

*Maatalouden
tutkimuskeskuksen
julkaisuja*

S A R J A A

90

*Helena Hyvärinen
(toim.)*

Kasviperäiset biomolekyylit – glukosinolaatit

Kirjallisuuskatsaus

Helena Hyvärinen (toim.)

Kasviperäiset biomolekyylit – glukosinolaatit

Kirjallisuuskatsaus

Maatalouden tutkimuskeskus

ISBN 951-729-593-6

ISSN 1238-9935

Copyright

Maatalouden tutkimuskeskus

Kirjoittajat

Julkaisija

Maatalouden tutkimuskeskus, 31600 Jokioinen

Jakelu ja myynti

Maatalouden tutkimuskeskus, tietopalveluyksikkö, 31600 Jokioinen

Puhelin (03) 4188 2327, telekopio (03) 4188 2339

sähköposti julkaisut@mtt.fi

Painatus

Jyväskylän yliopistopaino 2001

Sisäsivujen painopaperille on myönnetty pohjoismainen Joutsenmerkki.

Kansimateriaali on 75-prosenttisesti uusiokuitua.

Tiivistelmä

Avainsanat: ristikukkaiset kasvit, kasvinviljely, kasvu, biosynteesi, kemiallinen koostumus, biomolekyylit, glukosinolaatit, torjuntamenetelmät, elintarviketuotanto, terveysvaikutukset, analyysimenetelmät

Glukosinolaatit ovat ristikukkaisilla kasveilla esiintyviä rikkiä sisältäviä yhdisteitä. Entsyymit hajottavat niitä ja hajoamistuotteet ovat fysiologisesti aktiivisia. Glukosinolaatit saattavat vaikuttaa mm. kasvien kestävyteen, siementen itämiseen, kasvitautilien ehkäisyyn sekä kasvien makuun. Yhdisteiden käyttäytyminen elimistössä sekä mahdolliset terveysvaikutukset ovat myös huonosti tunnettuja.

Aikaisemmasta käsityksestä poiketen glukosinolaatit kasvissa esiintyessään saattavat vaikuttaa kasvin kehittymiseen, erityisesti poikkeavissa tilanteissa. Niiden esiintymiseen vaikuttaa sellaisia eläviä ja elottomia (bioottiset ja abioottiset) tekijöitä, joista ainakin osaa voidaan jo nyt huomioida viljelytekniikassa. Tämän lisäksi erilaiset ärsykkeet saattavat kiihdyttää glukosinolaattien muodostumista. Sellaisen viljelytekniikan kehittäminen, joka suosii tarvittaessa glukosinolaattien muodostumista edellyttää yhdisteiden biosynteesin ja hydrolyysin ymmärtämistä.

Glukosinolaatteja pidetään kasvien puolustuskemikaaleina. Ristikukkaiskasvien murskatut solut, lahoavat kasvijätteet ja kasveista eristettyjen glukosinolaattien hajoamistuotteet estävät muiden kasvien sie-

menten itämistä ja taimien kasvua. Ne myös rajoittavat maassa elävien kasvintuhoojien lisääntymistä. Glukosinolaattien hajoamistuotteet vaikuttavat ristikukkaiskasvien ja niitä syövien hyönteisten väliseen kemialliseen viestintään. Ristikukkaiskasvien avulla uskotaan voitavan vähentää kemiallisen torjunnan tarvetta viljelykierrossa.

Elintarviketeknologiset prosessit ja varastointi vaikuttavat siihen, miten glukosinolaatit hajoavat ja paljonko hajoamistuotteita on elintarvikkeissa. Hajoamistuotteista erityisesti indoleilla ja isotiosyanaateilla on todettu positiivisia terveysvaikutuksia.

Kasvien glukosinolaatit määritetään monivaiheisen esikäsittelyn jälkeen. Menetelmänä käytetään pääasiassa korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa. Glukosinolaattien hajoamistuotteiden analysoinnissa käytetään puolestaan kaasui- tai nestekromatografiaa.

Tähän kirjallisuuskatsaukseen on koottu uusinta tutkimustietoa glukosinolaateista, niiden muodostumisesta ja hajoamisesta, biokemiasta, käytöstä kasvintuhoojien torjuntaan, käsittelyjen vaikutuksista, terveysvaikutuksista sekä analysoinnista.

Alkusanat

Kasviksilla, marjoilla ja viljatuotteilla on todettu olevan edullinen vaikutus ihmisen terveyteen. Viimeaikaisen tutkimuksen valossa erityisesti kasvipäriset biomolekyylit suojaavat esim. sydän- ja verisuonitaudeilta ja syövältä. Tällaisia ovat fenoliset yhdisteet (flavonoidit ja lignaanit) sekä glukosinolaatit.

Kasvin vegetatiivista kasvua rajoittavien pohjoisten kasvuolojen vaikutuksia biomolekyylien määrään ja laatuun ei tunneta, mutta viitteitä esimerkiksi pitkän päivän edullisista vaikutuksista on kuitenkin olemassa. Myöskään näiden biomolekyylien käyttäytymistä elintarvikeketjussa ei tunneta.

Viime vuosina on kiinnostuttu maailmanlaajuisesti siitä, miten kasvikunnasta peräisin olevia, luonnollisia biomolekyyliä voitaisiin hyödyntää terveysvaikutteisten eli funktionaalisten elintarvikkeiden aineosina. Tämä edellyttää kuitenkin tieteellisen tutkimustiedon syventämistä biomolekyylien muodostumisesta, siihen vaikuttavista tekijöistä ja viime kädessä biomolekyylien vaikutuksista ihmisen elimistössä.

Maatalouden tutkimuskeskus (MTT) aloitti vuonna 1998 tutkimusohjelman ”Kasvipäriset biomolekyylit elintarviketuotannossa”. Ohjelman tavoitteena oli kehittää suomalaiseen päivittäiseen perusruokavalioon uusia, kasvipohjaisia funktionaalisia elintarvikkeita, joilla voisi olla edullista vaikutusta kansantervey-

teen. Ohjelmassa tutkitaan kasvipärisien biomolekyylien koko elinkaarta pelosta pöytään.

Kasvintuotannon tutkimus selvittää, kuinka viljelytekniikan avulla voidaan muuttaa abioottisia ja bioottisia kasvutekijöitä terveysvaikutteisia biomolekyyliä suosivaksi. Kasvinsuojelu pyrkii osoittamaan, että terveysvaikutteisilla biomolekyyleillä on vaikutusta myös kasvien puolustuksessa. Lisäksi tutkitaan biomolekyylien käyttäytymistä elintarvikeprosesseissa. Näin prosesseja pyritään optimoimaan, jotta biomolekyylit säilyvät ja samalla kehitetään mallituotteita kliinisiin tutkimuksiin. Helsingin yliopistossa tehtävässä osaprojektissa haetaan mittareita, joilla voidaan havainnoida biomolekyylien vaikutuksia ihmisessä.

Tutkittaviksi kasveiksi valittiin Suomessa viljeltäviä, hyviksi biomolekyylien lähteiksi tiedettyjä kasveja ja marjoja tai luonnonmarjoja: kaalit (glukosinolaatit), mustaherukka, mansikka, puolukka ja tattari (flavonoidit) sekä pellava (lignaanit, oligosakkaridit). Ohjelmaa rahoittaa MTT:n lisäksi maa- ja metsätalousministeriön elintarvikeklusterin tutkimusohjelma. Seurantaryhmässä on edustettuna myös kotimaisia elintarvikeyrityksiä.

Tämä glukosinolaatteja käsittelevä kirjallisuuskatsaus koottiin tutkimusohjelman taustamateriaaliksi. Myöhemmin julkaistaan myös fenolisia yhdisteitä ja terpeenejä koskevat kirjallisuusselvitykset.

Hannu Korhonen

Professori

Ohjelman vastaava johtaja

Sisällys

Tiivistelmä	3
Alkusanat	4
1 Yleistä glukosinolaateista, <i>Keskitalo, M. & Hyvärinen, H.</i>	7
Kirjallisuus	9
2 Glukosinolaattien biokemia ja esiintymiseen vaikuttavat kasvutekijät, <i>Keskitalo, M.</i>	10
2.1 Glukosinolaattien merkitys kasvin kasvussa	11
2.2 Glukosinolaattien muodostuminen	11
2.2.1 Biosynteesi	11
2.2.2 Sijainti kasvissa	14
2.2.3 Biosynteesin geneettinen säätely	15
2.3 Glukosinolaattien hajoaminen	16
2.3.1 Hydrolyysi	16
2.3.2 Hajottajaentsyymit	17
2.3.3 Hajotuksen geneettinen säätely	18
2.4 Glukosinolaattien esiintymiseen vaikuttavat tekijät	19
2.4.1 Abioottiset tekijät	19
2.4.1.1 Valo	19
2.4.1.2 Lämpötila	20
2.4.1.3 Ilman dioksidit	20
2.4.1.4 Maalaji	21
2.4.1.5 Kuivuus	21
2.4.1.6 Ravinteet	21
2.4.1.7 Ulkoinen kemikaalikäsittely	22
2.4.2 Bioottiset tekijät	23
2.4.2.1 Kasvilaji	23
2.4.2.2 Kasvilajike	24
2.4.2.3 Kehitysvaihe	24
2.4.2.4 Kasvinosa	25
2.4.2.5 Satokomponentit	26
2.5 Glukosinolaattien modifiointi	26
Kirjallisuus	27
3 Glukosinolaatit ja niiden hajoamistuotteet kasvinsuojelussa, <i>Jaakkola, S.</i>	32
3.1 Glukosinolaattien hajoamistuotteet	33
3.2 Isotiosyanaattien ominaisuudet ja tuotanto	33
3.3 Hajoamistuotteet maassa	35
3.4 Glukosinolaattien vaikutukset	39
3.4.1 Rikka- ja viljelykasvit	39
3.4.2 Taudinaiheuttajat	41

3.4.3	Ankeroiset ja hyönteiset	44
3.4.4	Ristikukkaisia kasveja syövät eläimet	45
3.4.4.1	Isäntäkasvin tunnistaminen	46
3.4.4.2	Ristikukkaisille sopeutumattomien kasvinsyöjien syönti	47
3.4.4.3	Ristikukkaisilla kasveilla elävien hyönteisten syönti	48
3.4.4.4	Ristikukkaisilla kasveilla elävien hyönteisten muninta	48
3.4.5	Glukosinolaatit ja indusoitu puolustus	49
	Kirjallisuus	50
4	Glukosinolaatit ja niiden hajoamistuotteet elintarvikkeissa, <i>Ryhänen, E-L., Tolonen, M. & Taipale, M.</i>	58
4.1	Glukosinolaattien pitoisuudet kaalikasveissa (<i>Brassica oleracea</i>)	59
4.2	Glukosinolaattien sekä niiden hajoamistuotteiden vaikutus elintarvikkeiden makuun	60
4.3	Varastoinnin ja prosessoinnin vaikutus glukosinolaatteihin ja niiden hajoamistuotteisiin	60
4.3.1	Varastointi	60
4.3.2	Pilkkominen	60
4.3.3	Keittäminen	61
4.3.4	Pakastaminen ja kuivaaminen	62
4.3.5	Hapattaminen	62
4.4	Glukosinolaattien ja niiden hajoamistuotteiden vaikutukset terveyteen	62
4.4.1	Antikarsinogeeninen vaikutus	62
4.4.2	Haitalliset vaikutukset	64
	Kirjallisuus	64
5	Glukosinolaattien ja niiden hajoamistuotteiden määrittäminen, <i>Piiblava, J-M.</i>	68
5.1	Johdanto	68
5.2	Glukosinolaatit	68
5.2.1	Kasvinäytteen esikäsittely	68
5.2.2	Öljykasvien siementen esikäsittely	69
5.2.3	Glukosinolaattien eristäminen	69
5.2.4	Glukosinolaattien desulfonointi	69
5.2.5	Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi	69
5.2.5.1	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	69
5.2.5.2	Kaasukromatografia	69
5.3	Glukosinolaattien hajoamistuotteet	70
5.3.1	Hajoamistuotteiden eristäminen	70
5.3.2	Hajoamistuotteiden analysointi	70
5.3.2.1	Kaasukromatografia	70
5.3.2.2	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	70
5.3.2.3	Spektrofotometria	71
	Kirjallisuus	71

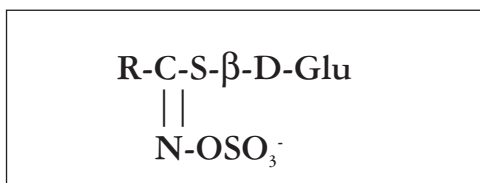
1 Yleistä glukosinolaateista

Marjo Keskitalo¹⁾ & Helena Hyvärinen²⁾

¹⁾ Maatalouden tutkimuskeskus, Kasvintuotannon tutkimus, Peltokasvit ja maaperä,
31600 Jokioinen, marjo.keskitalo@mtt.fi

²⁾ Maatalouden tutkimuskeskus, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemian ja -tekniikka,
31600 Jokioinen, helena.hyvarinen@mtt.fi

Glukosinolaatit ovat kasveissa esiintyviä sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita. Ne muodostuvat aminohapoista, ovat vesiliukoisia ja haihtumattomia. Ristikukkaisissa kasveissa, kuten rypsissä ja rapsissa, ne ovat tyypillisiä rikkiä sisältäviä glykosideja. Glukosinolaatteja ja niitä hajottavia myrosinaasi-entsyymejä on todettu mm. *Brassicaceae*-, *Resedaceae*-, *Tovariaceae*-, *Tropaeolaceae*-heimoihin kuuluvissa kasveissa (Rodman 1991). Glukosinolaattien yleinen rakenne on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Glukosinolaatin rakennekaava. R = alkyyli, alkenyyli, aryyli, aryylialkyyli, aryyli-alkyyli, β -hydroksialkyyli tai indolyylimetyyli (Verhoeven et al. 1997).

Erilaisia glukosinolaatteja on tunnistettu jo yli 100. Glukosinolaattien lukumäärä kasveissa vaihtelee, mutta yleensä samasta kasvista on tunnistettu useampia kuin yhdentyyppisiä yhdisteitä. Kaalien glukosinolaattikoostumus on melko yhtenäinen, sillä 20 kasvilajista tunnistettiin vain 15 erilaista glukosinolaattia (Cole 1997). Sen sijaan yhdestä lituruohosta analysoitiin jopa 23 eri-

laista glukosinolaattia (Haughn 1991). Glukosinolaatit hajoavat kasveissa myrosinaasi-entsyymin vaikutuksesta yhdisteiksi, joista mm. isotiosyanaatit ovat haihtuvia (Doughty et al. 1996). Glukosinolaattien pitoisuus kasvilla on yleensä hyvin pieni (1–250 $\mu\text{mol g}^{-1}$) yhdisteestä ja lajista riippuen, mutta voi kuitenkin olla jopa 10 % kasvin kuivapainosta (Cole 1997).

Glukosinolaatit muodostuvat kasvin soluissa monivaiheisen reaktiosarjan tuloksena. Yhdisteiden merkitys kasville ei ole täysin selvä, mutta aikaisemmasta käsityksestä poiketen, glukosinolaatit saattavat kuitenkin vaikuttaa kasvin kasvuun. Ne ilmeisesti myös osallistuvat rikkitasapainon ylläpitämiseen, millä saattaa olla merkitystä kasvin selviytymisessä erilaisissa normaalioloista poikkeavissa tilanteissa. Yhdisteiden biokeemiasta sekä niiden esiintymiseen vaikuttavista tekijöistä kerrotaan luvussa 2. Kasvin ja sitä ympäröivän ekosysteemin vuorovaikutuksessa glukosinolaateilla sekä niiden hajoamistuotteilla tiedetään olevan tärkeä rooli. Erityisesti glukosinolaattien hajoamistuotteiden, kuten isotiosyanaattien, on todettu karkottavan hyönteisiä, ehkäisevän kasvitauteja sekä muiden kasvien kasvua, mistä kerrotaan luvussa 3.

Glukosinolaattien on aikaisemmin todettu olevan yksinomaan haitallisia lämmenverisille eläimille, mutta viimeaikaiset tutkimukset osoittavat, että eräät niistä saattavat ehkäistä tiettyjen kansansairauksien syntymistä. Glukosinolaatit ovatkin

kiinnostavia kasvien sekundaarisia aineenvaihduntatuotteita siksi, että niiden entsyymaattisesti vapautuvat hajoamistuotteet ovat ilmeisesti fysiologisesti aktiivisia yhdisteitä. Sen lisäksi ne esim. antavat kaalikasveille tyypillisen pistävän maun (McGregor et al. 1983). Näiden takia on tärkeää tietää, miten elintarvikkeiden valmistusprosessit vaikuttavat glukosinolaattien säilymiseen. Tästä kerrotaan luvussa 4.

Kasvisten terveyttä edistävä vaikutus saattaa johtua eri komponenttien vuorovaihtuksesta. Sen takia on tärkeää ymmärtää kasvi kokonaisuutena sekä myös muiden molekyylien muodostuminen (Schreiner et

al. 1998, Kushad et al. 1999), vaikka tässä kirjoituksessa keskitytäänkin pelkästään glukosinolaatteihin.

Glukosinolaatit ovat negatiivisesti varautuneita yhdisteitä, jotka esiintyvät kasveissa yleisimmin kaliumsuoloina. Ne voivat myös esiintyä sinapiinihapon koliinesterinä (McGregor et al. 1983). Glukosinolaatti muodostuu sivuketjusta (R) ja tiohydroksamaatti-*O*-sulfonaattista, jossa sokeriosa on kiinnittynyt β -sidoksen avulla rikkiatomiin (Kuva 1). Taulukossa 1 on esitetty eräiden glukosinolaattien triviaalinitmet sekä sivuketjut (R).

Glukosinolaattien sokeriosana on lähes

Taulukko 1. Glukosinolaattien triviaalinitmiä, sivuketju (R-ryhmä).

Triviaalinitmi	Sivuketju
glukoalyyssiini	5-metyylisulfinyyli-pentyyli
glukoberteriini	4-pentyyli
glukobrassikanapiini	5-metyylitiopentyyli
glukoerusiini *	4-metyylitiobutyli
glukoerysoliini	4-metyylisulfonylibutyli
glukoiberiini	3-metyylisulfinyyli-propyyli
glukoiberveriini *	3-metyylitiopropyyli
glukokappariini	metyyli
glukokeirolini	3-metyylisulfonyli-propyyli
glukokokleariini	2-metyylibutyli
glukojiabutiini	
glukolepidiini	etyyli
glukonapiini *	3-butenyyli
glukonapoleiferiini	2-hydroksi-4-pentyyli
glukonapoliferiini	2-hydroksi-4-pentyyli
glukoputranjiviini	<i>iso</i> propyyli
glukorafaniini *	4-metyylisulfinyyli-butyli
progoitriini **	(<i>R</i>)-2-hydroksi-3-butenyyli
epiprogoitriini	
sinigriini *	2-propenyyliallyyli
glukonasturttiini *	2-fenyylitetyli
glukotropaeoliini	bentsyyli
sinalbiini	<i>p</i> -hydroksibentsyyli
4-hydroksiglukobrassikiini *	4-hydroksi-3-indolyylimetyyli
4-metoksiglukobrassikiini *	4-metoksi-3-indolyylimetyyli
glukobrassikiini *	1-metoksi-3-indolyylimetyyli
goitriini	5-vinylioksazolidiinitioni
neoglukobrassikiini *	<i>N</i> -metoksi-3-indolyylimetyyli
	1-metoksi-3-indolyylimetyyli

* = esiintyvät yleisesti kaalikasveissa (Brassica)

** = isomeerejä

Tiedot koostettu seuraavista lähteistä: VanEtten et al. 1976, Fenwick et al. 1983, Sones et al. 1984 ja Shahidi et al. 1997.

poikkeuksetta glukoosi, mutta se voi olla myös jokin muu sokeri. Sivuketjunsä perusteella glukosinolaatit voidaan jakaa alifaattisiin, aromaattisiin ja heterosyklisiin eli indolyyliglukosinolaatteihin. Kasviperäisten

raaka-aineiden ja tuotteiden glukosinolaattien analyysimenetelmistä kerrotaan luvussa 5.

Kirjallisuus

- Cole, R.A.** 1997. The relative importance of glucosinolates and amino acids to the development of two aphid pests *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on wild and cultivated brassica species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85: 121–133.
- Doughty, K.J., Blight, M.M., Bock, C.H., Fieldsend, J.K. & Pickett, J.A.** 1996. Release of isothiocyanates and other volatiles from *Brassica rapa* during infection by *Alternaria brassicae*. *Phytochemistry* 43: 371–374.
- Fenwick, G.R., Heaney, R.H. & Mullin, W.J.** 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 18 (2): 123–201.
- Haughn, G.W., Davin, L., Giblin, M. & Underhill, E.W.** 1991. Biochemical genetics of plant secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 97: 217–226.
- Kushad, M.M., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Juvik, J.A., Klein, B.A., Wallig, M.A. & Jeffery, E.H.** 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1541–1548.
- McCregor, D., Mullin, W. & Fenwick, G.** 1983. Analytical methodology for determining glucosinolate composition and content. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 66: 825–849.
- Rodman, J.E.** 1991. A taxonomic analysis of glucosinolate-producing plants, part 1: phenetics. *Systematic Botany* 16: 598–618.
- Schreiner, M., von, Schonhof, I. & Krumbein, A.** 1998. Neue Dimension der Produktqualität-Bioaktive Substanzen im Gemüse. *Gemüse* 34: 80–84.
- Shahidi, F.** 1997. Beneficial health effects and drawbacks of antinutrients and phytochemicals in foods. In: Shahidi, F. (ed.). *Antinutrients and phytochemicals in food*. Washington: American Chemical Society. p. 1–9. ISBN 0-8412-3498-1.
- Sones, K., Heaney, R.K. & Fenwick, G.R.** 1984. An estimate of the mean daily intake of glucosinolates from cruciferous vegetables in the UK. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 35: 712–720.
- VanEtten, C.H., Daxenbichler, M.E., Williams, P.H. & Kwolek, W.F.** 1976. Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables. Analysis of the edible part from twenty-two varieties of cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 452–455.
- Verhoeven, D.T.H., Verhagen, H., Goldbohm, R.A., van den Brant, P.A. & Poppel, G.** 1997. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions* 103: 79–129.

2 Glukosinolaattien biokemia ja esiintymiseen vaikuttavat kasvutekijät

Marjo Keskitalo

*Maatalouden tutkimuskeskus, Kasvintuotannon tutkimus, Peltokasvit ja maaperä,
31600 Jokioinen, marjo.keskitalo@mtt.fi*

Glukosinolaatit, joita tunnetaan tällä hetkellä yli 100, ovat rikki- ja typpi-pitoisia kasvin sekundäärisiä yhdisteitä, jotka muodostuvat aminohaposta ja sokerista.

Erityisesti ristikukkaisissa kasveissa esiintyviä glukosinolaattien oletettiin aikaisemmin olevan pelkästään ylijäämätuotteita, joilla ei olisi merkitystä kasvin kehityksessä.

Vieläkään glukosinolaattien merkitystä ei täysin tunneta, mutta niiden on havaittu osallistuvan moniin kasville tärkeisiin tapahtumiin. Näitä ovat mm rikkitasapainon säätely, itäminen ja kasvien puolustus. Sen lisäksi glukosinolaatit ovat tunnetun kasvihormonin, IAA:n esiasteita.

Aikaisemmasta käsityksestä poiketen eräiden glukosinolaattien on todettu vaikuttavan myös ihmisen terveyteen positiivisesti. Sen lisäksi glukosinolaateilla on kasvinsuojelullista merkitystä.

Glukosinolaattien hyödyllisten tekijöiden takia on tärkeää tietää, miten eri abiottiset ja bioottiset kasvutekijät vaikuttavat niiden muodostumiseen, jotta yhdisteiden pitoisuuteen voitaisiin viljelyteknisesti vaikuttaa. Abioottisista tekijöistä tärkeim-

piä ovat valo, lämpötila, kuivuus, maalaji, ravinteet, ilman dioksidit ja ulkoiset kemikaalikäsittelyt. Bioottisia tekijöitä ovat puolestaan kasvilaji, kasvilajike, kehitysvaihe, kasvinosa ja muiden satokomponenttien vaikutus.

Glukosinolaattien biosynteesi tapahtuu solun mikrosomeissa tai muiden soluorganellien kalvorakenteiden läheisyydessä. Glukosinolaatit esiintyvät soluissa ilmeisesti varastoproteiineihin liittyneinä tai nk. myrosiinisoluisissa, joissa glukosinolaattien lisäksi esiintyy myös niitä hajottavia myrosinaasientsyymejä.

Rypsi ja rapsi ovat esimerkkejä siitä, miten klassisen jalostuksen avulla on voitu vähentää sekundääriaineina esiintyvien glukosinolaattien pitoisuuksia. Glukosinolaattien biosynteesin ja myrosinaasien geneettinen säätely ei ole vielä selvä, vaikka useita säätelyyn osallistuvia geenejä onkin voitu tunnistaa. On kuitenkin todennäköistä, että geeni- ja biotekniset menetelmät mahdollistavat jo lähitulevaisuudessa hyödyllisten glukosinolaattien modifioinnin.

Avainsanat: ristikukkaiset kasvit, kasvinviljely, sekundäärinen aineenvaihdunta, glukosinolaatit, muodostuminen, biosynteesi, myrosinaasit, hajoaminen, hydrolyysi, biokemia, geneettinen säätely, solu, abioottiset ja bioottiset kasvutekijät

2.1 Glukosinolaattien merkitys kasvin kasvussa

Kasvien sekundääristen aineenvaihduntatuotteiden, kuten glukosinolaattien oletettiin aikaisemmin olevan pelkästään ylijäämätuotteita, joilla ei olisi merkitystä kasvin kehityksessä. Vieläkään glukosinolaattien merkitystä ei täysin tunneta, vaikka niiden on havaittu osallistuvan moniin kasville tärkeisiin tapahtumiin.

Eräät glukosinolaatit ja niiden johdannaiset, kuten IAA (indolyli-3-etikkahappo), ovat kasvihormoneja, jotka edistävät auksiinien tapaan mm. Pituuskasvua. Glukosinolaatit toimivat kasvissa ilmeisesti rikkitasapainon ylläpitäjänä tai varastoina. Ne osallistuvat myös kasvin typpiaineenvaihduntaan, ja saattavat siten vaikuttaa kasvin kykyyn selviytyä erilaisista stresseistä. Rikinpuutteessa glukosinolaattien on havaittu hajoavan, jolloin vapautuva rikki käytetään muiden aineenvaihduntatuotteiden, kuten aminohappojen valmistukseen.

Glukosinolaattien sisältämät molekyylit saattavat olla erityisen tärkeitä kasvin selviytymisessä poikkeavissa lämpötiloissa, kuten talvehtimisen tai kuumuusstressin aikana (Ludwig-Müller et al. 2000). Glukosinolaattien, myrosinaasin ja niiden hydrolyysiin vaikuttavan askorbiinihapolla on ilmeisesti tärkeä rooli siemenen itämisessä, jolloin komponenttien pitoisuuksien on havaittu muuttuvan selvästi. Lukuisat glukosinolaatit sekä niitä hajoittavien myrosinaasi-entsyymien eri muodot viittaavat siihen, että glukosinolaatit tai niiden hajoamistuotteet ovat tärkeitä tietyissä kasvin kehitysvaiheissa (Kelly et al. 1998).

Glukosinolaateista, kuten muistakin sekundääristä aineenvaihduntatuotteista, on ollut ihmiselle apua hänen jaotellessaan kasveja taksonomisesti eri ryhmiin (Bennet et al. 1997a).

Kasvin ja sitä ympäröivän ekosysteemin vuorovaikutuksessa glukosinolaateilla sekä niiden hajoamistuotteilla tiedetään olevan tärkeä rooli. Hajoamistuotteista erityisesti isotiosyanaattien on todettu karkottavan hyönteisiä sekä ehkäisevän kasvitauteja.

Niiden avulla kasvi pystyy puolustautumaan vaaratekijöitä vastaan. Toisaalta isotiosyanaatit voivat houkutelaa tai muutoin muuttaa hyönteisten käyttäytymistä kasvin läheisyydessä. Glukosinolaattien kitkerä maku karkottaa kasvissyöjiä, millä on saatantanut olla evoluutioissa merkittävä rooli kasvin säilymisen ja leviämisen kannalta.

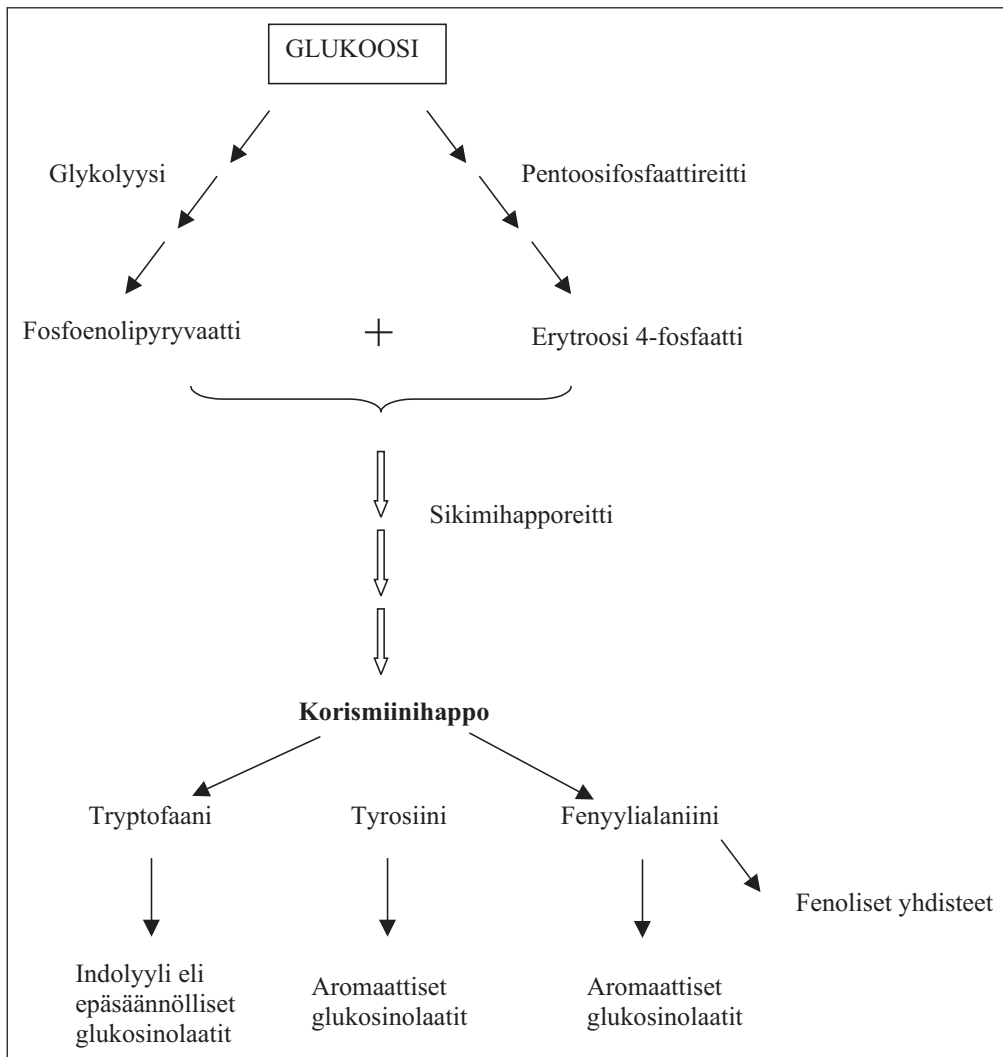
2.2 Glukosinolaattien muodostuminen

2.2.1 Biosynteesi

Glukosinolaatit ovat rikki- ja typpipitoisia yhdisteitä, jotka koostuvat sokeriesasta (glykonista) sekä sivuketjusta (aglykoni). Sivuketjun muodostamat aminohapot ovat pääasiassa samoja, joita käytetään valkuaisaineiden synteesiin (α -aminohapot), mutta myös muita aminohappoja tavataan glukosinolaattien sivuketjuissa. Aromaattisten aminohappojen muodostumista ja siirtymistä glukosinolaattien sekä fenolisten yhdisteiden synteesiin on havainnollistettu kuvassa 2.

Glukosinolaatit jaetaan sivuketjussa olevan aminohapon mukaan kolmeen ryhmään: L-metioniinistä muodostuneet alifaattiset- eli alkenyyli-glukosinolaatit, L-fenylalaniinista, L-tyrosiinistä (ja mahdollisesti L-fenylylietyylistä) muodostuneet aromaattiset glukosinolaatit, sekä L-tryptofaanista muodostuneet indolyli-glukosinolaatit (Sørensen 1990). Alifaattiset glukosinolaatit voidaan edelleen jakaa propyyli-, butyyli- ja pentyyli-glukosinolaateiksi (Magrath et al. 1993). L-metioniinistä johdetut alifaattiset glukosinolaatit ovat yleisimpiä juuri ristikkukaisissa (Giamoustaris & Mithen 1996).

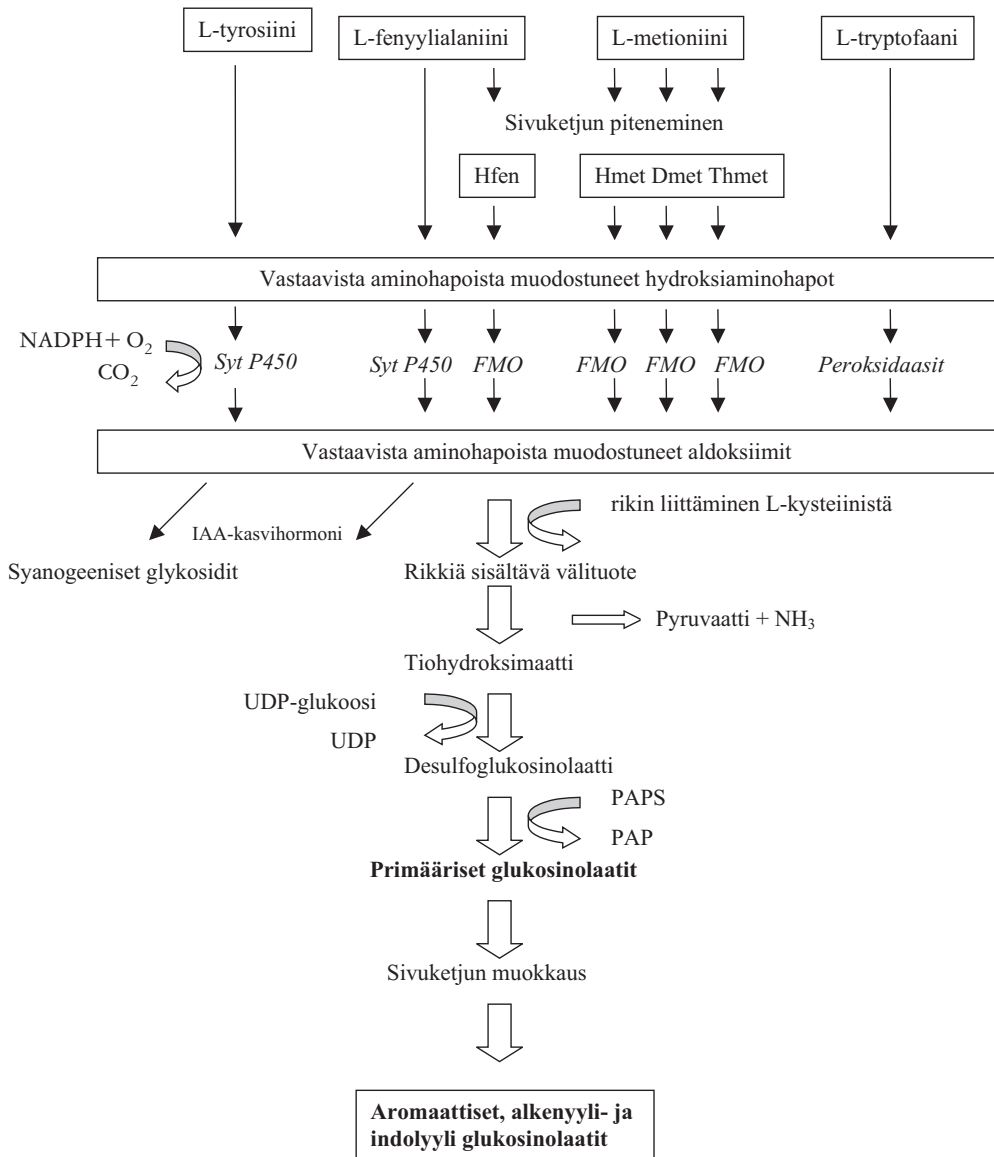
Glukosinolaattien biosynteesin tärkeimmät vaiheet ovat sivuketjun hiilirungon pidentyminen, N-hydroksiaminohappojen muodostuminen, aldoksiimien muodostuminen vastaavista aminohaposta, glukosin ja rikin liittyminen sekä sivuketjun muotoutuminen (Bennett et al. 1995, Bennett et al. 1996, Halkier & Du 1997). Näi-



Kuva 2. Yksinkertaistettu kaavio aromaattisten aminohappojen siirtymisestä glukosinolaattien ja fenolisten yhdisteiden biosynteesiin.

den päätapahtumien aikana glukosinolaattiin päättyvä aminohappo käy läpi eri vaiheita, joista tunnetaan ainakin seuraavat välituotteet: N-hydroksiaminohapot, aldoksiimit, tiohydroksimaatit sekä desulfoglukosinolaatit (Kuva 3) (Haughn et al. 1991, Magrath et al. 1993). Vielä biosynteesin lopussa muotoutuvat ainakin osa metioniini-, tryptofaani- ja tyrosiinilähtöisten glukosinolaattien sivuketjuista (Halkier & Du 1997).

Glukosinolaattien biosynteesin ensimmäiseen vaiheeseen, aldoksiimien muodostumiseen aminohapoista, osallistuu kolmenlaisia entsyymejä. Hapettaa vaativista mono-oksigenaasityyppisistä entsyymeistä toinen, sytokromi P450, toimii tyrosiini- ja fenyylialaniinilähtöisten aromaattisten glukosinolaattien tuotannossa. Toinen entsyymi, flaviiniin sitoutunut mono-oksigenaasi (FMO), sitoo fenyylialaniinista ja metioniinista muodostuneita aminohappoja aromaattisiksi ja alifaattisiksi glukosinolaateiksi (Halkier & Du 1997). Kolmas entsyymi



Kuva 3. Yksinkertaistettu malli aromaattisten, alifaattisten/alkenyyl- ja indolyyliglukosinolaattien biosynteesistä. Osa lähtöaineina toimivien aminohappojen sivuketjuista pitenee ennen varsinaisen glukosinolaatti-synteesin alkamista, jonka seurauksena muodostuvat homologiset aminohapot (Hfen = homofenyylialaniini, Hmet = homometioniini, Dhmet = dihomometioniini, Thmet = trihomometioniini). Aldoksiimeja tuottavat lähtöainespesifiset entsyymit: Syt P450 = sytokromi-P450-mono-oksygenaasi, FMO = flaviiniin liittynyt mono-oksygenaasi sekä peroksidiaasit Hydroksiaminohapot, aldoksiimit, tiohydroksimaatit ja desulfoglukosinolaatit ovat glukosinolaatti-synteesin välituotteita. Glukoosin liittäminen desulfoglukosinolaattiin tapahtuu UDPG-tiohydroksimaatti-glukosyyli transferaasin avulla. Sen jälkeen tapahtuu sulfaatin liittäminen PAPS:desulfoglukosinolaatti-sulfotransferaasin avulla. Osa primääristen glukosinolaattien sivuketjuista muokataan ennen lopullisten glukosinolaattien muodostumista. IAA = indolyli-3-etikkahappo, UDPG = uridiinidifosfaatti-glukoosi, PAPS = 3'-fosfoadenosiini-5'-fosfosulfaatti. (Du et al. 1995, Halkier & Du 1996, Bennet et al. 1997a, Bennet et al. 1997b).

mityyppi on peroksidaasi, jolla tuotetaan tryptofaanista indolyyliglukosino- laatteja (Wallsgrave et al. 1995, Bennett et al. 1997a, Halkier & Du 1997). FMO:n on todettu toimivan kaaleissa, isovesikrassissa ja retiisissä. Sytokromi P450-tyyppinen mono-oksygenaasi-entsyymi on yleinen keltasinapissa ja köynnöskrassissa (Du et al. 1995, Bennett et al. 1996, Du & Halkier 1996), eikä entsyymiä ole tavattu muissa kasveissa (Bennet et al. 1997b). Keltasinapissa toimii P450:n lisäksi myös FMO ja peroksidaasi (Bennett et al. 1997b).

Biosynteesiä säädellään ilmeisesti alkuvaiheessa, ja säätelystä vastaavien entsyymien aktivoitumisen onkin havaittu vaikuttavan lopputuotteiden muodostumiseen (Halkier & Du 1997). Synteesin alkuvaiheessa toimivat sytokromi P450, FMO ja peroksidaasit ovat erittäin lähtöainespesifisiä (Bennett et al. 1995, Bennett et al. 1996, Bennet et al. 1997b). Sen sijaan synteesin loppuvaiheen entsyymeillä on havaittu olevan vain vähän lähtöainespesifisyyttä (Halkier & Du 1997). Glukosinolaattien muodostuminen riippuu lähtöaineesta, pH:sta, rauta-ioneista, epitospesifisen proteiinin mukanaolosta sekä muista vielä huonosti tunnetuista tekijöistä (Taipalesuu et al. 1997).

Aminohappojen dekarboksylaasi-aktiivisuutta on havaittu tietyissä soluorganismeissa, kuten mikrosomeissa, joiden arvelaan olevan glukosinolaatti-synteesin välituotteita (aldoksiimeja) muodostavien FMO-entsyymien sijaintipaikkoja (Bennett et al. 1996). Peroksidaasien on sen sijaan todettu toimivan solukalvoihin sitoutuneena ja riippuvan kasvin kehitystasesta (Bennett et al. 1997a).

Glukosinolaattien lisäksi saman biosynteesin tiedetään tuottavan mm syanogeenisiä glykosidejä sekä kasvihormoneja. Aromattisten glukosinolaattien (tyrosiini- ja fenyylialaniinilähtöiset) ja syanogeenisten glukosidien biosynteesit erkanevat juuri aldoksiimien muodostumisen jälkeen, minkä takia aldoksiimit ovat tärkeitä välituotteita myös syanogeenisten glukosinolaattien synteesissä (Du et al. 1995). Glukosinolaat-

tien synteesistä poiketen syanogeeniset glukosinolaatit ovat ilmeisesti riippuvaisia pelkästään sytokromi P450:n toiminnasta (Bennett et al. 1996). Tryptofaani toimii puolestaan indolyyliglukosinolaattien lisäksi tunnetun kasvihormonin, indolyylitietikkahapon (IAA), lähtöaineena (Halkier & Du 1997).

2.2.2 Sijainti kasvissa

Glukosinolaattien ja myrosinaasien sijainti kasvisolukossa sekä solun sisällä ei ole selvä. Glukosinolaatit sijaitsevat eräiden tutkimusten mukaan samassa solussa niitä hydrolysoivien myrosinaasi-entsyymien kanssa (Bones & Rossiter 1996). Tällöin tarkoitetaan myrosinaasi-glukosinolaatti-systeemiä, josta kerrotaan glukosinolaattien hydrolyysin yhteydessä luvussa 2.3.

Eräiden tutkimusten mukaan itävässä sareptansinapin siemenessä glukosinolaatit (sinigriini) ja myrosinaasit sijaitsevat pääosin täysin eri soluissa. Glukosinolaatit esiintyvät mahdollisesti solujen vakuoleissa (solunesterakkuloissa) tai proteiineihin (*protein body*) liittyneinä tai niiden yhteydessä. Nämä proteiinia sisältävät solut muistuttavat heinäkasvien varastoproteiinia sisältäviä aleuronisoluja, joissa ei kuitenkaan esiinny glukosinolaatteja. Myrosinaasit sijaitsevat nk. myrosiinisolujen myrosiinijyväsissä, niiden ulkokalvoilla tai muiden soluorganellien ulkokalvoihin kiinnittyneinä (Kuva 4). On mahdollista, että glukosinolaattien sijainti ja pitoisuus muuttuu selvästi itämisen alkuvaiheessa, sillä noin neljän vuorokauden vanhassa taimessa proteiiniavarasto oli hajonnut ja sinigriiniä oli vakuolissa jäljellä enää vähän (Kelly et al. 1998). Glukosinolaatin lisäksi vakuolit ilmeisesti sisältävät melko suuria pitoisuuksia askorbiinihappoa (Bones & Rossiter 1996).

Glukosinolaattien on havaittu kerääntyvän erityisesti juuriin ja lehtiin. Eräillä kasveilla, kuten papajalla, mono-oksygenaasi-entsyymiaktiivisuus rajoittuu vain lehtiin (Bennett et al. 1997a). Näiden lisäksi glukosinolaatteja esiintyy runsaasti risti-

kukkaisten siemenissä ja kehittyvissä alkioissa, vaikka ne eivät tutkimuksen mukaan pysty syntetisoimaan näitä yhdisteitä, vaan ainoastaan muodostamaan rikkihaitoisia aminohappoja (Toroser et al. 1995).

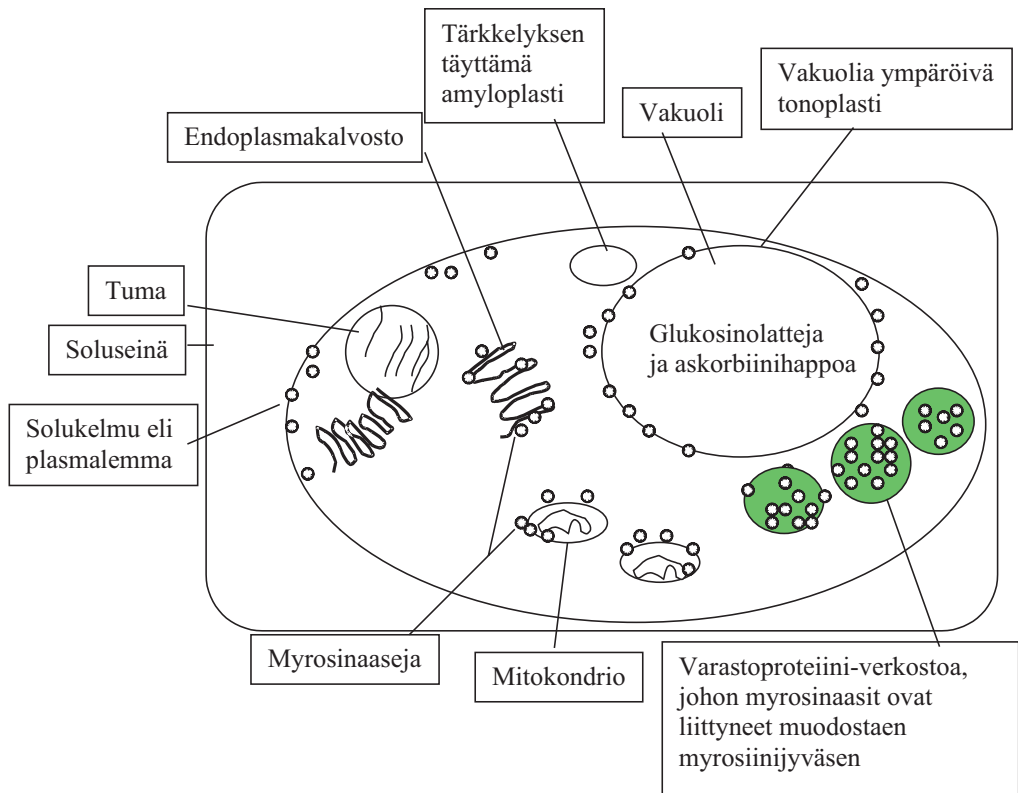
Glukosinolaattien kulkeutumisesta tuotantokohdasta muualle solukkaan ei ole tarkkaa tietoa. Glukosinolaattien fysiokemiallisten ominaisuuksien todettiin kuitenkin olevan sellaisia, että niiden kuljetus kasvin varren johtosolukon nilaosassa on mahdollista (Brudenell et al. 1999). Glukosinolaattien todettiin kulkeutuvan kehittyvien rapsinsiementen alkioista kasvatustalustaan, mikä osoitti jonkinlaisen kuljetusmekanismin toimivuutta (Gijzen et al. 1989).

Kun siemenissä esiintyville glukosino-

laateille etsittiin mahdollista synteesipaikkaa, havaittiin että litujen glukosinolaattipitoisuus vähenee samanaikaisesti, kun siementen glukosinolaattipitoisuus kasvaa. On ilmeistä, että litu toimii varsinaisena synteesisolukona siemeniin kuljetettaville glukosinolaateille (Bilsborrow et al. 1993a, Toroser et al. 1995).

2.2.3 Biosynteesin geneettinen säätely

Glukosinolaattien biosynteesin säätelyä on ymmärrettävä, kun tavoitteena on niiden hallittu ja optimoitu tuotanto sekä mahdollisesti aineenvaihduntatuotteiden muokaus. Usein tutkimuksissa hyödynnetään mutantteja kasveja, joilta tutkittava aineen-



Kuva 4. Myrosinaasi-entsyymien ja glukosinolaattien oletettu sijainti soluissa. Myrosinaasi-entsyymit sijaitsevat myrosiinijyväsissä, niiden ulkokalvoilla tai muiden soluorganellien ulkokalvoilla. Glukosinolaatit esiintyvät mahdollisesti vakuoleissa tai kiinnittyneinä varastoproteiineihin. Myrosinaasien sijaintisolua kutsutaan myrosiinisoluksi (Bones & Rossiter 1996, Kelly et al. 1998).

vaihduntatuote puuttuu tai sen muodostuminen on vähäistä. Näin aineenvaihdunnan merkitystä kasvin kehityksessä voidaan tutkia. Alifaattisten glukosinolaattien vähyys tai puuttuminen mutantista lituruohosta ei muuttanut kasvin rakennetta tai kasvua, vaikka usein aineenvaihduntatuotteiden tasapainon muuttuminen on kasvin kehityksen kannalta tuhoisaa. Glukosinolaattien vähyys johtui mutantista geenistä (*gsm1*). Tällöin yhdisteen oleelliset lähtöaineet puuttuivat, eikä metioniinia muodostunut alifaattisia glukosinolaatteja varten (Haughn et al. 1991).

Erityisesti on tutkittu niiden geenien toimintaa, jotka vaikuttavat metioniinilähtöisten glukosinolaattien sivuketjun muodostumiseen. Vähintään kahteen, mutta mahdollisesti useampaankin eri lokukseen (geeni) (*Gsl-alk*, *Gsl-elong*, *Gsl-obp*, *Gsl-oxid*), kuuluvien muotojen (alleeli) arvellaan säätelevän alifaattisten eli metioniinilähtöisten glukosinolaattien muodostumista (Magrath et al. 1994, Giamoustaris & Mithen 1996, Halkier & Du 1997). Ristikukkaisilla *Gsl-elong* määrää sen, muodostuuko vain propyylijohdannaisia vai niiden lisäksi myös butyylijohdannaisia (Magrath et al. 1994, Mithen & Campos 1996). *Gsl-elong* määrää mahdollisesti myös alifaattisten glukosinolaattien kokonaispitoisuuden (Halkier & Du 1997). *Gsl-elongin* lisäksi *Gsl-pron* on havaittu säätelevän propyyli-glukosinolaattien muodostumista (Magrath et al. 1994).

Lituruoholla *Gsl-alk* säätelee butyyli- ja pentyyliglukosinolaateiksi päätyviä sivuketjuja. *Gsl-obp* ja *Gsl-ob* säätelevät hydroksiryhmien liittymistä mm. metyyli-sulfinylibutyli ja butyyli-glukosinolaatteihin (Mithen & Campos 1996).

Maantieteellisesti tarkasteltuna länsieurooppalaiset lituruohot sisälsivät *Gsl-obp*-alleeleja ja tuottivat propyyli- ja butyyli-glukosinolaatteja. Keski- ja itäeurooppalaiset kasvit puolestaan sisälsivät *Gsl-elong*-alleeleja ja tuottivat pelkästään propyyli-glukosinolaatteja (Mithen & Campos 1996). On ilmeistä, että eri kasveilla esiintyy erilaisia *Gsl-elong* -lokuksen (geeni)

muotoja (alleeleja), mikä aiheuttaa vaihtelua glukosinolaattien sivuketjun pituuteen sekä siihen liittyvien toiminnallisten ryhmien kiinnittymiseen (Magrath et al. 1994, Mithen & Campos 1996).

2.3 Glukosinolaattien hajoaminen

2.3.1 Hydrolyysi

Myrosinaasi-entsyymit hajottavat glukosinolaatteja D-glukoosiksi ja thiohydroksimaatti-O-sulfonaatiksi (aglukoni). Pysymätön aglukoni hajoaa muun muassa sulfaattiksi, isotiosyanaatiksi, tiosyanaatiksi, epitionitriiliksi ja nitriliksi, joista osa on myrkyllisiä. Myrosinaaseja on tavattu *Brassicaceae*-heimoon kuuluvien kasvien lisäksi ainakin 14 muusta heimosta (Rodman 1991). Myrosinaasi-aktiivisuutta on löydetty myös sienistä, bakteereista, kirvoista ja nisäkkäiden soluista (Bones & Rossiter 1996).

Glukosinolaattien hajoamisnopeus ja hajoamistuotteen luonne riippuu glukosinolaatin sivuketjun sisältämistä ryhmistä, pH:sta sekä myrosinaasiin liittyneistä proteiineista (Bones & Rossiter 1996, Sharma & Garg 1996, Taipalensuu et al. 1996, Halkier & Du 1997, Eriksson 2000). Suurin myrosinaasi-aktiivisuus havaittiin pH 7:ssä (+37 °C lämpötilassa) (Sharma & Garg 1996), ja poikkeama tästä arvosta laskee aktiivisuutta. Neutraaleissa (pH 5) oloissa hajoamistuotteina olivat isotiosyanaatit ja happamissa (pH 2) nitrilit, joiden muodostumiseen vaikuttavat rautaionit ja muut kationit (Bones & Rossiter 1996).

Hydrolyysin sijaintipaikkaa tutkittaessa on ensin selvitettävä glukosinolaatteja sekä niitä hydrolysoivien myrosinaasi-entsyymien keskinäinen sijainti kasvisolukossa. Asiaa vaikeuttaa se, että hydrolyysi käynnistyy vasta solukon vioittuessa, minkä takia komponenttien keskinäinen sijainti on edelleen epäselvä (Bones & Rossiter 1996). Eräs oletus on, että hajottajaentsyymit ja glukosinolaatit sijaitsevat eri soluissa, josta kerrottiin kappaleessa 2.2. Toinen oletus on,

että hajottavat entsyymit sijaitsevat glukosinolaattien kanssa samassa solussa. Niitä kutsutaan myrosinaasi-glukosinolaatti-soluiksi tai myrosiinisoluiksi, joiden hajottua glukosinolaattien hydrolyysi alkaa. Solussa glukosinolaatit ja myrosinaasi-entsyymit voivat sijaita joko eri tai samassa osassa, jolloin ne ovat inaktiivisia. Myrosinaasin ja glukosinolaattien lisäksi samassa solussa esiintyy askorbiinihappoa, jonka on havaittu lisäävän myrosinaasiaktiivisuutta ja siten nopeuttavan glukosinolaattien hajoamista (Bones & Rossiter 1996).

Myrosiinisolut ovat kasvien eritesoluja. Niiden koko ja rakenne muuttuvat kasvisolukon erilaistuesssa. Erityisesti laaja eritekanavaverkosto sekä runsas myrosiinijyväsien määrä erottavat myrosiinisolut ympäröivästä soluista. Myrosiinijyväsien sisältävät homogeenista varastoproteiinia (Bones & Iversen 1985) (Kuva 4). Solun vanhetessa myrosiinijyväsien ympärille kehittyy vakuoleja, jotka voivat myöhemmin yhdistyä. Myrosiinisolujen määrän on havaittu pienenevän kasvisolukon kehittyessä. Tämä johtuu ilmeisesti siitä, ettei uusia soluja muodostu, eivätkä ne jakaudu kasvun aikana. Sinapilla havaittiin olevan enemmän myrosiinisoluja kuin samassa kehitysvaiheessa olevalla retiisillä. Myös valossa kasvaneissa kasveissa niitä oli enemmän kuin pimeässä kasvaneissa (Bones & Iversen 1985).

2.3.2 Hajottajaentsyymit

Myrosinaasi-entsyymi on glykoproteiini, jonka hiilihydraattipitoisuus on 9–23 % molekyylin kokonaispainosta (Bones & Rossiter 1996) ja molekyyli massa 61–70 kDa (Falk et al. 1992). Rypsin myrosinaasista on tunnistettu kolme isoentsyymistä muotoa, MA, MB ja MC, joista MA esiintyy pääasiassa siemenissä ja MB siemenissä, sirkkavarressa ja lehdissä (Eriksson 2000).

Myrosinaasia on paikallistettu myrosiinisolujen myrosiinijyväsistä, joissa on myös proteiinia. Myrosinaasi-aktiivisuuden ei kuitenkaan ole havaittu edellyttävän jy-

väsen olemassaoloa (Bones & Iversen 1985). Myrosinaasia on löydetty myös esimerkiksi rapsin kehittyvässä siemenessä myrosiinijyväsien ulkopuolelta (Höglund et al. 1991). Vakuolin ulkopuolella sitä on erityisesti solukalvoissa, kuten endoplasmakalvostossa (ER), solukelmussa sekä mitokondrion kalvorakenteissa (Bones & Iversen 1985). Myrosinaasin sijainti solussa ja sen pitoisuus muuttuvat ilmeisesti hyvin paljon siemenen kehittyessä sekä taimen alkukehityksen aikana. On mahdollista, että entsyymi kuljetetaan synteesipaikaltaan (ribosomeihin liittyneestä ER:stä) muualle soluun (Lenman et al. 1993).

Myrosinaasi-entsyymien aktiivisuutta on löydetty kaikista kasvinosista (Bones & Rossiter 1996), mutta aktiivisuuksissa on havaittu selviä eroja kasvinosien välillä (Höglund et al. 1991). Myrosinaasi-aktiivisuutta on erityisesti voittuneissa tai kuolleissa kasvisolukoissa (Schnug 1989), mutta myös elävien lehtien vihreässä perussolukossa, juuren kärkisolukossa sekä siemenissä (Iversen 1970, Bones & Iversen 1985). Rapsin sirkkavarren myrosinaasi-aktiivisuus oli selvästi suurempi kuin sirkkalehtien (Bones 1990, Falk et al. 1992), joka puolestaan oli moninkertainen juureen verrattuna (Bones 1990). Myrosinaasi-aktiivisuus oli ruusukaalin ulkolehdessä neljästä viiteen kertaa suurempi kuin muissa osissa (varsi, sisälehdet, keskusta) (Springett & Adams 1989, Bones & Rossiter 1996). Myrosinaasiin liittyneen proteiinin aktiivisuutta todettiin pelkästään siemenissä (Taipalensuu et al. 1996).

Myrosinaasi-aktiivisuus riippuu kasvinosan lisäksi kasvin kehitysvaiheesta (Höglund et al. 1991, Falk et al. 1992, Bones & Rossiter 1996). Jopa erilaistumattomassa solukossa eli kalluksessa esiintyi selvää myrosinaasi-aktiivisuutta, mikä pysyi tasaisena jopa kahden vuoden ajan. Kalluksesta kasvaneiden versojen myrosinaasi-aktiivisuus oli sen sijaan erilaistumatonta solukkoa korkeampi (Bones 1990). Eristettyjen ja erilaistuneiden solujen myrosinaasi-aktiivisuuden on havaittu laskevan kehitysvaiheen mukana (Bones & Rossiter

1996). Vanhoissa kasveissa myrosinaasi-aktiivisuus on yleensä nuoria pienempi. Poikkeuksena ovat kehittyvät siemenet, joissa entsyymiaktiivisuus oli korkein noin kuu-kauden kuluttua pölytyksestä. Muissa kasvinosissa aktiivisuus oli pieni, eikä sitä havaittu lainkaan varsissa ja juurissa (Falk et al. 1992).

Myrosinaasi-entsyymit voivat aktivoitua sekä ulkoisten että sisäisten säätelytekijöiden takia. Ulkoisia tekijöitä ovat mm. kasvisolukon vahingoittuminen (Koritsas et al. 1991). Sisäisiä säätelytekijöitä ovat puolestaan tietyt kasvin viestijärjestelmään liittyvät kemikaalit, jotka säätelevät kasvifysiologisia toimintoja. Viestikemikaaleja vapautuu kasvin kärsiessä stressistä, jota voivat aiheuttaa sekä abioottiset että bioottiset kasvutekijät. Eniten on tutkittu kasvisolukon voittumisen ja taudinaiheuttajien vaikutusta kasvin sisäiseen viestintään (Doughty et al. 1996, Taipalensuu et al. 1997). Sisäistä säätelyä saattaa tapahtua myös silloin, kun kasvi kärsii rikin puutteesta ja glukosinolaatteja hajotetaan primäärimetabolian tarpeita varten (Schnug 1989). Rikin puutteesta johtuvassa stressitilassa toimii askorbiinihappoa tuottava askorbaatti/glutathioni -sykli (Schung et al. 1995). Pieninä pitoisuuksina askorbiinihappo kiihdyttää ja suurina pitoisuuksina estää myrosinaasia (Bones & Rossiter 1996). Tämän mahdollistaa se, että myrosinaasista esiintyy useita isoentsyymisiä muotoja, joista ainakin yksi aktivoituu askorbiinihapon vaikutuksesta (Springett & Adams 1989, Xue et al. 1995, Bones & Rossiter 1996, Taipalensuu et al. 1996). Askorbiinihappo-pitoisuuden lisäksi myrosinaasin aktiivisuuteen vaikuttavat lämpötila (Springett & Adams 1989, Sharma & Garg 1996) ja myrosinaasi- sekä lähtöainepitoisuus (Sharma & Garg 1996).

Myrosinaasien toiminnan lisäksi glukosinolaattien hajoamisprosessiin vaikuttavat nk. myrosinaaseihin liittyvät proteiinit (MyAP, *myrosinase associated proteins* ja MBP, *myrosinase binding proteins*), joiden toimintaa on käsitelty laajasti viimeaikoina Andreassonin (2000) ja Erikssonin (2000) teoksissa.

Proteiinit vaikuttavat myrosinaasi-entsyymien toimintaan ja eräät jopa aktivoituvat myrosinaasin tavoin eri ärsykeille (Falk et al. 1992, Taipalensuu et al. 1996, Taipalensuu et al. 1997, Andreasson 2000, Eriksson 2000). Proteiineilla ei välttämättä ole myrosinaasi-aktiivisuutta, mutta ne edesauttavat myrosinaasi-entsyymien toimintaa ja vaikuttavat hajoamistuotteiden muodostumiseen tuottaen rauta-ionien kanssa epitionitriilejä (Bones & Rossiter 1996). Eräiden myrosiiniin liittyvien proteiinien on todettu aktivoituvan myrosiinien tavoin solukon voittuessa tai kemikaalikäsitteilyiden seurauksena (Taipalensuu et al. 1997).

2.3.3 Hajotuksen geneettinen säätely

Myrosinaasi-entsyymien aktiivisuutta säätelee geeniperhe, josta rapsilla on tunnistettu ainakin *MA*- (= *Myr1*) ja *MB*- (= *Myr2*) geenit (Xue et al. 1992, Thangstad et al. 1993, Bones & Rossiter 1996). Litoruoholla esiintyy kolme myrosinaasi-geeniä, joista kahden (*TGG1* ja *TGG2*) rakenne on selvitetty. Näiden rakenne kuitenkin erosi rapsin myrosinaasi-geeneistä, mikä havainnollisti rapsin ja litoruohon evoluutionaalista eroa (Xue et al. 1995). Rapsin myrosinaasi-geeniperhe puolestaan sisältää neljästä lähes kahteenkymmeneen jäsentä, sillä *MA*-tyyppisiä geenejä todettiin vähintään neljä ja *MB*-tyyppisiä yli kymmenen (Lenman et al. 1993, Thangstad et al. 1993; Xue et al. 1995). Sinapista on tunnistettu *MA1-MB1*-, *MB2*- ja *MB3*-geenit (Xue et al. 1992). Rapsissa myrosinaasi-geeniaktiivisuutta esiintyi erityisesti sirkkalehdissä, ensimmäisissä kasvulehdissä sekä kehittyvissä siemenissä, ja jonkin verran liduissa, terälehdissä ja lehtiruodissa. Varressa, vanhoissa lehdissä ja juurissa aktiivisuutta ei havaittu tai se oli erittäin matala (Falk et al. 1992).

Molempien myrosinaasi-geenityyppien (*MA*, *MB*) havaittiin toimivan kehittyvässä sinapin siemenen alkiossa, mutta vain *MB* oli aktiivinen itävän taimen sirkkalehdissä ja sirkkavarressa (Xue et al. 1993, Bones &

Rositer 1996). On ilmeistä, että myrosinaasi-geenit ilmenevät ajallisesti ja paikallisesti eri tavalla: *MA* on aktiivisin siemenen alkiossa ja *MB* puolestaan nopeasti jakaantuissa solukoissa, kuten sirkkataimen maanpäällisissä osissa sekä mahdollisesti siemenissä (Falk et al. 1992, Lenman et al. 1993, Xue et al. 1993).

2.4 Glukosinolaattien esiintymiseen vaikuttavat tekijät

Glukosinolaattien kuten muidenkin sekundaaristen aineenvaihduntatuotteiden muodostumiseen ja niiden vaihteluun vaikuttaa niin perimä kuin ympäristötekijätkin. Niiden esiintyminen kasvissa tai solukossa riippuu yhteyttämistuotteiden saatavuudesta (lähtöaineista), glukosinolaattien biosynteesistä sekä niitä hajottavien entsyymien aktiivisuudesta.

Glukosinolaattien tiedetään muodostuvan kahdella tavalla. Eräitä glukosinolaatteja kasvi tuottaa jatkuvasti (riippuen kehitysvaiheesta ja kasvinosasta), mutta tietyt glukosinolaatit muodostuvat vasta kasvin reagoidessa ärsykkeisiin. Ärsykkeet voivat myös kiihdyttää biosynteesiä. Siemens ja Mitchell-Olds (1998) testasivat kahta yleisesti esiintyvää väittämää glukosinolaattien esiintymisestä. Ensimmäisen hypoteesin mukaan ärsykkeeseen reagoivan kasvin aineenvaihdunnan ja perustasoisen metabolian välillä on negatiivinen korrelaatio eli mitä enemmän glukosinolaatteja muodostuu aineenvaihdunnan perustasolla, sitä vähemmän glukosinolaattien muodostuminen lisääntyy ärsykkeen jälkeen. Toisen hypoteesin mukaan korkea perusmetabolian vaatia kasvilta runsaasti energiaa, mikä aiheuttaa siemensadon alenemista. Tutkimukseen käytettiin rypsiä, jonka tiedettiin tuottavan glukosinolaatteja vaihtelevia määriä riippuen kasvuoloista. Tulokset eivät tukeneet ensimmäistä hypoteesia, sillä aineenvaihduntatuotteiden muodostuminen ärsytyksen (patogeenit ja hyönteiset) seurauksena oli joko riippumaton perustasoisesta glukosinolaatti- ja myrosinaa-

si-pitoisuudesta tai aineenvaihduntatuotteita syntyi enemmän, kun perustasoinen tuotto oli korkeampi. Sen sijaan tulokset vahvistivat toista väittämää, sillä runsaasti myrosinaasia tuottavilla kasveilla oli noin 16 % pienempi siemensato kuin vähän tuottavilla kasveilla (Siemens & Mitchell-Olds 1998).

Glukosinolaattien synteesiin ja myrosinaasin aktiivisuuteen vaikuttavat useat eri tekijät. Abioottisia eli elinympäristössä olevia elottomia tekijöitä ovat lämpötila, valo, ilman hiilidioksidipitoisuus, ravinnetila ja kuivuus. Bioottisia eli elollisia tekijöitä ovat kasvilaji, kasvilajike, kehitysvaihe, kasvinosa ja yhteyttämistuotteiden kulkeutuminen muihin satokomponentteihin. Glukosinolaatti-synteesin lisäksi lopulliseen glukosinolaatti-pitoisuuteen vaikuttaa myös myrosinaasin toiminta.

2.4.1 Abioottiset tekijät

2.4.1.1 Valo

Valo on kasvien yhteyttämisen sekä sen kasvuun ja kehitykseen tarvittavien primääristen aineenvaihduntatuotteiden synteesien peruselementti. Valon merkitys sekundääristen aineenvaihduntatuotteiden muodostumisessa ei ole kuitenkaan selvä. Valon vaikutus kasvien kehitykseen riippuu yhteyttämiskelpoisen säteilyn määrästä (photosynthetic active radiation, PAR, muusta säteilystä (nm. UVA ja UVB), säteilyn voimakkuudesta sekä päivänpituudesta.

Valon vaikutus kahdeksan vuorokautta vanhojen retiisintaimien glukosinolaattien muodostukseen riippui kasvinosasta sekä siitä, montako vuorokautta taimia oli kasvatettu yhtäjaksoisesti joko valossa tai pimeässä. Valovuorokausien määrän lisääntyminen lisäsi yleensä myös glukosinolaattien muodostumista sirkkavarressa ja vähensi niiden muodostumista sirkkalehdissä. Kun taimia oli kasvatettu jatkuvassa valossa, oli sirkkavarressa hyvin paljon glukosinolaattia ja sirkkalehdissä puolestaan hyvin vähän. Jatkuvassa pimeässä kasvatettujen

kasvien sirkkavarsissa glukosinolaattia oli sen sijaan hyvin vähän ja sirkkalehdissä hyvin paljon verrattuna muissa olosuhteissa kasvatettuihin kasveihin (Kimura et al. 1995).

Keräkaalintaimia kasvatettiin kasvatuskaapeissa, joiden yö- ja päivälämpötila oli sama. Glukosinolaatti-pitoisuudet vaihtelivat valo- ja pimeäjaksoista riippumattomasti (ultraradiaanisesti), sillä molempien jaksojen aikana havaittiin sekä juurissa että lehdissä korkeita glukosinolaatti-pitoisuuksia (Rosa & Rodrigues 1998). Aikaisemmassa kokeessa samat tutkijat havaitsivat, että valojakson aikana juurten kokonaisglukosinolaatti-pitoisuudet laskivat pimeäjaksoon verrattuna (Rosa 1997). Valojaksoisuudesta aiheutuva rytmitys peittyi sen sijaan korkean kasvatuslämpötilan aiheuttamien stressioireiden alle (Rosa & Rodrigues 1998).

Valo vaikuttaa ilmeisesti myrosinaasin toimintaan, sillä valossa kasvatetun keltasinapin sirkkalehdet sisälsivät vähemmän sinalbiiniä kuin pimeässä kasvatetun. Ilmiön oletettiin johtuvan siitä, että myrosinaasi-aktiivisuus ja siten glukosinolaattien hajoitus on runsaampaa valossa kasvatetuissa lehdissä (Bennett et al. 1997b).

2.4.1.2 Lämpötila

Lämpötila vaikuttaa yhteyttämistehokkuuteen sekä glukoosin muodostumiseen. Primaarisen aineenvaihdunnan tarpeesta riippuen ylijäävästä glukoosista syntetisoidaan sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita. Keräkaalin maanpäällisten osien sekä juurten glukosinolaatti-pitoisuudet kohosivat lämpimissä oloissa (Rosa & Rodrigues 1998). Vaihtelut kokonaisglukosinolaatti-pitoisuudessa ja yksittäisten glukosinolaattien pitoisuuksissa olivat selvästi suurempia lämpimässä kasvatetuissa taimissa.

Tutkimukset osoittavat, että korkeassa lämpötilassa glukosinolaatti-pitoisuudet saattavat olla suurempia, mutta glukosinolaattien vaihtelut vuorokauden aika-

na ovat myös normaalia suuremmat (Rosa & Rodrigues 1998). Portugalilaisessa tutkimuksessa verrattiin kesällä ja talvella kasvatettujen kaalien glukosinolaatti-pitoisuuksia. Kesäkautena kasvatettujen kaalien kokonaisglukosinolaatti- sekä gluukoiberiini-pitoisuudet olivat korkeimmat (Rosa & Heaney 1996, Rosa et al. 1996). Viileissä talvioloissa kasvatetut kaalit sisälsivät sitä vastoin runsaasti typpeä (Rosa & Heaney 1996).

2.4.1.3 Ilman dioksidit

Hiilen ja typen tasapainoteorian mukaan kasvi suuntaa yhteyttämistuotteitaan ensisijassa kasvuun. Energian siirtyminen sekundäärimetaboliitteihin ja kasvin puolustukseen riippuu kokonaisenergiatilanteesta sekä hiilen ja typen tasapainosta kasvissa. Mikäli energiaa on ylimäärin tai ravinteiden saatavuus ei ole tasapainossa, saattaa kasvi lisätä sekundääristen aineenvaihduntatuotteiden biosynteesiä (Gleadow et al. 1998). Ilmakehän hiilidioksidi-pitoisuuden kasvaessa hiilen ja typen tasapaino kasvissa muuttuu ja tyyppi tulee olemaan kasvien kasvua rajoittava tekijä. Tämä rajoittaa tyyppi-pitoisten primääriyhdisteiden muodostumista, mistä seurannee typpeä sisältävien sekundääristen aineenvaihduntatuotteiden väheneminen (Karowe et al. 1997).

Väittämän testaamiseksi tutkijat kasvatettiin sinappia, retiisiä ja naurista kasvatuskaapeissa, joiden hiilidioksidi-pitoisuus oli normaali (360 ppm) tai nostettu (725 ppm). Ainoastaan sinapin nuorien ja vanhojen lehtien glukoosinolaatti-pitoisuus aleni merkittävästi korkean hiilidioksidi-pitoisuuden takia, niin että toiseksi nuorimmassa lehdessä oli 45 % ja neljänneksi nuorimmassa lehdessä 30 % vähemmän glukosinolaatteja kuin verrannekasvin lehdissä. Käsittely ei sen sijaan vaikuttanut retiisiin ja nauriin glukosinolaatti-pitoisuuksiin (Karowe et al. 1997).

Lituruohoja kasvatettiin oloissa, joissa ilman rikkidioksidin pitoisuutta oli nostettu. Suurin rikkidioksidin altistus (706 ± 28

nl SO₂ l⁻¹) lisäsi versojen glukosinolaatti-pitoisuutta 2,5-kertaiseksi, kun mittaus tehtiin kymmenen vuorokautta käsittelyn jälkeen (van der Kooij et al. 1997).

2.4.1.4 Maalaji

Glukosinolaatti-pitoisuuden havaittiin olevan korkeampi savimaalla kasvatetuissa kasveissa verrattuna hiekkamaan kasveihin (Heaney & Fenwick 1980). Kun glukosinolaatteja sisältävien kasvijätteiden hajoamista tutkittiin savi- ja hiekkamailla, havaittiin, että mikrobihengitys oli runsaampaa savimaalla. Ilmeisesti tämän takia glukosinolaattien hajoamistuotteita esiintyi vähemmän juuri savimaalla. Hajoamistuotteita löydettiin savimaasta myös lyhemmän aikaa kuin hiekkamaasta (Bending & Lincoln 1999).

2.4.1.5 Kuivuus

Kuivuus lisää glukosinolaatti-pitoisuuksia (Bouchereau et al. 1996, Ciska et al. 2000). Rypsin siemenissä niitä on ollut jopa 120–200 % enemmän kuivuudesta kärsivissä kuin sadetetuissa kasveissa (Milford & Evans 1991). Glukosinolaatti-pitoisuus lisääntyy sitä enemmän, mitä myöhäisemmässä kehitysvaiheessa kasvi kärsii kuivuudesta. Rypsin siemenissä glukosinolaatteja oli eniten, kun kasvi kärsi kuivuudesta vegetatiivisen kasvun tai kukinnan alkuvaiheessa (Bouchereau et al. 1996, Jensen et al. 1996). Kuivuus kukintavaiheessa nosti siementen glukosinolaatti-pitoisuutta jopa 40–65 %, jolloin erityisesti alkenyyli-glukosinolaattien pitoisuus lisääntyi (Champolivier & Merrien 1996). Lituksen täyttövaiheessa kuivuus ei enää vaikuttanut tai vaikutus siemenen laatuun oli vain vähäinen (Bouchereau et al. 1996, Champolivier & Merrien 1996, Jensen et al. 1996). Rypsin glukosinolaatti-pitoisuus alkoi lisääntyä, kun kuivuusstressiä oli kestänyt yli kuusi vuorokautta ja lehden vesipotentiaali oli alle -1,4 Mpa. Tämän jälkeen glukosinolaat-

ti-pitoisuus lisääntyi lineaarisesti 1,5 μmol g⁻¹ kunakin stressipäivänä (Jensen et al. 1996).

Veden puute voi aiheuttaa kasveissa sellaisia metabolisia muutoksia, jotka estävät hyönteisten pesiytymisen sekä muuttavat niiden maittavuutta kasvin syöjille. Kaaleja kasteltiin niukasti siten, että kasvit kärsivät vedenpuutteesta. Oletuksesta poiketen kaali- ja persikkakirvan menestyminen ei riippunut kasvin vesipotentiaalista (Cole 1997). Tuloksen perusteella voidaan olettaa, ettei kasvi tuottanut kirvoja haittaavia yhdisteitä tai ne eivät vaikuttaneet tutkittujen kirvojen käyttäytymiseen.

2.4.1.6 Ravinteet

Rikki

Rikki on tärkeä ravinne erityisesti glukosinolaatteja syntetisoiville kasveille. Öljykasvit tarvitsevat rikkiä noin kaksi kertaa enemmän kuin viljakasvit eli 20–30 kg ha⁻¹ (Booth et al. 1991). Rikki-pitoisten lannoitteiden lisääminen on nostanut yleensä kasvien glukosinolaatti-pitoisuutta. Kaliumsulfaattina annettu rikki (50 kg ha⁻¹) lisäsi viljeltyjen ristikkukaisten glukosinolaatti-pitoisuutta (Booth & Walker 1994).

Lannoitus vaikuttaa eri tavalla eri kasvinosiin, sillä rikin lisäys ei nostanut retiisin juuren glukosinolaatti-pitoisuutta (Lee et al. 1996). Rikkilannoituksen nostaminen (10–45 kg S ha⁻¹) kylvölannoituksen yhteydessä on lisännyt kevätrypsin siementen glukosinolaatti-pitoisuutta (Asare & Scarisbrick 1995, Jonsson 1996). Myös syysrypsin siementen glukosinolaatti-pitoisuudet nousivat, kun kylvön yhteydessä lisättiin rikkilannoitusta (15–45 kg S ha⁻¹) (Jonsson 1996). Rikkilannoitus kukkimisvaiheessa on selvästi lisännyt siementen glukosinolaatti-pitoisuutta (Hocking et al. 1996). Vähän rikkiä sisältävillä maalajeilla rikin lisäys jopa kaksinkertaisti siementen glukosinolaatti-pitoisuuden (Zhao et al. 1993).

Rikin puute vaikuttaa eri glukosinolaatteihin eri tavalla. Alkenyyli-glukosinolaatit

muodostuvat metioniinistä ja ovat herkempiä rikinpuutteelle kuin indoliglukosinolaatit, jotka muodostuvat tryptofaanista. Tämä johtuu ilmeisesti siitä, että glukosinolaattien lähtöaineena toimivien aminohappojen synteysi reagoi eri tavalla rikin puutteeseen (Zhao et al. 1994). Tätä tukee havainto, jossa rikkilisäys kiihdytti metioniinin ja kysteiinin muodostumista aspartaatin ja asparagiinin kustannuksella (Zhao et al. 1993).

Rikkilannoitus saattaa vaikuttaa suoraan hyönteisten käyttäytymiseen kasvilla, mikä voi edelleen epäsuorasti vaikuttaa kasvin glukosinolaatti-pitoisuuteen. Tämä havaittiin, kun runsaasti rikkiä saaneet ruusukaalit houkuttelivat tehokkaimmin kaalikirvoja, joiden vioituksista seurasi puolestaan glukosinolaattien väheneminen kaalisissa (Yusuf & Collins 1998).

Rikin saannin vähenemisen yhteydessä myrosinaasi-entsyymit aktivoituvat ja kasvin glukosinolaatteja hydrolysoidaan primäärimetabolian rakennusaineiksi (Shung 1989, Schung 1990, Schung et al. 1995). Vaikka glukosinolaattien sisältämän rikin osuus kasvin kokonaisrikistä on pieni, toimivat glukosinolaatit jonkinlaisena rikkivara-astona tai puskurina rikin saannin muutoksille (Bones & Rossiter 1996). Rikkilannoitus vaikuttaa kasvin glukosinolaatti-pitoisuuteen vain silloin, kun maassa ei ole sitä tarpeeksi ja kasvi kärsii rikinpuutteesta (Shung 1989, Schung 1990, Schung et al. 1995).

Typpi

Typpilannoituksen lisääminen nostaa useiden tutkimusten mukaan siementen sinigrini-pitoisuutta (Bones & Rossiter 1996) sekä muiden glukosinolaattien pitoisuutta (Milford & Evans 1991, Bilsborrow et al. 1993b, Asare & Scarisbrick 1995). Tämä johtuu mitä ilmeisemmin siitä, että öljykasvien siementen valkuaisainesynteesi kiihtyy typpilannoitusta lisättäessä (Kundu & Dhaka 1996).

Lannoituksen vaikutusta glukosinolaattien hajoamistuotteiden muodostumiseen on tutkittu varsin vähän. Saatavilla olevien

tutkimusten mukaan vaikutus ei ole yksiselitteinen. Kun kyssäkaalien astiakokeessa typpilannoitus nostettiin nelinkertaiseksi, glukosinolaattien hajoamistuotteiden määrä laski yli 50 %. Sen sijaan kun kaliumlannoitusta lisättiin nelinkertaiseksi, lisääntyi glukosinolaattien hajoamistuotteiden määrä n. 40 %. Tuorepainoa kohden lasketuna tyypellä oli selvästi kaliumia suurempi merkitys hajoamistuotteiden muodostumiseen (Fischer 1992).

Typen ja rikin suhde

Typen ja rikin tasapaino vaikuttaa kasvin kasvuun ja kehittymiseen. Ravinteilla on havaittu selvä yhdysvaikutus kasvien glukosinolaatti-pitoisuuteen. Kasvi kärsii helposti rikin puutteesta, jos lannoituksen typen ja rikin suhde on korkea ja glukosinolaattien biosynteesi estyy. Vastaavasti, jos typen ja rikin suhde on pieni, saattaa jopa alifaattisten glukosinolaattien pitoisuus nousta (Milford & Evans 1991, Zhao et al. 1993, Hocking et al. 1996, Blake-Kalff et al. 1998). Typpilannoitus lisää siementen glukosinolaatti- ja valkuaispitoisuutta, kun rikkiä on riittävästi saatavilla. Mikäli rikkiä on vähän, typpilisäys saattaa jopa alentaa glukosinolaatti-pitoisuutta (Zhao et al. 1993).

2.4.1.7 Ulkoinen kemikaalikäsittely

Glukosinolaattien biosynteesiin on mahdollista vaikuttaa ulkoisin kemikaalikäsittelyin. Metyylijasmonaatti (100 μM) lisäsi erityisesti rapsin indolyyli-*glukosinolaattien* muodostusta, mutta se ei vaikuttanut glukosinolaattien kokonaispitoisuuteen (Bennett et al. 1997b). Salisyylihappo (2,5 mM) lisäsi rapsin fenyylityyli-*glukosinolaattien* muodostumista, mutta ei vaikuttanut glukosinolaattien lopulliseen pitoisuuteen. Samassa tutkimuksessa olleen sinapin indolyyli-*glukosinolaatti-pitoisuus* ei ulkoisten kemikaalikäsittelyjen takia muuttunut (Bennett et al. 1997b).

Toisessa tutkimuksessa sinapin sinalbiin-

ni-pitoisuus puolestaan lisääntyi jopa kahdeksankertaisesti jasmonihappo-käsittelyn (50–100 µM) jälkeen. Kokonaisglukosinolaattien määrä ei solussa kuitenkaan lisääntynyt, mikä viittaa lähtöaineen eli tyrosiinin rajoittuneeseen määrään (Du et al. 1995). Jasmonihappo kiihdytti aromaattisen glukosinolaatin lisäksi fenolisten yhdisteiden, kaneli- ja kumariinihapon muodostumista (Du & Halkier 1996).

Glukosinolaattien hajoamiseen ja myrosinaasi-entsyymien aktiivisuuteen voidaan vaikuttaa ulkoisin käsittelyin. Metyylijasmonaatin ja jasmonihapon havaittiin lisäävän myrosinaasi-entsyymiin liittyvän proteiinin (MyAP) aktiivisuutta. Salisylihappo puolestaan ehkäisi aktivoitumista (Taipalesuu et al. 1997). Matalan askorbiinihappo-pitoisuuden todettiin lisäävän (Du et al. 1995) ja korkean ehkäisevän myrosinaasi-aktiivisuutta (Du & Halkier 1996, Du et al. 1995). Askorbiinihappo ilmeisesti parantaa myrosinaasi-entsyymien ja sen substraatin, glukosinolaatin, yhteensopivuutta, jolloin hydrolyysinopeus kiihtyy. Koska askorbiinihappo ja glukosinolaatti kilpailevat myrosinaasin aktiivisesta kohdasta, saattaa askorbiinihappo suurina pitoisuuksina syrjäyttää glukosinolaatin ja hidastuttaa hydrolyysiä (Bones & Rossiter 1996).

2.4.2 Bioottiset tekijät

2.4.2.1 Kasvilaji

Glukosinolaattia tuottavat kasvit ovat hyvin erilaisia. Tähän vaikuttaa myös se, että muutokset nuorten ja vanhojen kasvinosien välillä ovat eri kasvilajeilla usein eri suuntaiset. Rapsin kuten muidenkin ristikukkaisen kasvien glukosinolaatti-pitoisuudet laskevat solukon vanhetessa, mutta keltasinapin osalta tilanne on päinvastainen (Karowe et al. 1997). Keltasinapilla glukosinolaattia hajottavan entsyymien aktiivisuus on jopa kymmenkertainen rypsiin ja rapsiin verrattuna. Tämä saattaa vaikuttaa mitattavaan glukosinolaatti-pitoisuuteen (Bones 1990).

Tavallisesti glukosinolaatteja on niitä

tuottavissa kasveissa monia erityyppisiä (Hrncirik & Velišek 1997). Kahdestakymmenestä kaalikasvista tunnistettiin 13 erilaista glukosinolaattia, joista sinigriini, glukonapiini ja glukobrassikiini esiintyivät suurimpina pitoisuuksina (Cole 1997). Sinappi sisältää poikkeuksellisesti vain yhtä pääkomponenttia. Sinalbiini on keltasinapin, sekä sinigriini mustasinapin ja rypsin pääsiällinen glukosinolaatti (Velišek et al. 1995).

Laajassa kaalikasvitutkimuksessa selvitettiin yhteensä 50 parsakaalilajikkeen, neljän ruusukaalinlajikkeen, kuuden kaalilajikkeen ja kolmen kukkakaalilajikkeen glukosinolaatti-koostumukset. Lähes kaikilla kaaleilla pääkomponentteina olivat glukobrassikiini ja glukonapiini. Sen lisäksi parsakaalin pääkomponentteina olivat glukoraphaniini ja progointriini, ruusukaalilla sinigriini ja progointriini, kaalilla sinigriini sekä kukkakaalilla sinigriini ja hydroksyglukobrassisiini (Kushad et al. 1999).

Indoliglukosinolaattien on havaittu muodostavan 30–40 % tavanomaisempien kaalien kokonaisglukosinolaatti-pitoisuudesta, ja loput muodostuvat pääasiassa alifaattisista glukosinolaateista (Ciska et al. 1994). Kasvien kokonaisglukosinolaatti-pitoisuuden mukainen järjestys suurimmasta pienimpään on seuraava: isovesikrassi, retiisit, ruusukaali, kukkakaali, nauris, parsakaali, kyssäkaali, kiinankaali ja valkokaali (Hrncirik & Velišek 1997). Punakaalissa oli glukosinolaattia selvästi valkokaalia vähemmän (Ciska et al. 1994). Viljeltyjen lajien lisäksi eroja havaitaan viljeltyjen sekä niiden jalostuksessa käytettyjen esi-isien välillä. Luonnonvaraisten kaalikasvien on nimittäin havaittu sisältävän keskimäärin enemmän glukosinolaatteja kuin jalostettujen lajien (Cole 1997).

Eri lajien glukosinolaatti-pitoisuuksien vaihtelut heijastavat eroja niiden muissa aineenvaihduntatuotteissa. Myös niihin on kiinnitettävä huomiota, sillä ne saattavat vaikuttaa glukosinolaatti-pitoisten kasvien terveysvaikutukseen. Kolmen parsakaalilajikkeen indolyyli-, alkyyli- ja alkenyyli-glukosinolaatti-pitoisuudet erosivat

selvästi. Lajike, jossa indolyylglukosinolaatti-pitoisuus oli korkein, sisälsi vähiten karoteeneja (β -karoteeni, luteiini) sekä klorofylliä (klorofylli a ja b). Kaksi muuta lajiketta, joissa oli joko paljon tai vähän alkyyli- ja alkenyyli-glukosinolaatteja, sisälsivät molemmat runsaasti klorofyllejä sekä karoteeneja (Schreiner et al. 1998). Parsakaalin glukoraphani- ja α -tokoferoli-pitoisuuden, alifaattisten glukosinolaattien ja γ -tokoferoli-pitoisuuden sekä glukonasturtiin ja γ -tokoferoli-pitoisuuden välillä havaittiin merkitsevät ja samalla positiiviset yhteydet. Sen sijaan yhteyttä ei havaittu indolyylglukosinolaattien ja antioksidanttien välillä (Kushad et al. 1999).

2.4.2.2 Kasvilajike

Ristikukkaisista kuten rypsistä ja rapsista on jalostuksen avulla pystytty tuottamaan 0- ja 00-lajikkeita. 0-lajikkeet tuottavat glukosinolaatteja, mutta erukahapon muodostuminen niistä on jalostuksen avulla poistettu lähes kokonaan.

Sen sijaan 00-lajikkeet eivät tuota kumpaakaan rehuarvoa alentavaa komponenttia. Suomessa viljellään tällä hetkellä ainoastaan rypsin ja rapsin 00-lajikkeita, joilla erukahappo- ja glukosinolaatti-pitoisuudet ovat alhaiset.

Rapsin 0- ja 00-lajikkeet ovat tieteellisesti kiinnostava kohde, kun haluamme ymmärtää glukosinolaattien muodostumista kasvissa sekä niiden vaihteluita eri oloissa. Rapsin lehtien glukosinolaatti-pitoisuuksissa sekä -koostumuksessa 00- ja 0-lajikkeiden välillä ei ole aina havaittu eroja (Porter et al. 1991), vaikka toisinaan lehtien glukosinolaatti-pitoisuus on 00-lajikkeilla ollut matalampi kuin vastaavalla 0-lajikkeella (Krzymanska et al. 1996). Lehdissä olleet pitoisuuserot ovat olleet pienempiä kuin erot vastaavien lajikkeiden siemenissä (Krzymanska et al. 1996). Siementen glukosinolaatti-pitoisuudet kasvavat 0- ja 00-lajikkeilla eri tavalla ja eri vaiheessa (Booth & Walker 1990). Rapsin 00-lajik-

keilla indolyylglukosinolaatit (erityisesti glukobrassikiini) olivat vallitsevia kehityksen alkuvaiheessa, kun taas 0-lajikkeilla alifaattiset glukosinolaatit (glukobrassikana piini) olivat vallitsevana koko vegetatiivisen kasvun ajan (Krzymanska et al. 1996). Toisessa tutkimuksessa indolyylglukosinolaattien pitoisuudet olivat 0- ja 00-rypsilajikkeilla samat, mutta 00-lajikkella niiden osuus oli suurempi kokonaisglukosinolaattipitoisuudesta (Bilborrow et al. 1993a).

Erot glukosinolaatti-pitoisuuksissa eri lajikkeiden välillä saattavat olla suuria. Yli 25-kertaisia glukoraphaniini-pitoisuuseroja analysoitiin parsakaalilajikkeista, kun alifaattisten glukosinolaattien pitoisuuserot ruusukaalin ja kukkakaalin kohdalla vaihtelivat vain kaksin- tai kolminkertaisesti (Kushad et al. 1999). Eri ruusukaalilajikkeiden lehtien glukosinolaatti-pitoisuudet vaihtelivat seitsemänkertaisesti (60–400 mg 100 g⁻¹ FW). Siemenissä oli glukosinolaattia noin 30 kertaa enemmän (2000 mg 100 g⁻¹ FW) kuin lehdissä (Heaney & Fenwick 1980).

2.4.2.3 Kehitysvaihe

Kehitysvaihe on yksi merkittävimmistä tekijöistä, jotka vaikuttavat glukosinolaattien (Bennett et al. 1996) sekä niitä muistuttavien syanogeenisten glukosinolaattien (Bennett et al. 1997a) muodostukseen. Jos kasvi kärsii stressistä, saattavat kehitysvaiheen aiheuttamat muutokset glukosinolaattien synteesissä peittyä muiden tekijöiden alle.

Glukosinolaattien biosynteesiä on havaittu jo erilaistumattomassa kalluksessa (Poulsen 1996), vaikka yleensä se vaatii erilaistuneen solukon (Mevy et al. 1997).

Erityisesti lehdissä erityyppisten glukosinolaattien muodostuminen riippuu kehitysvaiheesta. Monien ristikukkaisten havaittiin muodostavan indolyylglukosinolaatteja vain nuorissa lehdissä (Bennett et al. 1996). Sen sijaan alkenyyli- ja aromaattisten glukosinolaattien muodostuminen alkaa vasta kasvulehdissä (Bennett et al. 1997b). Näiden glukosinolaattien entsyy-

mitoiminta riippuu kehitysvaiheesta ja hidastuu solukon vanhetessa (Wallsgrove et al. 1995). Tavallisesti nuoret lehdet sekä lehtiruodit sisältävät enemmän glukosinolaatteja kuin vanhat (Koritsas et al. 1991, Merritt 1996, Bennett et al. 1997a). Poikkeuksena on keltasinappi, jolla vanhimpien lehtien havaittiin sisältävän lähes kolme kertaa enemmän glukosinolaatteja kuin nuorten (Karowe et al. 1997). Patogeenisaastunnan jälkeen nuoret lehdet lisäävät glukosinolaattien muodostusta enemmän kuin vanhat kasvinosat (Koritsas et al. 1991). Rypsin nuorimman lehden kokonaisglukosinolaattien, alifaattisen, aromaattisen ja indolyyliglukosinolaattien pitoisuudet kasvoivat taimettumisesta 40 vuorokauteen asti, jonka jälkeen pitoisuudet laskivat tasaisesti tuleentumiseen saakka (Porter et al. 1991).

Lehtien glukosinolaatti-muutoksista poiketen varsien glukosinolaatti-pitoisuus pysyi melko tasaisena kehitysvaiheesta riippumatta (Bennett et al. 1997a). Siementen glukosinolaatti-pitoisuus kasvaa kuivaa ja tuorepainoa kohden aina tuleentumiseen saakka (Milford & Evans 1991). Kasvua havaitaan sekä rapsin 00- että 0-lajikeilla, joista jälkimmäiset yltyvät korkeimpiin pitoisuuksiin (Bilsborrow et al. 1993a).

Rikkipitoisten yhdisteiden jakautuminen lehdessä muuttuu kehitysvaiheen mukana. Nuorten lehtien kokonaisrikki-pitoisuudesta 2 % esiintyy glutationina, 6 % glukosinolaattina, 50 % liukenemattomana rikkinä ja loput 42 % sulfaattina. Vanhoissa lehdissä 70–90 % kokonaisrikistä oli sulfaattina sekä glutationina, ja glukosinolaattina oli vain 1 % (Blake-Kalff et al. 1998). Monien kasvien vanhetessa kasvin kyky syntetisoida metioniinia (Doughty et al. 1991), tryptofaania ja fenyylalaniinia huonontuu, mikä aiheuttaa myös näistä johdettavien glukosinolaattien pitoisuuksien vähenemisen (Doughty et al. 1991, Halkier & Du 1997).

2.4.2.4 *Kasvinosa*

Kasvin glukosinolaatti-koostumusta tutkittaessa on tärkeää analysoida eri kasvinosia. Eri osat saattavat nimittäin syntetisoida täysin erilaisia yhdisteitä, eikä tietyn kasvinosan perusteella voida välttämättä tietää muiden kasvinosien koostumusta. Sinapin sirkkalehdet eivät syntetisoineet alkenyyli- ja aromaattisia glukosinolaatteja, joita täysikasvuiset lehdet taas tuottivat (Bennett et al. 1997b).

Glukosinolaatti-koostumuksen lisäksi glukosinolaattien pitoisuudet saattavat vaihdella paljon eri kasvinosien välillä (Haughn et al. 1991, Ludwig-Müller et al. 1997). Vaihtelut glukosinolaattien pitoisuuksissa saattavat olla seurausta eri kasvinosien erilaisista entsyymiaktiivisuuksista. Peroksidaaseja on paikannettu kaikista rypsin ja kiinankaalin solukoista, mutta flavin-tyyppisten mono-oksigenaasi-entsyymien aktiivisuutta ei ole havaittu sirkkalehdistä, eikä vanhoista lehdistä (Halkier & Du 1997).

Vaikka siementen ja nuorten taimien glukosinolaatti-pitoisuuksilla ei näyttäneen olevan yhteyttä, korreloivat litujen ja kolme-neljä viikkoa ennen korjuuta tuleentuneiden siementen glukosinolaattipitoisuudet toisiaan (Milford & Evans 1991). Tämä saattaa johtua siitä, että glukosinolaattit kuljetetaan lidun seinämäsolukoista siemeniin, jotka eivät itse pysty syntetisoimaan glukosinolaatteja. Siemenet ovat siis glukosinolaattien kohdesolukoita ja litujen seinämät lähdesolukoita (Bilsborrow et al. 1993a, Toroser et al. 1995). Litujen lisäksi muut kasvinosat saattavat toimia glukosinolaattien synteesi- ja paikkoina (Bilsborrow et al. 1993a). Litujen sijainti rypsin kukinnossa vaikuttaa muodostuvien siementen glukosinolaatti-pitoisuuteen. Kukinnan alaosan lituihin muodostuu siemeniä, joiden glukosinolaatti-pitoisuus on yläosassa kasvavia suurempi (Booth & Walker 1990, Milford & Evans 1991).

Juuret sisältävät maanpäällisiä osia enemmän glukosinolaatteja sekä nuorissa että korjuuvaiheessa olevilla kasveilla (Rosa

& Rodrigues 1998). Lehtien ja juurten glukosinolaatti-pitoisuuksien havaittiin olevan kääntäen riippuvaisia toisistaan ja vaihtelevan ultraradiaanisen rytmin mukaisesti. Kun pitoisuus oli lehdissä korkein, oli se juurissa alhaisin ja päinvastoin (Rosa & Rodrigues 1998). Retiisillä juuren alaosa sisälsi yli kolme kertaa enemmän glukosinolaatteja kuin yläosa ja kuoriossa 10–50 % enemmän kuin juuren sisäosa (Lee et al. 1996). Pääjuuren on havaittu sisältävän korkeampia bentsyyli-glukosinolaatti- sekä syanogeenisten glukosinolaattien pitoisuuksia kuin nuoret sivujuuret (Bennett et al. 1997a).

2.4.2.5 Satokomponentit

Glukosinolaatti-pitoisten kasvien kuten rypsin, rapsin ja sinapin siemensato muodostuu satokomponenteista, joita ovat tuhannen siemenen paino, siementen lukumäärä lidussa, litujen lukumäärä kasvissa sekä kasvitiheys neliometriä kohden. Sadon ja satokomponenttien merkitystä glukosinolaatti-pitoisuudessa on tutkittu varsin vähän. Rypsin glukosinolaatti-pitoisuuden havaittiin laskevan jopa puoleen, kun siementen määrä lidussa kolminkertaistui ($40 \rightarrow 120$ kpl m^2). Tämä saattoi olla seurausta siitä, että litujen glukosinolaatti-varasto jakautui useammalle siemenelle. Tämä puolestaan johti siemenen glukosinolaatti-väkevyyden laskemiseen (Milford & Evans 1991).

Tuhannen siemenen painon lisääntyminen nosti rypsin siementen glukosinolaatti-pitoisuutta suoraviivaisesti (Jensen et al. 1996). Tämä ilmeisesti aiheuttaa siementen tilavuuspainon (kg/m^3) kasvua. Tästä oli seurauksena glukosinolaattien lisääntyminen siemenissä. Korkea glukosinolaatti-pitoisuus paransi siementen itävyyttä (Velasco et al. 1998).

Primääriaineenvaihdunnan tuloksena muodostuva öljy kuvaa öljykasveilla sadon laatua. Koska glukosinolaatit muodostuvat primäärisistä aineenvaihduntatuotteista, on oleellista tuntea eri tekijöiden riippuvuus

toisistaan. Öljykasvitutkimuksessa määritettiin yhteensä 455 rapsilinjan sekä 44 rypsilinjan öljy- ja glukosinolaatti-pitoisuudet. Öljy- ja glukosinolaatti-pitoisuuden välillä oli selvä yhteys molempien kasvilajien kohdalla: korrelaatio oli positiivinen rypsilillä (+0,39) ja negatiivinen rapsilla (-0,14) (Bhardwaj & Hamama 2000).

2.5 Glukosinolaattien modifiointi

Glukosinolaatin biologinen vaikutus riippuu glykonin sekä aglykonin ominaisuuksista. Tämän takia jalostuksessa on mahdollista tarkastella molekyylin molempia osia. Jalostuksen mahdollisia menetelmiä ovat: glukosinolaatin kokonaismäärän lisääminen tai vähentäminen, sivuketjun rakenteen manipulointi, uusien glukosinolaattien tuottaminen tai ajallisen ja paikallisen glukosinolaatti-biosynteesin muuttaminen (Mithen & Campos 1996). Viidentenä vaihtoehtona on vaikuttaa tärkeiden välittäjäaineiden kuten glukosinolaattien esiintymiseen vaikuttavien hormonien pitoisuuteen. Esimerkiksi salisyylihapon on todettu indusoivan juuri FMO-entsyymiä säätelevää geenii (Wallsgrrove et al. 1995), kun taas jasmonaattien ja askorbiinihappojen on todettu vaikuttavan myrosinaasin aktiivisuuteen.

Ristikukkaisten käyttöä rehuksina on rajoittanut niiden sisältämät haitalliset glukosinolaatit. Klassisen kasvinjalostuksen avulla on pystytty poistamaan tai vähentämään oleellisesti rypsilillä ja rapsilla esiintyviä glukosinolaatteja (Brown et al. 1997, Halkier & Du 1997). Nykyään Suomessa viljeltävien lajikkeiden glukosinolaatti-pitoisuudet ovatkin alhaiset. Öljykasvien 00-lajikkeet ovat malliesimerkkejä jalostuksen mahdollisuuksista muokata kasvien sekundääriaineenvaihduntaa (Chen & Heneen 1996).

Tämän hetkinen kiinnostus on kohdistunut geenitekniikkaan ja sen mahdollisuuksiin säädellä glukosinolaatti-biosynteesiä tai glukosinolaattien hydrolyysiin liittyvien geenien toimintaa (Halkier & Du

1997). Kohteena voi olla sekä glukosinolaattien biosynteesi tai/ja myrosinaasin toiminta (Bones & Rossiter 1996). Glukosinolaattien synteesiin ja niiden hydrolyysiin liittyvien geenien toiminnat ovat usein riippuvaisia kasvinosasta tai kehitystasasteesta. Tämä riippuu mm geenien toimintaan vaikuttavista tekijöistä, jotka saattavat olla aktiivisia vain tietyn aikaa tai tietyssä kehitysvaiheessa. Ajallisesti ja paikallisesti rajoittuneiden geeniaktiivisuuteen vaikuttavien tekijöiden hyväksikäyttö onkin yksi mahdollisuus, kun glukosinolaattien synteesiä halutaan geneettisesti muuttaa (Magrath et al. 1994).

Glukosinolaatteihin liittyvän tiedon lisääntyminen mahdollistaa yhdisteiden käytön esimerkiksi kemiallisina markkereina

tutkittaessa kasvisolukon erilaistumista (Mevy et al. 1997). Kehitettyjen molekyyli-markkereiden avulla on mahdollista valita suuresta geenipopulaatiosta esimerkiksi runsaasti glukosinolaatteja tuottavat genotyypit, joilla saattaa kuitenkin olla hyvä tautien tai tuholaiten kestävyys (Campos de Quiroz & Mithen 1996). Biosynteesiin vaikuttavien tekijöiden tunteminen yhdessä geeni- ja bioteknisten menetelmien kanssa mahdollistavat sen, että glukosinolaattien modifioinnille voidaan asettaa uudet tavoitteet. Mielenkiintoinen tavoite voisi olla entistä terveellisempien ja kasvinsuojelua edistävien glukosinolaattien jalostaminen eräisiin Suomessa viljeltyihin ristikkaisiin.

Kirjallisuus

- Andreasson, E.** 2000. Structural and functional studies of the myrosinase-glucosinolate system in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. Doctoral thesis. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. Agraria 208, 41 p. ISBN 91-576-5727-0.
- Asare, E. & Scarisbrick, D.H.** 1995. Rate of nitrogen and sulphur fertilizers on yield, yield components and seed quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Field Crops Research 44: 41–46.
- Bending, G.D. & Lincoln, S.D.** 1999. Characterisation of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. Soil Biology and Biochemistry 31: 695–703.
- Bennett, R.N., Hick, A.J., Dawson, G.W. & Wallsgrove, R.M.** 1995. Glucosinolate biosynthesis. Plant Physiology 109: 299–305.
- , **Kiddle, G., Hick, A.J., Dawson, G.W. & Wallsgrove, R.M.** 1996. Distribution and activity of microsomal NADPH-dependent monooxygenases and amino acid decarboxylases in cruciferous and non-cruciferous plants, and their relationship to foliar glucosinolate content. Plant, Cell and Environment 19: 801–812.
- , **Kiddle, G. & Wallsgrove, R.M.** 1997a. Biosynthesis of benzylglucosinolate, cyanogenic glucosides and phenylpropanoids in *Carica papaya*. Phytochemistry 45: 59–66.
- , **Kiddle, G. & Wallsgrove, R.M.** 1997b. Involvement of Cytochrome P450 in glucosinolate biosynthesis in white mustard. Plant Physiology 114: 1283–1291.
- Bhardwaj, H.L. & Hamama A.A.** 2000. Oil, erucic acid, and glucosinolate contents in winter hardy rapeseed germplasms. Industrial Crops and Products 12: 33–38.
- Bilsborrow, P.E., Evans, E.J., Murray, F. & Zhao, F.J.** 1993a. Glucosinolate changes in developing pods of single and double low varieties of autumn-sown oilseed rape (*B. napus*). Annals Applied Biology 122: 135–143.
- , **Evans, E.J. & Zhao, F.J.** 1993b. The influence of spring nitrogen on yield, yield component and glucosinolate content of autumn-sown oilseed rape (*Brassica napus*). Journal of Agricultural Science, Cambridge 120: 219–224.
- Blake-Kalff, M.M.A., Harrison, K.R., Hawkswford, M.J., Zhao, F.J. & McGrath S.P.** 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape

leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiology* 118: 1337–1344.

Bones, A.M. 1990. Distribution of β -thioglucosidase activity in intact plants, cell and tissue cultures and regenerant plants of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* 41: 737–744.

– & **Iversen, T.H.** 1985. Myrosin cells and myrosinase. *Israel Journal of Botany* 34: 351–376.

– & **Rossiter, J.T.** 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiologia Plantarum* 97: 194–208.

Booth, E.J. & Walker, K.C. 1990. Effect of harvest date and pod position on glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 53: 43–61.

– & **Walker, K.C.** 1994. Consequences of cruciferous weed contamination on rapeseed quality and the effect of differing sulphur availability. 3. Congress of the European Society for Agronomy, Padova University, Albano-Padova. p. 582–583.

–, **Walker, K.C. & Schnug, E.** 1991. The effect of site, foliar sulphur and nitrogen application on glucosinolate content and yield of oilseed rape (*Brassica napus* L.). In: Proceedings of 8th International Rapeseed Congress. GCIRC, Saskatoon, Canada. p. 567–572.

Bouchereau, A., Clossais-Besnard, N., Ben-saoud, A., Leport, L. & Renard, M. 1996. Water stress effects on rapeseed quality. *European Journal of Agronomy* 5: 19–30.

Brown, J., Brown, A.P., Davis, J.B. & Erickson, D. 1997. Intergeneric hybridization between *Sinapis alba* and *Brassica napus*. *Euphytica* 93: 163–168.

Brudenell, A.J.P., Griffiths, H., Rossiter, J.T. & Bakes, D.A. 1999. The phloem mobility of glucosinolates. *Journal of Experimental Botany* 50: 745–756.

Campos de Quiroz, H. & Mithen, H. 1996. Molecular markers for low-glucosinolate alleles in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* 2: 277–281.

Champolivier, L. & Merrien, A. 1996. Effects of water stress applied at different growth stages to *Brassica napus* L. var. *oleifera* on yield, yield components and seed quality. *European Journal of Agronomy* 5: 153–160.

Chen, B.Y. & Heneen, W.K. 1996. A novel *Brassica campestris* with no glucosinolate aliphatic components. *Cruciferae newsletter* 28: 82–83.

Ciska, E., Martyniak-Przybyszewska, B. & Kozłowska, H. 2000. Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2862–2867.

–, **Piskula, M., Martyniak-Przybyszewska, B., Waszczuk, K. & Kozłowska, H.** 1994. Glucosinolates in various cabbage cultivars grown in Poland. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 3: 119–126.

Cole, R.A. 1997. The relative importance of glucosinolates and amino acids to the development of two aphid pests *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on wild and cultivated brassica species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85: 121–133.

Doughty, K.J., Blight, M.M., Bock, C.H., Fieldsend, J.K. & Pickett, J.A. 1996. Release of isothiocyanates and other volatiles from *Brassica rapa* during infection by *Alternaria brassicae*. *Phytochemistry* 43: 371–374.

–, **Porter, A.J.R., Morton, A.M., Kiddle, G., Bock, C.H. & Wallsgrave, R.** 1991. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. II. Response to infection by *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. *Annals Applied Biology* 118: 469–477.

Du, L. & Halkier, B.A. 1996. Isolation of microsomal enzyme system involved in glucosinolate biosynthesis from seedlings of *Tropaeolum majus* L. *Plant Physiology* 111: 831–837.

–, **Lykkesfeldt, J., Olsen, C.E., & Halkier, B.A.** 1995. Involvement of cytochrome P450 in oxime production in glucosinolate biosynthesis as demonstrated by an *in vitro* microsomal enzyme system isolated from jasmonic acid-induced seedlings of *Sinapis alba* L. *Plant Biology* 92: 12505–12509.

Eriksson, S. 2000. Structural and functional studies of myrosinases and associated proteins in *Brassica napus* and *Sinapsis alba*. Doctoral thesis. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. *Agraria* 216. 48 p. ISBN 91-576-5743-2.

Falk, A., Xue, J., Lenman, M. & Rask, L. 1992. Sequence of a cDNA clone encoding the enzyme myrosinase and expression of myrosinase in different tissues of *Brassica napus*. *Plant Science* 83: 181–186.

Fischer, J. 1992. The influence of different nitrogen and potassium fertilization on the chemical flavour composition of kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60: 465–470.

- Giamoustaris, A. & Mithen, R.** 1996. Genetics of aliphatic glucosinolates. IV. side-chain modification in *Brassica oleracea*. Theoretical and Applied Genetics 93: 1006–1010.
- Gijzen, M., McGregor, I. & Seguin-Swartz G.** 1989. Glucosinolate uptake by developing rapeseed embryos. Plant Physiology 89: 260–263.
- Gleadow, R.M., Foley, W.J. & Woodrow, I.E.** 1998. Enhanced CO₂ alters the relationship between photosynthesis and defence in cyanogenic *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell. Plant, Cell and Environment 21: 12–22.
- Halkier, B.A. & Du, L.** 1997. The biosynthesis of glucosinolates. Trends in Plant Science Reviews 2: 425–431.
- Haughn, G.W., Davin, L., Giblin, M. & Underhill, E.W.** 1991. Biochemical genetics of plant secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 97: 217–226.
- Heaney, R.K. & Fenwick, R.G.** 1980. Glucosinolates in Brassica vegetables. Analysis of 22 varieties of Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). Journal of the Science of Food and Agriculture 31: 785–793.
- Hocking, P.J., Pinkerton, A. & Good, A.** 1996. Recovery of field-grown canola from sulfur deficiency. Australian Journal of Experimental Agriculture 36: 79–85.
- Hrcirik, K. & Velišek, J.** 1997. Glucosinolate content of common *Brassicaceae* family vegetables. Potravinárské Vědy 15: 161–172.
- Höglund, A.-S., Lenman M., Falk A. & Rask L.** 1991. Distribution of myrosinase in rapeseed tissues. Plant Physiology 95: 213–221.
- Iversen, T.H.** 1970. Cytochemical localization of myrosinase (β -thioglucosidase) in root tips of *Sinapis alba*. Protoplasma 71: 451–466.
- Jensen, C.R., Mogensen, V.O., Fieldsend, J.K., Milford, G.F.J., Andersen, M.N. & Thage, J.H.** 1996. Seed glucosinolate, oil and protein contents of field-grown rape (*Brassica napus* L.) affected by soil drying and evaporative demand. Field Crops Research 47: 93–105.
- Jonsson, H.** 1996. Svavel och svavlets samspel med kväve. Inverkan på olika grödors avkastning och kvalitet. Kungliga skogs- och lantbruksakademins Tidskrift 6: 51–56.
- Karowe, D.N., Seimens, D.H. & Mitchell-Olds, T.** 1997. Species-specific response of glucosinolate content to elevated atmospheric CO₂. Journal of Chemical Ecology 23: 2569–2582.
- Kelly, P.J., Bones, A. & Rossiter, J.T.** 1998. Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. Planta 206: 370–377.
- Kimura, M., Tsushima, K., Kouno, I., Ichimura, M., Tomitaka, Y., Ito, H. & Anan, T.** 1995. Pungent component concentrations of blanched Japanese radish seedlings as affected by lighting period. Acta Horticulturae 390: 59–65.
- Koritsas, V.M., Lewis, J.A. & Fenwick, G.R.** 1991. Glucosinolate responses of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*). Annals Applied Biology 118: 209–221.
- Krzyminska, J., Lisiecka, E. & Nawrot, D.** 1996. The content and composition of glucosinolates in genetically different varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Journal of Plant Protection Research 37: 104–108.
- Kundu, S. & Dhaka, R.P.S.** 1996. Protein, oil and glucosinolate contents in some elite genotypes of Indian mustard (*Brassica juncea* L. (Czern & Coss)). Journal Oilseeds Research 13: 149–150.
- Kushad, M.M., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Juvik, J.A., Klein, B.A., Wallig, M.A. & Jeffery, E.H.** 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 1541–1548.
- Lee, J.-H., Yoo, I.-O. & Min, B.-H.** 1996. Effect of cultivars and culture conditions on the pungent principle contents in radish roots. Journal of Korean Society for Horticultural Science 37: 349–356.
- Lenman, M., Falk, A., Xue, J. & Rask, L.** 1993. Characterization of a *Brassica napus* myrosinase pseudogene: myrosinases are members of the BGA family of beta-glycosidases. Plant Molecular Biology 21: 463–474.
- Ludvig-Müller, J., Krishna, P. & Forreiter, C.** 2000. A glucosinolate mutant of *Arabidopsis* is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress. Plant Physiology 123: 949–958.
- , Schubert, B., Pieper, K., Ihmig, S. & Hilgenberg, G.** 1997. Glucosinolate content in susceptible and resistant Chinese cabbage varieties during development of clubroot disease. Phytochemistry 44: 407–414.
- Magrath, R., Bano, F., Morgner, M., Parkin, I., Sharpe, A., Lister, C., Dean, C., Turner, J., Lydiate, D. & Mithen, R.** 1994. Genetics of aliphatic

- glucosinolates. I. Side chain elongation in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 72: 290–299.
- , **Herron, C., Giamoustaris, A. & Mithen, R.** 1993. The inheritance of aliphatic glucosinolates in *Brassica napus*. *Plant Breeding* 111: 55–72.
- Merritt, S.Z.** 1996. Within-plant variation in concentrations of amino acids, sugar and sinigrin in phloem sap of black mustard, *Brassica nigra* (L.) Koch (Cruciferae). *Journal of Chemical Ecology* 22: 1133–1145.
- Mevy, J.P., Rabier, J., Quinsac, A., Krouti, M. & Ribailier, D.** 1997. Glucosinolate contents of regenerated plantlets from embryoids of horseradish. *Phytochemistry* 44: 1469–1471.
- Milford, G.F.J. & Evans, E.J.** 1991. Factors causing variation in glucosinolates in oilseed rape. *Outlook on Agriculture* 20: 31–37.
- Mithen, R. & Campos, H.** 1996. Genetic variation of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* and prospects for map based gene cloning. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 202–205.
- Porter, A.J.R., Morton, A.M., Kiddle, G., Doughty, K.J. & Wallsgrave, R.M.** 1991. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. I. Effect of leaf age and position. *Annals Applied Biology* 118: 461–467.
- Poulsen, G.B.** 1996. Glucosinolates in callus culture of *Brassica napus*. *Cruciferae Newsletter* 18: 32–33.
- Rodman, J.E.** 1991. A taxonomic analysis of glucosinolate-producing plants, part 1: phenetics. *Systematic Botany* 16: 598–618.
- Rosa, E.A.S.** 1997. Daily variation in glucosinolate concentrations in the leaves and roots of cabbage seedlings in two constant temperature regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73: 364–368.
- & **Heaney, R.** 1996. Seasonal variation in protein, mineral and glucosinolate composition of Portuguese cabbages and kale. *Animal Feed Science Technology* 57: 111–127.
- , **Heaney, R.K., Portas, C.A.M. & Fenwick, G.R.** 1996. Changes in glucosinolate concentrations in *Brassica crops* (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growing seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71: 237–244.
- & **Rodrigues, P.M.F.** 1998. The effect of light and temperature on glucosinolate concentration in the leaves and roots of cabbage seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78: 208–212.
- Schnug, E.** 1989. Double low oilseed rape in West Germany: sulphur nutrition and glucosinolate levels. *Aspects of Applied Biology* 23: 67–82.
- 1990. Glucosinolates – fundamental, environmental and agricultural aspects. In: *Rennenberg, H. et al. (eds.). Sulfur nutrition and sulphur assimilation in higher plants.* Hague: SPB Academic Publishing. p 97–106. ISSN 90-5103-038-X.
- , **Haneklaus, S., Borchers, A. & Polle, A.** 1995. Relations between sulphur supply and glutathione and ascorbate concentrations in *Brassica napus*. *Zeitschrift Pflanzenernährung und Bodenkunde* 158: 67–69.
- Schreiner, von, M., Schonhof, I. & Krumbein, A.** 1998. Neue Dimension der Produktqualität-Bioaktive Substanzen im Gemüse. *Gemüse* 34: 80–84.
- Sharma, A. & Garg, S.K.** 1996. Myrosinase activity in *Brassica* spp. *Crop Research* 11: 106–110.
- Siemens, H.D. & Mitchell-Olds, T.** 1998. Induced defenses in *Brassica* plants: Evolution of pest-tests of theory. *Ecology* 79: 632–646.
- Sørensen, H.** 1990. Glucosinolates: Structure, properties, function. In: *Shahidi, F. (ed.). Canola and Rapeseed: Production, chemistry, nutrition and processing technology.* New York: Van Nostrand Reinhold. p. 149–172. ISBN 0-442-00295-5.
- Springett, M.B. & Adams, J.B.** 1989. Properties of Brussels sprouts thioglucosidase. *Food Chemistry* 33: 173–186.
- Taipalensuu, J., Andreasson, E., Eriksson, S. & Rask, L.** 1997. Regulation of the wound-induced myrosinase-associated protein transcript in *Brassica napus* plants. *European Journal of Biochemistry* 247: 963–971.
- , **Falk, A. & Rask, L.** 1996. A Wound- and methyl jasmonate-inducible transcript coding for a myrosinase-associated protein with similarities to an early nodulin. *Plant Physiology* 110: 483–491.
- Thangstad, O.P., Winge, P., Husebye, H. & Bones, A.** 1993. The myrosinase (thioglucoside glucohydrolase) gene family in *Brassicaceae*. *Plant Molecular Biology* 23: 511–524.
- Toroser, D., Wood, C., Griffiths, H. & Thomas, D.R.** 1995. Glucosinolate biosynthesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.) studies with $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ and glucosinolate precursors using oilseed rape pods and seeds. *Journal of Experimental Botany* 46: 787–794.

- van der Kooij, T.A.W., De Kok, L.J., Haneklaus, S. & Schnug, E.** 1997. Uptake and metabolism of sulphur dioxide by *Arabidopsis thaliana*. *New Phytology* 135: 101–107.
- Velasco, L., Fernández-Martínez, J.M. & De Haro, A.** 1998. Increasing erucic acid content in Ethiopian mustard through mutation breeding. *Plant Breeding* 117: 85–87.
- Velíšek, J., Mikulcová, R., Míková, K., Kassahun, B.W., Link, J. & Davídek, J.** 1995. Chemometric investigation of mustard seed. *Potravinářské Vědy* 13: 1–12.
- Wallsgrave, M.R., Bennett, N.R., Doughty, J.K., Schrijvers S. & Kiddle, G.** 1995. Glucosinolate metabolism in diseased plants. *Aspects of Applied Biology* 42: 251–256.
- Xue, J., Jorgensen, M., Pihlgren, U. & Rask, L.** 1995. The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organization, expression and evolution. *Plant Molecular Biology* 27: 911–922.
- , **Lenman, M., Falk, A. & Rask, L.** 1992. The glucosinolate-degrading enzyme myrosinase in *Brassicaceae* is encoded by a gene family. *Plant Molecular Biology* 18: 387–398.
- , **Pihlgren, U. & Rask, L.** 1993. Temporal, cell-specific, and tissue-preferential expression of myrosinase genes during embryo and seedling expression of myrosinase genes during embryo and seedling development in *Sinapis alba*. *Planta* 191: 95–101.
- Yusuf, S.W. & Collins, G.G.** 1998. Effect of soil sulphur levels on feeding preference of *Brevicoryne brassicae* on Brussels sprouts. *Journal of Chemical Ecology* 24: 417–424.
- Zhao, F., Evans, E.J., Bilsborrow, P.E. & Syerrs, J.K.** 1993. Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63: 29–37.
- , **Evans, E.J., Bilsborrow, P.E. & Syerrs, J.K.** 1994. Influence of nitrogen and sulphur on the glucosinolate profile of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 64: 295–304.

3 Glukosinolaatit ja niiden hajoamistuotteet kasvinsuojelussa

Sirkka Jaakkola

*Maatalouden tutkimuskeskus, Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu,
31600 Jokioinen, sirkka.jaakkola@mtt.fi*

Tässä kirjallisuuskatsauksessa selvitetään ristikukkaiskasvien ja niiden glukosinolaatti-yhdisteiden vaikutuksia kasvintuhoojiin ja yhdisteiden käytön mahdollisuuksia kasvinsuojelussa. Torjunta-aineiden käyttöä kasvinviljelyssä pyritään korvaamaan vaihtoehtoisilla kasvinsuojelumenetelmillä. Syynä tähän ovat kemikaalien mahdolliset haittavaikutukset.

Lupaavana vaihtoehtona kemiallisille desinfiointiaineille pidetään glukosinolaatti-pitoisten ristikukkaiskasvien käyttöä maan puhdistukseen kasvintuhoojista. Glukosinolaatit itsessään ovat myrkyttämiä, mutta kasvisolujen rikkoutuessa eräät glukosinolaateista muodostuvat yhdisteet ovat suurina pitoisuuksina eläville organismeille haitallisia.

Yhdisteiden etuina torjunta-aineisiin verrattuna ovat niiden leviäminen maahan kasvien juurista ja kasvijätteen mukana ja nopea hajoaminen maassa.

Koska ristikukkaiskasveja viljellään laajalti vihanneksina, mausteina sekä öljy- ja rehuksveina, glukosinolaattien hyödyntämiselle kasvinsuojelussa on hyvät mahdollisuudet. Ristikukkaiskasveja voidaan käyttää puhdistavina välikasvina viljelykierrossa, viherkesantona, rivivälikasvina tai muulta tuotua kasvijätettä voidaan sekoittaa maahan.

Ristikukkaiskasvien nykyisellä glukosinolaatti-pitoisuudella ei kuitenkaan saavuteta riittävää torjuntaa. Tämän vuoksi olisi jalostettava kasveja, joissa tehokkaimmiksi osoittautuneita glukosinolaattien hajoamistuotteita olisi entistä enemmän.

Glukosinolaatteja ja niiden hajoamistuotteita pidetään myös kasvien puolustuskemikaaleina. Lisäksi ne ovat ristikukkaisiin sopeutuneille hyönteisille tärkeitä yhdisteitä isännän tunnistamisessa ja hyväksymisessä. Glukosinolaattien ja muiden houkuttavien ja karkottavien yhdisteiden hyödyntämistä hyönteisten massaesiintymisten vähentämisessä pidetään varteenotettavana vaihtoehtona torjunta-aineille.

Ristikukkaiskasvien houkuttavuutta voitaneen vähentää ruiskuttamalla kasveihin hyönteisten syömistä ja munintaa estäviä yhdisteitä. Houkuttelevilla yhdisteillä tuholaiset voidaan saada siirtymään muualle tai paikalle voidaan houkuttaa hyönteisten luontaisia vihollisia. Glukosinolaatteja tai myrosinaasi-entsyymien tuotantoa geneettisesti muuntelemalla voitaneen parantaa ristikukkaisten kasvien kestävyyttä kasvintuhoojia vastaan. Glukosinolaatti-yhdisteiden merkitys kasvien puolustuksessa ja infokemikaalina on vielä osittain epäselvä ja vaatii lisää tietoja, ennen kuin menetelmiä voidaan soveltaa käytäntöön.

Avainsanat: biologinen torjunta, glukosinolaatit, kemialliset yhdisteet, kaalit, ristikukkaiskasvi, torjuntamenetelmät

3.1 Glukosinolaattien hajoamistuotteet

Kun glukosinolaatit joutuvat kosketuksiin myrosinaasi-entsyymin kanssa, rikki-glukoosi-sidos hajoaa ja yhdiste pilkkoutuu glukosiksi, vetysulfaatti-ioniksi ja erilaisiksi typpiyhdisteiksi, kun kosteutta on riittävästi. Yhdisteiden syntymiseen vaikuttavat sekä glukosinolaatin sivuketjun R rakenne että olosuhteet, joissa hajoaminen tapahtuu.

Isotiosyanaatit ovat glukosinolaattien yleisimpiä hajoamistuotteita pH:n ollessa lähellä neutraalia. Tällöin glukosinolaatit hajoavat glukosiksi, vetysulfaatti-ioniksi ja lyhytaikaiseksi yhdisteeksi, joka järjestäytyy spontaanisti Lossen järjestyksen mukaisesti isotiosyanaatiksi muotoon $R-N=C=S$. (R tarkoittaa sivuketjua, N, C ja S tyyppiä, hiiltä ja rikkiä. Typpi ja rikki ovat sitoutuneet hiileen kaksinkertaisin sidoksina).

Kun alkenyyli-glukosinolaatissa on β -hydroksyyli-ryhmä, se muodostaa isotiosyanaattia, joka kuitenkin muuttuu välittömästi goitriiniksi (okszalidiini-2-tioni). Ionista tiosyanaattia, $S-C=N$, syntyy lopputuotteena p-hydroksibentsyyli- ja indolyyliglukosinolaattien pysymättömistä isotiosyanaateista (Chew 1988a, Agerbirk et al. 1998). Askorbiinihapon ollessa mukana indoleista muodostuu ionisen tiosyanaatin lisäksi askorbigeeniä ja ilman askorbiinihappoa indolialkoholia, joka lopulta muuttuu di-indolyylimetaaniksi (Chew 1988a, Agerbirk et al. 1998). Nitriiliä ja orgaanista tiosyanaattia syntyy hydrolyysin jälkeen ilman Lossenin järjestäytymistä, kun molekyylistä poistuu rikkiä. Nitriilit, $R-C\equiv N$, ovat glukosinolaattien pääasiallisia hajoamistuotteita pH:n ollessa alhainen tai rautaionin läsnäollessa (Hasapis & McLeod 1982, Agerbirk et al. 1998).

Jos glukosinolaatin alkenyyli-ryhmän päässä on tyydyttymätön hiiliosa, syntyy epitiospesifisen proteiinin läsnäollessa epinitriiliä pH:sta riippumatta. Proteiinin tehtävänä on edistää rikin kuljetusta S-glukoosista tyydyttymättömään hiiliosaan. Epitiospesifistä proteiinia on löydetty vain

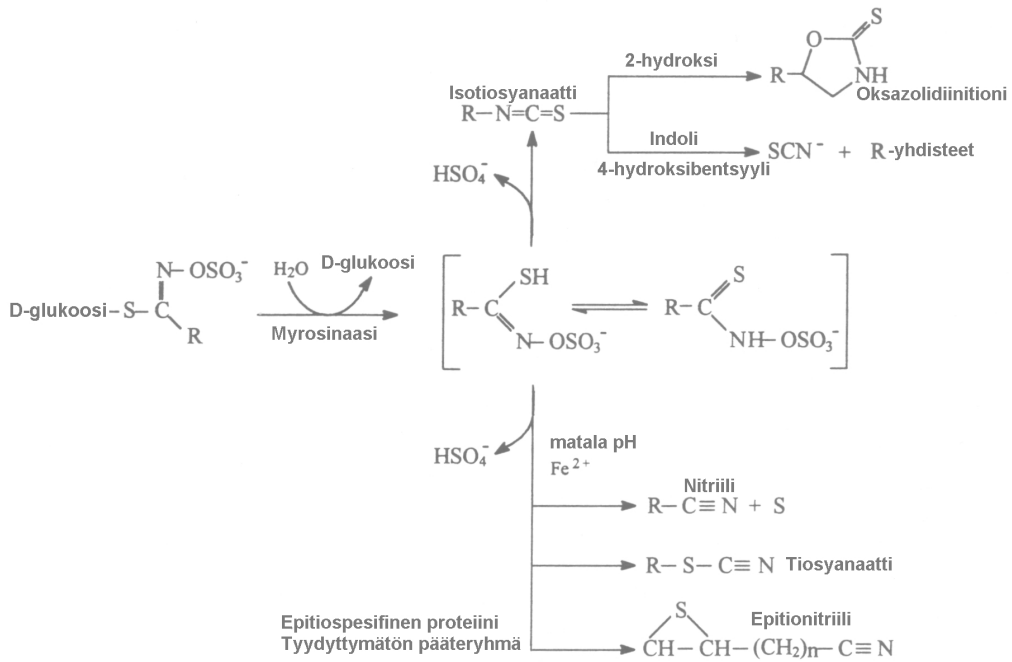
osasta ristikkukaiskasveja mm. merisinapin siemenrouheesta, keltasinapista sekä rapsin ja rypsin siemenistä (Chew 1988a). Orgaanista tiosyanaattia, $R-S-C\equiv N$, tiedetään muodostuvan vain kolmesta glukosinolaattista (Chew 1988a). Glukosinolaattien hajoaminen ja hydrolyysiyhdisteet on esitetty kuvassa 5.

Glukosinolaatin R-ketju muodostaa vastaavan ketjun isotiosyanaatteihin, nitriileihin ja orgaanisiin tiosyanaateihin. Esimerkiksi 2-propenyyliglukosinolaatti (sini-griini) voi hajota 2-propenyylisotiosyanaatiksi, 2-propenyylitiosyanaatiksi, 2-propenyylinitriiliksi ja 1-syano-2,3-epitiopropaniksi (Chin et al. 1996, Gardiner et al. 1999).

Glukosinolaattien hajoamistuotteista erityisesti isotiosyanaatteja pidetään kasveille, hyönteisille, ankeroisille ja mikrobeille haitallisina (Drobnica et al. 1967, Donkin et al. 1995, Brown & Morra 1997, Peterson et al. 1998). Goitriinia, ionista tiosyanaattia, nitriiliä ja indolyyliglukosinolaattien johdannaisia pidetään lievästi myrkyllisinä (Kutáček 1964, Donkin et al. 1995, McCaffrey et al. 1995, Smolinska et al. 1997, Angelini et al. 1998). Glukosinolaatit itsessään ovat myrkyttömiä (Mari et al. 1993, Manici et al. 1997).

3.2 Isotiosyanaattien ominaisuudet ja tuotanto

Isotiosyanaatit ovat verraten kaasuuntuvia, reaktioherkkiä yhdisteitä. Isotiosyanaatti-molekyylin sivuketjun R rakenne vaikuttaa yhdisteiden kaasuuntuvuuteen, liukoisuuteen ja pysyvyyteen (Borek et al. 1998) ja siten myrkyllisyyteen. Alifaattiset isotiosyanaatit ovat kaasuuntuvampia kuin aromaattiset ja kaasuuntuvuus alenee molekyylipainon kasvaessa (Sarwar et al. 1998). Liukoisuus- ja kaasuuntuvuuserojen takia isotiosyanaattien levitysmenetelmät ja ympäristöolot vaikuttavat havaittuun myrkyllisyyteen. Petersenin et al. (1999) esimerkiksi herkästi kaasuuntuva n-butyylisotiosyanaatti oli tehokkaampi kaasuna



Kuva 5. Glukosinolaattien hajoaminen ja hydrolyysiyhdisteet (Borek et al. 1996).

kuin liuoksena ja heikosti kaasuntuva 2-fenyylietyyli-isotiosyanaatti oli liuosmuodossa tehokkaampi kuin kaasuna. Bentsyyli- ja 2-fenyylietyyli-isotiosyanaatit ovat olleet liuoksina yli 10 kertaa tehokkaampia kuin n-butyli-isotiosyanaatti.

Nastruzzin et al. (1996) ja Borekin et al. (1998) mukaan yhdisteiden vesiliukoisuus vaikuttaa niiden soluun imeytymiseen. Siten se on tärkeä isotiosyanaattien myrkyllisyyttä selittävä tekijä. Hyönteisten munille myrkyllisimmät isotiosyanaatit olivat Borekin et al. (1998) kokeissa vettä hylkiviä. Sienille ja hyönteisten munille myrkyllisimpien isotiosyanaattien sivuketjussa on sulfinyyli-, tio- tai aromaattinen ryhmä tai useita hiiliatomeja (Nastruzzi et al. 1996, Manici et al. 1997, Borek et al. 1998).

Isotiosyanaattien vaikutusmekanismeja ei vielä täysin tunneta. Ne reagoivat proteiinien ja aminohappojen kanssa ja mahdollisesti fosforyloitujen sokerien kanssa (Lebova-Svobodová & Košťir 1962, Björkman 1973). Björkman (1973) havaitsi, että esim.

rapsin siemenpuristeen amino- ja sulfaatti-ryhmät reagoivat isotiosyanaatin kanssa muodostaen tioureaa ja ditiokarbamaatteja, erityisesti silloin, kun pH on korkea. Bentsyyli-isotiosyanaatti on entsyymi-inhibiittori (Lykkesfeldt & Møller 1993).

Isotiosyanaatteja vapautuu pääasiassa murskatuista ristikkukkaiskasvien soluista, vaikka pieniä määriä vapautuu myös elävien kasvien juurista ja versoista (Cole & Finch 1978, Choesin & Boerner 1991, Vaughn 1999). Ristikukkakaiskasvien kasvulisten osien glukosinolaatti-pitoisuus ja siten myös murskattujen kasvien isotiosyanaattien tuotanto on suurimmillaan nuppuvaiheessa ja alenee lähelle nollaa tuleentumisvaiheeseen mennessä (Sarwar & Kirkegaard 1998). Isotiosyanaatteja tuottaviksi viherkesantokasveiksi soveltuvat parhaiten nopeasti kasvavat, paljon biomassaa ja glukosinolaateistaan isotiosyanaatteja tuottavat kasvit. Petersen et al. (1999) mittasivat kukintavaiheessa maahan murskatun rypsikasvuston isotiosyanaatti-tuotannoksi noin 2 g isotiosyanaattia neliötä kohti. Sie-

menten vuoksi viljeltävät ristikukkaiskasvit korjataan tuleentumisvaiheessa, jolloin niiden versojen glukosinolaatti-pitoisuus on erittäin alhainen (Sarwar & Kirkegaard 1998). On edelleen epäselvä, kuinka paljon kasvavien kasvien juuret erittävät isotiosyanaatteja ja vaikuttaako pieni, mutta jatkuva isotiosyanaatti-tuotanto maassa eläviin kasvintuhoojiin.

Isotiosyanaatteja tuottavia glukosinolaatteja on eniten mustasinapissa, sareptansinapissa, keltasinapissa ja *Brassica carinata* (Kirkegaard & Sarwar 1998). Kukintavaiheessa murskatut sareptansinapin versot tuottivat Smolinskan & Horbowichin (1999) kokeissa 2-propenyylisotiosyanaattia $648 \mu\text{g g}^{-1}$ kuivia versoja. Keltasinappi 'Borowska' tuotti puolestaan 4-hydroksibentsyyliisotiosyanaattia $43,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Keväällä kylvettyjen ristikukkaiskasvien isotiosyanaatti-tuotanto oli suurempi kuin loppukesällä kylvettyjen.

Vaikka kaalien glukosinolaatti-tuotanto on suuri ja kevättrypsin ja rapsin kohtalainen, vain puolet näiden glukosinolaateista voi tuottaa isotiosyanaatteja (Kirkegaard & Sarwar 1998). Nuorten kaalintaimien isotiosyanaatti-tuotanto on kuitenkin runsasta. Kaksi viikkoa vanhat, murskatut valkokaalin taimet tuottivat 2-propenyylisotiosyanaattia $639 \mu\text{g g}^{-1}$ kuivia lehtiä. Kukkakaalin taimet tuottivat $344 \mu\text{g g}^{-1}$ ja ruusukaalin taimet $91 \mu\text{g g}^{-1}$ (Greenhalg & Mitchell 1976).

Samatkin glukosinolaatit voivat hajota isotiosyanaateiksi eri suhteissa. Charron & Sams (1999) mittasivat kahden sareptansinapin sirkkalehtien sinigriinin tuottavan isotiosyanaattia moolien suhteessa 1:39 ja keräkaalin sirkkalehtien sinigriinin 1: 0,2. Tutkittujen 28 mustasinappilajikkeen 2-propenyylisotiosyanaatin tuotanto oli 11 %–100 % ($0,4$ – $3,5 \text{ mg g}^{-1}$ tuoretta solua) sinigriinin määrästä ja 35 sareptansinappilajikkeen tuotanto 5–100 % (0 – $2,6 \text{ mg g}^{-1}$ tuoretta solua) sinigriinin määrästä (Oliver et al. 1999). Erot saattavat johtua erilaisesta myrosinaasi-aktiivisuudesta, sillä esim. retiisillä se on ollut lähes kymmenkertainen kiinankaaliin verrattuna ja parsakaalilla

kaksinkertainen valkokaaliin verrattuna (Yen & Wei 1993).

Rapsin verso- ja juurimurskasta vapautui kaasumaisia yhdisteitä enemmän kuin rapsin siemenpuristeesta, vaikka puristeen glukosinolaatti-pitoisuus oli paljon suurempi. Tämä viittaa siemenpuristeen isotiosyanaattien sitoutuvan voimakkaasti siemenpuristeen proteiineihin (Brown & Morra 1995, 1996).

Kuivattujen ja hienonnettujen kaalikasvien vaikutus kasvitauteihin on ollut suurempi kuin tuoreiden kasvinosien. Tämä johtuu yhdisteiden nopeammasta vapautumisesta ja siten korkeammasta pitoisuudesta (Ramirez-Villapudua & Munnece 1988, Angus et al. 1994). Rapsin glukosinolaatit ja niiden hydrolyysituotteet on koottu taulukoihin 2, 3 ja 4 ja eri parsakaalilajikkeiden glukosinolaatit taulukkoon 5.

3.3 Hajoamistuotteet maassa

Maan biologiset, kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet yhdessä kasvimateriaalin ominaisuuksien kanssa säätelevät glukosinolaattien hajoamistuotteiden syntyä ja häviämistä. Isotiosyanaattien reaktioista maassa on eniten tietoa, mutta muiden hajoamistuotteiden käyttäytymisestä tiedetään vielä vähän. Sinigriinin pähajoamistuote kuudella eri maalajilla ja kahdella eri kosteustasolla oli 2-propenyylisotiosyanaatti (Borek et al. 1994). Nitriiliä löytyi vain vähän. Puskuroimattomassa liuoksessa syntyi kuitenkin runsaammin nitriiliä. Kun maahan sekoitettiin murskattuja rapsin versoja ja juuria, maasta löytyi yhdeksää eri hajoamisyhdistettä. Isotiosyanaattien lisäksi havaittiin useita nitriilejä. Maasta analysoidut yhdisteet olivat peräisin pääasiassa juurten glukosinolaateista, vaikka suurin osa maahan sekoitetusta vihermassasta oli rapsin maanpäällistä kasvustoa (Gardiner et al. 1999). Gardiner et al. (1999) otaksuivat, että vihreiden kasvinosien glukosinolaattien hajoaminen suosii nitriilejä isotiosyanaattien kustannuksella ja että myös vihreiden kasvinosien proteiinit sitovat iso

Taulukko 2. 'Humus'-rapsin glukosinolaatti-pitoisuus, $\mu\text{mol g}^{-1}$, tuoretta solua. Näytteet otettu rapsin kukintavaiheessa ja analysoitu kaasukromatografilla (Brown & Morra 1996).

Glukosinolaatti	Juuri $\mu\text{mol g}^{-1}$	Lehdet ja varsi
isopropyyli	0,0	jäämiä
2-metyylipropyli	jäämiä	0,3
3-butenyyli	0,3	1,4
4-pentenyli	1,1	4,6
4-metyylipentyyli	jäämiä	0,0
2-hydroksi-3-butenyyli	2,0	4,9
2-hydroksi-4-pentenyli	0,5	1,3
4-metyylitiobutyli	0,4	0,0
fenylietyyli	4,5	1,1
5-metyylitiopentyyli	1,2	0,0
3-indolyylimetyyli	1,1	0,6
4-hydroksi-3-indolyylimetyyli	0,1	jäämiä
1-metoksi-3-indolyylimetyyli	0,2	0,1
4-metoksi-3-indolyylimetyyli	0,2	jäämiä

jäämä on $<0,05 \mu\text{mol g}^{-1}$ tuoretta solua kohti

Taulukko 3. 'Humus'-rapsin glukosinolaattien hydrolyysiyhdisteet. Haihtuvien yhdisteiden tuotanto, $\mu\text{mol g}^{-1}$, tuoretta solua 26 tunnin aikana (Brown & Morra 1996).

Hydrolyysiyhdiste	Juuri $\mu\text{mol g}^{-1}$			Lehdet ja varsi $\mu\text{mol g}^{-1}$		
	0,3-2,3	5-21	22-26	0,3-2,3	5-21	22-26
Näytteenottoaika tuntia alusta						
metyyliSCN	1,8	0,6	0,0	jäämiä	0,0	0,0
3-butenyyliCN	0,1	0,8	0,0	0,8	5,3	0,6
isopropyliITC	0,3	0,8	0,0	0,4	0,7	0,0
4-pentenyliCN	0,7	2,4	0,2	1,5	15,2	2,7
allyyliITC	0,4	1,0	0,0	0,7	0,0	0,0
1-metyylipropyliITC	4,8	6,1	0,4	5,2	21,6	1,6
3-butenyyliITC	15,2	37,3	3,3	41,3	111,1	10,1
4-pentenyliITC	51,1	98,8	14,8	68,1	240,0	35,0
3,4-epitiobutyliCN	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
4-metyylipentyyliITC	1,3	3,9	0,8	0,3	1,2	0,2
5-heksenyliITC	jäämiä	0,3	0,0	0,0	0,4	0,0
fenylietyyliCN	1,5	6,3	2,7	0,0	0,8	0,1
5-metyliheksyyliITC	0,8	2,9	0,9	0,1	0,8	jää
bentsyyliITC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
4-metyylitiobutyliITC	0,4	2,0	0,6	0,0	0,0	0,0
fenylietyyliITC	11,5	71,0	30,2	0,7	4,6	1,4
5-metyylitiopentyyliITC	0,3	1,9	0,6	0,0	0,0	0,0
4-metyylisulfinyylibutyliITC	jäämiä	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
5-metyylisulfinyyliipentyyliITC	jäämiä	0,1	0,0	0,0	0,00,0	

SCN-tiosyanaattiryhmä, CN-nitriiliryhmä, ITC-isotiosyanaattiryhmä

Taulukko 4. 'Humus'-rapsin glukosinolaattien hydrolyysiyhdisteet. Liukoisten yhdisteiden tuotanto, $\mu\text{mol g}^{-1}$, tuoretta solua (liuotin CH_2Cl_2) (Brown & Morra 1996).

Hydrolyysiyhdiste	Juuri $\mu\text{mol g}^{-1}$	Lehdet ja varsi $\mu\text{mol g}^{-1}$
4-pentyyliCN	jäämiä	0,02
1-metyylipropyliITC	0,02	0,02
2-hydroksi-3-butenyyliCN	0,01	0,02
3-butenyyliITC	0,04	0,36
4-pentenyliITC	0,12	0,91
3,4-epitiobutyliCN	0,00	0,03
4-metyyliotiobutyliCN	jäämiä	0,00
2-hydroksi-3,4-epitiobutyliCN	0,01	0,00
fenylietyyliCN	0,24	0,04
4,5-epitiopentyyliCN	0,05	0,41
5-metyyliotiopentyyliCN	0,03	0,00
4-metyyliotiobutyliITC	0,06	0,00
fenylietyyliITC	0,99	0,27
5-vinyyliOZT	0,48	0,91
5-metyyliotiopentyyliITC	0,09	0,00
5-allyyliOZT	0,10	0,24
4-metyylisulfinyylibutyliITC	0,03	jäämiä
indoliasetoCN	jäämiä	jäämiä
5-metyylisulfinyylipentyyliITC	0,09	0,30

CN-nitriiliryhmä, ITC-isotiosyanaattiryhmä, OZT-oksazolidiiniiniryhmä

Taulukko 5. Viiden parsakaalilajikkeen glukosinolaatti-pitoisuudet, $\mu\text{mol/g}$, kuiva-ainetta. Suhteelliset osuudet suluissa. (Hansen et al. 1997).

Glukosinolaatti	'Shogun'	'Hannamori'	'Premium Crop'	'Paxi'	'Purple Mountain'
Glukonapiini 3-butenyyli	1,4 (2)	0,0	0,5 (<1)	0,0	0,0
Glukobrassikanapiini 4-pentenyli	0,0	0,6 (<1)	0,0	0,0	0,0
Progoitriini 2-hydroksi-3-butenyyli	16,1 (25)	1,4 (2)	10,8 (12)	0,8 (2)	1,4 (2)
Glukoiberiini 3-metyylisulfinyylipropyli	1,7 (3)	0,0	0,0	0,0	7,8(11)
Glukorafaniini 4-metyylisulfinyylibutyli	29,0 (46)	21,7 (36)	38,4 (41)	20,4 (44)	15,2 (21)
Glukoalysiini 5-metyylisulfinyylipentyyli	0,4 (<1)	0,0	0,0	0,2 (<1)	0,0
Glukonasturtiini Fenylietyyli	0,4 (<1)	0,0	0,4 (<1)	0,0	0,0
Glukobrassikiini 3-i,0,0olyylimetyyli	11,8 (19)	16,3 (27)	21,8 (24)	10,7 (23)	33,4 (46)
Neoglukobrassikiini N-metoksi-3-i,0,0olyylimetyyli	2,6 (4)	19,7 (33)	19,9 (21)	13,8 (30)	11,9 (16)
4-metoksiglukobrassikiini 4-metoksi-3-i,0,0olyylimetyyli	1,4 (2)	0,7 (1)	1,3 (1)	0,8 (2)	2,0 (3)

tiosyanaatteja.

Glukosinolaattien entsyymaattinen hajoaminen on nopeaa. Korkeimmat isotiosyanaatti-pitoisuudet mitattiin 24 tunnin kuluttua puhtaan sinigriinin ja myrosinaasin lisäämisestä kivennäismaata sisältävään koeputkeen (Borek et al. 1994). Donkinin et al. (1995) mukaan 24 tunnin kuluttua sinigriinin ja myrosinaasin lisäyksestä veteen isotiosyanaatin tuotanto oli 12–31 % glukosinolaatin määrästä. Rapsikasvuston murskauksen jälkeen maasta mitattiin hajoamistuotteiden korkeimmat pitoisuudet 30 tuntia sekoituksen jälkeen (Gardiner et al. 1999).

Kaasumaiset isotiosyanaatit kulkeutuvat diffuusion avulla maan ilmahuokosissa, kunnes liukenevat veteen, sitoutuvat maa-hiukkasten pinnoille tai häviävät muulla tavoin. Veteen liunneena isotiosyanaatit leviävät joko diffuusin avulla tai valuman mukana. Jakautuminen eri faaseihin riippuu maan rakenteesta, vesipitoisuudesta, lämpötilasta sekä yhdisteen liukoisuudesta (Wambeke 1989). Veteen liunneiden myrkyllisten yhdisteiden pitoisuudesta ja vaikutusajasta puolestaan riippuu se, miten yhdisteet tehoavat maassa eläviin kasvintuhoojiin. Kaasut liikkuvat maassa diffuusin avulla nopeammin ja tasaisemmin kuin vesi, minkä vuoksi isotiosyanaattien arvelaan tehoavan kaasuna kulkeutuessaan paremmin kuin veden mukana (Brown & Morra 1997).

Lämpötilan noustessa kaasuntuvuus paranee ja liukoisuus laskee. Hyvä maan rakenne yhdessä korkean lämpötilan kanssa nopeuttavat isotiosyanaattien liikkumista ja leviämistä maassa, jolloin vähemmän isotiosyanaatteja ehtii sitoutua tai hajota ennen kosketusta kasvintuhoojan kanssa.

Esim. metyyli-isotiosyanaatin liukoisuus alenee 37 % lämpötilan noustessa 10 °C:sta 20 °C:een (Wambeke 1989). Metyyli-isotiosyanaatin liukoisuus 20 °C:seen veteen on 7,6 mg ml⁻¹, minkä vuoksi kosteassa maassa suurin osa yhdistestä liikkuu veteen liunneena (Smelt & Leistra 1974). Myrkyllisten yhdisteiden pitoisuus laimenee maan kosteuspitoisuuden lisääntyessä.

Ei tiedetä, ovatko veteen helposti liukenevat isotiosyanaatit, kuten p-hydroksibentsyyli ja 2-fenylylietyyli, kosteassa maassa tehokkaampia kuin heikommin liukenevat isotiosyanaatit.

Glukosinolaattien hajoamistuotteet häviävät nopeasti maasta. Ne häviävät kaasuntumalla ilmaan, sitoutumalla maa-hiukkasiin, huuhtoutumalla ja hajoamalla kemiallisesti tai mikrobitoiminnan tuloksena (Brown & Morra 1997). 2-propenyylimetyyli-isotiosyanaatin puoliintumisaika maassa vaihteli 20–60 tuntiin ja vastaavan nitriliin 80–120 tuntiin. Isotiosyanaatit ovat hävinneet maasta nopeammin glukosinolaattipitoisen kasvimateriaalin lisäyksen jälkeen kuin puhtaan glukosinolaatin ja myrosinaasin lisäyksen jälkeen (Brown & Morra 1997).

Myös ionisen tiosyanaatin puoliintumisaika maassa on verrattain lyhyt. Tiosyanaatin häviäminen neljältä maalajilta vaihteli 40–95 %:iin kuuden vuorokauden kuluessa (Brown & Morra 1993). Kun maahan on lisätty kokeissa 2-propenyylimetyyli-isotiosyanaattia ionisen tiosyanaatin mukana, on jälkimmäisen hajoaminen hidastunut. Rapsin siemenrouheesta maahan vapautuva ioninen tiosyanaatti on säilynyt maassa puhdasta yhdistettä kauemmin. Tällainen synergia-vaikutus saattoi johtua siitä, että isotiosyanaatti vaikutti myrkyllisesti hajottajamikrobeihin (Brown et al. 1991, Brown & Morra 1993).

Suuri osa isotiosyanaatista häviää maasta joko kaasuntumalla ilmaan tai hajoamalla. Isotiosyanaattien kaasuntuminen ilmaan vähentää torjunnan tehoa. Erot isotiosyanaattien kaasuntuvuudessa vaikuttavat todennäköisesti myös hävikkien määrään. Jopa 34 % maahan sijoitetusta metyyli-isotiosyanaatista havaittiin olevan maan pinnalta otetussa kaasuvirrassa kymmenen tunnin kuluessa (Munnece et al. 1962). Läheltä maan pintaa ja kuivasta maasta päästöt ovat suuremmat kuin syvältä ja kosteasta maasta. Metyyli-isotiosyanaatti (Gerstl et al. 1977, Gan et al. 1999) ja 2-propenyylimetyyli-isotiosyanaatti (Borek et al. 1995b) hävisivät nopeammin kuivassa maassa kuin kosteassa

ja lämpötilan nousu kiihdytti häviämistä. 2-propenyylinitriili puolestaan hävisi nopeammin, kun maan vesipitoisuus kasvoi (Borek et al. 1995b). Sadetuksen mukana läpäisevään hietamaahan annettua metyyli-isotiosyanaattia on löytynyt maasta 15 päivän ajan, kun lämpötila on ollut 2 °C. Huuhtoutumalla hävisi vain pieni osa metyyli-isotiosyanaatista. Suurin osa isotiosyanaatista löytyi 25 cm:n pintakerroksesta (Saeed et al. 1996).

Metyyli-isotiosyanaattia sisältävä Busan 1020, jonka tehoaine on natrium -N-metyyliditiokarbamaatti, tehosi *Verticillium dahliae* -sienen itöihin parhaiten kosteassa ja viileässä, +2 °C maassa, kun se levitettiin maahan kastellen. Tällöin se liikkui kasteluvien mukana. Teho kuivassa maassa parani lämpötilan noustessa, mutta +22 °C:n lämpötilassa kosteassa maassa teho heikkeni, koska hajoaminen oli nopeampaa (Saeed et al. 1997). Lämpötilan nousu on lisännyt maahan sekoitetun kaalijätteen tehoa maalevintäisiin taudinaiheuttajiin (Gamliel & Stapleton 1993). Tehon paraneminen johtui todennäköisimmin isotiosyanaateista ja muista haihtuvista rikkiyhdisteistä, joita lämmitetystä maassa vapautui enemmän kuin lämmittämättömästä.

Osa isotiosyanaateista sitoutuu maainekseen ja on siten torjunnan kannalta tehoton muodossa. Savi- ja humuspitoisuuden sekä typen määrän lisääntyessä isotiosyanaattien sitoutuminen maahan on lisääntynyt (Gerstl et al. 1977, Ben -Yephet & Frank 1985, Borek et al. 1995b). Myös mikrobiologisen hajoamisen on havaittu nopeutuvan maan orgaanisen aineen määrän kasvaessa (Gan et al. 1999). Ioninen tiiosyanaatti hajosi pääasiassa mikrobien vaikutuksesta (Brown & Morra 1993). Isotiosyanaattien hajoamiseen mikrobit eivät näytä oleellisesti vaikuttavan (Munnece & Martin 1964, Brown & Morra 1997), vaikkakin lämpötilan nousu yli 30 °C:n stimuloi voimakkaasti metyyli-isotiosyanaatin mikrobiologista hajoamista (Gan et al. 1999). Korkea lämpötila on nopeuttanut myös liukoksen ionisen tiiosyanaatin häviämistä (Brown & Morra 1993).

3.4 Glukosinolaattien vaikutukset

3.4.1 Rikka- ja viljelykasvit

Ristikukkaiskasvien hajoavista jätteistä ja murskatuista kasvisoluista voi vapautua siementen itämistä ja taimien kasvua haittaavia yhdisteitä. Elävien ristikukkaiskasvien juurista on havaittu erittyvän pieniä määriä samoja yhdisteitä (Choesin & Boerner 1991). Näistä kasveille myrkyllisimpiä ovat glukosinolaattien hajoamistuotteet, isotiosyanaatit, tiiosyanaatit ja goitriini (Brown & Morra 1995, Vaughn & Boydston 1997, Vaughn & Berhow 1998). Yhdisteet voivat pitoisuudesta ja testikasvista riippuen sekä estää kasvua että toisinaan myös edistää sitä. Myrkytysoireet näkyvät itämisen estymisenä, sirkkajuuren tai -varren heikkona kasvuna tai taimen värin vaalenemisenä (Dale 1986, Oleszek 1987, Angelini et al. 1998).

Yksi eniten tutkituista glukosinolaattien hajoamistuotteista on vesiliukoinen ioninen tiiosyanaatti, jota syntyy p-hydroksibentsyyli- ja indolyyliglukosinolaattien hajoatessa entsymaattisesti (Chew 1988a). Kaupallista ammoniumtiiosyanaattia (NH₄ SCN) on käytetty kasvuston tuhoamiseen ja amitrolin lisäaineena rikkakasvien torjuntaan (Duncan et al. 1989). Tiiosyanaattien vaikutustapa on valikoiva ja riippuu pitoisuudesta, mutta vaikutusmekanismeja ei täysin tunneta. Tiiosyanaatin tiedetään sitovan proteiineja (Duncan et al. 1989). Voimakkaiden värivirheiden oletetaan johtuvan ionisen tiiosyanaatin reagoinnista raudan kanssa (Ju et al. 1983).

Ammoniumtiiosyanaatti vaikuttaa synergisesti amitrolin kanssa estäen sitä muuttumasta kasvissa vaarattomampaan muotoon (Duncan et al. 1989). Ammoniumtiiosyanaatti on estänyt mm. perunoiden itämistä, kun mukulat on peitattu 2 % liuoksella (Brian 1976), mutta nopeuttanut itämistä pieninä pitoisuuksina (Duncan et al. 1989). Jun et al. (1983) mukaan tupakan taimet kuolivat, kun vesiviljelyliuoksessa oli alle 5 µg ml⁻¹ tiiosyanaatti-ioneja. Pavun kasvu loppui, kun niitä oli liuoksessa yli 25

$\mu\text{g ml}^{-1}$, mutta kaali kasvoi liuoksessa, jonka pitoisuus oli 5–50 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Sellaisina pitoisuuksina (-500 μM , ~29 $\mu\text{g ml}^{-1}$), joita esiintyy maassa, tiosyanaatti on estänyt kasvien verson ja juuren kasvua, mutta ei ole vaikuttanut siementen itävyyteen (Stiehl & Bible 1989).

Glukosinolaattien hydrolyysiyhdisteistä herkästi kaasuuntuvia isotiosyanaatteja pidetään kasveille myrkyllisimpinä. Metyyli-isotiosyanaattia sisältäviä torjunta-aineita, Na-N-metyyliditiokarbamaattia ja dat-somettia, on yleisesti käytetty mm. kasvu-alustojen desinfiointiin (Parker 1976). Metyyli-isotiosyanaatti on voimakas myrky, joka tuhoaa myös lepotilassa olevat siemenet (Parker 1976). Teasdaalen & Taylorsonin (1986) kokeissa puhdas metyyli-isotiosyanaattikaasu esti maassa verihirssin, *Digitaria sanguinalis*, siementen itämisen noin 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pitoisuudessa, hidasti itämistä 40–70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pitoisuudessa ja edisti itämistä 7–40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pitoisuudessa.

Puhtaat 2-propenyli- ja metyyli-isotiosyanaatit ovat kaasuna olleet itäville siemenille myrkyllisimpiä (Petersen et al. 1999, Vaughn & Boydston 1997). Maahan sekoitettu sareptansinapin kasvimurska tai siemenpuriste (pääglukosinolaatti 2-propenyliä) ei kuitenkaan ole estänyt siementen itämistä, vaan on päinvastoin edistänyt sitä (Laitinen et al. 1994, Vaughn & Boydston 1997). Bentsyyli-isotiosyanaatin vaikutus on kaasuna ollut heikko. Kuitenkin maahan sekoitettuna (Dale 1986) tai bentsyyli-isotiosyanaattia runsaasti tuottavista kasveista, kuten vihanneskrassista ja keltasinapista, valmistettu kasvimurska ovat olleet myrkyllisimpiä (Vaughn & Boydston 1997). Vihanneskrassin ja keltasinapin vaikutus saattaa johtua eri yhdisteiden tuomasta synergiasta tai bentsyylin paremmasta vaikutuksesta liuosmuodossa.

Helposti liukenevista isotiosyanaateista tehokkaimpia siementen itämisen ja kasvun estäjiä ovat liuoksina olleet 2-fenyli-isotiosyanaatti (Bialy et al. 1990, Petersen et al. 1999) ja 4-metyyliotiobutyli-isotiosyanaatti (Angelini et al. 1998). 2-fenyli-iso-

tiosyanaatti esti maljakokeissa vehnän itämisen kokonaan 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pitoisuudessa ja juuristo tuhoutui 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pitoisuudessa (Bialy et al. 1990). Fenyli-isotiosyanaatin lähtö-glukosinolaattia glukonasturtiinia on runsaasti mm. kaalien, rypsin, rapsin ja sinapin juurissa ja metyyliotiobutyliä kaaleissa.

Runsaasti glukosinolaattia sisältävien öljykasvien siemenpuristeessa on glukosinolaatteja, jotka hajoavat siemenpuristeesta vapautuneet kaasut ovat estäneet salaatin siementen itämisen, mutta hyvissä ajoin ennen koetta kostutetusta siemenpuristeesta ei vapautunut itämistä haittaavia kaasuja. Kaasut tunnistettiin isotiosyanaateiksi ja nitriileiksi (Brown & Morra 1995). Myös rapsin siemenpuristeesta ja murskattujen lehtisolujen uutokset estivät salaatin siementen itämistä. Puristeesta myrkyllisyys oli kuitenkin suurempi kuin siitä valmistetun vesiuutteen, joten näyttää siltä, että sekä kaasumaiset että vesiliukoiset yhdisteet vaikuttavat siemenpuristeesta myrkyllisyyteen. Siemenpuristeesta löydettiin pääasiassa goitriinia, mutta pienempiä määriä myös kuutta muuta hydrolyysiyhdistettä (Brown et al. 1991, Brown & Morra 1996).

Angelini et al. (1998) lisäsivät imupaperille sekä myrosinaasia että goitriinin lähtöyhdistettä, epiprogoitriinia. Goitriini sai jo pieninä pitoisuuksina (yli 1 mg ml^{-1} epiprogoitriinia) taimet kasvamaan täysin epänormaalisti ja 15 mg ml^{-1} glukosinolaattia esti itämisen kokonaan.

Vaughn ja Berhow (1998) havaitsivat hietamaahan sekoitetun merikaalin siemenpuristeteen (5 % maan painosta) vähentävän vehnän ja sesbanian taimettumista ja kasvua. Pienemmät puristemäärät estivät vehnän siementen taimettumista, mutta paransivat taimien kasvua, ilmeisesti puristeesta vapautuneen typen vuoksi. Merikaalin siemenpuristeesta syntyy runsaasti sekä goitriinia että sen nitriilimuotoa, 1-syano-2-hydroksi-3-buteenia, mikä kokeissa on estänyt vehnän ja kelta-aulion, *Abutilon theoblasti*, alkeisjuuren kasvua, mutta ei itämistä (Vaughn & Berhow 1998).

Maahan sekoitettu keltasinapin siemenpuriste (glukosinolaatti on p-hydroksibentsyyli) on vähentänyt voimakkaasti kasvien taimettumista ja kasvua (Johansson & Ascard 1994, Laitinen et al. 1994).

Ristikukkaiskasvien jätteet ovat myös viljelykasveille myrkyllisiä. Vaikutukset voivat näkyä glukosinolaatti-pitoisen kasvijätteen levityksen jälkeen viljelykasvin heikkona taimettumisena ja kasvuna. Mojtahedin et al. (1993) kokeissa perunan istutus keväällä välittömästi rapsin vihermassan (44 t ha⁻¹) muokkauksen jälkeen heikensi perunan taimettumista ja aiheutti kitukasvuisuutta.

Viljelykasvien altiudessa on suuria eroja. Istutettavat kasvit kestävät paremmin kuin siemenistä kasvatettavat ja suurisemeniset kasvit paremmin kuin pienisemeniset (Oleszek 1987, Johansson & Ascard 1994, Petersen et al. 1999).

Jaakkolan (1999) kokeissa vehnän orastuminen heikkeni 80 % ja ohran 60 % kontrolliin verrattuna, kun keltasinapin siemenpuristetta sekoitettiin kylvön yhteydessä maahan 625 kg ha⁻¹.

Johanssonin & Ascardin (1994) kokeissa porkkana, sokerijuurikas, kaura ja rapsi olivat taimiasteella arkoja keltasinapin siemenpuristeelle. Luumu ja omena kestivät hyvin ja mustaherukka kohtalaisesti suurina puristemääriä (2000 kg ha⁻¹). Myrkylliset yhdisteet häviävät kuitenkin hyvin nopeasti kasvijätteen hajotessa. Dalen (1986) mukaan kaksi päivää ennen kylvöä maahan sekoitettu bentsyyli-isotiosyanaatti ei enää vaikuttanut sementen itämiseen.

Vaikka laboratoriokokeissa murskatut kasvit ja glukosinolaattien hydrolyysiyhdisteet ovat estäneet sementen itämistä ja taimien kasvua, on pelto-oloissa teho rikkakasveihin ollut riittämätön. (Johansson & Ascard 1994, Boydston & Hang 1995, Vaughn & Boydston 1997).

Syinä voivat olla mm. kasvijätteen epätasainen sekoittuminen, rikkakasvien sementen valikoiva kestävyys ja/tai hajoamistuotteiden nopea häviäminen. Runsaankin vihermassamäärän levityksen jälkeen glukosinolaattien hajoamistuotteiden pitoi-

suus maassa näyttää olevan liian alhainen rikkakasvien hyväksyttävään torjuntaan. Gardinerin et al. (1999) mittauksissa isotiosyanaatti-pitoisuus ylitti harvoin 1 nmol g⁻¹ kuivaa maata, vaikka rapsin vihermassaa sekoitettiin noin 7000 kg ha⁻¹. Maan desinfiointiin suositellaan käytettäväksi metyyli-isotiosyanaattia 517–1294 nmol g⁻¹ kuivaa maata (Gardiner et al. 1999).

Vaikka rapsin siemenpuristeen glukosinolaatti-pitoisuus on huomattavasti suurempi kuin versojen, on puristeen teho ollut versoja heikompi, ilmeisesti isotiosyanaattien nopean sitoutumisen vuoksi siemenpuristeessa (Brown & Morra 1995, 1996).

Jotta glukosinolaatti-pitoisista kasveista saataisiin paras hyöty rikkakasvien torjunnassa, tulisi tutkia, mitkä yhdisteet ja pitoisuudet ovat eri kasveille haitallisimpia. Lisäksi olisi selvitettävä, miten olosuhteet ja muokkaus aika vaikuttavat yhdisteiden myrkyllisyyteen maassa ja onko pienellä, mutta jatkuvalla yhdisteiden tuotannolla vaikutusta rikkakasveihin. Viljelykiertoon, viherkesannoksi ja siemenpuristetta varten olisi kehittävä glukosinolaateiltaan entistä tehokkaampia ristikukkaiskasveja. Lisäksi olisi selvitettävä varoajat viljelykasvien kylvämiseksi. Ainoaksi torjuntakeinoksi em. menetelmät eivät valikoivuutensa vuoksi yleensä riitä, mutta ovat luonnollisia lisäkeinoja rikkakasvien vähentämisessä.

Ristikukkaiskasvien juurista erittyy pieniä määriä glukosinolaatti-yhdisteitä kasvun aikana. On arveltu, etteivät kasvavat ristikukkaiskasvit eritä allelokemikaaleja siinä määrin, että niillä olisi merkitystä ristikukkaiskasvien leviämiseksi (Choesin & Boerner 1991, Dietz et al. 1996).

3.4.2 Taudinaiheuttajat

Ristikukkaiskasvilla on todettu olevan joissakin viljelykierrossa edullinen jälkivaikutus. Esikasvina ollessaan ne ovat parantaneet mm. herneen (Chan & Close 1987, Muelchen et al. 1990, Williams-Woodward et al. 1997), vesimelonin (Keinath

1996) ja vehnän (Angus et al. 1991, Kirkegaard et al. 1993, 1994, 1996, Sarwar et al. 1998) kasvua. Edullinen vaikutus on johtunut todennäköisimmin ristikukkaiskasveista maahan vapautuvista yhdisteistä, jotka ovat vähentäneet maalevintäisiä kasvitauteja. Esikasvin edullinen jälkivaikutus voi perustua myös parantuneeseen maan rakenteeseen tai veden ja ravinteiden saatavuuteen. Vehnän parempaa kasvua mustasinapin tai rapsin jälkeen nämä tekijät eivät selittäneet (Cresswell & Kirkegaard 1995, Kirkegaard et al. 1993, 1996).

Ristikukkaisista kasveista vapautuvat yhdisteet vaikuttavat joko suoraan taudinaiheuttajaan tai lisäävät taudinaiheuttajan kanssa kilpailevia mikrobeja (Smolinska 2000). Maatuvien kasvijätteen vaikutusmekanismit taudinaiheuttajiin tunnetaan vain harvoissa tapauksissa. Pelto-oloissa ristikukkaiskasvien jätteen vaikutus on usein ollut vaihteleva ja huonosti ennustettavissa monien, yhtä aikaa maassa vaikuttavien tekijöiden vuoksi. Näyttöjä ristikukkaiskasvien maata puhdistavista vaikutuksista on kuitenkin jo niin runsaasti, että Kirkegaard & Sarwar (1998) käyttävät termiä ”*biofumigation brassicas*” kuvaamaan ristikukkaiskasvien merkitystä maan desinfiointiaineena.

Glukosinolaatti-pitoisten kasvien vaikutusta on ehkä eniten tutkittu herneen lakastumistautia, *Aphanomyces euthei* f. *pisi*, vastaan. Eri väli- ja viherkesantokasveilla on havaittu olevan erilainen herneen esikasviarvo lakastumistautiin saastuneessa maassa. Runsaasti glukosinolaattia sisältävän rapsin, ”Troy”-kauran tai ”Jubilee”-maissin murskaus maahan viiden viikon kasvatuksen jälkeen paransi herneen kasvua ja vähensi tautiin sairastuneiden herneiden osuutta. Sinimailasen jälkeen herneen tautisuus lisääntyi ja ”Dane”-kauran sekä tarhapavun jälkeen pysyi kesannon tasolla. Maahan sekoitetun vihermassan määrällä ei ollut yhteyttä taudin vähenemiseen, sillä maissin ja tarhapavun tuoretta kasvimassaa sekoitettiin maahan yli kaksi kertaa enemmän kuin rapsin tai kauran kasvimassaa (Williams-Woodward et al. 1997). Chanin & Closen (1987) mu-

kaan herneellä esiintyi lakastumistautia vähemmän neljä kuukautta saastuneessa maassa kasvaneen rapsikasvuston murskauksen jälkeen kuin kesannon, valkoapilan tai vehnän jälkeen. Kun saastunta oli heikko, herneen tautisuus väheni lähes 50 % esikasvina olleen ristikukkaiskasvin jälkeen, mutta kun saastunta oli keinotekoisesti voimakas, mikään esikasveista ei vähentänyt herneen tautisuutta (Chan & Close 1987).

Keltasinapin kylvö heti herneen jälkeen ja murskaus syystalvella vähensi seuraavan hernekasvuston oireita, mutta ei vaikuttanut satoon, koska herneen taimettuminen kärsi keltasinapin jätteen vuoksi. Jatkamalla herne-keltasinappikiertoa herneen sato kuitenkin parani (Muehlchen et al. 1990).

Lewiksen & Papavizas (1971) kokeissa murskatuista kaalin lehdistä vapautuneet kaasut vähensivät herneen lakastumistautia, muuttivat itiöiden morfologiaa ja heikensivät niiden kehitystä sekä rihmaston kasvua. Murskatuilla maissin lehdistä ei ollut samanlaista vaikutusta. Maahan sekoitetut 2-propenyyl- ja metyyli-isotiosyanaatit sekä eräät sulfidit, joita kaalikasveista haihtuu, vähensivät herneen lakastumistautia yli 90 %. Tutkijat (Lewis & Papavizas 1971) eivät kuitenkaan löytäneet maan pinnasta kaalimurskan sekoituksen jälkeen isotiosyanaatteja, vaikka sama kaalimurska vähensi selvästi herneen saastuntaa. Runsaasti glukosinolaattia sisältävän ”Dwarf Essex”-rapsin siemenpuriste alensi voimakkaasti herneen lakastumistaudin munaitiöiden tartuttamiskykyä ja rihmaston kasvua, samoin kuin siitä tehty vesiuute. Vähän glukosinolaattia sisältävä ”Stonewall”-rapsin puriste ja puriste, josta myrosinaasi oli tuhattu, heikensivät itiöitä vain vähän (Smolinska et al. 1997).

Ramirez-Villapudua & Munnece (1987) tutkivat astiakokein maahan sekoitetun ristikukkaiskasvijätteen vaikutusta kaalin taimipoltesieneen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Jäte paransi kaalien kasvua saastutetussa maassa verrattuna sinimailasen, vehnän tai kananlannan levitykseen tai

käsittelemättömään maahan. Kaalijäte kuitenkin esti sieni-itiöiden kehitystä vain kaasutiivissä astioissa, joissa kaasujen konsentraatio nousi riittävän korkealle. Maan peittäminen ja kuumentaminen lähelle 40 °C:tta lisäsi ristikukkaisjätteen tehoa taimipoltesieniin (Ramidez-Villapudua & Munnecke 1987) sekä *Pythium*-mätään ja *Sclerotium rolfii*-sieniin, sillä kuumentaminen on lisännyt isotiosyanaattien konsentraatiota (Gamliel ja Stapleton 1993). Kaalin jätteitä sisältävästä, kuumennetusta maasta vapautui isotiosyanaatteja, aldehydejä, alkoholeja ja sulfideja, kun taas kuumentamattomasta maasta vapautui pääasiassa etanolia ja etikkahappoa (Gamliel & Stapleton 1993). Gamliel & Stapletonin (1993) arvelivat, että *Pythium*- ja *Sclerotium*-sienien väheneminen kuumennetusta, kaalijätettä sisältävästä maasta oli seurausta yhdisteiden myrkyllisyydestä, kuumentamisesta sekä mikrobien suhteiden muutoksista. Maan mikrobiologinen aktiivisuus lisääntyi noin viikon ajaksi kaalijätteen sekoittamisen jälkeen, kun mikrobit alkoivat hajottaa orgaanista ainesta. Lahottajamikrobit eivät näyttäneet olevan yhtä herkkiä jätteistä haihtuville kaasuille kuin *Pythium*- ja *Sclerotium*-sienet (Gamliel & Stapleton 1993). Ramidez-Villapuduan & Munnecken (1988) mukaan kaalijätteen kaasujen johtaminen maahan lisäsi bakteerien määrän 16-kertaiseksi, vähensi sienten määrää 20 %:lla lukuunottamatta *Penicillium*- ja *Aspergillus*-lajeja, jotka pysyivät ennallaan tai kasvoivat ja *Actinomycetes*-lajeja, jotka pysyivät ennallaan.

Scott & Knudsen (1999) eivät havainneet rapsikasvuston maahan sekoituksen vaikuttavan oleellisesti herneen juuriston bakteeripopulaatioon eikä myöskään juurinysträbakteereihin. Smolinskan (2000) kokeissa ainoastaan sareptansinapin jätteet heikensivät *Fusarium oxysporium* -sienen kestoitiöiden itämistä, vaikka sekä sareptansinapin että rapsin jätteet lisäsivät massa elävien muiden mikrobien määrää. Smolinskan (2000) tutkimuksen mukaan pelkkä mikrobiaktiivisuuden nousu ei riitä vähentämään kestoitiöitä, vaan sareptan-

sinapin myrkylliset yhdisteet olivat ainakin osittain syynä kestoitiöiden elinkyvyn heikkenemiseen. Kokeissa maahan sekoitetut kasvien kuiva-ainemäärät ovat yleisesti olleet 0,5–2 % maan kuivapainosta.

Kaasuuntuvat isotiosyanaatit, erityisesti 2-propenyylisotiosyanaatti, on todettu mikro-organismeille erittäin myrkylliseksi (Mari et al. 1993, Mayton et al. 1996, Charon & Sams 1999, Smolinska & Horbowicz 1999). Lewiksen & Papavizasin (1971) maljakokeissa 2-propenyylisotiosyanaatti esti herneen lakastumistaudin rihmaston kasvun 0,04 ppm:n pitoisuutena, munaitiöiden muodostumisen 0,10 ppm:n ja itämisen 0,30 ppm:n pitoisuutena. Holleyn & Jonesin (1985) kokeissa 2-propenyylisotiosyanaattikaasun pienin vaikuttava annos *Nematospora*-hiivasientä vastaan oli 20–35 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Hiivoille ja bakteereille erittäin myrkyllisiä rikkiyhdisteitä, 2-propenyylisotiosyanaattia ja metyyylimetaanitiosulfinaattia (MMTSO), joka ei kuulu glukosinolaattien hajoamistuotteisiin, on eristetty mm. kaalimehusta. 2-propenyylisotiosyanaatin pienin vaikuttava pitoisuus hiivoille oli vain 1–4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ja bakteereille 50–500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ja metyyylimetaanitiosulfinaatin 6–10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ja 50–200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Kyung & Fleming 1997). Schreiner & Koide (1993) eristivät sienimyrkkyjä lukuisten ristikukkaiskasvien juurista, mutta vain keltasinapin juurista eristetty p-hydroksibentsyyliisotiosyanaatti esti mykorrhizasientien *Glomus intraradices* ja *G. etunicatum* itämisen agar-alustalla.

Mari et al. (1993) testasivat kuuden glukosinolaatin isotiosyanaatti-johdannaisen kykyä torjua hedelmien varastotauteja aiheuttavia sieniä. Glukosinolaatit eristettiin ristikukkaisten siemenistä ja myrosinaasi keltasinapista. Tutkijat (Mari et al. 1993) havaitsivat, että 2-propenyylisotiosyanaatti oli laaja-alaisin kaasu, joka esti hedelmien varastotauteja aiheuttavien sieni-itiöiden itämistä samoin kuin rihmaston kasvua. Sienten välillä oli suuria herkkyseroja. *Mucor piriformiksen* ja versotaudin, *Monilia laxa*, itiöt olivat helpoiten

torjuttavissa. Agariin sekoitettuna 3-metyylisulfinyyli-3-butenyyli- ja 2-propenyylisotiosyanaatit olivat sienirihmastoille myrkyllisimpiä. Useimmat agariin sekoitetut hydrolyysiyhdisteet paransivat versotaudin rihmaston kasvua.

Drobnica et al. (1967) havaitsivat 11 eri isotiosyanaatin liukoisuudessa eroja, jotka vaikuttivat kasvatusalustaan liuotettujen yhdisteiden myrkyllisyyteen. *Aspergillus*-, *Penicillium*- ja *Rhizopus*-sieniä vastaan 2-fenylylietyyli-isotiosyanaatti oli 30 kertaa myrkyllisempi, bentsyyli-isotiosyanaatti 4 kertaa myrkyllisempi ja 4-metoksibentsyyli-isotiosyanaatti 8 kertaa myrkyllisempi kuin 2-propenyylisotiosyanaatti. Tyypillistä kaikille tutkituille isotiosyanaateille oli se, että pitoisuuksina, joissa ne eivät estäneet rihmaston kasvua, ne viivästyttivät itiöintiä (Drobnica et al. 1967).

Manicin et al. (1997) kokeissa 3-metyylisulfinyyli-3-propenyylipropyyli-, 4-metyylitiobutyylisulfinyyli-, 3-metyylisulfonylipropyylisulfinyyli- ja bentsyyli-glukosinolaattien hydrolyysituotteet estivät voimakkaimmin tyvitautin, *Fusarium culmorum*, rihmaston kasvua agar-alustalla. Kun em. glukosinolaattien pitoisuus alustalla oli 0,1 mg ml⁻¹, rihmaston kasvu väheni 50 %:lla. Myrkyllisin hajoamisyhdiste syntyi alifaattisesta 3-metyylisulfinyyli-3-propenyylipropyylisulfinyylistä. Sen E₅₀-arvo (annos, jolla saadaan 50 % teho) oli 0,05 mg ml⁻¹ *Rhizoctonia solani*-, *Sclerotinia sclerotiorum*-, *Diaporthe phaseolorum*- ja *Pythium irregulare*-sieniin. Liukoinen bentsyyli-isotiosyanaatti oli myrkyllisempi kuin propenyylisotiosyanaatti tai butenyylisotiosyanaatit (Manici et al. 1997).

Isotiosyanaatteja muodostavien glukosinolaattien on arveltu vaikuttavan ristikkukaisten kasvien taudinkestävyyteen (Greenhalg & Mitchell 1976, Mithen et al. 1987). Kasvinosan glukosinolaatti-pitoisuus ei kuitenkaan ole korreloinut taudinkestävyyden kanssa (Holley & Jones 1985, Doughty et al. 1996, Li et al. 1999).

3.4.3 Ankeroiset ja hyönteiset

Kun on käytetty ristikkukaiskasveja esi-

kumppanuuskasvina ja viherkesantona, on voitu vähentää joidenkin ankeroislajien määrää ja niiden viljelykasveille aiheuttamia vioituksia (Winkler & Otto 1980, Mojtahedi et al. 1991, 1993). Ristikukkaiskasvien vaikutuksen arvellaan johtuvan ainakin osittain glukosinolaattien hajoamistuotteista.

Mojtahedi et al. (1991) havaitsivat esikasvina olevan rapsin kesantoa tehokkaammaksi ja rapsin vihermassan vehnän vihermassaa tehokkaammaksi äkämäankerosten, *Meloidogyne chitwoodi*, vähentäjäksi. Vaikutukset *M. incognitaa*n ja *M. javanicaa*n eivät ole olleet yhtä selkeät (Johnson et al. 1992). Maahan sekoitetut rapsin ja merisinapin siemenpuristeet ovat vähentäneet äkämäankeraisia (Walker 1996).

Mojtahedin et al. (1993) kasvihuonekokeissa viherlannoitus rapsin lehtisilpulla (pääasiassa glukonapiinia, glukobrassapiinia, progoitriinia ja glukonasturtiinia) vaikutti edullisemmin kuin juurisilppu (glukonasturtiinia) ja piti juuriäkämäankeriset loitolla perunan istutusrivistä usean viikon ajan. Verrattuna glukosinolaattiyhdisteiden häviämisenopeuteen vaikutusaika tuntuu pitkältä.

Gardinerin et al. (1999) kokeissa rapsikasvuston murskauksen jälkeen maasta löytyi vain juurten tuottamia glukosinolaattien hajoamistuotteita, vaikka suurin osa maahan sekoitetusta vihermassasta oli rapsin maanpäällistä kasvustoa. Ristikukkaisjätteen pitkä vaikutus saattaa johtua monien tekijöiden summasta. On havaittu mm., että ammoniumtypen, runsastyyppisen kasvijätteen ja suurten kananlantamäärien lisääminen maahan vähentää ankeraisia (Kaplan & Noe 1993, Crow et al. 1996).

Ellenbyn (1944) mukaan kelta- ja mustasinapin juurieritteet sekä 2-propenyylisotiosyanaatti estivät peruna-ankerosten toukkien kuoriutumista, kun niitä sekoitettiin perunan juurieritteiden joukkoon. Forrestin & Farrerin (1983) kokeissa ankeraisen munia sisältävien kystien siirto puhtaaseen perunan juurieritteeseen kuitenkin kumosi sinapin vaikutuksen.

Sareptansinapin siemenpuriste on ruuk-

kukokeissa hidastanut perunan kysta-anke-roisen toukkien kehitystä noin kolmella viikolla, mutta keltasinapin puristejätteellä ei ole ollut samanlaista vaikutusta (Laitinen et al. 1994). Sareptan- ja mustasinapin pääglukosinolaatti on sinigrini ja keltasinapin sinalbiini (Kirkegaard & Sarwar 1998). Laboratoriokokeet glukosinolaattien hydrosyyssi-yhdisteiden myrkyllisyydestä tukevat Laitisen et al. (1994) havaintoja sinapeista.

Kokeissa 2-propenyylisotiosyanaatti on ollut myrkyllinen peruna-anke-roisten ja juurikasankeroisten toukille sekä *Caenorhabditis elegans*-ankeroisille (Ellenby 1945, Lazzeri et al. 1993, Donkin et al. 1995). Pinton et al. (1997) mukaan kaikki juurikasankeroisen toukat kuolivat 1,0 mg ml⁻¹-pitoisessa sinigriniin ja myrosinaasin liuoksessa vuorokauden kuluessa.

Muita juurikasankeroisten toukille myrkyllisiä glukosinolaatti-yhdisteitä Lazzeri et al. (1993) kokeissa olivat glukoeusiinin, glukotropaeoliinin ja glukonapiinin isotiosyanaatit. Sen sijaan sinalbiinin ja glukorafeniinin hajoamistuotteet olivat myrkyttömiä. Huonekärpäselle 2-propenyylisotiosyanaatin myrkyllisyys on kaasuna ollut torjunta-aineena käytetyn kloropikriinin luokkaa (Peterson et al. 1998). Merikaalin siemenpuristeesta tehty uute oli moskiittojen ja huonekärpäsen torjunnassa teholtaan heikko ja hidas (Tsao et al. 1996). Merikaalin ja rapsin siementen puristeessa on pääasiassa progoitriinia, josta syntyy liukoista goitriinia l. 5-vinyylioksazolidiinitonia (Vaughn & Berhow 1998).

Borek et al. (1998) selvittivät isotiosyanaattien rakenteen ja myrkyllisyyden yhteyttä kastamalla hyönteisen munat ominaisuuksiltaan erilaisiin synteettisiin isotiosyanaatteihin. Myrkyllisimpiä *Limoni*-kuoriaisten munille olivat isotiosyanaatit, joilla oli useita hiiliatomeja tai sulfinyyli-, tio- tai aromaattinen ryhmä. Tulokset tukevat käsitystä isotiosyanaattien vaikutustavasta, minkä mukaan isotiosyanaatit reagoivat herkästi nukleofiilisten yhdisteiden kanssa muodostaen ditiokarbamaatin estereitä SH-ryhmän kanssa, tioureaa NH₂-

ryhmän kanssa ja OH- ryhmän kanssa N-monosubstituoituja tiokarbamaatin estereitä.

Borekin et al. (1998) mukaan isotiosyanaattien myrkyllisyys kovakuoriaisten munille lisääntyi järjestyksessä metyyli < etyyli < propyyli < allyyli < butyyli < fenyyli < bentsyyli < pentyyli < fenyylietyyli < sykloheksyyli < tert-oktyyli < 2-nafytyyli. Isotiosyanaattien suhteellista myrkyllisyyttä muille tuhoojille ei ole tutkittu.

Ristikukkaiskasvit ovat monille anke-roisille (ja eräille maassa eläville hyönteisille) hyviä isäntiä. Tämä on otettava huomioon suunniteltaessa ristikukkaiskasvien viljelyä saastuneella maalla. Rapsia pidetään hyvänä isäntänä juurikasankeroisille ja *H. cruciferae*-ankeroisille (Talatschian 1974, Evans 1984, Harris & Evans 1988), äkämä-ankeroisille, *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi* rodulle 1 ja 2 (Mojtahedi et al. 1991).

Huono isäntä rapsi on *M. incognita* rodulle 1, *M. javanica* (Johnson et al 1992), *Pratylenchus schribleri*-ankeroisille ja *Heterodera glycines*-ankeroisille (Bernard & Montgomery-Dee 1993).

Kasvin glukosinolaatti-pitoisuus on toisinaan yhdistetty niiden anke-roisten vastustuskykyyn. Sen biokemiallinen tausta on edelleenkin heikosti tunnettu (Lazzeri et al. 1993) ja kaippaa enemmän tutkimusta.

3.4.4 Ristikukkaisia kasveja syövät eläimet

Glukosinolaatti-pitoisten kasvien taksonominen sukulaisuus, glukosinolaattien rakenteellinen monimuotoisuus ja kasvien erilainen vastustuskyky niitä syöville hyönteisille ovat tehneet yhdisteistä suosittuja kasvien ja hyönteisten välisen vuorovaikutuksen tutkimuksissa. Glukosinolaateilla on ollut huomattava rooli, kun on kehitetty teoriaa kasvinsyöjä-isäntäsuhteesta. Kattavia yhteenvedoja glukosinolaattien ja kasvinsyöjien vuorovaikutuksesta ovat tehneet mm. Chew (1988b) ja Louda & Mole (1991).

Glukosinolaatteja ja niiden hajoamis-

tuotteita pidetään ristikukkaisten kasvien puolustuskemikaaleina. Niiden arvellaan suojaavan ristikukkaisia kasveja etenkin sellaisia kasvinsyöjiä vastaan, jotka eivät ole sopeutuneet elämään ristikukkaisilla kasveilla (Chew 1988b, Glen et al. 1990, Giannoustaris & Mithen 1995). Olettamuksia tukevat tutkimukset glukosinolaattien hydrolyysituotteiden myrkyllisyydestä hyönteisille ja nisäkkäille (kts. yllä ja Schöne et al. 1997, Thomke et al. 1998). Ristikukkaisille sopeutuneet hyönteiset ovat pystyneet murtamaan glukosinolaattien antaman suojan ja käyttävät niitä hyväkseen isäntäkasvien tunnistamisessa sekä syönnin ja muninnan lisääjänä.

Glukosinolaatti-yhdisteiden vaikutusta hyönteisten käyttäytymiseen halutaan käyttää hyväksi mm. kehittämällä hyönteisiä houkuttavia ja karkoittavia myrkyttömiä kasvinsuojeluaineita, joilla voidaan suojata arvokkaita viljelykasveja. Arvellaan, että näitä yhdisteitä tuottavia geenejä muokkaamalla voidaan kehittää hyönteisiä ja muita kasvintuhoojia paremmin kestäviä kasveja (Pickett et al. 1995).

3.4.4.1 Isäntäkasvin tunnistaminen

Hyönteiset tunnistavat isänniksi kelpaavat kasvit tuoksusta, joka tulvii niitä vastaan niiden lentäessä kasvien yli ja ulkonäön perusteella (Visser 1986, Loon 1996). Ennen kasvin hyväksymistä hyönteisten on saatava lisäksi koskettaa aistielimillään kasvin pintaa (Loon 1996).

Isäntäkasvista haihtuva tuoksu on kokeissa saanut mm. munintakypsät kaalikärpäsnäaraat, kärsäkkäät ja kaalikoit kääntymään tuoksua kohti (Hawkes & Coaker 1979, Nottingham & Coaker 1985, Palaniswamy et al. 1986, Pivnick et al. 1990, Bartlet et al. 1997). Tuoksuja vastaanottavat hermot tunnistavat useita haihtuvia yhdisteitä.

Ristikukkaisten kasvien tunnistamista helpottavia yhdisteitä ovat mm. isotiosyanaatit (Wallbank & Wheatley 1979, Nottingham & Coaker 1985, Bartlet et al.

1993) sekä lehtien pinnasta haihtuvat alkoholit ns. *green leaf volatiles*, joita haihtuu muistakin kuin ristikukkaisista kasveista (Wallbank & Wheatley 1979, Pivnick et al. 1994, Bartlet et al. 1997). Isotiosyanaatit ovat houkutelleet mm. kaalikärpäsiä (Hawkes & Coaker 1979, Nottingham & Coaker 1985), kaalikärpäsen toukkia (Košťál 1992), kaalikoita (Pivnick et al. 1994) ja kärsäkkäitä (Bartlet et al. 1993). Glukosinolaattien hajoamistuotteista lisäksi nitriilit ovat hajukokeissa houkutelleet kärsäkkäitä ja lisänneet isotiosyanaattien houkuttavuutta (Bartlet et al. 1997). Kasveista haihtuvat terpeenit ovat houkutelleet kaalikoita (Pivnick et al. 1994).

Hermosolujen ärsytystä mittaavissa kokeissa on todettu, että mm. kärsäkkäiden ja kaalikärpästen tuntosarvien aistinsolut reagoivat isotiosyanaatteihin, ja eri isotiosyanaattien välillä on ärsyttävyyseroja. Kärsäkkään tuntosarvien soluja ärsyttivät 3-butenyyli- ja 4-pentenyyli-isotiosyanaatit, mutta heikosti haihtuva 2-fenyylietyyli-isotiosyanaatti ei (Bartlet et al. 1993). Kaalikärpäsen tuntosarvien solut reagoivat voimakkaasti 2-propenyyli-isotiosyanaattiin, mutta myös dimetyylidisulfidiin ja eräisiin ”*green leaf*” -yhdisteisiin (Wallbank & Wheatley 1979).

Terveistä ristikukkaiskasveista haihtuu ilmaan pääasiassa alkoholeja, aldehydejä, ketoneita, sulfideja ja terpeenejä (Tollsten & Bergström 1988, Blaakmeer et al. 1994). ”*Green leaf volatiles*” -yhdisteiden uskotaan vaikuttavan useiden hyönteislajien isännän valintaan (Visser 1986). Isotiosyanaatteja haihtuu terveistä ristikukkaiskasveista hyvin vähän (Tollsten & Bergström 1988). Kaasujen haihtuminen lisääntyy, kun kasvit vioittuvat, mutta haihtuvien yhdisteiden koostumus esimerkiksi kaalien lehdiltä, on pysynyt lähes ennallaan (Mattiacci et al. 1994). Blaakmeerin et al. (1994) mukaan ruusukaalin lehdistä ei haihtunut isotiosyanaatteja kaali- ja naurisperhosten syötyä niitä, vaikka ruusukaaleissa on isotiosyanaatteja tuottavia glukosinolaatteja (Doorn et al. 1998). Sen sijaan on lehtilaikutaudin, *Alternaria brassicae*, saastutta-

masta rapsista todettu haihtuvan ilmaan 3-butenyyli-, 4-pentenyyl- ja 2-fenylietyyli-isotiosyanaatteja (Doughty et al. 1996). Ristikukkaiskasvien glukosinolaatti-pitoisuus vaihtelee laajasti riippuen lajista, lajikkeesta ja olosuhteista, mikä selittää eroja haihtuvissa kaasuisissa.

Koska ristikukkaisille sopeutuneet hyönteiset käyttävät isäntäkasveinaan glukosinolaatti-profiileiltaan erilaisia ristikukkaiskasveja, on arveltu, että ristikukkaiskasvin houkuttavuus syntyy useiden haihtuvien yhdisteiden ja konsentraatioiden kokonaisuudesta eikä yksittäisestä yhdisteestä. Kokeissa sinapin lehtiute on houkutelut kaalikoita riippumatta siitä, sisälsikö se isotiosyanaattia vai ei. Sinappiutteen terpeenifraktio houkutteli puolestaan koita isotiosyanaattejakin enemmän (Pivnick et al. 1994). Kaalikärpästen houkuttamiseksi puhtaan isotiosyanaatti-lähteen luo tarvittiin paljon suurempia isotiosyanaatti-määriä, kuin mitä terveistä kaalin taimista normaalisti haihtuu (Finch 1978, 1980, Hawkes & Coker 1979). Keltapyydykset on havaittu hyviksi kärsäkkäiden ja kaalikärpänaaraiden houkuttelijoiksi, mikä osoittaa, että näköaistilla on merkitystä tunnistamisessa. Haihtuvat isotiosyanaatit ovat kuitenkin lisänneet keltapyydysten houkuttavuutta (Wallbank & Wheatley 1979, Smart et al. 1997).

Suuri osa luonnossa kasvavista kasveista on aina jollakin tavoin voittanut, joten glukosinolaattien-hajoamistuotteiden pitoisuus ilmassa voi olla hyönteisten suuntautumisen kannalta riittävän korkea. Havaintojen mukaan ristikukkaisille sopeutuneilla hyönteisillä on isotiosyanaatille herkkiä aistinsoluja. Samoin niiden on havaittu suuntautuvat isotiosyanaatteja kohti. Nämä havainnot tukevat vahvasti olettamusta, jonka mukaan haihtuvilla isotiosyanaateilla (ja nitrileillä) on muiden yhdisteiden ohella merkitystä ristikukkaisille sopeutuneille hyönteisille tunnistettavuuden ja houkuttelevuuden parantajina.

3.4.4.2 Ristikukkaisille sopeutumattomien kasvinsyöjien syönti

Kasvin pinnan kemiallisen koostumuksen arvellaan vaikuttavan suurimmaksi osaksi siihen, hyväksyykö vai hylkääkö kasvinsyöjä lopulta kasvin (Bernays & Chapman 1994). Hyönteisten tuntosarvissa, suosissa ja nilkoissa on kemiallista ja mekaanista kosketusta aistivia soluja, joilla eläin saa tietoja kasvista tunnuksellensa sen pintaa. Arvellaan, että glukosinolaatit vähentävät sellaisten kasvinsyöjien ruokailua, jotka eivät ole sopeutuneet elämään ristikukkaisilla kasveilla (Glen et al. 1990, Louda & Mole 1991). Glukosinolaatit voivat joko suoraan estää syöntiä tai vaikuttaa ruuansulaukseen.

Kasvin glukosinolaatti-pitoisuuden ja voitusten välisestä yhteydestä on kuitenkin olemassa vain muutamia selviä esimerkkejä. Glen et al. (1990) havaitsivat, että etanoiden, *Deroceras reticulatum*, voitusten määrä oli kääntäen verrannollinen rapsin siemenen ja viikon ikäisten tainten glukosinolaatti-pitoisuuteen. Giamoustaris & Mithen (1995) raportoivat, että etanat söivät mieluummin rapsin "00"-lajikkeen lehtiä, joissa alifaattisia glukosinolaatteja oli vähemmän kuin korkea-glukosinolaattisissa "0"-lajikkeen lehdissä. Kokeissa ei kuitenkaan yksittäinen alifaattinen glukosinolaatti vaikuttanut käyttäytymiseen.

Kyyhkysket karttoivat korkea-glukosinolaattisten kasvien siemeniä (Giamoustaris & Mithen 1995). Giamoustaris & Mithen (1995) olettivat, että sekä kokonaisglukosinolaatti-pitoisuus että eri glukosinolaattien suhteelliset osuudet vaikuttavat kasvin ja sitä käyttävän moni-isäntäisen kasvinsyöjän suhteeseen. Bodnarykin (1996) kokeissa moni-isäntäisen yökkösen, *Mamestra configurata*, toukka söi viisi kertaa enemmän matala-glukosinolaattista sareptansinapin lehtiä kuin korkea-glukosinolaattisen kasvin lehtiä.

Yksikään nisäkäslaji ei ole sopeutunut elämään ristikukkaiskasveilla, eikä niillä ole nisäkkäiden ruokavaliossa juurikaan merkitystä (kts. Louda & Mole 1991). Glu-

kosinolaatti-pitoinen ruokavalio aiheuttaa nisäkkäille monenlaisia sairauksia mm. kilpirauhasen laajentuman ja munuaisvaurioita (Schöne et al. 1997, Campbell & Schöne 1998, Thomke et al. 1998). Myrkyllisyydestään huolimatta jotkut nisäkkäät, linnut ja ristikukkaisille sopeutumattomat hyönteiset turvautuvat ajoittain korkea-glukosinolaattisiin kasveihin (Louda & Mole 1991, MacFarlane Smith et al. 1991).

3.4.4.3 Ristikukkaisilla kasveilla elävien hyönteisten syönti

Suurimpia tuhoja ristikukkaiskasveille aiheuttavat niille sopeutuneet hyönteiset, jotka esiintyvät massoittain syöden kasveja glukosinolaattien hajoamistuotteiden myrkyllisyydestä huolimatta. Kasvit pyrkivät suojautumaan myös niille sopeutuneilta hyönteisiltä. Joidenkin tutkijoiden (Mithen 1992, Siemens & Mitchell-Olds 1996) mukaan se, miten paljon ristikukkaiskasveja isäntinään pitävät hyönteiset syövät, riippuu kasvin glukosinolaatti-konsentraatiosta. Mithenin (1992) mukaan matala-glukosinolaattisia rapseja on pellolla syöty enemmän kuin korkea-glukosinolaattisia kantoja.

Siemens & Mitchell-Olds (1996) arvelivat, että ristikukkaisille kasveille sopeutuneiden hyönteisten aiheuttama vioitus riippuu glukosinolaatti-pitoisuudesta ja kasvit ovat altteimpia, kun glukosinolaatti-pitoisuus on keskiverto. Heidän mukaansa sopeutuneet hyönteiset saattavat pyrkiä välttämään korkeita glukosinolaatti-pitoisuuksia, koska ne eivät ehkä kykene tekemään myrkyttömiksi hyvin suuria myrkkymääriä. Mitchell-Olds et al. (1996) havaitsivat, että geneettinen myrosinaasi-aktiivisuuden lisäys paransi kasvien kestävyyttä kirppoja vastaan, tosin siementuotannon kustannuksella.

Vertailemalla matala- ja korkea-glukosinolaattisten kasvien kulutusta useat tutkijat ovat päätyneet tulokseen, etteivät erot glukosinolaatti-pitoisuudessa vaikuta siihen, miten paljon ristikukkaisille kasveil-

le sopeutuneet hyönteiset syövät (Milford et al. 1989, Bartlet et al. 1996, Bodnaryk 1996, Hopkins et al. 1998, 1999). Verkerk & Wright (1996) olettavat, että ristikukkaiskasvien puolustus perustuu ennemmin isäntäkasvin fysiologiseen tilaan ja ravintoarvoon kuin sekundääriaineenvaihdunnan tuotteisiin.

Glukosinolaatit voivat stimuloida ristikukkaisille sopeutuneiden hyönteisten syöntiä. Tehokkaimpia syönnin lisääjiä ovat indolyyliglukosinolaatit (Bartlet et al. 1994). Kasveissa voi olla syöntiä estäviä yhdisteitä. Kaaliperhosen toukkien tiedetään tunnistavan suosillaan sekä syöntiä kiihdyttäviä että estäviä yhdistettä, ja niiden suhteelliset osuudet näyttivät määräävän ruokailukäyttäytymistä (Renwick & Huang 1995). Luonnossa kasveja syövät toukat ja niiden vanhemmat valitsevat isäntäkasvin samaan perusteisiin, mutta joissakin tapauksissa voi olla myös eroja. Kokeissa havaittiin, että perhostoukat valikoivat isäntäkasvinsa aiempien kokemusten perusteella; naurisperhosen toukat tulivat riippuvaisiksi glukosinolaateista vasta muutamia tunteja syötyään niitä (Renwick & Lopez 1999).

3.4.4.4 Ristikukkaisilla kasveilla elävien hyönteisten muninta

Hyönteiset hyväksyvät tai hylkäävät munintapaikan aistiensa varassa (Renwick & Chew 1994, Simmonds et al. 1994, Hopkins et al. 1996). Kaalikärpäsnaaraan on saatava koskettaa joko glukosinolaatteja, isäntäkasvista tehtyä uutetta tai isäntäkasvin pintaa ennen kasvin hyväksymistä (Städler 1978, Städler & Schöni 1990, Košťál 1993, Hopkins et al. 1996). Glukosinolaatit stimuloivat monien ristikukkaisille sopeutuneen hyönteisten munintaa, mutta eivät ole ainoita stimuloivia yhdisteitä. Pikkukaalikärpäsän munintaa kiihdytti glukosinolaattejakin enemmän kaalin lehden pintakerroksesta eristetty haihtumaton yhdiste, CIF, joka ärsytti voimakkaasti naaraan nilkan aistieliimiä (Baur et al. 1996a,

Roessingh et al. 1997). Isokaalikärpäseen yhdiste vaikutti heikommin (Simmonds et al. 1994). Glukosinolaattien tunnistettavuudessa on havaittu eroja. Kaalikärpästen nilkkojen reseptorit ovat herkkiä erityisesti glukobrassikiinille, glukobrassinapiinille ja glukonapiinille, mutta paljon tunnottomampia muille glukosinolaateille, kuten glukoberiinille ja sinigriinille (Roessingh et al. 1992, Simmonds et al. 1994).

Baur et al. (1996a) osoittivat, että kahden alttiin lanttulajikkeen glukosinolaateilla ja CIF-yhdistellä on yhteys kaalikärpästen hermoärsytykseen ja munintakäyttämiseen. Sen sijaan kestävien lajikkeiden aiheuttama hermoärsytys ei selittynyt kokonaan kummallakaan yhdisteellä, eikä se heijastunut munintakäyttöön. Tutkijat (Baur et al. 1996a) olettavat, että kaalin pinnassa on vielä tuntemattomia, munintaa estäviä yhdisteitä. Braven et al. (1996) väittävät, että pikkukaalikärpäsen munintaa stimuloivat monet erilaiset yhdisteet, joissa yhteistä oli vain S=O -ryhmä.

Finch (1978) havaitsi, että kaalikärpäset munivat mielellään isotiosyanaatteja tuottavan kasvin lähelle. Baur et al. (1996b) olettivat, että vioittuneista juurista erittyvä ilmaan kaalikärpäsnaaraita houkuttelevia yhdisteitä, sillä naaraat laskivat munansa mieluiten sellaisen kasvin tyvelle, jossa jo oli toukkia. Herkimmin kasville munittiin uudelleen 2–3 vuorokautta vioituksen alkamisesta (Baur et al. 1996b).

Glukosinolaateilla on oleellinen rooli ristikukkaiskasvien ja kasveja syövien eläinten välisessä vuorovaikutuksessa. Kuinka tärkeitä ne ristikukkaiskasvien puolustuksessa ja hyönteisten infokemikaalina ovat, on edelleen osittain epäselvä.

3.4.5 Glukosinolaatit ja indusoitu puolustus

Vioitukset ja tietyt kemialliset yhdisteet voivat muuttaa ristikukkaiskasveissa esiintyvien glukosinolaattien määrää ja keskinäisiä suhteita. Vioittaminen on useimmiten lisännyt indolyyliglukosinolaatteja ja

vähentänyt alifaattisia glukosinolaatteja (Doughty et al. 1991, Bodnaryk 1992, Hopkins et al. 1998, Bartlet et al. 1999). Kemiallisista yhdisteistä (elitoreista) metyylijasmonaatti ja jasmonihappo ovat lisänneet testikasvina olleen rapsin indoliglukosinolaatin synteesiä (Bodnaryk 1994, Doughty et al. 1995). Salisyylihapolla on ollut sama vaikutus fenyylityylyglukosinolaatin synteesiin (Doughty et al. 1995, Cole 1996). Näyttää siltä, että eri ärsykkeillä voidaan vaikuttaa kasvissa eri glukosinolaattien metaboliareitteihin. Oletetaan, että esim. metyylijasmonaatti on lähettiyhdiste, joka ilmoittaa stressitekijöistä, sillä se on aktiivinen useissa *Brassica*-suvun kasvisoluissa (Doughty et al. 1995).

Monilla kasveilla hyönteisten tai patogeenien vioitus aiheuttaa kemiallisen puolustusreaktion. On arveltu, että vioituksen tai em. kemiallisten yhdisteiden aiheuttama glukosinolaatti-pitoisuuden muutos olisi tällainen puolustusreaktio. Muutamia viitteitä indusoidusta puolustuksesta on olemassa. Li et al. (1999) havaitsivat rapsin pahkahomeen kestävyuden olevan yhteydessä glukosinolaatti-pitoisuuden nousuun koko kasvissa (Li et al. 1999). Salisyylihappokäsittely ennen ristikukkaista imipoltteen, *Alternaria brassicae* ja ristikukkaislehtihomeen, *Peronospora parasitica*, tartuntaa on lisännyt rapsin 2-fenyylityylyglukosinolaattia ja vähentänyt taimien oireita (Doughty et al. 1995). Samoin rapsin juurten salisyylihappokastelu kasvin ollessa 4-lehtiasteella lisäsi myöhemmin kehittyvien lehtien 2-fenyyliglukosinolaatin määrää ja vähensi kaalikirvoja (Cole 1996). Siemens & Mitchell-Olds (1996) havaitsivat kaalikoin ja kirpan vioituksen vähenevän, kun ennen syönnin aloitusta rapsi saastutettiin kuivamätäitiöillä (*Leptosphaeria maculans*), jolloin rapsin glukosinolaattipitoisuus nousi. He eivät kuitenkaan pystyneet selittämään, johtuiko vaikutus glukosinolaateista vai muista tekijöistä.

Glukosinolaattien merkityksestä kasvin indusoidussa puolustuksessa on esitetty vastakkaisiakin näkemyksiä. Colemanin et al. (1996) mukaan kasvin indusoidun puo-

lustuksen tulisi johtaa siihen, että hyönteiset syövät vähemmän tai liikkuvat syöntipaikalta pois päin. Koska kaaliperhosen toukat eivät kuitenkaan käyttäytyneet näin, tutkijat eivät usko glukosinolaattien aiheuttavan indusoitua puolustusta. Bodnaryk (1992) sekä Palaniswamy & Lamb (1992) havaitsivat mekaanisen vioituksen jälkeen, että kirpat söivät kyllä vähemmän, mutta syynä ei ollut sinapin kohonnut glukosinolaatti-pitoisuus, vaan muut, tunnistamattomat tekijät. On edelleen epäselvää, mikä rooli kohonneella glukosinolaatti-pitoisuudella puolustuksessa on.

On arveltu, että glukosinolaatti-pitoisuuden nousu tekisi kasveista jopa alttiim-

pia, sillä indoliglukosinolaattien tiedetään parantavan monien ristikukkaisille sopeutuneen hyönteisten ruokahalua. Indoliglukosinolaattien lisääntymisen on arveltu vaikuttavan kasvisolujen uusiutumiseen (MacFarlane-Smith et al. 1991), sillä ne saattavat olla IAA-kasvuhormonin lähtöyhdisteenä (Rausch et al. 1983). Birch et al. (1992) arvelivat, että glukosinolaatti-pitoisuuden muutokset voivat vaikuttaa herbivorin seuraaviin sukupolviin ja myöhemmin esiintyviin kasvinsyöjiin. Cole (1996) puolestaan oletti, että kohonnut fenyyliglukosinolaatti-pitoisuus salisyylihappo-käsittelyn jälkeen liittyy salisyylihapon myrkyttömäksi tekemiseen.

Kirjallisuus

Agerbirk, N., Olsen, C.E. & Sørensen, H. 1998. Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1563–1571.

Angelini, L., Lazzeri, L., Galletti, S., Cozzani, A., Macchia, M. & Palmieri, S. 1998. Antigerminative activity of three glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *Seed Science & Technology* 26: 771–780.

Angus, J.F., Gardiner, P.A., Kirkegaard, J.A. & Desmarchelier, J.M. 1994. Biofumigation: isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* 162: 107–112.

–, **van Herwaarden, A. & Howe, G.** 1991. Productivity and break-crop effect of winter growing oilseeds. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 31: 669–677.

Bartlet, E., Blight, M.M., Hick, A.J. & Williams, I.H. 1993. The responses of the cabbage seed weevil (*Ceutorhynchus assimilis*) to the odour of oilseed rape (*Brassica napus*) and to some volatile isothiocyanates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 68: 295–302.

–, **Blight, M.M., Lane, P. & Williams, I.H.** 1997. The responses of the cabbage seed weevil *Ceutorhynchus assimilis* to volatile compounds from oilseed rape in linear track olfactometer. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85: 257–262.

–, **Kiddle, G., Williams, I. & Wallsgrave, R.** 1999. Wound-induced increases in the glucosinolate content of oilseed rape and their effect on subsequent herbivory by a crucifer specialist. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 163–167.

–, **Mithen, R. & Clark, S.J.** 1996. Feeding of the cabbage stem flea beetle *Psylliodes chrysocephala* on high and low glucosinolate cultivars of oilseed rape. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 87–89.

–, **Parsons, D., Williams, I. & Clark, S.** 1994. The influence of glucosinolates and sugars on feeding by the cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephala*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 73: 77–83.

Baur, R., Birch, A.N.E., Hopkins, R.J., Griffiths, D.W., Simmonds, M.S.J. & Städler, E. 1996a. Oviposition and chemosensory stimulation of the root flies *Delia radicum* and *D. floralis* in response to plants and leaf surface extracts from resistant and susceptible *Brassica* genotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 78: 61–75.

- , **Kostal, V. & Städler, E.** 1996b. Root damage by conspecific larvae induces preference for oviposition in cabbage root flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 224–227.
- Ben-Yephet, Y. & Frank, Z.R.** 1985. Effect of soil structure on penetration by metham-sodium and temperature on concentrations required to kill soilborne pathogens. *Phytopathology* 75: 403–406.
- Bernard, E.C. & Montgomery-Dee, M.E.** 1993. Reproduction of plant-parasitic nematodes on winter rapeseed (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Journal of Nematology* 25: 863–868.
- Bernays, E.A. & Chapman, R.F.** 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. *Contemporary topics in entomology* 2. New York: Chapman & Hall. 312 p.
- Bialy, Z., Oleszek, W., Lewis, J. & Fenwick, G.R.** 1990. Allelopathic potential of glucosinolates (mustard oil glycosides) and their degradation products against wheat. *Plant and Soil* 129: 277–281.
- Birch, A.N.E., Griffiths, D.W., Hopkins, R.J., MacFarlane-Smith, W.H. & McKinlay, R.G.** 1992. Glucosinolate in responses of swede, kale, forage and oilseed rape to root damage by turnip root fly (*Delia floralis*) larvae. *Journal of Scientific Food and Agriculture* 60: 1–9.
- Björkman, R.** 1973. Interaction between proteins and glucosinolate isothiocyanates and oxazolidinethiones from *Brassica napus* seed. *Phytochemistry* 12: 1585–1590.
- Blaakmeer, A., Geervliet, J.B.F., Loon, J.J. van, Posthumus, M.A., Beek, T.A. van & de Groot, A.E.** 1994. Comparative headspace analysis of cabbage plants damaged by two species of *Pieris* caterpillars: consequences for in-flight host location by *Cotesia parasitoides*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 73: 175–182.
- Bodnaryk, R.** 1992. Effects of wounding on glucosinolates in the cotyledons of oilseed rape and mustard. *Phytochemistry* 31: 2671–2677.
- 1994. Potent effect of jasmonates on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard. *Phytochemistry* 35: 301–305.
- 1996. Will low-glucosinolate cultivars of the mustards *Brassica juncea* and *Sinapis alba* be vulnerable to insect pests? *Canadian Journal of Plant Science* 77: 283–287.
- Borek, V., Elberson, L.R. McCaffrey, J.P. & Morra, M.J.** 1995a. Toxicity of aliphatic and aromatic isothiocyanates to eggs of the black vine weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economical Entomology* 88: 1192–1196.
- , **Elberson, L.R., McCaffrey, J. & Morra, M.** 1998. Toxicity of isothiocyanates produced by glucosinolates in *Brassicaceae* species to black vine weevil eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 5318–5323.
- , **Morra, M., Brown, P. & McCaffrey, J.** 1994. Allelochemicals produced during sinigrin decomposition in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1030–1034.
- , **Morra, M., Brown, P. & McCaffrey, J.** 1995b. Formation of the Glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1935–1940.
- , **Morra, M. & McCaffrey, J.** 1996. Myrosinase activity in soil extracts. *Soil Science Society of America Journal* 60: 1792–1797.
- Boydston, R.A. & Hang, A.** 1995. Rapeseed (*Brassica napus*) green manure crop suppress weeds in potato (*Solanum tuberosum*). *Weed Technology* 9: 669–675.
- Braven, J., Chilcott, N.P. & Hawkes, C.** 1996. Structure-activity relationships in glucosinolates and other compounds stimulating oviposition in the cabbage root fly (*Delia radicum*). *Journal of Chemical Ecology* 22: 1567–1578.
- Brian, R.C.** 1976. The history and classification of herbicides. In: Audus, L.J. (ed.). *Herbicides, physiology, biochemistry, ecology*. 2nd. ed. London: Academic Press. p. 1–54. ISBN 0 12 067701 6.
- Brown, P.D. & Morra, M.J.** 1993. Fate of ionic thiocyanate (SCN⁻) in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 978–982.
- & **Morra, M.J.** 1995. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 3070–3074.
- & **Morra, M.J.** 1996. Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination. *Plant and Soil* 181: 307–316.
- & **Morra, M.J.** 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy* 61: 167–231.

- , **Morra, M.J., Mc Caffrey, J.P., Auld, D.L. & Williams, L.** 1991. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *Journal of Chemical Ecology* 17: 2021–2034.
- Campbell, L.D. & Schöne, F.** 1998. Effects of antinutritional factors in rapeseed. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and rapeseed. Series: EAAP European Association for Animal Production Publication 93:185–198.
- Chan, M.K.Y. & Close, R.C.** 1987. *Aphanomyces* root-rot of peas 3. Control by use of cruciferous amendments. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 30: 225–233.
- Charron, C.S. & Sams, C.** 1999. Inhibition of *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of *Brassica* species. *Journal of American Society for Horticultural Science* 124: 462–467.
- Chew, F.S.** 1988a. Biological effects of glucosinolates. In: Cutler, H. (ed.). *Biologically active natural products. Potential use in agriculture*. 2nd ed. Washington DC: American Chemical Society. p. 155–181. ISBN 0-8412-1556-1.
- 1988b. Searching for defensive chemistry in the Cruciferae, or, do glucosinolates always control interactions of Cruciferae with their potential herbivores and symbionts? No ! In: Spencer, K. (ed.). *Chemical mediation of coevolution*. San Diego: Academic Press. p. 81–112. ISBN 0-12-656856-1.
- Chin, H.-W., Zeng, Q. & Lindsay, R.C.** 1996. Occurrence and flavor properties of sinigrin hydrolysis products in fresh cabbage. *Journal of Food Science* 61: 101–104.
- Choesin, D.V. & Boerner, R.E.** 1991. Allyl isothiocyanate release and the allelopathic potential of *Brassica napus* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany* 78: 1083–1090.
- Cole, R.** 1996. Abiotic induction of changes to glucosinolate profiles in *Brassica* species and increased resistance to the specialist aphid *Brevicoryne brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 228–230.
- & **Finch, S.** 1978. Vapours from intact plants. In: Annual report – National Vegetable Research Station year 1977. p. 84. ISSN 0510-002x.
- Coleman, R.A., Baker, A.M. & Fenner, M.** 1996. Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) fails to show wound-induced defence against a specialist and a generalist herbivore? *Oecologia* 198: 105–112.
- Cresswell, H. & Kirkegaard, J.** 1995. Subsoil amelioration by plant roots: the process and the evidence. *Australian Journal of Soil Research* 32: 221–239.
- Crow, W.T., Guertal, E.A. & Rodrigues-Kabana, R.** 1996. Response of *Meloidogyne arenaria* and *M. incognita* to green manures and supplemental urea in glasshouse culture. *Journal of Nematology* 28: 648–654.
- Dale, J.** 1986. Decline in phytotoxicity of benzyl isothiocyanate formulated as granules. *Weed Science* 34: 325–327.
- Dietz, H., Steinlein, T., Winterhalter, P. & Ullman, I.** 1996. Role of allelopathy as a possible factor associated with the rising dominance of *Bunias orientalis* L. (*Brassicaceae*) in some native plant assemblages. *Journal of Chemical Ecology* 22: 1797–1811.
- Donkin, S., Eiteman, M. & Williams, P.** 1995. Toxicity of glucosinolates and their enzymatic decomposition products to *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology* 27: 258–262.
- Doorn, H. van, Kruk, G. van der, Holst, G.-J., Raaijmakers, N., Postma, E., Groeneweg, B. & Jongen, W.** 1998. The glucosinolates sinigrin and progoitrin are important determinants for taste preference and bitterness of brussels sprouts. *Journal of Scientific Food and Agriculture* 78: 30–38.
- Doughty, K., Blight, M., Bock, C., Fieldsend, J. & Pickett, J.** 1996. Release of alkenyl isothiosyanates and other volatiles from *Brassica rapa* seedlings during infection by *Alternaria brassicae*. *Phytochemistry* 43: 371–374.
- , **Kiddle, G., Pye, B., Wallsgrave, R. & Pickett, J.** 1995. Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate. *Phytochemistry* 38: 347–350.
- , **Porter, A., Morton, A., Kiddle, G., Bock, C. & Wallsgrave, R.** 1991. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape leaves. II. Response to infection by *Alternaria brassicae* (Berk). *Sacc. Annals of Applied Biology* 118: 469–477.
- Drobnica, L., Zemanová, M., Nemeč, P., Antoš, K., Kristián, P., Štullerová, A., Knoppová, V. & Nemeč, P.J.R.** 1967. Antifungal activity of isothiosyanates and related compounds. *Applied Microbiology* 15: 701–709.
- Duncan, H.J., Cook, G.T. & Stephen, N.H.** 1989. Thiocyanate: mode of action as a herbicide and herbicide adjuvant. In: Chow, P.N. et al. (eds.). *Adjuvants and Agrochemicals vol 1*. Boca Raton, Florida: CRC Press. p. 28–33. ISBN 0-8493-6532-3.

- Ellenby, C.** 1944. The influence of crucifers and mustard oil on the emergence of larvae of the potato-root eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Annals of Applied Biology* 32: 67–70.
- 1945. Control of the potato-root eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber, by allyl isothiocyanate, the mustard oil of *Brassica nigra* L. *Annals of Applied Biology* 32: 237–239.
- Evans, K.** 1984. Cyst nematode problems on oilseed rape. *Annals of Applied Biology* 6: 275–279.
- Finch, S.** 1978. Volatile plant chemicals and their effect on host plant finding by the cabbage root fly (*Delia brassicae*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 350–359.
- 1980. Chemical attraction of plant-feeding insects to plants. In: Coaker, T.H. (ed.). *Applied Biology* 5. New York. p. 67–143.
- Forrest, J.M.S. & Farrer, L.A.** 1983. The response of eggs of the white potato cyst nematode *Globodera pallida* to diffusate from potato and mustard roots. *Annals of Applied Biology* 103: 283–289.
- Gamliel, A. & Stapelton, J.** 1993. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83: 899–905.
- Gan, J., Papiernik, S.K., Yates, S.R. & Jury, W.A.** 1999. Temperature and moisture effects on fumigant degradation in soil. *Journal of Environmental Quality* 28: 1436–1441.
- Gardiner, J., Morra, M. J., Eberlein, C.V., Brown, P.D. & Borek, V.** 1999. Allelochemicals released in soil following incorporation of rapeseed (*Brassica napus*) green manures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3837–3842.
- Gerstl, Z., Mingelgrin, U. & Yaron, B.** 1977. Behaviour of Vapam and MIT in soils. *Proceedings of the Soil Science Society of America* 41: 545–548.
- Giamoustaris, A. & Mithen, R.** 1995. The effect of modifying the glucosinolate content of leaves of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) on its interaction with specialist and generalist pests. *Annales of Applied Biology* 126: 347–363.
- Glen, D.M., Jones, H. & Fieldsend, J.K.** 1990. Damage to oilseed rape seedlings by the field slug *Deroceras reticulatum* in relation to glucosinolate concentration. *Annales of Applied Biology* 117: 197–207.
- Greenhalg, J.R. & Mitchell, N.D.** 1976. The involvement of flavour volatiles in the resistance to downy mildew of wild and cultivated forms of *Brassica oleracea*. *New Phytologist* 77: 391–398.
- Hansen, M., Laustsen, A.M., Olsen, C.E. & Poll, L.** 1997. Chemical and sensory quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*). *Journal of Food Quality* 20: 441–459.
- Harris, P.G.W. & Evans, K.** 1988. Field investigation of the responses to nematicide treatment of three winter oilseed rape cultivars infested by *Heterodera cruciferae*. *Crop Protection* 7: 137–142.
- Hasapis, X. & McLeod, A.J.** 1982. Effects of metal ions on benzylglucosinolate degradation in *Lepidium sativum* seed autolysis. *Phytochemistry* 21: 559–563.
- Hawkes, C. & Coaker, T.H.** 1979. Factors affecting the behavioural responses of adult cabbage root fly, *Delia brassicae*, to host plant odour. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 25: 45–58.
- Holley, R.A. & Jones, J.D.** 1985. The role of myrosinase in the development of toxicity toward *Nematospira* in mustard seed. *Canadian Journal of Botany* 63: 521–526.
- Hopkins, R., Ekbohm, B. & Henkow, L.** 1998. Glucosinolate content and susceptibility for insect attack of three populations of *Sinapis alba*. *Journal of Chemical Ecology* 24: 1203–1216.
- , **Wright, F., McKinlay, R. & Birch, A.** 1996. Analysis of sequential behaviour patterns: the oviposition decision of the turnip root fly, *Delia floralis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 93–96.
- Jaakkola, S.** 1999. Sinappirouhetta rikkakasveille. In: Mitä Suomi syö - ja millä hinnalla? Agro-Food '99, Tampere, 2.-4.2.1999. Helsinki: Agro-Food ry. p. P48.
- Johansson, H. & Ascard, J.** 1994. Ogräsbekämpning med senapsexpeller bland träd och buskar. Trädgård 379. Alnarp: Sveriges lantbruksuniversitet. 46 p. ISSN 1101-3753.
- Johnson, A.W., Golden, A.M., Auld, D.L. & Sumner, D.R.** 1992. Effects of rapeseed and vetch as green manure crops and fallow on nematodes and soil-borne pathogens. *Journal of Nematology* 24: 117–126.
- Ju, H., Bible, B. & Chong, C.** 1983. Influence of ionic thiocyanate on growth of cabbage, bean and tobacco. *Journal of Chemical Ecology* 9: 1255–1262.
- Kaplan, M. & Noe, J.P.** 1993. Effects of chicken-excrement amendments on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 25: 71–77.

- Keinath, A.** 1996. Soil amendment with cabbage residue and crop rotation to reduce gummy stem and increase growth and yield of watermelon. *Plant Disease* 80: 564–570.
- Kirkegaard, J., Gardner, P., Angus, J. & Koetz, E.** 1994. Effect of *Brassica* crops on growth and yield of wheat. *Australian Journal of agricultural Research* 45: 529–545.
- , **Gardner, P., Desmarchelier, J. & Angus, J.** 1993. Biofumigation – using *Brassica* species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. In: Wratten, N. & Mailer, R. (eds.). Proceedings of the 9th Australian Research Assembly on Brassicas. Wagga Wagga, NSW: NSW Agriculture. p. 77–82.
- & **Sarwar, M.** 1998. Biofumigation potential of brassicas. I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil* 201: 71–89.
- , **Wong, P. & Desmarchelier, J.** 1996. In vitro suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathology* 45: 593–603.
- Košťal, V.** 1992. Orientation behavior of newly hatched larvae of the cabbage maggot, *Delia radicum* (L.) (*Diptera: Anthomyiidae*), to volatile plant metabolites. *Journal of Insect Behavior* 5: 61–70.
- 1993. Physical and chemical factors influencing landing and oviposition by the cabbage root fly on host -plant models. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 66: 109–118.
- Kutáèk, M.** 1964. Glucobrassicin a potential inhibitor of unusual type affecting the germination and growth of plants; mechanism of its action. *Biologia Plantarum* 6: 88–98.
- Kyung, K.H. & Fleming, H.P.** 1997. Antimicrobial activity of sulfur compounds derived from cabbage. *Journal of Food Protection* 60: 67–71.
- Laitinen, P., Jaakkola, S. & Tiilikkala, K.** 1994. Effects of mustard meals on root cyst nematodes of potato and on germination and early growth of annual weeds in glasshouse. In: Narwal, S. & Tauro (eds.). Abstracts of International Symposium Allelopathy in Sustainable Agriculture, Forestry and Environment, New Delhi, India, 6-8.9.1994. p. 105.
- Lazzeri, L., Tacconi, R. & Palmieri, S.** 1993. In vitro activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 825–829.
- Lebová-Svobodová, S. & Koštir, J.** 1962. Action of isothiocyanates on germinating plants. *Experientia* 18: 554–555.
- Lewis, J.A. & Papavizas, G.C.** 1971. Effect of sulfur-containing volatile compounds and vapors from cabbage decomposition on *Aphanomyces eutheiches*. *Phytopathology* 61: 208–214.
- Li, Y., Kiddle, G., Bennet, R.N. & Wallsgrave, R.M.** 1999. Local and systemic changes in glucosinolates in Chinese and European cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.) after inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* (stem rot). *Annales of Applied Biology* 134: 45–58.
- Loon, J.J.A. van** 1996. Chemosensory basis of feeding and oviposition behaviour in herbivorous insects: a glance at the periphery. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 7–13.
- Louda, S. & Mole, S.** 1991. Glucosinolates: Chemistry and ecology. In: Rosenthal, G.A. & Berenbaum, M.R. (eds.). *Herbivores, their interactions with secondary plant metabolites*. 2nd ed. New York: Academic Press. p. 124–162. ISBN 0-112-597 183-4.
- Lykkesfeldt, J. & Møller, B.L.** 1993. Synthesis of benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. Isothiocyanates as potent enzyme inhibitors. *Plant Physiology* 102: 609–613.
- Macfarlane Smith, W., Griffiths, D. & Boag, B.** 1991. Overwinter variation in glucosinolate content of green tissue of rape (*Brassica napus*) in response to grazing by wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Scientific Food and Agriculture* 56: 511–521.
- Manici, L., Lazzeri, L. & Palmieri, S.** 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2768–2773.
- Mari, M., Iori, R., Leoni, O. & Marchi, A.** 1993. In vitro activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. *Annales Applied Biology* 123: 155–164.
- Mattiacci, L., Dicke, M. & Posthumus, M.A.** 1994. Induction of parasitoid attracting synomone in brussels sprouts plants by feeding of *P. brassicae* larvae: Role of mechanical damage and behaviour elicitor. *Journal of Chemical Ecology* 20: 2229–2247.
- Mayton, H.S., Oliver, C., Vaughn, S.F. & Loria, R.** 1996. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerates leaf tissue. *Phytopathology* 86: 267–271.

- McCaffrey, J., Williams, L., Borek, V., Brown, P. & Morra, M.** 1995. Toxicity of ionic thiocyanate-amended soil to the wireworm *Limonius californicus* (Coleoptera:Elateridae). *Journal of Economic Entomology* 88: 793–797.
- Milford, G., Porter, A., Fieldsend, J. Miller, C., Leach, J. & Williams, I.** 1989. Glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*) and the incidence of pollen beetles (*Meligetes aeneus*). *Annals of Applied Biology* 115: 375–380.
- Mitchell-Olds, T., Siemens, D. & Pedersen, D.** 1996. Physiology and costs of resistance to herbivory and disease in *Brassica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 231–237.
- Mithen, R.** 1992. Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica* 63: 71–83.
- , **Lewis, B., Heaney, R. & Fenwick, G.** 1987. Resistance of *Brassica* species to *Leptosphaeria maculans*. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 525–531.
- Mojtahedi, H., Santo, G., Hang, A. & Wilson, J.** 1991. Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. *Journal of Nematology* 23: 170–174.
- , **Santo, G. & Wilson, J. & Hang, A.** 1993. Managing *Meloidogyne chitwoodi* on potato with rapeseed as green manure. *Plant Disease* 77: 42–46.
- Muehlchen, A.M., Rand, R.E. & Parke, J.L.** 1990. Evaluation of crucifer green manures for controlling *Aphanomyces* root rot of peas. *Plant Disease* 74: 651–654.
- Munnece, D. E., Domsch, K. H. & Eckert, J. W.** 1962. Fungicidal activity of air passed through columns of soil treated with fungicides. *Phytopathology* 52: 1298–1306.
- & **Martin, J. P.** 1964. Release of methylisothiocyanate from soils treated with Mylone (3,5-dimethyl-tetrahydro-1,3,5,2H-thiadiazine-2-thione). *Phytopathology* 54: 941–945.
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R. & Palmieri, S.** 1996. *In vitro* cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1014–1021.
- Nottingham, S. & Coaker, T.** 1985. The olfactory response of cabbage root fly *Delia radicum* to the host volatile allylisothiocyanate. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 39: 307–316.
- Oleszek, W.** 1987. Allelopathic effects of volatiles from some *Cruciferae* species on lettuce, barnyard grass and wheat growth. *Plant and Soil* 102: 271–273.
- Oliver, C., Vaughn, S.F., Mizubuti, E.S. & Loria, R.** 1999. Variation in allyl isothiocyanate production within *Brassica* species and correlation with fungicidal activity. *Journal of Chemical Ecology* 25: 2687–2701.
- Palaniswamy, P. & Lamb, R.J.** 1992. Host preferences of flea beetles, *Phyllotreta cruciferae* and *P. striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae), for crucifer seedlings. *Journal of Economic Entomology* 85: 743–752.
- , **Gillot, C. & Slater, G.P.** 1986. Attraction of diamondback moths, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), by volatile compounds of canola, white mustard and faba bean. *The Canadian Entomologist* 118: 1279–1285.
- Parker, C.** 1976. Effects on the dormancy of plant organs: In: Audus, L. (ed.) *Herbicides, physiology, biochemistry, ecology*. Volume 1, 2nd ed. London: Academic Press. p. 165–190.
- Petersen, J., Belz, R., Walker, F. & Hurlie, K.** 1999. Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip rape mulch. In: *Program & Abstracts, Second world congress on allelopathy*, Lakehead university, Canada, 8-13.8.1999. Lakehead University, Thunder Bay, Canada: International Allelopathy Society. p. 148.
- Peterson, C., Tsao, R. & Coats, J.** 1998. Glucosinolate aglucones and analogues: Insecticidal properties and a QSAR. *Pesticide Science* 54: 35–42.
- Pickett, J.A., Butt, T.M., Kiddle, K.J., Wallsgrove, R.M. & Williams, I.H.** 1995. Minimizing pesticide input in oilseed rape by exploiting natural regulatory processes. In: *Rapeseed, today and tomorrow*. 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7.7.1995, p. 565–571.
- Pinto, S., Rosa, E. & Santos, S.** 1997. Effect of 2-propenyl glucosinolate and derivated isothiocyanate on the activity of the nematodes *Globodera rostochiensis* (Woll.). In: Thomas, G. & Monteiro, A. (eds.). *Proceedings of the International Symposium on Brassicas*, Rennes, France, 23-27. September 1997. p. 323–327.
- Pivnick, K.A., Jarvis, B.J. & Slater, G.P.** 1994. Identification of olfactory cues used in host-plant finding by diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Chemical Ecology* 20: 1407–1427.

- , **Jarvis, B.J., Slater, G.P., Gillot, C. & Underhill, E.W.** 1990. Attraction of the diamondback moth (*Lepidoptera:Plutellidae*) to volatiles of oriental mustard: The influence of age, sex and prior exposure to mates and host plants. *Environmental Entomology* 19: 704–709.
- Ramirez-Villapudua, J. & Munnecke, D.E.** 1987. Control of cabbage yellows (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) by solar heating of field soils amended with dry cabbage residues. *Plant Disease* 71: 217–221.
- , 1988. Effect of solar heating and soil amendments of Cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and other organisms. *Phytopathology* 78: 289–295.
- Rausch, T., Butcher, D. & Hilgenberg, W.** 1983. Indole-3-methyl glucosinolate biosynthesis and metabolism in clumbroot diseased plants. *Plant Physiology* 58: 93–100.
- Renwick, J.A. & Chew, F.S.** 1994. Oviposition behaviour in Lepidoptera: *Annual Review of Entomology* 39: 377–400.
- & **Huang, X.P.** 1995. Rejection of host plant by larvae of cabbage butterfly: diet-dependent sensitivity to an antifeedant. *Journal of Chemical Ecology* 21: 465–475.
- & **Lopez, K.** 1999. Experience-based food consumption by larvae of *Pieris rapae*: addition to glucosinolates? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 51–58.
- Roessingh, P.E., Städler, E., Baur, R., Hurter, J. & Ramp, T.** 1997. Tarsal chemoreceptors and oviposition behaviour of the cabbage root fly (*Delia radicum*) sensitive to fractions and new compounds of host leaf surface extracts. *Physiological Entomology* 22: 140–148.
- , **Städler, E., Fenwick, G., Lewis, J., Nielsen, J., Hurter, J. & Ramp, T.** 1992. Oviposition and tarsal chemoreceptors of the cabbage root fly are stimulated by glucosinolates and host plant extracts. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 65: 267–282.
- Saeed, I., Harkin, J. M. & Rouse, D.I.** 1996. Leaching of methyl isothiocyanate in plainfield sand chemigated with metam-sodium. *Pesticide science* 46: 375–380.
- , **Rouse, D., Harkin, J. M. & Smith, K.** 1997. Effect of soil water content and soil temperature on efficiency of metham-sodium against *Verticillium dahliae*. *Plant Disease* 81: 773–776
- Sarwar, M. & Kirkegaard, J.A.** 1998. Biofumigation potential of brassicas. 11. Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant and Soil* 201: 91–101.
- , **Kirkegaard, J., Wong, P. & Desmarchelier, J.** 1998. Biofumigation potential of brassicas. III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne pathogens. *Plant and Soil* 201: 103–112.
- Schreiner, R.P. & Koide, R.T.** 1993. Antifungal compounds from the roots of mycotrophic and non-mycotrophic plant species. *New Phytologists* 123: 99–105.
- Schöne, F., Rudolph, B., Kirchheim, U. & Knapp, G.** 1997. Counteracting the negative effects of rapeseed and rapeseed press cake in pig diets. *British Journal of Nutrition* 78: 947–962.
- Scott, J. & Knudsen, G.** 1999. Soil amendment effects of rape (*Brassica napus*) residues on pea rhizosphere bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 1435–1441.
- Siemens, D.H. & Mitchell-Olds, T.** 1996. Glucosinolates and herbivory by specialists (*Coleoptera: Chrysomelidae, Lepidoptera: Plutellidae*): consequences of concentration and induced resistance. *Environmental Entomology* 25: 1344–1353.
- Simmonds, M., Blaney, W., Mithen, R., Birch, A. & Lewis, J.** 1994. Behavioural and chemosensory responses of turnip root fly *Delia floralis* to glucosinolates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 71: 41–57.
- Smart, L.E., Blight, M.M. & Hick, A.J.** 1997. Effect of visual cues and a mixture of isothiocyanates on trap capture of cabbage seed weevil, *Ceutorhynchus assimilis*. *Journal of Chemical Ecology* 23: 889–902.
- Smelt, J.H. & Leistra, M.** 1974. Conversion of metham-sodium to methyl isothiocyanate and basic data on the behaviour of methyl isothiocyanate in soil. *Pesticide Science* 5: 401–407.
- Smolinska, U.** 2000. Survival of *Sclerotium cepivorum sclerotia* and *Fusarium oxysporum* clamydospores in soil amended with cruciferous residues. *Phytopathology* 148: 343–349.
- & **Horbowicz, M.** 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* 147: 119–124.
- , **Morra, M., Knudsen, G. & Brown, P.** 1997. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal toward *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* 87: 77–82.

- Stiehl, B. & Bible, B.** 1989. Reaction of crop species to thiocyanate ion toxicity. *HortScience* 24: 99–101.
- Städler, E.** 1978. Chemoreception of host plant chemical by ovipositing females of *Delia (Hylemya) brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 511–520.
- **& Schöni, R.** 1990. Oviposition behaviour of the cabbage root fly, *Delia radicum* (L.), influenced by host plant extracts. *Journal of Insect Behaviour* 3: 195–209.
- Talatschian, P.** 1974. Populationsentwicklung phytoparasitärer Nematoden an Stoppelfrüchten unter besonderer Berücksichtigung von Örettich. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 81: 538–549.
- Teasdale, J.R. & Taylorson, R.B.** 1986. Weed seed response to methyl isothiocyanate and metham. *Weed Science* 34: 520–524.
- Thomke, S., Pettersson, H., Neil, M. & Håkanson, J.** 1998. Skeletal muscle goitrin concentration and organ weights in growing pigs fed diets containing rapeseed meal. *Animal Feed Science and Technology* 73: 207–215.
- Tollsten, L. & Bergström, G.** 1988. Headspace volatiles of whole plants and macerated plant parts of *Brassica* and *Sinapis*. *Phytochemistry* 27: 2073–2077.
- Tsao, R., Reuber, M., Johnson, L. & Coats, J.** 1996. Insecticidal toxicities of glucosinolate-containing extracts from crambe seeds. *Journal of agricultural Entomology* 13: 109–120.
- Vaughn, S.F.** 1999. Glucosinolates as natural pesticides. In: Cutler, H. G. & Cutler, S. J. (eds.). *Biologically active natural products: Agrochemicals*: 81–91. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-1885-8.
- **& Berhow, M.A.** 1998. 1-cyano-2-hydroxy-3-butene, a phytotoxin from crambe (*Crambe abyssinica*) seedmeal. *Journal of Chemical Ecology* 24: 1117–1126.
- **Boydston, R.** 1997. Volatile allelochemicals released by crucifer green manures. *Journal of Chemical Ecology* 23: 2107–2116.
- Verkerk, R. & Wright, D.** 1996. Common cabbage resistance mechanism against the diamondback moth still an open book? *Annales of Applied Biology* 128: 571–577.
- Visser, J.H.** 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 31: 121–144.
- Walker, J.T.** 1996. Crambe and rapeseed meal as soil amendments: nematocidal potential and phytotoxic effects. *Crop Protection* 15: 433–437.
- Wallbank, B.E. & Wheatley, G.A.** 1979. Some responses of cabbage root fly (*Delia brassicae*) to allylisothiocyanate and other volatile constituents of crucifers. *Annales of Applied Biology* 91: 1–12.
- Wambeke, E. van** 1989. Behaviour of fumigant and their degradation products in soil: consequences and solutions. *Acta horticulturae* 255: 347–359.
- Williams-Woodward, J.L., Pflieger, F.L., Fritz, V.A. & Allmaras, R.R.** 1997. Green manures of oat, rape and sweet corn for reducing common root rot in pea (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces eutheiches*. *Plant and Soil* 188: 43–48.
- Winkler, H. & Otto, G.** 1980. Replant losses with strawberries and suggestions for their reduction. *Horticultural abstracts* 50: 344.
- Yen, G.-C. & Wei, Q.-K.** 1993. Myrosinase activity and total glucosinolate content of cruciferous vegetables, and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan. *Journal of Scientific Food and Agriculture* 61: 471–475.

4 Glukosinolaatit ja niiden hajoamistuotteet elintarvikkeissa

Eeva-Liisa Ryhänen¹⁾, Marja Tolonen¹⁾ & Marianne Taipale

*Maatalouden tutkimuskeskus, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemia ja -tekniikka,
31600 Jokioinen, eeva-liisa.ryhanen@mtt.fi, marja.tolonen@mtt.fi*

Kaalikasveissa esiintyvät glukosinolaatit ja niiden hajoamistuotteet ovat tärkeitä elintarvikkeiden aistittavaan laatuun vaikuttajia komponentteja. Eräillä glukosinolaattien hajoamistuotteilla on todettu positiivisia terveysvaikutuksia, mikä tekee kaalikasveista kiinnostavan myös terveysvaikutusteisten elintarvikkeiden potentiaalisina valmistusaineina. Tässä kirjallisuuskatsauksessa selvitetään glukosinolaattien ja niiden hajoamistuotteiden merkitystä elintarvikkeissa ja prosessoinnin vaikutuksia näihin yhdisteisiin. Lisäksi kuvataan glukosinolaattien ja niiden hajoamistuotteiden vaikutuksia terveyteen.

Kaalikasvien glukosinolaatti-koostumus ja -pitoisuus vaihtelee lajeittain ja lajikkeittain. Varastointiajalla ja -olosuhteilla on vaikutusta glukosinolaatti-pitoisuuksiin. Kaalikasvien glukosinolaatit ovat pääosin indoliglukosinolaatteja, joista merkittävien

on glukobrassikiini. Elintarvikkeiden valmistusprosesseissa glukosinolaatit hajoavat myrosinaasi-entsyymien vaikutuksesta. Glukosinolaattien ja niiden hajoamistuotteiden määriin vaikuttavat käytetyt prosessointimenetelmät. Kirjallisuuskatsauksessa on selvitetty mm. keittämisen, pakastamisen, kuivaamisen ja hapattamisen vaikutuksia glukosinolaatteihin.

Eräiden glukosinolaattien hajoamistuotteiden kuten isotiosyanaattien ja indoli-3-karbinolin on *in vitro* syöpäsoluilla ja koe-eläimillä tehdyissä tutkimuksissa todettu olevan antikarsinogeenisiä. Toisaalta suurina pitoisuuksina eräillä hajoamistuotteilla voi olla myös karsinogeeninen vaikutus. Suolistoflooralla on tärkeä merkitys glukosinolaattien metaboliassa. Eläimillä suuret pitoisuudet glukosinolaatteja ja niiden hajoamistuotteita saattavat aiheuttaa haitallisia vaikutuksia.

Avainsanat: glukosinolaatit, glukosinolaattien hajoamistuotteet, elintarvikkeet, terveysvaikutukset, elintarvikeprosessointi

4.1 Glukosinolaattien pitoisuudet kaalikasveissa (*Brassica oleracea*)

Kaikki kaalikasvit sisältävät glukosinolaatteja, joita tunnetaan jo yli sata erilaista yhdistettä. Kaalikasveissa niitä esiintyy yleisesti vain noin 10–20. Glukosinolaatit jaetaan kolmeen ryhmään sen mukaan, mistä aminohaposta ne ovat muodostuneet: alifaattiset glukosinolaatit (metioniini), indoliglukosinolaatit (tryptofaani) ja aromaattiset glukosinolaatit (fenylalaniini ja tyrosiini) (Sørensen 1990).

Glukosinolaatti-koostumus ja -pitoisuus vaihtelee kasvilajeittain ja lajikkeittain (VanEtten et al. 1976, Heaney & Fenwick 1980). Heaney ja Fenwickin (1987) kirjallisuusselvityksen mukaan vaihtelu oli seu-

raavanlaista: valkokaali 420–1560 µg/g, savoiijinkaali, 1210–2960 µg/g, kukkakaali 610–1140 µg/g ja ruusukaali 600–3900 µg/g tuorepaino. Kaalikasvien glukosinolaatit ovat pääosin indoliglukosinolaatteja, joista merkittävin on glukobrassikiini (Heaney & Fenwick 1987, Slominski & Campbell 1989). Taulukossa 6 on esitetty kaalikasveissa esiintyviä glukosinolaatteja.

Glukosinolaatit hajoavat myrosinasi-entsyymien vaikutuksesta, kun kasveja prosessoidaan esim. pilkkomalla, keittämällä tai jauhamalla. Hydrolyysin seurauksena syntyy aglukonia, glukoosia ja sulfaattia. Aglukoni on pysymätön ja hajoaa edelleen indoleiksi, isotiosyanaateiksi, tiosyanaateiksi, nitrileiksi ja oksazolidiini-2-tioneiksi. Mitä reaktiotuotteita muodostuu, riippuu glukosinolaatin rakenteesta, pH:sta,

Taulukko 6. Kaalikasveissa (*Brassica*) esiintyviä glukosinolaatteja.

Glukosinolaatti	Kasvi	Viite
4-hydroksi-glukobrassikiini	kerä-, kiinan-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
4-metoksi-glukobrassikiini	kerä-, kiinan-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
glukoalysiini	kiinan-, parsaa-, valkokaali	Hansen et al. 1995, Jongen 1996
glukobrassikanapiini	kiinan-, kukka-, parsakaali	Hansen et al. 1995
glukobrassikiini	kiinan-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	Sones et al. 1984, Hansen et al. 1995
glukoerusiini	kerä-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	VanEtten et al. 1976, Hansen et al. 1995
glukoerysoliini	kerä-, valkokaali	VanEtten et al. 1976, Hansen et al. 1995
glukoiberiini	kerä-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	Carlson et al. 1987, Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
glukoiberiini	kerä-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	VanEtten et al. 1976, Sones et al. 1984, Hansen et al. 1995, Plumb et al. 1996
glukonapiini	kerä-, kiinan-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	VanEtten et al. 1976, Sones et al. 1984, Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
glukonasturtiini	kiinan-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	VanEtten et al. 1976, Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
glukorafaniini	kerä-, kiinan-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	VanEtten et al. 1976, Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
glukotropaeoliini	kerä-, valkokaali	VanEtten et al. 1976, Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
glukotropaeoliini	Keräkaali	VanEtten et al. 1976, Hansen et al. 1995
neoglukobrassikiini	kerä-, kiinan-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	Sones et al. 1984, Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
progoitriini tai epiprogoitriini	kerä-, kiinan-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	Sones et al. 1984, Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998
sinigriini	kerä-, kukka-, parsaa-, ruusu-, valkokaali	VanEtten et al. 1976, Sones et al. 1984, Hansen et al. 1995, Ciska & Kozłowska 1998

ja kasvilla esiintyvistä kofaktoreista (Vos & Blijleven 1988). Isotiosyanaatteja muodostuu pH:n ollessa lähellä neutraalia (pH 5–7) ja nitriilejä alhaisessa lämpötilassa ja pH:ssa (Heaney et al. 1986). Indoliglukosinolaattien hajotessa muodostuu muun muassa indoli-3-karbinolia ja askorbigeeniä (Bradfield & Bjeldanes 1987, McDanell et al. 1987, Agerbirk et al. 1998). Myrosinaasi-entsyymien tai myrosinaasi-entsyymien kaltaisen tioglukohydrolaasin on todettu esiintyvän kaalikasveissa ja suolistomikro-obeissa (Rhodes 1996).

4.2 Glukosinolaattien sekä niiden hajoamistuotteiden vaikutus elintarvikkeiden makuun

Glukosinolaateilla ja niiden hajoamistuotteilla on vaikutusta kasvien makuun. Fenwick et al. (1983) mukaan sinigriini ja progoitriinin hajoamistuote (-)5-vinyylioksazolidiini-2-tioni aiheuttavat ruusukaaliin karvasta makua. Stressi, kuten kuivuus ja ahtaus, aiheuttavat glukosinolaattien määrän lisääntymistä ja samalla voimakkaamman maun. Glukonapiinin ja glukobrassikiinin makujen todettiin olevan vähemmän karvaita kuin sinigriinin maun. Doorn et al. (1998) mukaan kuluttajat pitävät enemmän tuotteista, joissa sinigriinin ja progoitriinin pitoisuus on alhainen.

Sinigriinin hajoamistuote propenyli-isotiosyanaatti on maultaan hyvin karvas ja on esitetty, että kaalin keskiosissa esiintyvä voimakas maku johtuisi nimenomaan näissä osissa esiintyvistä propenyli-isotiosyanaatista (MacLeod 1976). Pieninä pitoisuuksina 2-propenyli-isotiosyanaatti aiheuttaa lattean maun (Rosa et al. 1997). Isotiosyanaatit aiheuttavat muun muassa joidenkin kaalilajien ominaisen pistävän hajun ja maun. Pieninä pitoisuuksina isotiosyanaatit antavat miellyttävän aromin, mutta suurina pitoisuuksina ne vähentävät maittavuutta (Underhill 1980).

4.3 Varastoinnin ja prosessoinnin vaikutus glukosinolaatteihin ja niiden hajoamistuotteisiin

4.3.1 Varastointi

Varastoinnilla on todettu olevan vaikutus glukosinolaatti-pitoisuuteen. Kassahun et al. (1995) mukaan kaalin säilönnässä (3–6 °C) rikkiä sisältävien glukosinolaattien (glukoiberviriini ja glukokerusiini) pitoisuudet laskivat. Viiden viikon jälkeen niiden pitoisuudet olivat laskeneet alkuperäisestä tasosta noin 70 %. Sinigriini-pitoisuuksissa todettiin nousua säilytyksen jatkuessa, mutta sen oletettiin johtuvan sinigriinin epätasaisesta jakaantumisesta kaalissa. Toisessa kaalilajikkeessa sinigriinin pitoisuus laski viidessä viikossa noin 9 %:iin alkuperäisestä pitoisuudesta. Alifaattisten glukosinolaattien pitoisuudet laskivat toisen säilytysviikon jälkeen jyrkästi. Rikkiä sisältävien alkyyliglukosinolaattien pitoisuudet olivat viiden viikon säilytyksen jälkeen laskeneet noin 90 %. Indoliglukosinolaattien määrä oli tuoreessa kaalissa pienempi kuin kaksi viikkoa säilytetyssä kaaleissa. Tämä johtuu ilmeisesti yhdisteiden liikkumisesta (migraatiosta) säilytyksen aikana kasvin rikkoontuneiden kohtien ympärille. Suurin pitoisuuden pieneneminen tapahtui neoglukobrassikiinilla, joka laski nollaan viidenellä säilytysviikolla.

Hansenin et al. (1995) mukaan varastoidessa parsakaalia kylmässä ilman suoja-kaasua glukosinolaattien pitoisuus nousee. Käytettäessä suoja-kaasua sen koostumuksella voidaan vaikuttaa glukosinolaattien pitoisuutta nostavasti tai laskevasti. Chong ja Berard (1983) ovat todenneet, että kaalin glukosinolaatti-tuotteiden määrä nousee kylmävarastoinnin aikana siihen saakka kunnes kaali alkaa vanhentua, jolloin pitoisuus laskee.

4.3.2 Pilkkominen

Kaalikasvien voimakas hienontaminen kasvismassaksi aiheuttaa glukosinolaattien no-

pean hajoamisen. Daxenbichler et al. (1977) totesivat, että kaalin ja ruusukaalin tasalaatuisiksi tekeminen eli homogenointi aiheutti lähinnä nitriliä eikä isotiosyanaattien tai goitriinin muodostumista. Pilkotussa (autolysoidussa) kaalissa yleisin yhdiste oli 1-syano-3-metyylisulfinyylipropani. Nitrilejä autolysoidussa tuotteessa oli 28–95 mg/kg tuotetta kaalia. McDanell et al. (1987) mukaan homogenoidusta ruusukaalista löytyi indoli-3-karbinolia, indoli-3-asetonitriliä ja 3,3-indolyylimetaania ja askorbigeeniä.

Verkerk et al. (1997a, 1997b) mukaan paloitellun valkokaalin eri glukosinolaattipitoisuudet vaihtelivat: jotkut alifaattiset glukosinolaattipitoisuudet laskivat, toiset nousivat paloitellun jälkeen. Yksittäisten glukosinolaattien yhteenlaskettu pitoisuus nousi. 4-metoksylglukobrossikiini-pitoisuus nousi 15-kertaiseksi 48 tunnin kuluttua paloitellun aloittamisesta. Pitoisuuksien kasvu alkaa noin 8 tunnin kuluttua vihannesten paloitellusta. Indoliglukosinolaattit lisääntyivät voimakkaasti, kun prosessissa ei käytetty vettä. Tämä glukosinolaattien pitoisuuksien nousu on Koritsas et al. (1991) mukaan selitettävissä kaalin luontaisella puolustusmekanismilla. Sitä esiintyy muun muassa tuhohyönteisten vaikutuksesta, jolloin kasvi alkaa syntetisoida glukosinolaatteja. Koritsas et al. (1991) totesivat, että rapsissa indoliglukosinolaattien, glukobrossikiinin ja neoglukobrossikiinin pitoisuudet kasvoivat, kun kasvia oli vaurioitettu mekaanisesti. Prosessointi veden kanssa aiheuttaa Rosa et al. (1993) mukaan glukosinolaattien hajoamisen.

4.3.3 Keittäminen

Keittäminen ei inaktivoi myrosinaasi-entsyymiä täysin ja glukosinolaattien hajoamistuotteita on todettavissa myös keitettyissä kaalikasveissa. Bradfielin ja Bjeldanes (1987) havaitsivat keitetystä kaalista löytyvän autolyysituotteita noin 80 % siitä määrästä, joka todettiin tuoreessa kaalissa. McMillan et al. (1986) totesivat tutkimuk-

sessaan myrosinaasi-aktiivisuuden alenevan keitettyä jopa 1–4 %:een alkuperäisestä.

Keitettyä osa glukosinolaateista liukenee keitinvedeen (Rosa & Heaney 1993). Kaalikasvien glukosinolaattipitoisuus laskee vihanneksia keitettyä 30–60 % (Mullin & Sahasrabudhe 1978, Sones et al. 1984, McDanell et al. 1987, Rosa & Heaney 1993). Liukeneminen veteen vaihtelee lajeittain ja lajikkeittain.

Lämpökäsittely kuten keittäminen ja höyryttäminen, aiheuttavat indoliglukosinolaattien hajoamista (Slominski & Campbell 1989). Kaalin höyryttäminen ja vesiryöppäys vähentävät isotiosyanaattia muodostavien glukosinolaattien pitoisuutta 30 %:a ja indoliglukosinolaattien pitoisuutta 50 %:a (Srisangnam et al. 1980). Slominski ja Campbell (1989) totesivat kaalin, parsakaalin, ruusukaalin ja kukkakaalin lämpökäsittelyn (keittäminen tai höyrykuumennus) aiheuttavan indoliglukosinolaattien hajoamista tiosyanaateiksi ja indoliasetonitrileiksi.

Mullin ja Sahasrabudhe (1978) mukaan keitettyissä kaalikasveissa esiintyvä glukosinolaatti-häviö saattaa osittain johtua allyyli- tai butenyli-isotiosyanaattien haihtumisesta. Keitettyä kaalista vapautuvista yhdisteistä yleisin on dimetyylisulfidi, myös allyyli- ja butenyli-isotiosyanaattia ja allyylisyanidia esiintyy (McLeod & McLeod 1968). Mikroaaltokuumentaminen ja höyryttäminen aiheuttavat parsakaalissa Howard et al. (1997) mukaan sulforaanin, sulforaaninitriilin, syanohydroksibutyeenin, iberiinin ja iberiininitriilin pitoisuuden merkittävän laskun. Höyryttämisessä ruusukaalista haihtuu pääosin isotiosyanaatteja ja nitrilejä ja kukkakaalista aldehydejä (Langenhove et al. 1991). Rosa & Heaney (1993) mukaan vain pieni osa kaalin glukosinolaateista haihtuu, sillä heidän tutkimuksessaan yli 92 % kokonaisglukosinolaattimäärästä säilyi keitettyä kaalissa ja sen keitinvedessä. Keittäminen voi myös lisätä joidenkin yhdisteiden pitoisuutta (McDanell et al. 1987). Valkokaalissa glukobrossikiinin hajoamistuotteen askorbigeenin pitoisuus nousi 2,5-kertaiseksi keittämisen seurauksena.

4.3.4 Pakastaminen ja kuivaaminen

Kaalin pakastuksen on todettu laskevan tiosyanaatti-ionin, haihtuvien isotiosyanaattien ja goitriinin määrää (Chong & Bérard 1983). Sama on todettu suojakaasussa säilytetyissä kaaleissa. Kaaleissa oli säilytyksen alussa runsaasti isotiosyanaatteja ja goitriinia ja näiden yhdisteiden pitoisuus laski nopeimmin säilytyksen aikana (Bérard & Chong 1985). Ryöppäys ennen pakastusta laskee merkittävästi glukosinolaattien hajoamistuotteiden pitoisuutta. Howard et al. (1997) mukaan ryöppätyssä ja pakastetussa parsakaalissa ei voitu osoittaa lainkaan glukosinolaattien hajoamistuotteita. Muunnellun ilmakehän vaikutus glukosinolaattien hajoamiseen riippuu myös pakkauksessa käytettävien kaasujen pitoisuudesta (Hansen et al. 1995). Jos kaalia ei kuumenteta myrosinaasin inaktivoimiseksi ennen pakastusta, sulatuksen jälkeen glukosinolaatit hajoavat lähes täydellisesti (Quinsac et al. 1994).

Kuivauksen vaikutuksesta glukosinolaattien ja niiden hajoamistuotteiden pitoisuuksiin on vähän tutkimustietoa. Jensen et al. (1995) totesivat tutkimuksessaan, että rapsin siemenien paahtaminen 100 °C lämpötilassa laski glukosinolaattien määrää ajan funktiona. Kahden tunnin kuumentuksen jälkeen glukosinolaatti-pitoisuus laski 95 %. 4-hydroksi-glukobrassikiinin todettiin tuhoutuvan lämmössä nopeammin kuin progoitriinin ja glukonapiinin.

Myrosinaasi-entsyymi säilyy aktiivisena ruusukaalin ja kaalin kuivauksessa. Kun kuivattuun tuotteeseen lisätään vettä, glukosinolaatit hajoavat pääasiassa isotiosyanaateiksi ja goitriiniksi (Daxenbichler et al. 1977).

4.3.5 Hapattaminen

Daxenbichlerin et al. (1980) mukaan hapankaalin valmistuksessa kahden viikon kuluttua hapattamisen (fermentoinnin) aloituksesta kaikki glukosinolaatit olivat hajonneet. Valmiissa hapankaalissa todet-

tiin olevan tiosyanaattia ja 1-syano-3-metyylisulfinyylipropania. Sen sijaan isotiosyanaattia, goitriinia ja 1-syano-2,3-epitiopropania ei voitu osoittaa. Hävikit voivat johtua myös kuumennuksesta säilöntäprosessin aikana tai mehun poistamisesta.

Fermentaatiolämpötila vaikuttaa glukosinolaattien hajoamiseen. Gail-Ellerin ja Gierscherin (1984) mukaan glukosinolaatit hajosivat 19 °C:een lämpötilassa 3 vuorokauden kuluttua. Lämpötilan ollessa 5 °C:ta glukosinolaatit hajosivat 8 päivän kuluessa. Joidenkin hapankaalipakkausten pinnalta löytyi allyyli-isotiosyanaattia. Valkokaalin säteilyttäminen ionisoivalla säteilyllä ennen fermentointia lisäsi glukosinolaattien hajoamista. Maitohappobakteerien lisääminen ei vaikuttanut glukosinolaattien hajoamiseen. Palop et al. (1995) ovat löytäneet maitohappobakteerikannan, joka hajottaa sinigriiniä allyyli-isotiosyanaatiksi ja glukosiksi.

Daxenbichlerin et al. (1980) mukaan ainoat hapankaalista löytyvät glukosinolaattien hajoamistuotteet ovat tiosyanaatti-ioni, 1-syano-3-metyylisulfinyylipropani ja nitrili. Vaikka lähtöaineissa oli 2-propenyyliglukosinolaattia, niin sen hajoamistuotteita ei löytynyt hapankaalista (Daxenbichler et al. 1977).

Glukosinolaattien hajoamistuotteissa on todettu olevan antimikrobista aktiivisuutta bakteereita ja hiivoja vastaan. Sinigriinillä tällaista inhiboivaa vaikutusta ei näytä juurikaan olevan. Glukosinolaattien hajoamistuotteilla kuten isotiosyanaateilla ja kaalin fermentaatiossa muodostuvilla rikkipitoisilla yhdisteillä on sen sijaan todettu estävän eräiden bakteereiden ja hiivojen kasvua (Brabban & Edwards 1995, Kyung & Fleming 1997).

4.4 Glukosinolaattien ja niiden hajoamistuotteiden vaikutukset terveyteen

4.4.1 Antikarsinogeeninen vaikutus

Epidemiologisten tutkimusten mukaan

jopa pienien määrien nauttiminen (10 g/vrk) kaalikasveja vähentää merkittävästi riskiä sairastua syöpään (Kohlmeier & Su 1997). Eräiden glukosinolaattien hajoamistuotteiden, kuten alkyyli- ja sulfinyyli-glukosinolaateista muodostuvien isotiosyanaattien sekä indoliglukosinolaateista muodostuvan indoli-3-karbinolin, on esitetty vaikuttavan edullisesti terveyteen (Verhoeven et al. 1997).

In vitro syöpäsoluilla tehdyissä tutkimuksissa glukosinolaattien hajoamistuotteiden on osoitettu estävän syöpäsolujen kasvua (Nastruzzi et al. 1996, Leoni et al. 1997). Suojaava vaikutus on todettu α -naftyyli-, β -naftyyli-, fenyyl-, benzyyli-, fenethyyli-, ja muilla aryylialkyyli-isotiosyanaateilla (Zhang & Talalay 1994). Sinigriinin ja glukotropaeoliinin hajoamisessa syntyvien isotiosyanaattien todettiin estävän aktiivisimmin syöpäsolujen kasvua (Nastruzzi et al. 1996, Leoni et al. 1997). Hiirillä ja rotilla tehdyissä koe-eläintutkimuksissa isotiosyanaattien on todettu inhiboivan kemiallisesti aiheutettuja rinta-, keuhko-, maksa-, rakko- ja ruuansulatuskanavan syöpäkasvaimia (Zhang & Talalay 1994). Useimmat isotiosyanaatit ovat osoittaneet syövältä ehkäisevää vaikutusta, kun ne on annettu ennen karsinogeeniä tai samanaikaisesti sen kanssa (Morse et al. 1990).

Eräillä glukosinolaateilla, kuten glukobrassikiinilla, on eläinkokeissa todettu olevan inhiboivaa vaikutusta syöpäkasvaimiin. On epäselvää, aiheuttaako sen glukosinolaatti vai sen hajoamistuotteet (Talalay & Zhang 1996). Indoliglukosinolaattien hajoamistuotteiden, brassikiinin ja syklobrassikiinin, on todettu inhiboivan kemiallisesti aiheutettua syöpää koe-eläimissä (Mehta et al. 1995). Myös indoliglukosinolaattien hajoamistuotteisiin kuuluvilla indoli-3-karbinolilla, 3-di-indolylmetaanilla ja indoli-3-asetonitriilillä on todettu antikarsinogeenisiä vaikutuksia. Erityisesti indoli-3-karbinoli on useiden tutkimusten mukaan antikarsinogeeni (Verhoeven et al. 1997).

Isotiosyanaattien antikarsinogeeninen vaikutus johtuu tämän hetkisen käsityksen

mukaan kahdesta yhtäaikaista ja ilmeisesti synergisestä vaikutusmekanismista. Ne estävät karsinogeenien aktivoitumisen sytokromi P-450:n avulla (*Phase 1 enzymes*) ja aiheuttavat sellaisten entsyymien muodostumisen, jotka tekevät karsinogeenit vaarattomiksi (indusoivat karsinogeeniä detoksifioivia entsyymejä) (*Phase 2 enzymes*) (Talalay & Zhang 1996). Bradfieldin ja Bjeldanesin (1984) mukaan indoli-3-karbinoli käynnistää nämä kaksi vaikutusmekanismia (bifunktionaalinen induktio). Detoksifioivien entsyymien induktio riippuu bioaktiivisen yhdisteen annoksesta ja niiden seoskoostumuksesta (Staack et al. 1998). Jotkut isotiosyanaatit voivat jopa lisätä kasvainten kasvua. Isotiosyanaattien kyky estää tai kiihdyttää syövän muodostumista on riippuvainen isotiosyanaatin rakenteesta, eläinlajista, kohdekudoksesta ja karsinogeenistä (Talalay & Zhang 1996). Yhdisteen pitoisuus vaikuttaa bioaktiivisuuteen ja suurina annoksina isotiosyanaatit voivat olla mutageenisia (Musk et al. 1995). Kaalikasvien uutteissa on todettu olevan antioksidanttiaktiivisuutta, joka ei kuitenkaan ole tutkimusten mukaan glukosinolaattien aiheuttamaa (Plumb et al. 1996).

Isotiosyanaatit ovat hyvin reaktiivisia ja ne muodostavat tiokarbamaatti-, ditiokarbamaatti- tai tiourea-johdannaisia. On epävarmaa, aiheutuuko antikarsinogeeninen vaikutus isotiosyanaateista vai niiden sekundääristä aineenvaihduntatuotteista (Delaquis & Mazza 1998). Viimeaikaisissa tutkimuksissa on todettu, että ihmisen suolistoflooralla on tärkeä merkitys glukosinolaattien aineenvaihdunnassa. Suolistoflooran aikaansaama isotiosyanaattien ja glukosinolaattien muuntuminen (konversio) on todettu virtsassa olevista aineenvaihduntatuotteista, lähinnä ditiokarbamaateista (Shapiro et al. 1998). *In vivo* -kokeissa ihmisen suolistoflooran on todettu hajottavan glukosinolaatteja isotiosyanaateiksi (Chung et al. 1998).

Ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa glukobrassikiinin hajoamistuotteen, indoli-3-karbinolin, on todettu indusoivan estradioli 2-hydroksylaasia. Se on on faa-

si-1-entsyymi, joka inhibioi rinta- ja koh- tussyöpää (Michnovics & Bradlow 1991, 1994). Kaalikasvien, erityisesti ruusukaa- lin, nauttimisen on osoitettu kohottavan detoksifioivan entsyymin, glutationi-S- transferaasin, pitoisuutta (Bogaards et al. 1994, Nijhoff et al. 1995). Lisäksi se indusoi sytokromi P-450 pitoisuutta (Kall et al. 1996). Sellaisilla henkilöillä, joiden ruoka- valiossa oli runsaasti kaalikasveja (ruusu- kaali), todettiin merkittävästi vähemmän DNA-vaurioita kuin kotrolliryhmän henki- löillä, joiden ruokavaliossa ei ollut kaalia lainkaan (Verhagen et al. 1995).

4.4.2 Haitalliset vaikutukset

Glukosinolaateilla ja niiden hajoamistuot- teilla on todettu olevan haitallisia vaikutuk- sia (Heaney & Fenwick 1987). Useilla elä- millä glukosinolaattien runsas nauttiminen (2–5 mg/g dieetti) aiheuttaa haittavaiku-

tuksia, kuten kasvun heikentymistä, mak- san vaurioita tai kuolion ja kilpirauhasen lii- kakasvua. Ihmisillä myrkyllisiä vaikutuksia ei ole havaittu (Heaney & Fenwick 1995).

Oksazolidiini-2-tioni (goitriini) on pro- goitriinin hajoamistuote. Sen ja tiosyanaa- tin tiedetään aiheuttavan eläimille struu- maa. Tiosyanaatti-ionin katsotaan kilpaile- van jodin kanssa ja se aiheuttaa struumaa vain silloin, kun jodista on puute. Oksazoli- diini-2-tioni vaikuttaa kilpirauhashormo- nin eli tyroksiinin synteesiin, mutta se ei rii- pu jodin saannista (Verhoeven et al. 1997).

Joillakin isotiosyanaateilla ja indoleilla on todettu olevan mutageenisia ja kar- sinogeesia ominaisuuksia bakteeri- ja nisä- kässoluilla tehdyissä kokeissa (Sasagawa & Matsushima 1991, Musk et al. 1993, Kassie et al. 1996). Indolit voivat reagoida nitriit- tien kanssa ja muodostaa karsinogeenisiä N-nitroso-yhdisteitä. Nämä yhdisteet ovat pysyviä vain, jos vapaata nitriittiä on läsnä suuria pitoisuuksia (Jongen 1996).

Kirjallisuus

Agerbirk, N.A., Olsen, C.E. & Sørensen, H. 1998. Initial and final products, nitriles and ascorbigens produced in myrosinase catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1563–1571.

Bérard, L.S. & Chong, C. 1985. Influence of stor- age on glucosinolate fluctuations in cabbage. *Acta Horticulturae* 157: 203–210.

Bogaards, J.J., Verhagen, H., Willems, M.I., Poppel, G. van & Bladeren, P.J. van. 1994. Con- sumption of brussels sprouts results in elevated al- pha-class glutathione S-transferase levels in human blood plasma. *Carcinogenesis* 15 (5): 1073–1075.

Brabban, A.D. & Edwards, C. 1995. The effects of glucosinolates and their hydrolysis products on mi- crobial growth. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 171–177.

Bradfield, C.A. & Bjeldanes, L.F. 1984. Effect of dietary indole-3-carbinol on intestinal and hepatic

monoxygenase, glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activities in the rat. *Food and Chemical Toxicology* 22: 977–982.

– **& Bjeldanes, L.F.** 1987. High-performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 46–49.

Carlson, D.G., Daxenbichler, M.E., VanEtten, C.H., Kwolek, W.F. & Williams, P.H. 1987. Glucosinolates in crucifer vegetables: broccoli, brussels sprouts, cauliflower, collards, kale, mus- tard greens and kohlrabi. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112(1): 173–178.

Chong, C. & Bérard, L.S. 1983. Changes in glucosinolates during refrigerated storage of cab- bage. *Journal of the American Society for Horticul- tural Science* 108: 688–691.

Chung, F.-L., Getahun, S.M., Jiao, D., & Conway, C.C. 1998. Hydrolysis of glucosinolates to iso- thiocyanates in humans. *Proceedings of the Amer-*

ican Association for Cancer Research 39: 18.

Ciska, E. & Kozłowska, H. 1998. Glucosinolates of cruciferous vegetables. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 7/48 (1): 5–22.

Daxenbichler, M.E., VanEtten, C.H. & Spencer, G.F. 1977. Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables. Identification of organic nitriles from cabbage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 25: 121–124.

–, **VanEtten, C.H. & Williams, P.H.** 1980. Glucosinolate products in commercial sauerkraut. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28: 809–811.

Delaquis, P. & Mazza, G. 1998. Functional vegetable products. In: Mazza, G. (ed.). Functional Foods: Biochemical and processing aspects. Lancaster: Technomic publishing. p. 193–233. ISBN 1-56676-487-4.

Doorn, H.E. van, Kruk, G.C. van der, Holst G.-J. van, Raaijmakers, C.M.E., Postma, E., Groeneweg, B. & Jongen, W.H.F. 1998. The glucosinolates sinigrin and progoitrin are important determinants for taste preference and bitterness of brussels sprouts. Journal of the Science of Food and Agriculture 78: 30–38.

Fenwick, G.R., Griffiths, N.M. & Heaney, R.H. 1983. Bitterness in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*): The role of glucosinolates and their breakdown products. Journal of the Science of Food and Agriculture 34: 73–80.

Gail-Elter, R. & Gierschner, K. 1984. Zum Gehalt und Verhalten der Glucosinolate in Weißkohl und Sauerkraut. Deutsche Lebensmittel Rundschau 80(11): 341–346.

Hansen, M., Moller, P., Sørensen, H. & Trejo, de, M.C. 1995. Glucosinolates in broccoli stored under controlled atmosphere. Journal of the American Society for Horticultural Science 120 (6): 1069–1074.

Heaney, R.K. & Fenwick, G.R. 1980. Glucosinolates in *Brassica* Vegetables. Analysis of 22 Varieties of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). Journal of the Science of Food and Agriculture 31: 785–793.

– & **Fenwick, G.R.** 1987. Identifying toxins and their effects: glucosinolates. In: Watson, D.H. (ed.). Natural toxicants in food: progress and prospects. Chichester, Weinheim: Ellis Horwood, VHC Verlagsgesellschaft. p. 76–108. ISBN 0-89573-548-2, ISBN 3-527-26439-6, ISSN 0930-3332.

– & **Fenwick, G.R.** 1995. Natural toxins and protective factors in brassica species, including rapeseed.

Natural Toxins 3: 233–237.

– **Fenwick, G.R. & Mawson, R.** 1986. Glucosinolates. In: Cheeke, P.R. (ed.). Natural Toxicants Vol II: Glycosides. Boca raton: CRC press. p. 1–41. ISBN 0-8493-6991-6.

Howad, L.A., Jeffery, E.H., Wallig, M.A. & Klein, B.P. 1997. Retention of phytochemicals in fresh and processed broccoli. Journal of Food Science 62: 1098–1104.

Jensen, S.K., Liu, Y.-G. & Eggum, B.O. 1995. The effect of heat treatment on glucosinolates and nutritional value of rapeseed meal in rats. Animal Feed Science and Technology 53: 17–28.

Kassahun, B.W., Velíšek, J., Davídek, J. & Hajšlová, J. 1995. The change of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) glucosinolate content during storage. Potravinarske Vedy 13 (1): 13–24.

Jongen, W.M.F. 1996. Glucosinolates in *Brassica*: occurrence and significance as cancer-modulating agents. Proceedings of the Nutrition Society 55: 433–446.

Kall, M.A., Vang, O. & Clausen, J. 1996. Effects of dietary broccoli on human in vivo drug metabolising enzymes: evaluation of caffeine, oestrone and chlorzoxazone metabolism. Carcinogenesis 17 (4): 793–799.

Kassie, F., Parzefall, W., Musk, S., Johnson, I., Lamprecht, G., Sontag, G. & Knasmüller, S. 1996. Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. Chemico-biological Interactions 102: 1–16.

Kohlmeier, L. & Su, L. 1997. Crucifereous vegetables consumption and colorectal cancer risk: meta-analysis of the epidemiologica evidence. The FASEB Journal 11: A369.

Koritsas, V.M.F., Lewis, J.A. & Fenwick, G.R. 1991. Glucosinolate responses of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by cabbage sem feabeetle (*Psylliodes chrysocephala*). Annual Applied Biology 118: 209–221.

Kyung, K.H. & Fleming, H.P. 1997. Antimicrobial activity of sulfur compounds derived from cabbage. Journal of Food Protection 60: 67–71.

Langenhove, H.J. Van, Cornelis, C.P. & Schamp, N.M. 1991. Identification of volatiles emitted during blanching process of Brussels sprouts and cauliflower. Journal of the Science of Food and Agriculture 55: 483–487.

- Leoni, O., Iori, R., Palmieri, S., Esposito, E., Menegatti, E., Cortesi, R. & Nastruzzi, C.** 1997. Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and in vitro antiproliferative studies. *Bio-organic & Medicinal Chemistry* 5 (9): 1799–1806.
- MacLeod, A.J.** 1976. Volatile flavour compounds of the Cruciferae. In: Vaughan, J.G., MacLeod, A.J. & Jones, B.M.G. (eds.) *The Biology and Chemistry of the Cruciferae*. London: Academic Press. p. 307–330. ISBN 0-12-715150-8.
- & **Macleod, G.** 1968. Volatiles of cooked cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 19: 273–277.
- McDanell, R., MacLean, A.E.M., Hanley, A.B., Heaney, R.K. & Fenwick, G.R.** 1987. Differential induction of mixed-function oxidase (MFO) activity in rat liver and intestine by diets containing processed cabbage: correlation with cabbage levels of glucosinolates and glucosinolate hydrolysis products. *Food and Chemical Toxicology* 25 (5): 363–368.
- McMillan, M., Spinks, E.A. & Fenwick, G.R.** 1986. Preliminary observations on the effect of dietary Brussels sprouts on thyroid function. *Human Toxicology* 5: 15–19.
- Mehta, R.G., Liu, J., Constantinou, A., Thomas, C.F., Hawthorne, M., You, M., Gerhäuser, C., Pezzuto, J.M., Moon, R.C. & Morarty, R.M.** 1995. Cancer chemopreventative activity of brassicin, a phytoalexin from cabbage. *Carcinogenesis* 16: 399–404.
- Michnovicz, J.J. & Bradlow, H.L.** 1991. Altered estrogen metabolism and excretion in humans following consumption of indole-3-carbinol. *Nutrition and Cancer* 16: 56–69.
- & **Bradlow, H.L.** 1994. Dietary cytochrome P-450 modifiers in the control of estrogen metabolism. In: Huang, M.-T. et al. (eds.) *Food phytochemicals for cancer prevention I: Fruits and vegetables*. p. 282–293. Washington DC: American Chemical Society. ISBN 0-8412-2768-3.
- Morse, M.A., Reinhardt, J.C., Amin, S.G., Hecht, S.S., Stoner, G.D. & Chung, F.L.** 1990. Effect of dietary aromatic isothiosyanates fed subsequent to the administration of 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on lung tumorigenicity in mice. *Cancer Letters* 49: 225–230.
- Mullin, W.J. & Sahasrabudhe, M.R.** 1978. Effect of cooking on the glucosinolates in cruciferous vegetables. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 11(1): 50–52.
- Musk, S.R.R., Astley, S.B., Edwards, S.M., Stephenson, P., Hubert, R.B. & Johnson, I.T.** 1995. Cytotoxic and clastogenic effects of benzyl isothiocyanate towards cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology* 33 (1): 31–37.
- & **Johnson, I.T.** 1993. The clastogenic effects of isothiocyanates. *Mutation Research* 300: 111–117.
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R. & Palmieri, S.** 1996. In vitro cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1014–1021.
- Nijhoff, W.A., Grubben, M.J., Nagengast, F.M., Jansen, J.B., Verhagen, H., Poppel, G. van & Peeters, W.H.** 1995. Effects of consumption of Brussels sprouts on intestinal and lymphocytic glutathione S-transferases in humans. *Carcinogenesis* 16 (9): 2125–2128.
- Palop, M.L., Smiths, J.P. & Brink, B.** 1995. Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16. *International Journal of Food Microbiology* 26(2): 219–229.
- Plumb, G.W., Lambert, N., Chambers, S.J., Wanigatunga, S., Heaney, R.K., Plumb, J.A., Aruoma, O.I., Halliwell, B., Miller, N.J. & Williamson, G.** 1996. Are whole extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants? *Free Radical Research* 25 (1): 75–86.
- Quinsac, A., Charrier, A. & Ribaillier, D.** 1994. Glucosinolates in etiolated sprouts of sea-kale (*Cramble maritima* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65: 201–207.
- Rhodes, M.J.C.** 1996. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. *Proceedings of the Nutrition Society* 55: 371–384.
- Rosa, E.A.A. & Heaney, R.K.** 1993. The effect of cooking and processing on the glucosinolate content: studies on four varieties of portuguese cabbage and hybrid white cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62: 259–265.
- , **Heaney, R.K., Fenwick, G.R. & Portas, C.A.M.** 1997. Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* 19: 99–215.
- Sasagawa, C. & Matsushima.** 1991. Mutagen formation on nitrite treatment of indole compounds derived from indole-glucosinolates. *Mutation Research* 250: 169–174.
- Shapiro, T.A., Fahey, J.W., Wade, K.L., Stephenson, K.K. & Talalay, P.** 1998. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective

glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 7: 1091–1100.

Slominski, B.A. & Campbell, L.D. 1989. Formation of indole glucosinolate breakdown products in autolyzed, steamed and cooked *Brassica* vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 1297–1302.

Sones, K., Heaney, R.K. & Fenwick, G.R. 1984. An estimate of the mean daily intake of glucosinolates from cruciferous vegetables in the UK. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 35(6): 712–720.

Sørensen, H. 1990. Glucosinolates: Structure, properties, function. In: Shahidi, F. (ed.). *Canola and Rapeseed: Production, chemistry, nutrition and processing technology*. New York: Van Nostrand Reinhold. p. 149–172. ISBN 0-442-00295-5.

Srisangnam, C., Salunkhe, D.K., Reddy, N.R. & Dull, G.G. 1980. Quality of cabbage part II: physical, chemical and biochemical modification in processing treatments to improve flavor of blanched cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Food Quality* 3: 233–250.

Staack, R., Kingston, S., Wallig, M.A. & Jeffery, E.H. 1998. A comparison of the individual and collective effects of four glucosinolate breakdown products from Brussels sprouts on induction of detoxification enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 149: 17–23.

Talalay, P. & Zhang, Y. 1996. Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochemical Society Transactions* 24 (3): 806–810.

Underhill, E.W. 1980. Secondary plant products, glucosinolates. In: Bell, E.A. & Charlwood, B.V. (eds.). *Encyclopedia of plant physiology* 8. New

York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 493–512. ISBN 3-540-09461-X.

VanEtten, C.H., Daxenbichler, M.E., Williams, P.H. & Kwolek, W.F. 1976. Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables. Analysis of the edible part from twenty-two varieties of cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 452–455.

Verhagen, H., Poulsen, H.E., Loft, S., van Poppel, G., Willems, M.I. & van Bladeren, P.J. 1995. Reduction of oxidative DNA-damage in humans by Brussels sprouts. *Carcinogenesis* 16 (4): 969–970.

Verhoeven, D.T.H., Verhagen, H., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A. & van Poppel, G. 1997. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-biological Interactions* 103: 79–129.

Verkerk, R., Krebbers, B., Dekker, M. & Jongen, W.M.F. 1997a. Effects of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Cancer Letters* 114: 193–194.

–, **Krebbers, B., Dekker, M. & Jongen, W.M.F.** 1997b. Glucosinolates as contributing factors in the quality of brassica vegetables: stress induced increase of indole glucosinolates. *Protection des cultures a qualite de 17-19 September 1997. The british crop protection council and ac'ssociety Nationale de Protection des plantes*. p. 93–101.

Vos, R.H. de & Blijleven, G.H. 1988. The effect of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel, Untersuchung und Forschung* 187: 525–529.

Zhang, Y. & Talalay, P. 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Research (Suppl.)* 54: 1976–1981.

5 Glukosinolaattien ja niiden hajoamistuotteiden määrittäminen

Juha-Matti Pihlava

*Maatalouden tutkimuskeskus, Elintarvikkeiden tutkimus, Kemian laboratorio,
31600 Jokioinen, juha-matti.pihlava@mtt.fi*

Glukosinolaattien tunnistaminen ja kvantointi tehdään esikäsittelyjen jälkeen pääasiassa neste- tai kaasukromatografisesti. Esikäsittelyssä on huomioitava että myrosinaasi-entsyymi hajottaa glukosinolaatteja nopeasti. Glukosinolaattien haihtuvien

hajoamistuotteiden analysoinnissa käytetään kaasukromatografiaa. Haihtumattomien hajoamistuotteiden, kuten eräiden indolien ja askorbigeenien, määrittäminen tehdään helpoiten nestekromatografisesti.

Avainsanat: glukosinolaatit, hajoamistuotteet, määrittäminen, nestekromatografia, kaasukromatografia

5.1 Johdanto

Kun glukosinolaatteja analysoidaan kasvimatriisista, on huomioitava se, että ne hajoavat herkästi kasveissa olevan myrosinaasi-entsyymien vaikutuksesta. Uutossa myrosinaasi pyritään denaturoimaan käyttämällä korkeita lämpötiloja. Glukosinolaatteja voidaan määrittää kaasukromatografisesti tai nestekromatografisesti. Nestekromatografisessa määrittämisessä yhdisteiden tunnistaminen ja kvantointi tapahtuu UV- tai diodirividetektorilla. Kaasukromatografista määrittäystä varten glukosinolaateista poistetaan polaarinen sulfaattiryhmä entsyymaattisesti ja muodostuneet desulfoglukosinolaatit silyloidaan. Nykyisin käytettympi tapa on glukosinolaattien nestekromatografinen määrittäminen entsyymaattisen desulfonoinnin jälkeen. Glukosinolaatit voidaan määrittää myös nestekromatogra-

fisesti ilman entsyymaattista sulfaatin poistoa (McGregor et al. 1983, Björkvist & Hase 1988, Rosa et al. 1997). Kapillarielektroforeesi vaikuttaa myös lupaavalta tavalta analysoida glukosinolaatteja (Karcher & El Rassi 1999).

Glukosinolaattien hajoamistuotteiden määrittämisessä käytetään kaasu- tai nestekromatografiaa. Kaasukromatografi soveltuu hyvin monien glukosinolaattien hajoamistuotteiden analysointiin, ainoastaan eräät indolit on silyloitava ennen määrittäystä (Slominski & Cambell 1988, Daxenbichler et al. 1991).

5.2 Glukosinolaatit

5.2.1 Kasvinäytteen esikäsittely

Tuoreiden kasvinäytteiden valmistusta

hankaloittaa näytteessä oleva glukosinolaatteja hajottava myrosinaasi-entsyymi. Edustavaa näytettä tehtäessä näyte on pilkottava, sekoitettava ja pakastettava mahdollisimman nopeasti. Glukosinolaattien säilymisen kannalta paras esikäsittely olisi nestetyypellä jäädyttäminen ja näytteen kryogeeninen jauhatus (Rosa & Heaney 1993). Pakastamisen jälkeen näyte pakkauskuivataan ja säilytetään pakastimessa.

5.2.2 Öljykasvien siementen esikäsittely

Öljykasvien siemenistä pitää poistaa öljy murskaamalla siemenet ja uuttamalla öljy pois esim. petroolieetterillä tai heksaanilla. Öljyn poiston jälkeen näytteessä oleva orgaaninen liuotin haihdutetaan ennen glukosinolaattien eristämistä (Minchinton et al. 1982, Björkvist & Hase 1988).

5.2.3 Glukosinolaattien eristäminen

Glukosinolaatit uutetaan tutkittavasta materiaalista kiehuvalle 70 % metanolilla (British Standard 1995), 80 % etanolilla (Hogge et al. 1988) tai vedellä (Björkvist & Hase 1988, Kushad et al. 1999). Näytettä inkuboidaan kuumassa (75–95 °C) vesihauteessa 5–10 min myrosinaasin inaktivoimiseksi (Hogge et al. 1988, British Standard 1995). Näyte voidaan tarvittaessa uuttaa muutamia kertoja uuttoliuksella ja väkevöidä uute lopuksi pyöröhaihduttimella (Hogge et al. 1988).

5.2.4 Glukosinolaattien desulfonointi

Glukosinolaateista poistetaan sulfaattiryhmä käsittelemällä uute sulfataasi-entsyymillä. Tämä tehdään tavallisimmin lataamalla näyte pieneen ioninvaihtohartsikolooniin (DEAE Sephadex A25), minkä jälkeen kolooniin lisätään sulfataasi-entsyymiliuosta. Näytettä inkuboidaan yön yli, jonka jälkeen desulfoglukosinolaatit eluoidaan kolonnista vedellä (British Standard 1995).

5.2.5 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi

Glukosinolaattien tunnistamista ja kvantitointia haittaa se, että vain kolme glukosinolaattia on saatavilla kaupallisesti (sinigriini, glukotropaeoliini ja glukonasturtiini). Tällöin yhdisteiden tunnistamisessa luotetaan paljon aikaisempiin julkaistuihin tutkimuksiin, joissa on selvitetty mitä glukosinolaatteja tuotteessa on ja missä suhteissa. Glukosinolaateille on sovittu tietyt 229 nm aallonpituudella mitatut vastekeruimet, joiden perusteella yhdisteiden pitoisuudet tuotteissa voidaan laskea, vaikkei niille olisikaan malliyhdisteitä. Glukosinolaateille on olemassa kaupallisia vertailumateriaaleja (ns. referenssit, esim. BCR:n rapsinäytteet), joilla voi tarkastaa määrityslaitteen kalibrointia.

5.2.5.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Glukosinolaattien tunnistamisessa ja kvantitoinnissa käytetään eniten korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC). Yhdisteiden havaitsemiseen käytetään UV- tai diodirividetektoria yleensä 229 nm:n aallonpituudella. Analysoitaessa desulfoituja glukosinolaatteja voidaan ajoliuokset pitää mahdollisimman yksinkertaisina: vesi ja asetonitriilin seoksena. Tavallisimmin käytetyt kolonnit ovat C18- tai C8-käänteisfaasikolonneja (Minchinton et al. 1982, Hogge et al. 1988, Rosa & Heaney 1993, British Standard 1995, Kushad et al. 1999).

Intaktit glukosinolaatit pitää analysoida ioniparina, jolloin ajoliuoksena on esim. 0,1 M ammoniumasetatti-asetonitriili (Björkvist & Hase 1988). Muita ioniparin muodostajia ovat tetraoktyyli-, tetradekyyli-, tetrametyyliammoniumionit (Prester et al. 1996).

5.2.5.2 Kaasukromatografia

Glukosinolaatteja voidaan määrittää desul-

faation ja silyloinnin jälkeen kaasukromatografisesti (Heaney & Fenwick 1980, Olsen & Sørensen 1980, Minchinton et al. 1982, Slominski & Campbell 1989). Tätä tekniikkaa käytetään hyvin vähän, vaikka joissakin tapauksissa kaasukromatografi-massaspektrometri voisi tuoda lisävarmuutta yhdisteiden tunnistamiseen (Bennett et al. 1997). Suurin ongelma kaasukromatografisessa tekniikassa on puhdistetun näyteuutteen kuiviin haihduttaminen ennen silylointia, sillä desulfoglukosinolaattien on todettu olevan epästabiileja vähäisenkin vesimäärän läsnäollessa (Hase et al. 1988).

Glukosinolaatit voidaan uuttamisen jälkeen hajottaa entsyymaattisesti ja hajoamistuotteet tunnistaa kaasukromatografisesti. Hajoamistuotteiden perusteella päätellään, mitä glukosinolaatteja tuotteessa on (Daxenbichler & VanEtten 1977, Daxenbichler et al. 1991, Buning-Pfaue & Dick-Hennes 1995).

5.3 Glukosinolaattien hajoamistuotteet

5.3.1 Hajoamistuotteiden eristäminen

Käytetyimmät ja perinteisimmät liuottimet isotiosyanaattien, nitriliin ja tiosyanaattien uuttamiseen kasviuutteista ovat dikloorimetaani (Daxenbichler & VanEtten 1977, Daxenbichler et al. 1977) ja dietyylieetteri (Cole 1976).

Dikloorimetaanilla on uutettu sinigrinin hajoamistuotetta allyyli- isotiosyanaattia ja 1-syano-2,3-epitiopropania kaalin vesihomogenaatista (Chin et al. 1996), sulforafaania parsakaalista (Bertelli et al. 1998, Chiang et al. 1998, Howard et al. 1997) ja indoliasetonitrilejä rypsiinemenistä ja kaa-leista (Slominski & Campbell 1989). Isotiosyanaatteja, indoleita ja oksatsolidiini-tioneja määritettiin rapsi- ja rapsirehunäyteistä lisäämällä näytteisiin fosfaatti-sitraatitipuskuriliuosta, myrosinaasia ja dikloorimetaania (Matthäus & Fiebig 1996).

Maanäytteistä glukosinolaattien hajoamistuotteita on uutettu kalsiumkloridili-

uoksen ja etyyliasetaatin (Borek et al. 1995) tai dikloorimetaanin seoksella (Brown et al. 1994).

5.3.2 Hajoamistuotteiden analysointi

5.3.2.1 Kaasukromatografia

Brown et al. (1994) käyttivät kaasukromatografia liekki-ionisaatiodetektorilla (GC-FID) isotiosyanaattien, nitriliin ja 5-vinyyli-2-oksazolidiiniinonin (OZT) määrittämiseen maanäytteistä. Cole (1976) määrittäi noin 20 ja Daxenbichler et al. (1991) yli 40 glukosinolaattien hajoamistuotetta GC-FID:lla. Chiang et al. (1998) määrittivät parsakaalista suhteellisen termolabiilia sulforafaania kaasukromatografilla, joka oli varustettu massaselektiivisellä detektorilla. Optimoimalla painepulssi-injektointi sulforafaanin hajoaminen hajoaminen 3-butenyyli-isotiosyanaatiksi saatiin minimoitua. Indoliasetonitriliä ja 4-hydroksi-3-asetonitriliä on määritetty kaasukromatografisesti silyloinnin jälkeen rapsirehusta ja keitetystä valkokaalista (Slominski & Campbell 1988, Slominski & Campbell 1989).

5.3.2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Sulforafaania on määritetty parsakaalista kiinteäfaasiuuton jälkeen HPLC:lla Yhdisteen määrittämiseen käytettiin 201 nm:n aallonpituutta (Bertelli et al. 1998). Matthäus & Fiebig (1996) määrittivät isotiosyanaatteja, indoleita ja oksazolidiini-tioneja rapsista ja rapsirehu-uutteista 210 ja 240 nm:n aallonpituuksilla. Indoliglukosinolaattien entsyymaattisen hajoamisen tuloksena syntyvää askorbigeeniä eli L-askorbiinihapon sisältämää indolia ja sen johdannaisia on määritetty kaalista ja hapankaalista HPLC: lla 280 nm:n aallonpituudella (Aleksandrova et al. 1992).

Kokonaisotiosyanaatti-pitoisuus voidaan määrittää nestekromatografisesti glukosinolaattien hajoamistuotteiden reagoi-

tua vikinaalisen ditiolin kanssa. Isotiosyanaatit syklokonendoituvat 1,2-bentseeniditiolin kanssa 1,3-bentseeniditioli-2-tioniksi, joka mitataan 365 nm:n aallonpituudella (Jiao et al. 1998).

5.3.2.3 Spektrofotometria

Kokonaisotiosyanaatti-pitoisuus voidaan määrittää spektrofotometrisesti tiosyanaattien reagoitua vikinaalisten ditiolien kanssa (Zhang et al. 1992). Vapaata tiosyanaatti-iona voidaan määrittää spektrofotometrisesti perustuen sen reagoimiseen rautanitraatin kanssa (Daxenbichler et al. 1980, Slominski & Cambell 1989).

Kirjallisuus

- Aleksandrova, L.G., Korolev, A.M. & Preobrazhenskaya, M.N.** 1992. Study of natural ascorbigen and related compounds by HPLC. *Food Chemistry* 45: 61–69.
- Bennett, R.N., Kiddle, G. & Wallsgrave, R.M.** 1997. Involvement of cytochrome P450 ingluco-sinolate biosynthesis in white mustard. *Plant Physiology* 114: 1283–1291.
- Bertelli, D., Plessi, M., Braghiroli, D. & Monzani, A.** 1998. Separation by solid phase extraction and quantification by reverse phase HPLC of sulforaphane in broccoli. *Food Chemistry* 63: 417–421.
- Björkqvist, B. & Hase, A.** 1988. Separation and determination of intact glucosinolates in rapeseed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 435: 501–507.
- Borek, V., Morra, M.J., Brown, P.D. & McCaffrey, J.P.** 1995. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1935–1940.
- British Standard 4325. 1995. Methods for analysis of oilseed residues. Part 12. Determination of glucosinolates content by high-performance liquid chromatography ISO 10633–1: 1995 (E).
- Brown, P.D., Morra, M.J. & Borek, V.** 1994. Gas chromatography of allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2029–2034.
- Buning-Pfaue, H. & Dick-Hennes, E.** 1995. Glucosinolate in Gemuse, methodischer Ansatz und neue Ergebnisse. *Lebensmittelchemie* 49: 64–65.
- Chiang, W.C.K., Pusateri, D.J. & Leitz, R.E.A.** 1998. Gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of sulforaphane and sulforaphane nitrile in broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1018–1021.
- Chin, H.-W., Zeng, Q. & Lindsay, R.C.** 1996. Occurrence and flavor properties of sinigrin hydrolysis products in fresh cabbage. *Journal of Food Science* 61: 101–104.
- Cole, R.A.** 1976. Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae. *Phytochemistry* 15: 759–762.
- Daxenbichler, M.E., Spencer, G.F., Carlson, D.G., Rose, G.B., Brinker, A.M. & Powell, R.G.** 1991. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry* 30: 2623–2638.
- & **VanEtten, C.H.** 1977. Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables: gas-liquid chromatographic determination of the aglycon derivatives from cabbage. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 60: 950–953.
- , **VanEtten, C.H. & Spencer, G.F.** 1977. Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables. Identification of organic nitriles from cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25: 121–124.
- , **VanEtten, C.H. & Williams, P.H.** 1980. Glucosinolate products in commercial sauerkraut.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 28: 809–811.

Hase, A., Johansson, M.-L. & Viljava, T.-R. 1988. Sources of error in the analysis of glucosinolates by gas-liquid chromatography. *Journal of American Oil Chemists Society* 65: 647–651.

Heaney, R.K. & Fenwick, R.G. 1980. The analysis of glucosinolates in Brassica species using gas chromatography. Direct Determination of the thiocyanate ion precursors, glucobrassicin and neoglucobrassicin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 31: 539–599.

Hogge, L.R., Reed, D.W., Underhill, E.W. & Haughn, G.W. 1988. HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana* and their identification using thermospray liquid chromatography / mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* 26: 551–556.

Howard, L., Jeffery, E., Wallig, M. & Klein, B. 1997. Retention of phytochemicals in fresh and processed broccoli. *Journal of Food Science* 62: 1098–1100, 1104.

Jiao, D., Yu, M.C., Hankin, J.H., Low, S.-H. & Chung, F.-L. 1998. Total isothiocyanate contents in cooked vegetables frequently consumed in Singapore. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1055–1058.

Karcher, A. & El Rassi, Z. 1999. Capillary electrophoresis of glucosinolates and their degradation products. *Electrophoresis* 20: 3181–3189.

Kushad, M.M., Brown, A.K., Kurilich, A.C., Juvik, J.A., Klein, B.P., Wallig, M.A. & Jeffery, E.H. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1541–1548.

Matthäus, B. & Fiebig, H.-J. 1996. Simultaneous determination of isothiocyanates, indoles, and oxazolidinethiones in myrosinase digests of rape-

seeds and rapeseed meal by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3894–3899.

McCregor, D.I., Mullin, W.J. & Fenwick, G.R. 1983. Analytical methodology for determining glucosinolate composition and content. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 66: 825–849.

Minchinton, I., Sang, J., Burke, D. & Truscott, R. 1982. Separation of desulphoglucosinolates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 247: 141–148.

Olsen, O. & Sørensen, H. 1980. Sinalbin and other glucosinolates in seeds of double low rape species and *Brassica napus* cv. *Bronowski*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28: 43–48.

Pretera, T., Fahey, J.W., Holtzclaw, D.W., Abeygunawardana, C., Kachinski, J.L. & Talalay, P. 1996. Comprehensive chromatographic and spectroscopic methods for the separation and identification of intact glucosinolates. *Analytical Biochemistry* 239: 168–179.

Rosa, E.A.S. & Heaney, R.K. 1993. The effect of cooking and processing on the glucosinolate content: studies on four varieties of Portugese cabbage and hybrid white cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62: 259–265.

Slominski, B.A. & Cambell, L.D. 1988. Gas chromatographic determination of indoleacetonitriles in rapeseed and *Brassica* vegetables. *Journal of Chromatography* 454: 285–291.

– **& Cambell, L.D.** 1989. Formation of indole glucosinolate breakdown products in autolyzed, steamed, and cooked *Brassica* vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 1297–1302.

Zhang, Y., Cho, C., Posner, G. & Talalay, P. 1992. Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Analytical Biochemistry* 205: 100–107.

		Julkaisun sarja ja numero Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja. Sarja A 90	
		Julkaisuaika (kk ja vuosi) Tammikuu 2001	
Tekijä(t) Helena Hyvärinen (toim.)		Tutkimushankkeen nimi	
		Toimeksiantaja(t) Maatalouden tutkimuskeskus	
Nimike Kasvipäriset biomolekyylit – glukosinolaatit. Kirjallisuuskatsaus			
Tiivistelmä <p>Glukosinolaatit ovat ristikukkaisilla kasveilla esiintyviä rikkiä sisältäviä yhdisteitä. Entsyymit hajottavat niitä ja hajoamistuotteet ovat fysiologisesti aktiivisia. Glukosinolaatit saattavat vaikuttaa mm. kasvien kestävyteen, siementen itämiseen, kasvitautilien ehkäisyyn sekä kasvien makuun. Yhdisteiden käyttäytyminen elimistössä sekä mahdolliset terveysvaikutukset ovat myös huonosti tunnettuja.</p> <p>Aikaisemmasta käsityksestä poiketen glukosinolaatit kasvissa esiintyessään saattavat vaikuttaa kasvin kehittymiseen, erityisesti poikkeavissa tilanteissa. Niiden esiintymiseen vaikuttaa sellaisia eläviä ja elottomia (bioottiset ja abioottiset) tekijöitä, joista ainakin osaa voidaan jo nyt huomioida viljelytekniikassa. Tämän lisäksi erilaiset ärsykkeet saattavat kiihdyttää glukosinolaattien muodostumista. Sellaisen viljelytekniikan kehittäminen, joka suosii tarvittaessa glukosinolaattien muodostumista edellyttää yhdisteiden biosynteesin ja hydrolyysin ymmärtämistä. Glukosinolaatteja pidetään kasvien puolustuskemikaaleina. Ristikukkaiskasvien murskatut solut, lahoavat kasvijätteet ja kasveista eristettyjen glukosinolaattien hajoamistuotteet estävät muiden kasvien siementen itämistä ja taimien kasvua. Ne myös rajoittavat maassa elävien kasvintuhoajien lisääntymistä. Glukosinolaattien hajoamistuotteet vaikuttavat ristikukkaiskasvien ja niitä syövien hyönteisten väliseen kemialliseen viestintään. Ristikukkaiskasvien avulla uskotaan voitavan vähentää kemiallisen torjunnan tarvetta viljelykierrossa. Elintarviketeknologiset prosessit ja varastointi vaikuttavat siihen, miten glukosinolaatit hajoavat ja paljonko hajoamistuotteita on elintarvikkeissa. Hajoamistuotteista erityisesti indoleilla ja isotiosyanaateilla on todettu positiivisia terveysvaikutuksia. Kasvien glukosinolaatit määritetään monivaiheisen esikäsittelyn jälkeen. Menetelmänä käytetään pääasiassa korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa. Glukosinolaattien hajoamistuotteiden analysoinnissa käytetään puolestaan kaasui- tai nestekromatografiaa. Tähän kirjallisuuskatsaukseen on koottu uusinta tutkimustietoa glukosinolaateista, niiden muodostumisesta ja hajoamisesta, biokemiasta, käytöstä kasvintuhoajien torjuntaan, käsittelyjen vaikutuksista, terveysvaikutuksista sekä analysoinnista.</p>			
Avainsanat: ristikukkaiset kasvit, kasvinviljely, kasvu, biosynteesi, kemiallinen koostumus, biomolekyylit, glukosinolaatit, torjuntamenetelmät, elintarviketuotanto, terveysvaikutukset, analyysimenetelmät			
Toimintayksikkö Maatalouden tutkimuskeskus, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemia- ja -teknologia, 31600 Jokioinen			
ISSN 1238-9935	ISBN 951-729-593-6	<input type="checkbox"/> Tuloksia voi soveltaa luomuviljelyssä	
Myynti: MTT tietopalveluyksikkö, 31600 JOKIOINEN Puhelin (03) 4188 2327 Telekopio (03) 4188 2339		Sivuja 72 s.	Hinta

Jyväskylän yliopistopaino 2001
ISBN 951-729-593-6
ISSN 1238-9935