προς τα επίπεδά τους, όταν το φυτό βρεθεί σε κατάσταση τροφопενίας (Chishaki & Horiguchi, 1997).

Είναι έκδηλο πως υπάρχει μια ανάγκη για μια μετάβαση των υπαρχόντων γεωργικών συστημάτων σε συστήματα παραγωγής τα οποία να είναι αειφόρα και

να υποστηρίζουν επάρκεια ποιοτικής παραγωγής γεωργικών προϊόντων. Μέσα στους στόχους της ανάπτυξης αειφορικών συστημάτων είναι και η βελτίωση της απόδοσης της χρήσης του αζώτου. Η βέλτιστη χρήση για την ανάπτυξη και τη μεγιστοποίηση των αποδόσεων καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά των φυτών, τις φυσιολογικές διαδικασίες, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τη διαχείριση των θρεπτικών ουσιών. Οι πιο σημαντικές αυξήσεις στην απόδοση της χρήσης του αζώτου έχουν προκύψει από τη βελτίωση των φυτικών γονοτύπων και των καλλιεργητικών πρακτικών (Spiertz, 2010).

Οι καλλιεργητικές πρακτικές φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση των δευτερογενών μεταβολιτών (Fortier et al. 2010; Hamilton & Fonseca 2010; Selma et al. 2010). Στα φυτά της οικογένειας Brassicaceae οι στρατηγικές λίπανσης με άζωτο (N) και θείο (S) είναι πρωταρχικής σημασίας για τη συγκέντρωση των ΓΚΣ, καθώς τα στοιχεία αυτά αποτελούν βασικά συστατικά των πρόδρομων τους μορίων (Aires et al., 2007; Li et al., 2007; Omirou et al., 2009; 2012). Η χορήγηση θείου και αζώτου επηρεάζει τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα λαχανικά της οικογένειας Brassicaceae, αλλά οι συνέπειες στη συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσής τους από τη μυροσινάση έχουν ελάχιστα μελετηθεί (Siemens et al., 2008).

## 8.2. Επίδραση του θείου

Κάθε μόριο ΓΚΣ, περιέχει τουλάχιστον δύο άτομα θείου. Το ένα προέρχεται από τη θειϊκή ομάδα, ενώ το άλλο από την κυστεΐνη. Επίσης, πολλά από τα ΓΚΣ συντίθενται και από τη μεθειονίνη και έτσι μπορεί να περιέχουν και τρίτο άτομο θείου στη δομή τους.

Ως εκ τούτου αναμένεται πως η χορήγηση θείου να προκαλεί αύξηση στη συγκέντρωση των ΓΚΣ στις περισσότερες περιπτώσεις (Li et al., 2007; Schonhof et al., 2007). Σε πείραμα με *Brassica napus*, στα οποία η χορήγηση θείου ήταν απρόσκοπτη, η συγκέντρωση αλειφατικών ΓΚΣ ήταν 15 έως 20 φορές μεγαλύτερη, σε σχέση με αυτή των φυτών στα οποία χορηγήθηκε θείο μόνο στα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους (Blake-Kalff et al., 1998).

Τα αποτελέσματα τέτοιων πειραμάτων δείχνουν ότι υπάρχουν σημαντικές δυνατότητες να μεταβληθούν τα επίπεδα των ΓΚΣ σε καλλιεργούμενα φυτά, ώστε να αυξηθούν οι οργανοληπτικές καθώς και οι θετικές για την υγεία ιδιότητές τους ή η αξία τους ως βιοαπολυμαντικά εδάφους. Ωστόσο, στο μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *italica*), η κατάσταση φαίνεται να είναι πιο πολύπλοκη (Falk et al., 2007). Η προσπάθεια να αυξηθεί η συγκέντρωση ΓΚΣ με αύξηση της θειικής λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα την ελάχιστη αύξηση της συγκέντρωσης στις ανθοκεφαλές κάποιων ποικιλιών, ενώ σε άλλες δεν είχε καμία επίδραση ή ακόμη και μείωση. Η επίδραση της θειικής λίπανσης στη συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ ποικίλλει, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, ενώ η εφαρμογή της φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική όταν πραγματοποιείται στα ενδιάμεσα στάδια της ανάπτυξης των ανθοκεφαλών (Vallejo et al., 2003a, b; Rangkadilok et al., 2004).

Μια περαιτέρω ένδειξη ότι η διαθεσιμότητα του θείου σχετίζεται με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ προέρχεται από έρευνες σε φυτά που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικούς τύπους εδάφους. Η λίπανση με θείο σε φυτά που καλλιεργούνται σε εδάφη με έλλειψη θείου οδήγησε σε δραματική αύξηση των ΓΚΣ από ότι η λίπανση σε φυτά που μεγαλώνουν σε εδάφη με επαρκές θείο (Withers & O'Donnell, 1994).

Η χορήγηση θείου μπορεί να επηρεάσει διαφορετικά τη συγκέντρωση των διαφόρων τύπων ΓΚΣ. Στην ελαιοκράμβη, η εφαρμογή θείου σε φυτά με έλλειψη θείου προκάλεσε μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των αλειφατικών από ότι των ινδολικών ΓΚΣ (Withers & O'Donnell, 1994; Zhao et al., 1994; Blake-Kalff et al., 1998). Ο κύριος λόγος αύξησης της συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ με την εφαρμογή της θειικής λίπανσης μπορεί να αποδοθεί στην προέλευσή τους από τη μεθειονίνη που περιέχει θείο, σε αντιδιαστολή με τα ινδολικά ΓΚΣ που προέρχονται από την τρυπτοφάνη (Falk et al., 2007).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να ερευνώνται και οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους οι αλλαγές στην παροχή θείου μπορούν να διαμορφώσουν το μεταβολισμό των ΓΚΣ. Συγκρίνοντας τα μεταγραφικά προφίλ φυτών *A.thaliana* που έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες επάρκειας θείου με άλλα που έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες έλλειψης θείου, μπορεί να διευκρινιστεί ποια γονίδια παρουσιάζουν

διαφορετική έκφραση σε συνθήκες καταπόνησης λόγω έλλειψης θείου (Nikiforova et al., 2003; Hirai et al., 2003; Maruyama-Nakashita et al., 2003). Επίσης, έχουν γίνει αναλύσεις μεταβολιτών, με τη χρήση GC-MS και LC-MS, σε φυτά *A.thaliana* που έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες έλλειψης θείου (Nikiforova et al., 2003, 2005; Hirai et al., 2004, 2005). Συνδυάζοντας τις μεταβολικές αναλύσεις και το μεταγραφικό προφίλ με ένα χρονοεξαρτώμενο τρόπο οι ερευνητές έδειξαν ότι η έκφραση των γονιδίων των οικογενειών *MAM*, *CYP79* και *CYP83* μειώθηκε σε συνθήκες ανεπάρκειας θείου. Σε γενικές γραμμές, από αυτές τις έρευνες φαίνεται ότι η ανεπάρκεια θείου οδηγεί σε μειωμένη έκφραση όλων των κύριων βιοσυνθετικών γονιδίων των γλυκοσινολικών και κατά συνέπεια, τη μείωση της συγκέντρωσης γλυκοσινολικών στο φυτό. Παράλληλα, το φυτό μεγιστοποιεί την ικανότητά του να προσλάβει, να αφομοιώσει και να χρησιμοποιήσει το θείο, αυξάνοντας την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων (Falk et al., 2007).

### 8.3. Επίδραση του αζώτου

Εκτός από το θείο, το άζωτο επίσης φαίνεται ότι επηρεάζει τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών. Η αύξηση του χορηγούμενου αζώτου έχει αναφερθεί ότι οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ σε αρκετά φυτά (Li et al. 2007; Kopsel et al. 2007; Schonhof et al., 2007). Σε πειράματα θρέψης με ρόκα, η περιεκτικότητα σε γλυκοσινολικά επηρεάστηκε σημαντικά από τα επίπεδα αζώτου, το στάδιο ανάπτυξης και την αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων μεταξύ τους. Τα αλειφατικά ΓΚΣ μειώθηκαν σημαντικά σε αυξημένα επίπεδα αζώτου, σε αντίθεση με τα ινδολικά. Υπό υπερβολική αζωτούχα λίπανση η συνολική συγκέντρωση ΓΚΣ μειώθηκε σημαντικά (Omirou et al., 2012).

Ωστόσο γενικεύσεις για την επίδραση του αζώτου πρέπει να γίνονται με προσοχή, γιατί τα δεδομένα μερικών ερευνών (Li et al. 2007; Kopsel et al. 2007; Schonhof et al., 2007) αντικρούουν τα αποτελέσματα άλλων (Bloem et al., 2007; Omirou et al., 2009). Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψιν η σημαντική επίδραση του θείου στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ (Omirou et al., 2012).

Το άζωτο φαίνεται ότι ελέγχει την αφομοίωση του θείου σε μεταγραφικό επίπεδο

(Nikiforova et al. 2003; Hesse et al. 2004; Kruse et al. 2007). Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης ΓΚΣ και της χορήγησης θείου, για κάποια είδη Brassicaceae όπως το μπρόκολο και η ελαιοκράμβη επηρεάζεται μερικώς από το περιεχόμενο του φυτού σε άζωτο (Schonhof et al., 2007; Schnug et al., 1995; Kim et al., 2002). Ωστόσο τα αποτελέσματα είναι μερικώς αντιφατικά αφού προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι, η χορήγηση αζώτου τείνει να μειώσει, να αυξήσει ή να μην έχει καμία επίδραση στη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα είδη του γένους *Brassica*. (Zhao et al., 1993; Kim et al. 2002; Zimmermann et al., 2005; Kopsel et al. 2007; Schonhof et al. 2007; Omirou et al. 2009)

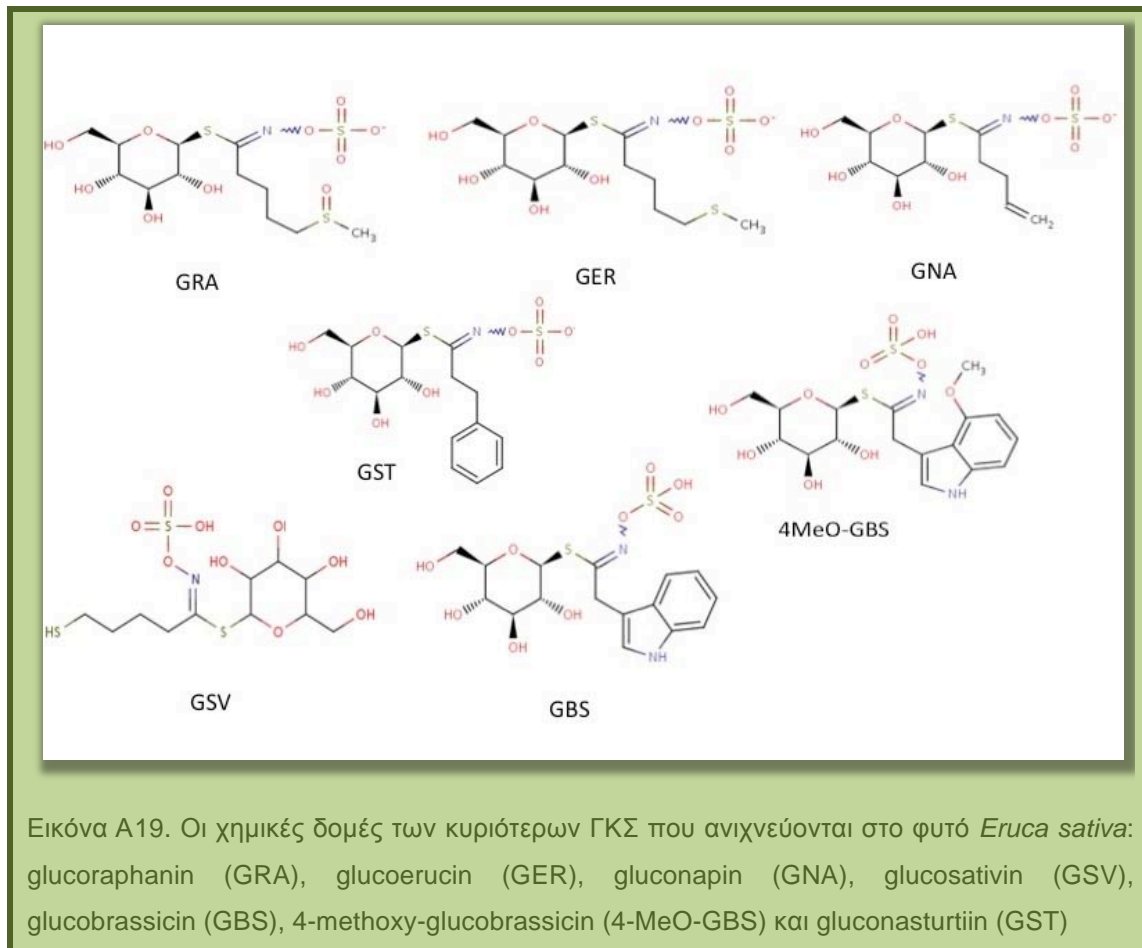
### **9. Γλυκοσινολικά οξέα στο φυτό *Eruca sativa***

Έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 12 είδη ΓΚΣ συμπεριλαμβανομένων 7 αλειφατικών ενώσεων (glucoraphanin, glucoerucin, 4-mercaptobutyl-GLS, progoitrin/epiprogoitrin, sinigrin, 4-methylpentyl-GLS, *n*-hexyl-GLS), τριών ινδολικών (4-hydroxyglucobrassicin, 5-hydroxyglucobrassicin, 4-methoxy-glucobrassicin), αλλά και δύο δομικά σχετιζόμενων ενώσεων που περιέχουν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό (4-(β-D-glucopyranosyldisulfanyl)butyl-GLS και ένα διμερές 4-mercaptobutyl-GLS) (Cataldi et al., 2007).

Τα περισσότερα ΓΚΣ που έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί από τη ρόκα είναι αλειφατικά και παράγονται από τη μεθειονίνη. Τα κυριότερα είναι η glucoerucin (4-MTB) και η glucosativin (GSV). Επιπλέον, η GSV και το διμερές 4-(β-D-glucopyranosyldisulfanyl)butyl-GSL είναι μοναδικά στη χημική σύσταση αλειφατικά γλυκοσινολικά τα οποία δεν έχουν περιγραφεί σε άλλα είδη. Η παραγωγή του ως κύριο πτητικό από φρέσκους ιστούς είναι πιθανώς υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική γεύση και μυρωδιά της ρόκας (Bennett et al., 2002). Τα σημαντικότερα ΓΚΣ που ανιχνεύονται στα φύλλα είναι: glucoraphanin (GRA), glucoerucin (GER), gluconarin (GNA), glucosativin (GSV), glucobrassicin (GBS) και 4-methoxy-glucobrassicin (4-MeO-GBS) (Omirou et al., 2012).

Σε μελέτη ανίχνευσης ΓΚΣ σε φύλλα και ρίζες φυτών που αναπτύχθηκαν για τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσας διατριβής, εντοπίστηκαν τα αλειφατικά

GRA (glucoraphanin), GER (glucoerucin), GNA (gluconapin) και GSV (glucosativin), τα ινδολικά GBS (glucobrassicin) και 4-MeO-GBS (4-methoxy-glucobrassicin) και το αρωματικό GST (gluconasturtiin) (Ομήρου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Η χημική τους δομή φαίνεται στην εικόνα A19.





ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

## **1.Φυτικό υλικό-Πειράματα θρέψης**

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα ρόκας (*Eruca sativa* Mill.) ντόπιας κυπριακής ποικιλίας.

### **1.1. Προετοιμασία των σπόρων**

Αρχικά οι σπόροι απολυμάνθηκαν με εμβάπτισή τους σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου για 5 λεπτά. Ακολούθως, ξεπλύθηκαν 6 φορές με απιονισμένο νερό και απλώθηκαν σε τρυβλία, ο πάτος των οποίων καλύφθηκε με 2 φύλλα διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM και εμποτίστηκε με απιονισμένο νερό. Τα τρυβλία αφέθηκαν στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 36 ως 48 ώρες, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προβλάστηση των σπερμάτων.

### **1.2. Πειραματικό σχέδιο - Λιπάνσεις**

Για τις ανάγκες της εργασίας εφαρμόστηκαν δύο πειραματικές προσεγγίσεις. Η πρώτη αφορούσε στην ανάπτυξη των φυτών για διάστημα 40 ημερών υπό έλλειψη : α)αζώτου, β)θείου, γ)και των δύο μαζί (μακροχρόνια πενία - long-term starvation). Στη δεύτερη τα φυτά αναπτύχθηκαν για μικρό διάστημα υπό έλλειψη θείου και στη συνέχεια εφαρμόστηκε πλήρες θρεπτικό διάλυμα (βραχυχρόνια πενία - short-term starvation).

#### **1.2.1 Πρώτο πείραμα (long-term starvation)**

Μετά την προβλάστηση τα νεαρά έκφυτα μεταφυτεύτηκαν σε γλάστρες, όπου χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα περλίτης, ο οποίος προηγουμένως είχε αποστειρωθεί. Σε κάθε γλάστρα μεταφυτεύτηκαν δεκαοχτώ φυτά και οι γλάστρες αφού χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες-μεταχειρίσεις τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 23°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι).

Για τη λίπανση των φυτών χρησιμοποιήθηκαν 4 τροποποιημένα θρεπτικά διαλύματα Hoagland ανάλογα με την κάθε μεταχείριση (Πίνακας Β1). Οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων έγκεινται σε τροποποιήσεις ως προς τη χορήγηση αζώτου και θείου.

Πίνακας Β1. Συστατικά των θρεπτικών διαλυμάτων πρώτου πειράματος και συγκεντρώσεις

| ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ  | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ<br>ΣΤΟ STOCK<br>Δ/ΜΑ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ<br>STOCK Δ/<br>ΤΟΣ ΤΕΛΙΚΟ<br>ΘΡΕΠΤΙΚΟ | Δ/ΜΑ<br>1<br>N+/S+ | Δ/ΜΑ<br>2<br>N-/S+ | Δ/ΜΑ<br>3<br>N+/S- | Δ/ΜΑ<br>4<br>N-/S- |
|--|----------------------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                     | 14.42 g/100ml                    | 5 ml/L  | ✓                  |                    | ✓                  |                    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 1M                               | 1 ml/L  | ✓                  | ✓                  |                    |                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1M                               | 1 ml/L  | ✓                  | ✓                  | ✓                  | ✓                  |
| Fe(EDTA)   | 0.1M                             | 1 ml/L  | ✓                  | ✓                  | ✓                  | ✓                  |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 2.36 g /100ml                    | 5 ml/L  | ✓                  | ✓                  | ✓                  | ✓                  |
| KCl  | 10.6 g/100ml                     | 5 ml/L  |                    | ✓                  |                    | ✓                  |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                 | 1M                               | 5 ml/L  |                    |                    | ✓                  | ✓                  |

Στον πίνακα Β1 φαίνονται τα συστατικά του κάθε διαλύματος και οι συγκεντρώσεις τους, τόσο στα πυκνά διαλύματα που ετοιμάστηκαν για κάθε μακροστοιχείο, όσο και η τελική συγκέντρωση του κάθε άλατος που χρησιμοποιήθηκε στο τελικό θρεπτικό διάλυμα. Όπως φαίνεται, η διαφοροποίηση από το πλήρες θρεπτικό διάλυμα για τη μείωση των συγκεντρώσεων αζώτου ή/και θείου έγινε με την αντικατάσταση του KNO<sub>3</sub> με KCl και του MgSO<sub>4</sub> με MgCl<sub>2</sub>. Έτσι τελικά προέκυψαν τα εξής διαλύματα:

- N+/S+ : πλήρες σε άζωτο (114 mg/L) και θείο (32 mg/L),
- N-/S+ : μειωμένης συγκέντρωσης αζώτου (14 mg/L),
- N+/S- : μειωμένης συγκέντρωσης θείου (0,019 mg/L)
- N-/S- : μειωμένης συγκέντρωσης αζώτου (14 mg/L) και θείου (0,019 mg/L).

Επιπρόσθετα, όλα τα διαλύματα εμπλουτίστηκαν και με διάλυμα ιχνοστοιχείων. Για κάθε λίτρο διαλύματος προστέθηκε 1 ml από το πυκνό διάλυμα ιχνοστοιχείων, τα συστατικά του οποίου φαίνονται στον πίνακα Β2.

Πίνακας Β2. Συστατικά και συγκεντρώσεις stock διαλύματος ιχνοστοιχείων

| ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ  | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ STOCK Δ/ΤΟΣ |
|---|-------------------------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 2.86 g/L                |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                | 1.81 g/L                |
| ZnCl <sub>2</sub>                                   | 0.11 g/L                |
| CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0.05 g/L                |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.027 g/L               |

Τα φυτά ποτίζονταν κάθε δεύτερη μέρα εναλλάξ με νερό τη μία φορά και με το αντίστοιχο διάλυμα για την κάθε μεταχείριση την επόμενη. Το διάλυμα Hoagland εφαρμόστηκε σταδιακά σε αραιώσεις 25%, 50% και τελικά 100% για την αποφυγή τοξικότητας στα σπορόφυτα. Η ποσότητα του θρεπτικού διαλύματος που εφαρμόστηκε αυξάνονταν με την αύξηση των φυτών.

#### 1.2.1.α Δειγματοληψία

Μετά την ανάπτυξή τους για 35 ημέρες, κάθε φυτό εκριζώθηκε από τη γλάστρα με προσοχή και χωρίς να σημειωθούν απώλειες οποιουδήποτε τμήματος φυτικού ιστού. Αφαιρέθηκαν οι κοτυληδόνες και διαχωρίστηκαν το ριζικό τμήμα και τα φύλλα του κάθε φυτού. Κάθε κομμάτι συλλεγόμενου ιστού μεταφερόταν κατευθείαν σε υγρό άζωτο. Έτσι μετά το τέλος της διαδικασίας συλλέχθηκαν για κάθε μεταχείριση τόσο φύλλα όσο και ρίζες χωριστά. Οι ιστοί αποθηκεύτηκαν στη συνέχεια σε θερμοκρασία -80° C. Τα φυτά του πειράματος την ημέρα της δειγματοληψίας φαίνονται στην εικόνα Β1.



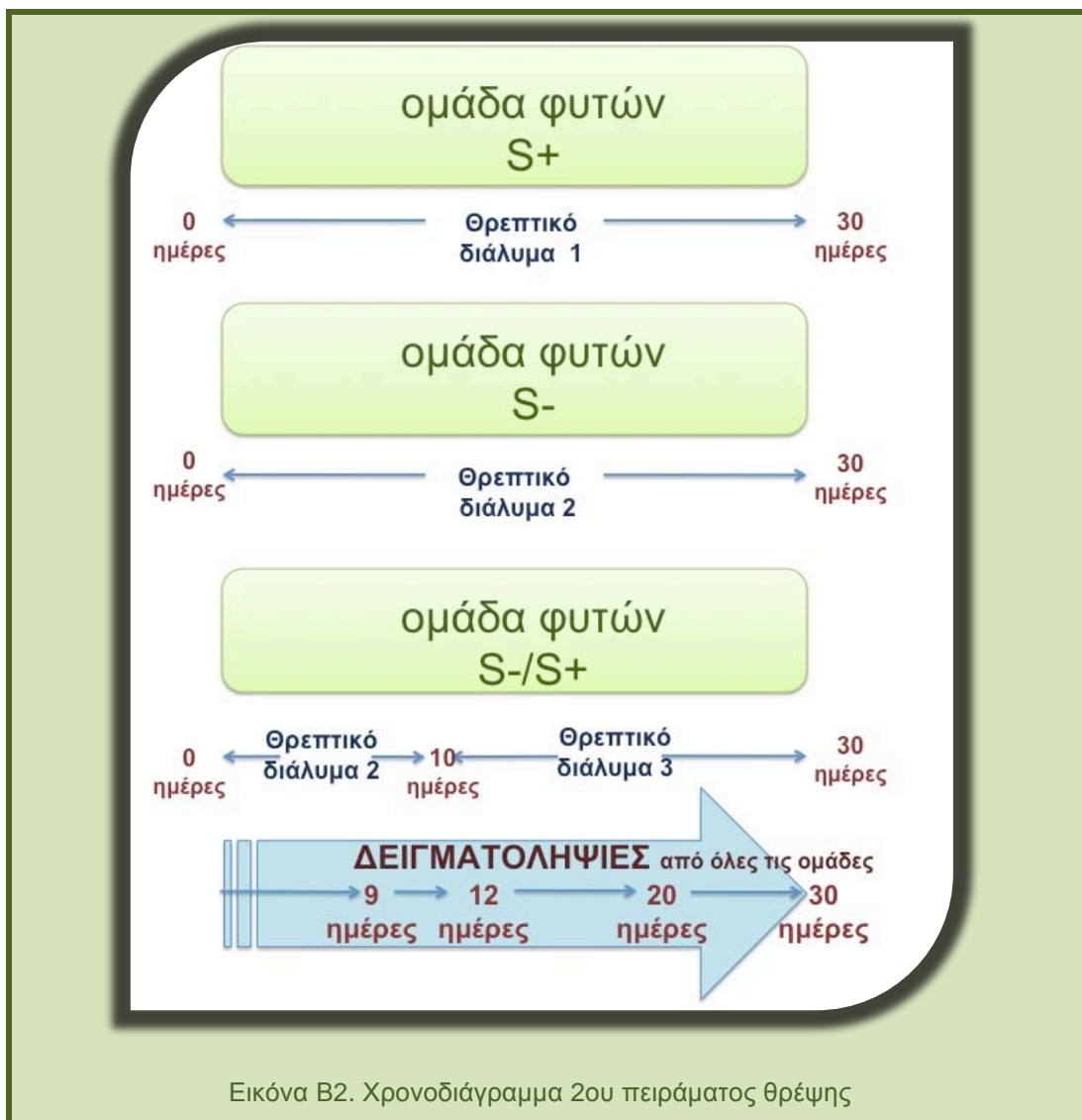
Εικόνα Β1. Φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος την ημέρα της δειγματοληψίας

### 1.2.2 Δεύτερο πείραμα (short-time starvation)

Μετά την προβλάστηση τα νεαρά έκφυτα φυτεύτηκαν σε γλάστρες, όπου χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα περλίτης, ο οποίος προηγουμένως είχε αποστειρωθεί. Σε κάθε γλάστρα φυτεύτηκαν πενήντα φυτά και οι γλάστρες αφού χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 23°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι). Τα φυτά της πρώτης ομάδας (S+), αναπτύχθηκαν για 30 ημέρες και σ'αυτό το διάστημα ποτίζονταν με το Διάλυμα 1, που περιείχε όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Τα φυτά της δεύτερης ομάδας (S-), αναπτύχθηκαν για 30 ημέρες και σ'αυτό το διάστημα ποτίζονταν με το Διάλυμα 2, που περιείχε θείο σε συγκέντρωση 1/10 σε σχέση με το Διάλυμα 1. Τα φυτά της τρίτης ομάδας (S+/S-), αναπτύχθηκαν για 9 ημέρες υπό συνθήκες έλλειψης θείου και ποτίζονταν με το Διάλυμα 2, ενώ μετά την δέκατη ημέρα και για 20 ημέρες ακόμα αναπτύχθηκαν υπό πλήρεις συνθήκες. Για το σκοπό αυτό ποτίστηκαν με το Διάλυμα 3, στο οποίο έχουν γίνει οι απαραίτητες τροποποιήσεις ώστε να λαμβάνεται ποσότητα θείου ίση με τα φυτά της ομάδας 1, δεδομένου ότι για 9 ημέρες τα φυτά λάμβαναν το 1/10 του θείου. Η πλήρης σύσταση των διαλυμάτων φαίνεται στον πίνακα Β3, ενώ το χρονοδιάγραμμα του πειράματος στην εικόνα Β2.

Πίνακας Β3. Συστατικά των θρεπτικών διαλυμάτων δεύτερου πειράματος και συγκεντρώσεις

| ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ  | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ<br>ΣΤΟ STOCK<br>Δ/ΜΑ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ<br>STOCK Δ/ΤΟΣ<br>ΣΤΟ ΤΕΛΙΚΟ<br>ΘΡΕΠΤΙΚΟ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ<br>STOCK Δ/ΤΟΣ<br>ΣΤΟ ΤΕΛΙΚΟ<br>ΘΡΕΠΤΙΚΟ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ<br>STOCK Δ/ΤΟΣ<br>ΣΤΟ ΤΕΛΙΚΟ<br>ΘΡΕΠΤΙΚΟ |
|--|----------------------------------|--|--|--|
|  |                                  | Δ/ΜΑ 1   | Δ/ΜΑ 2   | Δ/ΜΑ 3   |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 1M                               | 7 ml/L   | 7 ml/L   | 7 ml/L   |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1M                               | 5 ml/L   | 5 ml/L   | 5 ml/L   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1M                               | 2 ml/L   | 2 ml/L   | 2 ml/L   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 1M                               | 2 ml/L   | 0.2 ml/L   | 1.8 ml/L   |
| Fe(EDTA)   | 0.1M                             | 1 ml/L   | 1 ml/L   | 1 ml/L   |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                 | 1M                               | -  | 1.6 ml/L   | 0.25 ml/L  |
| ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ (stock)                                 | -                                | 1 ml/L   | 1 ml/L   | 1 ml/L   |



Εικόνα Β2. Χρονοδιάγραμμα 2ου πειράματος θρέψης

### 1.2.2.α. Δειγματοληψία

Έγιναν συνολικά τέσσερις δειγματοληψίες, στις 9, 12, 20 και 30 ημέρες. Κάθε φυτό εκριζώθηκε από τη γλάστρα με προσοχή και χωρίς να σημειωθούν απώλειες οποιουδήποτε τμήματος φυτικού ιστού. Αφαιρέθηκαν οι κοτυληδόνες και διαχωρίστηκαν το ριζικό τμήμα και τα φύλλα του κάθε φυτού. Κάθε κομμάτι συλλεγόμενου ιστού μεταφερόταν κατευθείαν σε υγρό άζωτο. Έτσι μετά το τέλος της διαδικασίας συλλέχθηκαν για κάθε μεταχείριση τόσο φύλλα όσο και ρίζες χωριστά. Οι ιστοί αποθηκεύτηκαν στη συνέχεια σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2. Μοριακή μελέτη**

Έγινε προσπάθεια απομόνωσης αλληλουχιών που σχετίζονται με γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση γλυκοσινολικών οξέων στη ρόκα, κλωνοποίησής τους σε φορείς έκφρασης για απομόνωση της αντίστοιχης πρωτεΐνης και μελέτη της έκφρασής τους στις διαφορετικές μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν.

### 2.1. Απομόνωση γονιδίων

Απομονώθηκε αρχικά ολικό RNA από φυτά ρόκας. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε αλυσίδα cDNA και σχεδιάστηκαν εκκινητές με σκοπό να την ενίσχυση τμημάτων των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν. Οι αλληλουχίες κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα και ακολούθησε η αλληλούχισή τους. Εφόσον διαπιστώθηκε ότι σχετίζονται με γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση ΓΚΣ, έγινε επέκτασή τους προς το 5' και 3' άκρο. Ακολούθησε επεξεργασία των αλληλουχιών που προέκυψαν, ανάλυση με τα κατάλληλα προγράμματα και εν τέλει κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε διαδικασία παρατίθεται στο παράρτημα I. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε διαδικασία παρατίθενται στο παράρτημα II.

### 2.1.1. Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ιστός από βλαστούς και φύλλα που συγκομίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 80°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. Απομόνωση ολικού RNA έγινε και με τη μέθοδο του χλωριούχου λιθίου (Brusslan and Tobin, 1992).

Λειοτριβημένος ιστός 0.2 g περίπου μεταφέρθηκε με σπάτουλα σε σωληνάκι του 1.5 ml που περιείχε 300 μl διάλυμα εκχύλισης και 300 μl διαλύματος PIC. Ακολούθησε ανάδευση με χρήση vortex για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι του 1.5 ml και προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος PIC. Ακολούθησε ανάδευση με χρήση vortex για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Για την κατακρήμνιση του DNA και RNA που περιέχονται στην υδατική φάση πραγματοποιήθηκε προσθήκη 1/10 του όγκου διαλύματος CH<sub>3</sub>COONa συγκέντρωσης 3M, pH 5.2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης. Μετά από φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 14.000 στροφές/λεπτό στους 4° C το DNA αφαιρέθηκε με κατακρήμνιση με LiCl. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 562.5 μl διαλύματος 10T/10E και 187.5 μl διαλύματος LiCl συγκέντρωσης 8M και το δείγμα αφέθηκε για τουλάχιστον 4 ώρες στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 14.000 στροφές/λεπτό στους 4° C. Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη για 15 λεπτά στους 4° C, αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου υπό αέρα και επαναδιαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O. Το RNA διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C ή -80° C ανάλογα με το αν πρόκειται για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης αντίστοιχα.

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



### 2.1.2. Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Όσον αφορά τον διαχωρισμό γραμμικών δίκλωνων μορίων, 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 αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη. Για παράδειγμα σε ένα πήκτωμα με 0.8% συγκέντρωση αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb. 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.

Για την παρασκευή της πηκτής προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης σε ορισμένο όγκο διαλύματος 1xTAE, ώστε να εξασφαλισθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση, με βάση το εύρος διαχωρισμού που χρειάζεται για κάθε περίπτωση και ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθούν. Ενδεικτικά, για προετοιμασία πηκτής αγαρόζης 1% προστίθεται 1g αγαρόζης σε 100 gr διαλύματος 1xTAE. Το υλικό θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί εντελώς η αγαρόζη και στη συνέχεια κρύωσε μέχρι τους 50° C περίπου. Στο διάλυμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθιδίο σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml και αναμίχθηκε καλά. Στη συνέχεια αδειάστηκε σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, εφαρμόστηκε η ειδική «χτένα» ώστε να δημιουργηθούν υποδοχείς για την τοποθέτηση των δειγμάτων και αφέθηκε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων στα οποία προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης 10x. Μόλις στερεοποιήθηκε η πηκτή αφαιρέθηκε προσεκτικά η «χτένα» και τοποθετήθηκε στο δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE. Σε κάθε μία από τις θέσεις που δημιουργήθηκαν στην πηκτή τοποθετήθηκε με πιπέτα η επιθυμητή ποσότητα δείγματος, ενώ σε κάποια

από αυτές τοποθετήθηκε μάρτυρας (ladder). Εφαρμόστηκε η επιθυμητή τάση ρεύματος στη συσκευή και τα δείγματα αναλύθηκαν σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν υπερέβη τα 5 V/cm.

### 2.1.3. Υδρόλυση του γονιδιωματικού DNA με τη χρήση του ενζύμου DNaseI

Με αυτή τη μέθοδο απομακρύνεται το γονιδιωματικό DNA που ίσως συνυπάρχει με το RNA που απομονώθηκε από τον ιστό. Αρχικά προστίθεται δεοξυριβονουκλεάση (*DNase I, Takara*) στο αρχικό δείγμα RNA και στη συνέχεια γίνεται μεταχείριση με φαινόλη και χλωροφόρμιο για τον “καθαρισμό” του RNA.

Τα δείγματα RNA (20-50 µg) μεταφέρθηκαν σε σωληνάκι του 1.5 ml στον οποίο είχαν προστεθεί 3 µl ρυθμιστικού διαλύματος 10X, 1 µl DNase I, 0.5 µl RNase Inhibitor (παρεμποδιστής ριβονουκλεασών) και ddH<sub>2</sub>O έως 30 µl. Ακολούθησε επώαση στους 37° C για 30 λεπτά.

Μετά την προσθήκη 170µl ddH<sub>2</sub>O και 200µl φαινόλης, πραγματοποιήθηκε ανάδευση με χρήση vortex, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι. Η ίδια διαδικασία έγινε και κατά την ανάμιξη με φαινόλη/χλωροφόρμιο σε αναλογία 1:1 και σε ανάμιξη με ίσο όγκο χλωροφόρμιο.

Η κατακρήμνιση του RNA έγινε 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 πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 200 µl αιθανόλης 70% v/v. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και οι σωλίνες με το ίζημα αφέθηκαν να στεγνώσουν αφού τοποθετήθηκαν σε πάγο. Τέλος, έγινε επαναδιάλυση σε 20 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### 2.1.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χρησιμοποιήθηκε φωτομετρική ανάλυση. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο νόμο των Beer και Lambert. Με το νόμο αυτό η απορρόφηση του φωτός από ένα διάλυμα συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της ουσίας και το μήκος της διαδρομής του φωτός μέσα από το διάλυμα.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αραίωση του δείγματος 1:50 σε ddH<sub>2</sub>O (συνήθως χρησιμοποιείται 1 μl δείγματος) και προσδιορίστηκε η απορρόφηση του διαλύματος σε μήκος κύματος 260 nm χρησιμοποιώντας ειδική κυβέττα χαλαζία. Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, δίνεται από τον τύπο:

$C = O.D._{260} \times D \times \text{συντελεστής αραίωσης}$ , όπου O.D. είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και D είναι η σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος. Για καθαρά διαλύματα DNA η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml, για διαλύματα RNA ισούται με 40 mg/ml, ενώ στην περίπτωση ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 30 mg/ml.

Προκειμένου να υπολογιστεί η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων, υπολογίζονται επιπλέον οι λόγοι  $O.D._{260}/O.D._{280}$  και  $O.D._{240}/O.D._{260}$ . Το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας όταν η τιμή του πρώτου λόγου κυμαίνεται μεταξύ 1.8 – 2.0 και του δεύτερου στο 0.5.

#### 2.1.5. Σύνθεση cDNA - αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το ολικό RNA το οποίο μετατρέπεται σε cDNA παρουσία του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τα ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης (oligo-dT). Η χρήση τους βασίζεται στην ικανότητα υβριδισμού τους στην poly(A) ουρά των μορίων mRNA, η οποία προκύπτει από την πολυαδενυλίωση που υφίστανται τα

mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων κατά την ωρίμανσή τους. Το cDNA που παράγεται θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στη συνήθη τεχνική της PCR.

Για την αντίδραση PCR τοποθετήθηκαν σε σωληνάκι ειδικό για PCR τα εξής: 1 ng – 5 µg ολικού RNA, 1 µl (500 µg/ml) εκκινητές *Oligo(dT)<sub>12-18</sub>* (*invitrogen*), 1 µl dNTP Mix (10 mM από το κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 12 µl.

Το μίγμα που προέκυψε θερμάνθηκε στους 65°C για 5 λεπτά και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Σε αυτό προστέθηκε το μίγμα της αντίστροφης μεταγραφάσης αποτελούμενο από 4 µl ρυθμιστικό διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφάσης, 1 µl *RNAseOUT-Invitrogen* (40 U/µl) (παρεμποδιστής ριβονουκλεασών) και 2 µl DDT 0.1M.

Το μίγμα επώαστηκε για 2 λεπτά στους 42° C, ακολούθησε προσθήκη 1 µl (200 units) αντίστροφης μεταγραφάσης *SuperScript™ II* (*Invitrogen*) και επώαση στους 42° C για 50 λεπτά, ακολουθούμενη από άλλη μία επώαση 15 λεπτών στους 70° C. Τελικά το συντιθέμενο cDNA διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C.

#### 2.1.6. Αντίδραση PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA.

Στο ολικό RNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για να διαπιστωθεί τυχόν ύπαρξη DNA. Για αυτό το σκοπό ενισχύθηκε το γονίδιο της ουβικιτίνης το οποίο εκφράζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς.

Η αντίδραση 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 τα εξής:

Στο πρώτο βήμα (denaturation step) γίνεται η αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95°C).

Στο δεύτερο βήμα (annealing step) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με το DNA με εφαρμογή συγκεκριμένης θερμοκρασίας υβριδισμού. 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 συνήθως 5° C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης.

Στο τρίτο βήμα (extention step) λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η ανωτέρω διαδικασία επαναλαμβάνεται συνήθως για 25 – 35 κύκλους. 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 αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε σωληνάκι κατάλληλο για PCR σε τελικό όγκο 20 μl και περιελάμβανε 2 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα Kara Taq, 0.4 μl μίγμα dNTPs 10 mM (τελική συγκέντρωση 200 μM το κάθε ένα), 0.5 μl ολικό RNA, 0.8 μl εκκινητής έμπροσθεν 5μM (τελική συγκέντρωση 0.4 μM), 0.8 μl εκκινητής ανάστροφος 5μM (τελική συγκέντρωση 0.4 μM), 0.08 μl DNA πολυμεράση Kara Taq (Karabiosystems) (τελική συγκέντρωση 0.02 U/μl) και 15.42 μl ddH<sub>2</sub>O.

Το τελικό μίγμα αναμίχθηκε μετά από γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετήθηκε στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το πρόγραμμα του πίνακα Β4.

Πίνακας Β4. Πρόγραμμα PCR με KaraTaq πολυμεράση

|                                  | Θερμοκρασία  | Χρόνος          | Αρ. κύκλων |
|----------------------------------|--------------|-----------------|------------|
| <b>Αρχική αποδιάταξη</b>         | 95 °C        | 2 λεπτά         | 1          |
| <b>Αποδιάταξη αλυσίδων DNA</b>   | 95 °C        | 30 δευτερόλεπτα | 35         |
| <b>Υβριδισμός εκκινητών</b>      | $T_m - 5 °C$ | 30 δευτερόλεπτα |            |
| <b>Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA</b> | 72 °C        | 1 λεπτό / kb    |            |
| <b>Τελική επιμήκυνση</b>         | 72 °C        | 10 λεπτά        | 1          |

### 2.1.7. Επιλογή εκκινητών για την ενίσχυση γονιδίων της ρόκας

Αλληλουχίες γονιδίων που κωδικοποιούν τα ίδια ένζυμα του βιοχημικού μονοπατιού της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ σε άλλα φυτά της οικογένειας Brassicaceae είναι διαθέσιμες στις διεθνείς γονιδιακές βάσεις δεδομένων. Οι παραπάνω αλληλουχίες, κυρίως από τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa*, *Brassica napus* και άλλα, ανακτήθηκαν από το δικτυακό τόπο του NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Στη συνέχεια ομοπαράτέθηκαν με το πρόγραμμα MegAlign (Lasergene) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW. Από την ομοπαράθεση φάνηκε η ύπαρξη συντηρημένων περιοχών σε αρκετά σημεία. Έτσι, μετά την *in silico* διερεύνηση των γονιδίων και με τη βοήθεια του προγράμματος Beacon Designer 7, σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών με στόχο την ενίσχυση ενός τμήματος μεγέθους 350-700 περίπου βάσεων για κάθε γονίδιο στη ρόκα.

### 2.1.8. PCR για την ενίσχυση γονιδίων της ρόκας

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση DNA πολυμεράσης υψηλής πιστότητας (*Phusion High-Fidelity*) σε συνθήκες που προτείνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία (*Finnzymes*, Finland).

Σε σωληνάκι κατάλληλο για PCR προστέθηκαν τα ακόλουθα υλικά σε τελικό όγκο 20 μl: 1μl cDNA, 4μl Phusion buffer 5X, 0.4μl dNTPs 10μM (τελική συγκέντρωση 200 μM το κάθε ένα), 2μl εκκινητής έμπροσθεν 5μM (τελική συγκέντρωση 0.5 μM), 2μl εκκινητής ανάστροφος 5μM (τελική συγκέντρωση 0.5 μM), 0.2 μl *Phusion High-Fidelity DNA* πολυμεράση (τελική συγκέντρωση 0.02 U/μl) και 10.4 μl ddH<sub>2</sub>O.

Το τελικό μίγμα αναμείχθηκε μετά από γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετήθηκε στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το πρόγραμμα του πίνακα Β5.

Στο στάδιο της τελικής επιμήκυνσης έγινε προσθήκη Taq DNA πολυμεράσης, ώστε να εισαχθούν προεξέχουσες αδενίνες στο 3' άκρο των προϊόντων.

Το προϊόν της κάθε αντίδρασης PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης με παράλληλη ηλεκτροφόρηση μάρτυρα (*1 kb DNA Ladder*, *New England Biolabs*).

Πίνακας Β5. Πρόγραμμα PCR με Phusion High-Fidelity πολυμεράση

|                           | Θερμοκρασία                                   | Χρόνος             | Αρ. κύκλων |
|---------------------------|---|--------------------|------------|
| Αρχική αποδιάταξη         | 98 °C   | 30 δευτερόλεπτα    | 1          |
| Αποδιάταξη αλυσίδων DNA   | 98 °C   | 5 δευτερόλεπτα     | 35         |
| Υβριδισμός εκκινητών      | Εξαρτάται από το T <sub>m</sub> των εκκινητών | 30 δευτερόλεπτα    |            |
| Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA | 72 °C   | 30 δευτερόλεπτα/kb |            |
| Τελική επιμήκυνση         | 72 °C   | 10 λεπτά           | 1          |

#### 2.1.9. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτική αγαρόζης

Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης το προϊόν της PCR απομονώθηκε από την πηκτική με νυστέρι αφού προηγουμένως διαπιστώθηκε βάσει μεγέθους ότι πρόκειται για το κομμάτι που μας ενδιαφέρει. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)*, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, όπου με θερμική διαλυτοποίηση της πηκτής και χρήση της στήλης που περιέχεται εκλούεται το DNA.

Η ποσότητα του DNA μπορεί να προσδιοριστεί με φωτομετρική ανάλυση όπως περιγράφηκε στο 2.1.4. ή με ηλεκτροφορητικό προσδιορισμό. Αυτό γίνεται μέσω σύγκρισης με κάποιον ποσοτικοποιημένο μάρτυρα γνωστού μεγέθους που ηλεκτροφορείται παράλληλα (*1 kb DNA Ladder, New England Biolabs*).

#### 2.1.10 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμίδια

Η διαδικασία της κλωνοποίησης ξεκινά με τη σύνδεση του τμήματος DNA ή cDNA που είναι έτοιμο για ένθεση στο φορέα που έχει επιλεγεί. Στη συνέχεια δεκτικά βακτήρια (competent cells) μετασχηματίζονται με εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα και ακολουθεί πολλαπλασιασμός των βακτηριακών κυττάρων. Τέλος γίνεται

ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το σύστημα *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I (Promega)*.

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

Η τεχνική αυτή αποσκοπεί στην εισαγωγή των επιθυμητών πλασμιδίων σε εργαστηριακά στελέχη, έτσι ώστε τα πλασμίδια να παραχθούν σε μεγάλη ποσότητα μετά από τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων .

Τα στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli (E.coli)* που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών κυττάρων για μετασχηματισμό ήταν τα DH5a. Για την δημιουργία τους πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία: 200 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάστηκαν με 2 ml υγρής καλλιέργειας του στελέχους που επιλέχθηκε και η καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37° C με συνεχή ανακίνηση (210 στροφών/λεπτό) μέχρι η οπτική πυκνότητα του αιωρήματος να φτάσει την τιμή  $O.D._{600}=0.2-0.3$ .

Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4° C και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10 ml διαλύματος 25mM παγωμένου  $CaCl_2$ . Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4° C και τα κύτταρα αφού επαναδιαλύθηκαν σε 5 ml διαλύματος 75 mM  $CaCl_2$  αφέθηκαν στον πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4° C και επαναδιαλύθηκαν σε 9.6 ml διαλύματος 0.1M  $CaCl_2$ , το οποίο βρισκόταν στον πάγο.

Η αποθήκευση των δεκτικών κυττάρων έγινε στους -80° C με την προσθήκη 2.4 ml γλυκερόλης.

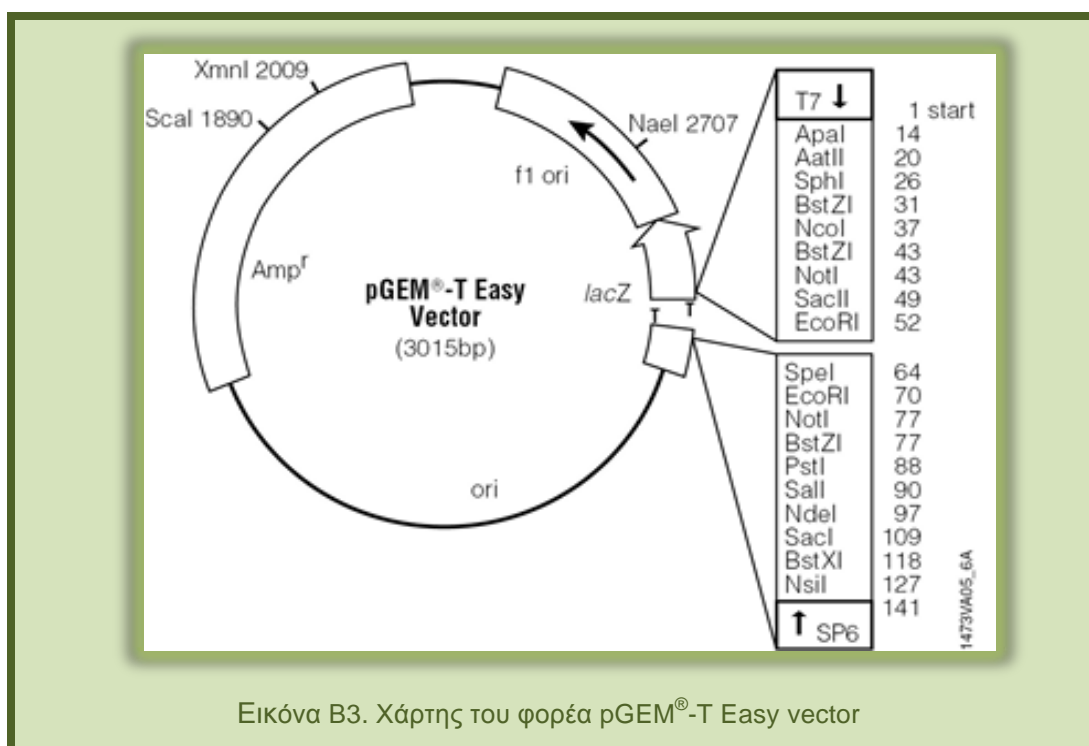


### 2.1.10.β. Κλωνοποίηση στο φορέα pGEM

Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε για τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ήταν το πλασμίδιο *pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Promega)* (εικόνα Β3).

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 αμπικιλίνη.
- 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 των ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω του μηχανισμού της α-συμπληρωματικότητας.
- Φέρει στα άκρα πολύT, ώστε να διευκολύνεται η σύνδεση με κατάλληλα διαμορφωμένα προϊόντα της αντίδρασης της PCR.



Εικόνα Β3. Χάρτης του φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector

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

Η κατασκευή ανασυνδυσμένων μορίων DNA επιτυγχάνεται με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (ligase). Στηρίζεται στην ικανότητα της λιγάσης να καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού με κατανάλωση ενέργειας. Χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA ligase (*Promega*) που έχει απομονωθεί από ανασυνδυσμένο *E.coli*.

Η αντίδραση της DNA λιγάσης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl και περιείχε 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα 2X, 1 μl T4 DNA ligase (25.000 U/ml), 0.5 μl pGEM T-Easy Vector, x μl ένθετο DNA, ddH<sub>2</sub>O έως 10μl.

Προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα δημιουργίας ανασυνδυσμένων πλασμιδίων, η αναλογία της αλληλουχίας DNA προς ένθεση και του πλασμιδιακού φορέα θα πρέπει να κυμαίνεται από 1:1 έως 3:1. Σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA (κεφάλαιο 2.1.9), ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα του ενθέματος που θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση. Ο υπολογισμός γίνεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{\text{ng πλασμιδίου} \times \text{μέγεθος DNA} \times \text{μοριακός λόγος}}{\text{μέγεθος πλασμιδίου}}$$

Το δείγμα επωάζεται στους 4° C για 14-16 ώρες ή για 3 ώρες στους 25° C και διατηρείται στους -20° C μέχρι το μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων.

Ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκαν 25ng πλασμιδίου (0.5 μl).

2.1.10.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 επανακάμπτουν και αναπτύσσουν την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό που τους προσδίδει το νεοεισαχθέν πλασμίδιο.

Για τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων *E.coli* μεταφέρθηκαν 2 μl πλασμιδίου (από τα 10 μl της αντίδρασης ligation) σε 80 μl δεκτικών κυττάρων του στελέχους DH5a αμέσως μετά το ξεπάγωμά τους. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στον πάγο και το δείγμα παρέμεινε στον πάγο για ακόμη 30 λεπτά. Ακολούθως τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση (42° C) για 45 δευτερόλεπτα, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου και επώαστηκαν στον πάγο για 2 λεπτά. Μετά την προσθήκη 200 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB το μίγμα επώαστηκε στους 37° C για 40-50 λεπτά. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη (σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml θρεπτικού διαλύματος) για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τρυβλία μετά από επώαση 12-16 ωρών στους 37° C διατηρούνται στους 4° C.

Για την επιλογή των αποικιών που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, πριν την επίστρωση των κυττάρων στο τρυβλίο προστίθενται στο μίγμα 10 μl 100mM IPTG και 50 μl 2% X-Gal. Οι αποικίες που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρωματίζονται μπλε, λόγω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης. Το IPTG, ανάλογο της λακτόζης, απενεργοποιεί τον lacZ καταστολέα και επάγει την μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης. Κατά την αντίδραση αυτή το χρωμογόνο υπόστρωμα X-gal υδρολύεται από την β-γαλακτοσιδάση, δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στις μη ανασυνδυασμένες αποικίες. Αντίθετα, οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται λευκές, εφόσον δεν εκφράζεται λειτουργική πρωτεΐνη και το X-gal δεν μεταβολίζεται.

#### 2.1.10.ε. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού (Boiling method)

Η μέθοδος αυτή (Holmes and Quigley 1981) χρησιμοποιούνταν ευρέως πριν την αυτοματοποιημένη μέθοδο απομόνωσης πλασμιδίου. Το πλασμίδιο που απομονώνεται με τη μέθοδο αυτή περιέχει και ποσότητα RNA, καθώς και το RNA

διέρχεται από τους πόρους που δημιουργεί η λυσοζύμη στο βακτηριακό τοίχωμα. Για το λόγο αυτό απαιτείται η κατεργασία του απομονωμένου πλασμιδίου με RNase. Στην παρούσα μελέτη η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδίου από μεγάλο αριθμό διαφορετικών κλώνων από το μετασηματισμό, 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 υγρού θρεπτικού μέσου LB, που περιέχουν αμπικιλίνη εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για 12-16 ώρες στους 37° C υπό ανάδευση 210 στροφών/λεπτό. Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1.5 ml σε σωληνάκι του 1.5 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται όσο το δυνατόν περισσότερο, γιατί το ίζημα πρέπει να παραμείνει όσο το δυνατόν στεγνό και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl διαλύματος STET και προστίθενται 2 ml λυσοζύμης (50 mg/ml). Στη συνέχεια, γίνεται επώαση στους 100° C για 45 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά και 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 στροφές/λεπτό 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.

#### 2.1.10.στ. Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Για την πλήρη ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση του ενθέματος με διαγνωστικές πέψεις των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Επιλέχτηκε η ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI* (*New England Biolabs*). Όπως φαίνεται από τον πλασμιδιακό χάρτη (εικόνα Β2) υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης από το ένζυμο *EcoRI* και η πέψη του πλασμιδίου με το ένζυμο αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση του ενθέματος.

Η πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε σε σωληνάκι του 1.5 ml που περιείχε το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου, Rnase A αν το δείγμα περιέχει RNA και, τέλος, ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Συνήθως μια μονάδα ενζύμου (1 unit) είναι αρκετή για ένα μικρογραμμάριο δείγματος DNA.

Μια τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 20 μl περιλαμβάνει 5 μg DNA, 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 10X, 0.5 μl Rnase A (2,5 mg/ml), 0.3 μl *EcoRI* (20 U / μl) και ddH<sub>2</sub>O ως 20μl.

Το δείγμα αναμίχθηκε καλά και επώαστηκε για 1 έως 2 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία (37° C). Μετά το πέρας της διαδικασίας τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

#### 2.1.10.ζ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση του επιθυμητού πλασμιδίου που φέρει την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin® Plasmid kit* (*Macherey-Nagel*), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

#### 2.1.11. Rapid Amplification of cDNA ends (3'/5' RACE)

Χρησιμοποιήθηκε το *5'/3' RACE kit, 2<sup>nd</sup> Generation* (*Roche*), με σκοπό την επέκταση των αλληλουχιών τόσο προς το 3' όσο και προς το 5' άκρο, έτσι ώστε να απομονωθεί εν τέλει η πλήρης αλληλουχία του κάθε γονιδίου.

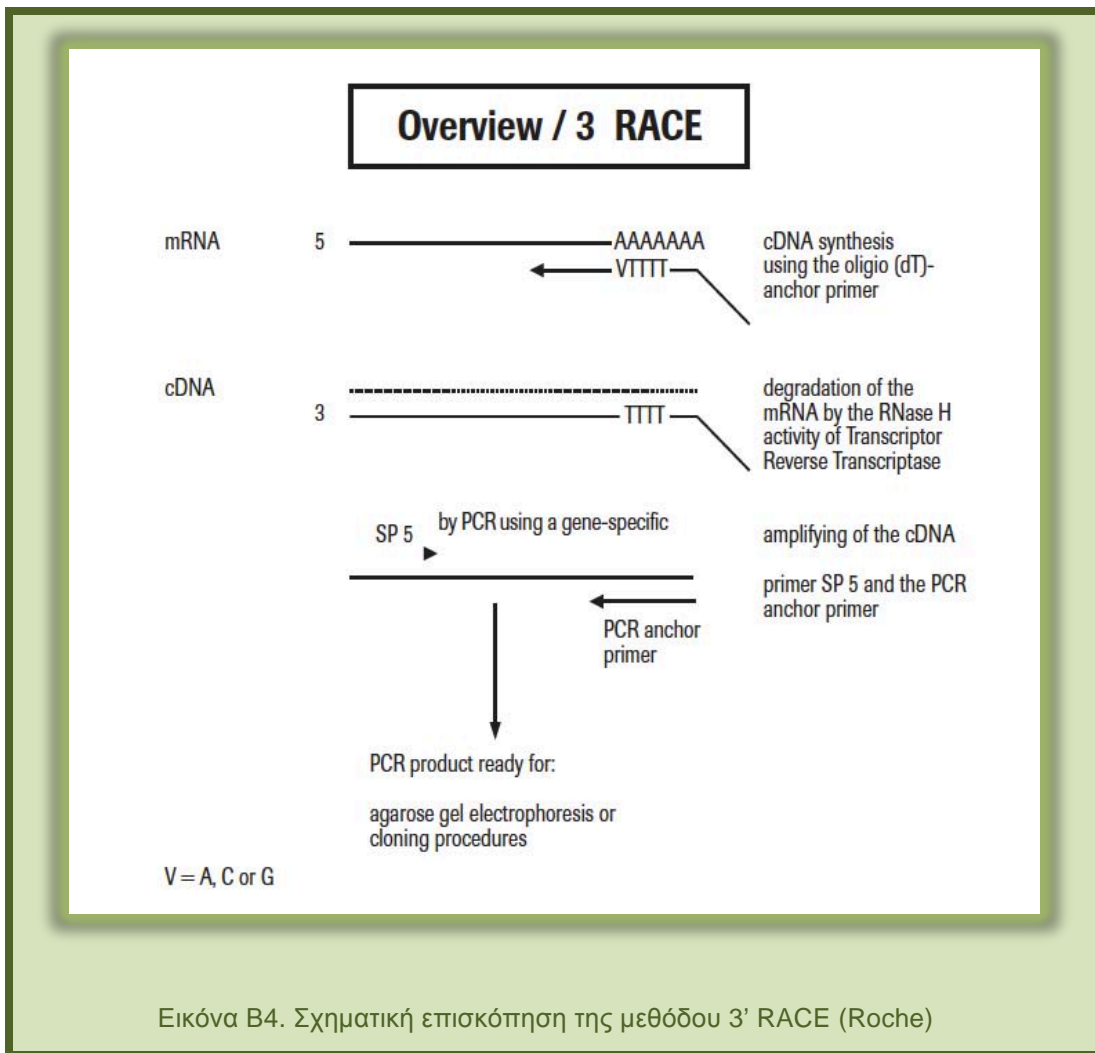
### 2.1.11.α. 3'RACE

Πρώτο βήμα της μεθόδου είναι η σύνθεση cDNA με τη χρήση oligodT-anchor εκκινητή που περιέχεται στο kit. Το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιείται στη συνέχεια σε αντίδραση PCR, στην οποία ο ένας εκκινητής (ανάστροφος) είναι ο PCR anchor που περιέχεται στο kit. Ο δεύτερος (έμπροσθεν), είναι ένας εξειδικευμένος για το κάθε γονίδιο εκκινητής, ο οποίος σχεδιάζεται από πριν, εφόσον ένα τμήμα της αλληλουχίας είναι ήδη γνωστό.

Σε σωληνάκι κατάλληλο για αντίδραση PCR τοποθετήθηκαν 4 μl cDNA synthesis buffer, 2 μl dNTPs (10 mM από κάθε νουκεοτίδιο), 1 μl εκκινητής Oligo dT-anchor, 0.5-2 μg RNA, 1 μl Transcriptor Reverse Transcriptase (25 U/μl) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 20 μl.

Το μίγμα επώαστηκε στους 55° C για 60 λεπτά και στη συνέχεια στους 85° C για 5 λεπτά. Το παραγόμενο cDNA μπορεί να ενισχυθεί κατευθείαν με PCR χωρίς να χρειαστεί επιπλέον καθαρισμός. Έτσι, χρησιμοποιώντας την *Phusion High-Fidelity* πολυμεράση πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR όπως αυτή περιγράφεται στο 2.1.8. με εκκινητές ως ανάστροφο τον PCR anchor που περιέχεται στο kit και ως έμπροσθεν τον εξειδικευμένο εκκινητή που έχει σχεδιαστεί για την περίπτωση αυτή για το κάθε γονίδιο.

Το προϊόν της PCR αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια επανακτήθηκε από την πηκτή χρησιμοποιώντας το *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)*. Ακολούθως κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector, ακολουθώντας τα βήματα όπως περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2.1.10.



### 2.1.11.β. 5' RACE

Πρώτο βήμα της μεθόδου είναι η σύνθεση cDNA με τη χρήση εξειδικευμένου ανάστροφου εκκινητή που έχει σχεδιαστεί για το σκοπό αυτό. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι το cDNA πρέπει στη συνέχεια να καθαριστεί. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin® Gel* και *PCR Clean-up (Macherey-Nagel)* και εφαρμόστηκε η ακόλουθη διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Στο σωληνάκι που περιείχε 20 µl cDNA προστέθηκαν 100 µl binding buffer και στη συνέχεια προσαρμόστηκε η στήλη, που διατίθεται στο kit, στο σωληνάκι. Μετά τη φόρτωση του δείγματος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα σε στροφές 11.000 x g. Απομακρύνθηκε το διάλυμα που συλλέχθηκε στο σωληνάκι και

αυτό ξαναπροσαρμόστηκε στη στήλη. Προστέθηκαν 500 μl washing buffer και επαναλήφθηκε η διαδικασία. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μl washing buffer, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε στροφές 11.000 x g και απομακρύνθηκε το διάλυμα που συλλέχθηκε. Η στήλη προσαρμόστηκε σε νέο σωληνάκι, προστέθηκαν 50μl elution buffer και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να γίνει η έκλυση του cDNA.

Για την προσθήκη πολυ-A ουράς στο 3' άκρο του cDNA, πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη αντίδραση: Σε σωληνάκι της PCR προστέθηκαν 19 μl cDNA, 2.5 μl Reaction buffer και 2.5 μl dATP 2mM. Το δείγμα επώαστηκε για 3 λεπτά στους 94° C και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στον πάγο για λίγα δευτερόλεπτα. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση, προσθήκη 1 μl Terminal transferase και επώαση 30 λεπτών στους 37° C. Τέλος έγινε απενεργοποίηση της Terminal transferase με επώαση 10 λεπτών στους 70° C και μετά από σύντομη φυγοκέντρηση ακολούθησε τοποθέτηση στον πάγο.

Το dA-tailed cDNA μπορεί να ενισχυθεί κατευθείαν με PCR χωρίς να χρειαστεί καθαρισμός. Έτσι, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με εκκινητές έμπροσθεν τον Oligo dT-anchor που περιέχεται στο kit και ανάστροφο τον εξειδικευμένο που έχει σχεδιαστεί για το κάθε γονίδιο.

Ακολούθησε δεύτερη PCR (nested) στην οποία ως εκμαγείο χρησιμοποιείται το προϊόν της προηγούμενης PCR, σε αραίωση 1:20. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο PCR anchor του kit ως έμπροσθεν και ένας ακόμα εξειδικευμένος που έχει σχεδιαστεί από πριν για το κάθε γονίδιο ως ανάστροφος.

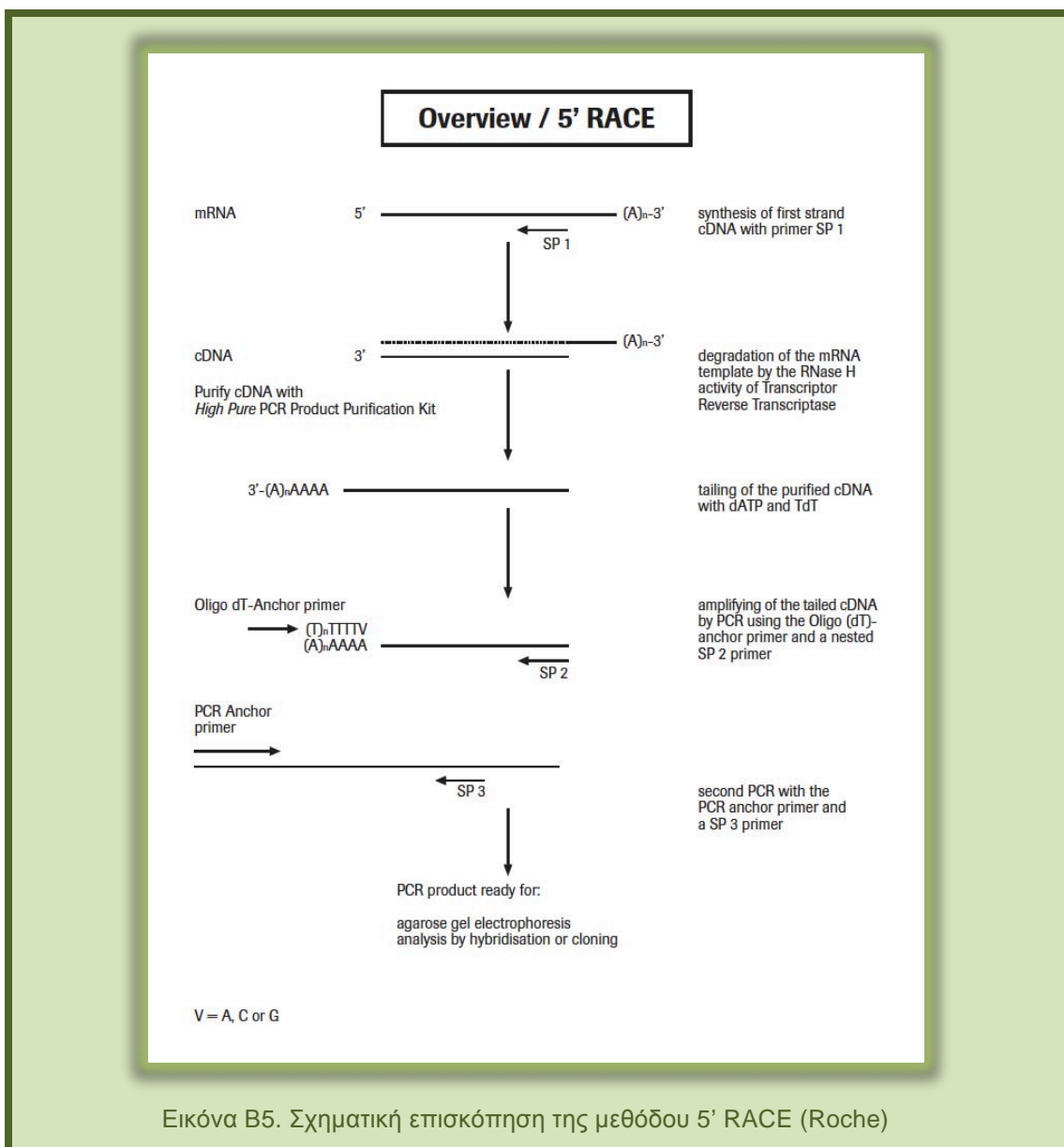
Το προϊόν της PCR αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια επανακτήθηκε από την πηκτή με gel extraction kit και κλωνοποίηση στον pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector, ομοίως με πριν.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την *Phusion High-Fidelity* πολυμεράση, όπως περιγράφηκε στο 2.1.8. Οι ιδανικές συνθήκες κάθε φορά προσδιορίστηκαν με βάση το ζεύγος των εκκινητών.

Για κάποια γονίδια δεν κατέστη δυνατή η επέκταση προς το 5' άκρο ή αυτή ήταν μερική. Στις περιπτώσεις εκείνες όπου με *in silico* ανάλυση παρατηρήθηκε μεγάλη



ομοιότητα βάσεων στην αρχή (5' άκρο) της αλληλουχίας μεταξύ των ορθόλογων γονιδίων, σχεδιάστηκε στην περιοχή αυτή εκκινητής απλός ή και εκφυλισμένος. Με τη χρήση αυτού του εκκινητή σε συμβατική PCR ως έμπροσθεν, σε συνδυασμό με έναν ανάστροφο που είχε ήδη σχεδιαστεί στο πρώτο μέρος, κατορθώθηκε η απομόνωση τμήματος του γονιδίου που περιέχει το 5' άκρο. Σε κάποιες περιπτώσεις απομονώθηκε ολόκληρη η επιθυμητή αλληλουχία με τη χρήση του εξειδικευμένου αυτού εκκινητή και του PCR anchor σε μια αντίδραση 3' RACE PCR, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω.



### 2.1.12. Ανάλυση αλληλουχιών

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen και βασίστηκε στη μέθοδο Sanger. Για τον καθορισμό των αλληλουχιών των κλωνοποιημένων ενθεμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι διαθέσιμοι εμπορικά εκκινητές του αντίστοιχου πλασμιδίου (T7, SP6). Ο έλεγχος της αξιοπιστίας των ακολουθιών για τυχόν «λάθη» κατά την αλληλούχιση έγινε με βάση το χρωματογράφημά τους στο πρόγραμμα Chromas.

Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα EditSeq και MegAlign (DNASTAR, Lasergene) για τη στοίχιση και ένωση των ακολουθιών DNA του κάθε γονιδίου που προήλθαν από τις αλληλουχίσεις του πρώτου τμήματος που προέκυψε από την αρχική PCR και των τμημάτων που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου RACE.

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST μέσω της σελίδας του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν κάθε φορά συγκρίθηκαν με αυτές που υπάρχουν στη βάση δεδομένων GenBank και βρέθηκαν οι αντίστοιχες ομοιότητες σε ποσοστό επί τοις εκατό. Επίσης, μέσω της σελίδας <http://expasy.org> έγινε μετάφραση της αλληλουχίας σε πρωτεΐνη με το εργαλείο translate, και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLAST της ίδιας σελίδας. Έτσι βρέθηκαν και οι ομοιότητες σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια, με τη χρήση του προγράμματος CLC sequence viewer, version 6.7.1 (CLC bio A/S) κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για κάθε οικογένεια γονιδίων, χρησιμοποιώντας τις πρωτεϊνικές ακολουθίες. Επιλέχτηκε ο αλγόριθμος neighbor-joining, με 1000 bootstrap αντίγραφα. Επίσης, χρησιμοποιώντας πάλι το πρόγραμμα BLAST της σελίδας του NCBI, βρέθηκε για κάθε αλληλουχία η ομοιότητα σε ποσοστό επί τοις εκατό που παρουσιάζει με ορθόλογα γονίδια.

### 2.1.13 Κατάθεση αλληλουχιών σε βάση δεδομένων

Οι αλληλουχίες κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank μέσω της σελίδας του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) και χρησιμοποιώντας το εργαλείο BankIt.

#### 2.1.14. Διατήρηση κλώνων που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι:

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 διατηρούνται στους 4° C για χρονικό διάστημα 15-20 ημερών, μετά το οποίο οι καλλιέργειες πρέπει να ανανεώνονται.

Stock γλυκερόλης: Η γλυκερόλη 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° C για διάστημα 6 μηνών, μετά από το οποίο απαιτείται ανανέωσή τους.

#### 2.2. Κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορείς έκφρασης

Κάποια από τα γονίδια των οποίων απομονώθηκε η πλήρης αλληλουχία κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να επιτευχθεί η παραγωγή των επιθυμητών πρωτεϊνών σε κύτταρα έκφρασης.

Χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς pET-49b(+) (εικόνα B6) και pGEX-4T-2 (εικόνα B7). Ο πρώτος είναι φορέας pET, με μέγεθος 5926 bp, που φέρει στο N-τελικό άκρο επίτοπο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST-Tag) και επίτοπο εξαϊστιδίνης (His-Tag). Αυτό εξυπηρετεί την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών τόσο με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ιόντων νικελίου, όσο και με στήλη χρωματογραφίας αγκιστείας με γλουταθειόνη. Ο δεύτερος φορέας έχει μέγεθος 4970 bp, φέρει στο N-τελικό άκρο επίτοπο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST-Tag) και ως εκ τούτου η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών γίνεται με στήλη χρωματογραφίας αγκιστείας με γλουταθειόνη.

### 2.2.1. Προετοιμασία των ενθεμάτων για κλωνοποίηση στο φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector

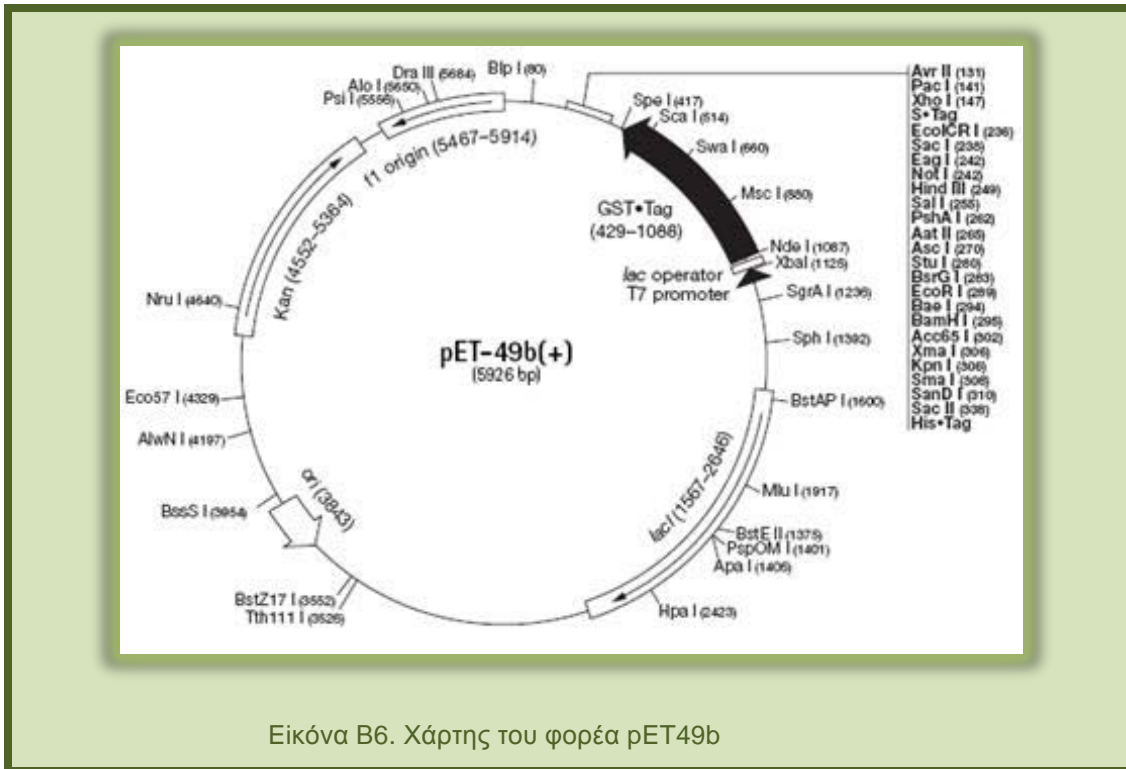
Σχεδιάστηκαν εκκινητές που να ενισχύουν τις αλληλουχίες πλήρους μήκους των γονιδίων, κατάλληλοι για την κλωνοποίησή τους στους φορείς έκφρασης. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR όπως περιγράφονται στο 2.1.8. Αναλυτικά χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο cDNA που είχε κατασκευαστεί προηγουμένως και DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (*Phusion High-Fidelity*) σε συνθήκες που προτείνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία (*Finnzymes, Finland*). Ακολούθησε επανάκτηση των προϊόντων από την πηκτή της αγαρόζης και κλωνοποίηση των ενθεμάτων στο φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector. Όλα τα βήματα έγιναν όπως περιγράφονται και στο 2.1.10.

### 2.2.2. Κλωνοποίηση στους φορείς pET49b και pGEX-4T-2

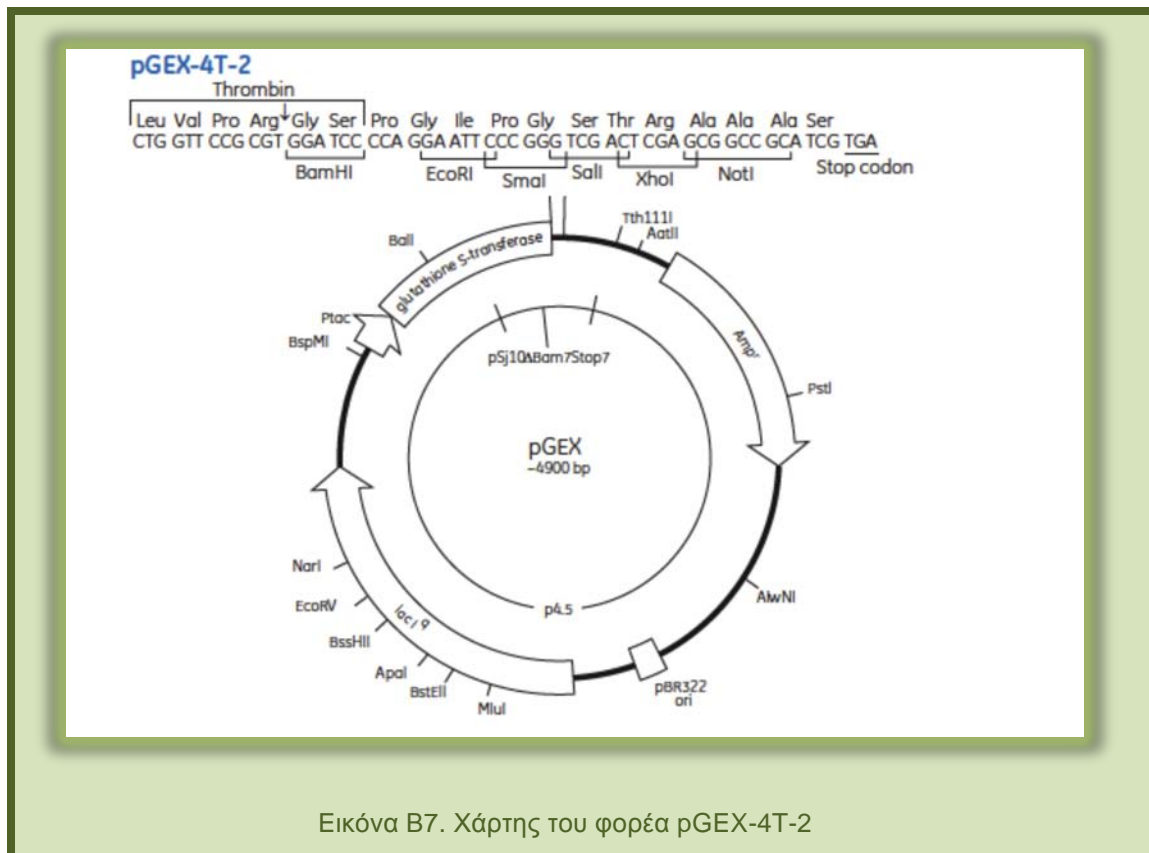
Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση των γονιδίων στους φορείς έκφρασης απαιτείται ενζυμική πέψη των ενθεμάτων (γονιδίων ενδιαφέροντος) και των φορέων με τα κατάλληλα ένζυμα, ώστε να είναι συμβατά τα άκρα τους και να είναι δυνατή η ενοποίηση τους. Στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση ότι διέθεταν ενθέματα των επιθυμητών αλληλουχιών των γονιδίων και στους φορείς έκφρασης πραγματοποιήθηκαν πέψεις με αντίστοιχες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού *BamH* και *Sall* (*New England Biolabs*) και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις κάθε μία από τις οποίες περιείχε 5 µg DNA, 2 µl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (buffer 3) 10x, 1µl BamHI (20.000 U/ml), 1µl Sall (20.000 U/ml), 0.2 µl BSA (bovine serum albumin- αλβουμίνη βόειου ορού) 100x και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 20 µl.

Το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία 37° C.



Εικόνα Β6. Χάρτης του φορέα pET49b



Εικόνα Β7. Χάρτης του φορέα pGEX-4T-2

Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων σε πηκτή αγαρόζης 1.5%, τα ενθέματα και οι φορείς ανακτήθηκαν με εκτομή και ακολούθησε η αντίδραση ενοποίησης με τη χρήση T4 DNA λιγάσης (*T4 DNA ligase, Takara*). Σε σωληνάκι του 1.5 ml τοποθετήθηκαν 150 ng ένθεμα, 50 ng φορέας, 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα 10x, 1 μl T4 DNA λιγάση (25.000 /ml), 1 mM ATP και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 20 μl. Το δείγμα επώαστηκε στους 4° C για 14-16 ώρες.

Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων όπως περιγράφεται στο 2.1.1.δ., χωρίς όμως τη χρήση του IPTG και του X-gal. Τα στελέχη του βακτηρίου *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών κυττάρων για μετασχηματισμό ήταν τα BL21 (DE3). Η διαδικασία ήταν όμοια με αυτή που περιγράφεται στο 2.1.10.α.

Επιλέχθηκαν αποικίες και επώαστηκαν στους 37° C για 16 ώρες σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB υπό ανάδευση 210 στροφών/λεπτό. Το θρεπτικό μέσο περιείχε καναμυκίνη (σε τελική συγκέντρωση 50 μg/ml θρεπτικού διαλύματος) στην περίπτωση που ο χρησιμοποιούμενος φορέας ήταν ο pET49b και αμικικιλίνη (σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml θρεπτικού διαλύματος) στην περίπτωση που ο χρησιμοποιούμενος φορέας ήταν ο pGEX-4T-2. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA, όπως συνιστάται από τον κατασκευαστή (*NucleoSpin® Plasmid kit, Macherey-Nagel*). Στα πλασμίδια που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που επιλέχθηκαν κατά το σχεδιασμό των εκκινητών για να ελεγχθεί η παρουσία γονιδίου του επιθυμητού μεγέθους. Ακολούθησε επώαση στους 37° C για 2 ώρες και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5 %. Επιλέχτηκαν τα πλασμίδια που έφεραν το γονίδιο στο αναμενόμενο μέγεθος και ακολούθησε αλληλούχιση για επιβεβαίωση των σωστών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

### 2.2.3. Υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG, θερμοκρασίες και χρόνους επώασης. Εφαρμόστηκε η

ακόλουθη διαδικασία: 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 50 µg/ml θρεπτικού διαλύματος στην περίπτωση που ο χρησιμοποιούμενος φορέας ήταν ο pET49b και αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml θρεπτικού διαλύματος στην περίπτωση που ο χρησιμοποιούμενος φορέας ήταν ο pGEX-4T-2) εμβολιάσθηκαν με κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με τα επιθυμητά ενθέματα. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε για 12-16 ώρες στους 37° C υπό συνεχή ανάδευση 210 στροφών/λεπτό. Η καλλιέργεια αραιώθηκε 1:10 με εμβολιασμό σε νέο υγρό θρεπτικό μέσο και επώαστηκε στους 37° C ώσπου η απορρόφηση στα 600 nm να φτάσει την τιμή 0.6. Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν συνδυαστικά συνθήκες όσον αφορά τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση του IPTG και το χρόνο επώασης. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.1 και 1 mM για 3, 5 και 7 ώρες επώασης, τόσο στους 37° C, όσο και στους 16° C. Οι ίδιοι χειρισμοί έγιναν και σε καλλιέργεια στην οποία αναπτύχθηκαν κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με το αντίστοιχο πλασμίδιο χωρίς αυτό να φέρει ένθεμα (μάρτυρας). Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στους 4° C στις 4.000 στροφές/λεπτό και επαναδιαλύθηκαν στο κατάλληλο διάλυμα λύσης αναλόγως τη μέθοδο απομόνωσης που επιλέγεται κάθε φορά. Για την λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων (2 λεπτά με παύσεις 10 δευτερολέπτων ανά 10 δευτερόλεπτα). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στους 4° C στις 14.000 στροφές/λεπτό. Τα ιζήματα περιέχουν σπασμένα κύτταρα, μεμβράνες και σπασμένα κυτταρικά οργανίδια ενώ τα υπερκείμενα περιέχουν τις πρωτεΐνες. Τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε νέους πλαστικούς σωλήνες και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του κάθε δείγματος με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια ίδιες συγκεντρώσεις από το κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

#### 2.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου έχει ως στόχο το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ή πολυπεπτιδίων ενός μίγματος με βάση μόνο το μοριακό τους βάρος. Η

πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζει ένα ομοιόμορφο πλέγμα που δρα σαν εμπόδιο στις πρωτεΐνες που μετακινούνται προσανατολισμένα μέσα του, όλες με σταθερή ταχύτητα ανάλογη με την εφαρμοζόμενη τάση και αντιστρόφως ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου. Οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση είναι αποδιαταγμένες ώστε η τριτοταγή τους δομή που ποικίλλει να μην παίζει κανένα ρόλο. Έτσι, οι μεγάλες πρωτεΐνες μετακινούνται αργά κατά μήκος της πηκτής, ενώ οι μικρές γρήγορα, οπότε και η τελική μετατόπιση είναι ανάλογη μόνο με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης. Παράλληλα με το δείγμα γίνεται και ηλεκτροφόρηση μάρτυρα (δείκτης μοριακών βαρών) που είναι ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου γίνεται σε ειδική συσκευή υπό την επίδραση διαφοράς δυναμικού στα άκρα της. Οι πηκτές σχηματίζονται από το συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του Bis-ακρυλαμιδίου σε αναλογία 30:1 (w/w) αντίστοιχα. Έτσι σχηματίζεται ένα ομογενές τρισδιάστατο πλέγμα με μέγεθος πόρων ανάλογο με το βαθμό πολυμερισμού. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και της τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνης (TEMED) πάνω στα δύο είδη ακρυλαμιδίου. Πιο συγκεκριμένα το TEMED μετατρέπει τα δύο αυτά είδη σε ελεύθερες ρίζες και το APS πολυμερίζει αυτές τις ενεργοποιημένες ενώσεις φτιάχνοντας το πλέγμα. Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό που χρησιμεύει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών ώστε να ηλεκτροφορούνται μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος.

#### 2.2.4.α. Προετοιμασία της πηκτής

Για τη μέθοδο χρειάζονται 2 πηκτές, η πηκτή επιστοιίβαξης και η πηκτή διαχωρισμού. Οι 2 πηκτές έχουν σύσταση, pH, και μέγεθος πόρων έτσι ώστε στην πηκτή επιστοιίβαξης οι πρωτεΐνες να συμπυκνώνονται και να συσσωρεύονται σε σημεία μεγάλης συγκέντρωσης και στην πηκτή διαχωρισμού να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Ετοιμάζεται πρώτα η πηκτή διαχωρισμού και εισάγεται αμέσως στο γυάλινο κάθετο καλούπι όπου αφήνεται να πολυμεριστεί για 1 ώρα (20-25° C). Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, εισάγεται η πηκτή επιστοιίβαξης. Το μίγμα αναδεύεται



ελαφρώς και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι. Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30 λεπτά (25° C). Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοίβασης, αυτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστίθεται 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Τέλος, με μια σύριγγα απομακρύνονται οι φυσαλίδες που σχηματίζονται στο κάτω μέρος της πηκτής μεταξύ των τζαμιών.

#### 2.2.4.β. Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης, το οποίο περιέχει τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης. Επιπλέον η β-μερκαπτοαιθανόλη που περιέχεται στο διάλυμα μετουσίωσης είναι απαραίτητη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων στους 99° C για 3 λεπτά για να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις επιμέρους αλυσίδες και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού αφαιρέθηκε προσεκτικά η χτένα από την πηκτή τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγαδάκια και αναλύθηκαν σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως 100-150V. Παράλληλα, σε ένα πηγαδάκι φορτώθηκε και μάρτυρας γωνστών μοριακών βαρών (*BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen*). Η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται όταν η χρωστική του δείγματος πλησιάσει στο κάτω μέρος της πηκτής.

Στην περίπτωση που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν ιζήματα, επαναδιαλύθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (100 μl) και επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 99° C. Ακολούθησε έντονη ανάδευση των ιζημάτων, φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά και ηλεκτροφόρηση 5 μl από τα κάθε υπερκείμενο.

#### 2.2.4.γ. Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Η πηκτή χρωματίστηκε με την χρώση Coomassie Brilliant Blue R-250, η οποία αποτελεί μια ανιοντική βαφή που έχει κυρίως μη πολική δομή και προσδένεται μη ειδικά στις πρωτεΐνες. Αρχικά, δημιουργείται ένα διάλυμα χρώσης στο οποίο επwάζονται μετά την ηλεκτροφόρηση οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα περιέχει οξικό οξύ που σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες, οι οποίες κατά την επwάση χρωματίζονται μπλε. Η περίσσεια του διαλύματος χρώσης απομακρύνεται και ακολουθεί επwάση με το διάλυμα αποχρωματισμού έως ότου γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες. Ανιχνεύονται με τη μορφή μπλε ζωνών, αρκεί τα μεγέθη τους να είναι μεγαλύτερα από 50 ng.

#### 2.2.5. Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Οι βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης (θερμοκρασία, χρόνος επwάσης και συγκέντρωση IPTG) εφαρμόστηκαν σε μεγαλύτερη κλίμακα, σε καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου, για να πραγματοποιηθεί έκφραση των γονιδίων και ακολούθως η απομόνωση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών. Αναλυτικά, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα λύσης (2-5 ml διαλύματος ανά gr κυττάρων). Στη συνέχεια προστέθηκε λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml και τα κύτταρα επwάστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε προσθήκη PMSF (αναστολέας πρωτεασών) σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM και έγινε λύση των κυττάρων με υπέρηχους (6 φορές για 10 δευτερόλεπτα στα 200-300 Watt με ενδιάμεση παύση 10 δευτερολέπτων). Στη συνέχεια το υλικό φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά στους 4° C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο.

#### 2.2.5.α. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ιόντων νικελίου

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται συγχωνευμένες με τις εξαϊστιδίνες απομονώθηκαν με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας που διαθέτει

σφαιρίδια αγαρόζης, που πάνω τους έχουν ακινητοποιηθεί χηλικά σύμπλοκα που δεσμεύουν ιόντα νικελίου. Τα έξι κατάλοιπα ιστιδινών στη σειρά αλληλεπιδρούν με τα ιόντα νικελίου με τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους που διαθέτουν και οι πρωτεΐνες προσδέονται ισχυρά στα σφαιρίδια. Για την έκλυση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται το ιμιδαζόλιο που ανταγωνίζεται την ουρά των ιστιδινών για την πρόσδεση στη στήλη. Κατά το βήμα των πλύσεων με συγκέντρωση ιμιδαζολίου 20 mM απομακρύνονται οι μη επιθυμητές πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί χαλαρά και μη ειδικά στη στήλη και κατά το βήμα των εκλούσεων (250 mM ιμιδαζόλιο) απομακρύνονται οι πρωτεΐνες με τις έξι ιστιδίνες που έχουν δεσμευτεί ισχυρά και ειδικά στη στήλη. Χρησιμοποιήθηκε η στήλη *Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel)*. Αρχικά πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση της στήλης ως εξής: Η στήλη επαναιωρήθηκε μετά από ανακίνηση μέχρι να γίνει ομοιογενές μίγμα και μεταφέρθηκε η απαιτούμενη ποσότητα σε σωληνάκι. Για κάθε 1ml όγκου στήλης που χρησιμοποιήθηκε, επιλέχθηκαν 2 ml διαλύματος στήλης (συγκέντρωση 50%). Έγινε φυγοκέντρηση στα 500 g για 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου και ακολούθως προσθήκη 10 όγκων στήλης διαλύματος NPI-10. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση για να ιζηματοποιηθεί η στήλη και προσεκτική απόρριψη του υπερκειμένου για να μη διαταραχθεί η στήλη.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολο καθαρισμού, όπως αυτό προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία. Στο υπερκείμενο από το 2.2.5. (στο οποίο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης NPI-10) προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα εξισορροπημένης στήλης Ni-NTA και το μίγμα επώαστηκε υπό συνεχή ήπια ανακίνηση στους 4° C για 30 λεπτά. Μετά την τοποθέτηση του παραπάνω δείγματος σε ειδική στήλη χρωματογραφίας έγινε συλλογή του διαλύματος που διαπερνά την στήλη (flow-through). Ακολούθησε καθαρισμός της στήλης με τουλάχιστον τετραπλάσιο όγκο στήλης διαλύματος πλύσης (NPI-20) για δύο φορές και συλλέχθηκαν δύο δειγμάτων. Τέλος πραγματοποιήθηκε έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από την στήλη με 2.5 ml διαλύματος έκλυσης (NPI-250), και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές.

Σε περίπτωση που η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος όταν εκφράζεται συσσωρεύεται σε συσσωματώματα (inclusion bodies), εφαρμόζεται το πρωτόκολλο καθαρισμού της

στήλης για αποδιατακτικές συνθήκες. Χρησιμοποιείται ουρία σε υψηλή συγκέντρωση (8 M), με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να αποδιαταχθεί, δηλαδή να χάσει τη φυσιολογική τριτοταγή της δομή.

Στα ιζήματα που προκύπτουν μετά τη χρήση των υπέρηχων και τη φυγοκέντρωση, μαζί με τα σπασμένα κύτταρα, τις μεμβράνες, τα σπασμένα κυτταρικά οργανίδια, υπάρχουν και τα συσσωματώματα που περιέχουν την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος μας. Για να διαλυθούν αυτά, το ίζημα αρχικά επαναδιαλύθηκε σε NPI-10. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές/λεπτό για μισή ώρα και παραλαβή του ιζήματος. Έγινε επαναδιάλυσή του σε DNPI-10 (2ml/gr ιζήματος) και τοποθέτηση σε τροχό στους 4° C για 2 μέρες ώστε να διαλυθεί το ίζημα και τα inclusion bodies. Στη συνέχεια το υλικό φυγοκεντρήθηκε στις 10000 στροφές/λεπτό για μισή ώρα και παραλήφθηκε το υπερκείμενο.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολο καθαρισμού όπως και παραπάνω, με τη διαφορά ότι αντί των διαλυμάτων NPI-10, NPI-20 και NPI-250, χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα DNPI-10, DNPI-20 και DNPI-250, που περιείχαν επιπλέον ουρία σε συγκέντρωση 8 M.

#### 2.2.5.β. Απομόνωση πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας ανχιστείας με γλουταθειόνη

Η απομόνωση των πρωτεϊνών με επίτοπο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST-Tag) πραγματοποιήθηκε με στήλη ανχιστείας που διαθέτει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε σφαιρίδια αγαρόζης. Η συγγένεια των σφαιριδίων της γλουταθειόνης με το τμήμα της τρανσφεράσης της S-γλουταθειόνης που βρίσκεται στην πρωτεΐνη επιτρέπει την πρόσδεση της στα σφαιρίδια. Η έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης που διαθέτει τον επίτοπο GST πραγματοποιείται με την προσθήκη διαλύματος ελεύθερης ανηγμένης γλουταθειόνης σε περίσσεια (10 mM). Η ανηγμένη γλουταθειόνη δημιουργεί δισουλφιδικούς δεσμούς με την προσδεμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνη, αποδεσμεύοντας την πρωτεΐνη από αυτά. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια με τη στήλη νικελίου που περιγράφηκε παραπάνω, με διαφορές στα διαλύματα που χρησιμοποιούνται. Χρησιμοποιήθηκε η

στήλη *Protino® Glutathione Agarose 4B (Macherey-Nagel)* και ακολουθήθηκε το πρωτόκολο της κατασκευάστριας εταιρείας (εξισορρόπηση στήλης, συλλογή flow-through, πλύσεις και έκλουση, όλα με τα αντίστοιχα διαλύματα).

Επειδή παρατηρήθηκε το φαινόμενο της δημιουργίας συσσωματωμάτων κατά την έκφραση της πρωτεΐνης, εφαρμόστηκε το πρωτόκολο Frangioni (1992), κατά το οποίο γίνεται χρήση N-laurylsarcosine. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα STE (2-5 ml διαλύματος ανά γραμμάριο κυττάρων) και προστέθηκε λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml. Αφού το υλικό αφέθηκε στον πάγο για 15 λεπτά έγινε προσθήκη DTT (τελική συγκέντρωση 5mM) και PMSF (τελική συγκέντρωση 0.5 mM). Ακολούθησε προσθήκη 1.5% N-laurylsarcosine (από 10% stock σε STE buffer), vortex για 5 δευτερόλεπτα και λύση κυττάρων με υπέρηχους (6 φορές για 10 δευτερόλεπτα στα 200-300 Watt με ενδιάμεση παύση 10 δευτερολέπτων). Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά στους 4° C και συλλογή του υπερκειμένου. Σε αυτό προστέθηκε Triton 3% (από 10% stock σε STE buffer) ακολουθούμενο από τα σφαιρίδια της αγαρόζης εξισορροπημένα. Τέλος το διάλυμα επώαστηκε υπό συνεχή ήπια ανακίνηση στους 4° C O/N.

Ακολούθησε καθαρισμός με τη στήλη χρωματογραφίας αγκιστείας με γλουταθειόνη, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

### 2.3. Αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR)

Η σχετική έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων στη ρόκα, σε ιστούς όλων των διαφορετικών μεταχειρίσεων που εφαρμόστηκαν μελετήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR).

#### 2.3.1. Γενικά

Στην PCR πραγματικού χρόνου η διαδικασία ενίσχυσης του προϊόντος καταγράφεται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας ανά κύκλο. Το σύστημα

ανίχνευσης φθορισμού που εφαρμόστηκε βασίζεται στη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR green I. Η χρωστική αυτή ενσωματώνεται στα δίκλινα μόρια DNA καθώς συντίθεται το προϊόν ενίσχυσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Το σήμα φθορισμού είναι ασθενές κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων της αντίδρασης, αλλά όσο περνά στην εκθετική της φάση εμφανίζει τη μέγιστη αποδοτικότητα. Από έναν αριθμό κύκλων και μετά, επέρχεται η γραμμική φάση, οπότε μειώνεται και η απόδοση. Τελικά η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε κορεσμό (plateau) οπότε και η αντίδραση τερματίζεται.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού, είναι τιμή αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας της μήτρας DNA και πρέπει να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο οριακό επίπεδο (threshold) κατά το οποίο η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του μη-ειδικού ενδογενούς σήματος (background). Συνεπώς οι μετρήσεις πραγματικού χρόνου αντανακλούν διαφορές στις αρχικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται.

### 2.3.2. Επιλογή εκκινήτων

Η επιλογή των εκκινήτων για τις αντιδράσεις της PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου προγράμματος επιλογής εκκινήτων Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων ήταν περίπου 100-150 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινήτες επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομο- και ετερο-διμερών από τους εκκινήτες έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου.

### 2.3.3. Η αντίδραση

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα σε συσκευή Mx3005P (*Stratagene*), όπως φαίνεται στον πίνακα 6. Στο τέλος της κάθε αντίδρασης ακολουθεί η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάση της οποίας επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδραση. Χρησιμοποιήθηκε το *KAPA SYBR® FAST qPCR Kit* (*Karabiosystems*) με χρωστική αναφοράς τη *Rox Low*, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε optical tubes και περιελάμβανε 10 μl *KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x) Universal*, 0.8μl έμπροσθεν εκκινητής 5μm, 0.8μl ανάστροφος εκκινητής 5μm, 1 μl cDNA, 0.4 μl χρωστική αναφοράς *Rox Low* (*Karabiosystems*) και 7μl ddH<sub>2</sub>O.

Οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται στον πίνακα B6.

Πίνακας B6. Πρόγραμμα PCR πραγματικού χρόνου

|                          | Θερμοκρασία | Χρόνος          | Αριθμός κύκλων |
|--------------------------|-------------|-----------------|----------------|
| <b>Αρχική Αποδιάταξη</b> | 95°C        | 10 λεπτά        | 1              |
| <b>Αποδιάταξη</b>        | 95°C        | 15 δευτερόλεπτα | 35             |
| <b>Υβριδισμός</b>        | 60°C        | 20 δευτερόλεπτα |                |
| <b>Επιμήκυνση</b>        | 72°C        | 10 δευτερόλεπτα |                |

### 2.3.4. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο της ουβικιτίνης ώστε να γίνει κανονικοποίηση – ποσοτικοποίηση στα αρχικά δείγματα cDNA. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η αντίδραση σε όλα τα δείγματα (αρχικά του πρώτου πειράματος και στη συνέχεια του δεύτερου), αφού αυτά είχαν αραιωθεί στο 1:10. Παρακολουθώντας την έκφραση του γονιδίου της ουβικιτίνης σε κάθε δείγμα διαπιστώθηκε η πυκνότητα του cDNA του κάθε ιστού. Κάνοντας τις

κατάλληλες αραιώσεις ισοσκελίστηκαν οι συγκεντρώσεις cDNA από κάθε δείγμα, έτσι ώστε στο 1μl της κάθε αντίδρασης να υπάρχει η ίδια ποσότητα cDNA.

Στόχος ήταν να διαπιστωθεί η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων σε όλους τους ιστούς που συλλέχθηκαν από το πρώτο και το δεύτερο πείραμα. Έτσι πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου για κάθε γονίδιο, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους γ'αυτό εκκινητές και cDNA που προέρχεται από τη μεταχείριση που ήταν υπό μελέτη κάθε φορά. Για κάθε μία από τις βιολογικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις. Για κάθε PCR πραγματικού χρόνου ενός γονιδίου παράλληλα γινόταν η ίδια αντίδραση (με το ίδιο cDNA, τις ίδιες συνθήκες και τις ίδιες επαναλήψεις) για το γονίδιο της ουβικιτίνης. Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξάχθηκαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα (efficiency) των εκκινητών της κάθε αντίδρασης (Eff), αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει των αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού.

Στη συνέχεια έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο Pfaffl (2001). Η έκφραση του κάθε γονιδίου υπολογίστηκε σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου της ουβικιτίνης (γονίδιο αναφοράς) που θεωρείται σταθερή. Για κάθε τεχνική επανάληψη υπολογίστηκε η διαφορά μεταξύ των Ct του δείγματος και του γονιδίου αναφοράς ( $\Delta Ct$ ) και στη συνέχεια υπολογίστηκε η σχετική έκφραση σύμφωνα με τον τύπο  $Eff^{\Delta Ct}$ . Για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου σε κάθε τύπο ιστού και μεταχείρισης υπολογίστηκε ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης των τριών επαναλήψεων. Επίσης έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης ενός ή δύο παραγόντων (ONE WAY ή TWO WAY ANOVA) ανάλογα με την κάθε περίπτωση, και οι μέσοι όροι των επαναλήψεων συγκρίθηκαν μεταξύ τους για σημαντικές διαφορές σε επίπεδο ( $\alpha=0.05$ ) με το κριτήριο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD) χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα STATISTICA 7.0.



### **3. Μελέτη δράσης εκχυλισμάτων σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα**

Μελετήθηκε η δράση εκχυλισμάτων από ιστούς ρόκας (φύλλα και ρίζες) που περιέχουν γλυκοσινολικά οξέα στην ανάπτυξη ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων.

#### **3.1. Διαδικασία απομόνωσης των φυτικών εκχυλισμάτων**

Ως φυτικό υλικό για την παραλαβή των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από φυτά ρόκας (*Eruca sativa*) από τα φυτά του πρώτου πειράματος που είχαν αποθηκευτεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Οι αποθηκευμένοι ιστοί θρυμματίστηκαν με χρήση υγρού αζώτου και τοποθετήθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, χωριστά για κάθε μεταχείριση. Στη συνέχεια έγινε αποξήρανση των δειγμάτων με φυγοκεντρικό συμπυκνωτή (χρόνος 24h, πίεση 5.1 Torr, θερμοκρασία  $45^{\circ}\text{C}$ ).



Εικόνα Β8. Ιστός φύλλων πριν και μετά την αποξήρανση

Σε κάθε δείγμα προστέθηκε ζεστή μεθανόλη 70% σε αναλογία 1:2. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και λήψη του υπερκείμενου διαλύματος. Η ανωτέρω διαδικασία (προσθήκη μεθανόλης) επαναλήφθηκε δυο φορές και στο τέλος ενώθηκαν τα υπερκείμενα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των

ιζημάτων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο φυγοκεντρικό συμπυκνωτή με πίεση 5.1 Torr και θερμοκρασία 45° C, ώσπου ο όγκος του κάθε δείγματος να συμπυκνωθεί στο 20-30% του αρχικού.

Τα δείγματα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού ψευδάργυρου 1M (10 μl για κάθε 0,5 ml δείγματος) και τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία στους 4° C για 2-3 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (10000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά) και συλλογή του υπερκείμενου. Στον πίνακα B7 φαίνεται η αρχική ποσότητα δείγματος κάθε μεταχείρισης και η τελική συγκέντρωση στο εκχύλισμα.



Εικόνα B9. Συμπυκνωμένα εκχυλίσματα

Πίνακας B7. Τα δείγματα της κάθε μεταχείρισης, οι αρχικές τους ποσότητες και οι τελικές συγκεντρώσεις μετά την αποξήρανση

|              |       |      |      |      |
|--------------|-------|------|------|------|
| N+/S- roots  | 1400  | 100  | 0.6  | 166  |
| N-/S- leaves | 1800  | 400  | 0.65 | 615  |
| N-/S- roots  | 3100  | 500  | 0.71 | 704  |
| N+/S+ roots  | 10000 | 1200 | 1.2  | 1000 |
| N-/S+ leaves | 2400  | 500  | 1.5  | 333  |
| N-/S+ roots  | 2300  | 300  | 1.4  | 214  |
| N+/S- leaves | 8300  | 1100 | 2.9  | 379  |

Ετοιμάστηκε στήλη Sephadex G50 με ρυθμιστικό διάλυμα 2M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ - $\text{CH}_3\text{COOH}$  pH 5.6 και κατάλληλη ποσότητα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας των 14 ml (3 ml bed volume για κάθε 0.5 ml δείγματος) (Barillari et al., 2001).

Φορτώθηκε 0.5 ml από κάθε δείγμα και διαδοχικά παραλήφθηκαν οι παρακάτω εκλούσεις :

- a) ddH<sub>2</sub>O 4ml
- b) Μεθανόλη 1ml
- c) 0.1 M  $\text{KNO}_3$  2ml
- d) 0.1 M  $\text{K}_2\text{SO}_4$  4ml



Εικόνα B10. Τα τέσσερα διαδοχικά κλάσματα μετά τις εκλούσεις από τη στήλη Sephadex G50

Στη συνέχεια όλα τα παραπάνω κλάσματα συμπυκνώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε ddH<sub>2</sub>O, έτσι ώστε όλα τα δείγματα να έχουν την ίδια συγκέντρωση (415 mg/ml), με βάση την αρχική συγκέντρωση των εκχλισμάτων, όπως αυτή φαίνεται στον πίνακα B7.

### 3.2. Καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών

#### 3.2.1. Γενικά

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa (ενδομητριάκιο αδενοκαρκίνωμα), HepG2 (ηπατικό αδενοκαρκίνωμα) και MCF-7 (αδενοκαρκίνωμα μαστού).

Τα κύτταρα HeLa προέρχονται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η ονομασία τους προέρχεται από την ασθενή Henrietta Lacks, από την οποία απομονώθηκαν πριν από 60 χρόνια. Αποτελούν την πιο παλιά και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά. Τα συγκεκριμένα κύτταρα διατηρούν κατά την κυτταρική διαίρεση μια ενεργή μορφή της τελομεράσης που αποτρέπει την αυξανόμενη βράχυνση των τελομερών, η οποία εμπλέκεται στη γήρανση και στον κυτταρικό θάνατο. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα HeLa παρακάμπτουν το όριο Hayflick, που είναι ο περιορισμένος αριθμός διαιρέσεων που πραγματοποιούν τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα σε μια κυτταροκαλλιέργεια προτού πεθάνουν.

Τα κύτταρα HepG2 προέρχονται από ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Έχουν πρότυπο χρωμοσωμικό αριθμό 55 και εκκρίνουν πρωτεΐνες του πλάσματος όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, ινωδογόνο, α-2-μακροαίμοσφαιρίνη και πλασμινογόνο. Μεγαλώνουν σε μονοστιβάδες και συσσωματώματα και ανταποκρίνονται σε ερέθισμα με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη.

Τα κύτταρα MCF-7 προέρχονται από ανθρώπινο μαστικό αδενοκαρκίνωμα. Η ονομασία τους προέρχεται από το ακρωνύμιο του Michigan Cancer Foundation - 7, που είναι το ινστιτούτο στο οποίο καθιερώθηκε η εν λόγω κυτταρική σειρά το 1973. Ο καρυότυπός τους επιδεικνύει 69 χρωμοσώματα. Τα κύτταρα αυτά έχουν υποδοχείς οιστρογόνων και αποτελούν την πρώτη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού που αποκρίνεται σε ορμόνες (hormone-responsive). Η ανάπτυξη τους αναστέλλεται από τον TNFα (tumor necrosis factor-παράγοντας νέκρωσης όγκων).

Όλες οι μεταχειρίσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας II (laminar flow hood) της εταιρείας TelStar AV-30/70.

### 3.2.2. Συντήρηση κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια

Για τη διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν επίπεδες αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες των 75 cm<sup>2</sup> (T<sub>75</sub>) ή των 25 cm<sup>2</sup> (T<sub>25</sub>). Είναι σημαντικό σε κάθε φλάσκα να αναγράφεται ο αριθμός περάσματος (passage) της κάθε καλλιέργειας. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό το οποίο αποτελείται από θρεπτικό μέσο DMEM ενισχυμένο με εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS, Fetal Bovine Serum) (τελικής συγκέντρωσης 10% κατ'όγκον) και με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (τελικής συγκέντρωσης 100 units/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα). Για την αποφυγή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος ο ορός απενεργοποιήθηκε με θέρμανση 30 λεπτών στους 56° C (heat inactivation) και διαχωρίστηκε σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) που συντηρούνται στους -20° C. Πριν τη χρήση τους, γινόταν προθέρμανση όλων των αντιδραστηρίων σε υδατόλουτρο στους 37° C.

Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε επωαστικό κλίβανο της εταιρείας RS BIOTECH, σε θερμοκρασία 37° C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub> /95% αέρα. Το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ανανεωνόταν κάθε 2-3 ημέρες και η κατάσταση των κυττάρων ελεγχόταν καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (της εταιρείας Kruss).

Όταν η επικάλυψη της φλάσκας καλλιέργειας πλησίαζε στο 80% γινόταν ανακαλλιέργεια και πέρασμα-μεταφορά των κυττάρων σε νέα φλάσκα, σύμφωνα με την εξής διαδικασία: αρχικά απομακρυνόταν το θρεπτικό υλικό με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur που είναι συνδεδεμένη σε αντλία κενού. Στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων με προσθήκη διαλύματος PBS, με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων ορού που περιέχονται στο θρεπτικό υλικό, ο οποίος απενεργοποιεί την τρυψίνη. Ο όγκος του PBS ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας, ενδεικτικά ήταν 5 ml για την T<sub>25</sub> και 10 ml για την T<sub>75</sub>. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος PBS προστέθηκε διάλυμα τρυψίνης (0,5% τρυψίνη σε EDTA), με σκοπό την διάσπαση των συνδέσεων των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το στερεό τους υπόστρωμα. Ο όγκος του διαλύματος της τρυψίνης που χρησιμοποιείται ποικίλει, ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας, ενδεικτικά 1,5 ml για την T<sub>75</sub> και 1 ml για την T<sub>25</sub>. Η φλάσκα επωαζόταν με το διάλυμα τρυψίνης

στον κλίβανο επώασης 37° C για λίγα λεπτά (περίπου 3-5 λεπτά) ή εναλλακτικά σε θερμοκρασία δωματίου για περισσότερο χρόνο μέχρι να δράσει η τρυψίνη. Είναι απαραίτητο να ακολουθήσει και μηχανική ανάδευση με πιπέτα, ώστε να επιτευχθεί διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων και ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων. Η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων ελέγχεται μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ακολούθως στο κυτταρικό εναιώρημα προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό, ώστε να αδρανοποιηθεί η τρυψίνη και πραγματοποιήθηκε καλή ανάμειξη των κυττάρων με χρήση πιπέτας, έτσι ώστε να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα. Μια ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων (συνήθως 1:5 - 1:10 ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις ανάγκες του πειράματος) μεταφέρεται σε νέα φλάσκα με πλήρες θρεπτικό μέσο και διατηρείται σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37° C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub> / 95% αέρα.

### 3.2.3. Πάγωμα και ξεπάγωμα των κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές αποθηκεύονται για μακροχρόνιο διάστημα σε κρυοπροστατευτικό μέσο (μέσο παγώματος). Αυτό μπορεί να αποτελείται από FBS με 10% DMSO ή από πλήρες θρεπτικό με 10% DMSO. Το DMSO αλλάζει τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και εμποδίζει το σχηματισμό πολλών κρυστάλλων νερού κατά το πάγωμα των κυττάρων. Έτσι δρα ως κρυοπροστατευτικό. Τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν το πάγωμα για να υπάρχει επιτυχής διατήρηση. Γι'αυτό κατά γενικό κανόνα το πάγωμα πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει λιγότερο από το 70-80% της επιφάνειας της φλάσκας.

Για το πάγωμα των κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού πραγματοποιήθηκε έκπλυση της φλάσκας με διάλυμα PBS (5 ml για την T<sub>25</sub> και 10 ml για την T<sub>75</sub>). Ακολούθως αφαιρέθηκε το διάλυμα PBS και προστέθηκε διάλυμα τρυψίνης (1,5 ml για την T<sub>75</sub> και 1 ml για την T<sub>25</sub>). Τα κύτταρα επώαστηκαν για λίγα λεπτά (3-5 λεπτά) στους 37° C και ακολούθησε μηχανική ανάδευση με πιπέτα ώστε να επιτευχθεί διάσπαση συσσωματωμάτων και ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων. Στη συνέχεια προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο

των 15 ml και φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε μέσο παγώματος. Ενδεικτικά χρησιμοποιείται 1 ml ανά σωληνάριο παγώματος (cryovial). Τα παγωμένα κύτταρα μεταφέρονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  (για μια-δύο ώρες) και στη συνέχεια στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για διάστημα λίγων μηνών. Για την μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται δοχείο υγρού αζώτου.

Σε αντίθεση με το πάγωμα, το ξεπάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα του κυτταρικού θανάτου. Για το ξεπάγωμα των κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από τον καταψύκτη  $-80^{\circ}\text{C}$  ή από το δοχείο υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους  $37^{\circ}\text{C}$  όπου αποψύχθηκαν πλήρως με συνεχή ανακίνηση του σωληναρίου με γρήγορες κινήσεις. Ακολούθως μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο των 15 ml που περιείχε πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου (που περιέχει το μέσο παγώματος) το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε πλήρες θρεπτικό μέσο και μεταφέρθηκε σε φλάσκα καλλιέργειας  $T_{75}$  ή  $T_{25}$  ανάλογα με τον αριθμό τους. Είναι σημαντικό στην επιφάνεια της φλάσκας να αναγράφεται ο αριθμός των περασμάτων της κάθε κυτταρικής σειράς.

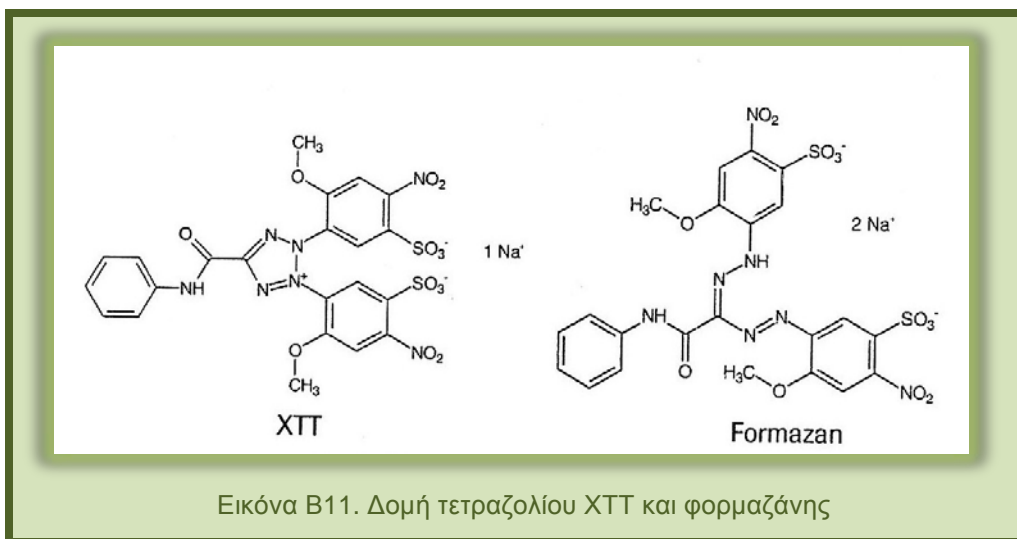
### 3.3. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο ΧΤΤ

#### 3.3.1. Αρχή της μεθόδου

Για τη μη-ραδιενεργή ποσοτικοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε μια χρωματομετρική μέθοδος η οποία βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ. Το τετραζόλιο ΧΤΤ, είναι ένα άλας κίτρινου χρώματος που έχει την ικανότητα να διασπάται και να σχηματίζει φορμαζάνη, που είναι μια πορτοκαλί χρωστική.

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αυτή, τα κύτταρα πρέπει να είναι μεταβολικά ενεργά και συνεπώς ζωντανά. Η αύξηση του αριθμού των ζωντανών

κυττάρων συνεπάγεται αύξηση της ολικής δραστηριότητας των μιτοχονδριακών δεϋδρογενασών στο δείγμα. Αυτή η αύξηση αντιπροσωπεύεται άμεσα από την ποσότητα της πορτοκαλί φορμαζάνης που σχηματίζεται. Η χρωστική φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή και μπορεί άμεσα να ποσοτικοποιηθεί από ένα φασματοφωτόμετρο (ELISA reader). Αυτό διασφαλίζει μεγάλο βαθμό ακρίβειας και άμεση επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τον υπολογιστή και συνεπώς καθίσταται δυνατός ο γρήγορος και εύκολος χειρισμός μεγάλου αριθμού δειγμάτων.



### 3.3.2. Υπολογισμός αριθμού κυττάρων

Για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε επεξεργασία της κυτταρικής καλλιέργειας με τρυψίνη και ένα δείγμα 10 μl από το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε πλάκα Neubauer (αιμοκυττόμετρο). Χρησιμοποιώντας ανάστροφο μικροσκόπιο καταμετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που περιέχεται στα 4 μεγάλα τετράγωνα (Α, Β, Γ, Δ) γύρω από τον κεντρικό σταυρό του αιμοκυττομέτρου. Τελικά υπολογίσθηκε ο μέσος όρος των κυττάρων σύμφωνα με τον τύπο  $[(A+B+Γ+Δ) / 4] \times 10^4$ . Ο αριθμός αυτός αναλογεί στον πληθυσμό των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας.



### 3.3.3. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης που βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ διαρκεί 4 ημέρες. Την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων σε τρυβλίο 96-θέσεων (96-well plate). Την δεύτερη ημέρα ξεκινάει η επώαση των κυττάρων με τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα και μετά από 48 ώρες (την τέταρτη ημέρα) προστίθεται το αντιδραστήριο ΧΤΤ και ακολουθεί φωτομέτρηση για την εκτίμηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

Η εκτίμηση της κυτταρικής ανάπτυξης πραγματοποιείται σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Αρχικά πραγματοποιείται η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων στο τρυβλίο. Για την επιλογή του κατάλληλου αριθμού κυττάρων, ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί αρχικά ένα πείραμα τιτλοδότησης, στο οποίο μελετάται η ανάπτυξη διαφορετικού αριθμού κυττάρων ( $10 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$ ,  $20 \times 10^3$ ,  $25 \times 10^3$ ,  $30 \times 10^3$ ,  $35 \times 10^3$ ,  $40 \times 10^3$ ,  $45 \times 10^3$ ,  $50 \times 10^3$ ), σε συνδυασμό με διαφορετικές ώρες επώασης ( 4, 6, 24 ώρες) με το αντιδραστήριο ΧΤΤ. Επιλέγεται ο συνδυασμός του αριθμού κυττάρων και του χρόνου επώασης με το αντιδραστήριο ΧΤΤ, στον οποίο παρατηρείται γραμμική ανάπτυξη των κυττάρων. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα πρέπει να διαθέτουν ένα καλό μεταβολικό ρυθμό, κάτι που συνήθως παρατηρείται όταν καλύπτουν ομοιόμορφα το 40-60% του πιάτου καλλιέργειας.

Λόγω της διαφορετικής μορφολογίας των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα κυττάρων για την επίστρωση του τρυβλίου 96 θέσεων ανάλογα με την κυτταρική σειρά. Συγκεκριμένα, για κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν 15.000 κύτταρα/πηγαδάκι, για κύτταρα MCF-7, χρησιμοποιήθηκαν 20.000 κύτταρα/πηγαδάκι και για κύτταρα HepG2 35.000 κύτταρα/πηγαδάκι.

Μετά από την επεξεργασία των κυττάρων με τρυψίνη και τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων/ml εναιωρήματος, υπολογίζεται ο όγκος που περιέχει τον

κατάλληλο αριθμό κυττάρων (όπως προαναφέρθηκε), στα οποία προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM, αντιβιοτικά, 10% FBS) σε τελικό όγκο 150 μl. Τα κύτταρα τοποθετούνται στα πηγαδάκια του τρυβλίου 96 θέσεων και επωάζονται στους 37° C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>/ 95% αέρα μέχρι την επόμενη μέρα, προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του πιάτου καλλιέργειας.

Τη δεύτερη ημέρα πραγματοποιείται η προσθήκη των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων στα κύτταρα. Για κάθε πηγαδάκι ετοιμάζεται μίγμα, το οποίο περιέχει θρεπτικό υλικό DMEM, απουσία ορού, με αντιβιοτικά και το εκχύλισμα σε συνολικό όγκο 100 μl. Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν πριν την κλασμάτωση είχαν τελική συγκέντρωση 20 mg/ml, ενώ μετά την κλασμάτωση τα εκχυλίσματα είτε συμπυκνώθηκαν, είτε αραιώθηκαν (ανάλογα με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος) και χρησιμοποιήθηκαν στην ίδια τελική συγκέντρωση. Αρχικά απομακρύνεται προσεκτικά το θρεπτικό υλικό από το κάθε πηγαδάκι και προστίθενται στα κύτταρα 100 μl από το κάθε δείγμα. Επιπλέον, κάθε πείραμα περιελάμβανε και τα ακόλουθα δείγματα: α) δείγματα αρνητικού ελέγχου, δηλαδή κύτταρα που επωάζονται παρουσία DMEM και αντιβιοτικών, απουσία ορού και εκχυλισμάτων (τουλάχιστον εις τριπλούν), β) δείγμα «θετικού ελέγχου», δηλαδή κύτταρα που επωάζονται παρουσία του αντικαρκινικού φαρμάκου ετοποσίδη σε τελική συγκέντρωση 100 μΜ (όπου αναμένεται πλήρης κυτταρικός θάνατος), γ) δείγματα που περιέχουν τις συγκεκριμένες ποσότητες εκχυλισμάτων σε θρεπτικό υλικό DMEM, απουσία κυττάρων. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται ώστε να εκτιμηθεί η απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα εξεταζόμενα μήκη κύματος. Το τρυβλίο τοποθετείται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>, όπου τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες.

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Roche (*cell proliferation kit II*), σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Αρχικά πραγματοποιείται η προσθήκη 50 μl από το αντιδραστήριο ΧΤΤ σε κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου 96-θέσεων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο ΧΤΤ πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων Α και Β που περιέχονται στο kit. Η ανάμιξη των αντιδραστηρίων Α και Β πραγματοποιείται λίγο πριν από τη χρήση τους. Κατόπιν, ακολουθεί επώαση των κυττάρων με το

αντιδραστήριο ΧΤΤ στους 37° C για 4 ώρες και φωτομέτρηση στα 450 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασφατοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) με χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).

### 3.4. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Μετά τη διεξαγωγή του πειράματος όπως περιγράφηκε παραπάνω, ακολούθησε η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, με σκοπό τον υπολογισμό του ποσοστού αναστολής της ανάπτυξης που προκαλούν τα εκχυλίσματα σε κάθε κυτταρική σειρά. Με βάση τις τιμές της απορρόφησης που λαμβάνονται από τη φωτομέτρηση (στα 450 και 630 nm), πραγματοποιούνται οι ακόλουθοι υπολογισμοί:

$OD_{\text{αρνητικού μάρτυρα}}$ : τιμή απορρόφησης του δείγματος ελέγχου, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm στα δείγματα που περιέχουν μόνο κύτταρα, απουσία εκχυλίσματος.

$OD_{\text{δείγματος}}$ : τιμή απορρόφησης των υπό εξέταση δειγμάτων, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm στα δείγματα που περιέχουν κύτταρα παρουσία εκχυλίσματος.

$OD_{\text{εκχυλίσματος}}$ : τιμή απορρόφησης του κάθε εκχυλίσματος, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm στα δείγματα που επώαστηκαν με την συγκεκριμένη ποσότητα εκχυλίσματος, απουσία κυττάρων.

Τελικά, το επί της εκατό (%) ποσοστό αναστολής στην ανάπτυξη των κυττάρων υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ Αναστολή} = \frac{O.D. (\text{control}) - [(O.D. (\text{δείγματος}) - O.D. (\text{εκχυλίσματος}))]}{O.D. (\text{control})} \times 100$$

Στα επί τοις εκατό ποσοστά αναστολής των εξεταζόμενων δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιώντας τη

μέθοδο Student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα (independent Student's t-test). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05.

#### **4. Ανάλυση μεταβολιτών**

##### 4.1 Φυτικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από τη δειγματοληψία των φυτών του πρώτου πειράματος, οι οποίοι λειοτριβήθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου και στη συνέχεια λειοφλοποιήθηκαν. Αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ανάλυσή τους. Επίσης, ιστοί από την ίδια δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους.

##### 4.2. Προσδιορισμός γλυκοσινολικών οξέων

Για τον προσδιορισμό των ΓΚΣ χρησιμοποιήθηκε η διαπιστευμένη μέθοδος ISO-9617-1, με κάποιες τροποποιήσεις (Bennett et al., 2012; Omirou et al., 2012). Ζυγίστηκαν 300mg ιστού από κάθε μεταχείριση σε σωλήνα πολυπροπυλενίου και προστέθηκαν 5ml ζεστού διαλύματος αιθανόλης 70% ( $70^{\circ}\text{C}$ ). Στη συνέχεια προστέθηκαν 150 μl διαλύματος σινιγκρίνης συγκέντρωσης 6.65 mM ως εσωτερικό πρότυπο και 250 μl tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) για την αποφυγή σχηματισμού του διμερούς της GSV (Bennett et al., 2002; 2007). Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με U-Turrax (T18, IKA 189, Germany) για 3 λεπτά στις 14500 στροφές/λεπτό. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 11500 στροφές/λεπτό στους  $4^{\circ}\text{C}$  και τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και τα υπερκείμενα συνενώθηκαν, ενώ ο όγκος διορθώθηκε στα 10 ml.

Τα δείγματα (1 ml) φορτώθηκαν σε στήλη DEAE—Sephadex A25 (Amersham, Biosciences), ενεργοποιημένη με διάλυμα οξικού νατρίου συγκέντρωσης 0.025 M, pH 5.6. Η στήλη ξεπλύθηκε τρεις φορές με 1ml διάλυμα οξικού νατρίου. Τέλος, εφαρμόστηκε στη στήλη διάλυμα σουλφατάσης *Helix pomatia* type I και επώαστηκε όλο το βράδυ σε θερμοκρασία δωματίου. Η έκλουση των αποθειωμένων ΓΚΣ έγινε με εφαρμογή 3ml απιονισμένου νερού στη στήλη.

Ο προσδιορισμός των ΓΚΣ έγινε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), συνδεδεμένο με ανιχνευτή δυαδικής συστοιχίας, εξοπλισμένο με στήλη Intertsil ODS3 (250X4.6 mm, 5 μm) και κινητή φάση ACN και νερό. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε είχε ως εξής: 0-1 λεπτό 1% ACN, πάνω από 30 λεπτά 30% ACN, και σταδιακά επιστροφή στο 1% ACN πάνω από 5 λεπτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

## **Εισαγωγικά**

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ρόκα, καλλιεργούμενο φυτό με οικονομική σημασία, το οποίο συγχρόνως όμως έχει χαρακτηριστικά γονιδιώματος και φυσιολογίας (μέγεθος γονιδιώματος, κύκλος ζωής, συγγένεια με το φυτό μοντέλο *A. thaliana*) που το καθιστούν απολύτως κατάλληλο για τη μελέτη του στη μεταγονιδιωματική εποχή με τα σύγχρονα εργαλεία γονιδιωματικής, πρωτεομικής και μεταβολομικής που πλέον είναι διαθέσιμα στην επιστημονική κοινότητα. Από τα αποτελέσματα προέκυψαν τα πρώτα στοιχεία μοριακού χαρακτηρισμού του φυτού. Το φυτό *Eruca sativa* ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae και ως εκ τούτου μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού του παράγει μεταξύ άλλων και γλυκοσινολικά οξέα. Παρόλο που το ποιοτικό και ποσοτικό προφίλ των μεταβολιτών αυτών στη ρόκα έχει μελετηθεί, δεν είναι ακόμη γνωστές οι λεπτομέρειες που αφορούν στο βιοχημικό μονοπάτι της βιοσύνθεσής τους. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να απομονωθούν τα γονίδια του φυτού τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται σε διάφορα στάδια της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ. Ορισμένα από αυτά κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης για να απομονωθεί η παραγόμενη πρωτεΐνη.

Η βιοσύνθεση των ΓΚΣ έχει μελετηθεί εκτενώς κυρίως στο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, και έχει οδηγήσει στην απομόνωση και στον χαρακτηρισμό των περισσότερων γονιδίων που συμμετέχουν στις βιοσυνθετικές αντιδράσεις των ΓΚΣ. Από το 2000 άρχισαν να δημοσιεύονται μελέτες που αφορούν στην ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ στο *A.thaliana*. Ακολούθησαν μελέτες συγκριτικής γονιδιωματικής με το *A.thaliana* (Gao et al., 2004; 2006; Zang et al., 2009, Wang et al., 2011), μέσω των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα αντίστοιχα γονίδια σε φυτά όπως το *B.rapa*, το *B. oleracea* και άλλα. Εξάλλου το *A.thaliana* και το *B.rapa* είναι δύο φυτά των οποίων το γονιδίωμα είναι γνωστό.

Οι πληροφορίες αυτές ήταν εξαιρετικά χρήσιμες στην παρούσα εργασία, λόγω της συγγένειας των παραπάνω φυτών με τη ρόκα. Η ύπαρξη περιοχών υψηλής συντήρησης και η μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των γονιδίων που έχουν την ίδια λειτουργία στα διαφορετικά φυτά βοήθησε στο σχεδιασμό εκκινητών που να

στοχεύουν στην ενίσχυση τμήματος της αλληλουχίας του αντίστοιχου γονιδίου στη ρόκα.

## **1. Αποτελέσματα**

### 1.1. Απομόνωση γονιδίων

Αρχικά έγινε εξαγωγή του ολικού RNA από φυτά ρόκας και στη συνέχεια κατασκευή αλυσίδας cDNA. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο σε αντιδράσεις PCR με τους κατάλληλους εκκινητές που σχεδιάστηκαν για κάθε γονίδιο και απομονώθηκε το προϊόν που ενισχύθηκε κάθε φορά. Αυτό κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector και ακολούθησε αλληλούχιση ώστε να «διαβαστεί» το ένθεμα. Το αποτέλεσμα επεξεργάστηκε και η κάθε αλληλουχία εισήχθη σε γονιδιακή βάση δεδομένων (GenBank) για να συγκριθεί με αλληλουχίες γνωστών γονιδίων που ήδη έχουν εναποτεθεί σε αυτήν. Η σύγκριση έγινε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) και αποκάλυψε υψηλή ομολογία με γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών σε άλλα φυτά. Σε όλες τις συγκρίσεις που έγιναν εμφανίστηκε ομοιότητα με γονίδια του *A.thaliana* και του *B.rapa*.

Σε όλες τις περιπτώσεις η ομοιότητα ξεπερνούσε το 85% και κάποιες φορές έφτανε το 95%, με κάποια τμήματα βάσεων να είναι 100% όμοια. Κάνοντας *in silico* διερεύνηση βρέθηκε ότι η κάθε αλληλουχία που απομονώθηκε βρίσκεται περίπου στο μέσον της πλήρους αλληλουχίας του γονιδίου, ενώ έλειπαν τα τμήματα προς το 5' και 3' άκρο. Έχοντας λοιπόν ως βάση την αρχική αυτή αλληλουχία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 5'/3' RACE, με στόχο την επέκταση προς τα δύο άκρα και εν τέλει την απομόνωση πλήρους μήκους αλληλουχιών του κάθε γονιδίου.

Απομονώθηκαν αλληλουχίες που σχετίζονται με τα γνωστά στο *A.thaliana* βιοσυνθετικά γονίδια *MAM*, *CYP79F1*, *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP83A1*, *CYP83B1*, *SUR1*, *FMOGS<sub>ox</sub>* και τους μεταγραφικούς παράγοντες *MYB34* και *MYB51*. Υπολογίστηκαν σε ποσοστό επί τοις εκατό οι ομοιότητες που έχουν οι DNA αλληλουχίες των γονιδίων που απομονώθηκαν, σε σχέση με συγγενείς αλληλουχίες γονιδίων που



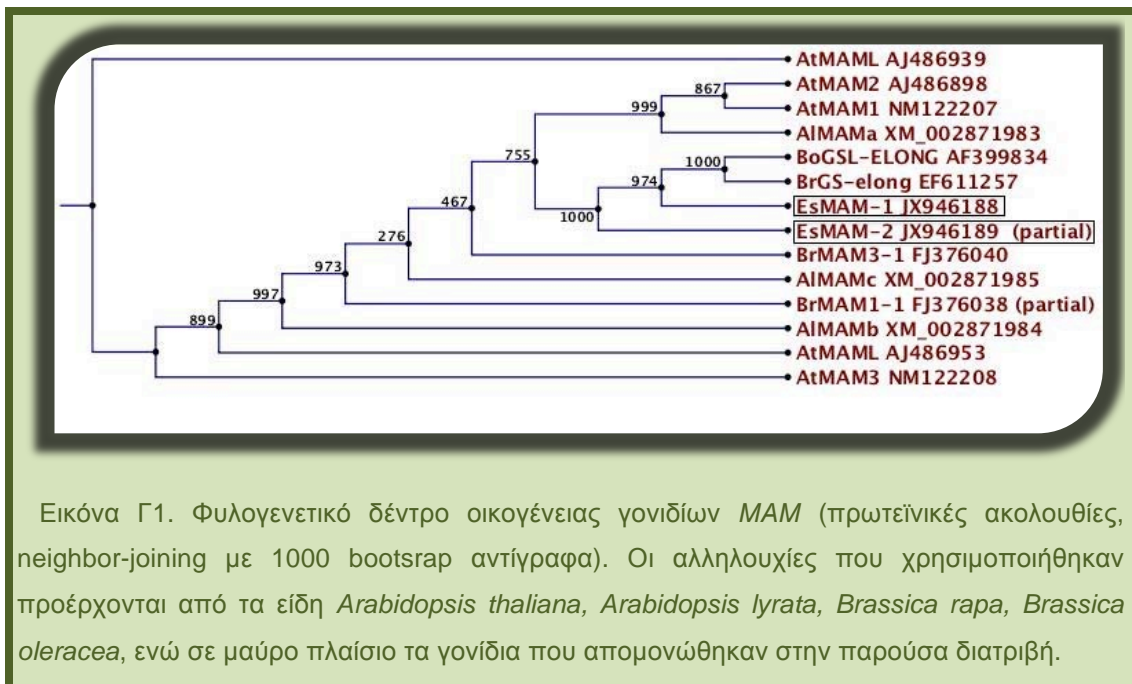
είναι διαθέσιμες. Ακολούθησε κατασκευή φυλογενετικών δέντρων ανά οικογένεια γονιδίων (μέθοδος neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα), όπου χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικές ακολουθίες. Μετά την εύρεση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών έγινε κατάθεσή τους στη βάση δεδομένων GenBank. Οι DNA ακολουθίες καθώς και τα accession numbers των γονιδίων που απομονώθηκαν παρατίθενται στο παράρτημα III. Οι ονομασίες που δόθηκαν ακολουθούν τις αντίστοιχες των γονιδίων του *A.thaliana*.

### 1.1.1. Οικογένεια γονιδίων MAM

Στην περίπτωση της οικογένειας αυτής χρησιμοποιήθηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές (MAMDG.F/MAMDG.R), γιατί τα τρία διαφορετικά που έχουν βρεθεί στο *Arabidopsis thaliana* έχουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας στις μεταξύ τους αλληλουχίες. Τελικά απομονώθηκαν δύο διαφορετικές αλληλουχίες (ESTs) που σχετίζονται με τα γονίδια της οικογένειας, τα οποία εμπλέκονται στην επιμήκυνση της αλυσίδας της μεθειονίνης στο πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης των αλειφατικών ΓΚΣ.

Η πρώτη αλληλουχία (*EsMAM-1*) αποτελεί γονίδιο πλήρους μήκους, αναγνωστικού πλαισίου (ORF, open reading frame) 1455 βάσεων. Η δεύτερη (*EsMAM-2*) είναι μερικού μήκους, 891 βάσεων και φαίνεται ότι αποτελεί κομμάτι γονιδίου, του οποίου δεν γνωρίζουμε το 5' άκρο, καθότι η επέκταση δεν κατέστη δυνατή.

Οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες μεταφράστηκαν σε πρωτεϊνικές και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου το οποίο φαίνεται παρακάτω (εικόνα Γ1). Στο δένδρο συμπεριλαμβάνονται πρωτεϊνικές ακολουθίες από ήδη γνωστά γονίδια της οικογένειας, που προέρχονται από το *Arabidopsis thaliana*, το *Arabidopsis lyrata*, το *Brassica rapa* και το *Brassica oleracea*.



Στη σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που απομονώθηκαν με αντίστοιχες από άλλα φυτά, τα ποσοστά ομοιότητας κυμάνθηκαν από 84% έως και 92% (πίνακας Γ1). Η πρώτη (πλήρους μήκους) αλληλουχία εμφανίζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με δύο γονίδια από *Brassica* φυτά. Πρόκειται για το *BrGSL-elong* και *BoGSL-ELONG* των *Brassica rapa* και *Brassica oleracea* αντίστοιχα, που θεωρείται ότι εμπλέκονται στην επιμήκυνση της αλυσίδας της μεθειονίνης. Η ομοιότητα με τα *MAM* γονίδια του *A.thaliana*, *A.lyrata*, καθώς και του *Brassica rapa* είναι μικρότερη αλλά εξίσου υψηλή.

Η δεύτερη (μερικού μήκους) αλληλουχία εμφανίζει επίσης μεγάλα ποσοστά ομοιότητας με τις υπόλοιπες, που κυμαίνονται από 85%-88% (Πίνακας Γ2).

Συγκρινόμενες μεταξύ τους οι δύο αλληλουχίες *EsMAM-1* και *EsMAM-2* εμφανίζουν ποσοστό ομοιότητας 87%.

Πίνακας Γ1. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *EsMAM-1* που απομονώθηκε στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών του γονιδίων της οικογένειας *MAM* από τα είδη *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* (πρόγραμμα BLAST)

| <i>Eruca sativa</i><br>gene name | orthologs of other Brassica species  | %<br>similarity |
|----------------------------------|--|-----------------|
| <b>EsMAM-1<br/>(JX946188)</b>    | <i>BrGS-elong</i> (EF611257) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> ) | 92              |
|                                  | <i>BoGS-ELONG</i> (AF399834) ( <i>Brassica oleracea</i> )                    | 92              |
|                                  | <i>AtMAM1</i> (NM122207) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                     | 85              |
|                                  | <i>AtMAM2</i> (AJ486898) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                     | 85              |
|                                  | <i>AtMAML</i> (AJ486939) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                     | 85              |
|                                  | <i>AtMAM3</i> (NM122208) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                     | 85              |
|                                  | <i>BrMAM1-1</i> (FJ376038) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> )   | 84              |
|                                  | <i>BrMAM3-1</i> (FJ376040) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> )   | 84              |
|                                  | <i>AIMAMa</i> (XM_002871983) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> )                   | 85              |
|                                  | <i>AIMAMb</i> (XM_002871984) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> )                   | 84              |
|                                  | <i>AIMAMc</i> (XM_002871985) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> )                   | 85              |

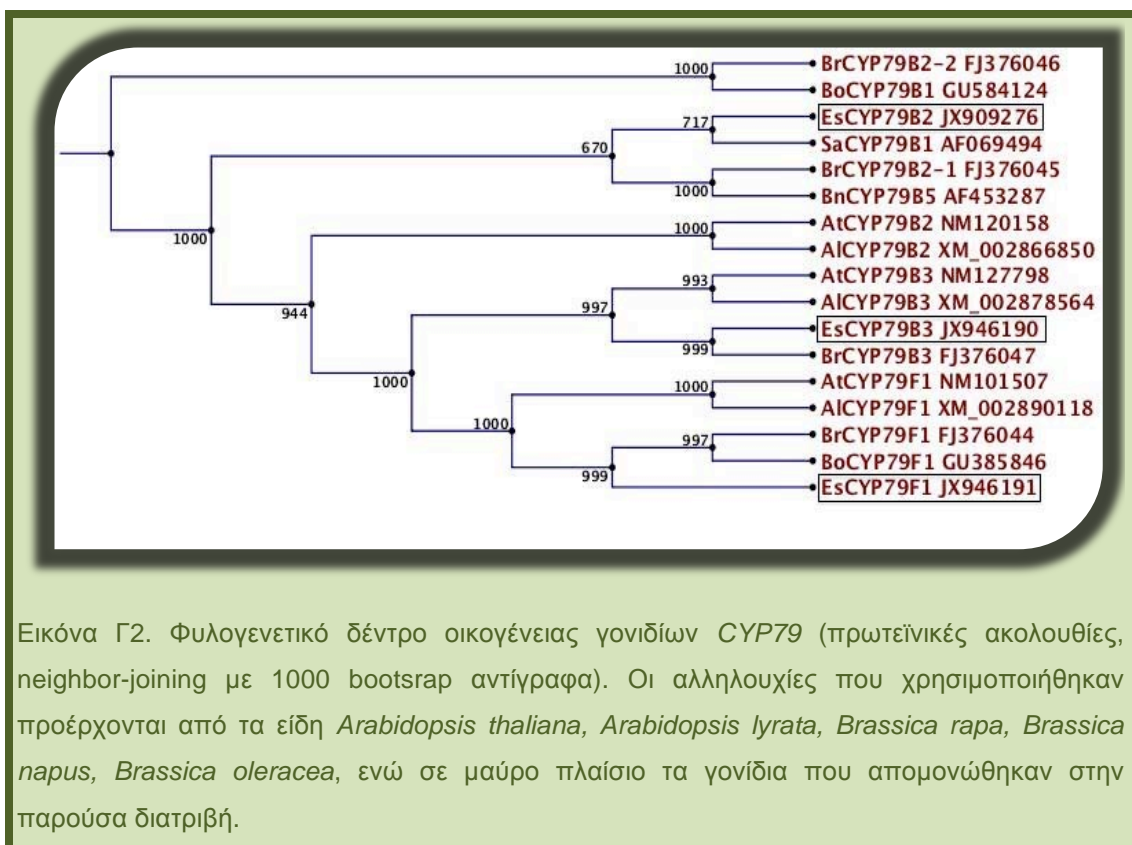
Πίνακας Γ2. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *EsMAM-2* που απομονώθηκε στην παρούσα διατριβή και των ορθολογών του γονιδίων της οικογένειας *MAM* από τα είδη *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* (πρόγραμμα BLAST)

| <i>Eruca sativa</i><br>gene name                   | orthologs of other Brassica species  | %<br>similarity |
|--|--|-----------------|
| <b><i>EsMAM-2</i><br/>(JX946189)<br/>(partial)</b> | <i>BrGS-elong</i> (EF611257) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> ) | 88              |
|  | <i>AtMAM1</i> (NM122207) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                     | 86              |
|  | <i>AtMAM2</i> (AJ486898) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                     | 87              |
|  | <i>AtMAML</i> (AJ486953) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                     | 86              |
|  | <i>AtMAM3</i> (NM122208) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                     | 86              |
|  | <i>BrMAM1-1</i> (FJ376038) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> )   | 85              |
|  | <i>BrMAM3-1</i> (FJ376040) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> )   | 85              |
|  | <i>AIMAMa</i> (XM_002871983) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> )                   | 88              |
|  | <i>AIMAMb</i> (XM_002871984) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> )                   | 85              |
|  | <i>AIMAMc</i> (XM_002871985) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> )                   | 87              |

### 1.1.2. Οικογένεια γονιδίων CYP79

Απομονώθηκαν τρεις αλληλουχίες που ανήκουν στην οικογένεια CYP79 και σχετίζονται με γονίδια που συμμετέχουν στο πρώτο βήμα, του σταδίου σχηματισμού του γλυκοσινολικού δακτυλίου. Πρόκειται για τις αλληλουχίες *EsCYP79F1*, *EsCYP79B2* και *EsCYP79B3*, και αποτελούν γονίδια πλήρους μήκους, αναγνωστικού πλαισίου 1614, 1629 και 1632 βάσεων αντίστοιχα. Οι αρχικές αλληλουχίες προέκυψαν από PCR χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τα ζεύγη CYP79F1.F/CYP79F1.R και CYP79DG-F/CYP79DG-R. Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών είναι εκφυλισμένο και έδωσε τα αρχικά κομμάτια των *EsCYP79B2* και *EsCYP79B3*. Ακολούθησε επέκταση των αλληλουχιών προς τα 5' και 3' άκρα χρησιμοποιώντας την τεχνική RACE.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταφράστηκαν σε πρωτεϊνικές και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου το οποίο φαίνεται παρακάτω (εικόνα Γ2). Σ' αυτό συμπεριλαμβάνονται, πρωτεϊνικές ακολουθίες από γονίδια της οικογένειας που προέρχονται από τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea* και *Sinapis alba*.



Εικόνα Γ2. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων *CYP79* (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, ενώ σε μαύρο πλαίσιο τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Η ομοιότητα των τριών πλήρους μήκους αλληλουχιών που απομονώθηκαν, με τα χαρακτηρισμένα στο *A.thaliana* γονίδια της οικογένειας είναι υψηλή και φτάνει το 90% στην περίπτωση του *CYP79B3* (πίνακας Γ3). Τα γονίδια που απομονώθηκαν εμφανίζουν αρκετά μεγάλη ομοιότητα νουλεοτιδικής αλληλουχίας και με τις διαθέσιμες αλληλουχίες *Brassica* φυτών. Η υψηλότερη ομοιότητα για κάθε γονίδιο από αυτά που απομονώθηκαν σε σχέση με κάποιο άλλο ήδη γνωστό φτάνει και στις τρεις περιπτώσεις το 94%.

Πίνακας Γ3. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *EsCYP79F1*, *EsCYP79B2* και *EsCYP79B3* που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων από τα είδη *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Sinapis alba* (πρόγραμμα BLAST)

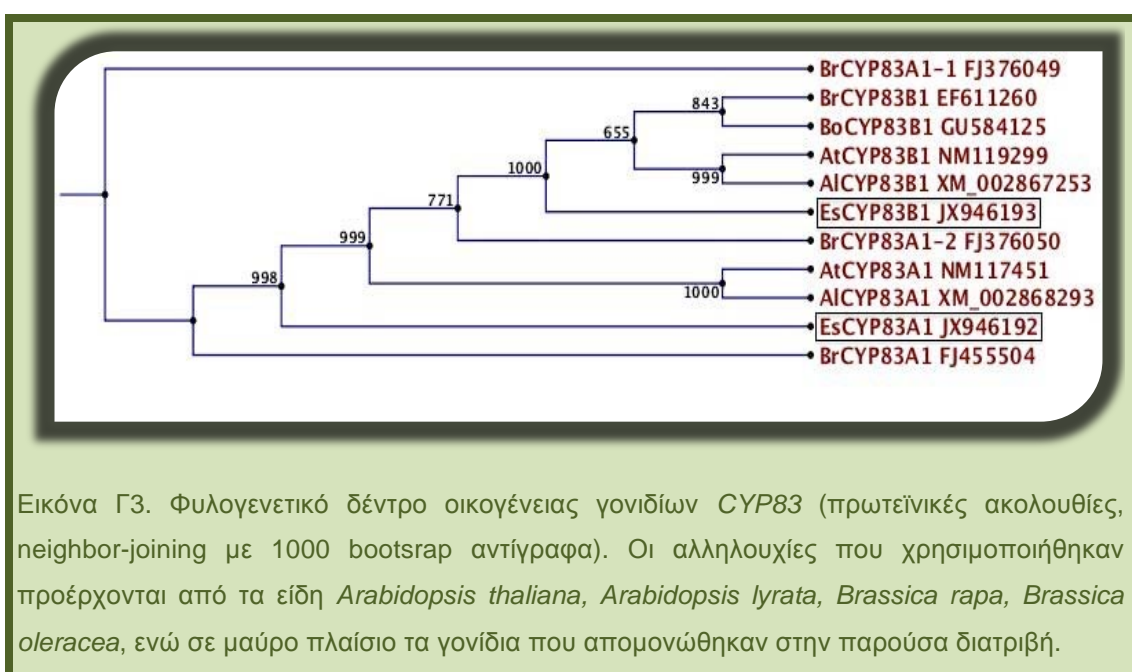
| <i>Eruca sativa</i><br>gene name                              | orthologs of other Brassica species                           | % similarity   |
|---|---|--|
| <b>EsCYP79F1</b><br><b>(JX946191)</b>                         | <i>BrCYP79F1</i> (FJ376044) ( <i>Brassica rapa</i> )          | 94   |
|   | <i>BoCYP79F1</i> (GU385846) ( <i>Brassica oleracea</i> )      | 94   |
|   | <i>AtCYP79F1</i> (NM101507) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )   | 85   |
|   | <i>AICYP79F1</i> (XM_002890118) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> ) | 86   |
| <b>EsCYP79B2</b><br><b>(JX909276)</b>                         | <i>SaCYP79B1</i> (AF069494) ( <i>Sinapis alba</i> )           | 94   |
|   | <i>BoCYP79B1</i> (GU584124) ( <i>Brassica oleracea</i> )      | 93   |
|   | <i>BnCYP79B5</i> (AF453287) ( <i>Brassica napus</i> )         | 93   |
|   | <i>BrCYP79B2-1</i> (FJ376045) ( <i>Brassica rapa</i> )        | 92   |
|   | <i>BrCYP79B2-2</i> (FJ376046) ( <i>Brassica rapa</i> )        | 91   |
|   | <i>AtCYP79B2</i> (NM120158) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )   | 89   |
|   | <i>AICYP79B2</i> (XM_002866850) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> ) | 90   |
|   | <i>EsCYP79B3</i><br><b>(JX946190)</b>                         | <i>BrCYP79B3</i> (FJ376047) ( <i>Brassica rapa</i> ) |
| <i>AtCYP79B3</i> (NM127798) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )   | 90  |  |
| <i>AICYP79B3</i> (XM_002878564) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> ) | 90  |  |

### 1.1.3. Οικογένεια γονιδίων CYP83

Απομονώθηκαν δύο αλληλουχίες που ανήκουν στην οικογένεια CYP83 και σχετίζονται με γονίδια που συμμετέχουν στο δεύτερο βήμα του σταδίου σχηματισμού του γλυκοσινολικού δακτυλίου. Οι ονομασίες που δόθηκαν σε αυτές ακολουθούν τις αντίστοιχες των γονιδίων του *Arabidopsis thaliana*.

Η πρώτη (*EsCYP83A1*) αποτελεί γονίδιο πλήρους μήκους αναγνωστικού πλαισίου 1506 βάσεων και η δεύτερη (*EsCYP83B1*) γονίδιο πλήρους μήκους αναγνωστικού πλαισίου 1500 βάσεων. Οι αρχικές αλληλουχίες προέκυψαν από PCR με εκκινητές τα ζεύγη CYP83A1.F/CYP83A1.R και CYP83B1.F/CYP83B1.R αντίστοιχα. Ακολούθησε επέκταση των αλληλουχιών προς τα 5' και 3' άκρα χρησιμοποιώντας την τεχνική RACE.

Στο φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε (εικόνα Γ3) συμπεριλήφθηκαν πρωτεϊνικές ακολουθίες CYP83 γονιδίων που προέρχονται από τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa* και *Brassica oleracea*.



Εικόνα Γ3. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων *CYP83* (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea*, ενώ σε μαύρο πλαίσιο τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Πίνακας Γ4. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *EsCYP83A1* και *EsCYP83B1* που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων από τα είδη *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* (πρόγραμμα BLAST)

| <i>Eruca sativa</i> gene name  | orthologs of other Brassica species                                    | % similarity |
|--------------------------------|--|--------------|
| <b>EsCYP83A1</b><br>(JX946192) | BrCYP83A1-1 (FJ376049) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> ) | 95           |
|                                | BrCYP83A1 (FJ455504) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> )    | 95           |
|                                | AtCYP83A1 (NM117451) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                   | 87           |
|                                | AlCYP83A1 (XM_002868293) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> )                 | 87           |
|                                | BrCYP83A1-2 (FJ376050) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> ) | 86           |
| <b>EsCYP83B1</b><br>(JX946193) | BrCYP83B1 (EF611260) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> )   | 91           |
|                                | BoCYP83B1 (GU584125) ( <i>Brassica oleracea</i> )                      | 91           |
|                                | AtCYP83B1 (NM119299) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                   | 89           |

Όσον αφορά στις νουκλεοτιδικές ακολουθίες των γονιδίων *EsCYP83A1* και *EsCYP83B1* που απομονώθηκαν, παρατηρείται και σε αυτήν την περίπτωση μεγαλύτερη ομοιότητα με τα αντίστοιχα γονίδια του *B.rapa* (ομοιότητα 95% και 91% αντίστοιχα), ενώ σε σχέση με τα γονίδια του *A.thaliana* οι ομοιότητες είναι 87% και 89% αντίστοιχα.

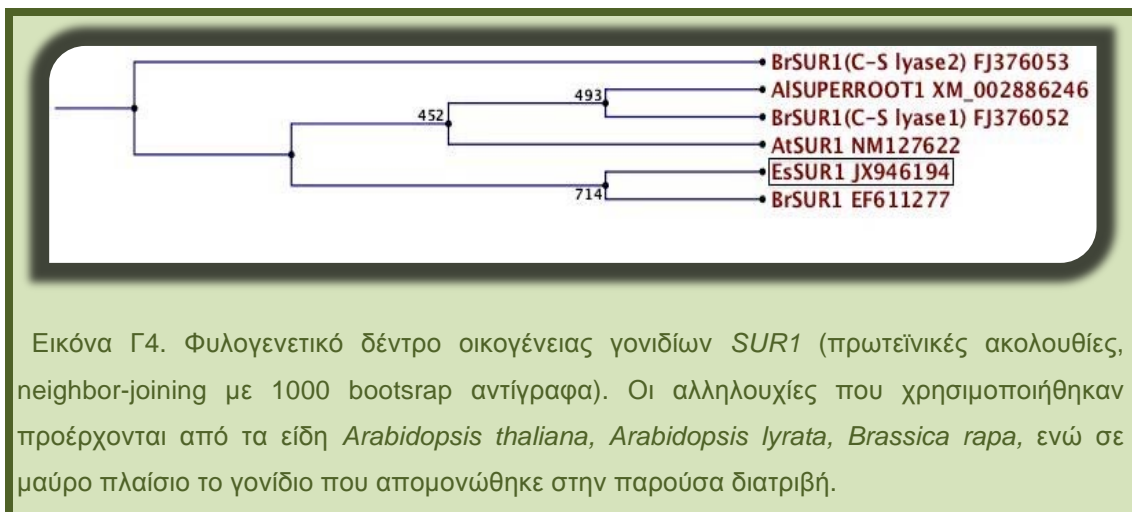
#### 1.1.4. Γονίδιο SUR1

Απομονώθηκε μία αλληλουχία (*EsSUR1*) που φαίνεται να αποτελεί γονίδιο πλήρους μήκους, αναγνωστικού πλαισίου 1377 βάσεων. Η αρχική αλληλουχία προέκυψε από PCR με εκκινητές το ζεύγος SUR1.F/SUR1.R και στη συνέχεια ακολούθησε επέκταση με τεχνική RACE προς το 3' άκρο. Για το 5' άκρο του γονιδίου έγινε συμβατική PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SUR.1-5-F/SUR1.RTR.

Κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο το οποίο φαίνεται παρακάτω (εικόνα Γ4) και η νουκλεοτιδική αλληλουχία συγκρίθηκε με άλλες ήδη γνωστές για να βρεθούν



τα ποσοστά ομοιότητας (πίνακας Γ5). Για την κατασκευή του δέντρου χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές ακολουθίες του ίδιου γονιδίου από τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* και *Brassica rapa*.



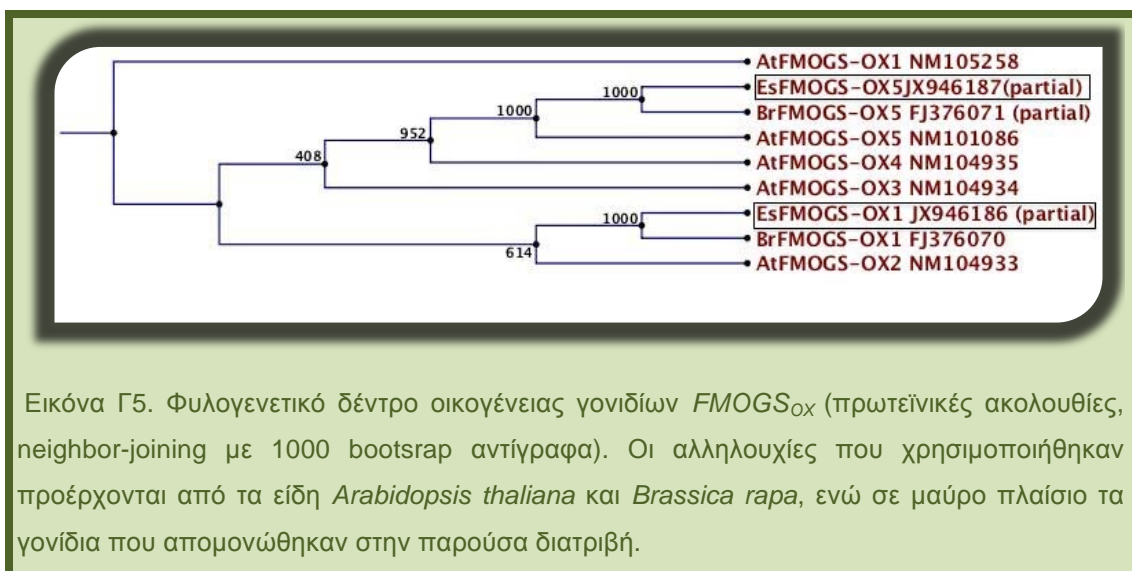
Πίνακας Γ5. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *EsSUR1* που απομονώθηκε στην παρούσα διατριβή και των ορθολόγων του γονιδίων από τα είδη *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* και *Brassica rapa* (πρόγραμμα BLAST)

| <i>Eruca sativa</i><br>gene name | orthologs of other Brassica species   | %<br>similarity |
|----------------------------------|---|-----------------|
| <b>EsSUR1<br/>(JX946194)</b>     | BrSUR1(C-S lyase1) (FJ376052) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> ) | 94              |
|                                  | BrSUR1(C-S lyase2) (FJ376053) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> ) | 90              |
|                                  | BrSUR1 (EF611277) ( <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> )              | 94              |
|                                  | AtSUR1 (NM127622) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )                             | 88              |
|                                  | AISUPERROOT1 (XM_002886246) ( <i>Arabidopsis lyrata</i> )                     | 89              |

### 1.1.5. Οικογένεια γονιδίων *FMOGS<sub>ox</sub>*

Η προσπάθεια απομόνωσης κάποιου μέλος της οικογένειας αυτής είχε ως αποτέλεσμα δύο αλληλουχίες μερικού μήκους. Η πρώτη (*EsFMOGS<sub>ox-1</sub>*) έχει μήκος 1067 βάσεις και περιέχει κωδικόνιο έναρξης, ενώ η δεύτερη (*EsFMOGS<sub>ox-5</sub>*) έχει μήκος 1004 βάσεων και περιέχει κωδικόνιο λήξης. Δεν κατέστη δυνατή η επέκταση προς το 3' άκρο για την πρώτη και προς το 5' άκρο για τη δεύτερη.

Κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο (εικόνα Γ5), στο οποίο συμπεριλήφθηκαν πρωτεϊνικές ακολουθίες γονιδίων της οικογένειας *FMOGS<sub>ox</sub>* που προέρχονται από τα φυτά *Arabidopsis thaliana* και *Brassica rapa*. Στον πίνακα Γ6 φαίνονται οι ομοιότητες με τα γονίδια αυτά.



Εικόνα Γ5. Φυλογενετικό δέντρο οικογένειας γονιδίων *FMOGS<sub>ox</sub>* (πρωτεϊνικές ακολουθίες, neighbor-joining με 1000 bootstrap αντίγραφα). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τα είδη *Arabidopsis thaliana* και *Brassica rapa*, ενώ σε μαύρο πλαίσιο τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή.

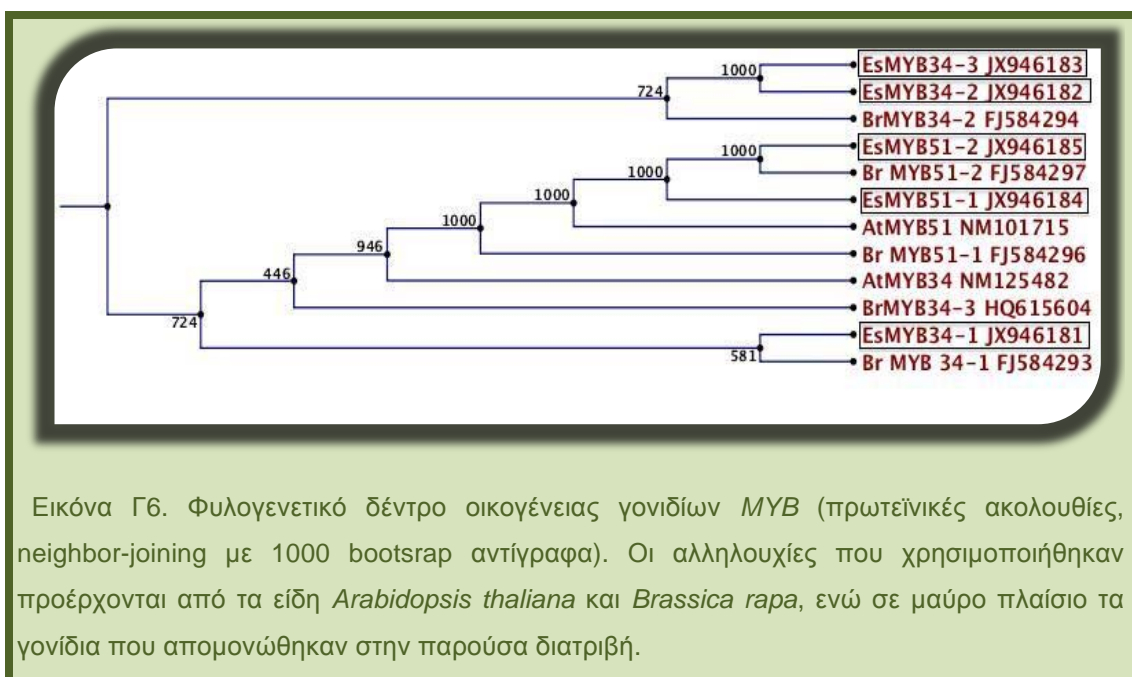
Πίνακας Γ6. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων της οικογένειας *FMOGS*<sub>OX</sub> που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων της οικογένειας *FMOGS*<sub>OX</sub> από τα είδη *Arabidopsis thaliana* και *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (πρόγραμμα BLAST)

| <i>Eruca sativa</i><br>gene name                | orthologs of other Brassica species                       | %<br>similarity |
|---|---|-----------------|
| <b>EsFMOGS-OX1<br/>(JX946186)<br/>(partial)</b> | BrFMOGS-OX1 (FJ376070) ( <i>Brassica rapa</i> )           | 92              |
|   | AtFMOGS-OX1 (NM105258) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )    | 84              |
|   | AtFMOGS-OX2 (NM104933) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )    | 84              |
|   | AtFMOGS-OX3 (NM104934) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )    | 83              |
| <b>EsFMOGS-OX5<br/>(JX946187)<br/>(partial)</b> | BrFMOGS-OX5 (FJ376071) (partial) ( <i>Brassica rapa</i> ) | 94              |
|   | AtFMOGS-OX5 (NM101086) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )    | 84              |

#### 1.1.6. Μεταγραφικοί παράγοντες MYB

Απομονώθηκαν πέντε συνολικά αλληλουχίες πλήρους μήκους, που σχετίζονται με γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες. Στην προσπάθεια για απομόνωση του *MYB34* προέκυψαν τρεις διαφορετικοί κλώνοι. Πρόκειται για πλήρους μήκους αλληλουχίες (*EsMYB34-1*, *EsMYB34-2*, *EsMYB34-3*), μήκους 924, 858 και 870 βάσεων αντίστοιχα. Στην προσπάθεια απομόνωσης του *MYB51* προέκυψαν δύο κλώνοι. Και σε αυτήν την περίπτωση, πρόκειται για πλήρους μήκους αλληλουχίες (*EsMYB51-1* και *EsMYB51-2*), μήκους 987 και 1005 βάσεων αντίστοιχα.

Κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο (εικόνα Γ6) για τη συγκεκριμένη οικογένεια, στο οποίο συμπεριλήφθηκαν πρωτεϊνικές ακολουθίες από τα φυτά *Arabidopsis thaliana* και *Brassica rapa*. Στους πίνακες Γ7 και Γ8 φαίνονται οι ομοιότητες των γονιδίων αυτών με τις αλληλουχίες που απομονώθηκαν.



Πίνακας Γ7. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *EsMYB34-1*, *EsMYB34-2* και *EsMYB34-3* που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων της οικογένειας MYB34 από τα είδη *Arabidopsis thaliana* και *Brassica rapa ssp. pekinensis* (πρόγραμμα BLAST)

|                                | <i>BrMYB34-1</i><br>(FJ584293)<br>( <i>Brassica rapa</i> ) | <i>BrMYB34-2</i><br>(FJ584294)<br>( <i>Brassica rapa</i> ) | <i>BrMYB34-3</i><br>(HQ615604)<br>( <i>Brassica rapa</i> ) | <i>AtMYB34</i><br>(NM125482)<br>( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) |
|--------------------------------|--|--|--|---|
| <i>EsMYB34-1</i><br>(JX946181) | 88   | 86   | 90   | 82  |
| <i>EsMYB34-2</i><br>(JX946182) | 86   | 91   | 86   | 85  |
| <i>EsMYB34-3</i><br>(JX946183) | 86   | 91   | 86   | 85  |

Πίνακας Γ8. Επί τοις εκατό ομοιότητες των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *EsMYB51-1* και *EsMYB51-2* που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή και των ορθόλογών τους γονιδίων της οικογένειας *MYB51* από τα είδη *Arabidopsis thaliana* και *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (πρόγραμμα BLAST)

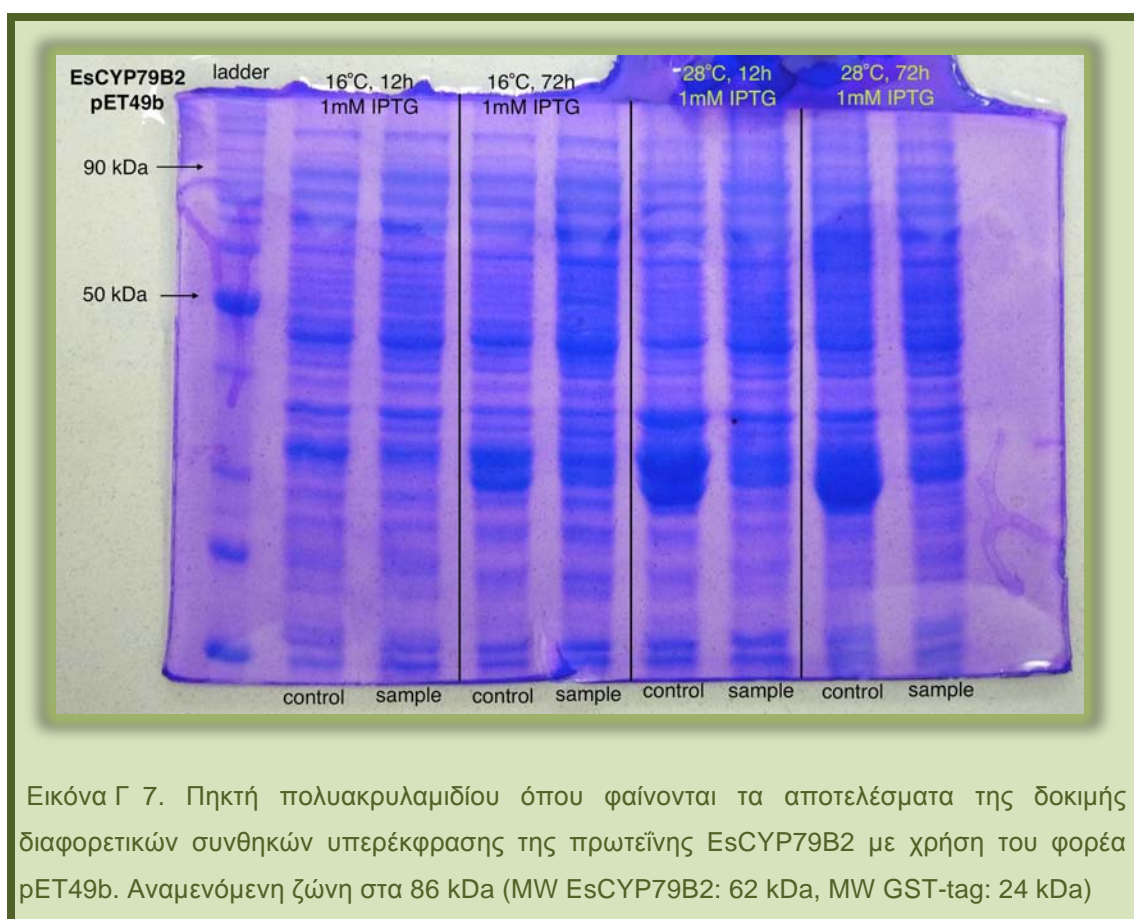
|                                | <i>BrMYB51-1</i><br>(FJ584296)<br>( <i>Brassica rapa</i> ) | <i>BrMYB51-2</i><br>(FJ584297)<br>( <i>Brassica rapa</i> ) | <i>AtMYB51</i><br>(NM101715)<br>( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) |
|--------------------------------|--|--|---|
| <i>EsMYB51-1</i><br>(JX946184) | 92   | 88   | 86  |
| <i>EsMYB51-2</i><br>(JX946185) | 88   | 94   | 84  |

### 1.2. Απομόνωση πρωτεϊνών

Μετά την απομόνωση των αλληλουχιών πλήρους μήκους των γονιδίων που προαναφέρθηκαν, ακολούθησε κλωνοποίηση κάποιων από αυτά σε φορείς έκφρασης ώστε να απομονωθεί το αντίστοιχο ένζυμο. Σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν την πλήρη ακολουθία του κάθε γονιδίου, φέροντας στα άκρα τους τις κατάλληλες αλληλουχίες για τα ένζυμα περιορισμού με τα οποία θα γινόταν η κλωνοποίηση, συμβατά με αυτά που υπάρχουν στην περιοχή ένθεσης του κάθε φορέα. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στο παράρτημα II. Αρχικά, το κάθε γονίδιο ενισχύθηκε με PCR και έγινε ηλεκτροφόρηση, απομόνωση από την ηλεκτρική και κλωνοποίηση στον φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη του ενθέματος και του φορέα με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και κλωνοποίηση σε φορέα έκφρασης. Για τα γονίδια *EsCYP79B2*, *EsCYP83A1* και *EsCYP83B1* χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pET49b, ενώ για το *EsCYP79B2*, λόγω προβλημάτων χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pGEX4T-2. Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση για επιβεβαίωση της σωστής ένθεσης.

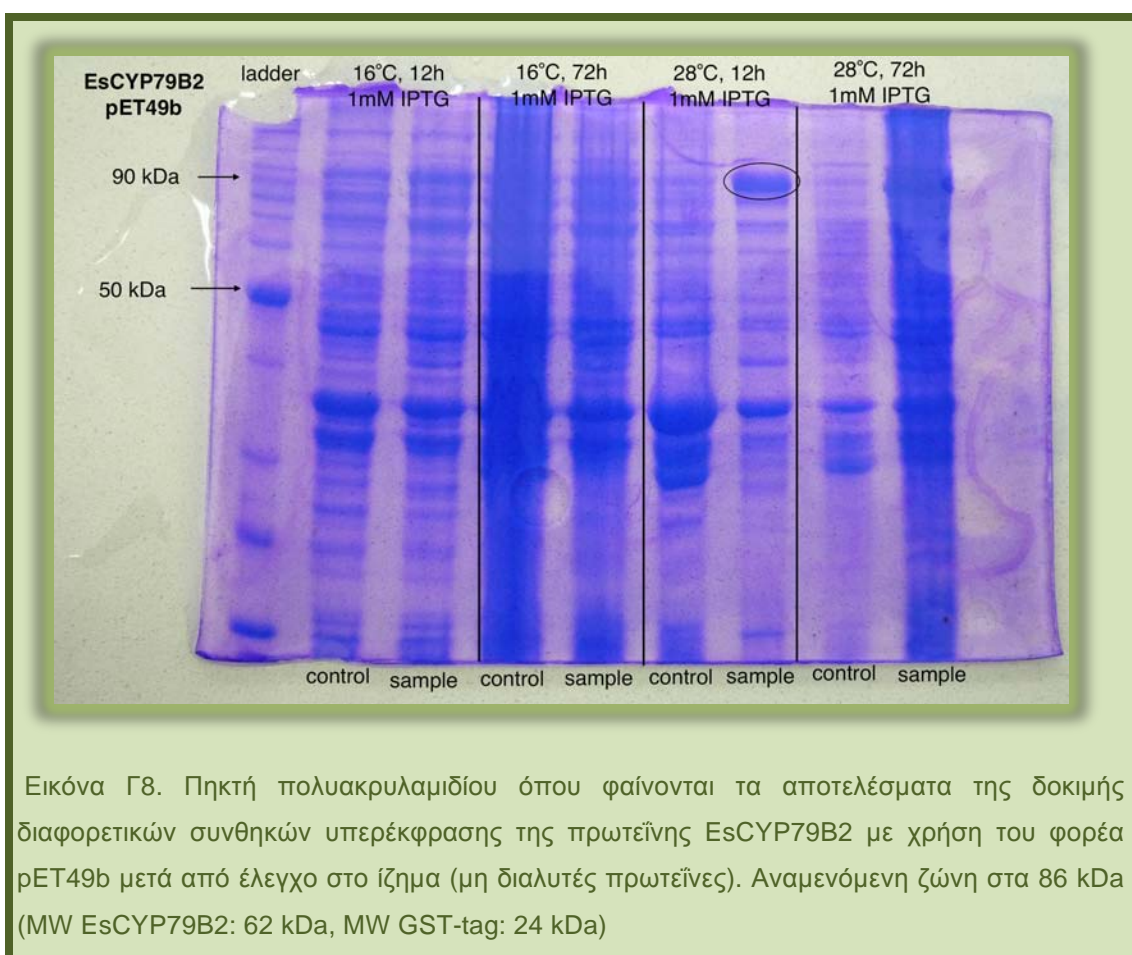
### 1.2.1. EsCYP79B2

Επιλέχθηκε μοναδιαία αποικία από τα μετασχηματισμένα κύτταρα που έφεραν τον pET49b με το ένθεμα και εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Εξετάστηκαν διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου επώασης και συγκέντρωσης IPTG, για να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες υπερέκφρασης. Μετά από φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και ανάλυση του πρωτεϊνικού περιεχομένου σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Κάποιες από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν φαίνονται στην εικόνα Γ7. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που έφεραν το φορέα χωρίς το ένθεμα και αναπτύχθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες.



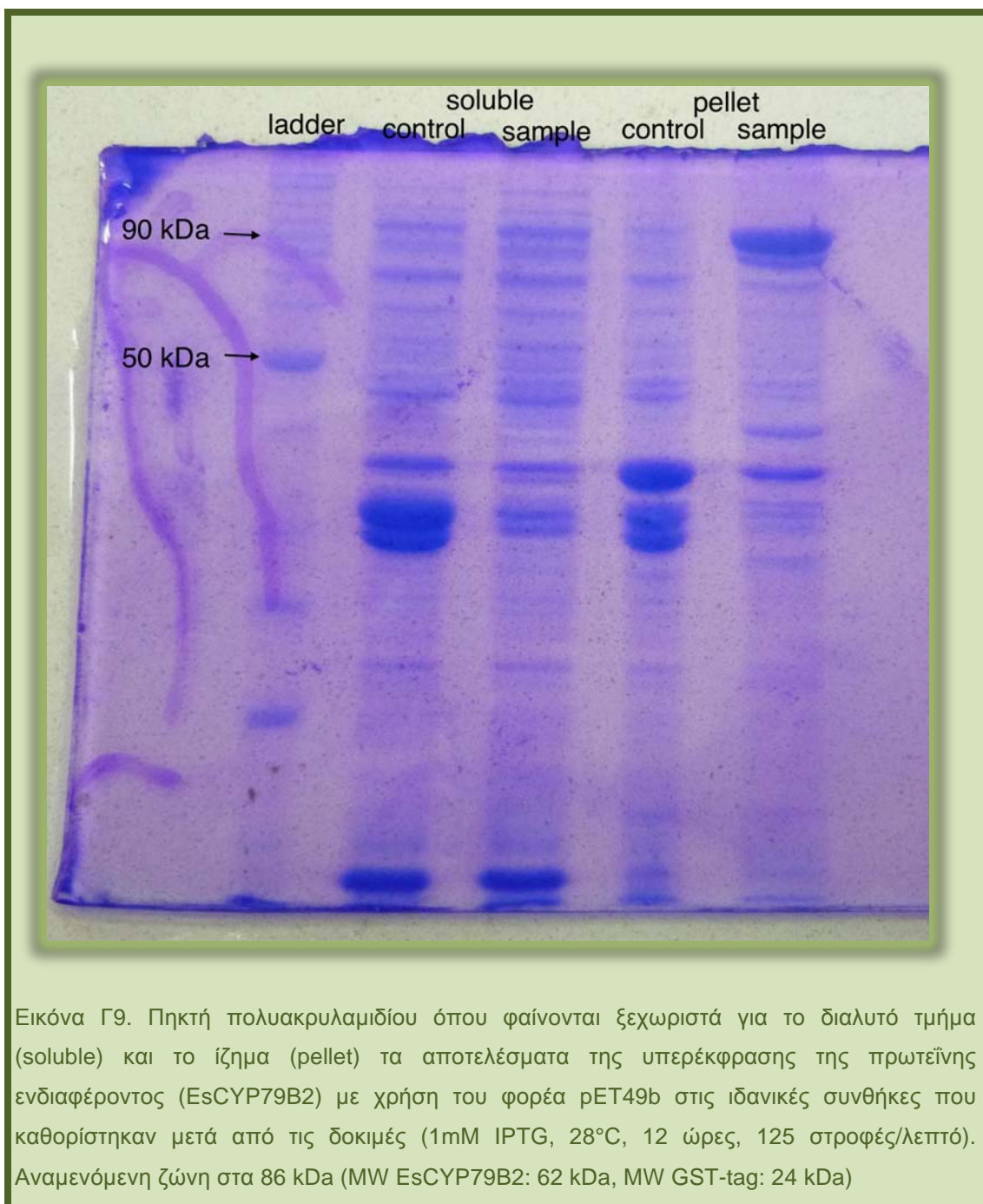
Καθώς η πρωτεΐνη δεν εντοπίστηκε στο υπερκείμενο που εξετάστηκε μετά τη λύση των κυττάρων (διαλυτές πρωτεΐνες) θεωρήθηκε απαραίτητο να εξεταστεί και το

ίζημα (μη διαλυτές πρωτεΐνες). Εκεί συνήθως περιέχονται κυτταρικά συστατικά αλλά και σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies), τα οποία πολλές φορές σχηματίζει η εκφραζόμενη πρωτεΐνη όταν γονίδια ενός οργανισμού εκφράζονται σε έναν άλλον. Μετά από έλεγχο και του ιζήματος που προκύπτει μετά από τη φυγοκέντρηση των λυμένων κυττάρων στις διάφορες συνθήκες που δοκιμάστηκαν, φάνηκε ότι η πρωτεΐνη υπερεκφράζεται στους 28° C, σε 12 ώρες, 125 στροφές/λεπτό και με συγκέντρωση IPTG 1 mM (εικόνα Γ8). Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που έφεραν το φορέα χωρίς το ένθεμα και αναπτύχθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες.



Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι ιδανικές συνθήκες υπερέκφρασης σε 0.5 λίτρο υγρής καλλιέργειας στην οποία εμβολιάστηκαν τα μετασχηματισμένα βακτήρια που φέρουν το φορέα με το ένθεμα. Στα κύτταρα εφαρμόστηκε συσκευή υπερήχων

(sonication) και απομονώθηκε το ίζημα μετά από φυγοκέντρηση των λυμένων κυττάρων. Όπως φαίνεται στην εικόνα Γ9, εκεί εντοπίζεται η πρωτεΐνη EsCYP79B2.

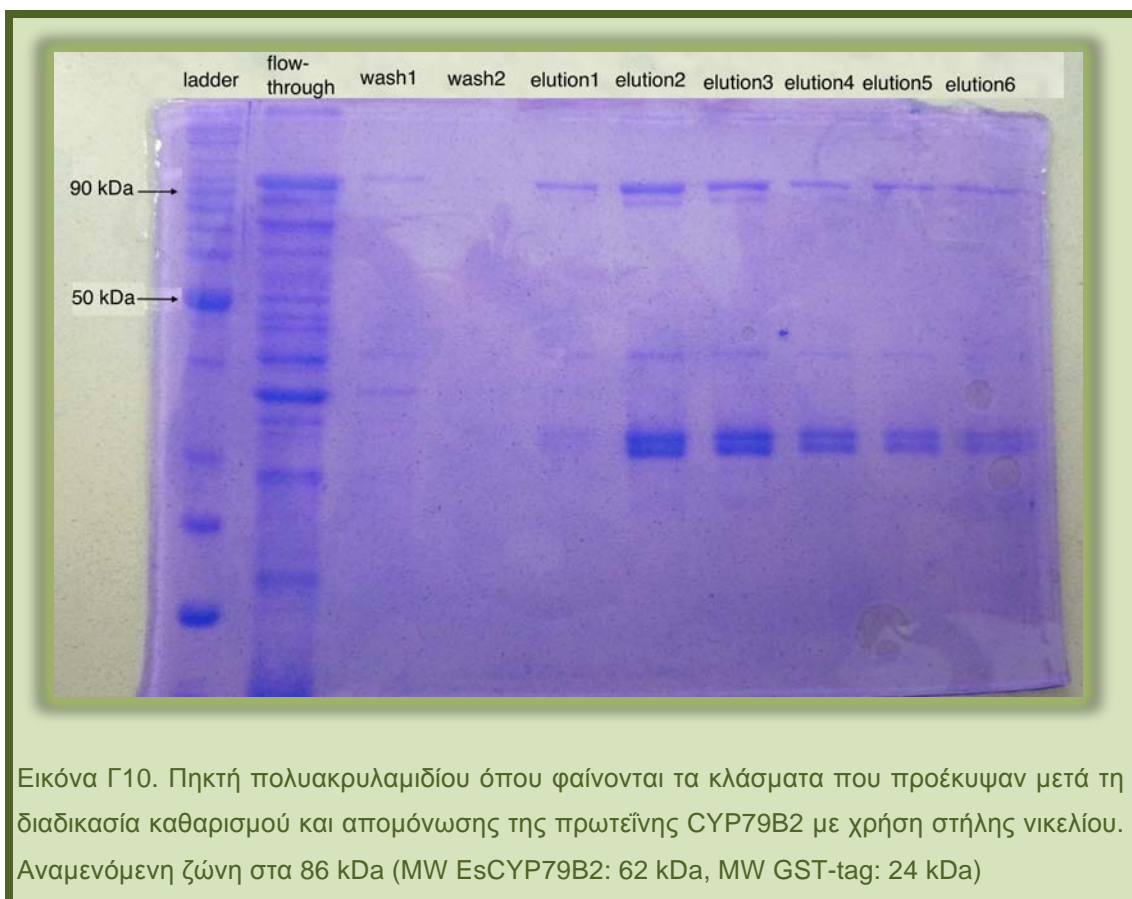


Εικόνα Γ9. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται ξεχωριστά για το διαλυτό τμήμα (soluble) και το ίζημα (pellet) τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (EsCYP79B2) με χρήση του φορέα pET49b στις ιδανικές συνθήκες που καθορίστηκαν μετά από τις δοκιμές (1mM IPTG, 28°C, 12 ώρες, 125 στροφές/λεπτό). Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa)

Για τον καθαρισμό και την απομόνωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η στήλη νικελίου Protino® Ni-NTA Agarose της Macherey Nagel και εφαρμόστηκε το

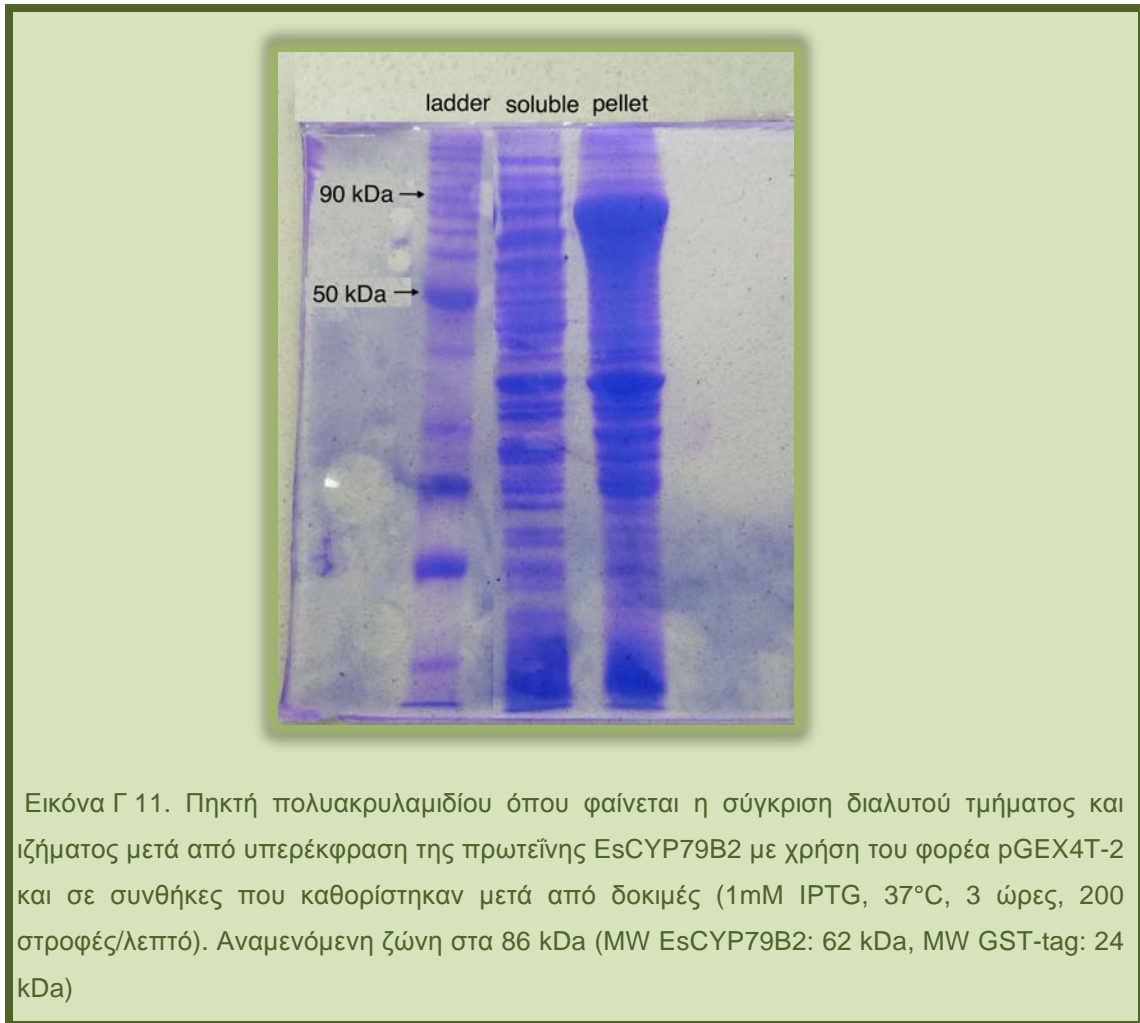


αντίστοιχο πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία για αποδιατακτικές συνθήκες (χρήση ουρίας). Στην εικόνα Γ10 φαίνονται τα διάφορα κλάσματα που προέκυψαν από τη διαδικασία.

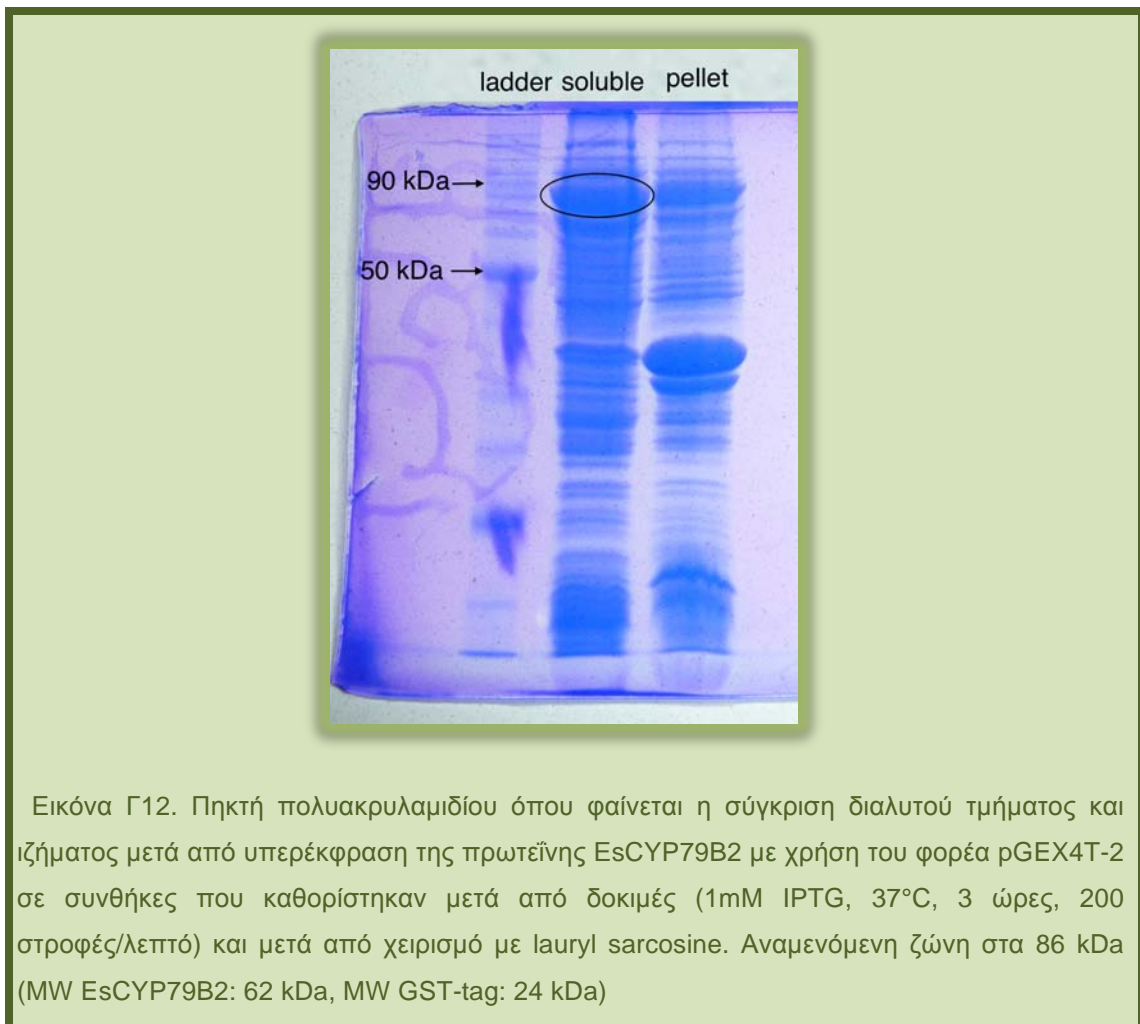


Εικόνα Γ10. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται τα κλάσματα που προέκυψαν μετά τη διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης CYP79B2 με χρήση στήλης νικελίου. Αναμενόμενη ζώνη στα 86 kDa (MW EsCYP79B2: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa)

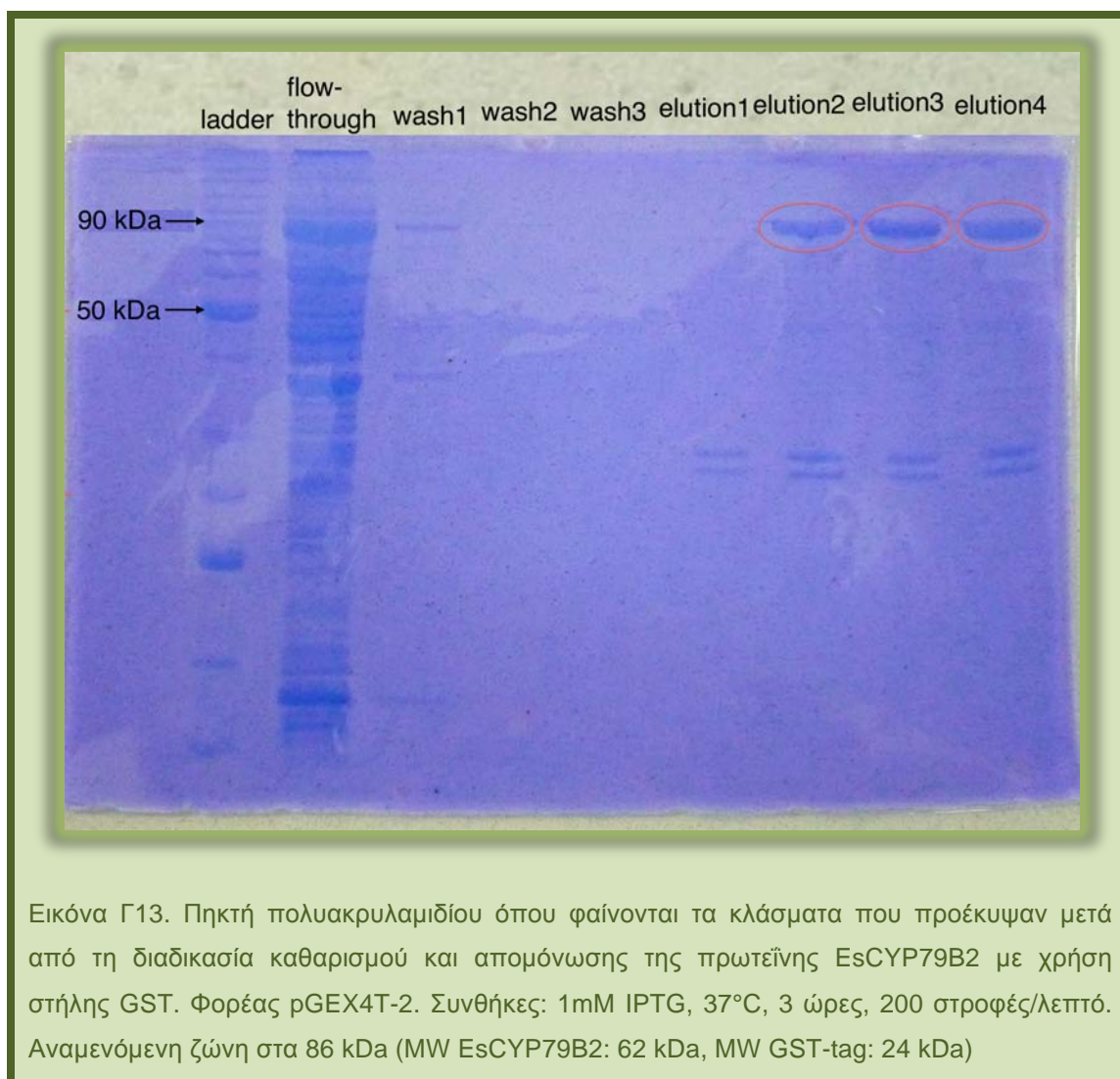
Το ίδιο γονίδιο κλωνοποιήθηκε και στον φορέα pGEX 4T-2. Δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες υπερέκφρασης και επιλέχθηκαν οι συνθήκες 37° C, 3 ώρες, 200 στροφές/λεπτό και 1 mM IPTG. Σε νέα καλλιέργεια, ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους και διαχωρισμός των διαλυτών από τις μη διαλυτές πρωτεΐνες με φυγοκέντρηση. Όπως φαίνεται στην εικόνα Γ11, η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει εντοπίζεται στο μη διαλυτό κλάσμα, προφανώς λόγω σχηματισμού σωματιδίων εγκλεισμού.



Για να αποφευχθεί ξανά η χρήση πρωτοκόλλου για αποδιατακτικές συνθήκες, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Frangioni (1993), όπου με τη χρήση lauryl sarcosine επιτυγχάνεται η διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών. Όπως φαίνεται στην εικόνα Γ12, η πρωτεΐνη πλέον εμφανίζεται και στο διαλυτό κλάσμα.



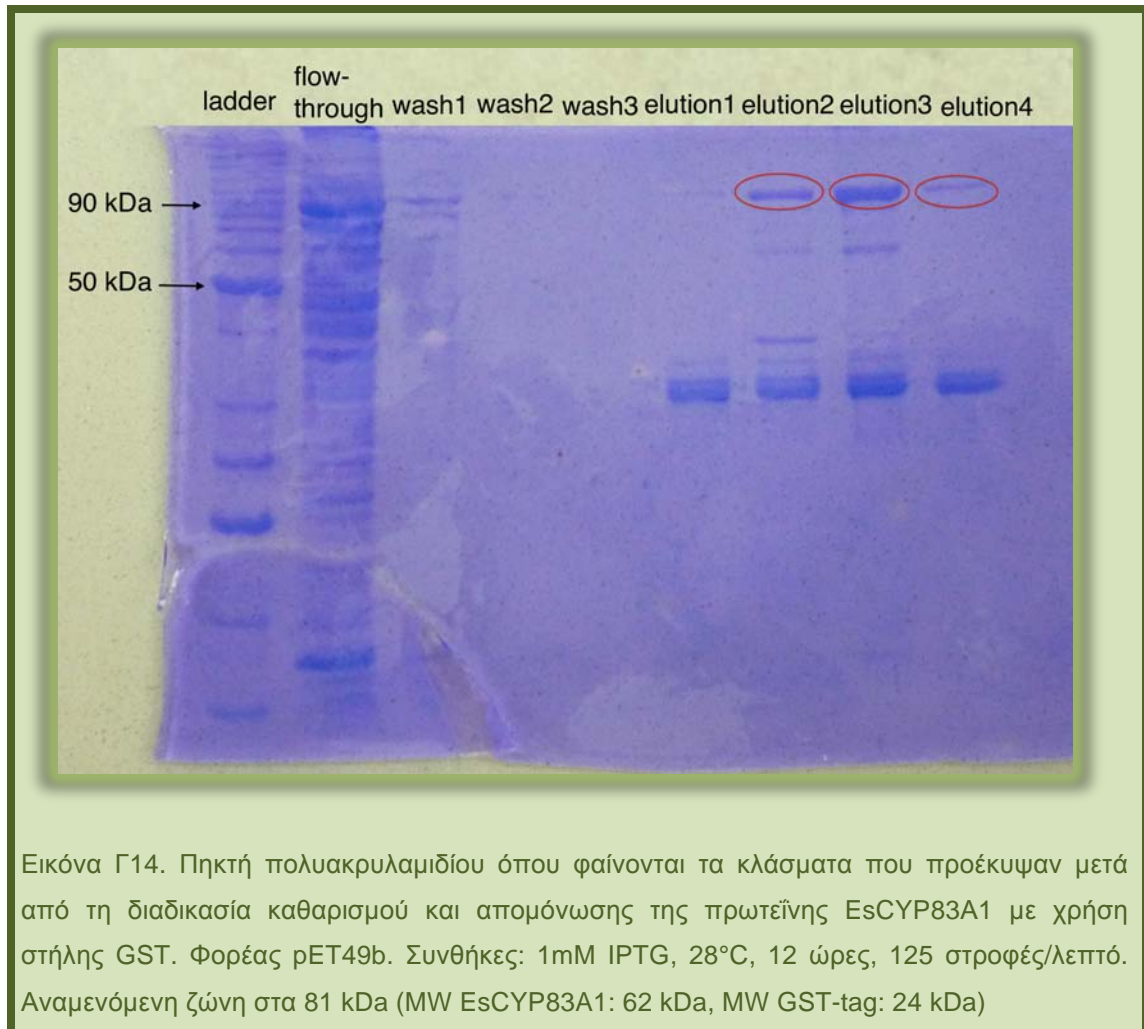
Για τον καθαρισμό και την απομόνωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η στήλη Protino® Glutathione Agarose 4B της Macherey Nagel. Στην εικόνα Γ13 φαίνονται τα διάφορα κλάσματα που προέκυψαν από τη διαδικασία.



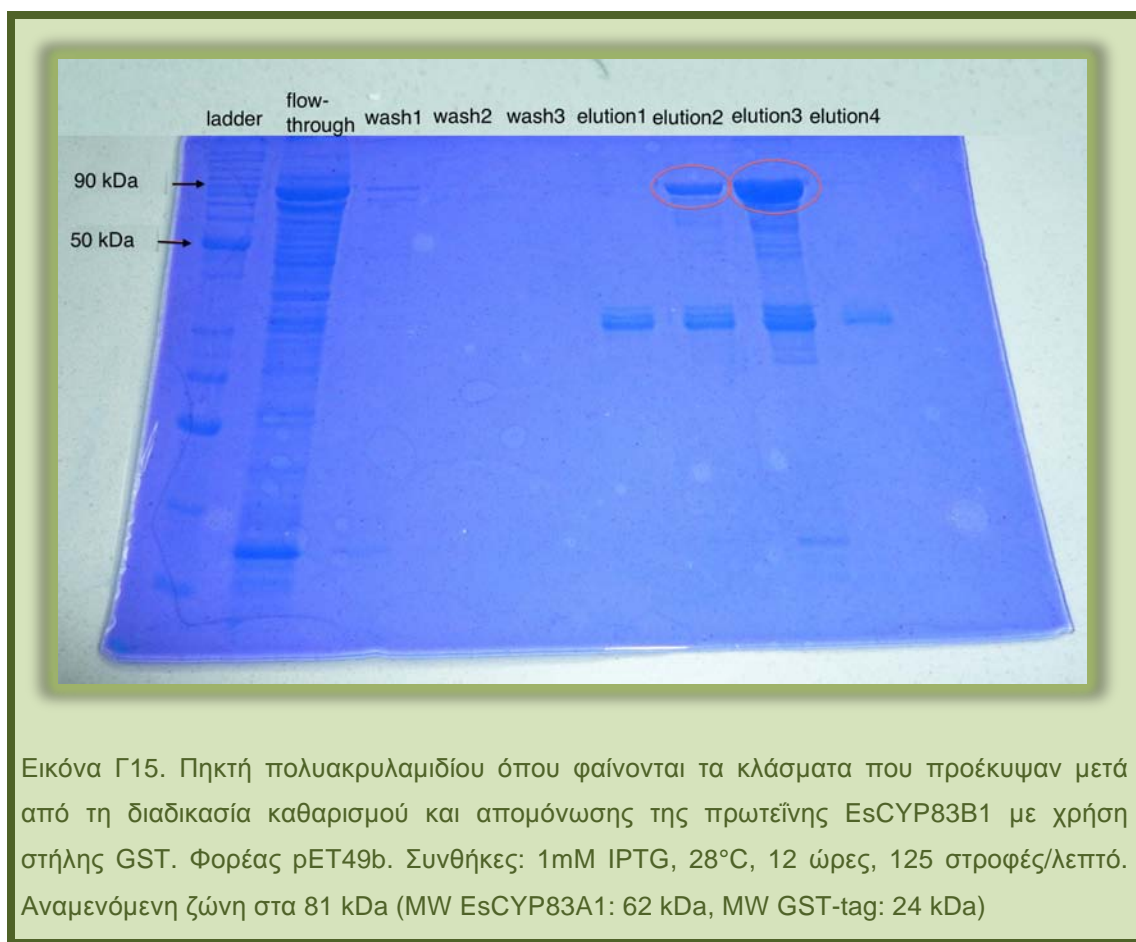
### 1.2.2. EsCYP83A1 και EsCYP83B1

Τα γονίδια *EsCYP83A1* και *EsCYP83B1* κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pET49b. Μετά από δοκιμές βρέθηκε ότι και οι δύο πρωτεΐνες υπερεκφράζονται στους 28° C, σε 12 ώρες, 125 στροφές/λεπτό και με συγκέντρωση IPTG 1 mM, αλλά εντοπίζονται στο ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση των λυμένων κυττάρων. Έτσι εφαρμόστηκε το πρωτόκολο Frangioni όπως αναφέρθηκε και παραπάνω και οι πρωτεΐνες εντοπίζονται πια στο διαλυτό τμήμα. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε η στήλη Protino® Glutathione Agarose 4B της Macherey Nagel. Τα

κλάσματα που προέκυψαν από τη διαδικασία φαίνονται στις εικόνες Γ14 για το EsCYP83A1 και Γ15 για το EsCYP83B1 .



Εικόνα Γ14. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου φαίνονται τα κλάσματα που προέκυψαν μετά από τη διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης EsCYP83A1 με χρήση στήλης GST. Φορέας pET49b. Συνθήκες: 1mM IPTG, 28°C, 12 ώρες, 125 στροφές/λεπτό. Αναμενόμενη ζώνη στα 81 kDa (MW EsCYP83A1: 62 kDa, MW GST-tag: 24 kDa)



## 2. Συζήτηση

Τα φυτά μοντέλα, και ανάμεσά τους με πρωτεύοντα ρόλο το *Arabidopsis thaliana*, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς και έχουν προσφέρει μια εξαιρετική βάση για την αναγνώριση και χαρακτηρισμό μοριακών μηχανισμών που διέπουν πλήθος αναπτυξιακών διαδικασιών και μεταβολικών διεργασιών. Αυτό έγινε δυνατό μέσω της εφαρμογής προηγμένων γενετικών προσεγγίσεων προωθητικής και ανάστροφης γενετικής. Παρόλα αυτά, η μετάφραση όλης αυτής της πληροφορίας σε άλλα είδη και κυρίως σε καλλιεργούμενα φυτά ακόμη παραμένει μια σημαντική πρόκληση. Μια στρατηγική προς αυτήν την κατεύθυνση αποτελεί η συγκριτική μελέτη γνωστών γενετικών στοιχείων ανάμεσα σε φυτά μοντέλα και καλλιεργούμενα είδη, ιδίως όταν τα δεύτερα είναι στενά συγγενικά

είδη των φυτών μοντέλων. Τα δεδομένα από τέτοιες συγκριτικές μελέτες υποδεικνύουν ότι τα διάφορα είδη φυτών έχουν βασικά ρυθμιστικά γονίδια, τα οποία έχουν αναπτυχθεί επανειλημμένως για την εμφάνιση παρόμοιων λειτουργιών και μορφολογιών. Η σύγκριση των γονιδιωμάτων σε συνδυασμό με δεδομένα γονιδιακής έκφρασης και μεταβολικών προτύπων ανάμεσα σε συγγενικά είδη μπορεί να οδηγήσει σε κατανόηση των αναπτυξιακών και μεταβολικών διαδικασιών που έχουν αναπτυχθεί στα φυτά.

Τα ΓΚΣ έχουν μελετηθεί εκτενώς στα πλαίσια της κλωνοποίησης βιοσυνθετικών τους γονιδίων και του λειτουργικού χαρακτηρισμού τους, αλλά και της χαρτογράφησης θέσεων ποσοτικών χαρακτήρων (QTL-Quantitative trait locus mapping) στο *Arabidopsis* (Kliebenstein et al., 2001a; Kliebenstein et al., 2001c; Compos de Quiros et al., 2000; Brown et al., 2003; Benderoth et al., 2006; Textor et al., 2007; Li et al., 2008). Ωστόσο, περιορισμένες πληροφορίες σε γονιδιακό, βιοχημικό και μεταβολομικό επίπεδο είναι διαθέσιμες για τη βιοσύνθεση των ΓΚΣ σε φυτά καλλιεργειών του γένους *Brassica*.

Σχετικές μελέτες QTL χαρτογράφησης έχουν γίνει στο *B.rapa* (Lou et al., 2008), το *B.napus* (Uzunova et al., 1995; Toroser et al., 1995; Howell et al., 2003) αλλά και το *B.juncea* (Cheung et al., 1998; Mahmood et al., 2003; Ramchiary et al., 2007; Bisht et al., 2009).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ένα οικονομικά σημαντικό καλλιεργούμενο φυτό, το οποίο συγχρόνως όμως έχει χαρακτηριστικά γονιδιώματος και φυσιολογίας (μέγεθος γονιδιώματος, κύκλος ζωής, συγγένεια με το φυτό μοντέλο *A.thaliana*) που το καθιστούν απολύτως κατάλληλο για τη μελέτη του στη μεταγονιδιωματική εποχή με τα σύγχρονα εργαλεία γονιδιωματικής, πρωτεομικής και μεταβολομικής που πλέον είναι διαθέσιμα στην επιστημονική κοινότητα. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτουν τα πρώτα στοιχεία γενετικού χαρακτηρισμού του φυτού, αφού έγινε για πρώτη φορά απομόνωση γονιδίων που εκφράζονται στο φυτό *Eruca sativa* και φαίνεται να σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των ΓΚΣ.

Με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής και δεδομένων από γονιδιακές βάσεις σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές στοχεύοντας σε αλληλουχία συγκεκριμένου γονιδίου ή οικογένειας γονιδίων κάθε φορά. Η απομόνωση των cDNA κλώνων με τα υποψήφια γονίδια και η αλληλούχισή τους έγινε σταδιακά και η *in silico* επεξεργασία των πληροφοριών που προέκυψαν οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για γονίδια που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων, κωδικοποιώντας είτε ένζυμα που εμπλέκονται σε αντιδράσεις των διαφόρων σταδίων της είτε μεταγραφικούς παράγοντες.

Για κάθε αλληλουχία που απομονώθηκε βρέθηκαν οι κατατεθειμένες αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομοιότητα με αυτή (πρόγραμμα BLAST, αλγόριθμος αναζήτησης blastn) και υπολογίστηκαν τα ποσοστά ομοιότητας βάσεων μεταξύ τους. Η ομοιότητα νουλεοτιδικής ακολουθίας που παρουσιάζουν οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν σε σχέση με τις αντίστοιχες ακολουθίες βιοσυνθετικών γονιδίων του *Arabidopsis thaliana* και άλλων φυτών της οικογένειας Brassicaceae είναι αρκετά υψηλή.

Μέσω της εφαρμογής MegAlign (πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών, μέθοδος ClustalW) οι μεταξύ τους ομοιότητες έγιναν και οπτικά αντιληπτές, αφού στην ομοπαράθεση αυτή εύκολα διακρίνονται οι περιοχές υψηλής συντήρησης. Φαίνεται πως τα γονίδια είναι αρκετά συντηρημένα με μικρές διαφοροποιήσεις στην ακολουθία του DNA και έχουν αναγνωστικό πλαίσιο παραπλήσιου αριθμού βάσεων.

Μία επιπλέον ισχυρή ένδειξη για την ταυτότητα των αλληλουχιών που απομονώθηκαν υπάρχει και από τη φυλογενετική ανάλυση των αμινοξικών τους ακολουθιών. Από τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν για κάθε οικογένεια γονιδίων (πρόγραμμα CLC, μέθοδος neighbor-joining) φαίνεται η ομαδοποίηση των γονιδίων ανά οικογένειες και οι μεταξύ τους αποστάσεις.

Απομένει βέβαια να γίνει ο χαρακτηρισμός και η επιβεβαίωση της λειτουργίας των γονιδίων που απομονώθηκαν, είτε με *in vitro* επιβεβαίωση της ενζυμικής τους δράσης είτε με υπερέκφραση των γονιδίων σε κατάλληλα μεταλλάγματα *Arabidopsis* και άλλων *Brassica* φυτών όπως έχει πρόσφατα δειχθεί για άλλα φυτά.



Για παράδειγμα, στο *Brassica oleracea*, το *BoGSL-ELONG*, ένα γονίδιο επιμήκυνσης της πλευρικής αλυσίδας της μεθειονίνης κλωνοποιήθηκε βασισμένο στις πληροφορίες για την αλληλουχία του *Arabidopsis* και χαρακτηρίστηκε λειτουργικά χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση του μηχανισμού αποσιώπησης RNA (RNA interference, RNAi) στο *Brassica napus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το γονίδιο εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ με 4 και 5 άτομα άνθρακα στα είδη του γένους *Brassica* (Li & Quiros, 2002, Liu et al., 2010). Ένα ακόμη γονίδιο, το *BoGSL-ALK*, το οποίο αρχικά κλωνοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της κλωνοποίησης θέσης, βασισμένη σε έναν στενά συνδεδεμένο δείκτη SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism marker) στο *B. Oleracea* (Li & Quiros, 2003), χαρακτηρίστηκε λειτουργικά με υπερέκφραση στο *Arabidopsis* και με τη χρήση του μηχανισμού RNAi στο *B.napus* (Li & Quiros, 2003, Liu et al., 2012). Πρόσφατα αναγνωρίστηκαν 4 ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα MYB28 στο φυτό *Brassica juncea* (*BjuMYB28-1,-2,-3,-4*). Η λειτουργικότητά τους ελέγχθηκε με ανάλυση λειτουργικής συμπληρωματικότητας χρησιμοποιώντας μεταλλάγματα *Arabidopsis* με σίγηση στο συγκεκριμένο γονίδιο, αλλά και με υπερέκφραση των γονιδίων σε σειρές *Arabidopsis* αγρίου τύπου (Augustine et al., 2013). Επίσης, πρόσφατα έχει γίνει χαρακτηρισμός του *BoMYB29*, γονιδίου που απομονώθηκε στο *B.oleracea* var. *Acephala* και κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα MYB29 (Araki et al., 2013). Και σε αυτήν την περίπτωση έγινε υπερέκφραση σε φυτά *Arabidopsis* αγρίου τύπου, αλλά και έκφραση στο μετάλλαγμα *myb28myb29*, στο οποίο έχει γίνει σίγηση των δύο γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων MYB28 και MYB29.

#### Οικογένεια MAM

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν γονίδια που κωδικοποιούν συνθάσες του μεθυλθειοαλκυλμηλικού οξέος και καταλύουν αντιδράσεις του πρώτου σταδίου της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ (επιμήκυνση αλυσίδας μεθειονίνης). Στο *Arabidopsis thaliana* έχει εξακριβωθεί η ακριβής λειτουργία του καθενός από τα τρία MAM ένζυμα που έχουν απομονωθεί (MAM1, MAM2, MAM3), που έχει να κάνει με τον κύκλο στην επιμήκυνση της αλυσίδας της μεθειονίνης στον οποίο συμμετέχει το καθένα.

Γονίδια *MAM* που απομονώθηκαν από το *Brassica rapa* εμφανίζουν ομοιότητα 78-87% με τα ορθόλογα του *Arabidopsis thaliana*, ωστόσο δεν έχουν χαρακτηριστεί έτσι ώστε να διευκρινιστεί για το καθένα ξεχωριστά ποιο είναι ισοδύναμο του *MAM1*, *MAM2* και *MAM3* (Zang et al., 2009).

Οι δύο αλληλουχίες που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία και σχετίζονται με τα γονίδια *MAM* του *Arabidopsis* και του *Brassica rapa* έχουν ομοιότητα 84-92% με αυτά. Από τη νουκλεοτιδική ακολουθία δεν μπορούμε να κάνουμε αντιστοίχιση με κάποιο συγκεκριμένο *MAM* γονίδιο από αυτά που υπάρχουν στο *Arabidopsis thaliana*. Ονομάστηκαν *EsMAM-1* και *EsMAM-2* κατά αύξοντα αριθμό. Τα ποσοστά ομοιότητας με τα χαρακτηρισμένα *MAM* γονίδια είναι παρόμοια και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα μέσω λειτουργικής έκφρασης των γονιδίων σε βακτηριακούς φορείς και επιβεβαίωσης της ταυτότητάς τους με μελέτες της ενζυματικής δραστηριότητας των ενζύμων που κωδικοποιούν. Ένας άλλος τρόπος θα μπορούσε να είναι η ετερόλογη έκφραση τους σε φυτά *Arabidopsis* για να διαπιστωθεί η ικανότητα συμπληρωματικότητας της δράσης τους στα αντίστοιχα μεταλλάγματα φυτών *Arabidopsis* τα οποία είναι διαθέσιμα στην επιστημονική κοινότητα. Με δεδομένο όμως το γεγονός ότι γλυκοσινολικά οξέα μεγάλης αλυσίδας δεν απαντώνται στη ρόκα, είναι αναμενόμενο να μην υπάρχουν ορθόλογα γονίδια του *AtMAM3*.

Από το φυλογενετικό δέντρο φαίνεται πως και οι δύο πρωτεϊνικές ακολουθίες ομαδοποιούνται φυλογενετικά στην κατηγορία των *MAM* συνθασών. Ειδικότερα, και οι δύο συσχετίζονται περισσότερο με τη μεθυλθειοαλκυλμηλική συνθάση από το *Brassica rapa* (GS-elong).

#### Οικογένειες *CYP*

Πρόκειται για τις οικογένειες *CYP79* και *CYP83*, που κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που συμμετέχουν στην πρώτη και τη δεύτερη αντίδραση του δεύτερου σταδίου της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ (σχηματισμός γλυκοσινολικού δακτυλίου). Απομονώθηκαν τρεις αλληλουχίες πλήρους μήκους που φαίνεται να ανήκουν στην οικογένεια *CYP79* και ονομάστηκαν *EsCYP79F1*, *EsCYP79B2* και

*EsCYP79B3*, ανάλογα με τις αντίστοιχες ονομασίες των γονιδίων στο *Arabidopsis thaliana*. Η ομοιότητα κάθε γονιδίου με το αντίστοιχό του στο *Arabidopsis thaliana* φτάνει το 90%, ενώ συγκρινόμενα με αντίστοιχα γονίδια φυτών του γένους *Brassica* το ποσοστό αγγίζει ακόμα και το 94%.

Από την οικογένεια *CYP83* απομονώθηκαν δύο γονίδια (αλληλουχίες πλήρους μήκους) που θεωρούμε πως κωδικοποιούν τα ένζυμα *CYP83A1* και *CYP83B1*. Τα ονομάσαμε *EsCYP83A1* και *EsCYP83B1* από τις αντίστοιχες ονομασίες των γονιδίων στο *Arabidopsis thaliana*. Η ομοιότητά του καθενός με αυτά είναι 87% και 89% αντίστοιχα. Τα ποσοστά αυξάνονται στη σύγκριση με τα αντίστοιχα γονίδια του *Brassica rapa*, όπως άλλωστε είδαμε να συμβαίνει και με τα γονίδια της οικογένειας *CYP79*. Συγκεκριμένα, το *EsCYP83A1* έχει ομοιότητα 95% με το *CYP83A1* του *Brassica rapa*, ενώ για το *EsCYP83B1* το ποσοστό ομοιότητας με το *BrCYP83B1* είναι 91%.

Στα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν φαίνεται η ομαδοποίηση των πρωτεϊνικών ακολουθιών σε κλάδους, όπου διακρίνονται τα διαφορετικά μέλη της κάθε οικογένειας. Η εικόνα αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνει την υπόθεση για την ταυτότητα των γονιδίων που απομονώθηκαν. Παρατηρείται πως τα γονίδια από τα φυτά του γένους *Brassica* συσχετίζονται περισσότερο μεταξύ τους και αποκλίνουν από αυτά του *Arabidopsis thaliana*. Τα γονίδια που απομονώθηκαν από το *Eruca sativa* δείχνουν να συσχετίζονται περισσότερο με τα αντίστοιχα γονίδια των *Brassica* φυτών.

Τρία από τα γονίδια (*EsCYP79B2*, *EsCYP83A1* και *EsCYP83B1*) κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης και απομονώθηκε η αντίστοιχη πρωτεΐνη, γεγονός που πιστοποιεί τη λειτουργικότητα των συγκεκριμένων γονιδίων. Σε κάθε περίπτωση, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που κατά προσέγγιση υπολογίζεται από την εικόνα της πηκτής του πολυακρυλαμιδίου φαίνεται συμφωνεί με αυτό που προβλέπεται βάσει της ακολουθίας της.

### Γονίδιο *SUR1*

Στο τρίτο βήμα της βιοσύνθεσης του γλυκοσινολικού δακτυλίου συμμετέχει μια λυάση που διασπά το δεσμό C-S και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SUR1*. Από την

απουσία ΓΚΣ σε φυτά *Arabidopsis* με σίγηση στο γονίδιο αυτό, φαίνεται πως η λειτουργία του είναι απαραίτητη στη βιοσύνθεσή τους και συνιστά μία ξεχωριστή οικογένεια γονιδίων (Mikkelsen et al., 2004). Απομονώθηκε ένα γονίδιο που θεωρούμε πως κωδικοποιεί το συγκεκριμένο ένζυμο, εφόσον η ομοιότητά του με αντίστοιχες αλληλουχίες γονιδίων από το *Arabidopsis thaliana*, το *Arabidopsis lyrata* και το *Brassica rapa* κυμαίνεται από 89 έως 94%. Επίσης, στο φυλογενετικό δέντρο η πρωτεϊνική ακολουθία φαίνεται να ομαδοποιείται φυλογενετικά στην κατηγορία των C-S λυασών.

#### Οικογένεια *FMOGSox*

Έχουν αναγνωρισθεί και χαρακτηριστεί πέντε γονίδια που κωδικοποιούν μονοξυγενάσες FMO που εμπλέκονται στο τρίτο στάδιο βιοσύνθεσης των αλειφατικών ΓΚΣ στο *A.thaliana* και καταλύουν την αντίδραση S-οξυγόνωσης για τη μετατροπή από MT (methylthioalkyl) σε MS (methylsulfinylalkyl) ΓΚΣ (Li et al., 2008). Σε προϊόντα υδρόλυσης των τελευταίων, όπως η σουλφοραφάνη που προέρχεται από το 4-methylsulfinylbutyl ΓΚΣ (4-MSB) και ισοθειοκυανικές ενώσεις που προέρχονται από τα 7-methylsulfinylheptyl (7-MSH) και 8-methylsulfinyloctyl (8-MSO) ΓΚΣ έχουν αποδοθεί πιθανές ιδιότητες πρόληψης του καρκίνου λόγω της ισχυρής επαγωγής αποτοξικοποιητικών ενζύμων της φάσης II που προκαλούν (Zhang et al., 1992; Rose et al., 2000), γι'αυτό και υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τα συγκεκριμένα γονίδια. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις αυτές έχουν σχετιστεί με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκίνου όπως καρκίνου του στομάχου (Fahey et al., 2002), καρκίνου του στήθους (Rose et al., 2005), και καρκίνου του δέρματος (Talalay et al., 2007).

Σύμφωνα με τις μελέτες στις οποίες ταυτοποιήθηκαν τα *FMO<sub>GS-OX1-5</sub>* και με φυλογενετική ανάλυση που έγινε, οι φυτικές φλαβινικές μονοξυγενάσες (flavin monooxygenases, FMO) μπορούν να χωριστούν σε τρεις κλάδους (Hansen et al., 2007). Ο ένας απ'αυτούς φαίνεται να περιλαμβάνει αποκλειστικά FMOs που καταλύουν την αντίδραση S-οξυγόνωσης και τα *FMO<sub>GS-OX1-5</sub>* συνιστούν μια ομάδα γονιδίων σε έναν υποκλάδο που φαίνεται να περιλαμβάνει μόνο γονίδια από σταυρανθή φυτά. Στη συγκριτική γονιδιωματική έρευνα που έγινε στο *Brassica rapa*

αναγνωρίστηκαν δύο από τα μέλη της οικογένειας, τα *FMO<sub>GS-OX1</sub>* και *FMO<sub>GS-OX5</sub>*, ενώ δε βρέθηκαν τα *FMO<sub>GS-OX2-4</sub>* (Zang et al., 2009). Η πρώτη αλληλουχία που απομονώθηκε στην παρούσα εργασία είναι μερικού μήκους, και εμφανίζει ομοιότητα με τα *FMO<sub>GS-OX1</sub>* του *Arabidopsis thaliana* και του *Brassica rapa*, σε ποσοστό 84% και 92% αντίστοιχα. Η ομοιότητα της δεύτερης, επίσης μερικού μήκους αλληλουχίας με τα *FMO<sub>GS-OX5</sub>* είναι 84% και 94% αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με την εικόνα του φυλογενετικού δέντρου που δείχνει τις αλληλουχίες να ομαδοποιούνται στη συγκεκριμένη οικογένεια των FMO μονοξυγενασών οδηγούν στη θεώρηση πως πρόκειται για *FMO<sub>GS-OX</sub>* γονίδια, αλλά η αποκάλυψη της πλήρους αλληλουχίας και ο χαρακτηρισμός θα επιβεβαιώσουν και θα πιστοποιήσουν τις αντιστοιχίσεις με τα συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας.

#### Οικογένεια MYB

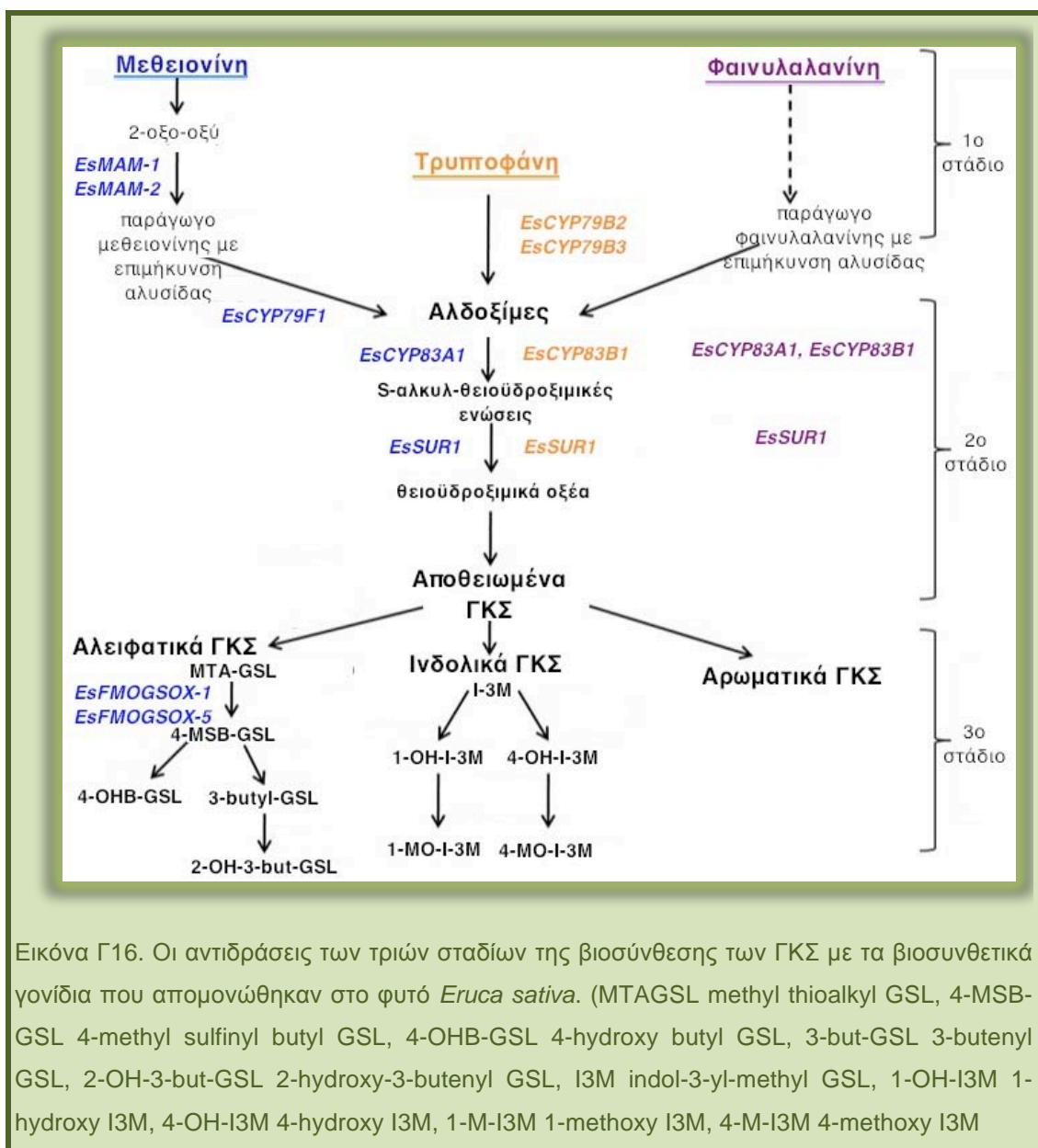
Οι μεταγραφικοί παράγοντες AtMYB34, AtMYB51, και AtMYB122 ρυθμίζουν την παραγωγή ινδολικών ΓΚΣ σε ρίζες και φύλλα ροζέτας τελικού σταδίου, μέσω ρύθμισης των γονιδίων *CYP79B2*, *CYP79B3*, και *CYP83B1*, που μεταβολίζουν την τρυπτοφάνη (Trp) (Celenza et al. 2005; Gigolashvili et al. 2007; Dubos et al. 2010). Στο γονιδίωμα του *Brassica rapa* αναγνωρίστηκαν τρία αντίγραφα του *MYB34* και τέσσερα του *MYB51* (Zang et al., 2009). Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής απομονώθηκαν τρεις πλήρους μήκους αλληλουχίες θεωρώντας πως πρόκειται για *MYB34* γονίδια και δύο επίσης πλήρους μήκους αλληλουχίες που θεωρήθηκαν ως γονίδια *MYB51*. Οι ομοιοτήτές τους με τα γονίδια του *Brassica rapa* είναι μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές που παρουσιάζουν συγκρινόμενες με τα γονίδια του *Arabidopsis*.

#### Συμπερασματικά-Μελλοντική έρευνα

Συνολικά απομονώθηκαν 15 EST αλληλουχίες, με 12 από αυτές να είναι πλήρους μήκους, που σχετίζονται με γονίδια της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ στη ρόκα. Πρόκειται για τα βιοσυνθετικά γονίδια *MAM*, *CYP79F1*, *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP83A1*, *CYP83B1*, *SUR1*, *FMOGS<sub>OX</sub>*, και τους μεταγραφικούς παράγοντες *MYB34* και *MYB51*.

Η ομοιότητα βάσεων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που απομονώθηκαν και των αντίστοιχων γονιδίων από άλλα φυτά κυμάνθηκε σε ποσοστά από 82% μέχρι και 95%. Είναι σαφώς αυξημένη όταν οι συγκρίσεις γίνονται με γονίδια φυτών του γένους *Brassica*. Στις μελέτες συγκριτικής γονιδιωματικής με το *A.thaliana* που οδήγησαν στην αναγνώριση μεγάλου αριθμού γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων στο *Brassica rapa* (Zang et al., 2009; Wang et al., 2011) η ομοιότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε σχέση με τα γονίδια του *A.thaliana* κυμάνθηκε από 59%-91%. Πρόσφατα, αναγνωρίστηκε μεγάλος αριθμός γονιδίων που φαίνονται να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ σε φυτά *Brassica oleracea* var. *acephala* (Araki et al., 2013).

Στην εικόνα Γ16 φαίνονται τα βιοσυνθετικά γονίδια των ΓΚΣ που απομονώθηκαν στο φυτό *Eruca sativa* και οι αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν τα ένζυμα που κωδικοποιούν.



Εικόνα Γ16. Οι αντιδράσεις των τριών σταδίων της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ με τα βιοσυνθετικά γονίδια που απομονώθηκαν στο φυτό *Eruca sativa*. (MTAGSL methyl thioalkyl GSL, 4-MSB-GSL 4-methyl sulfinyl butyl GSL, 4-OHB-GSL 4-hydroxy butyl GSL, 3-but-GSL 3-butenyl GSL, 2-OH-3-but-GSL 2-hydroxy-3-butenyl GSL, I3M indol-3-yl-methyl GSL, 1-OH-I3M 1-hydroxy I3M, 4-OH-I3M 4-hydroxy I3M, 1-M-I3M 1-methoxy I3M, 4-M-I3M 4-methoxy I3M)

Η απομόνωση γονιδίων του γλυκοσινολικού μονοπατιού στο φυτό *Eruca sativa* είναι ένα πρώτο βήμα σε μια προοπτική μεταβολικής μηχανικής των ΓΚΣ στο φυτό αυτό, σε μια στρατηγική παρόμοια με αυτή που προτείνεται και για άλλα φυτά όπως το *Brassica rapa* (Zang et al., 2009). Αν υποθεθεί ότι συνολικά η βιοσυνθετική οδός και τα ρυθμιστικά δίκτυα είναι ανάλογα με εκείνα του *Arabidopsis*, το γλυκοσινολικό προφίλ θα μπορούσε να αλλάξει ποσοτικά και ποιοτικά. Μεταβάλλοντας το επίπεδο των ενδογενών CYP79s και την εισαγωγή εξωγενών CYP79s μπορεί να καταστήσει δυνατή την παραγωγή ειδικά σχεδιασμένων γλυκοσινολικών προφίλ, μιας και τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για τους

διαφορετικούς τύπους ΓΚΣ. Επίσης, η συγκέντρωση των ΓΚΣ θα μπορούσε να μεταβληθεί με επέμβαση στο στάδιο τροποποίησης της πλευρικής αλυσίδας, επειδή η βιοσύνθεση των ΓΚΣ φαίνεται να ρυθμίζεται μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης στο *Arabidopsis* (Kliebenstein et al., 2001). Επιπρόσθετα, αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση των ΓΚΣ, συμπεριλαμβανομένων των μεταγραφικών παραγόντων MYB, θα παρέχει όχι μόνο πολύ αποτελεσματικό εργαλείο μεταβολικής μηχανικής για το χειρισμό τόσο του περιεχομένου όσο και της σύνθεσης των ΓΚΣ σε καλλιεργούμενα φυτά, αλλά και τα γενετικά εργαλεία για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα φυτά ελέγχουν την παραγωγή αυτών των ενώσεων. Στο φυτό *Nasturtium officinale*, που ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae έχει ήδη αναπτυχθεί μέθοδος γενετικής τροποποίησης μέσω του *Agrobacterium rhizogenes* και του σχηματισμού διαγονιδιακών θυσσανωδών ριζών (Park et al., 2011), ενώ πρόσφατα επιτεύχθηκε η γενετική τροποποίηση και της ρόκας μέσω *Agrobacterium tumefaciens* (Slater et al., 2011). Η προσέγγιση αυτή αποτελεί μια αξιόλογη προσπάθεια σε μια μελλοντική στρατηγική μεταβολικής μηχανικής, με σκοπό την παραγωγή φυτών υψηλής προστιθέμενης αξίας, δεδομένου του ότι τα ΓΚΣ αποτελούν πρόδρομα μόρια πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων.

Επίσης, οι αλληλουχίες (ESTs) που απομονώθηκαν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών. Οι μοριακοί δείκτες είναι αποτελεσματικά και αξιόπιστα εργαλεία που μειώνουν το χρόνο και το κόστος και μπορούν να ενισχύσουν την ικανότητα της συμβατικής βελτίωσης να στοχεύει προς καλύτερα αγρονομικά, ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των καλλιεργειών χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις. Στην κλασική βελτίωση χρησιμοποιούνται μορφολογικά χαρακτηριστικά, ωστόσο υπάρχουν πρακτικές δυσκολίες στη χρήση τους. Με την πρόοδο που έχει γίνει στα εργαλεία και τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιούνται σήμερα διαφορετικοί τύποι DNA μοριακών δεικτών. Βασίζονται είτε σε τεχνικές υβριδοποίησης όπως οι δείκτες RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ή στην τεχνική PCR όπως οι δείκτες SSR (Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region), SRAP (Sequence-related amplified



polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) και έχουν χρησιμοποιηθεί στη βελτίωση φυτών για γονιδιακή χαρτογράφηση, κλωνοποίηση, κατασκευή γονιδιακών χαρτών και επιλογή με τη βοήθεια δεικτών (Hirani et al., 2012).

Παρόμοια με τα αγρονομικά χαρακτηριστικά, την αντίσταση στις ασθένειες και την απόδοση, ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως η περιεκτικότητα σε ΓΚΣ μπορούν να χειριστούν γενετικά. Αυτό μπορεί να γίνει με υβριδισμό μεταξύ ειδών, ακολουθούμενο από επιλογή με τη βοήθεια μοριακών δεικτών για μετακίνηση ή αντικατάσταση ενός ενδογενούς γονιδίου. Φυσικές μεταλλάξεις σε γονίδια βιοσύνθεσης των ΓΚΣ που έχουν εντοπιστεί σε φυτά *B.oleracea* (Li & Quiros, 2002; 2003) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών και χειρισμό του γλυκοσινολικού προφίλ σε φυτά του γένους *Brassica* με αυτόν τον τρόπο. Έχει αναφερθεί σύνδεση SSR δεικτών με υποψήφιες γονιδιακές περιοχές βιοσυνθετικών γονιδίων των ΓΚΣ στο *B.napus* με πιθανή δυνατότητα εφαρμογής τους στην επιλογή με τη βοήθεια μοριακών δεικτών για τα ΓΚΣ (Hasan et al., 2008). Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί ανάπτυξη SNP δεικτών στην περίπτωση του *Brassica rapa* (Li et al., 2009).

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός γονιδίων από τη ρόκα μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά με τις πληροφορίες από την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων του *B.rapa* και του *Arabidopsis* για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών και να επισπεύσει τη διαδικασία επιλογής με τη βοήθεια μοριακών δεικτών στα ΓΚΣ, με σκοπό για παράδειγμα την αύξηση των ευεργετικών GRA και GER στα σταυρανή λαχανικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ.

1<sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑ ΘΡΕΨΗΣ

## **Εισαγωγικά**

Οι φυσιολογικές αποκρίσεις των φυτών καθορίζονται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την κατάσταση θρέψης σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων, έτσι όπως έχει περιγραφεί στις προηγούμενες ενότητες, περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση αζώτου και θείου, δύο πολύ βασικών θρεπτικών στοιχείων των φυτών. Επομένως, είναι αναμενόμενο τα επίπεδα λίπανσης των φυτών να έχουν επίδραση στο μεταβολικό πρότυπο των ΓΚΣ στα φυτά. Στην παρούσα διατριβή υιοθετήθηκε μια προσέγγιση λειτουργικής ανάλυσης των βιοσυνθετικών γονιδίων και των ρυθμιστικών γονιδίων της βιοσύνθεσης των ΓΚΣ που απομονώθηκαν από τη ρόκα με την ταυτόχρονη μελέτη της επίδρασης της λίπανσης τόσο στο μεταγραφικό πρότυπο των γονιδίων όσο και στη σύσταση και συγκέντρωση των μεταβολιτών. Με συνδυασμένη ανάλυση μεταγραφικών και μεταβολικών αποκρίσεων μπορεί να αξιολογηθεί η επίδραση της ανεπάρκειας θρεπτικών στοιχείων στα διαφορετικά επίπεδα του φυτικού μεταβολισμού. Ανάλυση συσχέτισης μεταγραφικών και μεταβολικών δεδομένων συντελεί στην ταυτοποίηση του ρόλου των γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο μεταβολικό περιβάλλον. Ωστόσο η επίδραση και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων είναι ισχυρή, γι' αυτό χρειάζεται μείωση των περιβαλλοντικών διαταραχών στο ελάχιστο, με καλλιέργεια των υπό μελέτη φυτών σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (Schlüter et al., 2012). Το πειραματικό σχήμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, με την υδροπονική καλλιέργεια φυτών ρόκας για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα σε ελεγχόμενο θάλαμο ανάπτυξης φυτών, το οποίο όμως ανταποκρινόταν σε χρόνους πραγματικής καλλιέργειας του φυτού, εξασφάλισε στο μέγιστο δυνατό βαθμό, την μικρότερη επίδραση άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων. Φυτά ρόκας αναπτύχθηκαν υπό τέσσερα διαφορετικά σχήματα λίπανσης αζώτου και θείου. Στην πρώτη μεταχείριση εφαρμόστηκε θρεπτικό διάλυμα που ήταν πλήρες σε άζωτο και θείο (N+/S+), στη δεύτερη διάλυμα με πλήρες θείο αλλά μειωμένο άζωτο (N-/S+), στην τρίτη διάλυμα με πλήρες άζωτο αλλά μειωμένο θείο (N+/S-), και στην τέταρτη μεταχείριση εφαρμόστηκε διάλυμα με μειωμένο άζωτο και θείο (N-/S-). Η μελέτη αφορούσε τόσο υπέργειους ιστούς/φύλλα (μέχρι το στάδιο της πλήρους βλαστητικής ανάπτυξης των φυτών για 35 ημέρες) όσο και ιστούς ρίζας. Τα φύλλα

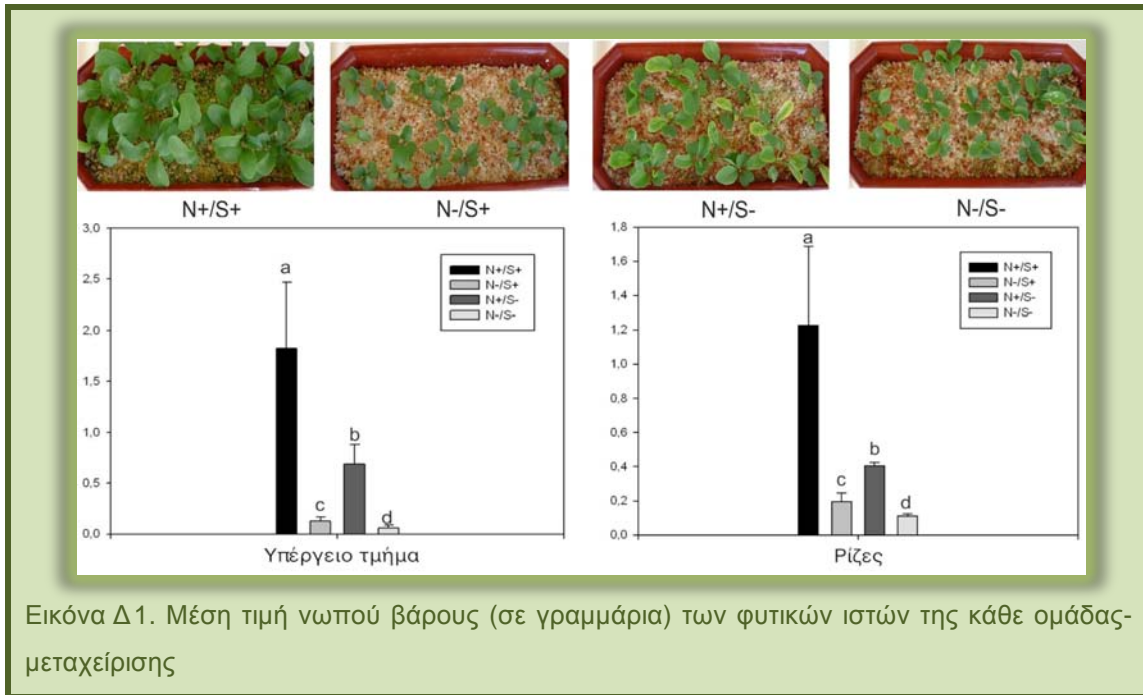
της ρόκας είναι το εμπορικά σημαντικό τμήμα του φυτού ενώ το ριζικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη των δύο θρεπτικών στοιχείων. Η λίπανση που εφαρμόστηκε είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συνθηκών ανεπάρκειας μεγάλης διάρκειας καθώς τα φυτά αναπτύχθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα με ελλειματική λίπανση αζώτου και θείου. Οι μεταχειρίσεις αυτές συγκρίθηκαν με τη μεταχείριση επαρκούς λίπανσης αζώτου και θείου που θεωρήθηκε ως η μεταχείριση ελέγχου.

## **1. Επίδραση της παροχής N και S στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των ΓΚΣ**

Πρώτος στόχος ήταν η μελέτη της έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων σε φύλλα και ρίζες των φυτών των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Για τη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής PCR (real-time). Σχεδιάστηκαν τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών για το κάθε γονίδιο, με μήκος εκκινητή περίπου 150 βάσεις. Αρχικά, κάθε ζεύγος ελέγχθηκε με συμβατική PCR για να πιστοποιηθεί ότι είναι λειτουργικό και ότι δίνει ένα μόνο προϊόν στο επιθυμητό μέγεθος, απουσία διμερών των εκκινητών ή άλλων μη ειδικών προϊόντων. Σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών για τα γονίδια *EsMAM-1*, *EsCYP79F1*, *EsCYP79B2*, *EsCYP79B3*, *EsCYP83A1*, *EsCYP83B1*, *EsSUR1*, *EsFMOGS<sub>OX-5</sub>*, *EsMYB34-1* και *EsMYB51-1*. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στο παράρτημα II.

### **1.1. Αποτελέσματα**

Κατά τη συλλογή των φυτών έγινε μέτρηση του βάρους υπέργειου και υπόγειου τμήματος κάθε φυτού. Στην εικόνα Δ1 φαίνεται ο μέσος όρος νωπού βάρους ξεχωριστά για το υπέργειο και υπόγειο τμήμα της κάθε ομάδας-μεταχείρισης .



Εικόνα Δ1. Μέση τιμή νωπού βάρους (σε γραμμάρια) των φυτικών ιστών της κάθε ομάδας-μεταχείρισης

Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA από όλα τα δείγματα (N+/S+ φύλλα, N-/S+ φύλλα, N+/S- φύλλα, N-/S- φύλλα, N+/S+ ρίζες, N-/S+ ρίζες, N+/S- ρίζες, N-/S- ρίζες) και κατασκευή αλυσίδων cDNA. Στα δείγματα cDNA της κάθε μεταχείρισης έγινε κανονικοποίηση, έτσι ώστε η ίδια συγκέντρωση cDNA να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν παράλληλες αντιδράσεις real-time PCR με εκμαγείο σε κάθε αντίδραση το διαφορετικό cDNA και χρησιμοποιώντας εκκινητές εξειδικευμένους για το γονίδιο της ουβικιτίνης. Με βάση το Ct (threshold cycle) που προέκυψε για κάθε δείγμα cDNA, υπολογίστηκαν και εφαρμόστηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε να υπάρχει ομοιογένεια στις συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν σετ αντιδράσεων real-time PCR, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο όλα τα διαφορετικά cDNA στη σειρά και το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών για το κάθε γονίδιο που μελετάται. Μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *EsMAM-1*, *EsCYP79F1*, *EsCYP79B2*, *EsCYP79B3*, *EsCYP83A1*, *EsCYP83B1*, *EsSUR1*, *EsFMOGS<sub>OX-5</sub>*, *EsMYB34-1* και *EsMYB51-1*. Κάθε φορά, μαζί με τα σετ των αντιδράσεων, τρία τον αριθμό για το κάθε γονίδιο, πραγματοποιήθηκε παράλληλα και σετ αντιδράσεων με εκμαγείο τα ίδια cDNA και τους εκκινητές της ουβικιτίνης. Αυτό έγινε για να μπορέσει να υπολογιστεί στη συνέχεια η σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου. Μετά το πέρας των αντιδράσεων

εξάχθηκαν οι πίνακες Ct και αποτελεσματικότητας της αντίδρασης (efficiency) από το πρόγραμμα του μηχανήματος της real-time PCR. Ακολούθως, έγινε ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης του κάθε γονιδίου, με επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων με το κατάλληλο πρόγραμμα (LinRegPCR) και κατασκευή των σχετικών διαγραμμάτων.

Επίσης έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το λογισμικό πρόγραμμα STATISTICA 7.0, όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (ONE WAY ANOVA), που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν η διαφορετική ομάδα-μεταχείριση (δηλαδή τα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα θρέψης σε άζωτο και θείο). Οι μέσοι όροι των επαναλήψεων ( $n=3$ ) συγκρίθηκαν μεταξύ τους για σημαντικές διαφορές σε επίπεδο ( $\alpha=0.05$ ) με το κριτήριο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος για τον κάθε τύπο ιστού χωριστά (φύλλα, ρίζες). Στα διαγράμματα φαίνεται η σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου στις τέσσερις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν (N+/S+, N-/S+, N+/S-, N-/S-), όπως και το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ τους. Διαφορές στα γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου σε κάθε μεταχείριση.

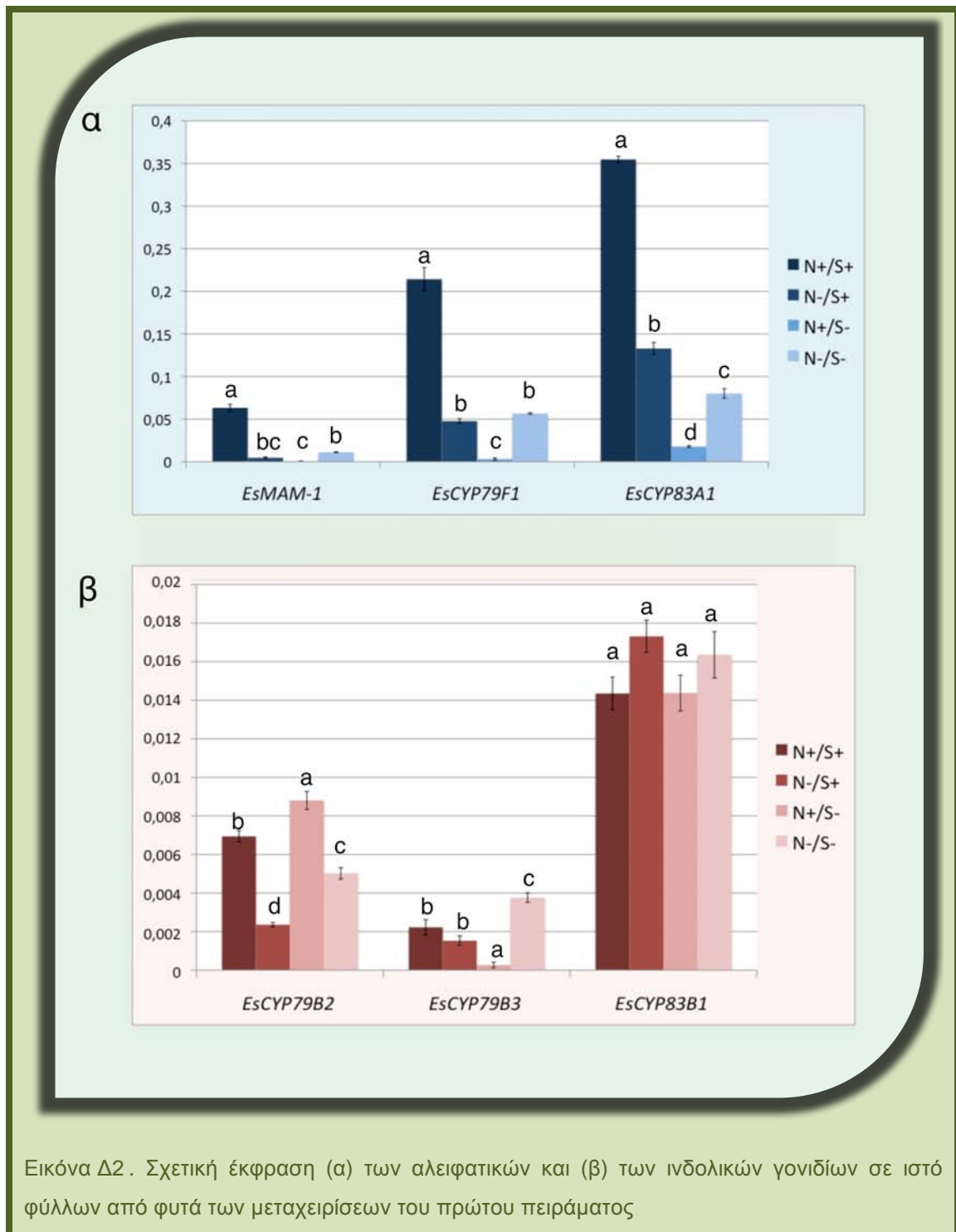
Τα διαγράμματα είναι ομαδοποιημένα για τα γονίδια που συμμετέχουν στις αρχικές αντιδράσεις στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των αλειφατικών ΓΚΣ (αλειφατικά γονίδια) και για τα γονίδια που συμμετέχουν στις αρχικές αντιδράσεις στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των ινδολικών ΓΚΣ (ινδολικά γονίδια).

#### 1.1.1. Έκφραση βιοσυνθετικών και ρυθμιστικών γονιδίων στα φύλλα

Η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στις αντιδράσεις της βιοσύνθεσης αλειφατικών ΓΚΣ δείχνει να επηρεάζεται με τον ίδιο τρόπο από την έλλειψη των στοιχείων N και S (εικόνα Δ2α). Φαίνεται επίσης πως η υψηλότερη έκφραση των *EsMAM1* (πρώτο βιοσυνθετικό στάδιο αλειφατικών ΓΚΣ), *EsCYP79F1* και *EsCYP83A1* (δεύτερο βιοσυνθετικό στάδιο αλειφατικών ΓΚΣ) παρατηρήθηκε σε φύλλα φυτών που αναπτύχθηκαν κάτω από επαρκή παροχή αζώτου και θείου. Ενώ η έλλειψη

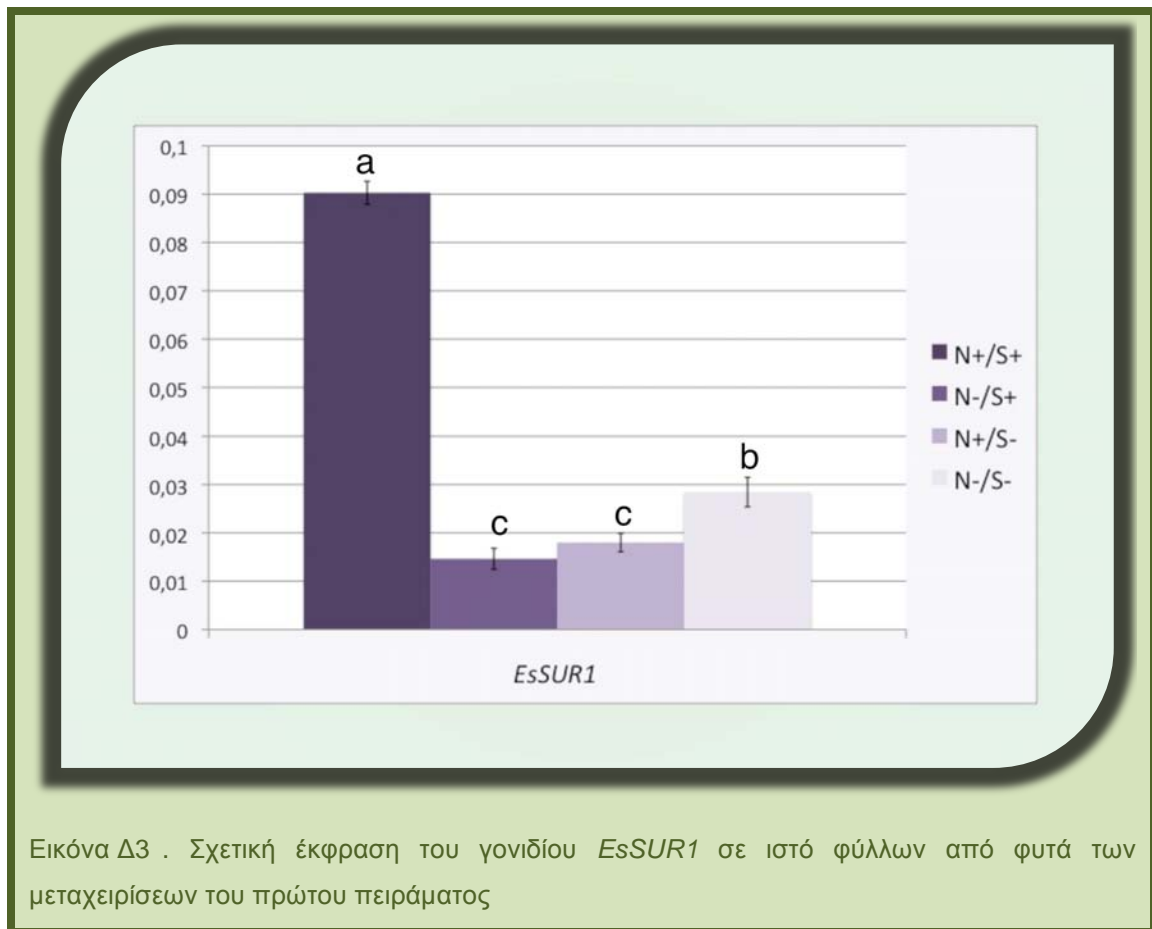
αζώτου και αζώτου-θείου είχε ως αποτέλεσμα μείωση της έκφρασης όλων των γονιδίων, η έλλειψη θείου από μόνη της είχε πιο σημαντική επίδραση. Το ίδιο πρότυπο φαίνεται να ακολουθεί και η έκφραση του *EsSUR1*, το οποίο συμμετέχει στα μονοπάτια της βιοσύνθεσης αλειφατικών αλλά και ινδολικών ΓΚΣ (εικόνα Δ3).

Όσον αφορά στα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ (εικόνα Δ2β), τα *EsCYP79B2* και *EsCYP79B3* δείχνουν ξεκάθαρα να επηρεάζονται από την έλλειψη των στοιχείων αλλά με διαφορετικό τρόπο το καθένα. Η έκφραση του *EsCYP83B1* δε φαίνεται να επηρεάζεται από τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν.



Όσον αφορά στην έκφραση του *EsSUR1*, το οποίο εμπλέκεται και στα δύο βιοσυνθετικά μονοπάτια, είναι αυξημένη κάτω από επαρκή παροχή αζώτου και θείου, ενώ είναι κατά πολύ μειωμένη σε όλες τις υπόλοιπες συνθήκες (εικόνα Δ3).

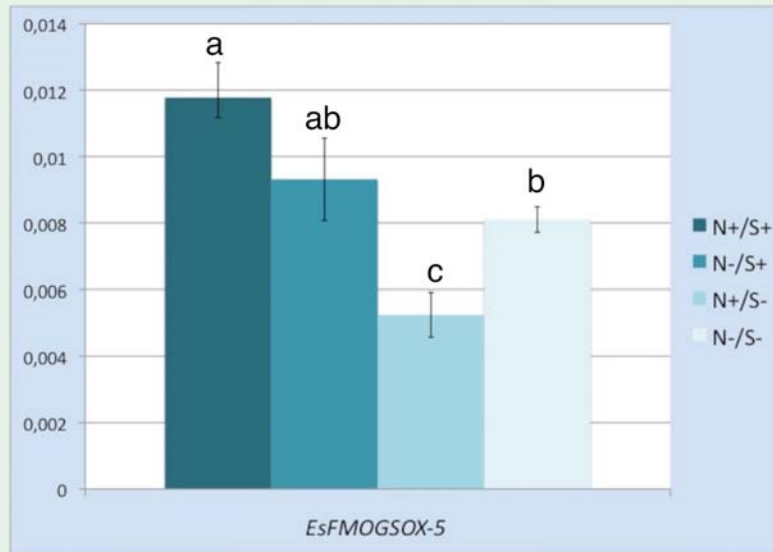




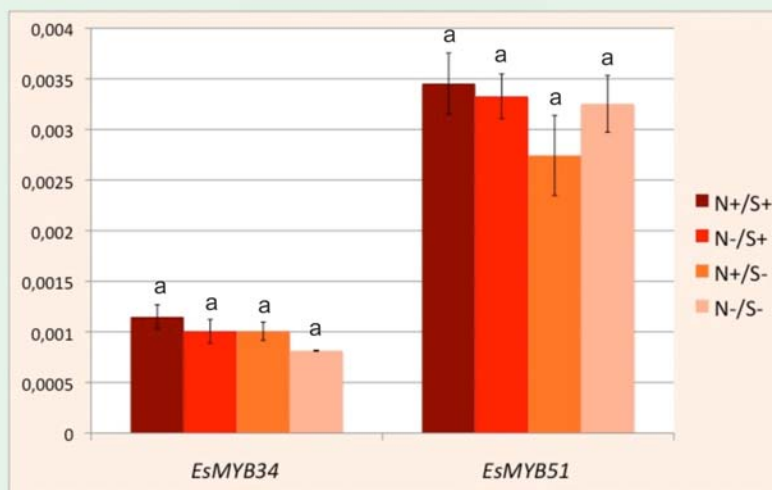
Εικόνα Δ3 . Σχετική έκφραση του γονιδίου *EsSUR1* σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος

Η έκφραση του *EsFMO<sub>GS-OX5</sub>* (τρίτο βιοσυνθετικό στάδιο αλειφατικών ΓΚΣ) είχε την υψηλότερη τιμή της σε φύλλα φυτών που αναπτύχθηκαν κάτω από επαρκή παροχή αζώτου και θείου και τη χαμηλότερη σε φύλλα της μεταχείρισης έλλειψης θείου (εικόνα Δ4). Παρατηρείται δηλαδή το ίδιο φαινόμενο που εμφάνισαν και τα υπόλοιπα αλειφατικά γονίδια παραπάνω.

Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *EsMYB34* και *EsMYB51* που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ δεν έδειξε να επηρεάζεται από τις συνθήκες λίπανσης που εφαρμόστηκαν (εικόνα Δ5).



Εικόνα Δ4. Σχετική έκφραση του γονιδίου *EsFMOGS<sub>OX-5</sub>* σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος



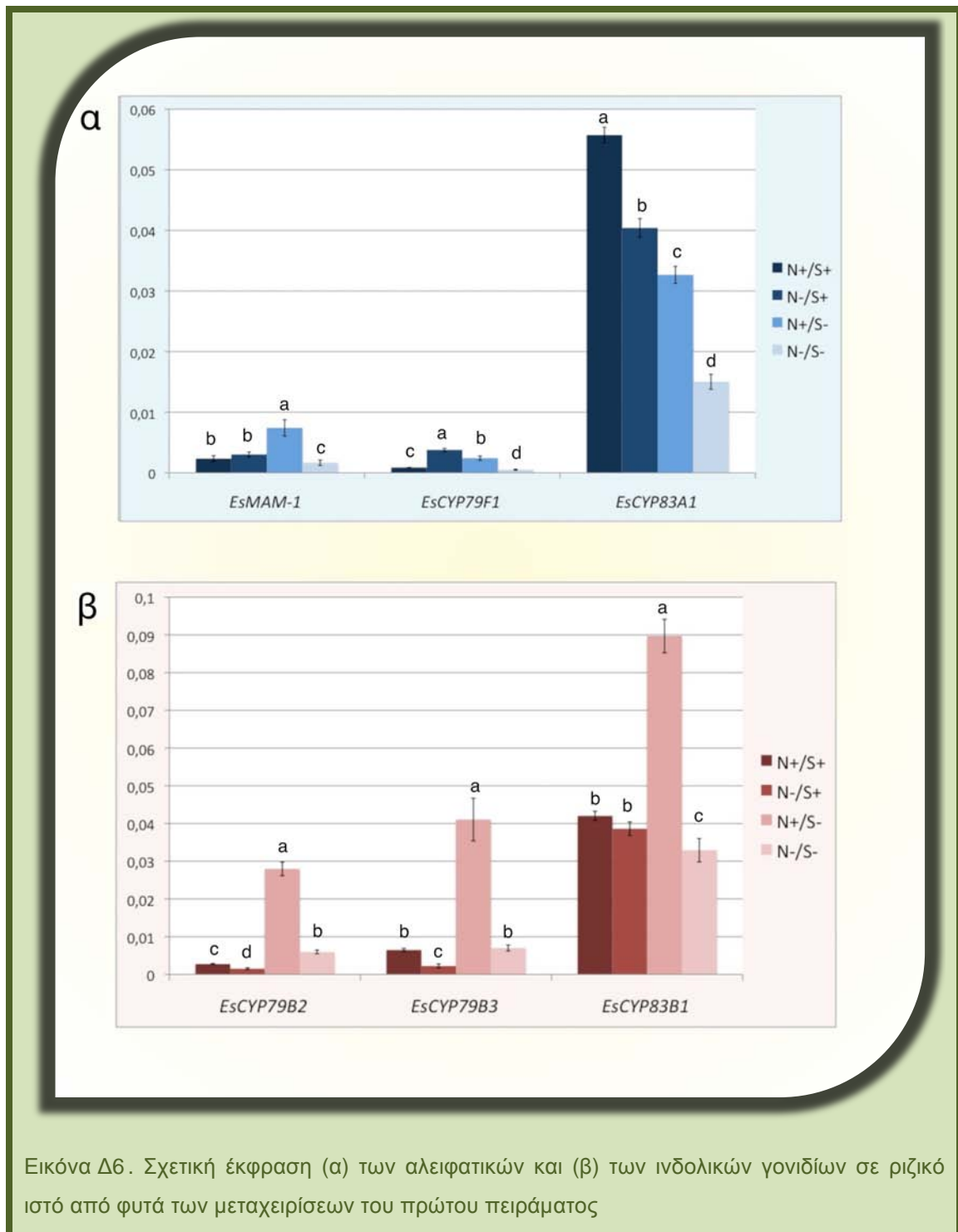
Εικόνα Δ5. Σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *EsMYB34-1* και *EsMYB51-1* σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος

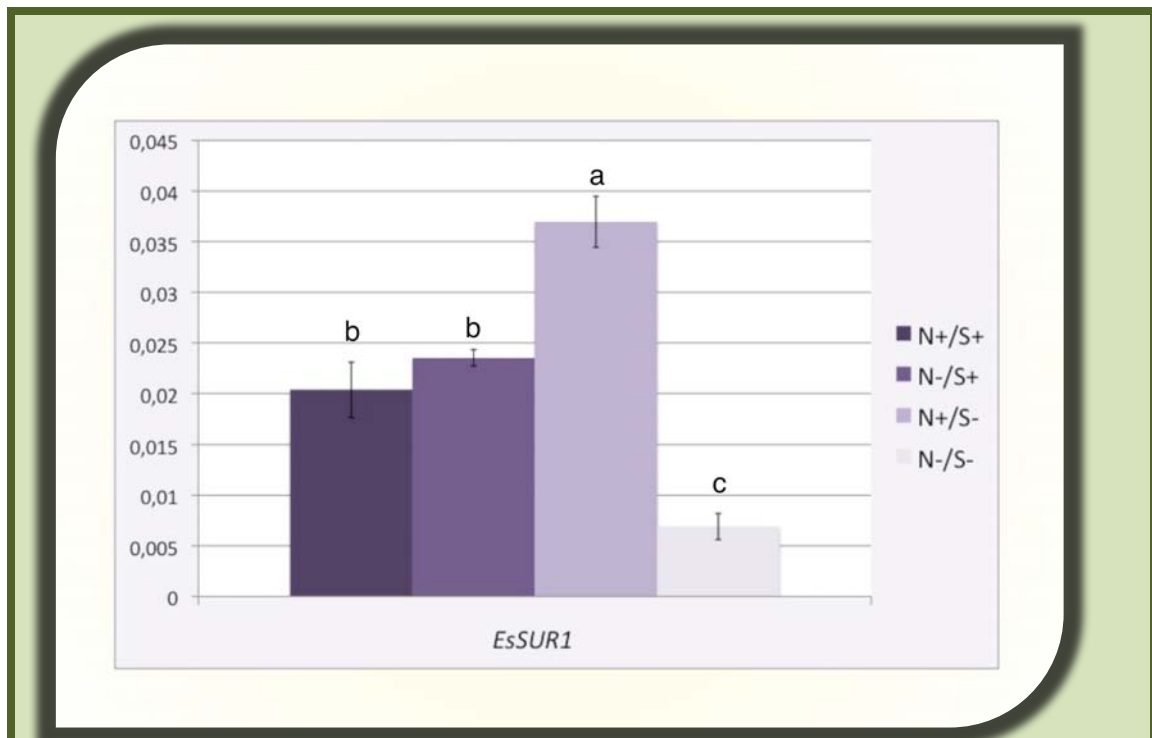
### 1.1.2. Έκφραση βιοσυνθετικών και ρυθμιστικών γονιδίων στις ρίζες

Στις ρίζες παρατηρήθηκε πως η σχετική έκφραση των πρώτων στη σειρά των βιοσυνθετικών αντιδράσεων γονιδίων των αλειφατικών ΓΚΣ *EsMAM1* και *EsCYP79F1* επηρεάστηκε με τον ίδιο τρόπο από την έλλειψη του θείου. Η έλλειψη θείου οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης και των δύο γονιδίων, ενώ η ταυτόχρονη έλλειψη θείου και αζώτου οδήγησε σε μείωση (εικόνα Δ6α). Τα επίπεδα έκφρασης όλων των επόμενων στη σειρά των βιοσυνθετικών αντιδράσεων γονιδίων (*EsCYP83A1*, *EsSUR1* και *EsFMO<sub>GS-OX5</sub>*) είναι υψηλότερα σε συνθήκες επάρκειας αζώτου και θείου και χαμηλότερα στην ταυτόχρονη έλλειψη και των δύο στοιχείων (εικόνες Δ6α, Δ7, Δ8). Μάλιστα, και τα τρία παρουσίασαν μείωση και στις τρεις διαφορετικές συνθήκες έλλειψης N και S. Παρά τις διαφορές που παρατηρούνται, η επίδραση της ταυτόχρονης έλλειψης αζώτου και θείου φαίνεται να επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο όλα τα αλειφατικά γονίδια. Έτσι όλα εμφανίζουν τη μικρότερή τους έκφραση σε αυτή τη συνθήκη.

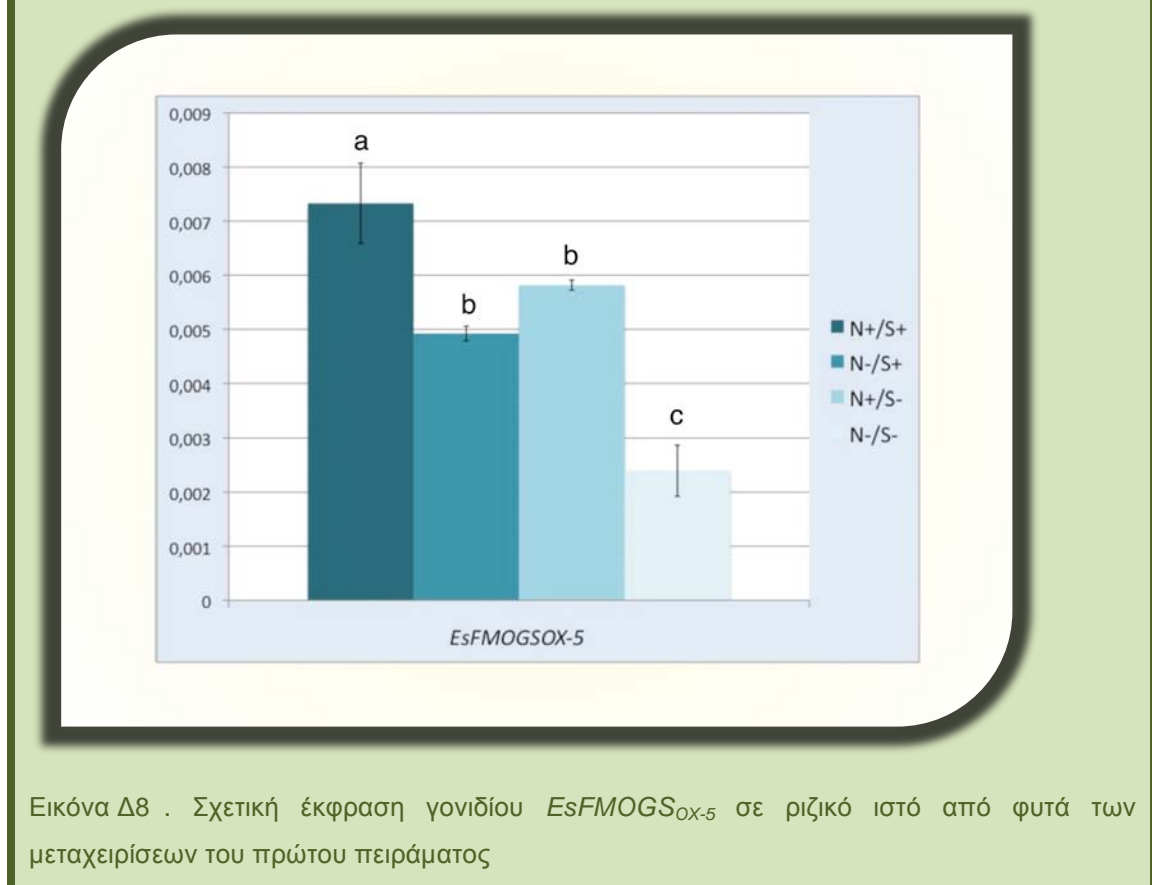
Όσον αφορά στα ινδολικά γονίδια, φαίνεται πως τα *EsCYP79B2* και *EsCYP79B3* ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης (εικόνα Δ6β). Το ίδιο συμβαίνει και μεταξύ των επόμενων στη σειρά των βιοσυνθετικών αντιδράσεων γονιδίων *EsCYP83B1* και *EsSUR1* (εικόνες Δ6β, Δ7). Πάντως αυτό που παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ (*EsCYP79B2*, *EsCYP79B3*, *EsCYP83B1*), είναι μια δραματική αύξηση των επιπέδων έκφρασης όταν υπάρχει έλλειψη θείου (εικόνα Δ6β).

Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στην έκφραση του *EsSUR1*, της οποίας τα επίπεδα φαίνεται να είναι αυξημένα στη μεταχείριση με μειωμένο θείο (εικόνα Δ7).





Εικόνα Δ7. Σχετική έκφραση γονιδίου *EsSUR1* σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος



Εικόνα Δ8 . Σχετική έκφραση γονιδίου *EsFMOGSOX-5* σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος

Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *EsMYB34* και *EsMYB51* που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ, όπως και στα φύλλα, δεν έδειξε να επηρεάζεται από τις συνθήκες λίπανσης που εφαρμόστηκαν, με εξαίρεση το *EsMYB51* στη μεταχείριση με μειωμένο θείο (εικόνα Δ9). Η έκφραση στην περίπτωση αυτή παρουσίασε αύξηση.



Εικόνα Δ9. Σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *EsMYB34-1* και *EsMYB51-1* σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι - Μεταβολίτες

Τα ΓΚΣ των οποίων μετρήθηκε η συγκέντρωση ήταν τα αλειφατικά GRA (glucoraphanin), GER (glucoerucin), GNA (gluconapin) και GSV (glucosativin), τα ινδολικά GBS (glucobrassicin) και 4-MeO-GBS (4-methoxy-glucobrassicin) και το αρωματικό GST (gluconasturtiin) (Ομήρου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Αναλυτικά οι μετρήσεις των συγκεντρώσεών τους σε κάθε μεταχείριση φαίνονται στον πίνακα Δ1 για τα φύλλα και στον πίνακα Δ2 για τις ρίζες.

Στα φύλλα, και τα τρία σχήματα ανεπαρκούς λίπανσης που εφαρμόστηκαν (-N/+S, +N/-S, -N/-S) οδήγησαν σε μείωση της συγκέντρωσης των ολικών ΓΚΣ (εικόνα Δ10). Επίσης μείωση παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις των ολικών αλειφατικών αλλά και των ολικών ινδολικών ΓΚΣ (εικόνα Δ11). Πιο συγκεκριμένα, κάθε ένα από τα αλειφατικά (GRA, GER, GNA και GSV) και ινδολικά (GBS και 4-MeO-GBS) ΓΚΣ που μετρήθηκε εμφάνισε μείωση στη συγκέντρωσή του υπό την επίδραση της ανεπάρκειας των στοιχείων που σε κάθε μεταχείριση εφαρμόστηκε (εικόνα Δ14α). Αυτό που επηρέασε περισσότερο τη συγκέντρωση όλων των αλειφατικών ΓΚΣ φαίνεται να είναι το θείο, αφού υπό την έλλειψη αυτού (μεταχειρίσεις +N/-S, -N/-S) παρατηρήθηκε η μικρότερη συγκέντρωση για καθένα από τα αλειφατικά ΓΚΣ (εικόνα Δ14α). Φαίνεται πως οι συγκεντρώσεις όλων των αλειφατικών αλλά και του καθενός ξεχωριστά ακολουθούν ένα παρόμοιο πρότυπο (εικόνα Δ14α). Το ίδιο συμβαίνει και μεταξύ των συγκεντρώσεων των ινδολικών GBS και 4-MeO-GBS (εικόνα Δ14α).

Στις ρίζες παρατηρήθηκε μείωση των ολικών ΓΚΣ αλλά και των επιμέρους αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στη μεταχείριση -N/+S (εικόνες Δ12, Δ13). Στη μεταχείριση +N/-S υπάρχει μείωση στα ολικά ΓΚΣ αλλά και τα αλειφατικά (εικόνες Δ12, Δ13), ωστόσο τα ολικά ινδολικά ΓΚΣ αυξάνονται (εικόνα Δ13) και κυρίως η 4-MeO-GBS (εικόνα Δ14β). Στη μεταχείριση -N/-S η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ δεν παρουσιάζει διαφορά σε σχέση με την κατάσταση πλήρους θρέψης, ωστόσο υπάρχει αύξηση των ολικών αλειφατικών (κυρίως της GER) και μείωση των ολικών ινδολικών ΓΚΣ. Φαίνεται δηλαδή πως τα αλειφατικά ΓΚΣ στη ρίζα αυξάνονται υπό την έλλειψη θείου και αζώτου, ενώ τα ινδολικά ΓΚΣ αυξάνονται στην περίπτωση που λείπει μόνο το θείο. Το πρότυπο που ακολουθούν οι συγκεντρώσεις στις

διάφορες μεταχειρίσεις είναι κοινό μεταξύ των αλειφατικών GRA και GER. Παρόμοιο πρότυπο υπάρχει και μεταξύ των συγκεντρώσεων των ινδολικών GBS και 4-MeO-GBS (εικόνα Δ14β).

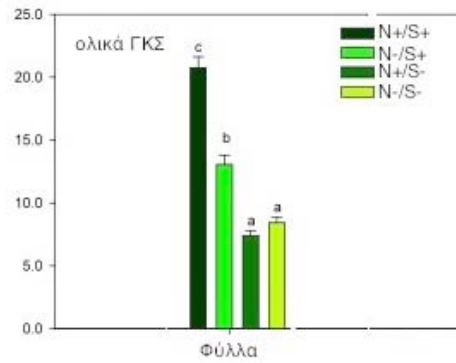
Πίνακας Δ1. Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων γλυκοσινολικών σε φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε  $\mu\text{mol/g dw}$

|                            | N+/S+ | N-/S+ | N+/S- | N-/S- |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>GRA</b>                 | 9,32  | 6,42  | 2,85  | 3,5   |
| <b>GNA</b>                 | 2,19  | 1,21  | 0,99  | 1,14  |
| <b>GSV</b>                 | 5,05  | 3,4   | 1,98  | 2,3   |
| <b>GER</b>                 | 3,00  | 1,57  | 1,05  | 1,19  |
| <b>ολικά αλειφατικά</b>    | 19,57 | 12,6  | 6,87  | 8,13  |
| <b>GBS</b>                 | 0,47  | 0,17  | 0,24  | 0,1   |
| <b>4-MeO-GBS</b>           | 0,72  | 0,28  | 0,31  | 0,18  |
| <b>ολικά ινδολικά</b>      | 1,19  | 0,45  | 0,55  | 0,28  |
| <b>ολικά γλυκοσινολικά</b> | 20,76 | 13,05 | 7,42  | 8,41  |

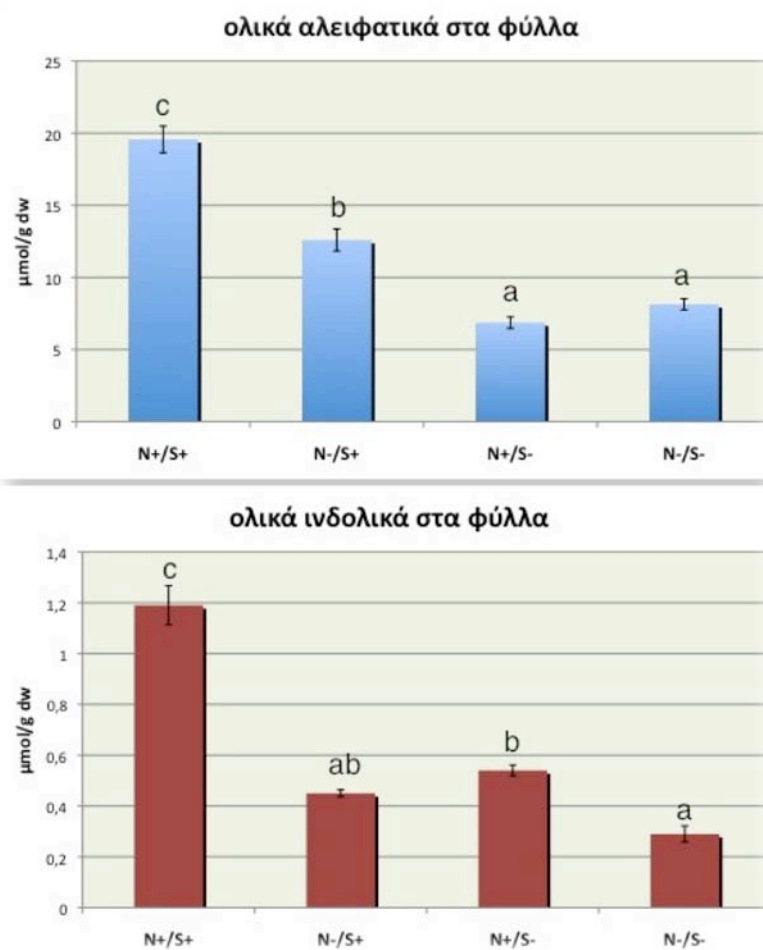
Πίνακας Δ2. Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων γλυκοσινολικών σε ρίζες των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε  $\mu\text{mol/g dw}$

|                            | N+/S+ | N-/S+ | N+/S- | N-/S- |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>GRA</b>                 | 6,46  | 5,59  | 3,33  | 7,05  |
| <b>GER</b>                 | 8,33  | 7,32  | 5,49  | 9,73  |
| <b>ολικά αλειφατικά</b>    | 14,79 | 12,91 | 8,82  | 16,78 |
| <b>GBS</b>                 | 0,88  | 0,38  | 1,10  | 0,56  |
| <b>4-MeO-GBS</b>           | 0,46  | 0,38  | 0,67  | 0,27  |
| <b>ολικά ινδολικά</b>      | 1,34  | 0,76  | 1,77  | 0,83  |
| <b>GST</b>                 | 3,47  | 4,13  | 2,86  | 2,12  |
| <b>ολικά γλυκοσινολικά</b> | 19,6  | 17,8  | 13,45 | 19,73 |

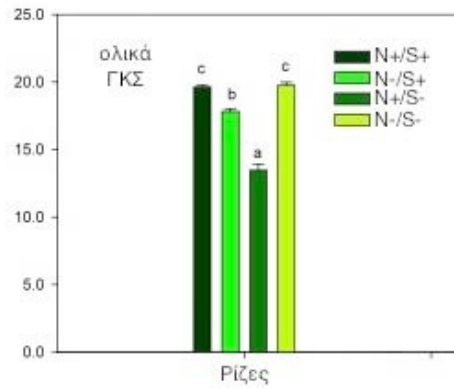




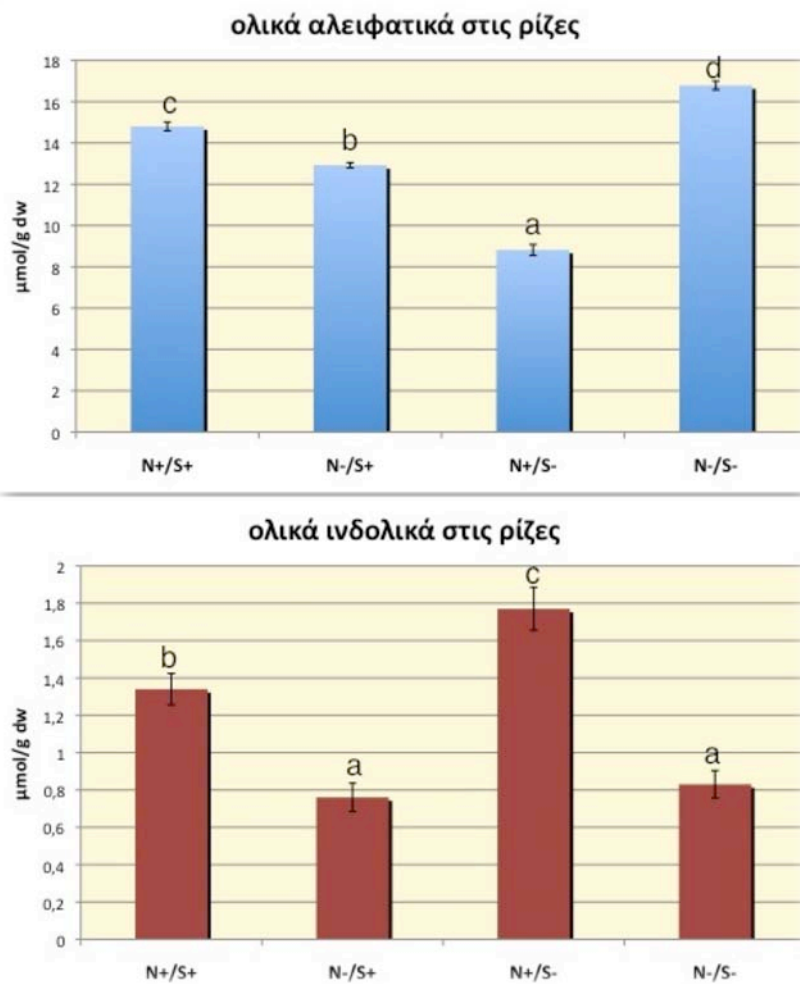
Εικόνα Δ10. Οι συγκεντρώσεις όλων των γλυκοσιδικών που ανιχνεύθηκαν σε φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε μολ/g dw



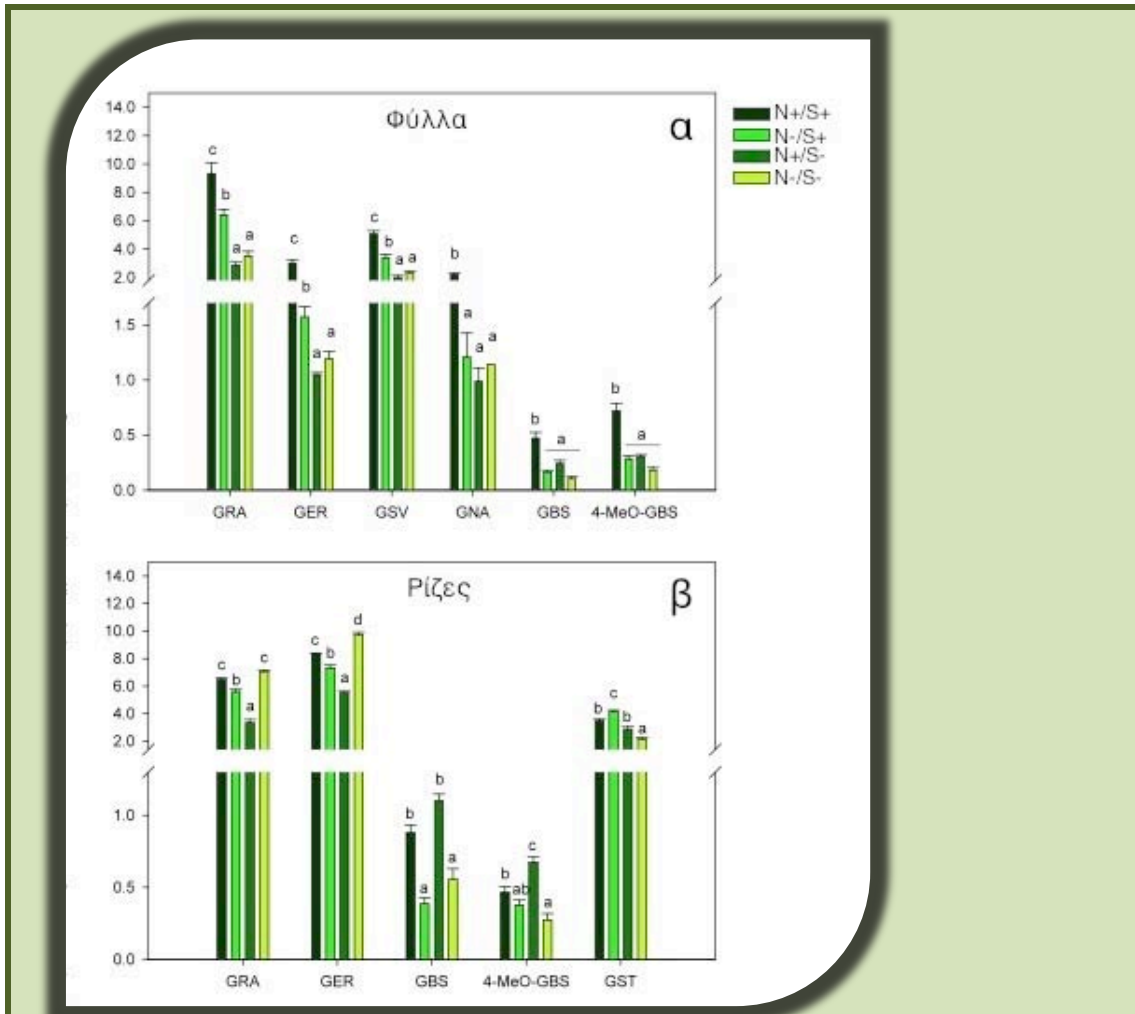
Εικόνα Δ11. Οι συγκεντρώσεις των αλειφατικών και ινδολικών γλυκοσιδικών χωριστά σε φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC



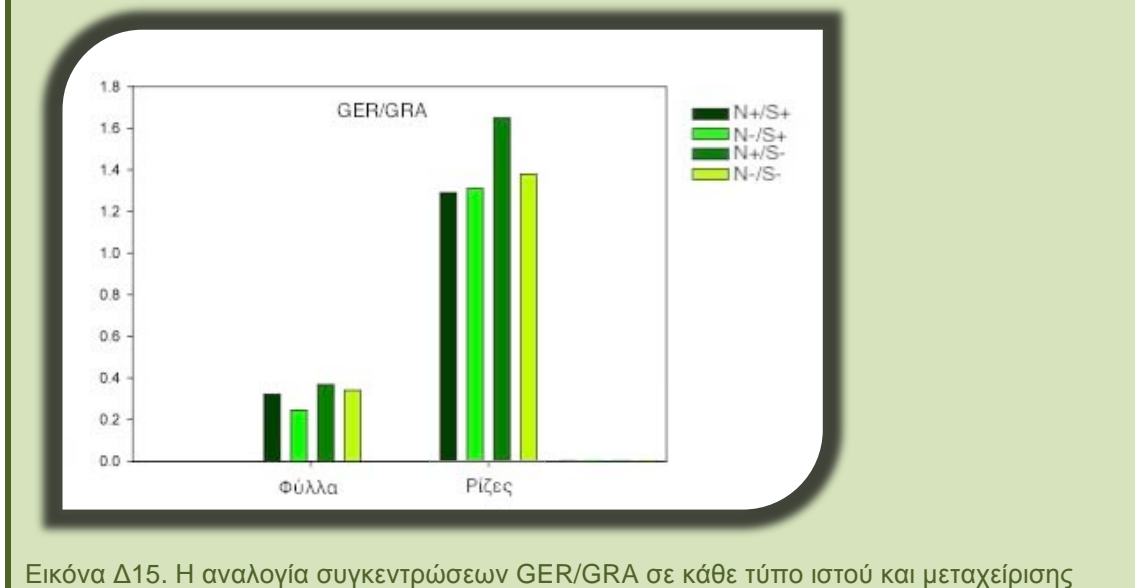
Εικόνα Δ 12. Οι συγκεντρώσεις όλων των γλυκοσινολικών που ανιχνεύτηκαν σε ρίζες των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε  $\mu\text{mol/g dw}$



Εικόνα Δ 13. Οι συγκεντρώσεις των αλειφατικών και ινδολικών γλυκοσινολικών χωριστά σε ρίζες των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC



Εικόνα Δ14. Οι συγκεντρώσεις του κάθε τύπου ΓΚΣ από αυτά που ανιχνεύτηκαν α) σε φύλλα και β) σε ρίζες των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος όπως μετρήθηκαν με HPLC σε  $\mu\text{mol/g dw}$



Εικόνα Δ15. Η αναλογία συγκεντρώσεων GER/GRA σε κάθε τύπο ιστού και μεταχείρισης

### 1.1.3. Συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων και των επιπέδων των μεταβολιτών

Ο βαθμός συσχέτισης της σχετικής έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων των ΓΚΣ με τη συγκέντρωση των διαφόρων κατηγοριών ΓΚΣ επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων σε ότι αφορά τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν και ελέγχουν τελικώς τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στη ρόκα .

#### 1.1.3.α. Συσχέτιση στα φύλλα

Υψηλή και στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p < 0.05$ ) παρατηρείται μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα βιοσύνθεσης των αλειφατικών ΓΚΣ και της συνολικής συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ. Αντίθετα, η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα βιοσύνθεσης των ινδολικών ΓΚΣ δε συσχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με τη συνολική συγκέντρωση αυτού του τύπου ΓΚΣ. Το γονίδιο *SUR1* παρουσιάζει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση τόσο των αλειφατικών όσο και των ινδολικών ΓΚΣ. Επίσης, οι μεταγραφικοί παράγοντες MYB34 και MYB51 που μελετήθηκαν, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση είτε με τη συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ είτε με τα γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεσή τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γονίδιο *EsFMO<sub>GSOX-5</sub>*, το οποίο παρουσιάζει υψηλή θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της GRA ( $r=0.804$ ,  $p=0.002$ ) και στο οποίο γίνεται ειδική αναφορά παρακάτω.

Πίνακας Δ3. Συσχέτιση σχετικής έκφρασης γονιδίων και συγκέντρωσης ΓΚΣ στα φύλλα

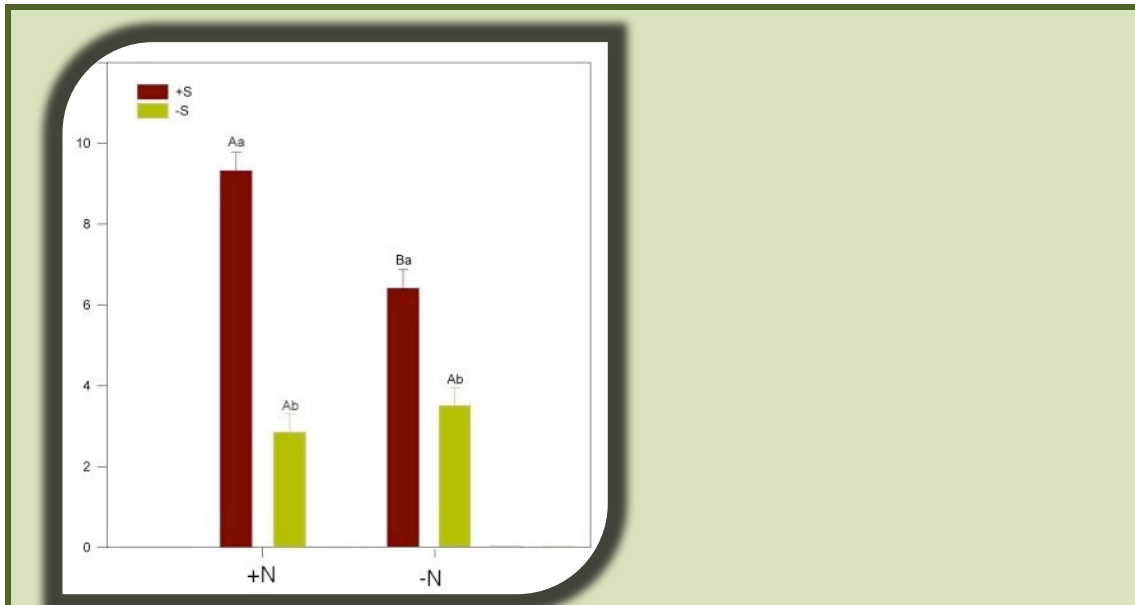
| Correlations (Spreadsheet1)                       |                 |               |           |            |            |            |         |        |              |           |           |        |        |
|---|-----------------|---------------|-----------|------------|------------|------------|---------|--------|--------------|-----------|-----------|--------|--------|
| Marked correlations are significant at p < ,05000 |                 |               |           |            |            |            |         |        |              |           |           |        |        |
| N=12 (Casewise deletion of missing data)          |                 |               |           |            |            |            |         |        |              |           |           |        |        |
| Variable  | Total Aliphatic | Total Indolyl | Total GSL | Es CYP79F1 | Es CYP79B2 | Es CYP79B3 | Es MAM1 | EsSUR1 | Es FMOSGov-5 | EsCYP83A1 | EsCYP83B1 | MYB34  | MYB51  |
| Total Aliphatic                                   | 1,0000          | ,8191         | ,9993     | ,9267      | -,1116     | ,1478      | ,8615   | ,8392  | ,8143        | ,9681     | -,1230    | ,5073  | ,4029  |
| Total Indolyl                                     | ,8191           | 1,0000        | ,8400     | ,8394      | ,3815      | -,1083     | ,9056   | ,8678  | ,6154        | ,8639     | -,4512    | ,5497  | ,1317  |
| Total GSL   | ,9993           | ,8400         | 1,0000    | ,9313      | -,0806     | ,1327      | ,8740   | ,8517  | ,8103        | ,9721     | -,1459    | ,5157  | ,3897  |
| EsCYP79F1   | ,9267           | ,8394         | ,9313     | 1,0000     | ,0671      | ,3251      | ,9619   | ,9645  | ,7883        | ,9716     | -,2046    | ,4188  | ,4079  |
| EsCYP79B2   | -,1116          | ,3815         | -,0806    | ,0671      | 1,0000     | -,3465     | ,2027   | ,3020  | -,2929       | -,0425    | -,6838    | ,1790  | -,4270 |
| EsCYP79B3   | ,1478           | -,1083        | ,1327     | ,3251      | -,3465     | 1,0000     | ,2612   | ,2407  | ,4261        | ,2474     | ,2553     | -,4512 | ,2270  |
| EsMAM1  | ,8615           | ,9056         | ,8740     | ,9619      | ,2027      | ,2612      | 1,0000  | ,9770  | ,7547        | ,9506     | -,3545    | ,4654  | ,3158  |
| EsSUR1  | ,8392           | ,8878         | ,8517     | ,9645      | ,3020      | ,2407      | ,9770   | 1,0000 | ,6918        | ,9123     | -,3719    | ,4654  | ,2690  |
| EsFMOSGov-5                                       | ,8143           | ,6154         | ,8103     | ,7883      | -,2929     | ,4261      | ,7547   | ,6918  | 1,0000       | ,8394     | ,1012     | ,2186  | ,3984  |
| EsCYP83A1   | ,9681           | ,8639         | ,9721     | ,9716      | -,0425     | ,2474      | ,9506   | ,9123  | ,8394        | 1,0000    | -,1928    | ,4797  | ,4038  |
| EsCYP83B1   | -,1230          | -,4512        | -,1459    | -,2046     | -,6838     | ,2553      | -,3545  | -,3719 | ,1012        | -,1928    | 1,0000    | -,3158 | ,4114  |
| MYB34   | ,5073           | ,5497         | ,5157     | ,4188      | ,1790      | -,4512     | ,4654   | ,4654  | ,2186        | ,4797     | -,3158    | 1,0000 | ,1249  |
| MYB51   | ,4029           | ,1317         | ,3897     | ,4079      | -,4270     | ,2270      | ,3158   | ,2690  | ,3984        | ,4038     | ,4114     | ,1249  | 1,0000 |

### 1.1.3.β. Η περίπτωση του γονιδίου *EsFMO<sub>GS-OX5</sub>*

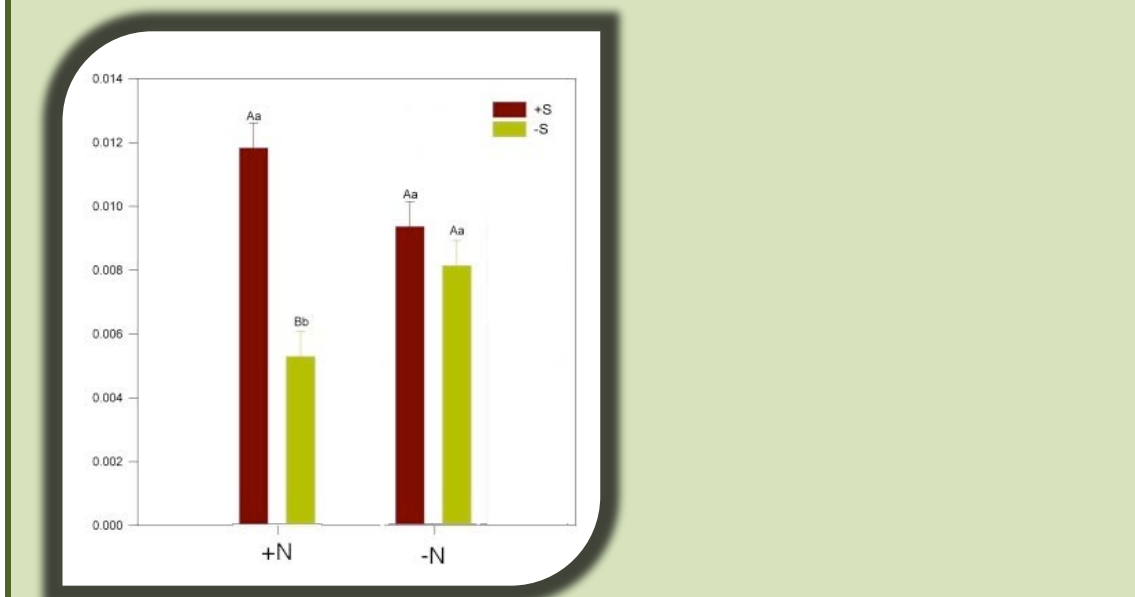
Τα γονίδια της οικογένειας *EsFMO<sub>GS-OX</sub>* κωδικοποιούν ένζυμα που τροποποιούν την πλευρική αλυσίδα των αλειφατικών ΓΚΣ, καταλύοντας την αντίδραση μετατροπής των MT (methylthioalkyl) σε MS (methylsulfinylalkyl) ΓΚΣ (Li et al., 2008). Τα MS ΓΚΣ υδρολύονται σε προϊόντα όπως η σουλφοραφάνη (προέρχεται από το 4-methylsulfinylbutyl ΓΚΣ (4-MSB)) και άλλες ισοθειοκυανικές ενώσεις που προέρχονται από τα 7-methylsulfinylheptyl (7-MSH) και 8-methylsulfinyloctyl (8-MSO) ΓΚΣ. Σε αυτά τα προϊόντα έχουν αποδοθεί πιθανές ιδιότητες πρόληψης του καρκίνου λόγω της ισχυρής επαγωγής αποτοξικοποιητικών ενζύμων της φάσης II που προκαλούν (Zhang et al., 1992; Rose et al., 2000), οπότε υπάρχει ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη οικογένεια γονιδίων.

Παρατηρείται πως το γονίδιο *EsFMO<sub>GS-OX5</sub>* που μελετήθηκε εκφράζεται σταθερά σε συνθήκες επάρκειας θείου (εικόνα Δ17), ενώ ταυτόχρονα υπάρχει μια αναλογική αύξηση της συγκέντρωσης τόσο της GER όσο και της GRA. Σε συνθήκες έλλειψης θείου η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σημαντικά (εικόνα Δ17), όπως και η συγκέντρωση της GRA, ωστόσο ο λόγος της συγκέντρωσης GRA/GER παραμένει σταθερός (εικόνα Δ15). Οι αντίστοιχες συσχετίσεις φαίνονται από το διάγραμμα της εικόνας Δ18, όπου παρουσιάζεται η έκφραση του γονιδίου ως προς το λόγο των συγκεντρώσεων GRA/GER, αλλά και από τα διαγράμματα της εικόνας Δ19, όπου παρουσιάζεται η έκφραση του γονιδίου αφενός ως προς τη συγκέντρωση της GER και αφετέρου ως προς τη συγκέντρωση της GRA.

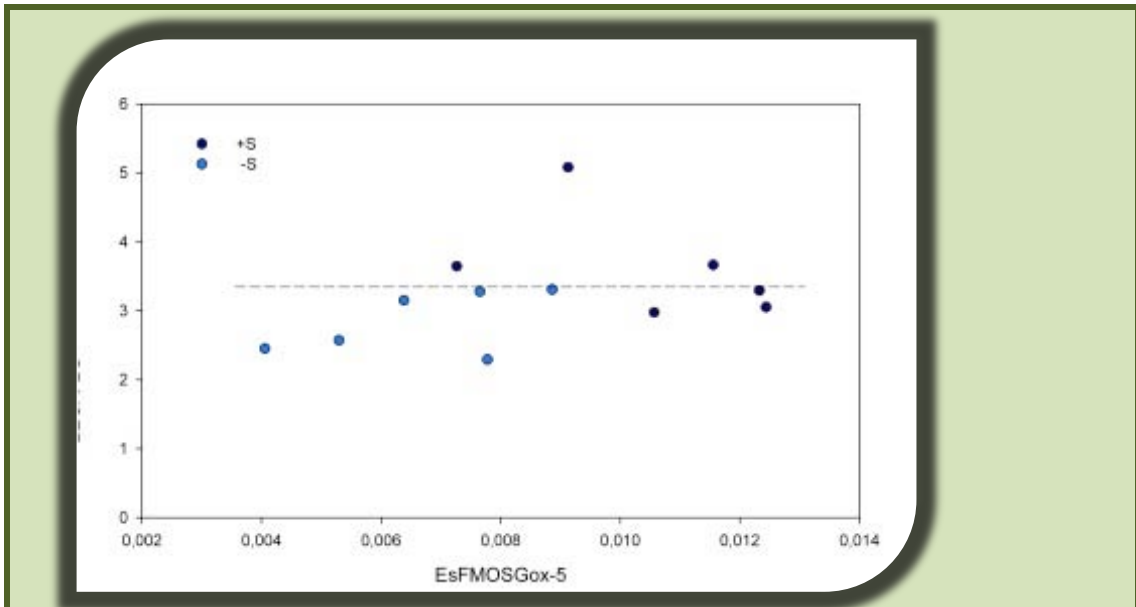
Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης δεν επηρεάζει από μόνη της την έκφραση του γονιδίου αυτού αλλά αλληλεπιδρά σημαντικά ( $p < 0.05$ ) με τη διαθεσιμότητα του θείου στα φυτά. Σε συνθήκες έλλειψης θείου η έλλειψη αζώτου έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της έκφρασης του γονιδίου (εικόνα Δ17), η οποία όμως δε συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης της GRA, η οποία παραμένει σταθερή στις τιμές που παρατηρήθηκαν σε συνθήκες τροφοπενίας θείου μόνο (εικόνα Δ16).



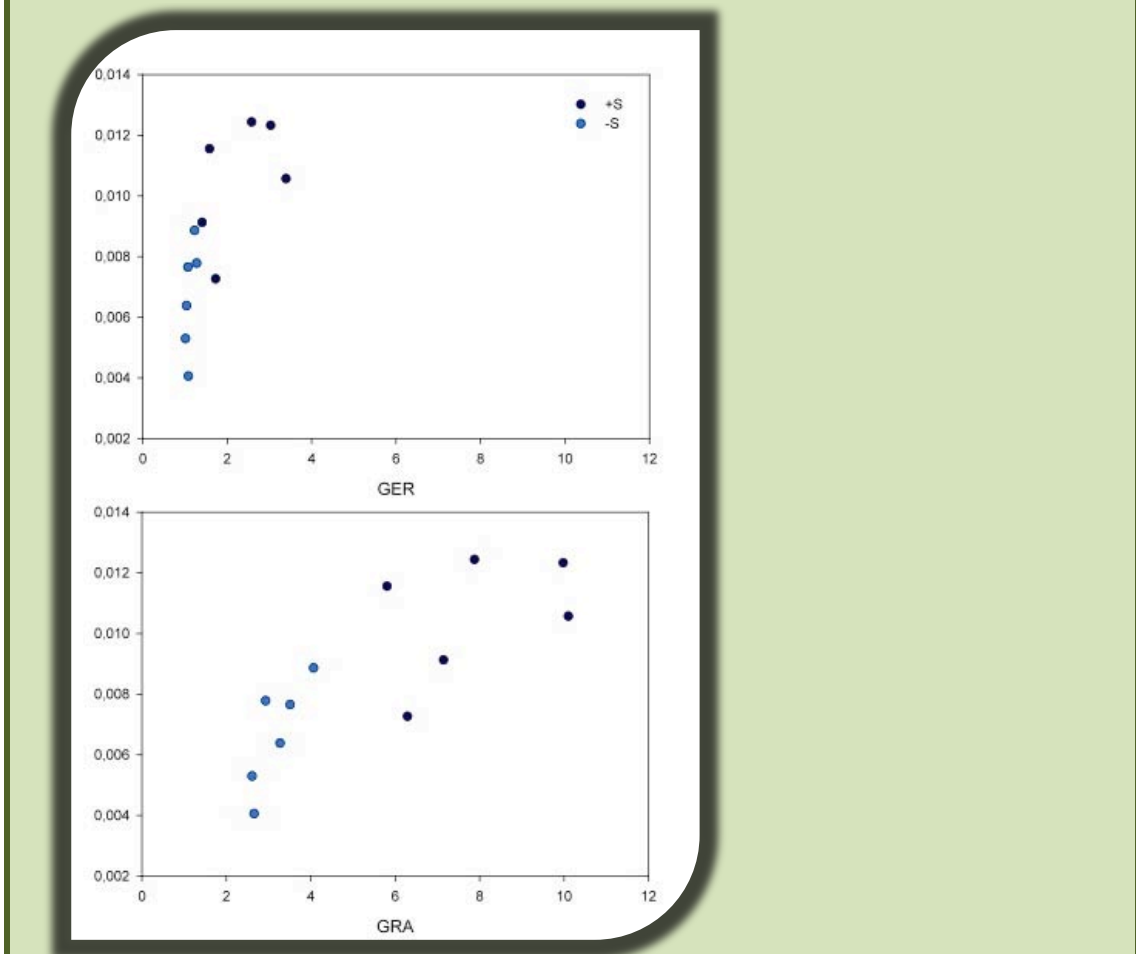
Εικόνα Δ 16. Η συγκέντρωση της GRA στα φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της συγκέντρωσης της GRA σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του αζώτου στην ίδια μεταχείριση θείου. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της συγκέντρωσης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου στην ίδια μεταχείριση αζώτου



Εικόνα Δ17. Η σχετική έκφραση του γονιδίου *EsFMO<sub>6S-0x5</sub>* στα φύλλα των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του αζώτου στην ίδια μεταχείριση θείου. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου στην ίδια μεταχείριση αζώτου



Εικόνα Δ18. Η έκφραση του  $EsFMO_{GS-OX5}$  προς το λόγο GRA/GER



Εικόνα Δ 19. Η συγκέντρωση της GER ως προς την έκφραση του  $EsFMO_{GS-OX5}$  και η συγκέντρωση της GRA προς την έκφραση του  $EsFMO_{GS-OX}$



### 1.1.3.γ. Συσχέτιση στις ρίζες

Όπως φαίνεται στον πίνακα Δ4, στις ρίζες η σχετική έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ (*EsMAM1*, *EsCYP79F1*, *EsCYP83A1*, αλλά και *EsFMO<sub>GS-OXS</sub>*) δεν παρουσίασε συσχέτιση με τα επίπεδα των αντίστοιχων μεταβολιτών (αλειφατικά ΓΚΣ). Το *EsSUR1* παρουσίασε συσχέτιση, ωστόσο αυτή ήταν αρνητική.

Αντίθετα με τα αλειφατικά γονίδια, συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ γονιδίων που κωδικοποιούν βιοσυνθετικά ένζυμα των ινδολικών ΓΚΣ (*EsCYP79B3*, *EsCYP83B1* και *EsSUR1*) και της συγκέντρωσης αυτού του τύπου ΓΚΣ.

Συσχέτιση με τη συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ παρατηρήθηκε και για το μεταγραφικό παράγοντα *EsMYB51*.

Πίνακας Δ4. Συσχέτιση σχετικής έκφρασης γονιδίων και συγκέντρωσης ΓΚΣ στις ρίζες

Correlations (Spreadsheet)  
 Marked correlations are significant at  $p < 0.0000$   
 N=12 (Case-wise deletion of missing data)

| Variable    | GRA     | GER     | GBS     | 4-MeO-GBS | GST     | Total Aliph | Total Inddl | Total Arom | Total GSL | ESMAM1  | ESCYP79F1 | ESCYP79F2 | ESCYP79B3 | ESCYP83A1 | ESCY83B1 | ESSUR1  | ESFMOSGox-5 | ESMVB34 | ESMVB51 |
|-------------|---------|---------|---------|-----------|---------|-------------|-------------|------------|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|-------------|---------|---------|
| GRA         | 1.0000  | 0.466   | -0.5701 | -0.8193   | -1.296  | 0.954       | -0.6914     | -1.296     | 0.905     | 0.4735  | 0.5481    | -0.6303   | -0.8656   | -0.0712   | -0.9317  | -0.9160 | -0.3185     | 0.3609  | -0.9302 |
| GER         | 0.466   | 1.0000  | -0.5102 | -0.8070   | -0.3494 | 0.976       | -0.6367     | -0.3494    | 0.950     | 0.3641  | 0.4393    | -0.4982   | -0.7252   | -0.2748   | -0.8437  | -0.9497 | -0.4691     | 0.4043  | -0.8452 |
| GBS         | -0.5701 | -0.5102 | 1.0000  | 0.8526    | -0.2574 | -0.5462     | 0.916       | -0.2574    | -0.5406   | 0.2153  | 0.634     | 0.5302    | 0.7396    | 0.2316    | 0.7728   | 0.5646  | 0.4904      | -0.1735 | 0.5254  |
| 4-MeO-GBS   | -0.8193 | -0.8070 | 0.8526  | 1.0000    | -1.180  | -0.8240     | 0.9367      | 1.180      | -0.7556   | -0.0461 | -0.1882   | 0.4709    | 0.7737    | 0.3234    | 0.8650   | 0.8357  | 0.5135      | -0.0598 | 0.7501  |
| GST         | -1.296  | -0.3494 | -0.2574 | -1.180    | 1.0000  | -0.2474     | -0.1294     | 1.0000     | -0.081    | 0.1670  | 0.2335    | -0.4771   | -0.3306   | 0.7392    | -0.1386  | 0.3342  | 0.5208      | 0.127   | 0.0311  |
| Total Aliph | 0.954   | 0.976   | -0.5462 | -0.8240   | -0.2474 | 1.0000      | -0.6671     | -0.2474    | 0.944     | 0.422   | 0.4981    | -0.5682   | -0.8033   | -0.1796   | -0.8980  | -0.9462 | -0.4023     | 0.3887  | -0.8980 |
| Total Inddl | -0.6914 | -0.6367 | 0.916   | 0.9367    | -0.1294 | -0.6671     | 1.0000      | -0.1294    | -0.6383   | 0.1274  | -0.0296   | 0.5274    | 0.7783    | 0.2734    | 0.8338   | 0.6636  | 0.5162      | -0.1381 | 0.6261  |
| Total Arom  | -1.296  | -0.3494 | -0.2574 | -1.180    | 1.0000  | -0.2474     | -0.1294     | 1.0000     | -0.081    | 0.1670  | 0.2335    | -0.4771   | -0.3306   | 0.7392    | -0.1386  | 0.3342  | 0.5208      | 0.127   | 0.0311  |
| Total GSL   | 0.905   | 0.950   | -0.5406 | -0.7556   | -0.081  | 0.944       | -0.6383     | -0.081     | 1.0000    | 0.567   | 0.6380    | -0.7084   | -0.8921   | 0.0596    | -0.9343  | -0.8741 | -0.2210     | 0.4277  | -0.9186 |
| ESMAM1      | 0.4735  | 0.3641  | 0.2153  | -0.0461   | -0.1670 | 0.422       | 0.1274      | 0.1670     | 0.567     | 1.0000  | 0.9619    | -0.4657   | -0.3692   | 0.6933    | -0.3410  | -0.2032 | 0.5458      | 0.1374  | -0.4549 |
| ESCYP79F1   | 0.5481  | 0.4383  | 0.634   | -0.1882   | 0.2335  | 0.4981      | -0.0266     | 0.2335     | 0.6380    | 0.9619  | 1.0000    | -0.5668   | -0.4907   | 0.6783    | -0.4457  | -0.3187 | 0.5354      | 0.1096  | -0.5558 |
| ESCYP79F2   | -0.6303 | -0.4982 | 0.5302  | 0.4709    | -0.4771 | -0.5682     | 0.5274      | -0.4771    | -0.7084   | -0.4657 | -0.5668   | 1.0000    | 0.8009    | -0.4324   | 0.6850   | 0.4468  | -0.1478     | -0.4531 | 0.7189  |
| ESCYP79B3   | -0.8656 | -0.7252 | 0.7396  | 0.7737    | -0.3306 | -0.8033     | 0.7783      | -0.3306    | -0.8921   | -0.3692 | -0.4907   | 0.8009    | 1.0000    | -0.1644   | 0.9557   | 0.7508  | 0.1844      | -0.2848 | 0.8860  |
| ESCYP83A1   | -0.0712 | -0.2748 | 0.2316  | 0.3234    | 0.7392  | -0.1796     | 0.2734      | 0.7392     | 0.0596    | 0.6933  | 0.6783    | -0.4324   | -0.1644   | 1.0000    | 0.0037   | 0.3690  | 0.8435      | -0.0511 | -0.0256 |
| ESCY83B1    | -0.9317 | -0.8437 | 0.7728  | 0.8650    | -1.386  | -0.8980     | 0.8338      | -1.386     | -0.943    | -0.3410 | -0.4457   | 0.6850    | 0.9557    | 0.0037    | 1.0000   | 0.8358  | 0.3605      | -0.3351 | 0.8615  |
| ESSUR1      | -0.9160 | -0.9497 | 0.5646  | 0.857     | 0.342   | -0.9462     | 0.6636      | 0.342      | -0.8741   | -0.2032 | -0.3187   | 0.4498    | 0.7508    | 0.3690    | 0.8358   | 1.0000  | 0.5248      | -0.2820 | 0.8672  |
| ESFMOSGox-5 | -0.3185 | -0.4691 | 0.4904  | 0.5135    | 0.5208  | -0.4023     | 0.5162      | 0.5208     | -0.2210   | 0.5458  | 0.5354    | -0.1478   | 0.1844    | 0.8435    | 0.3605   | 0.5248  | 1.0000      | -0.2431 | 0.2311  |
| ESMVB34     | 0.3609  | 0.4043  | -0.1735 | -0.0598   | 0.127   | 0.3887      | -0.1381     | 0.127      | 0.4277    | 0.1374  | 0.1096    | -0.4531   | -0.2848   | -0.0511   | -0.3351  | -0.2820 | -0.2431     | 1.0000  | -0.2540 |
| ESMVB51     | -0.9302 | -0.8452 | 0.5254  | 0.7501    | 0.0311  | -0.8980     | 0.6261      | 0.0311     | -0.9186   | -0.4549 | -0.5558   | 0.7189    | 0.8860    | -0.0256   | 0.8615   | 0.8672  | 0.2311      | -0.2540 | 1.0000  |

## 1.2. Συζήτηση

Η διαδικασία προσαρμογής των φυτών σε τροφопενία αζώτου και θείου έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα ως μια αλληλοεξαρτώμενη απόκριση στη φυσιολογία των φυτών, που αποτελείται από πλήθος διασταυρούμενων και αλληλένδετων μονοπατιών βιοσύνθεσης και καταβολισμού βιομορίων καθώς και μονοπατιών απόκρισης στις καταστάσεις καταπόνησης που δημιουργούνται. Τα μονοπάτια αυτά δεν αφορούν μόνο στον πρωτογενή μεταβολισμό αλλά έχουν σαφείς προεκτάσεις στον εξειδικευμένο μεταβολισμό των φυτικών ειδών όπως αυτός διαμορφώνεται από τις σχέσεις εξάρτησης και ανάδρασης που έχουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες με τις βασικές λειτουργίες της φυσιολογίας τους.

Το άζωτο αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών, αφού αποτελεί δομικό συστατικό πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Η ανεπάρκεια αζώτου εκτός του ότι προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην ανάπτυξη, έχει και επίδραση στα μεταβολικά προφίλ των φυτών. Τα αμινοξέα τείνουν να μειώνονται, ενώ τα σάκχαρα και οι δευτερογενείς μεταβολίτες τείνουν να αυξάνονται κάτω από χαμηλή παροχή αζώτου σε φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum*; Fritz et al., 2006a, 2006b), τομάτας (*Solanum lycopersicum*; Urbanczyk-Wochniak & Fernie, 2005) και *Arabidopsis* (Tschoep et al., 2009; Krapp et al., 2011). Είναι γνωστό ότι τα φυτά μπορούν να προσαρμοστούν σε περιορισμούς στην παροχή αζώτου με τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του συστήματος πρόσληψης νιτρικών στη ρίζα και με τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της χρησιμοποίησης του αζώτου εντός του φυτού (Hirel et al., 2001, 2007).

Το θείο αποτελεί βασικό (και το λιγότερο άφθονο) μακροστοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών με καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία ενζύμων και σε άλλες ποικίλες ηλεκτροχημικές λειτουργίες των βιομορίων στο κύτταρο. Τα φυτά χρησιμοποιούν θειούχες ενώσεις για τη σύνθεση των διαφόρων πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών. Τροφопενία θείου η οποία μειώνει το επίπεδο των αμυντικών ουσιών που περιέχουν θείο, όπως στοιχειακό θείο, H<sub>2</sub>S, γλουταθειόνη, φυτοχελατίνες, διάφορους δευτερογενείς μεταβολίτες και πλούσιες σε θείο πρωτεΐνες, προφανώς συνδέεται με μειωμένη αντοχή των φυτών, ενώ η λίπανση με

θείο αυξάνει την αντίσταση σε παθογόνα και στρες. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται θείο-επαγόμενη αντίσταση (sulfur-induced-resistance, SIR) (Rausch & Wachter, 2005; Kruse et al., 2007). Η έλλειψη (τροφοπενία) θείου εκλαμβάνεται στη φυσιολογία των φυτών ως έλλειψη του στοιχείου συγκριτικά με την επάρκεια αζώτου (Hirai & Saito, 2004). Αντιστρόφως, υπάρχει άμεση επίδραση της τροφοπενίας θείου στη λειτουργία διαφόρων ενζύμων με κομβικό ρόλο στην αφομοίωση του αζώτου. Έτσι έχει παρατηρηθεί ότι μια μακροχρόνια έλλειψη θείου οδηγεί σε μείωση της δράσης της νιτρικής αναγωγάσης αλλά και των μεταγράφων του αντίστοιχου γονιδίου. Έχει προταθεί ότι η τροποποίηση στη γονιδιακή έκφραση της νιτρικής αναγωγάσης αντιπροσωπεύει τμήμα της στρατηγικής που αναπτύσσεται από τα φυτά ως αντοχή στην έλλειψη θείου (Migge et al, 2000, Prosser et al, 2001; Kaur et al, 2011).

### **Προσαρμογή του μεταβολικού προτύπου γλυκοσινολικών οξέων σε συνθήκες έλλειψης αζώτου και θείου**

Από τον προσδιορισμό των ΓΚΣ σε φύλλα και ρίζες των φυτών του πρώτου πειράματος (Παράρτημα Ι), βρέθηκαν συνολικά έξι διαφορετικά ΓΚΣ στα φύλλα (4 αλειφατικά: GRA (glucoraphanin), GER (glucoerucin), GNA (gluconapin) και GSV (glucosativin)) και 2 ινδολικά: GBS (glucobrassicin) και 4-MeO-GBS (4-methoxy-glucobrassicin)) και πέντε στις ρίζες (2 αλειφατικά: GRA και GER, 2 ινδολικά: GBS και 4-MeO-GBS και 1 αρωματικό: GST (gluconasturtiin)). Συγκριτικά στους δύο ιστούς μετρήθηκαν παρόμοιες συγκεντρώσεις ολικών γλυκοσινολικών οξέων. Η σύσταση όμως και η συγκέντρωσή τους και στους δύο ιστούς επηρεάστηκε σημαντικά από τη διαθεσιμότητα αζώτου και θείου, όπως αυτή καθορίστηκε με το σχήμα λίπανσης που εφαρμόστηκε στην υδροπονική καλλιέργεια .

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών ΓΚΣ παρατηρήθηκαν υπό συνθήκες βέλτιστης διαθεσιμότητας αζώτου και θείου και στα δύο φυτικά όργανα, ενώ οι χαμηλότερες παρατηρήθηκαν όταν το θείο ήταν ο περιοριστικός παράγοντας. Η έλλειψη θείου επηρεάζει το αμινοξικό προφίλ των φυτών, προκαλώντας μείωση σε αμινοξέα πλούσια σε θείο, όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη (Mortensen et al.,

1994; Hesse et al., 2004). Εξαιτίας της μειωμένης αφομοίωσης θείου, η σύνθεση της κυστεΐνης και η παραγωγή ενώσεων που προκύπτουν από αυτήν όπως η μεθειονίνη μειώνονται (Leustek et al., 2000). Επιπλέον, το θείο συμμετέχει σε ποικίλες ηλεκτροχημικές λειτουργίες των βιομορίων στο κύτταρα ενώ τα φυτά χρησιμοποιούν θειϊκές ενώσεις, όπως γλουταθειόνη και PAPS για τη βιοσύνθεση των διαφόρων πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχουν θείο όπως τα ΓΣΚ. Επομένως, τόσο η βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ που απαιτεί μεθειονίνη ως πρόδρομο μόριο όσο και των ινδολικών και αρωματικών ΓΚΣ που απαιτεί το σχηματισμό των S-ακυλ-θειοϋδροξιμικών ενώσεων και τη μεταφορά της θειικής ομάδας, με δότη το 3'-φωσφοαδενοσινο-5'-φωσφοθειϊκό (PAPS), αναμένεται να εμφανίσει ευαίσθητη απόκριση στα επίπεδα θείου που παρέχονται στο φυτό (Zimmermann, 2005).

Στα φύλλα και οι τρεις καταστάσεις τροφοπενίας που εφαρμόστηκαν οδήγησαν σε μείωση των συγκεντρώσεων των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ. Μάλιστα στις δύο περιπτώσεις που υπήρχε έλλειψη μόνο θείου (+N/-S, -N/-S) παρατηρήθηκε η μικρότερη συγκέντρωση όλων των αλειφατικών ΓΚΣ. Ειδικότερα για τα αλειφατικά, φαίνεται ότι όταν το θείο είναι ο περιοριστικός παράγοντας, η παροχή του αζώτου δεν παίζει ρόλο στη συγκέντρωσή τους που παραμένει μειωμένη. Γενικότερα λίγες προηγούμενες μελέτες έχουν γίνει που αφορούν την επίδραση της λίπανσης στο μεταβολικό προφίλ ΓΚΣ σε καλλιεργούμενα φυτά και είναι σχετικές με την επίδραση της τροφοπενίας (*Brassica rapa* (Kim et al., 2002; Li et al., 2007), *Brassica oleracea* (Rosen et al., 2005), *Brassica napus* (Fismes et al., 2000), *Nasturtium officinale* (Kopsel et al., 2007), μπρόκολο (Schonhof et al., 2007; Omirou et al., 2009), αλλά και ρόκα (Omirou et al., 2012). Στις όλες τις περιπτώσεις, όταν η παροχή θείου αυξάνεται προκαλεί αύξηση στο περιεχόμενο σε ΓΚΣ, όπως παρατηρείται και στην παρούσα εργασία. Ειδικά για την επίδραση της ταυτόχρονης παροχής αζώτου και θείου στη συγκέντρωση και το περιεχόμενο των ΓΚΣ υπάρχουν λιγότερα δεδομένα αλλά και πάλι έχει αναφερθεί ως σημαντική για το μπρόκολο (Schonhof et al., 2007; Omirou et al., 2009), αλλά και τη ρόκα (Omirou et al., 2012). Στην παρούσα μελέτη, όταν το άζωτο αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα, η αύξηση του θείου προκαλεί αύξηση στη συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ στα φύλλα της ρόκας. Παρόμοια

απόκριση έχει παρατηρηθεί με την εφαρμογή τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου σε φύλλα και ανθοκεφαλές μπρόκολου όπου η αύξηση του παρεχόμενου θείου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στη συγκέντρωση τόσο των αλειφατικών όσο και των ινδολικών ΓΚΣ (Omirou et al, 2009).

Στις ρίζες η κατάσταση είναι διαφορετική και πιο πολύπλοκη. Παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ στις δύο μεταχειρίσεις όπου έλειπε ένα από τα δύο στοιχεία (-N/+S και +N/-S), ενώ όταν έλειπαν και τα δύο (-N/-S) επήλθε αύξηση. Ειδικότερα, όταν το θείο είναι ο περιοριστικός παράγοντας η συγκέντρωσή των αλειφατικών ΓΚΣ μειώνεται με αύξηση του αζώτου. Αυτό συμφωνεί με τη γενικότερη παρατήρηση ότι η έλλειψη (τροφοπενία) θείου εκλαμβάνεται στη φυσιολογία των φυτών ως έλλειψη του στοιχείου συγκριτικά με την επάρκεια αζώτου (Hirai & Saito, 2004). Το αντίστοιχο συμβαίνει και όταν το άζωτο είναι ο περιοριστικός παράγοντας, αφού η αύξηση του θείου προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης. Όσον αφορά στη συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ, μείωση παρατηρήθηκε και στις δύο μεταχειρίσεις όπου έλειπε το άζωτο (-N/+S και -N/-S), ενώ αύξηση παρατηρήθηκε στη μεταχείριση που έλειπε μόνο το θείο (+N/-S). Σε αντίθεση δηλαδή με τα αλειφατικά ΓΚΣ, όταν το άζωτο είναι ο περιοριστικός παράγοντας, η παροχή του θείου δε φαίνεται να επηρεάζει τη συγκέντρωση των ινδολικών, που παραμένει το ίδιο μειωμένη. Όταν το θείο είναι ο περιοριστικός παράγοντας, η συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ αυξάνεται με την παροχή του αζώτου. Παρόμοια απόκριση έχει παρατηρηθεί στις ρίζες φυτών μπρόκολου όπου με αύξηση του χορηγούμενου αζώτου κάτω από περιορισμό η συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ αυξήθηκε (Omirou et al, 2009). Ομοίως, η συγκέντρωση των ολικών ινδολικών ΓΚΣ σε ρίζες *B.rapa* (εδώδιμο τμήμα του φυτού) υπό έλλειψη θείου αυξήθηκε όταν τα επίπεδα παρεχόμενου αζώτου ήταν τα υψηλότερα (Li et al., 2007). Η αύξηση των ινδολικών ΓΚΣ με αύξηση του αζώτου στις ρίζες των φυτών, τα οποία αναπτύσσονται υπό συνθήκες τροφοπενίας θείου μπορεί να εξηγηθεί, γιατί στο *Arabidopsis* η ανεπάρκεια θείου έχει συνδεθεί με υψηλότερη περιεκτικότητα σε τρυπτοφάνη, η οποία αποτελεί πρόδρομο αμινοξύ των ινδολικών ΓΚΣ (Nikiforova et al., 2003). Επιπλέον, περισσότερο θείο χρειάζεται για τη σύνθεση αλειφατικών παρά ινδολικών ΓΚΣ, εξαιτίας των τριών ατόμων θείου αντί των δύο που χρειάζονται

για τη βιοσύνθεση αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας την κατάσταση στους δύο φυτικούς ιστούς παρατηρούμε ότι ενώ στα φύλλα σε όλες τις περιπτώσεις τα αλειφατικά ΓΚΣ μειώνονται, στη ρίζα η συγκέντρωσή τους αυξάνεται όταν υπάρχει ταυτόχρονη έλλειψη αζώτου και θείου. Κάτι παρόμοιο συμβαίνει και με τα ινδολικά ΓΚΣ. Ενώ σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωσή τους στα φύλλα μειώνεται, στη ρίζα η συγκέντρωσή τους αυξάνεται όταν υπάρχει έλλειψη μόνο του θείου. Η διαφορετική συμπεριφορά δηλαδή μεταξύ φύλλων και ρίζας εντοπίζεται στη μεταχείριση -N/-S για τα αλειφατικά και στη μεταχείριση +N/-S για τα ινδολικά ΓΚΣ.

### **Προσαρμογή της γονιδιακής έκφρασης σε συνθήκες έλλειψης αζώτου και θείου**

Στην παρούσα μελέτη καταγράφηκε η σχέση γονιδιακής έκφρασης (μετάγραφα) των βιοσυνθετικών γονιδίων ΓΣΚ με το τελικό μεταβολικό προφίλ των φυτών ρόκας στις διαφορετικές συνθήκες λίπανσης. Το γλυκοσινολικό προφίλ και περιεχόμενο των φυτών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που έχουν να κάνουν με το ίδιο το φυτό (είδος φυτού, αναπτυξιακό στάδιο), και από περιβαλλοντικές καταστάσεις (Kushad et al., 1999; Rangkadilok et al., 2004; Cartea et al., 2008). Η επίδραση της λίπανσης στα βιοσυνθετικά μονοπάτια των ΓΣΚ έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα μόνο στο *Arabidopsis* με πειράματα συστημικής βιολογίας (με χρήση μικροσυστοιχιών και ανάλυση ολικών μεταβολιτών) που επέτρεψαν τη συσχέτιση των μεταγραφικών προτύπων γονιδίων με τα μεταβολικά προφίλ (Hirai et al., 2003; Nikiforova et al., 2003; Maruyama-Nakashita et al., 2003; Hirai et al., 2004). Τα σχήματα λίπανσης που έχουν μελετηθεί αφορούν κυρίως την τροφοπενία θείου, η οποία εφαρμόστηκε σε φυτά για μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Επιπλέον αυτές οι προσεγγίσεις γενομικής και μεταβολομικής αλλαγές εντόπισαν τις αναμενόμενες αλλαγές στη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη και αφομοίωση θείου αλλά αποκάλυψαν επίσης και ένα δίκτυο αλληλεπιδρώντων μεταβολικών μονοπατιών ανάμεσα στο μεταβολισμό θείου και (α) στην μεταγωγή σήματος ιασμονικού οξέος και αυξίνης, (β) στην απόκριση σε οξειδωτική καταπόνηση και (γ) στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Hirai & Saito, 2004). Από μελέτες βιολογίας συστημάτων που έγιναν στο *Arabidopsis* έχει

προταθεί ένα μοντέλο που προτείνει την ύπαρξη δύο καταστάσεων, της κατάστασης περιορισμού (βραχυπρόθεσμη απόκριση) και της κατάστασης ανεπάρκειας (μακροχρόνια απόκριση) (Hoefgen & Nikiforova, 2008). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η αυξίνη εμπλέκεται στις φυσιολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της βραχυπρόθεσμης απόκρισης και ο μεταβολισμός κινείται προς εντατικοποίηση της πρόσληψης και αφομοίωσης θείου. Στην περίπτωση μιας παρατεταμένης περιόδου τροφοπενίας θείου, η επόμενη κατάσταση ορίζεται ως ανεπάρκεια θείου. Ο περιορισμός του θείου αυξάνει τη μεταφορά θεικών ενώσεων στις ρίζες, καθώς και τη δραστηριότητα της αναγωγάσης της φωσφορικής αδενοσίνης (APR), ενζύμου-κλειδιού της θειικής αφομοίωσης. Όταν το θείο είναι διαθέσιμο ξανά, και τα δύο αυτά στοιχεία του μεταβολισμού ρυθμίζονται προς τα κάτω (Vauclare et al., 2002) με μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταγραφικού, μετα-μεταγραφικού και μετα-μεταφραστικού ελέγχου. Έτσι, οι αντιδράσεις των φυτών σε τροφοπενία θείου μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κύριες φάσεις ανάλογα με το βαθμό και τη διάρκεια του ελλείμματος. Κατά την αρχική φάση, οι αλλαγές στην έκφραση αφορούν κυρίως τα γονίδια του μονοπατιού αφομοίωσης και πρόσληψης του θείου. Μετά από αυτή τη φάση, όταν το θείο εξακολουθεί να είναι περιοριστικός παράγοντας, οι αλλαγές αφορούν πολλαπλές μεταβολικές οδούς. Τα φυτά ξεκινούν την αμυντική απόκριση στην καταπόνηση και ρυθμίζουν προς τα κάτω τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη και αφομοίωση του αζώτου. Αυτή η φάση ακολουθείται από αλλαγές σε αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως επαγωγή της γήρανσης, αναστολή της αύξησης ρίζας και βλαστών, και πρόωμη αναπαραγωγή με σκοπό τη διατήρηση των αποθεμάτων για παραγωγή σπόρων. Μακροχρόνια πενία θείου προκαλεί μείωση στα επίπεδα ολικών πρωτεϊνών, χλωροφύλλης, RNA και βιομάζας. Ένα από τα οπτικά συμπτώματα είναι η χλώρωση που εμφανίζεται κυρίως σε νεαρά φύλλα τα οποία παράγουν ανεπαρκείς ποσότητες χλωροφύλλης και λιπιδίων και η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και μια συνολική πτώση του μεταβολισμού. (Maruyama-Nakashita et al., 2003; Nikiforova et al., 2003; Lewandowska et al., 2005; Wawrzynska et al., 2005).

Έχοντας υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα από το *Arabidopsis*, στην παρούσα



εργασία σχεδιάστηκε το πειραματικό σχέδιο της λίπανσης αζώτου και θείου ώστε να ανταποκρίνεται σε κατάσταση ανεπάρκειας των θρεπτικών στοιχείων (μακροχρόνιας τροφοπενίας αζώτου και θείου). Στα σχήματα λίπανσης που μελετήθηκαν στο *Arabidopsis* υπάρχει και μια μελέτη που αφορά την υδροπονική καλλιέργεια φυτών *Arabidopsis* σε μακροχρόνια τροφοπενία αζώτου και θείου (Hirai et al, 2004) και η οποία θα μπορούσε να θεωρηθεί άμεσα συγκρίσιμη με το σχέδιο του πειράματος I που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία. Στα γονίδια που αναλύθηκαν μέσω των μικροσυστοιχιών στο *Arabidopsis* υπήρχαν και γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή των ΓΣΚ στο *Arabidopsis* και τα οποία βρέθηκαν να ελέγχονται σε μεταγραφικό επίπεδο από την τροφοπενία θείου (και αζώτου).

Τα επίπεδα των μεταβολιτών ρυθμίζονται από αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, τη συσσώρευση πρωτεϊνών και την ενζυματική δραστηριότητα. Με τη σειρά τους αυτές οι διαδικασίες ρυθμίζονται από τα μεταβολικά επίπεδα. Τέτοιες αμοιβαίες ρυθμίσεις συνθέτουν περίπλοκα δίκτυα για τη διατήρηση της μεταβολικής ισορροπίας, κυρίως στον πρωτογενή αλλά και στο δευτερογενή μεταβολισμό. Τα φυτά του πειράματος προσαρμόστηκαν στη μακροχρόνια τροφοπενία του σχήματος λίπανσης διαμορφώνοντας μια σταθερή μεταγραφική και μεταβολική κατάσταση μετά από εξισορρόπηση των δυναμικών αλλαγών στις διαδικασίες αυτές.

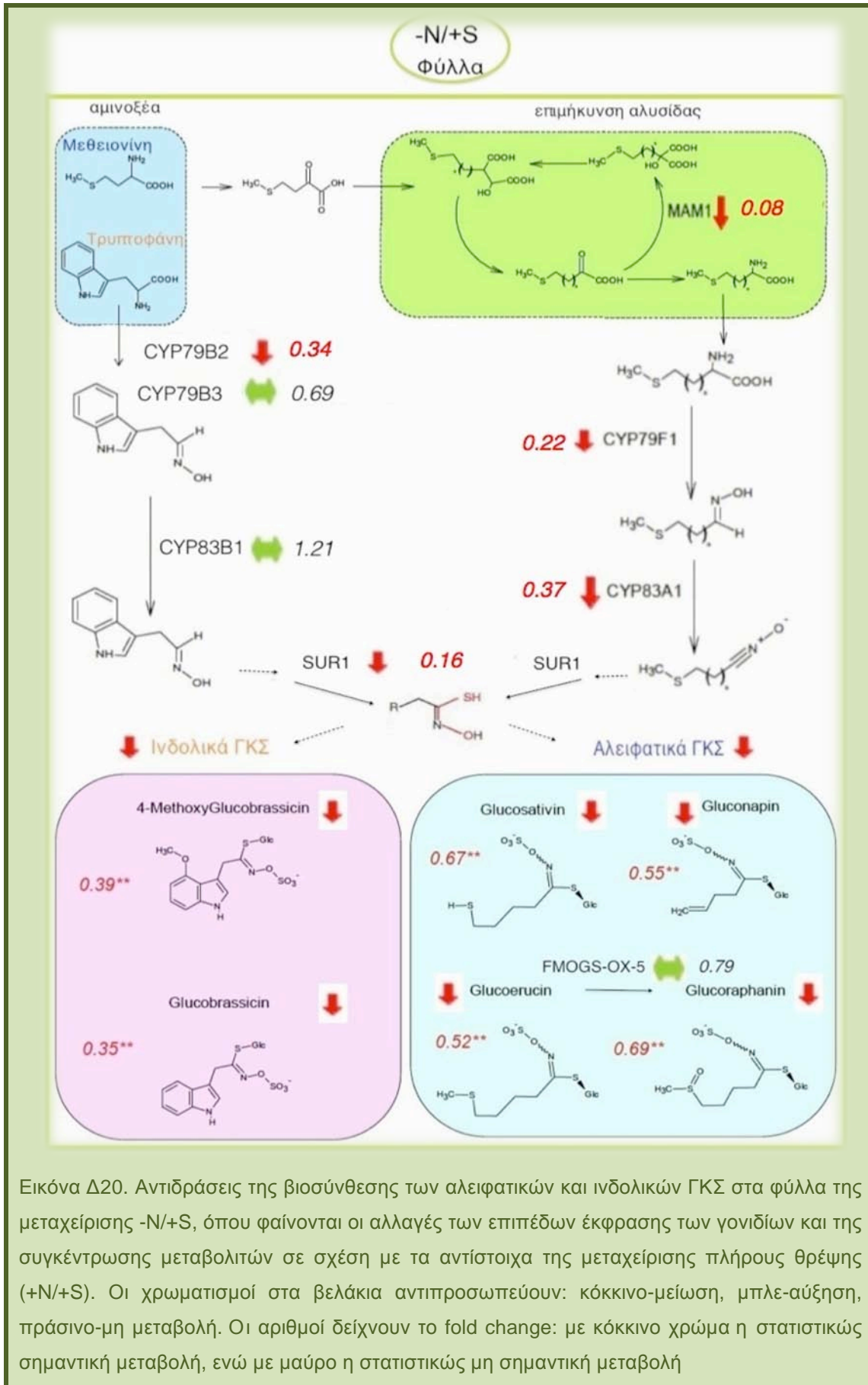
Η έκφραση των γονιδίων της ρόκας που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των μορίων τόσο των αλειφατικών όσο και των ινδολικών ΓΚΣ επηρεάζεται κάτω από περιοριστικές συνθήκες αζώτου και θείου. Επίσης, η διαθεσιμότητα των δύο στοιχείων επηρεάζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις των αντίστοιχων μεταβολιτών, χωρίς να υπάρχει ακριβής αντιστοίχιση έκφρασης γονιδίων και συγκέντρωσης μεταβολιτών σε όλες τις περιπτώσεις. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών αποτελούν μέρος του δικτύου της σύνθεσης ενεργών θειικών ενώσεων, η οποία περιλαμβάνει επίσης γονίδια του πρωτογενούς μεταβολισμού του θείου (Yatusevich et al., 2010). Επομένως, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αναμένεται να είναι πολύπλευρη. Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων (Levy et al., 2005; Celenza et al., 2005; Maruyama-Nakashita et al., 2006; Skirycz et al., 2006; Hirai et al., 2007;

Sønderby et al., 2007; Gigolashvili et al., 2007a, 2007b, 2008; Malitsky et al., 2008) που ενσωματώνουν πολλά διαφορετικά μονοπάτια απόκρισης σε ενδογενείς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η έλλειψη των στοιχείων N και S οδηγεί σε αρκετά μειωμένα επίπεδα σε ιστούς φύλλων, ενώ σε ιστούς ρίζας η κατάσταση είναι πιο πολύπλοκη και σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται αύξηση των ΓΚΣ που παράγονται. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η αφομοίωση του αζώτου και του θείου στις πρόδρομες ενώσεις των ΓΣΚ συμβαίνει στα φύλλα και ίσως το φυτό να έχει την ικανότητα να ρυθμίζει άμεσα τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μόλις παρουσιαστεί έλλειψη κάποιου θρεπτικού στοιχείου, με επακόλουθη εξισορρόπηση των μεταβολιτών. Αντίθετα στις ρίζες λαμβάνει χώρα η πρόσληψη αυτών των θρεπτικών στοιχείων και το φυτό είναι αναγκασμένο να συντονίσει αυτή τη λειτουργία με το μεταβολισμό των ΓΚΣ. Επιπλέον, επειδή οι ρίζες στις οποίες λείπουν θρεπτικά στοιχεία είναι επιρρεπείς σε επίθεση από παθογόνα, να προσπαθούν να συσσωρεύσουν περισσότερα γλυκοσινολικά για μια ενδεχόμενη επίθεση (Hirai et al., 2004). Αυτό πετυχαίνεται με την επαγωγή της έκφρασης των αντίστοιχων βιοσυνθετικών γονιδίων και πιθανώς με μεταφορά γλυκοσινολικών από τα φύλλα.

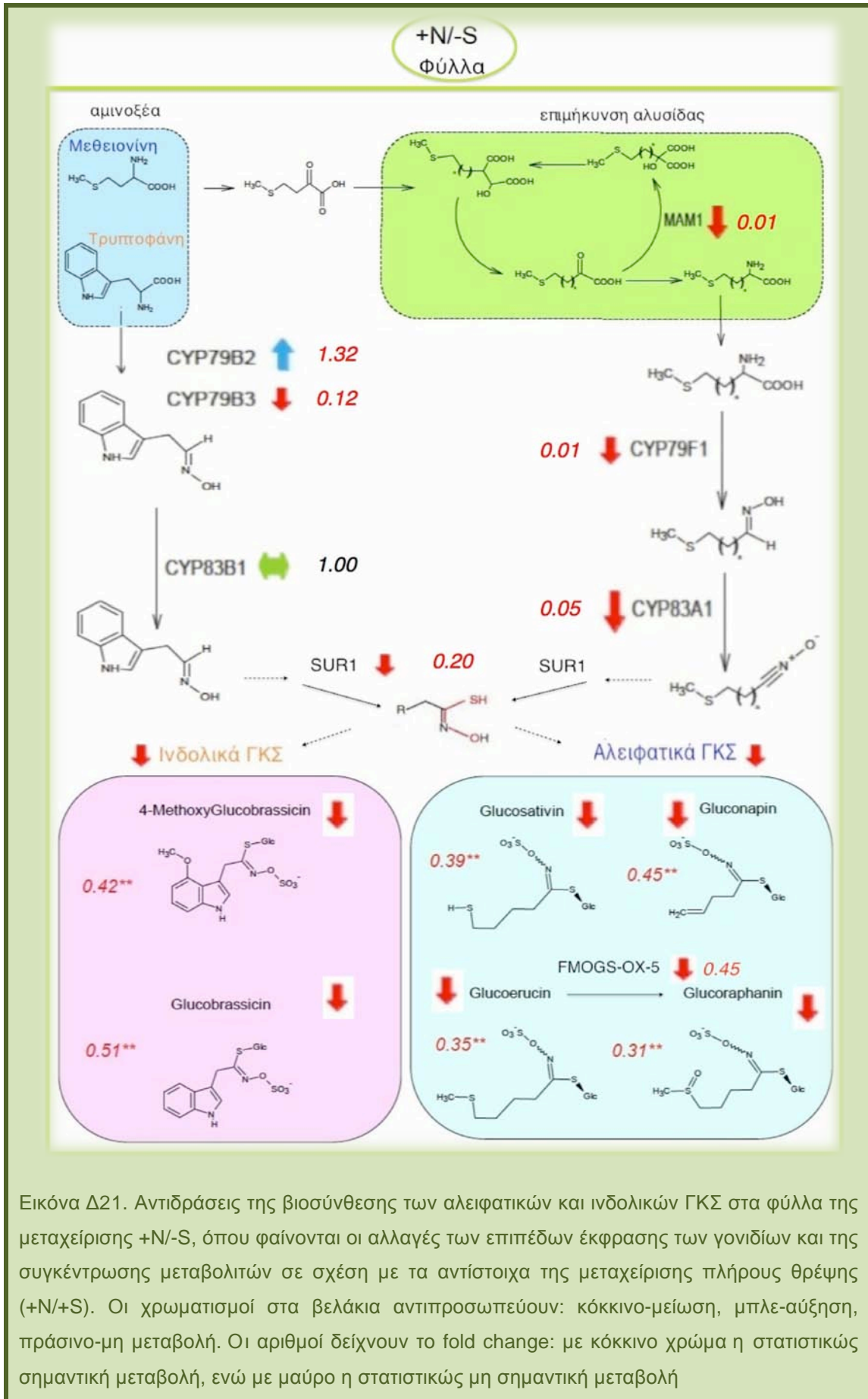
Πιο συγκεκριμένα, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής σε ότι αφορά στη συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης και του μεταβολικού προτύπου ΓΚΣ υπό μακροχρόνια τροφοπενία αζώτου και θείου στα φύλλα προκύπτει ότι η σχετική έκφραση όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ (*EsMAM-1*, *EsCYP79F1*, *EsCYP83A1*, *EsSUR1* και *EsFMOGSox-5*) ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο. Και οι τρεις συνθήκες τροφοπενίας οδήγησαν σε μείωση των επιπέδων έκφρασης όλων των αλειφατικών γονιδίων. Φαίνεται μάλιστα ότι η έλλειψη του θείου είναι αυτή που επηρεάζει περισσότερο, αφού στη συνθήκη αυτή (+N/-S) τα επίπεδα έκφρασης όλων των αλειφατικών γονιδίων ήταν τα χαμηλότερα σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Επίσης, υπάρχει σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με την ολική συγκέντρωση αλειφατικών ΓΚΣ στους ίδιους ιστούς. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ (*EsCYP79B2*, *EsCYP79B3*, *EsCYP83B1*) δε συσχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με την ολική συγκέντρωση

ινδολικών ΓΚΣ.

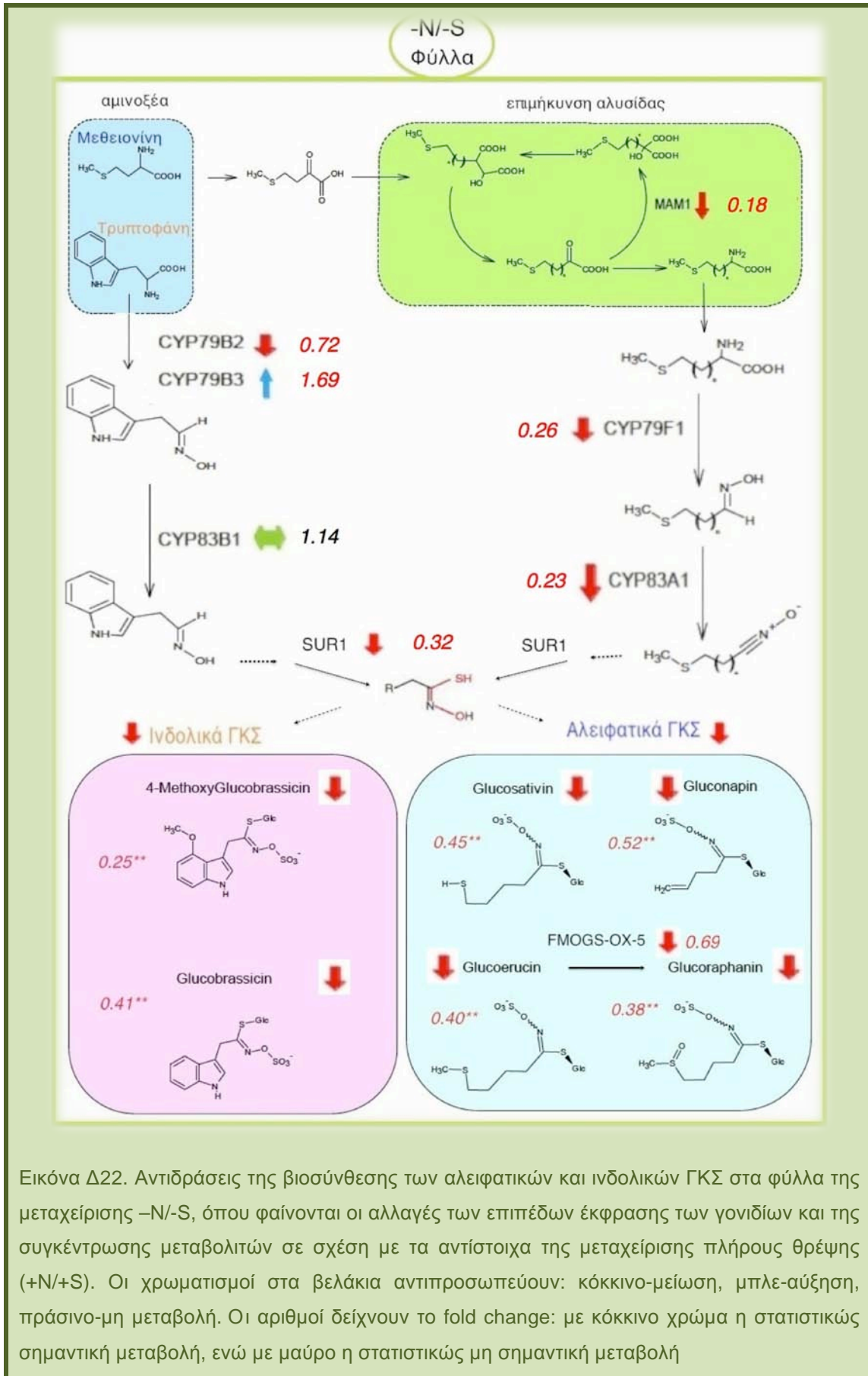
Οι συσχετισμοί μπορούν να γίνουν αντιληπτοί και από τις παρακάτω εικόνες Δ20-Δ22, όπου φαίνεται πώς μεταβάλλονται (fold change) τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων σε κάθε μεταχείριση (-N/+S, +N/-S, -N/-S), αλλά και τα επίπεδα της συγκέντρωσης των μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης +N/+S.



Εικόνα Δ20. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στα φύλλα της μεταχείρισης -N/+S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε-αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή. Οι αριθμοί δείχνουν το fold change: με κόκκινο χρώμα η στατιστικώς σημαντική μεταβολή, ενώ με μαύρο η στατιστικώς μη σημαντική μεταβολή



Εικόνα Δ21. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στα φύλλα της μεταχείρισης +N/-S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε-αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή. Οι αριθμοί δείχνουν το fold change: με κόκκινο χρώμα η στατιστικώς σημαντική μεταβολή, ενώ με μαύρο η στατιστικώς μη σημαντική μεταβολή



Το γονίδιο *EsSUR1* παρουσιάζει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση τόσο των αλειφατικών όσο και των ινδολικών ΓΚΣ. Αυτό υποδηλώνει ότι ανεξάρτητα από τον τύπο των ΓΚΣ η σχετική έκφραση του εν λόγω γονιδίου σχετίζεται σημαντικά με την συγκέντρωσή τους. Αυτό είναι αναμενόμενο αφού το εν λόγω γονίδιο εμπλέκεται στην κωδικοποίηση μιας C-S λυάσης που καταλύει την αντίδραση βιοσύνθεσης θειουδροξυμικών ενώσεων. Συμμετέχει δηλαδή στο μηχανισμό βιοσύνθεσης της κύριας δομής των ΓΚΣ και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου είναι άμεσα συνδεδεμένα με τη συγκέντρωση όλων των τύπων ΓΚΣ.

Το γονίδιο *EsFMOGSox-5* παρουσιάζει υψηλή θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της GRA ( $r=0.804$ ,  $p=0.002$ ). Η συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων συμμετέχει στην κωδικοποίηση ενζύμων που τροποποιούν την πλευρική αλυσίδα των αλειφατικών ΓΚΣ. Είναι γνωστό ότι στο φυτό της ρόκας, η GRA και η GER είναι μόρια με τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα στην πλευρική τους αλυσίδα. Η μοναδική διαφορά τους είναι η παρουσία οξυγόνου στο άτομο του θείου της πλευρικής αλυσίδας της GRA. Προηγούμενες μελέτες έχουν προτείνει ότι, η GRA προκύπτει από την οξείδωση της GER (Bennet et al., 2011). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι, όντως το γονίδιο *EsFMOGSox-5* εκφράζεται στα φύλλα του φυτού. Σε συνθήκες επάρκειας θείου, το γονίδιο εκφράζεται σταθερά ενώ ταυτόχρονα υπάρχει μια αναλογική αύξηση της συγκέντρωσης και της GRA που ακολουθεί τη συγκέντρωση της GER. Αυτό υποδηλώνει ότι η βιοσύνθεση των δύο αυτών ΓΚΣ είναι αλληλένδετη με αποτέλεσμα ο λόγος GRA/GER να παραμένει σταθερός. Σε συνθήκες έλλειψης θείου η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σημαντικά όπως και η συγκέντρωση της GRA. Ωστόσο ο λόγος της GRA/GER παραμένει σταθερός γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η έκφραση του γονιδίου *EsFMOGSox-5* ρυθμίζεται μεταγραφικά από τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης δεν επηρεάζει από μόνη της την έκφραση του γονιδίου αυτού αλλά αλληλεπιδρά σημαντικά ( $p<0.05$ ) με τη διαθεσιμότητα του θείου στα φυτά. Σε συνθήκες έλλειψης θείου η έλλειψη αζώτου έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της έκφρασης του γονιδίου ενώ ταυτόχρονα η συγκέντρωση της GRA παραμένει σταθερή. Η συμπεριφορά αυτή υποδηλώνει ότι σε αυτές τις συνθήκες το φυτό ενεργοποιεί μηχανισμούς

διατήρησης των επιπέδων της GRA και ένας από αυτούς είναι η επαγωγή του *EsFMOGSox-5*.

Επιπρόσθετα, οι μεταγραφικοί παράγοντες MYB34 και MYB51 που μελετήθηκαν είχαν σταθερή έκφραση σε όλες τις μεταχειρίσεις και δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση είτε με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ είτε με τα γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ.

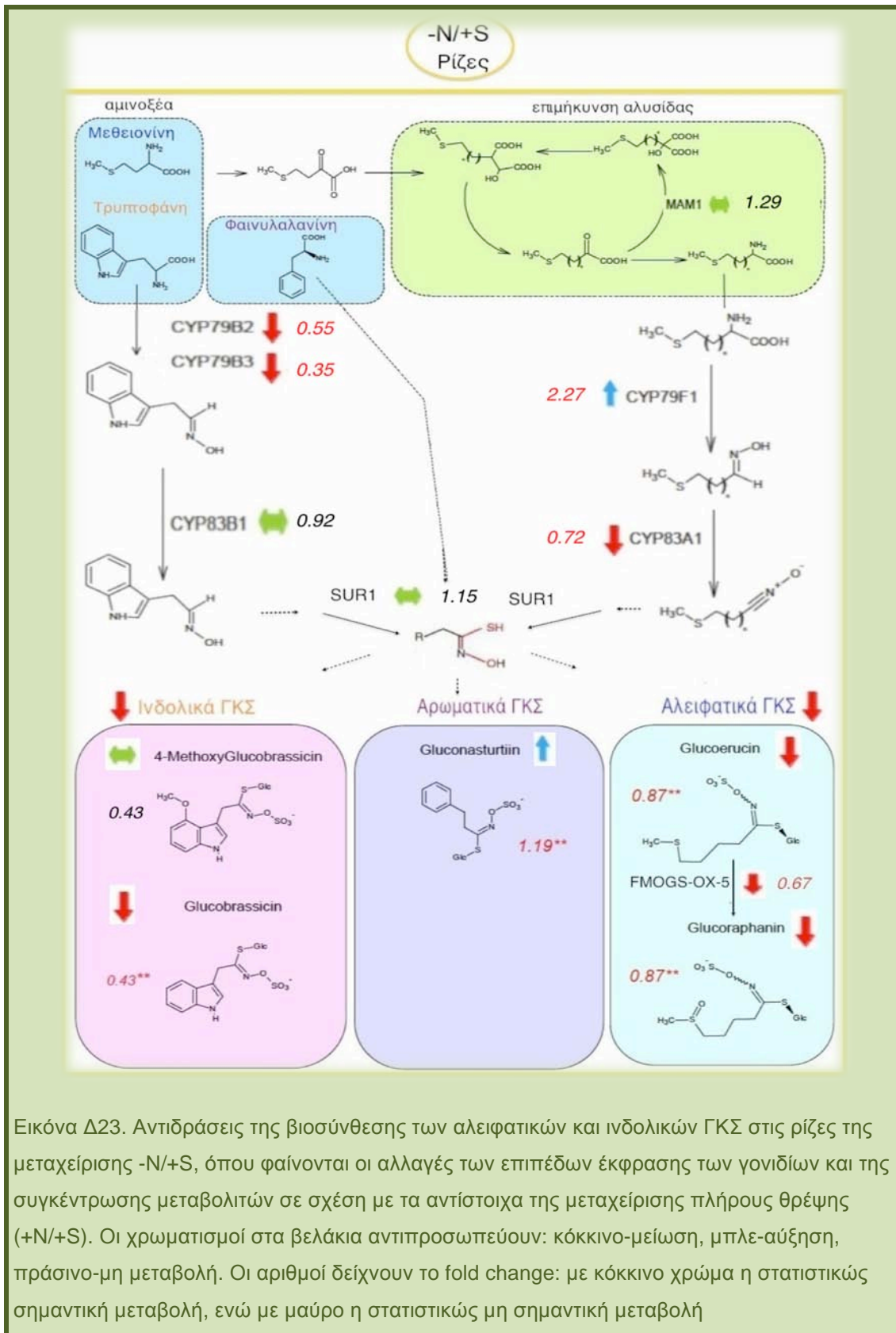
### *Ρίζες*

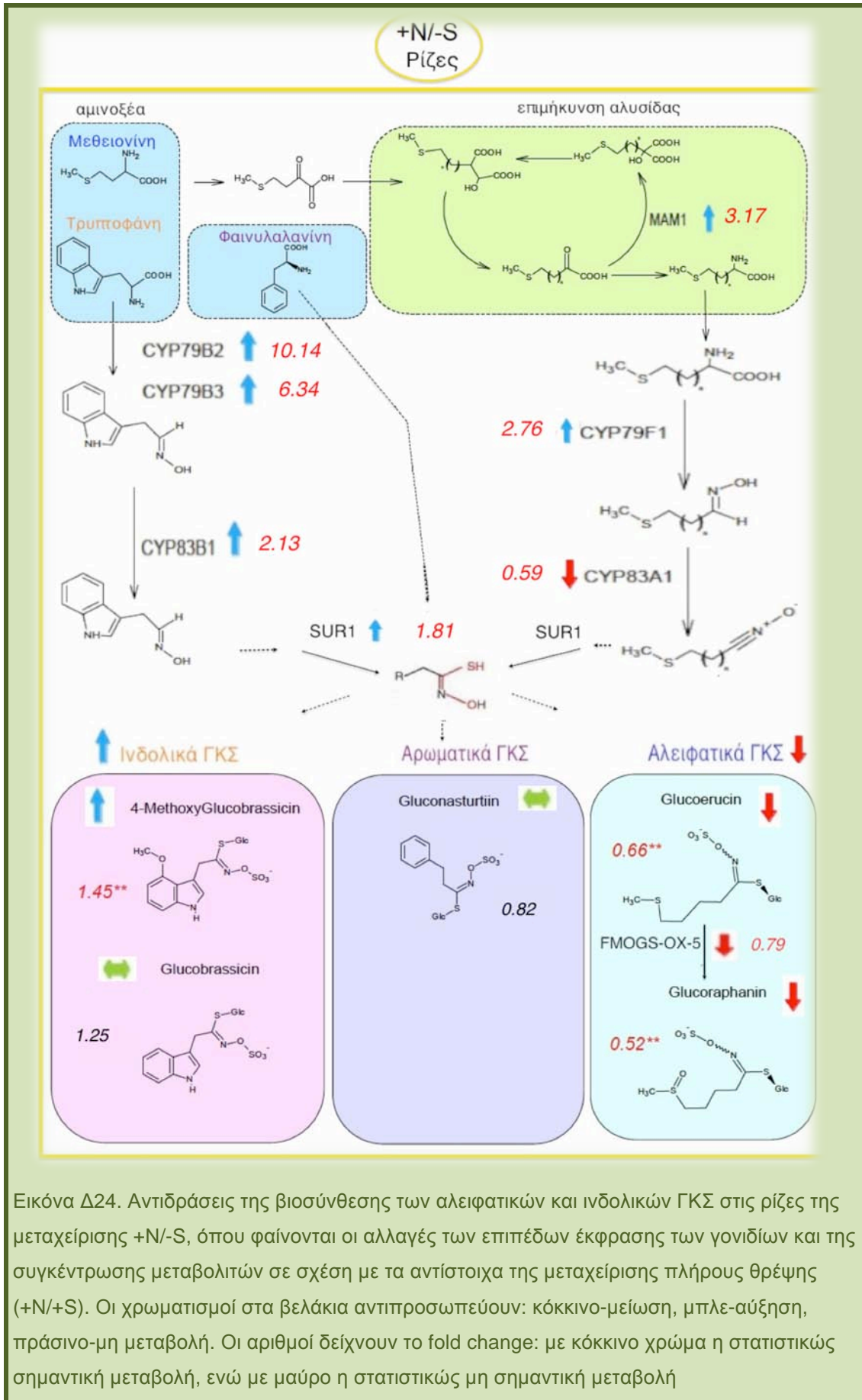
Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας σε ότι αφορά τη συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης και του μεταβολικού προτύπου ΓΚΣ υπό μακροχρόνια τροφοπενία αζώτου και θείου στις ρίζες, προκύπτει ότι η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ (*EsMAM-1*, *EsCYP79F1*, *EsCYP83A1*, *EsSUR1* και *EsFMOGSox-5*) επηρεάστηκε περισσότερο από την ταυτόχρονη έλλειψη και των δύο στοιχείων (-N/-S). Τα επίπεδα έκφρασης για καθένα από τα αλειφατικά γονίδια ήταν τα χαμηλότερα στη μεταχείριση αυτή σε σχέση με τις υπόλοιπες. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μεταχείριση ανιχνεύτηκαν τα υψηλότερα επίπεδα αλειφατικών ΓΚΣ. Γενικότερα στις ρίζες φαίνεται πως δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των αλειφατικών γονιδίων και της ολικής συγκέντρωσης αλειφατικών ΓΚΣ (εικόνες Δ23-Δ25).

Η έκφραση όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο στις περισσότερες συνθήκες και παρουσίασε συσχέτιση με τη συγκέντρωση των ολικών ινδολικών ΓΚΣ. Αυτό φαίνεται και στις παρακάτω εικόνες Δ23-Δ25. Η έλλειψη θείου (μεταχείριση +N/-S) φαίνεται πως επάγει την έκφραση όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ (*EsCYP79B2*, *EsCYP79B3*, *EsCYP83B1*, *EsSUR1*) μεταξύ αυτών και του μεταγραφικού παράγοντα *EsMYB51*, στην έκφραση του οποίου παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση στις ρίζες της ίδιας μεταχείρισης. Αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία και με τη συγκέντρωση των αντίστοιχων μεταβολιτών, που επίσης αυξήθηκε στη μεταχείριση αυτή (εικόνα Δ24). Η επαγωγή της μεταγραφής των

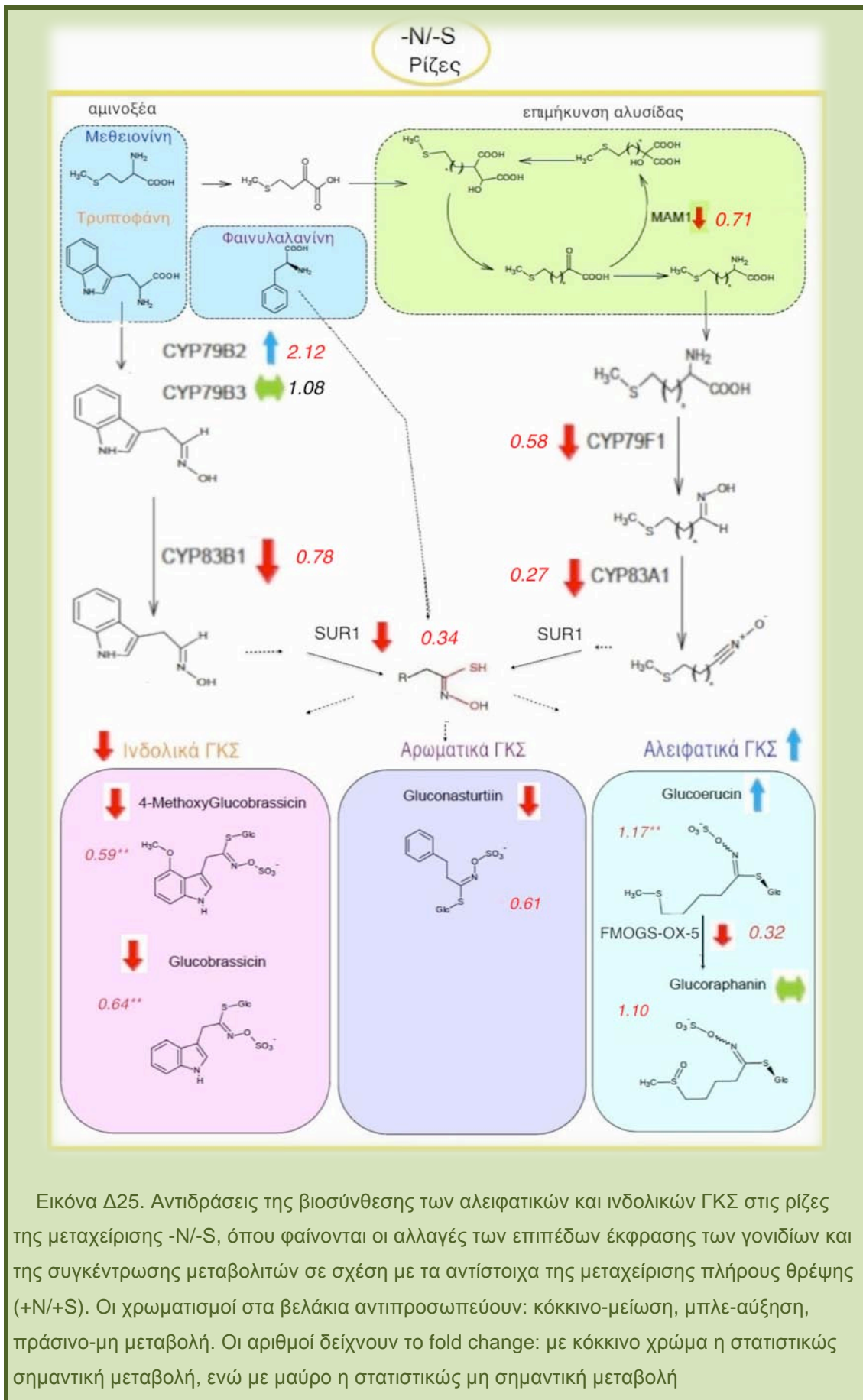


βιοσυνθετικών γονιδίων των ινδολικών ΓΚΣ έχει περιγραφεί και στα αντίστοιχα πειράματα τροφопενίας θείου στο *Arabidopsis* (Hirai et al, 2004).





Εικόνα Δ24. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στις ρίζες της μεταχείρισης +N/-S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε-αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή. Οι αριθμοί δείχνουν το fold change: με κόκκινο χρώμα η στατιστικώς σημαντική μεταβολή, ενώ με μαύρο η στατιστικώς μη σημαντική μεταβολή

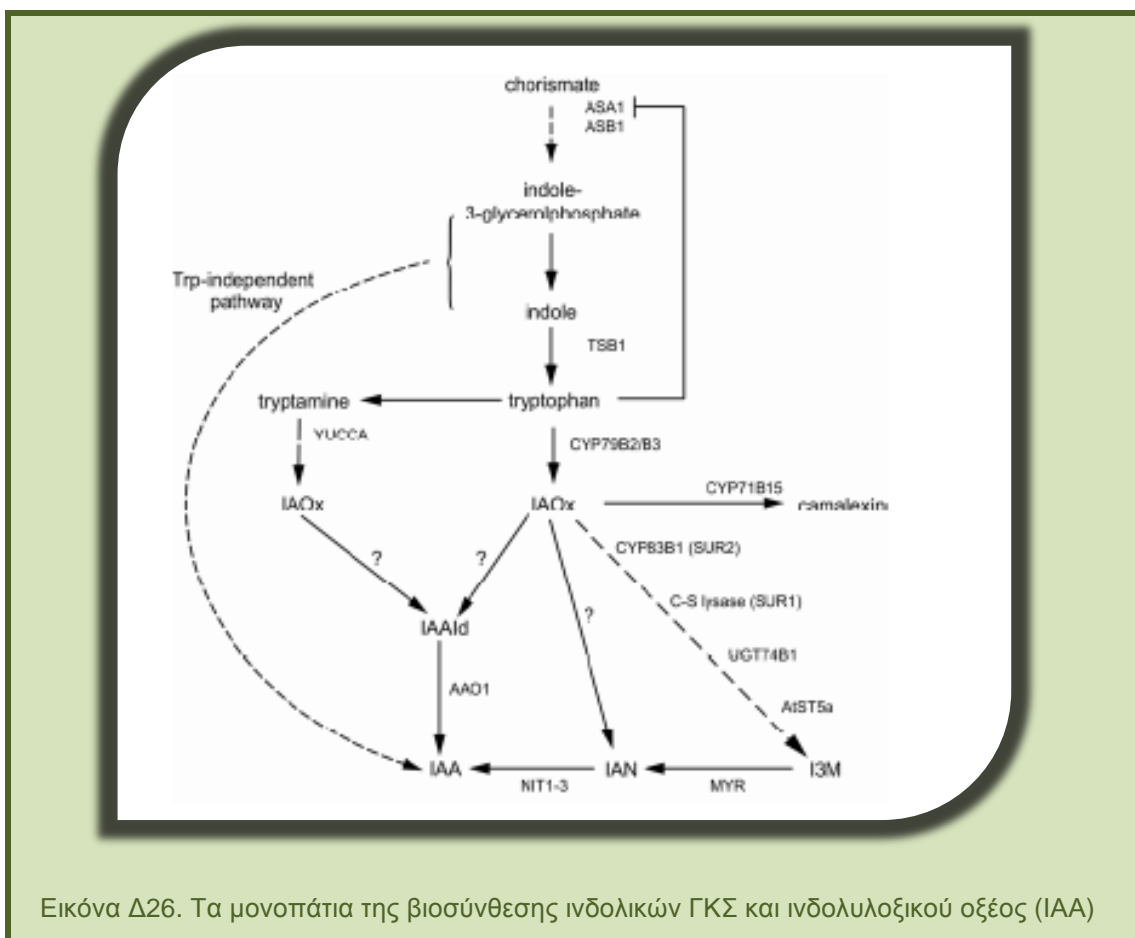


Εικόνα Δ25. Αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ στις ρίζες της μεταχείρισης -N/-S, όπου φαίνονται οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και της συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεταχείρισης πλήρους θρέψης (+N/+S). Οι χρωματισμοί στα βελάκια αντιπροσωπεύουν: κόκκινο-μείωση, μπλε-αύξηση, πράσινο-μη μεταβολή. Οι αριθμοί δείχνουν το fold change: με κόκκινο χρώμα η στατιστικώς σημαντική μεταβολή, ενώ με μαύρο η στατιστικώς μη σημαντική μεταβολή

Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των ινδολικών ΓΚΣ είναι άμεσα και στενά συνδεδεμένο με το μονοπάτι βιοσύνθεσης του ινδολυλοξικού οξέος (IAA) αφού μοιράζονται τα ίδια πρόδρομα μόρια (Grubb et al., 2004). Μερική ή ολική αναστολή της βιοσύνθεσης των ινδολικών ΓΚΣ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του IAA (Bak et al., 2001). Σε μεταλλάγματα διπλής σίγισης των γονιδίων *cyp79b2/cyp79b3* είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των ΓΚΣ αλλά ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του IAA (Zhao et al., 2002). Τα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θείου και αζώτου παρουσίασαν την μικρότερη συγκέντρωση ινδολικών ΓΚΣ καθώς επίσης και μικρότερη σχετική έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των μορίων αυτών. Αυτό πιθανότατα συνδέεται με ανακατεύθυνση της τρυπτοφάνης στο μονοπάτι βιοσύνθεσης του IAA με στόχο την αύξηση του ριζικού συστήματος και την καλύτερη εκμετάλλευση του εδάφους και κατ' επέκταση των διαθέσιμων θρεπτικών στοιχείων. Επιπλέον, η ανεπάρκεια θείου οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα κυστεΐνης και περίσσεια σερίνης η οποία μετατρέπεται σε τρυπτοφάνη, η οποία χρησιμοποιείται και για την παραγωγή ινδολικών ΓΚΣ (Hirai et al, 2004, Nikiforova et al, 2003).

Σε αυτές τις συνθήκες η συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ είναι ιδιαίτερα αυξημένη ενώ η σχετική έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τους είναι δραματικά μειωμένη. Αυτό πιθανόν να σχετίζεται με τις ιδιότητες των ενώσεων αυτών στην προστασία του φυτού από διάφορα παθογόνα εδαφογενή παθογόνα (Hirai et al., 2004). Η υψηλή όμως συγκέντρωσή τους δεν μπορεί να αιτιολογηθεί από τα μεταγραφήματα τα οποία μετρήθηκαν και ως εκ τούτου η παρουσία τους μάλλον οφείλεται σε μεταφορά από το υπέργειο τμήμα των φυτών. Αυτή η μεταφορά των αλειφατικών ΓΚΣ πιθανότατα συνδέεται με την ανάγκη προστασίας του ριζικού συστήματος κατά τη διάρκεια της αύξησής του. Ωστόσο αυτή η υπόθεση χρειάζεται περαιτέρω μελέτη και πρόσθετα πειράματα με σήμανση μορίων έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί. Μεταφορά των ΓΚΣ από τα φύλλα προς άλλα όργανα του φυτού μέσω του φλοιώματος έχει επιβεβαιωθεί με πειράματα στο *Arabidopsis* (Chen et al., 2001).

Σε συνθήκες έλλειψης θείου και επάρκειας αζώτου η έκφραση όλων των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ αυξάνει σημαντικά και αυτή η αύξηση της έκφρασης συσχετίζεται θετικά ( $r=0.64-0.84$ ,  $p<0.05$ ) με τη συγκέντρωση των τελικών μεταβολιτών. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην ανάγκη βιοσύνθεσης των ινδολικών ΓΚΣ αφού απαιτείται μικρότερη ποσότητα θείου για τη βιοσύνθεσή τους, ενώ τα μόρια αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθούν από το φυτό ως εναλλακτικές πηγές IAA (εικόνα Δ7).



## **2. Επίδραση εκχυλισμάτων ρόκας σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα**

Τις τελευταίες δεκαετίες υιοθετείται ολοένα και περισσότερο μια προσέγγιση πρόληψης και ελάττωσης των περιπτώσεων καρκίνου μέσω της κατανάλωσης τροφών με ιδιότητες προώθησης της υγείας του ανθρώπου. Στοιχεία από το World Cancer Research Fund και από το American Institute of Cancer Research υποδεικνύουν ότι είναι δυνατόν να γίνει πρόληψη κατά 30—40% εμφάνισης του καρκίνου με την κατάλληλη διατροφή (AICR, 2007). Στο πλαίσιο αυτό και με δεδομένο τη συνεχώς αυξανόμενη κατανάλωση φρέσκων ιστών ρόκας ως σαλάτα, έγινε μια πρώτη προσπάθεια επιβεβαίωσης της αντικαρκινικής δράσης που έχει αποδοθεί μέχρι σήμερα σε άλλα φυτά της οικογένειας Brassicaceae, που θα προσφέρει στοιχεία στον μηχανισμό της βιολογικής δράσης για τον οποίο ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα υπάρχουν.

Μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από φυτά ρόκας τα οποία αναπτύχθηκαν με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους, όσον αφορά την πρόσληψη θείου και αζώτου. Για την παραλαβή των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από τις τέσσερις μεταχειρίσεις του πρώτου πειράματος (N+/S+, N-/S+, N+/S-, N-/S-). Χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2, MCF-7 και HeLa, δηλαδή ανθρωπίνου ηπατοκαρκινώματος, αδενοκαρκινώματος μαστού και ενδομητρίου αντίστοιχα.

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση από τα φύλλα και τις ρίζες των φυτών όλων των μεταχειρίσεων. Τα φυτά μετά από μεταχείριση με μειωμένο άζωτο και θείο εμφάνισαν περιορισμένη ανάπτυξη. Για την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν δυνατό να απομονωθεί αρκετή ποσότητα εκχυλίσματος μόνο από τα φύλλα των φυτών αυτών, όχι όμως από τις ρίζες τους.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των εκχυλισμάτων, με σκοπό την περαιτέρω καθαρισμό τους και τον εμπλουτισμό τους σε γλυκοσινολικά οξέα. Χρησιμοποιήθηκε στήλη Sephadex διαφορετική κάθε φορά για το κάθε εκχύλισμα, και πραγματοποιήθηκαν τέσσερις διαδοχικές εκλούσεις με τα ακόλουθα διαλύματα: 1) νερό, 2) μεθανόλη, 3) διάλυμα νιτρικού καλίου και 4) διάλυμα θειικού καλίου.

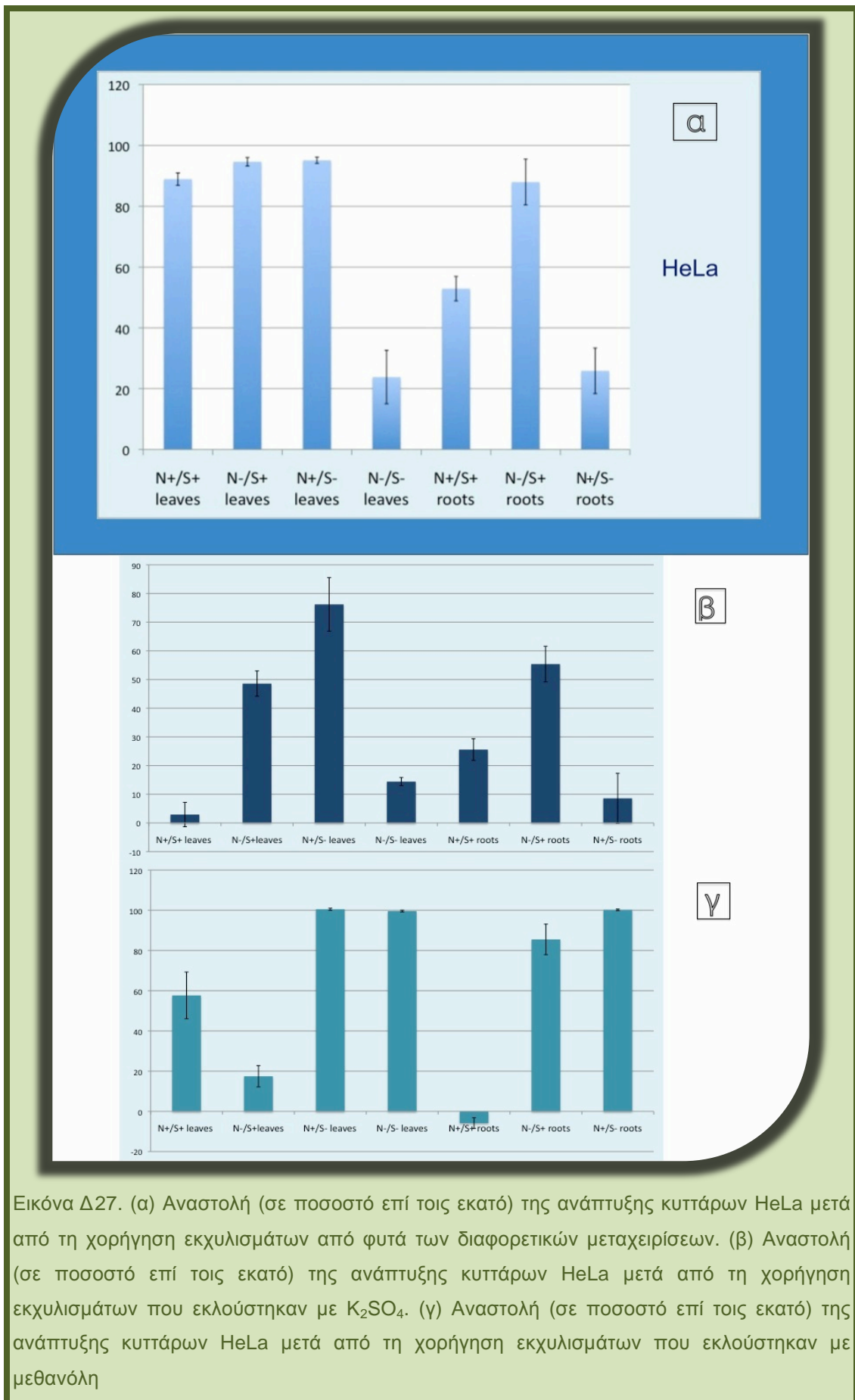
Με βάση προηγούμενες μελέτες αναμένεται ότι τα γλυκοσινολικά οξέα απομονώνονται μετά από την έκλυση παρουσία θειϊκών αλάτων (Barillari et al., 2001). Είναι επίσης αναμενόμενο οι διαφορές στην λίπανση να επηρεάσουν τη σύσταση των γλυκοσινολικών οξέων στα διαφορετικά αυτά τμήματα του φυτού και οι διαφορές να επιδράσουν με διαφορετικό τρόπο στην ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών που δοκιμάστηκαν.

## **2.1. Αποτελέσματα**

Παρακάτω παρουσιάζεται διαγραμματικά η επίδραση των αρχικών εκχυλισμάτων (εικόνες Δ27α, Δ28α, Δ29α), η επίδραση των εκχυλισμάτων μετά την έκλυση παρουσία θειϊκού άλατος (εικόνες Δ27β, Δ28β, Δ29β) και η επίδραση των εκχυλισμάτων μετά την έκλυση με μεθανόλη (εικόνες Δ27γ, Δ28γ, Δ29γ) στην ανάπτυξη των κυττάρων κάθε κυτταρικής σειράς. Η στατιστική ανάλυση που έγινε αφορούσε στην αναστολή που παρουσίασε το κάθε δείγμα σε σχέση με το control (κύτταρα με θρεπτικό απουσία εκχυλίσματος).

### **2.1.1. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa**

Στο διάγραμμα της εικόνας Δ27α παρατηρείται πως η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa έδειξε να αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα από φύλλα που προήλθαν από τις μεταχειρίσεις N+/S+, N-/S+ και N+/S-. Τα ποσοστά αναστολής ήταν ιδιαίτερα αυξημένα (89%-95%) και στις τρεις περιπτώσεις, σε αντίθεση με το ποσοστό αναστολής από την επώαση με το εκχύλισμα από φύλλα της μεταχείρισης N-/S- που ήταν πολύ μικρότερο (24%).



Εικόνα Δ27. (α) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυτάρων HeLa μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων από φυτά των διαφορετικών μεταχειρίσεων. (β) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυτάρων HeLa μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με  $K_2SO_4$ . (γ) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυτάρων HeLa μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με μεθανόλη



Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με εκχυλίσματα που προήλθαν από τις ρίζες των φυτών παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην αναστολή της ανάπτυξης μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Το εκχύλισμα των ριζών από φυτά που αναπτύχθηκαν με πλήρη λίπανση (N+/S+) ανέστειλε σε ποσοστό 52% την ανάπτυξη των κυττάρων HeLa, ενώ η μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης (ποσοστό 87%) εμφανίστηκε μετά από επώαση με το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N-/S+. Το εκχύλισμα της μεταχείρισης N+/S- είχε τη μικρότερη επίδραση, αναστέλλοντας την κυτταρική ανάπτυξη σε ποσοστό 26%.

Τα εκχυλίσματα των φύλλων από τις μεταχειρίσεις N-/S+ και N+/S- που λήφθηκαν παρουσία θειικού άλατος (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ανέστειλαν την ανάπτυξη των κυττάρων HeLa, σε ποσοστό 48.6% και 76.2% αντίστοιχα (εικόνα 27β). Αντίθετα, το εκχύλισμα των φύλλων από τη μεταχείριση N-/S- παρουσίασε πολύ μικρότερο ποσοστό αναστολής των κυττάρων HeLa (14.4%) ( $P=0.018$ ). Τέλος, το εκχύλισμα των φύλλων από τη μεταχείριση πλήρους λίπανσης (N+/S+) εμφάνισε μια τάση αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων σε ποσοστό 2.92%, το οποίο όμως δεν είναι στατιστικά σημαντικό,

Μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα των ριζών, η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa επηρεάστηκε σε διαφορετικό βαθμό, ανάλογα με την μεταχείριση. Το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N-/S+ ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων σε ποσοστό 55.4%, το οποίο ήταν μεγαλύτερο συγκριτικά με τα άλλα εκχυλίσματα. Το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S+ προκάλεσε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε ποσοστό 25.5%, ενώ το εκχύλισμα της μεταχείρισης N+/S- προκάλεσε μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 8.6%), η οποία όμως ήταν στατιστικά μη σημαντική ( $P=0.412$ ).

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση των εκχυλισμάτων μετά την έκλουσή τους με μεθανόλη. Σημαντική αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HeLa κυττάρων (με ποσοστά 99.6% και 100% αντίστοιχα) παρατηρήθηκε από τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S- και N-/S- (εικόνα Δ27γ). Το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N+/S+ ανέστειλε σε ποσοστό 58% την ανάπτυξη, ενώ το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N-/S+ προκάλεσε μικρή αναστολή της

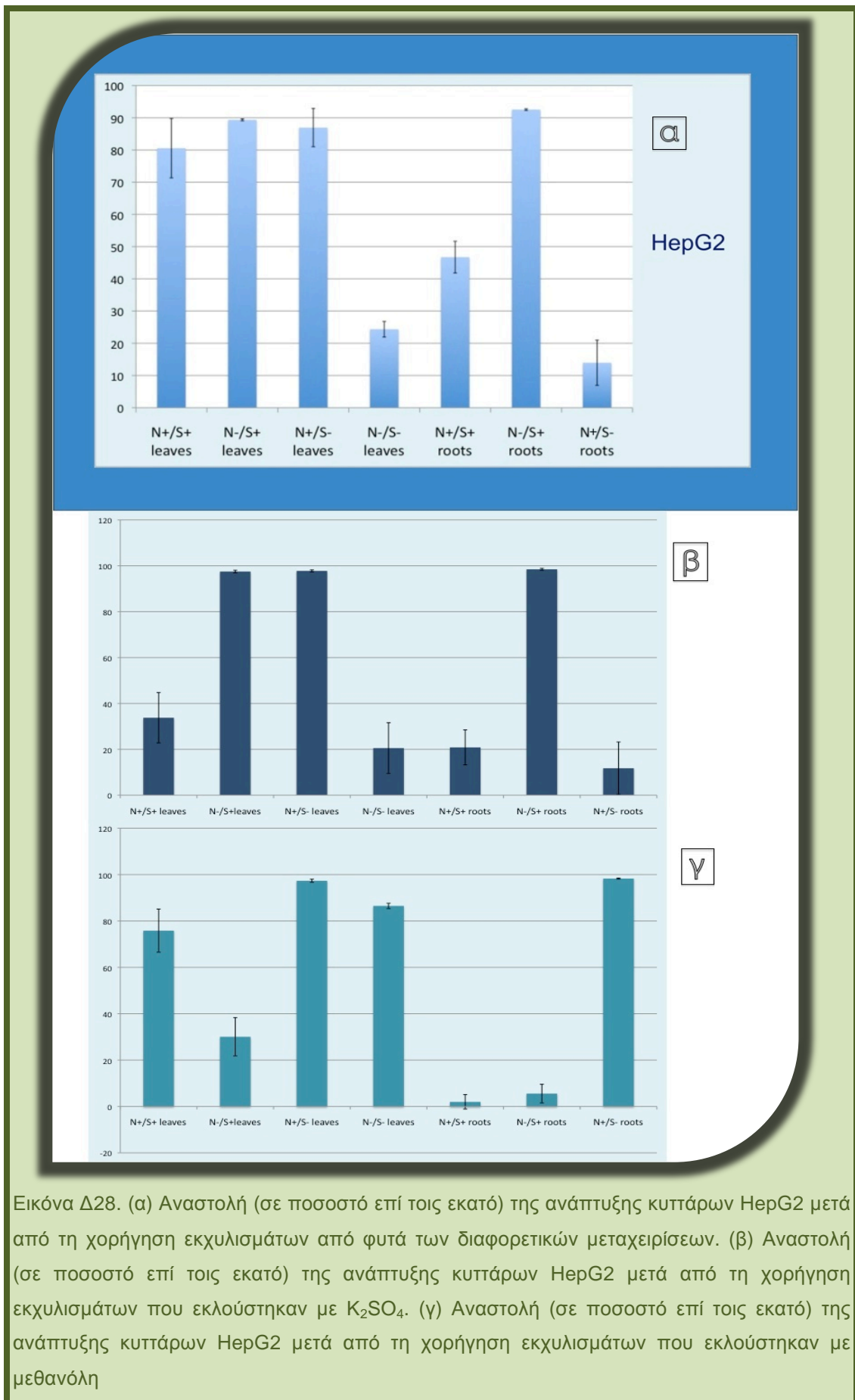
κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 17.5%), το οποίο όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικό ( $P=0.0677$ ).

Όσον αφορά στα εκχυλίσματα των ριζών, παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό αναστολής από τα εκχυλίσματα των μεταχειρίσεων N-/S+ και N+/S-, σε ποσοστό 85.5% και 100% αντίστοιχα, ενώ το εκχύλισμα από τη μεταχείριση πλήρους λίπανσης (N+/S+) εμφάνισε μια μικρή τάση ενίσχυσης της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 5.8%), το οποίο όμως ήταν στατιστικά μη σημαντικό ( $P=0.0673$ ).

### 2.1.2. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρήθηκαν στα κύτταρα HeLa εμφάνισε και η δράση των μη καθαρών εκχυλισμάτων στα κύτταρα HepG2 (εικόνα Δ28α). Η ανάπτυξη των κυττάρων έδειξε να αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα από φύλλα που προήλθαν από τις μεταχειρίσεις N+/S+, N-/S+ και N+/S-, και η αναστολή αυτή ανήλθε σε ποσοστά 80% έως 89%. Αντίθετα, το εκχύλισμα από τη μεταχείριση N-/S- προκάλεσε μικρό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (25%).

Κατά την επώαση με εκχυλίσματα που προήλθαν από τις ρίζες των φυτών των διαφορετικών μεταχειρίσεων παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, όπως και στην περίπτωση των HeLa κυττάρων. Η μεγαλύτερη αναστολή (ποσοστό 92%) πραγματοποιήθηκε μετά από εφαρμογή του εκχυλίσματος από τη μεταχείριση N-/S+. Το εκχύλισμα των ριζών από φυτά που αναπτύχθηκαν με πλήρη λίπανση (N+/S+) ανέστειλε σε ποσοστό 47% την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S- ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη σε ποσοστό 14%.



Μελετήθηκε επίσης η επίδραση που είχε στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 η επώαση με εκχυλίσματα μετά από έκλουσή τους με  $K_2SO_4$  (εικόνα Δ28β). Παρατηρήθηκαν μεγάλα ποσοστά αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N-/S+ και N+/S- (97.5% και 97.8% αντίστοιχα). Η αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S+ και N-/S- ήταν πολύ μικρότερη, με ποσοστά 33.8% και 20.5% αντίστοιχα, τα οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ( $P=0.08$  και  $P=0.2$  αντίστοιχα).

Όσον αφορά στα εκχυλίσματα των ριζών, παρατηρήθηκε 98.5% ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης από το εκχύλισμα που προήλθε από τη μεταχείριση N-/S+. Αυτό είναι και το μεγαλύτερο σε σχέση με τα υπόλοιπα (N+/S+ και N+/S-), τα οποία ανέστειλαν σε μικρό βαθμό την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 (20.8% και 11.8% αντίστοιχα). Τα ποσοστά αυτά όμως είναι στατιστικώς μη σημαντικά ( $P=0,15$  και  $P=0,27$  αντίστοιχα).

Πραγματοποιήθηκε επώαση κυττάρων HepG2 και με τα εκχυλίσματα που λήφθηκαν παρουσία μεθανόλης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα Δ28γ. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 παρατηρήθηκαν μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S+, N+/S- και N-/S (75.8%, 97.3% και 86.5% αντίστοιχα). Μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης προκάλεσε το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N-/S+ (ποσοστό αναστολής 30%).

Το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S- εμφάνισε μεγάλο ποσοστό αναστολής (98%), ενώ τα εκχυλίσματα των ριζών των μεταχειρίσεων N+/S+, N-/S+ εμφάνισαν μια μικρή τάση αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης, με ποσοστά αναστολής 2% και 5.6% αντίστοιχα, τα οποία όμως είναι μη στατιστικά σημαντικά ( $P=0.7$  και  $P=0.3$  αντίστοιχα)

### 2.1.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF7

Όσον αφορά στα κύτταρα MCF7, η δράση των εκχυλισμάτων από φύλλα των μεταχειρίσεων N+/S+, N-/S+ και N+/S- είχε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των δύο προηγούμενων κυτταρικών σειρών, αφού προκάλεσαν αναστολή της

κυτταρικής ανάπτυξης σε επίσης πολύ υψηλά ποσοστά (89-95%) (εικόνα Δ29α). Αντιθέτως, το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N-/S- προκάλεσε πολύ μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 18%), κάτι που επίσης παρατηρήθηκε και στα κύτταρα των σειρών HeLa και HepG2.

Σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα των φύλλων, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τις ρίζες των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Η μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με το εκχύλισμα από τη μεταχείριση N-/S+ (ποσοστό 89%), ενώ μικρότερη αναστολή (ποσοστό 53%) παρατηρήθηκε με το εκχύλισμα ριζών από φυτά που αναπτύχθηκαν με κανονική λίπανση (N+/S+). Ενδιαφέρον παρουσίασε το εκχύλισμα ριζών της μεταχείρισης N+/S-, το οποίο δεν ανέστειλε, αλλά προκάλεσε ενίσχυση της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7, σε ποσοστό 29%.

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση που είχε στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF7 η επώαση με εκχυλίσματα μετά από έκλουσή τους με  $K_2SO_4$  (εικόνα Δ29β). Σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7 παρατηρήθηκε μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα φύλλων των μεταχειρίσεων N-/S+, N+/S- και N-/S- (ποσοστά αναστολής 92.7%, 91.9% και 71.5% αντίστοιχα). Αντίθετα, το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N+/S+ εμφάνισε πολύ μικρή τάση αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 4.2%,  $P=0.411$ ).

Όσον αφορά στα εκχυλίσματα των ριζών, όλα προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7, σε διαφορετικό όμως βαθμό, ανάλογα με την μεταχείριση. Η μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα εκχυλίσματα των ριζών της μεταχείρισης N-/S+ (με ποσοστό 94.4%). Τα άλλα δύο εκχυλίσματα των μεταχειρίσεων N+/S+ και N+/S- ανέστειλαν την ανάπτυξη σε μικρότερο βαθμό (ποσοστά 51.4% και 47.6% αντίστοιχα).



Εικόνα Δ29. (α) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων MCF7 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων από φυτά των διαφορετικών μεταχειρίσεων. (β) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων MCF7 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με  $K_2SO_4$ . (γ) Αναστολή (σε ποσοστό επί τοις εκατό) της ανάπτυξης κυττάρων MCF7 μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων που εκλούστηκαν με μεθανόλη

Κύτταρα MCF7 επώαστηκαν και με εκχυλίσματα που λήφθηκαν παρουσία μεθανόλης (εικόνα Δ29γ). Όταν η επώαση έγινε με τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τα φύλλα των μεταχειρίσεων N+/S+, N+/S- και N-/S-, παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, με ποσοστά αναστολής 95.1%, 99% και 98.8% αντίστοιχα. Το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N-/S+ ανέστειλε σε μικρότερο ποσοστό την ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 (52.5%).

Τα εκχυλίσματα ριζών των μεταχειρίσεων N-/S+ και N+/S- ανέστειλαν την ανάπτυξη των κυττάρων σε εξίσου σημαντικά ποσοστά (95.1% και 97.4% αντίστοιχα), ενώ το εκχύλισμα ριζών της μεταχείρισης N+/S+ εμφάνισε πολύ μικρότερη τάση αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 9.8%,  $P=0.4157$ ).

#### 2.1.4. Παρατηρήσεις

Τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N-/S+, N+/S- και το εκχύλισμα ριζών της μεταχείρισης N-/S+ παρουσίασαν σημαντικά ποσοστά αναστολής σε κύτταρα HeLa (50-76%) μετά την κλασμάτωση παρουσία θεικών αλάτων, δεν υπερέβησαν όμως τα ποσοστά αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης πριν από την κλασμάτωση. Η επώαση των κυττάρων HepG2 με τα ανωτέρω εκχυλίσματα οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης τους, με ποσοστά αναστολής λίγο μεγαλύτερα (περίπου 98%) από εκείνα που προέκυψαν από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα, πριν από τον καθαρισμό τους στη στήλη. Παρομοίως, και στα κύτταρα MCF7, το ποσοστό αναστολής των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων αλλά και του εκχυλίσματος από φύλλα της μεταχείρισης N-/S-, είτε αυξήθηκε σημαντικά είτε παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (70-90%), σε σχέση με το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης πριν από την κλασμάτωση.

Το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N+/S+, παρόλο που προκάλεσε μεγάλη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης πριν από την κλασμάτωσή του, μετά την έκλουση με θειικά άλατα προκάλεσε πολύ μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε κύτταρα HeLa. Σημαντική ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των

κυττάρων παρατηρήθηκε από το εκχύλισμα αυτό, μετά την έκλουση με μεθανόλη (ποσοστό 58%). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε για το συγκεκριμένο εκχύλισμα και στην περίπτωση των κυττάρων MCF-7 και HepG2, στα οποία ανάλογη συμπεριφορά είχε και το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N-/S-.

Το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S- ενώ αρχικά είχε εμφανίσει ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7, μετά την κλασμάτωση παρουσία θειικών αλάτων παρουσίασε αναστολή της ανάπτυξης με ποσοστό περίπου 48%. Το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N-/S- και το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S- προκάλεσαν μικρή αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa και HepG2, τόσο πριν όσο και μετά την κλασμάτωση και την έκλουση με θειικά άλατα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης μετά την έκλουση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων παρουσία μεθανόλης.

Η συσχέτιση του ποσοστού αναστολής της κυτταρικής αύξησης με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα διάφορα μεθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζεται στους πίνακες Γ5 για τα φύλλα και Γ6 για τις ρίζες.

Όπως φαίνεται στον πίνακα Δ5, δεν παρατηρείται συσχέτιση της επίδρασης των εκχυλισμάτων από τα φύλλα με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ. Εξάιρεση αποτελεί η συγκέντρωση της GBS, η οποία φαίνεται να συσχετίζεται με την αναστολή στα κύτταρα MCF7.



Πίνακας Δ5. Συσχέτιση του ποσοστού αναστολής της κυτταρικής αύξησης με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα

| Variable        | Correlations (Leaves) |        |        |        |        |           |                 |               |           |        |        |        |
|-----------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|-----------|-----------------|---------------|-----------|--------|--------|--------|
|                 | GRA                   | GNA    | GSV    | GER    | GBS    | 4-MeO-GBS | Total Aliphatic | Total Indolyl | Total GSL | HepG2  | HeLa   | MCF7   |
| GRA             | 1,0000                | ,8185  | ,9726  | ,9308  | ,7101  | ,7492     | ,9912           | ,7560         | ,9869     | ,3178  | ,3636  | ,4679  |
|                 | p=---                 | p=.001 | p=.000 | p=.000 | p=.010 | p=.005    | p=.000          | p=.004        | p=.000    | p=.314 | p=.245 | p=.125 |
| GNA             | ,8185                 | 1,0000 | ,8589  | ,8593  | ,7495  | ,8694     | ,8759           | ,8460         | ,8836     | ,1203  | ,1885  | ,3626  |
|                 | p=.001                | p=---  | p=.000 | p=.000 | p=.005 | p=.000    | p=.000          | p=.001        | p=.000    | p=.710 | p=.557 | p=.247 |
| GSV             | ,9726                 | ,8589  | 1,0000 | ,9205  | ,7801  | ,8220     | ,9861           | ,8300         | ,9868     | ,3289  | ,3460  | ,4421  |
|                 | p=.000                | p=.000 | p=---  | p=.000 | p=.003 | p=.001    | p=.000          | p=.001        | p=.000    | p=.296 | p=.271 | p=.150 |
| GER             | ,9308                 | ,8593  | ,9205  | 1,0000 | ,7924  | ,8495     | ,9574           | ,8519         | ,9612     | ,2221  | ,3058  | ,4105  |
|                 | p=.000                | p=.000 | p=.000 | p=---  | p=.002 | p=.000    | p=.000          | p=.000        | p=.000    | p=.488 | p=.334 | p=.185 |
| GBS             | ,7101                 | ,7495  | ,7801  | ,7924  | 1,0000 | ,8772     | ,7636           | ,9560         | ,7846     | ,4798  | ,4799  | ,5957  |
|                 | p=.010                | p=.005 | p=.003 | p=.002 | p=---  | p=.000    | p=.004          | p=.000        | p=.003    | p=.114 | p=.114 | p=.041 |
| 4-MeO-GBS       | ,7492                 | ,8694  | ,8220  | ,8495  | ,8772  | 1,0000    | ,8156           | ,9795         | ,8354     | ,4183  | ,4467  | ,5413  |
|                 | p=.005                | p=.000 | p=.001 | p=.000 | p=.000 | p=---     | p=.001          | p=.000        | p=.001    | p=.176 | p=.145 | p=.069 |
| Total Aliphatic | ,9912                 | ,8759  | ,9861  | ,9574  | ,7636  | ,8156     | 1,0000          | ,8191         | ,9993     | ,2939  | ,3422  | ,4546  |
|                 | p=.000                | p=.000 | p=.000 | p=.000 | p=.004 | p=.001    | p=---           | p=.001        | p=.000    | p=.354 | p=.276 | p=.138 |
| Total Indolyl   | ,7560                 | ,8460  | ,8300  | ,8519  | ,9560  | ,9795     | ,8191           | 1,0000        | ,8400     | ,4571  | ,4745  | ,5810  |
|                 | p=.004                | p=.001 | p=.001 | p=.000 | p=.000 | p=.000    | p=.001          | p=---         | p=.001    | p=.135 | p=.119 | p=.048 |
| Total GSL       | ,9869                 | ,8836  | ,9868  | ,9612  | ,7846  | ,8354     | ,9993           | ,8400         | 1,0000    | ,3078  | ,3546  | ,4680  |
|                 | p=.000                | p=.000 | p=.000 | p=.000 | p=.003 | p=.001    | p=.000          | p=.001        | p=---     | p=.330 | p=.258 | p=.125 |
| HepG2           | ,3178                 | ,1203  | ,3289  | ,2221  | ,4798  | ,4183     | ,2939           | ,4571         | ,3078     | 1,0000 | ,9417  | ,8600  |
|                 | p=.314                | p=.710 | p=.296 | p=.488 | p=.114 | p=.176    | p=.354          | p=.135        | p=.330    | p=---  | p=.000 | p=.000 |
| HeLa            | ,3636                 | ,1885  | ,3460  | ,3058  | ,4799  | ,4467     | ,3422           | ,4745         | ,3546     | ,9417  | 1,0000 | ,9087  |
|                 | p=.245                | p=.557 | p=.271 | p=.334 | p=.114 | p=.145    | p=.276          | p=.119        | p=.258    | p=.000 | p=---  | p=.000 |
| MCF7            | ,4679                 | ,3626  | ,4421  | ,4105  | ,5957  | ,5413     | ,4546           | ,5810         | ,4680     | ,8600  | ,9087  | 1,0000 |
|                 | p=.125                | p=.247 | p=.150 | p=.185 | p=.041 | p=.069    | p=.138          | p=.048        | p=.125    | p=.000 | p=.000 | p=---  |

Όσο για τα την επίδραση που είχαν τα εκχυλίσματα από τις ρίζες, για όλα τα κύτταρα παρατηρείται ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τα ινδολικά ΓΚΣ. Θετική συσχέτιση υπάρχει για όλα τα κύτταρα με το αρωματικό ΓΚΣ GST και θετική συσχέτιση για τα MCF7 με τα αλειφατικά ΓΚΣ (πίνακας Δ6).

Πίνακας Δ6. Συσχέτιση του ποσοστού αναστολής της κυτταρικής αύξησης με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στις ρίζες

| Correlations (Spreadsheet1)                         |        |        |        |           |        |             |             |            |           |        |        |        |
|---|--------|--------|--------|-----------|--------|-------------|-------------|------------|-----------|--------|--------|--------|
| Marked correlations are significant at $p < ,05000$ |        |        |        |           |        |             |             |            |           |        |        |        |
| N=9 (Casewise deletion of missing data)             |        |        |        |           |        |             |             |            |           |        |        |        |
| Variable  | GRA    | GER    | GBS    | 4-MeO-GBS | GST    | Total Aliph | Total Indol | Total Arom | Total GSL | HeLa   | MCF7   | HepG2  |
| GRA   | 1,0000 | ,9499  | -,4916 | -,7469    | ,6293  | ,9889       | -,5856      | ,6293      | ,9858     | ,4627  | ,8851  | ,5425  |
|   | p=---  | p=,000 | p=,179 | p=,021    | p=,069 | p=,000      | p=,098      | p=,069     | p=,000    | p=,210 | p=,002 | p=,131 |
| GER   | ,9499  | 1,0000 | -,4291 | -,7027    | ,5625  | ,9858       | -,5272      | ,5625      | ,9783     | ,3813  | ,8457  | ,5026  |
|   | p=,000 | p=---  | p=,249 | p=,035    | p=,115 | p=,000      | p=,145      | p=,115     | p=,000    | p=,311 | p=,004 | p=,168 |
| GBS   | -,4916 | -,4291 | 1,0000 | ,8726     | -,8778 | -,4681      | ,9882       | -,8778     | -,4726    | -,8433 | -,8240 | -,9770 |
|   | p=,179 | p=,249 | p=---  | p=,002    | p=,002 | p=,204      | p=,000      | p=,002     | p=,199    | p=,004 | p=,006 | p=,000 |
| 4-MeO-GBS   | -,7469 | -,7027 | ,8726  | 1,0000    | -,7561 | -,7354      | ,9372       | -,7561     | -,7116    | -,7507 | -,9292 | -,8958 |
|   | p=,021 | p=,035 | p=,002 | p=---     | p=,018 | p=,024      | p=,000      | p=,018     | p=,032    | p=,020 | p=,000 | p=,001 |
| GST   | ,6293  | ,5625  | -,8778 | -,7561    | 1,0000 | ,6055       | -,8643      | 1,0000     | ,6507     | ,8528  | ,8644  | ,8709  |
|   | p=,069 | p=,115 | p=,002 | p=,018    | p=---  | p=,084      | p=,003      | p=---      | p=,058    | p=,003 | p=,003 | p=,002 |
| Total Aliph   | ,9889  | ,9858  | -,4681 | -,7354    | ,6055  | 1,0000      | -,5653      | ,6055      | ,9948     | ,4298  | ,8776  | ,5304  |
|   | p=,000 | p=,000 | p=,204 | p=,024    | p=,084 | p=---       | p=,113      | p=,084     | p=,000    | p=,248 | p=,002 | p=,142 |
| Total Indol   | -,5856 | -,5272 | ,9882  | ,9372     | -,8643 | -,5653      | 1,0000      | -,8643     | -,5610    | -,8380 | -,8803 | -,9790 |
|   | p=,098 | p=,145 | p=,000 | p=,000    | p=,003 | p=,113      | p=---       | p=,003     | p=,116    | p=,005 | p=,002 | p=,000 |
| Total Arom  | ,6293  | ,5625  | -,8778 | -,7561    | 1,0000 | ,6055       | -,8643      | 1,0000     | ,6507     | ,8528  | ,8644  | ,8709  |
|   | p=,069 | p=,115 | p=,002 | p=,018    | p=---  | p=,084      | p=,003      | p=---      | p=,058    | p=,003 | p=,003 | p=,002 |
| Total GSL   | ,9858  | ,9783  | -,4726 | -,7116    | ,6507  | ,9948       | -,5610      | ,6507      | 1,0000    | ,4552  | ,8804  | ,5324  |
|   | p=,000 | p=,000 | p=,199 | p=,032    | p=,058 | p=,000      | p=,116      | p=,058     | p=---     | p=,218 | p=,002 | p=,140 |
| HeLa  | ,4627  | ,3813  | -,8433 | -,7507    | ,8528  | ,4298       | -,8380      | ,8528      | ,4552     | 1,0000 | ,7693  | ,8898  |
|   | p=,210 | p=,311 | p=,004 | p=,020    | p=,003 | p=,248      | p=,005      | p=,003     | p=,218    | p=---  | p=,015 | p=,001 |
| MCF7  | ,8851  | ,8457  | -,8240 | -,9292    | ,8644  | ,8776       | -,8803      | ,8644      | ,8804     | ,7693  | 1,0000 | ,8662  |
|   | p=,002 | p=,004 | p=,006 | p=,000    | p=,003 | p=,002      | p=,002      | p=,003     | p=,002    | p=,015 | p=---  | p=,003 |
| HepG2   | ,5425  | ,5026  | -,9770 | -,8958    | ,8709  | ,5304       | -,9790      | ,8709      | ,5324     | ,8898  | ,8662  | 1,0000 |
|   | p=,131 | p=,168 | p=,000 | p=,001    | p=,002 | p=,142      | p=,000      | p=,002     | p=,140    | p=,001 | p=,003 | p=---  |

## 2.2. Συζήτηση

Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα και τις ρίζες των φυτών των τεσσάρων μεταχειρίσεων (N+/S+, N-/S+, N+/S-, N-/S-) εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση, αφού είχαν επίδραση στην ανάπτυξη και των τριών διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών που δοκιμάστηκαν (HeLa, HepG2, MCF7).

Η ανάπτυξη των κυττάρων επηρεάστηκε από όλα τα εκχυλίσματα που εφαρμόστηκαν και σε γενικές γραμμές παρατηρείται το ίδιο πρότυπο σε όλες τις περιπτώσεις. Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα των τριών πρώτων μεταχειρίσεων έδειξαν να προκαλούν αναστολή σε ποσοστά από 80% έως και 95% και στους τρεις τύπους κυτταρικών σειρών, ενώ το εκχύλισμα από τη μεταχείριση N-/S- είχε σαφώς μικρότερη επίδραση. Τα εκχυλίσματα ριζών είχαν γενικά μικρότερη επίδραση, με εξαίρεση αυτό της μεταχείρισης N-/S+, που και στις τρεις περιπτώσεις ήταν ιδιαίτερα δραστικό, με ποσοστό αναστολής της τάξεως του 90%. Επίσης το εκχύλισμα ριζών από τη μεταχείριση N+/S- σε μία περίπτωση αντί για αναστολή προκάλεσε επαγωγή της ανάπτυξης.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν επίδραση της διαφορετικής λίπανσης στην ικανότητα των αντίστοιχων εκχυλισμάτων των φυτών να αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, γεγονός που αντικατοπτρίζει την επίδραση της λίπανσης στη σύσταση των εν λόγω εκχυλισμάτων. Η συσχέτιση των επιδράσεων στα κύτταρα με το μεταβολικό προφίλ των φυτών των διαφορετικών μεταχειρίσεων δείχνει ότι η διαφορά στη δραστικότητα των εκχυλισμάτων πιθανώς να οφείλεται στις διαφορές στο περιεχόμενο (συγκέντρωση και σύσταση) των ιστών σε γλυκοσινολικά οξέα.

Οι περιπτώσεις της αυξημένης και μειωμένης δραστικότητας του εκχυλίσματος των φύλλων από φυτά της μεταχείρισης που αναπτύχθηκαν υπό πλήρη λίπανση και υπό έλλειψη θείου και αζώτου αντίστοιχα, μπορεί να εξηγηθεί από το αντίστοιχο αυξημένο και μειωμένο περιεχόμενο σε ολικά γλυκοσινολικά. Εκτός όμως από το διαφορετικό ολικό γλυκοσινολικό περιεχόμενο, παρατηρούνται διαφορές και στη σύσταση στους διάφορους τύπους γλυκοσινολικών. Για παράδειγμα, στα φύλλα της μεταχείρισης N+/S- παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση των ινδολικών glucobrassicin (GBS) και 4-methoxy-glucobrassicin (4-MeO-GBS) σε σχέση με αυτή των φύλλων της μεταχείρισης N-/S-. Αυτό ίσως θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη δράση του εκχυλίσματος φύλλων N+/S- σε αντίθεση με τη μειωμένη του εκχυλίσματος N-/S-, παρόλο που το ολικό γλυκοσινολικό περιεχόμενο και των δύο είναι παρόμοιας συγκέντρωσης, ωστόσο δε φαίνεται να υπάρχει σημαντική συσχέτιση του ποσοστού αναστολής με τη συγκέντρωση των ΓΚΣ.

Η επίδραση εκχυλισμάτων από τις ρίζες έδειξε να συσχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση των ινδολικών γλυκοσινολικών στους αντίστοιχους ιστούς. Τα δύο εκχυλίσματα (N+/S+ και N+/S-) που εμφανίζουν μειωμένη δράση προέρχονται από ρίζες με αυξημένα ινδολικά. Στην περίπτωση μάλιστα των MCF7 κυττάρων το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S-, που είχε και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ινδολικά, προκάλεσε ενίσχυση της ανάπτυξης αντί για αναστολή. Αντίθετα, το εκχύλισμα από ρίζες της μεταχείρισης N-/S+ ενώ προήλθε από ιστό με μικρότερη συγκέντρωση ολικών γλυκοσινολικών είχε επίδραση στην αναστολή μεγαλύτερη των άλλων δύο. Ωστόσο, η συγκέντρωση των ινδολικών των ριζών του τελευταίου εκχυλίσματος βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με αυτά των φύλλων των οποίων τα εκχυλίσματα είχαν την ίδια αυξημένη επίδραση στην αναστολή των

κυττάρων. Η αυξημένη συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ στους ιστούς των ριζών των μεταχειρίσεων N+/S+ και N+/S- συγκριτικά με τις υπόλοιπες, ακόμα και με αυτές των φύλλων, ίσως να εξηγεί τη μείωση της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων. Έχει εξάλλου αναφερθεί (Baird et al., 2005) ότι ορισμένοι μεταβολίτες ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων προκαλούν επαγωγή της καρκινογένεσης. Ειδικά η επίδραση που παρατηρήθηκε στα ορμονοεξαρτώμενα κύτταρα MCF7, μπορεί να εξηγηθεί από ενδεχόμενη δράση στην τροποποίηση του μεταβολισμού των στεροειδών ορμονών, κάτι που έχει αναφερθεί (Srinibas et al., 2000) για τα γλυκοσινολικά οξέα.

### *Κλασμάτωση*

Ο σκοπός της κλασμάτωσης που πραγματοποιήθηκε στα αρχικά εκχυλίσματα ήταν ο περαιτέρω καθαρισμός τους και ο εμπλουτισμός τους σε ΓΚΣ. Τα αποτελέσματα της επώασης των διαφορετικών κυτταρικών σειρών στις οποίες χορηγήθηκαν δείχνουν ότι τα περισσότερα εκχυλίσματα διατήρησαν ή αύξησαν την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων. Αυτό σημαίνει πως ο χρωματογραφικός καθαρισμός των εκχυλισμάτων που πραγματοποιήθηκε ήταν γενικά ικανοποιητικός και έτσι εξηγείται η ανάλογη δράση των εκχυλισμάτων.

Στις περιπτώσεις όπου η αυξημένη ικανότητα αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης δε διατηρήθηκε ή διατηρήθηκε μόνο στο εκχύλισμα που εκλούστηκε με μεθανόλη, φαίνεται πως η κλασμάτωση και η έκλυση παρουσία θειικών αλάτων δεν ήταν επιτυχής.

Το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S-, το οποίο είχε προκαλέσει ενίσχυση της ανάπτυξης των κυττάρων MCF7, εμφάνισε αντίστροφο αποτέλεσμα μετά την κλασμάτωσή του, προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Η τροποποίηση της δραστηριότητας του εκχυλίσματος προφανώς οφείλεται στην αλλαγή της σύστασης σε ΓΚΣ, και πιθανώς μετά την κλασμάτωση να υπερτερούν τα αλειφατικά ΓΚΣ έναντι των ινδολικών.

Έχει εξάλλου αναφερθεί πως οι συγκεντρώσεις που απαιτούνται για να ασκήσουν τα ΙΣΘ προστετευτική δράση είναι χαμηλές (0.01-1 g/kg διατροφής) και υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να κάνουν αυτή τη δράση να εξαφανιστεί. Ακόμα και

μικρότερες δόσεις (0.005 g/kg διατροφής) έχουν αναφερθεί ως δραστικές (Okazaki et al., 2002; Tang & Zhang, 2004; Villatoro-Pulido et al., 2012).

Επίσης αναφέρεται πως η προστατευτική δράση των ΓΚΣ και των προϊόντων υδρόλυσής τους προερχόμενα από το φυτό *E. vesicaria* subsp. *sativa* σε καρκινικά κύτταρα HT-29 μπορεί να εξουδετερώνεται από άλλα φυτοχημικά που είναι παρόντα στα φύλλα της ρόκας (Jin et al., 2009) Επιπλέον, αναφέρεται ότι για την ενεργοποίηση των κυτταρικών μηχανισμών ενάντια στο οξειδωτικό στρες είναι απαραίτητη μια μικρή μόνο ποσότητα ΓΚΣ, οπότε οι αυξημένες συγκεντρώσεις δεν έχουν επιπρόσθετη δράση.

Σε πειράματα με *Drosophila melanogaster* (Villatoro-Pulido et al., 2012) χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις σειρές φυτών ρόκας με διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικών ΓΚΣ, GRA και SF, από τα φύλλα των οποίων παραλήφθηκαν εκχυλίσματα για τη χορήγησή τους στα έντομα. Χορηγήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων και όλες είχαν την ικανότητα να αποτοξινώνουν τη γονοτοξική δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που χορηγήθηκε. Κατά τη χορήγηση ενός μόνο από τα τέσσερα εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 5mg/ml παρατηρήθηκε γονοτοξική επίδραση. Τα φύλλα από τα οποία προήλθε το εκχύλισμα τη μεγαλύτερη συγκέντρωση GRA (16.96 μmol/g) και ολικών ΓΚΣ (30.52 μmol/g), παρόλο που η συγκέντρωση ΣΦ ήταν η μικρότερη (1.24 μmol/g). Ωστόσο φαίνεται ότι σε χρόνια κατανάλωση δεν είναι τοξικό, πιθανότατα γιατί τα άλλα φυτοχημικά που υπάρχουν (πολυφαινόλες, καροτενοειδή) εξουδετερώνουν τη δράση αυτή. Προηγούμενες μελέτες με εφαρμογή εκχυλισμάτων *Eruca sativa* σε καρκινικά κύτταρα (HePG2) δεν έδειξαν γονοτοξική επίδραση, ακόμα και όταν οι συγκεντρώσεις ήταν υψηλές (Lamy et al., 2008). Ωστόσο, τέτοιες επιδράσεις έχουν αναφερθεί από σταυρανθή λαχανικά και τα ΙΣΘ που περιέχουν (Kassie et al., 1996). Εξάλλου, τα σταυρανθή λαχανικά, συμπεριλαμβανομένης της ρόκας, είναι γνωστό ότι εκτός των ΙΣΘ παράγουν και εναλλακτικά προϊόντα υδρόλυσης, όπως νιτρίλια και επιθειονιτρίλια, τα οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να κινήσουν μεταλλαξιγόνες, κυτταροτοξικές και καρκινογόνες διαδικασίες (Martin Dietz et al., 1991).

*Συμπερασματικά*

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιβεβαιώνουν μια κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων από φύλλα και ρίζες της ρόκας, τουλάχιστον *in vitro*. Επιπρόσθετα, μια γενική αποτίμηση των παραπάνω παρατηρήσεων καταδεικνύει την επίδραση της λίπανσης σε θείο και άζωτο, κύριων στοιχείων της δομής των μορίων των ΓΚΣ, στο μέγεθος της δραστηριότητας αυτής. Δραστηριότητα των ΓΚΣ ενάντια σε κάποιες μορφές καρκίνου αναφέρεται σε αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία. Απαιτείται επιπλέον έρευνα για τη διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης των ΓΚΣ, αλλά και των μηχανισμών με τους οποίους αυτή ασκείται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε.

2ο ΠΕΙΡΑΜΑ ΘΡΕΨΗΣ

Το δεύτερο πείραμα επίδρασης της λίπανσης στο μεταβολικό προφίλ των ΓΚΣ στη ρόκα, είχε ως στόχο τη μελέτη της έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων σε βραχυπρόθεσμη τροφοπενία θείου, δηλαδή σε συνθήκες έλλειψης θείου μόνο τις πρώτες μέρες ανάπτυξης των φυτών. Όπως αναφέρεται στο προηγούμενο κεφάλαιο, η βραχυπρόθεσμη τροφοπενία θείου έχει μελετηθεί στο *Arabidopsis* και έχουν αναφερθεί επιδράσεις τόσο στην έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης ΓΚΣ όσο και στο περιεχόμενο των ίδιων των μεταβολιτών. Οι περιπτώσεις που έχουν μελετηθεί στο *Arabidopsis* (Hirai et al, 2004, Nikiforova et al, 2003, Maruyama-Nakashita et al., 2003) αφορούσαν φυτά τα οποία από πλήρη λίπανση μεταφέρονται για ένα σύντομο χρονικό διάστημα ημερών σε συνθήκες ανεπάρκειας θείου. Στην παρούσα εργασία, με δεδομένο ότι ενδιαφέρει η φυσιολογική απόκριση σε ένα καλλιεργούμενο φυτό, επιλέχθηκε ένα σχήμα λίπανσης όπου φυτά αναπτύχθηκαν αρχικά για λίγες μέρες σε ανεπάρκεια θείου και στη συνέχεια μεταφέρονται σε πλήρη λίπανση μέχρι τη φάση της συγκομιδής των ιστών, θεωρώντας ότι ένα τέτοιο σχήμα περιγράφει καλύτερα τις πραγματικές συνθήκες λίπανσης. Για το σκοπό αυτό φυτεύθηκαν φυτά ρόκας τα οποία χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες και αναπτύχθηκαν για 30 ημέρες. Στα φυτά της πρώτης ομάδας ελέγχου εφαρμόστηκε πλήρες θρεπτικό διάλυμα καθ'όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους (+S). Στα φυτά της δεύτερης ομάδας ελέγχου εφαρμόστηκε θρεπτικό διάλυμα με μειωμένο θείο, επίσης καθ'όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους (-S). Στα φυτά της τρίτης ομάδας εφαρμόστηκε τις πρώτες 10 ημέρες θρεπτικό διάλυμα με μειωμένο θείο, ενώ στη συνέχεια τα φυτά αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες πλήρους λίπανσης (-S/+S). Έγινε συλλογή φύλλων και ριζών από φυτά όλων των ομάδων, στις 9, 12, 20 και 30 ημέρες ανάπτυξης. Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της λίπανσης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του φυτού σε δύο διαφορετικούς ιστούς, τα φύλλα και τη ρίζα.

## **1. Αποτελέσματα**

Για τη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής PCR (real-time). Έγινε απομόνωση ολικού RNA από όλα τα δείγματα και



κατασκευή αλυσίδας cDNA. Μετά από κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA, όπως προαναφέρθηκε για το πρώτο πείραμα, και ισοσκελισμό των συγκεντρώσεων, πραγματοποιήθηκαν σετ αντιδράσεων real-time PCR, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο όλα τα διαφορετικά cDNA στη σειρά και το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών για το κάθε γονίδιο που μελετάται. Μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *EsMAM-1*, *EsCYP79F1*, *EsCYP79B2*, *EsCYP83A1*, *EsCYP83B1*, *EsSUR1*, *EsFMOGS<sub>OX-5</sub>*, *EsMYB34-1* και *EsMYB51-1*. Κάθε φορά, μαζί με τα σετ των αντιδράσεων για το κάθε γονίδιο, πραγματοποιήθηκε παράλληλα και σετ αντιδράσεων με εκμαγείο τα ίδια cDNA και τους εκκινητές της ουβικιτίνης. Αυτό έγινε για να μπορέσει να υπολογιστεί στη συνέχεια η σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου. Μετά το πέρας των αντιδράσεων εξάχθηκαν οι πίνακες Ct και αποτελεσματικότητας της αντίδρασης (efficiency) από το πρόγραμμα του μηχανήματος της real-time PCR. Ακολούθως, έγινε ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης του κάθε γονιδίου, με επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων με το κατάλληλο πρόγραμμα και κατασκευή των σχετικών διαγραμμάτων.

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διακύμανσης δυο παραγόντων (TWO WAY ANOVA) και οι μέσοι όροι των επαναλήψεων συγκρίθηκαν μεταξύ τους για σημαντικές διαφορές σε επίπεδο ( $\alpha=0.05$ ) με το κριτήριο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD) χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα STATISTICA 7.0. Πρώτος παράγοντας ήταν τα επίπεδα του θείου και δεύτερος ο χρόνος ανάπτυξης (ημέρες δειγματοληψίας). Στα διαγράμματα που κατασκευάστηκαν, με κεφαλαίο γράμμα φαίνεται το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των δειγματοληψιών της κάθε ομάδας-μεταχείρισης (ανάλυση πρώτου παράγοντα), ενώ με μικρό το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των ομάδων-μεταχειρίσεων σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας (ανάλυση δεύτερου παράγοντα).

### 1.1. Έκφραση βιοσυνθετικών και ρυθμιστικών γονιδίων στα φύλλα

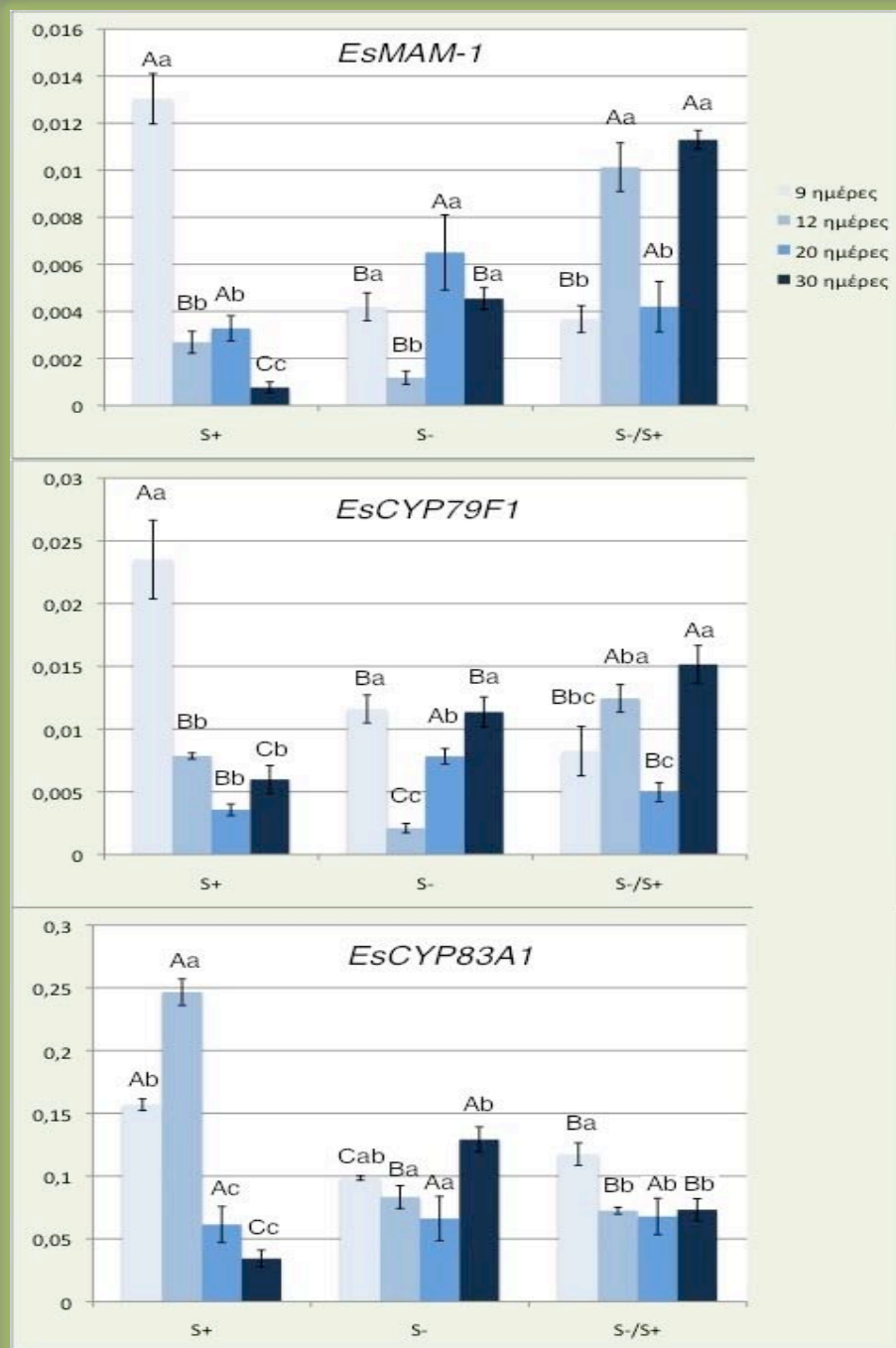
Η επίδραση των διαφόρων μεταχειρίσεων και του χρόνου δειγματοληψίας ήταν σημαντική στα επίπεδα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν ( $p<0.05$ ). Σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώθηκε επίσης σημαντική αλληλεπίδραση

μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της διαθεσιμότητας του θείου στο θρεπτικό διάλυμα ( $p < 0.05$ ). Αυτή η συμπεριφορά υποδηλώνει ότι, με την πάροδο του χρόνου τα φυτά μεταβάλλουν τα μεταγραφήματα τους σύμφωνα με το στάδιο ανάπτυξης τους αλλά ταυτόχρονα και σύμφωνα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος και δη με τη διαθεσιμότητα του θείου.

Τα γονίδια *EsCYP79F1* ( $p=0.097$ ) και *EsCYP79B2* ( $p=0.094$ ), που είναι υπεύθυνα για το δεύτερο στάδιο βιοσύνθεσης τόσο των αλειφατικών όσο και των ινδολικών ΓΚΣ (δημιουργία των αλδοξιμών), δεν επηρεάζονται από τα επίπεδα του θείου στο θρεπτικό διάλυμα αλλά από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και την αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων. Εξαιτίας της παρουσίας αλληλεπίδρασης η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά στο κάθε επίπεδο του παράγοντα ο οποίος εξετάζεται.

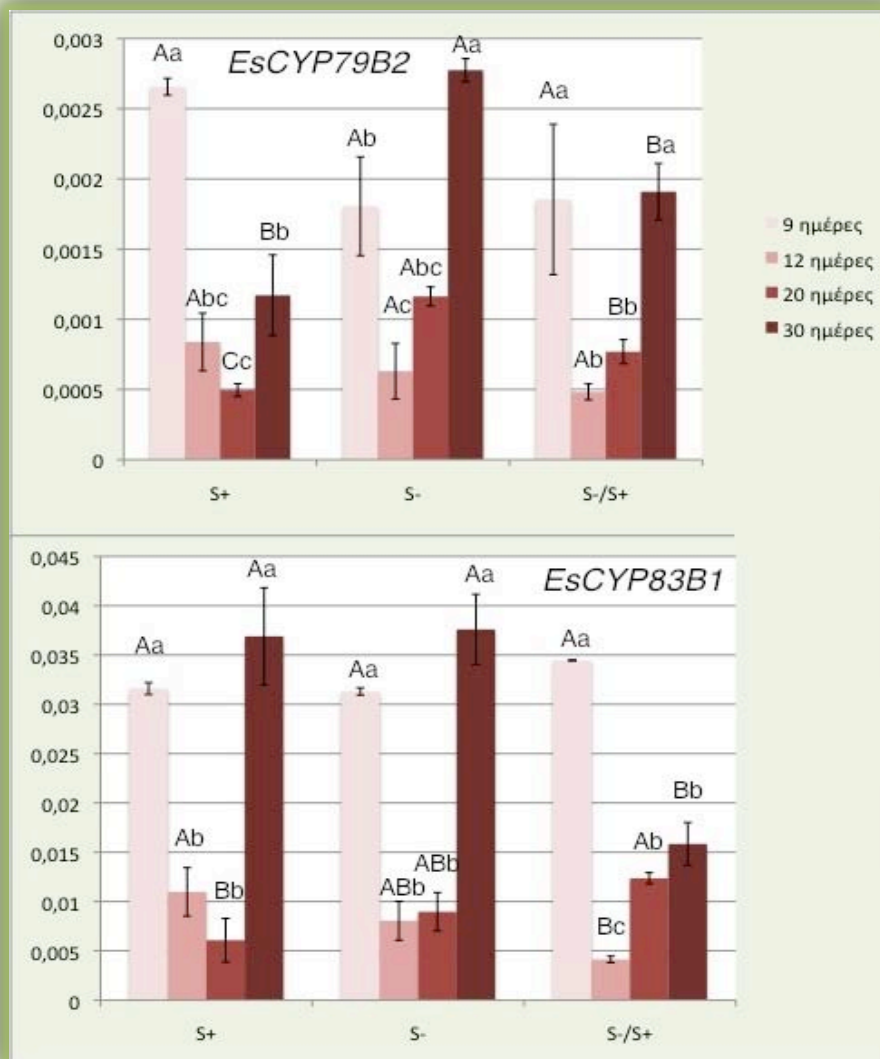
Σε συνθήκες επάρκειας θείου φαίνεται ότι η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ μειώνεται με την πάροδο του χρόνου εκτός από το γονίδιο *EsCYP83B1* η έκφραση του οποίου ενώ αρχικά (12 και 20 ημέρες) μειώθηκε δραματικά, κατά την τελευταία δειγματοληψία (30 ημέρες) η έκφραση του δεν διέφερε σημαντικά από αυτή που μετρήθηκε 9 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος.

Σε συνθήκες έλλειψης θείου, η σχετική έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ αυξήθηκε με την πάροδο του χρόνου (εικόνα E1). Συγκεκριμένα η έκφραση των γονιδίων *EsMAM1*, *EsCYP79F1* και *EsCYP83A1*, στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θείου ήταν σημαντικά υψηλότερη από τα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου κατά την τελευταία δειγματοληψία (30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος). Σημαντικά υψηλότερη έκφραση κατά την ίδια ημερομηνία δειγματοληψίας παρατηρήθηκε στα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν αρχικά σε συνθήκες έλλειψης και ακολούθως αποκαταστάθηκε η έλλειψη της θρέψης των φυτών σε θείο (εικόνα E1).



Εικόνα Ε1 . Σχετική έκφραση των αλειφατικών γονιδίων σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.

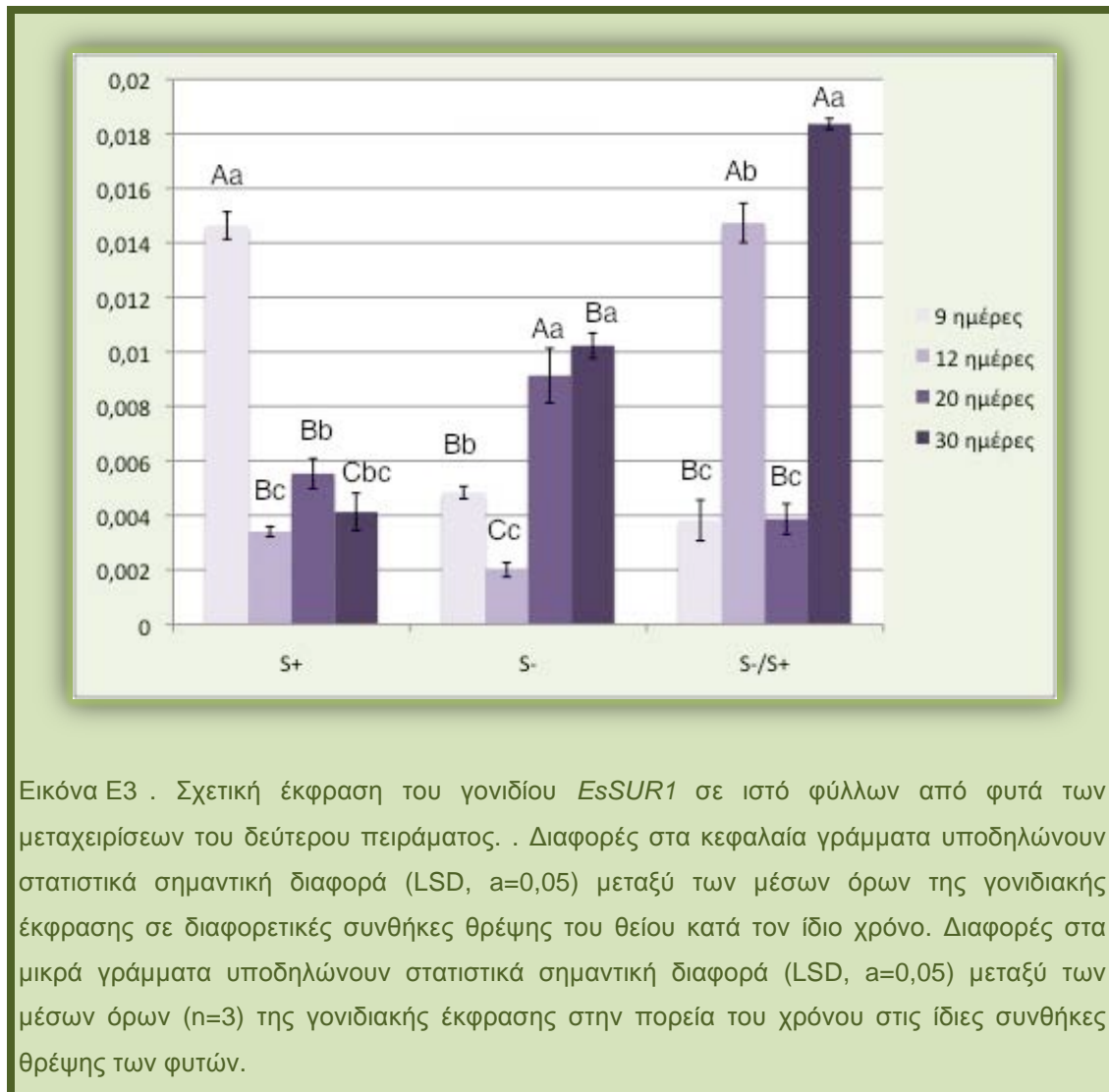
Τα γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά σε ότι αφορά την έκφραση τους σε σύγκριση με τα γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ. Συγκεκριμένα σε συνθήκες επάρκειας θείου, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης τους στις 12 και 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος ωστόσο αυτό δεν παρατηρήθηκε στις 30 ημέρες όπου διαπιστώθηκε μια σημαντική αύξηση της έκφρασης (εικόνα E2). Το ίδιο μεταγραφικό προφίλ παρατηρήθηκε τόσο σε συνθήκες παροδικής έλλειψης θείου όσο και σε συνθήκες διαρκούς έλλειψης υποδηλώνοντας ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του φυτού στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο είναι σημαντική (εικόνα E2). Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν στοιχεία σε ότι αφορά αυτή τη συμπεριφορά, ωστόσο αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα φυτά βρίσκονται σε μια φάση αναπτυξιακής και φυσιολογικής αλλαγής (έναρξη άνθησης) όπου τα ΓΚΣ χρησιμοποιούν κοινά μόρια με αυτά που χρησιμοποιούνται κατά τη βιοσύνθεση της αυξίνης.



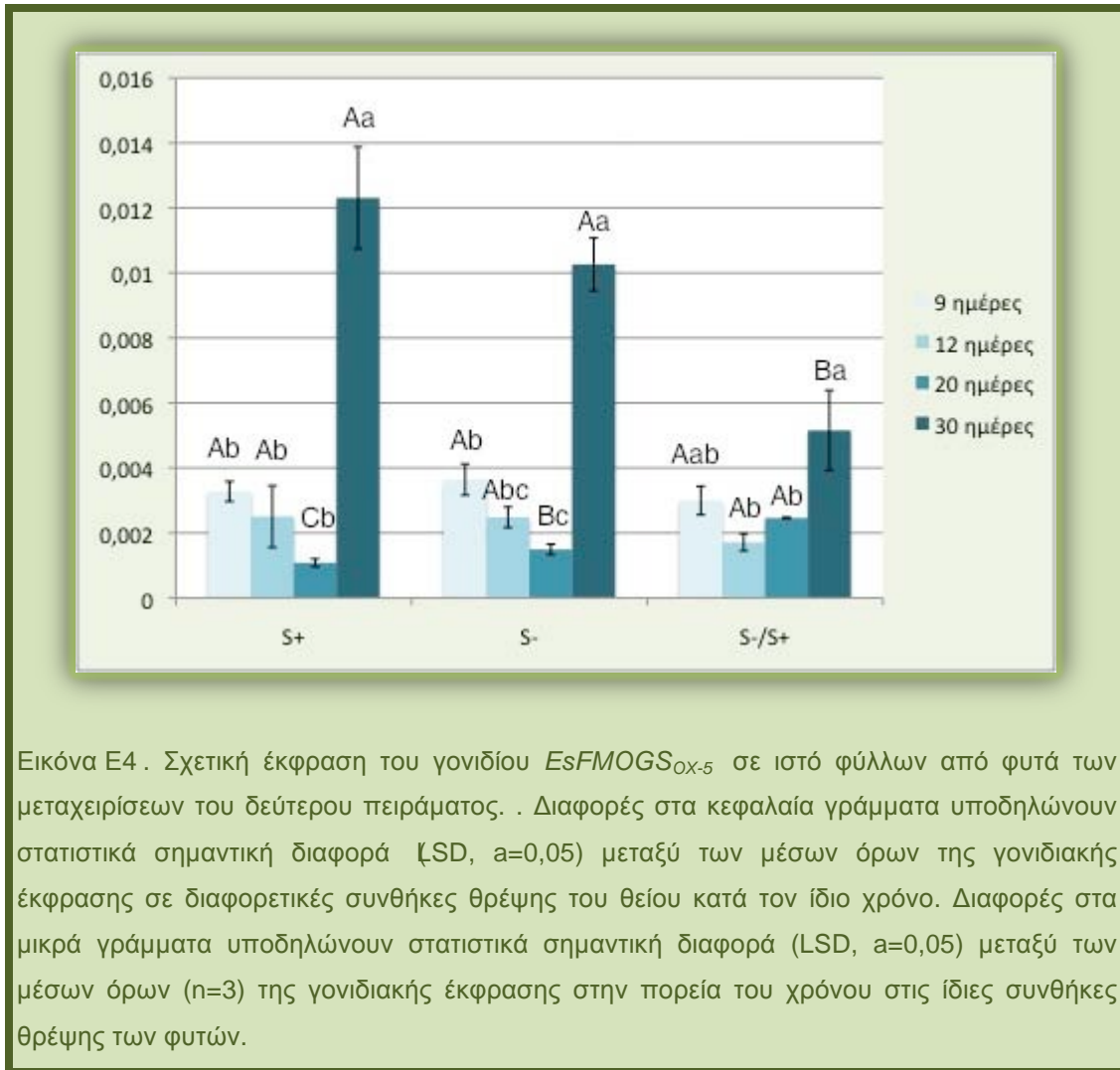
Εικόνα E2 . Σχετική έκφραση των ινδολικών γονιδίων σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.

Η έκφραση του γονιδίου *EsSUR1* (εικόνα E3) σε συνθήκες επάρκειας θείου μειώνεται σημαντικά 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος και παραμένει σταθερή μέχρι το τέλος (30 ημέρες). Σε συνθήκες έλλειψης η έκφραση του γονιδίου μειώνεται αρχικά αλλά 20 και 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος αυτή

αυξάνει. Τα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες αρχικής έλλειψης θείου και επαναφοράς των επιπέδων του στο θρεπτικό διάλυμα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης του 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, ακολούθησε σημαντική μείωση στις 20 ημέρες και σημαντική αύξηση στις 30 ημέρες.



Εικόνα E3 . Σχετική έκφραση του γονιδίου *EsSUR1* σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.

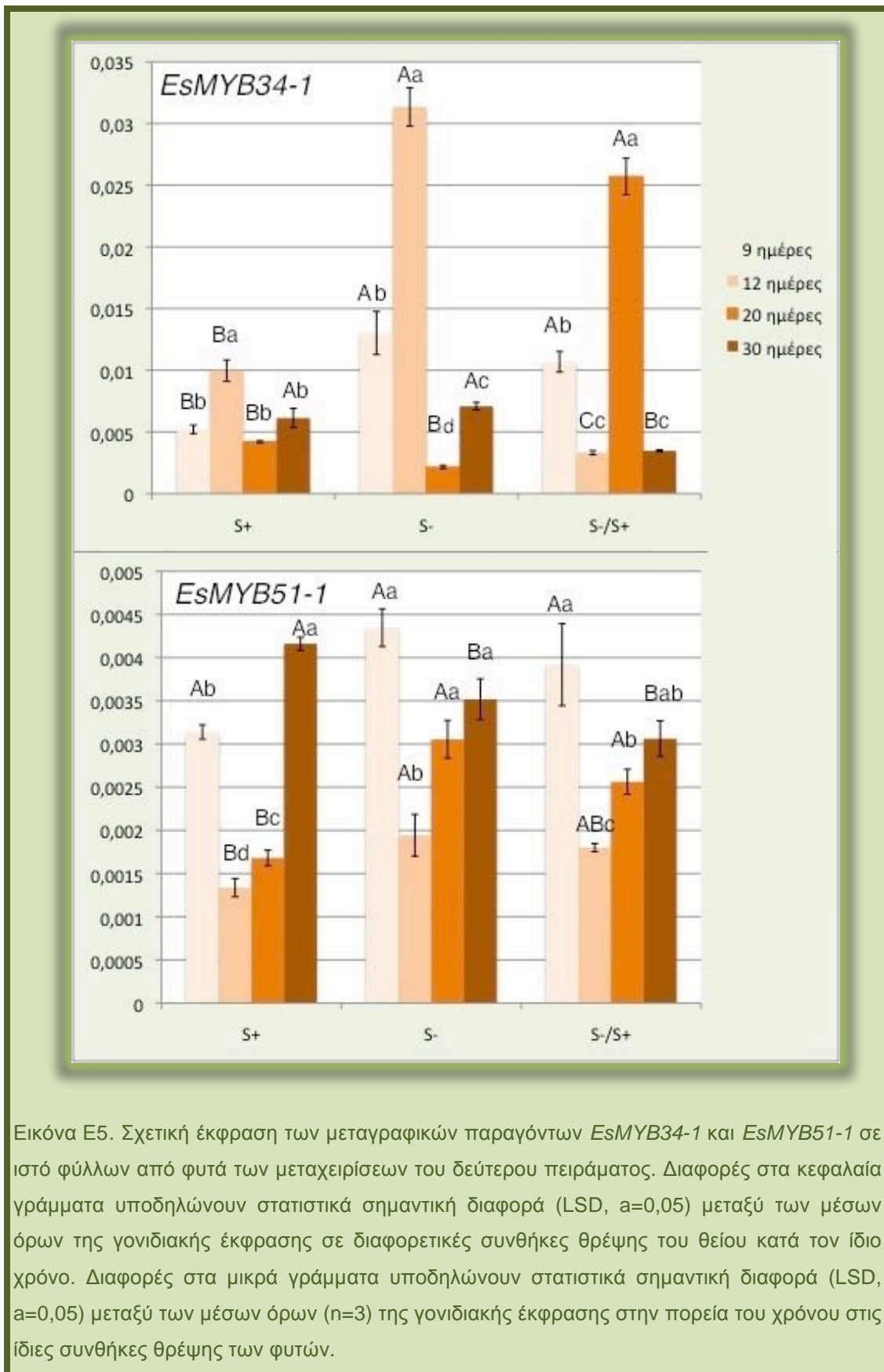


Εικόνα Ε4 . Σχετική έκφραση του γονιδίου *EsFMOGS<sub>ox-5</sub>* σε ιστό φύλλων από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.

Κατά την τελευταία δειγματοληψία παρατηρήθηκε επίσης δραματική αύξηση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *EsFMO<sub>GSOX-5</sub>* (εικόνα Ε4), υποδηλώνοντας ότι με τη πάροδο του χρόνου η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας των αλειφατικών ΓΚΣ που παρατηρείται πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων της ομάδας *EsFMO<sub>GSOX-5</sub>* (Li et al., 2011). Το μεταγραφικό προφίλ του εν λόγω γονιδίου παρόλο που τα επίπεδα του μειώθηκαν σημαντικά σε συνθήκες έλλειψης ή και επαναφοράς του θείου στο θρεπτικό διάλυμα δε μεταβλήθηκε υποδηλώνοντας ότι η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας των αλειφατικών ΓΚΣ γίνεται σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης του φυτού.

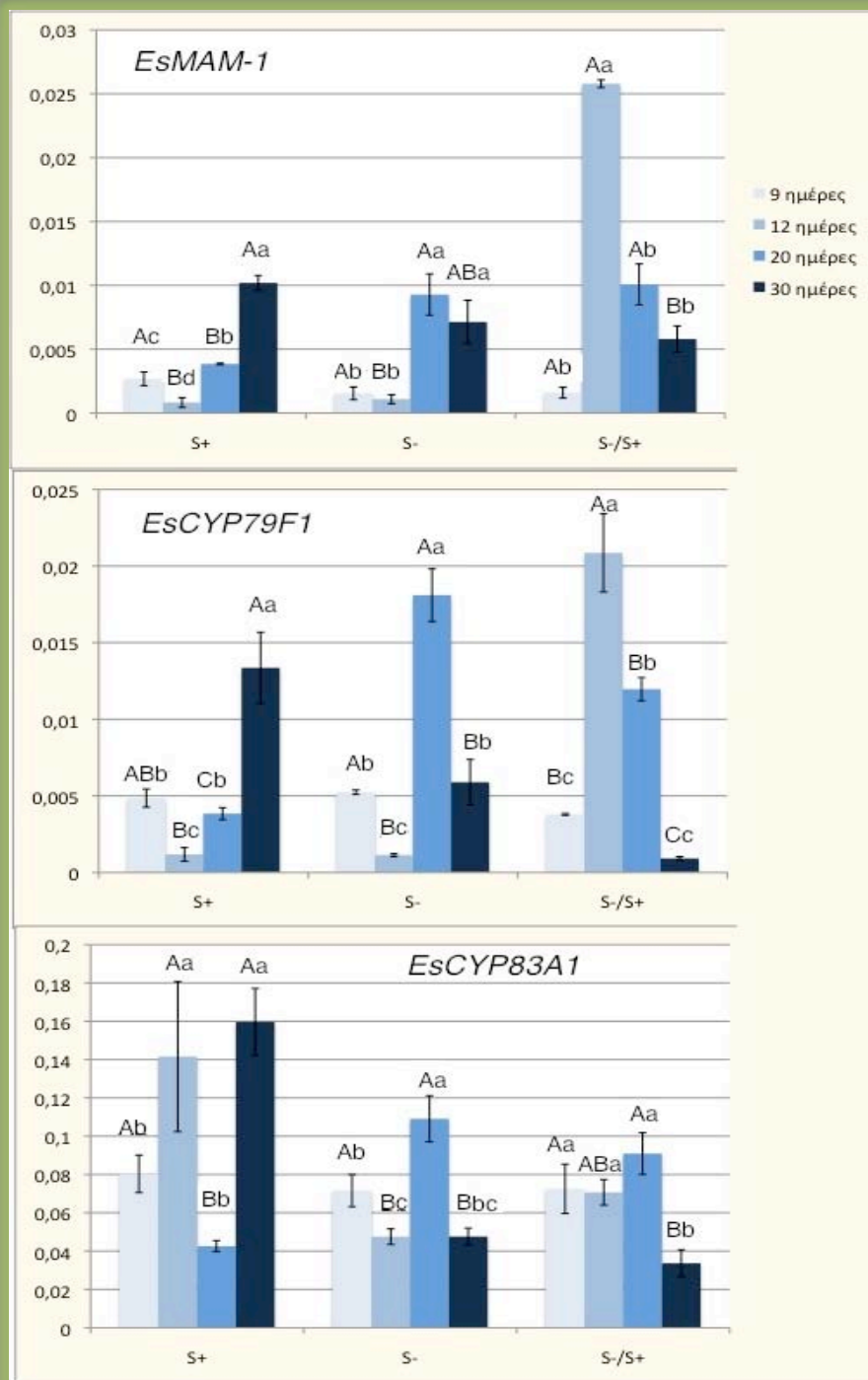
Οι μεταγραφικοί παράγοντες *EsMYB34-1* και *EsMYB51-1* επηρεάστηκαν σημαντικά τόσο από την παρουσία του θείου στο θρεπτικό διάλυμα όσο και από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Η σχετική έκφραση του *EsMYB34-1* αυξήθηκε σημαντικά μόνο 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Σε συνθήκες έλλειψης θείου η σχετική έκφραση του *EsMYB34-1* παρουσίασε σημαντική αύξηση 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος και ακολούθως η έκφραση του μειώθηκε σημαντικά. Αντίθετα, στα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν αρχικά σε συνθήκες έλλειψης θείου και ακολούθως σε επάρκεια, η σχετική έκφραση του γονιδίου μειώθηκε σημαντικά στις 12 ημέρες και ακολούθως αυξήθηκε σημαντικά στις 20 ημέρες. Κατά την τελευταία δειγματοληψία, η σχετική έκφραση του γονιδίου μειώθηκε σημαντικά (Εικόνα Ε5). Αντίθετα η σχετική έκφραση του *EsMYB51-1* μειώθηκε σημαντικά 12 και 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος και αυξήθηκε σημαντικά 30 ημέρες μετά όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου (εικόνα Ε5). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε στα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν είτε σε συνθήκες έλλειψης θείου είτε σε συνθήκες αρχικής έλλειψης και αποκατάστασης του επιπέδου του θείου στο θρεπτικό διάλυμα (εικόνα Ε5).



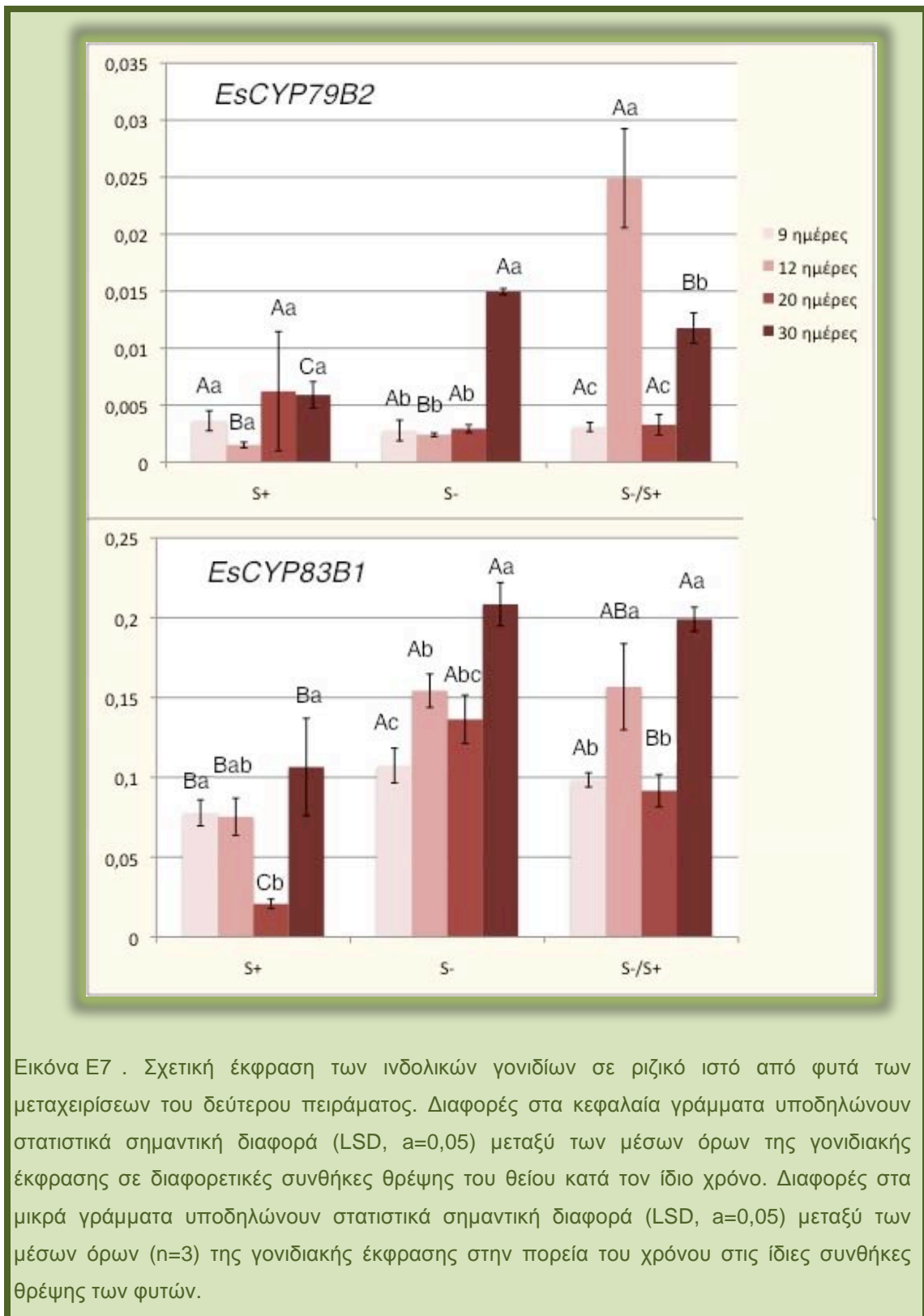


## 1.2. Έκφραση βιοσυνθετικών και ρυθμιστικών γονιδίων στις ρίζες

Όπως και στα φύλλα έτσι και στη ρίζα η σχετική έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ επηρεάστηκε τόσο από τις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών σε ότι αφορά την παρουσία θείου στο θρεπτικό διάλυμα, από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών καθώς και από την αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων ( $p < 0.05$ ). Η σχετική έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ παρουσίασε σημαντική αύξηση με την πάροδο του χρόνου (εικόνα E6) σε συνθήκες επάρκειας του θείου. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θείου δεν παρουσίασαν διαφορετικό μεταγραφικό προφίλ σε ότι αφορά τα γονίδια που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ (εικόνα E6) ενώ στατιστικά σημαντικά υψηλότερη σχετική έκφραση παρατηρήθηκε στα -S φυτά 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Διαφορετικό μεταγραφικό προφίλ παρατηρήθηκε στα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν αρχικά σε συνθήκες έλλειψης θείου και ακολούθως αποκατάστασης της επάρκειας του θρεπτικού στοιχείου στα φυτά. Συγκεκριμένα, για τα γονίδια *EsMAM1* και *EsCYP79F1* η σχετική έκφραση τους αυξήθηκε σημαντικά 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος και ακολούθησε σημαντική μείωση της έκφρασης τους μέχρι το τέλος του πειράματος. Αντίθετα στις ίδιες συνθήκες η σχετική έκφραση του γονιδίου *EsCYP83A1* παρέμεινε αμετάβλητη μέχρι και 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, ενώ σημαντική μείωση παρατηρήθηκε κατά το τέλος του πειράματος (εικόνα E6).



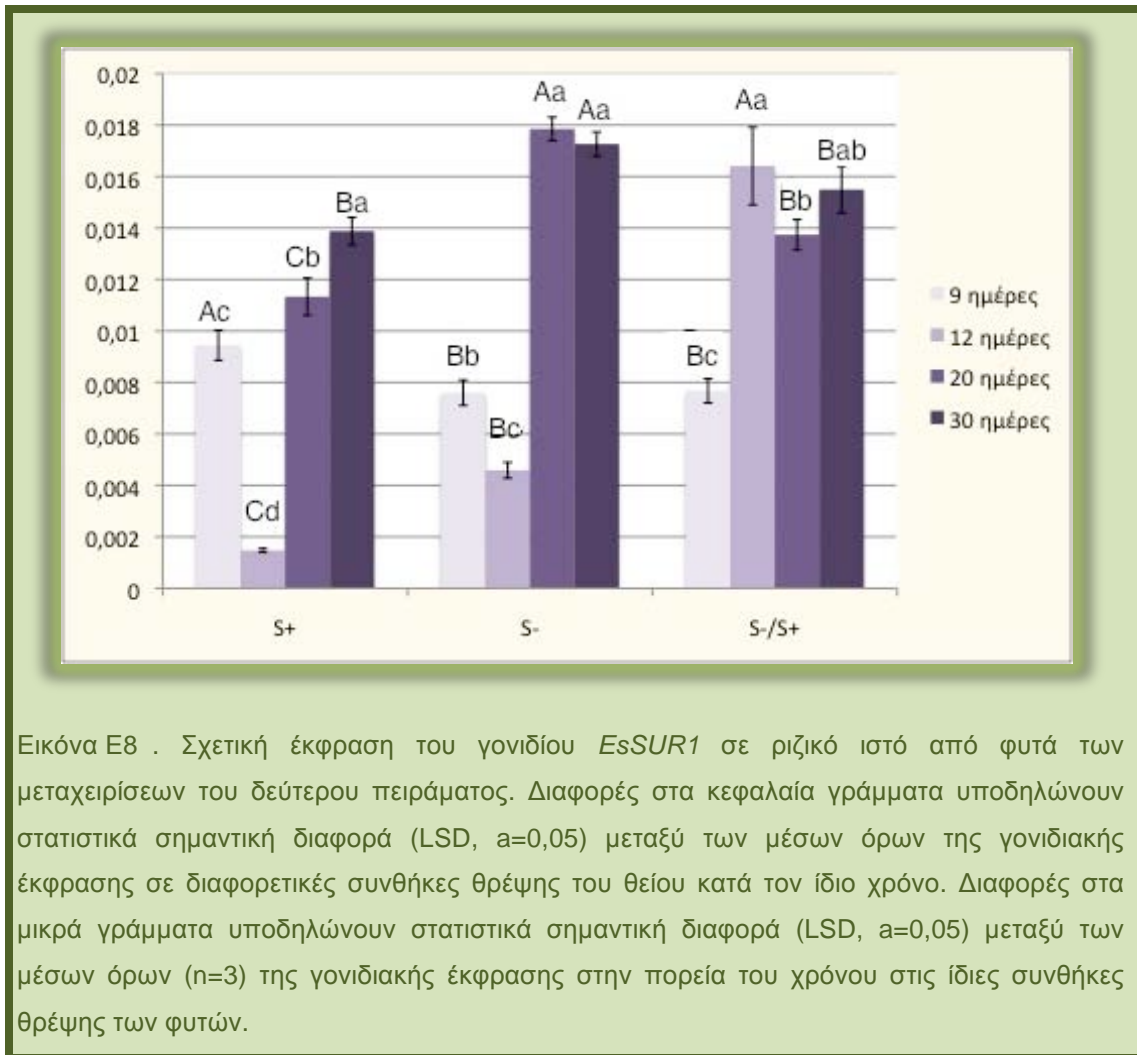
Εικόνα Ε6 . Σχετική έκφραση των αλειφατικών γονιδίων σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.



Εικόνα E7 . Σχετική έκφραση των ινδολικών γονιδίων σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.

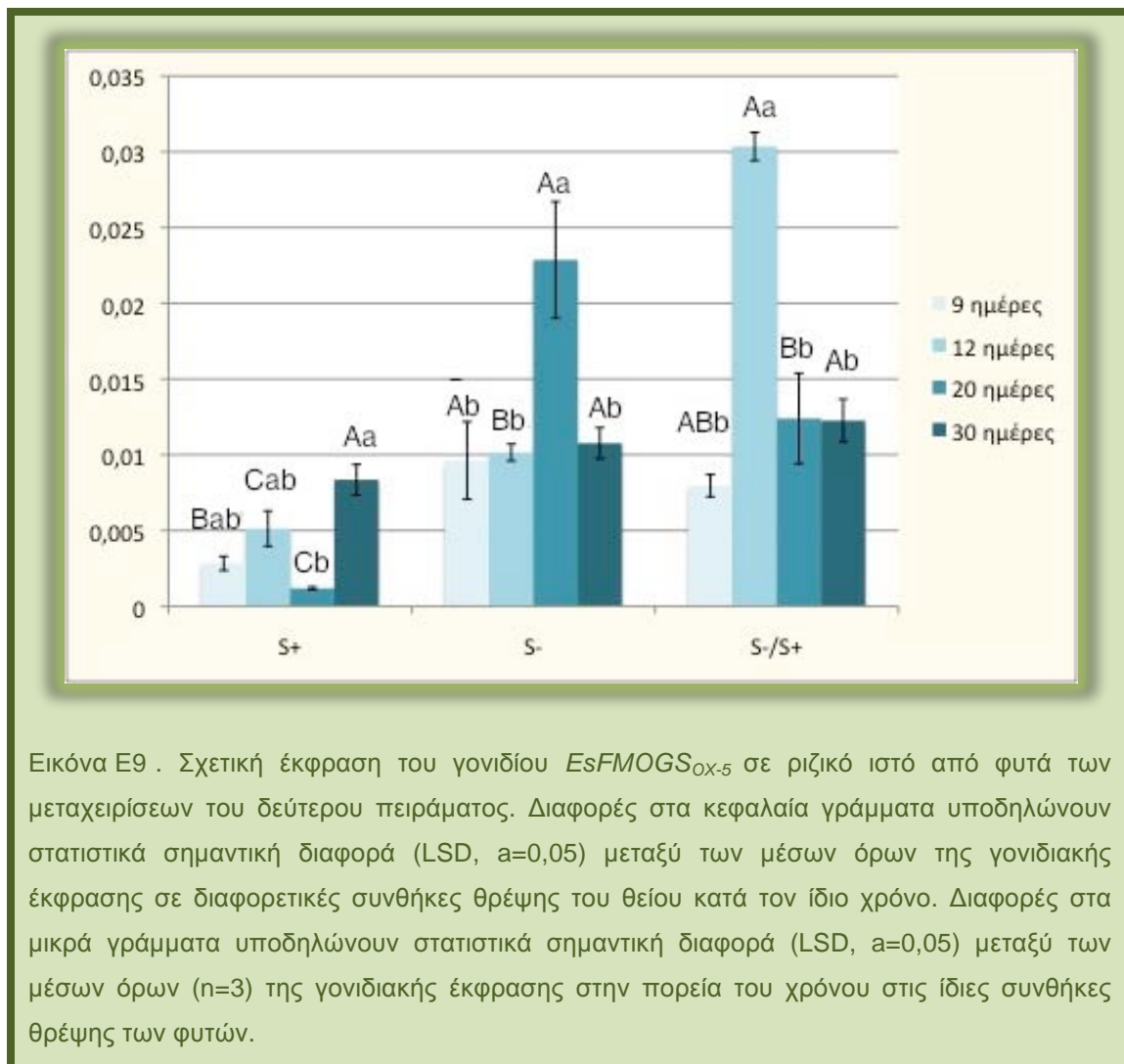
Η σχετική έκφραση του γονιδίου *EsSUR1* αυξήθηκε σημαντικά με την πάροδο του χρόνου ανεξάρτητα από την παρουσία του θείου στο θρεπτικό διάλυμα (εικόνα E8).

Ωστόσο η έλλειψη θείου είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου 12 και 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος (εικόνες E8 και E11).



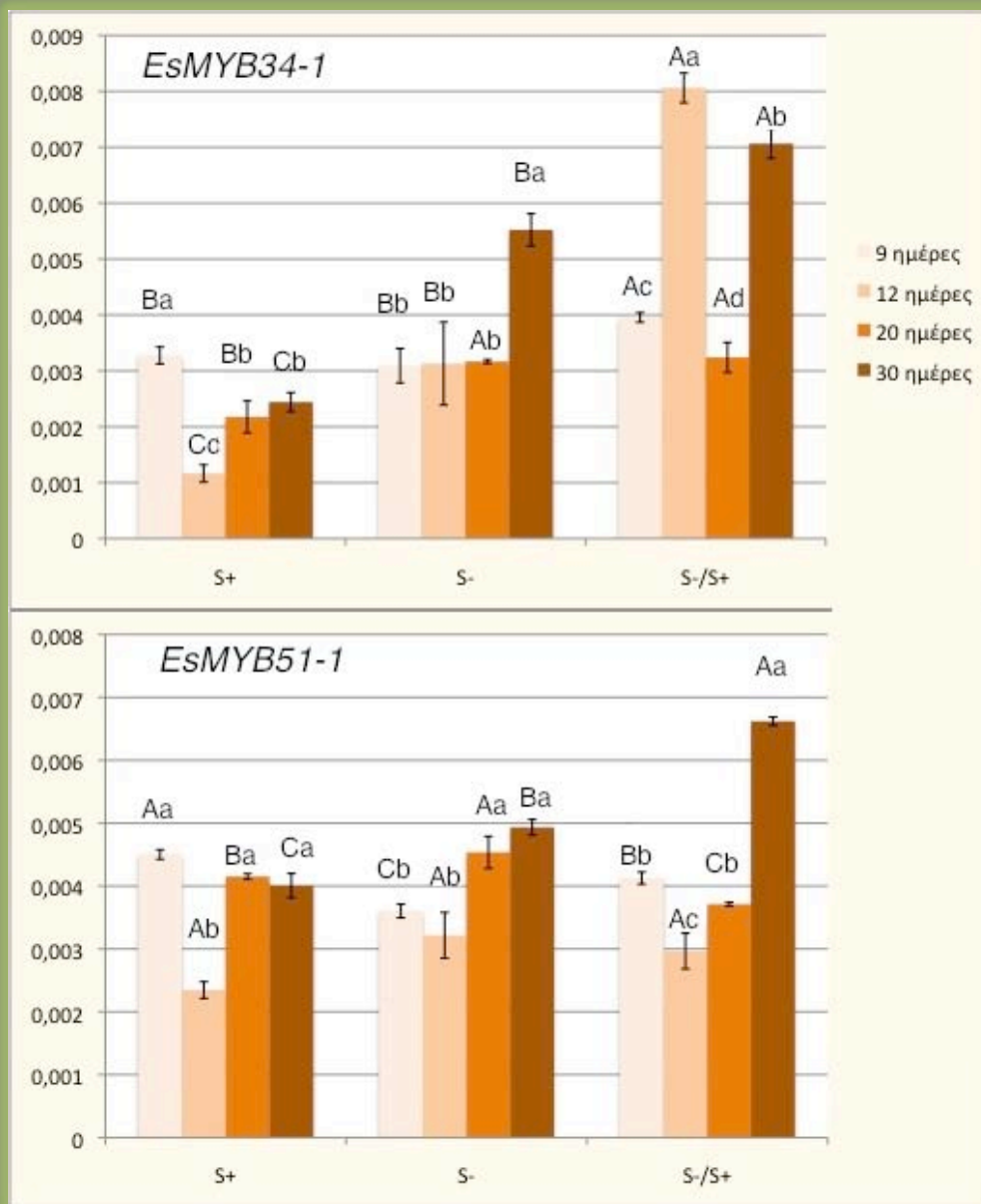
Η σχετική έκφραση του γονιδίου *EsFMOGSox-5* στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου παρουσίασε μικρή αύξηση με την πάροδο του χρόνου (εικόνα E9). Σε συνθήκες έλλειψης θείου σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου παρατηρήθηκε 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Στα φυτά -S/+S η σχετική έκφραση του γονιδίου αυξήθηκε σημαντικά 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος ενώ με την πάροδο του χρόνου μειώθηκε και επανήλθε στα επίπεδα έκφρασης κατά την έναρξη του πειράματος (εικόνα E9). Σημαντική αύξηση

της έκφρασης του γονιδίου παρατηρήθηκε σε συνθήκες έλλειψης θείου 9, 12 και 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος με βαθμό μεταβολής της έκφρασης 1.8, 1 και 4.3 φορές αντίστοιχα (εικόνα E11). Αυτή η μεταβολή ήταν μικρότερη στις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή του πειράματος και δεν διέφερε σημαντικά από αυτή των φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε στα  $-S/+S$  φυτά γεγονός που υποδηλώνει ότι η έλλειψη θείου στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών επάγει την έκφραση σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση του εν λόγω γονιδίου που σχετίζεται με την τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας των ΓΚΣ.



Η σχετική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *EsMYB34-1* στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου μειώθηκε σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα η σχετική έκφραση του εν λόγω μεταγραφικού παράγοντα αυξήθηκε σημαντικά σε συνθήκες έλλειψης του στοιχείου 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Στα φυτά  $-S/+S$  η σχετική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *EsMYB34-1* αυξήθηκε 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, μειώθηκε σημαντικά στις 20 ημέρες και επανήλθε στα ίδια επίπεδα με αυτή των 12 ημερών κατά την τελευταία δειγματοληψία.

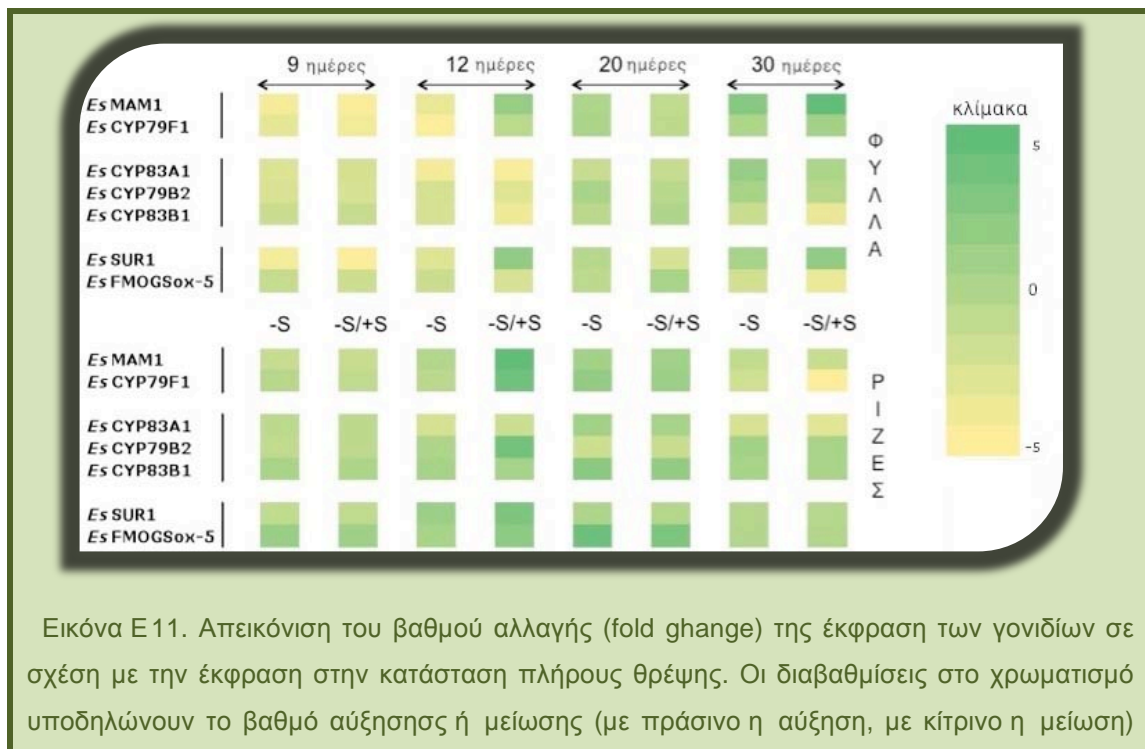
Αντίθετα η σχετική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *EsMYB51* παρέμεινε αμετάβλητη 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στις 12 ημέρες μετά την εφαρμογή στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου. Σε συνθήκες έλλειψης θείου, η σχετική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα αυξήθηκε σημαντικά 20 και 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε στα φυτά  $-S/+S$  αφού σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης παρατηρήθηκε 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος.



Εικόνα Ε10. Σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *EsMYB34-1* και *EsMYB51-1* σε ριζικό ιστό από φυτά των μεταχειρίσεων του δεύτερου πειράματος. Διαφορές στα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης του θείου κατά τον ίδιο χρόνο. Διαφορές στα μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (LSD,  $\alpha=0,05$ ) μεταξύ των μέσων όρων ( $n=3$ ) της γονιδιακής έκφρασης στην πορεία του χρόνου στις ίδιες συνθήκες θρέψης των φυτών.



Η σχετική έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ παρέμεινε αμετάβλητη στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου εκτός από το γονίδιο *EsCYP8B1* το οποίο παρουσίασε σημαντική μείωση 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Σε συνθήκες έλλειψης θείου η σχετική έκφραση των γονιδίων αυτών παρέμεινε σταθερή μέχρι και 20 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος και στα δύο γονίδια (εικόνα E7). Η έκφραση των γονιδίων αυτών στα φυτά όπου η έλλειψη θείου παρατηρήθηκε στα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους και ακολούθως αποκαταστάθηκε το επίπεδο του θείου στο θρεπτικό διάλυμα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων αυτών 12 και 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος (εικόνα E7). Η παροδική έλλειψη του θείου είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση των μεταγραφημάτων των γονιδίων *EsCYP79B2* και *EsCYP83B1* (εικόνα E11). Συγκεκριμένα 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, ο βαθμός αλλαγής της σχετικής έκφρασης ήταν 4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου.



## **2. Συζήτηση**

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της έλλειψης του θείου στην σχετική έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των ΓΚΣ τόσο στα φύλλα όσο και στο ριζικό σύστημα των φυτών ρόκας σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τόσο ο χρόνος όσο και η επάρκεια του θείου επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων αυτών σημαντικά ενώ οι δύο παράγοντες παρουσιάζουν σημαντική αλληλεπίδραση ( $p < 0.05$ ). Η μεταβολή των μεταγραφημάτων και της γονιδιακής έκφρασης διαφέρει μεταξύ του υπέργειου τμήματος των φυτών και της ρίζας επιβεβαιώνοντας ουσιαστικά τα ευρήματα του προηγούμενου πειράματος ότι η φυσιολογική απόκριση των φυτών ρόκας στην διαφορετική επάρκεια αζώτου και θείου είναι διαφορετική στους δύο ιστούς, αντικατοπτρίζοντας προφανώς και τόσο τις διαφορετικές βιοχημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα δυο όργανα του φυτού όσο και το ρόλο που διαδραματίζουν τα ΓΚΣ ως βιομόρια προστασίας και αποθήκευσης θείου.

Προηγούμενες μελέτες σε φυτά της οικογένειας των Σταυρανθών έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώθηκε με την αύξηση της ηλικίας των φυτών (Bellostas et al., 2007; Fahey et al., 2001; McGregor, 1988; Pereira et al., 2002; Vallejo et al., 2003). Πρόσφατη μελέτη σε φυτά ρόκας έδειξε ότι η συγκέντρωσή τους μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου σε συνθήκες επάρκειας θείου (Omirou et al., 2012). Η μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ με την αύξηση της ηλικίας των φυτών συνδέεται με πολύπλοκους μηχανισμούς βιοσύνθεσης και διάσπασης των μορίων αυτών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών (McGregor, 1988). Μέχρι στιγμής έχουν προταθεί δυο υποθέσεις για την αιτιολόγηση της μείωσης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στα φυτά. Ο πρώτος αφορά την συνεχή και σταθερή έκλυση μικρών ποσοτήτων πτητικών ισοθειοκυανικών ενώσεων που προκύπτουν από την υδρόλυση των ΓΚΣ μετά το θάνατο των φυτικών κυττάρων (Cole, 1980). Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται και από το γεγονός ότι, η ενζυμική δράση της μυροσινάσης, αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας των φυτών, γεγονός το οποίο προφανώς εξηγεί μερικώς τη μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ με την αύξηση της ηλικίας των φυτών (Rask et al., 2000). Ο δεύτερος αφορά το γεγονός ότι, ο ρυθμός

βιοσύνθεσης νέων ΓΚΣ σε σχέση με το ρυθμό διάσπασης τους στο φυτό να είναι πολύ μικρότερος και αυτό συνδέεται με την γονιδιακή έκφραση τόσο βιοσυνθετικών γονιδίων όσο και γονιδίων που συμμετέχουν στον καταβολισμό τους. Ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία που να αποκαλύπτουν τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται το φαινόμενο αυτό. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι τα πρώτα που δείχνουν ότι η μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στα φύλλα των Σταυρανόων συνδέεται με το μηχανισμό βιοσύνθεσής τους αφού η σχετική έκφραση των πλείστων γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ μειώνεται σημαντικά όσο αυξάνει το στάδιο ανάπτυξης του φυτού όταν αυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες επάρκειας θείου. Συγκεκριμένα η σχετική έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της επιμήκυνσης της αλειφατικής αλυσίδας των ΓΚΣ καθώς και τα γονίδια που συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της βιοσύνθεσης των ινδολικών ΓΚΣ στα φύλλα μειώνονται σημαντικά. (Εικόνα E1 και E2). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στη σχετική έκφραση του γονιδίου *EsSUR1*. Ως εκ τούτου φαίνεται ότι, η μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ μπορεί να οφείλεται στη μείωση της γονιδιακής έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων και στην αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στον καταβολισμό τους. Ωστόσο για την πλήρη επιβεβαίωση της υπόθεσης η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων κατάβολισμού των ΓΚΣ πρέπει να μελετηθεί. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *EsFMO* 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Το εν λόγω γονίδιο συμμετέχει στην τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας των ΓΚΣ των οποίων η παρουσία τους σχετίζεται με το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού. Συγκεκριμένα, σε προηγούμενη μελέτη έχει δειχθεί ότι στη ρόκα η συγκέντρωση των 3 κύριων αλειφατικών ΓΚΣ μεταβάλλεται σε σχέση με τον χρόνο. Κυρίαρχο μεμονωμένο ΓΚΣ ήταν η GRA στις 15 και 30 ημέρες μετά τη φύτευση ενώ η συγκέντρωσή της μειώθηκε σημαντικά 45 ημέρες μετά τη φύτευση και δεν διέφερε σημαντικά από την GSV. Αντίθετα με την GRA, η GSV και GER αυξήθηκαν με την πάροδο του χρόνου (Omirou et al., 2012). Προτάθηκε δε ότι η μείωση της συγκέντρωσης της GRA και αύξησης της συγκέντρωσης των άλλων δυο ΓΚΣ κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών πιθανό να οφείλεται σε διαδοχικές τροποποιήσεις της κοινής πλευρικής αλυσίδας καθώς επίσης ότι η βιοσύνθεση των τριών αυτών μεμονωμένων ΓΚΣ είναι αλληλένδετη, αφού υπάρχει υψηλή και

στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους. Όπως έχει αναφερθεί, θεωρείται ότι η GER αποτελεί πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεση της GRA και της GSV (Bennett et al., 2007) αφού η GRA και η GER έχουν την ίδια πλευρική αλυσίδα με μόνη διαφορά την παρουσία οξυγόνου στο άτομο θείου της GRA ενώ η GSV έχει πλευρική αλυσίδα με ένα άτομο άνθρακα λιγότερο και ελεύθερη στο άκρο του μορίου μια σουλφιδρική ομάδα. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής φαίνεται να επιβεβαιώνουν αυτή την υπόθεση αφού η σχετική έκφραση του γονιδίου *EsFMO* αυξάνει σημαντικά κατά την τελευταία δειγματοληψία, υποδεικνύοντας ότι η μετατροπή της GER σε GRA ελέγχεται αναπτυξιακά και μάλιστα ανεξάρτητα από την κατάσταση θρέψης του φυτού. Παρόμοια ευρήματα είναι σημαντικά καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς την αύξηση της εμπορικής αξίας των φυτών ρόκας μέσω της εμπειριστατωμένης ανάλυσης των βιοδραστικών ουσιών που καθορίζουν τη διατροφική αξία του φυτού.

Ο μεταβολισμός του θείου δεν μπορεί να διαχωριστεί από το γενικό μεταβολισμό των φυτών. Λαμβάνοντας υπόψη τις πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μεταβολισμού του θείου και άλλων μεταβολικών μονοπατιών δεν θα πρέπει να προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι πολυάριθμες μεταγραφικές και μεταβολικές αλλαγές επάγονται σε φυτά σε συνθήκες έλλειψης θείου. Ένας συνδυασμός μεταγραφικών και μεταβολικών δεδομένων από μελέτες σε διάφορες φάσεις της έλλειψης θείου αποκάλυψε μια πολυπλοκότητα στην απόκριση του φυτού σε μια σταδιακά εξελισσόμενη μείωση της διαθεσιμότητας αυτού του θρεπτικού στοιχείου (Hirai & Saito, 2004; Nikiforova et al., 2004; 2005a; 2005b; Noctor, 2006). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η συγκέντρωση των ΓΚΣ όσο και το μεταγραφικό προφίλ των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τους (*MAM*, *CYP79* και *CYP83*) μειώνονται σε συνθήκες έλλειψης θείου. Συγκεκριμένα οι Hirai et al. (2005) έδειξαν σε φυτά *Arabidopsis* σημαντική μείωση της έκφρασης των γονιδίων αυτών με την πάροδο του χρόνου. Όντως τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από την παρούσα διατριβή αφού σε όλες τις περιπτώσεις, η έκφρασή τους μειώθηκε σημαντικά σε συνθήκες έλλειψης θείου εκτός των γονιδίων *CYP83B1* και *EsFMOGSox-5* τα οποία παραμένουν αμετάβλητα (Εικόνα E11).

Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει συμπεριφορά της μεταγραφικής δραστηριότητας των φυτών μετά τις 12 ημέρες εφαρμογής της καταπόνησης αφού φαίνεται ότι η γονιδιακή έκφραση μεταβάλλεται διαφορετικά στα φύλλα σε σχέση με το ριζικό σύστημα των φυτών. Επιπρόσθετα η επαναφορά του θείου σε κανονικά επίπεδα έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης των φυτών σε ότι αφορά την βιοσύνθεση των ΓΚΣ (Εικόνα E11). Όντως η μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ σε συνθήκες έλλειψης θείου στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του φυτού μπορεί να συνδέεται με την ανάγκη των φυτών να ικανοποιήσουν τις ανάγκες του πρωτογενούς μεταβολισμού αντλώντας τα αποθέματα θείου που είναι αποθηκευμένα στο μόριο των ΓΚΣ (Falk et al., 2007). Με την πάροδο όμως του χρόνου τα φυτά ενεργοποιούν εκ νέου τον μηχανισμό βιοσύνθεσης των ΓΚΣ πιθανότατα για το σχηματισμό ενώσεων του αμυντικού τους μηχανισμού. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα δεδομένα της παρούσας διατριβής αφού η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αλειφατικών ΓΚΣ παρουσιάζει την μεγαλύτερη αύξηση (Εικόνα E11) σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επάρκειας θείου. Από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ να μην αυξάνουν τα μεταγραφήματά τους ωστόσο αυτή η αύξηση στις πλείστες των περιπτώσεων δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα E7 και E11).

Στο ριζικό σύστημα οι αλλαγές φαίνονται να είναι πιο έντονες 12 ημέρες από την έναρξη του πειράματος και να αφορούν περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό βιοσύνθεσης των ΓΚΣ και ειδικότερα στα φυτά τα οποία αρχικά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θείου στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης τους (Εικόνα E11). Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση που αναφέρεται στο προηγούμενο πείραμα ότι δηλαδή υπάρχει μεταφορά των ΓΚΣ στα διάφορα όργανα του φυτού. Ενδεικτικό είναι και το γεγονός ότι η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων στα φυτά αυτά ήταν σημαντικά υψηλότερη ακόμη και 20 ημέρες μετά τη λήξη της εφαρμογής της καταπόνησης. Η επαναφορά του θείου στο θρεπτικό διάλυμα είχε ως αποτέλεσμα την δραματική αύξηση σχεδόν όλων των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Η έλλειψη θείου από τα φυτά έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους της

ρίζας έτσι ώστε το φυτό να εκμεταλλεύεται μεγαλύτερο όγκο εδάφους έτσι ώστε να προσλάβει όσο το δυνατό περισσότερο θείο (Kutz et al., 2002; Buchner et al., 2004). Σε αυτό το σημείο η παρουσία των ΓΚΣ μπορεί να διαδραματίσει ένα φυσιολογικό τρόπο αντίδρασης του φυτού αποτελώντας υποστρώμα για τη βιοσύνθεση της αυξίνης, η οποία με τη σειρά της επάγει την αύξηση του ριζικού συστήματος. Αυτό ειδικότερα επιτυγχάνεται μέσω της διάσπασης της GBS με την επαγωγή γονιδίων που επάγουν τη βιοσύνθεση των νιτριλασών, ένζυμα διάσπασης των ινδολικών ΓΚΣ (Nikiforova et al., 2003).

Στην παρούσα διατριβή διαπιστώθηκε μείωση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ στα αρχικά στάδια του πειράματος ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα φυτά όχι μόνο επάγουν το μηχανισμό καταβολισμού των ινδολικών ΓΚΣ αλλά επίσης καταστέλλουν και τη βιοσύνθεσή τους (Εικόνα E11). Η έκφραση του γονιδίου *EsCYP83B1* ειδικότερα, φαίνεται να ελέγχει τη τύχη του IOAX (ινδολουλ-3-ακεταλδοξίμης) το οποίο θεωρείται κομβικό σημείο τόσο για τη βιοσύνθεση του ινδολουλοξικού οξέος. Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος φαίνεται να καθορίζεται από τον παράγοντα MYB51 αφού στα φυτά αυτά αυξήθηκε η σχετική του έκφραση 2.5 φορές μετά την πάροδο 30 ημερών από την έναρξη του πειράματος. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες που συνδέουν τον έλεγχο του γονιδίου από τον μεταγραφικό παράγοντα MYB51 (Yan and Chen, 2007).

## ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Abrol and Ahmad** (2003) Sulphur in plants, Kluwer Academic Publishers, 58:2369–2387
- **Agerbirk N. & Olsen C.E.** (2012) Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*, 77:16-45
- **Agerbirk N., De Vos M., Kim J. H., & Jander G.** (2009) Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews*, 8:101–120.
- **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.
- **Aires A, Rosa E, Carvalho R, Haneklaus S, Schnug E** (2007) Influence of nitrogen and sulfur fertilization on the mineral composition of broccoli sprouts. *Journal of Plant Nutrition*, 30:1035–1046
- **Aires, A., Dias, C. S. P., Carvalho, R., Oliveira, M. H., Monteiro, A. A., Simoes, M. V., et al.** (2011) Correlations between disease severity, glucosinolate profiles and total phenolics and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* inoculation of different Brassicaceae. *Scientia Horticulturae*, 129:503–510
- **Akagi K, Sano M, Ogawa K, Hirose M, Goshima H, Shirai T.** (2003) Involvement of toxicity as an early event in urinary bladder carcinogenesis induced by phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, and analogues in F344 rats. *Toxicologic Pathology*, 31:388-96
- **Alam M.S., Kaur G., Jabbar Z., Javed K. and Athar M.** (2007) *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 910-920
- **Aliabadi, A., Renwick, J. A. A., & Whitman, D. W.** (2002) Sequestration of glucosinolates by harlequin bug *Murgantia histrionica*. *Journal of Chemical Ecology*, 28:1749–1762
- **Alqasoumi Saleh, Al-Sohaibani Mohammed, Al-Howiriny Tawfeq, Al-Yahya Mohammed, Rafatullah Syed** (2009) Rocket “*Eruca sativa*”: A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World Journal of Gastroenterology*, 15(16): 1958-1965
- **Andreasson, E. et al.** (2001) Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 127:1750–1763
- **Araki, R., Hasumi, A., Nishizawa, O.I., Sasaki, K., Kuwahara, A., Sawada, Y., Totoki,**



- Y., Toyoda, A., Sakaki, Y., Li, Y., Saito, K., Ogawa, T. and Hirai, M.Y. (2013) Novel bioresources for studies of Brassica oleracea: identification of a kale MYB transcription factor responsible for glucosinolate production. *Plant Biotechnology Journal*, 11: 1017-27.
- **Arvind H. Hirani, Genyi Li, Carla D. Zelmer, Peter B.E. McVetty, M. Asif & Aakash Goyal** (2012) *Molecular Genetics of Glucosinolate Biosynthesis in Brassicas: Genetic Manipulation and Application Aspects*. Crop Plant, InTech, ISBN: 978-953-51-0527-5
  - **Asakage M, Tsuno NH, Kitayama J, Tsuchiya T, Yoneyama S, Yamada J, Okaji Y, Kaisaki S, Osada T, Takahashi K, Nagawa H.** (2006) Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. *Angiogenesis*, 9:83–91.
  - **Augustine R, Majee M, Gershenzon J, Bisht NC** (2013) Four genes encoding MYB28, a major transcriptional regulator of aliphatic glucosinolate pathway are differentially expressed in the allopolyploid Brassica juncea. *Journal of Experimental Botany*, 64:4907-4921
  - **Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B** (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45:106–114
  - **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
  - **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
  - **Bangarwa, S. K., Norsworthy, J. K., Mattice, J. D., & Gbur, E. E.** (2011) Yellow nutsedge interference in polyethylene-mulched bell pepper as influenced by turnip soil amendment. *Weed Technology*, 25(3):466–472
  - **Barcelo, S., Gardiner, J. M., Gescher, A., Chipman, J.K.** (1996) CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis*, 17:277–282
  - **Barillari J, Canistro D, Paolini M, Ferroni F, Pedulli GF, Iori R, Valgimigli L** (2005)

Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* mill.) seeds and sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2475–2482

- **Barillari J, Gueyrard D, Rollin P, Iori R** (2001) *Barbarea verna* as a source of 2-phenylethyl glucosinolate, precursor of cancer chemopreventive phenylethyl isothiocyanate. *Fitoterapia*, 72:760-764
- **Baskar V, Gururani MA, Yu JW, Park SW.** (2012) Engineering glucosinolates in plants: current knowledge and potential uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168:1694–1717
- **Bednarek, P. et al.** (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, 323:101–106
- **Bellostas, N., P. Kachlicki, J.C. Sørensen, and H. Sørensen** (2007) Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Scientia Horticulturae*, 114:234-242.
- **Benderoth, M., Textor, S., Windsor, A. J., Mitchell-Olds, T., Gershenzon, J., & Kroymann, J.** (2006) Positive selection driving diversification in plant secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:9118–9123
- **Bennett RN, Carvalho R, Mellon FA, Eagles J, Rosa EAS** (2007) Identification and quantification of glucosinolates in sprouts derived from seeds of wild *Eruca sativa* (salad rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket) from diverse geographical locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1):67–74
- **Bennett RN, Mellon FA, Botting NP, Eagles J, Rosa EAS, Williamson G** (2002) Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* (salad rocket). *Phytochemistry*, 61(1):25–30
- **Bennett RN, Rosa EAS, Mellon FA, Kroon PA** (2006) Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *eruca sativa* (salad rocket), *diplotaxis eruroides* (wall rocket), *diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *bunias orientalis* (turkish rocket). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4005–4015
- **Bianco V.V.** 1995. Rocket, an ancient underutilized vegetable crop and its potential, In: Padulosi S. (ed.). *Rocket genetic resources network*. International Plant Genetic

Resources Institute, Lisbon, Portugal, 13-15 November, 1994, pp. 35-59

- **Bisht, N. C., Gupta, V., Ramchiary, N., Sodhi, Y. S., Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Pental, D. & Pradhan, A. K.** (2009) Fine mapping of loci involved with glucosinolate biosynthesis in oilseed mustard (*Brassica juncea*) using genomic information from allied species. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 413-421.
- **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.
- **Blangiforti S., Venora G.** (1997) Cytological study on rocket species by means of image analysis system. In: Padulosi S. & Pignone D. (ed.). *Rocket: a Mediterranean crop for the world*. International Plant Genetic Resources Institute, Legnaro, Italy, 13-14 December, 1996, pp. 36-40
- **Bloem E, Haneklaus S, Schnug E** (2007) Comparative effects of sulfur and nitrogen fertilization and post-harvest processing parameters on the glucotropaeolin content of *Tropaeolum majus* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:1576–1585
- **Bowsher CS, Tobin M.** (2008) *Plant Biochemistry*. Garland Science, New York
- **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.
- **Bridges, M., Jones, A. M. E., Bones, A. M., Hodgson, C., Cole, R., Bartlet, E., et al.** (2001) Spatial organization of the glucosinolate–myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biology Science*, 269:187–191.
- **Brown KK, Blaikie FH, Smith RA, Tyndall JD, Lue H, Bernhagen J, Winterbourn CC, Hampton MB** (2009) Direct modification of the proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor by dietary isothiocyanates. *The Journal of Biological Chemistry*, 284:32425-32433
- **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
- **Bussy, A.** 1840. Sur la formation de l'huile essentielle de moutarde. *J. Pharm*, 27: 464-471

- **Cartea, M. E.; Velasco, P.; Obregon, S.; Padilla, G.; de Haro, A.** (2008) Seasonal variation in glucosinolate content in Brassica oleracea crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry*, 69:403–410
- **Cartea, M., Velasco, P.,** (2008) Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, 7:213-229
- **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 JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrikh H, Silvestro AR, Normanly J, 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*. *Journal of Plant Genomics*, 2008: 582837
- **Chang-Qing Yang, Xin Fang, Ying-Bo Mao, Ling-Jian Wang, Xiu-Ming Wu, Xiao-Ya Chen** (2012) Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. *Journal of integrative plant biology*, 54(10):703-12
- **Chen AX, Lou YG, Mao YB, Lu S, Wang LJ, Chen XY** (2007) Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49:179–186.
- **Chen S, Petersen BL, Olsen CE, Schulz A, Halkier BA.** (2001) Long-distance phloem transport of glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Physiology* 127:194– 201.
- **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.
- **Cheung, W. Y., Landry, B. S., Raney, P. & Rakow, G. F. W.** (1998) Molecular mapping of seed quality traits in Brassica juncea L. *Czern. and Coss. Acta Horticulturae*, 459:139-147.

- **Chisholm MD, Wetter LR** (1964) Biosynthesis of mustard oil glucosides: IV The administration of methionine-C14 and related compounds to horseradish. *Canadian Journal of Biochemistry*, 42:1033–1040
- **Chung, F. L., Conaway, C. C., & Rao, C. V.** (2000) Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*, 21:2287–2291
- **Cipollini, D., S. Enright, M.B. Traw, and J. Bergelson** (2004) Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Molecular Ecology*, 13:1643-1653
- **Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM** (2009) Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science*, 323:95–101
- **Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Journal*, 16:73–78
- **Cole, R.A.** (1980) Volatile components produced during ontogeny of some cultivated crucifers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31:549-557.
- **Conaway, C. C., Wang, C. X., & Pittman, B.** (2005) Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice. *Cancer Research*, 65:8548–8557.
- **Cornelis, M. C., El-Sohehy, A., & Campos, H.** (2007) GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86:752–758.
- **Croteau, R., Kutchan, T., Lewis, N.** (2000) Chapter 24: Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Griseham, W., Jones, R. (eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 1250 -1268
- **Custic Mirjana, Horvatic M., Butorac A.,** (2002) Effects of nitrogen fertilization upon the content of essential amino acids in head chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*). *Scientia Horticulturae*, 92(3-4):205-215

- **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
- **D'Antuono L.F., Elementi S., Neri R.** (2008) Glucosinolates in *Diplotaxis* and *Eruca* leaves: Diversity, taxonomic relations and applied aspects. *Phytochemistry*, 69:187-199
- **De Leonardis W., De Santis C., Fichera G., Padulosi S., Zizza A.** (1997) Seed morphology of some taxa belonging to genus *Diplotaxis* D.C. and *Eruca* Miller In: Padulosi S. & Pignone D. (ed.). *Rocket: a Mediterranean crop for the world*. International Plant Genetic Resources Institute, Legnaro, Italy, 13-14 December, 1996, pp. 25-35
- **Dixon DP, Skipsey M, Edwards R** (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71:338–350
- **Drewnowski A, Gomez-Carneros C.** (2000) Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72:1424–35
- **Duan LX, Chen TL, Li M, Chen M, Zhou YQ, Cui GH, Zhao AH, Jia W, Huang LQ, Qi X** (2012) Use of the metabolomics approach to characterize Chinese medicinal material Huangqi. *Molecular Plant*, 5:376–386
- **Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L** (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 15:573–581
- **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
- **F. Li, H. Kitashiba, K. Inaba and T. Nishio** (2009) Brassica rapa linkage map of EST-based SNP markers for identification of candidate genes controlling flowering time and leaf morphological traits. *DNA Research*, 16:311-323
- **Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A** (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:7610–7615

- **Fahey, J, Talalay, P.** (1995) The role of crucifers in cancer chemoprotection. In: Gustine DL, Florens HE. , editors. *Phytochemicals and Health*. Rockvill, Md, USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 87–93
- **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
- **Falk, K.L., J.G. Tokuhisa, and J. Gershenzon.** (2007) The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology*, 9:573-581
- **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
- **Fan, J., Crooks, C., Creissen, G., Hill, L., Fairhurst, S., Doerner, P., et al.** (2011) *Pseudomonas sax* Genes Overcome Aliphatic Isothiocyanate–Mediated Non-Host Resistance in Arabidopsis. *Science*, 331(6021):1185-1188
- **Fang X, Yang CQ, Wei YK, MaQX, Yang L, Chen XY** (2011) Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Diversity and Resources*, 33:53–64
- **Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E** (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant Journal*, 66:94–116
- **Field, B. et al.** (2004) Glucosinolate and amino acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135:828–839
- **Fismes, J., Vong, P. C., Tucker, A., Frossard, E.** (2000) Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rapa (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy*, 12:127–141
- **Fortier E, Desjardins Y, Tremblay N, Belec C, Cote M** (2010) Influence of irrigation and nitrogen fertilization on broccoli polyphenolics concentration. *ISHS Acta Hortic*, vol 856. International Symposium on Vegetable Safety and Human Health
- **Frangioni J.V. & B.G. Neel** (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochemistry*, 210: 179-187.

- **Fritz C, Mueller C, Matt P, Feil R, Stitt M** (2006a) Impact of the C-N status on the amino acid profile in tobacco source leaves. *Plant Cell and Environment*, 29:2055–2076
- **Gachon CMM, Langlois-Meurinne M, Henry Y, Saindrenan P** (2005) Transcriptional co-regulation of secondary metabolism enzymes in *Arabidopsis*: functional and evolutionary implications. *Plant Molecular Biology*, 58:229–245
- **Galloway, J. N., and Cowling, E. B.** (2002) Reactive nitrogen and world: 200 years of change. *Ambio*, 31:64-71
- **Gang, D.R., Beuerle, T., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., and Pichersky, E.** (2002) Differential production of meta hydroxylated phenylpropanoids in sweet basil glandular trichomes and leaves is controlled by the activities of specific acyltransferases and hydroxylases. *Plant Physiology*, 130:1536-1544.
- **Gao, M., Li, G., Potter, D., McCombie, W. R. & Quiros, C. F.** (2006) Comparative analysis of methylthioalkylmalate synthase (MAM) gene family and flanking DNA sequences in *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 25:592-598
- **Gao, M., Li, G., Yang, B., McCombie, W.R. & Quiros, C.F.** (2004) Comparative analysis of a *Brassica* BAC clones containing several major aliphatic glucosinolate genes with its corresponding *Arabidopsis* sequence. *Genome*, 47: 666-679
- **Gao, N., Cheng, S., Budhraj, A., Liu, E. H., Chen, J., Chen, D., et al.** (2012) 3, 3'-Diindolylmethane Exhibits Antileukemic Activity *In Vitro* and *In Vivo* through a Akt-Dependent Process. *PLoS One*, 7(2):e31783
- **Gerhauser, C., You, M., & Liu, J.** (1997) Cancer Chemopreventive Potential of Sulforamate, a Novel Analogue of Sulforaphane That Induces Phase 2 Drug-metabolizing Enzymes. *Cancer Research*, 57:272–278
- **Gerson, E.A., Kelsey, R.G.** (1999) Piperidine alkaloids in nitrogen fertilized. *Journal of Chemical Ecology*, 25:2027–2039
- **Geu-Flores, F. et al.** (2009) Glucosinolate engineering identifies a gamma-glutamyl peptidase. *Natural Chemical Biology*, 5:575–577
- **Giamoustaris, A., & Mithen, R.** (1995). The effect of modifying the glucosinolate content of leaves of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) on its interaction with generalist and specialist pests. *The Annals of Applied Biology*, 126:347–363



- **Gigolashvili T, Yatusevich R, Rollwitz I, Humphry M, Gershenzon J, Flügge U.I.** (2009) The plastidic bile acid transporter 5 is required for the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21:1813–1829
- **Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H.P., Muller, C., Weisshaar, B., and Fluegge, U.I.** (2007a). The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 50:886-901
- **Gigolashvili, T., Engqvist, M., Yatusevich, R., Müller, C. and Fluegge, 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
- **Gigolashvili, T., Yatusevich, R., Berger, B., Muller, C., and Flugge, U.I.** (2007b). The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **51**, 247-261.
- **Gimsing AL, Kirkegaard JA.** (2009) Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews*, 8(1):299-310
- **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
- **Gómez-Campo C.** (1980) Morphology and morpho-taxonomy of the tribe Brassiceae. In: Tsunoda S., Hinata K., Gómez-Campo C. (ed.). *Brassica crops and wild allies: biology and breeding*. Japan Scientific Society Press. Tokyo, Japan, pp. 1-31
- **Gómez-Campo C.** (1999) Taxonomy, In: Gómez-Campo C. (ed.). *Biology of Brassica Coenospecies*. Elsevier, Amsterdam, pp. 3-32
- **Gómez-Campo C., Prakash S.** (1999) Origin and domestication. In: Gómez-Campo C. (ed.). *Biology of Brassica Coenospecies*. Elsevier, Amsterdam, pp. 33-58
- **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
- **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
- **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., and Abel S.** (2006) Glucosinolate metabolism and its control. Trends in Plant Science, 11:89-100
  - **Gulfraz Muhammad, Sadiq Alia, Tariq Hira, Imran Muhammad, Qureshi Rahmatullah and Zeenat Asyia** (2011) Phytochemical analysis and antibacterial activity of Eruca sativa seed. Pakistan Journal of Botany, 43(2): 1351-1359
  - **Gunstone DF, Harwood JL, Padley FB** (1995). The Lipid Handbook. Chapman & Hall, London
  - **Halkier B.** (1999) Glucosinolates. In Naturally Occurring Glycosides: Chemistry, Distribution and Biological Properties (Ikan, R., ed.), John Wiley & Sons, pp. 193–223
  - **Halkier B.A. and Gershenzon, J.** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. Annual Review of Plant Biology, 57:303–333
  - **Hamilton JM, Fonseca JM** (2010) Effect of saline irrigation water on antioxidants in three hydroponically grown leafy vegetables: Diplotaxis tenuifolia, eruca sativa, and lepidium sativum. HortScience, 45(4):546–552
  - **Handiseni M., Brown J., Zemetra R., & Mazzola M.** (2011) Herbicidal Activity of Brassicaceae Seed Meal on Wild Oat (*Avena fatua*), Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*), Redroot Pigweed (*Amaranthus retroflexus*), and Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*) Weed Technology, 25(1):127–134
  - **Hansen BG, Kerwin RE, Ober JA, Lambrix VM, Mitchell-Olds T, Gershenzon J, Halkier BA, Kliebenstein DJ.** (2008) A novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase involved in the formation of the goiterogenic 2-hydroxybut-3-enyl glucosinolate and generalist insect resistance in Arabidopsis. Plant Physiology, 148:2096–2108
  - **Hansen BG, Kliebenstein DJ, Halkier BA.** (2007) Identification of a flavin monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. Plant Journal, 50:902–910
  - **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 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, B., and Halkier, B.** (2005) New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 221:603-606.
- **Haristoy X., Angioi-Duprez K., Duprez A., et al.** (2003) Efficacy of Sulforaphane in Eradicating *Helicobacter pylori* in Human Gastric Xenografts Implanted in Nude Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:3982–3984
- **Hasan M, Friedt W, Pons-Kuhnemann J, Freitag NM, Link K, Snowdon RJ.** (2008) Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theoretical and Applied Genetics*, 10: 3070-3081
- **He J, Giusti MM** (2010) Anthocyanins: Natural colorants with health promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1:163–187
- **He Y, Mawhinney TP, Preuss ML, Schroeder AC, Chen B, Abraham L, Jez JM, Chen S.** (2009) A redox-active isopropylmalate dehydrogenase functions in the biosynthesis of glucosinolates and leucine in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 60:679–690
- **Hecht, S.S.** (1999) Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *Journal of Nutrition*, 129:768S-774S
- **Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A** (2007) Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1724–1729
- **Hemm MR, Ruegger MO, 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
- **Hesse H, Nikiforova V, Gakire B, Hoefgen R** (2004) Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55:1283–1292
- **Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M, Saito K** (2003) Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA microarray reveals the

- role of *O*-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant Journal*, 33:651–663
- **Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, Yano M, Goodenowe DB, Yamazaki Y, Kanaya S, Nakamura Y, Kitayama M, Suzuki H, Sakurai N, Shibata D, Tokuhisa J, Reichelt M, Gershenzon J, Papenbrock J, 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. and Saito, K.** (2004) Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency. *Journal of Experimental Botany*, 55:1871-1879
  - **Hirai, M.Y. et al.** (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
  - **Hirai, M.Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M., Saito, K.,** (2003) Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA microarray reveals the role of *O*-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant Journal*, 33:651–663
  - **Hirai, M.Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T., Saito, K.,** (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:10205–10210
  - **Hirel B, Bertin P, Quilleré I, Bourdoncle W, Attagnant C, Dellay C, Gouy A, Cadiou S, Retalliau C, Falque M, et al** (2001) Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiology*, 125: 1258–1270
  - **Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A** (2007) The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*, 58(9):2369-87

- **Hoefgen R, Nikiforova VJ** (2008) Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. *Physiologia Plantarum*, 132:190–198
- **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
- **Hopkins, R. J., Van Dam, N. M., & Van Loon, J. J. A.** (2009) Role of Glucosinolates in Insect-Plant Relationships and Multitrophic Interactions. *Annual Review Entomology*, 54:57–83
- **Howarth, R. W.** (2004) Human acceleration of the nitrogen cycle: Drivers, consequences, and steps towards solutions. *Water Science and Technology*, 49:7-13
- **Howell, P. M., Sharpe, A. G. & Lydiate, D. J.** (2003) Homoeologous loci control the accumulation of seed glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*, 46: 454-460
- **Husebye, H. et al.** (2002) Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128:1180–1188
- **Ibrahim M.H., Jaafar H.Z.E.** (2011) Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip fatimah (*Labisia Pumila* Blume). *International Journal of Molecular Sciences*, 12:5238–5254
- **Ji, Y.** (2005) Membrane Transport of Dietary Phenethyl Isothiocyanate by ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein) *Molecular Pharmaceutics*, 2:414–419
- **Jin J, Koroleva OA, Gibson T, Swanston J, Magan J, Zhang Y, Rowland IR, Wagstaff C.** (2009) Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*) leafy salad following cultivation in different environments. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 57(12):5227-34
- **Jin-Hyuk Chun, Mariadhas Valan Arasu, Yong-Pyo Lim, and Sun-Ju Kim,** (2013) Variation of Major Glucosinolates in Different Varieties and Lines of Rocket Salad, *Horticulture Environment and Biotechnology*, 54(3):206-213
- **Ju, Y. H., Carlson, K. E., Sun, J., Pathak, D., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., et al.** (2000) Estrogenic effects of extracts from cabbage,

fermented cabbage, and acidified brussels sprouts on growth and gene expression of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48:4628–4634

- **Juge, N., Mithen, R. F., & Traka, M.** (2007) *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64:1105–1127
- **Καραμπουρνιώτης** (2003) *Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 333-335
- **Kassie F, Parzefall W, Musk S, Johnson I, Lamprecht G, Sontag G, Knasmüller S.** (1996) Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. *Chemico-biological Interactions* 102(1):1-16
- **Kaur G, Chandna R, Pandey R, Abrol YP, Iqbal M, Ahmad A** (2011) Sulfur starvation and restoration affect nitrate uptake and assimilation in rapeseed. *Protoplasma*, 248:299–311.
- **Kelly PJ, Bones A, Rossiter JT.** (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
- **Khoobchandani M., Ganesh N., Gabbanini S., Valgimigli L., Srivastava M.M.** (2011) Phytochemical potential of *Eruca sativa* for inhibition of melanoma tumor growth. *Fitoterapia*, 82(4):647-53
- **Khoobchandani M., Ojeswi B. K., Ganesh, N., Srivastava, M. M., Gabbanini, S., Matera R., Lori R. and Valgimigli, L.** (2010) Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plant extract. *Food Chemistry*, 120(1):217-224
- **Khor TO, Keum YS, Lin W, Kim JH, Hu R, Shen G, Xu C, Gopalakrishnan A, Reddy B, Zheng X, Conney AH, Kong AN.** (2006) Combined inhibitory effects of curcumin and phenethyl isothiocyanate on the growth of human PC-3 prostate xenografts in immunodeficient mice. *Cancer Research*, 66:613–621

- **Khor, T. O., Cheung, W. K., Prawan, A., et al.** (2008) Chemoprevention of familial adenomatous polyposis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice by phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Molecular Carcinogenesis*, 47(5):321–325
- **Kim SJ, Ishii G** (2006) Glucosinolate profiles in the seeds, leaves and roots of rocket salad (*Eruca sativa* mill.) and anti-oxidative activities of intact plant powder and purified 4-methoxyglucobrassicin. *Soil Science and Plant Nutrition*, 52:394–400
- **Kim, M. K., Park, J. H. Y.,** (2009) Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence. *Proceedings of the Nutrition Society*, 68:103-110
- **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
- **Kissen, R. & Bones, A.M.,** (2009) Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 284:12057-12070
- **Klein, M. et al.** (2006) The three desulfoglucosinolate sulfotransferase proteins in *Arabidopsis* have different substrate specificities and are differentially expressed. *FEBS Journal*, 273:122–136
- **Kliebenstein DJ, Lambrix VM, Reichelt M, Gershenzon J, Mitchell-Olds T.** (2001) Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13:681– 693
- **Kliebenstein, D. J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., et al.** (2001) Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiology*, 126:811–825
- **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.
- **Knill T, Reichelt M, Paetz C, Gershenzon J, Binder S.** (2009) *Arabidopsis thaliana* encodes a bacterial-type heterodimeric isopropylmalate isomerase involved in both Leu biosynthesis and the Met chain elongation pathway of glucosinolate formation. *Plant Molecular Biology*, 71:227–239

- **Knill T, Schuster J, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S.** (2008) Arabidopsis branched-chain aminotransferase 3 functions in both amino acid and glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiology*, 146:1028–1039
- **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
- **Kopriva, S.** (2006) Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. *Annals of Botany (Lond.)*, 97:479–495
- **Kopriva, S., and H. Rennenberg.** (2004) Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55:1831-1842
- **Koprivova, A., M. Suter, R.O. Camp, C. Brunold, and S. and Kopriva.** (2000) Regulation of Sulfate Assimilation by Nitrogen in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122:737-746
- **Kopsell DA, Barickman TC, Sams CE, McElroy JS.** (2007) Influence of nitrogen and sulfur on biomass production and carotenoid and glucosinolate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26):10628-34
- **Kos, M., Houshyani, B., Wietsma, R., Kabouw, P., Vet, L. E. M., van Loon, J. J. A., et al.** (2012) Effects of glucosinolates on a generalist and specialist leaf-chewing herbivore and an associated parasitoid. *Phytochemistry*, 77:162–170
- **Krapp A, Berthomé R, Orsel M, Mercey-Boutet S, Yu A, Castaings L, Elftieh S, Major H, Renou J-P, Daniel-Vedele F** (2011) Arabidopsis roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiology*, 157: 1255–1282
- **Kroymann J** (2011) Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:246–251
- **Kroymann J, Textor S, Tokuhsa JG, Falk KL, Bartram S, Gershenzon J, 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., & 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

- **Kruse J, Kopriva S, Hansch R, Krauss GJ, Mendel RR, Rennenberg H (2007)** Interaction of sulfur and nitrogen nutrition in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants: significance of nitrogen source and root nitrate reductase. *Plant Biology*, 9(5):638–646
- **Kushad, M. M.; Brown, A. F.; Kurilich, A. C.; Juvik, J. A.; Klein, B. P.; Wallig, M. A.; Jeffery, E. H. (1999)** Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47:1541–1548
- **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
- **Lamy E., Schroder J., Paulus S., Brenk P., Stahl T. and MerschSundermann V. (2008)** Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (Rocket plant), erucin and erucolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo (a) pyrene and their mode of action. *Food and Chemical Toxicology*, 46:2415-2421
- **Leustek, T.; Martin, M. N.; Bick, J. A.; Davies, J. P. (2000)** Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51:141–166
- **Levy M, Wang Q, Kaspi R, Parrella MP, Abel S. (2005)** Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant Journal*, 43:79–96
- **Lewandowska M, Wawrzynska A, Kaminska J, Liszewska F, Sirko A. (2005)** Identification of novel proteins of *Nicotiana tabacum* regulated by short term sulfur starvation. In: Saito K, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Sirko A, Rennenberg H, eds, *Sulfur transport and assimilation in plants in the postgenomic era*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, pp. 153–156

- **Li S, Schonhof I, Krumbein A, Li L, Stutzel H, Schreiner M** (2007) Glucosinolate concentration in turnip (*Brassica rapa* ssp. *Rapifera* L.) roots as affected by nitrogen and sulfur supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:8452–8457
- **Li, G. & Quiros, C. F.** (2002) Genetic analysis, expression and molecular characterization of Bo-GSL-ELONG, a major gene involved in the aliphatic glucosinolate pathway of Brassica species. *Genetics*, 162: 1937-1943
- **Li, G. & Quiros, C. F.** (2003) In planta side-chain glucosinolate modification in Arabidopsis by introduction of dioxygenase Brassica homolog BoGSL-ALK. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1116-1121
- **Li, G., Gao, M., Yang, B. & Quiros, C. F.** (2003) Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 168-180
- **Li, J., Hansen, B. G., Ober, J. A., Kliebenstein, D. J. & Halkier, B. A.** (2008) Subclade of flavin-monooxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiology*, 148: 1721-1733
- **Li, Y., Kiddle, G., Bennett, R. N., & Wallsgrove, R.** (1999) Local and systemic changes in glucosinolates in Chinese and European cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.) after inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* (stem rot). *The Annals of Applied Biology*, 134:45–58
- **Liu, Z., Hammerlindl, J., Keller, W., McVetty, P. B. E., Daayf, F., Quiros, C. F. & Li, G.** (2010) MAM gene silencing leads to the induction of C3 and reduction of C4 and C5 side-chain aliphatic glucosinolates in *Brassica napus*. *Mol Breed.* 27(4):467-478
- **Liu, Z., Hirani, A. H., McVetty, P. B. E., Daayf, F., Quiros, C. F. & Li, G.** (2012) Reducing progoitrin and enriching glucoraphanin in *B. napus* seeds through silencing of the GSL-ALK gene family. *Plant Molecular Biology*, 79(1-2):179-89
- **Lou, P., Zhao, J., He, H., Hanhart, C., Del Carpio, D. P., Verkerk, R., Custers, J., Koornneef, M. & Bonnema, G.** (2008) Quantitative trait loci for glucosinolate accumulation in *Brassica rapa* leaves. *New Phytologist*, 179: 1017-1032
- **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
- **Lysak MA, Koch M, Pecinka A & Schubert I** (2005) Chromosome triplication found

across the tribe Brassiceae. *Genome Research*, 15:516–525

- **Maheo, K., Morel, F., Langouet, S., et al.** (1997). *Cancer Research*, 57, 3649–3652.
- **Mahmood, T., Ekuere, U., Yeh, F., Good, A. G. & Stringam, G. R.** (2003) Molecular mapping of seed aliphatic glucosinolates in *Brassica juncea*. *Genome*, 46: 753-760.
- **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
- **Malitsky S, Blum E, Less H, Venger I, Elbaz M, Morin S, Eshed Y, Aharoni A.** (2008) The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiology*, 148:2021-2049
- **Mandelova, L., & Totusek, J.** (2007) Broccoli juice treated by high pressure: chemoprotective effects of sulforaphane and indole-3-carbinol. *High Pressure Research*, 27:151–156
- **Mari, M., Leoni, O., Iori, R., & Cembali, T.** (2002) Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathology*, 51:231–236
- **Martin Dietz, H., Panigrahi, S., Harris, R.V.** (1991) Toxicity of hydrolysis products from 3-butenyl glucosinolate in rats. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 39:311–315
- **Martinez-Sanchez A, Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F** (2008) A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2330–2340
- **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*, 80:1-5
- **McGregor, D.I.** (1988) Glucosinolate content of developing rapeseed (*Brassica napus* L Midas) seedlings. *Canadian Journal of Plant Science*, 68:367-380.

- **Medina-Lara, F., I. Echevarria-Machado, R. Pacheco-Arjona, N. Ruiz-Lau, A. Guzmán-Antonio, and M. Martínez-Estevez.** (2008) Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience, 43:1549-1554
- **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
- **Migge A, Bork C, Hell R, Becker TW** (2000) Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. Planta, 211: 587–595
- **Mikkelsen MD, Halkier BA.** (2003) Metabolic engineering of valine- and isoleucine-derived glucosinolates in Arabidopsis expressing CYP79D2 from cassava. Plant Physiology 131: 773-779
- **Mikkelsen MD, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA.** (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 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 MD, Naur P, Halkier BA.** (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
- **Mikkelsen MD, Petersen BL, Olsen CE, Halkier BA.** (2002) Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. Amino Acids, 22:279–295
- **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
- **Mizutani, M. and Ohta, D.** (1998) Two isoforms of NADPH:cytochrome P450 reductase in Arabidopsis thaliana. Gene structure, heterologous expression in insect cells, and differential regulation. Plant Physiology, 116:357–367
- **Moon, Y.J., Brazeau, D.A., & Morris, M.E.** (2011) Dietary Phenethyl Isothiocyanate Alters Gene Expression in Human Breast Cancer Cells. Evidence-based complementary and alternative medicine. Volume 2011, Article ID 462525
- **Mortensen, J.; Eriksen, J.** (1994) Effect of sulphur deficiency on amino acid

composition. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, 15:135–142

- **Mugford SG, Yoshimoto N, Reichelt M, Wirtz M, Hill L, Mugford ST, Nakazato Y, Noji M, Takahashi H, Kramell R, Gigolashvili T, Flügge UI, Wasternack C, Gershenzon J, Hell R, Saito K, Kopriva S** (2009) Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites. *Plant Cell*, 21:910–927
- **Muller, C., Agerbirk, N., Olsen, C. E., Boeve, J. L., Schaffner, U., & Brakefield, P.** (2001). Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive hemolymph of the sawfly *Athalia rosae*. *Journal of Chemical Ecology*, 27:2505–2516
- **Mumm, R., Burow, M., Bukovinszki, G., Kazantzidou, E., Wittstock, U., Dicke, M., et al.** (2008) Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology*, 34:1311–1321
- **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
- **Murugan, S. S., Balakrishnamurthy, P., & Mathew, Y. J.** (2007). Antimutagenic effect of broccoli flower head by the Ames Salmonella reverse mutation assay. *Phytotherapy Research*, 21:545–547
- **Naoya Chishaki, Tsuyosi Horiguchi** (1997) Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency, *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment Developments in Plant and Soil Sciences*, 78:341-345
- **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
- **Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R** (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant Journal*, 33(4):633–650
- **Nikiforova, V., Kopka, J., Tolstikov, V., Fiehn, O., Hopkins, L., Hawkesford, M.J., Hesse, H., Hoefgen, R.,** (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, 138:304–318
- **Norton, G., and Harris, J.F.** (1975). Compositional Changes in Developing Rape Seed

(Brassica-Napus L). *Planta*, 123:163-174

- **Okazaki, K., Yamagishi, M., Son, H. Y., Imazawa, T., Furukawa, F., Nakamura, H., Nishikawa, A., Masegi, T. & Hirose, M.** (2002) Simultaneous treatment with benzyl isothiocyanate, a strong bladder promoter, inhibits rat urinary bladder carcinogenesis by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Nutrition and Cancer*, 42:211-216
- **Omirou M, Papastefanou C, Katsarou D, Papastylianou I, Passam HC, Ehaliotis C and Papadopoulou KK** (2012) Relationships between nitrogen, dry matter accumulation and glucosinolates in *Eruca sativa* Mills. The applicability of the critical NO<sub>3</sub>-N levels approach. *Plant and Soil*, 354:347–358
- **Omirou MD, Papadopoulou KK, Papastylianou I, Constantinou M, Karpouzas DG, Asimakopoulos I, Ehaliotis C** (2009) Impact of nitrogen and sulfur fertilization on the composition of glucosinolates in relation to sulfur assimilation in different plant organs of broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:9408–9417
- **Park, N.I., I.K. Kim, W.T. Park, I.W. Cho, Y.P. Lim and. S.U. Park,** 2011. An efficient protocol for genetic transformation of watercress, *Molecular biology reports*, 38(8):4947-53
- **Patten, E. J., & DeLong, M. J.** (1999) Temporal effects of the detoxification enzyme inducer, benzyl isothiocyanate: activation of c-Jun N-terminal kinase prior to the transcription factors AP-1 and NFkappaB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257:149–155
- **Pereira, F.M.V., E. Rosa, J.W. Fahey, K.K. Stephenson, R. Carvalho, and A. Aires.** (2002) Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:6239-6244
- **Perry LM, Metzger J** (1978) *Medicinal Plants of SE Asia: Attributed Properties and Uses*, The MIT Press: Cambridge, London, UK; Massachusetts, USA, pp. 23–24.
- **Petersen B.L., Chen S.X., Hansen C.H., Olsen C.E., Halkier B.A.** (2002) Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 214:562-571.
- **Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29:e45

- **Pfalz M, Vogel H, Kroymann J.** (2009) The gene controlling the indole glucosinolate modifier1 quantitative trait locus alters indole glucosinolate structures and aphid resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21:985–999
- **Pignone D.** (1997) Present status of rocket genetic resources and conservation activities. In: Padulosi S. & Pignone D. (ed.) *Rocket: a Medi-terranean crop for the world*, pp.2-12. International Plant Genetic Resources Institute, Legnaro, Italy, 13-14 December, 1996
- **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
- **Porter, A.J.R., A.M. Morton, G. Kiddle, K.J. Doughty, and R.M. Wallsgrove** (1991) Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L) leaves .1. Effect of leaf age and position. *Annals of Applied Biology*, 118:461-467
- **Poulton, J.E. and Møller, B.L.** (1993) Glucosinolates. In *Methods in Plant Biochemistry* (Vol 9) (Lea, P.J., ed.), pp. 209–237, Academic Press
- **Pratap A., Gupta S.K.** (2009) Biology and ecology of wild crucifers. In: Gupta S.K. (ed.). *Biology and Breeding of Crucifers*, pp. 37-67CRC, Press. Boca Raton, Florida
- **Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT** (2001) Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany*, 52:113–121
- **Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339:62-66
- **Ramchiary, N., Bisht, N. C., Gupta, V., Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Sodhi, Y. S., Pental, D. & Pradhan, A. K.** (2007) QTL analysis reveals context-dependent loci for seed glucosinolate trait in the oilseed Brassica juncea: importance of recurrent selection backcross scheme for the identification of ‘true’ QTL. *Theoretical and Applied Genetics*, 116:77-85
- **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

- **Rask L., Andréasson E., Ekbohm B., Eriksson S., Pontoppidan B., Meijer J.** (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology*, 428(1):93–113.
- **Ratzka A, Vogel H, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Kroymann J.** (2002) Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:11223–11228
- **Rausch T, Wachter A** (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science*, 10:503-509
- **Reese, E. T., Clapp, R. C., & Mandels, M.** (1958) A thioglucosidase in fungi. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75:228– 242
- **Reichert, 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, Palme K.** (2001) Bus, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell*, 13:351–367
- **Riby, J. E., Chang, G. H., Firestone, G. L., & Bjeldanes, L. F.** (2000) Ligand-independent activation of estrogen receptor function by 3,3'-diindolylmethane in human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 60:167–177
- **Rich T.C.G.** (1991) *Crucifers of great Britain and Ireland*, pp. 336. Botanical Society of the British Isles, Handbook No. 6. London
- **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(7):997
- **Rohmer M.** (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Products Reports*, 16:565–74
- **Rose P, Faulkner K, Williamson G, Mithen R** (2000) 7-Methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II



enzymes. *Carcinogenesis*, 21:1983–1988

- **Rose P, Huang Q, Ong CN, Whiteman M** (2005) Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209:105–113
- **Rosen, C. J.; Fritz, V. A.; Gardner, G. M.; Hecht, S. S.; Carmella, S. G.; Kenney, P. M.** Cabbage yield and glucosinolate concentrations as affected by nitrogen and sulfur fertility. *HortScience* 2005, 40:1493–1498
- **Rouxel, T., Kollmann, A., Bouldard, L., & Mithen, R.** (1991) Abiotic elicitation of indole phytoalexins and resistance to *Leptosphaeria maculans* within Brassiceae. *Planta*, 184:271–278
- **Ryder E.J.** 2002. The new salad crop revolution. In: Janick J., Whipkey A. (ed.). *Trends in new crops and new uses*, pp. 408-412, ASHS Press Alexandria, Virginia
- **S. Pignatti** (1982) *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna, vol. 1-3
- **Sarwar AM, Kaur G, Jabbar Z, Javed K, Athar M** (2007) *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 45(6):910-920
- **Sawada Y, Kuwahara A, Nagano M, Narisawa T, Sakata A, Saito K, Hirai MY.** (2009) Omics-based approaches to methionine sidechain elongation in *Arabidopsis*: characterization of the genes encoding methylthioalkylmalate isomerase and methylthioalkylmalate dehydrogenase. *Plant Cell Physiology*, 50:1181–1190
- **Sawada Y, Toyooka K, Kuwahara A, Sakata A, Nagano M, Saito K, Hirai MY.** (2009) *Arabidopsis* bile acid: sodium symporter family protein 5 is involved in methionine-derived glucosinolate biosynthesis. *Plant Cell Physiology*, 50:1579–1586
- **Schlaeppli K, Bodenhausen N, Buchala A, Mauch F, Reymond P.** (2008) The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant Journal*, 55:774–786
- **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

- **Schuster J, Knill T, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S.** (2006) BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18:2664–2679
- **Schwab W** (2003) Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, 62:837–849
- **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.
- **Schwimmer, S. and Kjaer, A.** (1960) Purification and specificity of the C-S lyase of *Albizia lophanta*. *Biochimica et Biophysica Acta* 42, 316–324
- **Selma MV, Martinez-Sanchez A, Allende A, Ros M, Hernandez MT, Gil MI** (2010) Impact of organic soil amendments on phytochemicals and microbial quality of rocket leaves (*eruca sativa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:8331–8337
- **Shishu, Singla, A. K., & Kaur, I. P.** (2003) Inhibition of Mutagenicity of Food-Derived Heterocyclic Amines by Sulphoraphene - an Isothiocyanate Isolated from Radish. *Planta Medica*, 69:184–186
- **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 SMH, Keller WA, Scoles G** (2011) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eruca sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106:253–260
- **Slater, Scott and Fowler** (2003) *Plant biotechnology, The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press
- **Smolen, G. and Bender, J.** (2002) *Arabidopsis* cytochrome P450 cyp83B1 mutations activate the tryptophan biosynthetic pathway. *Genetics*, 160:323–332
- **Smolinska, U., Morra, M. J., Knudsen, G. R., & James, R. L.** (2003) Isothiocyanates

Produced by Brassicaceae Species as Inhibitors of *Fusarium oxysporum*. Plant Disease, 87:407–412

- **Sønderby I.E., Geu-Flores F., Halkier B.** (2010) Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond. Trends in Plant Science, 158(1):283–290
- **Sonderby, I.E. et al.** (2007a) A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. PLoS ONE. 2, e1322
- **Sønderby, I.E., Burow, M., Rowe, H.C., Kliebenstein, D.J. and Halkier, B.A.** (2010a) A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in Arabidopsis. Plant Physiology, 153:348–363
- **Song, L. J., Thornalley, P. J.,** (2007) Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. Food and Chemical Toxicology, 45:216-224.
- **Spalding, R.F. and M.E. Exner.** (1993) Occurrence of nitrate in groundwater: a review. Journal of Environmental Quality, 22:392-402
- **Spiertz, J.H.J.** (2010) Nitrogen, sustainable agriculture and food security. A review. Agronomy for Sustainable Development, 30(1):43—55
- **Srinibas Das, Amrish Kumar Tyagi and Harjit Kaur** (2000) Cancer modulation by glucosinolates: A review. Current Science, 79(12):1665
- **Sugie, S., Okamoto, K., & Okumura, A.** (1994). Carcinogenesis, 15, 1555–1560.
- **Sun, J. Y., Sonderby, I. E., Halkier, B. A., Jander, G., & de Vos, M.** (2010) Non-Volatile Intact Indole Glucosinolates are Host Recognition Cues for Ovipositing *Plutella xylostella*. Journal of Chemical Ecology, 35:1427–1436
- **Talalay P, Fahey JW, Healy ZR, Wehage SL, Benedict AL, Min C, Dinkova- Kostova AT** (2007) Sulforaphane mobilizes cellular defenses that protect skin against damage by UV radiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104:17500–17505
- **Tang, L., Zhang, Y.** (2004) Dietary isothiocyanates inhibit the growth of human bladder carcinoma cells. Journal of Nutrition 134:2004–2010
- **Tantikanjana, T. et al.** (2001) Control of axillary bud initiation and shoot architecture in Arabidopsis through the SUPERSHOOT gene. Genes and Development, 15:1577–1588

- **Tantikanjana, T. et al.** (2004) Functional analysis of the tandem duplicated P450 genes SPS/BUS/CYP79F1 and CYP79F2 in glucosinolate biosynthesis and plant development by Ds transposition-generated double mutants. *Plant Physiology*, 135:840–848
- **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
- **Thapliyal, R., & Maru, G. B.** (2001) Inhibition of Cytochrome P-450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 39:541–547
- **The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796-815
- **The Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium** (2011) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*, 43(10):1035-1040
- **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
- **Tierns, K., Thomma, B. P. H., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., et al.** (2001) Study of the Role of Antimicrobial Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Resistance of *Arabidopsis* to Microbial Pathogens, *Plant Physiology*, 125:1688–16
- **Tokuhsa J, de Kraker J-W, Textor S, Gershenzon J** (2004) The biochemical and molecular origins of aliphatic glucosinolate diversity in *Arabidopsis thaliana*. In JT Romeo, ed, *Secondary Metabolism in Model Systems*, pp 19–38. *Recent Advances in Phytochemistry*, Vol 38. Elsevier Science, Amsterdam

- **Toroser, D., Thormann, C. E., Osborn, T. C. & Mithen, R.** (1995) RFLP mapping of quantitative trait loci controlling seed aliphatic glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 91:802-808
- **Traka, M., & Mithen, R.** (2009). Glucosinolate, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, 8:269–282
- **Traw, M.B., J. Kim, S. Enright, D.F. Cipollini, and J. Bergelson** (2003) Negative cross-talk between salicylate- and jasmonate-mediated pathways in the Wassilewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*, 12:1125-1135
- **Tschoep H, Gibon Y, Carillo P, Armengaud P, Szecowka M, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Koehl K, Stitt M** (2009) Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, 32:300–318
- **Tseng, E.** (2002) Effect of Organic Isothiocyanates on the P-Glycoprotein- and MRP1-Mediated Transport of Daunomycin and Vinblastine. *Pharmaceutical Research*, 19:1509–1515
- **Τσέκος** (2003) Φυσιολογία Φυτών, Αφοι Κυριακίδη, σελ. 543-544, 557-561
- **Underhill, E.W.** (1980) Glucosinolates. In *Encyclopedia of Plant Physiology* (Bell, E.A. and Charlwood, B.V., eds), pp. 493–511, Springer
- **Uphof JCT** (1968) *Dictionary of Economic Plants*. Verlag Von J. Cramer Publ., New York, NY, USA
- **Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR** (2005) Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of Experimental Botany*, 56:309–321
- **Uzunova, M., Ecke, W., Weissleder, K., Robbelen, G.** (1995) Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theoretical and Applied Genetics*, 90:194-204
- **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
- **Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, von Ballmoos O, Krähenbuhl U, Op den Camp R, Brunold C.** (2002) Flux control of sulfate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulfate reductase is more susceptible to negative

control by thiols than ATP sulfurylase. *Plant Journal*, 31:729-740

- **Verhoeven, D. T., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., et al.** (1997) A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions*, 103:79–129
- **Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S.** (2009) Bio-protective effects of glucosinolates - A review. *LWT- Food Science and Technology*, 42:1561– 1572
- **Villatoro-Pulido, M., Font, R., De Haro-Bravo, M.I., Romero-Jimenez, M., Anter, J., De Haro Bailon, A., Alonso-Moraga, A., Del Rio-Celestino, M.** (2009) Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radish grown in metal-contaminated soils. *Mutagenesis*, 24:51–57
- **Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H., and Tilman, D. G.** (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications*, 7:737-750
- **Vogt T.**, (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant*, 3:2-20
- **Vom Endt D, Kijne JW, Memelink J** (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: What regulates the regulators? *Phytochemistry*, 61:107–114
- **Wakao, S. and Benning, C.** (2005) Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 41:243–256
- **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
- **Wang, H., Wu, J., Sun, S., Liu, B., Cheng, F., Sun, R., et al.** (2011) Glucosinolate biosynthetic genes in *Brassica rapa*. *Gene*, 487(2):135–142
- **Warwick S.I., Francis A., Al-Shehbaz I.A.** (2006) Brassicaceae: species check-list and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution*, 259:249-258
- **Warwick S.I., Francis A., Gugel R.K.** (2009) Taxonomic checklist and life history, ecological, and geographical data. In: Warwick S.I., Francis A., Gugel R.K. (ed.), pp. 3-5. *Guide to wild germplasm of Brassica and allied crop (tribe Brassiceae, Brassicaceae)*. 3rd Edition.
- **Wawrzynska A, Lewandowska M, Hawkesford MJ, Sirko A.** (2005) Using a suppression subtractive library-based approach to identify tobacco genes regulated

in response to short-term sulphur deficit. *Journal of Experimental Botany*, 56:1575–1590

- **Wetter, L. and Chisholm, M.D.** (1968) Sources of sulfur in the thioglucosides of various higher plants. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46:931–935
- **Wink M** (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3–19
- **Withers, P.J.A. and O'Donnell, F.M.** (1994). The response of double-low oilseed rape to fertiliser sulphur. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66:93-101
- **Wittstock, U. and Halkier, B.A.** (2000) Cytochrome P450 CYP79A2 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., Agerbirk, N., Stauber, E. J., Olsen, C. E., Hippler, M., Mitchell-Olds, T., et al.** (2004) Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:4859–4864
- **Wittstock, U., and Halkier, B.A.** (2002). Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science*, 7:263-270
- **Wittstock, U., Kliebenstein, D. J., Lambrix, V., Reichelt, M., & Gershenzon, J.** (2003) Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. In J. T. Romeo (Ed.), *Integrative phytochemistry: from ethnobotany to molecular ecology* (pp. 101–125). Amsterdam: Elsevier
- **Woodward, A.W., and Bartel, B.** (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95:707-735
- **Xiao, D., Srivastava, S. K., Lew, K. L., et al.** (2003) *Carcinogenesis*, 24:891–897
- **Yang, Y. M., Conaway, C. C., Chiao, J. W., et al.** (2002). *Cancer Research*, 62:2–7
- **Yaniv Z., Schafferman D., Amar Z.** (1998) Tradition, uses and biodiversity of rocket (*Eruca sativa*, Brassicaceae) in Israel. *Economic Botany* 52:394-400
- **Yatusevich R, Mugford SG, Matthewman C, Gigolashvili T, Frerigmann H, Delaney S, Koprivova A, Flügge U-I, Kopriva S.** (2010) Genes of primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*

- **Yehuda H., Khatib S., Sussan I, Musa R., Vaya J. and Tami R.S.** (2009) Potential skin anti-inflammatory effects of 4methylthiobutyl isothiocyanate (MTBI) isolated from rocket (*Eruca sativa*) seeds. *Biofactors*, 35(3):295-305
- **Zang, Yun-Xiang; Kim, Hyun Uk; Kim, Jin A; Lim, Myung-Ho; Jin, Mina; Lee, Sang Choon; Kwon, Soo-Jin; Lee, Soo-In; et al.** (2009) Genome-wide identification of glucosinolate synthesis genes in *Brassica rapa*. *FEBS Journal*, 276(13):3559-3574
- **Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH** (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6:2399–2403
- **Zhang, Y.** (2012). The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. *Carcinogenesis*, 33(1):2–9
- **Zhang, Y., Kensler, T. W., & Cho, C. G.** (1994) Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:3147–3150
- **Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes and Development*, 16:3100–3112
- **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, N.; Krumbein, A.; Zhu, Z.; Gerendás, J.** (2005) Influence of N and S supply on concentrations of glucosinolates and their precursor amino acids in bai cai (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*). In *Plant Nutrition for Food Security, Human Health and Environmental Protection*, pp 390–391. Li, C. J., Zhang, F. S., Dobermann, A., Hinsinger, P., Lambers, H., Li, X. L., Marschner, P., Maene, L., McGrath, S., Oenema, O., Peng, S. B., Rengel, Z., Shen, Q. S., Welch, R., von Wirén, N., Yan, X. L., Zhu, Y. G., Eds., Tsinghua University Press, China
- **Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Genevestigator, G.W.** (2004) *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, 136(4):4335



## Ζ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II - Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν**

- Απομόνωση ολικού RNA
  - Διάλυμα εκχύλισης:
    - 50mM Tris-HCl, pH 8.3
    - 150 mM NaCl
    - 10mM EDTA
    - 1% lauryl sarcosine
  - Διάλυμα PIC: φαινόλη/ισοαμυλική αλκοόλη/χλωροφόρμιο 24:1:24
  - Διάλυμα 10T/10E:
    - 10mM Tris, pH 8.3
    - 10mM EDTA
  
- Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων
  - 50x TAE: 24.2%(w/v) Tris, 57.1 ml/lit acetic acid, 100 ml EDTA 0.5M
  - Διάλυμα φόρτωσης 10x: 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου, 35% γλυκερόλη
  
- LB: Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος προστίθενται : 10 g καζεΐνη, 5 gr yeast extract, 5 gr NaCl. Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου τρυβλίων προστίθενται στα παραπάνω 15 gr άγαρ. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται με υγρή αποστείρωση και διατηρείται στους 4° C
  
- 100 mM IPTG: 0,238 gr IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 10 ml ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και διατηρείται στους 4° C

- Διάλυμα 2% X-Gal: 0,02 gX-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase) διαλύονται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιου. Το διάλυμα διατηρείται στους -20° C
- Αμπικιλίνη: Μητρικό διάλυμα 100 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και διατηρείται στους -20° C.
- Καναμυκίνη: Μητρικό διάλυμα 50 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και διατηρείται στους -20° C.
- διάλυμα STET : 8% σουκρόζη, 5% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA
- Λυσοζύμη : 50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
  
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)
  - Πηκτή διαχωρισμού (10%) 100 ml :
    - 33.3 ml ακρυλαμίδιο 30%
    - 25 ml Tris-HCl 1.5 M (pH 8.9)
    - 1 ml SDS 10%
    - 0.08 ml TEMED
    - 1 ml APS 10%
    - 32.9 ml ddH<sub>2</sub>O
  
  - Πηκτή επιστοίβαξης (4%) 100 ml:
    - 17 ml ακρυλαμίδιο 30%
    - 12.5 ml Tris-HCl 1 M (pH 6.8)
    - 1 ml SDS 10%
    - 0.1 ml TEMED
    - 1 ml APS 10%
    - 68 ml ddH<sub>2</sub>O

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x): 144 gr/lit γλυκίνη, 30,25 gr/lit Tris και 10 gr/lit SDS.
- Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2x: 4% SDS, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 0,1M Tris pH6.8 και 0.0005% χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- Διάλυμα χρώσης με Coomassie Brilliant Blue R-250: 0.2% Coomassie Blue, 10% Acetic acid, 50% Methanol.
- Διάλυμα Αποχρωματισμού για Coomassie Brilliant Blue R-250: 10% Acetic acid, 50% Methanol.
- Διαχωρισμός πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ιόντων νικελίου
  - Διάλυμα λύσης (NPI-10): 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, προσαρμογή του pH στο 8.0, χρησιμοποιώντας NaOH
  - Διάλυμα πλύσης (NPI-20): 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο, προσαρμογή του pH στο 8.0, χρησιμοποιώντας NaOH
  - Διάλυμα έκλουσης (NPI 250): 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM ιμιδαζόλιο, προσαρμογή του pH στο 8.0, χρησιμοποιώντας NaOH
  - DNPI-10, DNPI-20, DNPI-250: όπως τα αντίστοιχα NPI-10, NPI-20, NPI-250, με επιπλέον την προσθήκη ουρίας σε συγκέντρωση 8M

- Απομόνωση πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας αγχιστείας με γλουταθειόνη
  - Διάλυμα λύσης (PBS): 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl, (pH 7.3)
  - Διάλυμα εξισορρόπησης και πλύσης: PBS (pH 7.3).
  - Διάλυμα έκλουσης: 50 mM Tris base, 10 mM glutathione, (pH 8.0)
  
- Διάλυμα STE: 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ - Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν**

| TARGET          | NAME        | PROCEDURE                 | SEQUENCE                              |                             |
|-----------------|-------------|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| MAM             | MAMDG-F     | gene isolation            | 5'-TMTTMGAYACDACKCTCCGWGACG-3'        |                             |
|                 | MAMDG-R     | gene isolation            | 5'-GCRTTBCCASYTCTTTCCRC-3'            |                             |
|                 | MAM2-3-FLF  | 3' RACE                   | 5'-CAAGAAGAAGTCGTTGAGATGG-3'          |                             |
|                 | MAML-3-FLF  | 3' RACE                   | 5'-CACCACATAAGATAGAGATTGC-3'          |                             |
|                 | MAM2b-5-r1  | 5' RACE                   | 5'-TCCTCATCCACCTCATTCC-3'             |                             |
|                 | MAM2b-5-r2  | 5' RACE                   | 5'-TAGTAGAAGTGAATATGAGTATCC-3'        |                             |
|                 | MAM2b-5-r3  | 5' RACE                   | 5'-GTCCGACCTGCCGCCATC-3'              |                             |
|                 | MAM1.RTF    | real-time PCR             | 5'-ACTCCACCGCAGAAGATTG-3'             |                             |
|                 | MAM1.RTR    | real-time PCR             | 5'-CCTCATCCACCTCGTTTCC-3'             |                             |
|                 | CYP79F1     | CYP79F1.F                 | gene isolation                        | 5'-TTGATGGTCAAGAGGAGAGGG-3' |
| CYP79F1.R       |             | gene isolation            | 5'-CGTCCCGACTTTAACACC-3'              |                             |
| CYP79F1-5-r1    |             | 5' RACE                   | 5'-GCTGCCTTACCACCTTCTCC-3'            |                             |
| CYP79F1-5-r2    |             | 5' RACE                   | 5'-TCCCACCACTTCGTCTAACTCC-3'          |                             |
| CYP79F1-5-r3    |             | 5' RACE                   | 5'-CCGACATGAATGTGGCTACC-3'            |                             |
| CYP79F1-5-r1new |             | gene isolation            | 5'-CCACCTTCTCTCTCCATAACG-3'           |                             |
| CYP79F1-5-Fnew  |             | gene isolation            | 5'-ATGATGAGCYTTACMACATCAT-3'          |                             |
| CYP79F1-p-f     |             | full-length               | 5'-CTAGGATCCGATGATGAGCCTTACCACATCA-3' |                             |
| CYP79F1-p-r     |             | full-length               | 5'-ACAGTCGACCTAAGGGCAGAATTTGGATA-3'   |                             |
| RtCYP79F1F      |             | real-time PCR/<br>3' RACE | 5'-AAGAGGAGAGGGTGAGAG-3'              |                             |
| RtCYP79F1R      |             | real-time PCR             | 5'-CGTATCAATCCAATCTTCAAC-3'           |                             |
| CYP79           |             | CYP79DG-F                 | gene isolation                        | 5'-CGGMTACAAAACMTGCGTG -3'  |
|                 |             | CYP79DG-R                 | gene isolation                        | 5'-TTGATGGRTTGTCTGGCG-3'    |
| CYP79B2         | CYP79B2.RTF | real-time PCR/<br>3' RACE | 5'-CTATGTTTGAAGCATTAGGGTTTACG-3'      |                             |
|                 | CYP79B2.RTR | real-time PCR             | 5'-ACTTGTCCATAATCGCACTAGAATC-3'       |                             |

|                |                |                            |                                       |
|----------------|----------------|----------------------------|---------------------------------------|
|                | CYP79B2-5-r1   | gene isolation             | 5'-GGGTTTGATTTTCATCGGCCGTAAGC-3'      |
|                | CYP79B2-p-f    | full-length                | 5'-CTAGGATCCGATGAACACTTTTACCTCAAAC-3' |
|                | CYP79B2-p-r    | full-length                | 5'-ACAGTCGACTTACTTCACCGCCGGTAAAG-3'   |
| <b>CYP79B3</b> | CYP79B3-3-FLF  | 3' RACE                    | 5'-CCGATCATCTAACCGCTTGG-3'            |
|                | CYP79B3-5-r1   | 5' RACE                    | 5'-ATATGCTCAATATCTTCAATGG-3'          |
|                | CYP79B3-5-r2   | 5' RACE                    | 5'-CTCATGTCCGTTTAGATCCAATCC-3'        |
|                | CYP79B3-5-r3   | 5' RACE                    | 5'-ACGGCGTTTGATGGATTGTC-3'            |
|                | CYP79B3-5-Fnew | gene isolation             | 5'-ATGGATACTWTAGCWTCAAACCTCT-3'       |
|                | CYP79B3-5-r0   | gene isolation             | 5'-ATTCTACGAGTGGAACCC                 |
|                | CYP79B3-p-f    | full-length                | 5'-CTAGGATCCGATGGATACTTTAGCTTCAAAC-3' |
|                | CYP79B3-p-r    | full-length                | 5'-ACAGTCGACTCAGATTACCGATGGTAAAG-3'   |
|                | RtCYP79B3F     | real-time PCR              | 5'-CAAGAAGATGAGGAAAGTGATTATGAC-3'     |
|                | RtCYP79B3R     | real-time PCR              | 5'-TGTAAGCCAAGCGTTAGATG-3'            |
| <b>CYP83A1</b> | CYP83A1F       | gene isolation             | 5'-GAAGTACAATGAAGATGGAGAAG-3'         |
|                | CYP83A1R       | gene isolation             | 5'-TAACTAAGGCTCTGAAGTAAGG-3'          |
|                | CYP83A1.RTF    | real-time PCR/<br>3' RACE  | 5'-CGCTGGTTACGACATCCC-3'              |
|                | CYP83A1.RTR    | real-time PCR              | 5'-CACATTCTCCTGCCTGATCC-3'            |
|                | CYP83A1-5-F    | gene isolation             | 5'-ATGGAAGATATCATCATCG-3'             |
|                | CYP83A1-5-r1   | gene isolation             | 5'-ACCACGCCCTTGACATTCTC-3'            |
|                | CYP83A1-p-f    | full-length                | 5'-CTAGGATCCGATGGAAGATATCATCATCGGG-3' |
|                | CYP83A1-p-r    | full-length                | 5'-ACAGTCGACTCACTTACTCACTTTGTGGGG-3'  |
| <b>CYP83B1</b> | CYP83B1F       | gene isolation/<br>3' RACE | 5'-TAGACGAGACTCTTGACC-3'              |
|                | CYP83B1R       | gene isolation             | 5'GAGAAGGTTAGCGAAAGG-3'               |
|                | CYP83B1-5-r1   | 5' RACE                    | 5'-CGTGGGTGAATTTAATGGAGAAAGG-3'       |
|                | CYP83B1-5-r2   | 5' RACE                    | 5'-GGATGACTGGTTCCGAGACG-3'            |
|                | CYP83B1-5-r3   | 5' RACE                    | 5'-CTTGCCCATAAACCTCTCC-3'             |
|                | CYP83B1-5-Fnew | gene isolation             | 5'-ATGGATCTCTTMTGATTAT-3'             |

|                 |              |                                 |                                       |
|-----------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------------|
|                 | CYP83B1-5-r0 | gene isolation                  | 5'-GAGTCTCGTCTAGGAGTTCTTG-3'          |
|                 | CYP83B1-p-f  | full-length                     | 5'-CTAGGATCCGATGGATCTCTTCTTGATTATT-3' |
|                 | CYP83B1-p-r  | full-length                     | 5'-ACAGTCGACTCAAATGTGCGTCTTGGTAC-3'   |
|                 | CYP83B1.RTF  | real-time PCR                   | 5'-GCCAAGACCATCATTTCAGG-3'            |
|                 | CYP83B1.RTR  | real-time PCR                   | 5'-TCTCCCCGAACCAAAGG-3'               |
| <b>SUR1</b>     | SUR1.F       | gene isolation/3'<br>RACE       | 5'-TGACCGCTGGATGCAACC-3'              |
|                 | SUR1.R       | gene isolation                  | 5'-ACGCCCTCGGGATCATTTC-3'             |
|                 | SUR.1-5-F    | gene isolation                  | 5'ATGAGCGAAGAACAASAASCACA-3'          |
|                 | SUR.RTFnew   | real-time PCR                   | 5'-CATTGTTGTGATTAATCCCAAC-3'          |
|                 | SUR.RTRnew   | real-time<br>PCR/gene isolation | 5'-TCCGAATATAGTCTGATCATAA-3'          |
| <b>FMOGS-OX</b> | EsFMO.Fnew   | gene isolation/3'<br>RACE       | 5'-TCAAACCTCGTGGAGATGGTTCG-3'         |
|                 | EsFMO.Rnew   | gene isolation                  | 5'-ATATGGACTTCTTTAGCCACT-3'           |
|                 | FMO.DG-F     | gene isolation                  | 5'-ATGGCACCARCTCAAAAC -3'             |
|                 | EsFMOGS.RTF  | real-time PCR                   | 5'-TCGAGAAGGATGGTCGGAAATGGA-3'        |
|                 | EsFMOGS.RTR  | real-time PCR                   | 5'-GGAACCTCAGCGACACGAGGC-3'           |
| <b>MYB34</b>    | MYB34-F      | gene isolation                  | 5'-ATGGTGAGRACACCATGTTGCAA-3'         |
|                 | MYB34-R      | gene isolation                  | 5'-TCARACAAAGACACCAAT-3'              |
|                 | MYB34.RTF    | real-time PCR                   | 5'-CTACATGGTGAAGGTGGATGG-3'           |
|                 | MYB34.RTR    | real-time PCR                   | 5'-ATCGGGTCTTAGATAGTTAGCC-3'          |
| <b>MYB51</b>    | MYB51-F      | 3' RACE                         | 5'-ATGGTGCGGACACCRGTGTTGCA-3'         |
|                 | MYB51.RTF    | real-time PCR                   | 5'-CCTTCACACCAACCTCATCAG-3'           |
|                 | MYB51.RTR    | real-time PCR                   | 5'-AACACAAGACTCTCCGAACATC-3'          |



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV - DNA αλληλουχίες των γονιδίων που απομονώθηκαν**

- ***EsMAM-1*** (JX946188), methylthioalkylmalate synthase (MAM), involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGTTGTCCGGTCATTCTTACCCTTTGGATCTGTTGCTTGACCCGTCCGTACAACAAGT  
CGTTCTTGGCCATCTCATGTTGCTCCTCTGTGTCCGAAAAGCTGAGACTAGTGCTACTG  
ACCTGAAACCCATCGTGGAACGGTGGCCAGAGTATATTCCGAACAAGCTTCCCGACAAG  
AACTATGTGCGTGTATTCGACACGACGCTCCGTGACGGCGAACAATCTCCCGGTGCAGC  
ACTTACTCCACCACATAAGATAGAGATTGCCTGGCAGCTCGCTAAGCTCCGAGTAGACAT  
CATGGAAGTTGGTTTTCCCTGCGTCTTCAGAGGAAGAGTTTGAAACTATCAAAACCATCGC  
CAAGACCGTGGGGAATGAGGTGGATGAGGAAACAGGTTATATCCAGTGATATGCGTC  
ATCGCACGAAGCAAAGAAAGAGATATTAAAGCGGCTTGGGAGTCAGTGAAGTACGCAA  
AGAGGCCGAGGATACTCATATTCCTTCTACTAGTGACATCCACTTGAATATAAGTTGA  
AAATGAATAGGGACGAAGTCTCGAGATGGTTCGTACGTAGTATTAAGTTTGCTAAAAGT  
TTAGGTTTTCGAAGACATCGAATTTGGTTGTGAAGATGGCGGCAGGTCGGACAAGGATTA  
TATATGCAAGGTTTTTGAAGAAGCGATCAAAGCGGGTGCAACCACCCTGGCCTGCCCGG  
ACACAGTGGGGATCAACATGCCCCGAGAATATGGAGAACTTTTGAGATACGTCAAAGCA  
AACACTCCTGGAATTGATGATGTTATCTTGAGCACTCATTGTCACAATGACCTTGGTGT  
GCTACCGCCAACACAATCGCCGGTATATGTGCGGGAGCACGACAAGTCGATGTAACAAT  
CAATGGAATAGGTGAAAGAAGTGGAAATGCACCGCTTGAAGAGGTCGTGATGGCTTTG  
AAATGTCGAGGAGCATACTGATGGGTGGTGTTTACACAAGAATAGACACACGCCAAAT  
TATGGCTACAAGCAAGATGGTTCAAGAATACACCGGCTTGTATGTTTACGCCCCACAAGCC  
TATAGTTGGAGCCAACCTGTTTTGTTTATGAGAGCGGCATTACCAGGATGGGATATTGA  
AAAATCGGAGTACATATGAGATCTTATCACCAGAAGATATTGGGATTGAAAATCTGAA  
AAATCCGGCATTGTTCTTGGAAAGGCTTAGTGGACGTCATGCAGTGAAAGGTCGACTGAA  
AGAGTTGGGATATGAAACCAATGATGAGAAATTGAACGAGGTTTTCTCACGGTTCAGAG  
ATTTAACCAAGGAGAAAAAGAGAATCACGGATGATGACCTCAAGGCATTAGTAATGTGT  
GGTGATGAAATCTTCTCCTCCGAGAAGTTAAACGGCAAAGAAAGCAATAGTAACAGCTA  
TGTAACAGCCCCTCAAATTTCTCCGCGGTATAA

- ***EsMAM-2*** (JX946189), methylthioalkylmalate synthase (MAM), involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis mRNA, partial CDS

CAAGAAGAAGTCGTTGAGATGGCCGCGAGTAGTGTCAGGTTTGCTAAAAGCTTAGGCTT  
 CGTTGACGTTCAATTTGGTTGCGAAGATGGCGGCAGGTCGGATAAGGACTTTCTATGCA  
 AGATTCTAGGAGAATCGATAAAAAGCTGGTGCAACCACGGTCAACGTGGCGGACACTGTT  
 GGAATCAACATGCCGGAAGAATACGGAGAACTCGTGAGCTACGTCAAAGCAAATACTCC  
 TGGAATTGATGATATTATCTTCAGTGTTTATTGTCACAACGACCTTGGTGTTGCTACCGCC  
 AACACAATTGCCGGTGTATGTGCTGGAGCACGACAAGTCGAAGTAACAGTTAACGGAAT  
 AGGCGAAAGAAGTGGCAATGCACCGCTTGAAGAGGTCGTGATGGCTTTGAAATGTCGA  
 GGAGAATACCTAATGGATGGTGTCTACACAAGAATAAACACACGTCAAATTATGGCTAC  
 TAGCCAGATGGTTCAAGAATATAACCGGCTTGTATGTTCAACCACATAAACCCATAGTTGG  
 AGCCAAGTGTTCGTTTCATGAGAGCGGCATTACCAGGATGGAATCTTGAAAAACCGGA  
 GTACATATGAGATCTTATCGCCAGAAGATGTTGGGGTTGTAATCTCAAAGTTCTAGTA  
 TTGTTCTTGGAAAGCTTAGCGGACGTCATGCTGTGAAAGATCGGCTGAAAGAGTTGGGT  
 TATGAGCTCGATGATGAGAAATTGAACGACATCTTCTCAAGGTTCAAGGATTTAACCAA  
 GCAGAAAAAGAGAATCACGGATGATGATCTGAAGGCACTAGTAACGTGTGGTGATAAG  
 GTCTCGTCCAGTGAAGAGACTAACGGCTATGTACCAATCCCACAGATTTCTCTGTGGTA  
 TAA

- ***EsCYP79F1*** (JX946191), cytochrome P450 (CYP79F1), involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGATGAGCCTTACCACATCATTACCATAACCTTTTCAGATCCTACTAGTCCTTATCATCTC  
 CTTGGCATCAATCACTTTGCTTGGCCGAATACTATCAAAAACCCGCCAAAACCAAAGACCG  
 GTCTCGTCAGCTTCTCCTGGACCACCAGGATGGCCATCCTCGGCAACTTACCCGACCT  
 AATGAGGACTCGTCCTAGGCACAAATATTTGAGATTGCCACAAAAGGACAAAAACCGG  
 ATATCGCATGTTTCAACTTCGCTGGAACCCACGCCATCATCATAAACTCCGACGAGATCG  
 CTCGAGAAGCGTTTAAAGAGAGAGACGCCGACTTCGCAGACCGGCCTAATCTTTTCAAC  
 ATGAGAACCATCGGAGGCAATCACAAATCAATGGGGAACCTACCATACGGTGAACAGCT  
 CATGAAGATGAAAAGAGTGATCACAACGGAGATTATGTCCGGTCAAACATTAAACATGT

TGGTAGCTGCGAGGACCATTGAAGCGGATAACCTCCTTGCTTACCTTCTCTCGATGTACC  
AACGGTCCGAGACGGCTGACGTTAGAGAGTTCTCGAGGGTTTATGGTTACGCAGTGACC  
ATGAGATTGTTGTTTGAAGGAGACATGTCTCGAGAGATAATGCTTTCTCCGACGAGGG  
AAGGTTAGGACCAGCGGAGAAAGATCATCTTGATGCGATCTTTGAAACATTAACCTGTT  
TGCCGAGTTTTTCGCCGGCGGATTACTTGGAGAAATGGTTTAGAGGTTGGAACATTGAT  
GGTCAAGAGGAGAGGGTGAGAGTGTATTGTAATAAAGTTCGAAGTTACAACAATCCGA  
TCATTGACGAGAGGGTCGCGTTATGGAGAGAGAAAGGTGGTAAGGCAGCTGTTGAAGA  
TTGGATTGATACGTTCAATTACGCTAAAAGATGAAAATGGAAAGTATTATATCACAGCTGA  
TGAAATCAAAGCTCAATGCGTTGAATTTGTATAGCAGCGATCGATAATCCGGCAAATAA  
CATAGAATGGACACTTGCGGAAATGTTAAAAAATCCGGAGATTTACAAAAAGCTTTGA  
AGGAGTTAGACGAAGTGGTGGGAAAAGACAGGCTTGTTCAGAATCAGACATACCAA  
CCTAAACTACTTAAAAGCTTGTTCAGAGAAACATTCAGGATTCACCCAAGTGCTCATTA  
TGTTCCCTCATGTGGCTCGTCAAGATACCACCTCGGGGGTTATTCATTCCCAAAGGT  
AGTCACATTCATGTCCGCCGTCCTGGAATAGGCAGGAGCTCCAAAGTATGGAAAGATCC  
ATTGGTATACAAACCAGAGCGTCACCTCGAAGGAGATGGACTCTCGAAGGAGCTTTCTC  
TGGTCGAGTCTGAATTGCGTTTCGTGTCGTTTGGTACCGGTCGGCGTGGCTGCGTCGGT  
GTGAAGGTTGGGACGGTCATGATGGTTATAATGTTGGCTAGGTTTCTTCAAGCGTTAAC  
TGAAACTCCATCCTGGTTATGGACCGTTAAGTCTAGAGGAAGATGATGCATTGCTTATG  
GCTAAGCCTCTTCTTGTCCGTTGAGCCACGCTTGGCACCCAACCTTTATCCAAAATTCT  
GCCCTAG

- ***EsCYP79B2*** (JX909276), cytochrome P450 involved in indolic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGAACACTTTTACCTCAAACCTCTTCGGATCTCACTTCCACTACAAGGCAAACGTTGACGT  
TCAGCAACATGTATCTCCTCACTACGCTTCAGGCCTTTGTTGCTATAACCTTGGTGATGCT  
CTTCAAGAAAGTACTGGTCAAGGATCATAATAAAAAGAAATTGTCTTCCCCCTGGTCC  
CACCGGATGGCCCATCATCGGAATGGTTCCAGCGATGCTAAAGGGCCGTCCTGTTTCC  
GGTGGCTCCACAGCATCATGAAGCAGCTAAACACTGAGATTGCCTGCGTGAGACTAGGA  
AACACTCACGTGATCACCGTCACATGCCCTAAGATAGCACGTGAGATACTCAAGCAACA  
AGACGCTCTCTTCGCTCAAGACCTATGACTTACGCACAGAATGTCCTCTTAACGGATA

CAAAACATGCGTGATCACTCCCTTCGGTGAACAGTTCAAGAAAATGAGGAAAGTCGTGA  
 TGA CTGAACTCGTTTGTCCCGCGAGACACAGGTGGCTCCACCAGAAGAGAGCTGAAGA  
 GAACGATCATTAAACCGCATGGGTATACAACATGGTTAAGAACTCGGACTCAGTCGATTT  
 CCGGTTTCATGACAAGACACTACTGCGGCAATGCTATCAAGAACTTATGTTTCGGGACAA  
 GAACGTTCTCTCAAATACTGCACCTGACGGTGGACCAACCGCGGAGGATATCGAGCAT  
 ATGGAAGCCATGTTTGAAGCATTAGGGTTTACGTTTCGCTTTTTGCATCTCTGATTATCTAC  
 CTATGCTCACGGGACTTGATCTTAACGGCCACGAGAAGATCATGAGAGATTCTAGTGCG  
 ATTATGGACAGGTATCATGATCCTATCATTGATGCAAGGATCAAGATGTGGAGAGAAGG  
 AAAGAGAACTCAAATAGAAGATTTTCTAGATATTTTCATTTTCGATCAAAGATGAAGAAGG  
 AAACCTTTGCTTACCGCCGATGAAATCAAACCCACCATTAAGGAGCTTGTGATGGCGGC  
 GCCAGACAATCCATCAAACGCCGTAGAATGGGCCATGGCGGAGATGGTGAACAAACCT  
 GAGATTCTCCGTAAAGCAATGGAAGAAATAGACAGAGTTGTCGGAAAAGAAAGACTTG  
 TCCAGGAATCAGACATCCCAAACCTCAACTACATCAAAGCTATTCTCCGTGAAGCTTTCC  
 GTCTCCATCCCGTTGCCGCCTTTAACCTCCACACGTGGCACTTTCCGACACGACCGTCGC  
 CGGGTATCACATCCCTAAAGGAAGTCAAGTCCTTCTTAGCCGATATGGGCTGGGCCGTA  
 ACCCGAAAGTTTGGGCCGACCCACTGAGCTTTAAACCGGAGAGACATCTCAACGAATGC  
 TCCGAAGTTACTTTGACGGAGAATGATCTTCGGTTTATATCGTTTAGTACCGGTAAAAGA  
 GGTTGTGCTGCTCCGGCTTTAGGCACGGCGTTGACCACGATGATGCTCGCGAGACTACT  
 ACAAGGTTTTACTTGAAGATGCCGGAGAATGAGACACGTGTTGAGCTGATGGAGTCTA  
 GTCATGATATGTTTTGGCTAAACCATTGGTTATGGTCGGTGAGTTGAGACTACCTGAGC  
 ATCTTTACCCGGCGGTGAAGTAA

- ***EsCYP79B3*** (JX946190), cytochrome P450 (CYP79B3), involved in indolic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGATACTTTAGCTTCAAACCTTCGGACCTCACGACCAAACTAGTCTCCAAACATCTC  
 CGTTTAGCAATATGTATTTCTCACAACTTCAAGCTCTTGATGTCATTTCTCTTAAATG  
 ATATTCAAGAAAATAAAGTCATCTTCACAAAACAAGAAGTTGCACCCTCTCCCGCCGGGT  
 CCAAGTGGGTTTCCACTCGTAGGAATGGTTCCAGCGATGCTTAAAACCGTCCGGTTTTTC  
 CGTTGGCTTCATAGCCTCATGAAGGAGCTCAACACTGAGATAGCTTGTGTGCGTCTAGG  
 AAACACTCACGTCATTCCAGTCACATGTCCTAAGATAGCACGTGAGATTTTCAAGCAACA

AGACGCACTCTTTGCATCAAGACCACTCACTTACGCTCAAAAGATACTCTCCAACGGCTA  
 CAAAACCTGCGTGATCACACCCTTCGGTGAGCAATTCAAGAAGATGAGGAAAGTGATTA  
 TGACGGAGATAGTTTGCCTCCGCAAGACACCGATGGCTGCATGACAATAGAGCTGAAGA  
 AACCGATCATCTAACCGCTTGGCTTTACAACATGGTTAAAACTCTGAACCAGTCGATCT  
 CCGCTTTGTTACAAGGCATTACTGTGGTAATGCTATTAAGGCTTATGTTTGGAACGAG  
 GACGTTCTCGGAGAAAATAAGCCGATGGTGGGCCAACCATGAAGATATTGAGCATA  
 TGGAAGCTATGTTTGGGGTTAGGGTTTACGTTTTCGTTTTGTATATCGGATTATCTAC  
 CCATGCTTACGGGATTGGATCTAACCGGACATGAGAAGATCATGAGAGAAGCTAGTGCA  
 GTTATGGATAAATATCATGATCCTATTATTGATGAGAGGATTAATGTGGAGAGAAGG  
 AAAGAGAACTCAGATTGAAGATTTTCTAGACATTTTTATCTCTATCAAGGACGCAGATGG  
 CCAGCCTTTGCTTACCGCTGATGAAATCAAACCGACCATTAAGGAACTTGTGATGGCGGC  
 GCCGGACAATCCATCAAACGCCGTGGAATGGGCCATGGCGGAGATGATAAACAAACCG  
 GAGGTCCTCCAGAAAGCAATGGAAGAGATCGAAAGAGTCGTCGGAAAAGAAAGACTCG  
 TGCAAGAATCCGACATACCAAACCTTAACCTCTCAAAGCTATTATCCGTGAAGCTTTTCG  
 TCTTCATCCCGTCGCTGCCTTTAATCTCCACACGTGGCACTCTCCGACACAACCGTCGCT  
 GGTTACCATATCCCTAAAGGAAGTCAAGTTTTACTTAGCCGTTACGGTCTTGGTCGTAAC  
 CCTAAAGTTTGGTCTGATCCACTAAGCTTTAAACCGGAGAGGCATCTCAATGAGTGCTTG  
 GAAGTGACTTTGATCGAGAACGATCTCCGGTTTATCTCGTTTAGTACCGGGAAAAGAGG  
 ATGTGCTGCTCCTGCATTAGGTACTGCGATAACTGTCATGATGCTCGCTAGGCTTTTGCA  
 AGGGTTTAAGTGGAACCTACCCGGCGGTGAGACACGTGTGCAATTGATGGAATCGAGT  
 CATGATATGTTTCTCGCGAAGCCCTTGGTTATGGTCGGAGAATTGAGGTTGTCGGAAAA  
 TCTTTACCCATCGGTAATCTG

- ***EsCYP83A1*** (JX946192), cytochrome P450 (CYP83A1), involved in glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGAAGATATCATCATCGGGGTTGTGGCTGTAGCCGCAGTTCTCCTCTTCTCCTCTCTC  
 AAAAATCAAAAAACAAACGCTACAAATTGCCACCCGGCCACGGGGGCTTCCGGTGATT  
 GGAAACCTCCACCAGCTTAGCCAGCTTAACCCACAACGTTTCTTCTATGGATGGGCCAAA  
 AAATACGGTCCAATCTTTTCATACAAGATAGGAAGCCAAACAATGGTGGTCATATCATCA  
 GCTGAGCTAACAAAAGAGCTTCTCAAGACGCAGGATGTCAACTTCGCGAACCGGCCTCA

GCACCGTGGTCACGAGTTCATAACCTACGGTCTGAAGTGACATGGCAATGAACCACTACA  
CACCGTATTACCGGGAGATGAGGAAGATGGGCATGAACCACTTGTCTCACCCACACGT  
GTGGCCACCTTTAAGCACGTGCGAGAAGAGGAGGCAAGGACGATGATGGCTAAGATCG  
AAAAGGCTGCCGAGAGAGCCGAACCCGTCGATATAAGCGAGCTTATGTTGACCTTCAG  
AACTCGGTTGTGTGTAGGCAAGCGTTCGGGAAGAAGTACAATGAAGATGGGGAAGAGA  
TGAAGAGATTTATCCAGATTCTTTATGGCACTCAAAGCGTTTTGGGGAAGATTTTTTCTC  
TGATTTTTTCCGTTTTTTGGATTTTTAGATGACTGGACAGGCCTCACAGCTTATATGAAG  
GAGTGTTCGAAAGACAAGACACTTATATACAAGAGATTATTGATGAGACACTTGACCCC  
AACAGGGCCAAGCCAGAACTGAGAGCATGATCGATCTCTTGATGGAGATCTATAAAGA  
TCAACCTTTCGCTCAAAGTTTACTTTAGAGAATGTCAAGGGCGTGGTTTTGAATATAGT  
GGTTGCGGGAAGTACACGGCGGCTGCGGCGTTGTCTGGGGAATGACGTATTTGATG  
AAGTATCCTCAAGTGATGAAGAAAGCTCAAGCAGAAGTGAGAGAGTACGCAAGAGAGA  
ATGGTTCAACGTTTATTACTGAAGACGACGTCAAGAATCTTCCTTACTTCAGAGCCTTAGT  
TAAAGAAACCTTAAGGATCGAACCGGTGATTCCTCTCCTTATCCCTCGTGCTTGTATTCAA  
GACACCAAGATCGCTGGTTACGACATCCCTGCGGGGACTACTGTCAACGTCAACGCATG  
GGCCGTGTCCCGTGACGAGAAAGAGTGGGGTCCCAACCCTGACGAGTTCAGACCAGAG  
AGGTTTCTTGAAAAGGACGTTGACTTCAAAGGCACGGACTATGAGTTTATACCGTTCGG  
ATCAGGCAGGAGAATGTGCCCTGGAATGCGTCTTGGTGCGGCGATGCTTGAGGTTCCGT  
TTGCGAACCTTCTACTCAACTTCGACTTCAAACCTCCTAATGGAATGAAGCCAGAAGAGA  
TCAACATGGATGTCATGACTGGTCTTGCTATGCACAAATCGGATCATCTCAAGCTTGTTCC  
CCACAAAGTGAGTAAGTGA

- ***EsCYP83B1*** (JX946193), cytochrome P450 (CYP83B1), involved in glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGATCTCTTCTTGATTATTGCCTTCATGGTAGCTGCCACAGCCTTCTCCTCCTCCGTA  
GCTCAACCAAGAAGCCTCTCCGCCTACCTCCGGGACCAAAGGTCTTCTATAATTGGAA  
ACCTCCACCAGATGGAGAAATTCAACCCACAACACTTCCTTTTCCGTCTCTCCAAGCTCTA  
CGGTCCAATTTTACGATGAAAATCGGAGGACGCCGTCTCGCAGTGATCTCCTCCGCTGA  
GCTAGCCAAAGAACTCCTCAAGACCCAGGACCTTAACTTACCGCCCCGTCTCTCCTGAA  
AGGGCAGCAAACGATGTCGTACCAAGGCCGTGAGCTTGGTTTCGGACAGTACACAGCG

TACTATCGTGAGATGAGGAAGATGTGTATGGTTAACCTCTTCAGCCCGAACCGTGTGCG  
GAGTTTCCGACCCGTTAGAGAAGAAGAGTGTGGACGTATGATGGACAAGATCTACAAA  
GCCGCTGACCAATCAGGGAGCGTTGATCTAAGTGAGCTTCTCTTGTCTTTCACCAACTGT  
GTTGTCTGTAGACAAGCTTTTGGGAAGCGGTATAACGAGTACGGAACCGAGATGAAAA  
GATTCATAAACATTTTGTATGAGACTCAAGCTCTTTTGGGAACTCTGTTTTCTCCGACCT  
TTCCCTTATTTCCGGTTTCTTGACAACTCACTGGTCTTAGTGCACGTCTCAAGAGAGCT  
TTCAAGGAGTTAGACACTTACCTTCAAGAACTCCTAGACGAGACTCTTGACCTAACCGC  
CCTAAACCCGAGACAGAGAGTTTCATTGATCTTTTGTATGCAGATCTATAAAGATCAACCT  
TTCTCCATTAATTCAACCACGAAAATGTCAAGGCCATGATTTTGGATATTGTTGTACCCG  
GGACTGACACAGCAGCTGCAGTAGTGGTATGGGCCATGACATACCTTATAAAGAACCCT  
GAAGCAATGAAGAAAGCTCAAGACGAAGTGAGGAATGTGGTAAGAGACAAAGGACAC  
GTCTCGGAAGAAGATATCCCAATCTCCCTTATTTAAAGGCAGTCATCAAGGAGTCTCTC  
CGTCTCGAACAGTCATCCCAATTCTTCTACATAGAGAAACCATAGCGGACGCAAAGATC  
GGTGGCTATGATATTCCGGCGAAGACCATCATTCAAGTGAACGCATGGGCGGTTTCTCG  
GGACACATCAGCATGGGGAGACAACCCTGATGAGTTTATTCCGGAGAGGTTTATGGGCA  
AGCATAAAGGAGTGGATTTCAAGGGACAAGATTTTGTAGCTTTACCTTTTGGTTCCGGG  
AGAAGAATGTGTCCGGCTATGCATCTTGGTGTCCGATGGTTGAGATACCTTTTGCTAAC  
CTTCTTTACCGGTTTACTGGAGCTTACCGAAAGGTGTTAAACCTGAAGATATAAAGATG  
GATGTCATGACCGGACTCGCTATGCATAAGAAAGAACACCTCGTTCTTGTACCAAGGAC  
GCACATTTGA

- ***EsSUR1*** (JX946194), SUR1, involved in glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGAGCGAAGAACAAGAAGCACACGCCAACCTTGCGGTTCCCGGTTTTCGAACTGAGAA  
AGAGCCCAAAACGCAGACTCAGCAGAATGGCCACGGTACCGTTTGGCGGTTCCGGTGG  
GCCGATAAGGCCGCTAAAGCCTCTACGGTAACGCTGAGAGGTGTTATCTACATGCTCTTC  
GACAACTGCAGTAAGGACGTCAAAAAGACCATCTTACCCCTCGGCCATGGAGATCCTTCC  
GTCTATCCTTGCTTCCGCACCTGTATCGAGGCCGAAGACGCCGTCGTCGACGTTCTCCGC  
TCCGGCAAAGGCAACTCTTACGGTCTGGAGCTGGGATTCTCCCGGCCAGAAGAGCTGT  
AGCCGATTATCTGAACCTAGAACTTCCGAACAAGCTAACGCCGGACGACATCTTCTGAC

AGCTGGATGCAACCAAGGGATAGAGCTCGTGTTGGAATCGTTGGCTCGACCAAACGCAA  
ACATATTGCTCCCACGTCCCGGTTTCCCTCACTACGACGCTCGTGCTGTTTACAGTGGTCT  
CGAGATCCGCAAGTTCGATCTTCTTCCCGACCAAGAATGGGAGATTGATCTCCGAGGCG  
TCGAAGCCGTTGCAGACGAGAACACTGTGGCCATTGTTGTGATTAATCCCAACAATCCAT  
GTGGAAACGTCTACTCTCACGACCATCTCCAGAAGGTGGCAGAGACGGCTCGGAAGCTG  
GGGATAATGGTGATCACAGACGAAGTTTATGATCAGACTATATTCGGAGACAATCCTTTC  
GTTCCAATGGCCAAGTTCGCATCGATTGCCCTGTGTTGACCCTTGGAGGCATATCTAAA  
GGATGGGTTGTTCTGGATGGAAGATTGGCTGGATCGCCTTGAATGATCCCGAGGGCGT  
TTTCGAATCCACCAAGGTGGTTCAATCCATTAAGCAGAATCTTGACATAACTCCTGACCCT  
TCCACTATCATTAGGCTGCACTTCTCAGATTCTGGAGAAAGTTGATAAAAACCTTCTTTG  
CAAAGAAGAACAAGATACTCAAACATAATGTCGATTTGGTGTGTGATAGGCTCAAGGAT  
ATTCCTTGCGTCGTCTGTCCCAAGAAACCCGAGTCTTGCACTTATCTACTGACAAAGCTTG  
AGCTGTCATTGTTGGAGAACATCAAGGATGACATTGATTTCTGCGTGAAGCTTGCCAGA  
GAGGAAAACCTCGTGTTTCTACCAGGAGAGGCTCTGGGGTTGAAGAACTGGATGAGGA  
TTACTATCGGAGTGGAAGCCCATATGCTTGAGGATGCACTTGAGAGACTCAAGGGTTTC  
TGACACGTCATACCAAGAAGACAGATACAGAACTGAGTCACCTTCAAGCTTTGAAAAT  
GAGTGA

- ***EsFMOGS-OX1*** (JX946186), flavin-monooxygenase (FMOGS-OX1), involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis mRNA, partial CDS

ATGGCACCAGCTCAAACCCAATCAGTTCGAAACAGGTGGCTGTGATCGGAGCCGGAGC  
ATCCGGTTTAATAGCAGCCAGAGAGCTCCATCGTGAAGGTCACACCGTCGTGGTTTTTTGA  
ACGGGAGAAACAAGTGGGAGGTCTCTGGATTTACTCACCTAAGGCTGAATCCGACCCGC  
TTAGTCTCGATCCGAACCGACTCATAGTCCACTCGAGTGTCTACGAGTCTCTCCGAACCA  
ACCTCCCGAGAGAGTGTATGGGTTTCAGGGATTATCCGTTTCGTGCCACGTGATGATGATT  
TGCAAGAGACTCGAGAAGGTATCCGTGCCATAGGGAAGTTCTTGCGTATCTTCAAGAC  
TTTGCTAGAGAGTTTTAAATAGAGGAGATGGTCCGGTTTGAGACCGAGGTGGTCTCTGGT  
GGAGCCGGTTGACGGGAAATGGAGGGTCCGGTCCAAGAACTCCGCCGATCTATCCGAC  
GATGAGATCTTTGACGCCGTGGTTGTTTGCAGTGGGCACTACACCGAACCTTACGTCGCT  
ACTATTTCTGGGATAAATTCATGGCCAGGAAAGCATATCCATAGCCACAACCTACAGAGTT



CCTGGTCCATTCAAAAATGAGGTGGTGGTGGTATTGGAAATTTTTCGAGCGGTGCTGA  
 TATTAGTAGAGACGTAGCTAAGGTCGCCAAAGAAGTCCACATCGCGTCTAGAGGGAGT  
 GAAGCCAATACGTATGAGAAGCTTCCGTGCCACCAACAATCTATGGATTCATTCTGAG  
 ATAGAGACTGCATGTGAGGATGGGTCAATTATTTTCAAAAATGGGAAGGCCGTTTCATGC  
 CGATAGCGTTGTGTACTGTACCGGGTACAAGTATAAATTTCCATTTCTTCAAACCAATGG  
 CTATATGAGTATTGATGATAACCGCGTTGAGCCTTTATACGAACATGTGTTTCCACCCGC  
 GCTAGCCCCAGGACTTTCTTTTATTGTTTTACCAGGGATGGGCATACAATTCGTTATGTTT  
 GAAATCCAAAGCAAATGGGTAGCTGCAGTTTTGTCAGGACGAGTTACACTTCCCTC

- ***EsFMOGS-OX5*** (JX946187), flavin-monooxygenase (FMOGS-OX5), involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis mRNA, partial CDS

TCAAACCTCGTGGAGATGGTTCGGTTCGAGACAGAAGTGGTTCCTTGTGAGAAGGATGGT  
 CGGAAATGGAAGATCCGATCAAAAAGCTCTGATGGGGTGTCCAGAGATGAGATCTTTGA  
 CTCTGTTGTTGTGTGTAATGGACTATAACAGAGCCTCGTGTGCTGAAGTTCCTGGTAT  
 AGATCTATGGCCAGGGAAGCAACTTCATAGTCACAACACTACAGAGTTCCTGATCCATTTAA  
 AGACCAGGTGGTGGTAGTGATAGGTAACCTTTCGAGTGGATCAGATATCAGCAGGGAC  
 ATAACAGGAGTGGCGAAAGAAGTCCATATTGCGGCTAGGTCGCAACCGTCTGAGACTTA  
 TGGGAAGCTTCCCGGGGCCGATAATCTATGGCTTCACCCTATGATAGAAAGGGCACACA  
 AAGATGGTTCGATTGTTTTCAAGAATGGTAAAGTTATACAAGCTGATACTATTGTGCATT  
 GCACCGGTTACATATATCACTTCCCATTCTTAATACCAATGGATATATCACCGTGGAGG  
 ATAACCTGTGTTGGACCTCTTTACAAACATGTGTTTCTCCTGCTCTTGCTCCAGGGCTTTC  
 CTTGTCGGTTTACCATGGATGACATTGTTATTCATGTTTGGAGCTTCAAAGCAAGTG  
 GGTGGCTGCAGTTTTATCCGGTCGTGTCACACTTCCTTCAGAAGAAAAAATGATGGAGG  
 AACTAACGCCCTCTATGCAAAGCGTGATGCTAACGGGTTTCCCAAGAGATACACACATA  
 GGCTTGGTGCCTCTCAGGCTGAGTATCTCAACTGGATAGCTGATCAGATTGGTGAACCA  
 CCTGTTGAACAATGGAGAAACCAGGAACTAGAAGGTGGCTATGTAAGACTTGCCACACA  
 ACCAGACACGTTCCGTGATAAGTGGGATGATGATCATCTCATCGTTGAGGCTTATGAGG  
 ATTTCTTGAGACAGAAGTTGATCAGTGTTATTCCTCTCAGATATTGGGGTGA

- ***EsMYB34-1*** (JX946181), MYB transcription factor (MYB34), involved in indolic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGGGAGGACACCATGTTGCAAAGAAGAAGGAATCAAGAAAGGAGCCTGGACTCCTG  
AAGAAGATCAAAGCTTATTGCTTATATTCAACGACATGGTGAAGGTGGATGGCGTACT  
CTCCCGGAAAAAGCTGGGTTGAAGAGATGTGGGAAGAGTTGTAGACTGAGATGGGCTA  
ATTATCTAAGACCCGATATCAAGAGAGGAGAGTTTACTCCTGAAGAAGACGACACTATA  
ATCAAACCTTCATGCTCTTAAGGGTAACAAGTGGGCCGCAATAGCAACTCACTTGGCTGG  
ACGAACTGACAATGAGATTA AAAACTATTGGAACACAAATCTTAAAAAGCGTTTAAAC  
AAAAAGGTCTTGATCCAACCACTCACCAACCGATAGATTCAACCGACCAAACCGGTTTCG  
GACAAGAAAAACCTAAACTCACTTCATCCAGTTCAGCAAGGCTTCTTAACCGTGTGCGAA  
GCAAATACGCGGTGACCTAAACCGGGATTTACTAACCGGAATCATCATAGGAAACTCC  
ACAATCATCGCCGAAGATTCACAAAACCTCCGGCCATGTCTACTCCCGACTGAAAACCTCG  
ACCAACACAGCGGCAAACCTCAAGATCTCTCTCATCGGTTCTGATGAACAACACGTGCGACA  
TTTTCCGGTTTATCCGACAAGTGTTCTTTCTCTGAACTCTTTAGCAACGAAGATATCTCCG  
ACATGTATATGAGTGTGATAATGTTGGTCTTATGGAAGAGTTAAAAGGTATGTTAAGCT  
ACGAAAATGTCAGCGCAGGAGATATTAAGGACTCGCCGAGGTTAACGTAGCTGATGA  
GATGGAGATTCTTGATTCTTGGAACGTAGAAGATGATCTTGATTGGAGAAGTTTGTGA  
GGTCGTTAGATTCCAAGATTGGTGTCTTTGTCTGA

- ***EsMYB34-2*** (JX946182), MYB transcription factor (MYB34), involved in indolic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGTGAGGACACCATGTTGCAAAGAAGAAGGAATAAAGAAAGGAGCATGGACTCCTG  
AAGAGGATCAGAAGCTTATTGATTATCTTCAACTACATGGTGAAGGTGGATGGCGTACT  
CTCCCTGAAAAAGCTGGACTGAAGAGATGTGGGAAGAGTTGTAGACTGAGATGGGCTA  
ACTATCTAAGACCCGATATTAAGAGAGGAGAGTTTACTCCTGAAGAAGACAACACTATT  
ATCAGGCTTCATGCTCTTAAGGGTAACAAGTGGGCCGCAATAGCAACAAGTTTGGCGGG  
ACGAACAGACAACGAGATTA AAAAATTATTGGAACACGAATCTCAAGAAACGCCTAAAC  
AAAAAGGTATCGATCCAATCACTCACAAACCGATTAATCCTACCTCCCAAACCGGTTTCAG  
AACCAAAAATACATAAACTCGGTTTCATCCGGTTCCGCGAGGCTTCTTAACCGCGTGC

GCAAATACTCGACCGATTCAAACCGGGATTTACTAACCGGGATCATCATAGGAAACTCCA  
CAATCATCGCTGACGAGTCACAAAGCTCCGGTGACGTGATTTCCGACCAAGAACAAC  
ACGTGACATCTCCCGTTTCTCCGACAACCTTTCTTTCTCGGATGAGTTCTTTAGCAACG  
AAGAGATCTCTGATAACGTTGGCCTTATGGAAGAGTTAAAGGGTATATTAAGCTACGGC  
GGTGCCGACGCCGGAGATATCAAAGATTCGCCTGAGGTTAACGTAAATTATGAAATGGA  
TTTTCTTGATTCTTGAACGAAGAAGATGATTTAGATTTGGACAAGTTTGTAAGTTCGTT  
AGATTCCAAGATTGGTGTCTTTGTTTGA

- ***EsMYB34-3*** (JX946183), MYB transcription factor (MYB34), involved in indolic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGTGAGGACACCATGTTGCAAAGAAGAAGGAATAAAGAAAGGAGCATGGACTCCTG  
AAGAAGATCAGAAGCTTATTGATTATCTTCAACTACATGGTGAAGGTGGATGGCGTACT  
CTCCCTGAAAAAGCTGGACTGAAGAGATGTGGGAAGAGTTGTCGACTGAGATGGGCTA  
ACTATCTAAGACCTGATATTAAGAGAGAGAGTTTACTCCTGAAGAAGACGACACTATTA  
TCAGGCTTCATGCTCTTAAGGGTAACAAGTGGGCCGCAATAGCAACAAGTTTGCGGGGA  
CGAACAGACAACGAGATTAATAAATTATTGGAACACGAATCTCAAGAAACGCCTAAAACG  
AAAAGGTATCGATCCAGTCACTCACAAACCGATTAATTTAACCTCCCAAACCGGTTTCAGA  
ACCAAAACTACATAAACTCGGTTTCATCCGTTCCGCGAGGCTTCTTAACCGCGTCGCAAG  
CAAATACTCGACCGATTCAAACCGGGATTTACTAACCGGGATCATCATAGGAAACTCCAC  
AATCATCGCTGACGAGTCACAGAACTCCGGCGACGTGATTTCCGTCCAAGAATGTGA  
CCTCTCCCGTTTCTCCGACAACCTTTCTTTCTCCGGTGAGTTCTTTAGCAACGAAGAGAT  
CTCTGACTTGTATATGAATGTGGATAACGTTGACCTTATGGAAGAGTTAAAGGGTATATT  
AAGCTACGGCGGTGCCGACGCCGGAGATACCAAAGATTCGCCTGAGGTTAACGTAACCTT  
ATGAAAGGGATTTTCTTGATTCTTGAACGAAGAAGATGATTTAGATTTGGAGAAATTT  
GTAAGTTCGTTAGATTCCAAGATTGGTGTCTTTGTCTGA

- ***EsMYB51-1*** (JX946184), MYB transcription factor (MYB51), involved in indolic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGTGCGGACACCGTGTTGCAAAGCTGAGTTAGGGTTAAAGAAAGGAGCTTGGACTC  
 CCGAAGAAGATCAGAAGCTTATCTCCTACCTTAACCGTCACGGTGAAGGTGGCTGGCGA  
 ACTCTCCCCGAAAAAGCTGGACTCAAGAGATGTGGCAAAGCTGCAGACTGAGATGGG  
 CCAATTATCTAAGACCTGACATCAAAGAGGTGAGTTCACTGAAGACGAAGAACGTTCT  
 ATCATCTCTTTCACGCCCTTCACGGAAACAAATGGGCTGCAATAGCTCGTGGATTACCA  
 GGAAGAACCGATAACGAAATCAAGAACCACTGGAACACTCATATCAAAAAACGTTTGAT  
 CAAGAAAGGTGTTGATCCTGTTACACACAAGACCATATCAGAAAACCTTACAGGATATTTT  
 GGAGAAACAAAACGTTAATCAGAAAACCTAACGGGTAAAGATGATCTTGATCATAACG  
 AGAAGGTGAAGAAGCCGGGATTATCATCGGCTAGGTTCTTGAACAGAGTAGCTAATAG  
 GTTCGGAAAGAGAATCAACCAGAGTGTTCTGTCTGAGATTATAGGAAGTGGTGGCCAC  
 TTAATCACTAGTACTACTACAAAGAGTGTCACGGTTGACTCCGAATCTGATAAGTCAA  
 CGAGCTCTTCCTTCACACCAACCTCGAATCTTCAATGCCAGATGACCGTTAACGGTAACG  
 GTAACGCTACGTCTCCGTCCACATTCTCAGAGTCATCCATCAACGATCAATTAGTATA  
 CTGTGATTATAATGATGACATTGATGGATTCTCAACATTTCTAAATGATGAAGATTTTCATG  
 ATGTTGGAAGAGTCTTGTGTTGAGAACACTGAGTTCATGAAAGAACTTACGAGGTTTCTT  
 GACGAGGATGAGAGTCATGGGGTGGACAACGTAGAAATGATGCCCATCTATGAACATC  
 AAGACAGTTTTGAAGAGATTGATAGCTATTTTGCATGA

- ***EsMYB51-2*** (JX946185), MYB transcription factor (MYB51), involved in indolic glucosinolate biosynthesis mRNA, complete CDS

ATGGTGCGGACACCGTGTTGCAAAGCTGAACTAGGGTTGAAGAAGGGAGCATGGACTC  
 CAGAGGAAGATCAGAAGCTTGTCTCCTACGTCAACCGTCACGGTGAAGGTGGATGGCG  
 AACTCTCCCCGAAAAAGCTGGACTCAAGAGATGTGGCAAAGCTGCAGACTGAGATGG  
 GCCAATTATCTAAGACCTGACATCAAAGAGGAGAGTTCACTGAAGATGAAGAACGTTT  
 TATCATCTCTCCATGCCCTTCATGGCAACAAATGGGCTGCAATAGCTCGTGGATTACC  
 AGGAAGAACCGATAACGAAATCAAGAACCACTGGAACACTCATATCAAAAAACTTTTGA  
 TCAAAAAAGGTGTCGATCCGGTTACACACAAGAGCCTGATCTCCGACAAATCAGAAAAC

CTCCCGGAGATTCCAGAGAAACAAAACGTTATTCAAGAAATTATAACGAGTGGTGATAA  
TCTTGATAAAGAGGAGGTGAAGAATGACAACAAGAAGTCTGGACTCTCATCGGCCAGGT  
TCTTGAACAGAGTAGCTAATAGGTTTCGGTAAGAGAATCAATCAAAGTGTTTTGTCTGAG  
ATTATCGGAAGTGGTGGCCCACTTACTAGTACCACTACAAGTCACACAACCTACTACTACA  
AGTGTCACCATTAACCTCCGAATCAGATAAGTCAATTAGCTCTTCCTTCACACCAACCTCAT  
CAGATCTTCTATGCCAGATGACCGTTAACGGTAACGCTACATCGTCTCCGTCCACATTCTC  
TGATGCATCCGTTAATGATAGTTTAAATGTAAGTGTGATAATGAGGATAATCTCGGATTCTC  
AAATTTTCTGAATGATGAAGATTTTCATGATGTTTCGGAGAGTCTTGTGTTGACAACACTGA  
GTTTCATGAAAGAACTTACGAGCTTTCTTCAGGAGGATGTGAGTGACGACGTCCAGGTGA  
TGCCCGTCAATGAACATAAAGACAATATTGAAGAGACTGATAACTATTTTGCATGA

**ABSTRACT**

Rocket (*Eruca sativa*) is a salad vegetable classified in Brassicaceae family. It derives its origin from the Mediterranean region but it is widely used in human diet all over the world. It is rich in glucosinolates, amino acid-derived compounds belonging to the general category of plant secondary metabolites.

Glucosinolates can be found mainly in the order Caparrales and especially in the Brassicaceae family. Being rich in nitrogen and sulfur, their molecule consists of a thioglucose unit (the core), a sulfonated oxime unit, and a variable side chain. Their division in three major groups (aliphatic, aromatic and indolyl glucosinolates) depends on the amino acid they derive from, which may be methionine, phenylalanine and tryptophan respectively.

As intact molecules, glucosinolates are inactive and have no known function, but after cell disruption they react with a thioglucosidase known as myrosinase, and hydrolyse into various other metabolites (isothiocyanates, nitriles, thiocyanates, epithionitriles and oxazolidine-2-thiones). These products are bioactive and have some interesting properties, ranging from antimicrobial and cancer-preventing to inflammatory activities.

Their biosynthetic pathway has been studied in *Arabidopsis thaliana*, which also belongs to the Brassicaceae family. The procedure begins with a precursor amino acid, which can be one of the three mentioned above, and contains three stages: (i) side-chain elongation of amino acids, (ii) development of the core structure, and (iii) secondary side-chain modifications. Most of the enzymes and genes involved are known in *A.thaliana* and comparative genomics studies have also been performed. As a result, a lot of sequences of glucosinolate pathway genes from other Brassicaceae plants have been identified and can be obtained from databases such as GenBank.

Neither the genome of *Eruca sativa* nor the sequences of genes participating in glucosinolate biosynthesis are known. The aim of this study is to make a start in understanding the biosynthetic process of glucosinolates in *Eruca sativa*. Sequences

related with biosynthetic genes and transcriptional factors were isolated. The influence of N and S fertilization in the biosynthetic genes expression was also examined.

CDSs of glucosinolate biosynthesis and regulatory genes obtained from NCBI database were used to design specific and degenerated primers in order to amplify one part of the sequence of each gene we were interesting in. Primers were designed based on conserved areas of genes of other Brassicaceae plants such as *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa*. A total of 15 genes were isolated, containing a full-length (12 of them) or a partial (3 of them) coding sequence. All genes are highly related with glucosinolate biosynthetic and regulator genes of *Arabidopsis thaliana* and they share a similarity ranging from 82 – 90 %. When they are compared to orthologs of other Brassica species such as *Brassica rapa* similarity is higher and ranges from 85 to 95 %. Three of the full-length genes were cloned in expression vectors in order to isolate the corresponding protein.

It was also interesting to find whether the expression levels of each gene are decreased or increased when plants grow in different nitrogen and sulfur nutrition conditions. Two experimental approaches were designed. Plants of the first experimental approach were separated into 4 groups-treatments, grown in a different nutrient solution each. The first group consisted of plants grown in full strength Hoagland nutrient solution, whereas plants of the other groups were watered with modified Hoagland nutrient solutions; low nitrogen for the second, low nitrogen and sulfur for the third and low sulfur for the fourth group. In the second approach, the condition of a short-term sulfur starvation was investigated. Tissues from leaves and roots were harvested for total RNA extraction and cDNA synthesis. Relative expression of genes was studied by real-time PCR. The applied nutritional conditions affected the expression of the biosynthetic genes in both experimental approaches. It is also known that the concentration of the glucosinolates is affected by such conditions as well. Transcriptional and metabolic profiles from each treatment were statistically analyzed in order to find if they are correlated and in most cases there was a correlation between them.

Extracts from the tissues of the plants growing in different nutrition conditions were tested towards the growth of HeLa, MCF7 and HepG2 cancer cell lines, in order to study their biological activity. Differentiation in their biological activity was noted, depending on the fertilization levels.