

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Pracownia Proteomiki i Metabolomiki

Dorota Muth

**Rola fenolowych metabolitów wtórnych
w reakcji obronnej łubinu podczas antraknozy powodowanej
przez grzyb *Colletotrichum lupini*.**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Macieja Stobieckiego

Poznań 2010

Spis treści

Stosowane skróty.....	5
1 Cel pracy.....	7
2 Przegląd literatury	9
2.1 Flawonoidy	9
2.1.1 Struktura.....	9
2.1.2 Biosynteza.....	11
2.1.3 Modyfikacje struktury flawonoidów.....	13
2.1.4 Funkcje i aktywność biologiczna flawonoidów.....	19
2.2 Reakcje obronne roślin.....	21
2.2.1 Reakcja nadwrażliwości.....	22
2.2.2 Systemiczna odporność nabyta (SAR).....	22
2.2.3 Fitoaleksyny i fitoantycypiny.....	23
2.3 Metabolomika, jako narzędzie w genomice funkcjonalnej.....	24
2.3.1 Genomika funkcjonalna	24
2.3.2 Biologia systemów	26
2.4 Metabolomika.....	27
2.4.1 Metody analityczne wykorzystywane w badaniu metabolomu	28
2.5 Metody analityczne stosowane w analizie połączeń flawonoidów	33
2.5.1 Zastosowanie chromatografu cieczowego sprzężonego z detektorem UV w analizie związków fenolowych.....	33
2.5.2 Zastosowanie spektrometru mas w identyfikacji flawonoidów.....	35
3 Materiały i metody	42
3.1 Stosowane odczynniki	42
3.2 Materiał roślinny	42
3.3 Hodowla roślin	43
3.4 Porównanie wydajności metod ekstrakcji pod podwyższonym ciśnieniem oraz w łaźni ultradźwiękowej.....	43
3.4.1 Ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej.....	44
3.4.2 Ekstrakcja w ekstraktorze Dionex.....	44

3.5	Doświadczenie nr 1. Porównanie różnych sposobów infekcji sadzonek łubinu wąskolistnego zawiesiną zarodników grzyba <i>Colletotrichum lupini</i>	45
3.7	Doświadczenie nr 2. Infekcja siewek z populacji mapującej łubinu wąskolistnego.....	46
3.8	Doświadczenie nr 3. Inokulacja liści łubinu wąskolistnego zawiesiną metabolitów wyizolowanych z komórek grzyba <i>Colletotrichum lupini</i>	46
3.9	Doświadczenie nr 4. Badanie aktywności peroksydazowej białek cytoplazmatycznych infekowanych siewek łubinu wąskolistnego wobec gwajakolu..	47
3.9.1	Materiał roślinny	47
3.9.2	Ekstrakcja białek cytoplazmatycznych o aktywności peroksydazowej z liści siewek łubinu.	47
3.9.3	Badanie aktywności peroksydazowej enzymów:.....	48
3.10	Przygotowanie zawiesiny metabolitów wyizolowanych z komórek grzyba <i>C. lupini</i> .	48
3.11	Aparatura analityczna wykorzystywana do profilowania metabolitów wtórnych w ekstraktach roślinnych.....	49
3.11.1	Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem UV (HPLC-UV)	49
3.11.2	Chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas z analizatorem typu pułapka jonowa (LC/ESI-IT)	50
3.11.3	Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem UV oraz ze spektrometrem mas z hybrydowym analizatorem typu MS/MS: kwadrupol połączony z analizatorem czasu przelotu (UPLC/UV/ESI-QqToF).....	51
3.11.4	Chromatograf cieczowy RRLC sprzężony z detektorem UV i spektrometrem mas wyposażonym w hybrydowy analizator typu MS/MS: kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu (RRLC-UV-QqToF).....	52
3.12	Programy wykorzystywane do obliczeń statystycznych.....	53
4	Wyniki	54
4.1	Identyfikacja pochodnych połączeń flawonoidów w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego.....	54
4.1.1	Identyfikacja flawonoidów za pomocą systemów LC/MS	54
4.1.2	Określenie struktury diglikozydów flawonoidów	63
4.1.3	Określenie struktury malonylowanych glikozydów flawonoidów	67
4.1.4	Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem UV	77

4.2	Analiza ilościowa pochodnych flawonoidów w ekstraktach z liści łąbinu wąskolistnego.....	79
4.3	Opracowanie wydajnej metody ekstrakcji związków fenolowych z liści łąbinu wąskolistnego.....	80
4.4	Infekcja łąbinu wąskolistnego odm. Sonet zarodnikami grzyba <i>Colletotrihum lupini</i> (doświadczenie nr 1).....	81
4.5	Infekcja linii populacji mapującej łąbinu wąskolistnego (<i>L. angustifolius</i>) zarodnikami grzyba <i>C. lupini</i> (doświadczenie nr 2).	86
4.6	Elisytacja sadzonek łąbinu wąskolistnego zawiesiną metabolitów wyizolowanych z komórek grzyba <i>Colletotrichum lupini</i> (doświadczenie nr 3)	91
4.7	Porównanie zmian w poziomie stężeń malonylowego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny oraz wolnych aglikonów izoflawonów w liściach łąbinu wąskolistnego po infekcji zarodnikami <i>C. lupini</i> oraz traktowaniu roztworem toksyn grzybowych.	99
4.8	Badanie białek o aktywności peroksydazowej w liściach łąbinu wąskolistnego infekowanych zawiesiną zarodników <i>C.lupini</i> . (Doświadczenie nr 4)	102
5	Dyskusja	104
5.1	Analiza jakościowa i ilościowa połączeń flawonoidów w ekstraktach z łąbinu wąskolistnego – aspekty metodyczne.	105
5.2	Infekcja liści łąbinu wąskolistnego zawiesiną zarodników <i>C. lupini</i> oraz elisytacja roztworem metabolitów grzybowych.....	113
6	Wnioski	122
7	Literatura	124

Stosowane skróty:

CID	- dysocjacja jonów indukowana kolizyjnie
DAD	- detektor UV z matrycą diodową
DI	- bezpośredni nastrzyk
ESI	- jonizacja przez elektrorozpraszanie
FT ICR	- analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników
GC/MS	- chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa
HR	- reakcja nadwrażliwości
IT	- pułapka jonowa
LC	- chromatografia cieczowa
MALDI	- jonizacja przez desorpcję laserem z matrycy
MS	- spektrometria mas
MS/MS	- tandemowa spektrometria mas
MS ⁿ	- tandemowa spektrometria mas n-tego rzędu
NMR	- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PCA	- analiza składowych głównych
PR	- białka związane z mechanizmami reakcji obronnych
RP	- odwrócona faza
RRLC	- szybko rozdzielcza chromatografia cieczowa
SAR	- systemicznie indukowana odporność
QqTof	- analizator hybrydowy kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu
Tof	- analizator czasu przelotu
UPLC	- ultrasprawa chromatografia cieczowa
PAL	- amoniakolizacja fenyloalaniny
TAL	- amoniakolizacja tyrozyny
C4H	- 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego
4CL	- ligaza 4-kumarylokoenzymu A
CHS	- syntaza chalkonowa
CHI	- izomeraza chalkonowa
PKR	- reduktaza poliketonowa

IFS	- syntaza izoflawonowa
2HIS	- syntazę 2-hydroksyflawanonu
2HID	- 2-hydroksyizoflawanonu
F3H	3-hydroksylaza flawonoidowa
HI4'OMT	- O-metylotransferaza 4'-hydroksyizoflawonu
ANS	synteza antocyjanowa
OMT	- O-metylotransferaza
SAM	- S-adenozyl-L-metionina
HM3OMT	- 3-O-metylotransferaza (+)-6a-hydroksymackainy
DMAPP	- dimetyloallilo pirofosforan
GPP	- geranylo pirofosforan
UGT	- UDP glikozylotransferaza
ICA	- analiza składowych niezależnych
RDA	- reakcja retro Dielsa – Aldera
TMV	- wirus mozaiki tytoniowej
Rha	- ramnoza
Glc	- glukoza
Xyl	- ksyloza
MeLut	- 3'O-metyloluteolina

1 Cel pracy

Rośliny są niezbędnym elementem środowiska życia człowieka. Jako źródło pożywienia, na którego niedobór cierpią miliony ludzi w różnych zakątkach ziemi oraz rezerwar istotnych dla diety człowieka produktów naturalnych są przedmiotem zainteresowań badaczy na całym świecie. W obecnej chwili tereny upraw zajmują optymalną powierzchnię na ziemi. Ze względu na postępującą urbanizację zwiększanie areału rolniczego jest niemożliwe. Innym rozwiązaniem problemów aprowizacyjnych jest podniesienie wydajności produkcji rolnej poprzez stosowanie odmian roślin uprawnych, które są bardziej odporne na warunki atmosferyczne oraz na stesy biotyczne i abiotyczne. Zachodzące zmiany klimatyczne na Ziemi skutkują zmniejszeniem zasobów naturalnych wody oraz globalnym ociepleniem, co sprawia, że hodowlę roślin trzeba dostosować do nowych warunków.

Obecnie powszechnie wykorzystuje się trzy metody ulepszania roślin uprawnych: krzyżowanie odmian hodowlanych z roślinami typu dzikiego, technologię transgeniczną, oraz różnicowanie rodzajów uprawianych roślin. Wraz z wprowadzaniem nowych odmian roślin do hodowli przeprowadza się analizę genotypów oraz fenotypów ich przedstawicieli w celu określenia, która z wprowadzonych zmian w genomie jest odpowiedzialna za daną cechę ilościową rośliny (np. większą odporność na atak patogenu). Istotnym narzędziem w poznawaniu struktury i ewolucji genomów oraz znajdowania loci kontrolujących zmienność cech ilościowych o znaczeniu ekonomicznym (zwiększenie plonów) i ekologicznym (adaptacja do warunków środowiska, odporność na stres biotyczny i abiotyczny) są mapy genetyczne. Istotnym aspektem w badaniach biologicznych jest relacja pomiędzy markerem genetycznym a obserwowanymi cechami ilościowymi.

W badaniach nad zwiększeniem wydajności upraw ważnym problemem jest również jałowienie ziemi corocznie uprawianej w warunkach monokultury. Rozwiązaniem jest stosowanie poplonu, czyli wysianie odmiany rośliny, która dzięki swoim cechom gatunkowym pozwala na użyczenie oraz poprawę warunków glebowych pomiędzy kolejnymi plonami. Powszechnie stosowaną rośliną tego typu jest łubin. W ostatnich latach uprawy łubinu w Polsce znacznie zmalały ze względu na atak grzyba patogennego *Colletotrichum lupini* wywołującego antraknozę prowadzącą do śmierci rośliny.

Szacuje się, że ponad 200 000 metabolitów jest produkowanych w królestwie roślin. Przedstawiciele różnych gatunków charakteryzują się odmiennym składem

metabolomu. Metabolity pierwotne jak aminokwasy, cukry, kwasy tłuszczowe występują powszechnie we wszystkich gatunkach roślin, natomiast metabolity wtórne są charakterystyczne dla poszczególnych rodzin bądź gatunków. Zmiany w metabolomie są jednym z mechanizmów obronnych lub adaptacyjnych roślin w odmiennych warunkach życia. Badanie zmian w profilach metabolitów w różnych warunkach fitopatologicznych komórki (rośliny) jest konieczne w celu lepszego zrozumienia przebiegu mechanizmów biochemicznych i fizjologicznych. Dzięki większej wiedzy w zakresie kontroli syntezy metabolitów na poziomie transkryptomu oraz proteomu możliwe będzie bardziej precyzyjne zaprojektowanie zmian genetycznych prowadzących do uzyskania lepszych odmian uprawianych roślin.

Celem badań opisanych w przedstawionej pracy doktorskiej jest określenie wpływu poziomu związków fenolowych na podatność rośliny na antraknozę. Znanymi fitoaleksynami w łubinie są luteon oraz wighteon. Badanie mechanizmów akumulacji tych związków w liniach populacji mapującej, różniących się pod względem odporności na atak grzyba patogennego *C. lupini* wywołującego chorobę przyczyni się do wybrania do dalszej hodowli linii najbardziej odpornej, którą będzie można w przyszłości wprowadzić do uprawy. Innym aspektem tych badań będzie możliwość określenia loci cech ilościowych odpowiadających za odporność roślin na antraknozę. Przeprowadzenie badań nad poziomem syntezy związków fenolowych dla populacji mapującej łubinu wąskolistnego wymaga również opracowania metodycznego prowadzenia tego rodzaju eksperymentów. Dotyczy to głównie określenia sposobu infekowania roślin jak i zbioru materiału roślinnego. Ustalenie warunków prowadzenia tego typu doświadczeń będzie miało istotny wpływ na wyniki eksperymentu wykonanego na populacji mapującej.

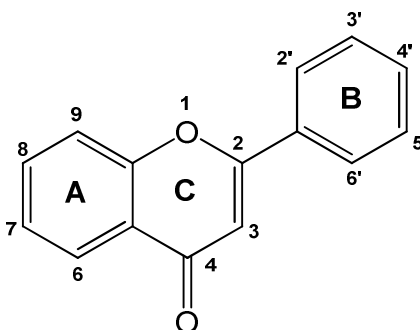
Profilowanie metabolitów jest wydajnym narzędziem w określaniu wartości odżywczych danej odmiany hodowlanej. Na podstawie szeroko zakrojonej analizy związków niskocząsteczkowych możliwe jest wskazanie ubocznych efektów manipulacji genetycznych. W analizie metabolomu stosuje się różnego rodzaju systemy analityczne, które dostarczają informacji o substancjach w badanych próbkach na różnym poziomie czułości i selektywności. Aspekty metodyczne, które przedstawione zostaną w tej pracy poruszają istotny problem świadomości, możliwości oraz ograniczeń stosowanych metod analitycznych.

2 Przegląd literatury

2.1 Flawonoidy

2.1.1 Struktura

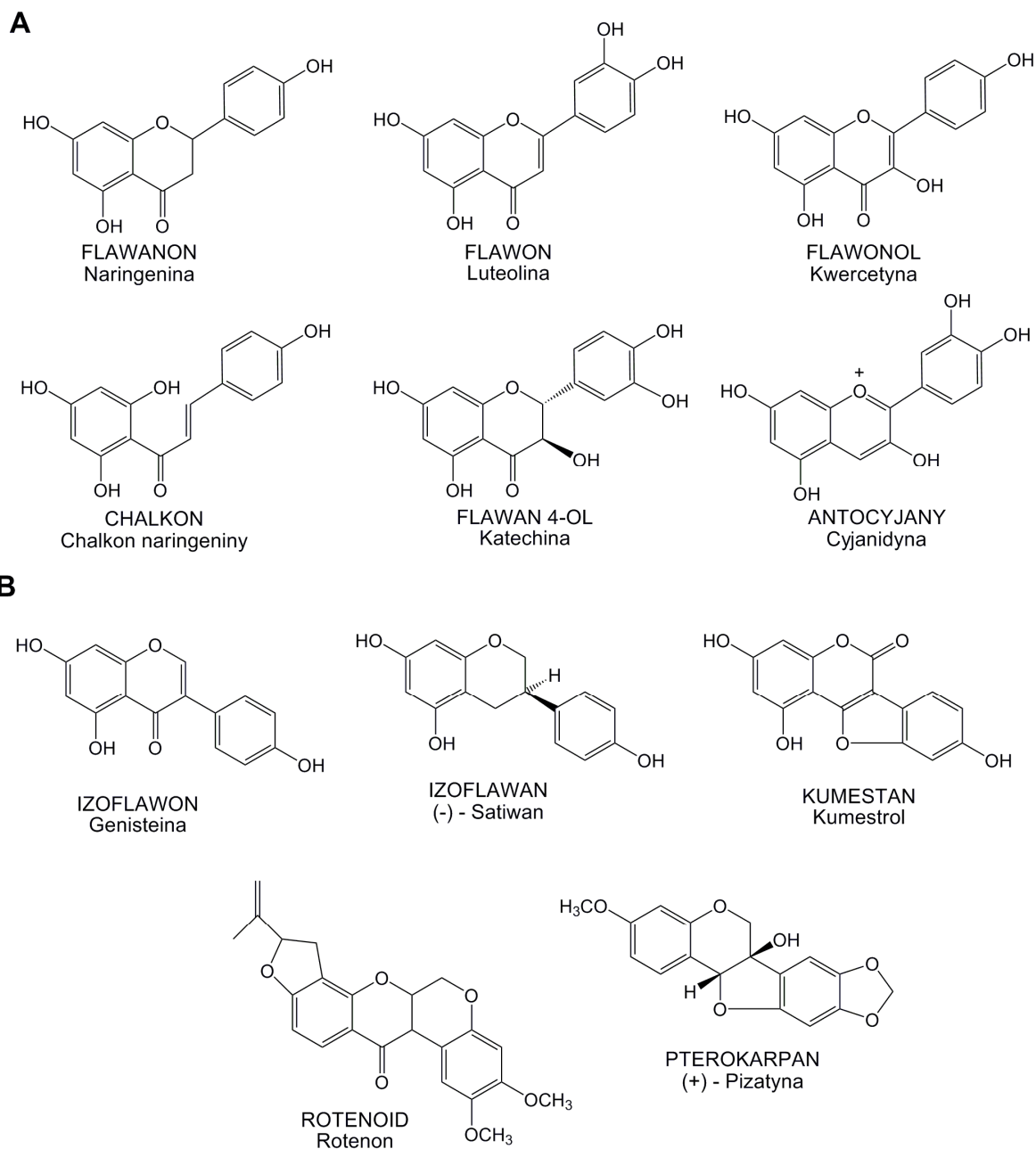
Flawonoidy są jedną z klas fenolowych metabolitów wtórnych syntezowanych przez rośliny. Związki należące do tej grupy zbudowane są na bazie szkieletu węglowego C₆-C₃-C₆ (Rys. 3-1) składającego się z dwóch pierścieni benzenowych połączonych mostkiem trójwęglowym. W większości struktur, wewnętrzny łańcuch jest zamknięty w heterocykliczny pierścień C.



Rys. 3-1 Struktura szkieletu C₆-C₃-C₆.

Kryteriami klasyfikacji flawonoidów są stopień utlenienia pierścienia C oraz miejsce przyłączenia pierścienia B. Do najważniejszych klas tej grupy związków należą: flawony, flawony, flawonole, izoflawonoidy, antocyjanidyny oraz chalkony. Ciąg sprzężonych wiązań podwójnych tworzy chromofor, dzięki któremu związki fenolowe absorbują światło w zakresie promieniowania ultrafioletowego (UV) oraz widzialnego (antocyjany). Na podstawie charakterystycznych maksimów absorpcji promieniowania UV dla poszczególnych klas flawonoidów, możemy je rozróżnić na podstawie rejestrowanych widm.

Izoflawonoidy tworzą jedną z podgrup flawonoidów i obejmują następujące substancje: izoflawony, izoflawany, pterokarpany, kumestany i rotenoidy. Charakterystyczną cechą struktury izoflawonoidów jest przyłączenie pierścienia B w pozycji 3 pierścienia C. Ta grupa związków występuje głównie w roślinach rodziny bobowatych (Fabaceae) choć w innych rodzinach również zidentyfikowano jej przedstawicieli (Lapcik, 2007).



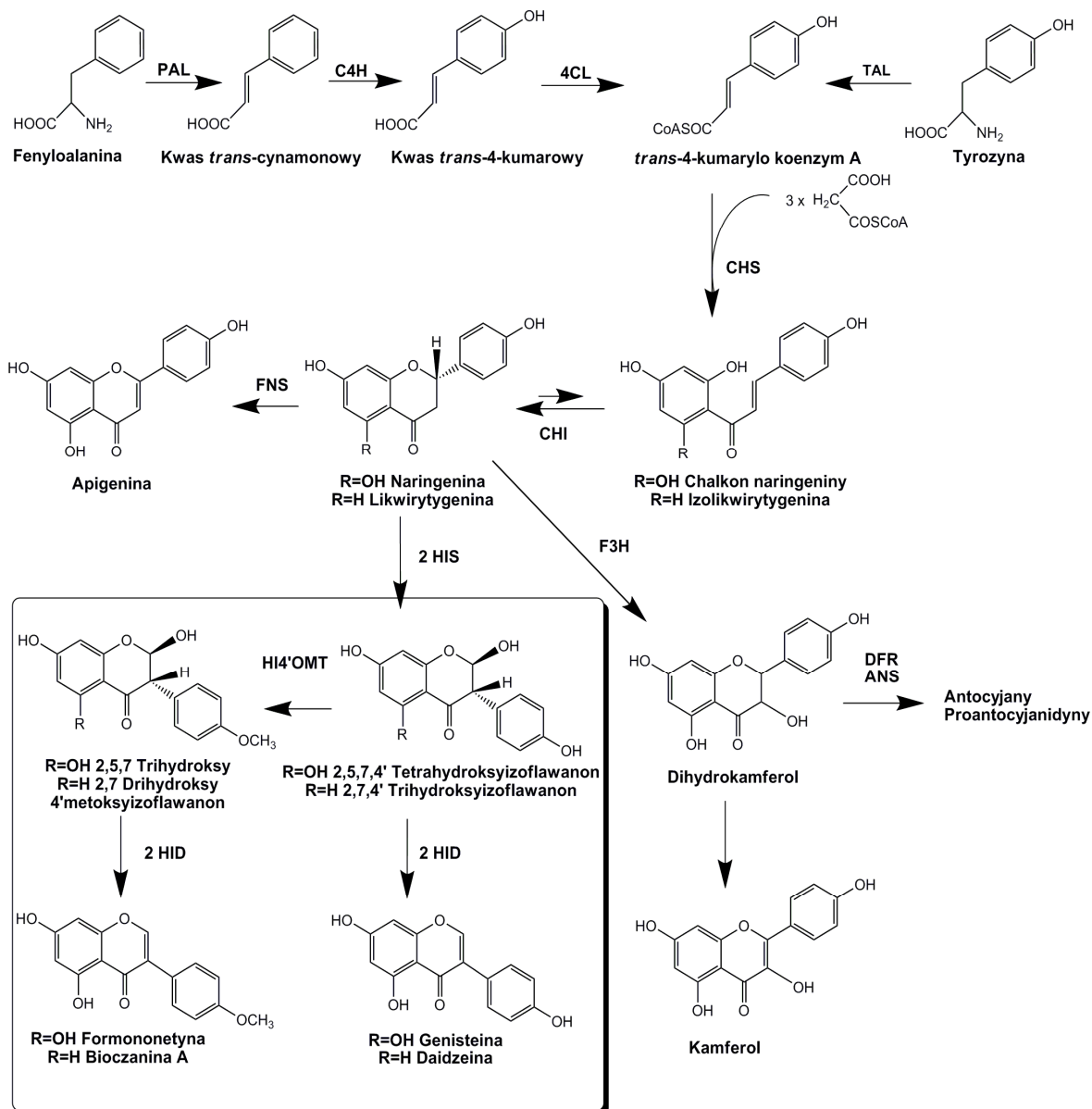
Rys. 3-2 Struktury najważniejszych klas flawonoidów (A) i izoflawonoidów (B).

Każdy z pierścieni flawonoidowych może ulegać podstawieniu następującymi grupami: hydroksylową (hydroksylowane pozycje to 3, 5, 7, 2', 3' oraz 4'), metylową, prenylową, glikozydową, acylową, sulfonową (zidentyfikowano pochodne sulfonowe flawonów i flawonoli, istnieje możliwość sulfonowania na grupach hydroksylowych pierścieni flawonoidowych bądź grupy cukrowej przyłączonej do aglikonu). Najpowszechniej występującymi miejscami podstawienia grup hydroksylowych są pozycje 5 i 7 pierścienia A oraz pozycja 4' pierścienia B, które wprowadzane są do szkieletu flawonoidów podczas reakcji biosyntezy zachodzących w szlaku fenylopropanoidowym.

Dalsze reakcje hydroksylacji mogące zachodzić w pierścieniu B są katalizowane przez mikrosomalne enzymy cytochromu P-450 oraz mono- i dioksygenazy (Ayabe i Akashi, 2006).

2.1.2 Biosynteza

Szlak fenylopropanoidowy jest jednym z najlepiej zbadanych i poznanych szlaków biosyntetycznych metabolitów wtórnych. W dużym stopniu jest zależny od szlaków metabolizmu pierwotnego: kwasu szikimowego, w którym powstają prekursorzy flawonoidów fenyloalanina i tyrozyna oraz od cyklu kwasu cytrynowego, w którym powstaje malonylo koenzym A. Przebieg syntezy flawonoidów opiera się na szeregu reakcji enzymatycznych, w którego pierwszym etapie enzymy amoniakoliaza fenyloalaniny (PAL) bądź amoniakoliaza tyrozyny (TAL), 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego (C4H), ligaza 4-kumarylo CoA (4CL) przekształcają aminokwasy w 4-kumarylo koenzym A (Rys. 3-3). Sprzężenie 4-kumarylo koenzymu A z trzema cząsteczkami malonylo koenzymu A przy udziale syntazy chalkonowej (CHS) prowadzi do powstania jednostki $C_6-C_3-C_6$ z otwartym pierścieniem C, na tej drodze powstaje chalkon naryngeniny (2',4,4',6'-tetrahydroksychalkon). W roślinach, w których występuje enzym reduktaza chalkonowa może tworzyć się 2',4,4'-trihydroksychalkon (izolikwirytygenina). Początkowo trudno było wyizolować poniższy związek, który jest produktem pośrednim w syntezie bardziej trwałego flawanonu naringeniny. W związku z tym sądzono, że syntaza flawanonu katalizuje reakcję bezpośredniej syntezy flawanonu z 4-kumarylo-CoA i malonylo-CoA. Przeprowadzone eksperymenty wskazały jednak, że reakcja przebiega dwuetapowo poprzez powstanie produktu pośredniego. Synteza flawanonu jest katalizowana przez dwa enzymy syntazę chalkonową (CHS) i izomerazę chalkonową (CHI), które działają w ścisłym sprzężeniu ze sobą. W roślinach występują dwa typy izomerazy chalkonowej – CHI I, dla której substratem są 6'-hydroksychalkony oraz CHI I-II, która może przekształcać zarówno 6'-hydroksy jak i 6'-deoksychalkony. Drugi typ enzymu jest charakterystyczny dla rodziny roślin bobowatych. Synteza 6'-deoksyhydrochalkonów związana jest z obecnością reduktazy poliketonowej (PKR) sprzężonej z CHS. W pierwszym etapie PKR redukuje grupę ketonową do alkoholowej, która następnie jest usuwana w procesie cyklizacji przez CHS. Przegrupowania te prowadzą do powstania 5'-deoksyflawonoidów (likwirytygenina)(Aoki i in., 2000).



Rys. 3-3 Szlak fenylpropanoidowy.

Pierścień B oraz atomy węgla w pierścieniu C pochodzą od kumarylokoenzymu A, natomiast pierścień A zbudowany jest z atomów pochodzących ze sprzężonych cząsteczek kwasu malonowego. Reakcja katalizowana przez izomerazę chalkonową jest całkowicie stereoselektywna. Produktem reakcji jest (-)-2*S*-flawanon (Stafford, 1990).

Przeciwnie do wszechobecnie występujących w królestwie roślin flawonoidów, izoflawonoidy występują głównie w roślinach rodziny bobowatych (Fabaceae), w których aktywowany jest enzym kluczowy w ich biosyntezie syntaza izoflawonowa (IFS). Choć nazwa enzymu wskazuje na proces jednoetapowy, przebiega on w dwóch reakcjach enzymatycznych, w pierwszym zachodzi przekształcenie flawanonu w 2-

hydroksyizoflawanon katalizowany przez syntazę 2-hydroksyflawanonu (2HIS), w drugiej następuje eliminacja cząsteczki wody katalizowana przez dehydratazę 2-hydroksyizoflawanonu (2HID), reakcje te prowadzą do powstania izoflawonu (Shimamura i in., 2007). Etap katalizowany przez 2HIS jest reakcją stereoselektywną, w której substratem może być jedynie 2*S*-flawanon a nie 2*R*-flawanon (Rys. 3-3). Przeniesienie grupy arylovej zachodzi po oderwaniu atomu wodoru w pozycji C-3, pierścień fenyłowy migruje z pozycji C-2 do C-3, kolejnym etapem jest hydroksylacja rodnika w pozycji C-2, a następnym dehydratacja (Tian i in., 2008). Reakcja migracji pierścienia arylovego jest reakcją bardzo nietypową, dlatego liczne eksperymenty zostały opisane w literaturze, aby określić mechanizm tej reakcji (Ayabe i Akashi, 2006).

Sekwencja aminokwasów w białku 2HIS w różnych gatunkach roślin wykazuje duży stopień pokrewieństwa. Przeprowadzone zostały badania na mutantach CYP93C2 soi (białka podrodziny cytochromu P450, należy do niej enzym 2HIS), w których w sekwencji 2HIS zmienione zostały aminokwasy znajdujące się w centrum aktywnym, wyznaczone na podstawie modelowania struktury białka. Geny białek z roślin typu dzikiego oraz zmutowanych poddano ekspresji w drożdżach. Na podstawie szeregu przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że lizyna 375 jest niezbędna do prawidłowej migracji pierścienia, natomiast seryna 310 oraz leucyna 371 odgrywają ważną rolę w reakcji odrywania wodoru z pozycji C-3 pierścienia C (Sawada i in., 2002; Sawada i Ayabe, 2005).

2.1.3 Modyfikacje struktury flawonoidów.

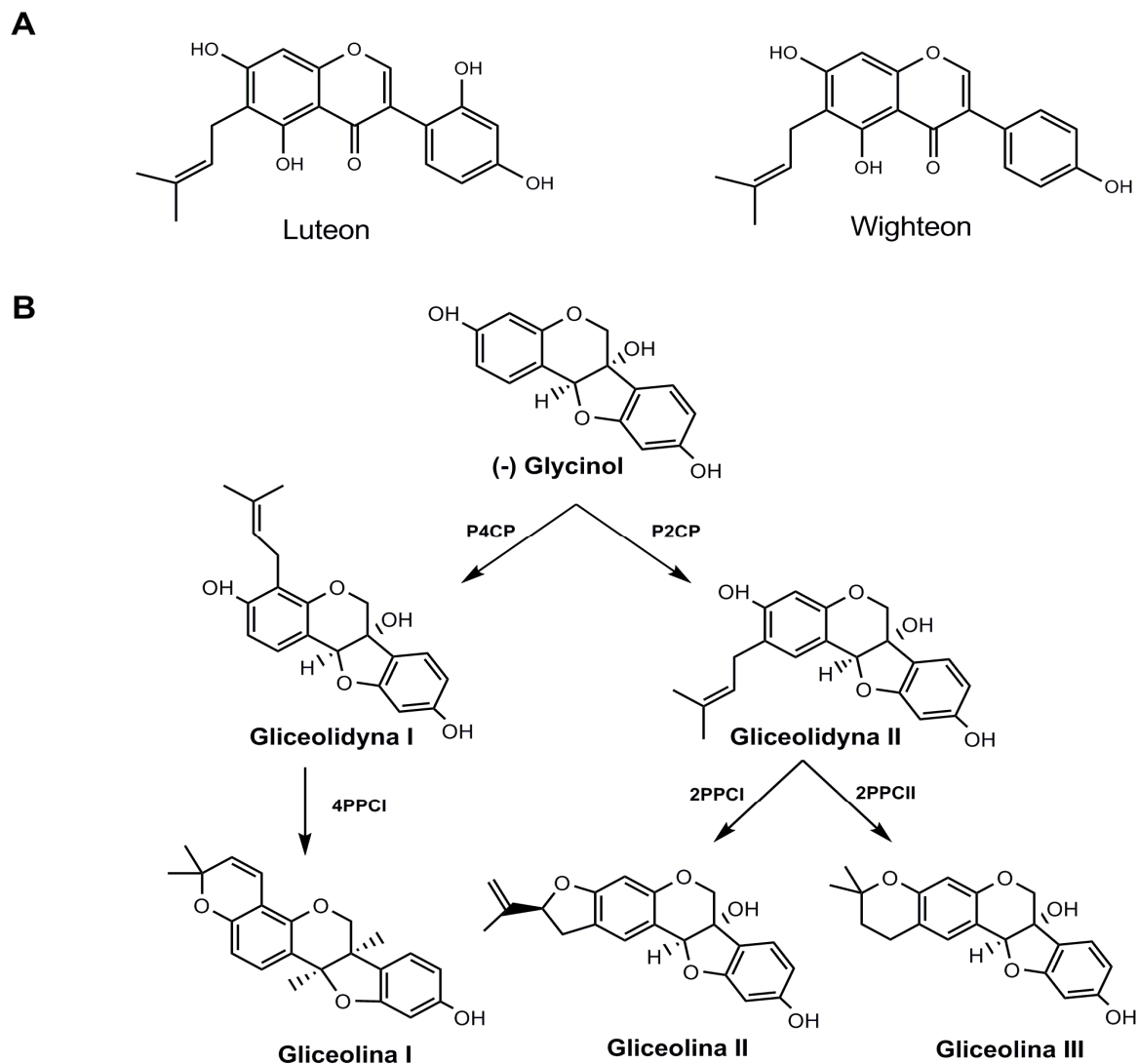
Poza głównym szlakiem metabolizmu flawonoidów, każda z cząsteczek tej klasy związków może ulec reakcji hydroksylacji oraz podstawienia na grupach hydroksylowych lub atomach węgla pierścienia A oraz B grupą metylową, glikozydową, acylową, sulfonową bądź prenylową. Na tej drodze syntezowana jest duża grupa strukturalnie zróżnicowanych związków pełniących odrębne funkcje w komórce roślinnej. Enzymy katalizujące tego typu reakcje należą do klasy transferaz. Wprowadzenie modyfikacji powoduje wzmocnienie roli biologicznej cząsteczek np. intensyfikując kolor lub zwiększając ich aktywność antybiotyczną (np. podstawienie grupą izoprenylową lub utworzenie dodatkowego pierścienia w cząsteczce). Z kolei w reakcji glikozylowania syntezowane są metabolity przeznaczone do magazynowania w wakuolach. Zmiana struktury związku może mieć również znaczenie w kontroli biosyntezy. Poprzez przekształcenie produktu pośredniego w bardziej przyswajalną formę dla jednego z

enzymów kompetycyjnych. Większość z wprowadzanych modyfikacji jest specyficzna dla danego gatunku roślin i nie do końca zrozumiała jest ich rola biochemiczna i fizjologiczna (Tian i in., 2008).

Reakcja metylowania grup hydroksylowych flawonoidów prowadzona jest przez enzymy należące do klasy O-metylotransferaz (OMT). Mechanizm reakcji polega na przeniesieniu grupy metylowej S-adenozylu-L-metioniny (SAM) na grupę OH tworząc eter metylowy oraz S-adenozylu-L-homocysteinę. W przypadku izoflawonów najczęściej metylowane są grupy hydroksylowe podstawione na atomach węgla C-4' oraz C-3' pierścienia B. Aktywność metylotransferaz jest indukowana odpowiedzią rośliny na stres np. infekcją grzybową (He i in., 1998; He i Dixon, 2000). Reakcje metylowania przebiegają według różnych mechanizmów, formononetyna powstaje w dwuetapowej reakcji enzymatycznej z 2,7,4'-trihydroksyflawanonu metylowanego przez O-metylotransferazę 4'-hydroksyizoflawonu HI4'OMT do 2,7-dihydroksy-4'-metoksyizoflawanonu, w kolejnym kroku następuje reakcja dehydratacji katalizowana przez dehydratazę (Rys. 3-3) (Akashi i in., 2003). Daidzeina nie jest substratem dla HI4'OMT. Pizatylna w grochu natomiast powstaje w prostej reakcji metylacji 6a-hydroksymackainy katalizowanej przez 3-O-metylotransferazę (+)-6a-hydroksymackainy (HM3OMT) (Liu i in., 2006). Metylotransferazy są grupą enzymów dobrze poznaną w reakcjach przebiegających w warunkach *in vitro*, natomiast nie jest jasna ich rola w warunkach *in vivo*.

Kolejną modyfikacją flawonoidów jest prenylowanie pierścieni fenolowych lub grup hydroksylowych zwane również izoprenyłowaniem. Wiązanie z łańcuchem prenylowym może mieć miejsce przez atom węgla lub przez atom tlenu, mówimy o C-prenylowanych i O-prenylowanych flawonoidach lub izoflawonoidach. W procesie tym następuje podstawienie grupą izoprenylową pierścienia arylowego najczęściej izoflawonoidów, substratem reakcji jest dimetyloallilo pirofosforan (DMAPP) lub geranylo pirofosforan (GPP) (Satoshi i Ragai, 1995). Oksoprenylowane izoflawonoidy po raz pierwszy zidentyfikowano w latach 80-tych, wcześniej uważane były za produkty pośrednie w syntezie C-prenylowanych pochodnych (Epifano i in., 2007). C-prenylowane pochodne są znacznie bardziej rozpowszechnione w królestwie roślin. Prenylacja pojedyncza lub podwójna może zachodzić w różnych pozycjach pierścieni A i B, następnie przyłączone łańcuchy mogą wchodzić w wewnątrzcząsteczkowe reakcje cyklizacji (Rys. 3-4). Żadna z prenylotransferaz nie została scharakteryzowana na poziomie cząsteczkowym. Wiadomo jednak, że enzym ten w łubinie oraz soi należy do grupy enzymów błonowych

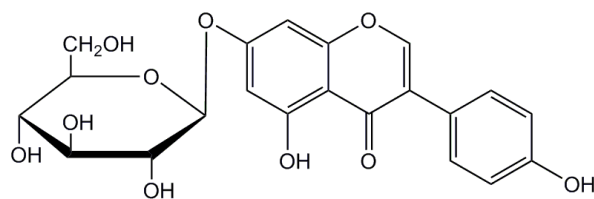
(Welle i Grisebach, 1991). Mikrosomalne frakcje preparatów z korzeni łubinu białego oraz z zawiesin komórkowych katalizowały reakcję prenylacji w obecności jonów manganu Mn^{2+} , w buforze o pH 7,5, w pozycjach C-6, C-8 i C-3' genisteiny oraz 2'-hydroxygenisteiny używanych jako substratów reakcji (Laflamme i in., 1993).



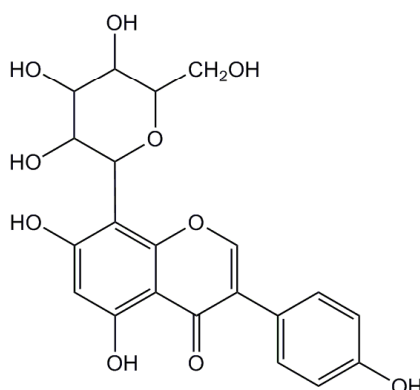
Rys. 3-4 Struktury prenylowanych izoflawonów w łubinie wąskolistnym (A). Schemat prenylowania oraz cyklizacji glycinolu, powstająca glyceolina jest fitoaleksyną w soi (B) (wg Andersen i Markham, 2006).

Glikozylacja metabolitów wtórnych zachodzi powszechnie w królestwie roślin. Celem procesu jest zwiększenie rozpuszczalności związków (metabolitów wtórnych), aby ułatwić ich transport i magazynowanie w wakuolach, skąd mogą być uwalniane w razie ataku organizmu patogennego. Przyłączenie cząsteczki cukru do aglikonu zwiększa również jego przyswajalność przez organizm człowieka. Glikozydy występują w dwóch formach w zależności od sposobu wiązania cząsteczki cukru do aglikonu. O-glikozydy są znacznie bardziej rozpowszechnione, a wiązanie podlega łatwo hydrolizie kwasem bądź w

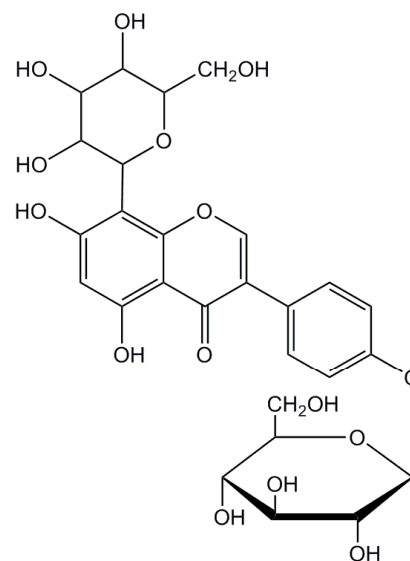
reakcji enzymatycznej. Wiązanie w C-glikozydach jest mocniejsze i nie rozpada się w wyniku hydrolizy.



7-O-glukozyd genisteiny



8-C-glukozyd genisteiny

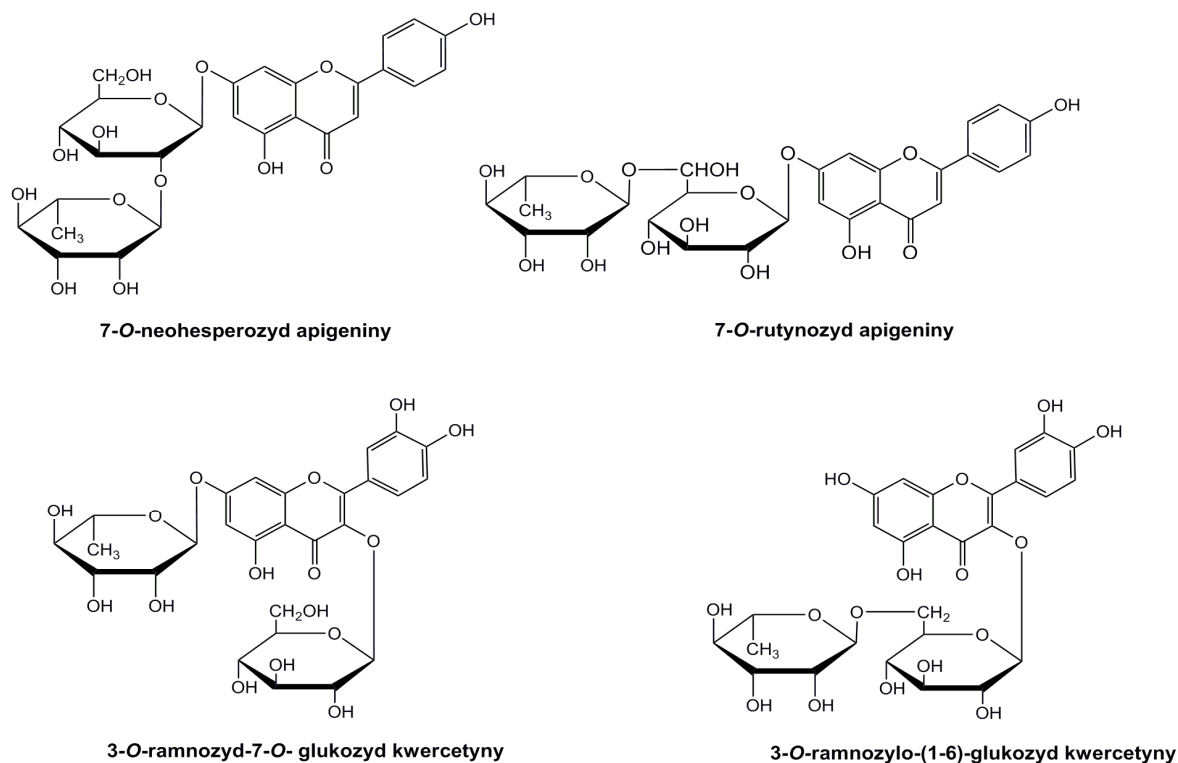


4'-O, 7-C diglukozyd genisteiny

Rys. 3-5 Przykłady sposobów glikozylacji flawonoidów.

Enzymy katalizujące reakcję przyłączenia cząsteczek cukrów do aglikonów należą do glikozylotransferaz. Mechanizm działania polega na przyłączeniu zaktywowanej nukleotydem fosforanowym cząsteczki cukru do cząsteczki glikozylowanej. W genomie rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) zidentyfikowano 117 genów kodujących przypuszczalnie UDP glikozylotransferazy (UGT) (Ross i in., 2001). Nie zidentyfikowano do tej pory genu kodującego C-glikozylację flawonoidów jednakże wiadomo, że są one syntezowane w oddzielnym szlaku niż O-glikozydy (Wallance i Grisenbach, 1973). Reakcje C-glikozylacji zachodzą na poziomie flawanonów, które następnie są utleniane do flawonów, natomiast O-glikozylacja zachodzi na wyższym etapie utlenienia, to znaczy dopiero po utworzeniu flawonów. Specyficzną dla izoflawonoidów glikozylotransferazę UGT73F1 zidentyfikowano w zawiesinach komórkowych *Glycyrrhiza echinata* (roślina z rodziny bobowatych). Enzym ten przekształca daidzeinę oraz formononetynę w odpowiednie 7-O-glukozydy, nie wykorzystując jako substraty innych produktów szlaku fenylopropanoidowego, na przykład flawonów lub flawonoli (Nagashima i in., 2004). Glikozylotransferazy zachowują zróżnicowaną specyficzność względem substratów. Najpowszechniej występującymi cukrami w pochodnych flawonoidów są glukoza i

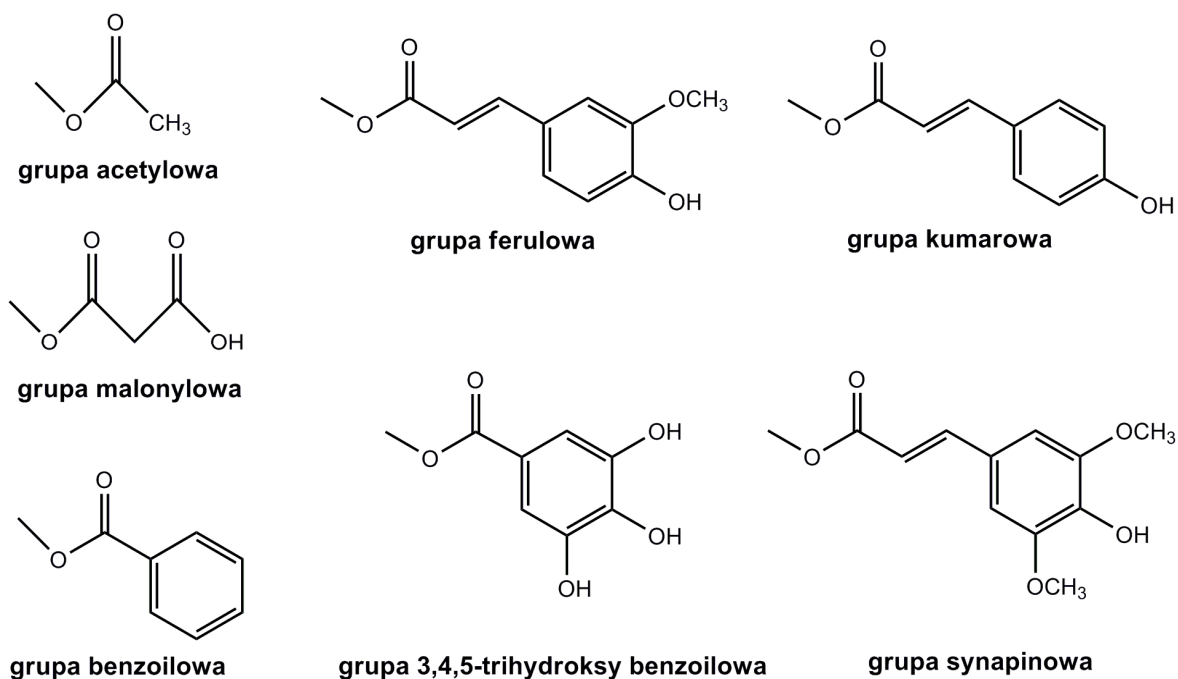
galaktoza (heksozy), ramnoza (deoksyheksoza) oraz ksyloza, występują również arabinoza i apioza (pentozy).



Rys. 3-6 Izomeria diglikozydów flawonoidów

W przypadku flawonoidów istnieje wiele sposobów przyłączenia cząsteczki cukru do aglikonu oraz szereg różnych połączeń pomiędzy jednostkami cukrowymi w łańcuchach sacharydowych (Rys. 3-6). Tego rodzaju zmiany powodują różnice we właściwościach danego metabolitu. Na przykład aktywność 1-2 ramnozylotransferazy w cytrusach powoduje zmianę smaku owoców na skutek obecności w tkankach tego izomeru (Frydman i in., 2004).

Acylowanie jest najmniej poznaną i zrozumianą formą modyfikacji glikozydów flawonoidów. Powszechnie występującymi grupami acylującymi są kwasy aromatyczne (często kwasy fenylopropanowe) lub alifatyczne (kwas malonowy), acylowanie zachodzi na części cukrowej glikozydów (Rys. 3-7).



Rys. 3-7 Grupy acylowe i arylove występujące w połączeniach glikozydowych flawonoidów (wg Cuyckens i Claeys, 2004).

W przypadku antocyjanin wprowadzenie reszty kwasu malonowego do cząsteczki glikozydu może mieć znaczenie w stabilizacji chromoforu (Stafford, 1990). Badania prowadzone na zawiesinach komórkowych lucerny (*Medicago sativa L.*) wskazują na obecność pochodnych malonylowanych flawonoidów w nieinfekowanych roślinach oraz wzrost ich poziomu po infekcji organizmem patogennym (Kessmann i in., 1990). Enzymy o aktywności acylotransferaz oraz ich specyficzność w stosunku do substratów zostały opisane w roślinach takich jak dalia, *Clitoria ternatea* (płatki kwiatów), rzodkiewnik, *Arabidopsis thaliana* (liście) oraz w zawiesinach komórkowych tytoniu (Taguchi i in., 2005; Nakayama i in., 2003; Suzuki i in., 2002; Kogawa i in., 2007; D'Auria i in., 2007). Wykazano, że omawiane enzymy charakteryzują się większą specyficznością w stosunku do części glikozydowej niż aglikonu, ponadto stwierdzono iż malonylacji ulegają monoglikozydy, a kolejne jednostki cukrowe przyłączane zostają do malonylowanej cząsteczki glikozydu flawonoidu (Suzuki i in., 2002). Rola grup malonylowych w cząsteczkach glikozydów metabolitów wtórnych nie jest ostatecznie określona, postuluje się, że ma na celu zmianę właściwości fizyko-chemicznych cząsteczek umożliwiającą transport przez błony w komórkach oraz zabezpieczenie przed glikozydazami (Nakayama i in., 2003).

2.1.4 Funkcje i aktywność biologiczna flawonoidów

Flawonoidy produkowane są wyłącznie w roślinach. Uważa się, że dzięki wyodrębnieniu szlaku syntezy związków fenolowych rośliny mogły zadomowić się na lądzie ponieważ zapewniają one ochronę przeciw szkodliwemu promieniowaniu UV-B (Shirley, 1996; Cooper-Driver i Bhattacharya, 1998). W strukturze flawonoidów zawarta jest grupa chromoforowa, dzięki której cząsteczki pochłaniają światło w szerokim zakresie długości fal, który pokrywa się z regionem charakterystycznym dla UV-B od 280 do 315nm. Zdolność absorpcji zmienia się wraz ze stopniem utlenienia pierścienia C oraz miejscem przyłączenia pierścienia B flawonoidów. Izoflawony absorbują przy jednej długości fali (około $\lambda=260\text{nm}$), flawonole i flawony mają dwa maksima w zakresie UV-B, dla antocyjanin zakres absorpcji przenosi się w kierunku światła widzialnego – większej długości fali (Swain, 1976) i jest silnie zależny od pH środowiska w jakim się znajdują cząsteczki. Związki te są syntezowane w dużych ilościach w warstwie epidermy oraz kutykuli liści i owoców, a ich synteza jest indukowana promieniowaniem UV-B (Alcerito i in., 2002; Ju i Bramlage, 1999; Shirley, 1996). Przykładem są mutanty *Arabidopsis* niezdolne do syntezy flawonoidów dla których została potwierdzona podwyższona wrażliwość na promieniowanie UV-B (Li i in., 1993; Laundry i in., 1995). W siewkach ryżu (*Secale cereale*) flawonoidy chronią aparat fotosyntetyczny przed promieniowaniem UV o wysokiej częstotliwości (Tevini i in., 1991). Flawonoidy syntezowane w odpowiedzi na stres promieniowania UV są przeważnie metylowane ponieważ przyłączenie tej grupy przesuwają zakres absorpcji do promieniowania o krótszych długościach fal (250-320nm) oraz zwiększa lipofilowość związku. W badaniach nad rolą flawonoidów w ochronie roślin przed promieniowaniem UV zaobserwowano również korelację pomiędzy zwiększoną zawartością dihydroksylowanych flawonoli oraz większą odpornością organizmów na szkodliwe promieniowanie. Jednak ta prawidłowość została powiązana z faktem że związki te mają większą zdolność do neutralizacji wolnych rodników tworzących się pod wpływem promieniowania UV-B (Ryan i in., 2001, 2002).

W oddziaływaniach roślin z mikroorganizmami flawonoidy pełnią funkcje obronne bądź sygnałowe. Stymulacja syntezy związków fenolowych następuje w momencie ataku organizmów patogennych takich jak wirusy, bakterie, grzyby czy nicienie. Znanymi prekursorami fitoaleksyn w roślinach rodziny bobowatych są daidzeina, genisteina, bioczanina A, formononetyna i glyciteina (Dakora i Philips, 1996). W roślinach lucerny związkiem indukowanym w momencie ataku organizmu patogennego jest pterokarpan

medikarpina, której prekursorem jest izoflawon formononetyna. Wprowadzane modyfikacje do struktury podstawowej takie jak prenylowanie, metylowanie bądź tworzenie mostków tlenowych pomiędzy atomami węgla numer 4 i 2' powodują wzrost lipofilowości związków oraz wzrost aktywności antyseptycznych. W badaniach przeprowadzonych na siewkach grochu (*Pisum sativum*) i koniczyny (*Trifolium* spp.) zidentyfikowano związek hamujący rozwój grzyba, którego synteza indukowana jest podczas ataku patogenu, mackainę (3-hydroksy-8,9-metylenodioxopteroکارpan). Podobnie eksperymenty na odmianach ciecierzycy podatnej (*Cicer arietinum*) i odpornej (*Cicer bijugum*) na atak grzyba patogennego *Botrytis cinerea* wskazały, że odmiany odporne zawierały trzykrotnie wyższe endogenne stężenie mackainy niż odmiana wrażliwa (Stevenson i Haware, 1999). Ponadto w odmianie odpornej stężenie mackainy wzrosło o jedną czwartą ilości początkowej po infekcji grzybem, w wyniku czego rozwój zarodników został skutecznie zahamowany. W siewkach łubinu białego i wąskolistnego zaobserwowano wzrost stężenia prenylowanych izoflawonów, luteonu i wighteonu, w odpowiedzi zarówno na stres biotyczny jak i abiotyczny (Bednarek i in., 2003, 2001; Muth i in., 2009).

Flawonoidy są związkami sygnałnymi podczas nawiązywania oddziaływań symbiotycznych pomiędzy roślinami z rodziny Fabaceae, a bakteriami *Rhizobium* wiążącymi azot atmosferyczny ze środowiska (Long, 1996; Wasson i in., 2006). Geny nodulacji *nod* i *nol* ulegają ekspresji w momencie rozpoznania przez czynnik transkrypcyjny bakterii, którym jest białko NodD, specyficznej cząsteczki flawonoidu uwalnianej przez roślinę – gospodarza (Phillips, 1992; 2000). Ekspresja genów nodulacji powoduje powstanie brodawek nodulacyjnych, w których znajdują się bakterioidy *Rhizobium* wiążące azot. W ostatnich latach pojawił się również szereg ważnych doniesień o roli izoflawonów w transporcie auksyn (Peer, 2007).

Rozmnażanie roślin wymaga zapylenia kwiatu. Barwa kwiatów powodowana obecnością antocyjanin wabi owady zapyłające roślinę bądź odstrasza różnego rodzaju organizmy, które mogą jej zaszkodzić (Kong i in., 2003). Jednakże istotną rolę w prawidłowym procesie rozmnażania roślin zaobserwowano również w przypadku flawonoidów bezbarwnych. Ich obecność jest konieczna do prawidłowego wzrostu łagiewki pyłkowej na słupku kwiatu (Andersen i Markham, 2006). Flawonoidy biorą również udział w oddziaływaniach allelopatycznych między roślinami. (-)Katechina wydzielana przez chabry *Centaurea maculosa* prowadzi do zahamowania wzrostu i kiełkowania nasion chabra drobnogłówkowego *Centaurea diffusa* oraz rzodkiewnika

Arabidopsis thaliana. Mechanizm działania polega na wywołaniu łańcucha reakcji, który uruchamia kaskadę sygnałową jonów Ca^{2+} prowadzącą do zapoczątkowania obumierania systemu korzeniowego (Bais i in., 2003).

Flawonoidy odgrywają istotną rolę w życiu człowieka ze względu na swoją obecność w codziennej diecie, są również składnikiem pasz dla bydła, trzody i drobiu oraz wielu roślin o znaczeniu leczniczym. Isoflawony są fitoestrogenami czyli związkami mającymi strukturę podobną do naturalnie występującego estrogenu. Związki takie jak genisteina, daidzeina, formononetyna oraz kumestrol wykazują aktywność hormonalną 17 β estradiolu (Dixon, 2004). Fitoestrogeny wspomagają terapię hormonalną jednak w zbyt dużym stężeniu mogą wywoływać efekt antagonistyczny i zaburzać gospodarkę hormonalną wiążąc się silniej z receptorem niż naturalnie występujący estrogen.

Udowodniono, że spożywanie produktów bogatych w izoflawony zmniejsza ryzyko raka piersi i prostaty, zmniejsza objawy menopauzy oraz zapobiega chorobom serca i osteoporozie (Lee i in., 1991; Denis i in., 1999; Baird i Umbach, 1995; Potter i in., 1998). Flawonoidy i izoflawonoidy powodują przyspieszoną śmierć komórek rakowych poprzez inhibicję aktywności kinazy tyrozynowej i topoizomerazy DNA (Boersma i in., 2001). Wiele grup badawczych donosi o korzystnym wpływie flawonoidów obecnych w diecie na zdrowie człowieka. Jakkolwiek w pewnych sytuacjach zostało również zaobserwowane niekorzystne działanie izoflawonów, dlatego dalsze badania nad właściwościami leczniczymi tej klasy produktów naturalnych powinny być prowadzone (Strauss i in., 1998).

2.2 Reakcje obronne roślin

W czasie ewolucji rośliny rozwinęły szereg mechanizmów obronnych przeciwko infekcjom przez mikroorganizmy (grzyby i bakterie). Reakcją charakterystyczną dla odporności roślin jest tzw. reakcja nadwrażliwości (ang.: *hypersensitive response* - HR), prowadząca do samobójczej śmierci komórek atakowanych przez mikroorganizm patogenny, oraz rozwijająca się często w jej następstwie systemowa odporność nabyta (ang.: *systemic acquired resistance* - SAR). Zarówno wystąpienie HR, jak i rozwój SAR uwarunkowane są poziomem aktywacji transkrypcji genów odporności. Kolejnym etapem reakcji na infekcję jest synteza białek związanych z mechanizmami reakcji obronnych (ang. *pathogenesis related proteins* - PR)(van Loon LC, 1985). W wyniku aktywacji tej klasy białek następuje synteza fitoaleksyn, wzmocnienie ścian komórkowych przez

osadzanie lignin oraz białek bogatych w prolinę (Dixon i in., 1994). Istotna jest również modyfikacja składu produktów naturalnych w woskach znajdujących się na powierzchni tkanek roślinnych (kutyna, suberyna) (Matern i in., 1995). Aktywacja mechanizmów obronnych zachodzi po rozpoznaniu związku sygnałowego czyli elisytora, którym może być fragment peptydowy lub oligosacharyd z hydrolizowanej ściany komórkowej organizmu patogennego bądź rośliny. Elisytor jest czynnikiem określającym poziom wirulencji mikroorganizmu patogennego, aktywuje geny R czyli geny odporności w roślinie. Aktywowanie odpowiedniego genu jest uzależnione od genu awirulencji w organizmie patogennym. Oddziaływanie to nosi nazwę gen do genu (ang. *gen-to-gen*) (Flor, 1971).

2.2.1 Reakcja nadwrażliwości

Reakcja nadwrażliwości jest najczęściej spotykana w odpowiedzi roślin na atak patogenu, wywołuje programową śmierć komórek wokół miejsca infekcji co powoduje unieszkodliwienie patogenu przez zahamowanie jego rozwoju. W odpowiedzi HR bierze udział jedynie mała frakcja komórek tworząca zmiany nekrotyczne, co skutkuje tym, że cała roślina może przetrwać infekcję. W obserwacjach liści roślin tytoniu zauważono, że zmiany nekrotyczne po infekcji wirusem mozaiki tytoniowej (TMV) skutecznie zahamowały rozprzestrzenianie się wirusa. W mutantach tytoniu, w których brakuje genu N odpowiedzialnego za rozpoznanie białka replikacyjnego (ang. *replicase protein*) wirusa, zaobserwowano chlorozę na powierzchni liścia związaną z rozwijaniem się wirusa, nie stwierdzono nadwrażliwej odpowiedzi co sugeruje, że mechanizm ten jest skuteczny wobec wirusa mozaiki tytoniowej (Dinesh-Kumar i Baker, 2000; Erickson i in., 1999). Reakcja nadwrażliwości nie jest jednak niezbędnym mechanizmem w obronie przed atakiem patogenu. W badaniach na mutantach *Arabidopsis thaliana dnd 1*, które zawierają gen odpowiadający za obronę rośliny bez powodowania śmierci komórek (ang. *defence – not death*), dowiedziono iż są one odporne na atak patogenu pomimo, że nie obserwuje się oznak HR (Clough i in., 2000).

2.2.2 Systemowa odporność nabyta (SAR)

Systemowa odporność nabyta jest to kaskada sygnałów aktywujących reakcje obronne w całej roślinie, jest aktywowana jako część odpowiedzi nadwrażliwości lub innego symptomu chorobowego (Hunt i in., 1997). Podczas aktywowania SAR nie

wszystkie geny związane z odpornością rośliny ulegają ekspresji, co odróżnia ten mechanizm od pozostałych. Geny, które ulegają ekspresji nazywane są genami SAR (Ward i in., 1995). Aktywowanie SAR nie zawsze powoduje skuteczną ochronę przed wszystkimi patogenami np. w tytoniu odporność następuje względem 7 z 9 patogenów. Większość z genów SAR koduje białka PR czyli białka związane z obroną przed patogenem (Gianinazzi, 1970; Van Loon, 1985). Mają aktywność glukanaż i chitynaż, występują głównie w apoplacie co sugeruje że są nastawione na szybki kontakt z atakującym patogenem. Ich rolą w SAR może być neutralizacja aktywności patogenu poprzez hydrolizę jego ścian komórkowych i zahamowanie wzrostu albo na wyzwoleniu elisytora niespecyficznego (Van Loon i in., 1997; Yoshikawa i in., 1993). W roślinach infekowanych wraz z aktywacją SAR zauważono wzrost stężenia kwasu salicylowego, ponadto egzogeny kwas salicylowy indukował SAR. Innymi związkami aktywującymi ten mechanizm obrony są kwas jasmonowy, jego ester metylowy lub peptyd składający się z siedemnastu aminokwasów systemina.

2.2.3 Fitoaleksyny i fitoantycypiny

Kolejnym mechanizmem obronnym roślin jest synteza niskocząsteczkowych związków o właściwościach antybiotycznych. Związki, które są syntezowane *de novo* podczas ataku patogenu nazywane są fitoaleksynami. Natomiast związki konstytutywnie występujące w roślinie, które uwalniane są z bardziej złożonych połączeń w momencie infekcji nazywamy fitonatycypinami (Van Etten i in., 1994). Aktywacja ścieżki syntezy w razie ataku patogenu zachodzi poprzez aktywację genów odporności gospodarza (Dixon, 2001). Klasyfikacja produktów naturalnych do odpowiedniej grupy jest trudna, ponieważ mogą one występować konstytutywnie w roślinie pełniąc w niej inne role. Przykładem może być etylowany flawon sakuranetyna, który w liściach czarnej porzeczki jest fitoantycypiną, a w liściach ryżu jego synteza jest indukowana w razie ataku patogena (Kodama i in., 1992).

Fitoaleksyny i fitoantycypiny to przede wszystkim metabolity wtórne, które są syntezowane poza głównymi szlakami metabolicznymi komórki tzn. w szlaku izoprenoidowym, fenylopropanoidowym czy też syntezy alkaloidów. Jedynym związkiem nieorganicznym będącym fitoaleksyną jest elementarna siarka (Cooper-Driver i Battacharya, 1996). Pierwszą fitoaleksyną, która została wyizolowana i scharakteryzowana

strukturalnie była (+) -pizatyna (Cruickshank i Perrin, 1960). Związek należy do grupy flawonoidów i występuje w grochu (*Pisum sativum*).

Istotny wpływ w zrozumieniu roli fitoaleksyn podczas odpowiedzi rośliny na atak patogenu został zobrazowany w trzech gatunkach roślin pomidorze, tytoniu oraz lucernie, które transformowano genem odpowiedzialnym za syntezę resweratrolu, fitoaleksyny winorośli. Rośliny nabyły odporność na atakujące je patogeny odpowiednio *Biotyris cinerea*, *Pfytophthora infestans*, *Phoma medicaginis* (Hain i in., 1993; Thomzik i in., 1997; Hipskind i Pavia, 2000). Dodatkową obserwację odnośnie roli fitoaleksyn w odpowiedzi na atak patogenu dostarczyły eksperymenty na 50 rodzajach grzybów patogennych poddanych działaniu pizatyny. Z sześciu patogenów typowych dla grochu pięć było odpornych na działanie związku, tylko jeden szczep był wrażliwy, wszystkie należały do grupy patogenów atakujących groch, w którym syntetyzowana jest pizatyna. Badania nad skutecznością neutralizacji fitoaleksyn przez patogeny są niezwykle ważne dla rolnictwa, możliwość rozszyfrowania mechanizmów regulujących ten proces umożliwi uzbrojenie rośliny w inhibitory enzymów detoksykacyjnych.

2.3 Metabolomika, jako narzędzie w genomice funkcjonalnej.

2.3.1 Genomika funkcjonalna

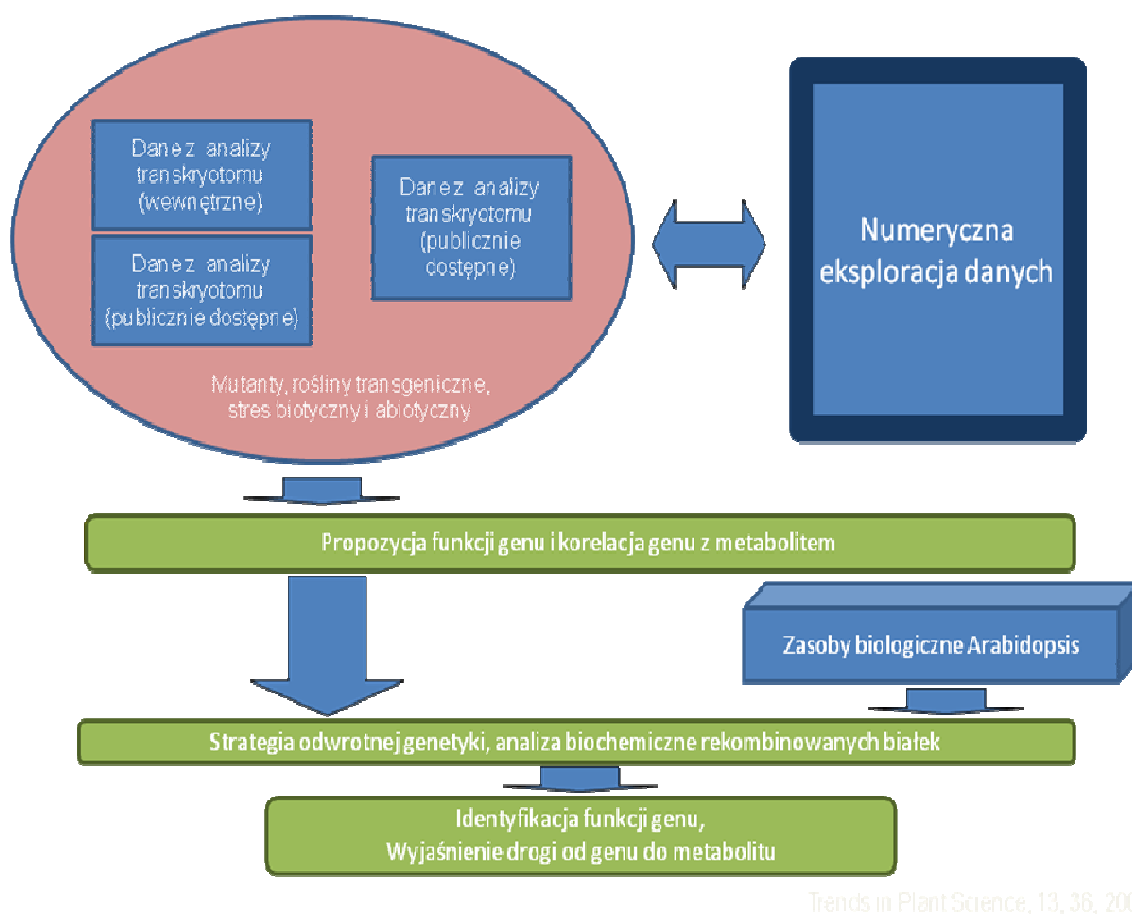
Sekwencjonowanie genomów coraz bardziej złożonych organizmów staje się obecnie powszechną procedurą. Genomy roślin modelowych jak *Arabidopsis thaliana* oraz roślin uprawnych takich jak ryż zostały scharakteryzowane w całości (Edwards i Batley, 2004). Okazało się, że niewiele informacji o funkcji genów można otrzymać na podstawie samej sekwencji kodu genetycznego danego organizmu. Badanie funkcji genów prowadzi się przez porównywanie określonych sekwencji dla genomu badanego organizmu z genami o znanej funkcji, których skład jest zamieszczony w bazach danych (Phelps i in., 2002). Podejście to może prowadzić do mylnych wniosków ze względu na ewolucyjne, strukturalne i funkcjonalne oddziaływania pomiędzy różnymi genami (Strauss i Falkow, 1997). Metody doświadczalne wymagają otrzymania materiału biologicznego z wyciszonymi bądź nadekspresjonowanymi genami, których funkcję chcemy poznać. W ten sposób można obserwować zmiany fenotypu białkowego oraz metabolicznego danego organizmu (Schauer and Fernie, 2006; Hall, 2006) lub skorelować dane z poziomu

transkryptomu oraz metabolomu (Shauer i in., 2006; Hirai i in., 2004, 2005; Jost i in., 2005).

Do tej pory połowa z 27 000 genów *Arabidopsis* została scharakteryzowana na podstawie podobieństwa sekwencji z genami o znanej funkcji, natomiast dla 11% genów wyniki przyporządkowania zostały potwierdzone doświadczalnie (Saito i in., 2008). Zrozumienie drogi przekazywania (transdukcji) sygnału z poziomu genomu do funkcjonującego fenotypu organizmu jest podstawowym zadaniem realizowanym w zakresie genomiki funkcjonalnej (Bino, 2004). Metodyka badań prowadzonych w tym obszarze wymaga integracji danych z trzech poziomów molekularnych, mianowicie transkryptomu, proteomu i metabolomu, których aktywności są ściśle od siebie zależne oraz są sprzężone z czynnikami zewnętrznymi, jakim poddawany jest dany organizm lub pojedyncza komórka. Należy pamiętać o możliwym efekcie plejotropowym manipulacji genetycznych (wyciszenia lub nadekspresji genów), które mogą wpłynąć na zmianę ekspresji więcej niż jednego genu, co powoduje powstanie różnic w poziomie syntezy i aktywności większej ilości białek oraz metabolitów niż kodowanych przez zmanipulowany gen (Stobiecki i in., 2003; Bino i in., 2005). Odpowiedź na stesy biotyczne bądź abiotyczne oraz bodźce zewnętrzne, stan fizjologiczny, etap rozwoju czy też stan patologiczny spowodowany infekcją obrazowane są przez zmiany ilościowe na wszystkich wymienionych poziomach, a korelacja tych danych umożliwia przyporządkowanie funkcji odpowiednim genom (Sumner i in., 2003).

Podjęcie wykorzystujące analizę koekspresji genów, zostało wykorzystane w pierwszym rzędzie do oznaczenia funkcji genów w organizmach drożdży, człowieka oraz innych ssaków. Polega ona na badaniu zależności ekspresji genu o nieznannej funkcji oraz genu już scharakteryzowanego funkcjonalnie w bazie danych, które podlegają temu samemu mechanizmowi regulacji. Podobną analizę wykonano na roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*, dla której istnieją rozbudowane bazy danych mikromacierzy DNA oraz szlaków metabolicznych. Fenotyp metaboliczny jest charakterystyczny dla danej rośliny w określonym stanie fizjologicznym oraz środowisku. Zastosowanie w badaniach mutantów roślin bądź poddanie roślin stresom biotycznym lub abiotycznym oraz korelacja danych z dwóch poziomów molekularnych wskazuje na istotność danego genu w badanym procesie fizjologicznym sugerując jego funkcję (Rys. 3-8). Następnie stosując techniki odwrotnej genetyki możliwe jest doświadczalne potwierdzenie funkcji genu (Yonekura-Sakakibara i in., 2007).

Zintegrowana analiza transkryptomu i metabolomu – koekspresja genów i profilowanie metabolitów



Rys. 3-8 Schemat integracji danych z badań transkryptomu i metabolomu (wg Saito i in., 2008).

Przeprowadzanie doświadczeń na roślinach nie modelowych, dla których genomowe bazy danych nie istnieją jest procesem bardziej złożonym. Rozwiązaniem jest zastosowanie alternatywnej metody analizy i korelacji wyników uzyskanych na poziomie metabolomu i transkryptomu. W kulturach komórkowych tytoniu (*Nicotiana tabacum*) elisytowanych jasmonianem metylu przeprowadzono analizę celowaną metabolitów wtórnych oraz analizę c-DNA polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów (*ang.* Amplified Fragment Length Polymorphism). Na podstawie korelacji wyników z obydwu analiz wytypowano geny specyficzne dla metabolizmu wtórnego (Gossens i in., 2003).

2.3.2 Biologia systemów

W ostatnich latach popularność zyskuje koncepcja biologii systemów sformułowana przez Kitano na początku XXI wieku i przedstawiona na łamach dwóch

czasopism - Science i Nature. Idea całościowego podejścia do badania systemów biologicznych takich jak sieci międzykomórkowe, komórki, organy oraz wszelkie biologiczne jednostki wyznacza nowy kierunek rozwoju nauk biologicznych (Kitano, 2002a,b). Poprzez integrację danych molekularnych z poziomów genomu, transkryptomu, proteomu oraz metabolomu uzyskuje się holistyczny obraz procesów zachodzących w pojedynczym organizmie. Zintegrowane podejście do badania systemów biologicznych wymaga stworzenia przestrzeni porozumienia dla matematyków, biologów, chemików, inżynierów, aby wypracować strategię rozwiązywania problemów związanych z poznawaniem funkcjonowania komórki (Friboulet i Thomas, 2005).

Holistyczne podejście do biologii zyskuje na znaczeniu, ponieważ pozwala zminimalizować efekt plejotropowy w projektowanych eksperymentach na organizmach transgenicznych (Oliver, 2002). Znaczne osiągnięcia widoczne są przede wszystkim podczas łączenia danych z poziomu transkryptomu i metabolomu. Zaproponowany schemat postępowania polegający na rozszyfrowaniu funkcji genów, które ulegają współekspresji, jest wydajnym narzędziem badawczym w określaniu funkcji genów. W opracowanej propozycji standaryzacji badań metabolomicznych zwraca się również uwagę na konieczność korelacji danych uzyskiwanych w różnych laboratoriach na wybranych poziomach molekularnych oraz możliwość porównania wyników badań uzyskanych przez różne grupy badawcze (Saito i in., 2008).

2.4 Metabolomika

Pojęcie metabolom wprowadził do języka nauki Stephen Oliver w 1998 roku, określając nim całość niskocząsteczkowych związków syntezowanych przez dany organizm (Oliver i in., 1998). Jednakże historia profilowania metabolitów sięga lat 70 XX wieku, kiedy po raz pierwszy pojawiły się publikacje na temat ilościowej i jakościowej analizy steroidów oraz metabolitów leków w moczu metodami GC-MS (Devaux i in., 1971; Horning i Horning, 1970). Pojęcie metabolomika wywodzi się z profilowania metabolitów, to podejście analityczne jest stosowane od wielu lat i wraz z rozwojem technik analitycznych zyskuje na znaczeniu (Sumner i in., 2003).

Metabolom jest źródłem wiedzy o cząsteczkach sygnałowych i strukturalnych. Pojęcie to obejmuje szeroki zakres cząsteczek produktów naturalnych takich jak: peptydy, węglowodory, lipidy, nukleotydy oraz kataboliczne produkty powstające ze związków egzogennych. Jednakże ogromna ilość związków o różnych masach, strukturach i

zróżnicowanych stężeniach sprawia, że niemożliwym jest zastosowanie jednej metody analitycznej do jednorazowego określenia zmian ilościowych i jakościowych zachodzących w komórce lub tkance roślinnej. Wraz z rozwojem metod analitycznych coraz więcej informacji jesteśmy w stanie uzyskać z jednej analizy. Wzrasta jednak stopień skomplikowania eksperymentów i rodzi się problem przetwarzania dużej ilości danych w celu uzyskania wniosków, które są dla badacza interesujące (Sumner i in., 2003).

Obecnie badanie metabolomu wykorzystuje się w różnych dziedzinach biologii – od badań podstawowych np. nad oddziaływaniami węgiel-azot w roślinach do metabolomiki osobniczej, która jest kolejnym krokiem w kontrolowaniu stanu żywienia człowieka (Bino, 2004). Fenotyp biochemiczny badanego organizmu jest wypadkową oddziaływania dwóch czynników genomu i środowiska, wpływy obydwu wymienionych cech są modulowane w zakresie homeostazy na poziomie subkomórkowym (Bino, 2004; Saghatelian and Cravatt, 2005). Symultaniczna identyfikacja i oznaczenie ilościowe metabolitów są niezbędne w celu badania dynamicznych zmian w metabolomie i w szlakach metabolicznych oraz aby określić rolę poszczególnych związków na wpływ bodźców zewnętrznych (Lange, 2006).

Analiza metabolomu zaczyna również odgrywać coraz większą rolę w naukach rolniczych. Poszukiwanie bardziej wartościowych gatunków lub odmian roślin uprawnych, bądź też wprowadzenie na rynek roślin uprawnych modyfikowanych genetycznie wymaga monitorowania zmian w składzie metabolitów w roślinach lub ich częściach przeznaczonych do konsumpcji. Kumulacja produktów naturalnych o niekorzystnych właściwościach dla konsumentów może być wykryta za pomocą analizy jak najszerszej ilości związków w tkance z rośliny modyfikowanej genetycznie, analizę tego typu wykonuje się wobec próbek kontrolnych (rośliny typu dzikiego lub linie rodzicielskie) (Rischer i Oksman-Caldenety, 2006). W ostatnich latach coraz większą wagę przywiązuje się do wzbogacania żywności w substancje odżywcze mające zapobiegać zapadaniu na choroby cywilizacyjne (Rezzi i in., 2007).

2.4.1 Metody analityczne wykorzystywane w badaniu metabolomu

Metabolomika jest najmłodszą z dziedzin genomiki funkcjonalnej. Postęp w zakresie metod analitycznych wykorzystywanych do badania związków niskocząsteczkowych umożliwia coraz bardziej precyzyjne określanie zawartości analizowanych substancji w poszczególnych próbkach. Ze względu na duże zróżnicowanie fizykochemiczne metabolitów nie ma jednej metody analitycznej, która byłaby odpowiednia dla całej puli

związków. W badaniach transkryptomu, analizujemy polimer składający się z czterech jednostek budulcowych zbliżonych do siebie pod względem struktury i grup funkcyjnych, podobnie w przypadku białek, gdzie analizowanych jest ok. 20 jednostek budulcowych – aminokwasów z możliwymi modyfikacjami. Badania metabolomu prowadzone są zwykle w połączeniu z analizą pozostałych poziomów molekularnych. Trudności w analizie metabolitów w porównaniu z transkrypcją oraz białkami wynikają z następujących własności:

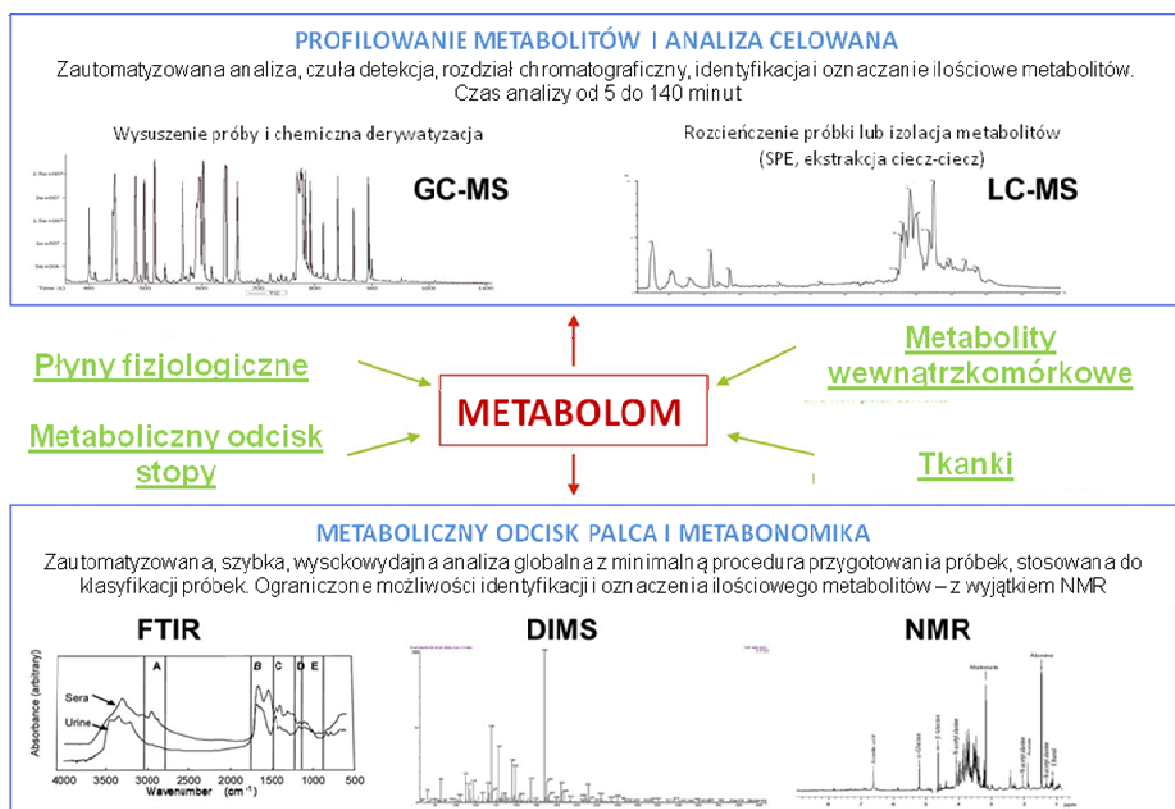
- braku bezpośredniego odniesienia do kodu genetycznego,
- metabolity są produktami złożonych szlaków reakcji enzymatycznych w komórkach i tkankach,
- zróżnicowania strukturalnego metabolitów - nie tworzą w dużej części przypadków polimerów zbudowanych z ograniczonej liczby jednostek monomerycznych,
- braku obecnie możliwości zastosowania techniki uniwersalnej w analizie cząsteczek o zróżnicowanych właściwościach fizyko-chemicznych (Saghatelian i Cravatt, 2005; Sumner i in., 2003).

W związku ze zróżnicowaniem właściwości strukturalnych obserwowanych dla produktów naturalnych istniała konieczność opracowania różnych podejść analitycznych, wykorzystywanych do analiz całej puli metabolitów lub wybranych związków syntezowanych w jednym ze szlaków biosyntezy w komórce. Każda z dróg obranych przez eksperymentatora wpisuje się w jedną z dwóch strategii - analizę celowaną (*ang. target analysis*), polegającą na badaniu określonych klas związków, niekoniecznie o znanej i zweryfikowanej strukturze, bądź analizę niecelowaną, w której nie ma sprecyzowanej docelowej grupy metabolitów (Morgenthal i in., 2006; Goodacre i in., 2004).

Strategie analityczne stosowane podczas analizy metabolomu (Rys. 3-8) (Fiehn, 2002; Goodacre, 2007):

- **metaboliczny odcisk palca** – umożliwia szybką analizę semi-ilościową jak największej ilości związków, niekoniecznie prowadzącą do identyfikacji, stosuje się w celu szybkiej klasyfikacji próbek ze względu na ich biologiczny związek i pochodzenie, wykorzystywane metody analityczne: LC/DIMS (*ang. liquid chromatography/ direct infusion mass spectrometry*), LC/NMR (*ang. liquid chromatography/ nuclear magnetic resonance*),
- **metaboliczny odcisk stopy** – odmiana metabolicznego odcisku palca, podejście, w którym bada się metabolity zewnątrzkomórkowe, wykorzystywane metody analityczne: LC/DI MS, LC/NMR,

- **profilowanie metabolitów** – najbardziej powszechne podejście do badania metabolomu, polega na określaniu zmian ilościowych oraz jakościowych w grupie metabolitów należących do jednej klasy związków (np. lipidy, flawonoidy, alkaloidy), LC/UV/MS/MS (*ang. liquid chromatography/ultraviolet/tandem mass spectrometry*), GC/MS (*ang. gas chromatography/mass spectrometry*), GC/GC/MS (*ang. two dimensional gas chromatography mass spectrometry*), CE/MS (*ang. capillary electrophoresis/mass spectrometry*), LC/NMR,
- **analiza celowana** – stosowana do śledzenia zmian ilościowych określonego związku np. substratu lub produktów badanej reakcji enzymatycznej, zastosowana metoda ekstrakcji powinna być selektywna dla badanej klasy produktów naturalnych, wykorzystywane metody analityczne: LC/UV/MS, GC/MS.

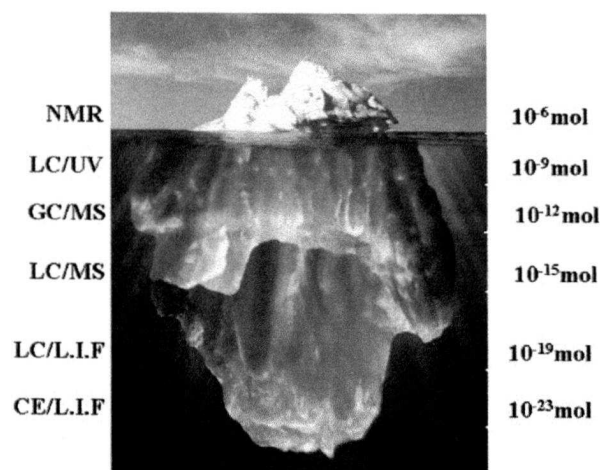


Rys. 3-8 Różne strategie analizy metabolomu (wg Dunn i Ellis, 2005).

Występowanie w tkankach roślinnych szerokiej gamy metabolitów o silnie zróżnicowanych właściwościach fizyko-chemicznych oraz stężeniach sprawiają, że badanie metabolomu roślinnego stanowi wyzwanie dla badaczy wykorzystujących różne techniki analityczne. Obecnie szereg metod identyfikacji niskocząsteczkowych produktów naturalnych jest wykorzystywanych w analizie metabolomu. Dobranie właściwej metody analitycznej do badanego materiału oraz informacji, jakie chce się uzyskać z analizy jest

kluczowym krokiem w planowaniu eksperymentu. Kryteriami przy wyborze odpowiedniej techniki są jej czułość i specyficzność oraz czas trwania i koszty analizy (Rys. 3-9). Najbardziej popularnymi metodami stosowanymi do identyfikacji związków w metabolomice są NMR i spektrometria mas. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego jest, jak dotąd jedyną metodą instrumentalną, która dysponuje odpowiednią specyficznością podczas analizy strukturalnej i dzięki której można zidentyfikować nieznaną związek *de novo* bez korzystania ze standardów. Charakteryzuje się jednak niską czułością, co sprawia, że zastosowanie tej metody jest ograniczone w przypadku mieszanin metabolitów oraz związków o niskim stężeniu. Technika spektrometrii mas natomiast jest metodą o wysokiej czułości i niewiele niższej selektywności niż NMR, pozwalającą na identyfikację związku na podstawie wyznaczenia jego masy oraz sposobu fragmentacji. Otrzymane tą techniką dane nie umożliwiają jednak określenia kompletnej struktury nieznanego wcześniej związku. Metody spektroskopii promieniowania w ultrafiolecie, w podczerwieni oraz fluorescencyjnej mogą dopełnić charakterystykę strukturalną badanego związku, ale z racji swej niskiej specyficzności nie mogą być narzędziem przeznaczonym do jednoznacznej identyfikacji substancji (Sumner i in., 2003).

Niezbędnym elementem podczas badań metabolomu są narzędzia bioinformatyczne, które stosowane są do analizy danych i pomagają w uzyskaniu wartościowych informacji dla eksperymentatora. Takimi narzędziami są analiza skupień (*ang. Cluster Analysis*) oraz analiza składowych głównych (*ang. principal components analysis - PCA*) (Roessner i in., 2001; Fhien, 2002). W bardziej ogólnym podejściu do analizy metabolomu, metaboliczny odcisk palca, przedstawiono możliwość zastosowania metody analizy niezależnych komponentów (*ang. independent component analysis – ICA*) (Scholz i in., 2004). Droga od rejestracji danych do interpretacji wyniku eksperymentu wiedzie przez odpowiednią klasyfikację rejestrowanych sygnałów, przekształcenie ich w format umożliwiający zastosowanie pożądanego algorytmu (formowanie macierzy, normalizacja, uzupełnienie brakujących wartości), pozwalającego na sprawne przeprowadzenie czasochłonnych obliczeń oraz wizualizację wyników (Steinfah i in., 2008).



Rys.3-9 Zależność czułości od specyficzności metod analitycznych stosowanych w analizie metabolomu (Sumner i in., 2003).

Bazy danych obrazujące zróżnicowanie na poziomie transkryptomu są już powszechnie dostępne (Shmid i in., 2005; Craigon i in., 2004). Choć powstało również kilka baz danych metabolitów udostępnionych publicznie jak np. Golm Metabolite Database, KNApSACk, Tomato Metabolome Database (TOMET), Metabolome Tomatoo Database (MoToDB), MassBank, potrzebne jest dalsze tworzenie powszechnie dostępnych zbiorów identyfikacji metabolitów w celu pokrycia szerszego zakresu struktur substancji występujących w metabolomie (Kopka i in., 2005; Moco i in., 2006; Shinbo i in., 2006). Baza danych dotycząca metabolitów pierwotnych, identyfikowanych techniką GC-MS powstała najwcześniej, ponieważ stosowana metoda analityczna charakteryzuje się najlepszą powtarzalnością wyników. Bazy widm metabolitów wtórnych analizowanych na układach LC-MS wymagają większej precyzji w kontroli warunków eksperymentu oraz dokładniejszego opisu stosowanych parametrów ze względu na mniejszą powtarzalność procesów jonizacji i fragmentacji związków. W komercyjnie dostępnych bazach danych takich jak Fiehn-Library, NIST, Wiley oraz Mass Spectrometry Database Committee zawarte są zarówno dane z eksperymentów LC-MS jak i GC-MS. Złożoność przebiegu procesów metabolicznych oraz próbę połączenia danych z różnych poziomów genomiki funkcjonalnej obrazuje baza danych MetaCyc, w której zebrane są wszystkie eksperymentalnie poznane reakcje biochemiczne związków niskocząsteczkowych zachodzące w komórce (Caspi i in., 2006, 2008).

Podobnie jak w eksperymentach na poziomie transkryptomu i proteomu zaistniała potrzeba standaryzacji badań w dziedzinie metabolomiki. Propozycja ustalenia protokołów zawierających minimum informacji o eksperymentach przeprowadzanych na związkach niskocząsteczkowych została opracowana przez grupę czołowych badaczy skupionych w

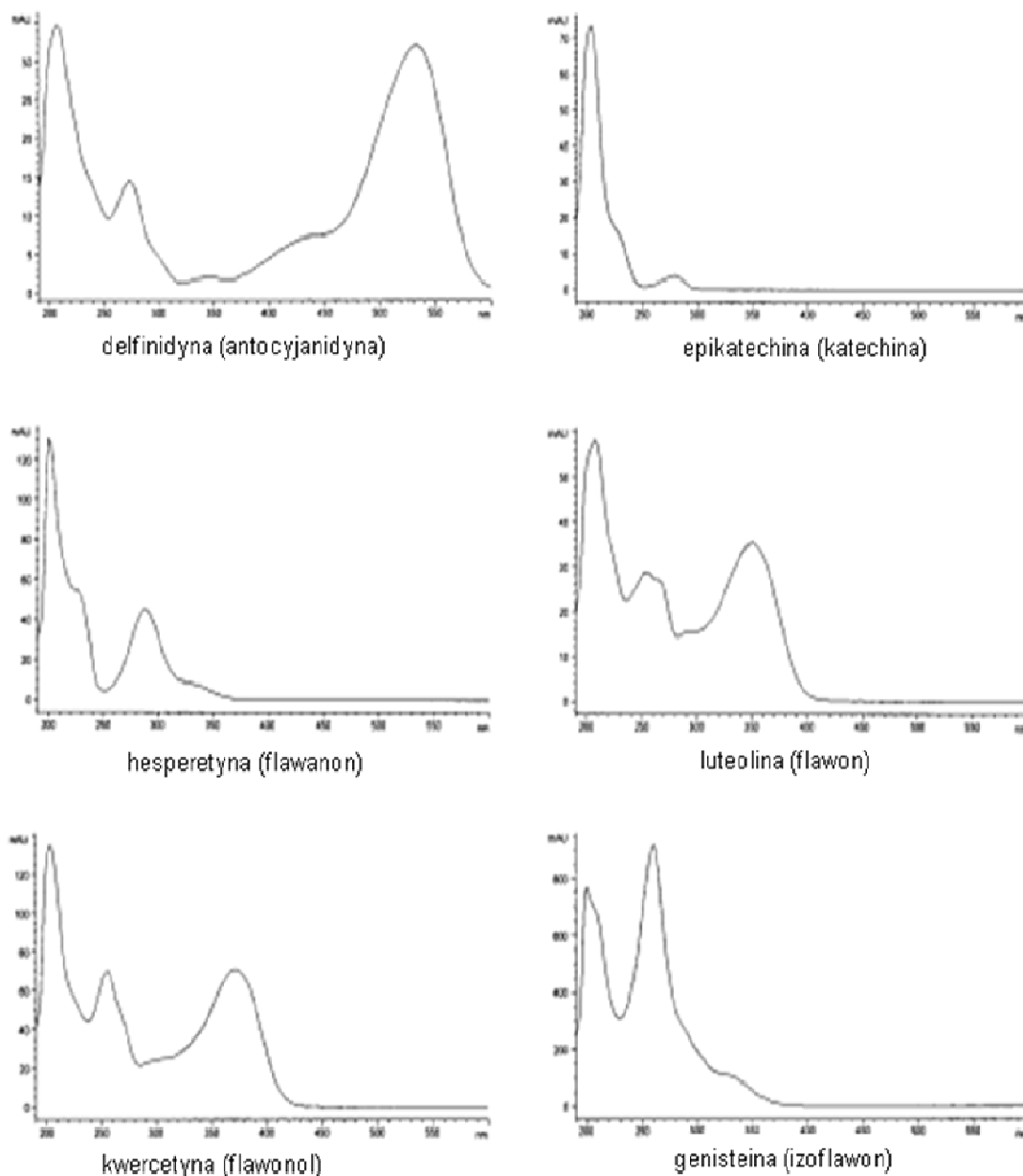
grupie Metabolomics Standard Initiative (MSI) w zakresie metabolomiki (Jenkins i in. 2004, Keurentjes i in., 2006; Weckwerth, 2007; Goodacre i in., 2007; Sanson i in., 2007; Fihlen i in., 2007). Precyzyjne określenie warunków przeprowadzania eksperymentów metabolomicznych umożliwia porównanie wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach, co jest kluczem do zintegrowanego podejścia w badaniach organizmów.

2.5 Metody analityczne stosowane w analizie połączeń flawonoidów

Zainteresowanie związkami fenolowymi ze względu na możliwości ich zastosowania w medycynie, przemyśle oraz w rolnictwie utrzymuje się na bardzo wysokim poziomie. Metody analityczne stosowane do ich identyfikacji były tematem kilku prac przeglądowych (de Rijke i in., 2006; Stalikas, 2007; Prasain i in., 2004; Stobiecki i Kachlicki, 2006; Cuyckens i Claeys, 2004; Muth i Kachlicki, 2009). Najpowszechniej wykorzystywanymi urządzeniami do analizy flawonoidów są chromatografy cieczowe sprzężone z detektorem UV oraz/lub spektrometrem mas (LC/UV/MS), lub spektrometrami rezonansu magnetycznego (LC/NMR) oraz mniej powszechnie chromatografy gazowe sprzężone z detektorem masowym (GC/MS).

2.5.1 Zastosowanie chromatografu cieczowego sprzężonego z detektorem UV w analizie związków fenolowych.

Głównym elementem strukturalnym flawonoidów jest ciąg sprzężonych wiązań podwójnych, który daje możliwość detekcji tych związków w zakresie UV oraz światła widzialnego. Poszczególne klasy strukturalne flawonoidów można rozróżnić na podstawie analizy maksimów w widmie absorpcyjnym UV. Maksimum rejestrowane w zakresie 240-285 nm, pochodzi od absorpcji pierścienia A, absorpcja światła w zakresie 300-550 nm zależy od struktury pierścienia C oraz miejsca jego przyłączenia do pierścienia B (Mabry i in., 1970). pH roztworu ma duży wpływ na widmo UV związków fenolowych, w podwyższonym pH następuje przesunięcie maksimów absorpcji ku wyższym długościom fali. Długości fal charakterystyczne dla absorpcji flawonoidów można ograniczyć do kilku maksimów dla poszczególnych klas mieszczących się w zakresie od 250 do 400 nm (Rys.3-10) (Merken i Becher, 2000).



Rys. 3-10 Widma UV różnych klas flawonoidów (wg Merken i Becher, 2000).

W aparatach HPLC stosuje się detektory UV monochromatyczne mierzące absorpcję przy jednej bądź dwóch długościach fali oraz detektory diodowe (DAD) lub skanujące, które są przystosowane do pomiaru absorpcji promieniowania w szerszym zakresie (UV-Vis) oraz rejestracji widm absorpcyjnych poszczególnych związków. Stosowanie detektorów monochromatycznych ogranicza możliwość oznaczenia ilościowego do jednej lub dwóch klas związków. Detektory DAD, choć charakteryzują się niższą czułością niż detektory monochromatyczne, umożliwiają pomiary przy długościach fali charakterystycznych dla analizowanych klas związków fenolowych oraz poprawne rozróżnienie ich typów strukturalnych. Wykorzystanie różnych detektorów absorbujących

promieniowanie UV może być wystarczającym narzędziem w analizie ekstraktów związków fenolowych (Carini i in., 2001; Łuczkiwicz i in., 2004). Jednakże w przypadku analizy bardziej złożonych mieszanin bardzo często mamy do czynienia z koelucją poszczególnych związków będących obiektem zainteresowania, uniemożliwia to jednoznaczna identyfikację poszczególnych składników mieszanin. W takich sytuacjach konieczne jest zastosowanie dodatkowego detektora, na przykład spektrometru mas (Bedair i Sumner, 2008; Dettmer i in., 2007; Glinski and Weckwerth, 2006).

2.5.2 Zastosowanie spektrometru mas w identyfikacji flawonoidów.

2.5.2.1 Układy chromatograf cieczowy-spektrometr mas stosowane do analizy metabolitów wtórnych

Izolacja związków w stanie czystym z materiału roślinnego umożliwiającym zapis widma NMR (H^1 i C^{13}) bardzo często jest procesem trudnym i czasochłonnym. Powodem rezygnowania z izolacji jest również niskie stężenie oraz nietrwałość produktów naturalnych będących obiektem zainteresowania. W takich sytuacjach powszechnie stosowanym systemem w analizie metabolitów wtórnych jest połączenie chromatografu cieczowego z spektrometrem mas. Technika ta umożliwia wstępne rozdzielanie mieszaniny związków, zmniejszając tym samym efekt tzw. supresji jonów występujący z powodu obecności matrycy. Zmniejszenie liczby cząsteczek substancji znajdujących się w wycieku kolumny chromatograficznej w jednostce czasu umożliwia skuteczniejszą jonizację oraz większą ilość identyfikowalnych komponentów (Dettmer i in., 2007). Zdolność rozdzielcza systemu chromatograficznego odgrywa ogromną rolę w identyfikacji połączeń flawonoidów będących izomerami położeniowymi lub związkami izobarycznymi (Muth i in., 2008). Stosuje się przede wszystkim kolumny z odwróconą fazą C-18, z których wymywa się związki w kolejności malejącej polarności w gradiencie rozpuszczalników woda/acetoniitryl bądź woda/metanol z dodatkiem kwasu mrówkowego bądź trifluorooctowego. Na początku XXI wieku nastąpił kolejny przełom w możliwościach wykorzystania chromatografii cieczowej, opracowano system ultrasprawnej chromatografii cieczowej (*ang. ultra high pressure liquid chromatography – UPLC*). Rozdział związków prowadzony jest pod wyższym ciśnieniem (400-1000 barów) i przy zwiększonych przepływach, a złoża kolumny zbudowane jest z ziaren o średnicy poniżej 2 μm , co znacznie podwyższa czułość i rozdzielczość systemu oraz skraca czas wykonywanych analiz w porównaniu do tradycyjnej chromatografii cieczowej HPLC (*ang.*

high performance liquid chromatography) (Plumb i in., 2004; Churchwell i in., 2005). W przypadku zastosowania tej techniki możliwe było rozróżnienie 5 izomerów położeniowych malonylowanych glikozydów chryzoeriolu, których rozdział na kolumnie HPLC był niemożliwy (Muth i in., 2008).

Znaczny wzrost w stosowaniu układów LC/MS nastąpił po wprowadzeniu metody jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym - elektrorozpraszania (*ang. electrospray* – ESI). W tej metodzie jonizacja zachodzi podczas odparowania fazy ruchomej w gradiencie potencjału pomiędzy końcem kapilary a szczeliną wejściową analizatora MS. Do analizatora spektrometru mas wprowadzane są jedynie zjonizowane cząsteczki analitu (Niessen, 1999). Podczas procesu jonizacji metodą elektrorozpraszania wzbudzonym cząsteczkom przekazywana jest mała ilość energii wewnętrznej, co powoduje brak fragmentacji jonów protonowanych $[M+H]^+$ lub deprotonowanych $[M-H]^-$. Alternatywnymi źródłami jonów stosowanymi w układach LC/MS są jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (*ang. atmospheric pressure chemical ionization* - APCI) oraz fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym (*ang. atmospheric pressure photo ionization* - APPI). Każda z tych metod wykazuje różną czułość dla różnych grup związków. Wszystkie mogą być stosowane z dowolnymi typami detektorów masowych.

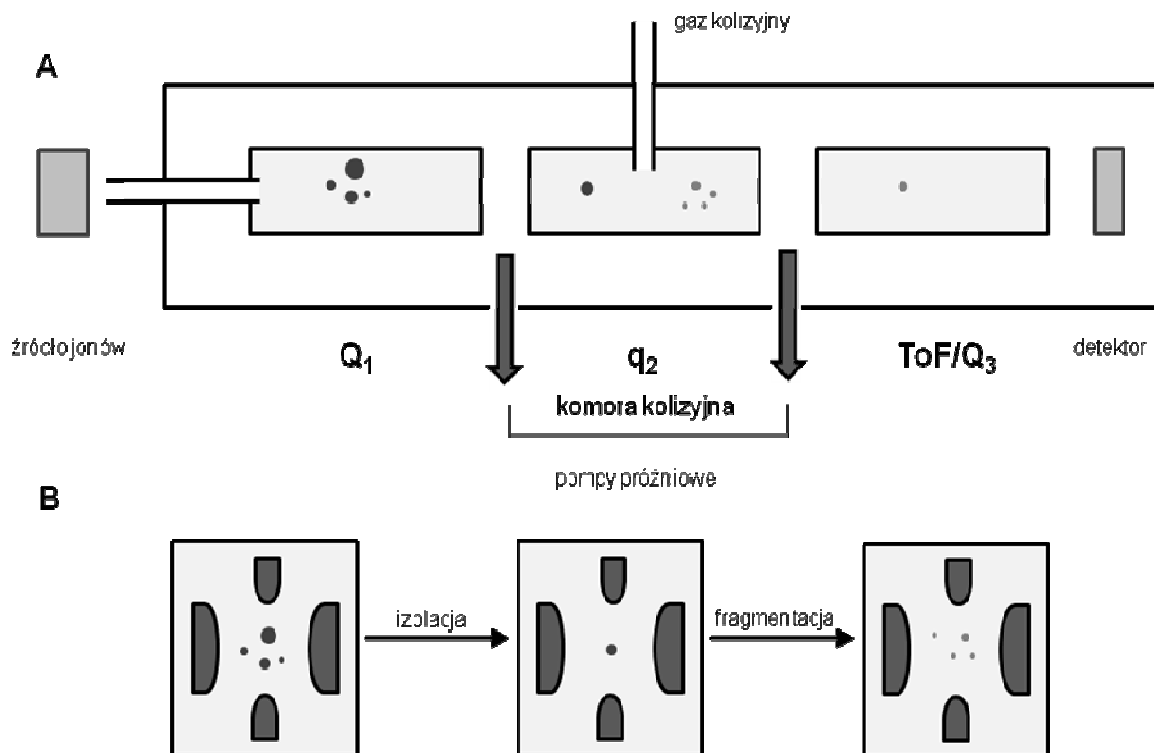
2.5.2.2 Analizatory stosowane w spektrometrach mas

Różnego rodzaju metody jonizacji oraz analizatory są wykorzystywane w spektrometrach mas do badania metabolomu. W zależności od zastosowanego podejścia i od informacji, jakie chce się otrzymać można wykorzystywać różne metody wprowadzania próbki do spektrometru. Przykładem może być metoda bezpośredniego nastrzyku – (*ang. direct infusion* - DI), dzięki jej zastosowaniu możemy określać tzw. metaboliczny odcisk palca próbki materiału roślinnego. Jest to metoda pozwalająca na szybkie porównanie dużej ilości próbek bez konieczności rozdzielania chromatograficznego składników mieszaniny. Znajduje ona zastosowanie jedynie przy wykorzystaniu wysokorozdzielczych analizatorów mas, takich jak analizatory jonowego rezonansu cyklotronowego z transformacją Fouriera (*ang. Fourier - Transform Ion Cyclotron Resonance* - FT ICR) oraz mierzące czas przelotu (*ang. time of flight* – ToF) oraz analizator działający na zasadzie ulepszonej pułapki jonowej - OrbiTrap. To podejście analityczne bazuje na określeniu z dużą dokładnością stosunku masy do ładunku (m/z) protonowanych $[M+H]^+$ lub deprotonowanych $[M-H]^-$ cząsteczek poszczególnych związków obecnych w mieszaninie. Przy dokładności odczytu masy do czwartego miejsca po przecinku możliwe jest

rozdzielenie związków o takiej samej masie nominalnej, a różnym składzie elementarnym (Last i in, 2007). Metoda ta ma jednak ograniczone zastosowanie w przypadku flawonoidów, które występują w roślinach w postaci połączeń glikozydowych, często acylowanych. Rozdzielenie izomerycznych oraz izobarycznych form tych związków może być trudne w przypadku stosowania metody bezpośredniego nastrzyku analizowanego ekstraktu.

Analizatory stosowane w spektrometrach mas dzielą się na wysoko i niskorozdzielcze. Do analizatorów niskorozdzielczych należą kwadrupol oraz pułapka jonowa. Do wysokorozdzielczych należą analizatory: ToF (rozdzielczość 17 000) oraz FT ICR (rozdzielczość 100 000), a także analizator działający na zasadzie pułapki jonowej OrbiTrap (rozdzielczość 40 000). Porównanie wyników przeprowadzonych analiz na spektrometrach mas wyposażonych w różnego typu analizatory wysokorozdzielcze najwyżej klasyfikuje urządzenia FT ICR (Bristow i Webb, 2003; Ham, 2007). Ze względu na mały stopień fragmentacji w normalnych warunkach analiz jonów $[M+H]^+$ oraz $[M-H]^-$ stosuje się analizatory tandemowe, w których wybrane jony poddawane są kolizjom i ulegają rozkładowi na jony potomne. Proces ten nosi nazwę kolizyjnie indukowanej fragmentacji w tandemowych analizatorach spektrometrów mas (*ang. collision induced dissociation tandem mass spectrometry* – CID MS/MS lub CID MSⁿ). Najczęściej stosowane w układach LC/ESI/CID/MS/MS są: potrójny analizator kwadrupolowy - QqQ, pułapka jonowa – IT lub też analizatory hybrydowe takie jak kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu QqToF oraz wysokorozdzielczy analizator działający na zasadzie pułapki jonowej OrbiTrap. W wymienionych analizatorach strategia wykonywania widm MS/MS jest różna (Rys. 3-11). W analizatorach kwadrupolowych mówimy o fragmentacji rozdzielonej w przestrzeni. Pomiedzy źródło jonów a analizator wstawia się dodatkowy analizator oraz komorę kolizyjną. Dzięki tak zaprojektowanej drodze jonów możliwa jest izolacja interesującego jonu w pierwszym kwadrupolu, jego fragmentacja ma miejsce w komorze kolizyjnej a następnie analiza fragmentów w drugim analizatorze, którym może być kwadrupol lub analizator czasu przelotu (Rys. 3-11 A). W analizatorach typu pułapka jonowa zachodzi fragmentacja rozdzielona w czasie tzn. analizator zdolny jest do utrzymania jonów w określonej przestrzeni i następują po sobie kolejne procesy izolacji i fragmentacji jonów. Możliwe jest przeprowadzenie kilku następujących po sobie kolizji oraz analiza powstałych jonów potomnych (Rys. 3-11 B).

W związku z różną konstrukcją analizatorów informacje otrzymywane z eksperymentów MS/MS są odmienne. Wysokorozdzielcze pomiary wartości stosunku masy do ładunku jonów (m/z) umożliwiają rejestrację jonów z dokładnością od 2 do 5 ppm, w zależności od typu analizatora, pozwala to na określenie składu elementarnego cząsteczki analizowanego związku. Dodatkowe informacje wspomagające charakterystykę strukturalną oraz identyfikację cząsteczek związków można uzyskać analizując powstające w eksperymentach CID MS/MS jony potomne (fragmentacyjne).



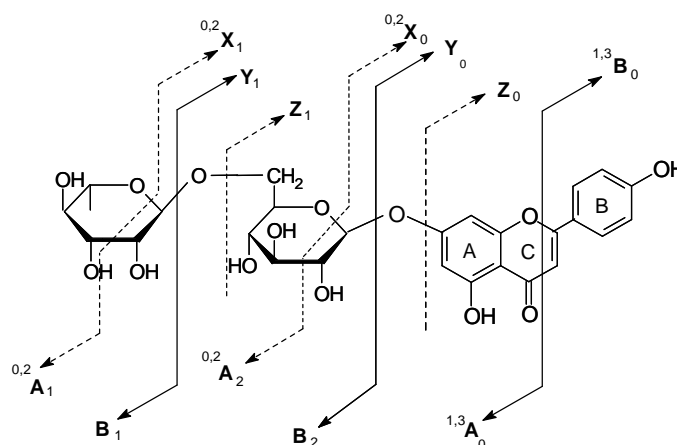
Rys. 3-11 Schematy fragmentacji rozdzielonej w przestrzeni (A) oraz w czasie (B)

2.5.2.3 Identyfikacja połączeń flawonoidów metodami LC/MS

Podstawowe wiadomości strukturalne, które można uzyskać z widm MS połączeń flawonoidów dotyczą stopnia i sposobu glikozylacji aglikonów. Możliwe jest określenie masy glikozydu, wielkości jednostek cukrowych oraz masy aglikonu, w pewnych warunkach również miejsc podstawienia cukrów w przypadku 3 lub 4 jednostek.

Badania strukturalne zmierzające do rozróżnienia izomerów C- i O- glikozydów oraz O-diglikozydów flawonoidów techniką HPLC/MS prowadzono już w latach 90. XX wieku przy użyciu niestosowanej już obecnie metody jonizacji FAB (*ang. fast atom bombardment*) (Stobiecki i in., 1988, Li i in., 1992; Li i Claeys, 1994; Ma i in., 2000, Ma i in., 2001). Wraz z udoskonalaniem metod analitycznych badano możliwości bardziej precyzyjnej charakterystyki połączeń glikozydowych flawonoidów za pomocą metod

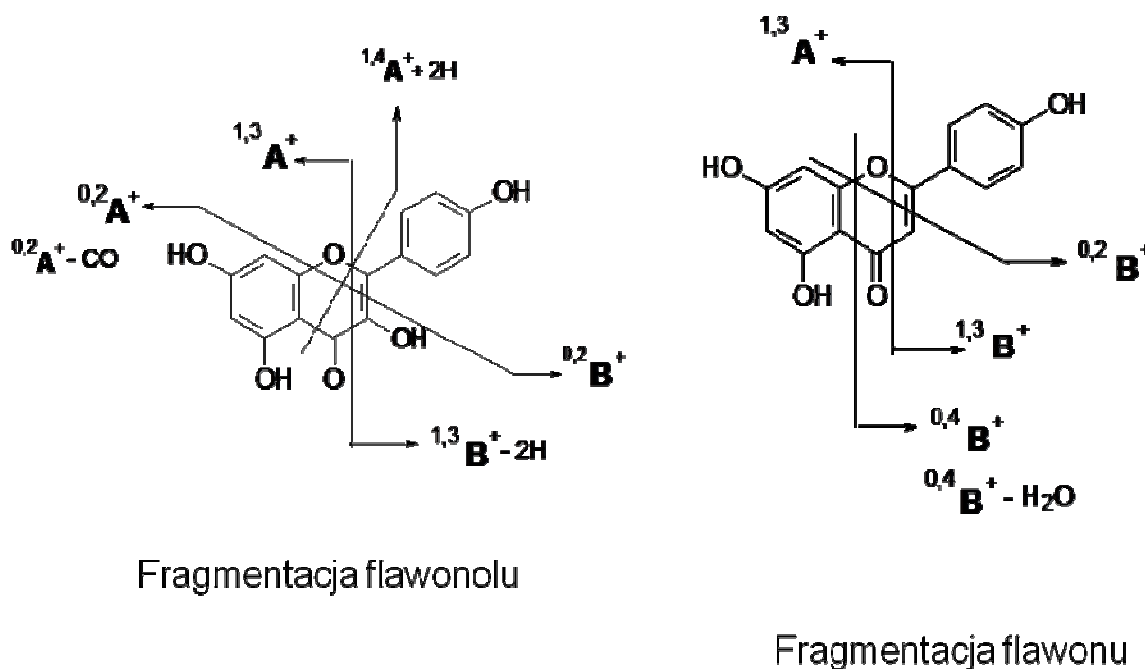
spektrometrii mas. W jonizacji w trybie jonów ujemnych powstają zarówno jony deprotonowane aglikonów jak i anionorodniki, które są wynikiem homolitycznego rozerwania wiązania glikozydowego. Z tendencji do tworzenia tego rodzaju jonów można wywnioskować miejsce podstawienia cukru na cząsteczce aglikonu. (Hvattum i Ekeberg, 2003; Cuyckens i Claeys, 2005). Scharakteryzowano również wiązania interglikozydowe di-, tri-, tetra- i pentaglikozylowanych flawonoidów na podstawie intensywności jonów fragmentacyjnych zarówno typu X jak i Y (rys. 3-12) (Ferrerres i in., 2004). Możliwe jest również określenie, jakie cząsteczki cukrów wchodzą w skład glikozydu.



Rys.3-12 Schemat fragmentacji glikozydów flawonoidów (nomenklatura wg Domon i Costello 1988).

Analizę strukturalną glikozydów flawonoidów z wykorzystaniem technik MS prowadzi się stosując w procesie jonizacji kationy sodu. Powstające jony $[M+Na]^+$ ulegają fragmentacji w sposób odmienny niż jony protonowanych cząsteczek (Kachlicki i in., 2008). Możliwe jest również wykorzystanie w badaniach strukturalnych glikozydów flawonoidów jonów metali dwuwartościowych (Pikulski i Brodbelt, 2003; Pikulski i in., 2007). Obydwe metody prowadzą do uzyskania informacji o sposobie podstawienia cząsteczek cukrowych (Kachlicki i in., 2008) i pozycjach ich przyłączenia do cząsteczki aglikonu (Cuyckens i in., 2005; Davis i Brodbelt, 2004). Informacje o budowie aglikonu można uzyskać na podstawie widm CID MS/MS. W tym celu protonowane cząsteczki aglikonu poddawane są fragmentacji w wyniku kolizji z cząsteczkami gazu szlachetnego. W eksperymencie tego typu istotnymi parametrami są potencjał w źródle jonów oraz energia kolizji (Stobiecki i in., 2006). Diagnostyczne jony fragmentacyjne aglikonów flawonoidów powstają podczas reakcji retro Dielsa – Aldera, (RDA) zachodzącej w pierścieniu C cząsteczek analitu (Rys. 3-13) (Stobiecki i in., 2006; Wolfender i in., 2000; March i in., 2006). Pęknięcie wiązań w pierścieniu C prowadzi do powstania serii jonów A

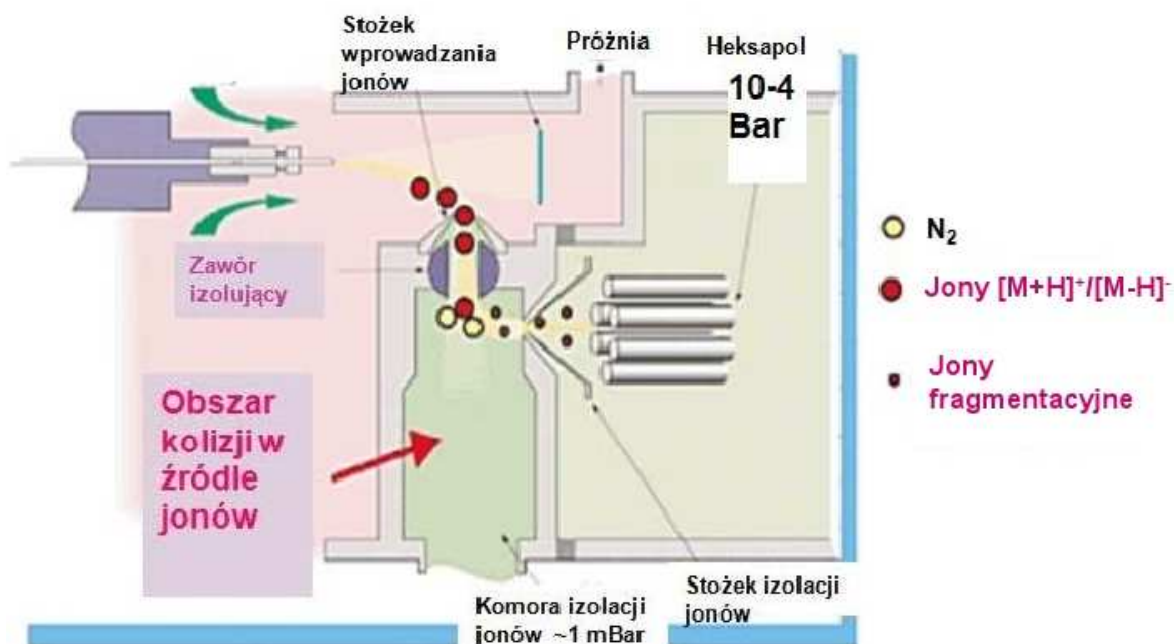
i B, których analiza prowadzi do określenia sposobu podstawienia grupami hydroksylowymi i metoksyłowymi pierścieni (Hughes i in., 2001).



Rys.3-13 Schematy fragmentacji aglikonów flawonów i flawonoli w reakcji RDA.

Istotnym aspektem w analizie glikozydów flawonoidów jest identyfikacja aglikonu. W eksperymentach MS/MS na instrumentach typu potrójny kwadrupol (QqQ) oraz kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu (QqToF) protonowana bądź deprotonowana cząsteczka poddawana jest zderzeniom w komorze kolizyjnej i w efekcie obserwujemy sekwencyjną fragmentację części cukrowej oraz jon pochodzący od protonowanego bądź deprotonowanego aglikonu, który nie ulega fragmentacji. Przeprowadzenie fragmentacji aglikonu w glikozydzie jest możliwe, gdy jon macierzysty poddamy wstępnej fragmentacji w źródle jonów a dokładniej w obszarze średniociśnieniowym, w którym wiązka jonów jest skupiana oraz kierowana do wysoko-próżniowej części spektrometru. Wykonywanie eksperymentów „pseudo MS³” polega na przyłożeniu podwyższonego napięcia pomiędzy szczelinami ogniskującymi, co dostarcza generowanym jonom więcej energii (Rys. 3-14). W wyniku kolizji wysokoenergetycznego jonu z obojętną cząsteczką np. rozpuszczalnika zachodzi fragmentacja glikozydu. W spektrometrach różnych firm konstrukcje źródła jonów oraz drogi optycznej są różne, zatem nazewnictwo parametru jest charakterystyczne dla danego urządzenia (cone-voltage, nozzle-skimmer, high orifice fragmentation) (Bruins, 1997). Najbardziej ogólnym określeniem jest ang. „in-source CID”, najbardziej rozpowszechnionym potencjał

stożkowy (*ang. cone voltage*). W niniejszej pracy będzie stosowany ostatni wymieniony termin.



Rys. 3-14 Proces fragmentacji jonów w źródle (wg Waters Corporation).

Rzadziej stosowanymi ze względu na swą specyfikę są techniki jonizacji MALDI. Korzystając z tego typu aparatów, zidentyfikowano oraz oznaczono ilościowo cztery glikozydy wyizolowane z łupiny migdałów (Frison-Norrie i Sporns, 2002). Spektrometr MALDI-ToF wykorzystano również w oznaczeniach ilościowych i jakościowych antocyjanin w sadzonkach rzodkiewnika poddanego stresowi wychłodzenia (Marczak i in., 2008). Metoda MALDI została opracowana w celu jonizacji biomolekuł o masie większej niż 500 Da. Nie jest to typowa technika jonizacji stosowana w analizie niskocząsteczkowych związków. Zastosowanie MALDI – ToF w analizie metabolitów wymaga precyzyjnego doboru matrycy oraz warunków eksperymentalnych (Vaidyanathan i in., 2001). Poszukiwanie dogodnych warunków analizy ekstraktów za pomocą tej techniki jest pożądane ze względu na znacznie skrócony czas oznaczania jednej próbki oraz zwiększenie wydajności przeprowadzonych analiz.

3 Materiały i metody

3.1 Stosowane odczynniki

Wykorzystywane rozpuszczalniki pochodziły z następujących źródeł:

- metanol MeOH (HPLC grade) – Chempur, Piekary Śląskie
- acetonitryl (HPLC grade) ACN - J.T Baker, Holandia
- acetonitryl (LC-MS grade) – Sigma-Aldrich, Polska
- woda dejonizowana w systemie Mili-Q Plus – Milipore, USA

Odczynniki i standardy:

- gwajakol (CH₃O)C₆H₄OH – Sigma-Aldrich, Polska
- peroksydaza chrzanowa (EC-1.11.1.7) – Sigma-Aldrich, Polska
- nadtlenek wodoru – Sigma-Aldrich, Polska
- fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF) - C₇H₇O₂SF – Sigma-Aldrich, Polska
- chrysoeriol - Extrasynthese, Francja
- luteolina – Extrasynthese, Francja
- wighteon, luteon, genisteina, 2'-hydroksygenisteina – standardy otrzymano od Profesora S. Tahary (Hokkaido University, Japonia)
- glukozyd genisteiny – standard oczyszczono w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki ICHB PAN wg procedury opisanej przez Frańskiego i in. 1999a, b.

3.2 Materiał roślinny

Podczas badań wykorzystywano nasiona łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) odmiany Sonet oraz nasiona populacji mapującej łubinu wąskolistnego charakteryzującej się niską zawartością alkaloidów chinolizydynowych w nasionach (poniżej 0,02% suchej masy). Populację mapującą składającą się z 89 linii otrzymano od Prof. dr hab. Bogdana Wolko z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Populacja została wyprowadzona w wyniku skrzyżowania linii hodowlanej 83A:476 z osobnikami typu dzikiego P27255. W ósmym pokoleniu F8 otrzymano 89 linii potomnych RIL (*ang. recombinant inbred lines*).

3.3 Hodowla roślin

Nasiona łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) odmiany Sonet w doświadczeniach 1, 3 i 4 sterylizowano 1.5 % roztworem KOCI przez 20 min, płukano wodą destylowaną do usunięcia zapachu chloru. W doświadczeniu 2 ze względu na twardą okrywą nasienną, nasiona populacji mapującej zanurzono w stężonym kwasie siarkowym aby naruszyć jej strukturę i spowodować wcześniejsze kiełkowanie, następnie płukano wodą destylowaną w celu usunięcia resztek kwasu. We wszystkich doświadczeniach nasiona sadzono w doniczkach wypełnionych perlitem po 5 nasion w doniczce. Infekcję przeprowadzano na trzytygodniowych siewkach. W całym okresie wegetacji podczas trwania doświadczeń w szklarni utrzymywano doświetlanie roślin: 14 h dzień oraz 10 h noc, temperaturę w okresie dnia na minimalnym poziomie 18°C lub wyższym oraz odpowiednią wilgotność podłoża. Po zakończeniu doświadczeń tkankę roślinną przechowywano w temperaturze -80°C.

Doświadczenie nr 1 prowadzono w okresie od 20 marca do 22 kwietnia 2007 roku. Eksperyment z opryskiem roślin zawiesiną zarodników grzyba powtórzono w okresie od 19 września do 22 października 2007.

Doświadczenie nr 2 miało miejsce od 12 kwietnia 2008 do 15 maja 2008 roku.

Doświadczenie nr 3 i 4 przeprowadzono w okresie od 25 września 2008 do 21 października 2008 roku.

3.4 Porównanie wydajności metod ekstrakcji pod podwyższonym ciśnieniem oraz w łaźni ultradźwiękowej.

Opracowanie wydajnej metody ekstrakcji związków fenolowych z liści zostało przeprowadzone na ekstraktorze firmy Dionex model ASE 200 oraz w łaźni ultradźwiękowej Bardelin SONOREX model AK 103H. W celu przeprowadzenia ekstrakcji dwiema metodami odważono po 100 mg zhomogenizowanego w ciekłym azocie materiału roślinnego (liście łubinu wąskolistnego odmiana Sonet) za pomocą homogenizatora CAT model X 620. Każdy wariant ekstrakcji przeprowadzono w czterech powtórzeniach.

3.4.1 Ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej

Zamrożony materiał biologiczny homogenizowano w temperaturze ciekłego azotu, następnie odważano 100 mg tkanki i dodawano 2 ml 80% metanolu oraz 10 µl standardu wewnętrznego – luteoliny, tak, aby w objętości ekstraktu wstrzykiwanego na kolumnę chromatograficzną było 0.5 µg standardu. Ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej trwała 30 minut. Ekstrakty były odwirowane, supernatanty z kolejnych próbek przenoszono do probówek szklanych i odparowywano rozpuszczalnik w 40°C w koncentratorze firmy Eppendorf model 5301. Wysuszone ekstrakty przechowywano w -80°C do momentu analizy. Próbkę rozpuszczano w 300 µl 80% metanolu wirowano przy 10 000 rpm przez 10 min przed wstawieniem do komory próbek chromatografu cieczowego.

3.4.2 Ekstrakcja w ekstraktorze Dionex

Zamrożony materiał biologiczny homogenizowano w temperaturze ciekłego azotu, następnie odważano 100 mg tkanki. Materiał wymieszano z suchą ziemią okrzemkową w moździerzku w celu zwiększenia powierzchni ekstrakcyjnej. Dodano 10 µl standardu wewnętrznego – luteoliny, tak, aby w objętości ekstraktu wstrzykiwanego na kolumnę chromatograficzną znajdowało się 0.5 µg związku. Tak przygotowany materiał roślinny umieszczano w celkach o pojemności 1ml w podajniku ekstraktora. Wykonano ekstrakcję w 3 programach. Zmienianymi parametrami była temperatura, czas statyczny – właściwy czas ekstrakcji. W każdym przypadku stosowano najmniejszą możliwą ilość rozpuszczalnika (Tab. 4-1).

Tab. 4-1 Programy stosowane w ekstrakcji ciśnieniowej

Próbka	1	2	3
Temperatura	23°C	23°C	45°C
Czas statyczny	5 min	5 min	5 min
Objętość rozpuszczalnika	7ml	7 ml	7ml
Ilość cykli	1	2	1

Ekstrakty z kolejnych próbek przenoszono do probówek szklanych i odparowywano rozpuszczalnik w 40°C w koncentratorze marki Eppendorf. Wysuszone ekstrakty przechowywano w -20°C do momentu analizy. Próbki rozpuszczano w 300 µl 80% metanolu wirowano przy 10 000 rpm przez 10 min przed wstawieniem do komory próbek chromatografu cieczowego.

3.5 Doświadczenie nr 1. Porównanie różnych sposobów infekcji sadzonek łubinu wąskolistnego zawiesiną zarodników grzyba *Colletotrichum lupini*

Rośliny zainfekowano na dwa różne sposoby:

Infekcja 1 - 5 µl zawiesiny o stężeniu 2×10^6 zarodników/ml nakładano na zranione igłą pojedyncze listki rozet liści z drugiego węzła (piętra) rośliny. W roślinach kontrolnych nakładano 5 µl wody destylowanej.

Infekcja 2 - rośliny opryskano zawiesiną zarodników o stężeniu 2×10^6 zarodników/ml, ok. 5 ml zawiesiny na roślinę. Rośliny kontrolne opryskano wodą destylowaną.

W obydwu eksperymentach przez 24 h po infekcji rośliny przykrywano namiotami foliowymi utrzymującymi wysoki stopień wilgotności w komorach, w celu zainicjowania procesu infekcji. Aby obserwować dynamikę zmian zachodzących w częściach zielonych rośliny, zbierano osobno liście z trzech kolejnych pięter, w trzech powtórzeniach w różnych punktach czasowych. Na jedno powtórzenie składał się materiał z trzech roślin rosnących w różnych doniczkach w celu zminimalizowania wpływu efektu różnorodności biologicznej. Materiał zbierano w następujących terminach po infekcji:

Infekcja 1: 24, 48, 120, 168 h

Infekcja 2: 24, 48, 120, 168 h oraz w powtórzonym eksperymencie 4, 8, 24, 48, 120, 168, 312 h po infekcji.

Zbierany materiał zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu ekstrakcji. Ekstrakcj3.6 materiału roślinnego prowadzono według procedury opisanej w punkcie 4.4.1.

3.7 Doświadczenie nr 2. Infekcja siewek z populacji mapującej łubinu wąskolistnego

Infekcję przeprowadzono przez oprysk zawiesiną zarodników trzytygodniowych sadzonek linii populacji mapującej. Ze względu na małą ilość nasion materiał zbierano w jednym punkcie czasowym - po 168 godzinach od infekcji. Liście z dwóch roślin zbierano jako jedną próbkę, przygotowano trzy powtórzenia biologiczne dla linii, które wykiełkowały w odpowiedniej ilości roślin. Dla pozostałych linii ze względu na zbyt małą liczbę kiełkujących nasion, przygotowano próbki w dwóch powtórzeniach biologicznych bądź bez powtórzeń. Po przeprowadzeniu oprysku rośliny przykryto na 24 godziny namiotami foliowymi utrzymującymi wysoki stopień wilgotności w komorach, w celu zainicjowania procesu infekcji. Zbierany materiał zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu ekstrakcji. Wykorzystano procedurę ekstrakcji zgodnie z punktem 4.4.1.

3.8 Doświadczenie nr 3. Inokulacja liści łubinu wąskolistnego zawiesiną metabolitów wyizolowanych z komórek grzyba *Colletotrichum lupini*.

Rozety liści z najniższego węzła rośliny zraniono igłą na 3 listkach, na nakłucia nałożono 10 μl roztworu metabolitów grzyba w 20% metanolu (stężenie roztworu 1mg/ml). W przypadku roślin kontrolnych na zranione listki nakładano stosowany rozpuszczalnik. Materiał zbierany był osobno z infekowanych i zdrowych liści z poszczególnych pięter liści wyrastających w kolejnych węzłach. Materiał zbierano 3, 6, 9, 24, 48, 72, 168 h po infekcji. Na jedną próbkę składał się materiał z trzech roślin, wykonano trzy powtórzenia biologiczne w poszczególnych wariantach eksperymentu z kolejnych (dwóch) pięter liści. Wykorzystano procedurę ekstrakcji zgodnie z punktem 4.4.1

3.9 Doświadczenie nr 4. Badanie aktywności peroksydazowej białek cytoplazmatycznych infekowanych siewek łubinu wąskolistnego wobec gwajakolu

3.9.1 Materiał roślinny

3-tygodniowe siewki łubinu (*L. angustifolius*) odm. Sonet opryskano zawiesiną stężeniu 3×10^6 zarodników/ml. Zbiór materiału odbywał się w następujących punktach czasowych od momentu infekcji: 0, 24, 168 h. Liście z sześciu roślin składały się na jedną próbkę. Materiał roślinny zgrupowano w czterech powtórzeniach biologicznych dla roślin kontrolnych i infekowanych.

3.9.2 Ekstrakcja białek cytoplazmatycznych o aktywności peroksydazowej z liści siewek łubinu.

Materiał roślinny homogenizowano w ciekłym azocie i odważono po ok. 200 mg tkanki z każdej próbki. Po wstępnych ekstrakcjach z materiału, okazało się, że nie obserwowano różnic pomiędzy aktywnością peroksydazową ekstraktów w czasie zerowym i po 24 h od czasu infekcji, dlatego dalsze badania były prowadzone jedynie na próbkach po 24 i 168 godzinach. Materiał roślinny wykorzystano również do ekstrakcji związków fenolowych, zastosowano procedurę ekstrakcji wg punktu 4.4.1.

Procedura ekstrakcji białek z tkanki roślinnej wg publikacji Urbanek i in. 1991 oraz Fernandes i in., 2006

Roztwory wykorzystywane w doświadczeniu:

- 0,05 M bufor octanu sodu
- 1M NaCl
- inhibitor proteaz - fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF) - $C_7H_7O_2SF$ (M = 174,19 g/mol) tak, aby stężenie w próbce wyniosło 2mM

Do odważonego materiału roślinnego dodano schłodzoną mieszaninę 0,05 M buforu octanu sodu pH 5,2 i roztworu 1M NaCl w stosunku 1:10 oraz 10 μ l roztworu 1mM PMSF. Następnie mieszanina ekstrakcyjna wytrząsana była 20 minut w 4° C i wirowana przez 15 minut w 4° C przy przyspieszeniu 17 500 g.

3.9.3 Badanie aktywności peroksydazowej enzymów:

1. Skład analizowanej mieszaniny:

0,975 ml – 0,05 M buforu octanu sodu pH 5,2

0,5 ml – 0,06 M H₂O₂

0,5 ml 10 mM gwajakolu

12,5 µl ekstraktu liści

2. Skład roztworu referencyjnego:

0,975 ml – 0,05 M buforu octanu sodu pH 5,2

0,5 ml – 0,06 M H₂O₂

0,5 ml 10 mM gwajakolu

12,5 µl roztworu peroksydazy o stężeniu 1u w 1000 µl

Pomiar wykonano przy długości fali 480 nm przez 5 minut. Wartości absorbancji odczytywano, co 10 sekund.

3.10 Przygotowanie zawiesiny metabolitów wyizolowanych z komórek grzyba *C. lupini*.

Hodowlę grzyba *C. lupini* prowadzono na pożywce płynnej (modyfikowana pożywka Fries'a) w dużej skali (100 butli Roux po 250 ml pożywki). Metabolity wtórne ekstrahowano z pożywki octanem etylu i oczyszczano technikami chromatografii kolumnowej („flash chromatography”, preparatywna HPLC). Flash chromatography prowadzono na kolumnie 70×1 cm z wypełnieniem typu odwróconej fazy C18 (Baker, USA) pod ciśnieniem 2 barów (do wytworzenia nadciśnienia stosowano sprężony azot N₂). Metabolity wmywano z kolumny stosując roztwory metanol woda o stopniowo zwiększającym się stężeniu komponenta organicznego (10, 20, 25, 30, 35, 40, 70%) zbierając frakcje 50 ml. Wymywanie kolejnymi roztworami kontynuowano do opadnięcia w wycieku z kolumny absorpcji światła $\lambda=270$ nm poniżej 0,1. Zawartość metabolitów wtórnych w poszczególnych frakcjach monitorowano korzystając z systemów HPLC/UV i HPLC/MSⁿ. Wyizolowane związki nie zostały dotychczas scharakteryzowane strukturalnie przy użyciu NMR H¹ i C¹³. Aktywność biologiczna poszczególnych frakcji metabolitów

była monitorowana na siewkach łąbinu, badano wielkość plamek nekrotycznych powstających po nałożeniu roztworów kolejnych frakcji.

3.11 Aparatura analityczna wykorzystywana do profilowania metabolitów wtórnych w ekstraktach roślinnych

3.11.1 Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem UV (HPLC-UV)

System HPLC firmy Merck Hitachi (Darmstad, Niemcy)	
Pompa HPLC	Model L-7100 Hitachi
Detektor	Model DAD L-7450 (Merck)
Sposób wprowadzania próby	Automatyczna komora nastrzykowa Model L-7200
Typ kolumny chromatograficznej	Superspher 100 RP-18 (250 x 2mm) Merck
Przepływ	0,2 ml/min
Objętość nastrzykiwanego ekstraktu	10 µl
Zakres rejestracji widm UV	220-400nm

Stosowane rozpuszczalniki:

- faza A - 95% ACN, 4.5% H₂O, 0.5% HCOOH v/v/v

- faza B - 95% H₂O, 4.5% ACN, 0.5% HCOOH v/v/v

Stosowany gradient:

Czas [min]	%A	%B
0	100	0
30	70	30
40	0	100
60	0	100
61	100	0
70	100	0

3.11.2 Chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas z analizatorem typu pułapka jonowa (LC/ESI-IT)

System HPLC firmy Agilent (Palo Alto, CA, USA)	
Pompa	Model 1100 HPLC (Waldburnn, Niemcy)
Sposób wprowadzania próbek	Pętla nastrzykowa
Kolumna	Superspher 100 RP-18 (250 x 2mm) Merck
Przepływ	0,2 ml/min
Objętość nastrzyku	10 μ l

Spektrometr masowy firmy Bruker Daltonics (Brema, Niemcy)	
Źródło jonów	elektrozpraszanie (ESI)
Napięcie w źródle jonów	4kV
Nebulizacja azotem	30 psi
Przepływ gazu suszącego	9 l/min
Temperatura gazu suszącego	310 C
Napięcie stożkowe	12,4 V oraz 44,2 V
Analizator	Model IT Esquire 3000
Gaz kolizyjny	Hel
Energia gazu kolizyjnego	30 eV
Oprogramowanie	EsquireControl 5.1Bruker
Program do analizy danych	Data Analysis 3.1Bruker

Używane rozpuszczalniki:

- faza A – 95% ACN, 4.5% H₂O, 0.5% HCOOH v/v/v,
- faza B – 95% H₂O, 4.5% ACN, 0.5% HCOOH v/v/v,

Stosowany gradient:

Czas [min]	%A	%B
0	10	90
5	10	90
40	30	70
48	100	0
61	10	90
70	10	90

3.11.3 Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem UV oraz ze spektrometrem mas z hybrydowym analizatorem typu MS/MS: kwadrupol połączony z analizatorem czasu przelotu (UPLC/UV/ESI-QqToF)

System UPLC Acquity firmy Waters (Miliford, USA)	
Pompa	Pompa dwufazowa
Sposób wprowadzania próby	Automatyczna komora nastrzykowa
Typ kolumny chromatograficznej	Acquity HSS T3 C-18 (100 x 2.1mm)
Średnica ziaren złoża	1,8 µm
Przepływ	0,6 ml/min
Temperatura rozdziału	40°C
Objętość nastrzyku	2 µl

Spektrometr masowy Q-ToF Premier firmy Waters Micromass (Manchester, Wielka Brytania)	
Źródło jonów	elektrozpraszanie (ESI)
Napięcie w źródle jonów	4kV
Temperatura igły ESI	120°C
Nebulizacja azotem	1 l/min
Przepływ gazu suszącego	8 l/min
Temperatura gazu suszącego	350°C
Napięcie stożkowe	35 V (jony dodatnie); 30 V (jony ujemne); 45 V (eksperyment pseudo-MS ³)
Analizator	QqToF
Gaz kolizyjny	Argon
Energia gazu kolizyjnego	15-35 eV
Oprogramowanie spektrometru	MassLynx 2.1 (Waters)
Program do analizy danych	MassLynx 2.1 (Waters)

Używane rozpuszczalniki:

- faza A - 95% ACN, 4.5% H₂O, 0.5% HCOOH v/v/v
- faza B - 95% H₂O, 4.5% ACN, 0.5% HCOOH v/v/v

Stosowany gradient:

Czas [min]	%A	%B
0	90	10
8	75	25
11	10	90
12	10	90
12,1	90	10
14	90	10

3.11.4 Chromatograf cieczowy RRLC sprzężony z detektorem UV i spektrometrem mas wyposażonym w hybrydowy analizator typu MS/MS: kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu (RRLC-UV-QqToF).

System RRLC firmy Agilent	
Pompa	Model RRLC 1200
Sposób wprowadzania próby	Automatyczna komora nastrzykowa
Typ kolumny chromatograficznej	Zorbax Eclipse (100 x 2,1 mm) C-18
Średnica ziaren złoża	1,8 µm
Przepływ	0,5 ml/min
Temperatura rozdziału	40°C
Objętość nastrzyku	5 µl

Spektrometr masowy microTofQ Bruker (Brema, Niemcy)	
Źródło jonów	elektrozpraszanie (ESI)
Napięcie w źródle jonów	4,5 kV
Temperatura igły ESI	210
Nebulizacja azotem	1,2 l/min
Przepływ gazu suszącego	8,0 l/min
Temperatura gazu suszącego	350 °C
Potencjał stożkowy	32 V (jony dodatnie i ujemne);
ISCD (eksperyment pseudo-MS³)	50 V
Analizator	QqToF
Gaz kolizyjny	Argon
Energia gazu kolizyjnego	15-35 eV
Oprogramowanie spektrometru	microTof control (Bruker)
Program do analizy danych	DataAnalysis (Bruker)

Analizowane pochodne flawonoidów były identyfikowane na podstawie korelacji z widmami masowymi standardów lub wcześniej wyizolowanych związków scharakteryzowanych za pomocą NMR i MS (Frański i in., 1999a,b; Bednarek i in., 2003; Kachlicki i in., 2008), lub na podstawie zarejestrowanych widm CID MS/MS oraz widm UV rejestrowanych podczas analiz LC/UV.

3.12 Programy wykorzystywane do obliczeń statystycznych

Programy wykorzystywane do analizy ilościowej i obliczeń statystycznych:

- Genstat Ed. 9 (VSN International Ltd.)
- Microsoft Office Excel
- Profile Analysis 1.1 (Bruker Daltoniks)

4 Wyniki

4.1 Identyfikacja pochodnych połączeń flawonoidów w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego

W pierwszym etapie badań przeprowadzono identyfikację związków fenolowych występujących w liściach łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) odmiany Sonet. W identyfikacji flawonoidów i ich połączeń glikozydowych wykorzystano chromatograf cieczowy z detektorem DAD UV (HPLC-UV), chromatograf cieczowy sprzężony z spektrometrem mas wyposażonym w niskorozdzielczy analizator typu pułapki jonowej (HPLC-MS/IT) oraz dwa wysokorozdzielcze systemy chromatograficzne typu UPLC oraz RRLC połączone z detektorami UV oraz analizatorami hybrydowymi składającym się z kwadrupola połączonego z wysokorozdzielczym analizatorem mierzącym czas przelotu (UPLC-UV-MS/QqToF – Waters oraz RRLC-UV-MS/QqToF – Agilent/Bruker). Wymienione aparaty różnią się rozdzielczością zarówno systemu chromatograficznego jak i parametrami analizatorów w spektrometrach masowych.

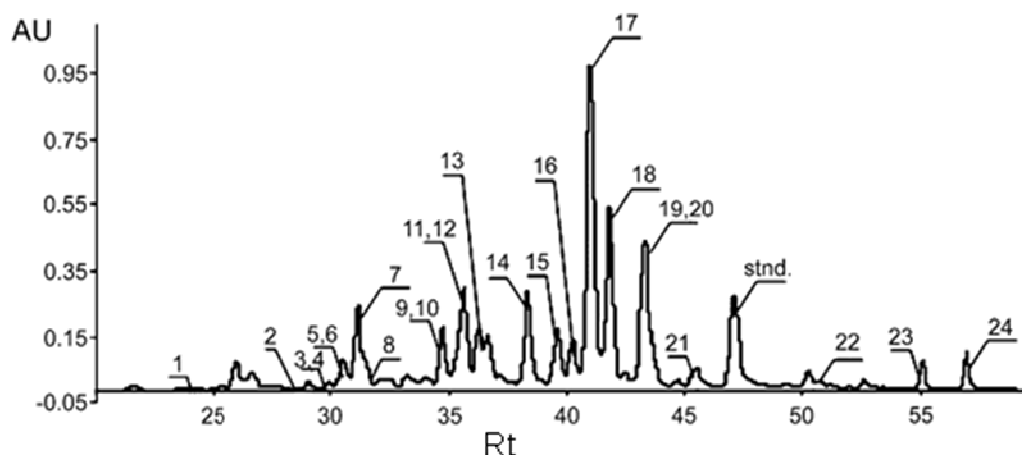
4.1.1 Identyfikacja flawonoidów za pomocą systemów LC/MS

Związki fenolowe z różnych gatunków łubinu były od lat przedmiotem zainteresowań w Laboratorium Proteomiki i Metabolomiki, struktury wielu z nich zostały określone po ich wyizolowaniu w stanie czystym lub na podstawie analiz widm masowych wykonywanych różnymi technikami spektrometrii mas (Frański i in., 1999a, b; Bednarek i in., 2001, 2003; Kachlicki i in., 2005, 2008; Muth i in., 2008).

W ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego podczas analiz wykonanych z wykorzystaniem systemu HPLC/MS-IT w eksperymentach typu MSⁿ zidentyfikowano 20 pochodnych flawonoidów – 11 glikozydów izoflawonów, 8 glikozydów flawonów oraz 1 glikozyd flawonolu, oraz 4 aglikony izoflawonów (Tab. 5-1) (Muth i in., 2009). Wykorzystując technikę chromatograficzną UPLC/UV/MS-QqToF zidentyfikowano 42 związki: 16 pochodnych izoflawonów, 21 połączeń glikozydowych flawonów, 1 glikozyd flawonolu oraz 4 wolne aglikony izoflawonów (Tab. 5-2) (Muth i in., 2008). Dzięki zastosowaniu nowej technologii chromatografii cieczowej UPLC do rozdzielania związków fenolowych skrócono czas analizy z 50 do 15 minut oraz otrzymano lepszy rozdział

izomerów, umożliwiło to identyfikację dwa razy większej ilości pochodnych flawonoidów niż przy zastosowaniu normalnego układu HPLC. Wykorzystanie wyższych ciśnień podczas analizy chromatograficznej oraz zastosowanie kolumn z drobniejszym uziarnieniem fazy stacjonarnej (o średnicy ziaren poniżej 2 μm) w kolumnach LC, powoduje uzyskanie lepszych rozdzieleń wcześniej współwymywanego związków. Ponadto, piki rejestrowane dla poszczególnych produktów naturalnych są węższe co zwiększa czułość podczas analiz LC/MS.

Liczba połączeń glikozydowych flawonów i izoflawonów występujących w liściach jest znacznie wyższa niż pochodnych flawonoidów rozpoznanych w korzeniach. Dominującym flawonem występującym w próbkach ekstraktów z liści łubinu wąskolistnego jest chryzoeriol (3'-*O*-metyloluteolina), związek zidentyfikowany wcześniej w lucernie (*Medicago sativa*), gatunku należącego również do roślin z rodziny Fabaceae (Stochmal i in., 2001). Podczas profilowania fenolowych metabolitów wtórnych stwierdzono, że pochodne cukrowe izoflawonów występowały w ilościach względnie dwukrotnie mniejszych niż połączenia flawonów. W ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego zidentyfikowano liczne izomery położeniowe oraz związki izobaryczne, które różnią się stopniem hydroksylacji aglikonów oraz obecnością różnych rodzajów cukrów (pentozy lub heksozy) w cząsteczce (związki **3**, **6** i **17** w tabeli 5-1).



Rys. 5-1 Chromatogram próbki uzyskanej z infekowanych liści łubinu wąskolistnego zebranych po 168 godzinach od infekcji zarejestrowany przy długości fali $\lambda=259\text{nm}$ za pomocą systemu HPLC/UV. Przypisane numery odpowiadają numeracji zidentyfikowanych połączeń flawonoidów i wolnych aglikonów związków w tabeli 5-1 (wg Muth i in., 2009).

Sposób glikozylacji aglikonów oraz acylowania kwasem malonowym reszt cukrowych w glikozydach zależą od stanu fizjologicznego tkanki oraz wieku liścia. Na podstawie korelacji danych z obydwu systemów LC/MS-IT oraz LC/UV możliwe było

przyporządkowanie czasów retencji pików poszczególnych związków do sygnałów rejestrowanych na chromatogramie UV przy długości fali $\lambda=259\text{nm}$ dla próbki infekowanej zawiesiną zarodników *C. lupini* zebranej 168h od oprysku (Rys. 5-1, Tab. 5-1). Podczas analiz wykonywanych z wykorzystaniem systemu LC/MS-IT na chromatografie cieczowym stosowano ten sam gradient chromatograficzny, jak w przypadku analiz wykonywanych na układzie LC/UV.

Tab. 5-1 Związki zidentyfikowane za pomocą systemu HPLC-MS/IT (wg Muth i in., 2009).

Nr	Rt	M.cz.	Zidentyfikowane związki
1	24,4	594	4',7-di- <i>O</i> -glukozyd genisteiny
2	28,9	448	7- <i>O</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny
3	29,9	680	malonylowany 4',7-di- <i>O</i> -glukozyd genisteiny I
4	30,2	432	8- <i>C</i> – glukozyd genisteiny
5	31,2	756	glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
6	31,3	680	malonylowany 4',7-di- <i>O</i> -glukozyd genisteiny II
7	31,7	610	3- <i>O</i> -ramnozyloglukozyd kwercetyny
8	33,3	432	7- <i>O</i> – glukozyd genisteiny
9	33,7	766	dimalonylowany 4',7-di- <i>O</i> -glukozyd genisteiny
10	33,8	842	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
11	35,1	928	dimalonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
12	35,3	564	ksylozyloglukozyd genisteiny
13	36,7	594	ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> - metyloluteoliny
14	37,9	462	glukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
15	38,9	650	malonylowany ksylozyloglukozyd genisteiny
16	39,5	518	malonylowany 7- <i>O</i> – glukozyd genisteiny I
17	40,1	680	malonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
18	40,7	518	malonylowany 7- <i>O</i> – glukozyd genisteiny II
19	41,1	548	malonylowany glukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
20	41,3	766	dimalonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
21	43,6	286	2'-hydroksygenisteina
22	45,9	270	genisteina
23	50,3	354	luteon
24	51,7	338	wighteon

Tab. 5-2 Związki zidentyfikowane za pomocą systemu UPLC-MS/QqToF (wg Muth i in., 2008).

Nr	Rt [min]	M.cz.	Masy jonów $[M+H]^+$ ^a		Zidentyfikowane związki
			obserwowana	obliczona	
1	1,26	594	595,1667	595,1663	4',7-di-O-glukozyd genisteiny
2a	2,36	680	681,1667	681,1667	malonylowany 4',7-di-O-glukozyd genisteiny I
2b	2,56	680	681,1693	681,1667	malonylowany 4',7-di-O-glukozyd genisteiny II
3	2,80	432	433,1134	433,1135	8-C – glukozyd genisteiny
2c	2,82	680	681,1666	681,1667	malonylowany 4',7-di-O-glukozyd genisteiny III
4a	2,86	756	757,2233	757,2191	glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyluteoliny I
4b	3,11	756	757,2217	757,2191	glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyloluteoliny II
5a	3,52	842	843,2197	843,2195	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyloluteoliny I
6	3,59	448	449,1801	449,1812	7-O- glukozyd 2'-hydroksygenisteiny
7	3,60	610	611,1648	611,1612	3-O-ramnozyloglukozyd kwercetyny
5b	3,75	842	843,2215	843,2195	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyloluteoliny II
8a	3,80	766	767,1663	767,1671	dimalonylowany 4',7-di-O-glukozyd genisteiny I
5c	3,83	842	843,2222	843,2195	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyloluteoliny III
9	3,91	432	433,1146	433,1135	7-O-glukozyd genisteiny
8b	3,96	766	767,1677	767,1671	dimalonylowany 4',7-di-O-glukozyd genisteiny II
5d	4,13	842	843,2241	843,2195	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyloluteoliny IV
8c	4,13	766	767,1666	767,1671	dimalonylowany 4',7-di-O-glukozyd genisteiny III
5e	4,32	842	843,2195	843,2195	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyloluteoliny V
10a	4,50	928	929,2208	929,2199	dimalonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyloluteoliny I
11	4,56	518	519,1121	519,1139	malonylowany 8-C – glukozyd genisteiny
12	4,62	564	565,1550	565,1557	7-O-ksylozyloglukozyd genisteiny
10b	4,71	928	929,2172	929,2199	dimalonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'-O-metyloluteoliny II

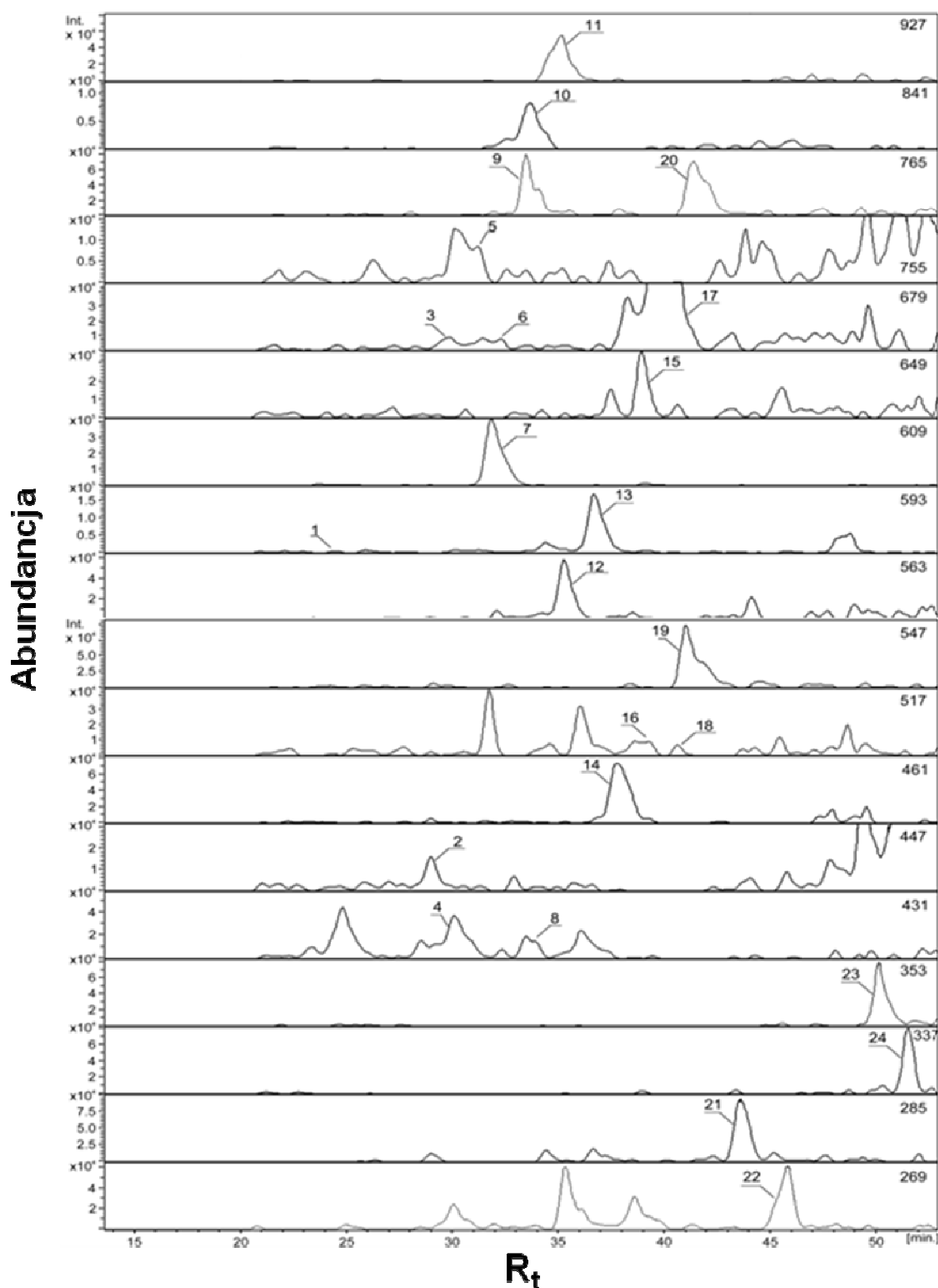
10c	4,86	928	929,2240	929,2199	dimalonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny III
10d	4,93	928	929,2198	929,2199	dimalonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny IV
13	5,17	594	595,1694	595,1663	malonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
14	5,23	534	535,1088	535,1088	malonylowany 7- <i>O</i> -glukozyd 2'hydroksygenisteiny
15	5,46	462	463,1258	463,1240	glukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
16a	5,91	518	519,1138	519,1139	malonylowany 7- <i>O</i> - glukozyd genisteiny I
17a	5,91	680	681,1694	681,1667	malonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny I
17b	6,02	680	681,1669	681,1667	malonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny II
18	6,21	650	651,1535	651,1561	malonylowany 7- <i>O</i> -ksylozyloglukozyd genisteiny
17c	6,31	680	681,1667	681,1667	malonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny III
16b	6,51	518	519,1152	519,1139	malonylowany 7- <i>O</i> - glukozyd genisteiny II
17d	6,59	680	681,1666	681,1667	malonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny IV
19	6,91	548	549,1238	549,1244	malonylowany glukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny
20a	7,04	766	767,1658	767,1671	dimalonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny I
20b	7,23	766	767,1686	767,1671	dimalonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny II
20c	7,32	766	767,1689	767,1671	dimalonylowany ksylozyloglukozyd 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny III
21	7,9	286	286,0478	286,0477	2'hydroksygenisteina
22	9,67	270	270,0526	270,0528	genisteina
23	12,29	354	354,1101	354,1103	luteon
24	13,2	338	338,1155	338,1154	wigtheon

a – zapis m/z z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku pozwala na określenie składu elementarnego z dokładnością lepszą niż 5 ppm.

Podczas analiz wykonywanych za pomocą systemu LC/UV oraz LC/MS obserwujemy efekt jednoczesnego wymywania związków z kolumny chromatograficznej. Jednakże w przypadku zastosowania spektrometru mas jako detektora, na podstawie

zarejestrowanych sygnałów m/z możliwe jest wykreślenie chromatogramów pojedynczych jonów EIC (*ang. Extracted Ion Chromatogram*) $[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$ dla analizowanych związków. Różne wartości m/z jonów protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek umożliwiają rozdzielenie współwplywających związków na podstawie ich mas cząsteczkowych (np. związki nr **9** i **10**) (Rys. 5-2, Tab. 5-1). Należy zaznaczyć, że w analizatorze typu pułapki jonowej (IT) zachodzi wielokrotna fragmentacja kolejno powstających jonów potomnych otrzymywanych w kolejnych etapach po rozpadzie jonów $[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$. W zależności od intensywności jonu macierzystego możliwe jest otrzymanie widma czwartego lub nawet piątego rzędu. Analiza jonów potomnych w widmach zapisanych przy danym czasie retencji, uzyskanych podczas eksperymentów CID MS^n , umożliwia rozróżnienie substancji współwymywanych z kolumny. Na podstawie zarejestrowanych dróg fragmentacji związków można określić strukturę aglikonu oraz jego stopień glikozylacji i malonylacji. Należy podkreślić, że podczas wykonywania widm z wykorzystaniem kolizyjnie indukowanej fragmentacji, niezwykle ważnym jest dobór odpowiednich potencjałów elektrycznych podczas jonizacji cząsteczek (potencjał stożkowy) analizowanych związków oraz dopasowanie energii kolizji z atomami gazu kolizyjnego (helu lub argonu).

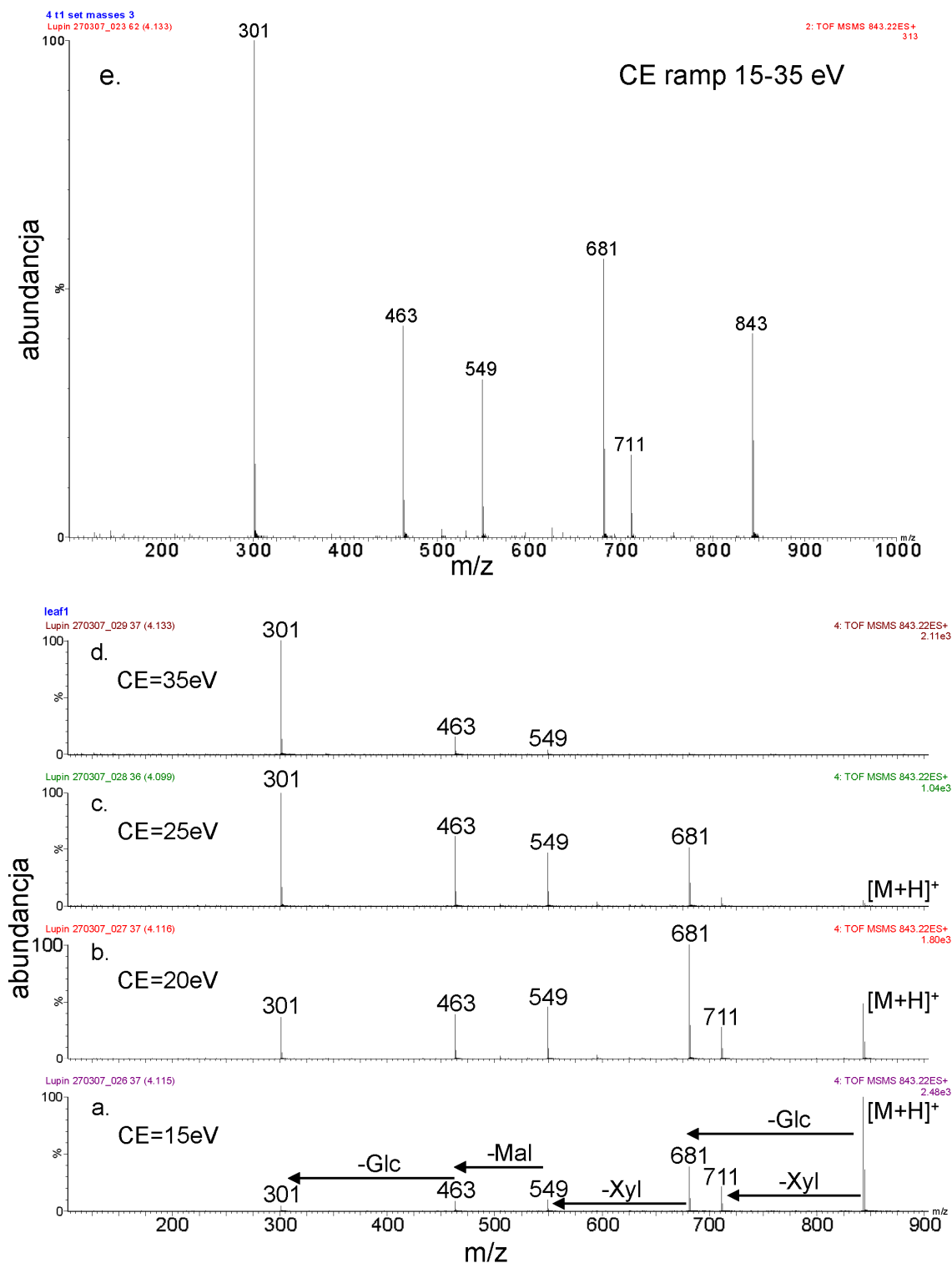
Wykonywanie analiz z wykorzystaniem analizatorów wysokorozdzielczych (mierzących czas przelotu) z dużą dokładnością (cztery miejsca po przecinku) umożliwia określenie składu elementarnego poszczególnych jonów protonowanych oraz deprotonowanych cząsteczek związków. W analizatorach hybrydowych QqToF możliwe jest również przeprowadzenie eksperymentów CID MS/MS jonów $[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$ oraz zarejestrowanie wartości m/z dla jonów potomnych z dokładnością poniżej 5 ppm. Analiza widm CID MS/MS pozwala na określenie na której jednostce cukrowej podstawiona jest grupa acylowa w glikozydach flawonoidów. W przypadku izomerów położeniowych tej klasy połączeń możliwe jest rozróżnienie poszczególnych izomerów na podstawie odmiennych intensywności względnych jonów potomnych w rejestrowanych dla poszczególnych substancji widmach CID MS/MS. W zaprezentowanych wynikach pomiarów wysokorozdzielczych uzyskanych po zastosowaniu systemów UPLC/MS-QqToF wartości m/z poszczególnych jonów rejestrowane były z dokładnością poniżej 5 ppm dla określonego związku (Tab. 5-2).



Rys. 5-2 Chromatogramy pojedynczych jonów $[M-H]^-$ dla wartości m/z zarejestrowanych z dokładnością 1 Da, uzyskane podczas analiz ekstraktów z liści łubinu wąskolistnego wykonanych z wykorzystaniem systemu LC/MS-IT. Wartości m/z , dla których wykreślono chromatogramy są umieszczone w prawym górnym rogu. Numery przypisane bezpośrednio poszczególnym pikom, odpowiadają numeracji związków w tabeli 1-1 (wg Muth i in., 2009).

Podczas identyfikacji związków z wykorzystaniem tandemowego analizatora masowego w układach LC/MS istotna jest kontrola potencjałów elektrycznych w źródle jonów oraz w układzie ogniskowania i transmisji jonów w analizatorze, ponieważ mogą one wpływać na intensywność fragmentacji poszczególnych związków poza komorą kolizyjną. W układzie tandemowych analizatorów hybrydowych (QqToF) możliwe jest zarejestrowanie widm jonów potomnych dla protonowanych oraz deprotonowanych cząsteczek glikozydów flawonoidów w eksperymencie MS². Z kolei fragmentację jonów aglikonów przeprowadza się w eksperymentach „pseudo MS³”, w których konieczna jest wstępna fragmentacja glikozydu w źródle jonów, podczas której zachodzi oderwanie reszt cukrowych. Uzyskane na tej drodze jony aglikonów są izolowane w pierwszym kwadrupolu, poddawane kolizjom w celu fragmentacji w drugim kwadrupolu (pełniącym funkcję komory kolizyjnej), a produkty rozpadu analizowane są w drugim analizatorze (trzeci kwadrupol lub analizator czasu przelotu). Struktury aglikonów potwierdzono przez porównanie wykonanych widm CID MS/MS oraz „pseudo MS³” glikozydów flawonoidów oraz widm wykonanych dla odpowiednich standardów.

Ważnym parametrem podczas przeprowadzania eksperymentów CID MS/MS jest silna zależność stopnia fragmentacji związku, obrazowana intensywnością jonów potomnych, od zastosowanej energii kolizji (*ang. collision energy* - CE)(Rys. 5-3 a-d). Stosowanie zmiennej energii kolizji podczas jednego eksperymentu CID umożliwia rejestrację wszystkich jonów fragmentacyjnych powstających zarówno przy wysokiej jak i niskiej energii (*ang. ramping*) (Rys. 5-3 e). Przy wykorzystaniu tej techniki wykonywania widm można rozróżnić izomery położeniowe, które charakteryzują się różną intensywnością jonów potomnych (Rys. 5-10).



Rys. 5-3 Intensywności fragmentacji jonu $[M+H]^+$ rejestrowanego przy m/z 843 malonylowanego glukozydu-ksylozyloglukozydu 3'-*O*-metyloluteoliny w zależności od energii kolizji w eksperymentach CID MS/MS. Widma zarejestrowane przy różnych wartościach energii kolizji: (a) 15 eV, (b) 20 eV, (c) 25 eV, (d) 35 eV oraz widmo uśrednione przy zmiennej energii kolizji (e).

4.1.2 Określenie struktury diglikozydów flawonoidów

Diglikozydy flawonoidów występują powszechnie w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego. Zastosowanie spektrometru mas do identyfikacji związków fenolowych w próbkach ekstraktów roślinnych umożliwia określenie rodzajów cząsteczek cukrów, które wchodzi w skład badanej cząsteczki oraz sposobu ich przyłączenia do aglikonu, czyli rozróżnienie *O*-di, di-*O* oraz C-,*O*- glikozydów. W przypadku rejestracji w widmach MS/MS jonów potomnych powstających w wyniku rozerwania pierścienia cukrowego (jony typu X, Rys. 3-12) można określić również rodzaj wiązania glikozydowego w disacharydach. Jednakże określenie struktury związku wymaga również wskazania konkretnych pozycji grup hydroksylowych aglikonu, do których przyłączone są reszty glikozydowe. Uzyskanie tego typu informacji metodami spektrometrii mas w wielu przypadkach jest niemożliwe (Stobiecki i in., 2006). Jedynie izolacja związku i wykonanie analiz z wykorzystaniem spektroskopii NMR może dostarczyć tego typu informacji.

W celu identyfikacji połączeń flawonoidów w ekstraktach z łubinu wąskolistnego wykonano analizy za pomocą systemów LC/MS w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych. W zarejestrowanych widmach masowych zaobserwowano różne drogi fragmentacji protonowanych i deprotonowanych cząsteczek. W widmach jonów ujemnych fragmentacja deprotonowanych cząsteczek może przebiegać poprzez rozerwanie wiązania w dwojaki sposób: homolityczny – produktem jest anionorodnik oraz heterolityczny – produktem jest jon parzystoelektronowy. Eksperymenty CID MS/MS w trybie jonów ujemnych przeprowadzono przy zastosowaniu wyższej energii kolizji, ponieważ powstające jony [M-H]⁻ są bardziej stabilne niż te otrzymywane w trybie jonów dodatnich. Interpretacja widm deprotonowanych cząsteczek jest trudniejsza ze względu na przegrupowania zachodzące w warunkach wysokoenergetycznych. Analiza widm CID MS/MS wykonanych dla obydwu rodzajów jonów dostarcza uzupełniających informacji na temat struktur analizowanych produktów naturalnych znajdujących się w badanych ekstraktach.

W celu ułatwienia określenia sposobu podstawienia cukrów na cząsteczce aglikonu do wycieku z kolumny dodawano roztwór octanu sodu, w wyniku czego analizowano sodowane cząsteczki [M+Na]⁺. Kationy jedno- oraz dwuwartościowych metali mają w odpowiednich warunkach zdolność tworzenia związków kompleksowych z częścią cukrową glikozydów. W efekcie fragmentacji sodowanych cząsteczek [M+Na]⁺ obserwujemy jony potomne pochodzące od cząsteczek cukrów wchodzących w skład glikozydu z przyłączonym kationem sodowym oraz eliminację obojętnej cząsteczki

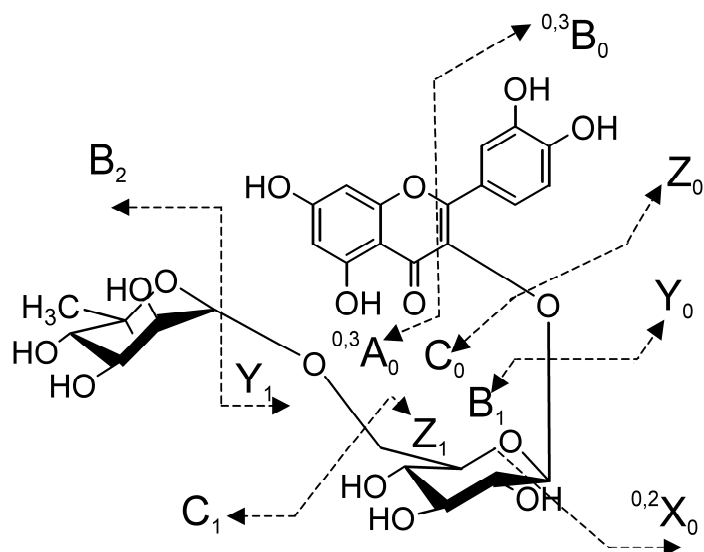
aglikonu. Tego rodzaju fragmentacja ma miejsce w przypadku 3-O-glikozylowanych flawonoli, na przykład kwercetyny.

W ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego zidentyfikowano 3-O-ramnozyloglukozyd kwercetyny (nr 7 w tabeli nr 1), którego izomer położeniowy 3-O-glukozyd-7-O-ramnozyd kwercetyny został scharakteryzowany strukturalnie za pomocą analizy NMR w ekstraktach z liści rzodkiewnika, *Arabidopsis thaliana* (Bloor i Abrams, 2002; Tohge i in., 2005). Widma MSⁿ zarejestrowane dla izomerycznych diglikozydów kwercetyny obecnych w próbkach ekstraktów z obu gatunków roślin różniły się między sobą intensywnością względną. Podczas analiz ekstraktów z liści łubinu wąskolistnego wykonano widma MSⁿ dla cząsteczek protonowanych [M+H]⁺, sodowanych [M+Na]⁺ oraz deprotonowanych [M-H]⁻ diglikozydu kwercetyny. Otrzymane widma porównano z wcześniej zarejestrowanymi dla związków fenolowych obecnych w próbkach z liści rzodkiewnika (Stobiecki i in., 2006). Na tej podstawie możliwe było określenie rodzaju cukrów oraz sposobu i miejsca ich przyłączenia do grupy hydroksylowej przy atomie węgla C-3 pochodnej kwercetyny zidentyfikowanej w ekstraktach z liści *L. angustifolius* jako 3-O-ramnozyloglukozyd kwercetyny.

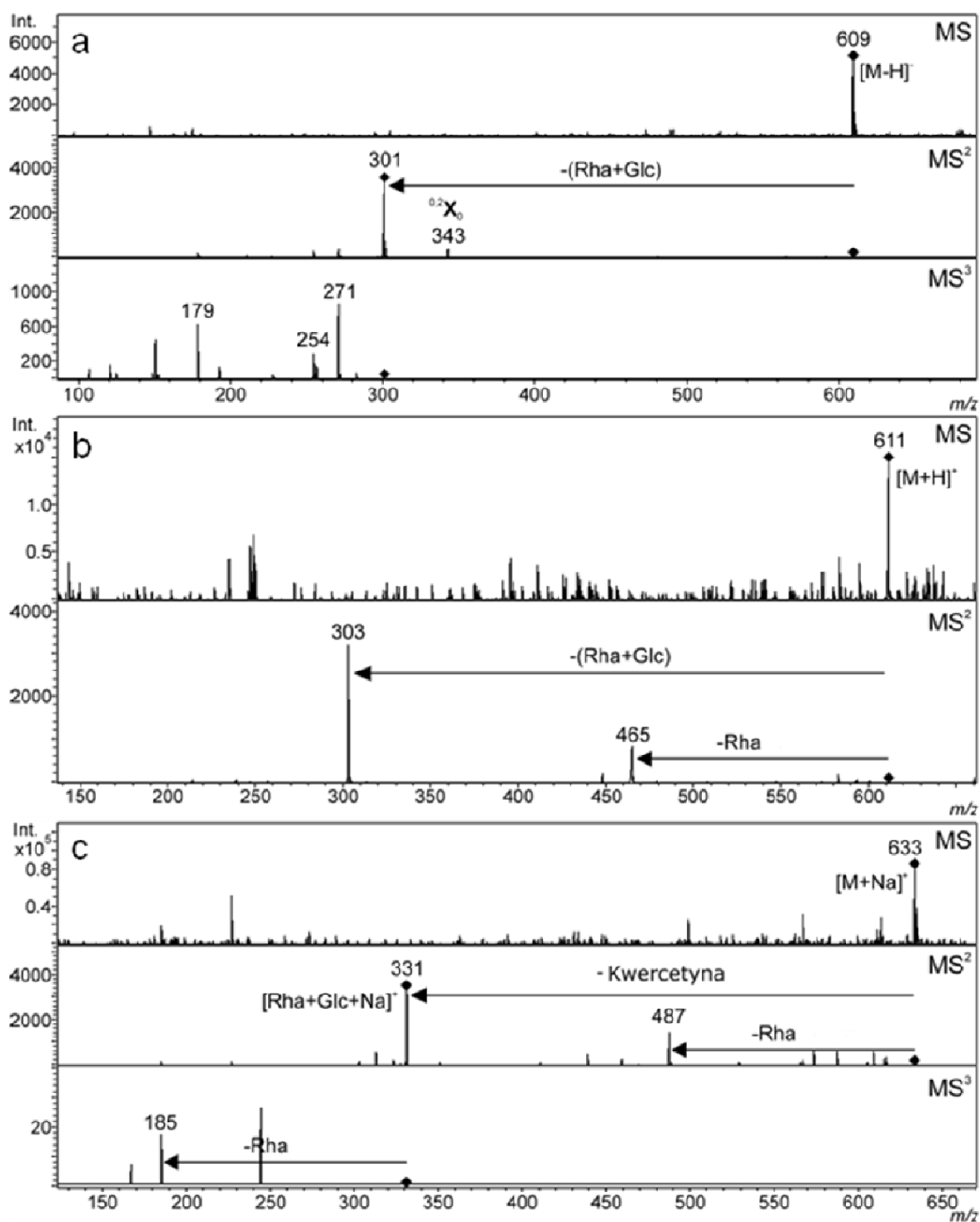
W widmach zarejestrowanych dla 3-O-diglikozydu kwercetyny w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego zarówno w trybie jonów dodatnich jak i w trybie jonów ujemnych obserwujemy dominujący jon pochodzący od protonowanego bądź deprotonowanego aglikonu odpowiednio przy wartościach m/z 303 Da oraz 301 Da (Rys. 5-5 a i b). W widmie jonów dodatnich zaobserwowano eliminację ramnozy z nieredukującego końca glikozydu, jednakże intensywność sygnału [M+H-Rha]⁺ przy m/z 465 stanowi 1/3 intensywności sygnału pochodzącego od aglikonu, co sugeruje przyłączenie obydwu jednostek cukrowych do jednej grupy hydroksylowej kwercetyny. W widmie jonów ujemnych zaobserwowano jednoetapową eliminację disacharydu (ramnozyloglukozydu) z odpowiednio deprotonowanej cząsteczki [M-H-Rha-Glc]⁻, co potwierdza wcześniejsze przypuszczenia o sposobie przyłączenia cukrów do aglikonu (Rys. 5-5 a). Ponadto w widmie jonów sodowanych [M+Na]⁺ obserwujemy jon pochodzący od sodowanego kompleksu części cukrowej [Rha+Glc+Na]⁺ przy m/z 331, powstały poprzez rozerwanie wiązania glikozydowego pomiędzy disacharydem a aglikonem i szacowaniem ładunku na części cukrowej (Rys. 5-5 c).

Z powyższych obserwacji wynika, że obydwie jednostki cukrowe przyłączone są do jednej grupy hydroksylowej wolnego aglikonu. Eliminacja fragmentu o masie 146 Da w widmie jonów dodatnich wskazuje na obecność ramnozy na nieredukującym końcu

disacharydu. Ponadto zarejestrowany fragment typu $^{0,2}X_0$ m/z 343 w widmie jonów ujemnych jest charakterystyczny dla wiązania 1-6 glikozydowego (Rys. 5-4, 5-5 a). Ramnozyloglukozyd jest przyłączony w pozycji 3 flawonolu kwercetyny, o czym świadczy jon $[Rha+Glc+Na]^+$, który jest podstawowym fragmentem w widmie MS^2 wykonanym dla cząsteczek sodowanych, ten sam wzór fragmentacji był obserwowany dla glikopochodnych kemferolu i kwercetyny identyfikowanych w ekstraktach z liści *Arabidopsis thaliana* (Stobiecki i in., 2006).



Rys. 5-4 Struktura 3-O-ramnozylo (1-6) glukozylu kwercetyny.



Rys. 5-5 Widma masowe 3-*O*-ramnozyglukozydu kwercetyny (M.cz. 610 Da) zarejestrowane za pomocą systemu HPLC/MS-IT:

- (a) widmo jonów ujemnych,
- (b) widmo jonów dodatnich,
- (c) widmo jonów sodowanych.

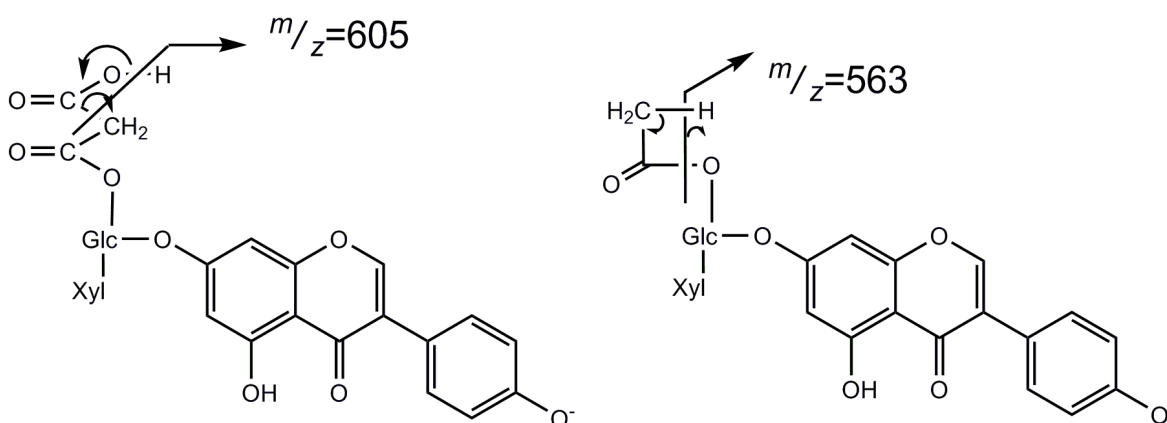
4.1.3 Określenie struktury malonylowanych glikozydów flawonoidów

W ekstraktach z tkanek różnych gatunków łubinów powszechnie występują malonylowane glikozydy flawonów i izoflawonów. Stopień różnorodności strukturalnej flawonoidów wzrasta wraz z dodaniem kolejnej jednostki cukru ze względu na możliwość ich przyłączenia do różnych grup hydroksylowych aglikonu, odmiennych sposobów połączeń między cząsteczkami cukrów poprzez tworzenie wiązań glikozydowych (1-2 lub 1-6) oraz możliwości przyłączenia grupy acylowej do każdej z grup hydroksylowych cząsteczki cukru. Podczas interpretacji widm MS/MS możliwe jest określenie cząsteczki cukru, do której przyłączona jest reszta kwasu malonowego, natomiast nie można precyzyjnie przypisać pozycji grupy acylowej na pierścieniu cukrowym. Należy podkreślić, że połączenia tego typu są niestabilne termicznie, więc sposób przygotowania próbki ekstraktu z materiału roślinnego ma zasadniczy wpływ na ilości malonylowanych glikozydów obecnych w analizowanych ekstraktach.

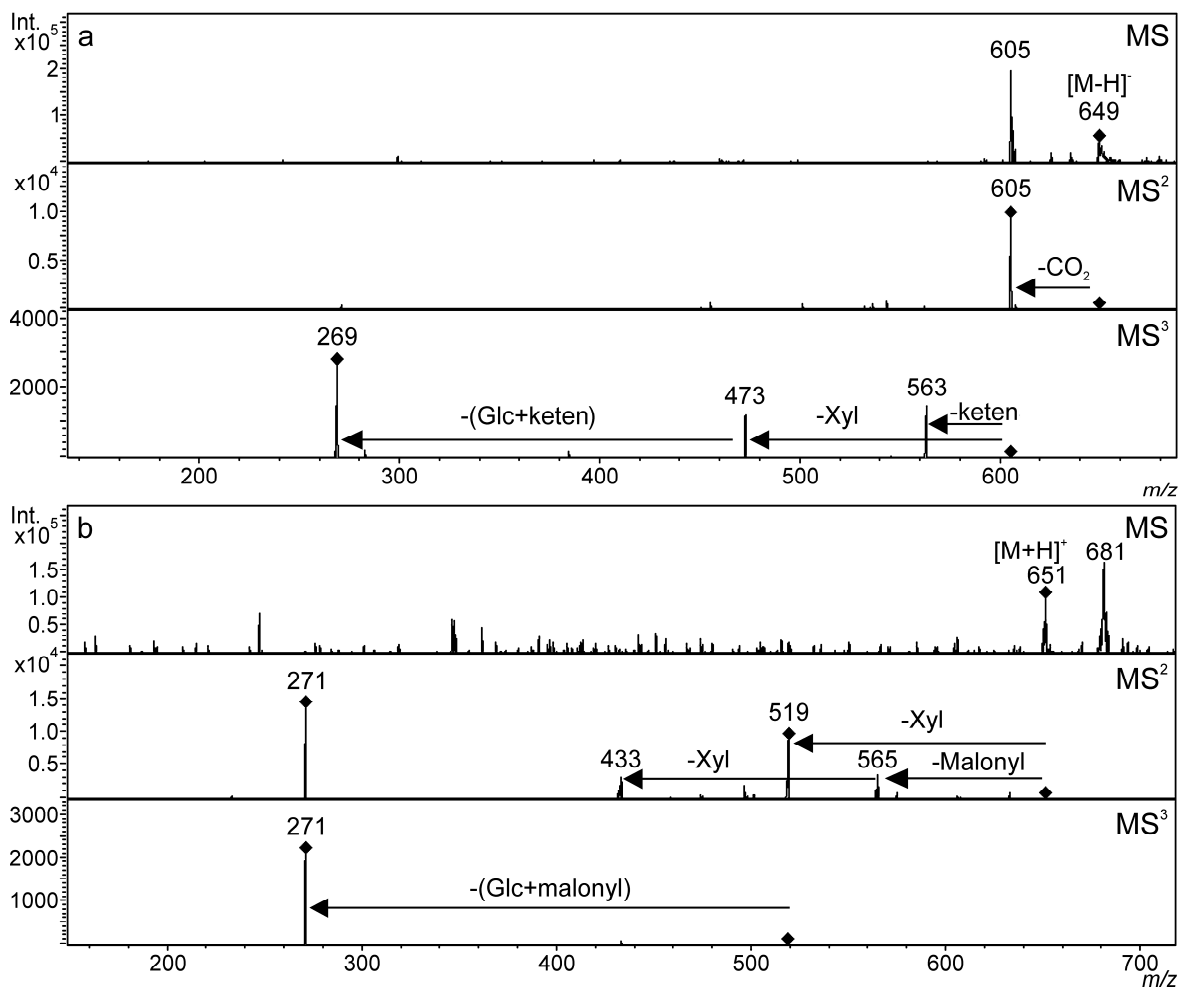
Podczas analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem kolizyjnie indukowanej dysocjacji typu MSⁿ przy zastosowaniu systemu LC/MS-IT oraz typu MS/MS przeprowadzonych przy użyciu układu LC/MS-QqToF zidentyfikowano pochodne połączeń flawonoidów pojedynczo oraz podwójnie malonylowanych. Na rysunku 5-7 przedstawiono widma malonylowanego ksylozyloglukozydu genisteiny zarejestrowane na analizatorze typu pułapki jonowej (IT) w trybie jonów ujemnych (a) i dodatnich (b). W widmie jonów ujemnych (Rys. 5-7a) obserwujemy eliminację obojętnej cząsteczki CO₂ [M-H-44]⁻ odłączonej z wolnej grupy karboksylowej podstawnika malonylowego. Tego rodzaju fragmentacja jest charakterystyczna dla malonylowanych pochodnych flawonoidów rejestrowanych w trybie jonów ujemnych (Rys. 5-6). W widmie trzeciego rzędu MS³ następuje sekwencyjna eliminacja jednostek cukrowych z jonu powstałego po dekarboksylacji deprotonowanej cząsteczki (przy m/z 605). Obserwujemy oderwanie kolejno obojętnych fragmentów o masie 132 Da oraz 204 Da, co odpowiada cząsteczce ksylozy oraz glukozy z pozostałą po dekarboksylacji grupą ketenową. Możliwa jest również alternatywna droga fragmentacji, w której następuje kolejno eliminacja ketenu (CH₂=CO, 42 Da), jon potomny przy m/z 563 oraz disacharydu o masie 294 Da, co odpowiada eliminacji cząsteczki ksylozyloglukozydu (Rys. 5-7a). Należy podkreślić, że w przypadku widm rejestrowanych w spektrometrach mas wyposażonych w analizatory hybrydowe (np. QqToF) w widmach jonów ujemnych nie obserwuje się w ogóle jonów [M-H]⁻, a jedynie jony powstające w wyniku dekarboksylacji deprotonowanych cząsteczek

[M-H-CO₂]⁻. Intensywność tego typu fragmentacji jest zależna w dużym stopniu od stosowanego potencjału jonizacji. Efekt łatwej dekarboksylacji zachodzącej w trybie jonów ujemnych może powodować mylną interpretację uzyskanych wyników.

W widmach MSⁿ zarejestrowanych w trybie jonów dodatnich na podstawie sygnałów m/z w widmach drugiego i trzeciego rzędu możemy określić rodzaj podstawników cukrowych oraz stopień malonylacji. Fragmenty kolejno eliminowane z protonowanej cząsteczki o masach 132 Da oraz 248 Da odpowiadają oderwaniu obojętnej cząsteczki ksylozy oraz malonylowanej cząsteczki glukozy. Zaobserwowano również sygnał przy m/z 565, który powstał w wyniku oderwania fragmentu o masie 86 Da, co odpowiada masie reszty kwasu malonowego. Najbardziej intensywny sygnał przy m/z 271 pochodzi od jonu protonowanego aglikonu – genisteiny. Obserwowana fragmentacja jonu [M+H]⁺ wskazuje na przyłączenie obydwu jednostek cukrowych do jednej grupy hydroksylowej aglikonu (Rys. 5-7b). Eliminacja w pierwszym etapie fragmentu o masie 132 Da zarówno w widmie jonów dodatnich jak i ujemnych wskazuje na zerwanie wiązania glikozydowego i odejście ksylozy z nieredukującego końca disacharydu. Natomiast fragmentacja przebiegająca przez oderwanie cząsteczki o masie 248 Da w widmie trzeciego rzędu wskazuje na podstawienie grupy malonylowej na cząsteczce glukozy. Informacje zawarte w widmach jonów potomnych protonowanych [M+H]⁺ i deprotonowanych [M-H]⁻ cząsteczek sugerują przyłączenie kwasu malonowego do glukozy w disacharydzie, która jest połączona z cząsteczką ksylozy oraz aglikonem.



Rys. 5-6 Fragmentacja grupy malonylowej w malonylowany ksylozylo glukozydzie genisteiny obserwowana w trybie jonów ujemnych.



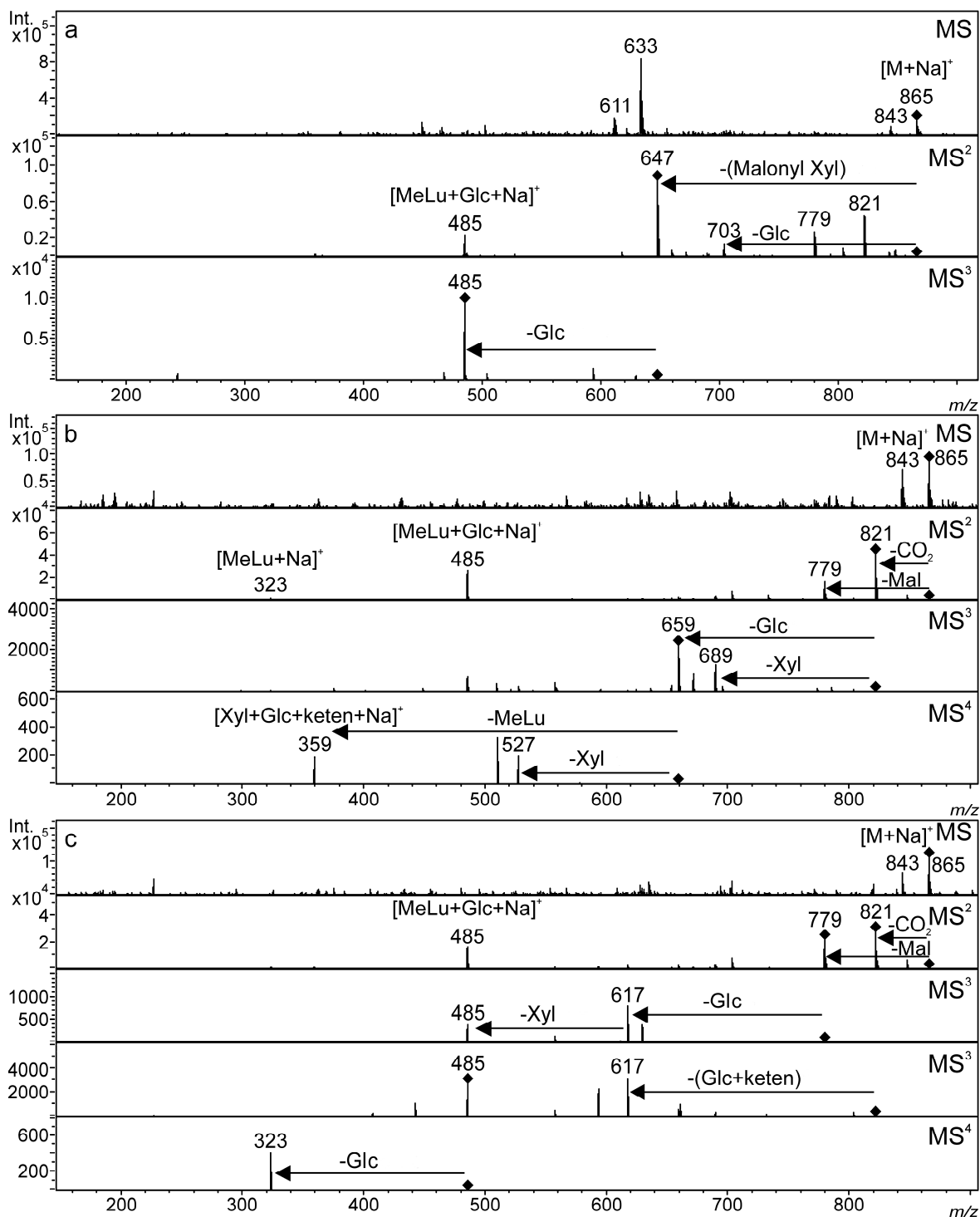
Rys. 5-7 Widma masowe malonylowanego ksylozyloglukozydu genisteiny (M.cz. 650 Da) z wykorzystaniem systemu CID MSⁿ (LC/MS-IT): (a) jony ujemne [M-H]⁻, (b) jony dodatnie [M+H]⁺.

Na podstawie wartości m/z kolejnych jonów w widmach fragmentacyjnych [M+H]⁺, [M-H]⁻ oraz [M+Na]⁺ zarejestrowanych w trybie MSⁿ oraz MS/MS było możliwe określenie ważnych informacji strukturalnych w identyfikacji związków fenolowych. W przypadku malonylowanych pochodnych di- oraz triglikozydów flawonoidów istnieje możliwość występowania kilku izomerów położeniowych. Problem w analizie tego typu związków polega na zbliżonej polarności oraz ułożeniu podstawników, co powoduje trudności w rozdzieleniu izomerów. Na podstawie intensywności jonów potomnych cząsteczek protonowanych i deprotonowanych izomerów pochodnych malonylowanych glikozydów, określenie różnic w strukturze izomerów jest trudne a często nawet niemożliwe. Zastosowanie podejścia analitycznego polegającego na fragmentacji sodowanych cząsteczek acylowanych glikozydów flawonoidów umożliwia uzyskanie dodatkowych informacji strukturalnych o badanych związkach.

Przykładem związku, dla którego zaobserwowano obecność współwplywających izomerów jest malonylowany triglikozyd chryzoeriolu (M.cz.=842Da). Na podstawie analiz wykonanych w trybie jonów dodatnich oraz jonów ujemnych określono masę cząsteczkową związku (842Da), rodzaj aglikonu (300Da – 3'-*O*-metyloluteolina), cząsteczki cukrów wchodzących w skład glikozydu (dwie cząsteczki glukozy oraz jedna ksylozy) oraz stopień malonylacji (jedna reszta kwasu malonowego). Na podstawie zarejestrowanych widm fragmentacyjnych nie określono miejsca przyłączenia cząsteczek cukrów do grup hydroksylowych aglikonu oraz rodzaju wiązań glikozydowych pomiędzy jednostkami, ponieważ kolejne izomery nie zostały rozdzielone na kolumnie chromatograficznej. Zarejestrowane jony fragmentacyjne dla sygnału $[M+H]^+$ przy m/z 843 pochodziły od fragmentowanych w tym samym czasie współwymywanymi izomerów malonylowanego triglikozydu chryzoeriolu (M.cz.=842Da). Nie możliwe było zdefiniowanie ilości izomerów położeniowych badanego związku występujących w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego.

Analiza MS^n z użyciem pułapki jonowej jonów sodowanych malonylowanego triglikozydu 3'-*O*-metyloluteoliny umożliwiła rozróżnienie trzech izomerów położeniowych (Rys. 5-8 a-c). Podobnie jak w przypadku analizy widm rejestrowanych w wyniku kolizyjnie indukowanej fragmentacji jonów deprotonowanych $[M-H]^-$ pochodnych malonylowanych flawonoidów, jony sodowane łatwo ulegają dekarboksylacji. W pierwszym widmie MS^2 zaobserwowano eliminację fragmentu o masie 218 Da, w skład którego wchodzi cząsteczka ksylozy z przyłączoną resztą kwasu malonowego, co wskazuje na miejsce położenia reszty malonylowej na pierścieniu ksylozy pierwszego izomeru. W widmie MS^n kolejnego izomeru, obecność jonu przy m/z 359 świadczy o utworzeniu jonu sodowanego części disacharydowej – ksylozylo-glukozy z pozostałym po dekarboksylacji fragmentem grupy malonylowej $[Xyl+Glc+keten+Na]^+$. Z kolei fragmentacja obserwowana w widmie MS^3 czyli obecność jonów przy m/z 689 i m/z 659 powstałych po oderwaniu z jonu $[M+Na]^+$ odpowiednio reszt ksylozy i glukozy, wskazuje na przyłączenie reszty malonylowej do jednej z grup hydroksylowych cząsteczki glukozy na redukującym końcu glikozydu. Ponadto zaobserwowano odłączenie fragmentu o masie 162 Da od jonu $[M+Na]^+$ przy m/z 865, które jest dowodem na odrębne miejsce przyłączenia jednej cząsteczki glukozy. W trzecim izomerze pozycja grupy malonylowej wyznaczona została na oddzielnie związanej cząsteczce glukozy, na podstawie zarejestrowanych jonów przy m/z 865, 821 i 617, które odpowiadają $[M+Na]^+$, $[M+Na-CO_2]^+$ oraz $[M+Na-CO_2-(Glc+keten)]^+$. W przedstawionych widmach MS^n obserwujemy jon $[M+Na-$

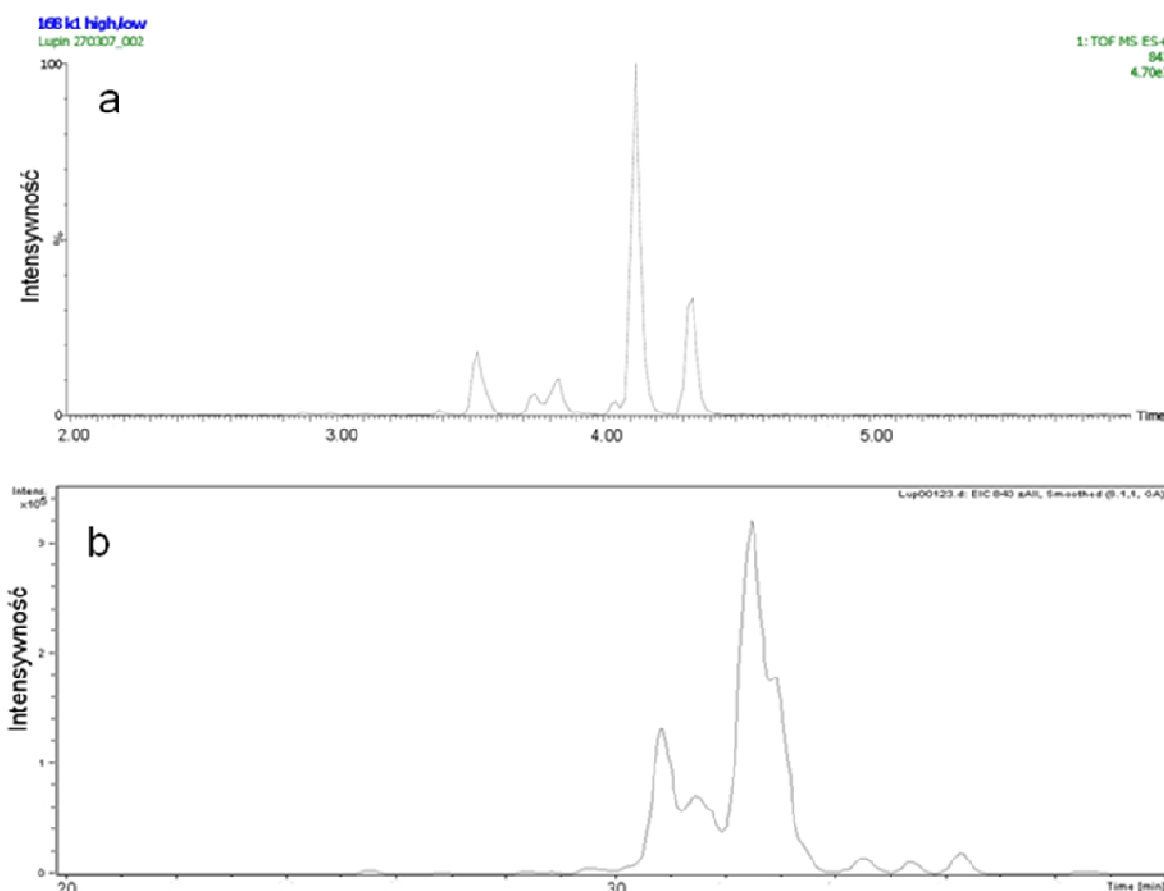
CO_2^+ przy m/z 821, który jest najbardziej intensywnym jonem w przypadku podstawienia reszty kwasu malonowego na cząsteczkach glukozy.



Rys. 5-8 Widma MSⁿ jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ trzech izomerów malonylowanego glukozydu-ksylozyloglukozydu 3'-*O*-metyloluteoliny zarejestrowane przy użyciu systemu HPLC/MS-IT.

Rozdzielczość systemu chromatograficznego odgrywa istotną rolę w analizach złożonych mieszanin związków o podobnej strukturze i polarności. Na podstawie analizy chromatogramów pojedynczych jonów zarejestrowanych na systemie

HPLC/MS-IT dla glikozydów genisteiny i 3'-*O*-metyloluteoliny i ich malonylowanych pochodnych, czyli związków nr **3, 5, 6, 9, 10, 11, 16, 17, 18, 20** w tabeli 5-1, stwierdzono obecność kilku izomerów położeniowych wymienionych połączeń flawonoidów (Tab. 5-1, Rys. 5-2). Jednakże niektóre z badanych związków są współwymywane z kolumny chromatograficznej i nawet zastosowanie techniki HPLC-CID/MS/MS nie ułatwiło rozróżnienia wszystkich izomerów badanych substancji (Kachlicki i in., 2005, 2008; Stobiecki i in., 2006). Ich rozdzielenie było możliwe dzięki zastosowaniu systemu ultrasprawnej chromatografii ciekowej UPLC (Rys. 5-9). Zastosowanie wysokiego ciśnienia podczas rozdziału chromatograficznego ekstraktu z liści łubinu wąskolistnego umożliwiło rozróżnienie izomerów wyżej wymienionych związków w krótszym czasie niż na tradycyjnym HPLC (związki nr **2 a/b/c, 4 a/b, 5 a/b/c/d/e, 8 a/b/c, 10a/b/c/d, 16 a/b, 17 a/b/c/d, 20a/b/c/d** w tabeli 5-2).



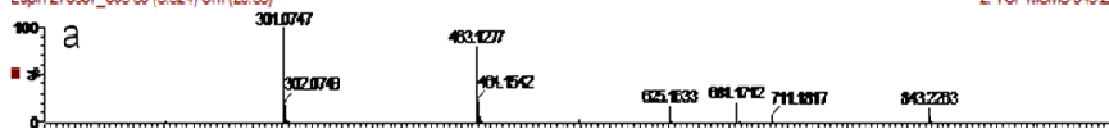
**Rys. 5-9 Chromatogramy pojedynczego jonu protonowanej cząsteczki [M+H]⁺ przy m/z 843 dla malonylowanego glikozyd-ksylozyloglukozyd 3'-*O*-metyloluteoliny, porównanie zdolności rozdzielczej dwóch typów chromatografów:
(a) UPLC (system LC/MS-QqToF),
(b) HPLC (system LC/MS-IT).**

Przedstawione na rysunku 5-9 chromatogramy pojedynczego jonu [M+H]⁺ m/z 843 zarejestrowane na systemach UPLC/MS-QqToF oraz HPLC/MS-IT wskazują na znaczną

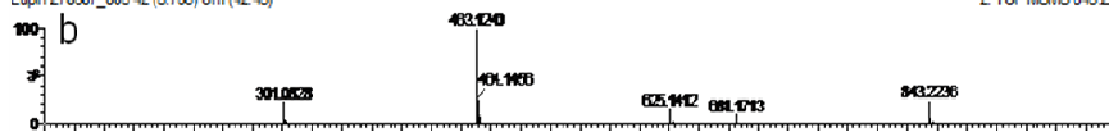
poprawę rozdzielczości przy zastosowaniu ultrasprawnej chromatografii cieczowej. Wraz z lepszym rozdzieleniem związków otrzymano węższe piki chromatograficzne, co w połączeniu z odpowiednim ustawieniem częstotliwości skanowania spektrometru mas powoduje zwiększenie czułości analizy. W przypadku malonylowanego glukozydu – ksylozyloglukozydu 3'-O-metyloluteoliny zarejestrowano piki chromatograficzne dla pięciu izomerów położeniowych badanego związku. Dokładna analiza widm CID MS/MS zarejestrowanych pod poszczególnymi pikami przy czasach retencji 3,52; 3,75; 3,83; 4,13; 4,32 min. pozwoliła na częściową charakterystykę strukturalną poszczególnych izomerów malonylowanego glukozydu - ksylozyloglukozydu 3'-O-metyloluteoliny (Rys. 5-11 - kolejnym czasem retencji odpowiadają widma a, b, c, d, e). Obecność w widmach jonów potomnych przy m/z 711,1773 $[M+H-132]^+$ wskazują na eliminację wolnej cząsteczki ksylozy ze związków c, d, e, podczas gdy w widmach izomerów a i b jon przy m/z 625,1769 $[M+H-218]^+$ świadczy o oderwaniu malonylowanej cząsteczki ksylozy znajdującej się na nieredukującym końcu disacharydu (Rys. 5-10). Na podstawie podobnych obserwacji określono pozycję położenia grupy malonylowej na odrębnie związanej glukozie, ponieważ nie zarejestrowano jonu m/z 681,1667 $[M+H-162]^+$, który wskazywałby by na eliminację wolnej cząsteczki glukozy. W przypadku pozostałych izomerów reszta kwasu malonowego umieszczona została na cząsteczce glukozy na końcu redukującym disacharydu związku c i d (Rys. 5-10). Jednak dokładne miejsce malonylacji z określeniem pozycji grupy hydroksylowej na pierścieniach cukrowych nie może zostać określone na podstawie danych uzyskanych z widm CID MS/MS. Przepuszczalne pozycje przyłączenia glukozy i ksylozyloglukozy do aglikonu to odpowiednio 4' i 7 (Muth i in., 2009).

168 k1 set masses 3

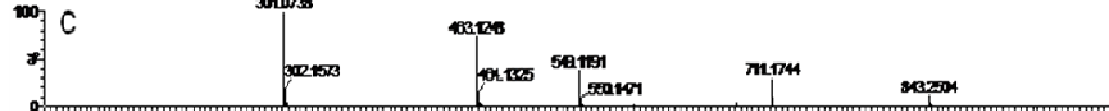
Lupin 270307_005 30 (3.524) Cm (29:33)

2: TOF MSMS 843.22ES+
408

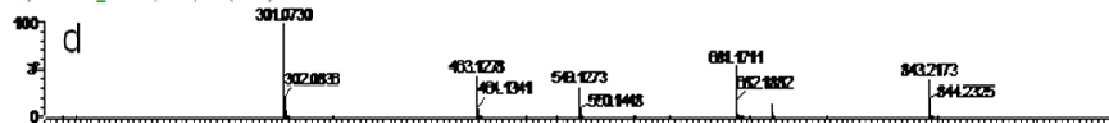
Lupin 270307_005 42 (3.736) Cm (42:43)

2: TOF MSMS 843.22ES+
144

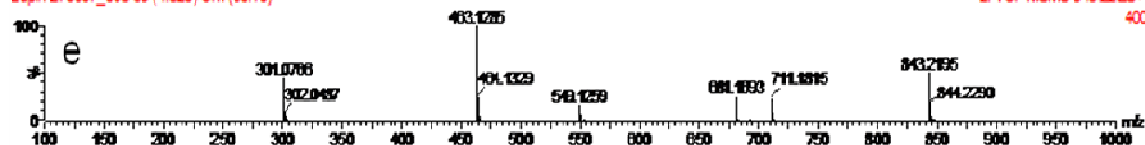
Lupin 270307_005 47 (3.828) Cm (48:49)

2: TOF MSMS 843.22ES+
210

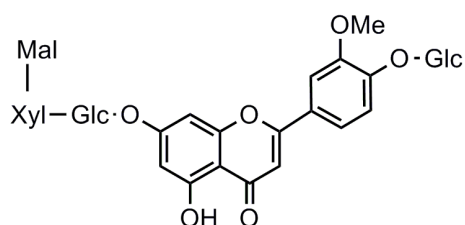
Lupin 270307_005 62 (4.134) Cm (81:83)

2: TOF MSMS 843.22ES+
987

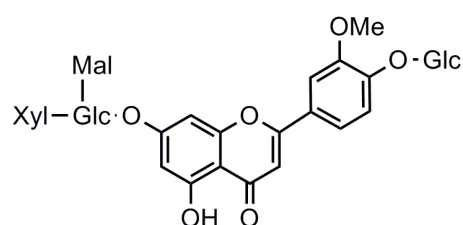
Lupin 270307_005 69 (4.320) Cm (89:70)

2: TOF MSMS 843.22ES+
400

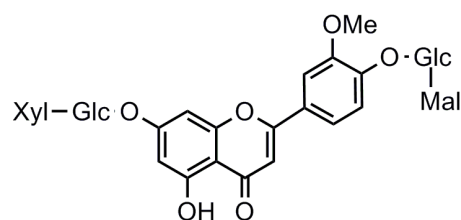
Rys. 5-10 Widma masowe CID MS/MS pięciu izomerów malonylowanego glukozydu ksylozyloglukozydu 3'-O-metyloluteoliny (M. cz. 842 Da) zarejestrowane z wykorzystaniem systemu UPLC/MS-QqToF.



Izomery a i b



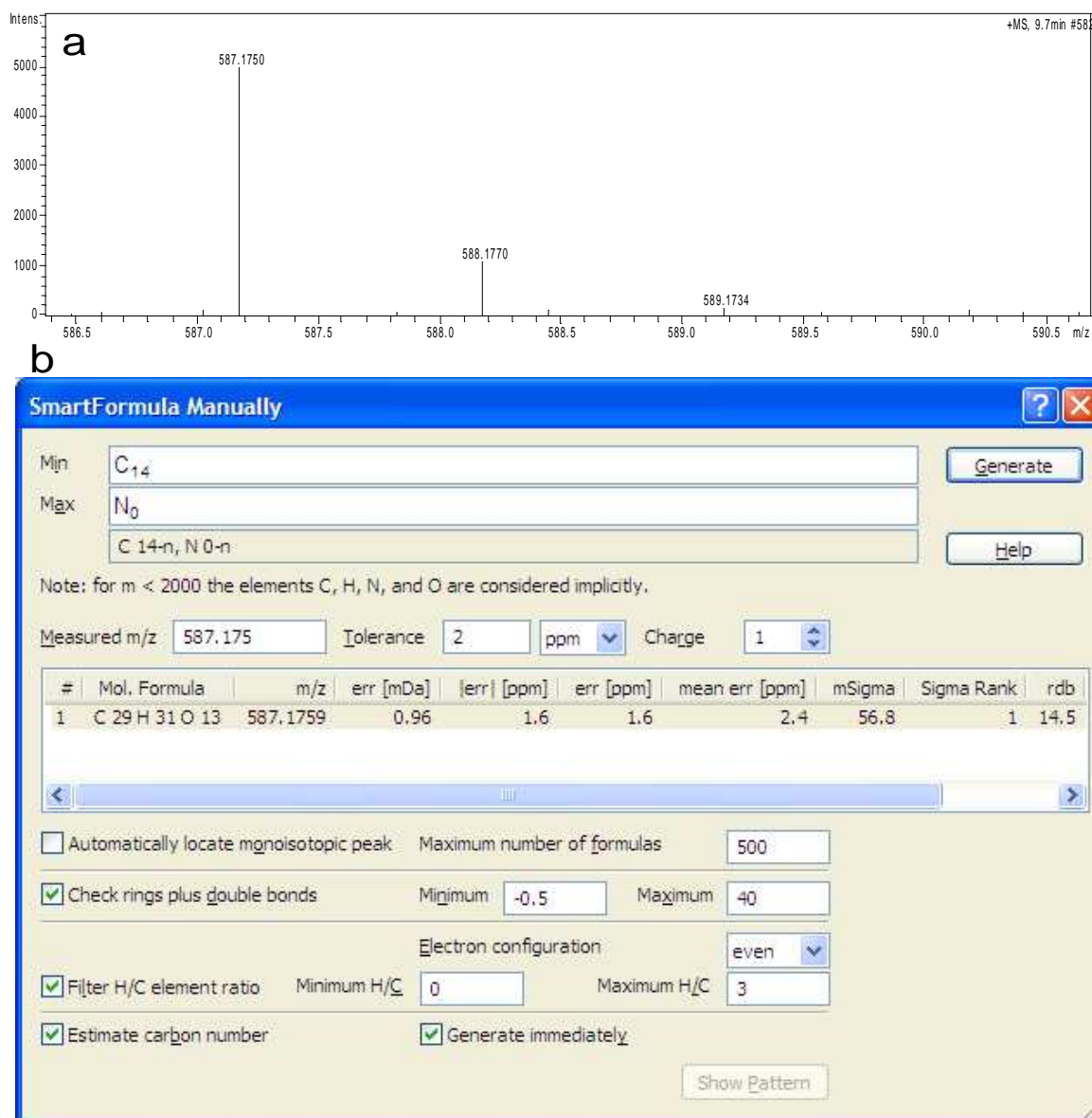
Izomery c i d



Izomer e

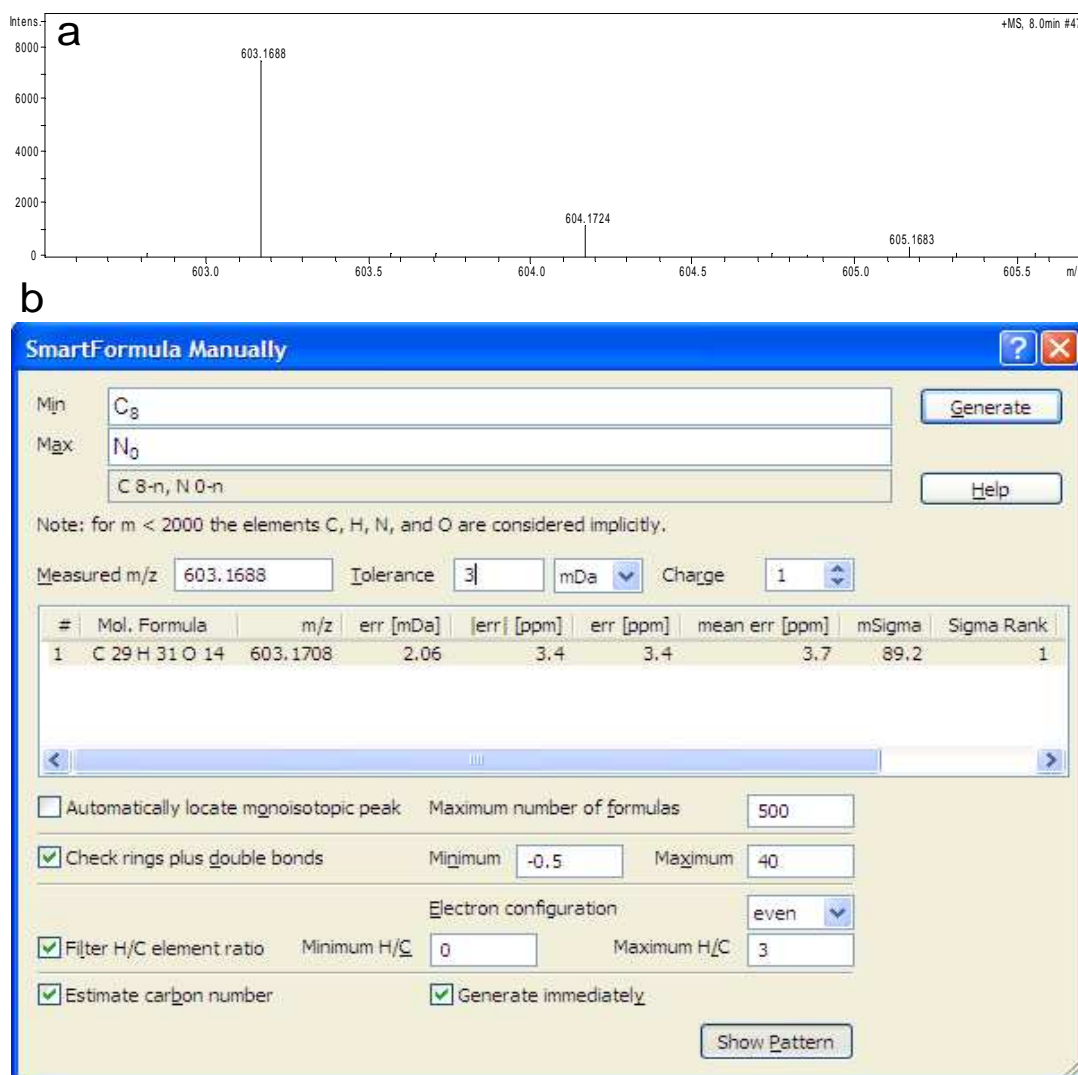
Rys. 5-11 Struktury izomerów malonylowanego glukozydu-ksylozyloglukozydu 3'-O-metyloluteoliny rozróżnionych na podstawie widm MS/MS protonowanych i sodowanych cząsteczek.

W roślinach wzrastających w normalnych warunkach wegetatywnych nie zidentyfikowano połączeń glikozydów prenylowanych izoflawonów wighteonu i luteonu. Natomiast w próbkach z liści zranionych i elisytowanych toksynami wyizolowanymi z grzyba *C. lupini* oraz w odpowiadających im roślinach kontrolnych potraktowanych rozpuszczalnikiem (20% MeOH), zidentyfikowano glikozydy wighteonu oraz luteonu i ich malonylowane pochodne. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem systemu RRLC/MS-QqToF, który jest wyposażony w wysokorozdzielczy analizator mierzący czas przelotu. Na podstawie pomiarów wartości m/z wykonanych z dużą dokładnością (poniżej 5 ppm), wyznaczono wzór elementarny dla wszystkich czterech związków. Do obliczeń wykorzystano program Smart Formula dostarczony przez producenta spektrometru. Zasada działania programu polega na wygenerowaniu możliwych wzorów elementarnych na podstawie wyznaczonej masy z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku. Dodatkowym parametrem brany pod uwagę podczas identyfikacji związku na podstawie składu elementarnego jest algorytm pozwalający na dopasowanie zarejestrowanej na widmie obwiedni izotopowej z obwiednią jonów izotopowych utworzoną *in silico*. Każdy z pierwiastków naturalnie występuje w przyrodzie w postaci izotopów, w przypadku węgla są to izotopy ^{13}C i ^{12}C , których rozpowszechnienie jest równe odpowiednio 1,11% i 98,89%. W wyniku różnicy mas obu izotopów węgla, która wynosi 1 Da, w widmie MS obecne są jony odzwierciedlające zawartość poszczególnych izotopów pierwiastków w przyrodzie. Dla różnych składów elementarnych obserwowany jest charakterystyczny stosunek intensywności sygnałów (jonów) w obwiedni izotopowej, który jest ściśle związany z naturalnym rozpowszechnieniem izotopów poszczególnych pierwiastków. W programie Smart Formula wprowadzono dodatkowy parametr o nazwie Sigma, który uwzględnia dopasowanie również pod względem tej właściwości (Rys. 5-12).



Rys. 5-12 Identyfikacja malonylowanego glukozydu wighteonu na podstawie wysokorozdzielczych pomiarów, wykonanych w trybie jonów dodatnich na układzie LC/MS-QqToF
(a) profil izotopowy jonu $[M+H]^+$ m/z 587,
(b) raport programu Smart Formula z wygenerowanym wzorem elementarnym związku na podstawie zarejestrowanego sygnału dla jonu $[M+H]^+$ m/z 587.

Dla malonylowanego glukozydu wighteonu wyznaczono skład elementarny z dokładnością do 1,6 ppm (Rys. 5-12). Podobnie w przypadku jonów $[M+H]^+$ malonylowanego glukozydu luteonu (M.cz.=602 Da) możliwe było wygenerowanie wzoru sumarycznego, nie zawierających atomu azotu z dokładnością poniżej 5 ppm oznaczanej substancji (Rys 5-13). Pozostałe związki czyli glukozyd luteonu M.cz.=516 Da oraz glukozyd wighteonu M.cz.=500 Da zostały oznaczone z dokładnością odpowiednio do 2,7 oraz 0,3 ppm.



Rys. 5-12 Identyfikacja malonylowanego glukozydu luteonu na podstawie wysokorozdzielczych pomiarów, wykonanych w trybie jonów dodatnich na układzie LC/MS-QqToF
(a) profil izotopowy jonu [M+H]⁺ m/z 603,

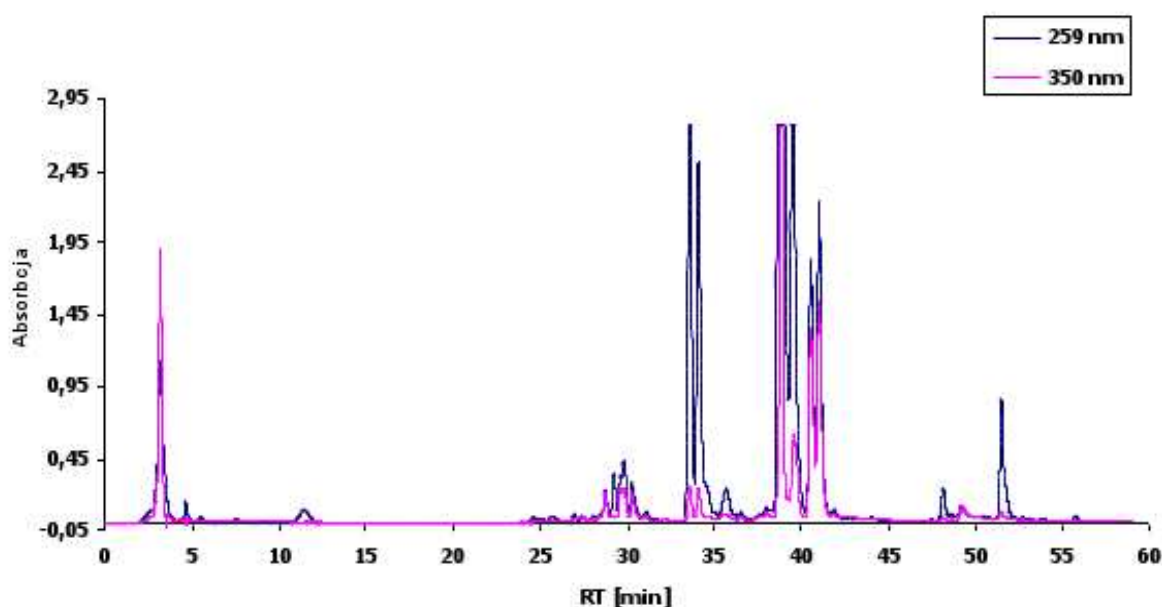
(b) raport programu Smart Formula z wygenerowanym wzorem elementarnym związku na podstawie zarejestrowanego sygnału dla jonu [M+H]⁺ m/z 603.

4.1.4 Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem UV

Na podstawie widm UV zarejestrowanych podczas analiz LC/UV możliwe jest rozróżnienie klasy flawonoidów obecnych w połączeniach cukrowych, nie można natomiast określić jego dokładnej struktury ani sposobu podstawienia cząsteczkami cukru. Podczas rozdzielania złożonej mieszaniny, jaką jest ekstrakt z liści łubinu wąskolistnego występuje problem równoczesnego wymywania różnych związków z kolumny chromatograficznej i nakładania się ich widm absorpcyjnych UV. Powoduje to, że klasyfikacja tych substancji do odpowiedniej grupy flawonoidów jest często niemożliwa oraz w istotny sposób utrudnia analizę ilościową badanej klasy produktów naturalnych.

Dopracowanie właściwego gradientu chromatograficznego zapewniającego optymalny rozdział składników złożonych ekstraktów, jest pierwszym krokiem do udanej identyfikacji związków.

Mieszanki związków fenolowych występujących w liściach są wzbogacone o połączenia glikozydowe flawonów i flawonoli w porównaniu z opisanym wcześniej profilem flawonoidów w korzeniach (Frański i in., 1999a, b; Bednarek i in., 2001, 2003; Kachlicki i in., 2005). Obecność różnych klas flawonoidów stanowi dodatkową trudność w identyfikacji połączeń izoflawonowych jedynie na podstawie chromatogramu UV. Z różnicy intensywności sygnałów przy długościach fal odpowiadających maksimum absorpcji promieniowania UV dla flawonów ($\lambda=350\text{nm}$ oraz $\lambda=260\text{nm}$) i izoflawonów ($\lambda=260\text{nm}$) można określić w pewnych granicach, w którym momencie związki należące do obydwu klas flawonoidów wypływają z kolumny nierozdzielone (Rys. 5-12) (Andersen i Markham, 2006). Poważnym ograniczeniem tej metody jest duże zróżnicowanie stężeń



poszczególnych składników analizowanego ekstraktu roślinnego.

Rys. 5-12 Chromatogram próbki ekstraktu z liścia łubinu wąskolistnego zarejestrowany przy dwóch długościach fal 259 i 350 nm.

Rozdziały próbek ekstraktów przeprowadzano na kolumnach z odwróconą fazą (RP C-18) w gradiencie acetonitrylu w wodzie. W początkowej fazie analizy z kolumny wypływają związki bardziej polarne, między innymi glikozydy flawonoidów. Na tym etapie rozdziału chromatograficznego równoczesne wymywanie związków będących obiektem zainteresowania jest powszechne. Połączenia cukrowe flawonoidów w szeregu

przypadków stanowią izomery położeniowe lub substancje izobaryczne, które nie różnią się od siebie znacząco stopniem polarności lub strukturą przestrzenną, więc ich rozdział na normalnej kolumnie chromatograficznej jest ograniczony. Pod koniec analizy LC przy wysokiej zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej następuje wymywanie mniej polarnych związków (czas retencji powyżej 45 min Rys. 5-12), wolnych aglikonów flawonoidów, których rozdział na pojedyncze składniki jest wyraźny. Podczas analizy zarejestrowanych chromatogramów próbek ekstraktów z liści *L. angustifolius* stwierdzono, że jedynie w przypadku izoflawonów mamy do czynienia z obecnością niepodstawionych aglikonów w próbkach ekstraktu. Identyfikacje wolnych izoflawonów przeprowadzono na podstawie porównania ze standardami – 2'-hydroksygenisteiną, genisteiną, luteonem, wighteonem.

4.2 Analiza ilościowa pochodnych flawonoidów w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego

Problem niekompletnego rozdziału związków ma znaczenie również w analizie ilościowej. Nie jesteśmy w stanie oszacować względnych ilości współwypływających pochodnych izoflawonu i flawonu na podstawie chromatogramów UV. Spektrometr masowy wyposażony w analizator pułapki jonowej również nie jest detektorem umożliwiającym oznaczenia ilościowe ze względu na konstrukcję i zasadę analizowania jonów. Podstawą działania analizatora pułapki jonowej jest akumulacja zjonizowanych cząsteczek. Pojemność pułapki jest ograniczona i łatwo doprowadzić do jej przesylenia oraz utraty czułości. W związku z tym analiza ilościowa składników próbek występujących w dużych ilościach jest często niemożliwa.

W doświadczeniu nr 1 oznaczenia ilościowe prowadzono na podstawie chromatogramów zarejestrowanych przy pomocy systemu LC/UV. W związku z przedstawionymi powyżej ograniczeniami (paragraf 4.1.4), przedmiotem badań ilościowych były jedynie wolne aglikony. Wyniki przedstawiono jako ekwiwalenty standardu: 6-*O*-glukozydu genisteiny, dla którego wykonano krzywą kalibracyjną.

Oznaczenia ilościowe w pozostałych doświadczeniach przeprowadzono na podstawie wyników analiz wykonanych na systemie RRLC/MS-QqToF. Do obliczeń wykorzystano zintegrowane chromatogramy pojedynczych jonów $[M+H]^+$ zarejestrowanych z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku. Analiza ilościowa na podstawie wyników zarejestrowanych sygnałów m/z umożliwiła rozróżnienie

koeluuujących substancji oraz określenie ilości względnych malonylowanych połączeń flawonoidów.

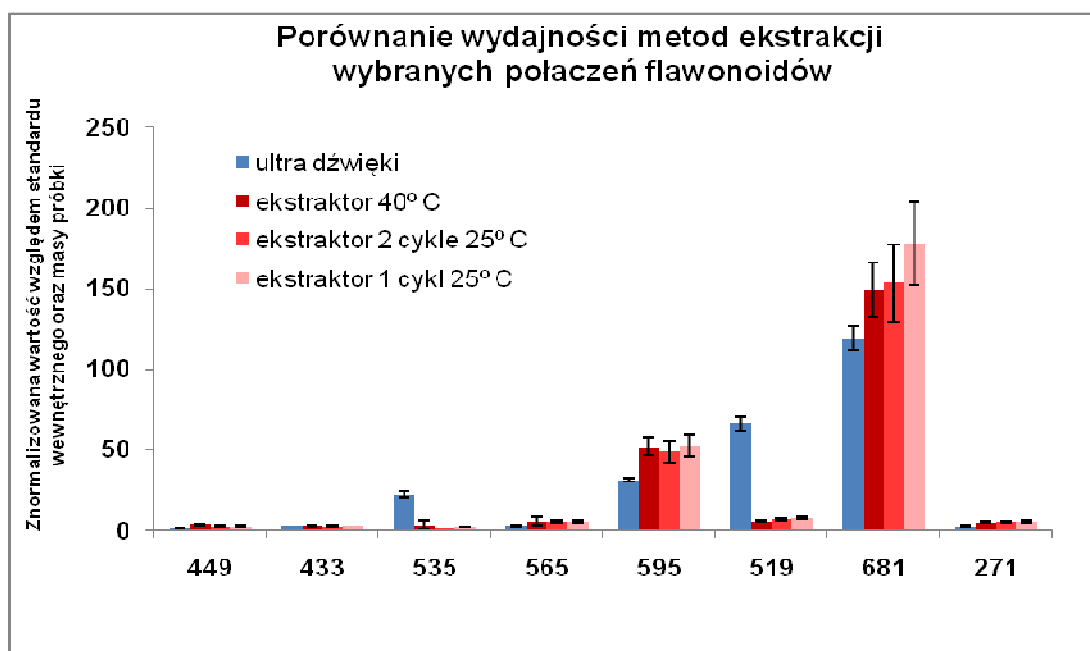
4.3 Opracowanie wydajnej metody ekstrakcji związków fenolowych z liści łubinu wąskolistnego

Celem doświadczenia polegającego na porównaniu wydajności ekstrakcji związków fenolowych z liści łubinu wąskolistnego odmiany Sonet w łaźni ultradźwiękowej oraz w automatycznym ekstraktorze firmy Dionex, działającym pod wysokim ciśnieniem, była optymalizacja warunków izolacji. Analizy zostały wykonane na 100 mg próbkach zamrożonego, zhomogenizowanego materiału roślinnego, do każdej z nich dodano standard wewnętrzny w momencie rozpoczęcia ekstrakcji. Ekstrakcję prowadzono w łaźni ultradźwiękowej jednoetapowo (2ml rozpuszczalnika) w oparciu o procedurę opracowaną przez von Roepenack do ekstrakcji związków fenolowych z liści rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* (von Roepenack i in., 2004). Stosowana metoda izolacji związków fenolowych z liści łubinu wąskolistnego jest wydajna oraz powtarzalna.

W drugiej zastosowanej metodzie ekstrakcji próbowano wykorzystać aparat do ekstrakcji próbek firmy Dionex, w którym jednorazowo można zaprogramować 30 procesów izolacji niezależnych próbek. Porównano powtarzalność ekstrakcji w trzech programach - w pierwszym stosowano temperaturę pokojową oraz jeden cykl ekstrakcji, w drugim stosowano temperaturę pokojową oraz dwa cykle ekstrakcji, w trzecim stosowano temperaturę 40°C oraz jeden cykl ekstrakcji. We wszystkich programach wykorzystywano tą samą ilość rozpuszczalnika (minimalna możliwa do zastosowania objętość 7 ml MeOH 80%).

Otrzymane próbki ekstraktów poddano analizie za pomocą systemu RRLC/MS. Na podstawie integracji chromatogramów pojedynczych jonów, wyznaczono zawartość wybranych glukozydów, glukozydów malonylowanych oraz wolnych aglikonów w analizowanych próbkach. Otrzymane wartości integracji pików chromatograficznych znormalizowano względem powierzchni pików standardu oraz masy próbki. Każdą z analiz wykonano w czterech powtórzeniach technicznych. Wyniki analiz przedstawiono na rysunku 5-13. Znaczne ilościowe różnice w efektywności ekstrakcji zaobserwowano dla malonylowanych glukozydów 2'-hydroksygenisteiny $[M+H]^+$ przy m/z 535 oraz genisteiny $[M+H]^+$ przy m/z 519. W efekcie procesu ekstrakcji wysokociśnieniowej wyizolowano większe ilości ksylozyloglukozydu malonylowanego 3'-O-metyloluteoliny $[M+H]^+$ przy

m/z 681 oraz ksylozyloglukozydu 3'-*O*-metyloluteoliny [M+H]⁺ przy m/z 595 jednakże powtarzalność procesu była mniejsza (większy błąd standardowy). Uzyskane wyniki wskazują na wyraźny wpływ stosowanej metody ekstrakcji na skuteczność izolacji malonylowanych pochodnych flawonoidów. Otrzymane wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi izolacji acyloowanych połączeń glikoflawonoidów.



Rys. 5-13 Porównanie wydajności ekstrakcji z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej i ekstraktora automatycznego. Wydajności ekstrakcji przedstawiono dla następujących związków:

- 449 - glukozyd 2'-hydroksygenisteiny;
 - 433 - glukozyd genisteiny;
 - 535 - glukozyd malonylowany 2'-hydroksygenisteiny;
 - 565 - ksylozyloglukozyd genisteiny;
 - 595 - ksylozyloglukozyd 3'-*O*-metyloluteoliny;
 - 519 - malonylowany glukozyd genisteiny;
 - 681 - ksylozyloglukozyd malonylowany 3'-*O*-metyloluteoliny;
 - 271 – genisteina.
- Kolorami określono metody ekstrakcji.

4.4 Infekcja łubinu wąskolistnego odm. Sonet zarodnikami grzyba *Colletotrihum lupini* (doświadczenie nr 1)

Przeprowadzenie pierwszego doświadczenia miało na celu porównanie dwóch metod infekcji łubinu wąskolistnego odm. Sonet oraz ustalenie warunków przeprowadzania eksperymentów podczas badania wpływu infekcji na zmiany w profilach związków fenolowych w poszczególnych liniach populacji mapującej. W pierwszym

etapie badań infekowano trzytygodniowe sadzonki łąbinu wąskolistnego, z wykształconymi trzema węzłami liści, przez nałożenie zawiesiny zarodników grzyba *C. lupini* na nakłucia listków w rozetach drugiego węzła. W drugim podejściu zastosowano oprysk całych roślin w tym samym stadium rozwoju zawiesiną zarodników *C. lupini*. W obydwu doświadczeniach badano odpowiedź osobno w liściach z kolejnych trzech węzłów, każdy wariant wykonany był w trzech powtórzeniach. Materiał do analizy zbierano w różnych punktach czasowych, dla doświadczenia z nakłuciem listków były to 24, 48, 120 i 168h, a w eksperymencie z opryskiem roślin w pierwszym powtórzeniu analizowano próbki zbierane w czasach 24, 48, 120 i 168h, natomiast w drugim po 4, 8, 24, 48, 120 i 168 oraz 320h. Celem tak ustalonego protokołu było zbadanie jakie zmiany po ataku organizmu patogennego zachodzą w zależności od wieku liścia oraz od odległości od miejsca infekcji oraz określenie momentu uruchomienia odpowiedzi rośliny na infekcję na poziomie syntezy fitoaleksyn. Przeprowadzone badania miały wykazać czy zaobserwujemy indukcję syntezy fitoaleksyn klasy izoflawonów w liściach rosnących na węzłach wyższym i niższym (starszych i młodszych liściach) od infekowanego, która mogłaby świadczyć o wystąpieniu systemowej odpowiedzi nabytej (SAR) na poziomie metabolitów wtórnych.

Względne ilości wolnych aglikonów izoflawonów – 2'-hydroksygenisteiny, genisteiny, luteonu i wighteonu w próbkach infekowanych i kontrolnych wyznaczano na podstawie integracji chromatogramów UV rejestrowanych przy długości fali $\lambda = 259\text{nm}$. Ilości poszczególnych związków normalizowano dzieląc zintegrowaną powierzchnię pików oznaczanych substancji przez powierzchnię pików standardu wewnętrznego (luteolina), dodawanego do próbek liści w momencie rozpoczęcia ekstrakcji. Stężenie badanych substancji określono w ekwiwalentach 7-O-glukozydu genisteiny na podstawie krzywej kalibracyjnej, wykonanej równoległe z analizami próbek materiałów badanych. Następnie przeliczano ilość związku na 1 gram świeżej masy materiału roślinnego.

Oznaczenie ilościowe połączeń glikozydowych flawonoidów i izoflawonów na podstawie chromatogramu UV było niemożliwe ze względu na ich koelucję, co utrudniało rozróżnienie poszczególnych związków pod pikami rejestrowanymi za pomocą detektora UV. Jedynie na podstawie zmian w wielkości absorpcji promieniowania przy długościach fali $\lambda_1 = 259\text{nm}$ oraz $\lambda_2 = 350\text{nm}$ charakterystycznych dla flawonów (λ_1 i λ_2) oraz izoflawonów (λ_1) możliwe było oszacowanie ilości badanych związków w ekstraktach z materiału roślinnego zbieranego w różnych czasach od momentu infekcji. W badanych próbkach zaobserwowano, że liście najmłodsze, z górnego piętra rośliny (nr 3) zawierają

względnie więcej izoflawonów w stosunku do flawonów niż liście z niższych pięter (nr 1 i 2), natomiast ogólny poziom związków fenolowych jest niższy niż w liściach starszych (piętro nr 1 i 2). Podczas 10 dni prowadzenia doświadczenia stwierdzono, że profil związków fenolowych w liściach z trzeciego węzła zmienił się zarówno pod względem ilościowym i jakościowym. Zaobserwowano intensywny wzrost syntezy flawonów oraz ich glikozylowanych i malonylowanych form. Istotną obserwacją jest również fakt, że w przypadku starszych liści (piętro nr 1 i 2) wraz z wiekiem liścia w trakcie trwania doświadczenia stosunek izoflawonów do flawonów zwiększył się.

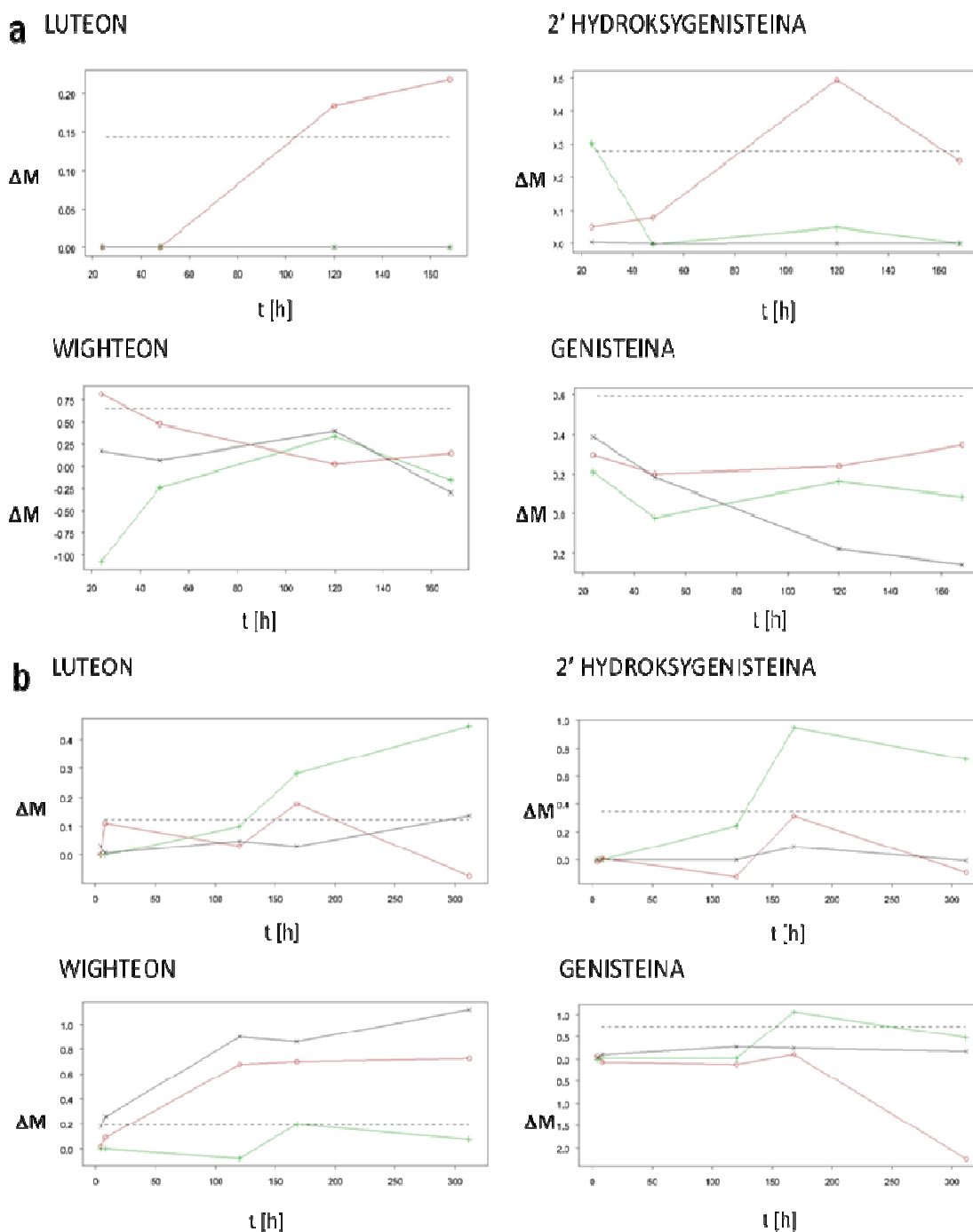
Analiza statystyczna wyników w doświadczeniu 1 przeprowadzono na podstawie różnic w ilości wolnych aglikonów izoflawonów w liściach z poszczególnych poziomów roślin infekowanych i kontrolnych. Obliczono średnie wartości różnic dla wszystkich punktów czasowych oraz określono błąd standardowy dla każdej z nich za pomocą dwukierunkowej analizy wariancji (nr liścia x czas zbioru). Istotność różnic została wyznaczona przez porównanie z trzykrotnym średnim błędem standardowym.

W doświadczeniu z nakłuciem liścia z drugiego węzła zmiany nekrotyczne na zranionych liściach zaobserwowano po 7 dniach od infekcji. Wzrost stężenia prenylowanych izoflawonów – luteonu i wighteonu oraz 2'-hydroksygenisteiny w materiale roślinnym zaobserwowano znacznie wcześniej niż chorobowe zmiany morfologiczne. Odpowiedź roślin na infekcję na poziomie syntezy izoflawonów zaobserwowano jedynie w ekstrakcie z porażonego liścia, nie stwierdzono natomiast zwiększenia poziomu syntezy izoflawonów w liściach z węzłów niższego i wyższego (1 i 3) (Rys. 5-14A). Wzrost ilości 2'-hydroksygenisteiny oraz luteonu zarejestrowano w ekstraktach uzyskanych po 120 i 168 godzinach po infekcji. Poziom stężenia 2'-hydroksygenisteiny po osiągnięciu najwyższego poziomu w 120 h po infekcji zaczął obniżać się a luteonu zwiększał się do momentu zakończenia doświadczenia po 168 h. Profil zmian ilościowych 2'-hydroksygenisteiny i luteonu w czasie trwania doświadczenia może sugerować, że pierwszy wymieniony związek (2'-hydroksygenisteina) jest prekursorem swojej prenylowanej pochodnej (luteonu). Zmiany w stężeniach dwóch innych izoflawonów obecnych w liściach, czyli genisteiny i wighteonu nie były statystycznie istotne (Rys. 5-14 A).

W eksperymencie, w którym rośliny opryskano zawiesiną zarodników typowe symptomy antraknozy (Nirenberg i in., 2002) zaobserwowano 7 dni od momentu zainfekowania. Zwijanie się liści oraz załamywanie łodygi miały miejsce na najmłodszych liściach w najwyższej części rośliny (liście z węzła nr 3). Znaczący wzrost ilości 2'-

hydroksygenisteiny oraz prenylowanych izoflawonów (luteonu i wighteonu) zaobserwowano w liściach z węzłów 1, 2 oraz 3. Natomiast zmiany w stężeniu genisteiny nie były statystycznie znaczące (rys. 5-14B). Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że sposób odpowiedzi na atak patogenu zależy od wieku liści. Wzmoczona synteza aglikonów izoflawonów luteonu i 2'-hydroksygenisteiny została zaobserwowana w najmłodszych liściach po 120 h od momentu infekcji, w obydwu powtórzeniach eksperymentu z opryskiem roślin zarodnikami *C. lupini*. Ilość tych związków pozostawała wysoka w chorych roślinach przez 7 kolejnych dni (312 h). Z kolei w liściach z pierwszego i drugiego węzła znacząco wzrósł poziom wighteonu, podczas gdy stężenie pozostałych aglikonów nie zmieniło się.

Porównanie profili związków fenolowych uzyskanych dla liści roślin zebranych w obydwóch doświadczeniach, gdzie liście były infekowane przez nałożenie zawiesiny zarodników grzyba *C. lupini* na nakłucie oraz przez oprysk zawiesiną zarodników, wskazuje na różnice ilościowe i jakościowe w poziomach wolnych aglikonów izoflawonów syntezowanych w liściach. Zaobserwowane różnice były zależne w pierwszym rzędzie od zastosowanej metody infekcji, a także od wieku liści w roślinach. Szczególnie wysokie różnice zaobserwowano w syntezie prenylowanych pochodnych genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny: luteonu i wighteonu. Istotnym jest fakt, że oprysk rośliny spowodował dwukrotnie większy wzrost syntezy prenylowanych izoflawonów niż inokulacja zranionego liścia.



Rys. 5-14 Wykresy zmian stężeń wolnych aglikonów w czasie po infekcji w liściach z kolejnych węzłów w eksperymencie ze zranieniem liścia (a) oraz z opryskiem roślin(b).

Liść nr 1 —

Liść nr 2 —

Liść nr 3e —

Poziom ufności - - -

ΔM - różnice w ilości produktów naturalnych w ekstraktach z liści z roślin infekowanych i kontrolnych

4.5 Infekcja linii populacji mapującej łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) zarodnikami grzyba *C. lupini* (doświadczenie nr 2).

Po wstępnych doświadczeniach na sadzonkach odmiany hodowlanej Sonet (doświadczenie nr 1) określono warunki przeprowadzania eksperymentu na populacji mapującej łubinu wąskolistnego (doświadczenie nr 2). Infekcję roślin prowadzono przez oprysk części zielonych zawiesiną zarodników *C. lupini* ponieważ na podstawie wyników z doświadczenia metodycznego (nr 1) uznano ten sposób zakażenia roślin jako bardziej efektywny. Określono również czas zbioru materiału na 168h po infekcji, ponieważ w tym czasie możliwe było zaobserwowanie objawów morfologicznych antraknozy na sadzonkach traktowanych grzybem patogennym, a jednocześnie w tym czasie obserwowano wysoką akumulację prenylowanych izoflawonów. Podczas badań nad populacją mapującą łubinu wąskolistnego wykonano analizy pod kątem zawartości związków fenolowych w liściach infekowanych i kontrolnych roślin łubinu.

Wysiano nasiona 89 linii populacji mapującej, z których wykiełkowały sadzonki 58 linii w ilościach roślin zapewniających zbiór materiału w 3 powtórzeniach, co umożliwiło przeprowadzenie wiarygodnej statystycznie analizy ilościowej na podstawie zarejestrowanych metodą LC/MS profili związków fenolowych. Dla pozostałych linii liczba skiełkowanych roślin była mniejsza i liczba powtórzeń prób kontrolnych lub infekowanych została ograniczona do dwóch lub jednej. Przeprowadzono ocenę zmian morfologicznych infekowanych roślin 168 godzin po infekcji, dla 29 linii nie zaobserwowano objawów antraknozy. Analizę składu ekstraktów przeprowadzono wykorzystując system RRLC/UV/MS. Obliczenia ilościowe przeprowadzono na podstawie integracji chromatogramów pojedynczych jonów protonowanych cząsteczek zidentyfikowanych wcześniej połączeń cukrowych malonylowanych flawonów oraz izoflawonów oraz wolnych aglikonów. Do przeprowadzenia analizy statystycznej wybrano jony 16 związków – będących pochodnymi malonylowanych glikozydów flawonów i izoflawonów oraz wolnych aglikonów: luteonu i wighteonu, które występowały we wszystkich analizowanych próbkach roślin traktowanych grzybem i kontrolnych.

W pierwszym etapie analizy statystycznej testowano różnice pomiędzy wartościami średnimi ilości związków fenolowych w roślinach infekowanych a średnimi w roślinach kontrolnych dla każdej linii, aby wyznaczyć wpływ infekcji na poziom poszczególnych substancji w badanych liniach. Obliczenia przeprowadzono na wartościach znormalizowanych, względem standardu wewnętrznego – luteoliny oraz masy próbki.

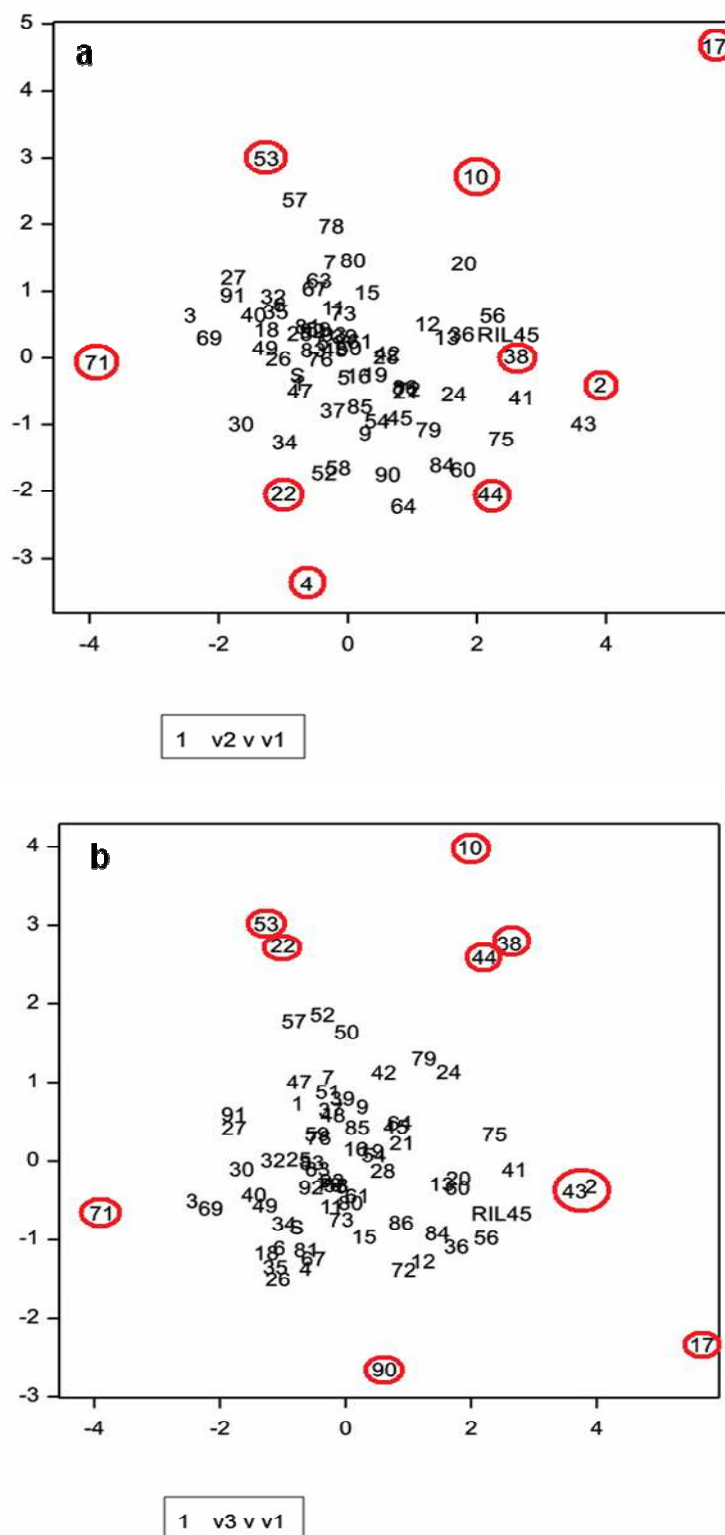
Ilości pochodnych flawonoidów określono w roślinach kontrolnych i infekowanych. Na podstawie analizy statystycznej wyników wykazano, że istotne statystycznie różnice wyznaczone na podstawie testu F-Snedecora znaleziono dla 8 związków wymienionych w tabeli 5-3. W kolejnym etapie analizy wyników porównano poszczególne linie pod względem zmiany poziomu flawonoidów związanej z przebiegiem infekcji. Przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA) na danych odpowiadających różnicom poziomów ośmiu pochodnych flawonoidów w roślinach infekowanych oraz kontrolnych dla każdej z 58 badanych linii. Pierwsze trzy składowe główne V1, V2 i V3, które wytyczają kierunki największego zróżnicowania linii pod względem reakcji na atak patogenu, reprezentują 80% wariancji, dlatego do tych wymiarów ograniczono interpretację wyników. Udział poszczególnych związków w różnicowaniu linii przez dany komponent, oceniony poprzez współczynnik korelacji pomiędzy danymi oryginalnymi a składowymi głównymi, przedstawiony został w tabeli 5-3. Na komponenty pierwszy, drugi i trzeci (V1, V2 oraz V3) mają w różnym stopniu wpływ pochodne flawonów oraz izoflawonów. Położenie linii w układzie składowych głównych V1, V2 i V3 przedstawiono na rysunku 5-15.

Tab.5-3 Współczynniki korelacji pod względem ośmiu pochodnych flawonoidów pomiędzy danymi oryginalnymi a składowymi głównymi w analizie różnic pomiędzy roślinami infekowanymi a kontrolnymi dla badanych linii.

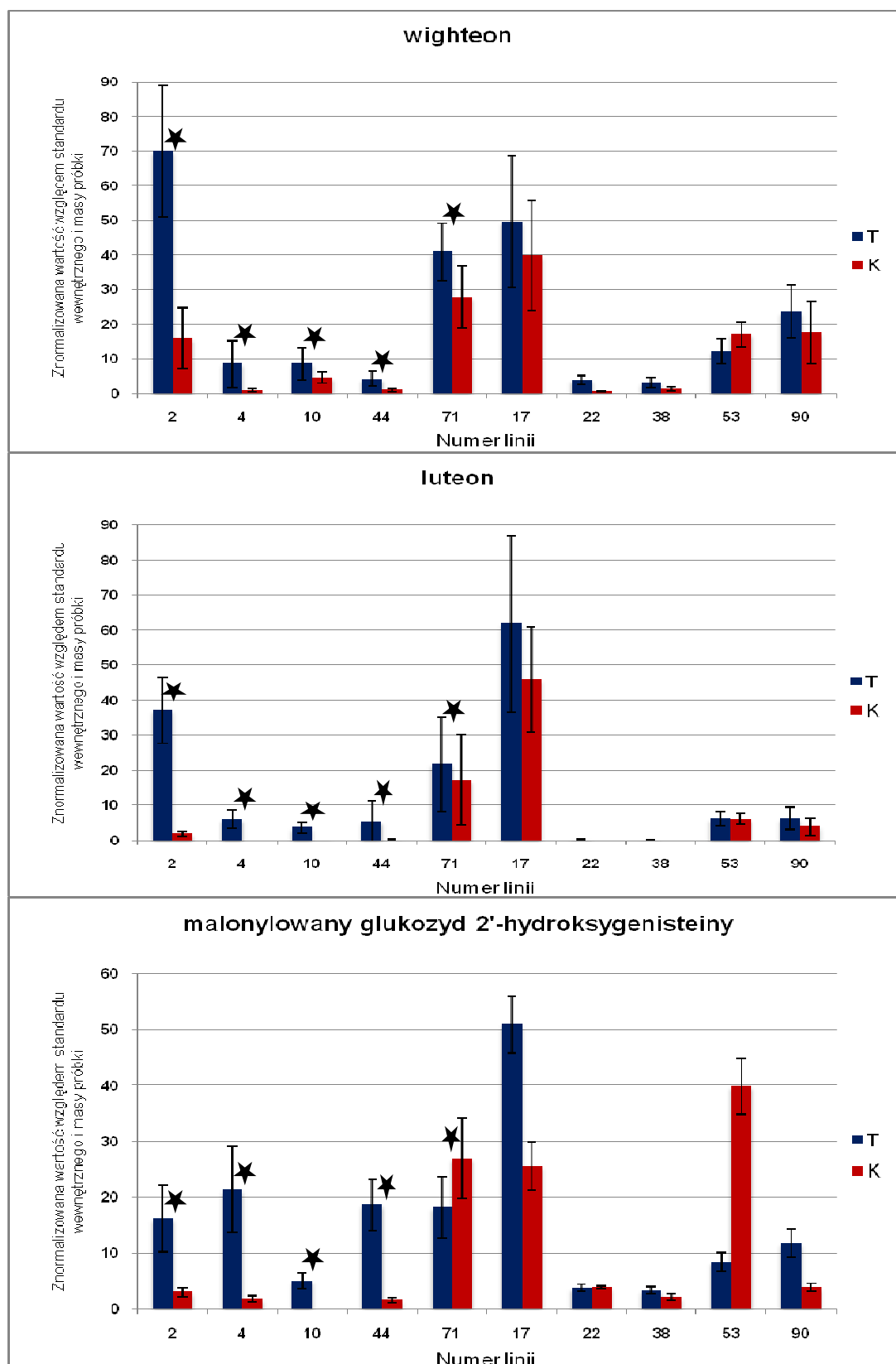
Nazwa związku	Współczynnik korelacji pomiędzy danymi oryginalnymi a składowymi głównymi		
	V1	V2	V3
4',7-di- <i>O</i> -Glukozyd malonylowany genisteiny	0.81	0.423	0.018
7- <i>O</i> -Ramnozyloglukozyd kwercetyny	0.396	0.609	-0.401
4',7-di- <i>O</i> -Glukozyd dimalonylowany genisteiny	0.586	0.225	0.553
Glukozyd-ksylozyloglukozyd dimalonylowany 3'- <i>O</i> -metyloluteoliny	0.041	0.444	0.626
7- <i>O</i> -Glukozyd malonylowany 2'-hydroksygenisteiny	0.602	-0.566	0.014
7- <i>O</i> -ksylozyloglukozyd genisteiny	0.419	-0.227	-0.499
7- <i>O</i> -Glukozyd malonylowany genisteiny	0.802	-0.306	-0.068
Wighteon	0.092	-0.545	0.537

W przypadku luteonu zaobserwowane zmiany w sadzonkach kontrolnych i traktowanych badanych linii były jakościowe, ten izoflawon był obserwowany jedynie w infekowanych roślinach. W 80% linii luteon nie był obecny w kontrolach, fakt ten wyeliminował ten związek z analizy statystycznej. Korelacja danych z obserwacji fenotypowych symptomów choroby z danymi z analizy ilościowej związków fenolowych wskazały na większą zawartość prenylowanych izoflawonów luteonu i wighteonu oraz malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny w próbkach kontrolnych roślin, w których nie zaobserwowano objawów choroby niż w próbkach kontrolnych linii z widocznymi oznakami antraknozy (rys. 5-16).

Dla najbardziej odległych od zgrupowanych w środku linii - 2, 4, 10, 44, 71, 17, 22, 38, 53, 90 (oznaczone czerwonym kółkiem na rys. 5-15 a i b) z populacji mapującej pod względem wszystkich trzech składowych głównych, przeprowadzono dogłębną analizę izoflawonów oraz ich pochodnych glikozylowanych i malonylowanych (Rys. 5-16).



Rys. 5-15 Wyniki analizy składowych głównych przedstawiające zależność różnic w stężeniu związków fenolowych w roślinach infekowanych i kontrolnych dla kolejnych linii populacji mapującej. Wykresy przedstawiają zależności: (a) składowa 2 vs składowa 1 (V2 v V1); (b) składowa 3 vs składowa 1 (V3 v V1). Liczby oznaczają numery linii populacji, zakreślone na czerwono to linie najbardziej odrębne od pozostałych.



Rys. 5-16 Różnica w ilości względnej luteonu, wighteonu i glukozydu malonylowanego 2'-hydroksygenisteiny w roślinach kontrolnych i infekowanych wybranych linii populacji mapującej. Nazwy próbek odpowiadają T- infekowane, K- kontrolne, liczba reprezentuje linię. Dla linii oznaczonych ★ zaobserwowano objawy antraknozy.

4.6 Elisytacji sadzonek łubinu wąskolistnego zawieszoną metabolitów wyizolowanych z komórek grzyba *Colletotrichum lupini* (doświadczenie nr 3)

Doświadczenie przeprowadzono na dwutygodniowych sadzonkach łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) odmiany Sonet. Po tym okresie rozwoju rośliny wykształciły dwa piętra liści (węzeł nr 1 i nr 2). Dwa listki z obydwóch rozet z pierwszego (najniższego) węzła rośliny nakłuwano igłą i nakładano roztwór metabolitów wyizolowanych z medium hodowlanego grzyba *C. lupini*, o stężeniu 1mg/ml. Frakcję zawierającą toksyny uzyskano po rozdzieleniu substancji znajdujących się w medium metodami chromatografii kolumnowej (izolację przeprowadzono wg procedury opisanej w punkcie 4.9). Listki roślin kontrolnych traktowano w podobny sposób jednakże na zranione miejsca nałożono sam rozpuszczalnik. Materiał do analizy zbierano osobno z liści z kolejnych pięter roślin kontrolnych i elisytowanych:

- liście zranione z I piętra roślin elisytowanych - TD,
- liście bez nakłucia z II piętra roślin elisytowanych – TG,
- liście zranione z I piętra roślin kontrolnych – KD,
- liście bez nakłucia z II piętra roślin kontrolnych – KG.

Wykonano po trzy powtórzenia biologiczne dla każdego wariantu. Materiał biologiczny zbierano po 3, 6, 9, 24, 48, 72 oraz 168 h od momentu elisytacji. Celem tak zaprojektowanego eksperymentu sprawdzenie czy istnieje różnica w akumulacji związków fenolowych na różnych poziomach liści w wyniku traktowania ich roztworem toksyn grzybowych oraz czy elisytacji wywołuje systemową odporność nabytą (SAR).

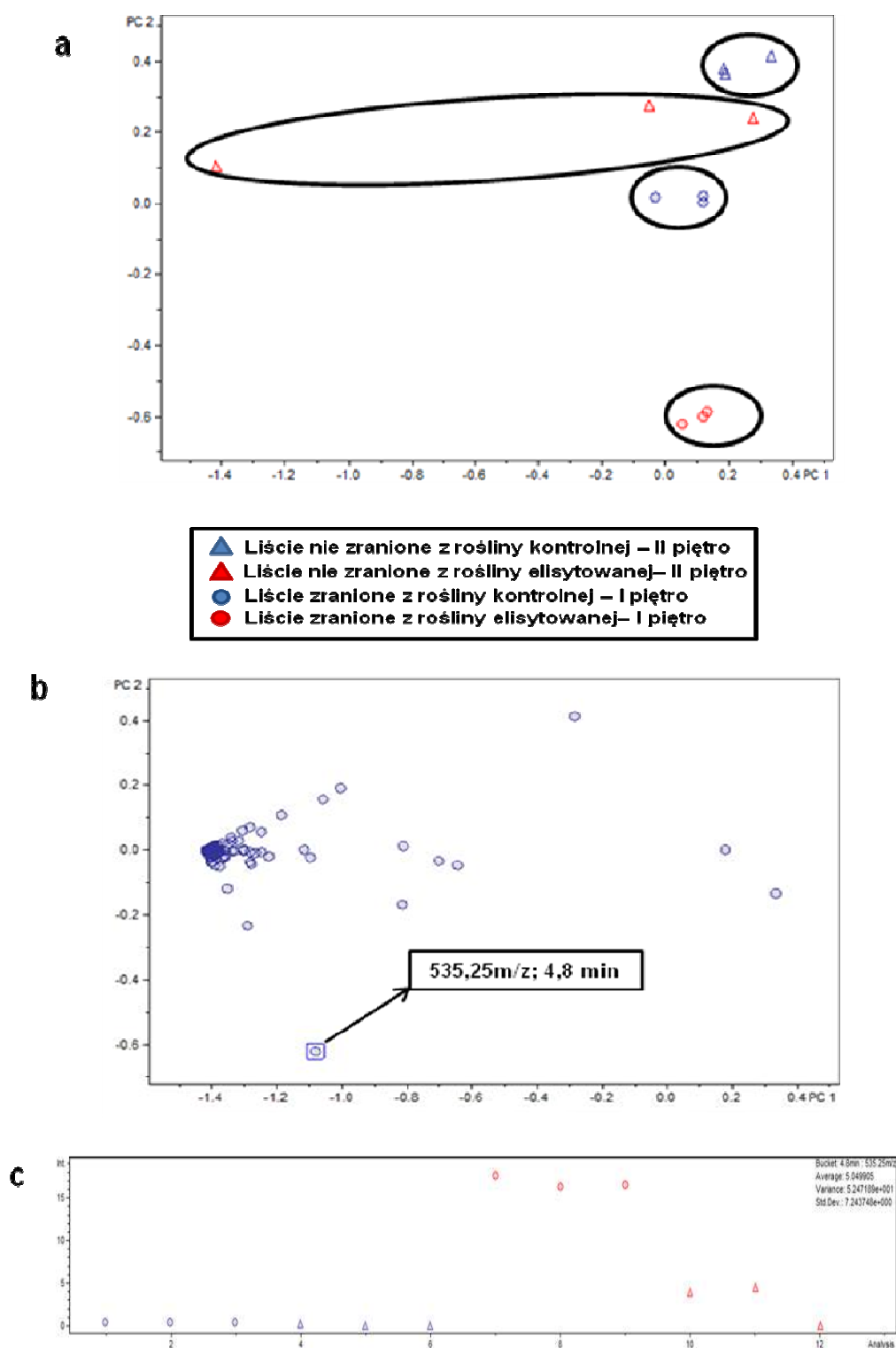
Ekstrakcję związków fenolowych przeprowadzono wg procedury opisanej w punkcie 4.4.1. Próbkę analizowano z wykorzystaniem układu RRLC/UV/MS, który pracował w trybie jonów dodatnich. Następnie dane analizowano pod względem zmian ilościowych wykorzystując program Profile Analysis 1.1 dostarczony przez producenta systemu LC/MS. Obliczenia prowadzone metodą analizy składowych głównych (PCA) wykonano na podstawie intensywności sygnałów odpowiadających jonom $[M+H]^+$ zapisanym przy określonych wartościach m/z , zarejestrowanych podczas analizy próbek ekstraktów na systemie RRLC/MS-QqToF. Zakres wykonanych obliczeń został zawężony do jonów rejestrowanych dla związków fenolowych, zidentyfikowanych w ekstraktach z liści *L. angustifolius* podczas wcześniejszych badań. Dane normalizowane były automatycznie względem standardu wewnętrznego, jakim była luteolina. Warunkiem zastosowania takiego algorytmu było powtarzalne wykonanie serii analiz.

. W wyniku analizy składowych głównych (PCA) próbek z roślin kontrolnych i traktowanych zbieranych po 3, 6 i 9 h po elisytacji nie zaobserwowano klasyfikacji grup odpowiednich wariantów próbek świadczącej o istotnym wpływie elisytacji na poziom stężeń poszczególnych flawonoidów. Istotne zróżnicowanie próbek zaobserwowano po 24 oraz 48 h od momentu nałożenia elisytora. Związkiem najmocniej różnicującym badany materiał kontrolny i traktowany roztworem toksyn wyizolowanych z grzyba *C. lupini*, był malonylowany glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (Rys. 5-17).

Na podstawie analizy składowych głównych wykonanych dla próbek z liści zebranych w 48 godzin od elisytacji możemy wyodrębnić cztery grupy próbek rozdzielonych według składowej głównej nr 2. (5-17 a). Obserwowany podział kolejnych próbek zbieranych w 48 godzinie po elisytacji odpowiada grupom próbek zebranych z obydwu pięter w roślinach poddanych działaniu roztworu toksyn grzybowych oraz kontrolnych. Wydzielone w wyniku PCA grupy odpowiadają ściśle:

- (1) liściom z piętra nr 1 roślin elisytowanych
- (2) liściom z piętra nr 1 roślin kontrolnych
- (3) liściom z piętra nr 2 roślin elisytowanych
- (4) liściom z piętra nr 2 roślin kontrolnych

Związek, którego jon $[M+H]^+$ ma najistotniejszy wpływ na rozdział próbek względem składowej głównej nr 2 został zarejestrowany przy m/z 535 ($[M+H]^+$ odpowiadający malonylowanemu glukozydowi 2'-hydroksygenisteiny) wypływającego z kolumny w czasie 4,8 minuty (Rys. 5-17 b). Identyfikacja związku została przeprowadzona wcześniej na podstawie zarejestrowanych widm masowych zarówno podczas eksperymentów CID MS/MS jak i widma wysokorozdzielczego. Z kolei na rysunku 5-17 c przedstawione są zmiany ilościowe malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny w próbkach z liści pierwszego i drugiego piętra zarówno w roślinach kontrolnych i elisytowanych. Na wykresie obrazującym intensywność tego jonu w kolejnych próbkach obserwowany jest wzrost intensywności jonu przy m/z 535 w ekstraktach z liści zranionych (1 węzeł) oraz niezranionych (2 węzeł) roślin poddanych elisytacji.

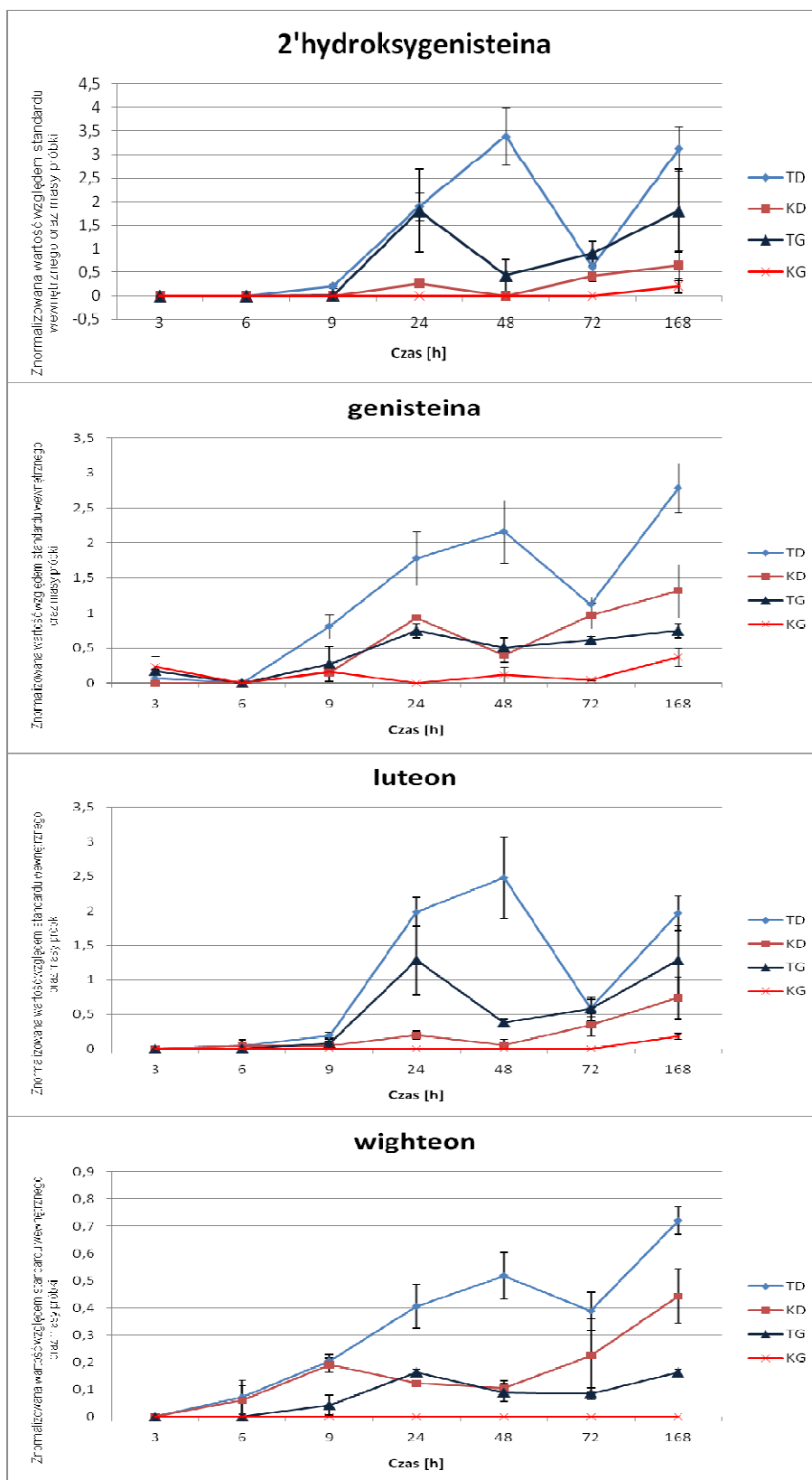


Rys. 5-17 Graficzne przedstawienie analizy składowych głównych (PCA) wyników analiz LC/MS zarejestrowanych dla próbek ekstraktów z liści łubinu (*L. angustifolius*) zebranych po 48 godzinach od momentu elisytacji.

- próbki rozdzielone względem składowych głównych PC 1 i PC 2
- udział poszczególnych jonów $[M+H]^+$ o określonych wartościach m/z rejestrowanych w zdefiniowanych czasach retencji w komponentach 1 i 2
- obraz zmian ilościowych malonyłowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny, $[M+H]^+$ przy m/z 535 w próbkach z liści łubinu wąskolistnego zebranych 48 godzin od momentu elisytacji.

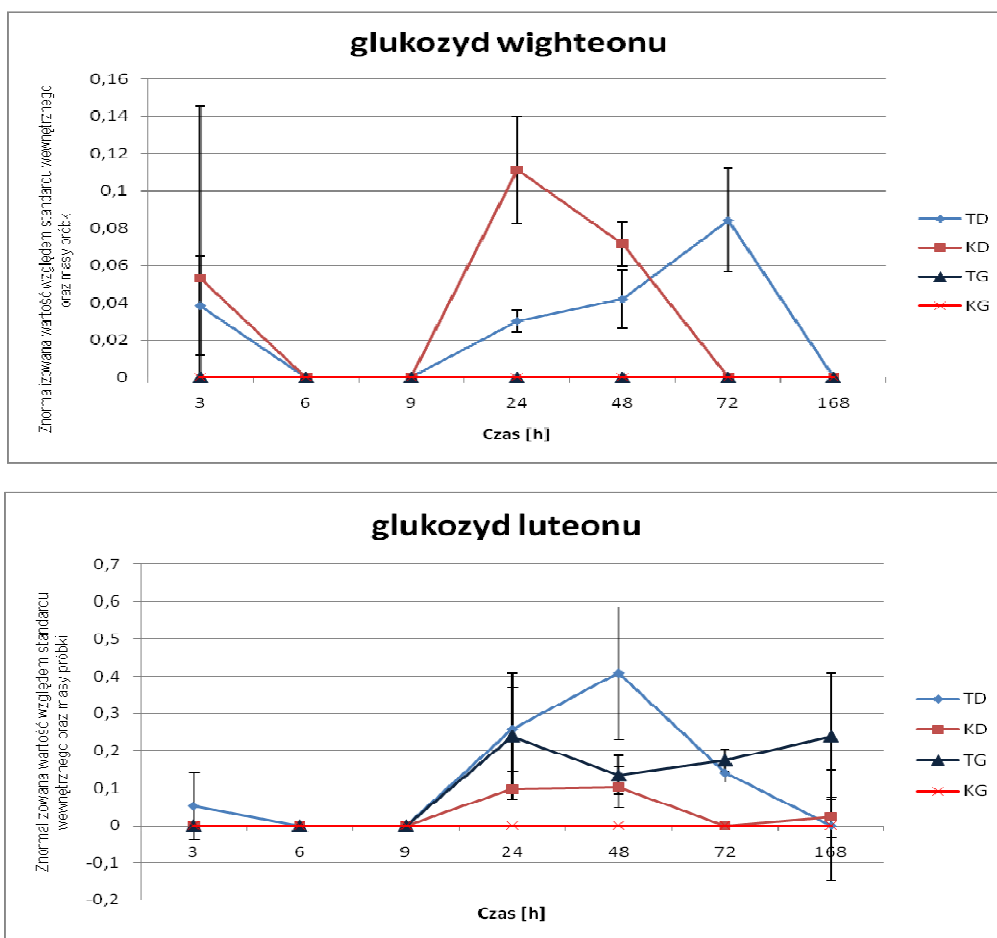
W wynikach uzyskanych po przeprowadzeniu PCA nie zaobserwowano istotnego wpływu sygnałów rejestrowanych od wolnych aglikonów genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny, luteonu i wighteonu (jonów $[M+H]^+$) na grupowanie próbek względem poszczególnych składowych głównych (PC1 i PC2). Dynamika zmian poziomu stężeń tych związków jest szczególnie interesująca ze względu na ich właściwości antybiotyczne w stosunku do grzyba *C. lupini* oraz rolę fitoaleksyn jaką pełnią w roślinach tego gatunku. Przeprowadzono zatem analizę ilościową wolnych aglikonów izoflawonów, w której wykorzystano zintegrowane chromatogramy pojedynczych jonów $[M+H]^+$ zarejestrowanych dla wolnej genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny, luteonu i wighteonu podczas analiz próbek ekstraktów z roślin kontrolnych i elisytowanych (Rys. 5-18). Wartości integracji zostały znormalizowane wobec standardu wewnętrznego i masy materiału roślinnego wykorzystanego do ekstrakcji. Dla każdego wariantu obliczono średnie z trzech powtórzeń biologicznych, na jedno powtórzenie zbierano materiał z trzech roślin.

Dynamikę zmian ilości względnych wolnych aglikonów w sadzonkach elisytowanych i kontrolnych przedstawiono na rysunku 5-18. W czasie od 6 do 9 godziny zaobserwowano wzrost stężeń wszystkich badanych wolnych aglikonów, jednakże największe zmiany ilościowe zaszły w przypadku genisteiny w próbkach uzyskanych z liści (zranionych) znajdujących się na pierwszym piętrze roślin traktowanych, gdzie miała miejsce elisytaacja roztworem toksyn. W tym samym przedziale czasu zarejestrowano również wzrost syntezy wighteonu w liściach (zranionych) z pierwszego piętra roślin kontrolnych i elisytowanych, co może wskazywać na syntezę tego związku w odpowiedzi na naruszenie struktury listków (zranienie). Akumulację wszystkich czterech analizowanych związków zaobserwowano zarówno w liściach z pierwszego jak i drugiego piętra roślin elisytowanych. Maksymalny wzrost syntezy zaobserwowano 24 i 48 h po elisytacji. Po 72 h zarejestrowano spadek ilości wolnych aglikonów w liściach z pierwszego piętra roślin elisytowanych, natomiast stały wzrost obserwowano w liściach z drugiego piętra roślin elisytowanych. W kolejnych czasach od elisytacji obserwowano dalszy wzrost ilości wolnych aglikonów w liściach z wszystkich pięter sadzonek jednakże tempo syntezy w roślinach kontrolnych była znacznie słabsza niż w przypadku roślin elisytowanych.



Rys. 5-18 Zmiany poziomu stężeń wolnych aglikonów izoflawonów w próbkach materiału z roślin kontrolnych i elisytowanych.

Oznaczenia próbek: TD-liście z I piętra poddane działaniu elisytora, KD-liście z I piętra traktowane rozpuszczalnikiem, TG-liście z II piętra roślin poddanych elisytacji, KG-liście z II piętra roślin kontrolnych.



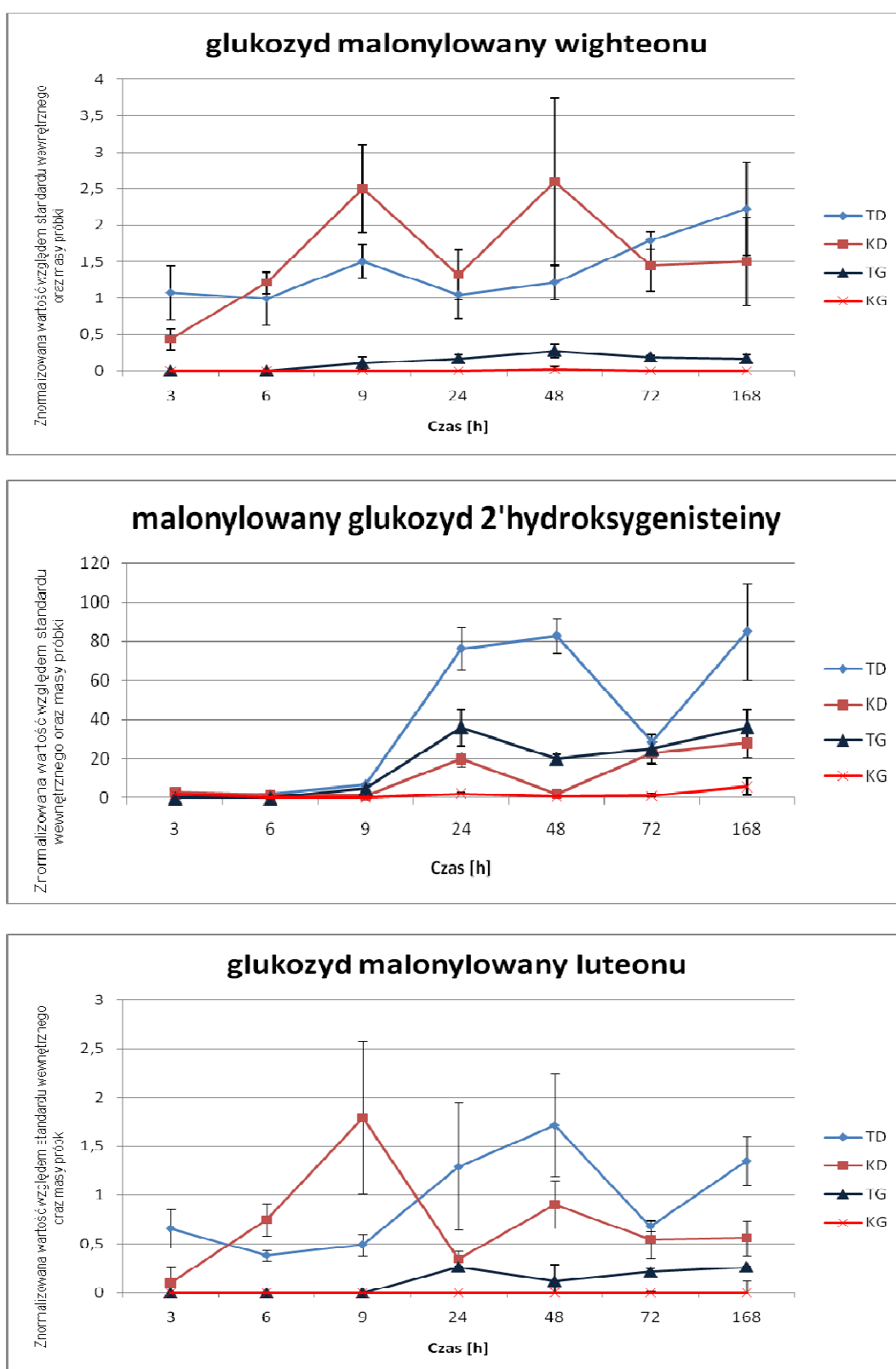
Rys. 5-19 Zmiany poziomu stężeń glukozydów prenylowanych izoflawonów w próbkach materiału z roślin kontrolnych i elisytowanych.

Oznaczenia próbek: TD-liście z I piętra poddane działaniu elisytoru, KD-liście z I piętra traktowane rozpuszczalnikiem, TG-liście z II piętra roślin poddanych elisytacji, KG-liście z II piętra roślin kontrolnych.

Podczas opracowania wyników analiz LC/MS zarejestrowanych dla próbek z liści roślin elisytowanych zidentyfikowano po raz pierwszy w tkance łubinowej glikozylowane i malonylowane pochodne prenylowanych izoflawonów, które scharakteryzowano jako: glukozyd luteonu (M.cz.=516 Da), malonylowany glukozyd luteonu (M.cz.=602 Da), glukozyd wighteonu (M.cz.=500 Da) oraz malonylowany glukozyd wighteonu (M.cz.=586 Da). Obecność wymienionych związków stwierdzono w ekstraktach liści z pierwszego piętra poddanych działaniu toksyn izolowanych z grzyba *C. lupini* oraz w ekstraktach uzyskanych z liści roślin kontrolnych, traktowanych jedynie rozpuszczalnikiem (20% MeOH). Połączenia cukrowe prenylowanych izoflawonów i ich malonylowane pochodne występują w stężeniach o dwa rzędy wielkości mniejszych niż np. malonylowany glukozyd 2'hydroksygenisteiny, dlatego sygnały od tych związków nie miały znaczącego wpływu na rozdział próbek w analizie PCA wykonanej dla rejestrowanych sygnałów MS związków

fenolowych. Pochodne związków fenolowych w liściach łubinu wąskolistnego występują w bardzo zróżnicowanych stężeniach, ich ilości różnią się o trzy lub nawet cztery rzędy wielkości. Z tego względu analiza ilościowa tej klasy substancji wymaga szczególnie uważnego podejścia.

Podobne obliczenia jak dla wolnych aglikonów przeprowadzono dla następujących połączeń izoflawonów: glukozydów luteonu i wighteonu oraz dla malonylowanych glukozydów luteonu, wighteonu i 2'-hydroksygenisteiny. Podczas analizy zmian stężeń glikozylowanych pochodnych izoflawonów zaobserwowano akumulację glukozydu luteonu oraz malonylowanych pochodnych glukozydów luteonu, wighteonu i 2'-hydroksygenisteiny w liściach z pierwszego piętra, które były poddane bezpośredniemu działaniu elisytora oraz w liściach z drugiego piętra rośliny. W tej drugiej grupie możliwe było wystąpienie odpowiedzi systemowej. Istotną obserwacją jest również wzrost stężenia tych wolnych aglikonów izoflawonów i ich pochodnych w zranionych liściach z roślin kontrolnych poddanych działaniu rozpuszczalnika. Najwyższy poziom akumulacji malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny następuje w czasie od 24 do 48 godzin po elisytacji. Podobny obraz uzyskano podczas analizy składowych głównych PCA profili uzyskanych metodą LC/MS (Rys. 5-17). W 72 h po elisytacji zaobserwowano spadek poziomu malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny oraz luteonu w liściach zranionych traktowanych toksynami, w kolejnym punkcie pomiarowym (168h) ponownie zaczynają rosnąć, dotyczy to również wolnych aglikonów (Rys. 5-18 i 5-20). W przypadku górnych liści roślin poddanych elisytacji obserwowany jest stały wzrost stężenia malonylowanych glukozydów 2'-hydroksygenisteiny, wighteonu i luteonu oraz glukozydu luteonu, efekt ten można obserwować na Rys. 5-18 i 5-19. Świadczy to o zdolności wywołania systemowej reakcji roślin łubinu w wyniku odebrania sygnału o obecności toksyn grzybowych.



Rys. 5-20 Zmiany poziomu stężeń malonylowanych glukozydów izoflawonów w próbkach materiału z roślin kontrolnych i elisytowych.

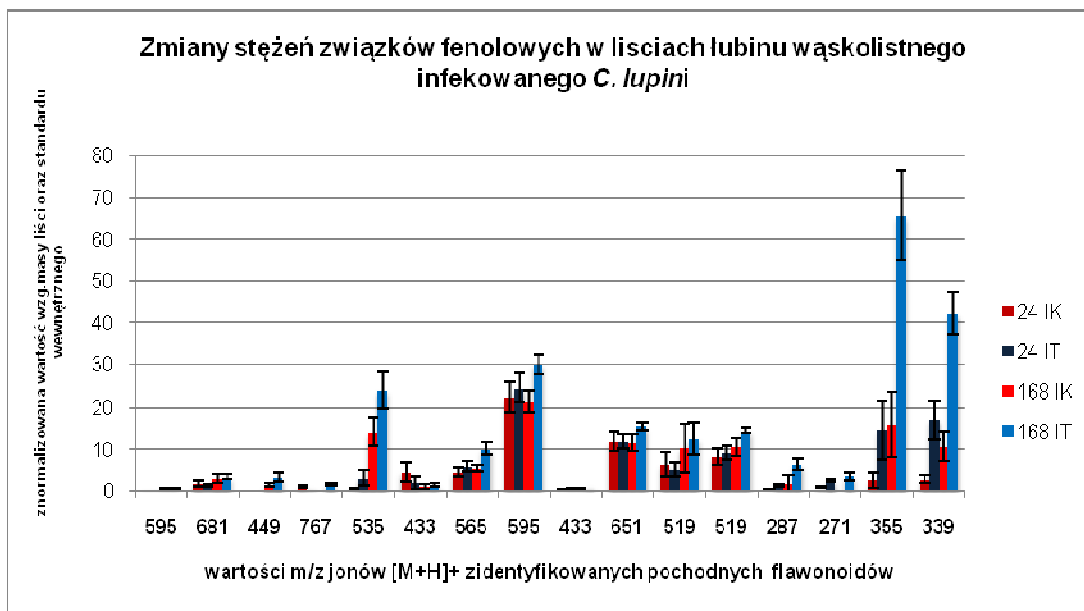
Oznaczenia próbek: TD-liście z I piętra poddane działaniu elisytora, KD-liście z I piętra traktowane rozpuszczalnikiem, TG-liście z II piętra roślin poddanych elisytacji, KG-liście z II piętra roślin kontrolnych.

4.7 Porównanie zmian w poziomie stężeń malonylowego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny oraz wolnych aglikonów izoflawonów w liściach łubinu wąskolistnego po infekcji zarodnikami *C. lupini* oraz traktowaniu roztworem toksyn grzybowych.

W ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego zidentyfikowano szereg malonylowanych pochodnych glikozydów izoflawonów oraz flawonów. Jednym z celów badań prowadzonych na sadzonkach łubinu wąskolistnego odmiany Sonet infekowanych przez oprysk zarodnikami *C. lupini* oraz elisytowanych roztworem toksyn grzybowych było sprawdzenie czy stopień acylowania pierścieni cukrowych pochodnych izoflawonoidów, jest istotny z punktu widzenia transportu glikoizoflawonów podczas infekcji (*). Połączenia cukrowe genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny są potencjalnymi prekursorami luteonu i wighteonu, związków o działaniu antybiotycznym w łubinie. Przedmiotem naszego zainteresowania była dynamika zmian stężeń tych związków w ekstraktach z liści roślin uzyskanych po przeprowadzeniu dwóch doświadczeń, podczas których liście roślin poddano elisytacji (doświadczenie 3) lub opryskowi zawiesiną zarodników *C. lupini* (doświadczenie 4). W pierwszym przypadku, podczas eksperymentu na roślinach elisytowanych zbierano osobno liście z obydwu pięter, natomiast w drugim przypadku podczas eksperymentu na roślinach infekowanych, zbierano liście z całej rośliny na jedną próbkę.

W pierwszym etapie analizy profili LC/MS pochodnych flawonoidów zbadano, dla jakich związków stężenia zmieniają się w wyniku infekcji. W przypadku roślin traktowanych roztworem toksyn grzybowych obserwowano zmiany ilościowe dla wolnych aglikonów izoflawonów oraz malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny. W drugim doświadczeniu przeprowadzono analizę dla roślin łubinu wąskolistnego odmiany Sonet infekowanych zawiesiną zarodników. W próbkach materiału roślinnego zbieranego po 24 i 168 h od momentu infekcji zaobserwowano znaczące statystycznie zmiany w poziomie związków fenolowych dla wolnych aglikonów izoflawonów oraz dla malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny. W przypadku pozostałych przebadanych pochodnych flawonoidów różnice nie przekraczały wartości odchylenia standardowego (Rys.5-21). Dlatego porównanie dynamiki zmian syntezy związków fenolowych w liściach łubinu wąskolistnego poddanych elisytacji i infekcji

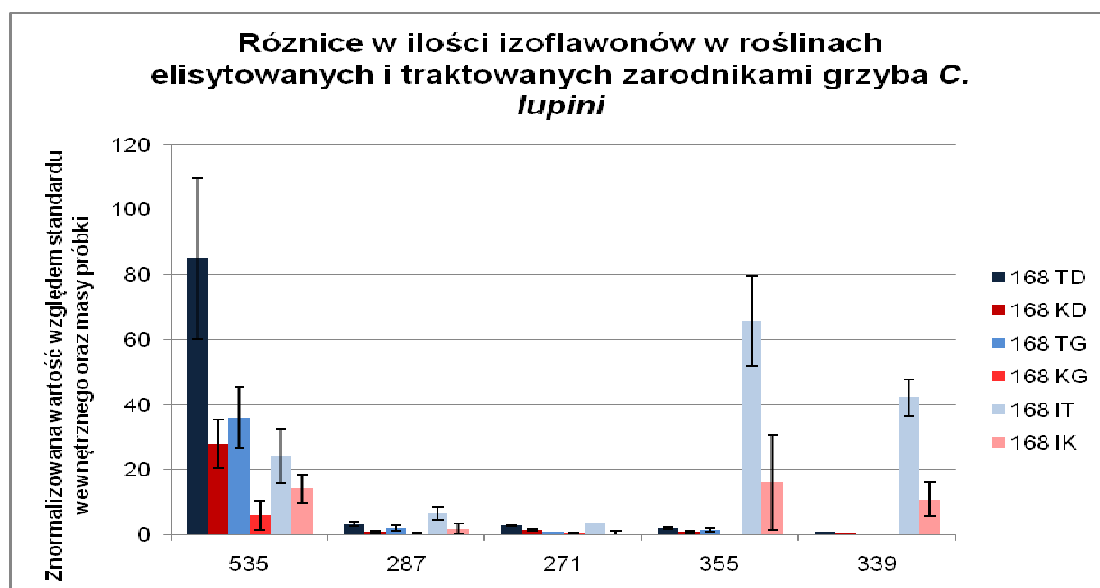
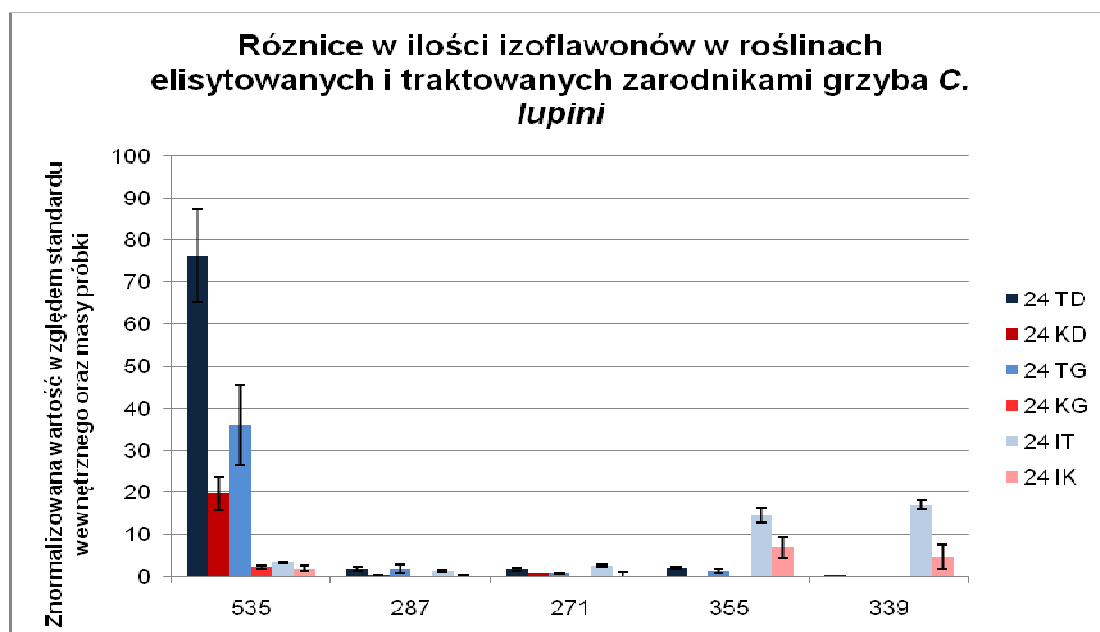
przeprowadzono dla pięciu związków: genisteiny ($[M+H]^+$ przy m/z 271), 2'-hydroksygenisteiny ($[M+H]^+$ przy m/z 287), wighteonu ($[M+H]^+$ przy m/z 339), luteonu ($[M+H]^+$ przy m/z 355) oraz malonylowanego glukozydu 2'hydroksygenisteiny ($[M+H]^+$ przy m/z 535). Dane dotyczące zmian ilościowych tych związków zostały przedstawione na Rys. 5-22.



Rys. 5-21 Zmiany ilościowe malonylowanych, glikozydów flawonoidów oraz wolnych aglikonów na podstawie chromatogramów pojedynczych jonów $[M+H]^+$ próbek zebranych w 24 i 168 h po infekcji. Kolejne wartości na osi x reprezentują wartości m/z zarejestrowane dla jonów $[M+H]^+$ następujących związków 1, 2, 6, 8, 14, 3, 12, 13, 9, 18, 16a, 16b, 21, 22, 23, 24 (Tab. 5-2). Oznaczenia próbek: 24 IK, 168 IK – rośliny kontrolne odpowiednio po 24 i 168 h od momentu infekcji; 24 IT, 168 IT – rośliny traktowane zawiesiną zarodników *C. lupini* odpowiednio po 24 i 168 h od traktowania.

Obliczenia wykonano dla powierzchni odpowiednich pików zintegrowanych chromatogramów pojedynczych jonów protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ związków w czasach 24 i 168 h po infekcji lub elisytacji roślin. Wartości integracji zostały znormalizowane wobec standardu wewnętrznego i masy materiału roślinnego wykorzystanego do ekstrakcji. Znaczny wzrost stężenia (ok. 200%) malonylowanego glukozydu 2'hydroksygenisteiny zaobserwowano po 24 h od momentu rozpoczęcia doświadczenia dla sadzonek elisytowanych zarówno w liściach pierwszego jak i w liściach z drugiego piętra. Natomiast w przypadku roślin infekowanych zawiesiną zarodników *C. lupini* znacznie wzrasta stężenie prenylowanych izoflawonów po 24 h, natomiast wzrost ilości malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny obserwowano po 168 h od infekcji, jednakże poziom stężenia tego związku był mniejszy niż ten obserwowany dla roślin poddanych elisytacji. Zarejestrowane ilości wolnych aglikonów

prenylowanych izoflawonów w liściach z roślin elisytowych były 6 do 10 razy mniejsze niż w przypadku roślin infekowanych zawiesiną zarodników *C. lupini* natomiast po 168 h obserwowane różnice jeszcze wzrastały (rys.5-22).

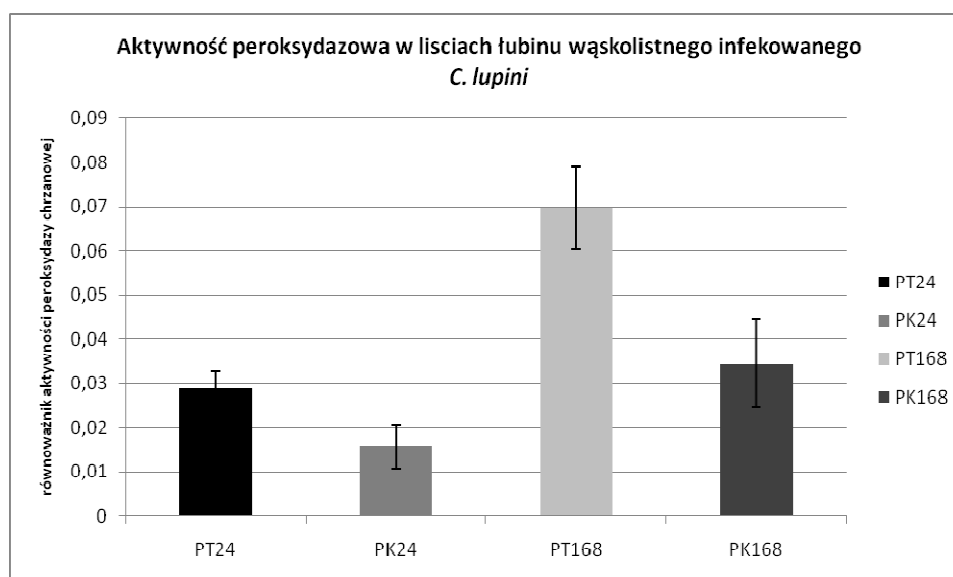


Rys. 5-22 Zmiany ilościowe obliczone dla malonylowanego glukozydu 2'hydroksygenisteiny, 2'-hydroksygenisteiny, genisteiny, luteonu i wighteonu na podstawie integracji chromatogramów pojedynczych jonów $[M+H]^+$ przy m/z odpowiednio 535, 287, 271, 355, 339, po infekcji i elisytacji zarejestrowane dla próbek zebranych w dwóch czasach 24 i 168 h. (Oznaczenia próbek: D- liście elisytowane, G-liście z wyższego węzła niż elisytowane, I-liście infekowane zawiesiną zarodników *C. lupini*).

4.8 Badanie białek o aktywności peroksydazowej w liściach łubinu wąskolistnego infekowanych zawiesiną zarodników *C.lupini*. (Doświadczenie nr 4)

Doświadczenie przeprowadzono na roślinach łubinu wąskolistnego odmiana Sonet poddanych infekcji przez oprysk zawiesiną zarodników grzyba *C. lupini*. Celem eksperymentu było określenie odpowiedzi organizmów na atak grzyba patogenego na poziomie białek o aktywności peroksydazowej. Peroksydazy gwajakolowe należą do białek związanych z patogenezą roślin (PR), których aktywność wzrasta w momencie infekcji przez mikroorganizmy patogenne. Monitorowanie tego rodzaju zmian może potwierdzić zajście infekcji w roślinach na poziomie proteomu. Ponadto korelacja danych uzyskanych na poziomie analizy wybranych białek biorących udział w odpowiedzi na infekcję przez mikroorganizmy patogenne oraz metabolitów wtórnych może być pomocna w analizie mechanizmów obronnych obserwowanych w sadzonkach badanych pod tym kątem roślin.

Zmiany w poziomie białek o aktywności peroksydazowej w próbkach z liści roślin infekowanych i kontrolnych łubinu wąskolistnego oznaczono mierząc zdolność katalizowania przez próbki ekstraktów białkowych utleniania gwajakolu w obecności nadtlenu wodoru. Wykonano ekstrakcję białek z liści roślin w dwóch punktach czasowych po infekcji: 24 oraz 168 h. Testy na aktywność peroksydazową ekstraktów w reakcji utleniania gwajakolu przeprowadzono mierząc zmianę absorbancji przy długości fali $\lambda=436$ nm w spektrofotometrze UV-Vis wg procedury opisanej w literaturze (Urbanek i in. 1991). Wykres zamieszczony na Rys. 5-23 obrazuje zmiany zachodzące w roślinach infekowanych i kontrolnych. Mniej więcej dwukrotny wzrost aktywności peroksydazowej zaobserwowano w próbkach z roślin traktowanych w porównaniu z kontrolnymi zebranych zarówno w 24 jak i 168 h po infekcji. Równoległe do zmian aktywności peroksydazowej związanych z infekcją roślin zarejestrowano wzrost aktywności związanej z wiekiem roślin.



Rys. 5-23 Zmiany w aktywności białek o aktywności peroksydazowej w różnym 24 i 168 godzin po oprysku zarodnikami grzyba *C. lupini*. Prezentowane wyniki są średnią z czterech pomiarów.

5 Dyskusja

Flawonoidy są przedmiotem badań wielu grup badawczych na całym świecie ze względu na role jaką pełnią w roślinach oraz pozytywny wpływ ich obecności w diecie człowieka (March i Brodbelt, 2008; Cuyckens i Claeys 2004; Tian i in., 2008; Farag i in., 2008). Postęp w opracowywaniu nowych metod analitycznych stosowanych w badaniu złożonych mieszanin pochodzenia biologicznego umożliwia równoległe oznaczanie ilościowe i jakościowe coraz większej ilości związków. Czas wykonywanych analiz również się zmniejsza poprzez wykorzystanie nowych rozwiązań aparaturowych w zakresie rozdziału mieszanin substancji, co sprawia, że możliwe jest badanie coraz liczniejszych zbiorów próbek, zawierających więcej wariantów doświadczalnych w odpowiedniej ilości powtórzeń. Opracowanie właściwego protokołu analitycznego dla badanej grupy związków w ściśle określonym materiale roślinnym lub zwierzęcym jest koniecznym etapem w przygotowaniu każdego eksperymentu metabolomicznego (Lisiec i in., 2006; Weckwerth, 2007). Podejście polegające na profilowaniu metabolitów w badaniach nad rolą związków fenolowych podczas infekcji stosuje się powszechnie dla wielu gatunków roślin np. w siewkach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) jak i zawiesin komórkowych lucerny (*Medicago truncatula*) (Kerhoas i in., 2006; Skiryecz i in., 2007; Tohge i in., 2005; Routaboul i in., 2006; von Roepenack-Lahaye i in., 2004; Sumner i in., 2003; Farag i in., 2008). W dotychczasowych badaniach na sadzonkach różnych odmian łubinu dokonano identyfikacji połączeń flawonoidów w korzeniach *Lupinus angustifolius* (łubin wąskolistny) oraz w tkankach (korzeń, części zielone) sadzonek *Lupinus albus* (łubin białego) oraz *Lupinus luteus* (łubin żółty) (Bednarek i in., 2003; Bednarek i in., 2001; Frański i in., 1999 a, b, Kachlicki i in., 2005). Zbadano również wpływ stresów abiotycznych (niedobór światła) oraz biotycznych (elisytor grzybowy oraz mikroorganizmy patogenne) na akumulację związków fenolowych (Bednarek i in., 2003; Bednarek i in., 2001). Dotychczas nie podejmowano prób wyjaśnienia roli procesu malonylowania glikozydów flawonoidów w odpowiedzi na atak patogenu. Zależności pomiędzy stopniem akumulacji izoflawonów w tkance podczas infekcji, a wiekiem liścia i sposobem odbioru przez roślinę sygnałów zewnętrznych nie były dotąd dyskutowane.

5.1 Analiza jakościowa i ilościowa połączeń flawonoidów w ekstraktach z łubinu wąskolistnego – aspekty metodyczne.

Identyfikację związków fenolowych w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego przeprowadzono na układzie chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem UV oraz spektrometrem mas wykorzystując systemy różnych producentów: HPLC/UV, HPLC/MS-IT, UPLC/UV/MS-QqToF, RRLC/UV/MS-QqToF. Stosowane aparaty różniły się między sobą zdolnością rozdzielczą chromatografów, oprócz tradycyjnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC analizy wykonywano na systemach wysokorozdzielczych: ultrasprawnym chromatografie cieczowym UPLC oraz szybko-rozdzielczym chromatografie cieczowym RRLC. W spektrometrach masowych wykorzystano dwa rodzaje analizatorów mas niskorozdzielczy analizator pułapki jonowej oraz hybrydowy analizator wysokorozdzielczy składający się z kwadrupola, komory kolizyjnej oraz analizatora czasu przelotu. W wymienionych systemach stosowane są odmienne strategie wykonywania eksperymentów kolizyjnie indukowanej fragmentacji, dlatego intensywności jonów potomnych zarejestrowane dla tego samego związku na obydwóch typach spektrometrów mas mogą być różne. W przypadku pułapki jonowej fragmentacji poddawana jest protonowana lub deprotonowana cząsteczka oraz jej jony potomne, w rezultacie otrzymujemy widma fragmentacyjne n-tego rzędu (w zależności od ilości analizowanej substancji możemy nawet zarejestrować widmo 4-tego lub 5-tego rzędu). W analizatorze wysokorozdzielczym QqToF fragmentacja cząsteczki zachodzi w jednym etapie w komorze kolizyjnej w przypadku standardowo wykonywanych eksperymentów MS/MS bądź w dwóch etapach w analizach „pseudo MS³”: pierwszy zachodzi w źródle jonów i prowadzi do rozerwania wiązań o niższej energii, w drugim natomiast cząsteczka poddawana jest kolizyjnie indukowanej dysocjacji w komorze kolizyjnej. Sygnały m/z rejestrowane są z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku, co umożliwia wygenerowanie wzoru sumarycznego związku. Przedstawione powyżej różnice w sposobie analizy jonów oraz dokładności ich rejestracji są przyczyną różnic w specyficzności uzyskiwanych informacji na temat danych strukturalnych uzyskiwanych podczas profilowania metabolitów metodami LC/UV i LC/MS.

Opracowanie powtarzalnego protokołu izolacji związków fenolowych z materiału roślinnego jest niezbędne do przeprowadzenia analizy jakościowej i ilościowej na dużej ilości próbek. Kilka sposobów ekstrakcji połączeń flawonoidów zostało opisanych dotychczas w literaturze: (1) izolacja pod zwiększonym ciśnieniem, (2) za pomocą płynu w

stanie nadkrytycznym na przykład ciekły CO₂, (3) w łaźni ultradźwiękowej (Rostagno i in. 2004; Herrera i Luque de Castro, 2004; Bajer i in., 2007). Porównanie procedur izolacji związków fenolowych z liści łubinu wąskolistnego za pomocą ekstraktora marki Dionex oraz łaźni ultradźwiękowej miało na celu optymalizację procedury ekstrakcji względem ilości zużywanych odczynników i materiału roślinnego, czasu wykonania oraz powtarzalności procesu pod względem ilościowym. Szczególnie istotne było sprawdzenie trwałości poszczególnych klas produktów naturalnych będących przedmiotem analiz. Ważnym czynnikiem w badaniu połączeń flawonoidów jest wydajna izolacja malonylowanych pochodnych, które ze względu na ich termolabilność, w podwyższonej temperaturze mogą łatwo ulegać degradacji do nie-acylowanych glikozydów. Należy podkreślić, że próbki materiału roślinnego oraz wysuszone ekstrakty były przechowywane w temperaturze -80°C w celu uniknięcia degradacji materiału roślinnego. Podczas ekstrakcji prowadzonej na aparacie firmy Dionex przy podwyższonym ciśnieniu w komorze z kontrolowaną temperaturą (40°C) oraz w temperaturze pokojowej zaobserwowano podobną wydajność oraz powtarzalność procesu (Rys. 5-13). Procedura izolacji związków fenolowych z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej prowadzona była bez reżimu temperaturowego (temperatura otoczenia). W tym przypadku zaobserwowano o rząd wielkości wyższe stężenie labilnych, w podwyższonej temperaturze, pochodnych malonylowanych glukozydów genisteiny oraz 2'-hydroksygenisteiny. Ponadto ilość stosowanego rozpuszczalnika w tym protokole była trzy razy mniejsza niż w przypadku ekstrakcji pod zwiększonym ciśnieniem. Mniejsze odchylenie standardowe obliczone dla kolejnych pomiarów świadczy również o lepszej powtarzalności procesu izolacji, w którym wykorzystuje się łaźnię ultradźwiękową.

Optymalizacja programu rozdziału chromatograficznego ekstraktów jest jednym z kluczowych kroków w procesie profilowania roślinnych metabolitów wtórnych. Podczas opracowywania metody analizy chromatograficznej związków fenolowych stwierdzono, że podstawowym problemem tradycyjnie stosowanych systemów HPLC jest brak powtarzalności czasów retencji w serii analiz. Istotne są również parametry kolumny, na której prowadzony jest rozdział oraz jej wypełnienie. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano trzy systemy chromatograficzne. Jeden z nich to tradycyjna wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), pozostałe dwa to systemy ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC), w których rozdział prowadzony był pod podwyższonym ciśnieniem (600 Bar) przy zastosowaniu kolumn z wypełnionym złożem o średnicy ziaren poniżej 2 µm. Zaobserwowano, że nawet prowadzenie rozdziału na chromatografii HPLC, w którym

kolumna utrzymywana była w kontrolowanych warunkach temperatury nie poprawiło powtarzalności czasów retencji analizowanych związków. Satisfakcjonujące wyniki otrzymano jedynie przy rozdzielach w podwyższonej temperaturze (40°C) oraz pod zwiększonym ciśnieniem na chromatografach UPLC bądź RRLC, gdzie obserwowane różnice w czasach retencji wynosiły maksymalnie $\pm 0,05$ min. Należy podkreślić, że powtarzalność rejestracji czasów retencji analizowanych związków warunkuje możliwość porównania analiz wykonywanych dla wielu próbek oraz przeprowadzenie obliczeń statystycznych na danych otrzymanych bezpośrednio podczas wykonywania analiz z wykorzystaniem systemów LC/MS.

Wyniki analiz jakościowych zaprezentowane w tabelach 1 i 2 wskazują na silną zależność ilości identyfikowanych bądź rozpoznawanych związków od zastosowanej aparatury analitycznej (Muth i in., 2008). W trakcie prowadzenia badań wykorzystano szereg układów składających się z różnych chromatografów cieczowych oraz systemów detekcji różniących się poziomem czułości oraz specyficzności wobec identyfikowanych w analizowanych próbkach metabolitów wtórnych. W szczególności dotyczyło to identyfikacji izomerów położeniowych. Podczas analiz ekstraktów łubinu wąskolistnego za pomocą UPLC/MS zidentyfikowano dwa razy więcej połączeń flawonoidów niż podczas stosowania normalnych systemów HPLC/MS. Polepszenie sprawności rozdzielania stosowanych chromatografów cieczowych w badaniach metabolomicznych sprawia, że wykonywane pomiary są coraz bardziej precyzyjne. Jednocześnie skraca się czas analizy, co jest szczególnie istotne w przypadku prowadzenia badań na dużych ilościach próbek, gdzie konieczne jest wykonanie odpowiedniej liczby powtórzeń analiz w celu dalszej obróbki statystycznej wyników. Ma to miejsce podczas badań prowadzonych na roślinach transformowanych lub na populacjach mapujących w projektach skierowanych na efekty hodowlane. Wyniki analiz ekstraktów z liści łubinu wąskolistnego wykazały obecność szerokiej gamy połączeń flawonoidów obecną w próbkach w porównaniu z ekstraktami z korzeni, w których dominowały połączenia izoflawonów (Kachlicki i in., 2005, Muth i in., 2009). Powodem obecności pochodnych flawonów i flawonoli w częściach zielonych roślin jest ich rola w ochronie tkanki przed szkodliwym działaniem promieniowania UV-B.

W chromatografach UPLC lub RRLC zastosowanych w sprzężeniu z spektrometrem mas analizator hybrydowy typu QqToF generuje widma wysokorozdzielcze, gdzie wartości m/z poszczególnych jonów $[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$ są rejestrowane z dokładnością lepszą niż 5ppm i na tej podstawie można wyznaczyć wzór elementarny związku. Przy zastosowaniu dodatkowej kalibracji widm przez dodanie

roztworu referencyjnego na początku analizy można poprawić dokładność wyznaczenia wzoru elementarnego nawet do około 1-2 ppm. W ten sposób potwierdzono skład elementarny związków zidentyfikowanych w próbkach z liści roślin łąbinu wąskolistnego. Ponadto w liściach roślin elisytowanych oraz zranionych roślin kontrolnych oznaczono cztery dotąd nieopisane związki: glukozydy wighteonu oraz luteonu i ich malonylowane pochodne z dokładnością poniżej 2 ppm. Na podstawie różnic pomiędzy wartościami m/z w widmach jonów potomnych analizowanych związków, zarejestrowanych w wyniku eksperymentów kolizyjnie indukowanej fragmentacji CID MS/MS jonów $[M+H]^+$ do odpowiednich aglikonów, potwierdzono, jakie cząsteczki cukru wchodzą w skład analizowanych substancji oraz ich stopień acylacji.

Istotnym problemem podczas analizy substancji na systemie LC/MS jest precyzyjny dobór parametrów fizycznych wpływających na przebieg procesu jonizacji, na transfer jonu przez analizator do detektora oraz na sposób fragmentacji cząsteczki (Kachlicki i in., 2005, Stobiecki i in., 2006). W trakcie porównywania widm zarejestrowanych na różnego typu spektrometrach istotne jest porównywanie względnych intensywności jonów potomnych rejestrowanych w trybie MS/MS. W doświadczeniach przeprowadzonych na spektrometrach wyposażonych w źródło jonów ESI oraz dwa różne typy analizatorów kwadrupol sprzężony z analizatorem mierzącym czas przelotu QqToF oraz pułapkę jonową IT wykazano, iż przy stosowaniu niskich energii kolizji intensywności jonów fragmentacyjnych są podobne, jednak przy stosowaniu wyższych energii kolizji obserwowane są znaczące zmiany, które mogą być efektem przegrupowań zachodzących podczas transmisji jonów do analizatora (Wolfender i in., 2000). Zwrócenie uwagi na parametry energetyczne procesu jonizacji analitu jest szczególnie istotne przy tworzeniu baz widm substancji pochodzenia naturalnego rejestrowanych przy wykorzystaniu jonizacji przez elektrorozpraszanie z kolizyjnie indukowaną dysocjacją jonów (ESI CID MS/MS).

Brak widm masowych standardów dla licznej grupy produktów naturalnych powoduje znaczne wydłużenie procesu identyfikacji analizowanych związków. Istotnym problemem jest również porównywanie wyników eksperymentów wykonanych w różnych laboratoriach, ze względu na stosowanie odmiennych wartości potencjałów jonizacji podczas wzbudzania jonów jak i energii stosowanych podczas kolizyjnie indukowanej fragmentacji. Wyżej wymienione różnice w warunkach przeprowadzania analiz LC/MS ograniczają możliwość tworzenia baz danych rejestrowanych widm, co sprawia, że są one mniej rozbudowane w porównaniu z bardziej powtarzalną metodą GC/MS (Moco i in.,

2006). Obecnie dostępnymi bazami widm GC-MS są dostępna publicznie Golm Metabolite Database oraz komercyjna Fiehn-Library, z kolei baza widm KNApSACk jest skonstruowana w oparciu o widma zarejestrowane za pomocą spektrometru FT ICR i jest dostępna bezpłatnie. Ponadto dostępne są bazy widm metabolitów zidentyfikowanych w różnych odmianach pomidora - Tomato Metabolome Database (TOMET), Metabolome Tomatoe Database (MoToDB) oraz bazy danych skupiające informacje z różnego rodzaju systemów GC/MS oraz LC/MS jak MassBank, NIST, Wiley oraz Mass Spectrometry Database Committee. Publicznie dostępna baza danych związków fenolowych z owoców pomidora (*Solanum lycopersicum*) została opracowana na podstawie zarejestrowanych widm wysokorozdzielczych MS/MS na analizatorze QqTof (Moco i in., 2006). Powszechnie tworzone są wewnętrzne bazy danych metabolitów w oparciu o program NIST (Lee i in., 2005; Helket i in., 2004). Inicjatywa standaryzacji badań metabolomicznych, której celem jest ujednoczenie opisu protokołów analitycznych w badaniu metabolomu, przedstawiła schemat, który zawiera minimum informacji o eksperymencie, które są wymagane, aby powtórzyć go bądź porównać jego wyniki z innymi grupami badawczymi (Jenkins i in., 2004). Z kolei w latach 2007-2009 ukazało się szereg publikacji przedstawiających wymogi dotyczące zarówno hodowli materiału roślinnego jak i przygotowania próbek, a także procedur analitycznych (Allwood i in., 2008; de Vos i in., 2007; Bottcher i in., 2007; Fernie, 2007). Autorzy tych publikacji należą do MSI (*ang. Metabolomic Standard Initiative*), spełnienie wszystkich zaleceń metodycznych umożliwi porównanie wyników pomiędzy laboratoriami. Tego rodzaju unifikacja badań jest wymagająca podczas realizacji projektów z zakresu biologii systemów (Keurentjes i in., 2006; Weckwerth, 2007; Goodacre i in., 2007; Sanson i in., 2007; Fiehn i in., 2007).

Określenie pełnej struktury flawonoidów na podstawie rejestrowanych widm MS nie jest możliwe. Analiza widm masowych uzyskiwanych przy zastosowaniu dodatkowych strategii wykonywania analiz takich jak dodawanie kationów metali w celu zmodyfikowania sposobu fragmentacji cząsteczek oraz przeprowadzenia eksperymentów przy różnych wartościach energii kolizji i potencjału stożkowego, może doprowadzić do określenia, jakie rodzaje cukrów są obecne w cząsteczce (rozdzielić pentozy, heksozy i deoksyheksozy), w jaki sposób są ze sobą połączone czy są one acylowane, a także, w jakim miejscu cząsteczek są przyłączone reszty kwasowe (Pikulski i Brodbelt, 2003; March i Brodbelt 2009). Należy jednak podkreślić, że przyporządkowanie cząsteczek cukrowych konkretnym pozycjom grup hydroksylowych aglikonu oraz rozróżnienie

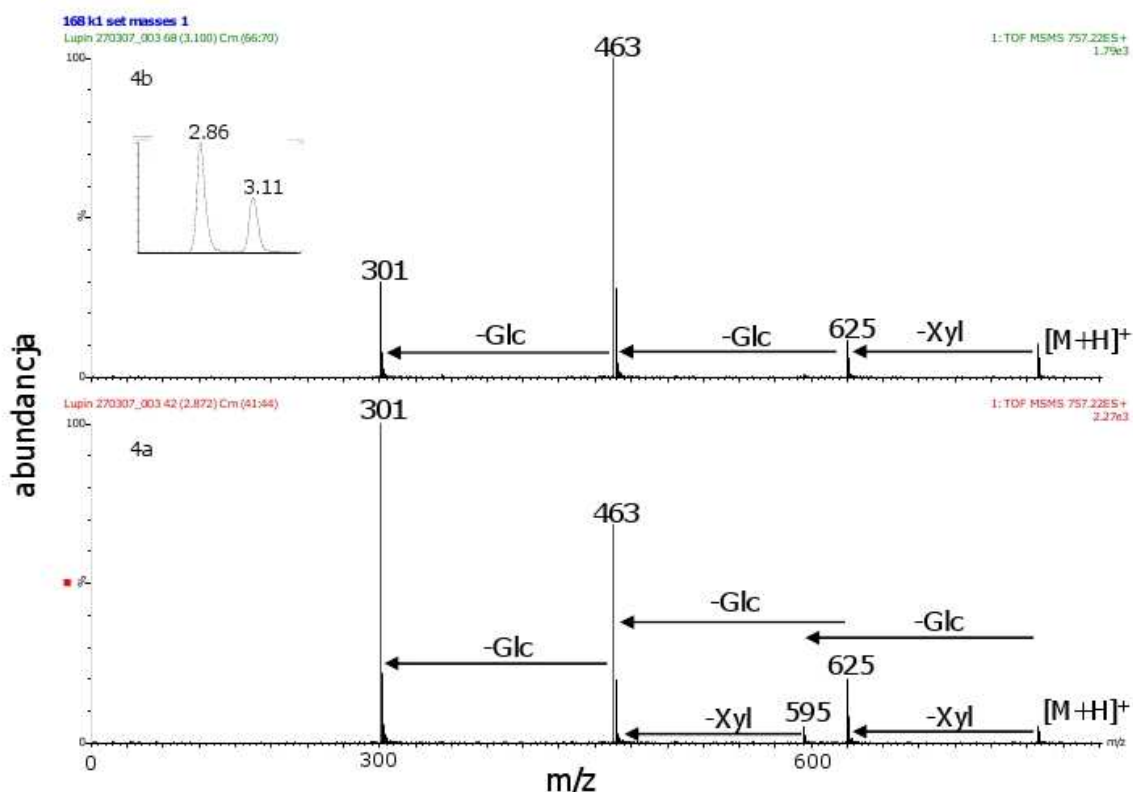
rodzaju wiązania glikozydowego przy wykorzystaniu technik MS jest często bardzo trudne lub niemożliwe, szczególnie w przypadku analizy ekstraktów zawierających duże ilości związków.

W zależności od typu analizatora w spektrometrze mas oraz stosowanych podczas analizy protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek parametrów źródła i transmisji jonów w drodze optycznej aparatu, dla analizowanej substancji obserwowane są jony potomne o różnych intensywnościach. Jak wskazano na Rys. 5-3 w zależności od zastosowanej energii kolizji ilość informacji o związku uzyskiwanych z widm MS ulega zmianom. Intensywności jonów potomnych zależą od geometrii cząsteczki poszczególnych substancji oraz od energii wiązań. Na podstawie zapisanych widm można rozróżnić izomery położeniowe, jak na przykład w przypadku malonylowanego glikozyduksylozyloglukozydu 3'-*O*-metyloluteoliny (Muth i in., 2008). Porównanie widm zarejestrowanych dla jednego z izomerów tego związku przy różnych energiach kolizji (Rys. 5-3) oraz dla pięciu izomerów związku (Rys. 5-10) zapisanych w tych samych warunkach energetycznych świadczy o konieczności zwrócenia uwagi na warunki przeprowadzania eksperymentów MS/MS. Różnica w intensywności jonów w pierwszym przypadku nie wynika z różnic w położeniu grupy malonylowej w cząsteczce związku, a jedynie z odmiennej kolejności dysocjacji wiązań glikozydowych w cząsteczce znajdującej się w różnych stanach energetycznych na skutek zderzeń z atomami gazu kolizyjnego. Bezpiecznie jest, zatem przeprowadzanie eksperymentów w szerszym zakresie wartości energii kolizji (ramping energy), w których minimalizuje się ryzyko utraty istotnych informacji strukturalnych (Muth i in., 2008).

Podczas określania struktury związków na podstawie widm MS ważnym uzupełnieniem danych uzyskiwanych z widm CID MS/MS, dla których analizuje się drogi rozpadu odpowiednich jonów macierzystych są informacje na temat składu związku zawarte w widmach wykonywanych w trybie jonów dodatnich – protonowanych $[M+H]^+$ i sodowanych cząsteczek $[M+Na]^+$ oraz jonów ujemnych, czyli deprotonowanych substancji $[M-H]^-$ (rys. 5-4, 5-7) (Stobiecki i in., 2006; Kachlicki i in., 2008). Jonizację ujemną wykorzystuje się często w analizie ilościowej ponieważ jest bardziej czułą oraz generowane jony ujemne są bardziej stabilne niż jony dodatnie. Jednakże jony deprotonowanych cząsteczek malonylowanych pochodnych flawonoidów łatwo ulegają dekarboksylacji, czyli eliminacji cząsteczki CO_2 z reszty kwasu malonowego, czego efektem jest obecność obok spodziewanego jonu $[M-H]^-$, jonu $[M-44-H]^-$ w widmach MS jonów ujemnych. W związku z tym w prowadzonych badaniach analizy ilościowe oparte

na zintegrowanych chromatogramach pojedynczych jonów w trybie jonów dodatnich. Ponadto w eksperymentach MS/MS fragmentacja cząsteczek deprotonowanych wymaga zastosowania znacznie większej energii kolizji niż w przypadku jonów dodatnich, jednocześnie uzyskane widma są trudniejsze w interpretacji (Cuyckens i Claeys, 2004; Justensen, 2000).

Główne drogi fragmentacji glikozydów flawonoidów obejmują eliminację kolejnych cząsteczek cukrów. Możliwe jest określenie wzorca podstawienia cząsteczek cukrów w aglikonie, trudno jednak określić miejsca podstawienia oraz rodzaj wiązań glikozydowych między cząsteczkami cukrów. W pracach przeprowadzonych na standardach glikozydów flawonów określono zależność intensywności jonów fragmentacyjnych Y_0 (Domon i Costello, 1988) powstających po rozerwaniu wiązań glikozydowych pomiędzy cząsteczkami cukrów i aglikonem od miejsca przyłączenia cząsteczki cukru dla monoglikozydów flawonów i flawonoli (Cuyckens i Claeys, 2005). W cząsteczkach glikozydów zawierających większą ilość cząsteczek cukru zwiększa się stopień trudności w określeniu wzorca podstawienia cukrów, w konsekwencji kompletnej struktury związku. Z sekwencji jonów potomnych w widmie masowym można wnioskować o kolejności podstawienia jednostek cukrowych. Poniższy przykład wskazuje na obecność dwóch izomerów glukozydu-ksylozyloglukozydu 3'-*O*-metyloluteoliny (Rys. 6-1). Na podstawie obserwowanych jonów potomnych glukozydu-ksylozyloglukozydu 3'-*O*-metyloluteoliny można określić sposób połączenia między cukrami. Udowodniono, że fragmentacja części disacharydowej jest charakterystyczna dla wiązania glikozydowego 1-6, co obserwujemy w przypadku izomeru 4a (Ma i in., 2001), natomiast brak rozerwania wiązania glikozydowego między cząsteczkami cukrów w drugim glikozydzie sugeruje wiązanie ksylozylo (1-2) glukozydu.



Rys. 6-1 Widma MS/MS izomerów glukozydu-ksylozylglukozydu 3'-O-metyloluteoliny (wg Muth i in., 2008)

Flawonoidy występują w tkankach w postaci połączeń glikozydowych oraz ich acylowanych pochodnych. Określony sposób przyłączenia cukrów do aglikonu oraz stopień malonylacji może mieć związek ze stanem fizjologicznym organizmu roślinnego, dlatego ważne jest opracowanie metody, która umożliwi oznaczenie ilościowe i jakościowe poszczególnych izomerów glikozydów flawonoidów. Problem kompletnego określenia struktury związku prowadzący do jego jednoznacznej identyfikacji jest możliwy jedynie za pomocą spektroskopii NMR. Jednakże badane substancje są niestabilne termicznie, z czym wiąże się trudności w ich izolacji w ilości wystarczającej do przeprowadzenia pomiarów. Dodatkowo należy podkreślić, że ich stężenia w tkance roślinnej są niskie. Poważnym utrudnieniem jest również konieczność rozdzielania związków o podobnych właściwościach fizykochemicznych, a rozdzielczość normalnych kolumn chromatograficznych w przypadkach związków izomerycznych jest niewystarczająca.

Możliwość określenia struktury związków chemicznych za pomocą spektrometrii mas jest ograniczona, jednakże można wykorzystać metody poszerzające zakres informacji o badanych związkach na przykład poprzez analizę jonów substancji utworzonych przez przyłączenie kationów jedno i dwuwartościowych metali zamiast protonu. Zastosowanie

jonów srebra Ag^+ w identyfikacji związków fenolowych w ekstraktach z cytrusów umożliwiło rozróżnienie izomerów diglikozydów flawonoidów (Zhang i Brodbelt, 2005). Podjęto również próbę rozróżnienia izomerów diglikozydów poprzez zastosowanie jonów metali przejściowych (Cu^{2+} , Co^{2+}) oraz dodatkowych ligandów należących do halogenowych pochodnych fenantroliny i bipyridyny. Trwałość kompleksów typu $[\text{Me}^{2+}(\text{flawonoid-H}) \text{ ligand pomocniczy}]^+$ jest zależna od struktury pochodnej flawonoidu. Poddanie takiego jonu kolizyjnie indukowanej dysocjacji powoduje rozerwanie wiązań pierścieni jednostek cukrów umożliwiając łatwiejszą identyfikację natury połączeń glikozydowych (Pikulski i in., 2007). Jednakże analiza złożonych mieszanin pochodzenia roślinnego z zastosowaniem jonów dwuwartościowych metali, przy dużym stopniu koelucji związków, skomplikowałaby znacznie proces identyfikacji substancji. Kationy metali dwuwartościowych mogą tworzyć związki koordynacyjne z dwoma lub trzema pochodnymi flawonoidów, co spowodowałoby powstanie i fragmentacje jonów mieszanych i znacznie utrudniłoby interpretację widm jonów potomnych. W prezentowanych badaniach przeprowadzono analizę MS/MS jonów sodowanych związków fenolowych. Na podstawie uzyskanych widm MS^n sodowanych cząsteczek możliwe było określenie połączeń pomiędzy cukrami w triglikozydzie, w którym cukry są podstawione na dwóch różnych grupach hydroksylowych aglikonu (bez określania pozycji glikozylacji) (Rys. 5-8). Dodatkową informacją otrzymaną podczas analizy zarejestrowanych widm masowych była możliwość określenia pierścienia cukrowego, do którego były przyłączone reszty kwasu malonowego (Kachlicki i in., 2007).

5.2 Infekcja liści łąbinu wąskolistnego zawiesiną zarodników *C. lupini* oraz elisytacja roztworem metabolitów grzybowych.

Wybór warunków eksperymentalnych w badaniach metabolomicznych jest niezwykle istotny z punktu widzenia powtarzalności obserwacji oraz zakresu informacji, jakie chce się otrzymać. Pierwszym etapem w badaniach nad rolą związków fenolowych podczas infekcji łąbinu wąskolistnego zarodnikami grzyba *C. lupini* było określenie warunków hodowli roślin i sposobu infekcji sadzonek. W pierwszej kolejności skupiono się na analizowaniu zmian ilościowych wolnych aglikonów izoflawonów: genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny, luteonu i wighteonu, których sygnały na chromatogramach UV były dobrze rozdzielone. Luteon i wighteon są znanymi fitoaleksynami łąbinu wąskolistnego (Ingham i in., 1983).

Doświadczenie nr 1 zostało przeprowadzone na trzytygodniowych roślinach łubinu wąskolistnego, odmianie Sonet. Miało ono na celu ustalenie procedury postępowania z sadzonkami 89 linii populacji mapującej łubinu *L. angustifolius*. W pierwszym etapie przeprowadzono infekcję listków z rozet z drugiego węzła przez nakłucie i nałożenie zawiesiny zarodników na zranioną tkankę liścia. Materiał zbierano osobno z kolejnych trzech pięter rośliny. Celem eksperymentu było sprawdzenie czy w liściach z innych poziomów niż infekowany zaobserwowana zostanie indukcja syntezy izoflawonów, świadczyłoby to, że atak mikroorganizmu patogenego na liść na drugim z trzech pięter indukuje reakcję systemowej odporności nabytej (SAR) w roślinie. Badanie dynamiki zmian ilości wolnych aglikonów izoflawonów przeprowadzono w pięciu punktach czasowych po infekcji 24, 48, 120 i 168 h (Rys. 5-14a). Zmiany istotne statystycznie zaobserwowano jedynie w przypadku luteonu i 2'-hydroksygenisteiny w liściu poddanym infekcji, co wskazuje, że na poziomie syntezy fitoaleksyn roślina nie indukuje systemowej reakcji odporności.

W drugiej części doświadczenia nr 1 przeprowadzonej w tym samym czasie dokonano infekcji przez oprysk sadzonek zawiesiną zarodników grzyba patogenego *C. lupini*. Celem eksperymentu było określenie reakcji w liściach z poszczególnych pięter rośliny na infekcję całego organizmu i zbadanie zależności rodzaju akumulowanych związków od wieku liści. Materiał roślinny zbierano w czasach 4, 8, 24, 48, 120, 168, 320h po infekcji. Zaobserwowano różny sposób akumulacji fitoaleksyn w liściach zebranych z różnych węzłów (pięter) roślin infekowanych jak i kontrolnych. Akumulację luteonu i 2'-hydroksygenisteiny zarejestrowano w liściach z najwyższej części rośliny. Zwiększenie stężenia wighteonu zachodziło w starszych liściach, z 1 i 2 piętra. Ciekawą obserwacją w obydwóch etapach doświadczenia jest zależność spadku stężenia 2'-hydroksygenisteiny z jednoczesnym wzrostem stężenia luteonu, którą zaobserwowano w 120 h po infekcji w eksperymencie z nakłuciem w liściach infekowanych oraz w 168 h po infekcji w przypadku oprysku roślin zawiesiną zarodników w liściach najmłodszych. Fakt wzrostu poziomu syntezy luteonu w liściach infekowanych przez zranienie (z drugiego węzła) oraz najmłodszych (z najwyższych węzłów) może być spowodowany łatwiejszą penetracją tkanki liściowej przez rozwijające się mycelium grzyba. W przeprowadzonych obserwacjach fitopatologicznych roślin infekowanych przez oprysk stwierdzono objawy antraknozy w najmłodszej części rośliny po 168 h od infekcji. Uzyskane dane na temat przebiegu procesu infekcji mogą wskazywać na słabszą odporność mechanicznych barier takich jak ściana komórkowa, warstwy suberyn oraz kutikuli w najmłodszych liściach. Z

kolei zmiany stężeń 2'-hydroksygenisteiny (obniżenie) oraz luteonu (wzrost stężenia) mogą świadczyć o tym, że pierwszy z wymienionych aglikonów jest substratem wykorzystywanym w infekowanych tkankach do syntezy luteonu. Synteza związku o aktywności antybiotycznej jest prawdopodobnie wynikiem aktywności prenylotransferaz.

We wcześniejszych eksperymentach, w których infekowano rośliny elisytorem izolowanym ze ściany komórkowej grzyba wstrzykiwanym w łodygę siewek łubinu (*L. albus* i *L. angustifolius*), aby zasymulować odpowiedź rośliny na stres obserwowano reakcję rośliny w kilka godzin od infekcji (Bednarek i in., 2001, 2003). W przypadku doświadczeń z zarodnikami grzyba czas reakcji był dłuższy ze względu na konieczność pokonania mechanicznych barier przez spory grzyba. Podobne obserwacje poczyniono w badaniach na częściach zielonych rzepaku infekowanych zarodnikami grzyba *Phoma lingam*. Wzrost syntezy glukozyzolanów indolowych, fitoaleksyn rzepaku, nastąpił po 4 dniach od infekcji (Kachlicki, 2004).

Colletotrichum lupini jest grzybem nekrotroficznym, który powoduje w pierwszej kolejności śmierć komórek roślinnych, a następnie odżywia się martwą tkanką (Nirenberg i in., 2002). Patogen ten jest specyficzny dla gatunku łubinu, atakuje wiązki przewodzące odcinając transport substancji odżywczych do wyższych międzywęźli, wywołując antraknozę, a w efekcie śmierć rośliny. Najlepsze warunki do rozwoju infekcji powodowanej przez atak *C. lupini* to ciepły i wilgotny klimat, dlatego podczas pierwszych 24h eksperymentu utrzymywano rośliny w takich warunkach poprzez nałożenie namiotów foliowych. Mikroorganizmy przez wiele lat ewolucji wykształciły mechanizmy detoksyfikacji fitoaleksyn produkowanych w roślinach (Pedras i Ahiahonu, 2005). Szczególnie w przypadku patogenów specyficznych dla danego gatunku rośliny często występuje element obrony patogena przed reakcjami obronnymi rośliny. Może to również powodować opóźnienie w akumulacji fitoaleksyn do poziomu, który mógł być zarejestrowany podczas profilowania metabolitów metodami LC/UV i LC/MS.

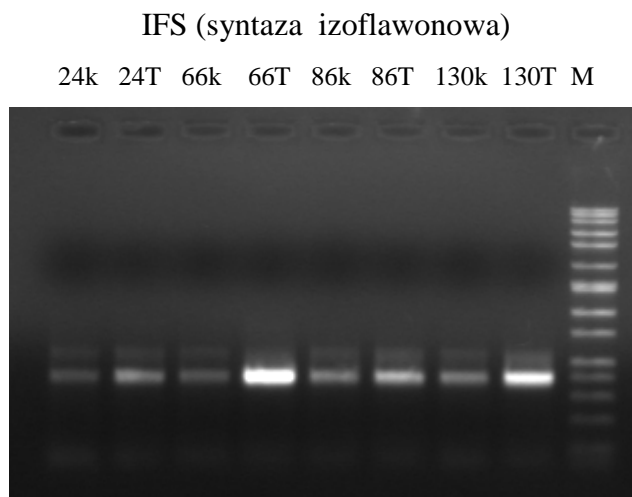
Podczas trwania pierwszego doświadczenia w roślinach kontrolnych obserwowano zmiany jakościowe i ilościowe pochodnych flawonoidów w liściach z kolejnych pięter w kolejnych punktach czasowych. W miarę rozwoju najmłodszych listków zaobserwowano wzrost syntezy pochodnych flawonów, co może być związane z rozwijaniem się powierzchni rozet i jednocześnie większą ekspozycją tkanek na szkodliwe promieniowanie UV. Podczas trwania doświadczenia sprawdzano również wzajemny stosunek flawonów do izoflawonów w starszych liściach. Stwierdzono, że w rozetach z niższych węzłów zmniejsza się ilość syntezowanych pochodnych flawonów, a poziom izoflawonów

pozostaje taki sam. Zmniejszenie poziomu syntezy produktów naturalnych spełniających rolę filtra UV w dolnych partiach liści roślin może świadczyć o niższym zapotrzebowaniu na tego rodzaju metabolity ze względu na obniżenie natężenia promieniowania UV docierającego do tkanek w tych częściach roślin.

Doświadczenie nr 2 przeprowadzono na 89 liniach populacji mapującej łubinu wąskolistnego w celu zbadania roli izoflawonów w odporności poszczególnych linii na atak organizmu patogenicznego. Zastosowano metodę oprysku roślin zawiesiną zarodników, ponieważ była bardziej naturalnym sposobem infekcji, a jednocześnie dostarczyła informacji o infekcji w całej roślinie. Ponadto metoda oprysku była znacznie mniej pracochłonna, co w perspektywie infekcji ok. 800 roślin miało duże znaczenie. Zmiany w poziomie związków fenolowych obserwowano w jednym punkcie czasowym, 168h po infekcji, ponieważ wtedy pojawiły się zmiany chorobowe, które można było skorelować z analizami zmian w profilach pochodnych flawonoidów. Wyniki eksperymentu na liniach populacji mapującej nie umożliwiły ostatecznej klasyfikacji linii pod względem podatności na antraknozę w korelacji z poziomem produkowanych fitoaleksyn (luteonu i wighteonu). Na podstawie obserwacji zmian pochodnych flawonoidów w liniach, które zostały wyodrębnione z całej populacji na wykresach PCA określono, że największe różnice ilościowe związków pomiędzy siewkami kontrolnymi a infekowanymi występują dla malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny, luteonu oraz wighteonu (Rys. 5-15). Określono również zależność pomiędzy poziomem izoflawonów oraz obserwowanymi objawami infekcji. Okazało się, że rośliny, dla których nie zaobserwowano objawów chorobowych mają wyższy endogeny poziom glukozydu 2'-hydroksygenisteiny oraz wighteonu niż rośliny o niższej zawartości tych związków. Zaobserwowano także tendencję zwiększonego poziomu syntezy izoflawonów w sadzonkach kontrolnych linii bez obserwowanych objawów antraknozy. Zanotowano również wyjątki jak na przykład linia nr 71, dla której nie zarejestrowano istotnych statystycznie zmian w poziomie badanych związków pomiędzy kontrolą a rośliną infekowaną. Fakt ten świadczy o tym, że synteza fitoaleksyn jest jednym z procesów obronnych indukowanych przez roślinę podczas infekcji przez organizmy patogenne (Rys. 5-16).

Zróznicowanie w poziomie izoflawonów i ich pochodnych pomiędzy liniami może wskazywać na różny przebieg procesów regulatorowych aktywujących szlak fenylopropanoidowy w poszczególnych liniach. Dowodem na różny stopień ekspresji genów regulujących syntezę izoflawonów są badania przeprowadzone na wybranych liniach, dla których zaobserwowano w różnym stopniu objawy chorobowe – linia 24 i 86 –

brak objawów; linie 36 i 130 – widoczne objawy. Zarejestrowano wyższy poziom ekspresji genu syntazy izoflawonowej (ISF) dla linii z widocznymi objawami chorobowymi, co może świadczyć o aktywowaniu syntezy izoflawonów w celu obrony przed atakiem organizmu patogennego (Rys. 6-2).



Rys. 6-2 Wyniki badań ekspresji syntazy izoflawonowej (IFS) w liniach, dla których obserwowano objawy choroby 66, 130 oraz dla linii 24, 86, dla których nie obserwowano objawów choroby. K- roślina kontrolna; T- roślina infekowana.

W doświadczeniu nr 3 przeprowadzono elisytację listków z rozet pierwszego węzła sadzonek łubinu wąskolistnego roztworem toksyn wyizolowanych z grzyba *C. lupini*. Badano dynamikę zmian stężeń pochodnych flawonoidów w różnych punktach czasowych 3, 6, 9, 24, 48, 72, 168 h po elisytacji. W pierwszym rzędzie podczas analizy danych, po wykonaniu analizy PCA, zaobserwowano wzrost poziomu malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny w próbkach z liści roślin infekowanych zarówno z pierwszego jak i drugiego piętra po 24 i 48 godzinach. 2'-Hydroksygenisteina jest prekursorem luteonu, który jest znaną fitoaleksyną w łubinie (Rys. 5-17, 5-20). Akumulacja pochodnych tych związku w liściach z wyższego piętra niż elisytowane może świadczyć o indukowaniu systemowej odpowiedzi w roślinie. W siewkach elisytowanych roztworem metabolitów grzybowych po raz pierwszy zidentyfikowano połączenia glukozydów prenylowanych izoflawonów luteonu i wighteonu oraz ich malonylowane odpowiedniki. Związki te występują w ilościach o rząd wielkości mniejszych niż w przypadku malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny. W przypadku glukozydów prenylowanych izoflawonów istotne różnice pomiędzy próbkami z liści rośliny kontrolnej i infekowanej zaobserwowano jedynie dla glukozydu luteonu w liściach z pierwszego i drugiego piętra rośliny infekowanej. Po 48 godzinach od elisytacji poziom glukozydu luteonu zaczyna spadać w liściach elisytowanych, natomiast zaczyna rosnać w liściach z wyższego piętra rośliny

elisytowanej. Tendencja ta może również świadczyć o tym, że po reakcji w miejscu elisytacji, roślina przygotowuje się do obrony systemowej gromadząc pochodne fitoaleksyn w górnych liściach. Podobną dynamikę zmian obserwujemy w przypadku ilości względnych malonylowanych glukozydów wighteonu, 2'-hydroksygenisteiny i luteonu.

W doświadczeniu na roślinach elisytowanych toksynami wyizolowanymi z grzyba *C. lupini* zidentyfikowano glukozydy wighteonu i luteonu oraz ich malonylowane pochodne zarówno w liściach z pierwszego jak i drugiego piętra. Należy podkreślić, że zaobserwowano obecność wymienionych związków również w liściach zranionych, traktowanych 20% metanolem (I piętro) w roślinach kontrolnych. W liściach z drugiego piętra roślin kontrolnych nie zarejestrowano śladu tych substancji. Obserwacje te porównano z wynikami doświadczenia przeprowadzonego na sadzonkach łubinu wąskolistnego, infekowanych przez zranienie liścia z drugiego piętra i nałożenie na niego zawiesiny zarodników grzyba *C. lupini*. W eksperymencie tym pomimo podobnej metody infekcji nie zidentyfikowano pochodnych luteonu ani wighteonu. W przypadku pięter liści bezpośrednio traktowanych roztworem toksyn oraz zawiesiną zarodników, różnicę w reakcji można wytłumaczyć indukcją odmiennych mechanizmów obronnych uruchamianych w odpowiedzi na infekcje i elisytację toksynami wyizolowanymi z grzyba *C. lupini*. W przypadku liści zranionych z roślin kontrolnych nakładano odpowiednio roztwór 20% metanolu i wodę destylowaną. Fakt zastosowania innego sposobu traktowania sadzonek kontrolnych może być powodem różnicy w reakcji na poziomie indukcji syntezy pochodnych luteonu i wighteonu. Powodem tych obserwacji może być toksyczne działanie metanolu. W doświadczeniu 1, gdzie rośliny były poddawane infekcji poprzez naniesienie zawiesiny spor na zranione liście, nie zarejestrowano w profilach metabolitów wtórnych obecności pochodnych cukrowych luteonu i wighteonu. Może to świadczyć o tym, że zranienie igłą nie wywołało silnej reakcji obronnej roślin.

Przeprowadzone doświadczenia doprowadziły do wniosków, że istnieją różnice w reakcji obronnej roślin w zależności od sposobu traktowania sadzonek. Spowodowało to wykonanie dodatkowego porównania, którego celem było określenia odmiennej dynamiki zmian stężeń malonylowanych pochodnych izoflawonów oraz wolnych aglikonów w trakcie rozwoju infekcji sadzonek łubinu wąskolistnego odmiany Sonet powodowanej przez oprysk zarodnikami grzyba *C. lupini* oraz przez elisytację pierwszego z dwóch pięter liści roztworem toksyn grzybowych. Zaobserwowano istotne różnice w ilościach względnych dla pięciu związków: malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny,

genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny, luteonu i wighteonu w analizie próbek po 24 i 168 godzinach od traktowania elisytozem lub zawiesiną zarodników. Po porównaniu wyników obliczeń stwierdzono czterokrotny wzrost stężenia malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny w 24 h po elisytacji toksynami grzybowymi, podczas gdy w próbkach z roślin infekowanych zaobserwowano znacznie mniejsze zmiany w tym zakresie (w granicach odchylenia standardowego). W przypadku wolnych aglikonów zaobserwowano dwukrotny wzrost stężenia luteonu i trzykrotny wzrost stężenia wighteonu zarówno w liściach z roślin infekowanych przez oprysk zawiesiną zarodników jak i w liściach z roślin elisytowanych (Rys. 5-18, 5-22). Jednakże w roślinach elisytowanych i ich kontrolach obserwowano te związki w ilościach o rząd wielkości mniejszych niż w roślinach infekowanych przez oprysk. Różnice te mogą wynikać z odmiennych warunków pogodowych przeprowadzania eksperymentu ponieważ nie były one przeprowadzane równolegle. Wszystkie hodowle roślin przeprowadzono w szklarni, gdzie nie jest możliwe zachowanie ściśle tych samych warunków wegetacyjnych (temperatura, wilgotność, oświetlenie) podczas kolejnych eksperymentów. Wyeliminowanie tego rodzaju zmian poprzez wykorzystanie w badaniach fitotronów pozwoliło by na zwiększenie precyzji wykonywanych obserwacji. W próbkach z roślin infekowanych zarodnikami *C. lupini* wzrost stężenia 2'-hydroksygenisteiny zaobserwowano po 168 h od infekcji, w tym samym czasie stężenie wighteonu i luteonu zwiększyło się czterokrotnie w porównaniu do kontroli.

Generalna tendencja zmian względnych ilości badanych związków wskazuje na odmienną dynamikę akumulacji izoflawonów i ich pochodnych w przypadku elisytacji oraz infekcji zarodnikami *C. lupini*. Zróżnicowane mechanizmy odpowiedzi na atak mikroorganizmu patogennego oraz wywołanej przez poddanie działaniu elisytora zarejestrowano podczas badania zawiesin komórkowych korzeni *Medicago truncatula* elisytozem z drożdży symulującym infekcję grzybową oraz kwasem jasmonowym, który jest związkiem sygnałowym inicjującym odpowiedź rośliny na zranienie (Farg i in., 2008). Zmiany w poziomie związków fenolowych obserwowano w 21 punktach czasowych do 48 godziny od infekcji. W wyniku traktowania zawiesin komórkowych elisytozem grzybowym zaobserwowano wzmożoną syntezę wolnych aglikonów izoflawonów, podczas gdy ester metylowy kwasu jasmonowego powodował akumulację fitoaleksyn – medykarpiny poprzez uwalnianie tego związku z glikozydowych pochodnych. W zawiesinach komórkowych lucerny, alfalfa, traktowanych elisytozem drożdżowym zaobserwowano 15-sto krotny wzrost stężenia fitoaleksyny – medykarpiny.

Wykazano również wzmożoną syntezę jej prekursorów formononetyny oraz westionu (Tang i Smith, 2001).

W roślinach rodziny bobowatych rolę fitoaleksyn pełnią związki z grupy izoflawonoidów jak medikarpina w lucernie, glyceolina w soi oraz luteon i wighteon w łubinie. Akumulację izoflawonoidów w różnych gatunkach roślin obserwowano w odpowiedzi na stresy abiotyczne jak promieniowanie UV, reakcja na podwyższone stężenia metali ciężkich oraz biotyczne jak infekcja zarodnikami grzybów patogennych bądź traktowanie elisytorem drożdżowym (Broeckling i in., 2005; Kessmann i in., 1990; Parry i in., 1994; Bednarek i in., 2003). Różne sposoby reakcji na poziomie izoflawonów oraz ich połączeń glikozydowych zaobserwowano stosując metodę infekcji zarodnikami patogenów oraz traktowania elisytorem grzybowym bądź drożdżowym (Farag i in., 2008). W łubinie wąskolistnym indukcję syntezy aglikonów genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny oraz ich prenylowanych odpowiedników wighteonu i luteonu zarejestrowano w odpowiedzi na infekcję zarodnikami grzyba *Pleiochaeta setosa* (Bednarek i in., 2003). Nie opisano jednak zmian w połączeniach glikozydowych izoflawonów w reakcji łubinu na stres.

Podczas analizy wyników uzyskanych podczas profilowania związków fenolowych zwrócono uwagę na możliwość przypisania malonylowanym pochodnym izoflawonów roli w transporcie aglikonów do miejsc nieinfekowanych w celu przygotowania odpowiedniej ilości substratów w tkankach rośliny do syntezy związków o działaniu antybiotycznym w odpowiedzi na potencjalne zagrożenie. Izoflawony mogą być syntezowane bądź też uwalniane z połączeń glikozydowych magazynowanych w wakuoli. Mechanizm transportu tych związków do miejsca infekcji nie jest do końca poznany. Wiadomym jest, że w procesie tym biorą udział transportery typu ABC (ATP Binding Cassette). Przyłączenie kwasu malonowego do cząsteczki glikozydu flawonoidu może mieć wpływ na przenoszenie tych cząsteczek przez transportery anionowe ABC typu MRP (Multidrug Related Proteins), przystosowane do transportu rozbudowanych przestrzennie amfipatycznych związków anionowych. Sugerowane miejsce występowania transporterów MRP w *Arabidopsis thaliana* to błona komórkowa wakuoli (Taguchi i in., 2005; Buer i in., 2007; Liu i in., 2001). Badania prowadzone na zawiesinach komórkowych Alfalfa (*Medicago sativa* L.) wskazują na obecność pochodnych malonylowanych flawonoidów w nieinfekowanych roślinach oraz wzrost ich poziomu po infekcji organizmem patogennym (Kessmann i in., 1990). Wzrost stężenia malonylowanego glukozydu formononetyny wykazano w liściach lucerny *Medicago sativa* w reakcji na infekcję mikroorganizmem

patogennym *Phoma medicaginis* (Jasiński i in., 2009). Formononetyna, jako prekursor medykarpiny może być uwalniana z połączeń glikozydowych. W przypadku badań na łubinie wąskolistnym infekowanym zarówno zarodnikami *C. lupini* jak i traktowanym roztworem toksyn grzybowych obserwowano wzrost stężenia malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny odpowiednio w 168 h od infekcji oraz 24 h od elisytacji (Rys. 5-22). W liściach sadzonek elisytowanych po raz pierwszy zidentyfikowano pochodne malonylowane luteonu i wighteonu, zarówno w liściach zranionych jak i w liściach z wyższego piętra. W przypadku liści z pierwszego piętra roślin elisytowanych zmiany stężeń malonylowanych glukozydów luteonu i wighteonu nie są statystycznie istotne jednak w przypadku liści z wyższego węzła zaobserwowano stały wzrost tych związków. Może to świadczyć o indukcji systemowej odporności nabytej (SAR) w roślinie pod wpływem traktowania toksynami wyizolowanymi z grzyba *C. lupini*.

Wykazano, że enzymy o aktywności acylotransferaz charakteryzują się większą specyficznością odnośnie części glikozydowej niż aglikonu, ponadto stwierdzono, iż malonylacji ulegają monoglikozydy a kolejne jednostki cukrowe przyłączane zostają do malonylowanej cząsteczki glukozydu aglikonu (flawonoidu) (Suzuki i in., 2002). W analizowanych próbkach z liści łubinu wąskolistnego, obserwowano jedynie malonylowane monoglikozydy prenylowane. Postulowana rola malonylacji cząsteczek metabolitów wtórnych to: zabezpieczenie przed glikozydazami oraz zmiana właściwości fizyko-chemicznych cząsteczek umożliwiająca transport poprzez błony w komórkach (Nakayama i in., 2003).

Badanie dynamiki zmian na poziomie metabolomu umożliwia obserwację aktywacji bądź supresji szlaków biosyntetycznych związków o aktywności antyseptycznej bądź ich prekursorów podczas ataku organizmu patogennego. Zmiany w sposobie ułożenia cząsteczek cukru na aglikonie oraz stopień ich malonylacji są zależne od stanu fizjologicznego komórki. Różnice w profilach połączeń cukrowych związków fenolowych złożonych ekstraktów roślinnych jest możliwe przy wykorzystaniu technik, w których chromatograf cieczowy jest sprzężony z spektrometrem mas. Metoda ta umożliwia identyfikację związków oraz rozróżnienie współwypływających izomerów na podstawie zarejestrowanych sygnałów m/z dla protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek. Jednocześnie możliwe jest przeprowadzenie analizy ilościowej na podstawie chromatogramów pojedynczych jonów analizowanych substancji.

6 Wnioski

1. Wykorzystanie w prowadzonych badaniach systemów, w których chromatografy cieczowe były sprzężone z różnego typu detektorami pozwoliło na ocenę ich przydatności do monitorowania zmian ilościowych i jakościowych w składzie metabolitów wtórnych w tkankach roślinnych poddanych działaniu czynników stresowych. Ze względu na skomplikowany skład analizowanych ekstraktów, pod kątem zawartości pochodnych flawonoidów będących obiektem badań, stwierdzono, że jedynie spektrometry mas spełniają rolę detektorów umożliwiających właściwy poziom selektywności i specyficzności. Również zdolność rozdzielcza stosowanych chromatografów cieczowych miała zasadniczy wpływ na jakość uzyskiwanych wyników profilowania metabolitów wtórnych.
2. Podczas analiz jakościowych możliwość rejestracji widm jonów potomnych w eksperymentach CID MS/MS była niezwykle istotna dla uzyskania ważnych informacji strukturalnych o obecnych w próbkach metabolitach wtórnych. Szczególnie w sytuacjach, gdy wiele substancji było związkami izomerycznymi lub izobarami (związkami posiadającymi ten sam skład elementarny cząsteczek).
3. Wykazano przydatność hybrydowego spektrometru mas, gdzie tandemowy analizator składa się z kwadrupola i analizatora mierzącego czas przelotu (QqToF), do analiz ilościowych metabolitów wtórnych wymywanych z kolumny chromatograficznej.
4. Wykazano wpływ wieku poszczególnych części zielonych w sadzonkach łubinu na zróżnicowanie składu pochodnych flawonów i flawonoli oraz izoflawonów.
5. Zademonstrowano, że metoda przeprowadzania infekcji roślin ma zasadniczy wpływ na poziom rozwoju infekcji w sadzonkach łubinu oraz na profile pochodnych flawonoidów obecnych w częściach zielonych roślin.
6. Zmiany w poziomie malonylacji glikozydów izoflawonów po infekcji lub elisytacji świadczą, że ten typ modyfikacji może mieć znaczenie dla transportu wewnątrz tkanek malonylowanych glukozydów genisteiny oraz szczególnie 2'-hydroksygenisteiny będących potencjalnymi prekursorami syntezy fitoaleksyn w łubinie, prenylowanych pochodnych wymienionych wcześniej aglikonów: wighteonu i luteonu.
7. Mechanizmy obronne inicjowane w tkankach sadzonek łubinu są zależne od sygnałów odbieranych przez rośliny podczas infekcji grzybem lub elisytacji

toksynami grzybowymi. Podczas infekcji roślin zawiesiną zarodników, w pierwszym rzędzie następuje wzrost syntezy wolnych aglikonów izoflawonów, natomiast w przypadku elisytacji, we wszystkich badanych tkankach roślinnych akumulowane są glikopochodne wighteonu i luteonu. Świadczy to o przygotowaniu rośliny do obrony przed organizmem patogennym i wystąpieniu systemowej odpowiedzi nabytej (SAR).

8. W roślinach infekowanych zarodnikami grzyba *C. lupini* bądź elisytowanych toksynami na jednym poziomie liści zauważono odmienny sposób akumulacji wolnych izoflawonów. W pierwszym przypadku reakcja na traktowanie nastąpiła lokalnie, w drugim natomiast zaobserwowano wzrost stężenia wolnych aglikonów izoflawonów na wszystkich poziomach liści roślin elisytowanych.
9. Wykazano, że odpowiedź rośliny na infekcję zachodzi nie tylko na poziomie metabolitów wtórnych, ale także różnych białek związanych z patogenezą (enzymy szlaku fenylopropanoidowego, peroksydazy).

7 Literatura

Akashi T, Sawada Y, Shimada N, Sakurai N, Aoki T, Ayabe S (2003) cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,40-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol* **44**: 103–112.

Alcerito T, Barbo FE, Negri G, Santos DYAC, Meda CI, Young MCM, Cha´vez D, Blatt CTT (2002) Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Bio-chem Syst Ecol* **30**: 677-683.

Allwood JW, Ellis DI, Goodacre R (2008) Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiol Plant* **132**: 117-135.

Andersen OM, Markham KR (2006) Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor and Francis Group, Nowy Jork, USA.

Aoki T, Akashi T, Ayabe S (2000) Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J Plant Res* **113**: 475–488.

Ayabe S, Akashi T (2006) Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Pphytochemistry Rev* **5**: 271-282.

Baird D, Umbach D (1995) Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy, among postmenopausal women. *Clin Endocrinol* **80**:1685–1690.

Bais HP, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM, Vivanco JM (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interaction. *Science* **301**:1377–1380.

Bajer T, Adam M, Galla L, Ventura K (2007) Comparison of various extraction techniques for isolation and determination of isoflavonoids in plants. *J Sep Sci* **30**: 122-127.

Bedair M, Sumner LW, (2008) Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *Trends in Anal Chem* **27**:238-249.

Bednarek P, Frański R, Kerhoas L, Einhorn J, Wojtaszek P Stobiecki M (2001) Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor. *Phytochemistry* **56**: 77-85.

Bednarek P, Kerhoas L, Einhorn J, Frański R, Wojtaszek P, Rybus-Zajac M, Stobiecki M (2003). Profiling of flavonoid conjugates in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* responding to biotic and abiotic stimuli. *J Chem Ecol* **29**: 1127-1142.

Bino RJ (2004) Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci* **9**: 418–425.

Bino RJ, de Vos CHR, Lieberman M, Hall RD, Bovy A, Jonker HH, Tikunov Y, Lommen A, Moco S, Levin I (2005) The light-hyperresponsive high pigment-2(dg) mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytol* **166**: 427–438.

- Bloor SJ, Abrahams S** (2002) The structure of the major anthocyanin in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **59**: 343–346.
- Boersma BJ, Barnes S, Kirk M, Wang C-C, Smith M, Kim HI** (2001) Soy isoflavonoids and cancer—metabolism at the target site. *Mut Res* **480–481**:121–127.
- Bottcher Ch, Centenob D, Freitag J, Hofgen R, Kohl K, Kopka J, Kroymann J, Matros A, Mock H-P, Neumann S, Pfalzd M, von Roepenack-Lahaye E, Schauer N, Trencamp S, Zurbriggen M, Fernie AR** (2007) PlantMetaNet ETNA Metabolomics Research School. *Physiol Plant* **132**: 136-149.
- Bristow AWT, Webb K** (2003) Intercomparison study on accurate mass measurements of small molecules in mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**: 1086-1098.
- Broeckling CD, Huhman DV, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P, Dixon RA, Sumner LW** (2005) Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J Exp Bot* **56**: 323–336.
- Bruins AP** (1997) ESI source design and dynamic range consideration w Electrospray ionization mass spectrometry, Wiley Interscience, Nowy Jork.
- Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, Hopkinson R, Ingraham J, Kaipa P, Krummenacker M, Paley S, Pick J, Rhee SY, Tissier Ch, Zhang P, Karp PD** (2006) MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucl Acids Res* **34**: D511-D516.
- Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, Hopkinson R, Ingraham J, Kaipa P, Krummenacker M, Latendresse M, Paley S, Pick J, Rhee SY, Shearer AG, Tissier Ch, Walk TC, Zhang P, Karp PD** (2008) The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucl Acids Res* **36**: D623-D631.
- Carini M, Aldini G, Furlanetto S, Stefani R, Maffei FR** (2001) Liquid Chromatography coupled to Ion-Trap Mass Spectrometry for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *J Pharm Biomed Anal* **24**: 517-526.
- Clough SJ, Fengler KA, Yu I, Lippok B, Smith RK, Bent AF** (2000) The *Arabidopsis thaliana* ‘defense, no death’ gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *PNAS* **97**: 9323–9328.
- Churchwell M, Twaddle N, Meeker L, Doerge DR** (2005) Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. *J Chromatogr B* **825**: 134-143.
- Cooper RM, Resende MLV, Flood J, Rowan MG, Beale MH, Potter U** (1996) Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature* **379**: 159-162.
- Cooper-Driver G A, Battacharya M** (1998) Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* **49**: 1165-1174.

- Craigon DJ, James N, Okyere J, Higgins J, Jotham J, May S** (2004) NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucl Acids Res* **32**: D575-D577.
- Cruickshank IAM, Perrin DR** (1960) Isolation of a Phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature* **187**: 799-800.
- Cuyckens F, Claeys M** (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* **39**: 1-15.
- Cuyckens F, Claeys M** (2005) Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. *J Mass Spectrom* **40**: 364-372.
- Dakora FD, Philips DA** (1996) Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol Mol Plant P* **49**: 1-20.
- D'Auria JC, Reichelt M, Luck K, Svatos A, Gershenzon J** (2007) Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl CoA: Anthocyanidin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase (At5MAT) in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **581**: 872-878.
- Davis BD, Brodbelt JS** (2004) Determination of the Glycosylation Site of Flavonoid Monoglucosides by Metal Complexation and Tandem Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**: 1287-1299.
- Denis L, Morton M, Griffiths K** (1999) Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol* **35**: 377-387.
- de Rijke E, Out P, Niessen W, Ariese F, Gooijer C, Brinkman U** (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A* **1112**: 31-63.
- Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD** (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **26**: 51-78.
- Devaux PG, Horning MG, Horning EC** (1971) Benzyl-oxime derivative of steroids; a new metabolic profile procedure for human urinary steroids. *Analytical letters* **4**: 151-160.
- de Vos RCh, Moco S, Lommen A, Keurentjes JJB, Bino RJ, Hall R** (2007) Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Prot* **2**: 778-791.
- Dinesh-Kumar SP, Baker BJ** (2000) Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *PNAS* **97**: 1908-1913.
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- Dixon RA** (2004) Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 225-261.
- Dixon RA, Harrison, MJ, Lamb CJ** (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 479-501.

- Domon B, Costello CE** (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal* **5**: 397-409.
- Dunn W B, Ellis D I** (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal Chem* **24**: 285-294.
- Edwards D, Batley J** (2004) Plant bioinformatics: from genome to phenome. *Trends Biotechnol* **22**: 232-237.
- Epifano F, Genovese S, Menghini L, Curini M** (2007) Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* **68**: 939-953.
- Erickson F, Holzberg L, Calderon-Urrea S, Handley A, Corr V, Baker CB** (1999) The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the *N*-mediated defense response in tobacco. *Plant J* **18**: 67-76.
- Farag MA, Huhman DV, Dixon RA, Sumner LW** (2008) Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol* **146**: 387-402.
- Fernandes CF, Moraes VCP, Vasconcelos IM, Silveira JAG, Oliveira JTA** (2006) Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. *J Plant Physiol* **163**: 1040-1048.
- Fernie AR** (2007) The future of metabolic phytochemistry: larger numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding. *Phytochemistry* **68**: 2861-2880.
- Ferrerres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A** (2004) Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **39**: 312-21.
- Fiehn O** (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* **48**: 155-171.
- Fiehn O, Robertson D, Griffin J, van der Werf M, Nikolau B, Morrison N, Sumner LW, Goodacre R, Hardy NW, Taylor Ch, Fostel J, Kristal B, Kaddurah-Daouk R, Mendes P, van Ommen B, Lindon JC, Sansone SA** (2007) The metabolomics standards initiative. *Metabolomics* **3**: 175-178.
- Fiehn O, Wohlgemuth G, Scholz M, Kind T, Lee DY, Lu Y, Moon S, Nikolau B** (2008) Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. **53**: 691-704.
- Flor HH** (1971) Current status of the gene-for-gene interactions. *Annu Rev Phytopatol* **9**: 275-296.
- Frański R, Bednarek P, Siatkowska D, Wojtaszek P, Stobiecki M** (1999a) Application of mass spectrometry to structural identification of flavonoid monoglycosides isolated from shoot of lupin (*Lupinus luteus* L.). *Acta Biochem Pol* **46**: 459-473.

- Frański R, Bednarek P, Wojtaszek P, Stobiecki M** (1999b) Identification of flavonoid diglycosides in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) with mass spectrometric techniques. *J Mass Spectrom* **34**: 486-495.
- Friboulet A, Thomas D** (2005) Systems Biology-an interdisciplinary approach. *Biosensors and Bioelectronics* **20**: 2404-2407.
- Frison-Norrie S, Sporns P** (2002) Identification and Quantification of Flavonol Glycosides in Almond Seedcoats Using MALDI-TOF MS. *J Agric Food Chem* **50**: 2782-2787.
- Frydman A, Weisshaus O, Bar-Peled M, Huhman DV, Sumner LW, Marin FR, Lewinsohn E, Fluhr R, Gressel J, Eyal Y** (2004) Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene *Cm1,2RhaT* encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant J* **40**: 88-100.
- Gianinazzi S** (1970) Hypersensibilite aux virus, temperatures et proteines solubles chez le *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. *Cr Acad Sci Paris D* **270**: 2382-2386.
- Glinski M, Weckwerth W** (2006) The role of mass spectrometry in plant systems biology. *Mass Spec Rev* **25**: 173-214.
- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB** (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* **22**: 245-252.
- Goodacre R** (2007) Metabolomics of a Superorganism. *J Nutrition* **137**: 259S-266S.
- Goodacre R, Broadhurst D, Smilde AK, Kristal BS, Baker JD, Beger R, Bessant C, Connor S, Capuani G, Craig A, Ebbels T, Kell DB, Manetti C, Newton J, Paternostro G, Somorjai R, Sjostrom M, Trygg J, Wulfert F** (2007) Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics* **3**: 231-241.
- Goossens A, Häkkinen ST, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau M, Inzé D, Oksman-Caldentey KM** (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *PNAS* **100**: 8595-600.
- Hain R, Reif H-J, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stöcker R H, Stenzel K** (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**: 153-156.
- Hall RD** (2006) Plant metabolomics:from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol* **169**: 453-468.
- Harborne BJ, Williams CA** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- Herrera MC, Luque de Castro MD** (2004) Ultrasound-assisted extraction for the analysis of pphenolic compounds in strawberries. *Anal Bioanal Chem* **379**: 1106-1112.

- He Xian-Zhi, Reddy JT, Dixon RA** (1998) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase. *Plant Mol Biol* **36**: 43-54.
- He Xian-Zhi, Dixon RA** (2000) Genetic Manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in Alfalfa. *Plant Cell* **12**: 1689-1702.
- Hipskind JD, Paiva NL** (2000) Constitutive Accumulation of a Resveratrol-Glucoside in Transgenic Alfalfa Increases Resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 551-562.
- Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, Yano M, Goodenowe DB, Yamazaki Y, Kanaya S, Nakamura Y, Kitayama M, Suzuki H, Sakurai N, Shibata D, Tokuhisa J, Reichelt M, Gershenzon J, Papenbrock J, Saito K** (2005) Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics. *J Biol Chem* **280**: 25590-25595.
- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K** (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **101**: 10205-10210.
- Horning EC, Horning MG** (1970) Metabolic profiles: chromatographic methods for isolation and characterization of a variety of metabolites in man. In Olson, R.E. (Ed.) *Methodes in Medical Research*. Year Book Medical Publishers, Chicago, USA.
- Huges RJ, Croley TR, Metcalfe ChD, March RE** (2001) A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *Int Journal of Mass Spec* **210/211**: 371-385.
- Hunt MD, Delaney TP, Dietrich RA, Weymann KB, Dangel JL, Ryals JA** (1997) Salicylate-Independent Lesion Formation in Arabidopsis lsd Mutants. *MPMI* **10**: 531-536.
- Hvattum E, Ekeberg D** (2003) Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **38**: 43-49.
- Jenkins H, Hardy N, Beckmann M, Draper J, Smith AR, Taylor J, Fiehn O, Goodacre R, Bino RJ, Hall R, Kopka J, Lane GA, Lange BM, Liu JR, Mendes P, Nikolau BJ, Oliver SG, Paton NW, Rhee S, Roessner-Tunali U, Saito K, Smedsgaard J, Sumner LW, Wang T, Walsh S, Wurtele ES, Kell DB** (2004) A proposed framework for the description of plant metabolomics experiments and their results. *Nat Biotechnol* **22**: 1601-1606.
- Jost R, Altschmied L, Bloem E, Bogs J, Gershenzon J, Hähnel U, Hänsch R, Hartmann T, Kopriva S, Kruse C, Mendel RR, Papenbrock J, Reichelt M, Rennenberg H, Schnug E, Schmidt A, Textor S, Tokuhisa J, Wachter A, Wirtz M, Rausch T, Hell R** (2005) Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res* **86**: 491-508.

- Ju Z, Bramlage WJ** (1999) Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Postharvest Biol Tec* **16**: 107–118.
- Justensen U** (2000) Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J Chromatogr A* **902**: 369–379.
- Kachlicki P** (2004) Rola metabolitów wtórnych w interakcji grzyba *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. i roślin rzepaku (*Brassica napus* L.) Rozprawy i Monografie, Poznań.
- Kachlicki P, Marczak Ł, Kerhoas L, Einhorn J, Stobiecki M** (2005) Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSⁿ systems. *J Mass Spectrom* **40**: 1088–1103.
- Kachlicki P, Einhorn J, Muth D, Kerhoas L, Stobiecki M** (2008) Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. *J Mass Spectrom* **43**: 572–586.
- Keurentjes JJB, Fu J, de Vos CHR, Lommen A, Hall RD, Bino RJ, van der Plas LHW, Jansen RC, Vreugdenhil D, Koornneef M** (2006) The genetics of plant metabolism. *Nat Gen* **38**: 842 – 849.
- Kerhoas L, Aouak D, Cingöz A, Routaboul JM, Lepiniec L, Einhorn J, Birlirakis N** (2006) Structural characterization of the major flavonoid glycosides from *Arabidopsis thaliana* seeds. *J Agric Food Chem* **54**: 6603–6612.
- Kessmann H, Edwards R, Geno PW, Dixon RA** (1990) Stress responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **94**: 227–232.
- Kitano H** (2002) Systems Biology: A Brief Overview. *Science* **295**: 1662–1664.
- Kitano H** (2002) Computational systems biology. *Nature* **420**: 206–210.
- Kodama O, Miyakawa J, Akatsuka T, Kiyosawa S.** (1992) Sakura-netin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochemistry* **31**: 3807–3809.
- Kogawa K, Kazuma K, Kato N, Noda N, Suzuki M** (2007) Biosynthesis of malonylated flavonoid glycosides on the basis of malonyltransferase activity in the petals of *Clitoria ternatea*. *J Plant Physiol* **164**: 886–894.
- Kong J-M, Chia L-S, Goh N-K, Chia T-F, Brouillard R** (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**: 923–933.
- Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmüller E, Dörmann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D** (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* **21**: 1635–1638.
- Laflamme P, Khouri H, Goulick P, Ragai I** (1993) Enzymatic prenylation of isoflavones in white lupin. *Phytochemistry* **34**: 147–151
- Lange BM** (2006) integrative analysis of metabolic networks: from peaks to flux models? *Cur Opin plant Biol* **9**: 220–226.

- Lapcik O** (2007) Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule? *Phytochemistry* **68**: 2909–2916.
- Last RL, Jones AD, Shachar-Hill Y** (2007) Towards the plant metabolome and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 167-174.
- Laundry LG, Chapple CCS, Last R** (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sun screens exhibit enhanced ultraviolet-B injury oxidative damage. *Plant Physiol* **109**: 1159-1166.
- Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J, Day NE** (1991) Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* **337**: 1197–1200.
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL** (1993) Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B radiation. *Plant Cell* **5**: 171-179
- Li QM, van den Heuvel H, Dillen L, Claeys M** (1992) Differentiation of 6-C and 8-C-glycosidic flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biol mass spectrom* **21**: 213-221.
- Li QM, Claeys M** (1994) Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* **23**: 406-416.
- Lisiec J, Shauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**: 387-396.
- Liu CJ, Deavours BE, Richard SB, Ferrer JL, Blount JW, Huhman D, Dixon RA, Noel JP** (2006) Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant defense responses. *Plant Cell* **18**: 3656-3669.
- Long SR** (1996) Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**: 1885-1898.
- Luczkiewicz M, Glod D, Baczek T, Bucinski A** (2004) LC-DAD UV and LC-MS for the analysis of isoflavones and flavones from in vitro and in vivo biomass of *Genista tinctoria* L. *Chromatographia* **60**: 179-285.
- Ma YL, Vedernikova I, van den Heuvel H, Claeys M** (2000) Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation. *J Amer Soc Mass Spectrom* **11**: 136-144.
- Ma YL, Cuyckens F, van den Heuvel H, Claeys M** (2001) Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric O-diglycosyl flavonoids. *Phytochem Anal* **12**: 159-165.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB** (Eds.), (1970) The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, New York, NY, USA
- March RE, Lewars EG, Stadey ChJ, Xiu-Sheng M, Xiaoming Z, Metcalfe ChD** (2006) A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* **248**: 61-85.

- March R, Brodbelt J** (2008) Analysis of flavonoids: Tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR. *J Mass Spectrom* **43**: 1581–1617.
- Marczak Ł, Kachlicki P, Koźniewski P, Skirycz A, Krajewski P, Stobiecki M** (2008) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry monitoring of anthocyanins in extracts from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**: 3949-3956.
- Matern U, Grimming B, Kneusel RE** (1995) Plant cell wall reinforcement in the disease resistance response – molecular composition and regulation. *Can J Bot* **73**: S511-S517.
- Merken HM, Beecher GR** (2000) Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Agric Food Chem* **48**: 577.
- Mihaleva VV, Vorst O, Maliepaard Ch, Verhoeven HA, de Vos RCH, Hall RD, van Ham RCHJ** (2008) Accurate mass error correction in liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry based metabolomics. *Metabolomics* **4**: 171-182.
- Moco SIA, Bino RJ, Vorst OFJ, Verhoeven HA, Groot JCW de, Beek TA van, Vervoort JJM, de Vos CH** (2006) A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolome Database for Tomato. *Plant Physiol* **141**: 1205-1218.
- Morgenthal K, Weckwerth W, Steuer R** (2006) Metabolomic networks in plants: transitions from pattern recognition to biological interpretation. *Biosystems* **83**: 108-117.
- Muth D, Marsden-Edwards E, Kachlicki P, Stobiecki M** (2008) Differentiation of Isomeric Malonylated Flavonoid Glyconjugates in Plant Extracts with UPLC-ESI/MS/MS. *Phytochem Anal* **19**: 444-452.
- Muth D, Kachlicki P** (2009) Metody analizy flawonoidów w materiale roślinnym. *Biotechnologia* **2**: (65-80).
- Muth D, Kachlicki P, Krajewski P, Przystalski M, Stobiecki M** (2009) Differential metabolic response of narrow leafed lupine (*Lupinus angustifolius*) leaves to infection with (*Colletotrichum lupini*). *Metabolomics* **5**: 354-362.
- Nagashima S, Inagaki R, Kubo A, Yoshikawa T** (2004) cDNA cloning and expression of isoflavonoid-specific glucosyltransferase from *Glycyrrhiza echinata* cell-suspension cultures. *Planta* **218**: 456-459.
- Nakayama T, Suzuki H, Nishino T** (2003) Anthocyanin acyltransferases: specificities, mechanism, phylogenetics, and application. *J Mol Catal* **23**: 117-132.
- Niessen WMA** (1999) Liquid chromatography Mass Spectrometry, Second Edition, Marcel Dekker Inc., New York
- Nirenberg HI, Feiler U, Hagedorn G** (2002) Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia* **94**: 307-320.
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F** (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* **16**: 373-378.
- Oliver SG** (2002) Metabolism: demand management in cells. *Nature* **418**: 33-34.

- Parry AD, Tiller SA, Edwards R** (1994) The effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Plant Physiol* **106**: 195–202.
- Peer WA, Murphy AS** (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci* **12**: 556-563.
- Pikulski M, Brodbelt JS** (2003) Differentiation of Flavonoid Glycoside Isomers by Using Metal Complexation and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**: 1437–1453.
- Pikulski M, Aguilar A, Brodbelt JS** (2007) Tunable Transition Metal–Ligand Complexation for Enhanced Elucidation of Flavonoid Diglycosides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **18**: 422–431
- Phelps TJ, Palumbo AV, Beliaev AS** (2002) Metabolomics and microarrays for improved understanding of phenotypic characteristics controlled by both genomics and environmental constraints. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 20-24.
- Phillips DA** (1992) Flavonoids: plant signals to soil microbes. W H.A. Stafford and R.K. Ibrahim, eds., Recent Advances in Phytochemistry. Phenolic Metabolism in Plants, Plenum Press, New York, **26**: 201-231.
- Phillips DA** (2000) Biosynthesis and release of rhizobial nodulation gene inducers by legumes. W E.W. Triplett, ed., Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 349-363.
- Plumb R, Castro-Perez J, Granger J, Beattie I, Joncour K, Wright A** (2004) Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**: 2331–2337.
- Potter S, Baum J, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr** (1998) Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **68**: 1375S–1379S
- Prasain JK, Wang C-C, Barnes S** (2004) Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radic Res* **37**: 1324-1350.
- Rezzi S, Ramadan Z, Fay LB, Kochhar S** (2007) Nutritional Metabonomics: Applications and Perspectives. *J Prot Res* **6**: 513-525.
- Rischer H, Oksman-Caldenety KM**, (2006) Unintended effects in genetically modified crops:revealed by metabolimics? *Trends Biotechnol* **24**: 102-104
- Roessner U, Leudemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR** (2001) Metabolic Profiling Allows Comprehensive Phenotyping of Genetically or environmentally Modified plant Systems. *The Plant Cell* **13**: 11-29.
- Ross JR, Li Y, Lim EK, Bowles DJ** (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* **2**: 3004.1-3006.1.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG** (2004) Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta* **522**: 169-177.

- Routaboul J-M, Kerhoas L, Debeaujon I, Pourcel L, Caboche M, Einhorn J, Lepiniec L** (2006) Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**: 96–107.
- Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C** (2002) Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* **59**: 23-32
- Ryan KG, Swinny EE, Winefield C, Markham KR** (2001) Flavonoid and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. *Z Naturforsch* **56c**: 745-754
- Saghatelian A, Cravatt BF** (2005) Global strategies to integrate the proteome and metabolome. *Curr Opin Chem Biol* **9**: 62-68.
- Saito K, Masami YH, Keiko Y-S** (2008) Decoding genes with coexpression networks and metabolomics – ‘majority report by precogs’. *Trends Plant Sci* **13**: 36-43.
- Sanson SA, Schober D, Atherton HJ, Fiehn O, Jenkins H, Rocca-Serra P, Rubtsov DV, Spasi I, Soldatova L, Taylor Ch, Tseng A, Viant MR, Ontology Working Group Members** (2007) Metabolomics standards initiative: ontology working group work in progress. *Metabolomics* **3**: 249–256.
- Satoshi T, Ragai I** (1995) Prenylated isoflavonoids – an update. *Phytochemistry* **38**: 1073-1094.
- Sawada Y, Ayabe S** (2005) Multiple mutagenesis of P450 isoflavonoid synthase reveals a key active-site residue. *Biochem Bioph Res Commun* **330**: 907-913.
- Sawada Y, Kinoshita K, Akashi T, Aoki T, Ayabe S** (2002) Key amino acid residues required for aryl migration catalysed by the cytochrome P450 2-hydroxyisoflavanone synthase. *Plant J* **31**: 555-564.
- Schauer N, Fernie AR** (2006) Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends Plant Sci* **11**: 508-516.
- Shimamura M, Akashi T, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Ayabe S, Aoki T** (2007) 2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase is a Critical Determinant of Isoflavone Productivity in Hairy Root Cultures of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **48**: 1652-1657.
- Shinbo Y, Nakamura Y, Altaf-Ul-Amin M, Asahi H, Kurokawa K, Arita M, Saito K, Ohta D, Shibata D, Kanaya S** (2006) Plant Metabolomics. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **57**: 165-181.
- Shirley BW** (1996) Flavonoid biosynthesis: ‘new’ functions for an ‘old’ pathway. *Trends Plant Sci* **1**: 377-382.
- Shmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**: 501-506.

- Sholz M, Gatzek S, Sterling A, Fiehn O, Selbig J** (2004) Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. *Bioinformatics* **20**: 2447-2454.
- Skirycz A, Jozefczuk S, Stobiecki M, Muth D, Zanon MI, Witt I, Mueller-Roeber B** (2007) Transcription factor AtDOF4;2 affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **175**: 425-38.
- Stafford H** (1990) *Flavonoid Metabolism*. CRC, Boca Raton, USA
- Stalikas C** (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* **30**: 3268-3295.
- Steinfah M, Groth D, Lisiec J, Selbig J** (2008) Metabolite profile analysis: from raw data to regression and classification. *Physiologia Plantarum* **132**: 150-161.
- Stevenson P C, Haware M P** (1999) Maackiain in *Cicer bijungum* associated with resistance to Botrytis. *Biochem Sys Ecol* **27**: 761-767.
- Stobiecki M, Skirycz A, Kerhoas L, Kachlicki P, Muth D, Einhorn J, Mueller-Roeber B** (2006) Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS. *Metabolomics* **2**: 197-219.
- Stobiecki M, Kachlicki P** (2006) W: *The Science of Flavonoids*, (Grotewold E. ed.), Springer Science and Business Media, New York, 47-69.
- Stobiecki M, Olechnowicz-Stępień W, Rządowska-Bodalska H, Cisowski W, Budko E** (1988) Identification of flavonoid glycosides isolated from plants by fast atom bombardment and gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Environ Mass* **15**: 589-594.
- Stobiecki M, Matysiak-Kata W, Frański R, Skala J, Szopa J** (2003) Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry. *Phytochemistry* **62**: 959-969.
- Stochmal A, Simonet AM, Macias FA, Oleszek W** (2001) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids 2. Tricine and chrysoeriol from aerial parts. *J Agric Food Chem* **49**: 5310-5314.
- Strauss E, Falkow S** (1997) Microbial pathogenesis: genomics and beyond. *Science* **276**: 707-712.
- Strauss L, Santti R, Saarinen N, Streng T, Joshi S, Makela S** (1998) Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol Lett* **103**: 349-354.
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA** (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* **62**: 817-836.
- Suzuki H, Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Fukui Y, Nakamura N, Yamaguchi M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T** (2002) cDNA cloning, heterologous expressions, and functional characterization of malonyl-coenzyme A: anthocyanidin 3-*O*-glucoside-6-*O*-malonyltransferase from Dahlia Flowers. *Plant Physiol* **130**: 2142-2151.

- Swain T** (1976) Nature and properties of flavonoids, Chemistry and Biochemistry in Plant Products (Goodwin T.W.,ed) 425-463, Academic Press
- Taguchi G, Shitchi Y, Shirasawa S, Yamamoto H, Hayashida N** (2005) Molecular cloning, characterization, and downregulation of an acyltransferase that catalyzes the malonylation of flavonoid and naphthol glucosides in tobacco cells. *Plant J* **42**: 481–491.
- Tahara S, Ibrahim RK** (1995) Prenylated isoflavonoids - an update *Phytochemistry* **38**: 1073–1094.
- Tang M, Smith CJ** (2001) Elicitor induced defence responses in *Medicago sativa*. *New Phytol* **149**: 401-418.
- Tevini M, Braun J, Fieser G** (1991) The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraiolet-B radiation. *Photochem Photobiol* **53**: 329.
- Thomzik JE, Stenzel K, Stöcker R, Schreier PH, Hain R, Stahl DJ** (1997) Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol Molec Plant Pathol* **51**: 265-278.
- Tian L , Pang Y , Dixon RA** (2008) Biosynthesis and genetic engineering of proanthocyanidins and (iso)flavonoids. *Phytochem Rev* **7**: 445-465.
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J-I, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M, Saito K** (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J* **42**: 218–235.
- Urbanek H, Kuzniak-Gebarowska E, Herka K** (1991) Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiol Plant* **13**: 43-50.
- Wallance JW, Grisenbach H** (1973) The *in vivo* incorporation of a flavanone into *c*-glycosylflavones. *Biochim Biophys Acta* **304**: 837-841
- Ward DM, CM Perou, M Lloyd, J Kaplan** (1995) 'Synchronized' endocytosis and intracellular sorting in alveolar macrophages: The early sorting endosome is a transient organelle. *J Cell Biol* **129**: 1229-1240
- Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U** (2006) Silencing the Flavonoid Pathway in *Medicago truncatula* Inhibits Root Nodule Formation and Prevents Auxin Transport Regulation by Rhizobia. *The Plant Cell* **18**: 1617–1629.
- Weckewerth W** (2007) Metabolomics: Methods and rotocols. Humana Press Inc. New Jersey
- Welle R, Grisebach H** (1991) Properties and solubilization of the prenyltransferase of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis in soybean. *Phytochemistry* **30**:479-484
- Wolfender J-L, Waridel P, Ndjoko K, Hobby KR, Major HJ, Hostettmann K** (2000) Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis* **28**: 895-906.

- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Niida R, Saito K** (2007) Identification of a Flavonol 7-*O*-Rhamnosyltransferase Gene Determining Flavonoid Pattern in *Arabidopsis* by Transcriptome Coexpression Analysis and Reverse Genetics. *J Biol Chem* **282**: 14932-14941.
- Yoshikawa M, Tsuda M, Takeuchi Y** (1993) Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften* **80**: 417-420.
- Vaidyanathan S, Gaskell S, Goodacre R** (2006) Matrix-suppressed laser desorption/ionisation mass spectrometry and its suitability for metabolome analyses. *Rapid Comm Mass Spectrom* **20**: 1192-1198.
- Van Etten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE** (1994) Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell* **6**: 1191-1192.
- van Loon LC** (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Europ J Plant Pathol* **103**: 753-65.
- van Loon LC** (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* **4**: 111-116.
- von Roepenack-Lahaye E, Degenkolb T, Zerjeski M, Franz M, Roth U, Wessjohann L, Schmidt J, Scheel D, Clemens S** (2004) Profiling of Arabidopsis Secondary Metabolites by Capillary Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Plant Physiol* **134**: 548–559.
- Zhang J, Brodbelt JS** (2005) Silver Complexation and Tandem Mass Spectrometry for Differentiation of Isomeric Flavonoid Diglycosides. *Anal Chem* **77**: 1761-1770.