

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Zakład Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin



Rozprawa doktorska

Paweł Czerniawski

**Unikalne zmiany w biosyntezie glukozyolanów wśród
gatunków plemienia Camelinae rodziny Brassicaceae**

Promotor:
prof. dr hab. Paweł Bednarek

Promotor pomocniczy:
dr Anna Piasecka

Poznań 2021

Pragnę najmocniej podziękować mojemu promotorowi **prof. dr hab. Pawłowi Bednarkowi** za ogromne wsparcie merytoryczne, cenne wskazówki oraz okazaną wyrozumiałość, bez których niniejsza praca nigdy by nie powstała.

Szczególne podziękowania kieruję również do promotora pomocniczego **dr Anny Piaseckiej** za przekazaną wiedzę, poświęcony czas i nieocenioną pomoc w analizach metabolomicznych.

Dziękuję wszystkim byłym i obecnym członkom **Zakładu Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin**, dzięki którym codzienna praca w laboratorium była przyjemnością i bezcennym doświadczeniem.

Pragnę podziękować także koleżankom i kolegom z **Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin**, których cenne rady i sugestie uratowały niejedną eksperyment.

Serdeczne dziękuję również **Najbliższym i Przyjaciółom**, którzy każdego dnia mnie wspierali i motywowali do działania, nawet gdy brakowało mi już sił.

Badania prowadzone w przedłożonej rozprawie doktorskiej finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego OPUS pt. „Molekularne mechanizmy utraty szlaku metabolicznego na przykładzie gatunków blisko spokrewnionych z rośliną modelową *Capsella rubella*” (UMO-2015/17/B/NZ1/00871).

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	7
1. Wstęp.....	10
1.1. Roślinne metabolity wtórne	10
1.1.1. Znaczenie biologiczne metabolitów wtórnych.....	10
1.1.2. Klasyfikacja roślinnych metabolitów wtórnych.....	11
1.2. Charakterystyka roślin z rodziny Brassicaceae.....	12
1.2.1. Gatunki plemienia Camelinae jako rośliny modelowe	14
1.3. Glukozynolany jako charakterystyczne metabolity wtórne rzędu Brassicales ...	15
1.4. Metody analizy ilościowej i identyfikacja glukozynolanów.....	18
1.5. Biosynteza glukozynolanów	21
1.5.1. Modyfikacja prekursorów	21
1.5.2. Zasadniczy szlak biosyntezy	23
1.5.3. Modyfikacja łańcuchów bocznych.....	25
1.5.4. Regulacja biosyntezy glukozynolanów.....	26
1.6. Hydroliza glukozynolanów i jej produkty	27
1.6.1. Aktywność biologiczna produktów rozpadu glukozynolanów	29
1.6.2. Wpływ modyfikacji łańcucha bocznego na funkcje produktów rozpadu glukozynolanów	30
1.7. Molekularne podstawy zakonserwowania glukozynolanów w gatunkach Brassicaceae	31
1.7.1. Obecność glukozynolanów w gatunkach Brassicaceae	32
1.7.2. Wpływ mutacji w genach związanych z biosyntezą glukozynolanów na wzrost roślin	34
1.7.3. Defekty w biosyntezie IG i nadprodukcja auksyn	35
2. Cel pracy	37
3. Materiały i metody	38
3.1. Lista użytych odczynników	38
3.2. Materiał roślinny	40
3.3. Identyfikacja ortologów i analizy filogenetyczne	42

3.4. Izolacja całkowitego RNA i analiza ekspresji genów.....	44
3.5. Ekstrakcja metabolitów	48
3.6. Identyfikacja i analiza ilościowa glukozynolanów	48
3.7. Identyfikacji i analiza ilościowa IAOx oraz IAA i jego konjugatów	49
3.8. Izolacja genomowego DNA.....	50
3.9. Generowanie linii transgenicznych roślin.....	51
3.9.1. Metodyka przygotowania DNA	51
3.9.2. Tworzenie konstrukcji genetycznej pAMPAT+prom _{AtMYB34} +AtMYB34 przy użyciu metody USER.....	52
3.9.3. Tworzenie konstrukcji genetycznej pAMPAT+prom _{AtMYB34} +CrMYB34 przy użyciu enzymów restrykcyjnych.....	54
3.9.4. Transformacja bakterii <i>E. coli</i>	55
3.9.5. Transformacja bakterii <i>A. tumefaciens</i>	55
3.9.6. Transformacja kwiatostanów	56
3.9.7. Selekcja roślin transgenicznych	56
4. Wyniki.....	58
4.1. Identyfikacja glukozynolanów za pomocą metody LC-MS/MS.....	58
4.2. Zmiany zdolności do produkcji glukozynolanów w plemienu Camelinae	60
4.2.1. Całkowita akumulacja AG i IG.....	60
4.2.2. Ekspresja genów biorących udział w biosyntezie glukozynolanów	63
4.3. Różnorodność strukturalna glukozynolanów zidentyfikowanych w badanych gatunkach i jej molekularne podstawy	65
4.3.1. Akumulacja długołańcuchowych AG	67
4.3.2. Ewolucja genów <i>MAM</i>	69
4.3.3. Zróżnicowanie strukturalne IG	74
4.3.4. Ewolucja genów <i>CYP81F</i>	75
4.3.5. Ewolucja genów <i>IGMT</i>	82
4.4. Regulacja szlaku biosyntezy glukozynolanów w badanych gatunkach.....	84
4.4.1. Zakonserwowanie czynników transkrypcyjnych MYB	84
4.4.2. Ekspresja zidentyfikowanych ortologów genów <i>MYB</i>	94
4.4.3. Utrata funkcji CrMYB34 w biosyntezie IG.....	96

4.4.4. Brak funkcjonalnego MYB34 jako przyczyna ograniczonej zdolności do biosyntezy IG	98
4.4.5. MYB34 jako główny regulator sprzężenia zwrotnego w biosyntezie IG.....	102
5. Dyskusja.....	107
5.1. Unikalny organospecyficzny wzór akumulacji glukozyolanów w gatunkach plemienia Camelinae	107
5.2. Hipoteza optymalnej obrony a zdolność do biosyntezy glukozyolanów w liściach.....	109
5.3. Molekularne przyczyny obniżonej produkcji IG	110
5.4. Molekularne przyczyny braku glukozyolanów w liściach.....	113
5.5. Zróżnicowanie długości łańcuchów bocznych AG.....	114
5.6. Wpływ długości łańcuchów AG na funkcje tych związków	116
5.7. Wsteczna ewolucja modyfikacji IG	117
5.8. Wsteczna ewolucja biosyntezy IG w kontekście adaptacji roślin do środowiska	119
5.9. Podsumowanie	121
6. Wnioski	122
Streszczenie.....	124
Abstract.....	126
Bibliografia	128
Materialy uzupełniające	142

Wykaz stosowanych skrótów

- 10-MeSO – 10-(metylosulfinylo)decyloglukozynolan
- 11-MeSO – 11-(metylosulfinylo)undecyloglukozynolan
- 1MI3G – indolilo-3-metyloglukozynolan
- 4MI3G – 4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan
- 4OHI3G – 4-hydroksy-indolilo-3-metyloglukozynolan
- 9-MeSO – 9-(metylosulfinylo)nonyloglukozynolan
- AG – glukozynolany alifatyczne (ang. *aliphatic glucosinolates*)
- amu – jednostka masy atomowej (ang. *atomic mass unit*)
- ANOVA – analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)
- AOP – dioksygenazy zależne od 2-okso-glutaranu (ang. *2-oxo-glutarate-dependent dioxygenases*)
- BG – glukozynolany aromatyczne (ang. *benzyl glucosinolates*)
- BGLU – β -glukozydazy (ang. *β -glucosidases*)
- bHLH – czynniki transkrypcyjne zawierające domenę helisa-pętla-helisa (ang. *helix-loop-helix*)
- BLAST – narzędzie bioinformatyczne umożliwiające porównywanie sekwencji genów (ang. *basic local alignment search tool*)
- cDNA – komplementarne DNA (ang. *complementary DNA*)
- CID – kolizyjnie indukowana dysocjacja (ang. *collision induced dissociation*)
- COSY – spektroskopia korelacyjna (ang. *correlation spectroscopy*)
- CRISPR – zgrupowane, regularnie rozmieszczone krótkie powtórzenia palindromiczne (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)
- CYP – cytochrom P450 (ang. *cytochrome P450*)
- DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
- dU – deoksyurydyna (ang. *deoxyuridine*)
- ESI – jonizacja przez elektrorozpylanie (ang. *electrospray ionisation*)

ESP – białka epitiospecyficzne (ang. *epithiospecifer proteins*)

FMO – monooksygenazy zawierające flawinę (ang. *flavin-containing monooxygenases*)

GC – chromatografia gazowa (ang. *gas chromatography*)

GGP – peptydazy γ -glutamylowe (ang. *γ -glutamyl peptidases*)

GST – S-transferazy glutationowe (ang. *glutathione S-transferases*)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*)

I3A – indolilo-3-metyloamina

I3G – indolilo-3-metyloglukozynolan

IAA – kwas indolilo-3-octowy

IAAla – indolilo-3-acetylo-L-alanina

IAAsp – kwas indolilo-3-acetylo-L-asparaginowy

IAGlc – indolilo-3-acetylo-D-glukoza

IAGlu – kwas indolilo-3-acetylo-L-glutaminowy

IAGly – indolilo-3-acetylo-L-glicyna

IAOx – indolilo-3-acetaldotsym

IASer – indolilo-3-acetylo-L-seryna

IAVal – indolilo-3-acetylo-L-walina

IG – glukozynolany indolowe (ang. *indolic glucosinolates*)

IGMT – O-metylotransferazy glukozynolanów indolowych (ang. *indolic glucosinolates O-methyltransferases*)

IPMS – syntazy izopropyljabłczanowe (ang. *isopropylmalate synthases*)

LB – bulion lizogenny (ang. *lysogeny broth*)

LC – chromatografia cieczowa (ang. *liquid chromatography*)

MAM – syntazy metyltioalkiljabłczanowe (ang. *methylthioalkylmalate synthases*)

MIM – motyw interakcji z MYC (ang. *MYC-interaction motif*)

MS – spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*)

MUSCLE – algorytm wyrównujący sekwencje (ang. *multiple sequence comparison by log-expectation*)

MYB – rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. *myeloblastosis*)

MYC – rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. *myelocytomatosis*)

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*)

NOESY – homojądrowa spektroskopia wykorzystująca jądrowy efekt Overhausera (ang. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*)

OMT – *O*-metylotransferazy (ang. *O-methyltransferases*)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PEN2 – myrozynaza hydrolizująca glukozynolany indolowe (ang. *penetration2*)

ppm – liczba części na milion (ang. *parts per milion*)

RA – kwas rafanusamowy (ang. *raphanusamic acid*)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

rpm – ilość obrotów na minutę (ang. *revolutions per minute*)

RT-qPCR – ilościowa reakcja PCR z odwrotną transkrypcją (ang. *quantitative reverse transcription PCR*)

SDS – dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

SOT – sulfotransferazy (ang. *sulfotransferases*)

SUR1 – liaza typu C-S (ang. *superroot1*)

T-DNA – transformujący DNA (ang. *transforming DNA*)

TGG – glukohydrolazy β -tioglukozydowe (ang. *β -thioglucoside glucohydrolases*)

Tris – tris(hydroksymetylo)aminometan (ang. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*)

UGT – UDP-glukozylotransferazy (ang. *UDP-glucosyltransferases*)

UPLC – ultrasprawa chromatografia cieczowa (ang. *ultra-performance liquid chromatography*)

USER – mieszanina enzymów (ang. *uracil-specific excision reagent*)

UV – promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet*)

YEB – pożywka do hodowli bakterii (ang. *yeast extract beef*)

1. Wstęp

1.1. Roślinne metabolity wtórne

Metabolity wtórne, zwane również metabolitami wyspecjalizowanymi lub produktami naturalnymi, stanowią klasę niskocząsteczkowych związków chemicznych pochodzenia naturalnego. W odróżnieniu od metabolitów pierwotnych (jak np. tłuszcze, cukry czy aminokwasy), nie są one niezbędne do prawidłowego przebiegu podstawowych procesów życiowych czy wzrostu roślin. Jednak dokładne granice pomiędzy metabolitami pierwotnymi i wtórnymi nie są jednoznaczne, a podział ten przyjmuje się jako umowny. Najnowsze badania genetyczne i biochemiczne wykazują, że u roślin metabolity wtórne mogą funkcjonować jako regulatory ważnych procesów fizjologicznych, a także jako prekursorzy metabolitów pierwotnych [1].

Do tej pory udało się zidentyfikować ponad 200 tys. roślinnych metabolitów wtórnych, które głównie pochodzą od metabolitów pierwotnych lub produktów pośrednich ich biosyntezy [2]. Przykładowo, prekursor biosyntezy terpenów i terpenoidów stanowi pirofosforan izopentyli, zaś związki fenolowe i alkaloidy są częstymi produktami metabolizmu aminokwasów aromatycznych [3, 4]. Co istotne, w różnych rodzinach roślin ten sam prekursor może być metabolizowany poprzez zupełnie różne szlaki, jak również dany metabolit wtórny może być produktem końcowym różnych szlaków biosyntetycznych, co pokazuje ogromną różnorodność biosyntetyczną roślinnych metabolitów wtórnych [5].

1.1.1. Znaczenie biologiczne metabolitów wtórnych

Roślinne metabolity wtórne są produktami naturalnymi, które pozwalają roślinom oddziaływać ze środowiskiem zewnętrznym, regulować procesy wewnętrzne oraz reagować na stresy zarówno abiotyczne, jak i biotyczne [6, 7]. Wśród stresów abiotycznych, na które rośliny odpowiadają przy użyciu metabolizmu wtórnego, zaliczyć możemy m.in. podwyższoną zawartość jonów metali ciężkich lub soli, niedobór wody, nadmierną ekspozycję na promieniowanie UV, wysokie temperatury czy niedobór składników pokarmowych w glebie [8]. W odpowiedzi na te czynniki, rośliny wytwarzają metabolity wtórne odgrywające rolę związków chelatujących jony metali, przeciwutleniaczy lub neutralizatorów wolnych rodników. Inne metabolity wtórne mogą

modulować aktywność enzymatyczną lub absorbować nadmiar promieniowania UV [9]. W przypadku stresów biotycznych, metabolity wtórne pełnią funkcje sygnałowe i obronne w oddziaływaniach między rośliną i mikroorganizmem, a także stanowią mogą naturalne związki przyciągające insekty (np. w celu zapylenia) lub odstraszać je (np. w przypadku ataku owadów żerujących na roślinach) [10, 11]. Dodatkowo, stanowią mogą barierę obronną wobec patogenów, oddziałując ze ścianą komórkową i hamując dalszą penetrację tkanek przez patogen w przypadku naruszenia ich integralności [12, 13]. Niektóre z nich mogą również być aktywne jako związki antybiotyczne, hamujące rozwój patogennych grzybów lub bakterii [14, 15].

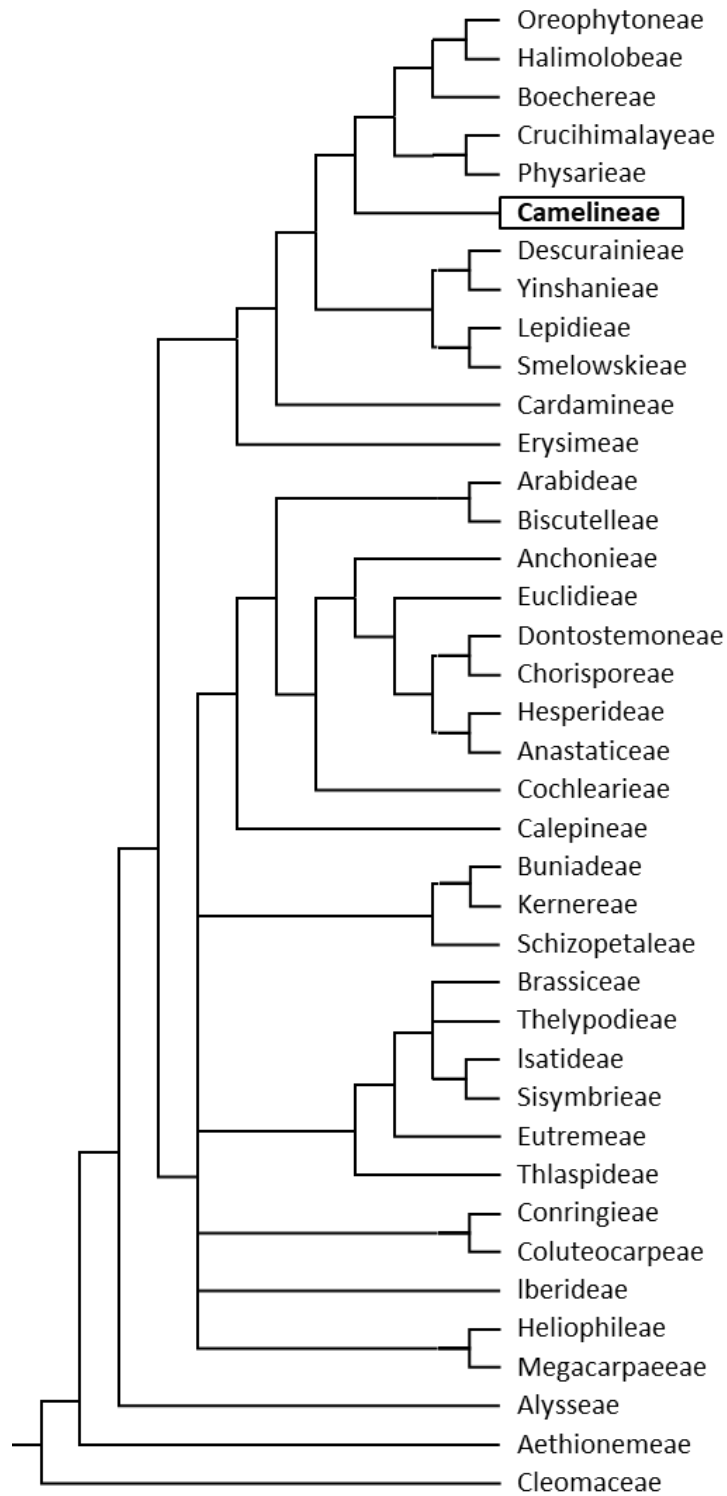
1.1.2. Klasyfikacja roślinnych metabolitów wtórnych

Pod względem strukturalnym roślinne metabolity wtórne stanowią niezwykle zróżnicowaną grupę związków chemicznych. Wśród głównych klas metabolitów wtórnych wyróżnić możemy: fenylopropanoidy (stanowiące pochodne fenyloalaniny i tyrozyny, m.in. flawonoidy, izoflawonoidy, stilbeny, lignany), terpeny i terpenoidy wraz z ich pochodnymi (np. zawierające reszty cukrowe saponiny), alkaloidy, glikozydy cyjanogenne, glikozydy benzoksazynonów, glukozynolany i wiele innych [16]. Część ze wspomnianych klas metabolitów wtórnych obecna jest w większości znanych grup filogenetycznych roślin. Należą do nich np. fenylopropanoidy obecne w całym królestwie roślin czy terpenoidy występujące we wszystkich organizmach żywych [17, 18]. Inne grupy metabolitów można co prawda uznać za rozpowszechnione w królestwie roślin, w przeciwieństwie jednak do fenylopropanoidów, nie są one obecne we wszystkich gatunkach roślin. Przykład takich metabolitów stanowią mogą glikozydy cyjanogenne obecne między innymi u przedstawicieli rodzin Fabaceae (motylkowate), Rosaceae (rózowate), Linaceae (lnowate) czy Compositae (astrowate) [19]. Z drugiej jednak strony, niektóre z klas metabolitów wtórnych są specyficzne jedynie dla wybranych grup filogenetycznych, w których wyewoluowały. Przykładem takiej grupy metabolitów są glukozynolany charakterystyczne dla gatunków rzędu Brassicales (kapustowce) [20, 21]. Ze względu na swoje interesujące właściwości biologiczne oraz obecność tych metabolitów w rodzinie Brassicaceae (kapustowate), która zawiera szereg gatunków o znaczeniu ekonomicznym oraz gatunków modelowych, glukozynolany stały się obecnie jedną z najlepiej poznanych grup metabolitów wtórnych.

1.2. Charakterystyka roślin z rodziny Brassicaceae

Rodzina roślin Brassicaceae, zwana również Cruciferae (krzyżowe), obejmuje wiele ważnych gospodarczo gatunków, uprawianych na całym świecie. Od wieków są szeroko stosowane w ludzkiej diecie w postaci warzyw oraz jako źródło olejów spożywczych i przypraw. Rodzina ta zawiera w przybliżeniu ponad 330 rodzajów i z liczbą ponad 4 tys. gatunków występujących naturalnie na wszystkich kontynentach (Ryc. 1), z wyjątkiem Antarktydy, należy do jednej z najliczniejszych rodzin roślin [22, 23]. Do wykorzystywanych rolniczo przedstawicieli rodziny Brassicaceae należą rośliny oleiste, m.in. rzepak i lnicznik siewny (źródło oleju rydzowego), liczne warzywa, jak kapusta, brokuł, kalafior, rzodkiew, kalarepa, brukselka czy jarmuż, oraz przyprawy, np. gorczyca i chrzan [24, 25]. Różne gatunki Brassicaceae, oprócz ich zastosowania kulinarnego, już od starożytności stosowane były w tradycyjnej medycynie. W ostatnich latach liczne badania wykazały, że dieta bogata w warzywa kapustowate wiąże się obniżonym ryzykiem zachorowania na kilka typów nowotworów, co wynika głównie z wysokiej zawartości związków zawierających siarkę, m.in. glukozynolanów i ich produktów hydrolizy [26]. Poza glukozynolanami, rośliny kapustowate zawierają także inne związki prozdrowotne, takie jak polifenole czy triterpeny [27]. Wszystkie te związki wykazują również potencjalnie działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne.

Systematyka, taksonomia i historia ewolucji rodziny Brassicaceae od lat budzą kontrowersje. Granice między gatunkami były często niewyraźnie wydzielone, a próby grupowania różnych gatunków w rzędy i łączenia rodzajów w tzw. plemiona, skutkowały różnymi niespójnymi koncepcjami. Wysoka liczebność gatunków Brassicaceae oraz trudności w systematycznym ich uszeregowaniu, spowodowały brak jednoznacznie ustalonej liczby i granic filogenetycznie zdefiniowanych plemion i rodzajów oraz doprowadziły do kilku sprzecznych systemów klasyfikacji, które zostały zaproponowane w przeszłości [28]. W konsekwencji, do dnia dzisiejszego brakuje wyczerpujących i jednoznacznych informacji na temat rozmieszczenia gatunków i rodzajów rodziny Brassicaceae. Z powodu dużego rozpowszechnienia, znaczenia ekonomicznego, łatwości w uprawie oraz wysokiej bioróżnorodności, rodzina Brassicaceae stała się częstym obiektem badań w wielu dziedzinach nauk o roślinach, m.in. w porównawczych badaniach ewolucyjnych, metabolomice czy odporności roślin [29, 30].



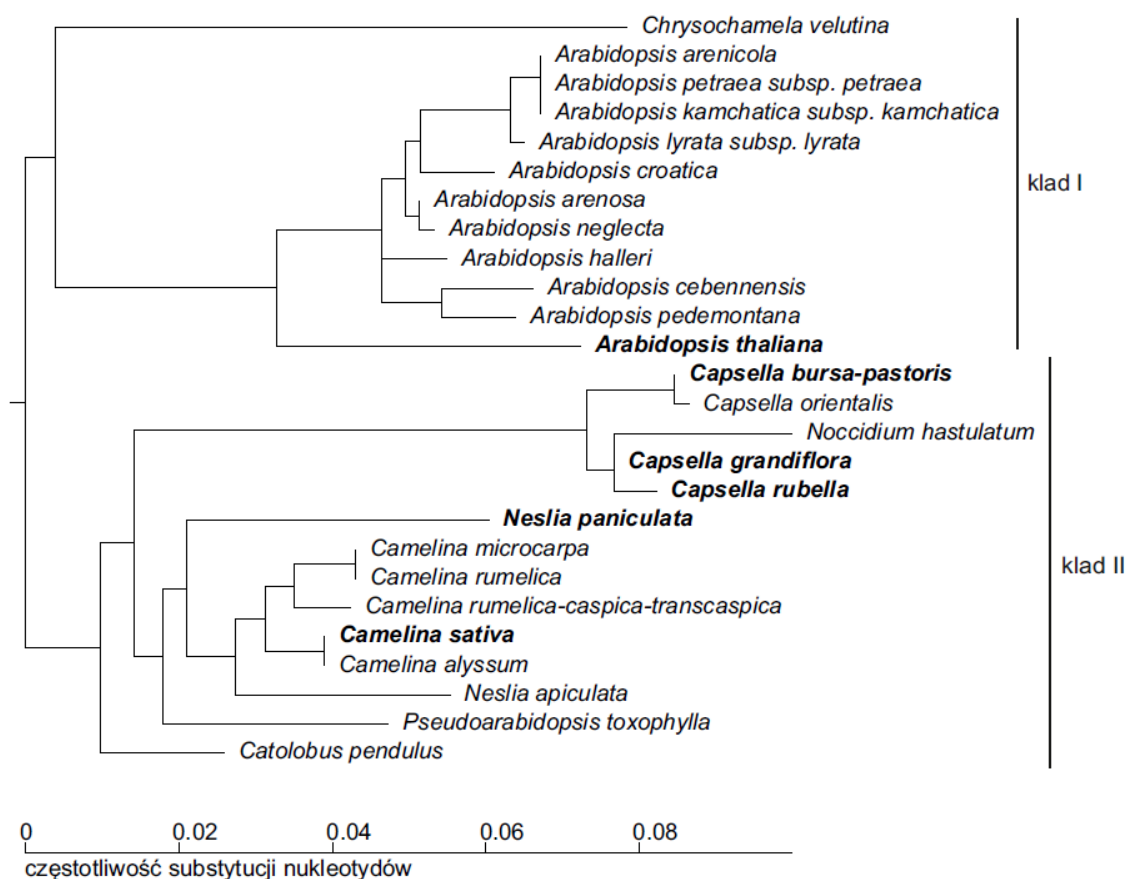
Ryc. 1. Jedna z zaproponowanych do tej pory korelacji filogenetycznych pomiędzy plemionami rodziny Brassicaceae [31]. Czcionką pogrubioną w ramce zaznaczono plemię Camelineae, będące przedmiotem naszych badań. Rodzina Cleomaceae stanowi grupę zewnętrzną.

1.2.1. Gatunki plemienia *Camelineae* jako rośliny modelowe

Wśród wszystkich rodzin królestwa roślin, rodzina Brassicaceae posiada najwięcej gatunków o zsekwencjonowanych do tej pory genomach. Najwięcej z tych gatunków należy z kolei do plemienia *Camelineae* (Ryc. 2). Najbardziej znanym gatunkiem modelowym nie tylko w obrębie tego plemienia, ale również w całym królestwie roślin, jest *Arabidopsis thaliana*, zwana zwyczajowo rzodkiewnikiem pospolitym. Jest to niewielka roślina o drobnych białych kwiatach, uważana często za chwast, występująca naturalnie w całej Europie, Azji i Afryce. Do największych zalet *A. thaliana* jako rośliny modelowej należą: krótki cykl życiowy (~8 tygodni), niskie wymagania dotyczące warunków temperaturowych i oświetleniowych, łatwość uprawy w warunkach laboratoryjnych, mały rozmiar. Jej niewielki (~115 Mb), diploidalny genom, zawierający ponad 25 tys. genów, ulokowanych na pięciu chromosomach, został całkowicie zsekwencjonowany w roku 2000 [32]. *A. thaliana* rozmnaża się poprzez samozapylenie, chociaż w warunkach laboratoryjnych można również łatwo przeprowadzić zapylenie krzyżowe [33]. Roślinę tę można efektywnie transformować przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens*, dzięki czemu do tej pory wygenerowano pokaźną kolekcję linii insercyjnych T-DNA [34]. Od wielu lat *A. thaliana* jest szeroko stosowaną rośliną modelową w badaniach molekularnych i ewolucyjnych, dostarczając wiedzę na temat rozwoju, fizjologii czy licznych „-omik”, w tym metabolomiki roślin.

Wśród przedstawicieli rodzaju *Capsella* (tasznik), należącego do innego niż rodzaj *Arabidopsis* kładu plemienia *Camelineae* (Ryc. 2; kład II), do roślin modelowych zaliczyć można *Capsella rubella* i *Capsella grandiflora*, których diploidalne genomy zostały zsekwencjonowane w 2013 roku [35]. *C. rubella* stosunkowo niedawno (~200 tys. lat temu) przeszła ewolucję z zapylenia krzyżowego na samopylność. Porównanie jej genomu z blisko spokrewnionymi gatunkami, które nadal wykazują krzyżowy sposób zapylenia, jak np. *C. grandiflora*, pozwala zbadać molekularne i genetyczne mechanizmy odpowiadające za samopylność roślin [35]. Wśród roślin blisko spokrewnionych z gatunkami rodzaju *Capsella*, zsekwencjonowany został również diploidalny genom *Neslia paniculata* (ozędka groniasta) oraz heksaploidalny genom *Camelina sativa* (lnicznik siewny) [35, 36]. Ten ostatni gatunek był uprawiany w Europie jako roślina oleista (źródło oleju rydzowego) już ponad 3000 lat temu, jednak z początkiem XX wieku został wyparty przez bardziej wydajny rzepak. Pomimo tego, za sprawą wysokiej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz antyoksydantów

w nasionach *Cam. sativa*, gatunek ten jest ponownie coraz częściej wykorzystywany jako doskonałe źródło oleju spożywczego, składnik zdrowej żywności i suplementów diety czy też jako komponent pasz dla zwierząt. Olej pochodzący z lnicznika siewnego może też służyć jako materiał do produkcji chemikaliów czy biopaliw przyjaznych środowisku [36-38].



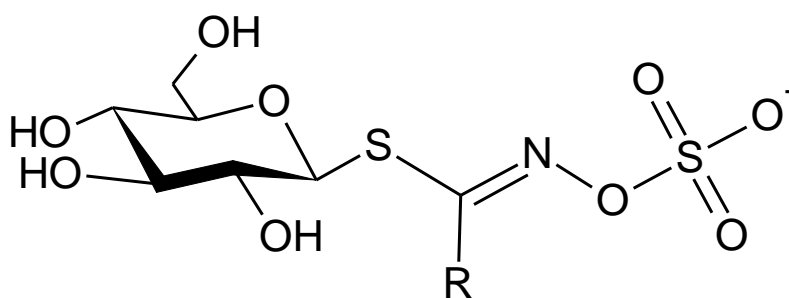
Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne plemienia Camelinae. Czcionką pogrubioną zaznaczono gatunki będące obiektem badań w niniejszej pracy [39].

1.3. Glukozytolany jako charakterystyczne metabolity wtórne rzędu Brassicales

Jak wspomniano powyżej, glukozytolany są charakterystycznymi metabolitami wtórnymi produkowanymi przez gatunki kapustowate. Występują one niemal wyłącznie w roślinach rzędu Brassicales, który obejmuje około 15 rodzin, w tym oprócz Brassicaceae zalicza się do tego rzędu między innymi Capparaceae (kapparowate) i Caricaceae (melonowcowate) [40]. Co ciekawe, glukozytolany zostały wykryte także

w gatunkach z rodziny Euphorbiaceae (wilczomleczowate), całkowicie niezwiązanej z innymi rodzinami zawierającymi glukozynolany [21]. Metabolity te odpowiadają za charakterystyczny, ostry i piekący smak wyczuwalny w warzywach kapustowatych, m.in. kapuście głowiastej (*Brassica oleracea* var. *capitata*), brokule (*Brassica oleracea* var. *italica*), kalafiorze (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), rzodkiewce (*Raphanus sativus* var. *sativus*), a także roślinach stosowanych jako przyprawy, takich jak chrzan (*Armoracia rusticana*) czy gorczyca biała (*Sinapis alba*) [41]. W ciągu ostatnich lat zainteresowanie glukozynolanami wyraźnie wzrosło po odkryciu ich potencjału jako środków ochrony roślin i grzybobójczych [42, 43]. Jak wspomniano powyżej, odkryto również ich aktywność jako substancje potencjalnie ograniczające ryzyko zachorowań na niektóre formy nowotworów, przez co dieta o wysokiej zawartości warzyw kapustowatych jest zalecana w żywieniu człowieka [44]. Dodatkowo, dzięki obecności glukozynolanów w *A. thaliana*, jednej z najlepiej zbadanych roślin modelowych, stały się one przedmiotem intensywnych badań, a ich szlak biosyntezy i metabolizmu wtórnego został obszernie opisany [45].

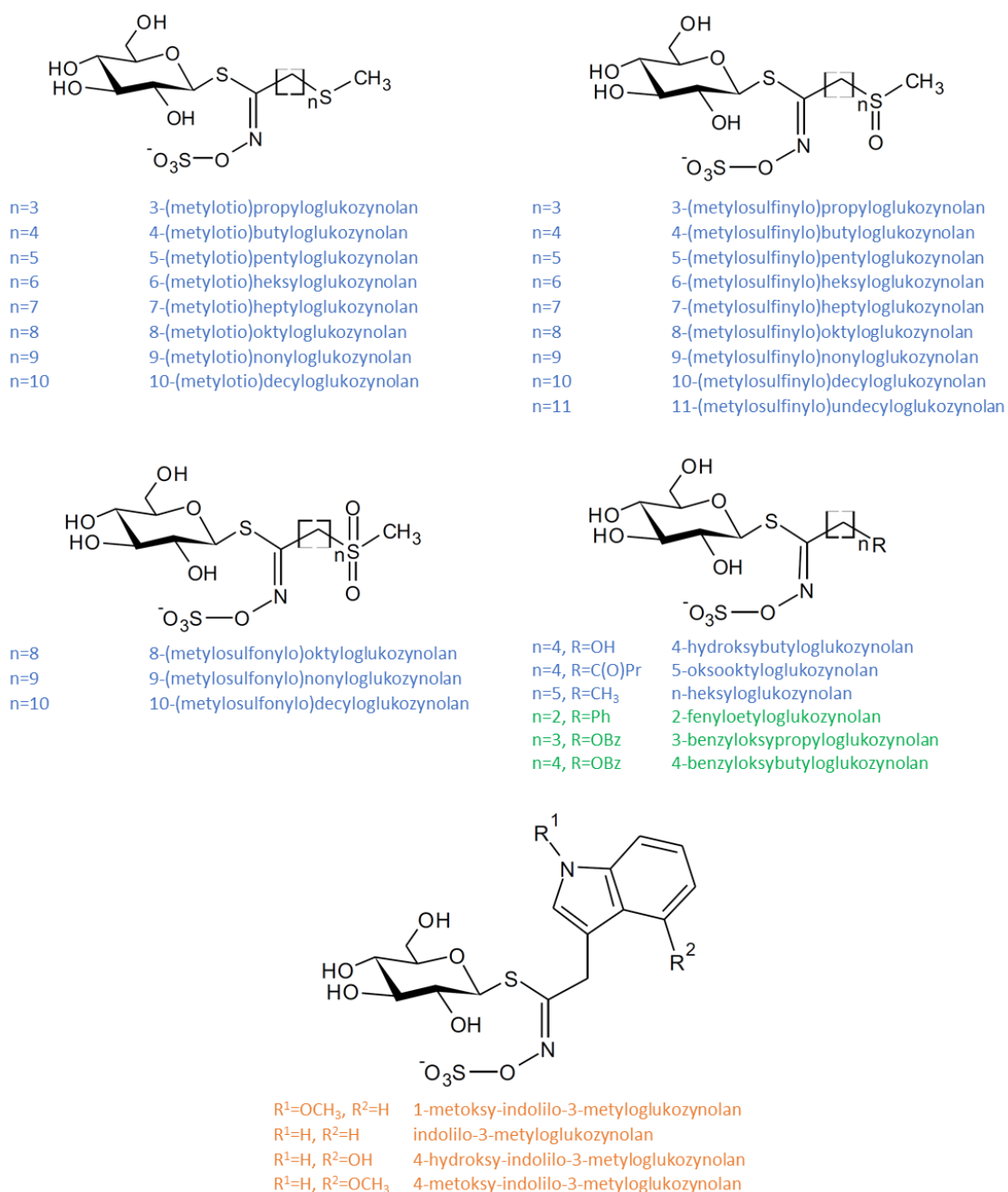
Glukozynolany są β -D-tioglukozydami, a ich cząsteczki składają się z glukozy przyłączonej wiązaniem tioglikozydowym do sulfonowanego aldoksydu oraz z łańcucha bocznego, którego prekursor stanowi aminokwas (Ryc. 3). Właściwości glukozynolanów determinowane są przede wszystkim przez specyficzny układ heteroatomów połączonych z grupą sulfonową, w mniejszym zaś stopniu przez ich łańcuch boczny [20, 21].



Ryc. 3. Ogólny wzór strukturalny cząsteczki glukozynolanu. R – łańcuch boczny

Ze względu na aminokwas będący prekursorem łańcucha bocznego w szlaku biosyntezy, wyróżnić możemy trzy podstawowe klasy glukozynolanów (Ryc. 4). Pierwszą klasę, najbardziej zróżnicowaną, a jednocześnie najliczniej reprezentowaną w większości gatunków Brassicaceae, stanowią glukozynolany alifatyczne (AG), będące pochodnymi głównie metioniny, nieco rzadziej leucyny, izoleucyny, waliny lub alaniny.

Wśród AG można wyróżnić serie struktur o wzrastającej długości łańcucha bocznego. Dodatkowo mogą one zawierać atomy siarki, w postaci utlenionej lub nie, grupy hydroksylowe i wiązania podwójne (Ryc. 4). Kolejną grupę tworzą glukozynolany indolowe (IG), których prekursorem jest tryptofan, zaś trzecia grupa tworzona jest przez glukozynolany aromatyczne, zwane też benzyłowymi (BG), a ich biosynteza związana jest z metabolizmem fenyloalaniny i tyrozyny (Ryc. 4). Skład i zawartość danego typu



Ryc. 4. Przykładowe struktury wybranych glukozynolanów reprezentujących ich różne klasy. Kolorem **niebieskim** zaznaczono glukozynolany alifatyczne, **zielonym** aromatyczne (benzyłowe), a **pomarańczowym** indolowe.

glukozynolanów w tkance roślinnej zależą przede wszystkim od genotypu, ale także od klimatu i warunków uprawy, w tym nawożenia, czasu zbioru czy ekspozycji świetlnej roślin. Poziom akumulacji i obecność poszczególnych glukozynolanów różnią się wyraźnie nie tylko pomiędzy gatunkami czy nawet liniami roślin, ale także pomiędzy poszczególnymi organami tego samego gatunku [46].

1.4. Metody analizy ilościowej i identyfikacji glukozynolanów

Historia rozwoju jakościowych i ilościowych metod analitycznych, skupiających się na glukozynolanach, sięga lat 50-tych ubiegłego wieku, jednak skuteczny rozdział chromatograficzny i identyfikacja glukozynolanów stanowiła wyzwanie dla ówczesnej nauki. Podczas ekstrakcji z materiału roślinnego, dochodzi do kontaktu glukozynolanów z hydrolizującymi je myrozynazami, w związku z czym, metabolity te ulegają degradacji. Biorąc to pod uwagę, początkowo w wielu przypadkach struktury tych metabolitów dedukowano jedynie w oparciu o ich produkty rozpadu [47, 48]. Najczęściej badanymi produktami hydrolizy glukozynolanów były izotiocyjaniany, jednak ich obecność mogła wynikać również z rozpadu innych metabolitów i nie zawsze korespondowała bezpośrednio z obecnością glukozynolanów. Przełom w dziedzinie identyfikacji produktów hydrolizy glukozynolanów nastąpił wraz z rozwojem techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (ang. gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS). Metoda ta umożliwiła identyfikację kilkudziesięciu izotiocyjanianów, jednak przemiany chemiczne podczas GC i często błędna identyfikacja w ówczesnych niskorozdzielczych spektrometrach mas sprawiają, że wyniki te bywają dzisiaj kwestionowane i wymagają ponownej weryfikacji z udziałem współczesnych metod [49-51].

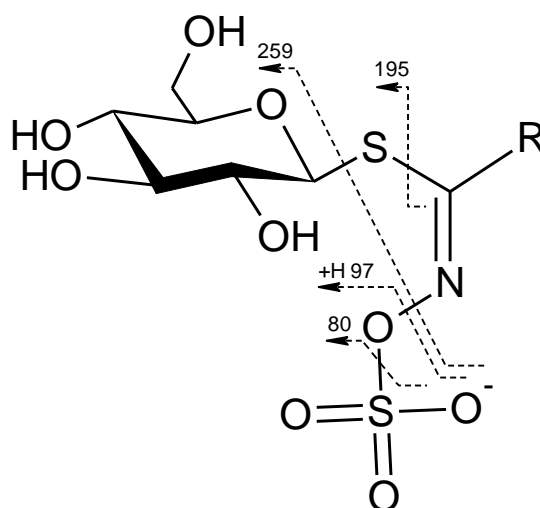
Postępem w dziedzinie pośredniej identyfikacji glukozynolanów było zastosowanie na szeroką skalę enzymatycznej desulfatacji prowadzącej do powstawania desulfoglukozynolanów. W skrócie metoda ta polega na ekstrakcji glukozynolanów w rozpuszczalnikach dezaktywujących myrozynazy, najczęściej z liofilizowanej tkanki roślinnej, przepuszczeniu ekstraktu przez złożo anionowymienne w celu związania wszystkich anionów, a następnie dodaniu enzymu (sulfatazy) katalizującego hydrolizę wiązań estrowych w cząsteczkach glukozynolanów prowadząc ostatecznie do wymywania nienaładowanych desulfoglukozynolanów ze złoża. Technika ta umożliwiła

identyfikację wielu wcześniej nieznanymi struktur tych metabolitów oraz ich analizę ilościową [52-54].

Rozwijająca się w kolejnych latach technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. high-performance liquid chromatography, HPLC) początkowo wciąż nie umożliwiała rozdziału i bezpośredniej identyfikacji glikozynolanów, ale z powodu braku wymogu wprowadzenia analizowanych cząsteczek w stan gazowy, powoli wypierała GC w przypadku analiz desulfoglikozynolanów. Rozdział chromatograficzny całych cząsteczek glikozynolanów stał się możliwy dopiero w momencie pojawienia się techniki HPLC par jonowych [55, 56]. Wraz z odkryciem, że lekko zakwaszone eluenty umożliwiają łatwy rozdział glikozynolanów bez ich degradacji na kolumnach z odwróconą fazą, metoda HPLC znalazła powszechne zastosowanie w analizie tych metabolitów i do dnia dzisiejszego stanowi podstawową jej technikę [57]. Detekcję glikozynolanów przeprowadzano najczęściej sprzęgając HPLC ze spektrometrem mas, jednak stosunkowo niska rozdzielczość i czułość aparatów dostępnych na przełomie lat 80-tych i 90-tych XX wieku dyktowały liczne ograniczenia w detekcji glikozynolanów.

Wraz z poprawą parametrów spektrometrów mas rosło znaczenie metody HPLC-MS. Na początku XXI wieku technika HPLC-MS była już rutynowo stosowaną metodą wykrywania i identyfikacji glikozynolanów w ekstraktach roślinnych [58, 59]. Zastosowanie spektrometrii mas umożliwia zbadanie struktury różnorodnych związków chemicznych, w tym również glikozynolanów. Metoda ta wymaga jonizacji badanych cząsteczek oraz przeprowadzenie ich w stan gazowy. Obecnie najczęściej stosowaną metodą jonizacji w spektrometrach mas połączonych z instrumentami HPLC jest elektrorozpylanie (ang. electrospray ionisation, ESI). Ponieważ możliwość badania struktury analizowanych związków jest jednym z najważniejszych celów stosowania analiz HPLC-MS, w spektrometrach mas stosuje się dodatkowe mechanizmy umożliwiające uzyskiwanie fragmentów badanych cząsteczek, a analizy te określa się jako HPLC-MS/MS. Proces ten zachodzi na drodze tak zwanej kolizyjnie indukowanej dysocjacji (ang. collision induced dissociation, CID) polegającej na wzbudzeniu jonów i doprowadzania do ich zderzeń z atomami gazu szlachetnego, np. helu lub argonu. Współczesne tandemowe spektrometry mas umożliwiają pomiar stosunku masy powstającego jonu do jego ładunku (m/z) zarówno dla protonowanych i deprotonowanych cząsteczek, jak i ich fragmentów oraz uzyskiwanie informacji o strukturze związku na podstawie analizy mas utraconych nienaładowanych fragmentów [60]. W czasie fragmentacji ujemnie zjonizowanych cząsteczek glikozynolanów powstaje jon

wodorosiarczanowy $[\text{HSO}_4]^-$ o wartości stosunku masy do ładunku $m/z = 97$, stanowiący najbardziej charakterystyczny i diagnostyczny produkt jonowy we fragmentacji glukozynolanów (Ryc. 5). Dodatkowo produkt jonowy przy $m/z = 195$ odpowiada deprotonowanej cząsteczce tioglukozy $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{S}]^-$, zaś sygnał przy $m/z = 259$ koresponduje z deprotonowaną cząsteczką sulfonowanej glukozy, co również wskazuje na cząsteczkę glukozynolanu (Ryc. 5) [61, 62]. W niektórych widmach fragmentacyjnych glukozynolanów widoczny jest również jon przy $m/z = 80$ odpowiadający grupie siarczanowej $[\text{SO}_3]^-$. Często obserwowane jony $[\text{HO}_4\text{S}_2]^-$ przy $m/z = 129$ oraz $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_5\text{S}]^-$ przy $m/z = 139$ również stanowią sygnały charakterystyczne dla widm fragmentacyjnych glukozynolanów [63]. Rozwój analizatorów jonów, takich jak pułapka jonowa oraz kwadrupol, postępuje niezwykle szybko, co pozwala przewidywać struktury glukozynolanów z coraz większą pewnością, jednak identyfikacja poszczególnych izomerów przy zastosowaniu HPLC-MS wciąż sprawia wiele trudności [64, 65].



Ryc. 5. Przykładowy mechanizm fragmentacji glukozynolanów w jonizacji ujemnej, uwzględniający najczęściej powstające produkty jonowe.

Ostateczne potwierdzenie struktury glukozynolanów jest zwykle oparte na spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), która umożliwia szczegółowy opis strukturalny związków roślinnych, również poszczególnych izomerów, a nawet stereoizomerów. Szerokie zastosowanie przy określaniu struktur związków roślinnych, a w szczególności pozycji glikozylacji znajduje ^{13}C NMR oraz widma sprzężeń korelacyjnych heteroatomów typu COSY czy NOESY. Jednak wciąż najdokładniejszą metodą ustalania struktur glukozynolanów pozostaje ^1H NMR [20]. Ograniczeniem w zastosowaniu NMR do analiz metabolomicznych jest jej niska czułość

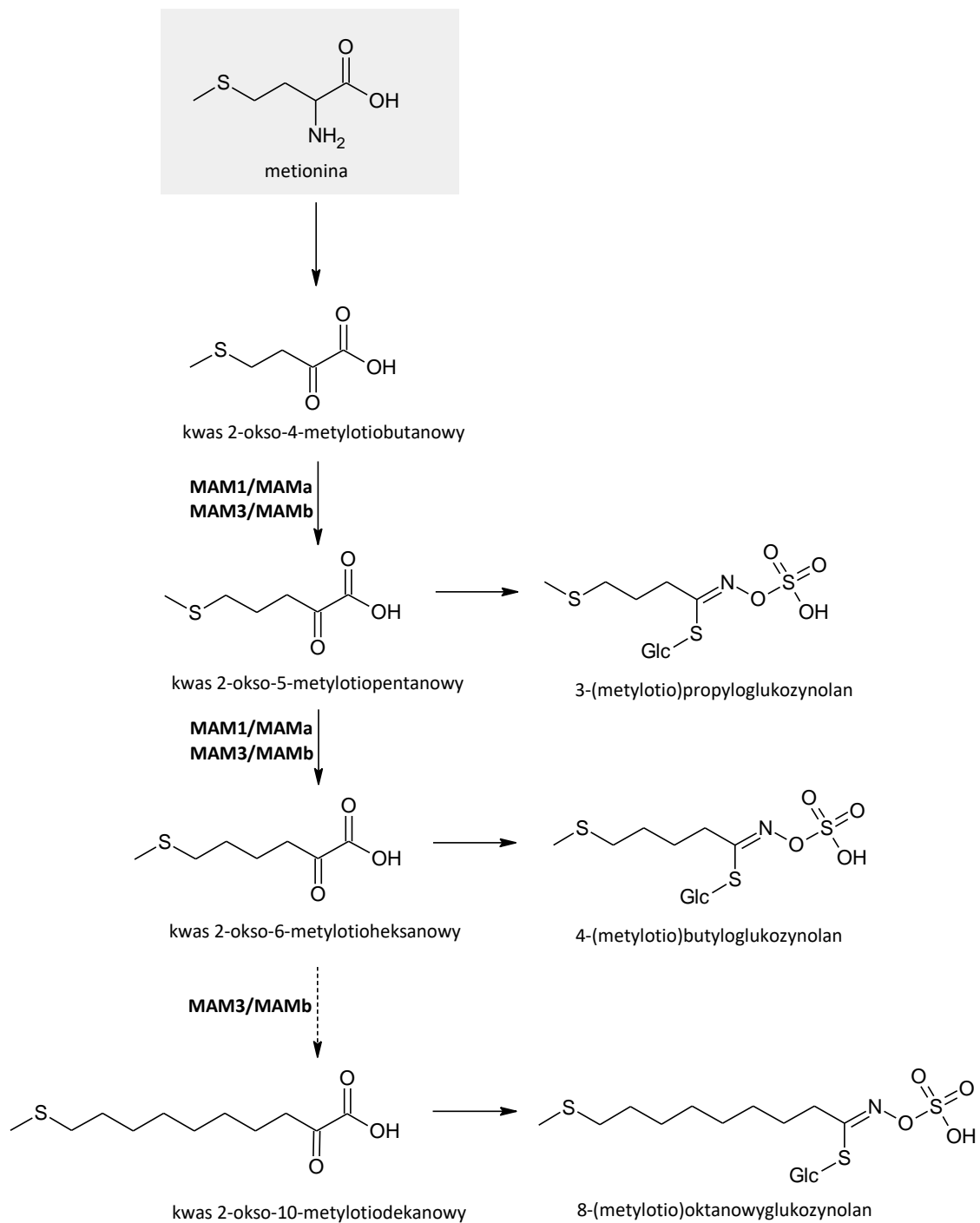
i konieczność izolacji pojedynczych metabolitów z materiału roślinnego o odpowiedniej czystości. Z tego powodu metody NMR stanowią często uzupełnienie i potwierdzenie wyników uzyskanych za pomocą wysokoprzepustowych technik HPLC-MS.

1.5. Biosynteza glukozynolanów

Glukozynolany produkowane są w szlaku biosyntetycznym posiadającym dla wszystkich klas strukturalnych zasadniczą część wspólną, w której poszczególne etapy mogą być katalizowane zarówno przez specyficzne izoformy tych samych enzymów, jak i przez niespecyficzne enzymy wspólne dla wszystkich szlaków. Dodatkowo na szlak biosyntezy glukozynolanów składają się specyficzne dla poszczególnych klas strukturalnych reakcje modyfikacji prekursorów i modyfikacji glukozynolanów. Najlepiej poznane do tej pory zostały szlaki biosyntezy IG i AG pochodzących od metioniny [66, 67].

1.5.1. Modyfikacja prekursorów

Początkiem biosyntezy IG jest bezpośrednio tryptofan. Natomiast w przypadku AG, będąca prekursorem metionina przechodzi wieloetapową elongację, co w końcowym efekcie determinuje finalną długość łańcucha bocznego AG (Ryc. 6). Kluczowym elementem tego procesu jest kondensacja acetylo-koenzymu A z serią kwasów ω -metylotio-2-oksoalkanowych, katalizowana przez syntazy metylotioalkilobjabłczanowe (ang. methylthioalkylmalate synthases, MAM). Co ciekawe, białka MAM stanowią prawdopodobnie najliczniejszą rodzinę enzymów biorących udział w biosyntezie glukozynolanów. Najnowsze badania sekwencji genomowych gatunków Brassicaceae wykazały, że w tej rodzinie występuje łącznie co najmniej sześć paralogów MAM (MAMa – MAMf) [68, 69]. W poszczególnych gatunkach występują natomiast z reguły co najmniej dwa białka MAM. Na przykład, w ekotypie Columbia-0 (Col-0) *A. thaliana* MAM1/MAMa katalizuje etap kondensacji w pierwszych trzech cyklach elongacji metioniny, podczas gdy kolejne cykle katalizowane są przez syntazę MAM3/MAMb (Ryc. 6) [70-72]. Wciąż jednak brakuje informacji na temat dokładnej funkcji i aktywności pozostałych białek MAM.

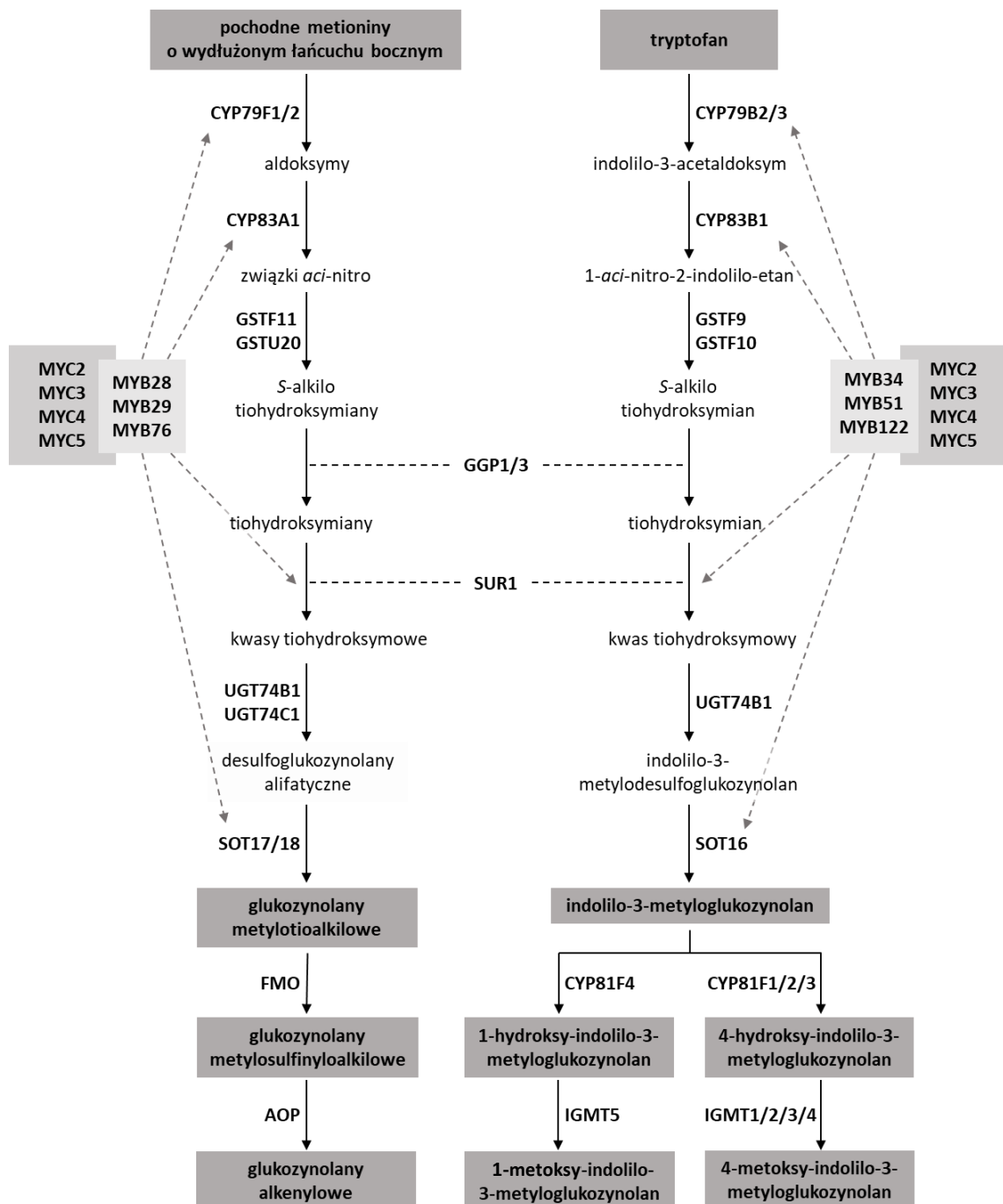


Ryc. 6. Schemat elongacji łańcucha bocznego metioniny w *A. thaliana*, stanowiącej pierwszy etap biosyntezy glukozynolanów alifatycznych. Strzałka przerywana wskazuje proces wieloetapowy. MAM – syntaza metyloalkilojabłcznowa

1.5.2. Zasadniczy szlak biosyntezy

W pierwszym wspólnym kroku zasadniczego szlaku biosyntezy glukozyolanów, cząsteczka metioniny o wydłużonym łańcuchu węglowym lub tryptofan przekształcane są w aldoksyminy przy pomocy monoooksygenaz cytochromu P450. W przypadku szlaku biosyntezy AG aktywność na tym etapie wykazywały enzymy CYP79F1 i CYP79F2, podczas gdy analogiczny etap biosyntezy IG katalizowany jest przez enzymy CYP79B2 i CYP79B3 (Ryc. 7) [73, 74]. Badania wykazały, że w *A. thaliana* CYP79F1 bierze głównie udział w biosyntezie krótkołańcuchowych AG, zaś CYP79F2 jest zaangażowany w produkcję zarówno krótko-, jak i długołańcuchowych AG [75]. W przypadku szlaku biosyntezy IG, enzymy CYP79B2 i CYP79B3 niemal w równym stopniu katalizują reakcję tworzenia indolilo-3-aldoksyminy (IAOx) [76]. Powstałe produkty zostają następnie utleniane przez monoooksygenazy CYP83A1 oraz CYP83B1 do związków *aci-nitro*. Reakcja ta dla aldoksymin alifatycznych jest katalizowana przez CYP83A1, zaś dla substratów indolowych przez CYP83B1 (Ryc. 7) [77, 78]. Badania *in vitro* wykazały jednak, że CYP83A1 jest zdolny do konwertowania również substratów indolowych, a CYP83B1 metabolizuje także substraty alifatyczne, jednak w obu przypadkach reakcja ta przebiega z mniejszą efektywnością i wymaga większych stężeń substratu [79]. Kolejnym etapem biosyntezy jest przyłączenie atomów siarki, których donorem nie jest, jak wcześniej przypuszczano, wolna cysteina, a peptyd złożony z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny, zwany glutationem. Za reakcje katalitycznego sprzężenia glutationu ze związkami *aci-nitro* odpowiedzialne są *S*-transferazy glutationowe (ang. glutathione *S*-transferases, GST). Analizy bioinformatyczne przypisują GSTF11 i GSTU20 do szlaku biosyntezy AG, zaś GSTF9 i GSTF10 do biosyntezy IG (Ryc. 7), jednak te sugestie nie zostały jednoznacznie zweryfikowane eksperymentalnie [80, 81]. Powstałe produkty ulegają przekształceniu do odpowiednich tiohydroksymianów przez peptydazy γ -glutamylowe (ang. gamma-glutamyl peptidases, GGP) GGP1 i GGP3, które nie są specyficznymi enzymami i oba biorą udział w biosyntezie AG, jak i IG [82, 83]. W kolejnym etapie alifatyczne i indolowe tiohydroksymiany są konwertowane do odpowiadających im kwasów tiohydroksymowych przez również niespecyficzną liazę C-S SUR1 (ang. superroot1) [84], a następnie w desulfoglukozyolany przez UDP-glukozylotransferazy (ang. UDP-glucosyltransferases, UGT) (Ryc. 7). Badania fenotypów mutantów wykazały, że UGT74B1 może katalizować reakcje w obu szlakach biosyntezy glukozyolanów,

podczas gdy UGT74C1 działa tylko wobec desulfoglukozyzolanów alifatycznych [85, 86]. Ostatni etap, prowadzący finalnie do powstania glukozyzolanów, wykorzystuje sulfotransferazy (ang. sulfotransferases, SOT), które mają za zadanie przyłączenie ugrupowania siarczanowego do cząsteczek desulfoglukozyzolanów (Ryc. 6). Charakterystyka biochemiczna tej grupy enzymów w *A. thaliana* wskazuje SOT17 i SOT18 jako katalizatory reakcji przyłączenia reszty siarczanowej do desulfoglukozyzolanów alifatycznych, skutkując powstaniem AG, podczas gdy SOT16 preferuje sprzężanie z substratem indolowym, tworząc ostatecznie IG [87].



◀ **Ryc. 7.** Ogólny schemat biosyntezy glukozynolanów alifatycznych i indolowych wraz z modyfikacjami ich łańcuchów bocznych. Strzałki przerywane wskazują regulację przez czynniki transkrypcyjne.

1.5.3. Modyfikacja łańcuchów bocznych

Powstałe w szlaku biosyntezy podstawowe AG i IG, mogą ulegać dalszym modyfikacjom łańcuchów bocznych, wpływając na wysoką różnorodność obu klas glukozynolanów. Łańcuchy boczne AG ulegają licznym reakcjom, takim jak alkenylacja, utlenianie czy hydroksylacja. Jednym z przykładów jest reakcja utleniania atomów siarki w łańcuchu bocznym AG przez enzymy z grupy monooksygenaz zawierających flawinę (ang. flavin-containing monooxygenases, FMO). Kolejnym przykładem stanowią mogą dioksygenazy zależne od 2-okso-glutaranu (ang. 2-oxo-glutarate-dependent dioxygenases, AOP) odpowiedzialne za tworzenie wiązań nienasyconych w łańcuchach bocznych (Ryc. 7) [72, 88, 89]. W wielu przypadkach modyfikacji AG dokładne mechanizmy oraz enzymy zaangażowane w te przekształcenia pozostają wciąż nieznanymi.

W przypadku IG, tworzony w szlaku biosyntezy indolilo-3-metyloglukozynolan (I3G) może być modyfikowany poprzez podstawienie pierścienia indolowego grupą hydroksylową lub metoksyłową (Ryc. 7). Hydroksylacja IG w *A. thaliana* katalizowana jest przez monooksygenazy z rodziny CYP81F, wśród których CYP81F1, CYP81F2 i CYP81F3 są uznawane za enzymy przyłączające grupę -OH w pozycji 4 pierścienia indolowego, tworząc 4-hydroksy-indolilo-3-metyloglukozynolan (4OHI3G) [90, 91]. Z kolei podstawienie w pozycji 1 katalizowane jest przez CYP81F4, prowadząc do powstawania 1-hydroksy-indolilo-3-metyloglukozynolanu (1OHI3G) [91]. Następny etap stanowi metylacja wprowadzonych do pierścienia indolowego grup hydroksylowych, katalizowana przez *O*-metylotransferazy glukozynolanów indolowych (ang. indolic glucosinolate *O*-methyltransferases, IGMT). Badania aktywności enzymatycznej IGMT w *A. thaliana* wykazały, że IGMT1, IGMT2, IGMT3 i IGMT4 są odpowiedzialne za produkcję 4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolanu (4MI3G), podczas gdy IGMT5 bierze udział w tworzeniu 1-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolanu (1MI3G) [91, 92].

1.5.4. Regulacja biosyntezy glukozyzolanów

Podobnie jak w przypadku wielu procesów biologicznych, aktywność szlaku biosyntezy glukozyzolanów regulowana jest przez czynniki transkrypcyjne. Poprzez wzajemne interakcje i wiązanie z promotorami genów, białka te odpowiedzialne są za efektywność transkrypcyjną genów kodujących enzymy niezbędne do biosyntezy glukozyzolanów. Jedną z grup regulatorów zaangażowanych w biosyntezę glukozyzolanów są białka z rodziny R2R3 MYB. Ta grupa czynników transkrypcyjnych charakteryzuje się obecnością w sekwencji białkowej dwóch domen R2 i R3, z których każda zawiera trzy helisy α . Ostatnia helisa z każdej domeny koordynuje wiązanie białka do szeregu specyficznych sekwencji promotorowych kontrolowanych genów [93].

Wśród białek MYB, opisano sześć pozytywnie regulujących transkrypcję genów biorących udział w produkcji glukozyzolanów oraz powiązanych z nią reakcjach, m.in. biosyntezie aminokwasów czy asymilacji siarki [94]. Do regulatorów biosyntezy AG należą MYB28, MYB29 oraz MYB76 [80, 95-97], podczas gdy produkcja IG kontrolowana jest przez MYB34, MYB51 oraz MYB122 (Ryc. 7) [98, 99]. Badania wykazały, że w przypadku biosyntezy AG, kluczową rolę pełnią MYB28 i MYB29, czego dowodem jest niemal całkowicie zahamowana produkcja AG w podwójnym mutancie *A. thaliana myb28 myb29*. Doniesienia literaturowe sugerują jedynie niewielki udział MYB76 w regulacji tego szlaku metabolicznego w *A. thaliana* [95, 100, 101]. Wymienione czynniki transkrypcyjne biorą również udział w procesie elongacji metioniny z z preferencją MYB29 i MYB76 do kontroli produkcji krótkołańcuchowych AG oraz udziałem MYB28 w regulacji biosyntezy długołańcuchowych AG [100, 101]. W przypadku IG, najwyższy wpływ na regulację biosyntezy obserwuje się dla MYB34 i MYB51, podczas gdy MYB122 samodzielnie nie wpływa znacząco na ich produkcję [102]. Konsekwentnie, biosynteza IG jest prawie całkowicie wyłączona w podwójnym mutancie *A. thaliana myb34 myb51*. Pomimo dużego podobieństwa sekwencji czynników transkrypcyjnych związanych z produkcją IG, każdy z kodujących je genów wykazuje indywidualny wzór organospecyficznej ekspresji. Przykładowo, gen *MYB51* ulega najwyższej ekspresji w liściach, z kolei *MYB34* i *MYB122* ulega zwiększonej ekspresji w korzeniach [102, 103]. Liczne badania ko-ekspresji wykazały ponadto, że białka MYB są zaangażowane w największym stopniu w regulację poziomu transkrypcji genów z rodziny *CYP79*, *CYP83* i *SOT* w sposób specyficzny dla szlaków biosyntezy AG

i IG. Dodatkowo czynniki transkrypcyjne związane z produkcją AG i IG kontrolują równocześnie także ekspresję genu *SURI* wspólnego dla obu szlaków [96, 97, 102].

Jednak nie tylko czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB wykazują zdolność do kontrolowania biosyntezy glukozyzolanów. Funkcję tą pełnią także niektóre białka z rodziny bHLH (ang. basic helix-loop-helix), które charakteryzują się obecnością dwóch helis połączonych pętlą o zmiennej długości [104]. Na podstawie badań *A. thaliana*, wśród tej grupy białek opisano dotąd cztery zdolne do oddziaływań z czynnikami transkrypcyjnymi MYB kontrolującymi biosyntezę glukozyzolanów, a należą do nich białka MYC2/bHLH06, MYC3/bHLH05, MYC4/bHLH04 oraz MYC5/bHLH28 (Ryc. 7). Co ciekawe, białka te nie wykazują specyficzności w regulacji biosyntezy AG i IG, tak jak ma to miejsce w przypadku czynników transkrypcyjnych MYB. Dodatkowo stwierdzono, iż MYC2-MYC5 biorą udział nie tylko w biosyntezie glukozyzolanów, ale również w szlaku sygnałowym kwasu jasmonowego [105].

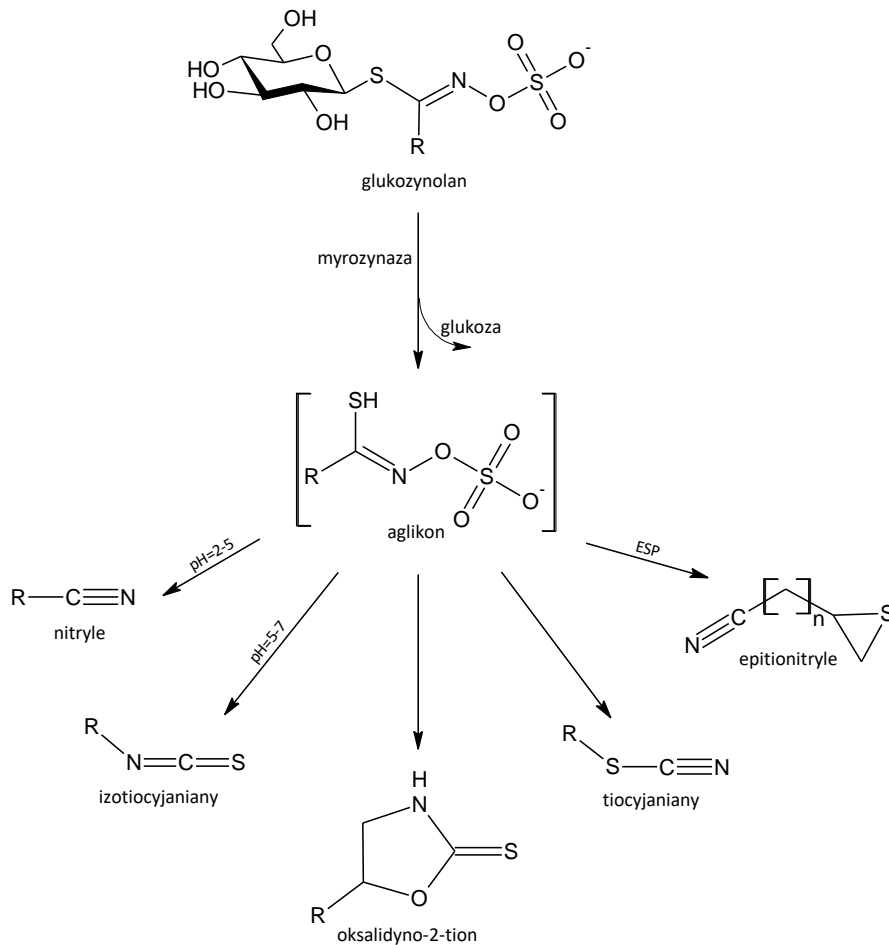
Miejscem oddziaływania czynników transkrypcyjnych MYB z białkami MYC jest tzw. motyw interakcji z MYC (ang. MYC-interaction motif, MIM) zlokalizowany poza domenami R2 i R3 MYB [106], a interakcje te wpływają pozytywnie na regulację biosyntezy glukozyzolanów [107, 108]. Chociaż wszystkie cztery białka MYC uzupełniają się pod względem funkcji, efektywnie spełniają one swoje role w różnych organach. Przykładowo, gen *MYC2* w *A. thaliana* ulega najwyższej ekspresji w korzeniach, podczas gdy ekspresja *MYC3* i *MYC4* osiąga najwyższy poziom w tkankach pędów, a *MYC5* w liściach i kwiatach [109-111]. Badania wykazały także, że linie mutantów *A. thaliana myc4 myc5* produkowały wyraźnie mniej zarówno AG, jak i IG, zaś linie *myc2 myc3 myc4* charakteryzowały się wręcz dramatycznym spadkiem produkcji obu klas glukozyzolanów. Podsumowując, przytoczone wyniki badań jasno wskazują, że interakcje MYC-MYB są niezbędne do efektywnej biosyntezy glukozyzolanów [108, 112].

1.6. Hydroliza glukozyzolanów i jej produkty

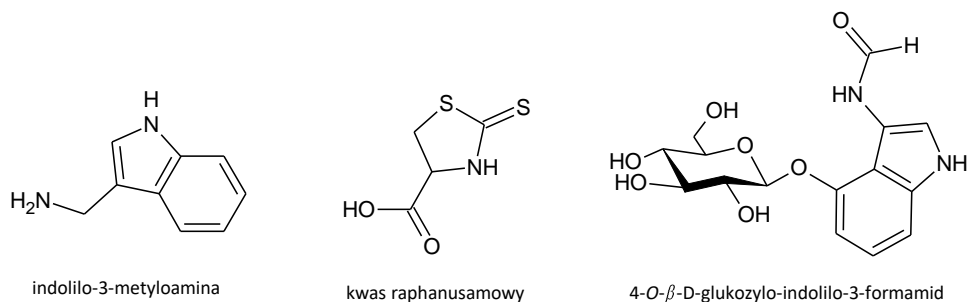
Cząsteczki glukozyzolanów są chemicznie stabilne i nie posiadają aktywności biologicznej, a ich liczne fizjologiczne funkcje wymagają aktywacji poprzez hydrolizę. Reakcja ta jest katalizowana przez specyficzne β -tioglukozydazy, zwane myrozynazami. Glukozyzolanony pod wpływem myrozynaz, ulegają hydrolizie do niestabilnego aglikonu, następnie przekształcanego w różnorodne bioaktywne produkty końcowe, m.in. nityle,

epithionitryle, oksalidyno-2-tion, tiocyjaniany czy izotiocyaniany (Ryc. 8A) [21]. Tworzenie konkretnego produktu rozpadu glukozynolanów zależy od łańcucha bocznego glukozynolanu, warunków reakcji oraz obecności białek specyfikujących (ang. specifier proteins). Przykładowo, produkcja nitryli wspierana jest przez niskie pH, obecność jonów żelaza oraz białek epitiospecyficznych, podczas gdy w przypadku nieobecności białek specyfikujących oddziałujących z myrozynazami, produktami hydrolizy są z reguły izotiocyaniany.

A



B



◀ **Ryc. 8.** Hydroliza glukozynolanów. **A.** Uproszczony schemat hydrolizy glukozynolanów, uwzględniający najczęściej powstające produkty. ESP – białka epitiospecyficzne. **B.** Zidentyfikowane do tej pory produkty końcowe hydrolizy glukozynolanów indolowych w szlaku PEN2.

W normalnych warunkach fizjologicznych glukozynolany są oddzielone od myrozynaz na poziomie komórkowych lub subkomórkowym, dlatego też ich degradacja nie zachodzi konstytutywnie. Kontakt enzymu z substratem następuje jedynie w przypadku naruszenia integralności tkanek lub na skutek stresu, prowadząc do hydrolizy w odpowiedzi na zagrożenie. Do jednej z grup myrozynaz zalicza się białka zwane glukohydrolazami β -tioglukozydowymi (ang. β -thioglucoside glucohydrolases, TGG), które zawierają resztę glutaminy w centrum aktywnym. Drugą grupę stanowią blisko spokrewnione z TGG enzymy do których zalicza się między innymi PENETRATION2 (PEN2), PYK10, BGLU21 czy też BGLU18, w których centrum aktywnym kluczowa reszta glutaminy została zastąpiona resztą kwasu glutaminowego [113-115]. Dodatkowo, wiele myrozynaz wykazuje również organo- lub subkomórkowo specyficzną lokalizację w tkankach i organellach roślinnych. Przykładowo, w *A. thaliana* myrozynazy TGG1 i TGG2 są enzymami występującymi w liściach, zaś obecność TGG4 i TGG5 jest charakterystyczna dla korzeni [113, 116, 117]. Z kolei obecność PYK10 i BGLU21 zaobserwowano w *A. thaliana* w ciałkach retikulum endoplazmatycznego kotyledonów i korzeni [115, 118], BGLU18 w ciałkach retikulum endoplazmatycznego liści [119], zaś białko PEN2 lokalizowało głównie peroksysomach i mitochondriach komórek liści i korzeni [120].

1.6.1. Aktywność biologiczna produktów rozpadu glukozynolanów

Wśród wszystkich produktów rozpadu glukozynolanów najmniej reaktywne wydają się być proste nitryle, zaś najwyższą toksyczność u większości organizmów żywych wykazują izotiocyjaniany. Jednak skutki aktywności wszystkich produktów hydrolizy glukozynolanów zależne są od przyjętej dawki, co sprawia, że nawet nitryle czy epitionitryle, wykazują wysoką toksyczność u zwierząt hodowlanych [121]. Dodatkowo, wykazano, że pochodzące od glukozynolanów nitryle mogą w *A. thaliana* zwiększać produkcję fitohormonów związanych z odpornością, w tym kwasu salicylowego, jasmonowego i abscysynowego [122]. Ze względu na toksyczność oraz

sygnalne funkcje produktów rozpadu glukozynolanów, aktywowanych po uszkodzeniu tkanki lub rozpoznaniu patogenu, glukozynolany od lat uznawane są za ważny element obronności roślin Brassicaceae przeciwko roślinożernym owadom i patogennym mikroorganizmom [123, 124].

W przypadku owadów roślinożernych, AG i odpowiadające im izotiocyjaniiny stanowią ochronę przede wszystkim przed atakami insektów żujących [101, 113], IG i produkty ich rozpadu chronią przed owadami posiadającymi kłująco-ssący aparat gębowy i pobierającymi pożywienie z łyka [90, 125], zaś BG i odpowiednie izotiocyjaniiny odgrywają rolę w odporności wobec nicieni [126, 127]. Badania interakcji między roślinami a mikroorganizmami patogennymi wykazały, że produkty metabolizmu IG kontrolują penetrację niezaadaptowanych patogenów do komórek roślinnych [114, 128], podczas gdy alifatyczne izotiocyjaniiny zapewniają odporność wobec wybranych patogenów grzybowych, jak np. *Sclerotinia sclerotiorum* czy bakterii *Pseudomonas syringae* [129, 130].

Prowadzone w wielu laboratoriach badania wykazały również, że oprócz funkcji obronnych, glukozynolany są aktywne także w odpowiedzi na stresy abiotyczne oraz wpływają na inne procesy fizjologiczne [131]. Do funkcji tych należy m.in. pośrednictwo w otwieraniu aparatów szparkowych w liściach [132], kontrola przewodnictwa hydraulicznego korzeni w warunkach stresu solnego [133] oraz udział w biosyntezie auksyn [117]. Podsumowując, konstytutywna obecność glukozynolanów oraz ich zróżnicowanie strukturalne w tkankach roślinnych wydają się być istotne dla zapewnienia odpowiedniego poziomu odporności gatunków Brassicaceae na różne typy szkodników oraz na tolerancję różnych stresów abiotycznych.

1.6.2. Wpływ modyfikacji łańcucha bocznego na funkcje produktów rozpadu glukozynolanów

Jak opisano powyżej, AG, a w konsekwencji pochodzące od nich izotiocyjaniiny, charakteryzują się zmienną długością łańcucha bocznego i jego dodatkowymi modyfikacjami. W kontekście tej różnorodności strukturalnej, interesującym wydaje się, czy długość i modyfikacje łańcucha wpływają na aktywność biologiczną izotiocyjaniinów. Do tej pory w sposób systematyczny przebadano aktywność zaledwie dwóch grup tych związków wobec wybranych patogenów grzybowych. Analiza izotiocyjaniinów alkenylowych (1-5C) wykazała wyższą toksyczność cząsteczek

o krótszych łańcuchach bocznych wobec *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Pythium irregulare*. Inne doświadczenia wykazały, że toksyczność izotiocyjanianów metylosulfinyloalkilowych (4-8C) w stosunku do *S. sclerotiorum* rośnie wraz z długością łańcucha [134, 135]. Przeciwny wpływ długości łańcucha bocznego na aktywność biologiczną obserwowany w tych dwóch badaniach może wynikać, z różnych typów izotiocyjanianów (alkenylowe i metylosulfinyloalkilowe) lub z różnych patogenów użytych w odpowiednich doświadczeniach. Precyzyjne określenie wpływu długości łańcucha bocznego AG i jego modyfikacji na aktywność powstających izotiocyjanianów wymagałoby kolejnych usystematyzowanych badań.

Nieco lepiej poznano rolę modyfikacji pierścienia indolowego IG w zewnątrzkomórkowej odpowiedzi immunologicznej wobec szeregu patogennych grzybów i łęgniowców w *A. thaliana*, [120, 128, 136, 137]. Jak wspomniano wcześniej, myrozynaza PEN2 jest istotna dla hydrolizy IG w odpowiedzi na infekcję przez mikroorganizmy patogenne [114, 138]. Metabolizm I3G w *A. thaliana*, inicjowany przez białko PEN2 prowadzi do powstania co najmniej dwóch produktów końcowych, w indolilo-3-metyloaminy (ang. indolyl-3-methyl amine, I3A) i kwasu rafanusamowego (ang. raphanusamic acid, RA) (Ryc. 8B) [114]. Wyniki badań wykazują jednak, że do zapewnienia aktywności immunologicznej wymagana jest wcześniejsza hydroksylacja pierścienia indolowego I3G w pozycji 4, która katalizowana jest przez enzym CYP81F2 [114]. Co za tym idzie, substratami PEN2 istotnymi dla odporności na infekcje są 4OH I3G lub 4MI3G, a nie sam I3G, jednak produkty końcowe metabolizmu tych dwóch glukozyzolanów nie są jak dotychczas szczegółowo poznane. Jednym z tych produktów jest 4-O- β -D-glukozylo-indolilo-3-formamid, jednak przypuszcza się, że nie jest to związek o aktywności biologicznej (Ryc. 8B) [139].

1.7. Molekularne podstawy zakonserwowania glukozyzolanów w gatunkach Brassicaceae

Analizy metabolomiczne wielu ekotypów *A. thaliana* nie wykazały istnienia naturalnie występującej linii tego gatunku z wyraźnym defektem w biosyntezie AG lub IG, [140, 141]. Podobnie, pomimo przynajmniej pobieżnej analizy glukozyzolanów u ponad 300 gatunków Brassicaceae do tej pory nie zidentyfikowano gatunku z deficytem w biosyntezie tych metabolitów. Zakłada się, że silne zakonserwowanie glukozyzolanów

może wynikać z ich istotnych funkcji w oddziaływaniu roślin ze środowiskiem. Opublikowane wyniki badań prowadzonych na mutantach *A. thaliana* wskazują również na prawdopodobne podstawy molekularne zakonserwowania tego szlaku metabolicznego.

1.7.1. Obecność glukozynolanów w gatunkach Brassicaceae

Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 150 różnych glukozynolanów, zaklasyfikowanych jako naturalnie występujące metabolity wtórne w gatunkach należących do rodziny Brassicaceae [20]. Roślina modelowa *A. thaliana*, należąca do plemienia Camelinae, produkuje konstytutywnie krótko- i średniołańcuchowe AG pochodzące od metioniny, które zawierają od 2 do 8 grup metylenowych $-CH_2-$ w łańcuchu bocznym (2-8C), a także IG oraz niewielkie ilości BG w każdym badanym organie, m.in. w liściach, korzeniach i nasionach [142, 143]. Podobny profil zawartości glukozynolanów zaobserwowano również w innym gatunku, reprezentującym ten sam rodzaj, *Arabidopsis lyrata* [144, 145]. Analizy metabolomiczne wykazały również, że rośliny uprawne, należące do plemienia Brassicaceae (Ryc. 1), takie jak *Brassica napus* i *Brassica rapa*, gromadzą w liściach i korzeniach krótkołańcuchowe AG (2-5C), a także IG i BG [146-148]. Analizy przeprowadzone na liściach i nasionach gatunku *Boechera stricta*, reprezentującego plemię Boechereae, wykazały obecność tych samych klas glukozynolanów z przewagą krótko- i średniołańcuchowych AG (2-7C) [149]. Podobne długości łańcuchów bocznych AG zaobserwowano również w liściach *Cardamine pratensis*, należącej do plemienia Cardamineae [50, 144, 145, 150].

Przeprowadzone do tej pory analizy LC-MS wielu innych gatunków Brassicaceae, potwierdzają, że każda z klas glukozynolanów obecna jest konstytutywnie we wszystkich organach przedstawicieli różnych plemion tej rodziny (Tabela 1). W trakcie mniej dokładnych, celowanych analiz glukozynolanów opartych na poszukiwaniu określonych metabolitów, a często jedynie produktów ich degradacji, w ponad 300 zbadanych gatunków dodatkowo potwierdzono powyższą obserwację. Z drugiej strony uzyskane wyniki sugerują, że od tej reguły mogą istnieć wyjątki w postaci gatunków blisko spokrewnionych z *A. thaliana*, należących do tego samego plemienia Camelinae, jednak innego jego kladu (Ryc. 2; klad II). Celowane analizy metabolomiczne wskazywały na brak IG i badanych AG w liściach *Camelina microcarpa*, *N. paniculata* i *Catolobus pendulus* [145]. Podobne celowane analizy wykazały brak IG w liściach *C. rubella* (Tabela 1) [151]. Przepuszczalny deficyt glukozynolanów w tych gatunkach korelował

z wcześniejszymi badaniami wykazującymi brak izotiocyjanianów pochodzących od AG w częściach nadziemnych *Cam. sativa* [49]. Z drugiej jednak strony, analiza dojrzałych nasion *Capsella bursa-pastoris*, *Cam. sativa* i *N. paniculata* wykazała obecność trzech izotiocyjanianów, które mogą pochodzić z nietypowych długołańcuchowych (9-11C) metylosulfinyloalkilowych AG [152, 153]. Dokładnie te same AG zostały później zidentyfikowane w nasionach kilku gatunków rodzaju *Camelina* [37, 38, 154, 155]. Ponieważ długołańcuchowe (9-11C) glukozynolany metylosulfinyloalkilowe nie były brane pod uwagę w trakcie wcześniejszych analiz celowanych na liściach, nie można wykluczyć ich obecności w tym organie [145]. Również brak danych na temat akumulacji glukozynolanów w innych organach gatunków reprezentujących klad II Camelinae, nie pozwala jednoznacznie ocenić zdolności tych gatunków do biosyntezy wszystkich klas glukozynolanów.

Tabela 1. Zestawienie dostępnych informacji na temat obecności glukozynolanów alifatycznych (AG) i indolowych (IG) w wybranych gatunkach reprezentujących różne plemiona rodziny Brassicaceae. +, wykryto; -, nie wykryto

	AG	IG	Plemię
analizy niecelowane, różne organy			
<i>Brassica rapa</i>	+	+	Brassicaceae
<i>Brassica napus</i>	+	+	
<i>Brassica oleracea</i>	+	+	
<i>Brassica juncea</i>	+	+	
<i>Cardamine pratensis</i>	+	+	Cardamineae
<i>Cardamine hirsuta</i>	+	+	
<i>Rorippa indica</i>	+	+	
<i>Barbarea vulgaris</i>	+	+	
<i>Boechera stricta</i>	+	+	Boechereae
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	Camelineae
<i>Arabidopsis lyrata</i>	+	+	
analizy celowane, pojedyncze organy			
<i>Camelina microcarpa</i>	+	-	Camelineae
<i>Camelina sativa</i>	+	-	
<i>Neslia paniculata</i>	+	-	
<i>Catolobus pendulus</i>	-	-	
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	+	-	
<i>Capsella rubella</i>	-	-	

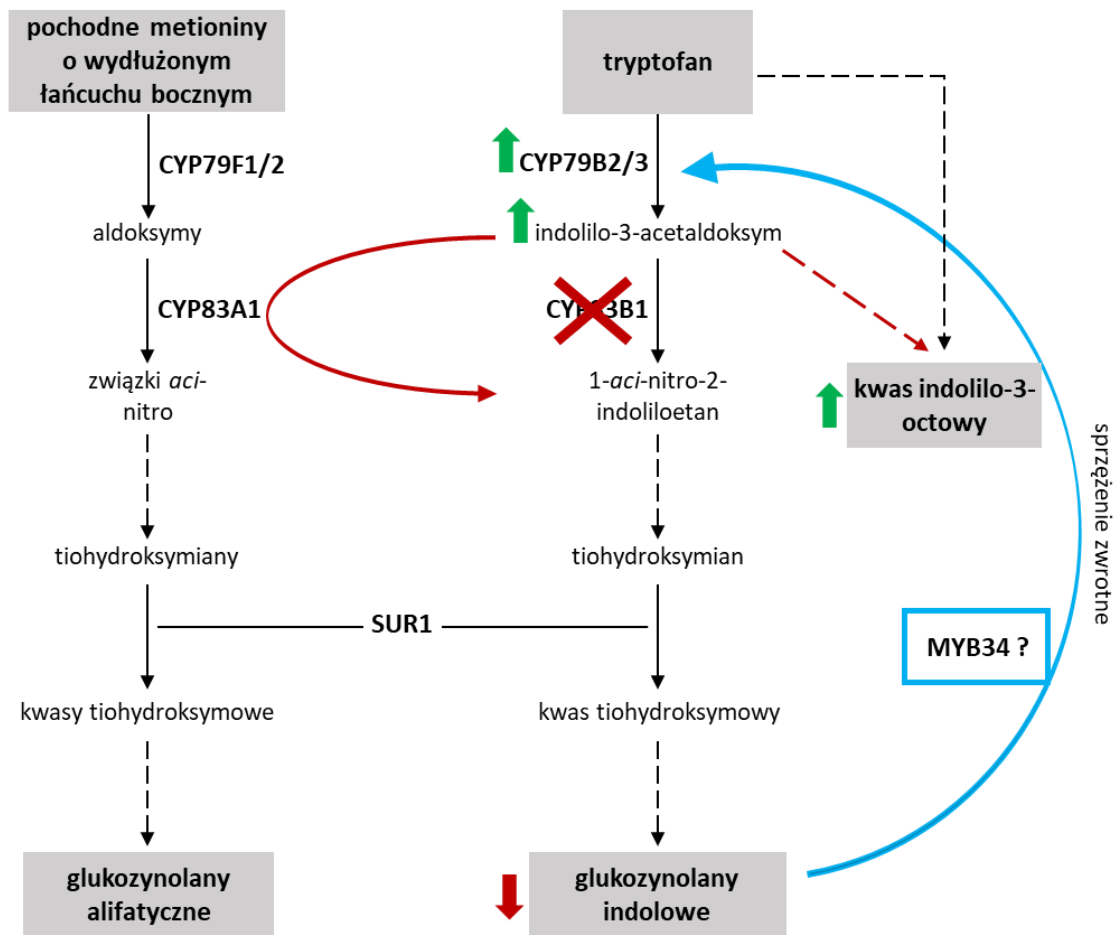
1.7.2. Wpływ mutacji w genach związanych z biosyntezą glukozynolanów na wzrost roślin

Wygenerowane w laboratoriach linie *A. thaliana* posiadające pojedyncze mutacje w genach kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę AG lub IG z reguły albo nie wykazują obniżonej zdolności do produkcji glukozynolanów, ze względu na obecność dodatkowych izoform odpowiednich białek, albo charakteryzują się silnymi defektami wzrostu. W przypadku genów kodujących enzymy ze szlaku biosyntezy AG, najsilniejsze zamiany w fenotypach w *A. thaliana* obserwowano w przypadku mutacji genów *CYP79F1* i *CYP79F2* (Ryc. 7). Mutant *cyp79f1*, nazwany *bushy1* (*bus1*), oprócz silnie obniżonej zdolności do produkcji krótkołańcuchowych AG charakteryzuje się pomarszczonymi liśćmi o niewielkim rozmiarze, wczesnym tworzeniem się wtórnych liści rozety oraz zwiększoną liczbą pędów bocznych [156]. Z kolei linia *cyp79f2* charakteryzowała się obniżoną produkcją długołańcuchowych AG, zaś wygenerowany podwójny mutant *cyp79f1 cyp79f2* wykazywał silne zaburzenie rozwoju zarówno części nadziemnych rośliny, jak i korzeni [75, 157]. Z kolei mutacja genu *SUR1*, wspólnego dla biosyntezy AG i IG (Ryc. 7), oprócz defektu w biosyntezie tych związków objawia się silnie zahamowanym wzrostem części nadziemnych oraz rozbudowanym systemem korzeniowym i letalnością w późniejszych etapach rozwoju, która uniemożliwia uzyskanie homozygotycznych nasion tego mutantu [84, 158]. Zbliżony, chociaż nie aż tak silny fenotyp, w tym wypadku możliwe jest przejście do fazy generatywnej i uzyskanie nasion, wykazuje również mutant *cyp83b1*, nazwany pierwotnie *superroot2* (*sur2*) [79, 159].

Dotychczasowe badania wykazały, że silne obniżenie produkcji glukozynolanów połączone z uniknięciem niekorzystnego wpływu na rozwój roślin wymaga równoczesnej mutacji w co najmniej dwóch ściśle określonych genach związanych z biosyntezą tych metabolitów. Do takich linii *A. thaliana* należą potrójny mutant *myc2 myc3 myc4*, z silnie zaburzoną biosyntezą wszystkich glukozynolanów; mutant *myb28 myb29*, z defektem w produkcji AG; oraz linie *myb34 myb51*, *myb34 myb51 myb122* i *cyp79b2 cyp79b3*, które produkują jedynie śladowe ilości IG (Ryc. 7) [75, 95, 102, 107]. Jeśli tylko takie specyficzne wielokrotne mutacje mogą efektywnie, i bez negatywnego wpływu na rozwój roślin, obniżyć akumulację glukozynolanów, naturalne powstawanie linii gatunków Brassicaceae z defektem w produkcji tych metabolitów wydaje się niezwykle mało prawdopodobne.

1.7.3. Defekty w biosyntezie IG i nadprodukcja auksyn

Wspomniane powyżej fenotypy wzrostu obserwowane w liniach z brakiem niektórych enzymów związanych z biosyntezą glukozynolanów tłumaczone są głównie akumulacją reaktywnych produktów pośrednich biosyntezy glukozynolanów, które mogą negatywnie wpływać na szereg procesów biochemicznych zachodzących w komórce roślinnej. Dodatkowo, linie *sur1* i *sur2* zostały wyizolowane podczas poszukiwania mutantów z defektami w biosyntezie auksyn, hormonów roślinnych, biorących udział w regulacji wzrostu i rozwoju roślin [79, 84]. Zaobserwowano, że linie te charakteryzują się silną nadprodukcją jednej z auksyn, kwasu indolilo-3-octowego (ang. indolyl-3-acetic acid, IAA), co może tłumaczyć część wymienionych powyżej defektów rozwojowych obserwowanych w tych dwóch liniach. Późniejsze badania nad mutantami *cyp79b2* *cyp79b3* i *cyp83b1* pozwoliły na lepsze poznanie mechanizmów wiodących do nadprodukcji IAA w mutantach *sur*. Podwójny mutant *cyp79b2 cyp79b3* charakteryzuje się niewielkim zahamowaniem wzrostu i spadkiem akumulacji IAA obserwowanymi w podwyższonej temperaturze. Ten fenotyp wskazuje na zdolność *A. thaliana* do metabolizmu produktu aktywności CYP79B2/3, IAOx, do IAA [76]. Z kolei w linii *cyp83b1*, oprócz wspomnianej wcześniej nadprodukcji IAA, zaobserwowano zwiększoną ekspresję genów *MYB34*, *CYP79B2* i *CYP79B3* [98]. Zasugerowało to istnienie mechanizmu sprzężenia zwrotnego, który w roślinach typu dzikiego kontroluje poziom IG i w przypadku spadku ich akumulacji, prowadzi do aktywacji szlaku biosyntezy tych metabolitów (Ryc. 9). Jednak przy braku monooksygenazy CYP83B1 zwiększona aktywność CYP79B2/3 prowadzi do nadprodukcji IAOx, który w wyższych stężeniach może być konwertowany przez CYP83A1. Tłumaczy to jedynie niewielki defekt w akumulacji IG obserwowany w mutancie *cyp83b1*. Równocześnie uruchomione zostaje przekierowanie nadmiaru IAOx do IAA, skutkując nadprodukcją tego hormonu (Ryc. 9) [98]. Wprowadzenie mutacji *myb34* w linii *cyp83b1* skutkuje, przynajmniej we wczesnych etapach rozwoju siewek, przywróceniem porównywalnego z typem dzikim fenotypu wzrostu, co z kolei wskazuje na spadek nadprodukcji IAA [98]. Sugeruje, to że sprzężenie zwrotne regulujące poziom IG w roślinach *A. thaliana* typu dzikiego jest przynajmniej częściowo kontrolowane przez MYB34 (Ryc. 9).



Ryc. 9. Uproszczony mechanizm działania sprzężenia zwrotnego regulującego poziom akumulacji glikozynolanów indolowych oraz jego wpływ na akumulację kwasu indolilo-3-octowego w przypadku mutacji genu *CYP83B1*. Strzałki przerywane wskazują procesy wieloetapowe. Zielone strzałki skierowane w górę odpowiadają nadprodukcji metabolitu lub zwiększonej ekspresji genu, zaś czerwone strzałki w dół wskazują obniżoną akumulację metabolitu. Indolilo-3-acetaldoxymu w zwiększonym stężeniu może być metabolizowany przez *CYP83A1*.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy doktorskiej było dokładne zbadanie biosyntezy glukozynolanów w gatunkach należących do kladu II Camelinae plemienia Camelinae, dla których dotychczasowe opublikowane niekompletne wyniki sugerowały bezprecedensowy dla roślin Brassicaceae deficyt w biosyntezie glukozynolanów. Do naszych eksperymentów wybraliśmy 5 gatunków reprezentujących ten kład: *C. rubella*, *C. grandiflora*, *C. bursa-pastoris*, *Cam sativa* i *N. paniculata* razem z rośliną modelową *A. thaliana*, która jest blisko spokrewniona z badanymi gatunkami, a dodatkowo produkuje glukozynolany w ilościach reprezentatywnych dla rodziny Brassicaceae. W ramach prowadzonych doświadczeń postanowiliśmy przeprowadzić systematyczne, analizy LC-MS glukozynolanów w różnych organach i na różnych etapach rozwojowych badanych roślin. Dodatkowo planowaliśmy identyfikację ortologów genów związanych z biosyntezą glukozynolanów w gatunkach kladu II oraz analizy ekspresji tych genów w organach, dla których przeprowadzimy analizy metaboliczne. Co istotne w tym kontekście, dla *C. rubella*, *C. grandiflora*, *Cam sativa* i *N. paniculata*, dostępne są sekwencje genomowe umożliwiające tego typu analizy. Założyliśmy, że wyniki uzyskane podczas naszych analiz metabolomicznych, genomicznych i transkryptomicznych pozwolą nam nie tylko jednoznacznie określić zdolność badanych gatunków do biosyntezy glukozynolanów, ale jednocześnie wskażą na potencjalne molekularne podstawy różnic w biosyntezie i akumulacji tych metabolitów pomiędzy *A. thaliana* a gatunkami kladu II Camelinae. W kolejnych etapach pracy założyliśmy weryfikację przynajmniej niektórych z potencjalnych molekularnych przyczyn zmian w biosyntezie glukozynolanów, co powinno pomóc w zrozumieniu ewolucyjnych zmian jakie zaszły w tym skomplikowanym szlaku biosyntezy metabolitów wtórnych.

3. Materiały i metody

3.1. Lista użytych odczynników

Antybiotyki:

ampicylina (BioShop, Kanada)

kanamycyna (BioShop, Kanada)

karbenicylina (BioShop, Kanada)

rifampicyna (BioShop, Kanada)

Enzymy:

DNaza I wolna od RNaz (Qiagen, Niemcy)

enzymy restrykcyjne AscI, SbfI, EcoRI (New England Biolabs, USA)

inhibitor rybonukleaz RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega, USA)

ligaza T4 DNA ligase (Promega, USA)

mieszanina enzymów USER enzyme (ang. Uracil-Specific Excision Reagent) (New England Biolabs, USA)

polimeraza GoTaq DNA Polymerase (Promega, USA)

polimeraza *PfuTurbo* Hotstart DNA Polymerase (Agilent, USA)

polimeraza Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific, USA)

Zestawy do pracy z kwasami nukleinowymi:

DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, USA); zestaw do oczyszczania produktów reakcji PCR z mieszaniny poreakcyjnej

iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, USA); zestaw do przeprowadzania ilościowej reakcji PCR z odwrotną transkrypcją

Omniscript RT Kit (Qiagen, Niemcy); zestaw do odwrotnej transkrypcji

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Niemcy); zestaw do izolacji całkowitego RNA z tkanek roślinnych

Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA); zestaw do oczyszczania fragmentów DNA z żelu agarozowego po elektroforezie

Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, USA); zestaw do izolacji plazmidów z zawiesin bakteryjnych

Pozostałe odczynniki:

acetonitryl, czystość LC-MS (VWR, USA)
agar (BioShop, Kanada)
agarozja (BioShop, Kanada)
BASTA 150 SL (Bayer, Niemcy)
 β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, Niemcy)
bufor obciążający Purple Gel Loading Dye (New England Biolabs, USA)
bulion lizogenny LB (ang. lysogeny broth) Miller (BioShop, Kanada)
chlorek magnezu (Sigma-Aldrich, Niemcy)
chloroform (POCH, Polska)
deoksyrybonukleotydy dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega, USA)
dimetylosulfotlenek, DMSO (Bioshop, Kanada)
dodecylosiarczan sodu, SDS (VWR, USA)
ekstrakt drożdżowy (BioShop, Kanada)
ekstrakt wołowy (BioShop, Kanada)
etanol (Merck, Niemcy)
glicerol (Chempur, Polska)
izopropanol (VWR, USA)
kwas mrówkowy (Merck, Niemcy)
kwas octowy (POCH, Polska)
kwas solny (POCH, Polska)
kwas wersenowy, EDTA (BioShop, Kanada)
pepton (BioShop, Kanada)
pożywka Murashige & Skoog Medium (Duchefa, Holandia)
sacharoza (Chempur, Polska)
Silwet L-77 (PhytoTechnology Laboratories, USA)
starter Oligo(dT) (Genomed, Polska)
SYBR Green Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA)
tris(hydroksymetylo)aminometan, Tris (BioShop, Kanada)
wodorotlenek sodu (POCH, Polska)

Standardy analityczne:

1-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan, 1MI3G (oczyszczony z liści *A. thaliana*)

4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan, 4MI3G, (oczyszczony z liści *A. thaliana*)

kwasy indolilo-3-octowy, IAA (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Bufory i pożywki:

bufor Edwardsa (200 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS)

pożywka YEB (ang. Yeast Extract Beef) (5 mg/ml ekstraktu wołowego, 1 mg/ml ekstraktu drożdżowego, 5 mg/ml peptonu, 5 mg/ml sacharozy i 0,5 mg/ml MgCl₂)

3.2. Materiał roślinny

Do przeprowadzenia eksperymentów wykorzystano następujące linie roślin:

- *A. thaliana*, ekotyp Columbia-0 (Col-0).
- *C. rubella*, ekotyp Monte Gargano; nasiona uzyskane z Nottingham Arabidopsis Stock Center (nr linii: N9606).
- *C. rubella*, ekotyp Gr1; nasiona otrzymane od prof. Tanji Slotte (Uniwersytet Sztokholmski, Szwecja) [35].
- *C. bursa-pastoris*, nasiona uzyskane z B&T World Seeds (nr linii: 1507).
- *C. grandiflora*, nasiona otrzymane od prof. Miltosa Tsiantisa (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Niemcy).
- *Cam. sativa*, linia DH55, nasiona otrzymane od dr Isobel Parkin (Saskatoon Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Kanada) [36].
- *N. paniculata*, nasiona uzyskane od dr Arne Saatkamp (Aix Marseille Université, Francja) [160].
- *A. thaliana*, linie mutantów *myb34*, *myb51*, *myb122* i potrójny mutant *myb34/51/122*; nasiona uzyskane od dr Henninga Frerigmana (Uniwersytet w Kolonii, Niemcy) [102].

- *A. thaliana*, linia *cyp83b1* SALK_071430; nasiona uzyskane z Nottingham Arabidopsis Stock Center (nr linii: N571430). Homozygotyczny mutant wyizolowany w Zakładzie Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin, ICHB PAN.
- *A. thaliana*, podwójne mutanty *cyp83b1 myb34*, *cyp83b1 myb51* i *cyp83b1 myb122*; linie wygenerowane w Zakładzie Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin, ICHB PAN.

Nasiona badanych gatunków *Camelineae*, jak również wygenerowanych w ramach tej pracy transgenicznych linii *C. rubella* (pokolenie T₂) wysiewano do doniczek z ziemią i uprawiano w komorze hodowlanej w temperaturze 23/20°C (dzień/noc) w warunkach krótkiego dnia (8 h światła, 16 h ciemności). Po 2 tygodniach od wysiewu, pojedyncze siewki były przenoszone do osobnych doniczek i uprawiane nadal w tych samych warunkach. Po 6 tygodniach wszystkie rośliny, z wyjątkiem ekotypu Monte Gargano *C. rubella*, umieszczano w warunkach długiego dnia (16 h światła, 8 h ciemności) w celu zainicjowania kwitnienia. W przypadku *C. rubella* Monte Gargano, przed przeniesieniem roślin do komory o warunkach długiego dnia, umieszczano je najpierw na 2 tygodnie w komorze hodowlanej o temperaturze 4°C i krótkim dniu, w celu przeprowadzenia wernalizacji niezbędnej do kwitnienia tej linii.

Z roślin 4- i 6-tygodniowych pobierano próbki liści, a dodatkowo z dojrzałych roślin zawiązujących nasiona pobierano próbki również z liści, pędów, łuszczynek i korzeni. Ze względu na różnice rozwojowe pomiędzy badanymi gatunkami, o tym punkcie czasowym decydowało stadium rozwojowe, a nie wiek rośliny. Orientacyjny czas osiągnięcia tego stadium dla *A. thaliana*, *C. bursa-pastoris* i *Cam. sativa* wynosił około 8-9 tygodni, dla *C. rubella* i *C. grandiflora* około 10-11 tygodni, zaś dla *N. paniculata* około 12-13 tygodni. Wszystkie próbki tkanek roślinnych zamrażano niezwłocznie po pobraniu w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

Badane gatunki *Camelineae* hodowano również *in vitro* w celu uzyskania próbek z 2-tygodniowych siewek badanych gatunków. W przypadku *A. thaliana*, *C. rubella*, *C. bursa-pastoris* i *C. grandiflora* siewki uprawiano w 24-dółkowych płytkach wypełnionych pożywką Murashige & Skoog zawierającą 0,5% sacharozy i 0,5% MES o pH równym 5,7. W celu zniwelowania ryzyka zakażeń pożywką, nasiona sterylizowano 2 x 3 min w 70% roztworze etanolu, a następnie 2 min w 96% roztworze etanolu. Siewki *Cam. sativa* i *N. paniculata* z powodu znacznie większych rozmiarów uprawiane były

w doniczkach wypełnionych mieszanką perlitu, wermikulitu i piasku. Pobrane próbki tkanek roślinnych zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

W przypadku linii *myb34*, *myb51*, *myb122*, *cyp83b1*, *cyp83b1 myb34*, *cyp83b1 myb51* i *cyp83b1 myb122*, wykorzystywanych do analiz IAA, nasiona wysiewano do doniczek, które wstawiano do komory hodowlanej zaprogramowanej na warunki krótkiego dnia (jak wyżej). Po około 2 tygodniach siewki przenoszono do krążków torfowych Jiffy-7 o średnicy 44 mm (Jiffy, Niemcy) i hodowano nadal w warunkach krótkiego dnia do osiągnięcia wieku 6 tygodni.

Do przeprowadzenia transformacji roślin linii *C. rubella* Gr1 i *A. thaliana myb34/51/122*, nasiona wysiewano jak opisano powyżej, a następnie po około 2 tygodniach siewki przenoszono do doniczek wypełnionych ziemią. Rośliny hodowano w warunkach krótkiego dnia do osiągnięcia wieku 6 tygodni, po czym przeniesiono je do komory hodowlanej o warunkach długiego dnia gdzie wzrastały do momentu zawiązania kwiatostanów.

3.3. Identyfikacja ortologów i analizy filogenetyczne

Sekwencje kodujące genów oraz białek zostały pobrane z dostępnych baz danych:

- Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) dla *A. thaliana*, *A. lyrata*, *C. rubella* i *C. grandiflora*
- Genome Prairie (<http://www.camelinadb.ca/>) dla *Cam. sativa*
- *Cardamine hirsuta* genetic and genomic resource (<http://chi.mpipz.mpg.de/>) dla *Car. hirsuta*

Dla *N. paniculata* surowe sekwencje genomowe pobrano z baz danych CoGe (<https://genomeevolution.org/coge/>)

Dla *A. thaliana* sekwencje znanych genów i białek związanych z biosyntezą glukozyzolanów wyszukano na podstawie ich adnotacji w sekwencji genomowej. W przypadku *C. rubella*, *C. grandiflora*, *A. lyrata*, *Cam. sativa* i *Car. hirsuta* zastosowano algorytm BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool) w celu znalezienia genów i białek o wysokim podobieństwie do sekwencji znanych z *A. thaliana*. W przypadku *Cam. sativa* wykorzystaliśmy również opublikowaną listę potencjalnych ortologów badanych genów [36]. Ze względu na brak adnotacji genów dla genomu *N. paniculata* oraz brak sekwencji kodujących i białkowych, sekwencje wybranych

ortologów ustaliliśmy wykorzystując algorytm BLAST, a następnie porównując dostępną sekwencję genomową dla tego gatunku z sekwencjami kodującymi z innych gatunków, co pozwoliło przewidzieć lokalizację intronów i eksonów. Dysponując przypuszczalną sekwencją kodującą danego genu w *N. paniculata*, przepisaliśmy ją na odpowiadającą jej sekwencję białkową za pomocą narzędzia Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>). Listę wszystkich wyszukanych lub zidentyfikowanych ortologów badanych genów umieszczono w Tabeli 2.

Tabele podobieństwa sekwencji białkowych wybranych enzymów przygotowano za pomocą oprogramowania MatGAT v2.01. Analizy filogenetyczne wykonano za pomocą oprogramowania MEGA v10.1 stosując metodę najbliższego sąsiada (ang. neighbor-joining). Wyrównanie wybranych sekwencji białkowych przeprowadzono również w programie MEGA v10.1 przy użyciu algorytmu MUSCLE (ang. Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), następnie wyniki eksportowano do formatu FASTA i edytowano graficznie za pomocą oprogramowania Jalview v2.1.

Tabela 2. Lista analizowanych genów związanych z biosyntezą glukozynolanów w *A. thaliana* oraz ich zidentyfikowanych ortologów w *C. rubella*, *C. grandiflora* i *Cam. sativa*.

	<i>A. thaliana</i>	<i>C. rubella</i>	<i>C. grandiflora</i>	<i>Cam. sativa</i>
Aktyna	At2g37620.1	Carubv10023442	Cagra.18121s0003.1	Csa04g051240.1 Csa06g040380.1 Csa05g016060.1
CYP79B2	At4g39950.1	Carubv10004524	Cagra.5414s0021.1	Csa11g003080.1 Csa10g002730.1 Csa12g003200.1
CYP79B3	At2g22330.1	Carubv10025388	Cagra.7028s0001.1	Csa16g044070.1 Csa07g052430.1 Csa09g086670.1
CYP79F1	At1g16410.1	Carubv10010983	Cagra.0824s0013.1	Csa17g021980.1 Csa14g020530.1 Csa03g020150.1
CYP79F2	At1g16400.1	Carubv10011470	Cagra.0824s0012.1	Csa17g021960.1 Csa14g020510.1 Csa03g020120.1
CYP83A1	At4g13770.1	Carubv10004635	Cagra.4326s0004.1	Csa00382s010.1 Csa10g033000.1 Csa12g061690.1
CYP83B1	At4g31500.1	Carubv10007516	Cagra.3807s0022.1	Csa11g011890.1 Csa10g011030.1 Csa12g014260.1

MYB28	At5g61420.2	Carubv10027861	Cagra.0542s0036.1	Csa02g068380.1 Csa11g097210.1 Csa18g034740.1
MYB29	At5g07690.1	Carubv10001328	Cagra.2925s0017.1	Csa08g056690.1 Csa13g009720.1 Csa20g010130.1
MYB34	At5g60890.1	Carubv10027524	Cagra.2519s0060.1	
MYB51	At1g18570.1	Carubv10009563	Cagra.4153s0023.1	Csa03g022420.1 Csa03g022440.1 Csa14g023900.1
MYB122	At1g74080.1	Carubv10020723	Cagra.0876s0043.1	Csa07g044350.1 Csa09g078700.1 Csa16g038030.1
SUR1	At2g20610.1	Carubv10013645	Cagra.2516s0008.1	Csa15g082360.1 Csa19g048070.1 Csa01g043660.1

3.4. Izolacja całkowitego RNA i analiza ekspresji genów

Do izolacji całkowitego RNA używano około 50 mg zamrożonej tkanki roślinnej. Izolację prowadzono za pomocą zestawu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Niemcy) zgodnie z załączonym przez producenta protokołem. Dodatkowo zastosowano również enzym DNAza I (Qiagen, Niemcy) w celu uniknięcia zanieczyszczenia RNA genomowym DNA. Stężenie i jakość wyizolowanego RNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, USA). Następnie 2 µg RNA poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu Omniscript RT Kit (Qiagen, Niemcy) według załączonego protokołu. W celu spowolnienia degradacji RNA w tym procesie zastosowano inhibitor rybonukleaz RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega, USA). Otrzymane w wyniku odwrotnej transkrypcji komplementarne DNA (cDNA) zostało następnie rozcieńczone do stężenia 25 ng/µl.

W kolejnym kroku uzyskane cDNA zostało wykorzystane jako matryca w ilościowej reakcji PCR z odwrotną transkrypcją (ang. quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR). Do reakcji tej zastosowano bufor zawierający polimerazę iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, USA) oraz termocykler CFX Real-Time PCR Detection System (Biorad, USA), stosując gen kodujący aktynę jako gen referencyjny. Sekwencje starterów zastosowane dla poszczególnych genów zaprojektowaliśmy przy użyciu oprogramowania BioEdit v7 (Tabela 3). Dla heksaploidalnego gatunku *Cam. sativa* zaprojektowaliśmy uniwersalne pary starterów, które pasują do wszystkich

(zazwyczaj trzech) zidentyfikowanych ortologów poszczególnych genów, pozwalając ewentualnie na niedopasowanie pojedynczych nukleotydów. Podobnie przygotowaliśmy uniwersalne pary starterów dla blisko spokrewnionych *C. rubella* i *C. grandiflora*. Te same startery wykorzystaliśmy do analiz *C. bursa pastoris*, dla której nie ma dostępnej sekwencji genomowej. Wszystkie sekwencje starterów użytych do analiz RT-qPCR zostały uwzględnione w Tabeli 3. Wszystkie reakcje przeprowadzono zgodnie z protokołem zawartym w Tabeli 4.

Względny poziom ekspresji badanych ortologów genów wyznaczyliśmy przy użyciu metody ΔCt w odniesieniu do poziomu ekspresji genu kodującego aktynę według wzoru:

$$\Delta Ct = 2^{(Ct_a - Ct_b)}$$

gdzie: ΔCt – względna wartość ekspresji, Ct_a – wartość cyklu progowego dla genu referencyjnego, Ct_b – wartość cyklu progowego dla badanego genu.

W niektórych przypadkach, otrzymane wartości względnej ekspresji badanych genów zostały dodatkowo znormalizowane dzieląc każdą z nich przez maksymalną wartość uzyskaną dla danego genu w wybranym gatunku.

Tabela 3. Lista starterów użytych do analiz RT-qPCR.

<i>A. thaliana</i>	
At_Aktyna_F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
At_Aktyna_R	AATTTCGCTCTGCTGTTG
At_CYP79B2_F	AACAAAAAGAAACCGTATCTGCCAC
At_CYP79B2_R	TCCTAACTTCACGCATGCTATCTC
At_CYP79B3_F	ACCGCTGATGAAATCAAACC
At_CYP79B3_R	TCCGACGACTCTATCGATCT
At_CYP79F1_F	ACCACATCATTACCATACCCTT
At_CYP79F1_R	ATGCCGGCAAAGTTGAAAC
At_CYP79F2_F	AACCCACACCATCACCATAAA
At_CYP79F2_R	CGCAGCTTCCAACATATTCAAC
At_CYP83A1_F	CACATCGTGGCCATGAGTT
At_CYP83A1_R	ACTTCGGATTTATCCGCGG
At_CYP83B1_F	GAAATCTCTCCGGTTACCTC
At_CYP83B1_R	TAGCTCGGCCGAGGAGATCA
At_MYB28_F	ACGTTTGATGGAACAGGGTATT
At_MYB28_R	CCATCATTGCTGCTAAGCTC
At_MYB29_F	GCTCCTGATCGATAAGGGAATC
At_MYB29_R	GGCGCCTAGTATAGTTCCC

At_MYB34_F	GTGAAGGTGGATGGCGTACT
At_MYB34_R	CCACTTGTTACCCCTTAAGAGCATGA
At_MYB51_F	CCTCCGTTAACAATCCTCTA
At_MYB51_R	CATCCTCGTGAAGAAACCTC
At_MYB122_F	GTTGTAGAGCAGAAGGGTTGA
At_MYB122_R	TCTCAATCTGCAGCTTTTGC
At_SUR1_F	CGCAAGTTTGATCTTCTTCCCGA
At_SUR1_R	CCGTCTCTGCAACCTTTTTG
<i>C. rubella / C. grandiflora / C. bursa-pastoris</i>	
Cr_Aktyna_F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
Cr_Aktyna_R	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG
Cr_CYP79B2_F	CGGATCTCATCACTCCCACT
Cr_CYP79B2_R	CTTTAGCATGGCCGGAATCA
Cr_CYP79B3_F	ACCGCTGATGAAATCAAACC
Cr_CYP79B3_R	GCCGACGACTCTGTCAATCT
Cr_CYP79F1_F	GATGAAAAGAGTGATCACAACGG
Cr_CYP79F1_R	GCCACAAGATGATGCTTTTC
Cr_CYP79F2_F	CGAAACTGAGAAAAGTGATCACG
Cr_CYP79F2_R	CCTCAAGATGGTGTTTTTCCGC
Cr_CYP83A1_F	GCTGGATGGGCTAAAAAGTAC
Cr_CYP83A1_R	CGAGAACAAGTGGTTCATCC
Cr_CYP83B1_F	GAAACCTCTCCGGCTACCTC
Cr_CYP83B1_R	CTAGCTTTGCCGAGGAGATG
Cr_MYB28_F	AGCTCAATGCCTTCTCTGT
Cr_MYB28_R	CAGAAGCCGACAATATATCTTTG
Cr_MYB29_F	ATACGGTGCTTCCTTGACATC
Cr_MYB29_R	GTTGTCCATCTGAAGTTGATCACTA
Cr_MYB34_F	GTGAAGGTGGATGGCGTACT
Cr_MYB34_R	CCACTTGTTACCCCTTAAGAGCATGA
Cr_MYB51_F	CCTCCGTTAACAATCCTCCA
Cr_MYB51_R	CGTCCTCGTGAAGAAACCTC
Cr_MYB122_F	GCTGTAGAGCAGAAGGGTTGA
Cr_MYB122_R	TCTCAGTCTGCAGCTTTTGC
Cr_SUR1_F	CGCAAGTATGATCTTCTTCTGA
Cr_SUR1_R	CCGTCTCTGCAACCTTTTTG
<i>Cam. sativa</i>	
Cs_Aktyna_F	CTTCATGCTGCTTGGTGC
Cs_Aktyna_R	TTAATTCTCCAGCTATGTATG
Cs_CYP79B2_F	GAACACTTTTACCTCAAACCTC
Cs_CYP79B2_R	TAGCATCGCCGGAATCATT
Cs_CYP79B3_F	GAGCATATGGATGCTATGTTTC
Cs_CYP79B3_R	GTCCCTAATAGAGATGAAAATGT
Cs_CYP79F1_F	ACATTTTTTCGGATGATGGGA
Cs_CYP79F1_R	CGTCGATTATGGGATTGTTG
Cs_CYP79F2_F	GTTTGGAAGGAGACATGTCA
Cs_CYP79F2_R	CCTCTTGACCATCAATATTCC
Cs_CYP83A1_F	GCTAGATGGGCCAAAAAATAC

Cs_CYP83A1_R	GTGAGAATACATGGTTCATCC
Cs_CYP83B1_F	TGAACCTCTTCAGCCCAA
Cs_CYP83B1_R	CCGTACTCATTGTAACGCTT
Cs_MYB28_F	GAGACAGAGAAGGCATTGA
Cs_MYB28_R	AGAACGGACAACGAGATCAA
Cs_MYB29_F	ATCATTGAGACATGGAGGAGA
Cs_MYB29_R	GTGATGAGACACCGAGAC
Cs_MYB51_F	TCCTCCGTTAACAATCATCTA
Cs_MYB51_R	TGTCTTGACGTTTCATAGACC
Cs_MYB122_F	CCATTGGAACACTCACATCAA
Cs_MYB122_R	GCTACTCTGTTTAAGAACCGA
Cs_SUR1_F	TCCTGCGATCCTGGAGAA
Cs_SUR1_R	ATCTCTCAAGTGCATCCTCAA
<i>N. paniculata</i>	
Np_Aktyna_F	CTTCATGCTGCTTGGTGC
Np_Aktyna_R	TTAACTCACCAGCTATGTATG
Np_CYP79B2_F	GAACACTTTTACCTCAAACCTC
Np_CYP79B2_R	TAGCATCGCCGGAATCATT
Np_CYP79B3_F	GAGCATATGGATGCTATGTTC
Np_CYP79B3_R	GTCTTGATAGAGATGAAAATGT
Np_CYP79F1_F	ACGTTTTCTCGGATGATGGGA
Np_CYP79F1_R	CTTCGATTATGGGATTGTTG
Np_CYP79F2_F	GTTTGGAAGGAGACATGTCA
Np_CYP79F2_R	CCTCTTGACCATCAAGATTCC
Np_CYP83A1_F	GCTGGATGGGCCAAACAATAC
Np_CYP83A1_R	GTGAGAACACGTGGTTCATCC
Np_CYP83B1_F	TGAACCTCTTCAGCCCAA
Np_CYP83B1_R	CCGTACTCATTGTAACGCTT
Np_MYB28_F	GAGACAGAGAAGGCATTGA
Np_MYB28_R	AGAACAGACAACGAGATCAAG
Np_MYB29_F	CATTGAGACATGAAGACAATGG
Np_MYB29_R	CTGATGAGACACCGAGAC
Np_MYB51_F	TCCTCCGTTAACAATCATCTA
Np_MYB51_R	GTCTTGACGTTTCGTACACC
Np_MYB122_F	CCATTGGAACACTCACATCAA
Np_MYB122_R	CAACTCTGTTCAAGAACCGA
Np_SUR1_F	GTAACGCTGAGAGGTGTCA
Np_SUR1_R	AGTGATAAAGTTACCGTCTTGC

Tabela 4. Program reakcji RT-qPCR

	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	3 min	
Denaturacja	95°C	30 sek	35
Przylączanie starterów	54°C	30 sek	
Wydłużanie starterów	72°C	1 min	
Ostateczne wydłużanie	72°C	5 min	

3.5. Ekstrakcja metabolitów

Próbki zawierające około 200 mg pobranych tkanek roślinnych, zamrożonych w ciekłym azocie, zostały wykorzystane do ekstrakcji w DMSO (2,5 µl na 1 mg świeżej tkanki) przy użyciu kulek cyrkoniowych o średnicy 1 mm (Carl Roth, Niemcy). Użycie dla wszystkich próbek stałej objętości rozpuszczalnika w przeliczeniu na masę świeżej tkanki umożliwiło porównanie zawartości poszczególnych glukozynolanów pomiędzy analizowanymi próbkami. Ekstrakcję przeprowadzono w homogenizatorze Precellys Evolution (Bertin Instruments, Francja) z częstotliwością wytrząsania 8000 rpm w czasie 2 x 30 sek dla liści, pędów i łuszczynek oraz 10000 rpm w czasie 3 x 30 sek dla korzeni. Po homogenizacji próby poddano wirowaniu przez 20 min z częstotliwością 15000 rpm w temperaturze 4°C. Następnie supernatant przeniesiono do fiolek chromatograficznych i wykorzystano do analiz LC-MS/MS.

3.6. Identyfikacja i analiza ilościowa glukozynolanów

Analizę jakościową i ilościową glukozynolanów przeprowadzono przy użyciu systemu do ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS), składającego się z chromatografu Acquity UPLC (Waters, USA) oraz spektrometru mas micrOTOF-Q (Bruker Daltonics, Niemcy). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono stosując kolumnę XSelect HSS T3 C18 (2,1 x 150 mm o średnicy uziarnienia 2,5 µm) (Waters, USA). Jako fazy ruchome zastosowano 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (rozpuszczalnik A) oraz 98% roztwór acetonitrylu w wodzie (rozpuszczalnik B) z przepływem 0,3 ml/min w następującym gradiencie: 0-0,5 min 100% A; 0,5-22 min od 0% B do 25% B; 22-29 min od 25% B do 80% B; 29-30 min od 80% B do 100% B z utrzymaniem tych warunków

do 35 min, a następnie 35-55 min 100% A dla stabilizacji kolumny. Widma masowe rejestrowano w trybie jonizacji ujemnej stosując metodę jonizacji przez elektrorozpraszanie i skanowano w zakresie 50-1000 m/z przy zastosowaniu następujących parametrów: napięcie w źródle jonów -4,5 kV; temperatura w źródle jonów 220°C, energia kolizji 25 eV.

Obecność wcześniej wspomnianych charakterystycznych jonów fragmentacyjnych wyraźnie sugeruje cząsteczkę glukozynolanu, a wartość m/z jonu molekularnego wskazuje masę deprotonowanej cząsteczki konkretnego związku. Uzyskane wartości m/z porównano z dostępną literaturą i bazami danych glukozynolanów zidentyfikowanych w gatunkach rodziny Brassicaceae [20]. Zawartość poszczególnych glukozynolanów oszacowano poprzez obliczenie powierzchni pików na chromatogramach jonów molekularnych. Powierzchnie pików wyznaczono przy pomocy oprogramowania DataAnalysis v4.1 (Bruker Daltonics, Niemcy). Całkowitą zawartość AG i IG obliczono poprzez zsumowanie powierzchni pików wszystkich glukozynolanów reprezentujących konkretną ich klasę.

3.7. Identyfikacji i analiza ilościowa IAOx oraz IAA i jego konjugatów

Identyfikację i analizy ilościowe IAOx oraz IAA i jego konjugatów z aminokwasami i cukrami przeprowadzono korzystając z systemu UPLC-MS/MS złożonego z chromatografu cieczowego Acquity UPLC (Waters, USA) sprzężonego z wysokorozdzielczym spektrometrem mas Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, USA). Rozdziału chromatograficznego dokonano stosując kolumnę Acquity UPLC HSS T3 C18 (2,1 x 50 mm o średnicy uziarnienia 1,8 μm) (Waters, USA). Jako fazy ruchome zastosowano 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (rozpuszczalnik A) oraz 98% roztwór acetonitrylu w wodzie (rozpuszczalnik B) z przepływem 0,4 ml/min w następującym gradiencie: 0-4 min od 0% B do 35% B; 4-6 min 35% B do 100% B z utrzymaniem tych warunków do 10 min, 10-10,3 min od 100% B do 0% B, a następnie 10,3-15 min 100% A dla stabilizacji kolumny. Jako metodę jonizacji zastosowano ESI w trybie jonizacji ujemnej, skanując widma masowe w zakresie 75-1000 m/z przy zastosowaniu następujących parametrów: napięcie w źródle jonów -3 kV; temperatura w źródle jonów 250°C, energia kolizji 15 eV.

W celu prawidłowej identyfikacji IAA w badanych ekstraktach z liści 6-tygodniowych roślin, przeprowadziliśmy analizę UPLC-MS/MS standardu tego związku, co ujawniło czas retencji oraz fragmentację tego związku w zastosowanych warunkach analitycznych. W trybie jonizacji ujemnej, IAA wykazuje w widmie fragmentacyjnym charakterystyczne sygnały przy m/z 116 i 130, co wskazuje odpowiednio jony fragmentacyjne $[C_8H_6N]^-$ i $[C_9H_8N]^-$. W przypadku widm fragmentacyjnych konjugatów IAA z cukrami i aminokwasami, poza wspomnianymi jonami potomnymi, widoczne są również sygnały przy m/z 174 odpowiadające deprotonowanej cząsteczce IAA. Wartości m/z jonów molekularnych konjugatów IAA zostały następnie porównane z dostępną literaturą w celu identyfikacji konkretnego związku [161, 162]. W przypadku IAOx nie uzyskaliśmy jego widma fragmentacyjnego przez co dalsze analizy przeprowadziliśmy w oparciu o sygnał przy m/z 173, przypuszczalnie odpowiadający deprotonowanej cząsteczce IAOx. Analizę zarówno IAOx, jak i IAA oraz jego konjugatów przeprowadziliśmy korzystając z oprogramowania Xcalibur v3.0 (Thermo Scientific, USA).

Uzyskane surowe dane LC-MS/MS ze wszystkich próbek zostały następnie przetworzone za pomocą oprogramowania MZmine v2.32 uwzględniając wykrywanie pików, tworzenie chromatogramów, ich wyrównanie pomiędzy próbkami oraz uzupełnienie luk w otrzymanej tabeli z danymi [163]. Poziom akumulacji poszczególnych związków wyznaczono poprzez obliczenie powierzchni pików na chromatogramach ich jonów molekularnych.

3.8. Izolacja genomowego DNA

Genomowe DNA gatunków *A. thaliana* i *C. rubella* izolowane było z liści około 4-tygodniowych roślin przy użyciu zmodyfikowanej metody Edwardsa. W pierwszym etapie ~50 mg zebranej tkanki roślinnej homogenizowano za pomocą mini tłuczków (Eppendorf, Niemcy) w 300 μ l buforu Edwardsa. Zhomogenizowana tkanka została następnie inkubowana przez 10 min w temperaturze 65°C z wytrząsaniem 500 rpm, po czym inkubowano ją kolejne 10 min na lodzie. W kolejnym etapie dodano 200 μ l chloroformu, wytrząsano do połączenia faz i wirowano przez 5 min w temperaturze 4°C z prędkością 15000 rpm. Następnie 200 μ l supernatantu przeniesiono do czystej próbówki, dodano 200 μ l zimnego izopropanolu, wymieszano i wirowano jak poprzednio. Po wirowaniu supernatant zlano zostawiając w próbówce jedynie osad, po czym dodano

500 µl 70% roztworu etanolu, wytrząsano i wirowano 3 min w temperaturze 4°C z prędkością 15000 rpm. Następnie powtórzono przemywanie etanolem i wirowanie, po czym supernatant zlano, a osad suszono w temperaturze pokojowej do całkowitego odparowania etanolu. Wyszuszony osad zawieszono w 100 µl sterylnej wody. Czystość i stężenie wyizolowanego genomowego DNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, USA).

3.9. Generowanie linii transgeniczných roślin

W celu wygenerowania linii transgeniczných *A. thaliana* i *C. rubella*, przygotowaliśmy konstrukcje genetyczne zawierające interesujące nas geny z odpowiednimi promotorami, w wektorze binarnym pAMPAT (<https://novoprolabs.com/vector/Vgmydooa>) otrzymanym z Max Planck Institute for Plant Breeding Research (Kolonia, Niemcy). Wektor ten wykorzystywany jest do transformacji roślin przy użyciu bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, a dodatkowo posiada sekwencje umożliwiające jego transformację i replikację w *Escherichia coli*. Jego sekwencja zawiera gen kodujący białko niosące odporność wobec dwóch antybiotyków: ampicyliny (w *E. coli*) i karbenicyliny (w *A. tumefaciens*), co umożliwia selekcję bakterii po transformacji tym wektorem. Dodatkowo, zawiera on również gen kodujący białko odporności wobec glufosynatu amonowego, będącego związkiem aktywnym herbicydu o nazwie BASTA, pozwalając na późniejszą selekcję roślin transgeniczných po transformacji.

3.9.1. Metodyka przygotowania DNA

Plazmidy amplifikowano w odpowiednich szczepach *E. coli* i oczyszczano przy pomocy zestawu Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, USA). Poprawność reakcji cięć enzymatycznych oraz reakcji PCR sprawdzano poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Produkty PCR oczyszczano za pomocą DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, USA). Produkty cięć enzymatycznych rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym a następnie oczyszczano za pomocą Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA).

3.9.2. Tworzenie konstrukcji genetycznej pAMPAT+prom_{AtMYB34}+AtMYB34 przy użyciu metody USER

Metoda inżynierii DNA USER opiera się na generowaniu lepkich końców DNA za pomocą mieszaniny enzymów USER (New England Biolabs, USA), która specyficznie usuwa fragment jednej nici produktu reakcji PCR od 5' końca do wprowadzonej reszty deoksyurydyny (dU) włącznie. Startery do reakcji PCR zaprojektowane są w taki sposób, aby ich sekwencje zawierały pojedyncze reszty dU wprowadzane są do projektowanych starterów w miejscu reszty deoksytymidyny w odległości 6-10 nukleotydów od końca 5' [164]. W przypadku wektora odpowiednie lepkie końce generowane są przez działanie pary enzymu restrykcyjnego i nacinającego (ang. nicking enzyme). Wektor pAMPAT został wcześniej zmodyfikowany w naszym Zakładzie, tak aby zawierał kasetę AsiSI/Nb.bsmI. Plazmid ten został strawiony restrykcyjnie enzymem AsiSI, co spowodowało jego linearyzację. Oczyszczony produkt nacięto enzymem Nb.bsmI tworząc specyficzne lepkie końce.

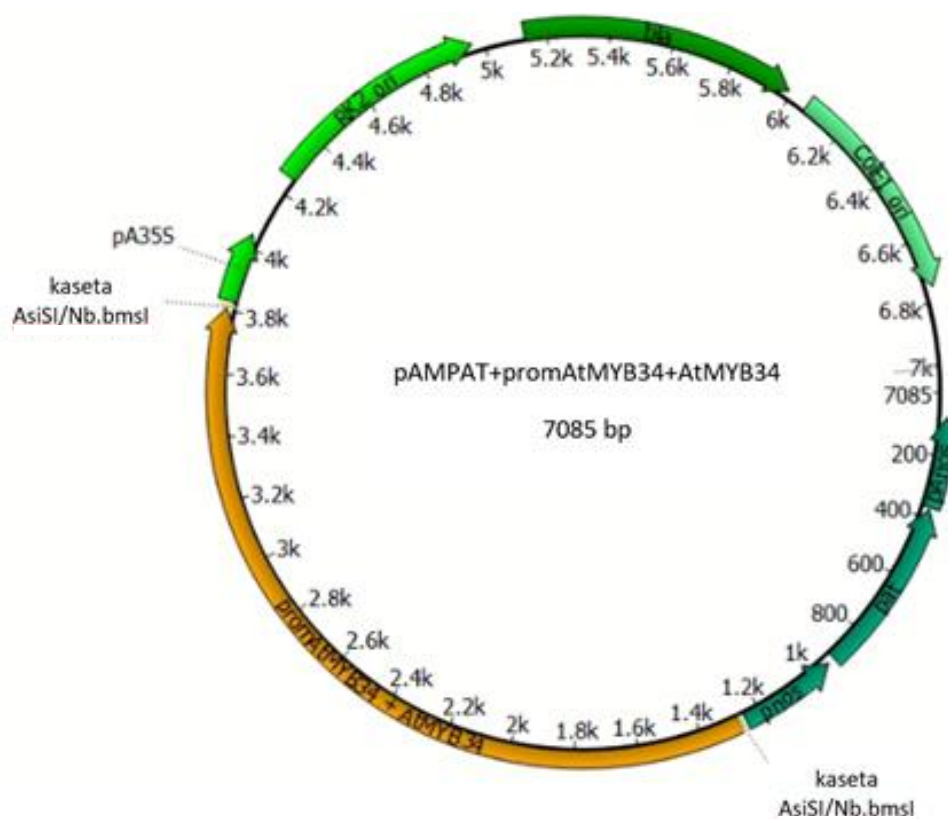
Amplifikację fragmentu DNA zawierającego gen *AtMYB34* wraz z jego natywnym promotorem (jako promotor przyjęto region DNA o długości 1345 par zasad poprzedzających kodon start) przeprowadzono za pomocą reakcji PCR stosując polimerazę *PfuTurbo* Hotstart (Agilent, USA), która wprowadza naprawę błędów oraz umożliwia syntezę produktów zawierających dU. Do reakcji użyto starterów nakładających się z odpowiednimi sekwencjami wektora (Tabela 5) i prowadzono ją zgodnie z programem zawartym w Tabeli 6. W kolejnym kroku oczyszczony produkt reakcji PCR oraz wcześniej przygotowany wektor zostały użyte do reakcji z udziałem mieszaniny enzymów USER zgodnie z protokołem producenta, a otrzymana mieszanina reakcyjna została wykorzystana do transformacji bakterii *E. coli* (Ryc. 10).

Tabela 5. Sekwencje starterów wykorzystane do amplifikacji wybranych fragmentów genomowego DNA *A. thaliana* i *C. rubella* przy użyciu klonowania USER i metody klasycznej.

	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')
klonowanie USER	AtMYB34_F	CGTGCGAUGCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG
	AtMYB34_R	CACGCGAUTCAGACAAAGACTCCAACCATATTG
klasyczna metoda klonowania	promAtMYB34_F	ATATATATATATGGCGCGCCGGTGAGCACAAACTTGTGTT
	promAtMYB34_R	TTAGCCTGCAGGCTCTCTGCTCTTCTTCTGA
	CrMYB34_F	ATATAGCCTGCAGGATGGTGAGGACACCATGTTG
	CrMYB34_R	GCGCGGAATTCGTGTTCTTATTCGTTCCAACAACC

Tabela 6. Program reakcji PCR dla amplifikacji fragmentów genomowego DNA przy użyciu polimeraz *PfuTurbo* Hotstart i Phusion High-Fidelity.

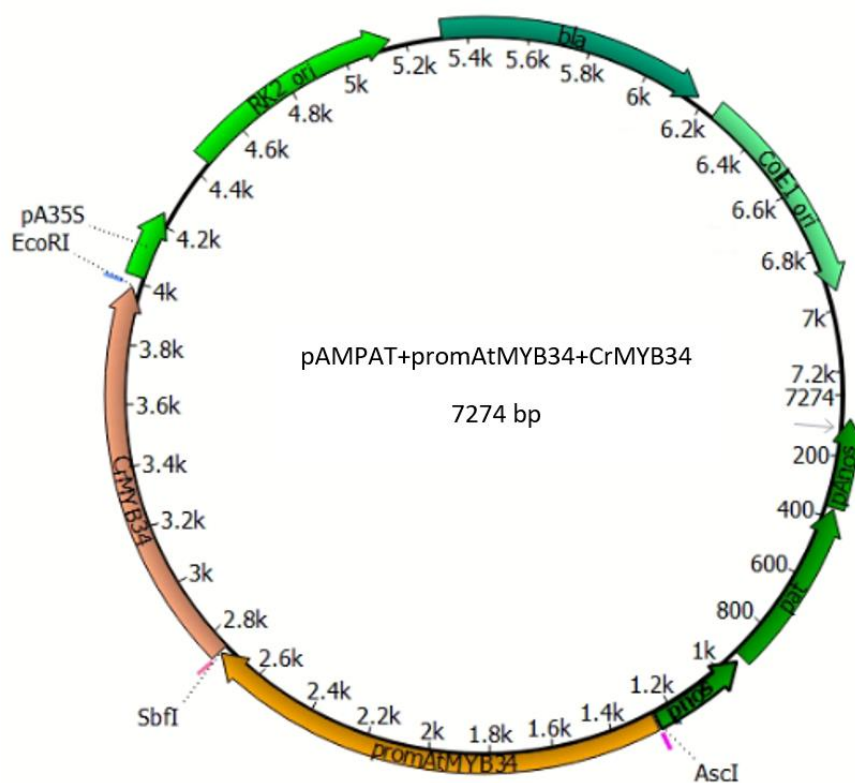
	<i>PfuTurbo</i> Hotstart	Phusion High-Fidelity
Wstępna denaturacja	95°C, 2 min	98°C, 30 sek
Denaturacja	95°C, 30 sek	98°C, 10 sek
Przyłączanie starterów	62°C, 30 sek	65°C, 30 sek
Wydłużanie starterów	72°C, 4 min	72°C, 1 min
Ostateczne wydłużanie	72°C, 10 min	72°C, 5 min



Ryc. 10. Mapa plazmidu pAMPAT wraz genem *AtMYB34* i jego natywnym promotorem otrzymanego za pomocą metody USER.

3.9.3. Tworzenie konstrukcji genetycznej pAMPAT+prom_{AtMYB34}+CrMYB34 przy użyciu enzymów restrykcyjnych

Wektor pAMPAT strawiono restrykcyjnie enzymami AscI i EcoRI. Przeprowadzono amplifikację regionu promotorowego (długość jak powyżej) genu *AtMYB34* z genomowego DNA *A. thaliana* oraz sekwencji genu *CrMYB34* z genomowego DNA ekotypu Monte Gargano gatunku *C. rubella*. Do reakcji tych wykorzystano startery z dołączonymi miejscami restrykcyjnymi (Tabela 5) oraz polimerazę Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific, USA), posiadającą aktywność naprawy błędów, zgodnie z programem reakcji PCR zawartym w Tabeli 6. Produkty reakcji strawiono restrykcyjne enzymami AscI i SbfI (New England Biolabs, USA) dla promotora *AtMYB34* oraz SbfI i EcoRI (New England Biolabs, USA) dla sekwencji genu *CrMYB34*. Oczyszczone produkty PCR oraz strawiony wektor pAMPAT zostały użyte do ligacji stosując enzym T4 DNA Ligase (Promega, USA) zgodnie z załączonym przez producenta protokołem (Ryc. 11). Otrzymana mieszanina reakcyjna po inkubacji i dezaktywacji enzymu została wykorzystana do transformacji bakterii *E. coli*.



Ryc. 11. Mapa plazmidu pAMPAT wraz genem *CrMYB34* i promotorem genu *AtMYB34* otrzymanego przy zastosowaniu enzymów restrykcyjnych.

3.9.4. Transformacja bakterii *E. coli*

50 μ l zawiesiny glicerolowej elektrokompetentnych bakterii *E. coli* szczepu DH10 β (New England Biolabs, USA), przechowywanej w temperaturze -80°C , rozmrożono i inkubowano na lodzie przez 30 min. Następnie do bakterii dodano 10 μ l mieszaniny po ligacji lub po reakcji z udziałem mieszaniny enzymów USER. Elektroporację przeprowadzono w kuwecie o szerokości szczeliny 0,1 cm (Biorad, USA), przy użyciu aparatu MicroPulser (Biorad, USA), stosując pojedynczy impuls elektryczny o napięciu 1,8 kV. W celu regeneracji, bakterie natychmiast zawieszono w 500 μ l płynnej pożywki LB i inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 220 rpm przez 1 h. Następnie 200 μ l zawiesiny bakteryjnej wyłożono na szalki selekcyjne zawierające pożywkę LB wraz z agarem i ampicyliną o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ w celu przeprowadzenia selekcji. Zamknięte szalki bakteryjne inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 h. Wyrośnięte pojedyncze kolonie zawieszono w 3 ml płynnej pożywki LB zawierającej ampicylinę o tym samym stężeniu co poprzednio i inkubowano ponownie przez 16 h w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 200 rpm. Z bakterii izolowano plazmid i potwierdzano wstępnie otrzymanie zaplanowanej konstrukcji genetycznej poprzez reakcję PCR, stosując startery użyte do klonowania, oraz poprzez trawienie restrykcyjne weryfikujące unikalny wzór trawienia otrzymanego plazmidu. W przypadku pozytywnego wyniku tych reakcji, zlecono sekwencjonowanie uzyskanego plazmidu w celu potwierdzenia sekwencji i wykluczenia obecności mutacji punktowych.

3.9.5. Transformacja bakterii *A. tumefaciens*

50 μ l przygotowanych w naszym Zakładzie elektrokompetentnych bakterii *A. tumefaciens* szczepu GV3101::pMP90RK (uzyskane z Max Planck Institute for Plant Breeding Research w Kolonii; szczep odporny wobec rifampicyny i kanamycyny), przechowywanych w temperaturze -80°C , rozmrażano i inkubowano na lodzie przez 30 min. Do bakterii dodano 1 μ l roztworu oczyszczonego plazmidu i przeprowadzono elektroporację w analogiczny sposób, jak w przypadku *E. coli*, zmieniając jedynie napięcie prądu na 2,2 kV. Następnie bakterie zawieszono w 900 μ l pożywki YEB, po czym inkubowano je w temperaturze 28°C z wytrząsaniem 220 rpm przez 1 h. W kolejnym kroku 100 μ l zawiesiny bakteryjnej wykładano na szalki selekcyjne wypełnione pożywką YEB z agarem oraz antybiotykami: karbenicyliną (100 $\mu\text{g/ml}$), rifampicyną (50 $\mu\text{g/ml}$) i kanamycyną (50 $\mu\text{g/ml}$). Szalki z bakteriami inkubowano

w temperaturze 28°C przez około 1,5 doby. Pojedyncze kolonie bakteryjne zawieszono w 2 ml płynnej pożywki YEB z antybiotykami o tym samym stężeniu i ponownie inkubowano w temperaturze 28°C z wytrząsaniem 200 rpm przez 1,5 doby. Następnie w celu weryfikacji obecności plazmidu w transformowanych bakteriach *A. tumefaciens*, przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem otrzymanych zawiesin bakteryjnych.

3.9.6. Transformacja kwiatostanów

Bakterie *A. tumefaciens* zawierające odpowiednie plazmidy zostały namnożone w 2 ml płynnej pożywki YEB z antybiotykami (jak wyżej). Inkubację prowadzono w 28°C z wytrząsaniem 200 rpm przez 1,5 doby. Następnie 100 µl zawiesiny bakteryjnej przeniesiono do kolby stożkowej wypełnionej 20 ml pożywki YEB z antybiotykami i ponownie inkubowano w tych samych warunkach kolejne 1,5 doby. W kolejnym kroku przeniesiono 500 µl zawiesiny bakteryjnej do 10 ml pożywki YEB z antybiotykami, nadal prowadząc inkubację w tych samych warunkach. W trakcie inkubacji, co około 1 h mierzono OD₆₀₀ zawiesin bakteryjnych, a kiedy jego wartość osiągnęła ~0,6 zawiesinę zwirowano w temperaturze pokojowej z prędkością 4000 rpm. Następnie supernatant zlano pozostawiając jedynie osad, który zawieszono w 50 ml 5% roztworu sacharozy i dodano 30 µl związku powierzchniowo czynnego Silwet L-77. Kwiatostany dojrzałych, około 8-10 tygodniowych roślin linii *A. thaliana myb34/51/122* i *C. rubella* Gr1 zanurzano przez 30 sekund w przygotowanych zawiesinach *A. tumefaciens*, a następnie rośliny umieszczono w ciemności na 24 h. Po tym czasie rośliny ponownie przeniesiono do komory hodowlanej o warunkach długiego dnia i uprawiano je do momentu osiągnięcia dojrzałości i wydania nasion. Wsuszone nasiona zebrano, oczyszczono z pozostałości łuszczynek nasiennych i poddawano stratyfikacji w temperaturze 5°C przez co najmniej 2 tygodnie.

3.9.7. Selekcja roślin transgenicznych

Nasiona zebrane z roślin pokolenia T₀ zostały wysiane do plastikowych tacek wypełnionych ziemią. Po około tygodniu od wykiełkowania nasion, siewki pokolenia T₁ zostały spryskane roztworem herbicydu BASTA, zawierającym glufosynat amonowy o stężeniu 75 mg/l. Oprysk powtórzono 2-krotnie w tygodniowych odstępach czasu. Następnie siewki wykazujące odporność wobec tego herbicydu zostały przeniesione do osobnych doniczek i uprawiane w komorze hodowlanej przez kolejne 3-4 tygodnie. Z 5-6

tygodniowych roślin pobierano próbki liści do analiz RT-qPCR, w celu potwierdzenia ekspresji wprowadzonego genu i selekcji kilku z nich, które wykazywały najwyższy poziom ekspresji. Z tych roślin zbierano nasiona i potwierdzano ekspresję transgenu w pokoleniu T₂. Dla wybranych dwóch linii przeprowadzono doświadczenia mające na celu skorelowanie ekspresji transgenu z akumulacją glukozynolanów (analizy LC-MS/MS).

4. Wyniki

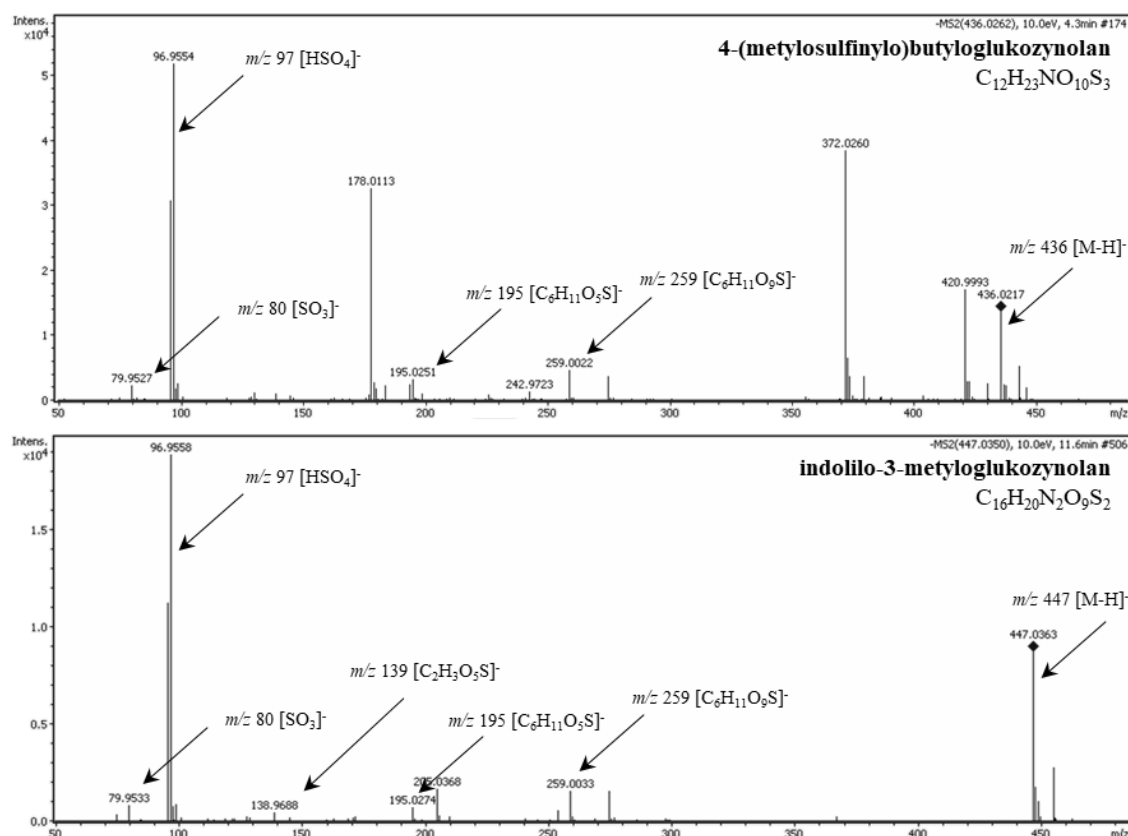
4.1. Identyfikacja glukozyzolanów za pomocą metody LC-MS/MS

W celu zbadania obecności glukozyzolanów w blisko spokrewnionych ze sobą gatunkach Camelinae, przeprowadziliśmy niecelowane analizy LC-MS/MS tych związków w różnych organach i stadiach rozwojowych roślin reprezentujących to plemię. Do naszych analiz wybraliśmy rośliny należące do kladu II Camelinae: *C. rubella*, *C. grandiflora*, *C. bursa-pastoris*, *Cam. sativa* oraz *N. paniculata* (Ryc. 2), które według fragmentarycznych doniesień literaturowych mogą posiadać defekt w produkcji glukozyzolanów. Jako gatunek referencyjny wykorzystaliśmy należącą do kladu I tego samego plemienia roślinę modelową *A. thaliana* (Ryc. 2), która zgodnie z doniesieniami literaturowymi cechuje się wysoką zawartością glukozyzolanów we wszystkich organach, podobnie jak zdecydowana większość gatunków Brassicaceae opisanych w literaturze. Aby nasze badania były w jak najwyższym stopniu kompletne, przeprowadziliśmy analizy ekstraktów z 4- i 6-tygodniowych liści, jak również z korzeni, pędów, łuszczynek nasiennych i liści z dojrzałych, kwitnących roślin uprawianych w ziemi. Dodatkowo przeanalizowaliśmy również ekstrakty z 2-tygodniowych siewek rosnących w warunkach *in vitro*. Klasyfikację danego metabolitu do glukozyzolanów oparliśmy na obecności w jego widmie fragmentacyjnym sygnałów odpowiadających charakterystycznym jonom powstającym w czasie fragmentacji deprotonowanych cząsteczek glukozyzolanów: $[\text{SO}_3]^-$ przy m/z 80, $[\text{HSO}_4]^-$ przy m/z 97, $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{S}]^-$ przy m/z 195 oraz $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{S}]^-$ przy m/z 259 (Ryc. 5, Ryc. 12, Tabela uzupełniająca 1). W widmach fragmentacyjnych niektórych glukozyzolanów obserwowaliśmy także obecność sygnału przy m/z 139, odpowiadającego jonowi $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_5\text{S}]^-$. Dodatkowo wartość m/z jonu molekularnego sugerowała masę deprotonowanej cząsteczki, pozwalając na kalkulację wzoru sumarycznego danego związku. Dzięki temu podejściu sklasyfikowaliśmy łącznie 30 metabolitów obecnych w analizowanych ekstraktach jako glukozyzolany.

Podczas analiz widm masowych dla poszczególnych gatunków roślin zaobserwowaliśmy występowanie serii deprotonowanych cząsteczek odpowiadających AG o wartościach m/z rosnących o 14 amu, wskazując na sukcesywne przyłączanie dodatkowych grup metylenowych $-\text{CH}_2-$, co umożliwiało ustalenie długości łańcuchów bocznych konkretnych AG. Każda dodatkowa grupa $-\text{CH}_2-$ łańcucha bocznego AG powoduje spadek polarności cząsteczki i prowadzi do przesunięcia elucji związku

w kierunku wyższych czasów retencji podczas rozdziału chromatograficznego, co również ułatwia prawidłową identyfikację. Dodatkowo, glukozynolany metyloalkilowe, metylosulfinyloalkilowe i metylosulfonyloalkilowe o tej samej długości łańcucha bocznego można łatwo rozróżnić na podstawie wartości m/z ich deprotonowanych cząsteczek, różniących się o 16 amu, co odpowiada wiązaniu dodatkowego atomu tlenu. Co więcej, zwiększona liczba atomów tlenu na końcu łańcucha bocznego zwiększa polarność związku i przesuwa jego elucję w kierunku niższych czasów retencji.

Aby rozróżnić i zidentyfikować dwa izomeryczne IG, 1MI3G i 4MI3G, przeprowadziliśmy analizę LC-MS/MS standardów obu tych związków, obserwując różne wzory ich fragmentacji. Fragmentacja deprotonowanej cząsteczki 1MI3G wykazuje obecność charakterystycznych jonów przy m/z 315, 341, 365 i 421, podczas gdy dla fragmentacji deprotonowanej cząsteczki 4MI3G zaobserwowano unikalne sygnały przy m/z 307, 345, 373 i 425. Dodatkowo, ugrupowanie metoksylowe w 1MI3G jest związane z dostarczającym elektrony atomem azotu, zmniejszając polarność cząsteczki w porównaniu z 4MI3G i w konsekwencji przesuując jego elucję z kolumny chromatograficznej w kierunku wyższych czasów retencji.



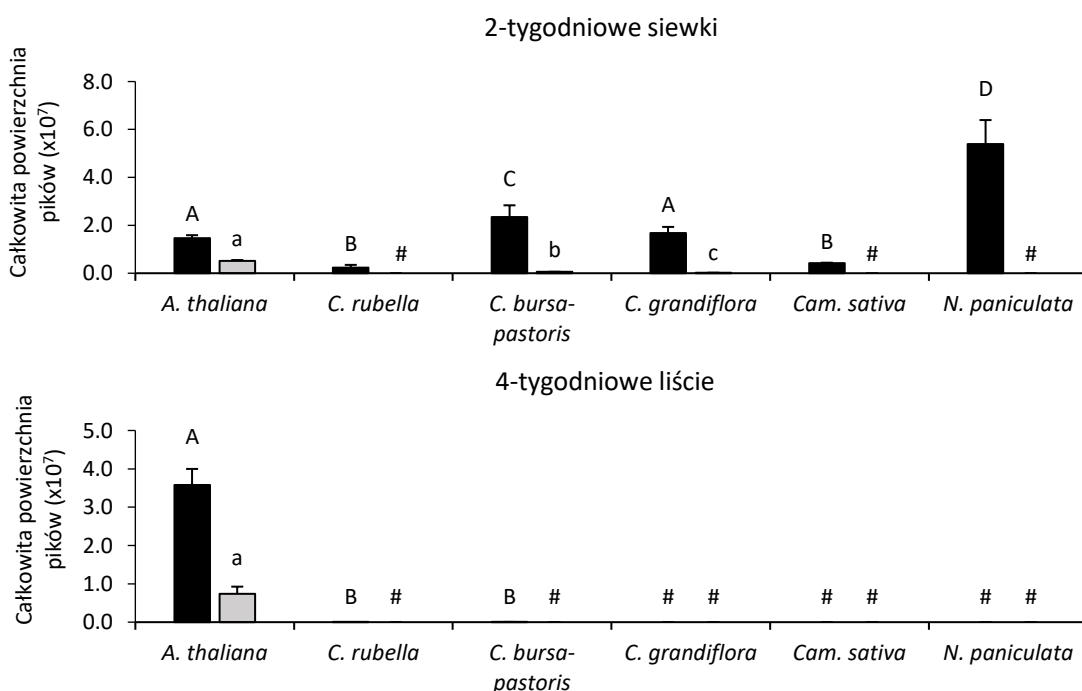
◀ **Ryc. 12.** Przykładowe widmo fragmentacyjne 4-(metylosulfinylo)butyloglukozynolanu i indolilo-3-metyloglukozynolanu w trybie jonizacji ujemnej. Strzałki wskazują sygnały najbardziej charakterystyczne dla cząsteczek glukozynolanów. $[M-H]^-$ - deprotonowana cząsteczka metabolitu

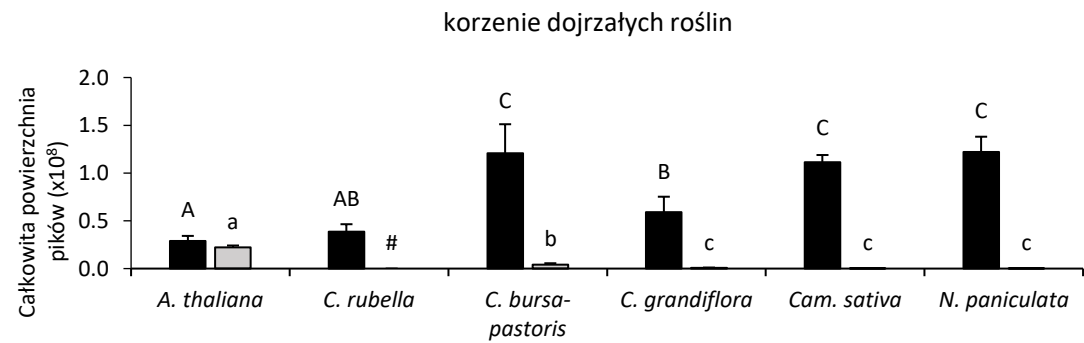
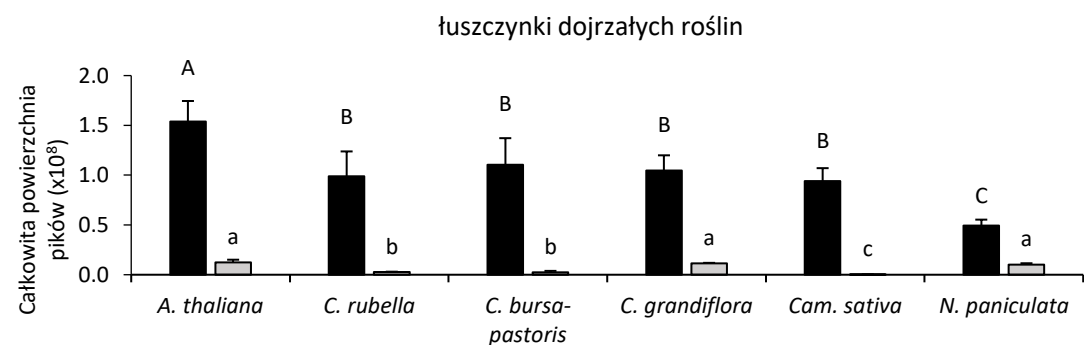
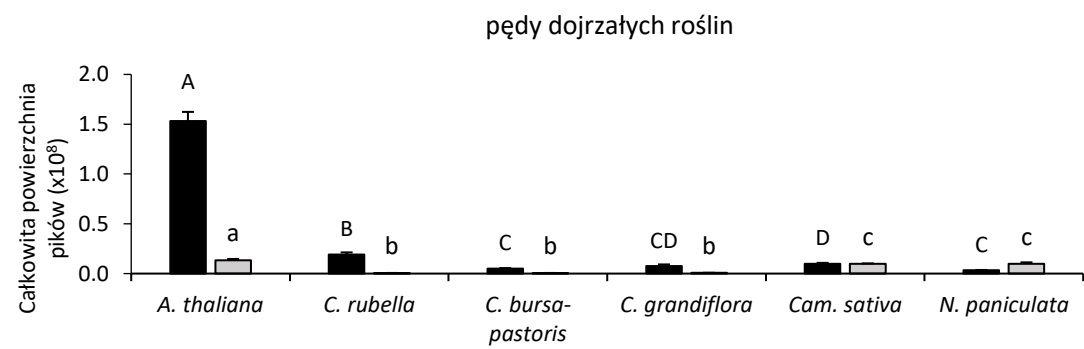
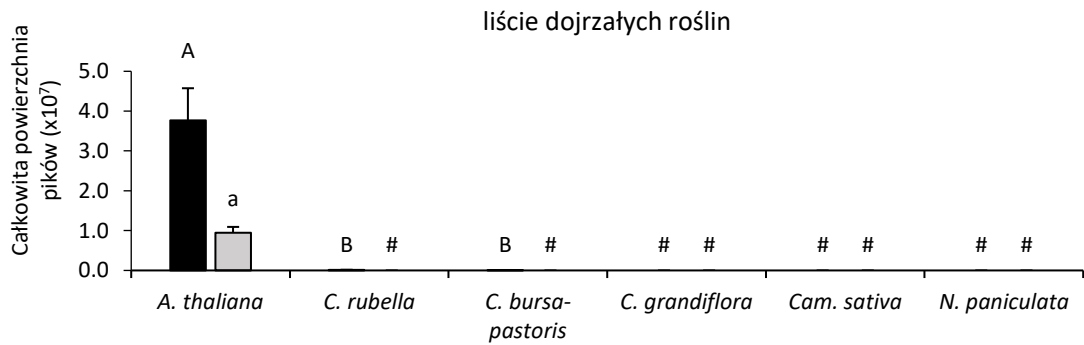
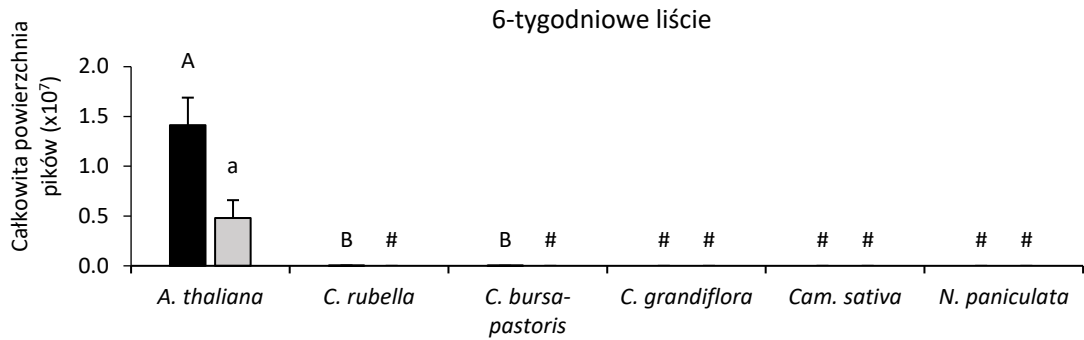
4.2. Zmiany zdolności do produkcji glukozynolanów w plemienu *Camelineae*

4.2.1. Całkowita akumulacja AG i IG

Poziom akumulacji poszczególnych glukozynolanów w badanych ekstraktach został określony ilościowo na podstawie powierzchni pików na chromatogramach jonów pseudomolekularnych. Całkowita akumulacja AG i IG została obliczona jako suma powierzchni pików uzyskanych dla poszczególnych glukozynolanów należących do danej klasy.

Analizy 2-tygodniowych siewek wykazały duże zróżnicowanie w poziomie akumulacji AG w badanych gatunkach. Najniższą akumulację tych metabolitów wykryliśmy w siewkach *C. rubella* i *Cam. sativa*, podczas gdy w *C. grandiflora* była ona porównywalna z *A. thaliana*, a w *C. bursa-pastoris* i *N. paniculata* wyraźnie wyższa (Ryc. 13). Dodatkowo nie wykryliśmy IG w siewkach *C. rubella*, *Cam. sativa* i *N. paniculata*, a w przypadku *C. bursa-pastoris* i *C. grandiflora* poziom ich akumulacji był powyżej granicy detekcji, wciąż jednak znacznie poniżej poziomu obserwowanego w *A. thaliana* (Ryc. 13).





■ AG □ IG

◀ **Ryc. 13.** Całkowita akumulacja glukozyolanów alifatycznych (AG) i indolowych (IG) w wybranych organach badanych gatunków. Wykres słupkowy wskazuje sumę powierzchni pików na chromatogramach jonów pseudomolekularnych. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z trzech niezależnych eksperymentów, każdy w trzech powtórzeniach biologicznych (n = 9). Istotnie różne grupy statystyczne zostały wskazane za pomocą testu ANOVA (P < 0,05; test post-hoc Tukey'a), duże litery odnoszą się do AG, zaś małe litery do IG. # - poniżej granicy detekcji

Inaczej niż w przypadku 2-tygodniowych siewek, nasze analizy wykazały jedynie śladowe ilości AG w liściach na różnych stadiach rozwojowych gatunków *C. rubella* i *C. bursa-pastoris*, podczas gdy w próbkach liści z *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata* nie wykryliśmy żadnych sygnałów pochodzących od tej grupy metabolitów (Ryc. 13). Poziom akumulacji AG w liściach badanych gatunków wyraźnie różni się od tego obserwowanego dla *A. thaliana*, gdzie AG produkowane są w dużych ilościach w liściach na wszystkich badanych stadiach rozwojowych. Ponadto, nie wykryliśmy żadnych IG w liściach badanych roślin, podczas gdy w *A. thaliana* ich akumulacja była wyraźna (Ryc. 13). Analizy te wykazały zatem obniżoną zdolność do biosyntezy AG w liściach badanych gatunków, a dodatkowo pokazały całkowite zahamowanie produkcji IG w tym organie.

W przeciwieństwie do liści, pędy wszystkich badanych gatunków wykazały poziom akumulacji zarówno AG, jak i IG wyraźnie ponad granicą detekcji (Ryc. 13). Wszystkie gatunki reprezentujące kład II plemienia Camelinae charakteryzowały się podobnym poziomem akumulacji AG w pędach, przy czym najniższy poziom zaobserwowaliśmy dla *C. bursa-pastoris* i *N. paniculata*, podczas gdy najwyższy obserwowany był w *C. rubella*. Pomimo, że we wszystkich gatunkach produkcja AG była wyraźnie dostrzegalna, to nawet w przypadku *C. rubella* wciąż była ona około 8-krotnie niższa niż w *A. thaliana*. W przypadku IG zaobserwowaliśmy jedynie śladowe ilości tych metabolitów w pędach *C. rubella*, *C. bursa-pastoris* i *C. grandiflora*, ale już w *Cam. sativa* i *N. paniculata* akumulacja była tylko nieznacznie niższa niż w *A. thaliana* (Ryc. 13).

Łuszczyнки nasienne niemal wszystkich badanych gatunków prezentowały zawartość AG na zbliżonym poziomie, nieco niższym niż w *A. thaliana*. Wyjątek stanowiły jednak łuszczyнки *N. paniculata*, w których akumulacja AG była wyraźnie niższa niż w pozostałych gatunkach (Ryc. 13). Jednak co ciekawe, zawartość IG w łuszczyńkach *C. grandiflora* i *N. paniculata* była na porównywalnym poziomie co

w *A. thaliana*, podczas gdy w *C. rubella*, *C. bursa-pastoris* i *Cam. sativa* była wyraźnie niższa, ale wciąż powyżej granicy detekcji (Ryc. 13).

Korzenie badanych gatunków w większości przypadków wykazały całkowitą akumulację AG na poziomie wyższym niż *A. thaliana*, z wyjątkiem *C. rubella*, gdzie nie zaobserwowaliśmy istotnej statystycznie różnicy względem *A. thaliana* (Ryc. 13). Z drugiej jednak strony zawartość IG w korzeniach badanych gatunków była wyraźnie niższa niż w *A. thaliana*, a w *C. rubella* nawet poniżej granicy detekcji (Ryc. 13).

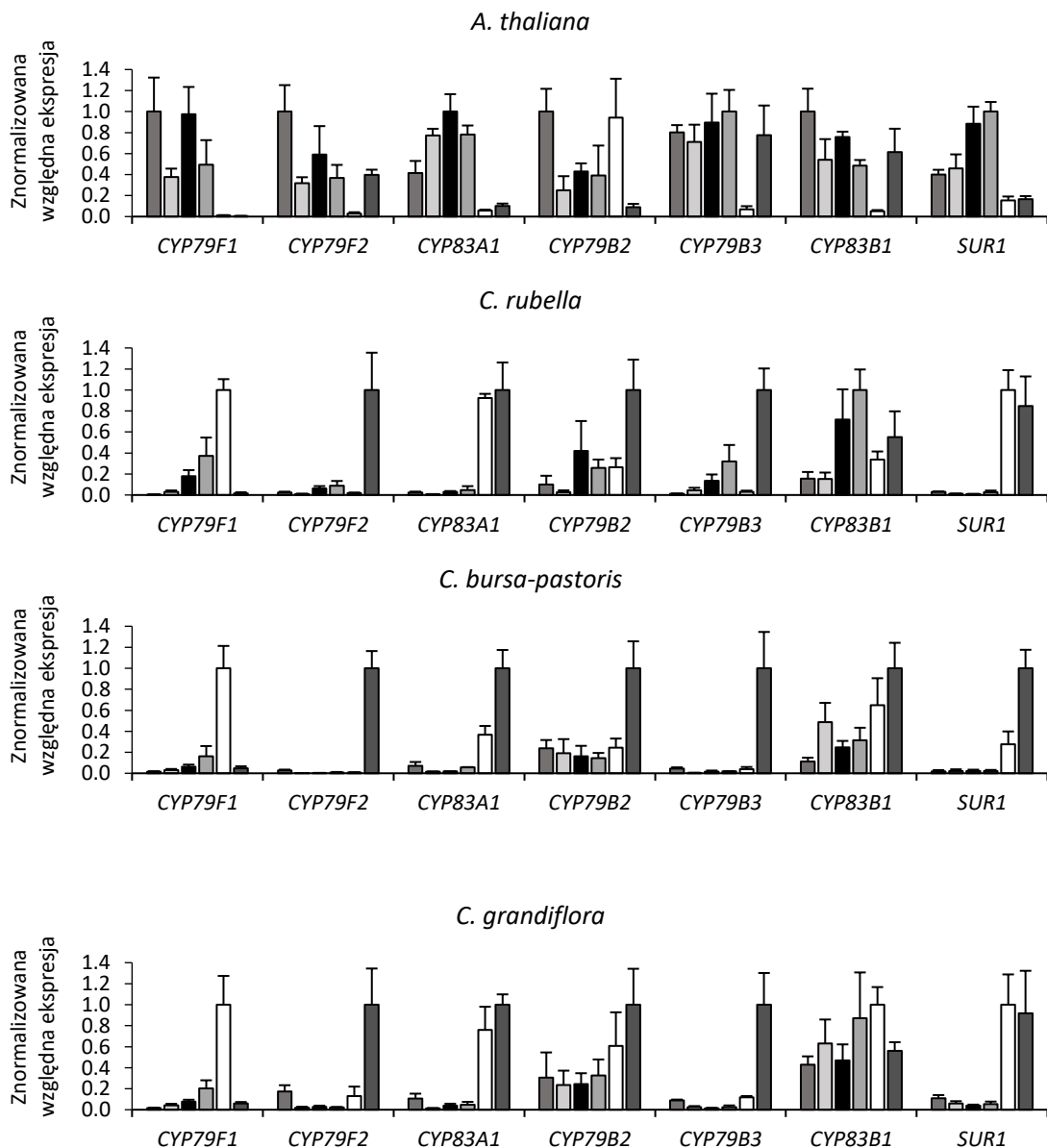
4.2.2. Ekspresja genów biorących udział w biosyntezie glukozyolanów

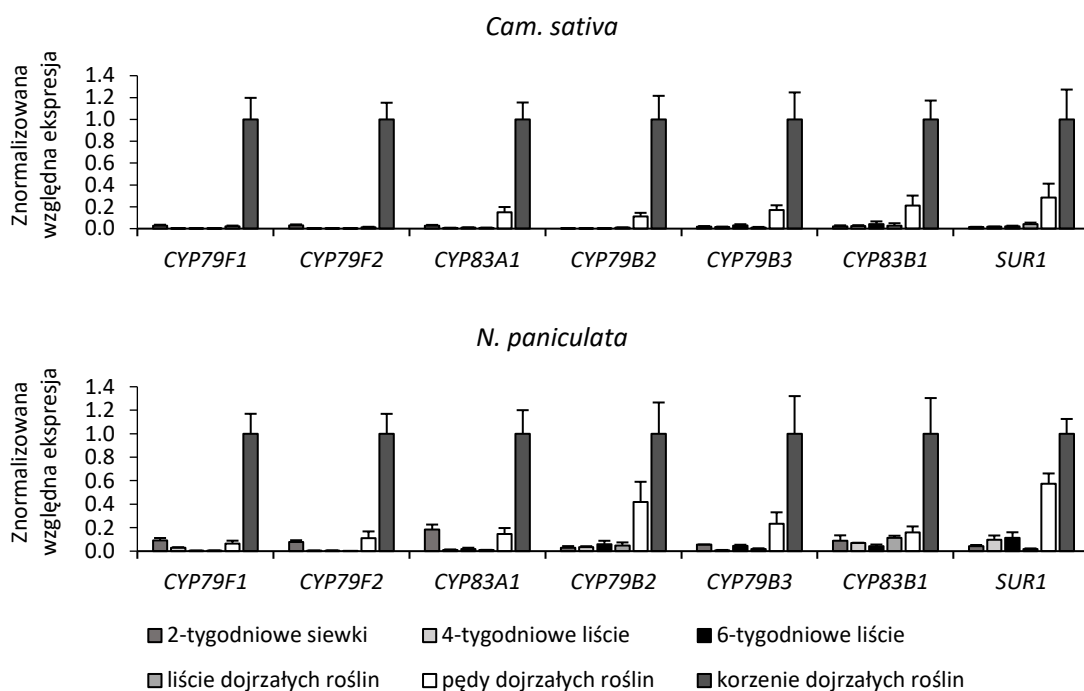
Zaobserwowana w trakcie analiz LC-MS/MS organospecyficzna akumulacja glukozyolanów w badanych gatunkach plemienia Camelinae skłoniła nas do przeprowadzenia analizy ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę zarówno AG, jak i IG. W celu porównania wzoru akumulacji metabolitów ze wzorem ekspresji genów, poszukaliśmy ortologów wybranych genów kodujących kluczowe enzymy biorące udział w tworzeniu glukozyolanów, a następnie przeprowadziliśmy analizę ich ekspresji metodą RT-qPCR. W przypadku AG wybraliśmy geny kodujące monooksygenazy cytochromu P450 CYP79F1/2 i CYP83A1, zaś dla IG analogicznie były to CYP79B2/3 i CYP83B1 (Ryc. 7). Dodatkowo, wybraliśmy również gen kodujący *C-S* liazę SUR1 biorącą udział równocześnie o obu szlakach. Przeprowadzone przez nas analizy dostępnych baz danych, zawierających sekwencje genomowe *C. rubella*, *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata*, pozwoliły nam zidentyfikować ortologi genów opisanych wcześniej dla *A. thaliana* (Tabela 2). Do analizy ekspresji genów zastosowaliśmy próbki z tkanek pochodzących z tych samych organów i stadiów rozwojowych jak w przypadku analiz LC-MS/MS, z wyjątkiem łuszczynek nasiennych.

W trakcie analiz zauważyliśmy, że *Cam. sativa* i *N. paniculata* wykazują najwyższy poziom ekspresji badanych genów w korzeniach, podczas gdy jej poziom w siewkach i liściach był bardzo niski (Ryc. 14). Podobną obserwację odnotowaliśmy w przypadku *C. rubella*, *C. bursa-pastoris* i *C. grandiflora*, jednak z kilkoma wyjątkami. Wśród nich wymienić można gen *CYP79F1*, którego ekspresja była najwyższa w pędach, a zdecydowanie niższa w korzeniach. Dodatkowo, względna ekspresja genu *CYP83B1* osiągała najwyższą wartość w liściach dojrzałych roślin (*C. rubella*), pędach (*C. grandiflora*) lub korzeniach (*C. bursa-pastoris*). Co ciekawe, *CYP79B2* wykazał

stosunkowo wysoką ekspresję w liściach w porównaniu do innych genów. Podobną zależność zaobserwowaliśmy również w przypadku *CYP79B3*, jednak jedynie w *C. rubella*.

Uzyskane wyniki ekspresji genów biorących udział w biosyntezie glukozynolanów wyraźnie kontrastowały ze wzorem ekspresji obserwowanym w *A. thaliana*, w której najwyższe wartości odnotowaliśmy w siewkach i liściach (Ryc. 14). Z drugiej jednak strony obserwowany wzór ekspresji bezpośrednio odpowiada wzorowi organospecyficznej akumulacji glukozynolanów wśród gatunków reprezentujących klad II plemienia Camelinae, preferujących produkcję tych metabolitów głównie w korzeniach i łuszczynekach (Ryc. 13).





Ryc. 14. Względna ekspresja wybranych genów biorących udział w biosyntezie glukozynolanów wyznaczona metodą RT-qPCR przy zastosowaniu referencyjnego genu kodującego aktywny. Otrzymane wartości zostały znormalizowane poprzez podzielenie każdej z nich przez maksymalną wartość uzyskaną dla konkretnego genu w danym gatunku. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z trzech niezależnych eksperymentów, każdy zawierający cztery powtórzenia biologiczne (n = 12).

4.3. Różnorodność strukturalna glukozynolanów zidentyfikowanych w badanych gatunkach i jej molekularne podstawy

Zastosowanie metody LC-MS/MS pozwoliło nam wykryć i zidentyfikować 30 różnych glukozynolanów, wśród których 23 stanowiły glukozynolany alifatyczne, 3 aromatyczne, a 4 indolowe (Tabela 7, Tabela uzupełniająca 1). Co ciekawe, wszystkie badane gatunki wykazały zdolność do produkcji zarówno AG, jak i IG, ale obecność BG wykryliśmy jedynie w *A. thaliana*. Ten gatunek cechował się również największym zróżnicowaniem łańcuchów bocznych glukozynolanów. Łącznie zidentyfikowaliśmy w *A. thaliana* 26 różnych struktur tych metabolitów, podczas gdy pozostałe gatunki wykazywały obecność od 12 do 16 glukozynolanów. Profil akumulacji tych związków w gatunkach *C. rubella*, *C. grandiflora*, *C. bursa-pastoris*, *Cam. sativa* i *N. paniculata*

był do siebie bardzo zbliżony, jednocześnie różniąc się znacznie od *A. thaliana*. Na podstawie powyższych wyników możemy wywnioskować, że badane gatunki kladu II plemienia Camelinae prezentują wyraźnie zredukowaną różnorodność produkowanych glukozynolanów względem *A. thaliana*, co sugeruje ich obniżoną w drodze ewolucji zdolność do modyfikacji łańcuchów bocznych.

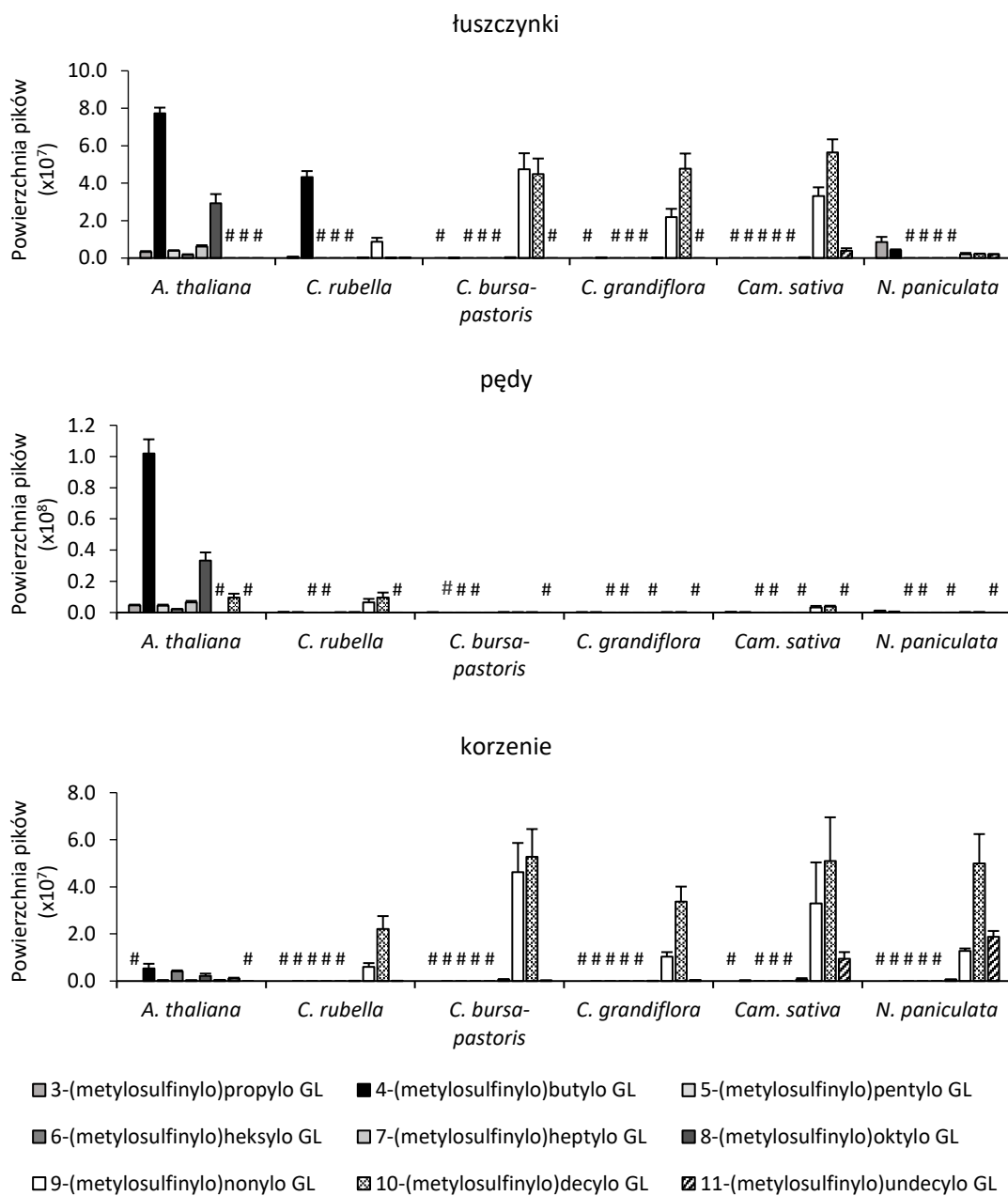
Tabela 7. Glukozynolany zidentyfikowane w trakcie analiz LC-MS/MS w ekstraktach z badanych gatunków roślin we wszystkich badanych organach. At – *A. thaliana*, Cr – *C. rubella*, Cbp – *C. bursa-pastoris*, Cg – *C. grandiflora*, Cs – *Cam. sativa*, Np – *N. paniculata*

	Glukozynolan	At	Cr	Cbp	Cg	Cs	Np
Alifatyczne	3-(metylosulfinylo)propyloglukozynolan	*	*	*	*	*	*
	3-(metylotio)propyloglukozynolan	*	*	*	*	*	
	4-(metylosulfinylo)butyloglukozynolan	*	*	*	*	*	*
	4-(metylotio)butyloglukozynolan	*					
	4-hydroksybutyloglukozynolan	*					
	5-(metylosulfinylo)pentyloglukozynolan	*					
	5-(metylotio)pentyloglukozynolan	*					
	5-oksooktyloglukozynolan	*					
	6-(metylosulfinylo)heksyloglukozynolan	*					
	6-(metylotio)heksyloglukozynolan	*					
	n-heksyloglukozynolan	*					
	7-(metylosulfinylo)heptyloglukozynolan	*	*				
	7-(metylotio)heptyloglukozynolan	*			*		
	8-(metylosulfonylo)oktyloglukozynolan	*					*
	8-(metylosulfinylo)oktyloglukozynolan	*	*	*		*	*
	8-(metylotio)oktyloglukozynolan	*	*	*	*		
	9-(metylosulfonylo)nonyloglukozynolan		*	*	*	*	*
	9-(metylosulfinylo)nonyloglukozynolan	*	*	*	*	*	*
	9-(metylotio)nonyloglukozynolan	*	*	*	*	*	*
	10-(metylosulfonylo)decyloglukozynolan		*	*	*	*	*
10-(metylosulfinylo)decyloglukozynolan	*	*	*	*	*	*	
10-(metylotio)decyloglukozynolan		*	*	*		*	
11-(metylosulfinylo)undecyloglukozynolan		*	*	*	*	*	
Aromatyczne	2-feniloetyloglukozynolan	*					
	3-benzylksypropyloglukozynolan	*					
	4-benzylksybutyloglukozynolan	*					
Indolowe	1-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan	*		*			
	indolilo-3-metyloglukozynolan	*	*	*	*	*	*
	4-hydroksy-indolilo-3-metyloglukozynolan	*	*	*	*	*	
	4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan	*	*	*		*	

4.3.1. Akumulacja długołańcuchowych AG

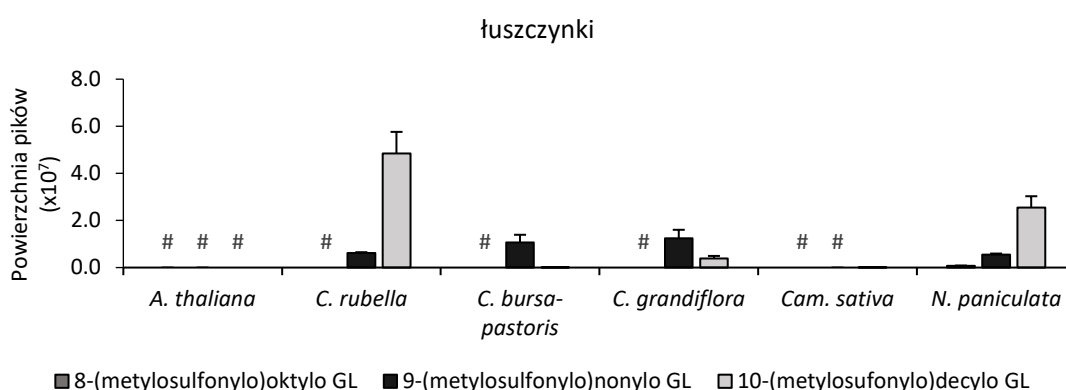
Wśród wszystkich zidentyfikowanych AG najliczniej reprezentowanymi pochodnymi były metylosulfinyloalkilo-, metylosulfonyloalkilo- oraz metyloalkiloglukozynolany. Stanowiły one dominujące klasy AG obecne w badanych gatunkach plemienia Camelinae, podczas gdy pozostałe AG były reprezentowane przez zaledwie kilka związków (Tabela 7). Dodatkowo, wśród wymienionych trzech grup AG, najwyższą akumulację w większości organów wykazywały metylosulfinyloalkiloglukozynolany, z wyjątkiem łuszczynek *C. rubella* i *N. paniculata*, gdzie najwyższą akumulację zaobserwowaliśmy dla pochodnych metylosulfonyloalkilowych. Aby porównać preferencje badanych gatunków do produkcji AG o określonej długości łańcucha bocznego, wykonaliśmy ilościowe analizy poszczególnych pochodnych metylosulfinyloalkilowych w łuszczynkach, pędach i korzeniach (Ryc. 15) oraz dodatkowo pochodnych metylosulfonyloalkilowych w łuszczynkach wybranych gatunków Camelinae (Ryc. 16).

Przeprowadzone analizy wykazały, że badane gatunki preferują produkcję długołańcuchowych AG, m.in. 9-(metylosulfinylo)nonylo- (9-MeSO) oraz 10-(metylosulfinylo)decylo- (10-MeSO) glukozynolanów, które były także głównymi AG zidentyfikowanymi w nasionach gatunków *Camelina* [37, 129, 154, 155]. Zauważyliśmy także znaczne ilości 11-(metylosulfinylo)undecyloglukozynolanu (11-MeSO), głównie w korzeniach *Cam. sativa* i *N. paniculata*. Wszystkie trzy wymienione wyżej związki akumulowały w znacznie mniejszych ilościach lub wcale nie zostały wykryte w próbkach *A. thaliana*, w której najwyższą akumulację zaobserwowaliśmy dla krótko- i średnio-łańcuchowych (3-8C) AG. Co ciekawe, wśród pozostałych gatunków jedynie łuszczynki *C. rubella* produkowały znaczne ilości 4-(metylosulfinylo)butyloglukozynolanu, a dodatkowo łuszczynki *N. paniculata* wykazały względnie wysoką zawartość krótkołańcuchowych metylosulfinyloalkilowych AG (3-4C). Pozostałe AG o średniej długości łańcuchów bocznych (5-7C) zwykle nie były wykrywalne w badanych gatunkach, co wyraźnie kontrastuje z obecnością tych związków w *A. thaliana* (Ryc. 15).



Ryc. 15. Akumulacja wszystkich zidentyfikowanych glukozynolanów metylosulfinyloalkilowych w łuszczynkach, pędach i korzeniach badanych gatunków *Camelineae*. Wykresy słupkowe wskazują powierzchnię pików na chromatogramach deprotonowanych cząsteczek, otrzymanych w trakcie analiz LC-MS/MS. Otrzymane wartości zostały uśrednione i wraz z odchyleniami standardowymi odpowiadają trzem niezależnym eksperymentom, każdy w trzech powtórzeniach biologicznych (n = 9). GL – glukozynolan, # - nie wykryto

Jak już wspomniano wyżej, pochodne metylosulfonyloalkilowe stanowiły dominującą formę AG w łuszczynach *C. rubella* i *N. paniculata*, wykazując dodatkowo najwyższą akumulację 8-(metylosulfonylo)oktylo-, 9-(metylosulfonylo)nonylo- i 10-(metylosulfonylo)decylo- glukozynolanów. Podobnie jak w przypadku pochodnych metylosulfonyloalkilowych, również te związki uwiarydociły silną preferencję badanych gatunków do produkcji długołańcuchowych AG, co wyraźnie kontrastuje z profilem akumulacji glukozynolanów w *A. thaliana* (Ryc. 16).



Ryc. 16. Akumulacja zidentyfikowanych glukozynolanów metylosulfonyloalkilowych w łuszczynkach badanych gatunków Camelinae. Wykresy słupkowe wskazują powierzchnię pików na chromatogramach jonów molekularnych, uzyskanych w trakcie analiz LC-MS/MS. Otrzymane wartości zostały uśrednione i wraz z odchyleniami standardowymi odpowiadają trzem niezależnym eksperymentom, każdy w trzech powtórzeniach biologicznych (n = 9). GL – glukozynolan, # - nie wykryto

4.3.2. Ewolucja genów *MAM*

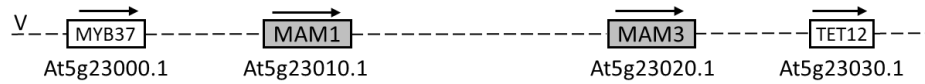
Z uwagi na wyraźną preferencję badanych gatunków do produkcji długołańcuchowych AG, postanowiliśmy znaleźć potencjalne molekularne przyczyny warunkujące biosyntezę dłuższych łańcuchów bocznych niż w przypadku *A. thaliana*. W tym celu postanowiliśmy zbadać zakonserwowanie genów *MAM* odpowiedzialnych za długość łańcucha bocznego w biosyntezie AG. Do przeprowadzenia analiz wybraliśmy gatunki, których genomy zostały zsekwencjonowane, a należą do nich: *A. thaliana*, *C. rubella*, *C. grandiflora* i *Cam. sativa* [35, 36, 165]. Dla lepszej oceny stopnia zakonserwowania i potencjalnych zmian, które zaszły w drodze ewolucji, uwzględniliśmy także sekwencje genomowe *Arabidopsis lyrata* i *Cardamine hirsuta* [166, 167]. Pierwszy z gatunków jest blisko genetycznie spokrewniony z *A. thaliana*, podczas

gdy drugi reprezentuje plemię *Cardamineae*, które jest dość blisko spokrewnione z badanymi roślinami *Camelineae* (Ryc. 1).

Wcześniejsze doniesienia literaturowe dowiodły obecności genów *MAMa*, *MAMb* i *MAMc* w locus *MAM* genomów wybranych gatunków *Camelineae*. Nasze analizy wykazały również występowanie genu *MAMc* w genomie *N. paniculata*, ale podobnie jak w *Cam. sativa* nie uległ on duplikacji zaobserwowanej w *C. rubella* (Ryc. 17). W przypadku sekwencji genomowej *C. grandiflora*, w której locus *MAM* podzielone jest pomiędzy dwa kontigi, nie jesteśmy w stanie w pełni odtworzyć jego sekwencji, a w konsekwencji określić dokładną liczbę kopii genu *MAMc*. Co ciekawe, dane literaturowe donoszą również, że we wszystkich trzech kopiach genomu *Cam. sativa* występuje odrębny gen *MAM*, umiejscowiony poza locus *MAM* i blisko spokrewniony z ortologami genu *MAMb* [68]. Niezależne badania wykazały z kolei obecność zlokalizowanego poza locus *MAM* genu *MAMe* w genomach *C. rubella* i *C. grandiflora* [69]. Nasze analizy sekwencji genomowych pokazały, że wspomniane dodatkowe geny *MAM* u *Cam. sativa* zlokalizowane są w analogicznych miejscach genomu jak *MAMe* u *C. grandiflora* i *C. rubella*, dlatego założyliśmy, że geny z *Cam. sativa* to ortologi *MAMe*. Dodatkowo, udało nam się również zidentyfikować potencjalny ortolog *MAMe* w analogicznym regionie genomu *N. paniculata* (Ryc. 18).

W celu lepszego zbadania pokrewieństwa nowych genów *MAM* z genami *MAMa*, *MAMb* i *MAMc*, przeprowadziliśmy analizę filogenetyczną odpowiadających im sekwencji białkowych. Zaobserwowaliśmy, że białka kodowane przez dodatkowe geny *MAM* z *C. rubella*, *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata* tworzą odrębny kład w drzewie filogenetycznym, który nie grupuje bezpośrednio z kładami tworzonymi przez białka *MAMa*, *MAMb* i *MAMc* (Ryc. 19). Potwierdziło to nasze przypuszczenie, że wszystkie te geny kodują białko *MAMe*, a nie *MAMb*, jak wcześniej zaproponował Zhang i in. [68] dla trzech dodatkowych genów z *Cam. sativa*. Dodatkowo, nasze analizy filogenetyczne wykazały, że obecne w genomie *C. grandiflora* dwa geny *MAM* kodują białka *MAMa* i *MAMc*, co sugeruje, że gen *MAMb* został usunięty z genomu tego gatunku.

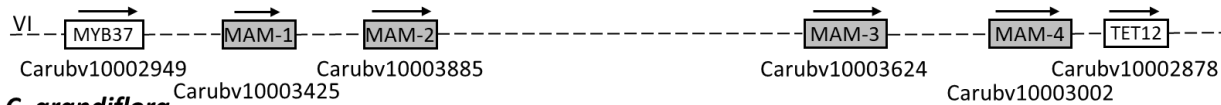
A. thaliana



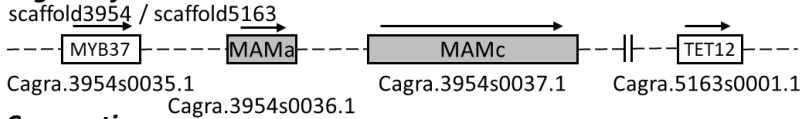
A. lyrata



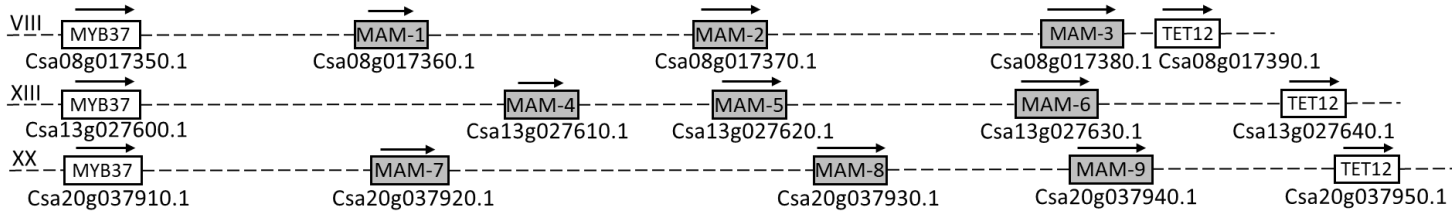
C. rubella



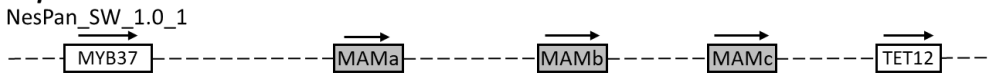
C. grandiflora



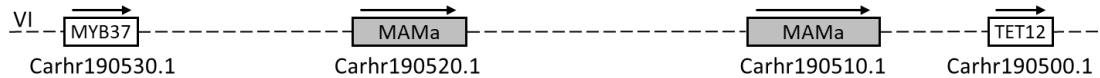
Cam. sativa



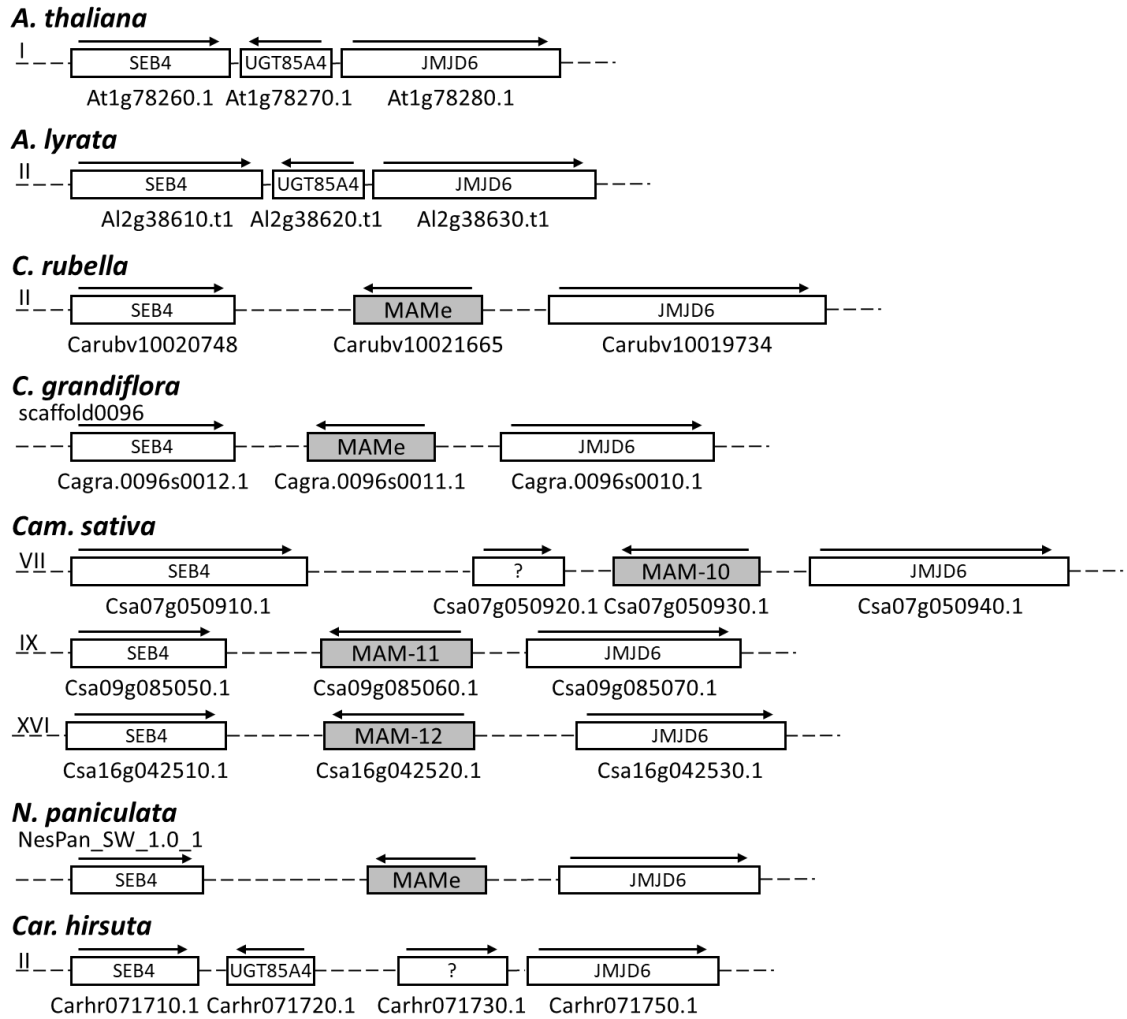
N. paniculata



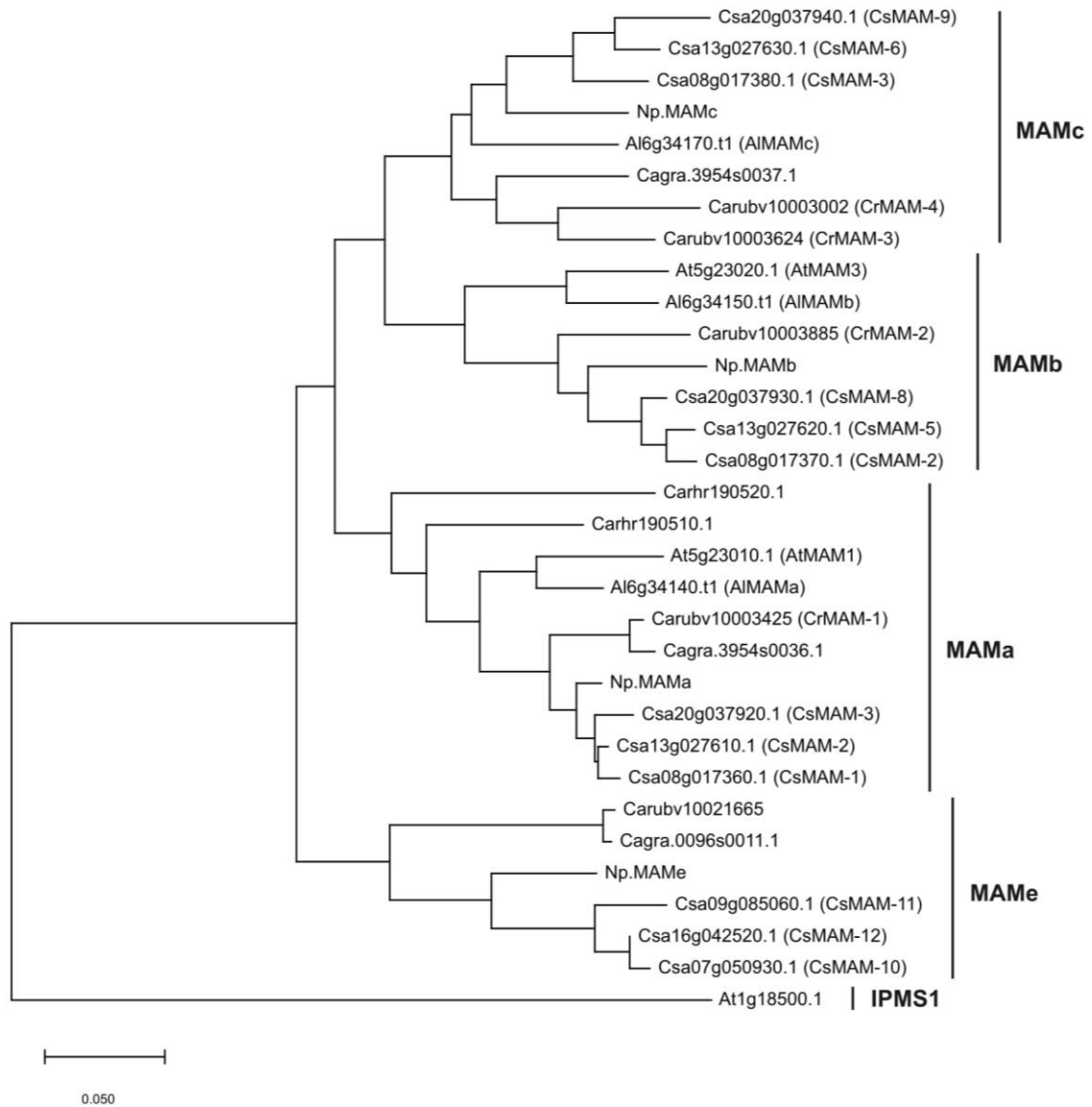
Car. hirsuta



Ryc. 17. Mapy genomowe locus *MAM*, zawierające ortologi genów *MAMa*, *MAMb* i *MAMc* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.



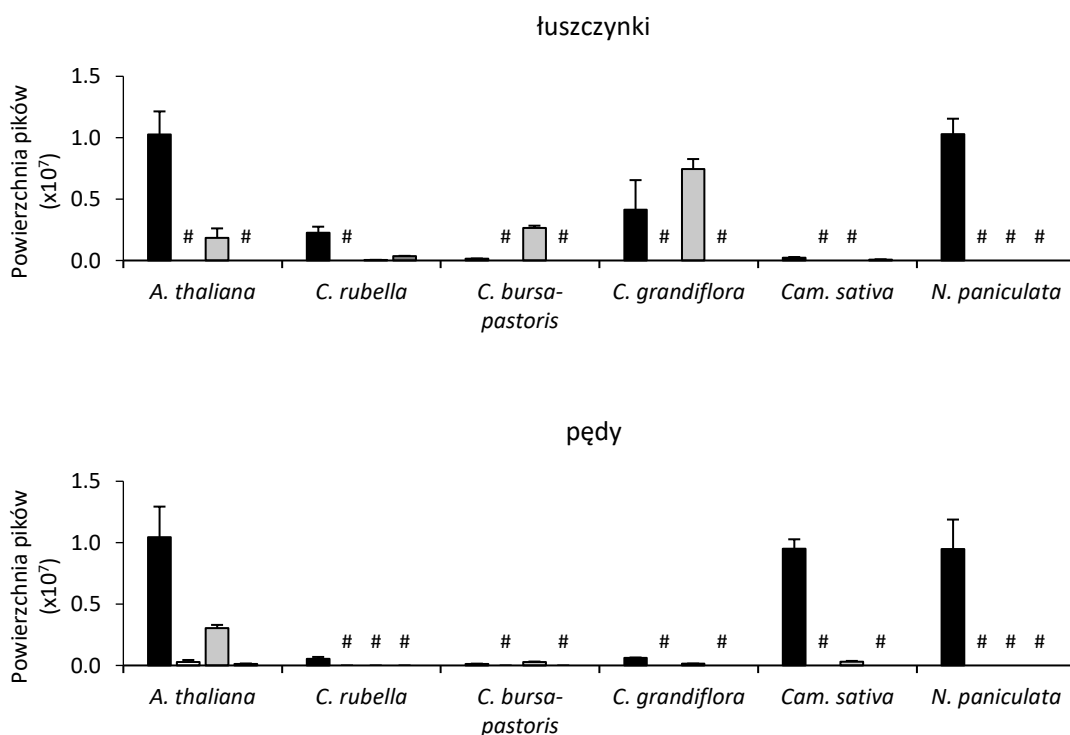
Ryc. 18. Mapy genomowe locus zawierającego ortologów genów *MAMe* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.

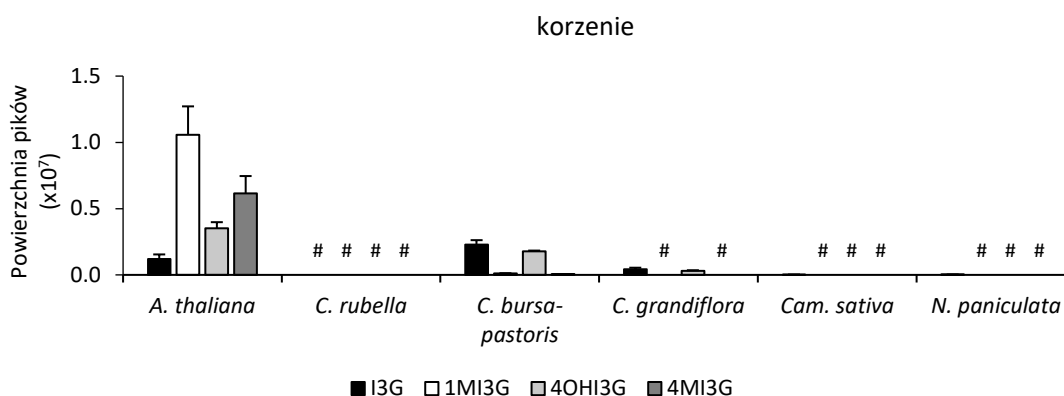


Ryc. 19. Drzewo filogenetyczne zidentyfikowanych enzymów MAM. Analizę filogenetyczną przeprowadzono przy użyciu algorytmu neighbor-joining. Jako grupę zewnętrzną zastosowano sekwencję syntazy izopropylojabłczanowej z *A. thaliana*. Skala pod drzewem wskazuje poziom 5% zróżnicowania porównywanych sekwencji białkowych.

4.3.3. Zróżnicowanie strukturalne IG

Analogicznie do przeprowadzonej analizy długości łańcuchów bocznych AG, postanowiliśmy sprawdzić również zdolność do modyfikacji pierścienia indolowego IG oraz preferencję do tworzenia poszczególnych pochodnych. Wśród badanych roślin kladu II plemienia Camelinae udało nam się zidentyfikować wszystkie cztery IG, które zostały do tej pory wykryte w *A. thaliana* (Ryc. 20). Wśród nich jedynie I3G wykazywał poziom akumulacji powyżej granicy detekcji we wszystkich gatunkach, a dodatkowo był on jedynym zidentyfikowanym IG w *N. paniculata* oraz dominującym nad pozostałymi w *C. rubella* i *Cam. sativa*. W przypadku *C. bursa-pastoris* i *C. grandiflora* dominującą formą okazał się 4OHI3G, ale jego niewielkie ilości wykryliśmy również w *C. rubella* i *Cam. sativa*. W tych ostatnich, a dodatkowo również w *C. bursa-pastoris*, zaobserwowaliśmy niewielkie ilości 4MI3G, podczas gdy zdolność do biosyntezy 1MI3G potwierdziliśmy jedynie w *C. bursa-pastoris*, która produkowała go w niewielkich ilościach w korzeniach (Ryc. 20). Nasze analizy wykazały zatem obniżoną zdolność do modyfikacji pierścienia indolowego w obrębie badanych gatunków w porównaniu do *A. thaliana*. Najwyższą akumulację zaobserwowaliśmy dla I3G lub 4OHI3G, zaś szczególnie silny defekt w produkcji wykazały 4MI3G oraz 1MI3G.



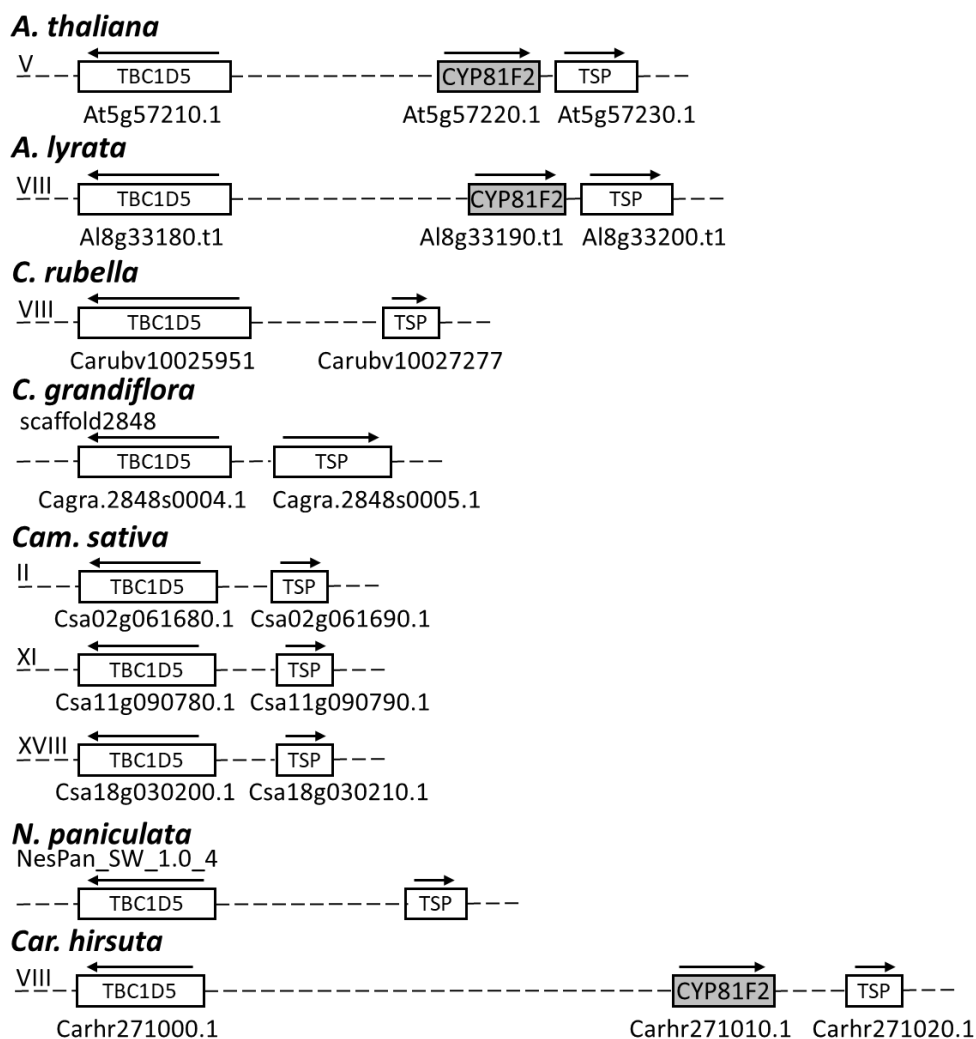


Ryc. 20. Akumulacja zidentyfikowanych IG w łuszczynekach, pędach i korzeniach badanych gatunków *Camelineae*. Wykresy słupkowe wskazują powierzchnię pików na chromatogramach jonów molekularnych, otrzymanych w trakcie analiz LC-MS/MS. Otrzymane wartości zostały uśrednione i wraz z odchyleniami standardowymi odpowiadają trzem niezależnym eksperymentom, każdy w trzech powtórzeniach biologicznych (n = 9). I3G – indolilo-3-metyloglukozynolan, 1MI3G – 1-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan, 4OHI3G – 4-hydroksy-indolilo-3-metyloglukozynolan, 4MI3G – 4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan, # - nie wykryto

4.3.4. Ewolucja genów *CYP81F*

W celu ustalenia potencjalnej przyczyny obniżonej zdolności do produkcji IG z podstawionym pierścieniem indolowym, postanowiliśmy sprawdzić poziom zakonserwowania genów kodujących enzymy odpowiedzialne za wspomniane modyfikacje. Do naszych analiz wybraliśmy enzymy z rodzin *CYP81F* oraz *IGMT*. Wśród nich *CYP81F4* i *IGMT5* są niezbędne do produkcji 1MI3G, podczas gdy *CYP81F2*, *CYP81F3* oraz *IGMT1-4* są odpowiedzialne za biosyntezę 4OHI3G i 4MI3G, przy czym doniesienia literaturowe sugerują również nieznaczną rolę *CYP81F1* w modyfikacjach pierścienia indolowego [90-92].

W genomie *A. thaliana* gen *CYP81F2* jest zlokalizowany na chromosomie V, a region ten jest zakonserwowany w *A. lyrata* i *Car. hirsuta* (Ryc. 21). Wcześniejsze doniesienia wykazywały brak ortologu tego genu w *C. rubella* [151]. Nasze analizy sekwencji genomowych wykazały również brak ortologów *CYP81F2* w genomach *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata*, co sugeruje, że gen ten musiał zostać utracony już u wspólnego przodka badanych gatunków (Ryc. 21).



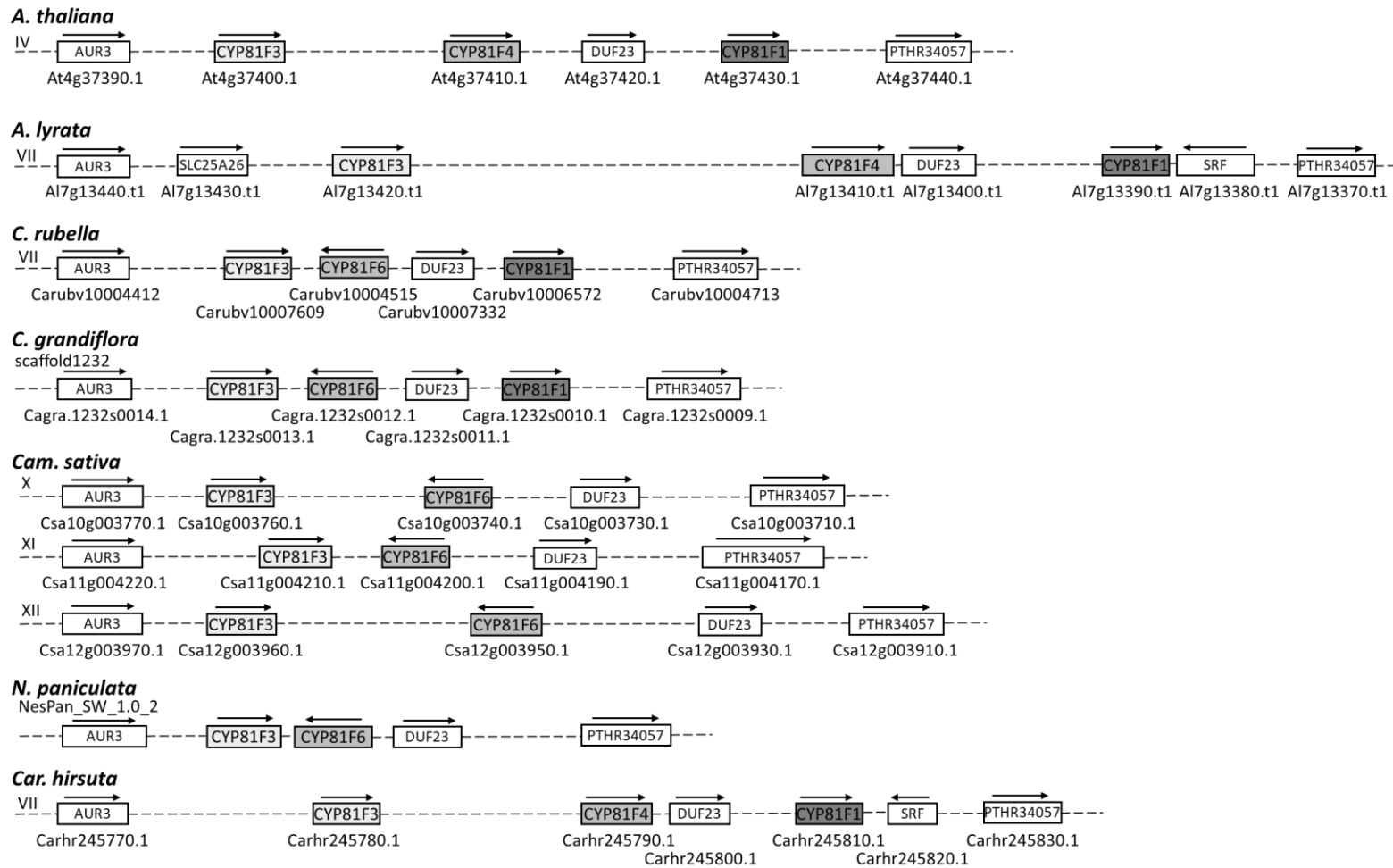
Ryc. 21. Mapy genomowe locus zawierającego ortologów genów *CYP81F2* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.

Geny kodujące monooksygenazy *CYP81F1*, *CYP81F3* i *CYP81F4* są zlokalizowane w genomie *A. thaliana* blisko siebie na chromosomie IV, i ten układ wydaje się być w pełni zakonserwowany w genomach *A. lyrata* i *Car. hirsuta*, jak również w *C. rubella* i *C. grandiflora* (Ryc. 22). W regionie zawierającym badane geny w *Cam. sativa* i *N. paniculata*, brakuje ortologów genu *CYP81F1*, co sugeruje, że został on utracony przed specjacją tych gatunków. Co ciekawe, w przypadku badanych gatunków kladu II Camelinae orientacja potencjalnego ortologu genu *CYP81F4* wobec sąsiadujących genów jest odwrócona w porównaniu z *A. thaliana*, *A. lyrata* i *Car. hirsuta*

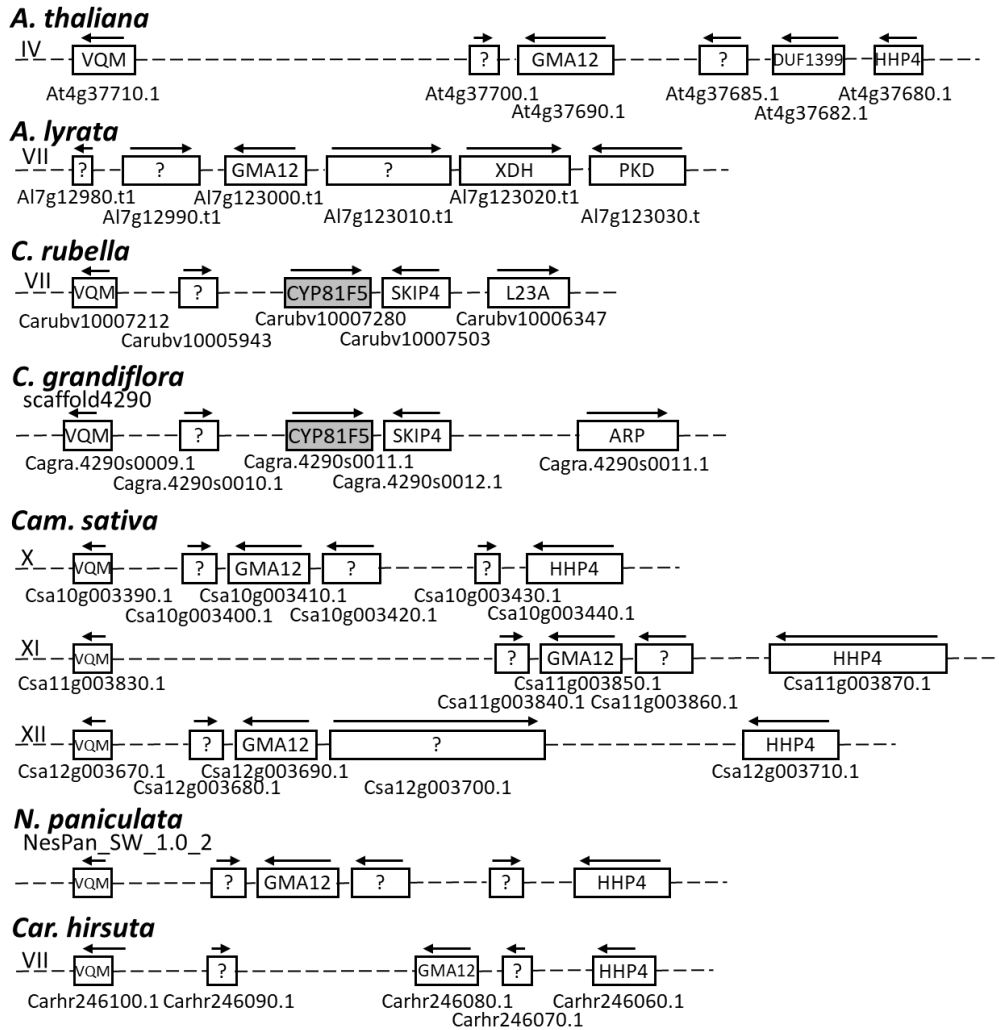
(Ryc. 22). Ponadto, w *Cam. sativa* jedna z kopii tego genu zlokalizowana na chromosomie X koduje skrócony wariant białka.

Dalsze przeprowadzone przez nas analizy sekwencji genomowych wykazały obecność w odrębnym locus genomów *C. rubella* i *C. grandiflora* dodatkowego genu homologicznego z innymi genami *CYP81F*. Enzym kodowany przez ten gen wykazywał wysokie podobieństwo (> 79%) z pozostałymi enzymami rodziny CYP81F, co skłoniło nas do nadania mu nazwy CYP81F5 (Ryc. 23, Tabela 8).

Aby potwierdzić właściwą identyfikację poszczególnych ortologów genów z rodziny *CYP81F*, sprawdziliśmy podobieństwo odpowiadających im sekwencji białkowych, a następnie przeprowadziliśmy ich analizę filogenetyczną. Otrzymane wyniki wskazały na wysokie podobieństwo (> 95%) wszystkich białek kodowanych przez geny *CYP81F1* (jeśli były obecne) i *CYP81F3* we wszystkich badanych gatunkach (Tabela 8). Z drugiej jednak strony, sekwencja *AtCYP81F4* wykazała wysokie podobieństwo (> 90%) jedynie do odpowiadających jej sekwencji z gatunków *A. lyrata* i *Car. hirsuta*. Ponadto, te trzy białka charakteryzowały się stosunkowo niskim podobieństwem (< 75%) z ortologami zidentyfikowanymi w pozostałych gatunkach. Te z kolei wykazywały dość wysoką homogeniczność między sobą (> 89%), z wyłączeniem skróconego białka kodowanego przez jedną z trzech kopii genu w *Cam. sativa* (Tabela 8). Dodatkowo analiza filogenetyczna wykazała, że potencjalne ortologi CYP81F4 z *C. rubella*, *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata* tworzą odrębny kład, który nie jest bezpośrednio związany z żadnym innym kładem tworzonym przez izoformy białek CYP81F. Co więcej, nawet białka CYP81F5 obecne w *C. rubella* i *C. grandiflora*, wykazały bliższe pokrewieństwo z pozostałymi enzymami CYP81F, niż wspomniane potencjalne ortologi CYP81F4 (Ryc. 24). Wyniki te sugerują, że geny w *C. rubella*, *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata* obecne w miejscu odpowiadającym *AtCYP81F4* nie powinny być sklasyfikowane jako funkcjonalne ortologi *CYP81F4*, ani dodatkowe kopie genów *CYP81F1* lub *CYP81F3*. W związku z tym, postanowiliśmy nadać im odrębną nazwę *CYP81F6* (Ryc. 22).



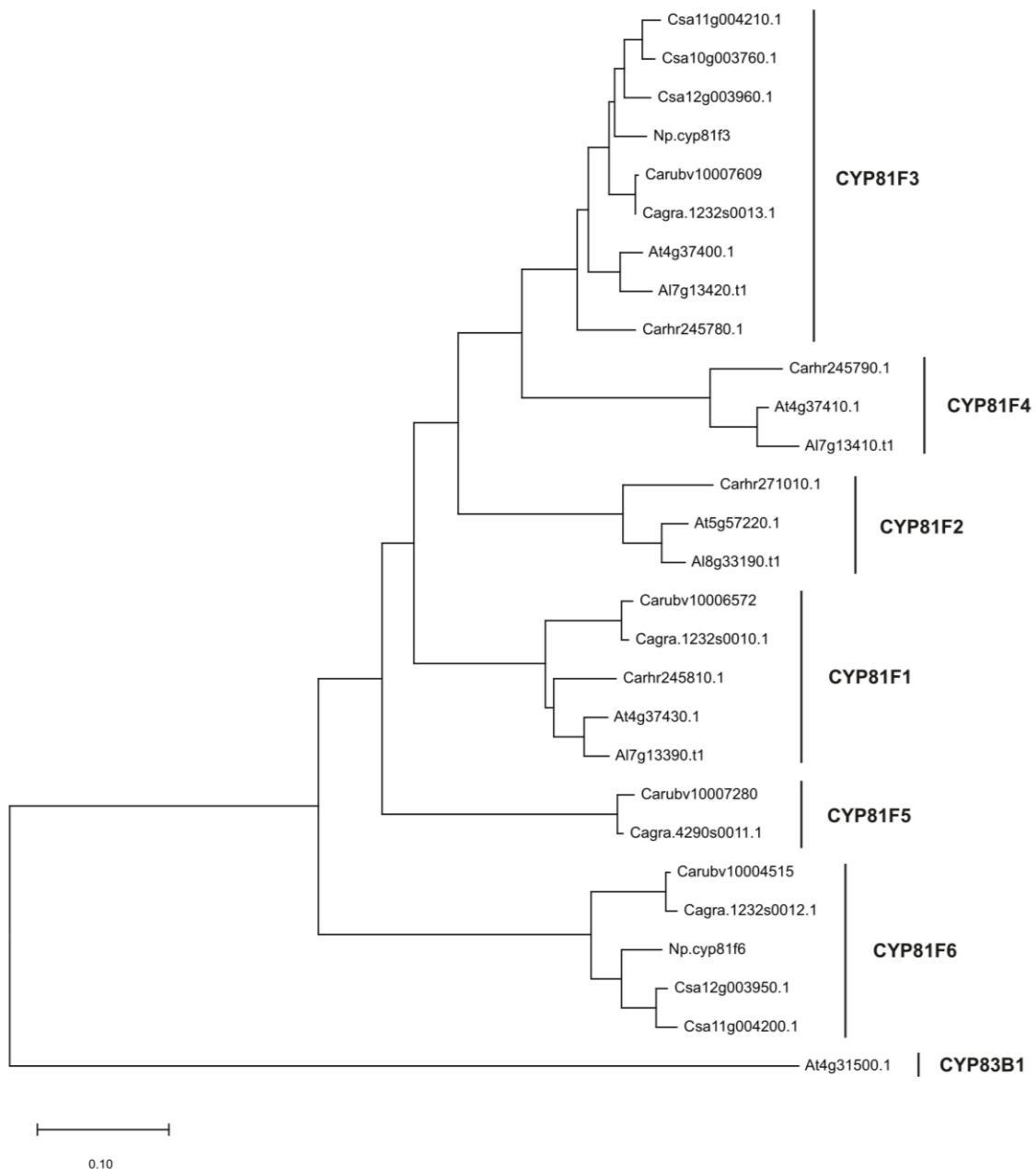
Ryc. 22. Mapy genomowe locus zawierającego ortologów genów *CYP81F1*, *CYP81F3* i *CYP81F4* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), zaś strzałki nad genami wskazują orientację genu.



Ryc. 23. Mapy genomowe locus zawierającego ortologów genów *CYP81F5* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.

		CYP81F3								CYP81F4								CYP81F1					CYP81F2			CYP81F5			
		Carhr245780.1	Al7g13420.t1	At4g37400.1	Carubv10007609	Cagra.1232s0013.1	Csa10g003760.1	Csa11g004210.1	Csa12g003960.1	Np.cyp81f3	Carhr245790.1	Al7g13410.t1	At4g37410.1	Carubv10004515	Cagra.1232s0012.1	Csa10g003740.1	Csa11g004200.1	Csa12g003950.1	Np.cyp81f6	Carhr245810.1	Al7g13390.t1	At4g37430.1	Carubv10006572	Cagra.1232s0010.1	Carhr271010.1	Al8g33190.t1	At5g57220.1	Carubv10007280	Cagra.4290s0011.1
CYP81F3	Carhr245780.1	x	96	96	96	96	95	95	96	95	87	82	87	73	78	65	78	79	78	84	85	85	83	83	85	86	86	81	81
	Al7g13420.t1	96	x	98	96	96	95	95	96	95	88	83	87	72	76	64	77	78	77	84	85	86	83	84	86	86	85	82	83
	At4g37400.1	96	98	x	96	96	95	95	96	95	87	83	88	72	77	64	77	77	77	84	85	86	84	84	86	86	86	82	83
	Carubv10007609	96	96	96	x	100	98	97	98	98	86	83	87	72	77	65	77	78	77	85	85	86	84	84	86	86	86	82	83
	Cagra.1232s0013.1	96	96	96	100	x	98	97	98	98	87	83	87	72	77	65	77	78	77	85	85	86	84	84	86	86	86	82	83
	Csa10g003760.1	95	95	95	98	98	x	98	98	97	86	82	86	71	76	65	77	77	77	83	83	84	83	83	86	86	87	82	82
	Csa11g004210.1	95	95	95	97	97	98	x	98	97	86	82	86	71	76	64	77	77	77	83	83	84	83	83	85	85	86	82	83
	Csa12g003960.1	96	96	96	98	98	98	98	x	98	87	83	87	71	76	63	76	77	76	84	84	85	84	84	86	87	86	82	83
Np.cyp81f3	95	95	95	98	98	97	97	98	x	86	82	87	72	77	64	76	77	77	83	83	84	83	83	85	86	85	82	82	
CYP81F4	Carhr245790.1	87	88	87	86	87	86	86	87	86	x	90	95	69	74	61	74	75	74	79	80	81	79	79	79	80	80	79	79
	Al7g13410.t1	82	83	83	83	83	82	82	83	82	90	x	94	65	70	61	71	71	70	76	76	77	75	75	77	76	77	76	76
	At4g37410.1	87	87	88	87	87	86	86	87	87	95	94	x	69	73	62	74	74	74	80	81	81	80	80	80	80	80	78	79
	Carubv10004515	73	72	72	72	72	71	71	71	72	69	65	69	x	92	71	89	89	89	73	73	73	73	73	70	71	71	70	71
	Cagra.1232s0012.1	78	76	77	77	77	76	76	76	77	74	70	73	92	x	76	95	95	95	78	78	79	79	79	75	76	76	75	76
	Csa10g003740.1	65	64	64	65	65	65	64	63	64	61	61	62	71	76	x	78	79	78	66	65	64	65	65	62	62	63	64	65
	Csa11g004200.1	78	77	77	77	77	77	77	76	76	74	71	74	89	95	78	x	99	97	79	79	79	79	79	76	76	77	75	76
	Csa12g003950.1	79	78	77	78	78	77	77	77	77	75	71	74	89	95	79	99	x	98	79	79	79	79	79	76	76	76	75	76
Np.cyp81f6	78	77	77	77	77	77	77	76	77	74	70	74	89	95	78	97	98	x	78	78	78	79	79	76	77	76	75	75	
CYP81F1	Carhr245810.1	84	84	84	85	85	83	83	84	83	79	76	80	73	78	66	79	79	78	x	96	96	95	95	84	84	84	83	83
	Al7g13390.t1	85	85	85	85	85	83	83	84	83	80	76	81	73	78	65	79	79	78	96	x	99	96	96	85	85	84	84	85
	At4g37430.1	85	86	86	86	86	84	84	85	84	81	77	81	73	79	64	79	79	78	96	99	x	96	97	85	85	84	84	84
	Carubv10006572	83	83	84	84	84	83	83	84	83	79	75	80	73	79	65	79	79	79	95	96	96	x	99	82	83	83	83	84
	Cagra.1232s0010.1	83	84	84	84	84	83	83	84	83	79	75	80	73	79	65	79	79	79	95	96	97	99	x	82	83	83	84	84
CYP81F2	Carhr271010.1	85	86	86	86	86	86	85	86	85	79	77	80	70	75	62	76	76	76	84	85	85	82	82	x	94	95	79	80
	Al8g33190.t1	86	86	86	86	86	86	85	87	86	80	76	80	71	76	62	76	76	77	84	85	85	83	83	94	x	98	81	81
	At5g57220.1	86	85	86	86	86	87	86	86	85	80	77	80	71	76	63	77	76	76	84	84	84	83	83	95	98	x	80	81
CYP81F5	Carubv10007280	81	82	82	82	82	82	82	82	82	79	76	78	70	75	64	75	75	75	83	84	84	83	84	79	81	80	x	99
	Cagra.4290s0011.1	81	83	83	83	83	82	83	83	82	79	76	79	71	76	65	76	76	75	83	85	84	84	84	80	81	81	99	x

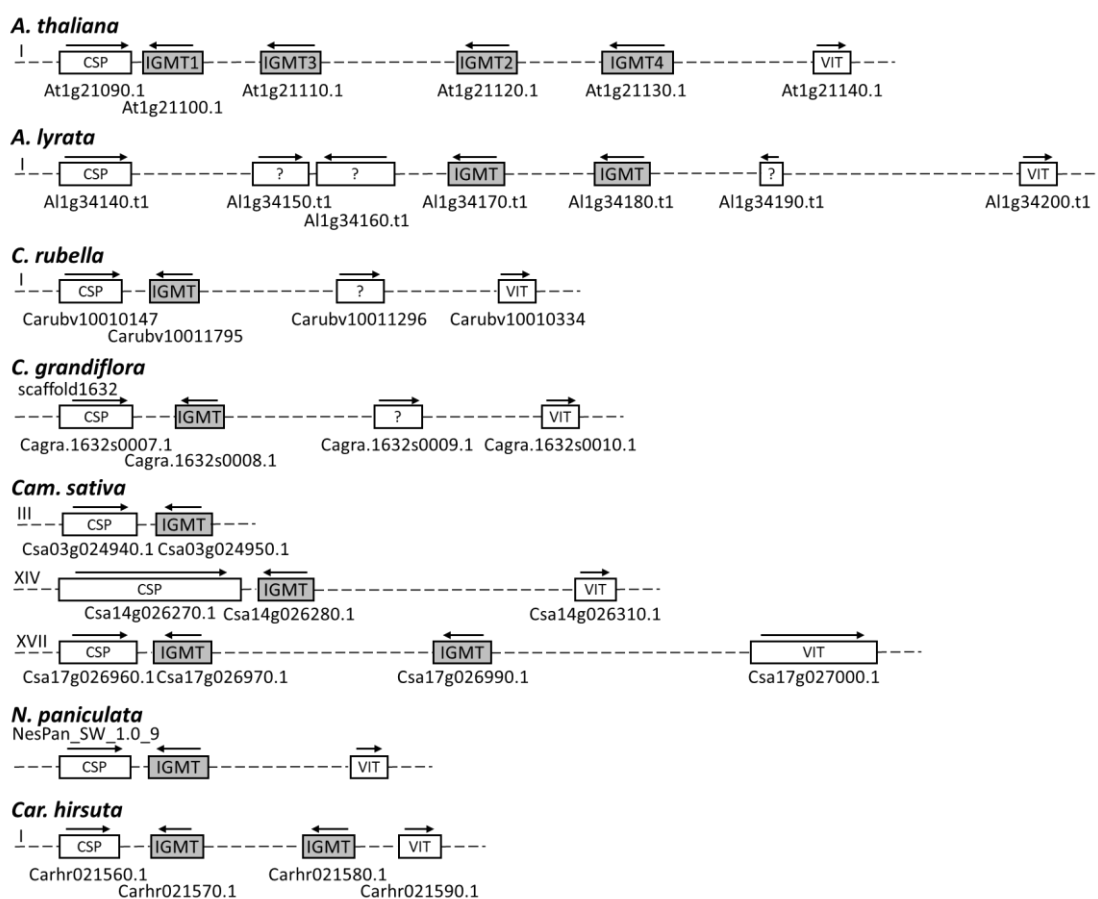
Tabela 8. Podobieństwo sekwencji zidentyfikowanych ortologów enzymów CYP81F. Prezentowane wartości wskazują procentowe podobieństwo sekwencji białkowych. Carhr - *Cardamine hirsuta*, Al - *Arabidopsis lyrata*, At - *Arabidopsis thaliana*, Carub - *Capsella rubella*, Cagra - *Capsella grandiflora*, Csa - *Camelina sativa*, Np – *Neslia paniculata*



Ryc. 24. Drzewo filogenetyczne zidentyfikowanych monoooksygenaz CYP81F. Analizę filogenetyczną przeprowadzono przy użyciu algorytmu neighbor-joining. Jako grupę zewnętrzną zastosowano sekwencję monoooksygenazy CYP83B1 z *A. thaliana*. Skala pod drzewem wskazuje poziom 10% różnicowania porównywanych sekwencji białkowych.

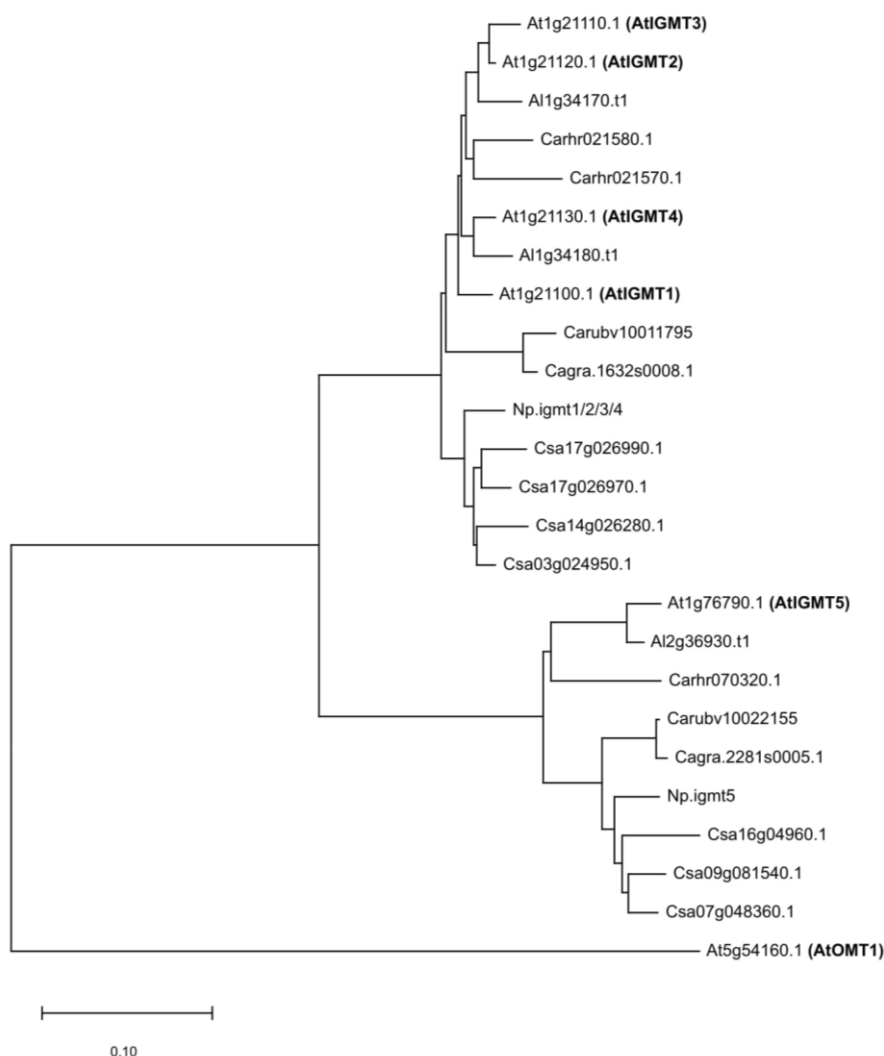
4.3.5. Ewolucja genów *IGMT*

W *A. thaliana* geny *IGMT1-4*, które kodują enzymy biorące udział w metylacji 4OH13G do 4MI3G, zlokalizowane są obok siebie na chromosomie I (Ryc. 25). Nasze analizy sekwencji genomowych wykazały, że analogiczne regiony w genomach *A. lyrata* i *Car. hirsuta* zawierają jedynie dwa geny *IGMT*. Sugeruje to, że w przypadku *A. thaliana* prawdopodobnie zaszła duplikacja obu genów. Te same regiony w *C. rubella* i *C. grandiflora* zawierają tylko po jednym potencjalnym ortologu *IGMT*. Podobna sytuacja ma miejsce w genomach *N. paniculata* oraz *Cam. sativa*, z wyjątkiem jednego chromosomu, na którym znajdują się potencjalne dwa ortologi. Wyniki wskazują na prawdopodobną delecję jednego z dwóch genów *IGMT* w gatunkach należących do kladu II Camelinaeae. Co ciekawe, przeprowadzone analizy filogenetyczne białek, kodowanych przez te geny, wykazały zależności niespójne z przyjętymi relacjami filogenetycznymi rodziny Brassicaceae (Ryc. 26). W uzyskanym drzewie, dwa potencjalne ortologi *IGMT1-4* z *Car. hirsuta* są bliżej spokrewnione z białkami pochodzącymi z *A. thaliana* i *A. lyrata*, niż ortologi z gatunków należących do kladu II Camelinaeae (Ryc. 26).

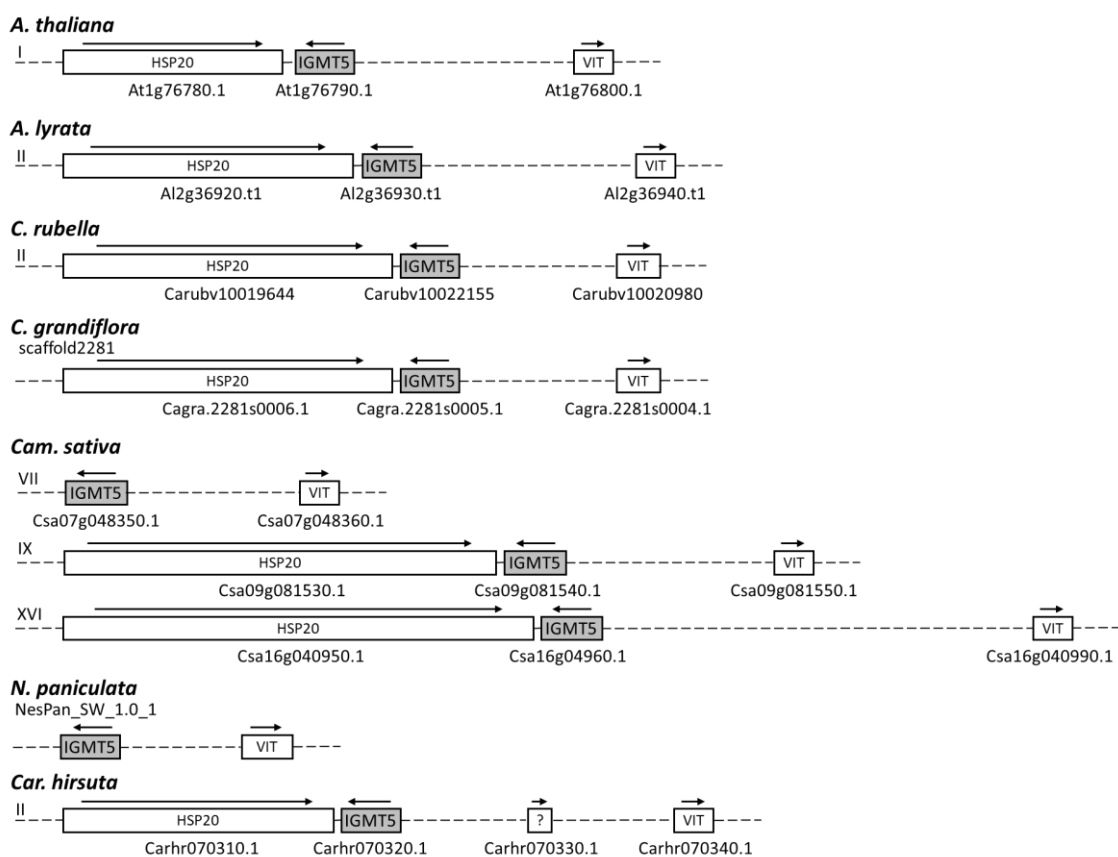


◀ **Ryc. 25.** Mapy genomowe locus zawierającego ortologów genów *IGMT1-4* w badanych gatunkach Camelinaeae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.

We wszystkich badanych gatunkach zidentyfikowaliśmy również pojedyncze ortologu genu *AtIGMT5*, kodującego enzym odpowiedzialny za tworzenie 1MI3G (Ryc. 27). Podobnie jak w przypadku białek *IGMT1-4*, drzewo filogenetyczne ortologów *IGMT5* nie było spójne z pokrewieństwem badanych gatunków, wskazując na większe podobieństwo *IGMT5* z *A. thaliana* i *A. lyrata* z ortologiem z *Car. hirsuta* niż z potencjalnymi ortologami z pozostałych gatunków II kladu plemienia Camelinaeae (Ryc. 26).



Ryc. 26. Drzewo filogenetyczne zidentyfikowanych enzymów IGMT. Analizę filogenetyczną przeprowadzono przy użyciu algorytmu neighbor-joining. Jako grupę zewnętrzną zastosowano sekwencję *O*-metylotransferazy 1 (OMT1) z *A. thaliana*. Skala pod drzewem wskazuje poziom 10% różnicowania porównywanych sekwencji białkowych.



Ryc. 27. Mapy genomowe locus zawierającego ortologów genów *IGMT5* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.

4.4. Regulacja szlaku biosyntezy glukozyzolanów w badanych gatunkach

4.4.1. Zakonserwowanie czynników transkrypcyjnych MYB

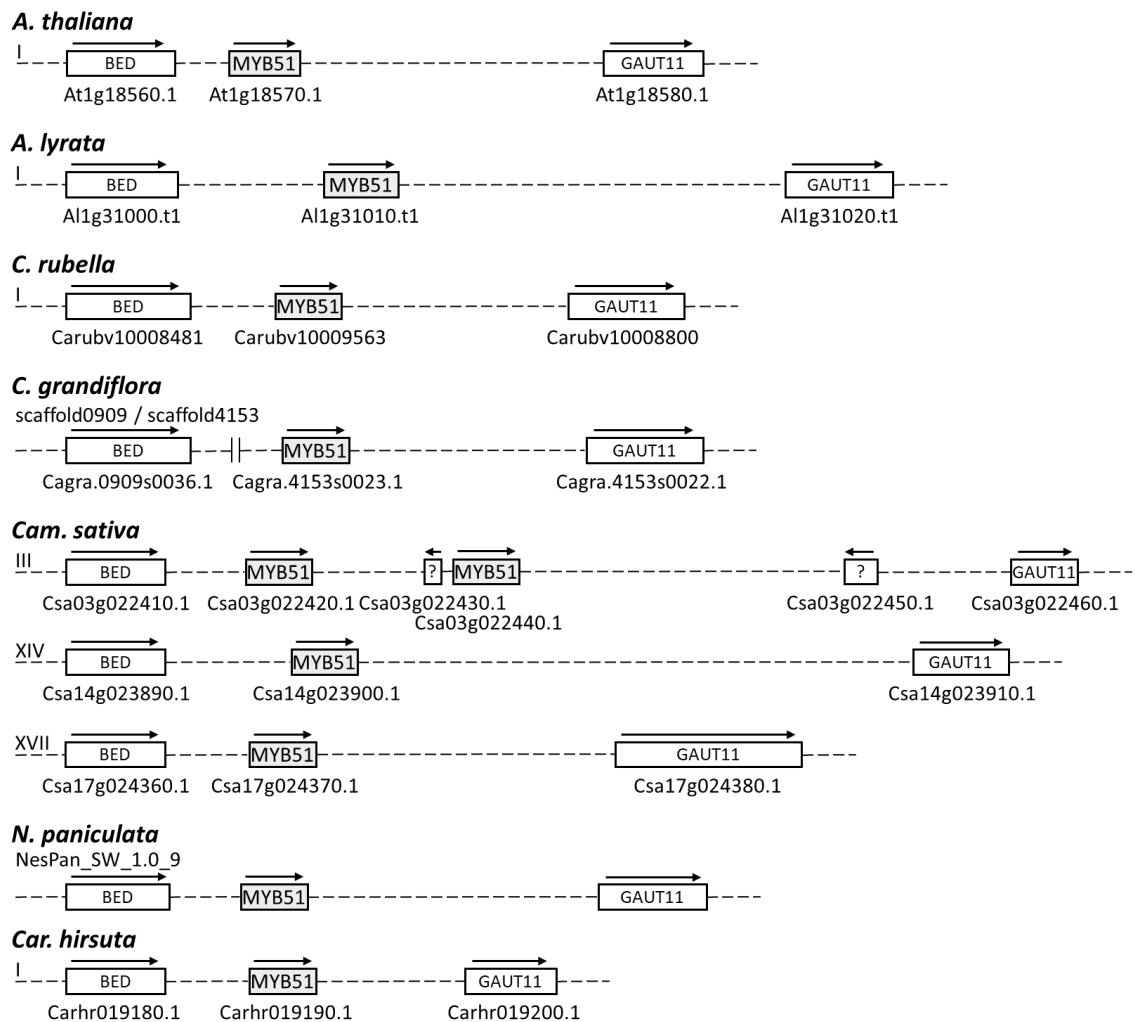
Organospecyficzny wzór akumulacji glukozyzolanów oraz ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w ich biosyntezę, wyraźnie kontrastuje pomiędzy *A. thaliana* i gatunkami kladu II Camelinae, co sugeruje występowanie różnic w regulacji tego szlaku metabolicznego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę rozbieżność pomiędzy całkowitą akumulacją AG i IG w poszczególnych organach gatunków kladu II Camelinae, możemy przypuszczać, że istnieje zasadnicza różnica w kontroli biosyntezy obu klas glukozyzolanów u tych roślin. Postanowiliśmy zatem sprawdzić czy znane

z *A. thaliana* czynniki transkrypcyjne wpływają na obserwowane różnice w akumulacji glukozyzolanów. Spośród dwóch klas czynników transkrypcyjnych kontrolujących produkcję tych metabolitów, bHLH/MYC regulują równocześnie biosyntezę zarówno AG, jak i IG, podczas gdy czynniki MYB, wykazują specyficzność w regulacji obu szlaków. Biorąc pod uwagę obserwowane różnice pomiędzy akumulacją AG i IG w roślinach II kladu Camelinae naszą uwagę skupiliśmy na czynnikach transkrypcyjnych MYB, które mogą być potencjalnie odpowiedzialne za dysproporcję w zdolności do biosyntezy tych dwóch grup glukozyzolanów.

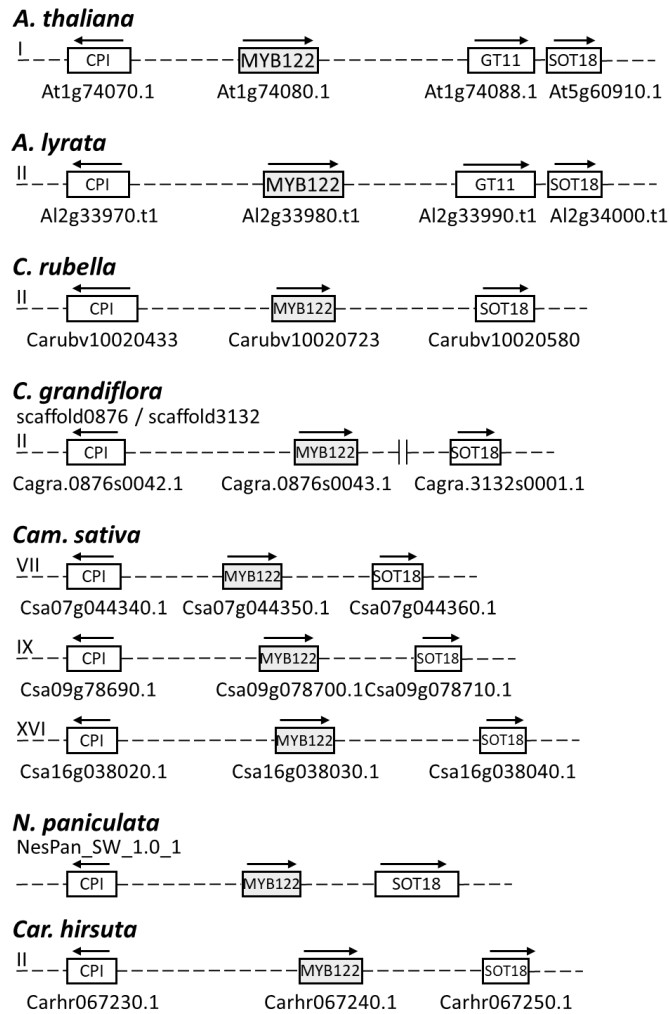
Wśród zidentyfikowanych do tej pory w *A. thaliana* białek MYB, MYB28, MYB29 i MYB76 regulują biosyntezę AG, podczas gdy MYB34, MYB51 i MYB122 są aktywne w biosyntezie IG. W przypadku genów kodujących czynniki transkrypcyjne, kontrolujące produkcję AG, zidentyfikowaliśmy ortologi *MYB28* i *MYB29* we wszystkich badanych gatunkach kladu II Camelinae. Co ciekawe, w przypadku *MYB76* udało nam się znaleźć ortologi jedynie w *A. lyrata* i *Car. hirsuta*, której genom zawierał nawet dwie kopie tego genu (Tabela 2). Doniesienia literaturowe sugerują jednak niewielki wpływ czynnika transkrypcyjnego MYB76 na biosyntezę AG w *A. thaliana*, dlatego jego brak w gatunkach II kladu Camelinae nie powinien wpływać istotnie na zdolność do produkcji tych metabolitów. Ponadto, biorąc pod uwagę obecność ortologów *MYB28* i *MYB29* oraz zdolność do biosyntezy AG przez badane gatunki Camelinae, możemy wysunąć wniosek, że wspomniane czynniki transkrypcyjne są zakonserwowane i nadal funkcjonalne w tym szlaku.

Analogiczne analizy przeprowadziliśmy dla czynników transkrypcyjnych regulujących biosyntezę IG. We wszystkich badanych gatunkach znaleźliśmy ortologi genów kodujących czynniki MYB51 i MYB122, a regiony genomowe, które zawierają te geny wykazywały wyraźne zakonserwowanie (Ryc. 28, Ryc. 29). Jedyny wyjątek stanowiła *Cam. sativa*, której gen *MYB51* uległ duplikacji na chromosomie III, podczas gdy analogiczny gen ulokowany na chromosomie XVII kodował jedynie skrócony wariant tego białka. Zaskakująco, w przypadku czynnika transkrypcyjnego MYB34 nie zaobserwowaliśmy występowania ortologów kodującego go genu w genomach *Cam. sativa* i *N. paniculata*, podczas gdy były one obecne w pozostałych badanych gatunkach (Ryc. 30).

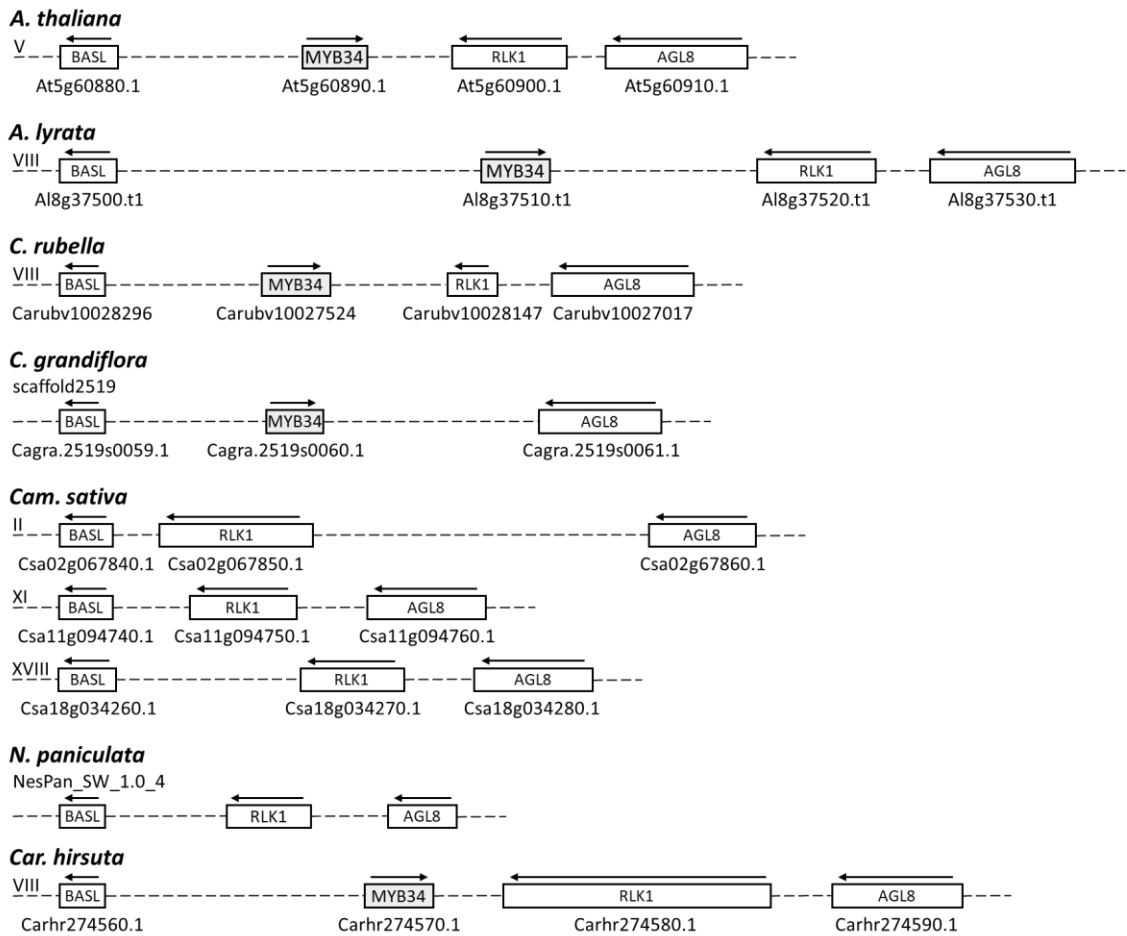
Przeprowadzone analizy filogenetyczne wykazały dodatkowo, że w przypadku MYB34, którego ortologów nie znaleźliśmy w *Cam. sativa* i *N. paniculata*, oraz MYB122 relacje filogenetyczne są niespójne z przyjętym pokrewieństwem pomiędzy gatunkami Brassicaceae (Ryc. 31). Analogicznie do analiz filogenetycznych IGMT, tutaj również zaobserwowaliśmy bliższe pokrewieństwo ortologów MYB34 i MYB122 z *A. thaliana* i *A. lyrata* z odpowiednimi ortologami z *Car. hirsuta* niż ortologami z gatunków kladu II Camelinae. Sugeruje to, że zmiany ewolucyjne obu białek w kladzie II Camelinae są szybsze niż w innych gatunkach Brassicaceae. W przeciwieństwie do MYB34 i MYB122, ortologi MYB51 nie wykazywały żadnych odstępstw od przyjętych relacji filogenetycznych pomiędzy badanymi gatunkami (Ryc. 31).



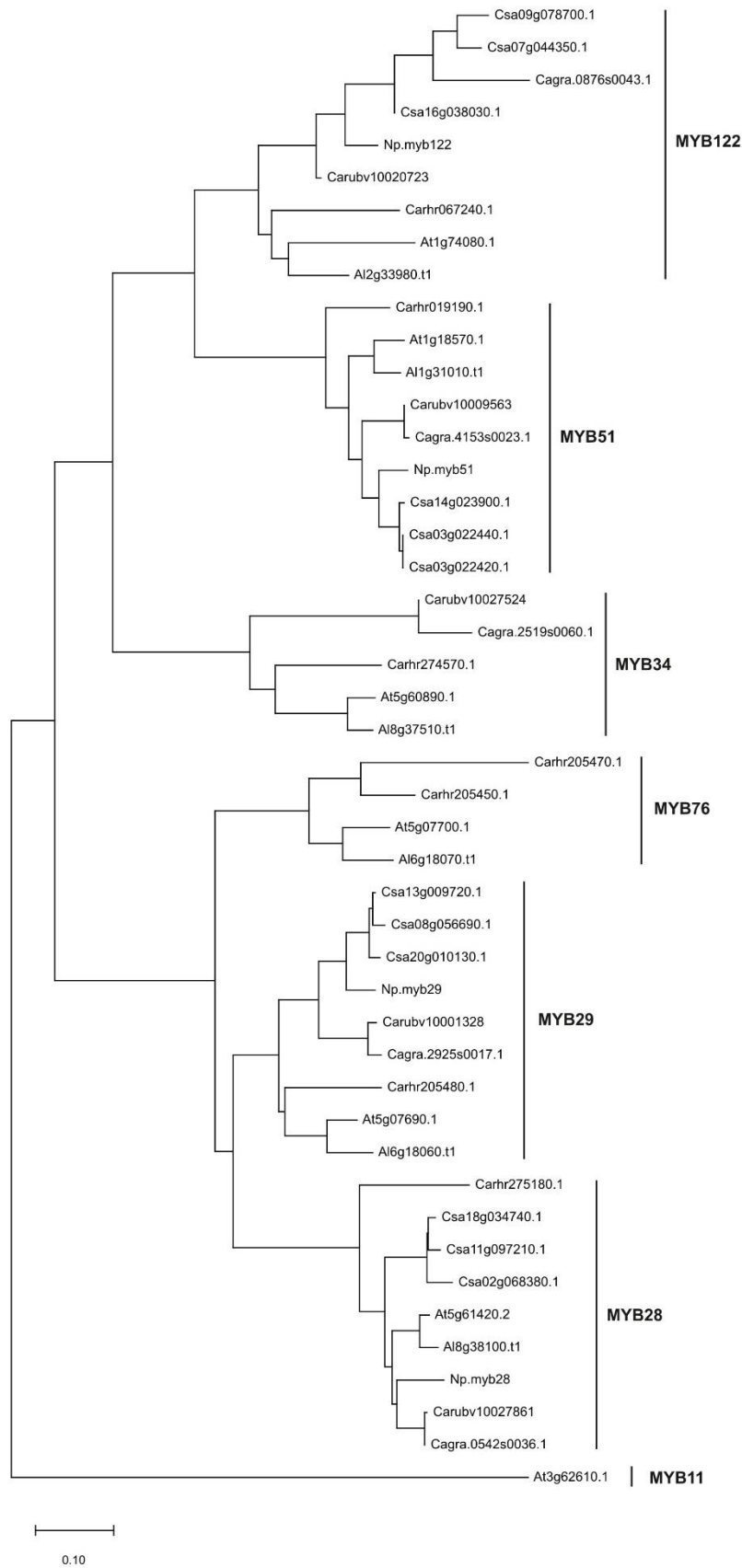
Ryc. 28. Mapy genomowe locus zawierającego ortologi genów *MYB51* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.



Ryc. 29. Mapy genomowe locus zawierającego ortologów genów *MYB122* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.



Ryc. 30. Mapy genomowe locus zawierającego ortologów genów *MYB34* w badanych gatunkach Camelinae. Liczby rzymskie odpowiadają numerowi chromosomu (jeśli jest on znany), strzałki nad genami wskazują orientację genu.

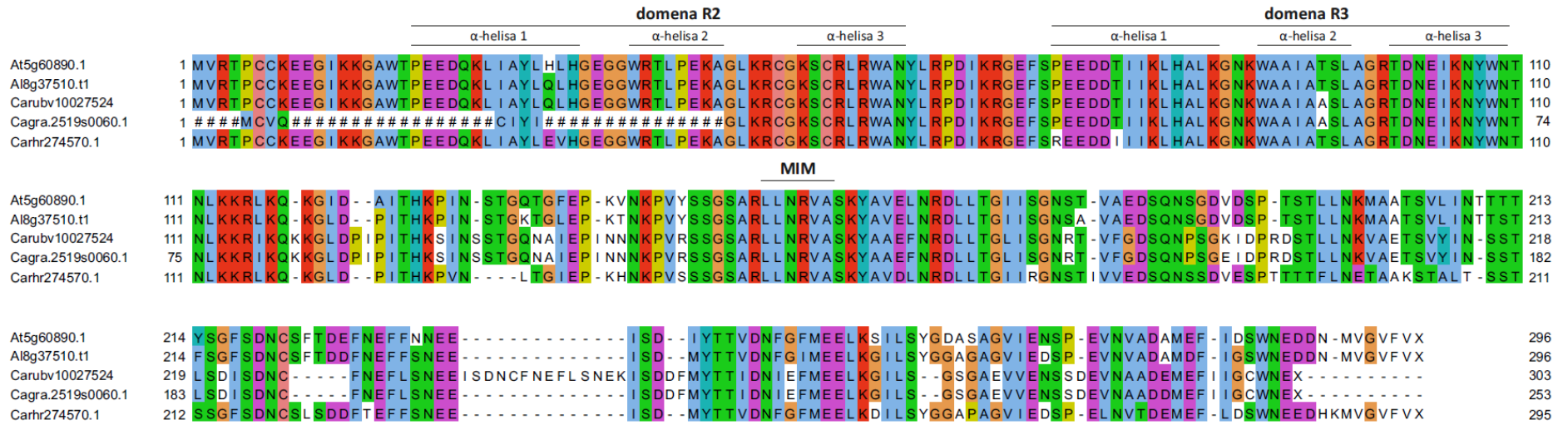


Ryc. 31. Drzewo filogenetyczne zidentyfikowanych ortologów czynników transkrypcyjnych MYB. Analizę filogenetyczną przeprowadzono przy użyciu algorytmu neighbor-joining. Jako grupę zewnętrzną zastosowano sekwencję MYB11 z *A. thaliana*. Skala pod drzewem wskazuje poziom 10% zróżnicowania porównywanych sekwencji białkowych.

W celu wskazania przyczyn zaburzonych relacji filogenetycznych ortologów MYB34 i MYB122 postanowiliśmy dokładniej porównać sekwencje białkowe poszczególnych czynników transkrypcyjnych regulujących szlak biosyntezy IG w badanych gatunkach. Zauważyliśmy, że sekwencje odpowiednich białek z *C. grandiflora* i *Cam. sativa* wykazywały pewne braki w początkowych ich częściach spowodowane niską jakością dostępnych sekwencji genomowych tych dwóch gatunków. Biorąc jednak pod uwagę, że sekwencje białkowe MYB34 i MYB122 dla *C. rubella* były kompletne, a ich relacje filogenetyczne również odbiegała od zakładanych, możemy wnioskować, że problemy z jakością sekwencji ortologów z *C. grandiflora* i *Cam. sativa* nie są główną przyczyną ich zaburzonych relacji filogenetycznych.

Pomijając wspomniane braki wynikające z jakości sekwencjonowania, wszystkie zidentyfikowane ortologi MYB34 wykazywały zakonserwowanie domen R2, R3 i motywu MIM (Ryc. 32). Co ciekawe, u *C. rubella* i *C. grandiflora* w dalszej części białka MYB34 zaobserwowaliśmy liczne insercje, delecje i substytucje. W przypadku czynnika MYB122 również zaobserwowaliśmy wysoki poziom zakonserwowania domen R2, R3 i motywu MIM, przy równoczesnej obecności zmian w C-końcowej części białek pochodzących od przedstawicieli kladu II Camelineae (Ryc. 33). Na tej podstawie, zakładamy, że N-końcowe części białek MYB34 i MYB122 pozostają silnie konserwowane we wszystkich badanych gatunkach, podczas gdy ich C-końce podlegają przyspieszonym zamianom ewolucyjnym w gatunkach kladu II Camelineae. W przeciwieństwie do MYB34 i MYB122, ortologi MYB51 pokazują wysoki stopień zakonserwowania całego białka, co koreluje z faktem, że drzewo filogenetyczne ortologów MYB51 było spójne z pokrewieństwem badanych gatunków (Ryc. 34).

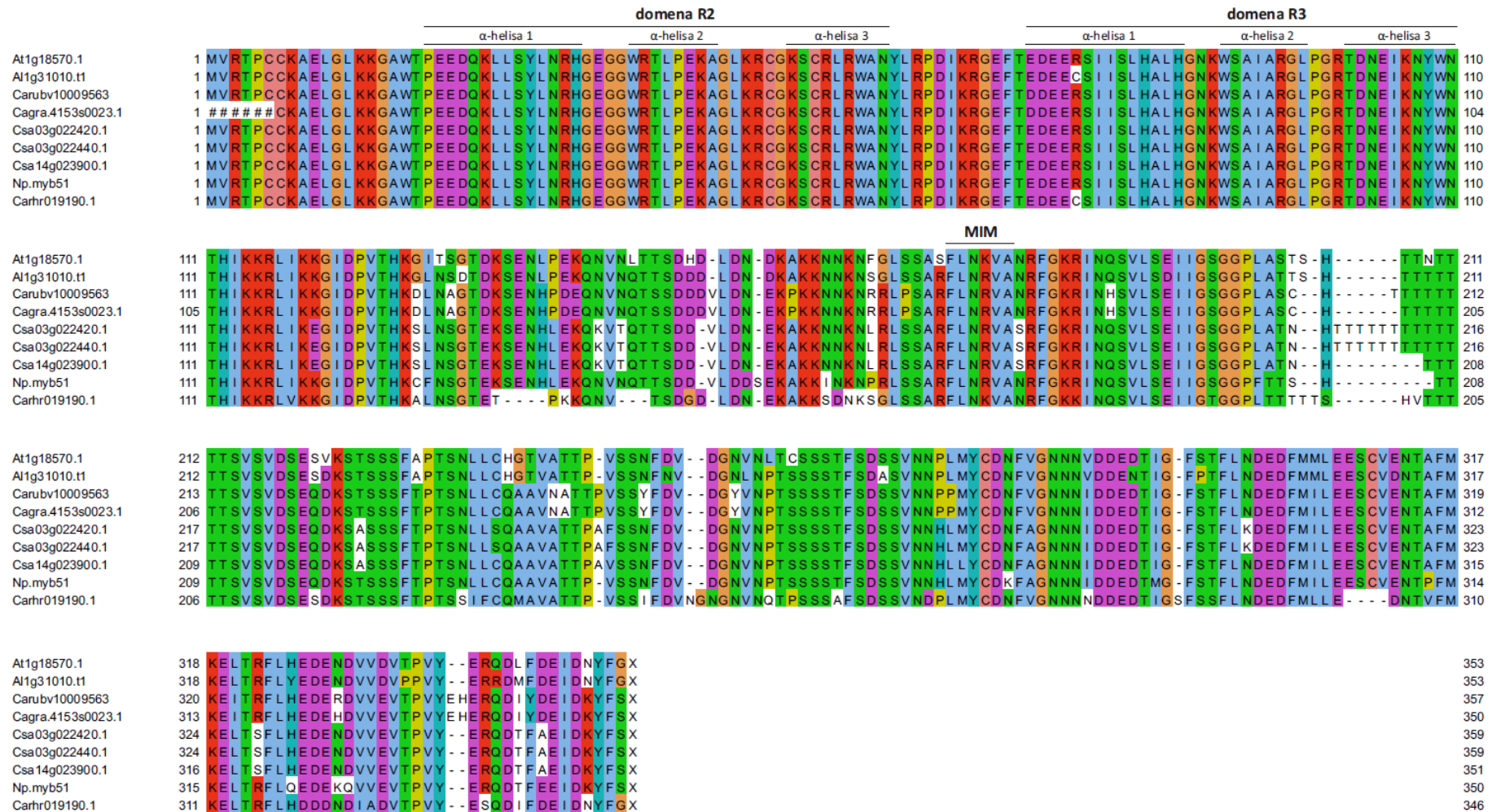
Zaobserwowane podczas tych analiz zmiany w sekwencjach MYB34 i MYB122 sugerują, że białka te mogły utracić swoją funkcjonalność w gatunkach należących do kladu II Camelineae. Biorąc pod uwagę niewielki wpływ MYB122 na biosyntezę IG, ewentualna utrata jego funkcjonalności nie wpłynęła raczej na produkcję IG u tych roślin.



Ryc. 32. Porównanie sekwencji białkowych ortologów MYB34 przy użyciu algorytmu MUSCLE. Carhr - *Cardamine hirsuta*, Al - *Arabidopsis lyrata*, At - *Arabidopsis thaliana*, Carub - *Capsella rubella*, Cagra - *Capsella grandiflora*, # - nieznana sekwencja, MIM – motyw oddziałujący z czynnikami transkrypcyjnymi bHLH/MYC



Ryc. 33. Porównanie sekwencji białkowych ortologów MYB122 przy użyciu algorytmu MUSCLE. Carhr - *Cardamine hirsuta*, Al - *Arabidopsis lyrata*, At - *Arabidopsis thaliana*, Carub - *Capsella rubella*, Cagra - *Capsella grandiflora*, Csa - *Camelina sativa*, Np – *Neslia paniculata*, # - nieznaną sekwencją, MIM – motyw oddziałujący z czynnikami transkrypcyjnymi bHLH/MYC

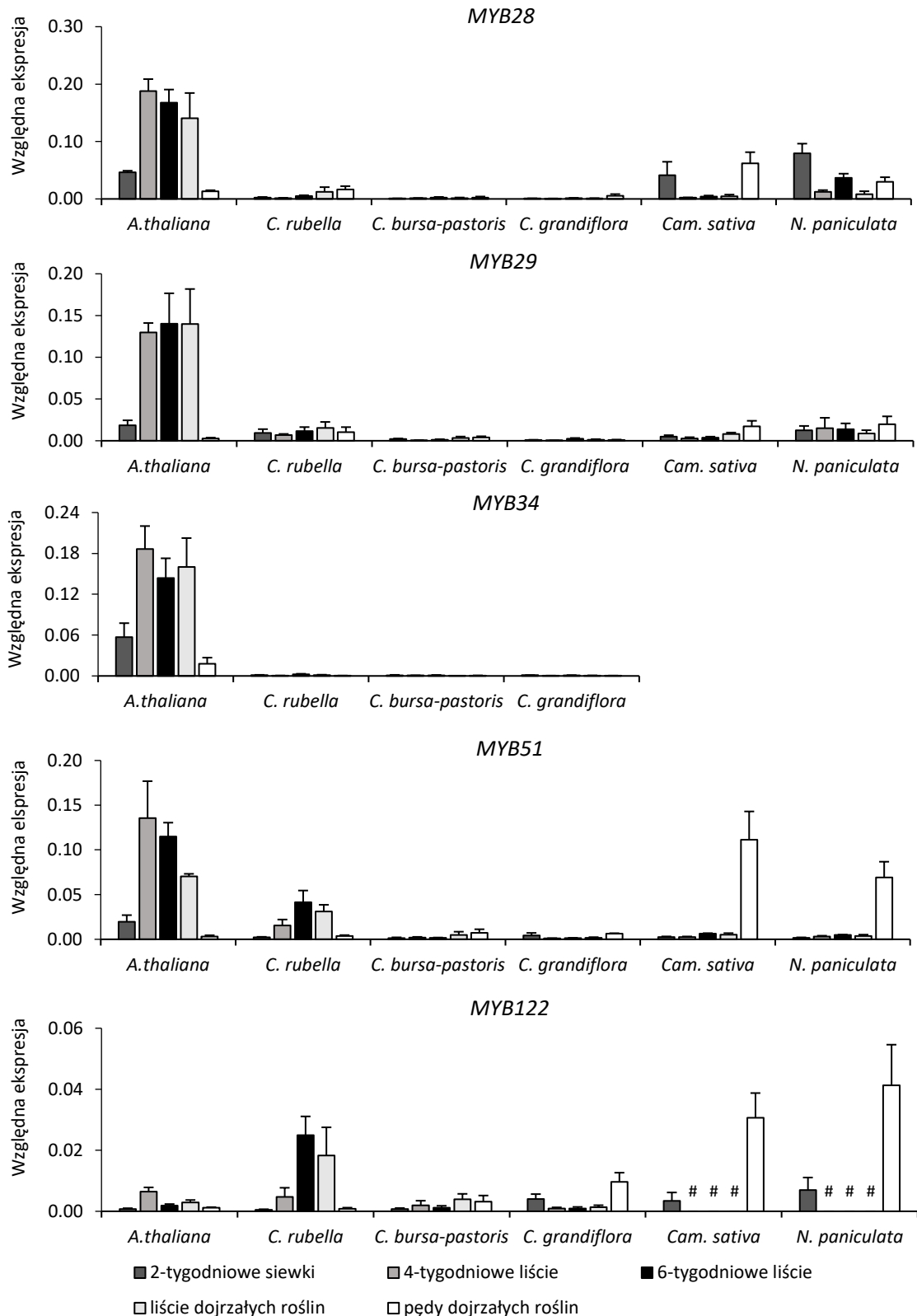


Ryc. 34. Porównanie sekwencji białkowych ortologów MYB51 przy użyciu algorytmu MUSCLE. Carhr - *Cardamine hirsuta*, Al - *Arabidopsis lyrata*, At - *Arabidopsis thaliana*, Carub - *Capsella rubella*, Cagra - *Capsella grandiflora*, Csa - *Camelina sativa*, Np – *Neslia paniculata*, # - nieznaną sekwencją, MIM – motyw oddziałujący z czynnikami transkrypcyjnymi bHLH/MYC

4.4.2. Ekspresja zidentyfikowanych ortologów genów *MYB*

Aby sprawdzić, w jakim stopniu ekspresja ortologów genów kodujących czynniki transkrypcyjne odpowiada organospecyficznemu wzorowi ekspresji genów związanych z biosyntezą AG i IG oraz z akumulacją tych metabolitów, wykonaliśmy analizy RT-qPCR dla różnych organów i stadiów rozwojowych badanych gatunków. Spośród czynników transkrypcyjnych regulujących szlak biosyntezy AG, zarówno gen *MYB28*, jak i *MYB29* ulegają widocznej ekspresji we wszystkich gatunkach. W przypadku *MYB28* zaobserwowaliśmy szczególnie wysoką ekspresję w 2-tygodniowych siewkach i pędach *Cam. sativa* i *N. paniculata*, podczas gdy w różnych organach pozostałych gatunków była ona niższa (Ryc. 35). Ekspresja *MYB29* również była dostrzegalna w różnych organach, choć różnice pomiędzy nimi nie były aż tak wyraźne, jak w przypadku *MYB28*. Wszystkie gatunki wykazały odrębny organospecyficzny wzór ekspresji wspomnianych genów w porównaniu do *A. thaliana*, u której najwyższy poziom ekspresji demonstrowany był w liściach, zaś najniższy w pędach (Ryc. 35).

Wśród genów kodujących czynniki transkrypcyjne zaangażowane w biosyntezę IG, zaskakująco zaobserwowaliśmy brak ekspresji genu *MYB34* w *C. rubella*, *C. grandiflora* i *C. bursa-pastoris* we wszystkich badanych organach i stadiach rozwojowych (Ryc. 35). W przypadku *MYB51* najwyższą ekspresję wykazywały pędy *Cam. sativa* i *N. paniculata*, ale co ciekawe, w *C. rubella* (podobnie jak w *A. thaliana*) gen ten prezentował najwyższą ekspresję w liściach na różnych stadiach rozwojowych. Dodatkowo, w badanych gatunkach kladu II Camelinae, wzór ekspresji *MYB122* był bardzo zbliżony do *MYB51*, różniąc się od *A. thaliana* w większości przypadków, ale równocześnie korespondując ze wzorem ekspresji genów kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie IG oraz wzorem akumulacji tych metabolitów.



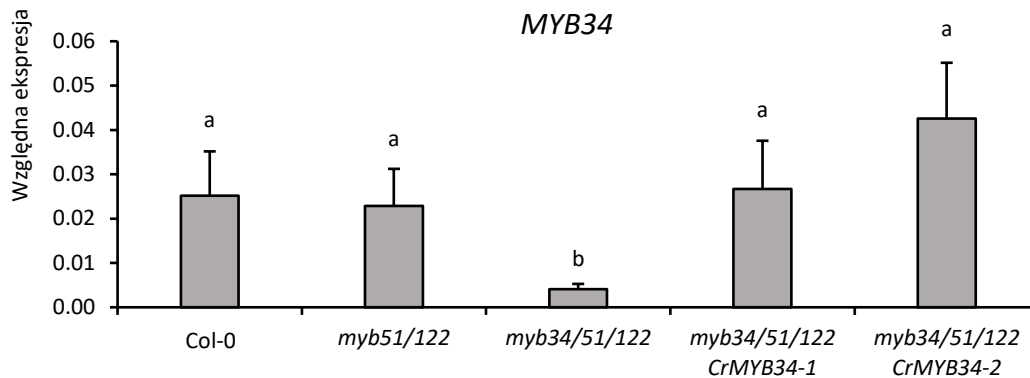
Ryc. 35. Względna ekspresja wybranych genów biorących udział w biosyntezie glukozynolanów wyznaczona metodą RT-qPCR przy zastosowaniu referencyjnego genu kodującego aktynę. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z trzech niezależnych eksperymentów, każdy zawierający cztery powtórzenia biologiczne (n = 12).

4.4.3. Utrata funkcji *CrMYB34* w biosyntezie IG

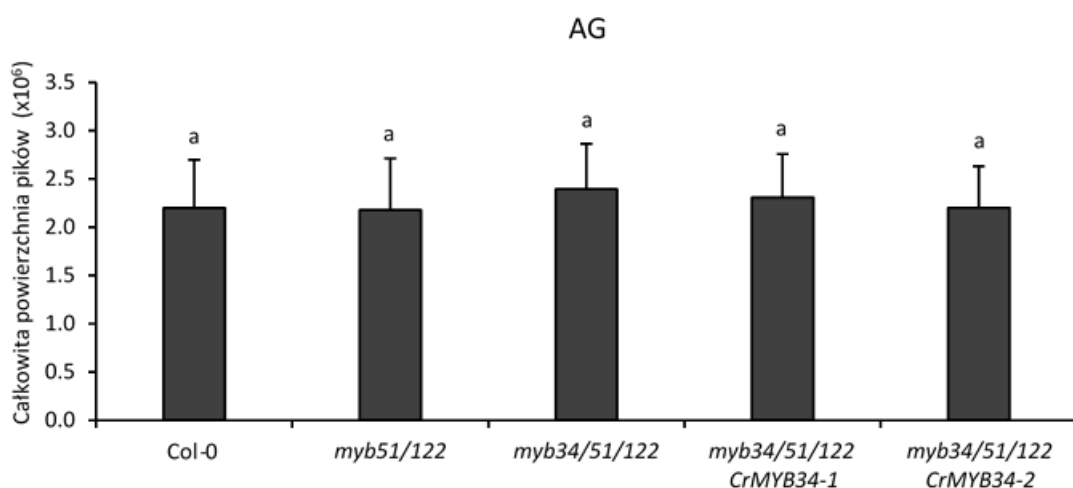
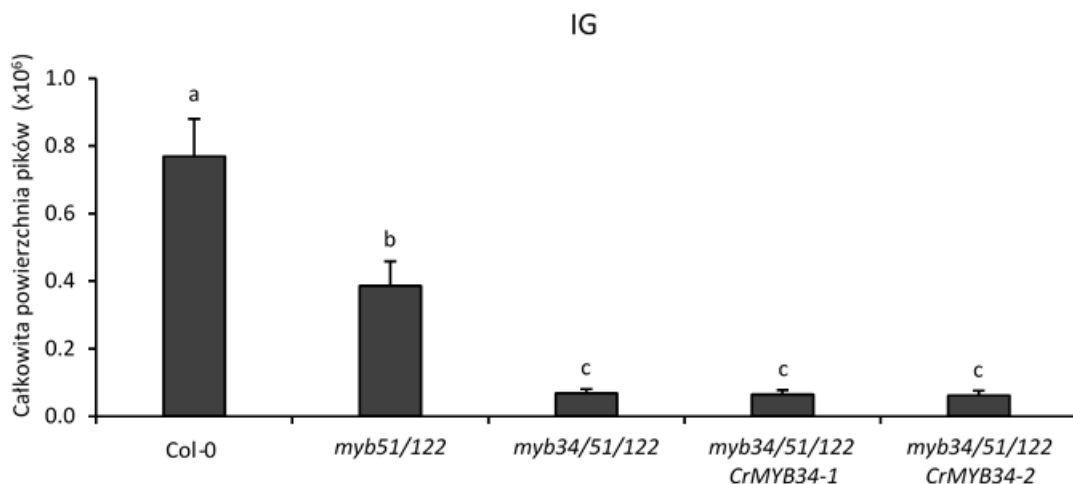
Wspomniany wcześniej brak ortologów MYB34 w *Cam. sativa* i *N. paniculata* (Ryc. 30), liczne zmiany w sekwencji białkowej ortologów z rodzaju *Capsella* (Ryc. 31) oraz brak ekspresji kodujących je genów (Ryc. 35), sugerują, że MYB34 mógł utracić swoją funkcję na wcześniejszych etapach ewolucji gatunków kladu II Camelineae. W celu weryfikacji tej hipotezy postanowiliśmy wygenerować linie transgeniczne *A. thaliana* ekspresyjące gen *MYB34* pochodzący z jednego z gatunków rodzaju *Capsella*, w których potencjalny ortolog *MYB34* został zachowany. Z uwagi na niekompletną sekwencję genu z *C. grandiflora*, jako dawcę *MYB34* wybraliśmy *C. rubella*. Biorąc pod uwagę brak ekspresji *MYB34* w *C. rubella* oraz konieczność uzyskania natywnego wzoru ekspresji z *A. thaliana*, zdecydowaliśmy się na użycie promotora genu *AtMYB34*, a nie natywnego promotora *CrMYB34*. Założyliśmy, że jeśli białko *CrMYB34* jest funkcjonalne, powinno być w stanie zastąpić białko *AtMYB34* w liniach *A. thaliana* posiadających mutację w genie *MYB34* i podnieść w nich akumulację IG. Biorąc pod uwagę fakt, że ze względu na pokrywające się funkcje białek MYB34, MYB51 i MYB122 różnica w poziomie akumulacji IG pomiędzy dzikim typem a pojedynczym mutantem *myb34* nie jest wysoka, jako linię do transformacji zastosowaliśmy potrójnego mutantu *myb34/51/122*, który cechuje się prawie całkowitym zanikiem produkcji IG [102]. Założyliśmy, że przy tak niskim poziomie akumulacji IG nawet niewielki wzrost ich biosyntezy będzie łatwiej dostrzegalny niż w przypadku linii *myb34*. W optymalnej sytuacji, w pełni funkcjonalnego białka MYB34, poziom ten powinien zrównać się z akumulacją IG w podwójnym mutancie *myb51 myb122*.

Wyselekcjonowane w pokoleniu T₁ transgeniczne rośliny zostały poddane analizie RT-qPCR w celu wyboru roślin o najwyższym poziomie transkrypty *CrMYB34*. Na tej podstawie do dalszych doświadczeń wybraliśmy dwie rośliny, których potomstwo w pokoleniu T₂ ekspresywność genu *CrMYB34* na poziomie porównywalnym do ekspresji *AtMYB34* w Col-0 i *myb51/122* (Ryc. 36). Z drugiej jednak strony nasze analizy LC-MS/MS wykazały, że obie linie transgeniczne nie wykazują żadnych zmian w akumulacji IG w porównaniu do mutantu *myb51/122*. Obecność transkrypty przy równoczesnym braku zmian w akumulacji IG jednoznacznie wykazuje, że *CrMYB34*, nie koduje białka zdolnego do kontroli biosyntezy IG (Ryc. 37). Dodatkowo, nie zaobserwowaliśmy również żadnych zmian w akumulacji AG pomiędzy wszystkimi badanymi liniami, co

świadczy o tym, że ekspresja *CrMYB34* nie wpływa w żaden sposób na zdolność do produkcji AG (Ryc. 37).



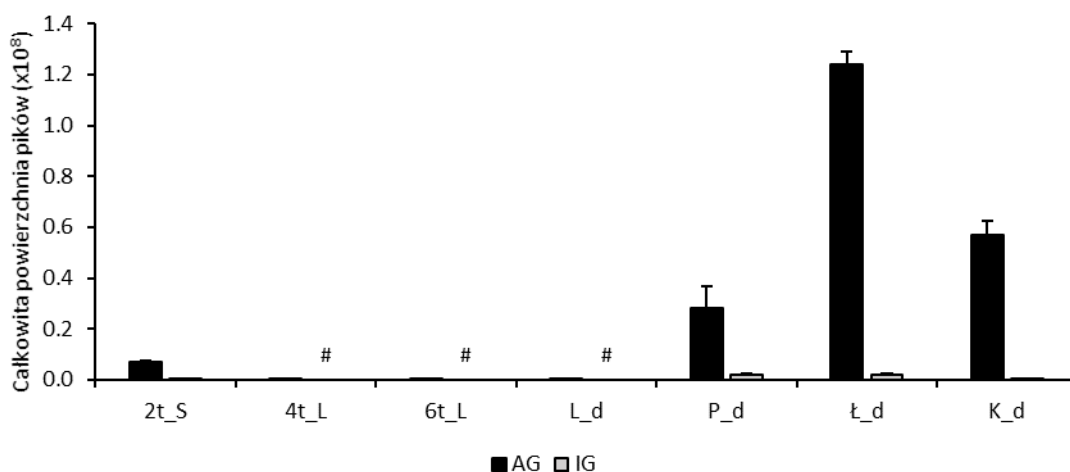
Ryc. 36. Względna ekspresja genu *MYB34* w wygenerowanych liniach transgenicznych *A. thaliana* eksprymujących gen *CrMYB34* pod natywnym promotorem *AtMYB34*. Do analiz użyto starterów uniwersalnych dla *MYB34* z *A. thaliana* i z *C. rubella*. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z jednego eksperymentu w pięciu powtórzeniach biologicznych (n = 5). Istotnie różne grupy statystyczne zostały wskazane za pomocą testu ANOVA ($P < 0,05$; test post-hoc Tukey'a).



◀ **Ryc. 37.** Całkowita akumulacja glukozyolanów indolowych (IG) i alifatycznych (AG) w wygenerowanych liniach transgenicznych *A. thaliana* ekspresyjnych gen *CrMYB34* pod natywnym promotorem *AtMYB34*. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z jednego eksperymentu w pięciu powtórzeniach biologicznych (n = 5). Istotnie różne grupy statystyczne zostały wskazane za pomocą testu ANOVA (P < 0,05; test post-hoc Tukey'a).

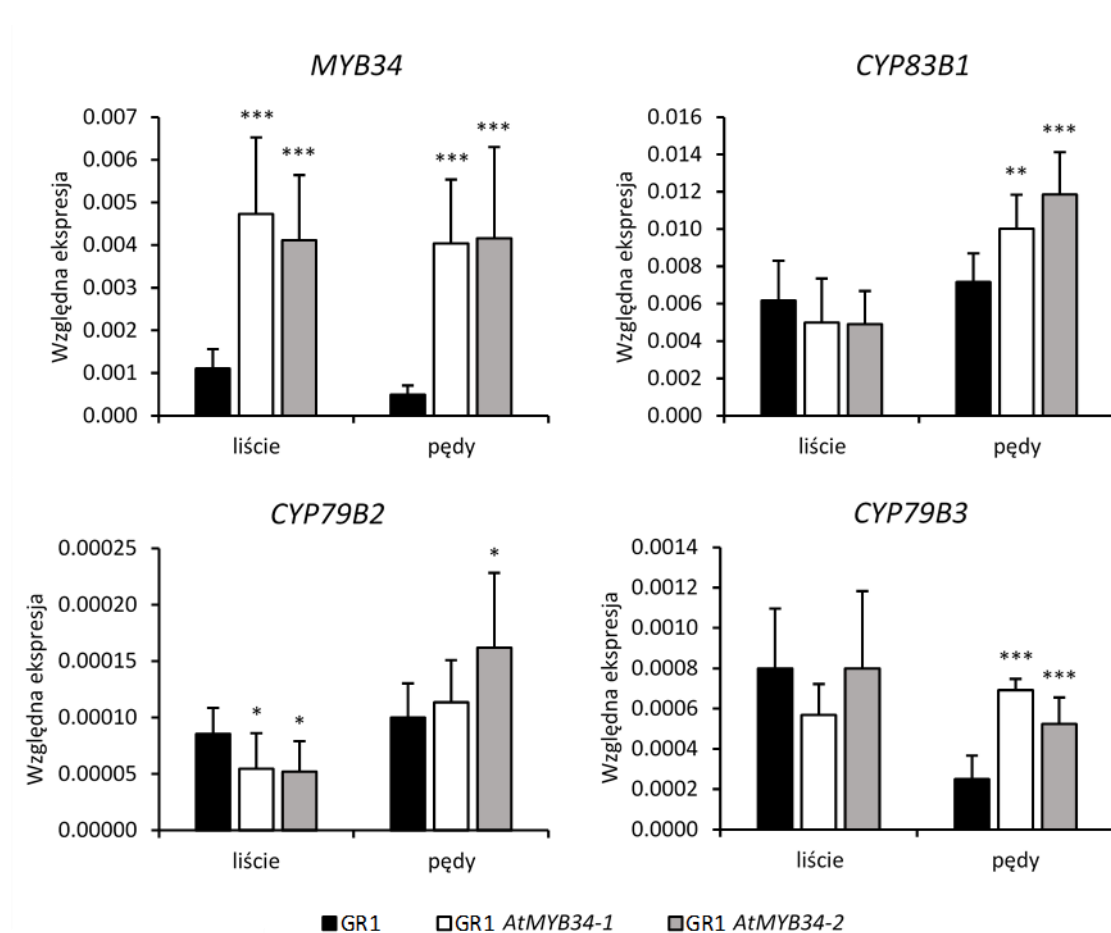
4.4.4. Brak funkcjonalnego MYB34 jako przyczyna ograniczonej zdolności do biosyntezy IG

Aby sprawdzić, czy utrata funkcjonalnego białka MYB34 mogła stać się molekularną przyczyną obniżonej zdolności do produkcji IG w gatunkach należących do kladu II Camelinae, postanowiliśmy wygenerować linie transgeniczne *C. rubella* ekspresyjne gen kodujący *AtMYB34* pod jego natywnym promotorem. Do przeprowadzenia transgenezy, jako biorcę wybraliśmy ekotyp GR1 *C. rubella*, który z uwagi na brak wymogu wernalizacji charakteryzuje się znacznie krótszym czasem osiągnięcia fazy kwitnienia w porównaniu z ekotypem Monte Gargano użytym w poprzednich eksperymentach. Zmiana ekotypu znacząco skróciła czas uzyskania kolejnych pokoleń linii transgenicznych. Co istotne dla planowanych eksperymentów, nasze analizy LC-MS/MS wykazały, że akumulacja AG i IG była porównywalna w obu ekotypach (Ryc. 38). Zakładając, że wprowadzony gen *AtMYB34* będzie ulegał ekspresji w *C. rubella* pod swoim natywnym promotorem, chcieliśmy również sprawdzić czy kodowane przez niego funkcjonalne białko wpłynie istotnie na regulację ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę IG, skutkując zwiększoną zdolnością do produkcji tych metabolitów.



◀ **Ryc. 38.** Całkowita akumulacja glukozyolanów alifatycznych (AG) i indolowych (IG) w wybranych organach ekotypu GR1 *C. rubella*. Wykres słupkowy wskazuje sumę powierzchni pików na chromatogramach deprotonowanych cząsteczek. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z dwóch niezależnych eksperymentów, każdy w trzech powtórzeniach biologicznych (n = 6). 2t_S – 2-tygodniowe siewki, 4t_L – 4-tygodniowe liście, 6t_L – 6-tygodniowe liście, L_d – liście dojrzałych roślin, P_d – pędy dojrzałych roślin, L_d – łuszczyнки dojrzałych roślin, K_d – korzenie dojrzałych roślin, # - poniżej granicy detekcji

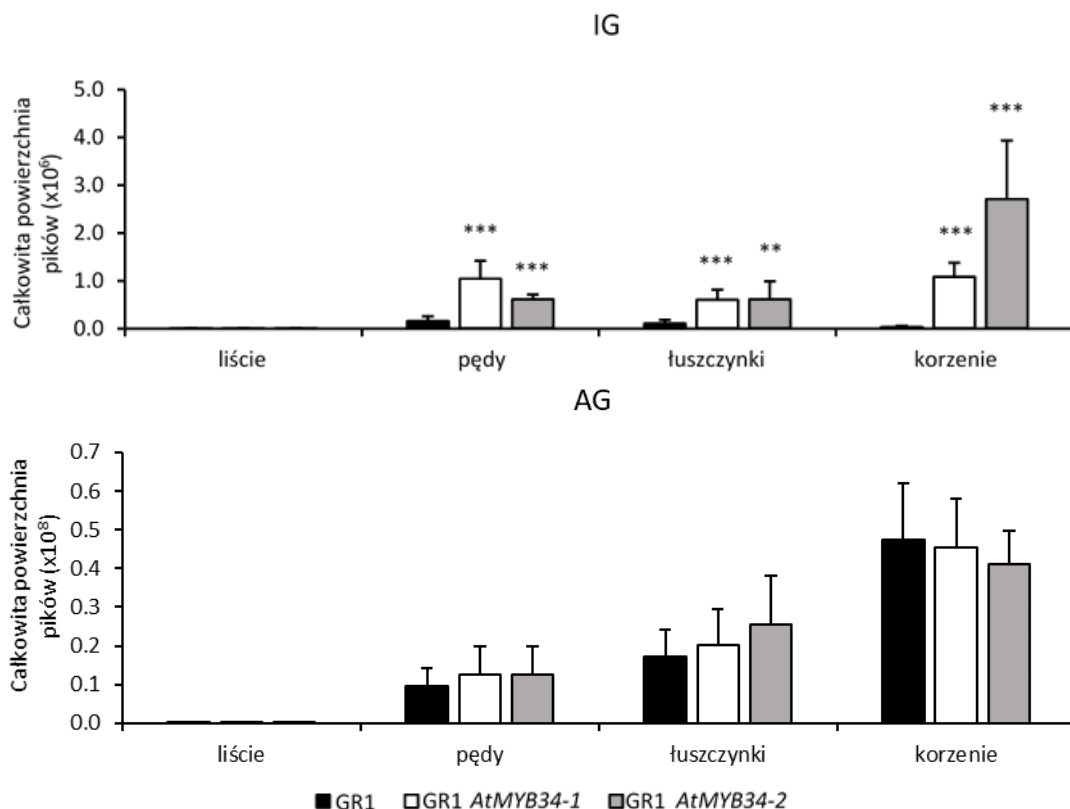
Z pokolenia T₁ wygenerowanych roślin transgenicznych wyselekcjonowaliśmy dwie rośliny o najwyższej ekspresji *AtMYB34*, a następnie poddaliśmy dalszym badaniom ich potomstwo w pokoleniu T₂. Przeprowadzone analizy linii transgenicznych potwierdziły zwiększony poziom transkryptu *MYB34* względem dzikiego typu w liściach oraz pędach, dowodząc, że promotor genu *AtMYB34* jest funkcjonalny w *C. rubella* (Ryc. 39). Aby zweryfikować, czy *AtMYB34* może kontrolować ekspresję genów związanych z biosyntezą IG w *C. rubella*, sprawdziliśmy poziom ekspresji *CYP79B2*, *CYP79B3* i *CYP83B1*. Nasze analizy linii transgenicznych wykazały wyższy poziom



◀ **Ryc. 39.** Względna ekspresja genów *MYB34*, *CYP79B2*, *CYP79B3* i *CYP83B1* w wygenerowanych liniach transgenicznych *C. rubella* ekspresyjnych gen *AtMYB34* pod jego natywnym promotorem. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z dwóch eksperymentów w czterech powtórzeniach biologicznych (n = 8). Istotność statystyczna względem dzikiego typu została wskazana za pomocą testu t-Studenta (wartość P: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001).

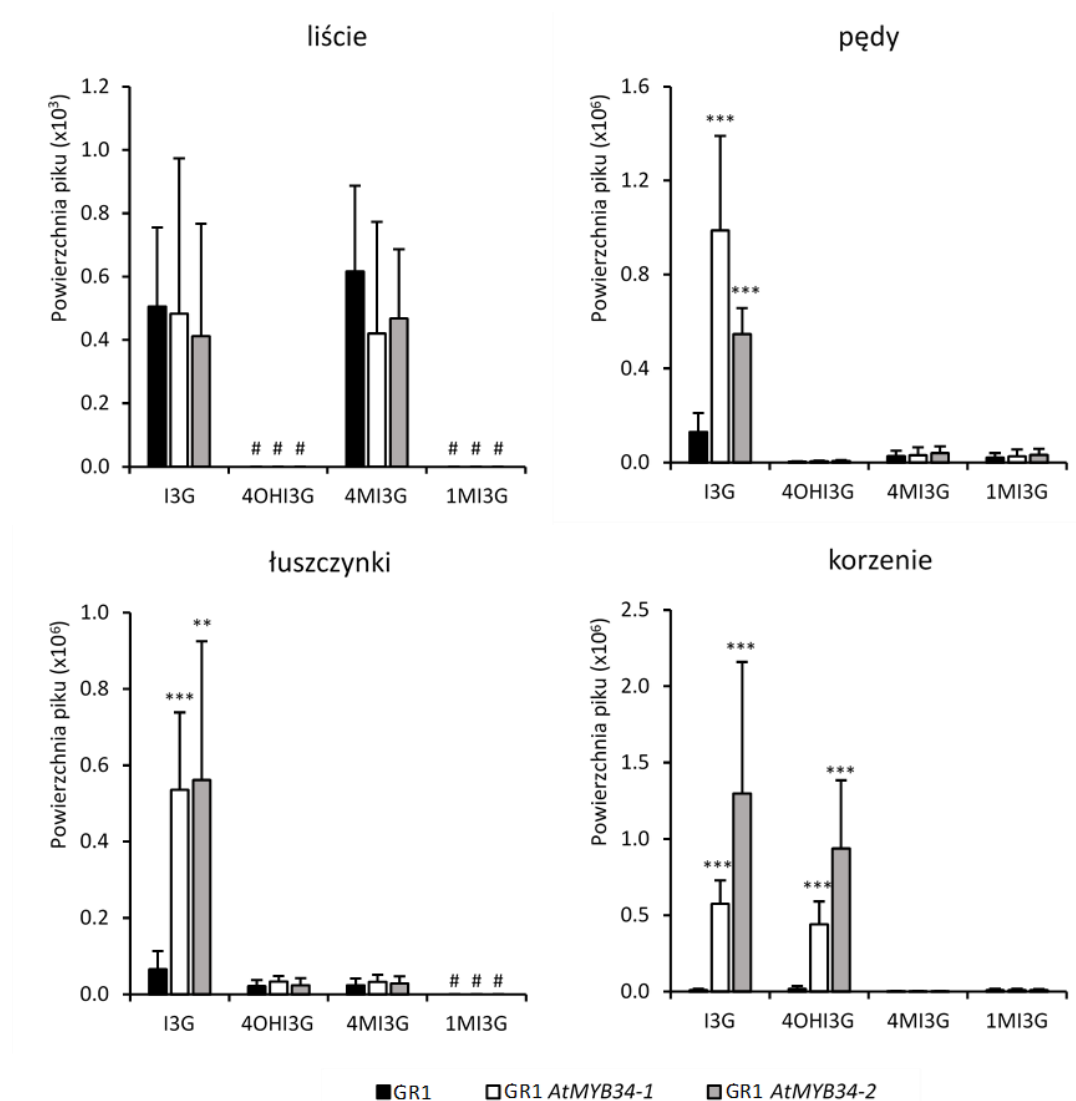
transkryptów *CYP79B3* i *CYP83B1* w porównaniu z dzikim typem GR1 (Ryc. 39). Jednak zmiany te były widoczne w obu przypadkach jedynie w pędach, zaś w liściach poziom ekspresji tych genów pozostawał bez zmian. Co ciekawe, ekspresja genu *CYP79B2* była wyższa w pędach tylko jednej z linii transgenicznych, a w przypadku liści jej poziom był nawet nieco niższy od dzikiego typu (Ryc. 39). Powyższe wyniki wykazały, że białko *AtMYB34* jest w stanie efektywnie kontrolować ekspresję genów kodujących enzymy ze szlaku biosyntezy IG w *C. rubella*, jednak kontrola ta nie jest możliwa w liściach.

W celu zweryfikowania wpływu obserwowanych różnic w ekspresji genów na biosyntezę IG w *C. rubella*, sprawdziliśmy poziom akumulacji glukozyolanów w wygenerowanych liniach transgenicznych ekspresyjnych *AtMYB34*. Nasze analizy LC-MS/MS wykazały wyraźny wzrost całkowitej produkcji IG w pędach, łuszczynkach i korzeniach linii transgenicznych, ale nie w liściach (Ryc. 40). W przypadku AG, ich akumulacja w porównaniu do typu dzikiego pozostawała bez zmian we wszystkich organach.



◀ **Ryc. 40.** Całkowita akumulacja glukozyolanów indolowych (IG) i alifatycznych (AG) w wybranych organach wygenerowanych linii transgenicznych *C. rubella* eksprymujących gen *AtMYB34* pod jego natywnym promotorem. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z dwóch eksperymentów w czterech powtórzeniach biologicznych (n = 8). Istotność statystyczna względem dzikiego typu została wskazana za pomocą testu t-Studenta (wartość P: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001).

W kolejnym kroku, postanowiliśmy sprawdzić czy ekspresja *AtMYB34* w *C. rubella* powoduje zniwelowanie defektu w produkcji wszystkich IG czy tylko niektórych pochodnych. Nasze analizy wykazały, że w pędach i łuszczynekach linii transgenicznych obserwowalny jest wyraźny wzrost produkcji jedynie I3G, podczas gdy pozostałe pochodne prezentowały niezmienny poziom akumulacji (Ryc. 41). Co ciekawe, w przypadku korzeni dostrzeżliśmy zwiększoną produkcję nie tylko I3G, ale również 4OHI3G. Liście natomiast nie wykazywały żadnych istotnych różnic w akumulacji ani I3G, ani którejkolwiek jego pochodnej.



◀ **Ryc. 41.** Akumulacja poszczególnych IG w wybranych organach wygenerowanych linii transgenicznych *C. rubella*. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z dwóch eksperymentów w czterech powtórzeniach biologicznych (n = 8). Istotność statystyczna względem dzikiego typu została wskazana za pomocą testu t-Studenta (wartość P: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001). I3G – indolilo-3-metyloglukozynolan, 4OH3G – 4-hydroksy-indolilo-3-metyloglukozynolan, 4MI3G – 4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan, 1MI3G – 1-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan, # - nie wykryto

Otrzymane przez nas wyniki jasno wskazują, że ekspresja genu kodującego funkcjonalny *AtMYB34* w *C. rubella* prowadzi do zwiększenia zdolności do produkcji IG, głównie I3G, w pędach, łuszczynekach i korzeniach. Utrata funkcjonalnego białka MYB34 jest zatem jedną z głównych molekularnych przyczyn zahamowania produkcji IG w *C. rubella* i przypuszczalnie w pozostałych gatunkach kladu II *Camelineae*.

4.4.5. MYB34 jako główny regulator sprzężenia zwrotnego w biosyntezie IG

Wcześniejsze badania podwójnego mutantu *cyp83b1 myb34 A. thaliana* wskazały na czynnik transkrypcyjny MYB34 jako białko biorące udział w sprzężeniu zwrotnym kontrolującym poziom IG, które w przypadku defektu w tym szlaku biosyntezy może prowadzić do nadprodukcji IAA (Ryc. 9) [98]. Nie sprawdzono jednak, czy w mechanizm powyższego sprzężenia zwrotnego zaangażowane są również MYB51 i MYB122. Postanowiliśmy zatem w sposób bardziej systematyczny sprawdzić potencjalny udział w tym sprzężeniu zwrotnym wszystkich trzech czynników transkrypcyjnych MYB kontrolujących biosyntezę IG. W tym celu, wykorzystaliśmy wygenerowane wcześniej w naszym laboratorium podwójne linie mutantów *A. thaliana cyp83b1 myb34*, *cyp83b1 myb51* i *cyp83b1 myb122*. Aby uzyskane wyniki miały znaczenie fizjologiczne, w odróżnieniu od warunków *in vitro* zastosowanych wcześniej w analizach linii *cyp83b1 myb34* [98], w naszych doświadczeniach wykorzystaliśmy 6-tygodniowe rośliny rosnące w ziemi.

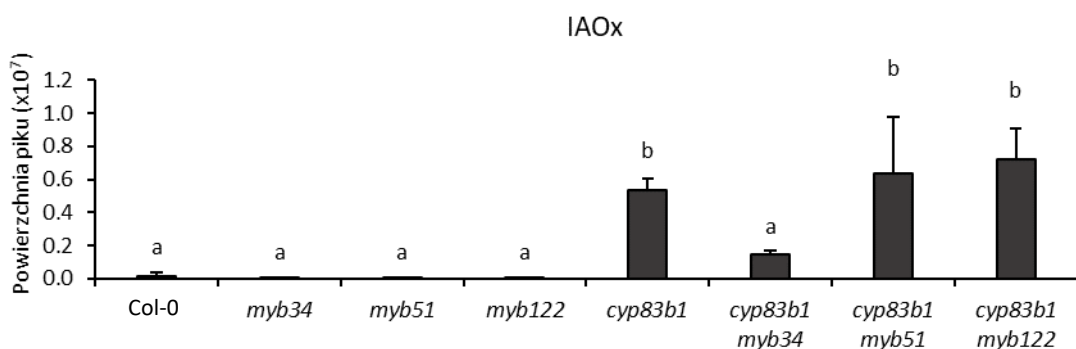
Porównanie wzrostu wygenerowanych mutantów pokazało, że linie *cyp83b1 myb51* i *cyp83b1 myb122*, podobnie jak pojedynczy mutant *cyp83b1*, charakteryzują się zahamowanym rozwojem części nadziemnych roślin, co może być wynikiem nadprodukcji auksyn (Ryc. 42). Zgodnie ze wcześniejszymi wynikami uzyskanymi dla siewek 10-dniowych siewek hodowanych *in vitro* [98], mutant *cyp83b1 myb34*

charakteryzował się odwróconym fenotypem zbliżonym do typu dzikiego oraz pojedynczych mutantów *myb34*, *myb51* i *myb122*. Wyniki te sugerują, że prawdopodobnie nadprodukcja auksyn w linii *cyp83b1* może być zahamowana poprzez wprowadzenie dodatkowej mutacji w genie *MYB34*, ale nie w przypadku mutacji genów *MYB51* i *MYB122*.



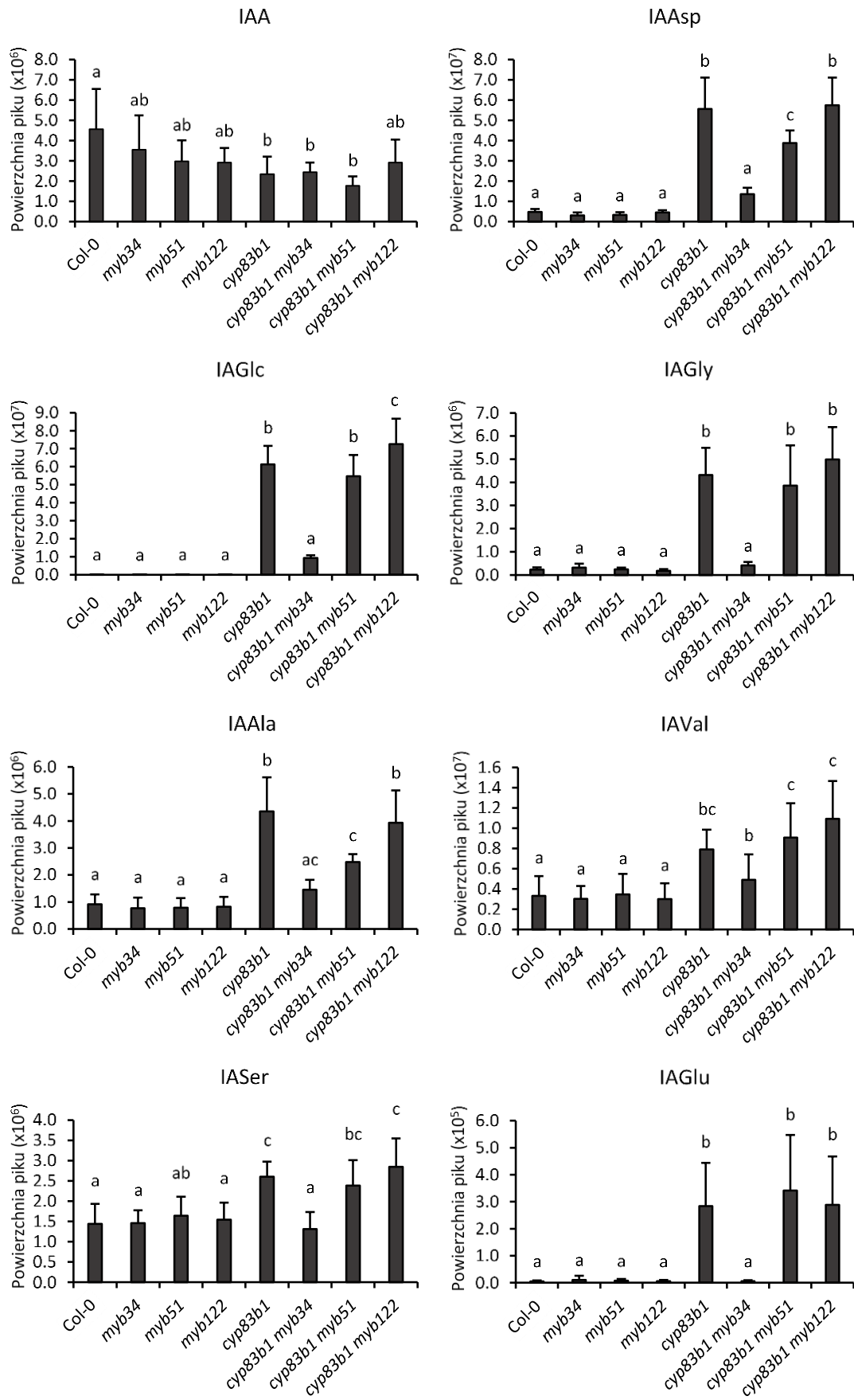
Ryc. 42. Porównanie fenotypu wzrostu 6-tygodniowych roślin wygenerowanych podwójnych mutantów z liniami pojedynczych mutantów i typem dzikim (Col-0).

W celu weryfikacji tej hipotezy, przeprowadziliśmy analizy LC-MS/MS próbek uzyskanych z podwójnych mutantów *cyp83b1 myb*. Nasze analizy wykazały, że w porównaniu do dzikiego typu, linie *cyp83b1*, *cyp83b1 myb51* i *cyp83b1 myb122* charakteryzują się wyraźnie wyższą akumulacją jonu o wartości *m/z* odpowiadającej deprotonowanej cząsteczce IAOx, będącego produktem pośrednim w biosyntezie zarówno IG, jak i IAA (Ryc. 9, Ryc. 43). Zgodnie z przypuszczeniami, podwójny mutant *cyp83b1 myb34* wykazywał zahamowaną nadprodukcję IAOx, akumulując ten związek na poziomie porównywalnym z typem dzikim oraz liniami *myb34*, *myb51* i *myb122*.



◀ **Ryc. 43.** Akumulacja indolilo-3-aldoksyumu (IAOx) w badanych liniach mutantów *A. thaliana*. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z dwóch eksperymentów w czterech lub pięciu powtórzeniach biologicznych (n = 9). Istotnie różne grupy statystyczne zostały wskazane za pomocą testu ANOVA (P < 0,05; test post-hoc Tukey'a).

Na podstawie analiz posiadanego standardu sprawdziliśmy również poziom akumulacji samego IAA, ale w tym przypadku nie zaobserwowaliśmy oczekiwanego wzoru zmian (Ryc. 44). Wszystkie linie mutantów *cyp83b1* (z wyjątkiem *cyp83b1 myb122*) wykazywały nawet niższą zawartość IAA względem typu dzikiego. Postanowiliśmy zatem zidentyfikować również formy IAA związane w postaci koniugatów tworzonych z aminokwasami i cukrami. Wśród sygnałów uzyskanych podczas analiz LC/MS udało nam się znaleźć sygnały o wartościach *m/z* odpowiadających opisanym w literaturze koniugatom IAA z glukozą (IAGlc) oraz 6 aminokwasami: kwasem asparaginowym (IAAsp), glicyną (IAGly), alaniną (IAAla), waliną (IAVal), seryną (IASer) i kwasem glutaminowym (IAGlu) (Ryc. 44, Tabela uzupełniająca 2). Co ciekawe, w linii *cyp83b1* zaobserwowaliśmy nadprodukcję wszystkich potencjalnych koniugatów IAA, która została silnie zredukowana w większości przypadków (z wyjątkiem IAVal) w linii *cyp83b1 myb34* do poziomu porównywalnego z dzikim typem. W odniesieniu do *cyp83b1*, nie zaobserwowaliśmy natomiast wyraźnych zmian w akumulacji związanego IAA w liniach *cyp83b1 myb51* (z wyjątkiem IAAsp i IAAla) i *cyp83b1 myb122* (poza IAGlc, który wykazywał nawet wyższą akumulację). Możemy zatem wnioskować, że wprowadzenie mutacji w obrębie genu *MYB34* w liniach *cyp83b1* powoduje zahamowanie nadprodukcji IAA i jego pochodnych, ale wpływu takiego nie zaobserwowaliśmy w przypadku mutacji genów *MYB51* i *MYB122*. Wyniki te sugerują, że w sprzężenie zwrotne prowadzące do nadprodukcji IAA w przypadku defektu w biosyntezie IG, zaangażowany jest czynnik transkrypcyjny *MYB34*, podczas gdy *MYB51* i *MYB122* raczej nie biorą w nim udziału. Zważywszy na obserwowany defekt w produkcji IG w gatunkach kladu II *Camelineae*, utrata funkcjonalności właśnie przez *MYB34* mogła dodatkowo ułatwić wsteczną ewolucję szlaku biosyntezy IG.



◀ **Ryc. 44.** Akumulacja kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz jego koniugatów z glukozą (IAGlc), kwasem asparaginowym (IAAsp), glicyną (IAGly), alaniną (IAAla), waliną (IAVal), seryną (IASer) i kwasem glutaminowym (IAGlu) w badanych liniach mutantów *A. thaliana*. Wyniki są średnimi z odchyleniami standardowymi z dwóch eksperymentów w czterech lub pięciu powtórzeniach biologicznych (n = 9). Istotnie różne grupy statystyczne zostały wskazane za pomocą testu ANOVA ($P < 0,05$; test post-hoc Tukey'a).

5. Dyskusja

5.1. Unikalny organospecyficzny wzór akumulacji glukozyolanów w gatunkach plemienia *Camelineae*

Opublikowane do tej pory wyniki sugerują, że pomimo międzygatunkowych różnic w profilu glukozyolanów, metabolity te występują konstytutywnie w znacznych ilościach we wszystkich tkankach roślin Brassicaceae [142, 146-149]. Jedyne badane wcześniej gatunki, należące do tej rodziny, dla których nie uzyskano jednoznacznych wyników potwierdzających obecność zarówno AG, jak i IG we wszystkich organach reprezentują kład II plemienia *Camelineae* [37, 38, 49, 152-155].

Wyniki uzyskane w tej pracy podczas niecelowanych analiz metabolicznych i analiz ekspresji genów jednoznacznie wykazały, że w przeciwieństwie do *A. thaliana*, zarówno AG, jak i IG nie są produkowane i akumulowane w liściach *C. rubella*, *C. grandiflora*, *C. bursa-pastoris*, *Cam. sativa* i *N. paniculata*. Brak glukozyolanów w tym organie przynajmniej u niektórych gatunków kładu II *Camelineae* sugerowały już wcześniejsze doniesienia literaturowe [49, 152, 153]. Celowane analizy LC-MS, przeprowadzone dla liści *N. paniculata*, *Cam. microcarpa* i *Cat. pendulus* wykazały brak wszystkich znanych IG, jednak w przypadku AG wykluczono obecność tylko 19 analizowanych związków z maksymalną długością łańcucha 8C [145]. Dlatego nie można było jednoznacznie stwierdzić, czy w liściach tych gatunków obecne są inne AG, na przykład ich długołańcuchowe warianty, których obecność wykryto w nasionach *C. bursa-pastoris*, *N. paniculata* i gatunkach rodzaju *Camelina* [37, 38, 49, 152-155]. Zgodnie z tym przypuszczeniem, nasze analizy wykazały obecność 3-10C AG w liściach *C. rubella* i *C. bursa-pastoris*, jednak były to znikome, bliskie limitu detekcji dla systemu LC-MS, ilości tych związków, które nadal wskazują na ogólny defekt w biosyntezie AG w tym organie. Z kolei wcześniejsze doniesienie o braku IG w liściach *C. rubella* oparte były na analizach LC z mniej czułą metodą detekcji UV, co nie wykluczało występowania niewielkich ilości IG w liściach tego gatunku [151]. Nasze analizy jednak nie potwierdziły tego przypuszczenia (Ryc. 13).

W przeciwieństwie do liści, nasze analizy LC-MS wykazały obecność zarówno AG, jak i IG w pędach, łuszczynekach nasiennych i korzeniach badanych gatunków *Camelineae* (Ryc. 13). Jedynym wyjątkiem w tym przypadku były korzenie *C. rubella*, które nie akumulowały wykrywalnych ilości IG. W przeciwieństwie do liści i nasion

obecność glukozynolanów nie była wcześniej analizowana w tych organach gatunków kladu II Camelinae. W przypadku AG zaobserwowaliśmy niewielkie, w porównaniu do *A. thaliana*, ilości tych związków w pędach, ale w łuszczynkach i korzeniach poziom ich akumulacji był porównywalny z *A. thaliana*, a niekiedy nawet wyższy. Podobnie jak w przypadku doniesień o akumulacji AG w nasionach *C. bursa-pastoris*, *N. paniculata* i gatunków rodzaju *Camelina* [37, 38, 49, 152-155], wykryliśmy dominującą akumulację długołańcuchowych (9-10C) AG w pędach, łuszczynkach i korzeniach badanych roślin. Dodatkowo, wykazaliśmy również znaczną akumulację krótkołańcuchowych (3-4C) AG (Ryc. 15), które nie były wcześniej wykryte w nasionach gatunków kladu II Camelinae. Nasze analizy wykazały również, że w niemal wszystkich organach badanych gatunków poziom akumulacji IG był znacznie niższy niż akumulacja AG. Dodatkowo, był on zazwyczaj poniżej poziomu akumulacji IG obserwowanego w danym organie dla *A. thaliana* (Ryc. 13). Dominującą formę IG stanowił najczęściej niepodstawiony I3G lub nieco rzadziej 4OHI3G, podczas gdy pochodne 1MI3G i 4MI3G występowały jedynie w śladowych ilościach lub poniżej granicy detekcji (Ryc. 20).

Przeanalizowaliśmy również akumulację glukozynolanów w młodych siewkach, a uzyskane wyniki wykazały zróżnicowany poziom produkcji AG pomiędzy badanymi gatunkami oraz śladowe ilości IG u *C. bursa-pastoris* i *C. grandiflora*. W siewkach *C. rubella*, *Cam. sativa*, *N. paniculata* IG były poniżej poziomu detekcji (Ryc. 13). W przypadku tych analiz ekstrakty zostały przygotowane z całych siewek i zawierały równocześnie metabolity z liści i korzeni, przez co nie możemy stwierdzić, który z tych organów przyczynił się istotnie do zaobserwowanej akumulacji glukozynolanów. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla starszych roślin, bardziej prawdopodobnym wydaje się być występowanie AG i IG w korzeniach siewek niż w ich liściach.

Wykryta przez nas obecność glukozynolanów w łuszczynkach jest zgodna z opisaną wcześniej akumulacją AG w dojrzałych nasionach *C. bursa-pastoris*, *N. paniculata* i wybranych gatunków rodzaju *Camelina* [37, 38, 49, 152-155]. Z drugiej jednak strony, te wcześniejsze badania nie wykryły w nasionach obecności IG, które według uzyskanych przez nas wyników były obecne w łuszczynkach wszystkich analizowanych gatunków kladu II Camelinae (Ryc. 13). Należy jednak wziąć pod uwagę, że analizy glukozynolanów w nasionach *C. bursa-pastoris* i *N. paniculata* były analizami pośrednimi opartymi na analizie izotiocyjanianów [49, 152, 153]. Izotiocyjaniany będące produktami hydrolizy IG są związkami wysoce nietrwałymi i praktycznie niewykrywalnymi w ekstraktach roślin Brassicaceae [168]. Dlatego też analizy

izotiocyjanianów nie mogą być podstawą do wykrycia obecności IG. Nie dotyczy to jednak analizy LC-MS glukozynolanów lub desulfoglukozynolanów, które przeprowadzono dla nasion badanych gatunków rodzaju *Camelina* [37, 38, 154, 155] i które powinny dostarczyć informacji o obecności IG. Dlatego można przypuszczać, że w tych analizach poziom IG w nasionach był poniżej poziomu detekcji. Koreluje to z obserwacją, że wykryta przez nas akumulacja IG w łuszczynekach *Cam. sativa*, była zdecydowanie najniższa w porównaniu do łuszczynek innych badanych gatunków (Ryc. 13).

Podsumowując, nasze analizy LC-MS połączone z opublikowanym wcześniej wynikami wykazały dla gatunków kładu II Camelinae nieopisane wcześniej u innych roślin Brassicaceae wysokie zróżnicowanie poziomu akumulacji glukozynolanów pomiędzy poszczególnymi organami. W szczególności zaskakujący jest brak glukozynolanów w liściach oraz ich niski poziom akumulacji w pędach. Wypływający z analiz LC-MS wniosek o zatrzymaniu produkcji glukozynolanów w liściach przedstawicieli kładu II Camelinae wsparliśmy dodatkowo analizą ekspresji genów związanych z biosyntezą glukozynolanów, która jak do tej pory nie była wykonana dla tych gatunków. Oprócz braku glukozynolanów w liściach uwagę zwraca również niewielka zawartość IG we wszystkich organach wskazująca na utratę pierwotnego biologicznego znaczenia tych metabolitów.

5.2. Hipoteza optymalnej obrony a zdolność do biosyntezy glukozynolanów w liściach

Zakonserwowany brak IG i AG w liściach badanych gatunków kładu II Camelinae (Ryc. 2), sugeruje istnienie adaptacyjnej przewagi wynikającej z wyłączenia produkcji glukozynolanów w tym organie, która równoważy brak tych metabolitów pełniących istotne funkcje w oddziaływaniu roślin Brassicaceae ze środowiskiem. Jedną z możliwych korzyści ze zmniejszonej zdolności do biosyntezy związków o charakterze obronnym może wynikać z kompromisu pomiędzy wzrostem roślin a ich konstytutywną zdolnością do obrony przed patogenami i roślinożercami [169]. Wszystkie szlaki biosyntezy wykorzystują składniki odżywcze i produkty fotosyntezy w celu uzyskania odpowiednich produktów końcowych. Utrzymywanie konstytutywnej produkcji metabolitów wtórnych przy ograniczeniu tych zasobów może skutkować obniżeniem poziomu produkcji metabolitów pierwotnych i w konsekwencji spowolnieniem wzrostu

roślin. Wywołane ograniczeniem zasobów zmiany w produkcji metabolitów wtórnych mogą być dodatkowo modulowane presją ewolucyjną wywieraną przez mikroorganizmy patogenne i owady roślinożerne [170]. Z tego względu w pewnych niszach ekologicznych rezygnacja z konstytutywnej produkcji metabolitów o charakterze obronnym na rzecz promowania wzrostu może być korzystna dla przetrwania i rozpowszechniania się gatunku.

Organospecyficzny wzór akumulacji glukozyolanów obserwowany przez nas w gatunkach reprezentujących rodzaje *Capsella*, *Camelina* i *Neslia* (Ryc. 13), koresponduje z tzw. hipotezą optymalnej obrony (ang. optimal defense hypothesis) [171]. Zgodnie z tą hipotezą, konstytutywne i indukowalne mechanizmy obronne, w tym wytwarzanie metabolitów wtórnych, są często silniejsze i bardziej efektywne w tkankach, które w największym stopniu przyczyniają się do przetrwania i rozmnażania roślin lub są najbardziej narażone na ataki roślinożerców z powodu wysokiego poziomu akumulacji składników odżywczych. Do takich tkanek należą przede wszystkim młode, rozwijające się organy, narządy rozrodcze i korzenie [171, 172]. Zgodnie z tą hipotezą najwyższe stężenia glukozyolanów obserwowaliśmy w młodych siewkach, łuszczynekach i korzeniach. W szczególności, poziom akumulacji AG w tych organach nie odbiegał istotnie od akumulacji tych metabolitów w *A. thaliana* (Ryc. 13). Można więc przypuszczać, że kompromis pomiędzy wzrostem a odpornością roślin doprowadził u przodka kladu II plemienia Camelinae do znacznego obniżenia produkcji glukozyolanów w organach, które nie są aż tak istotne dla przetrwania gatunku.

5.3. Molekularne przyczyny obniżonej produkcji IG

Poszukując molekularnych przyczyn zmniejszonej zdolności do biosyntezy IG w gatunkach kladu II Camelinae zwróciliśmy uwagę na czynniki transkrypcyjne MYB34, MYB51 i MYB122, które w specyficzny sposób kontrolują biosyntezę tych metabolitów. Przeprowadzone przez nas analizy filogenetyczne wykazały, że wśród tych trzech białek jedynie ortologi białka MYB51 wykazują relacje filogenetyczne zgodne z pokrewieństwem gatunków Brassicaceae, a dodatkowo ich sekwencje w badanych gatunkach są bardziej zakonserwowane niż sekwencje MYB34 i MYB122 (Ryc. 31, Ryc. 34). W przypadku tych dwóch białek zaobserwowaliśmy niespójność relacji filogenetycznych pomiędzy ich ortologami a pokrewieństwem między gatunkami Brassicaceae, co znajduje odzwierciedlenie w licznych substytucjach, insercjach

i delecjach w sekwencjach białkowych tych dwóch czynników transkrypcyjnych (Ryc. 31, Ryc. 32, Ryc. 33). Zmiany te nie są obecne w scharakteryzowanych pod względem funkcji domenach R2 i R3, które biorą udział w wiązaniu białka do specyficznych sekwencji promotorowych, a także w motywie MIM odpowiedzialnym za interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi MYC. Porównanie sekwencji ortologów MYB34 i MYB122 wykazało, że największa częstotliwość mutacji obserwowanych u przedstawicieli kladu II Camelinaeae występuje w regionie C-końca tych białek, którego funkcje nie zostały do tej pory poznane. W tym kontekście warto zaznaczyć, że formowanie i funkcjonowanie kompleksu transkrypcyjnego nie ogranicza się do wzajemnego oddziaływania i wiązania do sekwencji promotorowej dwóch czynników transkrypcyjnych. Wydaje się zatem prawdopodobnym, że niescharakteryzowany do tej pory funkcjonalnie C-końcowy region białek MYB może być odpowiedzialny za oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi i białkami, istotnymi dla inicjacji transkrypcji. W takim wypadku mutacje obserwowane w genach kodujących MYB34 i MYB112 mogłyby prowadzić do utraty funkcji tych białek.

Powyższą hipotezę zweryfikowaliśmy ekspresją *CrMYB34* pod natywnym promotorem *AtMYB34* w mutancie *A. thaliana myb34/51/122*, która jednoznacznie udowodniła brak zdolności białka *CrMYB34* do kontroli biosyntezy IG (Ryc. 37). Biorąc dodatkowo pod uwagę brak ekspresji genu *MYB34* w *C. rubella*, *C. grandiflora* i *C. bursa-pastoris*, a także brak jego ortologu w *Cam. sativa* i *N. paniculata*, możemy przypuszczać, że czynnik transkrypcyjny MYB34 utracił swoją funkcję przed specjacją tych gatunków, a następnie odpowiadające mu sekwencje kodujące zostały usunięte z genomów *Cam. sativa* i *N. paniculata*. Wygenerowane przez nas linie transgeniczne *C. rubella* ekspresyjujące *AtMYB34*, wykazały z kolei znacząco wyższą akumulację IG w pędach, łuszczynekach i korzeniach w porównaniu do akumulacji tych związków w roślinach dzikiego typu, co wskazuje, że wprowadzenie funkcjonalnego białka MYB34 przynajmniej częściowo niweluje defekt w produkcji IG w tych organach (Ryc. 40). Wyniki te sugerują, że utrata funkcji przez MYB34 może stanowić główną przyczynę defektu w produkcji IG w gatunkach kladu II Camelinaeae. Z drugiej jednak strony, dotychczasowe badania linii *A. thaliana myb34* wykazały, że brak czynnika transkrypcyjnego MYB34 obniża zdolność do produkcji IG o około 25% względem typu dzikiego, a zatem nie prowadzi do defektu w takim stopniu jak zaobserwowaliśmy w badanych gatunkach Camelinaeae [102]. Dodatkowo, akumulacja tych związków w liniach transgenicznych *C. rubella* była wciąż wyraźnie niższa niż w *A. thaliana*, co

wykazało, że wprowadzenie funkcjonalnego MYB34 do *C. rubella* wciąż nie usuwa całkowicie defektu w biosyntezie IG. Wyniki te wykazują, że brak funkcjonalnego MYB34 w gatunkach kladu II Camelinae, nie jest jedyną molekularną podstawą zmniejszonej wydajności biosyntezy IG. Dlatego można przypuszczać, że dodatkowe elementy szlaku biosyntezy IG uległy modyfikacji w gatunkach kladu II Camelinae. Jak wspomniano powyżej jednym z tych elementów może być MYB122. Jednak w przeciwieństwie do MYB51, który wydaje się zachowywać swoją funkcję w badanych gatunkach (Ryc. 31), doświadczenia z *A. thaliana* sugerują, że MYB122 nie ma znaczącego wpływu na biosyntezę IG [102]. Dlatego też wydaje się mało prawdopodobnym, aby utrata funkcji przez to białko przyczyniła się do znaczącego obniżenia zdolności biosyntezy IG jaką zaobserwowaliśmy u gatunków kladu II Camelinae.

Jedno z wcześniejszych doniesień literaturowych wykazało, że czynnik transkrypcyjny MYB34 może regulować w młodych siewkach *A. thaliana* mechanizm sprzężenia zwrotnego kontrolującego poziom akumulacji IG [98]. Skutkiem ubocznym tego mechanizmu jest nadprodukcja IAOx i IAA, obserwowana w wyniku mutacji w genach *CYP83B1*, *SUR1* (Ryc. 9, Ryc. 43, Ryc. 44). To w z kolei negatywnie wpływa na wzrost mutantów *cyp83b1* i *sur1* [79, 158, 159]. Dlatego można przypuszczać, że jedną z konsekwencji istnienia tego sprzężenia zwrotnego jest naturalna eliminacja mutantów charakteryzujących się zmniejszoną aktywnością enzymów katalizujących etapy biosyntezy IG pomiędzy IAOx a I3G. Analizy wygenerowanych w naszym laboratorium mutantów *cyp83b1 myb* potwierdziły, że MYB34 kontroluje sprzężenie zwrotne również u starszych roślin. Wykazaliśmy również, że pozostałe dwa czynniki transkrypcyjne MYB51 i MYB122 nie mają wpływu na nadprodukcję IAA w *cyp83b1*, przez co można wnioskować, że nie regulują sprzężenia zwrotnego kontrolującego akumulację IG. Wyniki te ukazują dodatkową niepoznaną do tej pory różnicę w funkcji białek MYB kontrolujących biosyntezę IG. Jednocześnie sugerują, że utrata białka MYB34, może w większym stopniu ułatwić wsteczną ewolucję szlaku biosyntezy IG niż utrata białka MYB51.

5.4. Molekularne przyczyny braku glukozynolanów w liściach

Wprowadzenie funkcjonalnego MYB34 do *C. rubella* zwiększyło produkcję IG w pędach, łuszczynkach i korzeniach, ale nie wpłynęło na wzrost ich akumulacji w liściach (Ryc. 40). Co więcej, nasze analizy RT-qPCR przeprowadzone na transgenicznym roślinach *C. rubella* wykazały, że w przeciwieństwie do pędów i korzeni, *AtMYB34* nie jest w stanie kontrolować ekspresji genów związanych z biosyntezą IG w liściach. Wskazuje to na istnienie dodatkowych czynników molekularnych inhibujących biosyntezę IG w tym organie. Dodatkowo, nasze doświadczenia wykazały, że liście gatunków kladu II Camelinae, w przeciwieństwie do innych organów, nie produkują AG (Ryc. 13). Efektywną biosyntezę AG zapewnia odpowiednia regulacja ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w ten szlak metaboliczny, za którą odpowiedzialne są głównie czynniki transkrypcyjne MYB28 i MYB29, z niewielkim udziałem MYB76 [95, 100, 101]. Przeprowadzone przez nas analizy genomów badanych gatunków wykazały obecność ortologów genów *MYB28* i *MYB29*, podczas gdy ortolog *MYB76* nie został przez nas odnaleziony w żadnym gatunku kladu II Camelinae (Ryc. 31). Brak ortologów genu *MYB76* w gatunkach kladu II Camelinae nie stanowi jednak, przeszkody w efektywnej produkcji AG metabolitów w pędach, łuszczynkach czy korzeniach tych roślin (Ryc. 13), dlatego trudno założyć, że przyczynia się on do zatrzymania syntezy AG w liściach.

Ponieważ poszczególne czynniki transkrypcyjne MYB odpowiadają specyficznie za biosyntezę AG lub IG, a defekt w produkcji glukozynolanów w liściach dotyczy jednocześnie obu tych klas, przypuszczamy, że mogą o nim decydować białka MYC, które regulują biosyntezę glukozynolanów w sposób niespecyficzny, co zostało potwierdzone podczas analiz odpowiednich mutantów *A. thaliana*. Linie *myc4/5* wykazują wyraźnie obniżony poziom akumulacji zarówno AG, jak i IG względem dzikiego typu, podczas gdy mutant *myc2/3/4* charakteryzuje się niemal całkowicie zahamowaną produkcją obu klas glukozynolanów [108, 112]. Dotychczas nie zidentyfikowano jednak ortologów genów *MYC* i nie przeanalizowano ich ekspresji w gatunkach innych niż *A. thaliana*. Obniżona zdolność do produkcji AG i IG jest szczególnie widoczna w liściach badanych gatunków, co sugeruje, że niektóre z genów *MYC*, a być może wszystkie, mogą nie ulegać ekspresji w tym organie. Szczególnie istotny dla prawidłowej regulacji biosyntezy AG i IG w liściach *A. thaliana* wydaje się być *MYC5*, co czyni go potencjalnym kandydatem do udziału w zatrzymaniu produkcji

glukozynolanów w liściach badanych gatunków [109-111]. Hipotezę tą można wstępnie zweryfikować za pomocą identyfikacji ortologów genów MYC w gatunkach kladu II *Camelineae* i analizy ich ekspresji w różnych organach tych roślin.

5.5. Zróźnicowanie długości łańcuchów bocznych AG

Biorąc pod uwagę duże zróźnicowanie długości i modyfikacji łańcuchów bocznych, AG pochodzące od metioniny stanowią najliczniejszą i najbardziej różnorodną klasę glukozynolanów [20]. Jak pokazano na przykładzie *A. thaliana*, profil akumulacji AG może różnić się zarówno pomiędzy ekotypami, jak i różnymi tkankami w obrębie jednego ekotypu [72]. Analizy 39 ekotypów *A. thaliana* wykazały, że można podzielić je na kilka grup ekotypów różniących się profilem akumulacji AG w liściach, a głównymi czynnikami różnicującymi wspomniane grupy są obecność poszczególnych modyfikacji łańcuchów bocznych oraz ich długość. Niektóre z ekotypów wykazują silną preferencję do produkcji glukozynolanów alkenylowych, podczas gdy inne cechują się wysoką zawartością pochodnych hydroksyloowanych, metyloalkilowych lub metylosulfinyloalkilowych. Dodatkowo, ekotypy *A. thaliana* wykazują zmienną preferencję do produkcji krótkołańcuchowych AG z dominującą formą 3C lub 4C oraz długołańcuchowych AG, gdzie dominować może pochodna 7C lub 8C [72].

W przeciwieństwie do różnorodności AG w ekotypach *A. thaliana*, w pojedynczych ekotypach pięciu różnych gatunków kladu II plemienia *Camelineae* zaobserwowaliśmy raczej zakonserwowany wzór akumulacji AG z wyraźną dominacją długołańcuchowych (9-10C) glukozynolanów metylosulfinyloalkilowych i metylosulfonyloalkilowych (Tabela 7, Ryc. 15, Ryc. 16). Ponadto zaobserwowaliśmy również akumulację znacznych ilości 11-MeSO, szczególnie w korzeniach *Cam. sativa* i *N. paniculata* (Ryc. 15). Podobny wzór akumulacji metylosulfinyloalkilowych AG i odpowiadających im izotiocyjanianów opisano już wcześniej dla nasion różnych gatunków rodzajów *Capsella*, *Camelina* i *Neslia* [37, 38, 49, 152-155]. Wyniki te wykazują, że poza liśćmi, które nie akumulują żadnych glukozynolanów, preferencja do akumulacji długołańcuchowych AG nie jest organospecyficzna i jest raczej zakonserwowana wśród badanych gatunków. Wniosek ten powinien jednak zostać dodatkowo zweryfikowany za pomocą badań większej liczby ekotypów poszczególnych gatunków.

Zgodnie z opublikowanymi do tej pory wynikami, poza plemieniem *Camelineae*, 10C AG zostały wykryte jedynie w nasionach kilku gatunków rodzaju *Arabis* oraz w korzeniach *Rorippa indica*, zaś obecności 11C AG nie stwierdzono jak do tej pory w żadnym innym gatunku rodziny *Brassicaceae* [20, 152, 173]. Wyniki te sugerują, że u większości gatunków *Brassicaceae* obecność 10-11C AG jest raczej wyjątkowa, a dodatkowo są one produkowane w niewielkich ilościach, przez co łatwe do przeoczenia w trakcie analiz metabolomicznych. Na podstawie rzadkiego występowania długołańcuchowych AG można wnioskować, że ich wytwarzanie jest związane z unikalną aktywnością izoformy białka MAM obecnej w gatunkach kladu II *Camelineae*. Badania przeprowadzone na *A. thaliana*, pozwoliły na identyfikację funkcji białek MAMa oraz MAMb, które mogą efektywnie prowadzić do biosyntezy AG o długości łańcucha bocznego odpowiednio do 4C i 8C [70, 71]. W naszych analizach wykazaliśmy obecność w gatunkach kladu II *Camelineae* zakonserwowanego locus *MAM* zawierającego geny *MAMa-c*. Dowiedliśmy również, że zidentyfikowane wcześniej w heksaploidalnym genomie *Cam. sativa* trzy geny *MAM10-12* [68] są ortologami genów *MAMe* opisanymi w *C. rubella* i *C. grandiflora* [69], a nasze analizy sekwencji genomowej wykazały także istnienie ortologu *MAMe* u *N. paniculata* (Ryc. 18). W przeprowadzonych przez nas analizach filogenetycznych białka kodowane przez geny *MAMe* tworzą spójny osobny kład i nie grupują razem z kładem MAMb, jak sugerowały wcześniejsze wyniki uzyskane przez Zhang i in. (2015) [68] uzyskane tylko dla genów *MAMe* z *Cam. sativa*. Ta obserwacja, zgodna z analizami filogenetycznymi wykonanymi przez Abrahams i in. (2020) [69] dla genów z *C. rubella* i *C. grandiflora*, sugeruje, że białko *MAMe* może posiadać odmienną specyficzność substratową i produkować pochodne metioniny o dłuższych łańcuchach alifatycznych niż pozostałe enzymy MAM (Ryc. 19). Jednoczesne występowanie genu *MAMe* oraz preferencja do produkcji 9-11C AG w badanych gatunkach sugeruje udział białka kodowanego przez ten gen w biosyntezie tych unikalnych glukozyolanów. Należy jednak wziąć pod uwagę, że nie scharakteryzowano też do tej pory aktywności nieobecnego w *A. thaliana* enzymu MAMc, który występuje w pozostałych badanych gatunkach *Camelineae* (Ryc. 17). Jednak u *A. lyrata*, która również posiada gen *MAMc*, nie wykryto akumulacji AG o długości łańcucha 9-11C [68, 144], co sugeruje, że kodowane przez ten gen białko nie posiada poszukiwanej aktywności. Z drugiej strony, nie można też wykluczyć, że u przodka kladu II *Camelineae* zaszła mutacja w genie *MAMa*, *MAMb* lub *MAMc*, która zmieniła specyficzność substratową kodowanego przez ten gen enzymu. Identyfikacja białka

MAM, które jest odpowiedzialne za wydłużanie łańcucha do 9-11C wymaga więc dodatkowych eksperymentów. Badania te mogłyby polegać na wygenerowaniu serii linii *A. thaliana* eksprymujących geny *MAMa-c* lub *MAMe* pochodzące z gatunków kladu II Camelineae, a następnie analizie profilu akumulacji AG w porównaniu z typem dzikim. Dodatkowo, wprowadzenie mutacji przy użyciu metody CRISPR (ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) w poszczególnych genach *MAM* analizowanych gatunków dostarczyłoby informacji o funkcji kodowanych przez nie białek.

5.6. Wpływ długości łańcuchów AG na funkcje tych związków

Zaobserwowane silne zakonserwowanie występowania długołańcuchowych AG w kladzie II plemienia Camelineae wskazuje na adaptacyjną przewagę jaką mogą dawać te metabolity. W tym kontekście interesujący wydaje się być fakt, że zgodnie z doniesieniami literaturowymi *Cam. sativa* wykazuje wysoką odporność wobec czarnej nóżki (*Leptosphaeria maculans*), będącej jedną z głównych chorób kapustowatych roślin uprawnych, a także wobec insektów żerujących na rzepaku [174, 175]. Nie wiadomo jednak czy ta zwiększona odporność wynika z obecności długołańcuchowych AG. Mimo tego, zasadnym wydaje się pytanie o zależność pomiędzy długością łańcucha bocznego AG a aktywnością biologiczną odpowiednich izotiocyjanianów. Jednak pomimo obserwacji, że pochodzący od 10-MeSO izotiocyjanian ogranicza wzrost patogennego grzyba *R. solani* w warunkach *in vitro*, jego aktywność nie została do tej pory porównana z innymi izotiocyjanianami [176]. Ponadto, dostępne dane literaturowe nie pozwalają na jednoznaczną ocenę wpływu charakteru chemicznego łańcucha bocznego, w tym jego długości, na toksyczność izotiocyjanianów wobec owadów roślinożernych lub patogenów. Przykładowo, aktywność grzybobójcza izotiocyjanianów metylosulfinyloalkilowych (4-8C) w stosunku do *S. sclerotiorum* wzrastała wraz z długością łańcucha bocznego, co pozwala postawić hipotezę o pozytywnej korelacji pomiędzy ilością grup metylenowych a toksycznością izotiocyjanianu [135]. Z drugiej jednak strony, systematyczna analiza krótkołańcuchowych (1-5C) izotiocyjanianów alkenyloowych wykazała, że wydłużanie łańcuchów bocznych zmniejsza toksyczność tych związków dla wybranych patogenów grzybowych, w tym *G. graminis* var. *tritici*, *R. solani*, *F. graminearum*, *B. sorokiniana* czy *P. irregulare* [134].

Wyniki te sugerują, że modyfikacja łańcucha bocznego może silnie wpływać lub nawet całkowicie odwracać korelację między długością łańcucha bocznego a aktywnością izotiocyjanianów. Dodatkowo, należy wziąć pod uwagę, że wynik testu na właściwości grzybobójcze zależy nie tylko od aktywności antybiotycznej badanej cząsteczki samej w sobie, ale również od zdolności poszczególnych grzybów do detoksykacji tego związku. W tym kontekście istotne wydaje się, że według opublikowanych wyników, *S. sclerotiorum* jest zdolny do detoksykacji izotiocyjanianów przy użyciu własnej hydrolazy [129]. Zwiększona podatność tego grzyba na izotiocyjaniany z dłuższymi łańcuchami bocznymi może wynikać więc ze specyficzności substratowej tego enzymu. Ponieważ, jak wspomniano powyżej, występowanie 9-11C AG jest dość rzadkie w roślinach Brassicaceae, wydaje się prawdopodobne, że tylko kilka potencjalnych szkodników może skutecznie radzić sobie z produktami hydrolizy tych związków. W takim przypadku wydajna biosynteza długołańcuchowych AG z pewnością stanowiłaby korzyść, nawet jeśli aktywność produktów hydrolizy tych związków nie jest wyższa niż tych pochodzących od krótko- i średniołańcuchowych AG. Ogólnie kwestia potencjalnej korzyści ewolucyjnej, jaką mogą dawać długołańcuchowe (9-11C) AG wymaga dalszych badań. Istotnych wyników dostarczyć mogą systematyczne analizy aktywności *in vitro* izotiocyjanianów o różnej długości łańcuchów bocznych jak również porównanie odporności na infekcję dzikiego typu wybranego gatunku reprezentującego klad II Camelinae z odpowiednim mutantem pozbawionym genu *MAM* odpowiedzialnego za biosyntezę długołańcuchowych AG.

5.7. Wsteczna ewolucja modyfikacji IG

W przeciwieństwie do AG, których całkowita akumulacja była wysoka w łuszczynkach i korzeniach oraz w młodych siewkach, w trakcie naszych analiz nie wykryliśmy żadnych BG, a dodatkowo produkcja IG była silnie obniżona we wszystkich tkankach badanych roślin w porównaniu do *A. thaliana* (Tabela 7, Ryc. 13) [72, 143]. Dodatkowo, nasze analizy wykazały ograniczoną zdolność badanych gatunków do modyfikacji IG, w szczególności do produkcji 1MI3G i 4MI3G. Ponieważ BG zwykle nie występują w znacznych ilościach w *A. thaliana*, ich niski poziom lub nawet brak w gatunkach reprezentujących rodzaje *Capsella*, *Camelina* i *Neslia* nie jest szczególnie zaskakujący, jednak ta sama obserwacja dla IG jest bardziej intrygująca.

Obniżona zdolność do modyfikacji IG znalazła odzwierciedlenie w zmianach w rodzinach białek biorących udział w tym procesie, jakie zaszły w gatunkach kladu II Camelineae. Nasze analizy wykazały, że genomy *C. rubella*, *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata* nie zawierają ortologów genu *CYP81F2* kodującego enzym hydroksylujący I3G w pozycji 4 pierścienia indolowego (Ryc. 21) [151]. Dodatkowo, obniżona liczebność ortologów IGMT1-4, które metylują grupę hydroksylową w pozycji 4 w badanych gatunkach oraz ich zależności filogenetyczne niespójne z pokrewieństwem gatunków, sugerują utratę funkcji przez te białka i tłumaczą zmniejszoną zdolność badanych gatunków do produkcji 4MI3G. Oprócz braku *CYP81F2*, genomy *C. rubella*, *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata* nie posiadają również ortologów genu *CYP81F4*, kodującego enzym katalizujący hydroksylację pierścienia indolowego w trakcie biosyntezy 1MI3G (Ryc. 7, Ryc. 22, Ryc. 24) [91]. Dodatkowo, podobnie jak w wypadku IGMT1-4, zależności filogenetyczne sugerują utratę funkcji przez IGMT5, enzymu który metyluje grupę hydroksylową w pozycji 1. Zmiany te tłumaczą, dlaczego nie wykryliśmy 1MI3G w analizowanych próbkach z badanych roślin, z wyjątkiem ekstraktów z korzeni *C. bursa-pastoris* (Ryc. 20).

Poza *CYP81F2* i *CYP81F4*, genomy *Cam. sativa* i *N. paniculata* nie mają żadnych ortologów genu kodujących białko CYP81F1, które w *A. thaliana* wydaje się mieć znikomy udział w modyfikacjach IG (Ryc. 22, Ryc. 24) [91]. Na podstawie tej obserwacji można przypuszczać, że utrata *CYP81F1* nie wpływa istotnie na modyfikację IG. Z drugiej jednak strony *Cam. sativa* i *N. paniculata* produkują mniej modyfikowanych IG niż pozostałe badane gatunki kladu II Camelineae, dotyczy to w szczególności *N. paniculata*, w którym to gatunku nie wykryliśmy żadnej z tych pochodnych (Ryc. 20).

Podsumowując utrata genów *CYP81F2*, *CYP81F4* i *CYP81F1* oraz zmiany w sekwencji białek IGMT wskazują na wsteczną ewolucję szlaku biosyntezy IG i tłumaczą obniżoną zdolność do modyfikacji I3G w badanych gatunkach Camelineae. Z drugiej jednak strony, udało nam się zidentyfikować w genomach *C. rubella* i *C. grandiflora* obecność nowego genu *CYP81F5*, a we wszystkich analizowanych genomach kladu II Camelineae obecność nowego genu *CYP81F6*. Według naszych analiz filogenetycznych geny te kodują białka należące do rodziny CYP81F (Ryc. 22, Ryc. 23, Ryc. 24). Nie jest jednak jasne, czy enzymy te są aktywne wobec I3G jako substratu. Z uwagi na zaobserwowaną przez nas niską akumulację IG oraz obniżoną zdolność do modyfikacji pierścienia indolowego w tych gatunkach, wydaje się to mało prawdopodobne. Wątpliwości te dodatkowo wspiera fakt, że w uzyskanym drzewie

filogenetycznym CYP81F5 i CYP81F6 znajdują się poza kładem scharakteryzowanych pod względem aktywności białek CYP81F1-4 (Ryc. 24).

5.8. Wsteczna ewolucja biosyntezy IG a adaptacja roślin do środowiska

Podobnie jak wyłączenie biosyntezy glukozyzolanów w liściach, w kontekście adaptacji roślin do środowiska, zastanawiająca jest wsteczna ewolucja biosyntezy IG, w tym ograniczenie zdolności do modyfikacji pierścienia IG. W przypadku *A. thaliana* zdolność do biosyntezy i modyfikacji IG związana jest z udziałem tych metabolitów w odporności na mszyce i patogeny grzybowe. Wyniki badań wskazują, że obie te funkcje są zależne od tworzenia IG podstawionych w pozycji 4 pierścienia indolowego, w którym udział bierze CYP81F2 (Ryc. 7) [90, 114, 138]. Jak wykazały nasze analizy, gatunki II kładu Camelinae nie posiadają ortologów genu kodującego to białko. Oprócz CYP81F2, funkcja IG w odpowiedzi immunologicznej *A. thaliana* jest ściśle zależna od aktywności myrozynazy PEN2 [114, 138]. Jednak podobnie jak w przypadku *CYP81F2*, nie znaleźliśmy ortologów genu *PEN2* w *C. rubella*, *C. grandiflora*, *Cam. sativa* i *N. paniculata*, pomimo ich obecności w genomach innych zsekwencjonowanych gatunków Brassicaceae [151, 177]. Jednoczesny brak ortologów *CYP81F2* i *PEN2* we wszystkich analizowanych genomach gatunków kładu II plemienia Camelinae sugeruje, że geny te zostały utracone u przodka tych roślin. Nasuwa to wniosek, że IG nie pełniły już istotnej roli w obronie przed mszycami i patogenami grzybowymi przed specjacją w obrębie tego kładu (Ryc. 2), a zmniejszenie zdolności do ich modyfikacji oraz wyłączenie kluczowego szlaku ich hydrolizy było jedynie konsekwencją wcześniejszej utraty obronnej funkcji tych metabolitów.

Oprócz CYP81F2, badane gatunki nie posiadają też ortologów CYP81F4. Jednak w przeciwieństwie do CYP81F2, biologiczna rola CYP81F4 nie została jak do tej pory poznana. Dlatego nie jest jasne, czy podstawienie IG w pozycji 1 pierścienia indolowego ma jakiegokolwiek znaczenie fizjologiczne. Ponadto, w przeciwieństwie do 4MI3G, występowanie 1MI3G nie jest tak silnie zakonserwowane w rodzinie Brassicaceae [151]. W konsekwencji utrata *CYP81F4* wydaje się być mniej zaskakująca niż brak *CYP81F2*.

Poza odpowiedzią na stresy biotyczne, I3G uważa się również za metabolit biorący udział w homeostazie IAA, przyczyniając się w ten sposób do rozwoju i wzrost roślin (Ryc. 9) [178, 179]. Badania wykazały, że w korzeniach *A. thaliana* uzyskany

podczas hydrolizy I3G przez wyspecjalizowane myrozynazy indolilo-3-acetonitryl może zostać przekształcony w IAA przez nitrylazy należące do specyficznej dla rodziny Brassicaceae grupy tych enzymów [117, 180]. Jednak niski poziom akumulacji I3G w korzeniach *C. rubella*, *Cam. sativa* i *N. paniculata* wskazuje, że przynajmniej w tych gatunkach udział IG w biosyntezie IAA jest raczej marginalny, o ile istnieje w ogóle (Ryc. 20).

Jak jednoznacznie wykazano podczas doświadczeń z odpowiednimi mutantami *A. thaliana*, konsekwencją utraty IG, CYP81F2 lub PEN2 jest zwiększona podatność na żerowanie niektórych insektów oraz na infekcje przez niektóre mikroorganizmy patogenne [90, 114], co z pewnością jest niekorzystne dla przetrwania gatunku. Dlatego można przypuszczać, że wsteczna ewolucja szlaku biosyntezy IG była poprzedzona powstaniem nowego mechanizmu obronnego, który później mógł zrekompensować brak biologicznej aktywności produktów pochodzących od IG. Jedną z możliwych opcji powstania takiego mechanizmu jest ewolucja nowego szlaku metabolicznego prowadzącego do produktów o podobnej funkcji. Taki szlak mógłby nie tylko rekompensować wyłączenie aktywacji IG, ale również brak obu klas glukozynolanów w liściach. Pojawienie się nowych bioaktywnych metabolitów może dodatkowo zwiększać odporność roślin wobec owadów roślinożernych i patogenów, które zaadaptowały się do istniejących mechanizmów obronnych, co stanowić może przewagę ewolucyjną, przynajmniej w niektórych niszach ekologicznych.

Niedawno opublikowane wyniki wskazują na ewolucję szlaku prowadzącego do nowych metabolitów wtórnych o aktywności owadobójczej w rodzaju *Erysimum* (Brassicaceae) [181]. Produkty tego szlaku są aktywne wobec owadów roślinożernych, które już przystosowały się do obecności glukozynolanów. Biorąc to pod uwagę, nie można wykluczyć, że nowe metabolity, posiadające funkcje obronne, wyewoluowały również u przodka rodzajów *Capsella*, *Camelina* i *Neslia*, co z kolei doprowadziło do spadku znaczenia IG i regresji szlaku ich biosyntezy. Biosynteza kamaleksyny jest szlakiem o funkcjach obronnych, który według opublikowanych wyników występuje jedynie w roślinach plemienia Camelinae i dlatego zapewne wyewoluował u przodka tego plemienia [151]. Podobnie jak IG, kamaleksyna pełni funkcje w obronie przed mszycami i drobnoustrojowymi patogenami [182, 183], jednak szczegółowe badania wskazują, że w *A. thaliana* kamaleksyna i IG odgrywają różne role w systemie odpornościowym [151, 184]. Biorąc pod uwagę ten fakt, nie wydaje się zatem

szczególnie prawdopodobne, aby w badanych gatunkach IG zostały funkcjonalnie zastąpione przez kamaleksynę.

Odkrycie związków, które przejęły funkcje IG w gatunkach kladu II *Camelineae*, pozwoliłoby na lepsze poznanie mechanizmów ewolucji szlaków metabolicznych oraz adaptacji do panujących zagrożeń w środowisku naturalnym. Jedną ze strategii mogłyby być niecelowane analizy LC-MS metabolitów, które w wybranych gatunkach *Brassicaceae* akumulowane są konstytutywnie lub w odpowiedzi na infekcje. Związki obecne specyficznie w kładzie II *Camelineae* byłyby potencjalnymi kandydatami to tej roli.

5.9. Podsumowanie

Wyniki uzyskane w tej pracy doktorskiej w znaczącym stopniu poszerzają obecną wiedzę na temat biosyntezy glukozynolanów oraz na temat ewolucji tego szlaku w gatunkach *Brassicaceae*. W szczególności informacje na temat zamian w biosyntezie IG rzucają światło na mechanizmy, które mogą prowadzić do wstecznej ewolucji szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych u roślin. Jest to o tyle ciekawe, że do tej pory badania ewolucji metabolitów wtórnych skupiały się przede wszystkim na powstawaniu nowych szlaków biosyntezy. Niewiele natomiast uwagi poświęcono mechanizmom prowadzącym do eliminacji produkcji metabolitów, które przestają być istotne dla przetrwania roślin w środowisku, na przykład z powodu nabycia przez potencjalnych wrogów, roślinożerców i patogeny, zdolności do detoksykacji bioaktywnych produktów końcowych. Biorąc pod uwagę całokształt ewolucji metabolizmu wtórnego, takie mechanizmy wydają się równie istotne jak te, które prowadzą to powstawania nowych metabolitów.

Poza poszerzeniem wiedzy na temat biosyntezy glukozynolanów i ewolucji metabolitów wtórnych, poznanie zdolności do biosyntezy glukozynolanów przez gatunki kladu II *Camelineae* może mieć też znaczenie praktyczne. Do tego kladu należy zbadany przez nas gatunek *Cam. sativa*, który jest źródłem niezwykle bogatego w wysokonienasycone kwasy tłuszczowe oleju rydzowego. Rosnące zainteresowanie tym gatunkiem jako uprawną rośliną oleistą doprowadziło między innymi do zsekwencjonowania jej genomu. Poznanie mechanizmów biosyntezy metabolitów istotnych dla odporności *Cam. sativa*, np. długołańcuchowych AG, może pozwolić w przyszłości na racjonalną selekcję bądź modyfikację genetyczną linii o profilu tych związków optymalnych dla wzrostu tych roślin.

6. Wnioski

1. Gatunki kladu II *Camelineae* wykazują organospecyficzny wzór biosyntezy i akumulacji glukozynolanów, odmienny od innych badanych roślin *Brassicaceae*. Najbardziej unikalnymi cechami tego profilu są brak glukozynolanów w liściach oraz obniżona akumulacja tych metabolitów w pędach.
2. Łuszczyнки i korzenie badanych gatunków akumulują porównywalne z innymi gatunkami *Brassicaceae* ilości AG, natomiast akumulacja IG w tych organach jest wyraźnie obniżona, co łącznie z brakiem IG w liściach wskazuje na utratę znaczenia IG w oddziaływaniach roślin II kladu *Camelineae* ze środowiskiem.
3. Organospecyficzny profil akumulacji glukozynolanów koreluje z hipotezą optymalnej obrony sugerując, że utrata zdolności do biosyntezy glukozynolanów w liściach i jej obniżenie w pędach jest wynikiem kompromisu pomiędzy wzrostem a konstytutywnymi mechanizmami obronnymi.
4. Utrata funkcji przez białko MYB34 u przodka gatunków kladu II *Camelineae* jest istotną, ale nie jedyną przyczyną wstecznej ewolucji biosyntezy IG u tych roślin.
5. MYB34 kontroluje sprzężenie zwrotne w biosyntezie IG bez udziału MYB51 i MYB122 co zwiększa wpływ utraty tego czynnika transkrypcyjnego na wsteczną ewolucję IG.
6. Całkowite zatrzymanie biosyntezy glukozynolanów w liściach badanych roślin jest niezależne od braku białek MYB34 oraz MYB76 i może być wynikiem zmian w ekspresji genów kodujących białka MYC2-5.
7. Gatunki kladu II *Camelineae* charakteryzują się niewielką różnorodnością strukturalną AG z preferencją do akumulacji metylosulfinyloalkilowych AG o długości łańcucha 9-10C, które są nieobecne lub występują w niewielkich ilościach w innych gatunkach *Brassicaceae*.
8. Koincydencja dominacji 9-10C i obecności 11C AG z występowaniem ortologu *MAMe* w gatunkach kladu II *Camelineae* sugeruje, że białko *MAMe* jest odpowiedzialne za efektywne wydłużanie łańcucha bocznego metioniny do 9-11C.

9. Wsteczna ewolucją enzymów CYP81F1, CYP81F2, CYP81F4 oraz IGMT1-4 i IGMT5 prowadzi do zmniejszonej zdolności badanych gatunków do modyfikacji pierścienia indolowego I3G.
10. Utrata CYP81F2 i PEN2, które są istotne dla aktywacji IG w odpowiedzi na infekcję przez mikroorganizmy patogenne i żerowanie mszyc, nastąpiła u przodka kladu II Camelineae, prawdopodobnie jako konsekwencja zaniku znaczenia metabolizmu IG w reakcjach obronnych tego gatunku.
11. Obniżony udział IG w reakcji odpornościowej jest prawdopodobnie rekompensowany przez nowy mechanizm obronny jaki wyewoluował u przodka kladu II Camelineae.

Streszczenie

Glukozynolany to zawierające atomy azotu i siarki metabolity wtórne powszechnie występujące w roślinach z rodziny Brassicaceae i pełniące funkcje w obronie przed ataku insektów i patogenów. Dwie główne klasy tych metabolitów to pochodzące od metioniny glukozynolany alifatyczne (AG) i produkowane z tryptofanu glukozynolany indolowe (IG). Pomimo dobrze udokumentowanej konstytutywnej obecności AG i IG w badanych gatunkach Brassicaceae, niektóre opublikowane wyniki sugerują, że gatunki jednego z kładów plemienia Camelinae mogą stanowić wyjątek od tej reguły. Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie, poprzez systematyczne analizy metabolomiczne, genomiczne i transkryptomyczne, zdolności biosyntezy glukozynolanów przez *Capsella rubella*, *Capsella bursa-pastoris*, *Capsella grandiflora*, *Camelina sativa* i *Neslia paniculata*, które to gatunki reprezentują omawiany kład Camelinae.

Przeprowadzone niecelowane analizy metabolomiczne przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas wykazały, że badane gatunki produkują glukozynolany w pędach, łuszczynek nasiennych i korzeniach, ale nie w liściach. Wykazaliśmy również, że IG są produkowane w tych roślinach w znacznie mniejszych ilościach niż AG, a dodatkowo znacznie poniżej poziomu obserwowanego w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*. Analizy dostępnych sekwencji genomowych pozwoliły na identyfikację ortologów genów kodujących enzymy związane z biosyntezą glukozynolanów, a przeprowadzone analizy ich ekspresji wykazały organospecyficzny wzór pokrywający się z akumulacją glukozynolanów. Z kolei identyfikacja i analiza ekspresji ortologów czynników transkrypcyjnych MYB, które w roślinie modelowej *A. thaliana* kontrolują biosyntezę glukozynolanów zasugerowała, że badane gatunki nie posiadają funkcjonalnego ortologu białka MYB34, które bierze udział w regulacji ekspresji genów związanych z biosyntezą IG. To przypuszczenie zostało potwierdzone przez ekspresję genu *MYB34* z *C. rubella* w *A. thaliana*. Co więcej, wzrost akumulacji IG, spowodowany ekspresją *MYB34* z *A. thaliana*, w *C. rubella* wykazał, że utrata funkcji przez MYB34 jest jedną z molekularnych przyczyn obniżonej zdolności do biosyntezy IG przez badane gatunki Camelinae.

Dodatkowo nasze analizy metabolomiczne wykazały zmiany w różnorodności strukturalnej AG i IG w badanych gatunkach. Objawiały się one preferencją do

akumulacji rzadkich długołańcuchowych AG oraz obniżoną zdolnością do modyfikacji pierścienia indolowego IG. Analizy ortologów genów kodujących białka biorące udział w wydłużaniu łańcuchów bocznych AG oraz w modyfikacji IG wykazały, że odpowiedzialne za obserwowane zmiany różnorodności glikozynolanów mogą być odpowiednio pojawienie się nowego ortologu syntazy metyloalkilobiochanowej oraz wsteczna ewolucja monooksygenaz rodziny CYP81F.

Abstract

Glucosinolates are sulfur- and nitrogen- containing secondary metabolites commonly occurring in plants belonging to the Brassicaceae family. These compounds act as protection against attack of insects and pathogens. The two main classes of these metabolites are methionine-derived aliphatic glucosinolates (AG) and tryptophan-derived indolic glucosinolates (IG). Despite the well-documented presence of AG and IG in the investigated Brassicaceae species, some published results suggest that species belonging to one clade of Camelinae tribe may constitute an exception from this rule. The aim of this doctoral thesis was to determine, through systematic metabolomic, genomic and transcriptomic analyzes, glucosinolate biosynthetic capacity of selected species representing mentioned Camelinae clade, including *Capsella rubella*, *Capsella bursa-pastoris*, *Capsella grandiflora*, *Camelina sativa* and *Neslia paniculata*.

Performed untargeted metabolomic analyzes using liquid chromatography coupled with mass spectrometry showed that the tested species produce glucosinolates in inflorescences, siliques and roots, but not in leaves. We have also shown that IG are produced in these plants in much lower amounts than AG, and in addition strongly below the levels observed in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Analyzes of the available genomic sequences enabled identification of orthologs of genes encoding enzymes involved in glucosinolate biosynthesis, while analyzes of their expression showed an organ-specific pattern correlating with the accumulation of glucosinolates. Identification and expression analysis of MYB transcription factor orthologs that control glucosinolate biosynthesis in *A. thaliana* suggested that the tested species lack a functional ortholog of MYB34 protein, which is involved in the regulation of gene expression during IG biosynthesis. This assumption was confirmed by the expression of *MYB34* gene from *C. rubella* in *A. thaliana*. Moreover, the increase in IG accumulation due to the expression of *MYB34* from *A. thaliana* in *C. rubella* demonstrated that loss of function by MYB34 is one of the molecular reasons of the reduced IG biosynthetic capacity in the tested Camelinae species.

Our metabolomic analyzes revealed also changes in AG and IG structural diversity in the tested species. These changes included preference for the accumulation of rarely occurring long-chain AG and reduced capacity for modification of the IG indole core. Analyzes of gene orthologs encoding proteins involved in the extension of AG side chain

and in IG modification have shown that the observed changes in glucosinolate diversity may result from the appearance of a new ortholog of methylthioalkylmalate synthase and from the backward evolution of monooxygenases belonging to the CYP81F family.

Bibliografia

1. Erb, M., Kliebenstein, D.J., *Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy*. *Plant Physiology*, 2020. 184(1): 39-52.
2. Kroymann, J., *Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011. 14(3): 246-251.
3. Banerjee, A., Sharkey, T.D., *Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation*. *Natural Product Reports*, 2014. 31(8): 1043-55.
4. Lichman, B.R., *The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis*. *Natural Product Reports*, 2021. 38(1): 103-129.
5. Hartmann, T., *Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1996. 80(1): 177-188.
6. Kessler, A., Kalske, A., *Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2018. 49(1): 115-138.
7. Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A., *Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants*. *Plant Signaling & Behavior*, 2011. 6(11): 1720-1731.
8. Isah, T., *Stress and defense responses in plant secondary metabolites production*. *Biological Research*, 2019. 52: 39.
9. Jasiński, M., Mazurkiewicz, E., Rodziewicz, P., Figlerowicz, M., *Flawonoidy - budowa, właściwości i funkcja ze szczególnym uwzględnieniem roślin motylkowatych*. *Biotechnologia*, 2009. 85: 81-94.
10. Neal, A.L., Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., Ton, J., *Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere*. *PLoS One*, 2012. 7(4): e35498.
11. Wink, M., *Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction?* *Frontiers in Physiology*, 2018. 9: 364-364.
12. Bednarek, P., *Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2012. 15(4): 407-14.
13. Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., Molina, A., *The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens*. *Frontiers in Plant Science*, 2014. 5: 358.
14. Freiesleben, S.H., Jäger, A., *Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms—A Review*. *Medicinal & Aromatic Plants*, 2014. 03.
15. Jeandet, P., *Phytoalexins: Current Progress and Future Prospects*. *Molecules*, 2015. 20(2): 2770-2774.
16. Ahmad, E., Arshad, M., Khan, M., Amjad, M.S., Sadaf, H., Riaz, I., Sabir, S., Ahmed, N., Saboon, *Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2017. 6: 205-214.

17. Deng, Y., Lu, S., *Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants*. Critical Reviews in Plant Sciences, 2017. 36: 1-34.
18. Pichersky, E., Raguso, R.A., *Why do plants produce so many terpenoid compounds?* New Phytologist, 2018. 220(3): 692-702.
19. Vetter, J., *Plant cyanogenic glycosides*. Toxicon, 2000. 38(1): 11-36.
20. Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C.E., Burow, M., Rollin, P., Agerbirk, N., *Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants*. Phytochemistry, 2020. 169: 112100.
21. Halkier, B.A., Gershenzon, J., *Biology And Biochemistry Of Glucosinolates*. Annual Review of Plant Biology, 2006. 57(1): 303-333.
22. Al-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A., Kellogg, E.A., *Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview*. Plant Systematics and Evolution, 2006. 259(2): 89-120.
23. Nikolov, L.A., Shushkov, P., Nevado, B., Gan, X., Al-Shehbaz, I.A., Filatov, D., Bailey, C.D., Tsiantis, M., *Resolving the backbone of the Brassicaceae phylogeny for investigating trait diversity*. New Phytologist, 2019. 222(3): 1638-1651.
24. Cartea, M., Lema, M., Francisco, M., Velasco, P., *Basic information on vegetables Brassica crops*. 2011. 1-34.
25. Chen, S., Nelson, M., Chevre, A.-M., Jenczewski, E., Li, Z., Mason, A., Meng, J., Plummer, J., Pradhan, A., Siddique, K., Snowdon, R., Yan, G., Zhou, W., Cowling, W., *Trigenomic Bridges for Brassica Improvement*. Critical Reviews in Plant Sciences, 2011. 30: 524-547.
26. Liu, B., Mao, Q., Wang, X., Zhou, F., Luo, J., Wang, C., Lin, Y., Zheng, X., Xie, L., *Cruciferous vegetables consumption and risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis*. Nutrition and Cancer, 2013. 65(5): 668-76.
27. Jahangir, M., Abdel-Farid, I.B., Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R., *Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae*. Environmental and Experimental Botany, 2009. 67(1): 23-33.
28. Warwick, S.I., Hall, J., *Phylogeny of Brassica and Wild Relatives*. Biology and Breeding of Crucifers, 2009: 19-36.
29. Franzke, A., Lysak, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Koch, M.A., Mummenhoff, K., *Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae*. Trends in Plant Science, 2011. 16(2): 108-116.
30. Koch, M., German, D., *Taxonomy and systematics are key to biological information: Arabidopsis, Eutrema (Thellungiella), Noccaea and Schrenkiella (Brassicaceae) as examples*. Frontiers in Plant Science, 2013. 4: 267.
31. Edger, P.P., Tang, M., Bird, K.A., Mayfield, D.R., Conant, G., Mummenhoff, K., Koch, M.A., Pires, J.C., *Secondary Structure Analyses of the Nuclear rRNA Internal Transcribed Spacers and Assessment of Its Phylogenetic Utility across the Brassicaceae (Mustards)*. PLoS ONE, 2014. 9(7): e101341.
32. The Arabidopsis Genome Initiative, *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*. Nature, 2000. 408(6814): 796-815.
33. Abbott, R.J., Gomes, M.F., *Population genetic structure and outcrossing rate of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.* Heredity, 1989. 62(3): 411-418.

34. Koncz, C., Németh, K., Rédei, G.P., Schell, J., *T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis*. Plant Molecular Biology, 1992. 20(5): 963-976.
35. Slotte, T., Hazzouri, K.M., Ågren, J.A., Koenig, D., Maumus, F., Guo, Y.-L., Steige, K., Platts, A.E., Escobar, J.S., Newman, L.K., Wang, W., Mandáková, T., Vello, E., Smith, L.M., Henz, S.R., Steffen, J., Takuno, S., Brandvain, Y., Coop, G., Andolfatto, P., Hu, T.T., Blanchette, M., Clark, R.M., Quesneville, H., Nordborg, M., Gaut, B.S., Lysak, M.A., Jenkins, J., Grimwood, J., Chapman, J., Prochnik, S., Shu, S., Rokhsar, D., Schmutz, J., Weigel, D., Wright, S.I., *The Capsella rubella genome and the genomic consequences of rapid mating system evolution*. Nature Genetics, 2013. 45(7): 831-835.
36. Kagale, S., Koh, C., Nixon, J., Bollina, V., Clarke, W.E., Tuteja, R., Spillane, C., Robinson, S.J., Links, M.G., Clarke, C., Higgins, E.E., Huebert, T., Sharpe, A.G., Parkin, I.A.P., *The emerging biofuel crop Camelina sativa retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure*. Nature Communications, 2014. 5(1): 3706.
37. Berhow, M.A., Polat, U., Glinski, J.A., Glensk, M., Vaughn, S.F., Isbell, T., Ayala-Diaz, I., Marek, L., Gardner, C., *Optimized analysis and quantification of glucosinolates from Camelina sativa seeds by reverse-phase liquid chromatography*. Industrial Crops and Products, 2013. 43: 119-125.
38. Yuan, D., Shim, Y.Y., Shen, J., Jadhav, P.D., Meda, V., Reaney, M.J.T., *Distribution of glucosinolates in Camelina seed fractions by HPLC-ESI-MS/MS*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2017. 119(3): 1600040.
39. BrassiBase. [dostęp: 09.06.2021]; adres: <https://brassibase.cos.uni-heidelberg.de/>.
40. Rodman, J.E., Karol, K.G., Price, R.A., Sytsma, K.J., *Molecules, Morphology, and Dahlgren's Expanded Order Capparales*. Systematic Botany, 1996. 21(3): 289-307.
41. Engel, E., Baty, C., Le Corre, D., Souchon, I., Martin, N., *Flavor-active compounds potentially implicated in cooked cauliflower acceptance*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. 50(22): 6459-67.
42. Brown, P.D., Morra, M.J., *Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. 43(12): 3070-3074.
43. Vaughn, S.F., Isbell, T.A., Weisleder, D., Berhow, M.A., *Biofumigant compounds released by field pennycress (Thlaspi arvense) seedmeal*. Journal of Chemical Ecology, 2005. 31(1): 167-77.
44. Miękus, N., Marszałek, K., Podlacha, M., Iqbal, A., Puchalski, C., Świergiel, A.H., *Health Benefits of Plant-Derived Sulfur Compounds, Glucosinolates, and Organosulfur Compounds*. Molecules, 2020. 25(17): 3804.
45. Chhajed, S., Mostafa, I., He, Y., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., Chen, S., *Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense*. Agronomy, 2020. 10(11): 1786.
46. Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., Morimitsu, Y., *Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables*. Breeding science, 2014. 64(1): 48-59.

47. Kjær, A., Christensen, B.W., Larsen, P.O., *isoThiocyanates*. XXXIX. *Glucobenzosisymbirin, a New Glucoside Present in Seeds of Sisymbrium austriacum* Acta Chemica Scandinavica, 1961. 15: 1477–1484.
48. Kjær, A.C., Gmelin, R., Jensen, R.B., *isoThiocyanates*. XXI. (-)-10-Methylsulphanyldecyl isothiocyanate, a new mustard oil present as a glucoside (glucocamelinin) in *Camelina species*. Acta Chemica Scandinavica, 1956. 10: 1614-1619.
49. Cole, R.A., *Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae*. Phytochemistry, 1976. 15(5): 759-762.
50. Olsen, C.E., Huang, X.-C., Hansen, C.I.C., Cipollini, D., Ørgaard, M., Matthes, A., Geu-Flores, F., Koch, M.A., Agerbirk, N., *Glucosinolate diversity within a phylogenetic framework of the tribe Cardamineae (Brassicaceae) unraveled with HPLC-MS/MS and NMR-based analytical distinction of 70 desulfoglucosinolates*. Phytochemistry, 2016. 132: 33-56.
51. Larsen, L.M., Olsen, O., Sørensen, H., *Failure to detect glucosinolates in Plantago species*. Phytochemistry, 1983. 22(10): 2314-2315.
52. Truscott, R.J., Burke, D.G., Minchinton, I.R., *The characterisation of a novel hydroxindole glucosinolate*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1982. 107(4): 1258-64.
53. Truscott, R.J.W., Minchinton, I.R., Burke, D.G., Sang, J.P., *A novel methoxyindole glucosinolate*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1982. 107(4): 1368-1375.
54. Reichelt, M., Brown, P.D., Schneider, B., Oldham, N.J., Stauber, E., Tokuhisa, J., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Olds, T., Gershenzon, J., *Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry, 2002. 59(6): 663-671.
55. Helboe, P., Olsen, O., Sørensen, H., *Separation of glucosinolates by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1980. 197(2): 199-205.
56. Pretera, T., Fahey, J.W., Holtzclaw, W.D., Abeygunawardana, C., Kachinski, J.L., Talalay, P., *Comprehensive Chromatographic and Spectroscopic Methods for the Separation and Identification of Intact Glucosinolates*. Analytical Biochemistry, 1996. 239(2): 168-179.
57. Mellon, F.A., Bennett, R.N., Holst, B., Williamson, G., *Intact glucosinolate analysis in plant extracts by programmed cone voltage electrospray LC/MS: performance and comparison with LC/MS/MS methods*. Annals of Clinical Biochemistry, 2002. 306(1): 83-91.
58. Bennett, R.N., Mellon, F.A., Kroon, P.A., *Screening crucifer seeds as sources of specific intact glucosinolates using ion-pair high-performance liquid chromatography negative ion electrospray mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. 52(3): 428-438.
59. Cataldi, T.R., Rubino, A., Lelario, F., Bufo, S.A., *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, 2007. 21(14): 2374-88.

60. Glish, G.L., Vachet, R.W., *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nature Reviews Drug Discovery, 2003. 2(2): 140-50.
61. Lee, K.-C., Chan, W., Liang, Z., Liu, N., Zhao, Z., Lee, A.W.-M., Cai, Z., *Rapid screening method for intact glucosinolates in Chinese medicinal herbs by using liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion trap mass spectrometry in negative ion mode*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. 22(18): 2825-2834.
62. Lin, L., Sun, J., Chen, P., Zhang, R.-W., Fan, X.-E., Li, L.-W., Harnly, J., *Profiling of glucosinolates and flavonoids in Rorippa indica (Linn.) Hiern. (cruciferae) by UHPLC-PDA-ESI/HRMSn*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. 62: 6118-6129.
63. Bianco, G., Pascale, R., Lelario, F., Bufo, S.A., Cataldi, T.R.I., *The Investigation of Glucosinolates by Mass Spectrometry*, in *Glucosinolates*. 2016, Springer International Publishing. 431-461.
64. Cataldi, T.R.I., Lelario, F., Orlando, D., Bufo, S.A., *Collision-Induced Dissociation of the A + 2 Isotope Ion Facilitates Glucosinolates Structure Elucidation by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry with a Linear Quadrupole Ion Trap*. Analytical Chemistry, 2010. 82(13): 5686-5696.
65. Agerbirk, N., Olsen, C.E., *Glucosinolate structures in evolution*. Phytochemistry, 2012. 77: 16-45.
66. Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., Halkier, B.A., *Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond*. Trends in Plant Science, 2010. 15(5): 283-290.
67. Jensen, L.M., Halkier, B.A., Burow, M., *How to discover a metabolic pathway? An update on gene identification in aliphatic glucosinolate biosynthesis, regulation and transport*. Biological Chemistry, 2014. 395(5): 529-543.
68. Zhang, J., Wang, X., Cheng, F., Wu, J., Liang, J., Yang, W., Wang, X., *Lineage-specific evolution of Methylthioalkylmalate synthases (MAMs) involved in glucosinolates biosynthesis*. Frontiers in Plant Science, 2015. 6: 18.
69. Abrahams, R.S., Pires, J.C., Schranz, M.E., *Genomic Origin and Diversification of the Glucosinolate MAM Locus*. Frontiers in Plant Science, 2020. 11: 711.
70. Textor, S., de Kraker, J.-W., Hause, B., Gershenzon, J., Tokuhiya, J.G., *MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2007. 144: 60-71.
71. Kroymann, J., Donnerhacke, S., Schnabelrauch, D., Mitchell-Olds, T., *Evolutionary dynamics of an Arabidopsis insect resistance quantitative trait locus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. 100: 14587-14592.
72. Kliebenstein, D.J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., Mitchell-Olds, T., *Genetic Control of Natural Variation in Arabidopsis Glucosinolate Accumulation*. Plant Physiology, 2001. 126(2): 811-825.
73. Mikkelsen, M., Hansen, C., Wittstock, U., Halkier, B., *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, 2000. 275: 33712-33717.
74. Mikkelsen, M.D., Petersen, B.L., Glawischnig, E., Jensen, A.B., Andreasson, E., Halkier, B.A., *Modulation of CYP79 Genes and Glucosinolate Profiles in*

- Arabidopsis* by Defense Signaling Pathways. *Plant Physiology*, 2003. 131(1): 298-308.
75. Chen, S., Glawischnig, E., Jørgensen, K., Naur, P., Jørgensen, B., Olsen, C.E., Hansen, C.H., Rasmussen, H., Pickett, J.A., Halkier, B.A., *CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2003. 33(5): 923-37.
 76. Zhao, Y., Hull, A., Gupta, N., Goss, K., Alonso, J., Ecker, J., Normanly, J., Chory, J., Celenza, J., *Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: Involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3*. *Genes & Development*, 2003. 16: 3100-3112.
 77. Bak, S., Tax, F.E., Feldmann, K.A., Galbraith, D.W., Feyereisen, R., *CYP83B1, a Cytochrome P450 at the Metabolic Branch Point in Auxin and Indole Glucosinolate Biosynthesis in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2001. 13(1): 101-111.
 78. Naur, P., Petersen, B.L., Mikkelsen, M.D., Bak, S., Rasmussen, H., Olsen, C.E., Halkier, B.A., *CYP83A1 and CYP83B1, Two Nonredundant Cytochrome P450 Enzymes Metabolizing Oximes in the Biosynthesis of Glucosinolates in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2003. 133(1): 63-72.
 79. Smolen, G., Bender, J., *Arabidopsis cytochrome P450 cyp83B1 mutations activate the tryptophan biosynthetic pathway*. *Genetics*, 2002. 160(1): 323-32.
 80. Hirai, M.Y., Sugiyama, K., Sawada, Y., Tohge, T., Obayashi, T., Suzuki, A., Araki, R., Sakurai, N., Suzuki, H., Aoki, K., Goda, H., Nishizawa, O.I., Shibata, D., Saito, K., *Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. 104(15): 6478-6483.
 81. Wentzell, A.M., Rowe, H.C., Hansen, B.G., Ticconi, C., Halkier, B.A., Kliebenstein, D.J., *Linking metabolic QTLs with network and cis-eQTLs controlling biosynthetic pathways*. *PLoS genetics*, 2007. 3: 1687-1701.
 82. Geu-Flores, F., Nielsen, M.T., Nafisi, M., Møldrup, M.E., Olsen, C.E., Motawia, M.S., Halkier, B.A., *Glucosinolate engineering identifies a γ -glutamyl peptidase*. *Nature Chemical Biology*, 2009. 5(8): 575-577.
 83. Geu-Flores, F., Møldrup, M.E., Böttcher, C., Olsen, C.E., Scheel, D., Halkier, B.A., *Cytosolic γ -Glutamyl Peptidases Process Glutathione Conjugates in the Biosynthesis of Glucosinolates and Camalexin in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2011. 23(6): 2456-2469.
 84. Mikkelsen, M.D., Naur, P., Halkier, B.A., *Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis*. *The Plant Journal*, 2004. 37(5): 770-777.
 85. Grubb, D.C., Brandon, Z.J., Ludwig-Müller, J., Masuno, M.N., Molinski, T.F., Abel, S., *Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis*. *The Plant Journal*, 2004. 40(6): 893-908.
 86. Grubb, D.C., Zipp, B.J., Kopycki, J., Schubert, M., Quint, M., Lim, E.-K., Bowles, D.J., Pedras, M.S.C., Abel, S., *Comparative analysis of Arabidopsis UGT74 glucosyltransferases reveals a special role of UGT74C1 in glucosinolate biosynthesis*. *The Plant Journal*, 2014. 79(1): 92-105.
 87. Piotrowski, M., Schemenewitz, A., Lopukhina, A., Müller, A., Janowitz, T., Weiler, E., Oecking, C., *Desulfoglucosinolate Sulfotransferases from Arabidopsis*

- thaliana* Catalyze the Final Step in the Biosynthesis of the Glucosinolate Core Structure. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 279: 50717-25.
88. Hansen, B.G., Kliebenstein, D.J., Halkier, B.A., *Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2007. 50(5): 902-910.
 89. Li, J., Hansen, B.G., Ober, J.A., Kliebenstein, D.J., Halkier, B.A., *Subclade of Flavin-Monooxygenases Involved in Aliphatic Glucosinolate Biosynthesis*. *Plant Physiology*, 2008. 148(3): 1721-1733.
 90. Pfalz, M., Vogel, H., Kroymann, J., *The Gene Controlling the Indole Glucosinolate Modifier1 Quantitative Trait Locus Alters Indole Glucosinolate Structures and Aphid Resistance in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2009. 21(3): 985-999.
 91. Pfalz, M., Mikkelsen, M.D., Bednarek, P., Olsen, C.E., Halkier, B.A., Kroymann, J., *Metabolic Engineering in Nicotiana benthamiana Reveals Key Enzyme Functions in Arabidopsis Indole Glucosinolate Modification*. *The Plant Cell*, 2011. 23(2): 716-729.
 92. Pfalz, M., Mukhaimar, M., Perreau, F., Kirk, J., Hansen, C.I.C., Olsen, C.E., Agerbirk, N., Kroymann, J., *Methyl Transfer in Glucosinolate Biosynthesis Mediated by Indole Glucosinolate O-Methyltransferase 5*. *Plant Physiology*, 2016. 172(4): 2190-2203.
 93. Kelemen, Z., Sebastian, A., Xu, W., Grain, D., Salsac, F., Avon, A., Berger, N., Tran, J., Dubreucq, B., Lurin, C., Lepiniec, L., Contreras-Moreira, B., Dubos, C., *Analysis of the DNA-Binding Activities of the Arabidopsis R2R3-MYB Transcription Factor Family by One-Hybrid Experiments in Yeast*. *PloS one*, 2015. 10: e0141044.
 94. Mitreiter, S., Gigolashvili, T., *Regulation of glucosinolate biosynthesis*. *Journal of Experimental Botany*, 2021. 72(1): 70-91.
 95. Sønderby, I.E., Hansen, B.G., Bjarnholt, N., Ticconi, C., Halkier, B.A., Kliebenstein, D.J., *A Systems Biology Approach Identifies a R2R3 MYB Gene Subfamily with Distinct and Overlapping Functions in Regulation of Aliphatic Glucosinolates*. *PLoS one*, 2007. 2(12): e1322.
 96. Gigolashvili, T., Yatusевич, R., Berger, B., Müller, C., Flügge, U.-I., *The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2007. 51(2): 247-261.
 97. Gigolashvili, T., Engqvist, M., Yatusевич, R., Müller, C., Flügge, U.-I., *HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 2008. 177(3): 627-642.
 98. Celenza, J.L., Quiel, J.A., Smolen, G.A., Merrikkh, H., Silvestro, A.R., Normanly, J., Bender, J., *The Arabidopsis ATR1 Myb Transcription Factor Controls Indolic Glucosinolate Homeostasis*. *Plant Physiology*, 2005. 137(1): 253-262.
 99. Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H.-P., Müller, C., Weisshaar, B., Flügge, U.-I., *The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2007. 50(5): 886-901.

100. Sønderby, I.E., Burow, M., Rowe, H.C., Kliebenstein, D.J., Halkier, B.A., *A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2010. 153(1): 348-63.
101. Beekwilder, J., van Leeuwen, W., van Dam, N.M., Bertossi, M., Grandi, V., Mizzi, L., Soloviev, M., Szabados, L., Molthoff, J.W., Schipper, B., Verbocht, H., de Vos, R.C.H., Morandini, P., Aarts, M.G.M., Bovy, A., *The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on insect herbivory in Arabidopsis*. *PloS one*, 2008. 3(4): e2068.
102. Frerigmann, H., Gigolashvili, T., *MYB34, MYB51, and MYB122 Distinctly Regulate Indolic Glucosinolate Biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 2014. 7(5): 814-828.
103. Gigolashvili, T., Berger, B., Flügge, U.-I., *Specific and coordinated control of indolic and aliphatic glucosinolate biosynthesis by R2R3-MYB transcription factors in Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry Reviews*, 2009. 8(1): 3-13.
104. Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J.F., Bilbao-Castro, J.R., Robertson, D.L., *Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae*. *Plant Physiology*, 2010. 153(3): 1398-1412.
105. Goossens, J., Mertens, J., Goossens, A., *Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling*. *Journal of Experimental Botany*, 2016. 68(6): 1333-1347.
106. Millard, P.S., Weber, K., Kragelund, B.B., Burow, M., *Specificity of MYB interactions relies on motifs in ordered and disordered contexts*. *Nucleic Acids Research*, 2019. 47(18): 9592-9608.
107. Schweizer, F., Fernández-Calvo, P., Zander, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., Lewsey, M.G., Ecker, J.R., Solano, R., Reymond, P., *Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior*. *The Plant Cell*, 2013. 25(8): 3117-3132.
108. Frerigmann, H., Berger, B., Gigolashvili, T., *bHLH05 Is an Interaction Partner of MYB51 and a Novel Regulator of Glucosinolate Biosynthesis in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2014. 166(1): 349-369.
109. Gasperini, D., Chételat, A., Acosta, I.F., Goossens, J., Pauwels, L., Goossens, A., Dreos, R., Alfonso, E., Farmer, E.E., *Multilayered Organization of Jasmonate Signalling in the Regulation of Root Growth*. *PLOS Genetics*, 2015. 11(6): e1005300.
110. Figueroa, P., Browse, J., *Male sterility in Arabidopsis induced by overexpression of a MYC5-SRDX chimeric repressor*. *The Plant Journal*, 2015. 81(6): 849-860.
111. Qi, T., Wang, J., Huang, H., Liu, B., Gao, H., Liu, Y., Song, S., Xie, D., *Regulation of Jasmonate-Induced Leaf Senescence by Antagonism between bHLH Subgroup IIIe and IIIc Factors in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2015. 27(6): 1634-1649.
112. Frerigmann, H., *Chapter Four - Glucosinolate Regulation in a Complex Relationship – MYC and MYB – No One Can Act Without Each Other*, in

- Advances in Botanical Research*, S. Kopriva, Editor. 2016, Academic Press. 57-97.
113. Barth, C., Jander, G., *Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense*. *The Plant Journal*, 2006. 46(4): 549-562.
 114. Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A., Schulze-Lefert, P., *A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense*. *Science*, 2009. 323(5910): 101-106.
 115. Nakano, R.T., Piślewska-Bednarek, M., Yamada, K., Edger, P.P., Miyahara, M., Kondo, M., Böttcher, C., Mori, M., Nishimura, M., Schulze-Lefert, P., Hara-Nishimura, I., Bednarek, P., *PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2017. 89(2): 204-220.
 116. Andersson, D., Chakrabarty, R., Bejai, S., Zhang, J., Rask, L., Meijer, J., *Myrosinases from root and leaves of Arabidopsis thaliana have different catalytic properties*. *Phytochemistry*, 2009. 70(11): 1345-1354.
 117. Fu, L., Wang, M., Han, B., Tan, D., Sun, X., Zhang, J., *Arabidopsis Myrosinase Genes AtTGG4 and AtTGG5 Are Root-Tip Specific and Contribute to Auxin Biosynthesis and Root-Growth Regulation*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. 17(6): 892.
 118. Yamada, K., Goto-Yamada, S., Nakazaki, A., Kunieda, T., Kuwata, K., Nagano, A.J., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., *Endoplasmic reticulum-derived bodies enable a single-cell chemical defense in Brassicaceae plants*. *Communications Biology*, 2020. 3(1): 21.
 119. Ogasawara, K., Yamada, K., Christeller, J.T., Kondo, M., Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., *Constitutive and Inducible ER Bodies of Arabidopsis thaliana Accumulate Distinct β -Glucosidases*. *Plant and Cell Physiology*, 2009. 50(3): 480-488.
 120. Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S., Schulze-Lefert, P., *Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis*. *Science*, 2005. 310(5751): 1180-1183.
 121. Tripathi, M.K., Mishra, A., *Glucosinolates in animal nutrition: A review*. *Animal Feed Science and Technology*, 2007. 132: 1-27.
 122. Ting, H.-M., Cheah, B.H., Chen, Y.-C., Yeh, P.-M., Cheng, C.-P., Yeo, F.K.S., Vie, A.K., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A.M., Kissen, R., *The Role of a Glucosinolate-Derived Nitrile in Plant Immune Responses*. *Frontiers in Plant Science*, 2020. 11: 257.
 123. Tierens, K.F., Thomma, B.P., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., Mauch-Mani, B., Cammue, B.P., Broekaert, W.F., *Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of Arabidopsis to microbial pathogens*. *Plant Physiology*, 2001. 125(4): 1688-1699.

124. Hopkins, R.J., van Dam, N.M., van Loon, J.J., *Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions*. Annual Review of Entomology, 2009. 54: 57-83.
125. Kim, J.H., Lee, B.W., Schroeder, F.C., Jander, G., *Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on Myzus persicae (green peach aphid)*. The Plant Journal, 2008. 54(6): 1015-1026.
126. Kabouw, P., van der Putten, W.H., van Dam, N.M., Biere, A., *Effects of intraspecific variation in white cabbage (Brassica oleracea var. capitata) on soil organisms*. Plant and Soil, 2010. 336(1): 509-518.
127. Potter, M.J., Vanstone, V.A., Davies, K.A., Kirkegaard, J.A., Rathjen, A.J., *Reduced Susceptibility of Brassica napus to Pratylenchus neglectus in Plants with Elevated Root Levels of 2-Phenylethyl Glucosinolate*. Journal of Nematology, 1999. 31(3): 291-298.
128. Hiruma, K., Onozawa-Komori, M., Takahashi, F., Asakura, M., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., Takano, Y., *Entry Mode-Dependent Function of an Indole Glucosinolate Pathway in Arabidopsis for Nonhost Resistance against Anthracnose Pathogens*. The Plant Cell, 2010. 22(7): 2429-2443.
129. Chen, J., Ullah, C., Reichelt, M., Beran, F., Yang, Z.-L., Gershenzon, J., Hammerbacher, A., Vassão, D.G., *The phytopathogenic fungus Sclerotinia sclerotiorum detoxifies plant glucosinolate hydrolysis products via an isothiocyanate hydrolase*. Nature Communications, 2020. 11(1): 3090.
130. Fan, J., Crooks, C., Creissen, G., Hill, L., Fairhurst, S., Doerner, P., Lamb, C., *Pseudomonas sax Genes Overcome Aliphatic Isothiocyanate-Mediated Non-Host Resistance in Arabidopsis*. Science, 2011. 331(6021): 1185.
131. Katz, E., Bagchi, R., Jeschke, V., Rasmussen, A.R.M., Hopper, A., Burow, M., Estelle, M., Kliebenstein, D.J., *Diverse Allyl Glucosinolate Catabolites Independently Influence Root Growth and Development*. Plant Physiology, 2020. 183(3): 1376-1390.
132. Zhao, Z., Zhang, W., Stanley, B.A., Assmann, S.M., *Functional proteomics of Arabidopsis thaliana guard cells uncovers new stomatal signaling pathways*. The Plant Cell, 2008. 20(12): 3210-3226.
133. Martinez-Ballesta, M., Moreno-Fernández, D., Castejon, D., Ochando, C., Morandini, P., Carvajal, M., *The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on water transport under salt stress in Arabidopsis thaliana*. Frontiers in Plant Science, 2015. 6(524): 524.
134. Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W., Desmarchelier, J.M., *Biofumigation potential of brassicas*. Plant and Soil, 1998. 201(1): 103-112.
135. Stotz, H.U., Sawada, Y., Shimada, Y., Hirai, M.Y., Sasaki, E., Krischke, M., Brown, P.D., Saito, K., Kamiya, Y., *Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of Arabidopsis against Sclerotinia sclerotiorum*. The Plant Journal, 2011. 67(1): 81-93.
136. Sanchez-Vallet, A., Ramos, B., Bednarek, P., López, G., Piślewska-Bednarek, M., Schulze-Lefert, P., Molina, A., *Tryptophan-derived secondary metabolites in Arabidopsis thaliana confer non-host resistance to necrotrophic Plectosphaerella cucumerina fungi*. The Plant Journal, 2010. 63(1): 115-127.

137. Pastorczyk, M., Bednarek, P., *Chapter Seven - The Function of Glucosinolates and Related Metabolites in Plant Innate Immunity*, in *Advances in Botanical Research*, S. Kopriva, Editor. 2016, Academic Press. 171-198.
138. Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., Ausubel, F.M., *Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response*. *Science*, 2009. 323(5910): 95-101.
139. Lu, X., Dittgen, J., Piślewska-Bednarek, M., Molina, A., Schneider, B., Svatoš, A., Doubský, J., Schneeberger, K., Weigel, D., Bednarek, P., Schulze-Lefert, P., *Mutant Allele-Specific Uncoupling of PENETRATION3 Functions Reveals Engagement of the ATP-Binding Cassette Transporter in Distinct Tryptophan Metabolic Pathways*. *Plant Physiology*, 2015. 168(3): 814-27.
140. Hanschen, F.S., Pfitzmann, M., Witzel, K., Stützel, H., Schreiner, M., Zrenner, R., *Differences in the enzymatic hydrolysis of glucosinolates increase the defense metabolite diversity in 19 Arabidopsis thaliana accessions*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018. 124: 126-135.
141. Panthee, D., Kopsell, D., Sams, C., *Diversity Analysis of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh Ecotypes for Glucosinolates in Shoots and Seeds*. *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*, 2011. 46.
142. Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M., Gershenzon, J., *Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 2003. 62(3): 471-481.
143. Petersen, B., Chen, S., Hansen, C., Olsen, C., Halkier, B., *Composition and content of glucosinolates in developing Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2002. 214(4): 562-571.
144. Clauss, M.J., Dietel, S., Schubert, G., Mitchell-Olds, T., *Glucosinolate and Trichome Defenses in a Natural Arabidopsis lyrata Population*. *Journal of Chemical Ecology*, 2006. 32(11): 2351-2373.
145. Windsor, A.J., Reichelt, M., Figuth, A., Svatoš, A., Kroymann, J., Kliebenstein, D.J., Gershenzon, J., Mitchell-Olds, T., *Geographic and evolutionary diversification of glucosinolates among near relatives of Arabidopsis thaliana (Brassicaceae)*. *Phytochemistry*, 2005. 66(11): 1321-1333.
146. Aires, A., Carvalho, R., *Rapid Separation of Indole Glucosinolates in Roots of Chinese Cabbage (Brassica rapa Subsp. Pekinensis) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017: 5125329.
147. Kittipol, V., He, Z., Wang, L., Doheny-Adams, T., Langer, S., Bancroft, I., *Genetic architecture of glucosinolate variation in Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology*, 2019. 240: 152988.
148. Padilla, G., Cartea, M.E., Velasco, P., de Haro, A., Ordás, A., *Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica rapa*. *Phytochemistry*, 2007. 68(4): 536-545.
149. Schranz, M.E., Manzaneda, A.J., Windsor, A.J., Clauss, M.J., Mitchell-Olds, T., *Ecological genomics of Boechera stricta: identification of a QTL controlling the allocation of methionine- vs branched-chain amino acid-derived glucosinolates and levels of insect herbivory*. *Heredity*, 2009. 102(5): 465-474.

150. Agerbirk, N., Olsen, C., Chew, F., Orgaard, M., *Variable Glucosinolate Profiles of Cardamine pratensis (Brassicaceae) with Equal Chromosome Numbers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. 58: 4693-4700.
151. Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Ver Loren van Themaat, E., Maddula, R.K., Svatoš, A., Schulze-Lefert, P., *Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in Arabidopsis thaliana relatives*. New Phytologist, 2011. 192(3): 713-726.
152. Daxenbichler, M.E., Spencer, G.F., Carlson, D.G., Rose, G.B., Brinker, A.M., Powell, R.G., *Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants*. Phytochemistry, 1991. 30(8): 2623-2638.
153. Kjær, A., Schuster, A., *Glucosinolates in seeds of Neslia paniculata*. Phytochemistry, 1972. 11(10): 3045-3048.
154. Amyot, L., McDowell, T., Martin, S.L., Renaud, J., Gruber, M.Y., Hannoufa, A., *Assessment of Antinutritional Compounds and Chemotaxonomic Relationships between Camelina sativa and Its Wild Relatives*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019. 67(3): 796-806.
155. Russo, R., Galasso, I., Reggiani, R., *Variability in Glucosinolate Content among Camelina Species*. American Journal of Plant Sciences, 2014. 05: 294-298.
156. Reintanz, B., Lehnen, M., Reichelt, M., Gershenzon, J., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Godde, M., Uhl, R., Palme, K., *Physiologists bus, a Bushy Arabidopsis CYP79F1 Knockout Mutant with Abolished Synthesis of Short-Chain Aliphatic Glucosinolates*. The Plant Cell, 2001. 13: 351-367.
157. Tantikanjana, T., Mikkelsen, M.D., Hussain, M., Halkier, B.A., Sundaresan, V., *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, 2004. 135(2): 840-848.
158. Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Van Onckelen, H., Van Montagu, M., Inzé, D., *Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction*. The Plant Cell, 1995. 7(9): 1405-1419.
159. Stepanova, A.N., Hoyt, J.M., Hamilton, A.A., Alonso, J.M., *A Link between Ethylene and Auxin Uncovered by the Characterization of Two Root-Specific Ethylene-Insensitive Mutants in Arabidopsis*. The Plant Cell, 2005. 17(8): 2230-2242.
160. Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T., Poschlod, P., *Germination traits explain soil seed persistence across species: the case of Mediterranean annual plants in cereal fields*. Annals of Botany, 2011. 107(3): 415-426.
161. Revelou, P.-K., Kokotou, M.G., Constantinou-Kokotou, V., *Identification of Auxin Metabolites in Brassicaceae by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry*. Molecules, 2019. 24(14): 2615.
162. Tam, Y.Y., Epstein, E., Normanly, J., *Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose*. Plant Physiology, 2000. 123(2): 589-596.

163. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M., *MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data*. BMC Bioinformatics, 2010. 11(1): 395.
164. Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H.H., Nielsen, M.T., Halkier, B.A., *USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products*. Nucleic Acids Research, 2007. 35(7): e55.
165. Lamesch, P., Berardini, T.Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D.L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A.S., Lee, C.H., Nelson, W.D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A., Huala, E., *The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools*. Nucleic Acids Research, 2011. 40: 1202-1210.
166. Hu, T.T., Pattyn, P., Bakker, E.G., Cao, J., Cheng, J.-F., Clark, R.M., Fahlgren, N., Fawcett, J.A., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hollister, J.D., Ossowski, S., Ottillar, R.P., Salamov, A.A., Schneeberger, K., Spannagl, M., Wang, X., Yang, L., Nasrallah, M.E., Bergelson, J., Carrington, J.C., Gaut, B.S., Schmutz, J., Mayer, K.F.X., Van de Peer, Y., Grigoriev, I.V., Nordborg, M., Weigel, D., Guo, Y.-L., *The Arabidopsis lyrata genome sequence and the basis of rapid genome size change*. Nature Genetics, 2011. 43(5): 476-481.
167. Gan, X., Hay, A., Kwantes, M., Haberer, G., Hallab, A., Ioio, R.D., Hofhuis, H., Pieper, B., Cartolano, M., Neumann, U., Nikolov, L.A., Song, B., Hajheidari, M., Briskine, R., Kougioumoutzi, E., Vlad, D., Broholm, S., Hein, J., Meksem, K., Lightfoot, D., Shimizu, K.K., Shimizu-Inatsugi, R., Imprialou, M., Kudrna, D., Wing, R., Sato, S., Huijser, P., Filatov, D., Mayer, K.F.X., Mott, R., Tsiantis, M., *The Cardamine hirsuta genome offers insight into the evolution of morphological diversity*. Nature Plants, 2016. 2(11): 161-167.
168. Agerbirk, N., *Indole glucosinolate breakdown and its biological effects*. Phytochemistry reviews, 2009. 8(1): 101-120.
169. Züst, T., Agrawal, A.A., *Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis*. Annual Review of Plant Biology, 2017. 68(1): 513-534.
170. Barton, K.E., Boege, K., *Future directions in the ontogeny of plant defence: understanding the evolutionary causes and consequences*. Ecology Letters, 2017. 20(4): 403-411.
171. Meldau, S., Erb, M., Baldwin, I.T., *Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns*. Annals of Botany, 2012. 110(8): 1503-1514.
172. van Dam, N.M., *Belowground Herbivory and Plant Defenses*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2009. 40(1): 373-391.
173. Yamane, A., Fujikura, J., Ogawa, H., Mizutani, J., *Isothiocyanates as alleopathic compounds from Rorippa indica Hiern. (Cruciferae) roots*. Journal of Chemical Ecology, 1992. 18(11): 1941-1954.
174. Séguin-Swartz, G., Eynck, C., Gugel, R.K., Strelkov, S.E., Olivier, C.Y., Li, J.L., Klein-Gebbinck, H., Borhan, H., Caldwell, C.D., Falk, K.C., *Diseases of Camelina sativa (false flax)*. Canadian Journal of Plant Pathology, 2009. 31(4): 375-386.

175. Soroka, J., Olivier, C., Grenkow, L., Séguin-Swartz, G., *Interactions between Camelina sativa (Brassicaceae) and insect pests of canola*. The Canadian Entomologist, 2014. 147(2): 193-214.
176. Conn, K.L., Browne, L.M., Tewari, J.P., Ayer, W.A., *Resistance to Rhizoctonia solani and Presence of Antimicrobial Compounds in Camelina sativa Roots*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 1994. 3(2): 125-130.
177. Czerniawski, P., Piasecka, A., Bednarek, P., *Evolutionary changes in the glucosinolate biosynthetic capacity in species representing Capsella, Camelina and Neslia genera*. Phytochemistry, 2021. 181: 112571.
178. Malka, S.K., Cheng, Y., *Possible Interactions between the Biosynthetic Pathways of Indole Glucosinolate and Auxin*. Frontiers in Plant Science, 2017. 8(2131): 2131.
179. Vik, D., Mitarai, N., Wulff, N., Halkier, B.A., Burow, M., *Dynamic Modeling of Indole Glucosinolate Hydrolysis and Its Impact on Auxin Signaling*. Frontiers in Plant Science, 2018. 9(550): 550.
180. Lehmann, T., Janowitz, T., Sánchez-Parra, B., Alonso, M.-M.P., Trompetter, I., Piotrowski, M., Pollmann, S., *Arabidopsis NITRILASE 1 Contributes to the Regulation of Root Growth and Development through Modulation of Auxin Biosynthesis in Seedlings*. Frontiers in Plant Science, 2017. 8(36): 36.
181. Züst, T., Strickler, S.R., Powell, A.F., Mabry, M.E., An, H., Mirzaei, M., York, T., Holland, C.K., Kumar, P., Erb, M., Petschenka, G., Gómez, J.-M., Perfectti, F., Müller, C., Pires, J.C., Mueller, L.A., Jander, G., *Independent evolution of ancestral and novel defenses in a genus of toxic plants (Erysimum, Brassicaceae)*. eLife, 2020. 9: e51712.
182. Kettles, G.J., Drurey, C., Schoonbeek, H.-j., Maule, A.J., Hogenhout, S.A., *Resistance of Arabidopsis thaliana to the green peach aphid, Myzus persicae, involves camalexin and is regulated by microRNAs*. New Phytologist, 2013. 198(4): 1178-1190.
183. Thomma, B.P.H.J., Nelissen, I., Eggermont, K., Broekaert, W.F., *Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of Arabidopsis thaliana to the fungus Alternaria brassicicola*. The Plant Journal, 1999. 19(2): 163-171.
184. Hiruma, K., Fukunaga, S., Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Watanabe, S., Narusaka, Y., Shirasu, K., Takano, Y., *Glutathione and tryptophan metabolism are required for Arabidopsis immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. 110(23): 9589-9594.

Materiały uzupełniające

Tabela uzupełniająca 1. Lista wszystkich zidentyfikowanych w tej pracy glukozynolanów, zawierająca ich czasy retencji i fragmentację w trybie jonizacji ujemnej, uzyskaną w trakcie analiz LC-MS/MS.

Nr	Czas retencji [min]	Nazwa związku	Wzór sumaryczny	Dokładna masa jonu [M-H] ⁻		Błąd [ppm]	Fragmentacja
				Zmierzona	Wyliczona		
1	2,1	3-(metylosulfinylo)propyloglukozynolan	C ₁₁ H ₂₀ NO ₁₀ S ₃	422,0257	422,0255	-0,5	422, 358, 196, 97
2	2,6	4-hydroksybutyloglukozynolan	C ₁₁ H ₂₁ NO ₁₀ S ₂	390,0528	390,0534	1,5	390, 372, 199, 128, 97
3	4,0	4-(metylosulfinylo)butyloglukozynolan	C ₁₂ H ₂₂ NO ₁₀ S ₃	436,0399	436,0411	2,8	436, 372, 178, 97
4	5,5	5-(metylosulfinylo)pentyloglukozynolan	C ₁₃ H ₂₄ NO ₁₀ S ₃	450,0559	450,0568	2,0	450, 386, 285, 194, 97
5	7,6	6-(metylosulfinylo)heksyloglukozynolan	C ₁₄ H ₂₆ NO ₁₀ S ₃	464,0711	464,0724	2,8	464, 400, 274, 229, 149, 97
6	7,9	3-(metylotio)propyloglukozynolan	C ₁₁ H ₂₀ NO ₉ S ₃	406,0307	406,0306	-0,3	406, 355, 225, 155, 97
7	8,1	4-hydroksy-indolilo-3-metyloglukozynolan	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₁₀ S ₂	463,0483	463,0487	0,8	463, 374, 221, 157, 97
8	10,1	7-(metylosulfinylo)heptyloglukozynolan	C ₁₅ H ₂₈ NO ₁₀ S ₃	478,0871	478,0881	2,0	478, 414, 252, 97

9	10,3	4-(metylotio)butyloglukozynolan	$C_{12}H_{22}NO_9S_3$	420,0453	420,0462	2,2	420, 259, 178, 97
10	11,5	8-(metylosulfonylo)oktyloglukozynolan	$C_{16}H_{30}NO_{11}S_3$	508,0985	508,0986	0,3	508, 444, 328, 275, 204, 97
11	12,0	indolilo-3-metyloglukozynolan	$C_{16}H_{19}N_2O_9S_2$	447,0529	447,0537	1,8	447, 394, 313, 259, 205, 152, 97
12	12,9	8-(metylosulfinylo)oktyloglukozynolan	$C_{16}H_{30}NO_{10}S_3$	492,1032	492,1037	1,1	492, 428, 234, 97
13	13,6	5-(metylotio)pentyloglukozynolan	$C_{13}H_{24}NO_9S_3$	434,0615	434,0619	0,9	434, 336, 223, 164, 97
14	13,7	2-fenylloetyloglukozynolan	$C_{15}H_{20}NO_9S_2$	422,0583	422,0585	0,5	422, 373, 278, 132, 97
15	15,0	4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan	$C_{17}H_{21}N_2O_{10}S_2$	477,0657	477,0643	-2,9	477, 425, 373, 345, 307, 259, 205, 97
16	15,6	n-heksyloglukozynolan	$C_{13}H_{24}NO_9S_2$	402,0913	402,0898	-3,8	402, 287, 231, 186, 97
17	15,8	9-(metylosulfonylo)nonyloglukozynolan	$C_{17}H_{32}NO_{11}S_3$	522,1136	522,1143	1,3	522, 447, 357, 258, 97
18	17,4	6-(metylotio)heksyloglukozynolan	$C_{14}H_{26}NO_9S_3$	448,0762	448,0775	3,0	448, 363, 243, 141, 97

19	17,6	9-(metylosulfinylo)nonyloglukozynolan	$C_{17}H_{32}NO_{10}S_3$	506,1203	506,1194	-1,8	506, 442, 248, 97
20	17,7	3-benzylksypropyloglukozynolan	$C_{17}H_{22}NO_{11}S_2$	480,0632	480,0640	1,6	480, 418, 359, 281, 196, 97
21	17,8	10-(metylosulfonylo)decyloglukozynolan	$C_{18}H_{34}NO_{11}S_3$	536,1293	536,1299	1,2	536, 463, 385, 300, 179, 97
22	17,9	1-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan	$C_{17}H_{21}N_2O_{10}S_2$	477,0640	477,0643	0,6	477, 446, 421, 365, 341, 315, 259, 97
23	19,2	10-(metylosulfinylo)decyloglukozynolan	$C_{18}H_{34}NO_{10}S_3$	520,1342	520,1350	1,7	520, 456, 425, 330, 211, 137, 97
24	20,2	4-benzylksybutyloglukozynolan	$C_{18}H_{24}NO_{11}S_2$	494,0784	494,0796	2,5	494, 443, 257, 163, 97
25	21,2	7-(metylotio)heptyloglukozynolan	$C_{15}H_{28}NO_9S_3$	462,0920	462,0932	2,6	462, 382, 275, 220, 97
26	21,6	11-(metylosulfinylo)undecyloglukozynolan	$C_{19}H_{36}NO_{10}S_3$	534,1507	534,1507	-0,1	534, 470, 414, 292, 217, 97
27	24,4	8-(metylotio)oktyloglukozynolan	$C_{16}H_{30}NO_9S_3$	476,1095	476,1088	-1,4	476, 275, 259, 195, 97
28	25,4	5-oksooktyloglukozynolan	$C_{15}H_{26}NO_{10}S_2$	444,1419	444,1428	2,0	444, 400, 356, 277, 213, 129, 97

29	25,5	9-(metylotio)nonyloglukozynolan	$C_{17}H_{32}NO_9S_3$	490,1223	490,1245	4,3	490, 421, 374, 305, 259, 186, 97
30	27,0	10-(metylotio)decyloglukozynolan	$C_{18}H_{34}NO_9S_3$	504,1407	504,1401	-1,2	504, 370, 335, 152, 97

Tabela uzupełniająca 2. Lista zidentyfikowanych w tej pracy metabolitów związanych z biosyntezą auksyn: IAOx oraz IAA i jego konjugatów, zawierająca ich czasy retencji i fragmentację w trybie jonizacji ujemnej, uzyskaną w trakcie analiz LC-MS/MS. * - z powodu niskiej intensywności sygnałów nie uzyskano widma fragmentacyjnego

Nr	Czas retencji [min]	Nazwa związku	Wzór sumaryczny	Dokładna masa jonu [M-H] ⁻		Błąd [ppm]	Fragmentacja
				Zmierzona	Wyliczona		
1	2,97	IAOx (indolilo-3-acetaldoksym)	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O	173,0715	173,0712	-1,67	*
2	3,01	IAGly (indolilo-3-acetylo-L-glicyna)	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₃	231,0770	231,0776	2,60	231, 174, 161, 130, 116
3	3,36	IASer (indolilo-3-acetylo-L-seryna)	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₄	261,0875	261,0881	2,30	261, 174, 156, 130, 116, 104
4	3,61	IAGlc (indolilo-3-acetylo-D-glukoza)	C ₁₆ H ₁₈ NO ₇	336,1083	336,1089	1,79	336, 280, 262, 174, 163, 130, 116
5	3,82	IAAsp (kwas indolilo-3-acetylo-L-asparaginowy)	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₅	289,0824	289,0832	2,77	289, 262, 228, 161, 146, 128, 116, 102
6	3,94	IAGlu (kwas indolilo-3-acetylo-L-glutaminowy)	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₅	303,0981	303,0988	2,31	303, 280, 221, 174, 146, 130
7	4,18	IAAla (indolilo-3-acetylo-L-alanina)	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	246,0926	246,0934	3,26	246, 228, 174, 160, 144, 130, 116

8	4,81	IAA (kwas indolilo-3-octowy)	$C_{10}H_8NO_2$	174,0555	174,0553	-1,79	174, 159, 147, 130, 116, 100
9	5,22	IVal (indolilo-3-acetylo-L-walina)	$C_{15}H_{17}N_2O_3$	273,1239	273,1247	2,93	273, 174, 164, 130, 116