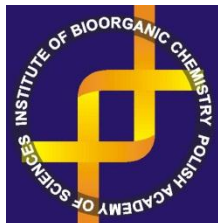


Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Pracownia Proteomiki i Metabolomiki



ROZPRAWA DOKTORSKA

Anna Wojakowska

**Wykorzystanie technik spektrometrii mas do profilowania
i analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych
w materiale roślinnym**

Promotor

Prof. dr hab. Maciej Stobiecki

Poznań 2012

Pragnę złożyć wyrazy szczerzej wdzięczności mojemu promotorowi

Prof. dr hab. Maciejowi Stobieckiemu

*za merytoryczne ukierunkowanie niniejszej rozprawy doktorskiej,
cenne rady i dyskusje, które w sposób znaczący przyczyniły się do jej powstania,
a także za okazaną cierpliwość, życzliwość i wsparcie
w trakcie realizacji i redagowania pracy.*

Serdecznie dziękuję mojemu opiekunowi naukowemu

Dr Łukaszowi Marczakowi

*za niezastąpioną pomoc podczas pracy z kapryśnymi urządzeniami,
wsparcie merytorycznie, cenne uwagi i życzliwość,
które bezpośrednio przelożyły się na kształt niniejszej pracy.*

*Szczególne podziękowania kieruję do koleżanek i kolegów
z Pracowni Proteomiki i Metabolomiki IChB ,
Basi Swarczewicz, Klaudii Chmielewskiej i Pawła Rodziewicza
za niezastąpioną atmosferę podczas realizacji badań.*

*Serdecznie dziękuję Paniom
Danusi Ciesiolce i Małgosi Zielińskiej
za rady i techniczną pomoc w laboratorium
oraz za okazaną życzliwość.*

*Wyrazy podziękowania kieruje również do Pana
Prof. dr hab. Piotra Kachlickiego
za życzliwość, okazaną pomoc i cenne uwagi
w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję również **mgr Annie Piaseckiej** za wykonanie analiz MS-IT,
a także cenne wskazówki i dyskusje w trakcie opracowania wyników.*

*Dziękuję zespołowi **Fizjologii Molekularnej Roślin IChB**
pod kierownictwem **prof. dr hab. Michała Jasińskiego**
za przygotowanie materiału roślinnego *M.truncatula*.*

*Niniejszą pracę dedykuję mojemu **Mężowi i Rodzicom**,
w podziękowaniu za wsparcie i wyrozumiałość
oraz wszelkie słowa otuchy w trakcie jej realizacji.*

Przedłożona praca doktorska została współfinansowana z następujących źródeł:

- projekt badawczy MNiSW, pt. „Badanie zależności pomiędzy profilem fenolowych metabolitów wtórnych oraz poziomem ekspresji genów szlaku fenylopropanoidów w siewkach łąbinu wąskolistnego podczas oceny odporności na infekcję patogenem grzybowym”

Numer grantu: *NN310 721640*

- projekt badawczy NCN PRELUDIUM pt. „Wykorzystanie technik tandemowej spektrometrii mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją do profilowania i analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych w wieloskładnikowych ekstraktach materiału roślinnego”.

Numer grantu: *UMO-2011/01/N/NZ2/00025*

Ponadto, oświadczam, że jestem stypendystką w ramach projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	10
I. WPROWADZENIE LITERATUROWE.....	15
1.1 Fenolowe metabolity wtórne.....	15
1.1.1 Struktura i jej modyfikacje.....	15
1.1.2 Biosynteza flawonoidów.....	19
1.1.3 Funkcje pełnione w roślinie i aktywność biologiczna.....	25
1.2 Mechanizmy obronne roślin.....	27
1.2.1 Roślinny układ immunologiczny.....	28
1.2.2 Reakcje obronne roślin przed infekcją patogenem.....	30
1.3 Metabolomika roślinna.....	31
1.3.1 Nowa dziedzina nauki?.....	31
1.3.2 Podejście metodyczne w badaniach metabolomów roślinnych.....	33
1.3.3 Metabolomika jako narzędzie w genomice funkcjonalnej i biologii systemów.....	36
1.4 Spektrometria mas jako narzędzie analityczne w metabolomice roślinnej.....	37
1.4.1 Techniki chromatograficzne stosowane w sprzężeniu ze spektrometrami mas.....	39
1.4.1.1 Sprzężenie chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas.....	40
1.4.1.2 Sprzężenie chromatografu gazowego ze spektrometrem mas.....	43
1.4.2 Metody analizy danych.....	44
1.5 Zastosowanie spektrometrii mas do analizy strukturalnej związków fenolowych...	45
II. CEL PRACY.....	50
III. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE.....	52
3.1 Stosowane odczynniki.....	52
3.2 Opis przebiegu eksperymentów.....	54
3.2.1 Analiza zmian profili fenolowych metabolitów wtórnych łubinu wąskolistnego (<i>Lupinus angustifolius</i>) w odpowiedzi na infekcję patogennym grzybem (<i>Colletotrichum lupini</i>) oraz elisytację zawiesiną toksycznych metabolitów <i>C.lupini</i>.....	54
3.2.1.1 Materiał roślinny.....	55

3.2.1.2 Przygotowanie zawiesiny zarodników grzyba <i>C.lupini</i>	56
3.2.1.3 Izolacja i oczyszczanie toksycznych metabolitów <i>C.lupini</i>	56
3.2.1.4 Infekcja łubinu wąskolistnego zawiesiną zarodników <i>C.lupini</i> oraz elisytacja toksyną wyizolowaną z komórek grzyba.....	57
3.2.1.5 Ekstrakcja metabolitów wtórnych wyizolowanych z tkanek łubinu wąskolistnego.....	58
3.2.1.6 Derywatyzacja.....	59
3.2.1.7 Analiza LC/MS i GC/MS.....	59
3.2.1.8 Analiza danych LC/MS i GC/MS.....	59
3.2.1.9 Analiza RT-PCR.....	60
3.2.2 Analiza strukturalna i profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinów meksykańskich w korelacji z gatunkami regionu śródziemnomorskiego.....	61
3.2.2.1 Materiał roślinny.....	61
3.2.2.2 Ekstrakcja i oczyszczanie fenolowych metabolitów wtórnych obecnych w liściach i korzeniach łubinu.....	62
3.2.2.3 Analiza LC/MS.....	62
3.2.2.4 Analiza chemotaksonomiczna.....	62
3.2.3 Zastosowanie techniki LC/MS/MS do profilowania glikozylowanych flawonoidów w korzeniach siewek, korzeniach włóknikowatych i zawiesinowych hodowlach komórek korzeniowych modelowej rośliny motylkowatej <i>Medicago truncatula</i>.....	63
3.2.3.1 Materiał roślinny.....	63
3.2.3.2 Ekstrakcja fenolowych metabolitów z tkanek korzeni <i>M.truncatula</i>	64
3.2.3.3 Ekstrakcja do fazy stałej pożywek pohodowlanych.....	64
3.2.3.4 Analiza LC/MS.....	64
3.2.4 Wykorzystanie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID) do analizy strukturalnej i profilowania flawonoidów obecnych w liściach pszenicy zwyczajnej (<i>Triticum aestivum</i>).....	64
3.2.4.1 Materiał roślinny.....	64
3.2.4.2 Ekstrakcja i oczyszczanie fenolowych metabolitów z liści pszenicy.....	65

3.2.4.3 Analiza LC/MS.....	65
3.2.5 Zastosowanie kationów metali w procesie jonizacji przez elektrorozpraszanie (ESI), celem uzyskania danych na temat wzorca glikozylacji aglikonów fenolowych.....	65
3.3 Aparatura analityczna.....	66
3.3.1 Chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (GC/TOF-MS).....	66
3.3.2 Chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas z hybrydowym analizatorem typu kwadrupol-analizator czasu przelotu (LC/ESI-Qq-ToF).....	66
3.3.3 Chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas z analizatorem typu pułapka jonowa (LC/ESI-IT).....	69
3.3.4 Spektrometr mas z analizatorem typu pułapka jonowa (ESI-IT).....	70
3.3.5 System TriVersa NanoMate.....	70
IV. WYNIKI	73
4.1 Analiza zmian profili fenolowych metabolitów wtórnych łubinu wąskolistnego (<i>Lupinus angustifolius</i>) w odpowiedzi na infekcję patogennym grzybem (<i>Colletotrichum lupini</i>) oraz elisytację zawieszoną toksycznych metabolitów <i>C.lupini</i>.....	73
4.1.1 Identyfikacja związków fenolowych w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego metodą LC/MS.....	73
4.1.2 Identyfikacja metabolitów obecnych na powierzchni liści łubinu wąskolistnego metodą GC/MS.....	78
4.1.3 Analiza ilościowa fenolowych metabolitów wtórnych.....	79
4.1.4 Profile fenolowych metabolitów łubinu w odpowiedzi na stres biotyczny.....	81
4.1.4.1 Infekcja łubinu zarodnikami <i>C.lupini</i>	82
4.1.4.2 Elisytacja łubinu toksyną wyizolowaną z hodowli grzyba <i>C.lupini</i>	85
4.1.4.3 Infekcja i elisytacja łubinu wąskolistnego grzybem i jego toksyną.....	88
4.1.5 Analiza RT PCR wybranych genów szlaku fenylopropanoidowego.....	90
4.2 Analiza strukturalna i profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinów meksykańskich w korelacji z gatunkami regionu śródziemnomorskiego.....	91
4.2.1 Analiza strukturalna związków fenolowych.....	91

4.2.1.1 Analiza strukturalna flawonoidów obecnych w ekstraktach łubinu meksykańskiego <i>Lupinus reflexus</i>	92
4.2.1.2 Analiza strukturalna związków fenolowych w różnych gatunkach łubinów meksykańskich i europejskich.....	100
4.2.1.3 Utworzenie biblioteki widm masowych.....	116
4.2.2 Profilowanie flawonoidów obecnych w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinu.....	116
4.2.3 Analiza chemotaksonomiczna.....	117
4.3 Zastosowanie techniki LC/MS/MS do profilowania glikozylowanych flawonoidów w korzeniach siewek, korzeniach włóśnikowatych i zawieszinowych hodowlach komórek korzeniowych modelowej rośliny motylkowatej <i>Medicago truncatula</i>.....	118
4.4 Wykorzystanie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID) do analizy strukturalnej i profilowania flawonoidów obecnych w liściach pszenicy zwyczajnej (<i>Triticum aestivum</i>).....	127
4.5 Wykorzystanie techniki spektrometrii mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją do analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych - aspekty metodyczne.....	138
V. DYSKUSJA.....	144
5.1 Analiza zmian profili fenolowych metabolitów wtórnych łubinu wąskolistnego (<i>Lupinus angustifolius</i>) w odpowiedzi na infekcję patogennym grzybem (<i>Colletotrichum lupini</i>) oraz elisytację zawiesziny toksycznych metabolitów <i>C.lupini</i>.....	144
5.2 Analiza strukturalna i profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinów meksykańskich w korelacji z gatunkami regionu śródziemnomorskiego.....	152
5.3 Zastosowanie techniki LC/MS/MS do profilowania glikozylowanych flawonoidów w korzeniach siewek, korzeniach włóśnikowatych i zawieszinowych hodowlach komórek korzeniowych modelowej rośliny motylkowatej <i>Medicago truncatula</i>.....	158
5.4 Wykorzystanie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID) do analizy strukturalnej i profilowania flawonoidów obecnych w liściach pszenicy zwyczajnej (<i>Triticum aestivum</i>).....	160
5.5 Wykorzystanie techniki spektrometrii mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją do analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych - aspekty metodyczne.....	162
VI. WNIOSKI.....	170
VII. STRESZCZENIE.....	172
ABSTRACT.....	174

VIII. LITERATURA.....	176
IX. SUPLEMENT.....	196

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABC - kasetą wiążącą ATP (ang. *ATP-binding cassette*)

ANOVA - analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)

APCI - jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *atmospheric pressure chemical ionization*)

APPI - fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *atmospheric pressure photo ionization*)

ATP - adenozylo-5'-trifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*)

BSTFA - N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid
(ang. *N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*)

CE - elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*)

CE/MS - chromatografia kapilarna/spektrometria mas (ang. *capillary electrophoresis/mass spectrometry*)

cDNA - komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)

C4H - 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego (ang. *cinnamic acid 4-hydroxylase*)

CID - kolizyjnie indukowana dysocjacja (ang. *collision induced dissociation*)

CID MS/MS - tandemowa spektrometria mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją
(ang. *tandem mass spectrometry with collision induced dissociation*)

CHR - reduktaza chalconowa (ang. *chalcone reductase*)

CHS - syntaza chalconowa (ang. *chalcone synthase*)

CHI - izomeraza chalconowa (ang. *chalcone isomerase*)

4CL - ligaza 4-kumaroilo-CoA (ang. *4-coumaroyl-CoA ligase*)

DI MS - spektrometria mas z bezpośrednim wprowadzeniem próbki (ang. *direct infusion mass spectrometry*)

DMAPP - pirofosforan dimetyloallilu (ang. *dimethylallyl diphosphate*)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

EI - jonizacja elektronami (ang. *electron impact*)

ER - retikulum endoplazmatyczne (ang. *endoplasmic reticulum*)

ESI - jonizacja przez elektrorozpraszanie (ang. *electrospray ionization*)

ETI - odporność indukowana przez efektory (ang. *effector triggered immunity*)

ETS - wrażliwość wywołana efektozem (ang. *effector-triggered susceptibility*)

F3H - 3-hydroksylaza flawanonowa (ang. *flavanone-3-hydroxylase*)

F3'H - hydroksylaza 3'-flawonoidowa (ang. *flavonoid 3'-hydroxylase*)

FLD - detektor fluorescencyjny (ang. *fluorescence detector*)

FLS2 - białko rozpoznające flagellinę (ang. *flagellin sensing 2*)

FLS - syntaza flawonolowa (ang. *flavonol synthase*)

FS - syntaza flawonowa (ang. *flavone synthase*)

FT-ICR - analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników (ang. *fourier transform ion cyclotron resonance*)

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

GC×GC/MS – dwuwymiarowa chromatografia gazowa/spektrometria mas (ang. *two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry*)

GC/MS - chromatografia gazowa/spektrometria mas (ang. *gas chromatography/mass spectrometry*)

GC/TOF/MS - chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas z detektorem typu analizator czasu przelotu (ang. *gas chromatograph/time of flight/mass spectrometer*)

GST - glutationo S-transferaza (ang. *glutathione S-transferase*)

HCA - hierarchiczna analiza klastrow (ang. *hierarchical cluster analysis*)

2HID - dehydrataza 2-hydroksyizoflawanonowa (ang. *2-hydroxyisoflavanone dehydratase*)

HI4'OMT - 4'-O-metylotransferaza hydroksyizoflawanonowa (ang. *hydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase*)

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

HPLC/NMR - wysokosprawna chromatografia cieczowa/magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *high performance liquid chromatography/nuclear magnetic resonance*)

HR - reakcja nadwrażliwości (ang. *hypersensitive response*)

ICA - analiza składowych niezależnych (ang. *independent component analysis*)

IFS - syntaza izoflawonowa (ang. *isoflavone synthase*)

ISCID - kolizyjnie indukowana dysocjacja w źródle (ang. *in source collision induced dissociation*)

ISR - systemiczna odporność indukowana (ang. *induced systemic resistance*)

IT- pułapka jonowa (ang. *ion trap*)

LCO's - lipochitynowe oligosacharydy (ang. *lipo-chitin oligosaccharides*)

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

LC/ESI-IT - chromatograf cieczowy sprzężony z pułapką jonową z jonizacją przez elektrorozpraszanie (ang. *liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap*)

LC/ESI-Qq-ToF - chromatograf cieczowy sprzężony z analizatorem hybrydowym typu podwójny kwadrupeol - analizator czasu przelotu z jonizacją przez elektrorozpraszanie (ang. *liquid chromatography/electrospray ionization-quadrupole quadrupole-time of flight*)

LC/MS - chromatografia cieczowa/spektrometria mas (ang. *liquid chromatography/mass spectrometry*)

LC/MS/SPE/NMR - chromatografia cieczowa/spektrometria mas/ekstrakcja do fazy stałej/magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *liquid chromatography/mass spectrometry/solid phase extraction/nuclear magnetic resonance*)

LC/NMR - chromatografia cieczowa/magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *liquid chromatography/nuclear magnetic resonance*)

LC/UV/MSⁿ - chromatografia cieczowa z detektorem ultrafioletowym/tandemowa spektrometria mas (ang. *liquid chromatography/ultraviolet/tandem mass spectrometry*)

LRR - powtórzenia bogate w leucynę (ang. *leucine rich repeat*)

MALDI-TOF - desorpcja laserowa z udziałem matrycy-analizator czasu przelotu (ang. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*)

MAMP - wzorce molekularne związane z mikroorganizmami (ang. *microbe-associated molecular patterns*)

MANOVA - wielowymiarowa analiza wariancji (ang. *multivariate analysis of variance*)

MATE - białka odpowiedzialne za usuwanie leków i związków toksycznych (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*)

MEP - fosforan metyloerytroitylu (ang. *methyl erythritol phosphate*)

MRM - monitorowanie reakcji następczych (ang. *multiple reaction monitoring*)

MRP - białka związane z odpornością wielolekową (ang. *multidrug resistance-associated proteins*)

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

MS/MS - tandemowa spektrometria mas (ang. *tandem mass spectrometry*)

MSⁿ - tandemowa spektrometria mas n-tego rzędu (ang. *multiple stage mass spectrometry*)

MT - malonylotransferazy (ang. *malonyltransferase*)

MSTFA - N-metylo-N-trimetylsililo-trifluoroacetamid (ang. *N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*)

NB-LRR - miejsce wiążące nukleotyd - bogate w powtórzenia leucynowe (ang. *nucleotide binding site-leucine-rich repeat*)

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

OMT - O-metylotransferazy (ang. *O-methyltransferase*)

PAL - amoniakolizazy fenyloalaniny (ang. *phenylalanine ammonia lyase*)

PAMP - wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns*)

PCA - analiza składowych głównych (ang. *principal component analysis*)

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

PR - białka związane z patogenezą (ang. *pathogenesis related proteins*)

PRR - receptory rozpoznające wzorce (ang. *pattern recognition receptors*)

PTI - odporność indukowana przez wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *PAMP-triggered immunity*)

R (białka) - białka odporności (ang. *resistance proteins*)

QA - alkaloidy chinolizydynowe (ang. *quinolizidine alkaloids*)

QqQ- potrójny analizator kwadropolowy (ang. *triple quadrupole*)

Qq-ToF - analizator hybrydowy typu podwójny kwadropol sprzężony z analizatorem czasu przelotu (ang. *quadrupole quadrupole-time of flight*)

QTL - locus cechy ilościowej (ang. *quantitative trait locus*)

RDA (reakcja) - reakcja retro-Dielsa-Aldera (ang. *retro-Diels-Alder reaction*)

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

ROS - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

RP - faza odwrócona (ang. *reversed phase*)

RT-PCR - PCR z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcriptase PCR*)

SAM - S-adenozyl-L-metionina (ang. *S-adenosyl methionine*)

SAR - systemiczna odporność nabyta (ang. *systemic acquired resistance*)

SIC - chromatogram pojedynczego jonu (ang. *single ion chromatogram*)

SCX - silny wymiennicz kationowy (ang. *strong cation exchanger*)

SPE - ekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid phase extraction*)

TIC - chromatogram całkowitego prądu jonowego (ang. *total ion chromatogram*)

TMS - grupa trimetylosililowa (ang. *trimethylsilyl*)

TOF - analizator czasu przelotu (ang. *time of flight*)

TOF/MS - spektrometr mas z analizatorem czasu przelotu (ang. *time of flight/mass spectrometer*)

UDP - urydino-5'-difosforan (ang. *uridine 5'-diphosphate*)

UGT - UDP-glukozylotransferaza (ang. *UDP-glucosyltransferase*)

UPLC - ultrasprawną chromatografię cieczową (ang. *ultra high pressure liquid chromatography*)

UV - promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet*)

VIS - promieniowanie widzialne (ang. *visible*)

I. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1 Fenolowe metabolity wtórne

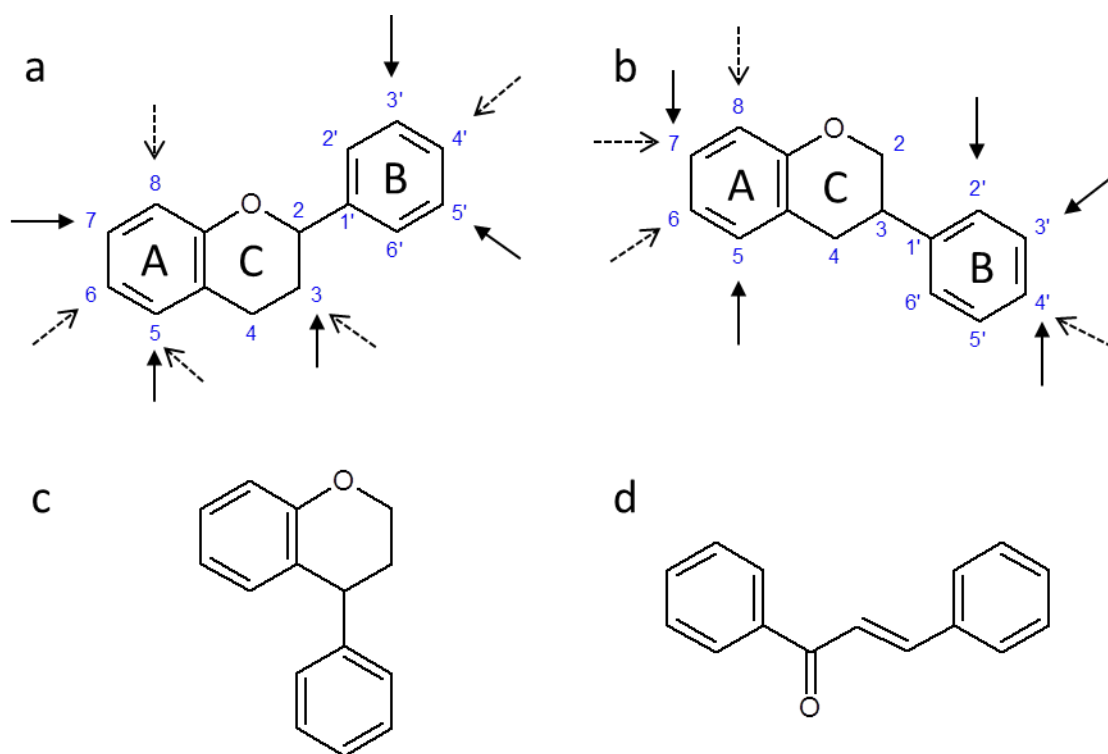
Flawonoidy stanowią szeroką i zróżnicowaną grupę roślinnych metabolitów wtórnych. Dotychczas sklasyfikowanych zostało ponad dziesięć tysięcy związków, a ich liczba stale wzrasta (Aoki i in., 2000; Veitch i Grayer, 2008; Roowi i Crozier, 2011; Cao i in., 2013). Te niskocząsteczkowe produkty naturalne syntetyzowane są powszechnie w tkankach roślinnych, będąc składnikiem komórek liści, korzeni, nasion, owoców czy kory drzew. Zarówno zwierzęta jak i grzyby nie posiadają zdolności biosyntezy flawonoidów, za wyjątkiem nielicznych koralowców, *Echinopora lamellose* (Sanduja i in., 1984) oraz grzybów, *Aspergillus candidus* Link (Bird i Marshall, 1969; Marchelli i Vining, 1973), *Phallus impudicus* (Bohm, 1975). Przez człowieka przyswajane są w postaci owoców i warzyw, a ponadto wchodzi w skład leków i suplementów diety. Ze względu na funkcje jakie pełnią w wielu procesach fizjologicznych i biochemicznych w komórce roślinnej, jak również korzystny wpływ na zdrowie człowieka, zainteresowanie tą grupą związków stale wzrasta.

1.1.1 Struktura i jej modyfikacje

Termin „flawonoidy” określa potocznie grupę związków, których struktura oparta jest na szkielecie węglowym C₆-C₃-C₆, gdzie dwa pierścienie aromatyczne A i B połączone są mostkiem trójwęglowym. W przypadku większości struktur, wewnętrzny łańcuch jest zamknięty w heterocykliczny pierścień C. W zależności od pozycji podstawienia pierścienia B do ugrupowania chromonu, wyróżniamy 3 główne klasy tych związków: flawonoidy, izoflawonoidy i neoflawonoidy. Większość flawonoidów opiera się na strukturze chalkonu (Ryc.1.1). W zależności od stopnia utlenienia pierścienia C lub podstawienia pierścienia B wyróżnia się poszczególne podklasy tych związków. Spośród najważniejszych można wyróżnić flawony, flawanony, flawonole, antocyjanidyny, izoflawony, rotenoidy, pterokarpany, chalkony czy aurony (Ryc.1.2) (Marais i in., 2006).

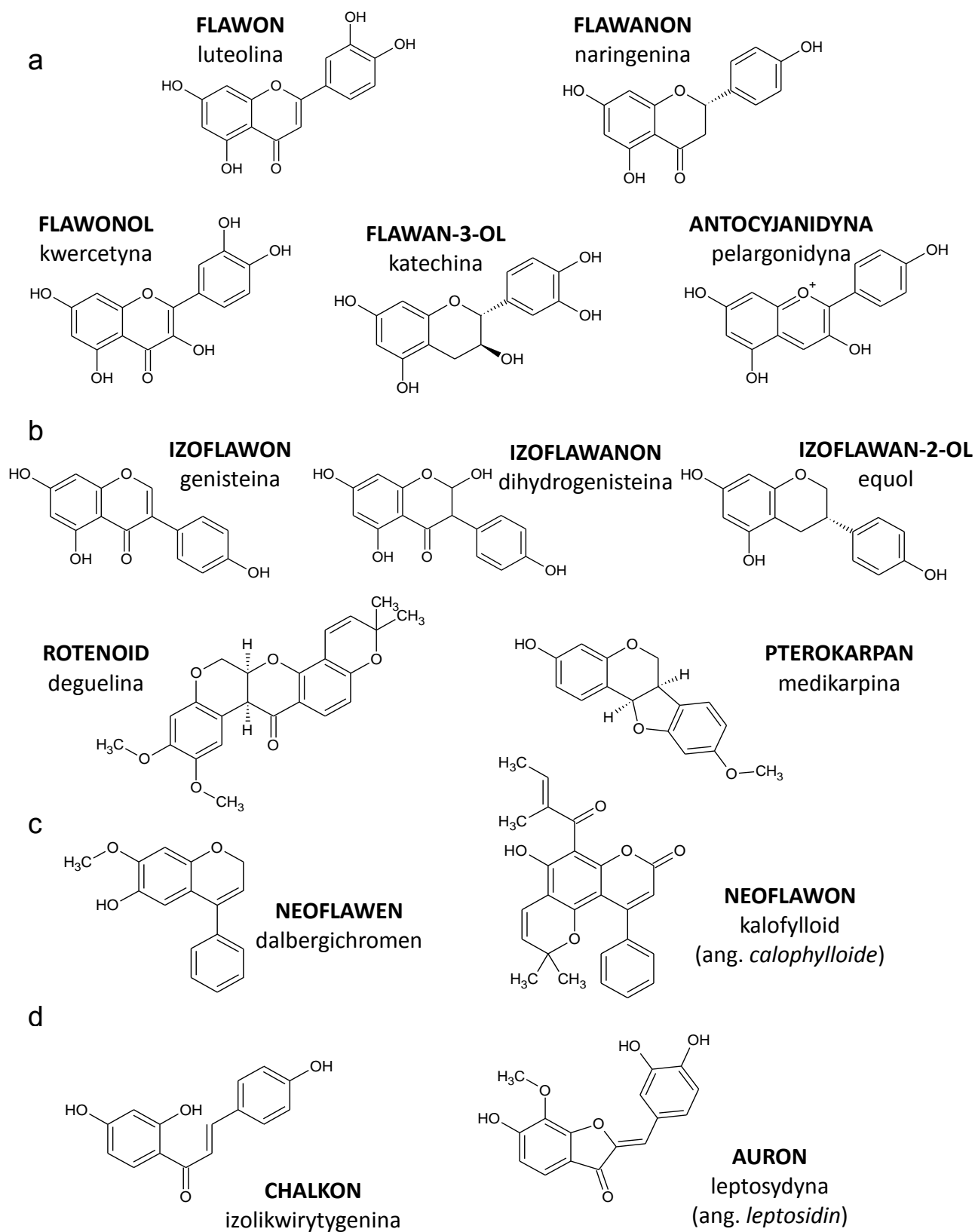
Flawonoidy w swojej strukturze zawierają grupę chromoforową, dzięki której absorbują światło w szerokim zakresie promieniowania ultrafioletowego (UV) i widzialnego (VIS). Ze względu na obecność pierścienia A, pierwsze maksimum absorpcji przypada na zakres $\lambda=240-285$ nm. Drugie maksimum w zakresie długości fali 300-550 wynika z różnego stopnia utlenienia pierścienia C oraz miejsca przyłączenia pierścienia B. W zależności od klasy związku maksima absorpcji mogą przypadać w różnym zakresie długości fali od 240-550 nm (Mabry i in., 1970). Izoflawony absorbują promieniowanie przy $\lambda=260$ nm. Flawony

i flawonole posiadają dwa maksima absorpcji w zakresie światła UV-B. Natomiast w przypadku antocyjanin zakres absorpcji przesunięty jest w stronę światła widzialnego (Swain, 1976).



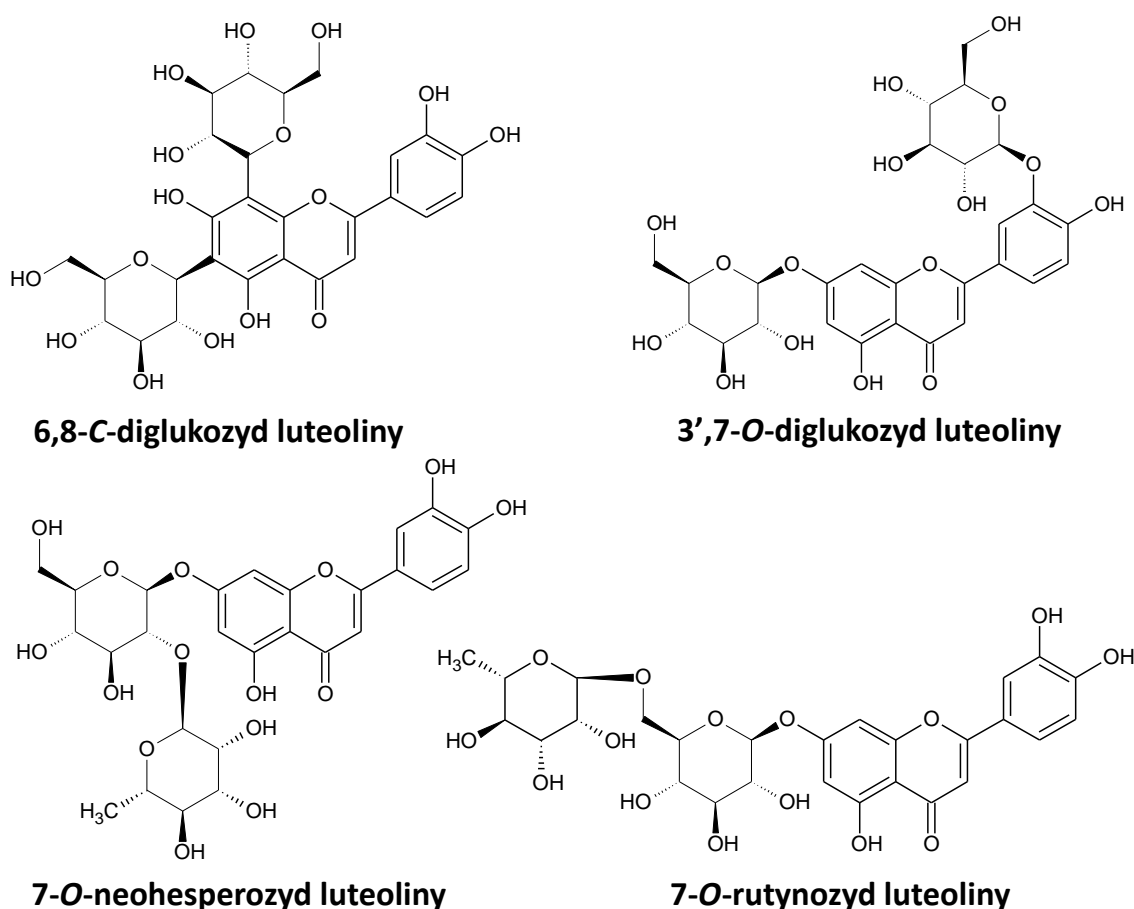
Ryc. 1.1 Struktury 3 klas związków fenolowych opartych na szkielecie C₆-C₃-C₆: flawonoidy (a), izoflawonoidy (b), neoflawonoidy (c) oraz struktura chalkonu (d). Struktury flawonoidów i izoflawonoidów zawierają oznaczenia pierścieni (A,B,C), numery atomów węgla w pierścieniach oraz najczęstsze pozycje hydroksylacji (—→) oraz O- i/lub C-glikozylacji (-----→).

Flawonoidy w komórce roślinnej ulegają wielu modyfikacjom. Do najczęstszych należą hydroksylacja w pozycji 3, 5, 7, 3', 4', 5' (Ryc.1.1), metylacja oraz glikozylacja. Innymi formami modyfikacji są acylacja kwasami aromatycznymi lub alifatycznymi, sulfonowanie, prenylacja czy izoprenylacja. Ugrupowania te mogą być przyłączone bezpośrednio lub poprzez cząsteczkę cukrową do rdzenia aglikonu. Flawonoidy naturalnie występują zazwyczaj w postaci O- lub C-glikozydów. Częściej spotykane są formy O-glikozylowane, gdzie cząsteczka cukru przyłączona jest do grupy hydroksylowej, podstawionej na atomie węgla w pierścieniu aglikonu w pozycji 3, 7, 4'. Rzadziej występujące C-glikozydy zawierają cząsteczkę cukrową w pozycji C-6 lub C-8 (Ryc.1.1) (Iwashina, 2000).



Ryc.1.2 Wybrane struktury najczęściej spotykanych flawonoidów (a), izoflawonoidów (b), neoflawonoidów (c) oraz pomniejszych flawonoidów (ang. *minor flavonoids*) (d) (według Marais i in., 2006).

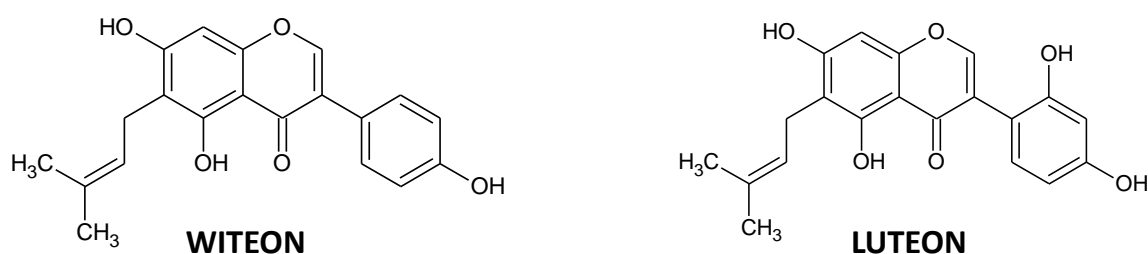
Najczęściej podstawianym cukrem jest glukoza. Rzadziej występują galaktoza, ramnoza, ksyloza czy arabinoza. Mannoza, fruktoza czy kwas glukuronowy należą do najrzadziej obserwowanych podstawników cukrowych. Flawonoidy najczęściej występują w postaci mono- lub di-glikozydów, rzadziej tri-, tetra- czy penta-glikozydów. W przypadku wielocukrowych pochodnych flawonoidów, najpopularniejsze jest podstawienie glukozą i ramnozą, które to mogą być połączone wiązaniem 1→6, tworząc rutynozyd, lub wiązaniem 1→2, stanowiąc neohesperozyd. W przypadku diglikozydów, w zależności od miejsca i sposobu podstawienia grupą cukrową, wyróżnia się *O/C*-diglikozydy, di-*O/C*-glikozydy lub *C,O*-diglikozydy (Ryc.1.3) (Jay, 1994).



Ryc.1.3 Przykładowe struktury diglikozydów luteoliny obrazujące różne sposoby glikozylacji.

Modyfikacje flawonoidów grupami hydroksylowymi, metoksyłowymi, prenylacją, acylacja czy glikozylacja, prowadzą do powstania szerokiej grupy związków, zróżnicowanych zarówno pod względem struktury jak i pełnionych funkcji w roślinie. Skutkuje to często wzmocnieniem aktywności biologicznej danego związku, co może się przejawiać np. w intensyfikacji koloru kwiatów czy owoców. Wzór hydroksylacji pierścienia B

antocyjanidyn jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za nadawanie koloru przez tę grupę związków. Wszystkie flawonoidy posiadają grupę hydroksylową w pozycji 4'. Hydroksylacja pierścienia B w dodatkowych pozycjach kontrolowana jest, między innymi, przez enzymy cytochromu P450, co prowadzi do powstania niebieskiego barwnika w postaci delfinidyny (antocyjanidyna) (Winkel-Shirley, 2001). *O*-metylacja flawonoidów, katalizowana przez *O*-metylotransferazy (OMT), powoduje zwiększenie ich rozpuszczalności, wpływa na ich rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe oraz zwiększa aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą (Ibrahim i in., 1987). Podstawienie szkieletu aglikonu grupą prenylową nadaje izoflawonoidom właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Prenylacja genisteiny i 2'-hydroxygenisteiny prowadzi do powstania charakterystycznych dla łubinu fitoaleksyn, odpowiednio witeonu i luteonu (Ryc.1.4) (Tahara i Ibrahim, 1995).



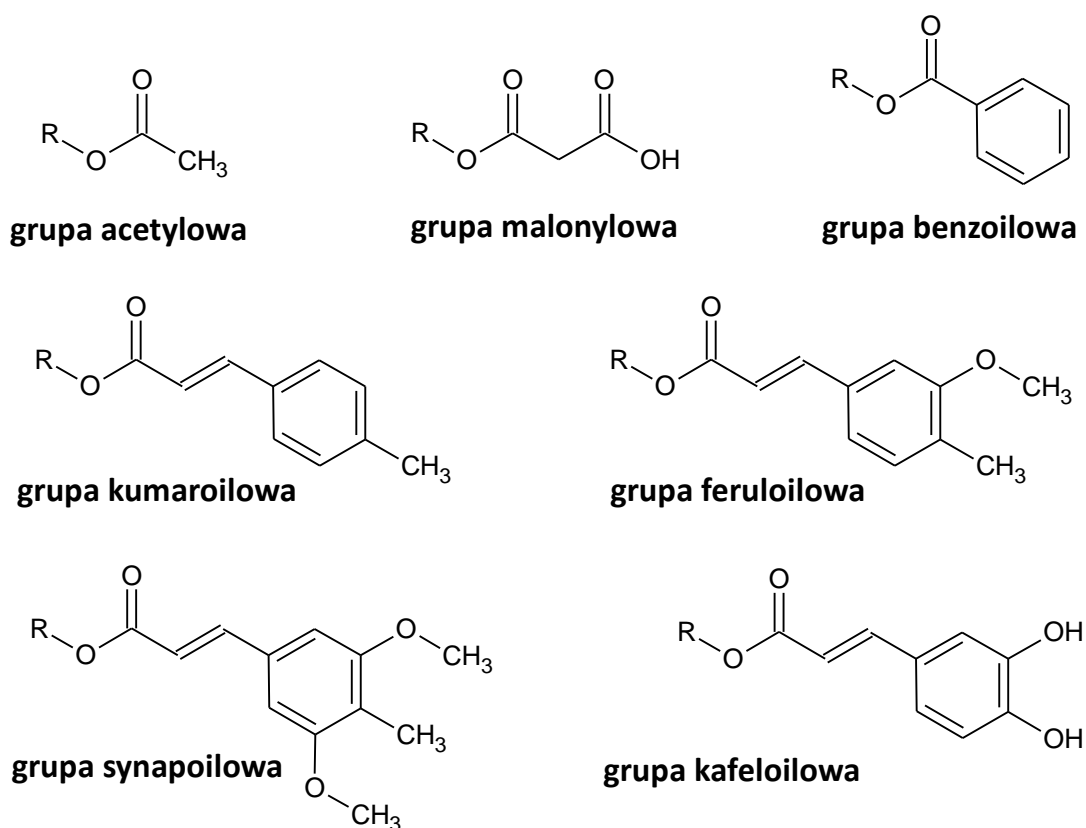
Ryc.1.4 Przykłady prenylowanych izoflawonoidów obecnych w łubinie.

Flawonoidy występują w komórce zazwyczaj w formie glikozylowanej, która to umożliwia ich magazynowanie w wakuoli. Często glikozylowane pochodne, acylowane są kwasami aromatycznymi lub alifatycznymi (Ryc.1.5), co zapewnia im różne właściwości biochemiczne. Podstawienie kwasami aromatycznymi (np. kumarowym, ferulowym, kawowym) odpowiada za właściwości barwne antocyjanidyn. Rola acylacji kwasami alifatycznymi jest stosunkowo najsłabiej poznana. Postuluje się, że malonylacja zapewnia stabilizację i ochronę flawonoidów przed degradacją enzymatyczną. Ponadto odpowiada za transport i przechowywanie związków fenolowych w komórce (Zhao i in., 2011).

1.1.2 Biosynteza i transport flawonoidów

Powszechnie uważa się, że biosynteza flawonoidów przebiega w cytozolu komórek różnych tkanek roślinnych, skąd następnie związki te mogą być transportowane lub gromadzone w wakuolach. Synteza flawonoidów może zachodzić w sposób tkankowo-specyficzny lub w reakcji na stres biotyczny czy abiotyczny. Szlak przemian prowadzących do

powstania fenolowych metabolitów wtórnych jest katalizowany przez szereg enzymów tworzących kompleks multienzymatyczny. Enzymy te, w przeważającej części występują w cytozolu, a niektóre z nich połączone są z błoną retikulum endoplazmatycznego (ER) (Kitamura, 2006). Biosynteza flawonoidów regulowana jest przez ekspresję zaangażowanych w nią licznych genów, różniących się w zależności od gatunku rośliny (Quattrocchio i in., 2006).



Ryc.1.5 Alifatyczne i aromatyczne ugrupowania występujące w połączeniach z flawonoidami.

Szlak biosyntezy fenylopropanoidów stanowi sieć złożonych i rozgałęzionych przemian i reakcji biochemicznych, prowadzących do powstania różnych klas związków fenolowych (Ryc.1.6). Substratami wyjściowymi do ich syntezy są produkty dwóch szlaków przemian metabolizmu pierwotnego. Jednym z substratów jest malonylo-CoA, powstający z produktu glikolizy, acetylo-CoA, w szlaku kwasu malonowego. Drugi substrat stanowią aminokwasy aromatyczne, fenyloalanina i tyrozyna, powstające z fosfoenolopirogronianu (produktu glikolizy) oraz fosforanu erytrozyny (dostarczonego w szlaku pentozo-fosforanowym) w szlaku kwasu szikimowego (Stafford, 1981).

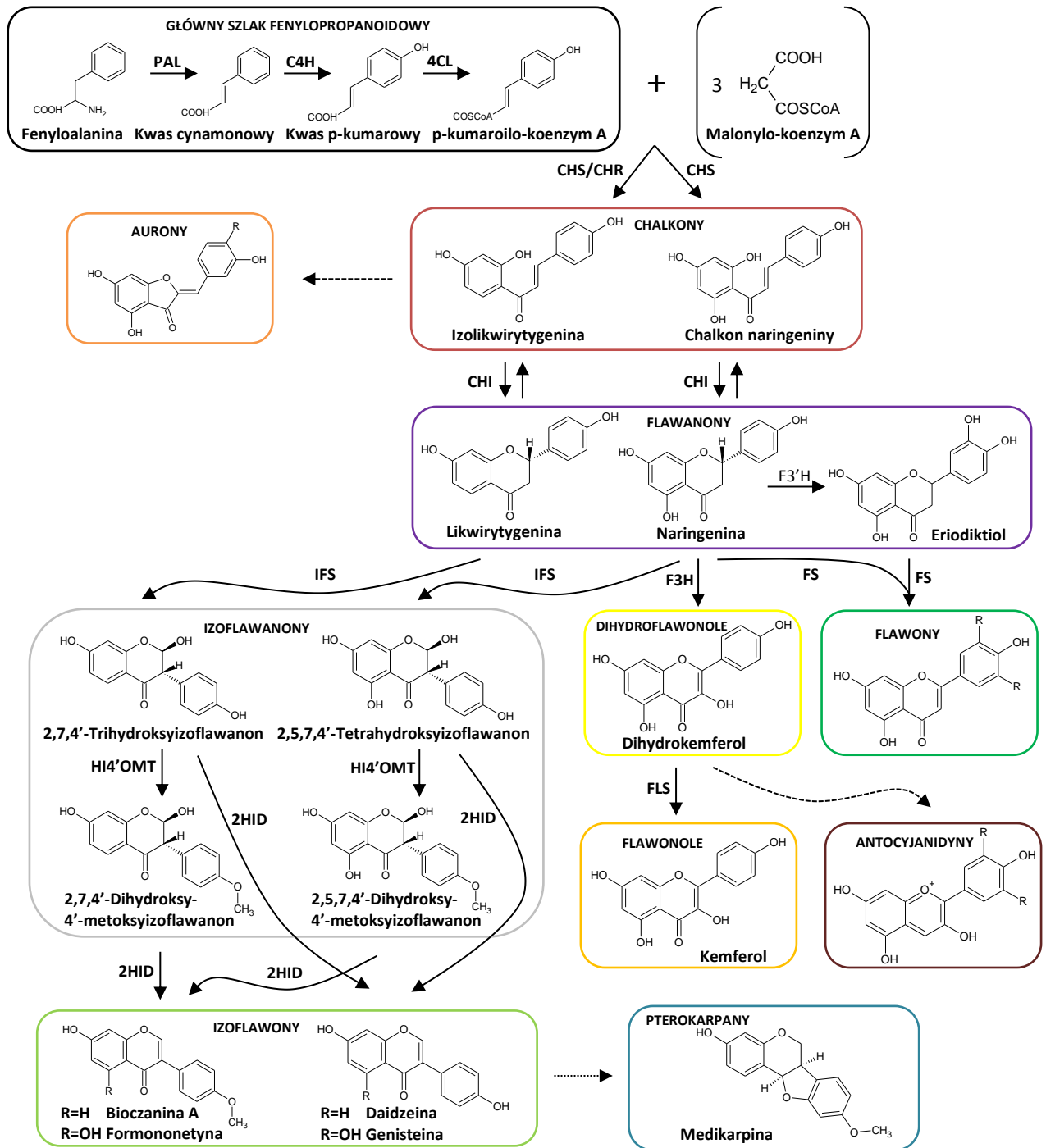
W pierwszych reakcjach szlaku fenylopropanoidowego fenyloalanina przekształcana jest z udziałem amoniakolizy fenyloalaniny (PAL) do kwasu *trans*-cynamonowego. Następnie

kwasy te ulegają hydroksylacji do kwasu *trans*-4-kumarowego. Reakcja ta katalizowana jest przez 4-hydroksylazę kwasu cynamonowego (C4H). W dalszej kolejności kwas p-kumarowy przekształcany jest przy udziale ligazy 4-kumaroilo-CoA (4CL) do p-kumaroilo-CoA (Winkel-Shirley, 2006).

Jednym z kluczowych enzymów szlaku biosyntezy fenylopropanoidów jest syntaza chalkonowa (CHS). Katalizuje on reakcję przyłączenia trzech jednostek octanowych, pochodzących z malonylo-CoA, do p-kumaroilo-CoA, w wyniku czego powstaje struktura chalkonu C₆-C₃-C₆ z otwartym pierścieniem C. Prekursorem pierścienia A są cząsteczki malonylo-CoA, natomiast p-kumaroilo-CoA jest prekursorem pierścienia B i źródłem atomów węgla w pierścieniu C. Produktem reakcji katalizowanej przez syntazę chalkonową jest chalkon naringeniny (2',4',6',4-tetrahydroksychalkon). U roślin, które posiadają dodatkowo enzym reduktazę chalkonową (CHR) dochodzi również do syntezy 2',4',4-trihydroksychalkonu-izolikwirytygeniny (Dixon i Steele, 1999). Chalkony te rzadko akumulowane są w komórce, ze względu na fakt, że izomeraza chalkonowa (CHI) szybko przekształca je w naringeninę lub likwirytygeninę. U roślin występują dwa typy izomerazy chalkonowej. Substratem dla izomerazy chalkonowej pierwszego typu są 6'-hydroksychalkony, natomiast drugi typ enzymu, który charakterystyczny jest dla roślin bobowatych, jako substrat wykorzystuje zarówno 6'-hydroksy- jak i 6'-deoksy-chalkony (Du i in., 2010). Reakcja katalizowana przez izomerazę chalkonową jest całkowicie stereoselektywana, a jej produktem jest (-)-2S-flawanon (Stafford, 1990).

Flawanony, naringenina i likwirytygenina, ulegają kolejnym reakcjom szlaku biosyntezy fenylopropanoidów, w wyniku czego powstają różne klasy związków fenolowych. Naringenina jest substratem do produkcji flawonoidów począwszy od flawonów, flawonoli, flawanów, poprzez antocyjanidyny, aż do wielobarwnych antocyjanin. Izoflawonoidy, które są charakterystyczne dla roślin bobowatych (Fabaceae), mogą powstawać w cyklu przemian zarówno z naringeniny jak i likwirytygeniny. Kluczowym enzymem, biorącym udział w konstrukcji szkieletu izoflawonoidów, jest należąca do podrodziny enzymów cytochromu P450 (CYP93C) syntaza izoflawonowa (IFS). Katalizuje ona nietypową reakcję migracji pierścienia B z pozycji C-2 do C-3, w wyniku czego flawanon przekształcany jest w 2-hydroksyizoflawanon (Steele i in., 1999; Jung i in., 2000). Powstały produkt przejściowy ulega dehydratacji przy udziale enzymu 2HID (dehydratazy 2-hydroksyizoflawanonowej), tworząc izoflawony daidzeinę i genisteinę. Daidzeina, będąca prekursorem fitoaleksyn, może ulegać dalszym przekształceniom tworząc medikarpinę lub gliceolinę. W przypadku niektórych bobowatych, przejściowy produkt 2-hydroksyizoflawanon w pierwszej kolejności ulega

metylacji przy udziale 4'-O-metylotransferazy hydroksyizoflawnonowej (HI4'OMT) a dopiero w następnej kolejności dehydratacji (Akashi i in., 2003).



Ryc.1.6 Uproszczony schemat szlaku biosyntezy fenylopropanoidów. Enzymy: *PAL* amoniakolizaza fenyloalaniny, *C4H* 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego, *4CL* ligaza 4-kumaroilo-CoA, *CHS* syntaza chalkonowa, *CHR* reduktaza chalkonowa, *CHI* izomeraza chalkonowa, *F3'H* hydroksylaza 3'-flawnonowa, *FS* syntaza flawnonowa, *F3H* 3-hydroksylaza flawnonowa, *IFS* syntaza izoflawnonowa, *FLS* syntaza flawnonowa, *HI4'OMT* 4'-O-metylotransferaza hydroksyizoflawnonowa, *2HID* dehydrataza 2-hydroksyizoflawnonowa. reakcja jednoetapowa \longrightarrow reakcja wieloetapowa \dashrightarrow (według: Dixon i Steele, 1999; Winkel-Shirley, 2001; Shimamura i in., 2007; Du i in., 2010; Zhao i in., 2011).

Nowo zsyntetyzowany rdzeń aglikonu ulegać może różnego rodzaju modyfikacjom, które umożliwiają flawonoidom pełnienie określonych funkcji w komórce roślinnej. Do najczęściej spotykanych modyfikacji należą metylacja, malonylacja, glikozylacja i prenylacja. Enzymy katalizujące tego typu reakcje należą do klasy transferaz.

Roślinne *O*-metylotransferazy katalizują reakcję przeniesienia grupy metylowej *S*-adenozyl-L-metioniny (SAM) na grupę hydroksylową cząsteczki flawonoidów. W zależności od typu akceptora grupy metylowej oraz sekwencji aminokwasowej, OMT dzieli się na dwie klasy: I i II. Metylacja flawonoidów wpływa na ich rozpuszczalność w komórce oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe. W szlaku biosyntezy izoflawonoidów *O*-metylotransferazy katalizują powstawanie związków biorących udział w mechanizmach obronnych rośliny. Najczęściej metylowane są grupy hydroksylowe podstawione na atomach węgla C-3' i C-4' pierścienia B (Ibrahim i in., 1987).

Równie często występującą modyfikacją jest glikozylacja, katalizowana przez UDP-glukozylotransferazy (UGT). Reakcja ta polega na przeniesieniu grupy cukrowej z UDP-glukozy na cząsteczkę akceptorową, jaką jest aglikon. Pozycja glikozylacji znacząco wpływa na aktywność biologiczną flawonoidu oraz jest czynnikiem zwiększającym różnorodność strukturalną tych związków. Izoflawonoidy najczęściej glikozylowane są w pozycji C-7 pierścienia A, rzadziej w pozycji C-4' pierścienia B. U bobowatych glikozylacja grupy hydroksylowej przy atomie węgla C-7 pierścienia A, a następnie malonylacja cząsteczki glukozy w pozycji C-6'', umożliwia utworzenie formy łatwej do magazynowania w wakuolach (Dixon i Sumner, 2003).

Reakcja prenylacji grupy hydroksylowej lub węgla pierścienia fenolowego dotyczy w przeważającym stopniu izoflawonoidów (Tahara i Ibrahim, 1995). Obecność grupy prenylowej nadaje cząsteczkom właściwości przeciugrzybiczne i przeciwbakteryjne, poprzez zwiększenie ich lipofilowości i przepuszczalności przez błony biologiczne. Reakcja katalizowana jest przez zlokalizowane w plastydach, specyficzne substratowo prenylotransferazy, w obecności jonów Mg^{2+} . Substratem reakcji jest grupa izoprenylova, pirofosforan dimetyloallilu (DMAPP), powstająca w szlaku fosforanu metyloerytroitylu (MEP) (Yazaki i in., 2009). W przypadku izoflawonów prenylacji ulegają najczęściej atomy C-6 lub C-8 pierścienia A aglikonu oraz C-2 lub C-4 w przypadku pterokarpanów (Akashi i in., 2009). Malonylotransferazy (MT) katalizują reakcję przeniesienia grupy malonylowej z malonylo-CoA na cząsteczkę flawonoidu. Malonylacji ulegają w większym stopniu cząsteczki glikozylowane niż same aglikony. Rola tego typu modyfikacji flawonoidów jest stosunkowo najslabiej poznana. Wykazano, że malonylacja odgrywa istotną rolę w stabilizacji chromoforu

antocyjanin (Suzuki i in., 2004, 2007). Ponadto postuluje się, że malonylowane flawonoidy pełnią rolę cząsteczek sygnałnych, umożliwiając transport do poszczególnych przedziałów komórkowych. Uznaje się również, że malonylacja i glikozylacja pozwalają na magazynowanie flawonoidów w wakuoli w formie prekursorów fitoaleksyn (Dixon i Stelle, 1999).

Zsyntetyzowane w cytozolu flawonoidy są następnie modyfikowane i przechowywane w wakuoli. Ze względu na funkcje jakie pełnią w komórce, ich obecność zaobserwowano w niemal wszystkich przedziałach komórkowych, między innymi w cytoplazmie, wakuoli, chloroplastach, jądrze komórkowym, retikulum wewnątrzplazmatycznym (ER), a także na powierzchni komórek (Winkel-Shirley, 2001; Lepiniec i in., 2006; Peer i Murphy., 2007). Jednak mechanizmy transportu flawonoidów pozostają nadal stosunkowo słabo poznane. Proponowane są dwie, niekoniecznie wykluczające się hipotezy, transport przy udziale pęcherzyków lub/i transporterów (Zhao i Dixon, 2010). Pierwsza koncepcja dotyczy transportu antocyjanin z cytozolu do wakuoli, poprzez pęcherzyki wywodzące się z retikulum wewnątrzplazmatycznego lub aparatu Golgiego. W drugim modelu uczestniczą różnego rodzaju transportery. Kwaśne środowisko wewnątrz wakuoli utrzymywane jest dzięki dwóm pompom protonowym zlokalizowanym w tonoplaście (błonie wakuolarnej): V-ATP-azowej i V-PP-azowej (pirofosfatazowej) (Sze i in., 1999; Maeshima, 2001). Powstały gradient pH między cytozolem a wakuolą zapewnia wytworzenie potencjału energetycznego, niezbędnego do transportu metabolitów do wnętrza wakuoli (Hopp i Seitz, 1987).

Transport flawonoidów możliwy jest dzięki obecności transporterów ABC (ang. *ATP-binding cassette*), które tworzą rodzinę białek, posiadających kasetę wiążącą ATP. Dzięki energii uwalnianej w wyniku hydrolizy ATP, mają one zdolność transportu cząsteczek przez błony biologiczne (Martinoia i in., 1993). Transport flawonoidów następuje z udziałem jednej z podklas transporterów ABC, a mianowicie białek związanych z odpornością wielolekową – MRP (ang. *multidrug resistance-associated proteins*). Białka te umożliwiają transport glutationowych pochodnych flawonoidów (Lu i in., 1997, 1998). Ze względu na fakt, że białka MRP transportują pochodne glutationowe, niezbędnym elementem systemu transportu flawonoidów są białka GST (glutatio S-transferazy). Enzymy te odpowiedzialne są za akumulację antocyjanin w formie pochodnych glutationowych (Marrs i in., 1995).

Kolejną klasą związków biorących udział w transporcie flawonoidów są transportery MATE (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*) (Brown i in., 1999). Są one odpowiedzialne za usuwanie ksenobiotyków z komórki oraz transport różnego rodzaju cząsteczek (m.in. kationów, kwasów organicznych, metabolitów wtórnych). Do swojego działania wykorzystują

elektrochemiczny gradient protonów lub jonów sodu wytworzonych przez pompy protonowe (Gaxiola i in., 2002). Transportery MATE wykazują specyficzność substratową. W przypadku tytoniu (*Nicotiana tabacum*) transportują niemodyfikowaną nikotynę do wakuoli (Morita i in., 2009), natomiast w przypadku winogrona (*Vitis vinifera*) transportowi ulegają acylowane flawonoidy. Acylacja jest zatem kolejnym mechanizmem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania transportu wewnątrzkomórkowego flawonoidów.

1.1.3 Funkcje pełnione w roślinie i aktywność biologiczna

Flawonoidy odgrywają istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych i biochemicznych zachodzących w komórce. Do ich głównych funkcji należy, między innymi, ochrona tkanek roślinnych przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego, dzięki obecności w strukturze cząsteczki układu chromoforu i sprzężonych wiązań podwójnych. Związki te syntetyzowane są w dużych ilościach w komórkach epidermy oraz rzadziej w warstwie epikutylarnej wosków liści i owoców, w wyniku indukcji przez promieniowanie UV-B. Glikozylowane i acylowane kwasem p-kumarowym flawony i flawonole są uważane za najskuteczniejsze filtry UV-B, ze względu na ich maksima absorpcji w zakresie długości fali 280-320 nm (Skaltsa i in., 1994; Schnitzler i in., 1996; Markham i in., 1998).

Dzięki obecności grup hydroksylowych w pierścieniu aglikonu, flawonoidy posiadają zdolność ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym. Ich działanie polega na neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS), chelatowaniu jonów metali oraz aktywacji enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa czy peroksydazy (Pietta, 2000; Heim i in., 2002).

Flawonoidy, takie jak kwercetyna czy kemferol, modulują polarny transport auksyn zachodzący przy udziale transporterów i białek nośnikowych (Peer i in., 2004, Peer i Murphy, 2007).

Flawonoidy odgrywają również istotną rolę w oddziaływaniach roślin ze środowiskiem zewnętrznym. Warunkują barwę, smak oraz zapach owoców i kwiatów, pełniąc tym samym rolę atraktantów bądź repelentów. Z jednej strony stanowią czynnik wabiący owady, ptaki i ssaki, które roznosząc pyłek kwiatowy czy nasiona przyczyniają się do zapylania i rozprzestrzeniania roślin. Z drugiej strony są związkami odstrasżającymi roślinożerne zwierzęta oraz szkodniki i patogeny. Ponadto biorą udział w oddziaływaniach allelopatycznych. Chalkony, dihydroflawonole, flawonony, flawonole czy izoflawonoidy mogą

przyczyniać się, w różnych stężeniach, do stymulowania lub hamowania kiełkowania i wzrostu innych gatunków roślin (Iwashina, 2003).

Niskocząsteczkowe związki fenolowe pełnią rolę fitoaleksyn, biorąc udział w reakcjach obronnych rośliny podczas infekcji przez mikroorganizmy patogenne - bakterie, grzyby, wirusy. Szczególną rolę podczas infekcji grzybowych pełnią izoflawonoidy, które hamują kiełkowanie spor oraz rozrost grzybni (Cushnie i Lamb, 2005). Stosunkowo dobrze poznanym przykładem takich związków są pterokarpany, mackiaina i pizatyna, które jako fitoaleksyny grochu (*Pisum sativum*) biorą udział w reakcji obronnej podczas infekcji grzybem *Nectria haematococca* (Enkerli i in., 1998; Wasmann i in., 1996). Czynniki wirulencji patogennego grzyba są enzymy zmniejszające toksyczność fitoaleksyn grochu. Pizatyna natomiast wpływa na indukcję białka, które kontroluje transkrypcję wirulentnego enzymu grzybowego (He i in., 1996).

Flawonoidy odgrywają rolę cząsteczek sygnałnych podczas oddziaływań symbiotycznych pomiędzy roślinami motylkowatymi (Fabaceae) a bakteriami brodawkowymi (*Rhizobium* i *Bradyrhizobium*) (Fisher i Long, 1992). Rośliny motylkowate (m.in. łubin, groch, fasola, soja) stanowią liczną rodzinę roślin, powszechnie uprawianych zarówno w Polsce jak i na świecie. Pełnią istotną rolę w żywieniu zwierząt i ludzi, ze względu na zawartość w nasionach i częściach nadziemnych, cennych składników odżywczych (białko, błonnik) i mineralnych. Najważniejszą biologiczną cechą łubinów jest ich zdolność do wiązania azotu atmosferycznego, co daje możliwość daleko idącej oszczędności w stosowaniu nawożenia azotowego. Warunkiem symbiozy jest konieczność wydzielania przez korzeń rośliny motylkowej flawonoidów, które jako cząsteczki sygnałne indukują u bakterii ekspresję genów nodulacji (brodawkowania) *nod* (ang. *nodule*-brodawka). W efekcie bakterie produkują czynnik Nod, będący lipochitynowym oligosacharydem (LCO), który inicjuje powstawanie brodawek i kolonizację korzeni przez bakterie (Wasson i in., 2006). Flawonoidy mogą specyficznie zarówno indukować jak i hamować ekspresję genów *nod*, dzięki czemu bakterie są w stanie rozróżnić gospodarza (Long, 1996).

Flawonoidy występujące powszechnie w owocach, warzywach, herbacie czy winie są ważnym składnikiem diety człowieka, głównie za sprawą ich właściwości przeciwutleniających. Najpowszechniej spożywanym flawonoidem jest flawonol kwercetyna, który w dużych ilościach można znaleźć w jabłkach (Knekt i in., 2002). Spośród flawonoli, równie często obecnymi w żywności są kemferol i mirycetyna, a spośród flawonów luteolina

i apigenina. Najbogatszym źródłem tych bioaktywnych związków jest cebula oraz herbata. Flawonoidy stanowią również składnik pasz dla bydła, trzody chlewnej i drobiu.

Flawonoidy, jako związki biologicznie aktywne, wykazują zróżnicowane działanie farmakologiczne. Dzięki właściwościom antyoksydacyjnym zmniejszają ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego, poprzez wychwyt wolnych rodników zapobiegają degradacji błon biologicznych, białek i kwasów nukleinowych (Hodek i in., 2002). Wykazują właściwości antynowotworowe, głównie związane z rakiem piersi i prostaty (Birt i in., 2001). Szczególnie dobrze poznane są właściwości genisteiny obecnej w soi (*Glicine max*), która hamuje wzrost i proliferację komórek nowotworowych, poprzez inhibicję kinazy tyrozynowej i topoizomerazy II DNA (Ravindranath i in., 2004). Ponadto flawonoidy wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwobrzękowe, rozkurczowe, uspokajające, moczopędne (Harborne i Williams, 2000). Obecnie istotne znaczenie odgrywa również aktywność fitoestrogenowa izoflawonów (Cornwell i in., 2004). Ich właściwości wynikają z podobnej budowy do naturalnego estrogenu, 17 β -estradiolu. Izoflawony sojowe, takie jak genisteina czy daidzeina, poprzez wiązanie się w organizmie człowieka z receptorami estrogenowymi, zmniejszają zagrożenia związane z osteoporozą, miażdżycą czy rakiem oraz łagodzą objawy menopauzy. Z powyższych względów, te naturalne produkty znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle, wchodząc w skład kosmetyków i leków. Nadal jednak prowadzone są badania nad bezpieczeństwem stosowania flawonoidów w medycynie i farmacji. Zaobserwowano, że niektóre z nich mogą wykazywać właściwości mutagenne oraz prooksydacyjne (Walle i in., 2003).

1.2 Mechanizmy obronne roślin

Rośliny stale narażone są na atak przez mikroorganizmy patogenne takie jak wirusy, bakterie i grzyby, które na drodze ewolucji wykształciły różne mechanizmy patogenezy. Bakterie mogą przenikać do tkanek roślinnych poprzez pory, aparaty szparkowe lub bezpośrednio w wyniku zranienia. Grzyby patogenne i symbiotyczne posiadają zdolność wnikania do komórek roślinnych i tworzenia struktur haustorium, dzięki którym mogą pobierać substancje odżywcze. Patogeny roślinne możemy podzielić na biotrofy (*Magnaporthe grisea*/zboża), które czerpią korzyści pokarmowe z żywych komórek, nekrotrofy (*Botrytis cinerea*/*Arabidopsis*), które pobierają pokarm z martwych komórek roślinnych oraz hemibiotrofy (*Colletotrichum lupini*/łubin). Mikroorganizmy patogenne mogą mieć zarówno szeroki zakres żywicieli, jak i ograniczać się do poziomu gatunkowego czy wręcz odmian (Flor, 1971). Patogeny atakujące komórki roślinne wytwarzają specyficzne białka efektorowe,

które rozpoznawane przez gospodarza inicjują reakcję obronną. Rośliny w odpowiedzi na atak patogenu wykształciły różnorodne mechanizmy obronne. Warstwa kutykuli oraz ściana komórkowa, jako stały element budowy tkanek, są pierwszą barierą chroniącą roślinę przed atakiem patogena. Molekularnym mechanizmem obrony roślin przed infekcją jest również wytwarzanie substancji sygnałnych, takich jak kwas salicylowy, jasmonowy czy etylen, które regulują ekspresję genów oraz produkcję reaktywnych form tlenu, fitoaleksyn czy białek związanych z patogenezą (PR) (Somssich i Hahlbrock, 1998).

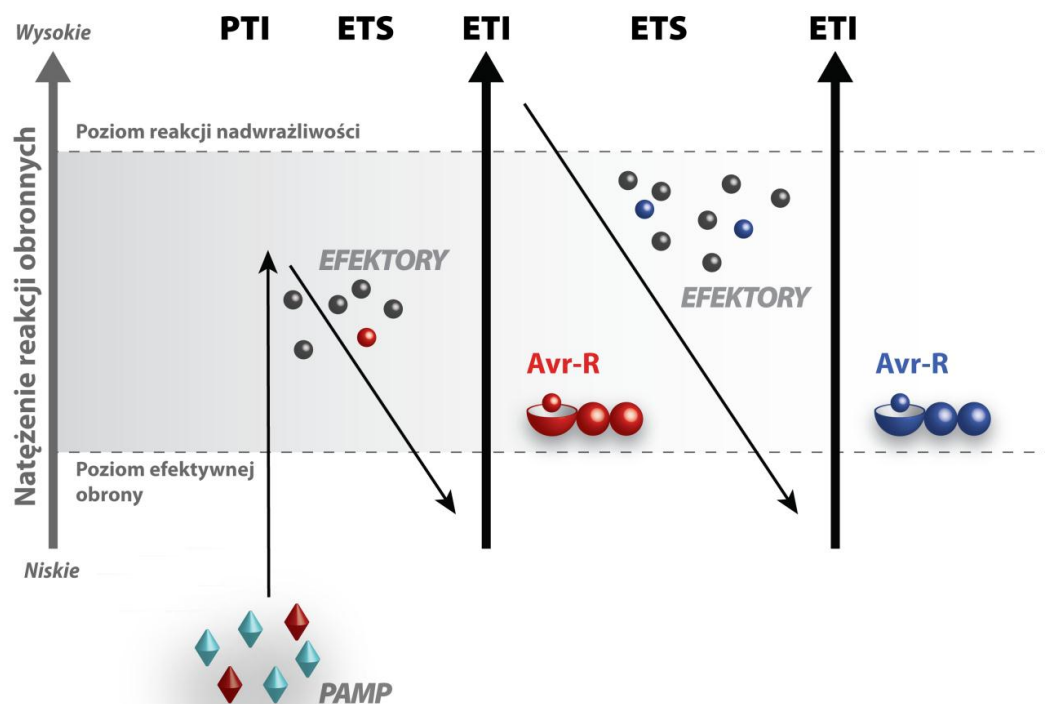
1.2.1 Roślinny układ immunologiczny

Rośliny, w przeciwieństwie do ludzi i zwierząt, nie posiadają adaptacyjnego układu odpornościowego. Możemy natomiast wyróżnić dwie formy odporności wrodzonej: odporność indukowaną przez wzorce (PTI- ang. *PAMP-triggered immunity*) oraz przez efekторы (ETI- ang. *effector triggered immunity*) (Chisholm i in., 2006; Jones i Dangl, 2006). Odporność indukowana przez wzorce jest pierwszą linią obrony rośliny przed patogenem. Uruchamiana jest przez związane z błoną komórkową receptory PRR (ang. *pattern recognition receptor*) rozpoznające wzorce związane z patogenami (PAMP-ang. *pathogen-associated molecular patterns*), które są zakonserwowane pomiędzy przedstawicielami danej klasy mikroorganizmów. Wzorcami molekularnymi, PAMPs/MAMPs (ang. *pathogen/microbe-associated molecular patterns*) (Zhang i Zhou, 2010), rozpoznawanymi przez receptory PRR, mogą być elisytory grzybowe takie jak chityna, ksylanaza lub bakteryjne lipooligosacharydy. Najlepiej dotąd opisanym przykładem tego rodzaju oddziaływań jest rozpoznawanie flageliny (białka budującego wici bakteryjne) przez transmembranowe białko FLS2 (ang. *flagellin sensing 2*) u *Arabidopsis*. 22-aminokwasowy peptyd flageliny - flag22 jest rozpoznawany i wiązany przez bogatą w leucynę domenę LRR (ang. *leucine rich repeat*) kinazowego receptora FLS2 (Gomez-Gomez i Boller, 2000;2002). W wyniku tych oddziaływań uruchamiana jest w komórce reakcja obronna, która przejawia się, między innymi, w zapoczątkowaniu kaskady sygnałowej kinaz MAP (ang. *mitogen-activated protein*), transkrypcji białek PR, depozycji kalozy (Nürnberger i in., 2004).

Jeżeli mikroorganizm patogenny przełamie powyższy system odporności, roślina uruchamia bardziej wyspecjalizowany mechanizm - ETI, zwany również odpowiedzią „gen na gen” (Flor, 1971). Odporność indukowana przez efekторы uruchamiana jest przez wewnątrzkomórkowe białka odporności (ang. *resistance (R)-protein*) wykrywające specyficzne dla danego szczepu patogena białka efektorowe (Avr). Białka efektorowe dostarczane przez mikroorganizm do komórki roślinnej, mają za zadanie zablokować reakcję obronną PTI, do której dochodzi po

wykryciu przez receptory wzorców molekularnych patogena. Roślinne cytoplazmatyczne białka odporności R, zawierające domenę leucynową oraz domenę wiążącą nukleotydy (białka NB-LRR-ang. *nucleotide binding site-leucine rich repeat*) rozpoznają białka Avr patogena i inicjują reakcje obronne, która często prowadzi do powstania reakcji nadwrażliwości HR (ang. *hypersensitive response*) (Dodds i Rathjen, 2010).

Jones i Dangl (2006) ujęli system odporności roślin w modelu „ZigZag” (Ryc.1.7). W pierwszej fazie, podczas ataku patogena, roślina poprzez receptory PRR rozpoznaje wzorce PAMPs/MAMPs i mamy do czynienia z odpornością indukowaną przez wzorce (PTI). W następnej kolejności patogenowi udaje się przełamać barierę odporności, poprzez wytworzenie efektora ETS (ang. *effector-triggered susceptibility*). W kolejnej fazie efektor rozpoznawany jest przez białka R i dochodzi do uruchomienia mechanizmu odporności indukowanej przez efektor (ETI) oraz powstania reakcji nadwrażliwości (HR). Dalej na drodze naturalnej selekcji patogen może wytworzyć nowy efektor, w wyniku czego obniżona zostaje odporność roślin. Kolejna selekcja prowadzi do wyodrębnienia nowych białek R rozpoznających efektor i do wystąpienia odporności ETI. Powtarzający się w ten sposób proces stanowi swoistą ewolucję systemu odporności roślin oraz jest odpowiedzialny za fakt, iż niektóre rośliny posiadają odporność a inne są jej pozbawione.



Ryc.1.7 Model „ZigZag” obrazujący roślinny układ odporności (według Jones i Dangl, 2006).

1.2.2 Reakcje obronne roślin przed infekcją patogenem

Atak organizmu patogennego, kontakt z elisytorem lub zranienie powodują uaktywnienie systemu immunologicznego rośliny i wyzwolenie reakcji obronnych na poziomie molekularnym. W ciągu pierwszych minut po infekcji, dochodzi do alkalizacji apoplastu oraz zmian w przepływie protonów H^+ oraz jonów, K^+ , Cl^- , Ca^{2+} . Następuje również wyrzut wolnych rodników, reaktywnych form tlenu (ROS), co w konsekwencji prowadzi do wybuchu tlenowego (Wojtaszek, 1997). Wybuch oksydacyjny aktywuje kaskadę zmian w komórce roślinnej, w następstwie których dochodzi do wystąpienia lokalnej reakcji nadwrażliwości-HR. W miejscu zakażenia następuje programowana śmierć komórki (apoptoza), powstają zmiany nekrotyczne i dochodzi do zahamowania rozwoju patogena w wyniku odcięcia dopływu substancji odżywczych (wyjątek stanowią nekrofity) (Dangl i in., 1996; Greenberg i in., 1997).

W dalszej kolejności dochodzi do syntezy białek odpowiedzialnych za produkcję substancji sygnałnych takich jak kwas salicylowy, jasmonowy czy etylen (Malamy i in., 1990; Enyedi i in., 1992; Creelman i Mullet, 1995) oraz uruchomienia kaskady sygnałowej kinaz MAP. W następnych minutach uruchamiana jest transkrypcja genów związanych z reakcjami obronnymi (Dixon i in., 1994). Kilka do kilkunastu godzin po infekcji następuje depozycja kalozy, produkowane są białka PR związane z patogenezą (Linthorst, 1991) oraz dochodzi do syntezy fitoaleksyn (metabolitów wtórnych o właściwościach antybiotycznych) oraz uwolnienia zgromadzonych w wakuolach fitoantycypin (Hahlbrock i Scheel, 1989; Van Etten i in., 1994; Dixon i Paiva, 1995).

Następstwem reakcji nadwrażliwości jest systemiczna odporność nabyta (SAR-ang. *systemic acquired resistance*) lub systemiczna odporność indukowana (ISR-ang. *induced systemic resistance*). W przypadku SAR obserwujemy indukcję reakcji obronnych w niezainfekowanych miejscach rośliny. Systemiczna odporność nabyta wyzwalana jest w wyniku ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę białek PR oraz innych genów tzw. genów SAR związanych z patogenezą. Znaczącą rolę w uruchomieniu odporności systemicznej nabytej odgrywa cząsteczka sygnałna, jaką jest kwas salicylowy. Kwas jasmonowy i etylen są cząsteczkami sygnałnymi dla wyzwolenia systemicznej odporności indukowanej (Durrant i Dong, 2004).

1.3 Metabolomika roślinna

Metabolomika jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki, zajmującą się analizą jakościową i ilościową zestawu metabolitów obecnych w organizmie, tkance czy komórce. Obok proteomiki, transkryptomiki i genomiki odgrywa istotną rolę w badaniach z zakresu biologii systemów (Fiehn, 2002). Ze względu na liczbę metabolitów obecnych w organizmach żywych (w samym tylko królestwie roślin szacuje się ją na około 250 000), wysoce zróżnicowane właściwości fizyko-chemiczne oraz dynamiczne zmiany zachodzące w składzie metabolomu, istnieje konieczność ciągłego doskonalenia metod izolacji materiału, analizy instrumentalnej oraz bioinformatycznej uzyskanych danych. Ciągły postęp dokonywany w tej dziedzinie, pozwala na poszerzenie naszej wiedzy z zakresu składu metabolomów żywych organizmów. Dane metabolomiczne połączone z informacjami uzyskanymi na poziomie genomu (DNA), transkryptomu (RNA) i proteomu (białka) oraz z charakterystyką fenotypową i morfologiczną, dają możliwość zrozumienia wzajemnych zależności, zachodzących na różnych poziomach molekularnych organizmów żywych (Baker, 2011).

1.3.1 Nowa dziedzina nauki?

Badania dotyczące metabolitów roślinnych fascynowały naukowców od dekad. Pierwsze pionierskie prace dotyczące ich rozdziału technikami chromatograficznymi przez Michaela Tswetta (1872–1920) datowane są na początek XX wieku (Roessner, 2007). Termin metabolomika związany jest ściśle z profilowaniem metabolitów. Pierwsze badania jakościowe i ilościowe puli metabolitów wtórnych (steroidów, kwasów karboksylowych) obecnych w próbkach moczu, przeprowadził przy użyciu metod GC-MS Horning wraz ze współpracownikami (Horning i Horning, 1970, 1971a, b; Devaux i in., 1971). Natomiast, pierwsze doniesienia dotyczące profilowania metabolitów roślinnych datuje się na rok 1991. Sauter wraz ze swoim zespołem badawczym przeprowadził analizę profilowania herbicydów w jęczmieniu, metodą GC-MS (Sauter i in., 1991). Gwałtowny rozwój nauki na polu metabolomicznym od drugiej połowy XX wieku, wymusił ujednoczenie definicji i pojęć z nią związanych. Pojęcie metabolom, jako zespół niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych organizmu, wprowadził Stephen Oliver w 1998 roku (Oliver i in., 1998). W 2004 r. powstaje międzynarodowe towarzystwo metabolomiczne Metabolomics Society (www.metabolomicsociety.org), zrzeszające naukowców, których nadrzędnym celem jest identyfikacja, charakterystyka i katalogowanie metabolitów obecnych w organizmach żywych, oraz opracowanie rzetelnych i wiarygodnych metod analitycznych.

Z uwagi na złożoność metabolomu danego organizmu, niemożliwe jest zidentyfikowanie wszystkich związków niskocząsteczkowych w nim obecnych. Z tego też względu w badaniach metabolomicznych stosowane są różne podejścia analityczne, których definicje z biegiem lat zostały określone i ujednolicone (Fiehn, 2002; Goodacre i in., 2004; Nielsen i Oliver, 2005; Dunn i Ellis, 2005) (Tab.1.1). W Tab.1.1 przedstawiono wykorzystywane przy poszczególnych podejściach metabolomicznych metody analityczne, które zostaną szczegółowo omówione w dalszej części wprowadzenia (Rozdz.1.4.1). Rozgraniczone zostały również terminy metabolomika i metabonomika, które wcześniej stosowane były wymiennie. Metabonomika jest pojęciem węższym niż metabolomika i dotyczy analizy metabolitów obecnych w płynach ustrojowych ludzi i zwierząt w reakcji na czynniki stresowe (choroba, dieta, substancje toksyczne) lub modyfikacje genetyczne. W analizie metabolitów wykorzystuje się następujące podejścia metodyczne. Metabolomiczny odcisk palca (ang. *metabolic fingerprinting*) pozwala na szybkie monitorowanie składu niskocząsteczkowych związków obecnych w komórce, bez konieczności ich szczegółowej identyfikacji. Z kolei metabolomiczny odcisk stopy (ang. *metabolic footprinting*) dotyczy badania związków znajdujących się poza komórką. Profilowanie metabolitów (ang. *metabolite profiling*) zawęża obszar poszukiwań do jednej klasy związków, np. węglowodanów, aminokwasów, alkaloidów. W oparciu o wcześniej zdobytą wiedzę z zakresu technik ekstrakcji, separacji i detekcji wybranej grupy związków można przeprowadzić bardziej szczegółowe profilowanie biochemiczne, wraz z oznaczeniem ilościowym, zwane analizą celowaną (ang. *targeted analysis*). Ponadto, podczas analizy przepływu metabolitów (ang. *metabolic flux*) odpowiednie substraty znakuje się trwałymi izotopami ^1H , ^{13}C , ^{15}N , a następnie wprowadza do komórek i śledzi ich drogę w szlakach metabolicznych. Metabolomika roślinna znajduje coraz szersze zastosowanie w wielu projektach naukowych, czego wyrazem jest wzrastająca liczba publikacji z obszaru badań nad roślinami modyfikowanymi genetycznie (Roessner i in., 2001), poddawanych stresom biotycznym i abiotycznym (Shulaev i in., 2008), analizie funkcji genów (Manetti i in., 2006) oraz identyfikacji genów cech ilościowych (QTL) (Schauer i in., 2006).

Tab.1.1 Rodzaje podejść analitycznych stosowanych w badaniach metabolomu.

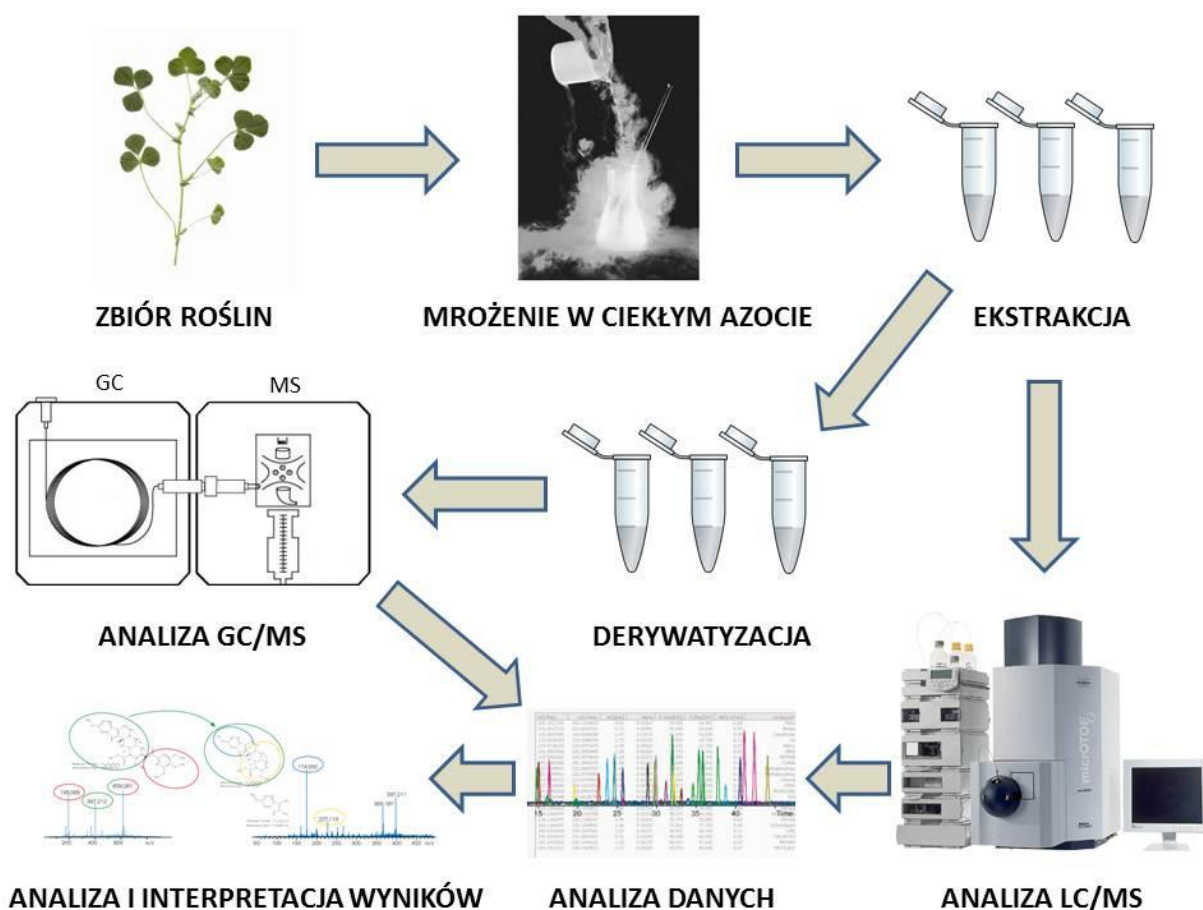
PODEJŚCIE METODYCZNE	DEFINICJA WYKORZYSTYWANE METODY ANALITYCZNE
<u>metabolomiczny odcisk palca</u> (ang. <i>metabolic fingerprinting</i>)	Definicja: szybkie monitorowanie metabolitów, pozwalające na analizę porównawczą i różnicową większej ilości próbek biologicznych, bez konieczności identyfikacji, analizy ilościowej. Nie wymaga skomplikowanego przygotowania próby oraz rozdziału chromatograficznego. Metody analityczne: - DI MS - spektrometria mas z bezpośrednim wprowadzeniem próbki, - NMR - magnetyczny rezonans jądrowy.
<u>metabolomiczny odcisk stopy</u> (ang. <i>metabolic footprinting</i>)	Definicja i metody analityczne jak wyżej. Dotyczy metabolitów zewnątrzkomórkowych.
<u>profilowanie metabolitów</u> (ang. <i>metabolite profiling</i>)	Definicja: identyfikacja i analiza ilościowa możliwie wysokiej liczby związków należących do danej klasy (flawonoidy, fosfolipidy, kwasy organiczne). Najbardziej rozpowszechnione podejście wymagające stosowania zaawansowanych metod ekstrakcji, analizy instrumentalnej i bioinformatycznej. Metody analityczne: -LC/UV/MS ⁿ - chromatografia cieczowa z detektorem UV/ tandemowa spektrometria mas, -GC/MS - chromatografia gazowa/spektrometria mas, -GC/GC/MS - dwuwymiarowa chromatografia gazowa/spektrometria mas, -CE/MS - chromatografia kapilarna/spektrometria mas, -LC/NMR - chromatografia cieczowa/magnetyczny rezonans jądrowy.
<u>analiza celowana</u> (ang. <i>targeted analysis</i>)	Definicja: ilościowa i jakościowa analiza jednego lub kilku wybranych związków, często stosowana w celu monitorowania udziału metabolitów w reakcjach biochemicznych. Metody analityczne: -LC/MS - chromatografia cieczowa/spektrometria mas, -GC/MS - chromatografia gazowa/spektrometria mas, -CE/MS - chromatografia kapilarna/spektrometria mas.
<u>analiza przepływu metabolitów</u> (ang. <i>metabolic flux</i>)	Definicja: określone substraty znakowane się trwałymi izotopami ¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N, a po wprowadzeniu do kultur komórkowych lub tkankowych monitoruje się kierunki ich transportu. Metody analityczne: -NMR - magnetyczny rezonans jądrowy, -DI MS - spektrometria mas z bezpośrednim wprowadzeniem próbki, -LC/MS - chromatografia cieczowa/spektrometria mas, -GC/MS - chromatografia gazowa/spektrometria mas.

1.3.2 Podejście metodyczne w badaniach metabolomów roślinnych

Ze względu na znaczną ilość metabolitów występujących w jednym organizmie roślinnym oraz ich różnorodność strukturalną, determinującą właściwości fizykochemiczne, istnieje konieczność doboru odpowiedniej strategii analitycznej przed przystąpieniem do właściwego eksperymentu. Nie istnieje jedna, uniwersalna metoda pozwalająca na analizę ilościową i jakościową wszystkich metabolitów zawartych w badanej próbce roślinnej. Podejścia analityczne różnią się między sobą specyficznością i czułością. Do najmniej precyzyjnych podejść należy metabolomiczny odcisk palca/stopy, najbardziej zaś

ukierunkowana jest analiza celowana. Najczęściej stosowana jest metoda profilowania metabolitów (Fiehn, 2002).

Ryc.1.8 przedstawia schematycznie główne etapy podejścia metodycznego stosowanego podczas badań metabolitów roślinnych. Niezwykle istotny wpływ na uzyskanie powtarzalnych wyników analiz jakościowych i ilościowych, ma przestrzeganie tych samych warunków hodowli i zbioru roślin. Uzasadnione jest to znaczną dynamikę procesów metabolicznych zachodzących w komórkach (Kim i Verpoorte, 2010). Bezpośrednio po zbiorze materiału, konieczne jest natychmiastowe mrożenie w temperaturze ciekłego azotu ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), w celu zatrzymania procesów enzymatycznych. Próbkę materiału biologicznego powinny być przechowywane w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dunn i Ellis, 2005).



Ryc.1.8 Główne etapy analizy metabolomu roślinnego.

Metabolity pierwotne i wtórne obecne w roślinnym materiale biologicznym różnią się pod względem zakresu mas cząsteczkowych, termostabilności, lotności oraz polarności. Z tego też względu nie jest możliwa ekstrakcja wszystkich tych związków jednocześnie, za pomocą tej samej metody izolacji. Dobór rozpuszczalnika ma w tym przypadku istotne znaczenie.

Szeroko stosowane podczas izolacji metabolitów wewnątrzkomórkowych są rozpuszczalniki organiczne o różnej polarności (metanol, woda, chloroform, heksan), co pozwala na wydzielenie z badanego materiału roślinnego stosunkowo dużej puli związków (Villas-Bôas, 2007).

Metody analityczne wykorzystywane w badaniach metabolomicznych wymagają często dostarczenia próby charakteryzującej się wysokim stężeniem i stanem czystości. W tym celu stosuje się zazwyczaj metody ekstrakcji do fazy stałej, SPE (ang. *solid phase extraction*). Mechanizm rozdziału polega na związaniu pożądanego związku do fazy stałej, dzięki wzajemnym oddziaływaniom fizykochemicznym, a następnie jej wymyciu przy udziale rozpuszczalnika o określonych właściwościach. Do oczyszczania związków różniących się polarnością najczęściej stosowana jest faza odwrócona (RP-ang. *reversed phase*), którą stanowią żele krzemionkowe połączone z łańcuchami alkilowymi od C-2 do C-18. Silne kationity SCX (ang. *strong cation exchanger*), zawierające powiązane z krzemionką aromatyczne grupy sulfonowe, pozwalają adsorbować związki o charakterze zasadowym np. alkaloidy (Stobiecki i in., 1997).

Dalsza procedura przygotowania próbki uzależniona jest od stosowanej metody analitycznej. Przykładowo, w przypadku chromatografii gazowej, podczas analiz związków polarnych, niezbędne jest przeprowadzenie derywatywacji w celu zablokowania niektórych grup funkcyjnych (Lisec i in., 2006).

Do analizy metabolitów obecnych w złożonych ekstraktach roślinnych stosowane są techniki analityczne, oparte na sprzężeniu chromatografii cieczowej, gazowej lub kapilarnej z detektorami absorpcji promieniowania UV, fluorescencyjnym (FLD), spektrometrem masowym (MS) lub magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Zastosowanie chromatografii pozwala na rozdział złożonych mieszanin, a określona czułość i selektywność detektora odpowiada ze poziom identyfikacji związków. Spektrometry mas zapewniają stosunkowo wysoką czułość detekcji. W badaniach z zakresu metabolomiki roślinnej najczęściej wykorzystywane są systemy LC/MS (ang. *liquid chromatography/mass spectrometry*) i GC/MS (ang. *gas chromatography/mass spectrometry*). Z kolei NMR jest metodą o największej specyficzności, umożliwiającą jednoznaczną identyfikację strukturalną analizowanych związków (Smedsgaard, 2007).

Ze względu na bardzo dużą ilość danych, uzyskiwanych podczas prowadzenia analiz metabolomicznych, konieczne jest zastosowanie odpowiednich narzędzi bioinformatycznych w celu przetwarzania, normalizacji i analizy statystycznej wyników. Szeroki dostęp do baz widm masowych pomaga w identyfikacji nieznanymi związków. Udoskonalane narzędzia

chemometryczne oraz zaawansowane platformy do analizy danych pozyskanych z różnych poziomów molekularnych (genom, proteom, transkryptom, metabolom) pozwalają na jakościową i ilościową interpretację uzyskanych wyników oraz otrzymanie szerszego spojrzenia na złożoność systemów biologicznych (Baker, 2011).

Możliwość uzyskiwania wyników porównywalnych między poszczególnymi zespołami badawczymi na świecie, zapewnia przestrzeganie ściśle określonych warunków prowadzenia analiz metabolomicznych. Potrzeba standaryzacji badań została wyrażona przez grupę czołowych naukowców, zajmujących się analizą metabolomiczną, zrzeszonych w MSI-Metabolomics Standard Initiative (www.msi-workgroups.sourceforge.net) (Fiehn i in., 2007, 2008).

1.3.3 Metabolomika jako narzędzie w genomice funkcjonalnej i biologii systemów

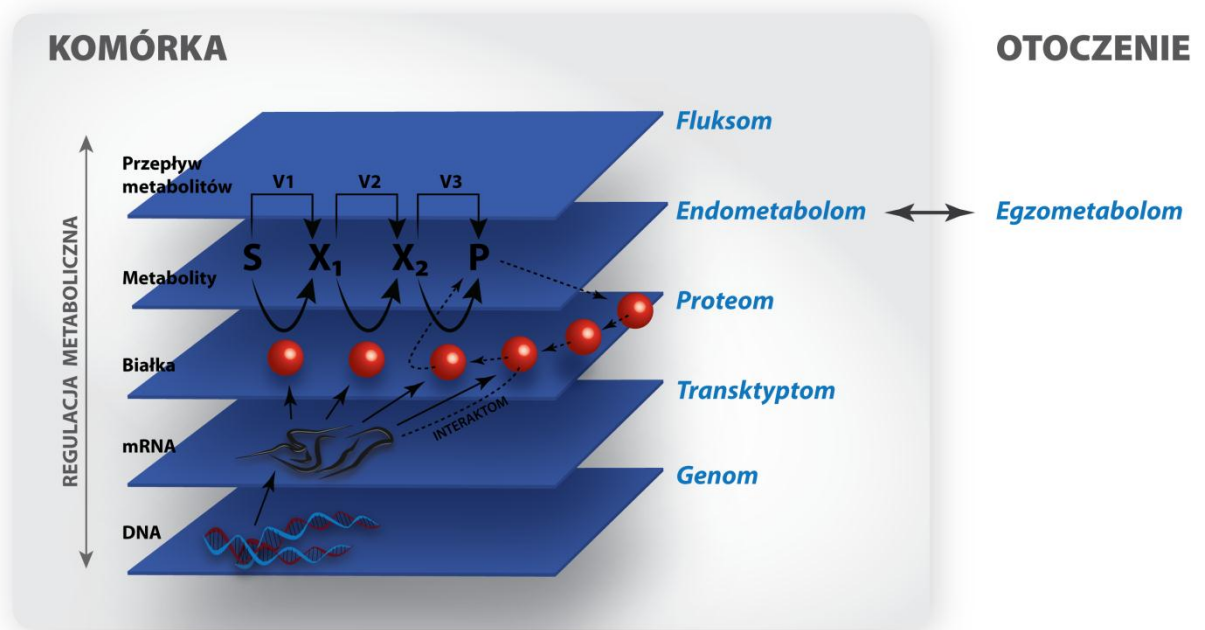
Metabolomika odgrywa istotną rolę w genomice funkcjonalnej, umożliwiając poznanie funkcji genów obecnych w genomie danego organizmu. Tego rodzaju podejście pozwala na identyfikację genów i ich produktów, odpowiedzialnych za procesy adaptacyjne roślin lub reakcje na stresy biotyczne czy abiotyczne (Roessner, 2007). Jako przykład, może posłużyć wykorzystanie analizy metabolomicznej podczas badania procesów adaptacyjnych *Arabidopsis thaliana* w zmiennych warunkach temperaturowych. Wykazały one, że niska temperatura ma większy wpływ na adaptację rzodkiewnika (Kaplan i in., 2004; Cook i in., 2004). Podejście obejmujące badania metabolomiczne umożliwiło również monitorowanie zmian określonych klas metabolitów w reakcji na infekcję elisytorem (von Röpenack i in., 1998; Bednarek i in., 2001) oraz podczas oddziaływań symbiotycznych roślin z grzybami mikoryzowymi (Harrison i Dixon, 1993; Maier i in., 1999).

Metabolomika jest również szeroko wykorzystywana do badania efektów transgenezy i mutacji roślin. Przykładem może być profilowanie metabolomiczne, przy użyciu GC/MS, transgenicznych linii ziemniaka z nadekspresją inwertazy w bulwach. Zastosowana metoda pozwoliła na zidentyfikowanie 150 metabolitów, a ponadto umożliwiła monitorowanie wpływu transgenezy na katabolizm sacharozy i syntezę skrobi (Roessner i in., 2000). Kolejne eksperymenty dały możliwość wykorzystania zaawansowanych technik analizy danych metabolicznych pozyskanych z transgenicznych linii ziemniaka, w celu określenia fenotypu biochemicznego (Roessner i in., 2001).

Podejście metabolomiczne stosowane jest również w analizie QTL, której celem jest znalezienie związku między markerem genetycznym (określonym miejscem na chromosomie) a fenotypem. Analiza taka polega na porównaniu profili metabolomicznych linii

(wyprowadzonych z jednej linii rodzicielskiej), różniących się między sobą pod względem badanej cechy (Schauer i in., 2006).

Biologia systemów, wykorzystując dane pozyskane z różnych poziomów uorganizowania komórki (genomu, transkryptomu, proteomu, metabolomu, fluksomu) oraz dzięki modelowaniu matematycznemu, stara się spojrzeć na funkcjonowanie komórki, tkanki czy organizmu jako całości (Ryc.1.9). Aby zrozumieć złożone wzajemne oddziaływania elementów tworzących sieć komórkową należy podjąć współpracę z naukowcami specjalizującymi się w różnych dziedzinach m.in. biologii, chemii, matematyki i statystyki. Nie jest to zadanie łatwe, ale niezbędne do uzyskania holistycznego obrazu funkcjonowania systemów biologicznych. Istotną rolę odgrywa tu konieczność stworzenia platform obliczeniowych pozwalających na korelację danych uzyskanych na poziomie DNA, RNA, białek czy metabolitów (Kitano, 2002a, b; Sumner, 2003; Goodacre, 2004; Baker, 2011).



Ryc.1.9 Koncepcja biologii systemów, przedstawiająca schematycznie wzajemne oddziaływania różnych poziomów molekularnych w komórce (według Nielsen i Oliver., 2005).

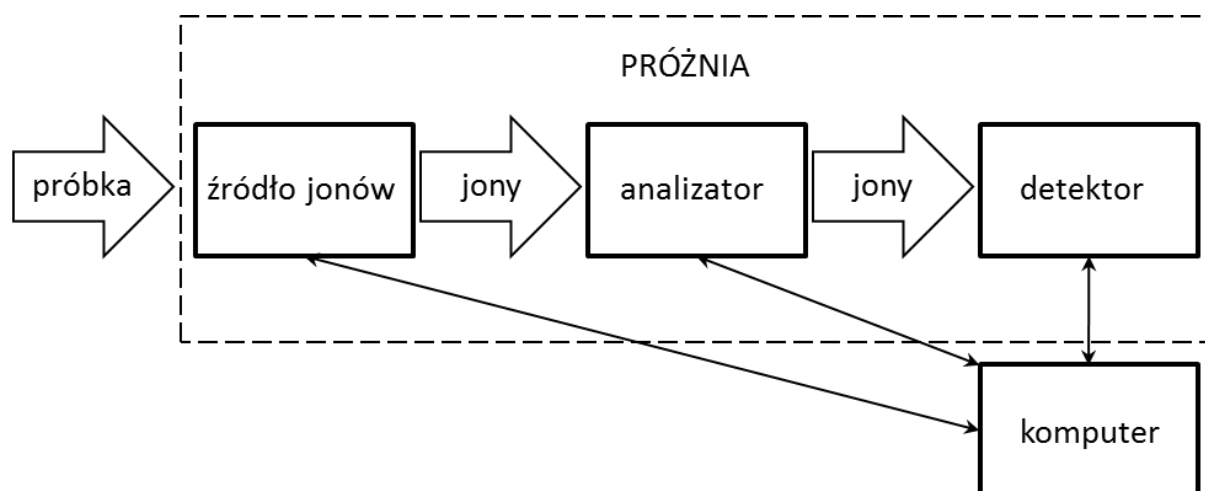
1.4 Spektrometria mas jako narzędzie analityczne w metabolomice roślinnej

Spektrometria mas jest podstawową metodą badawczą, stosowaną w dziedzinie metabolomiki do profilowania i identyfikacji związków niskocząsteczkowych. Szybki rozwój i szczególne zainteresowanie tą metodą wzrosło pod koniec lat 80-tych, wraz z wprowadzeniem w systemach LC/MS nowych technik jonizacji, przez elektrorozpraszanie-

ESI (ang. *electrospray ionization*) oraz jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym-APCI (ang. *atmospheric pressure chemical ionization*) (Villas-Bôas, 2005).

Technika spektrometrii mas pozwala na określenie masy cząsteczkowej oraz składu elementarnego analizowanej substancji, na podstawie stosunku masy (m) do ładunku elektrycznego (z), powstających w źródle jonów molekularnych (M^+) lub protonowanych bądź deprotonowanych cząsteczek ($[M+H]^+/[M-H]$). Natomiast w kwestii struktury badanego związku możemy wnioskować na podstawie zarejestrowanych, w trybie jonów dodatnich i/lub ujemnych, widm fragmentacyjnych, powstających w wyniku rozpadu jonów macierzystych na jony potomne (Bedair i Sumner, 2008).

Obecnie na rynku dostępne są spektrometry mas o różnorodnej budowie, pozwalające na wybór zarówno metody jonizacji jak i określonego analizatora, co daje możliwość uzyskania pożądanej czułości, rozdzielczości i selektywności oznaczeń. Ogólny schemat budowy spektrometru mas przedstawia Ryc.1.10.



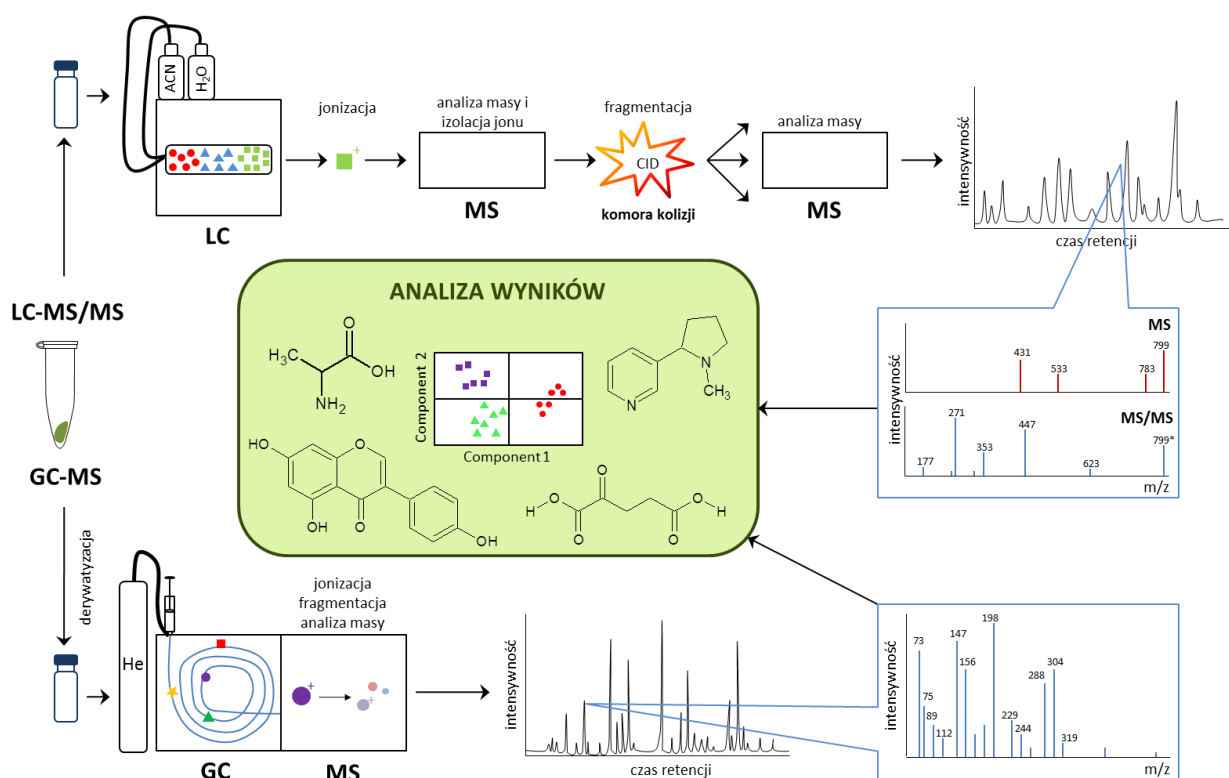
Ryc.1.10 Poglądowy schemat budowy spektrometru mas (źródło: Staszaków i Swarczewicz, 2011).

Spektrometria mas pozwala na analizę związków poprzez bezpośrednie wprowadzenie próbki do źródła jonów (ang. DI-ang. *direct infusion*) lub przy użyciu technik sprzężonych. Zastosowanie technik sprzężonych, w których spektrometry mas połączone są z chromatografami ciekowymi, gazowymi lub aparatami do elektroforezy kapilarnej (CE- ang. *capillary electrophoresis*), pozwala na badanie złożonych pod względem składu ekstraktów roślinnych. Rozdział mieszaniny związków na frakcje przed wprowadzeniem ich do

spektrometru daje możliwość zmniejszenia liczby jonów mierzonych w jednostce czasu, co poprawia właściwości analityczne metody (Glinski i Weckwerth, 2006; Last i in., 2007).

1.4.1 Techniki chromatograficzne stosowane w sprzężeniu ze spektrometrami mas

Techniki GC/MS i LC/MS (szerzej omówione w następnych podrozdziałach-1.4.1.1 i 1.4.1.2) są najpowszechniej wykorzystywanymi narzędziami podczas badań roślinnych metabolitów pierwotnych i wtórnych (Ryc.1.11). Rzadziej stosowanymi, ze względu na właściwości analityczne, są techniki MALDI-TOF (ang. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*), elektroforeza kapilarna sprzężona ze spektrometrią mas - CE/MS oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego-NMR (Hoffmann i Stroobant, 2007).



Ryc.1.11 Schematyczne ujęcie najczęściej stosowanych podejść wykorzystujących techniki sprzężone w badaniach metabolomicznych (źródło: Staszaków i Swarczewicz, 2011)

Wysokorozdzielcza, szybka i wydajna technika MALDI TOF, stosowana jest zazwyczaj w badaniach proteomicznych nad biopolimerami. Analizowana próbka poddawana jest łagodnej jonizacji, poprzez desorpcję laserem z matrycy, a rozdział powstałych jonów odbywa się w analizatorze mierzącym ich czas przelotu. Zastosowanie MALDI TOF do badań metabolomicznych wymaga optymalizacji warunków eksperymentalnych oraz doboru odpowiedniej matrycy (Vaidyanathan i in., 2006). Metoda ta została z powodzeniem

zastosowana do analizy ilościowej i jakościowej flawonoidów w liściach *Arabidopsis thaliana* oraz łupinach migdałów (Frison-Norrie i Sporns, 2002; Marczak i in., 2008)

Systemy CE/MS, zazwyczaj wykorzystywane do analizy białek i kwasów nukleinowych, znalazły swoje zastosowanie do profilowania polarnych metabolitów. Pomimo wysokiej specyficzności i czułości, jaką zapewnia metoda, jej stosowanie wymaga dużego doświadczenia, skomplikowanego przygotowania próbki oraz optymalizacji warunków prowadzenia analiz (Ramautar i in., 2009).

Spektroskopia NMR pozwala na jednoznaczną identyfikację strukturalną badanych związków, na podstawie widm rezonansowych jąder atomów ^1H , ^{13}C , ^{15}N , oraz ^{32}P , powszechnie obecnych w składzie wielu metabolitów. Stosunkowo niska czułość oraz potrzeba izolacji dużych ilości związków z materiału roślinnego w stanie wysokiej czystości, jest częstą przyczyną rezygnacji z wykorzystania tej metody w badaniach metabolomicznych. Zastosowanie sprzężonych technik HPLC/NMR (ang. *high performance liquid chromatography/nuclear magnetic resonance*) eliminuje konieczność dostarczenia związku w postaci oczyszczonej. Magnesy o wysokiej częstotliwości pola, rzędu 500-900 MHz, zapewniają poprawę czułości układu analitycznego. Metody HPLC/NMR wykorzystywane są zazwyczaj w celu uzupełnienia i obiektywizacji informacji strukturalnych, dotyczących związków analizowanych technikami LC/MS (Kim i in., 2011; Leiss i in., 2011). Spotykane jest również stosowanie systemów łączących techniki, np. LC/MS/SPE/NMR (ang. *liquid chromatography/mass spectrometry/solid phase extraction/nuclear magnetic resonance*), w celu analizy strukturalnej metabolitów obecnych w małych objętościach ekstraktu (van der Hoof i in., 2011a).

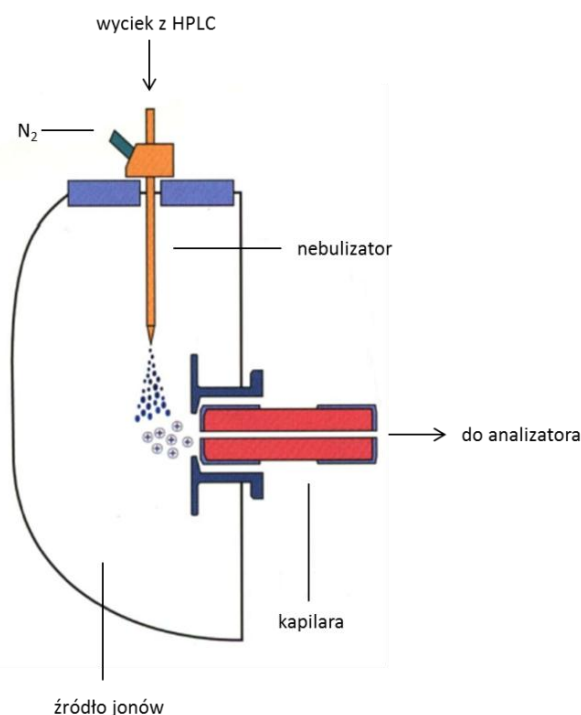
1.4.1.1 Sprzężenie chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas

Układy LC/MS powszechnie wykorzystywane są do analizy semi-polarnych roślinnych metabolitów wtórnych, takich jak alkaloidy, saponiny, kwasy fenolowe, flawonoidy, poliaminy oraz ich pochodne. Związki te dają się stosunkowo łatwo i szybko wyizolować, przy pomocy rozpuszczalników organicznych. Bezpośrednio po etapie ekstrakcji i ewentualnego oczyszczania metodą SPE poddawane są analizie instrumentalnej (de Vos i in., 2007).

Rozdział chromatograficzny zastosowany bezpośrednio przed analizą masową umożliwia badanie metabolitów wtórnych obecnych w złożonych mieszaninach roślinnych (Allwood i Goodacre, 2010). Dobór warunków chromatograficznych, takich jak rodzaj kolumny i fazy ruchomej oraz temperatura i czas analizy, uzależniony jest od właściwości fizykochemicznych badanych związków. Powszechnie wykorzystywanym wypełnieniem

kolumn do analiz metabolitów wtórnych jest tzw. faza odwrócona (RP), którą stanowią żele krzemionkowe modyfikowane grupami o niskiej polarności C-8 lub C-18. Analizowane związki wymywane są z kolumny izokratycznie lub w gradiencie mieszaniny rozpuszczalników organicznych (metanol, acetonitryl, izopropanol) z wodą oraz z niewielkim dodatkiem kwasów, mrówkowego, octowego lub trifluorooctowego (Kim i Verpoorte, 2010). Przełomem w technice HPLC (ang. *high performance liquid chromatography*) było wprowadzenie, w pierwszej dekadzie XXI wieku, ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC- ang. *ultra high pressure liquid chromatography*). Poprawa rozdzielczości, czułości i szybkości prowadzonych rozdziałów, stała się możliwa dzięki zastosowaniu wyższych zakresów ciśnień (400-1000 barów), mniejszych objętości przepływów fazy ruchomej oraz kolumn o średnicy uziarnienia poniżej 2 μm (Churchwell i in., 2005). Zastosowanie techniki UPLC w połączeniu ze spektrometrią mas, pozwoliło na skuteczny rozdział i identyfikację związków izomerycznych oraz izobarycznych obecnych w złożonych ekstraktach roślinnych (Muth i in., 2008; Stobiecki i in., 2010; Staszaków i in., 2011).

Znaczący wpływ na rozwój techniki LC/MS miło wprowadzenie nowych metod jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym: elektrorozpraszanie-ESI, jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym-APCI i fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym-APPI. Metoda jonizacji przez elektrorozpraszanie, za którą w 2002 John Fenn otrzymał Nagrodę Nobla, jest najczęściej stosowaną techniką jonizacji w układach LC/MS. Ta łagodna technika powstawania jonów, polega na odparowaniu rozpylonej cieczy, zawierającej badane związki pod ciśnieniem atmosferycznym w gradiencie potencjału pomiędzy końcem kapilary a szczeliną wejściową do analizatora (Ryc.1.12). Protonowane $[\text{M}+\text{H}]^+$ lub/i deprotonowane $[\text{M}-\text{H}]^-$ cząsteczki powstające w źródle w wyniku jonizacji w trybie jonów dodatnich lub/i ujemnych, ulegają jedynie nieznacznej fragmentacji (ze względu na niewielką wartość energii wewnętrznej jonów), co umożliwia wyznaczenie dokładnej masy analizowanych związków (Kebarle i Verkerk, 2010).



Ryc.1.12 Schemat budowy źródła jonów typu ESI.

W systemach LC/MS, w zależności od przyjętego podejścia metodycznego w badaniach metabolomicznych, stosowane są analizatory różniące się rozdzielczością i możliwościami analitycznymi (Bristow i Webb, 2003). Kwadrupol i pułapka jonowa należą do analizatorów niskorozdzielczych. Precyzyjne określenie masy cząsteczkowej badanego związku (z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku) umożliwiają analizatory wysokorozdzielcze, takie jak analizator czasu przelotu TOF (rozdzielczość do 100 000), analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników FTI-CR (ang. *fourier transform ion cyclotron resonance*) (rozdzielczość do 5 000 000) oraz analizator działający na zasadzie pułapki jonowej OrbiTrap (rozdzielczość do 240 000). W badaniach mających na celu określenie struktury badanego związku najczęściej stosuje się układy tandemowe, umożliwiające prowadzenie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID-ang. *collision induced dissociation*) (Prasain i in., 2004; Cuyckens i Claeys, 2005). Proces ten prowadzi do rozpadu jonów macierzystych na jony potomne, w wyniku zderzeń z cząsteczkami gazu szlachetnego. Niezwykle istotny jest w tym przypadku odpowiedni dobór warunków eksperymentalnych, takich jak potencjał w źródle jonów i energia kolizji, które wpływają na stopień fragmentacji badanych związków oraz intensywności względne jonów potomnych. Najczęściej stosowanymi analizatorami w układach LC/ESI/CID/MS/MS są potrójny analizator kwadrupolowy (QqQ), pułapka jonowa (IT), podwójny kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu (Qq-ToF) oraz OrbiTrap.

W wymienionych analizatorach strategia prowadzenia analiz fragmentacyjnych (MS/MS lub MSⁿ) jest różna.

1.4.1.2. Sprzężenie chromatografu gazowego ze spektrometrem mas

Technika GC/MS jest wykorzystywana w metabolomice głównie do analizy metabolitów pierwotnych, takich jak aminokwasy, cukry, kwasy tłuszczowe, steroidy, sterole, oraz niektórych metabolitów wtórnych, alkaloidów i związków fenolowych (Dettmer i in., 2007); Bedair i Sumner, 2008). Pomimo konieczności dostarczenia do systemu GC/MS analitu z zablokowanymi grupami polarnymi, w formie lotnej i stabilnej termicznie (a takie warunki spełnia bardzo ograniczona grupa związków), możliwa jest analiza szerokiej gamy metabolitów. Podstawą tych możliwości jest zastosowanie procesu derywatywacji próbki. Derywatywacja polega na przeprowadzeniu związków obecnych w ekstrakcie w pochodne, dzięki wykorzystaniu reaktywnych grup funkcyjnych, np. -OH, -NH₂, -SH, -COOH. Proces ten zmniejsza polarność związków oraz zwiększa ich termiczną stabilność i lotność (Roessner i in., 2000).

Najczęściej przeprowadzana jest dwuetapowa derywatywacja. Pierwszy etap polega na reakcji metoksyaminy z grupami karbonyłowymi, wynikiem czego jest powstanie oksymów. W ten sposób stabilizowana zostaje konformacja łańcucha cukrów redukujących, oraz zapewniana jest ochrona α -ketokwasów przed dekarboksylacją. W drugim etapie, tzw. silylacji, dochodzi do zablokowania polarnych grup funkcyjnych (karboksylowych, hydroksylowych, aminowych, tiolowych) poprzez ich podstawienie grupą trimetylosililową (TMS) z zastosowaniem odczynnika krzemooorganicznego (zwykle BSTFA lub MSTFA). Niestety, wraz ze wzrostem liczby derywatyzowanych grup, istnieje prawdopodobieństwo otrzymania pochodnej, której masa cząsteczkowa wykroczy poza zakres działania detektora (zazwyczaj 650-1000 m/z). Istotne jest również, aby reakcję silylacji przeprowadzać w warunkach bezwodnych. Tych samych warunków wymaga też przechowywanie derywatyzowanych próbek, ze względu na ich skłonność do szybkiej hydrolizy (Halket i in., 2005; Dettmer i in., 2007).

Najpowszechniej stosowaną metodą jonizacji w układach GC/MS jest jonizacja elektronami (EI- ang. *electron impact*). Należy ona do tzw. twardych technik jonizacji, gdyż podczas wzbudzania cząsteczek dochodzi do dużego wzrostu ich energii wewnętrznej. Prowadzi to do ich fragmentacji, przez co w otrzymanym widmie masowym jony molekularne mają stosunkowo niską intensywność, lub też obserwuje się ich całkowity rozpad na jony fragmentacyjne (Watson i Sparkman, 2007). Jako analizatory wykorzystywane są

niskorozdzielcze kwadrupole, umożliwiające szybkość skanowania z częstotliwością wynoszącą 1-6 widm/s lub wysokorozdzielcze analizatory TOF, które skanują nawet do 500 widm/s (Halket i in., 2005). Stosunkowo nową techniką sprzęganą ze spektrometrią mas jest dwuwymiarowa chromatografia gazowa (GC×GC/MS). Rozwiązanie wykorzystujące układ dwóch połączonych ze sobą kolumn chromatograficznych, dłuższej- niepolarniej z krótszą- polarną, znacząco zwiększa czułość oraz możliwości separacyjne układu (Górecki i in., 2004).

1.4.2 Metody analizy danych

Niezwykle istotnym etapem badań metabolomicznych, jest analiza ogromnych ilości danych, uzyskiwanych podczas analiz z wykorzystaniem technik spektrometrii mas. Wraz z rozwojem metod analizy instrumentalnej, opracowywane są coraz to wydajniejsze narzędzia przetwarzania, normalizacji wyników a także ich analizy statystycznej. Powstają również bazy widm masowych oraz zintegrowane platformy umożliwiające korelację danych uzyskanych z różnych poziomów uorganizowania komórki.

Duże ilości surowych danych, uzyskanych przy użyciu technik LC/MS i GC/MS, wymagają kompleksowej i automatycznej analizy wstępnej, przed przystąpieniem do analiz statystycznych. Obecnie badacze dysponują oprogramowaniem pozwalającym na wstępną integrację danych, przy pomocy odpowiednich algorytmów, w stosunkowo krótkim czasie. Integracja danych jest niezbędnym etapem, który pozwala na uzyskanie grupy zmiennych, porównywalnych pomiędzy poszczególnymi analizami, tak aby można je było następnie wykorzystać do dalszych wizualizacji i analiz metodami statystycznymi. Dane metabolomiczne charakteryzowane są zazwyczaj przez trzy wielkości: intensywność, stosunek m/z i czas retencji, których wypadkowa nazywana jest komponentem. Aby dane te były reprezentatywne należy wyrównać przesunięcia dla tych trzech wielkości, wynikające z niewielkich zmian parametrów analiz LC/MS i GC/MS (kondycji źródła, wydajności jonizacji, ciśnienia, jakości kolumny chromatograficznej) oraz warunków w jakich są przeprowadzane (np. temperatura). W tym celu dokonuje się kolejno redukcji szumów, korekcji linii bazowej, dekonwolucji, normalizacji i standaryzacji danych (Liland, 2011). Tego typu integracja uzyskanych danych możliwa jest dzięki ogólnodostępnym programom obliczeniowym, do których należą między innymi: metAlign, MzMine, Binbase, XCMS, MathDAMP, MetaQuant, METIDEA, Tagfinder (Lommen, 2009). Komercyjne programy, dostosowane do wymogów dostarczanego sprzętu analitycznego, oferują jego producenci, np. MarkerLynx (Waters), Mass Hunter (Agilent), Sieve (ThermoFischer Scientific) (Go, 2010).

Kolejnym etapem analizy danych metabolomicznych jest ich analiza statystyczna, pozwalająca określić poziom istotności poszczególnych zmiennych. W przypadku, gdy porównania dokonuje się pomiędzy dwiema grupami, wykorzystywany jest najprostszy test t-Studenta. W miarę wzrostu poziomu złożoności eksperymentu należy posłużyć się analizą wariancji ANOVA (ang. *analysis of variance*) lub jej wielowymiarową odmianą MANOVA (ang. *multivariate analysis of variance*) (Sumner i in., 2003). Równoległe do klasycznych metod statystycznych wykorzystywane są metody analizy multizmienności, które służą określeniu korelacji pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami oraz umożliwiają wizualizację danych np. w postaci dendrogramów. Do najczęściej wykorzystywanych tego typu metod należą, między innymi, analiza składowych głównych PCA (ang. *principal component analysis*), analiza składowych niezależnych ICA (ang. *independent component analysis*) oraz hierarchiczna analiza klastrow HCA (ang. *hierarchical cluster analysis*).

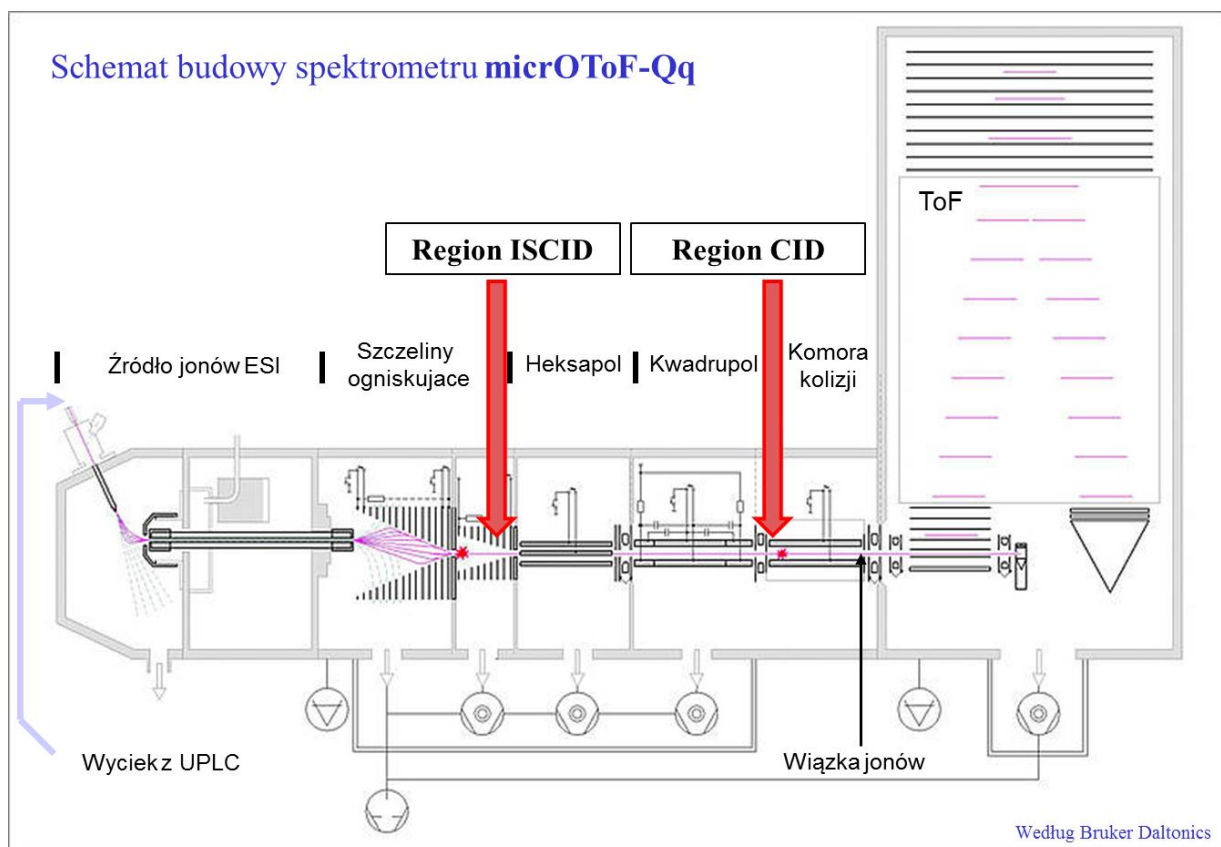
Podczas analiz metabolomicznych niezbędna jest konieczność korzystania z baz danych. W trakcie identyfikacji związków swoją pomocą służą bazy widm masowych, zarówno ogólnie dostępne: METLINE, MassBank, The Golm Metabolome Database, jak i komercyjne: Wiley Registry of Mass Spectral Data, MS/MS Spectral Libraries, NIST Standard Reference Database (Nordström, 2008). W umiejscowieniu zidentyfikowanego związku w szlaku metabolicznym, pomocne są takie bazy jak: KEGG, BioCyc, PubChem, ChemBank (Sumner, 2003). Platforma BiGG database umożliwia nie tylko umiejscowienie danego związku w konkretnym szlaku metabolicznym, ale również pozwala na określenie sposobu jego korelacji na poziomie proteomu czy genomu (Baker, 2011).

1.5 Zastosowanie spektrometrii mas do analizy strukturalnej związków fenolowych

Strukturalna analiza flawonoidów nie należy do zadań prostych, ze względu na złożony skład ekstraktów roślinnych. Wiele z tych naturalnych produktów, to związki o charakterze izomerycznym i izobarycznym, obecne w próbce często w bardzo zróżnicowanym stężeniu. Z tego względu, w celu określenia struktury związków fenolowych obecnych w mieszaninach, konieczne jest zastosowanie zaawansowanych i wydajnych metod rozdziału i detekcji. Najczęściej wykorzystywanymi narzędziami analitycznymi są techniki chromatografii cieczowej (HPLC/UPLC) stosowane w połączeniu z detektorami UV, MS (jonizacja ESI/APCI) i/lub NMR (Cuyckens i Claeys, 2004). Detektory UV pozwalają na rozróżnienie poszczególnych klas metabolitów, na podstawie zarejestrowanego widma absorpcji, w zakresie długości fali 250-400 nm. Należy pamiętać, że pH roztworu wpływa na przesunięcie maksimów w widmach absorpcji flawonoidów w kierunku wyższych długości fali

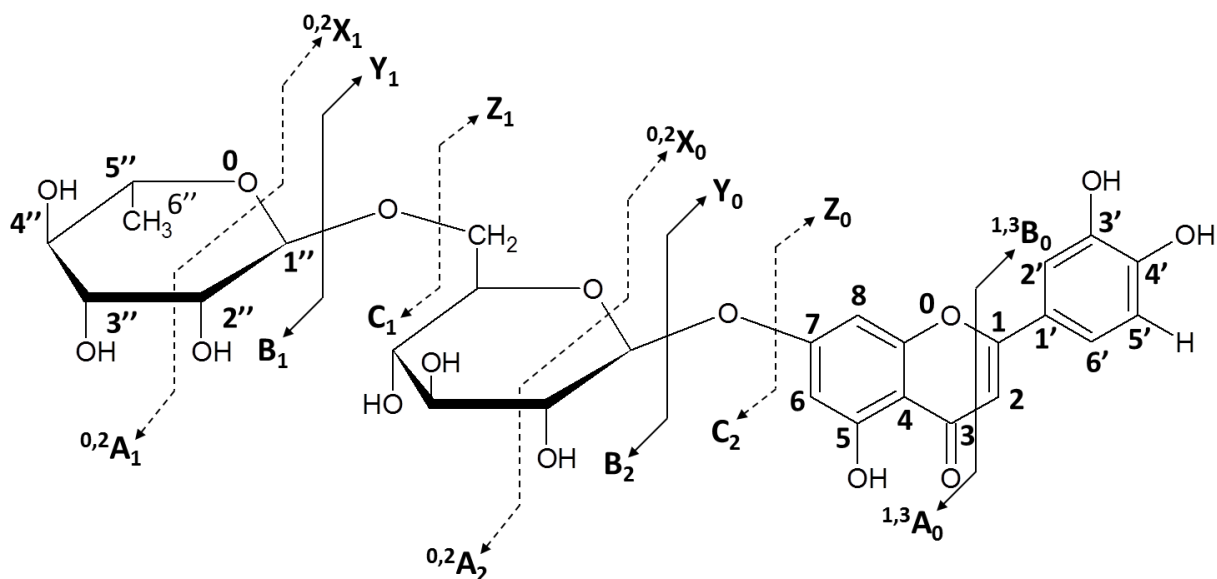
(Merken i Beecher, 2000). Widma ^1H i ^{13}C NMR umożliwiają określenie jednoznacznej struktury analizowanego związku. Ograniczeniem w stosowaniu techniki LC/NMR do analizy flawonoidów, obecnych w złożonych ekstraktach roślinnych, jest konieczność dostarczenia związku w formie wysoce oczyszczonej oraz odpowiednio wysokim stężeniu. Ponadto, stosunkowo niska czułość i wysoki koszt takich układów, są przyczyną ich rzadszego wykorzystywania w badaniach metabolomicznych (Vukics i Guttman, 2010). Z tego też względu najczęściej stosowanymi sprzężonymi technikami w analizie związków fenolowych są układy LC/MS (Cuyckens i in., 2000; Stobiecki, 2000; Cuyckens i Claeys, 2004; Prasain i in., 2003, 2004; March i in., 2006; de Rijke i in., 2006).

Eksperymenty z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID), przeprowadzane z wykorzystaniem spektrometrów tandemowych (np. Qq-ToF, QqQ), umożliwiają uzyskanie informacji strukturalnych dotyczących między innymi: struktury aglikonu, typu wiązania między aglikonem a podstawnikiem cukrowym (*O*- lub *C*-glikozyłacja), rodzaju podjednostki cukrowej, typu wiązań wewnątrzglikozydowych, rodzaju podstawnika acylowego (Prasain i in., 2004; Cuyckens i Claeys, 2005; Kachlicki i in., 2005). Informacje strukturalne uzyskiwane są w oparciu o analizę widm fragmentacyjnych CID MS/MS. Fragmentacji ulegają protonowane $[\text{M}+\text{H}]^+$ lub deprotonowane $[\text{M}+\text{H}]^-$ cząsteczki, w wyniku kolizyjnych zderzeń z cząsteczkami gazu szlachetnego w komorze kolizyjnej. Możliwe jest również uzyskanie tzw. fragmentacji w źródle (ISCID-ang. *in source collision induced dissociation*), dzięki przyłożeniu podwyższonego potencjału napięcia pomiędzy szczelinami ogniskującymi (Ryc.1.13). W przypadku eksperymentów CID konieczny jest odpowiedni dobór parametrów takich jak energia kolizji czy potencjał w źródle jonów (Stobiecki i in., 2006).



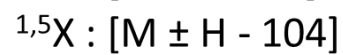
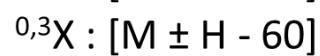
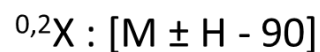
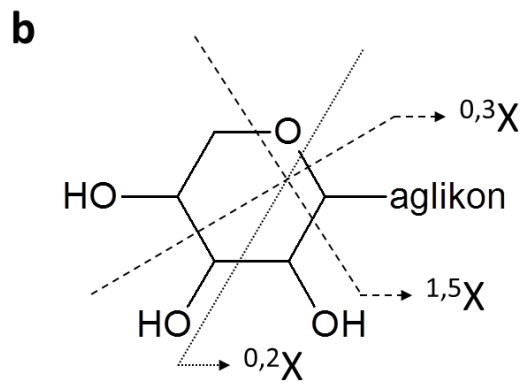
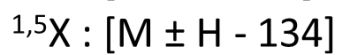
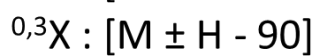
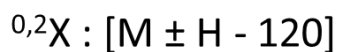
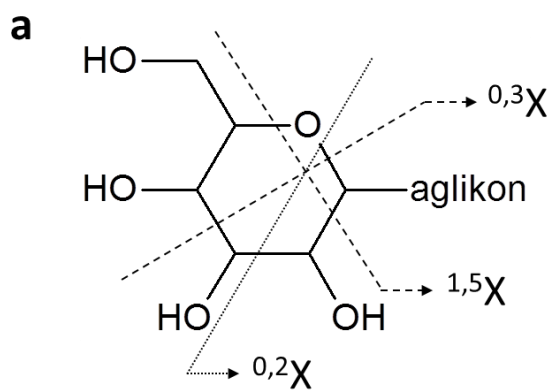
Ryc.1.13 Schemat budowy tandemowego spektrometru mas Qq-ToF firmy Bruker, wraz z zaznaczonymi obszarami, w których możliwa jest fragmentacja CID i ISCID (według Bruker Daltonics).

Analiza strukturalna flawonoidów możliwa jest w oparciu o względne intensywności jonów fragmentacyjnych, powstających w wyniku rozpadu jonu macierzystego (protonowanej lub deprotonowanej cząsteczki) na jony potomne. Nomenklaturę dotyczącą jonów fragmentacyjnych aglikonów wprowadzili w 1970 Marby, Markham i Thomas, która następnie została rozszerzona przez Ma i współpracowników w 1997 (Ryc.1.14). Podczas fragmentacji aglikonu, w wyniku reakcji RDA (retro-Dielsa-Aldera), następuje pęknięcie wiązania C-C w pierścieniu C i powstanie jonów diagnostycznych ${}^{i,j}A^{+/-}$ i ${}^{i,j}B^{+/-}$. Wielkimi literami (A,B) oznaczane są fragmenty zawierające odpowiednio pierścień A lub B, natomiast małe litery (i,j) określają pozycje, w których pęka pierścień C. Dla jonów fragmentacyjnych glikozylowanych flawonoidów obowiązuje nomenklatura wprowadzona przez Domon i Costello (1988). Jony zawierające aglikon są oznaczone jako ${}^{k,l}X_j$, Y_j , Z_j , gdzie j to numer zerwanego wiązania wewnątrzglikozydowego licząc od strony aglikonu, a indeksy k i l oznaczają miejsce rozerwania pierścienia cukrowego. Jony fragmentacyjne nie zawierające aglikonu, a jedynie fragment cukrowy, oznaczane są jako ${}^{k,l}A_i$, B_i , C_i , gdzie i (≥ 1) określa numer pękniętego wiązania glikozydowego licząc od końca nieredukującego.



Ryc.1.14 Nomenklatura jonów fragmentacyjnych aglikonów oraz glikozylowanych flawonoidów, na podstawie 7-*O*-rutynozydu luteoliny (według Vukics i Guttman, 2010).

Wysoko rozdzielcze widma fragmentacyjne, rejestrowane zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych, przy różnych energiach kolizji, umożliwiają uzyskanie niektórych informacji na temat struktury glikozylowanych flawonoidów. Jony diagnostyczne $^{i,j}A^{+/-}$ i $^{i,j}B^{+/-}$, powstające w wyniku rozerwania pierścienia C w odpowiednich pozycjach dla jonów dodatnich i ujemnych, pozwalają określić klasę flawonoidu. Typ glikozylacji (*O*-, *C*-, *-C/O*-glikozylacja) możliwy jest do określenia, na podstawie charakterystycznych fragmentów $^{i,j}X_i$ i Y_i oraz E_i (oznacza utratę cząsteczki wody). Na tej samej podstawie istnieje możliwość określenia typu podjednostki cukrowej przyłączonej do aglikonu (pentoza, heksoza) (Ryc.1.15). Fragmenty Y_1 , Y_0 , Z_1 oraz charakterystyczne jony rodnikowe, umożliwiają określenie sposobu rozmieszczenia grup cukrowych w cząsteczce flawonoidu (*di-O*-glikozydy, *O*-diglikozydy, *C,O*-diglikozydy). Na podstawie określonych fragmentów i ich wzajemnego stosunku inensywności, przy odpowiedniej energii kolizji, możliwe jest określenie typu wiązania wewnątrzglikozydowego czy też pozycji glikozylacji (Waridel i in., 2001; Cuyckens i Claeys, 2004; Vukics i Guttman, 2010). Przydatną metodą, pozwalającą na rozróżnianie izomerów glikozylowanych pochodnych flawonoidów, jest analiza widm fragmentacyjnych jonów sodowanych cząsteczek $[M+Na]^+$ (Kachlicki i in. 2008, March i Brodbelt, 2008) oraz kompleksów z jonami metali Ca(II), Mg(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) (Davis i Brodbelt, 2004).



Ryc.1.15 Charakterystyczne jony fragmentacyjne, powstające w wyniku rozerwania pierścienia cząsteczki heksozy (a) i pentozy (b) (według Cuyckens i Claeys, 2004).

II. CEL PRACY

Flawonoidy są liczną i powszechnie występującą grupą naturalnych produktów roślinnych, stanowiących przedmiot zainteresowania wielu grup badawczych, zarówno ze względu na rolę jaką pełnią w roślinie, jak również ich korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczna tej grupy związków, wynikają bezpośrednio z ich struktury, która oparta jest na trójpierścieniowym szkielecie węglowym. Liczne modyfikacje struktury zarówno aglikonów flawonoidowych jak i ich glikozylowanych pochodnych, grupami hydroksylowymi, metylowymi, czy acylowymi, są źródłem występowania wielu form izomerycznych i izobarycznych tych naturalnych produktów. Z tego też względu identyfikacja i analiza strukturalna flawonoidów nie należy do zadań prostych. Ponadto, złożony skład ekstraktów roślinnych oraz zbliżone właściwości fizykochemiczne, utrudniają ich właściwy rozdział chromatograficzny. Skuteczną separację i wiarygodną identyfikację glikozylowanych pochodnych flawonoidów umożliwia zastosowanie sprzężonych technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz spektrometrii mas.

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej było opracowanie wydajnej i rzetelnej metody profilowania oraz analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych obecnych w złożonych ekstraktach materiału roślinnego. Prace optymalizacyjne prowadzone były na układzie LC/Qq-ToF/MS. Wykorzystanie wysokorozdzielczych technik spektrometrii mas pozwala na określenie masy (m/z) jonu z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku. Znajomość dokładnej masy umożliwia z kolei obliczenie składu elementarnego związku. Charakterystyka strukturalna, możliwa jest w oparciu o analizę widm fragmentacyjnych protonowanych i deprotonowanych cząsteczek $[M+H]^+/[M-H]^-$. Na podstawie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID MS/MS), przy odpowiednim doborze warunków energetycznych prowadzonych analiz, możliwe jest uzyskanie informacji strukturalnych dotyczących m.in. struktury aglikonu, rodzaju podjednostki cukrowej i miejsca jej podstawienia oraz rodzaju podstawnika acylowego. Poszerzenie naszej wiedzy w kwestiach metodycznych związanych z analizą flawonoidów, oraz utworzenie bazy widm masowych badanych związków, będzie podstawą do szybkiej i skutecznej identyfikacji tej klasy związków.

Głównym obiektem badań, wykorzystujących zaproponowane techniki spektrometrii mas do identyfikacji i profilowania fenolowych metabolitów wtórnych, były różne gatunki i odmiany łubinu. Łubin jest rośliną należącą do rodziny bobowatych, która wyewoluowała niezależnie na obszarze śródziemnomorskim jak i na terenach obu Ameryk. Bogate tradycje

uprawy łubinu, szczególnie na terenie Wielkopolski, są powszechnie znane, a wynikają one z unikalnych właściwości proekologicznych tych roślin, oraz możliwości ich wykorzystania w żywieniu ludzi i zwierząt, jako komponenty żywności funkcjonalnej oraz paszowe. Powierzchnia upraw nasiennych roślin strączkowych w ciągu ostatnich pięciu lat wzrosła w skali kraju o 65%, natomiast w Wielkopolsce wzrost jest znacznie niższy i wynosi 18%. Istnieje konieczność ponownego upowszechnienia uprawy łubinów w Wielkopolsce, z uwagi na wyżej omówione korzyści dla naszego regionu. Zwiększenie powierzchni zasiewów wymaga poprawy odporności łubinów na choroby grzybowe, w szczególności antraknozę. Jednym z założeń prowadzonych badań było poznanie roli związków fenolowych w procesach odpornościowych różnych odmian łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) podczas infekcji grzybem *Colletotrichum lupini*, powodującym antraknozę. Równocześnie przedmiotem badań, podczas przygotowywania pracy doktorskiej, była identyfikacja i analiza strukturalna związków fenolowych w tkankach różnych gatunków łubinów meksykańskich w korelacji z gatunkami łubinów europejskich. Korelacja danych dotyczących profili flawonoidów obecnych w tkankach, z informacjami na temat zachorowalności roślin na infekcje grzybowe może pozwolić na opracowanie nowych strategii hodowli odpornościowej łubinów w Polsce.

Przedmiotem pracy doktorskiej było również sprawdzenie możliwości aplikacyjnych zaproponowanych technik LC/MS do analizy związków fenolowych obecnych w ekstraktach modelowej rośliny *Medicago truncatula* oraz pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum*.

III. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

3.1 Stosowane odczynniki

Rozpuszczalniki organiczne stosowane do ekstrakcji oraz analiz LC/MS i GC/MS:

- acetonitryl (czystość LC/MS): Sigma-Aldrich, Polska,
- chlorek metylenu (czda): POH, Polska,
- chlorek metylenu (czystość MS): Sigma-Aldrich, Polska,
- chloroform (czda): POH, Polska,
- heksan (czystość HPLC): Sigma-Aldrich, Polska,
- izopropanol (czystość LC/MS): Sigma-Aldrich, Polska,
- metanol (czystość HPLC): Chempur, Polska,
- octan etylu: Chempur, Polska.

Woda dejonizowana w systemie Mili-Q Plus - (Milipore, USA) oraz dwustopniowym systemie oczyszczania: TKA Pacific + MicroPure (Niemcy).

Standardy wykorzystywane podczas analiz LC/MS i GC/MS:

- standardy flawonoidów i ich pochodnych: 7,4'-dihydroksyflawon, 3',4',7-trihydroksyflawon, acacetyna, apigenina, 7-O-glukozyd apigeniny, 7-O-rutynozyd apigeniny, bioczanina A, 7-O-glukozyd bioczaniny A, chryzoeriol, daidzeina, eriodiktiol, fortunellina, formononetyna, 7-O-glukozyd formononetyny, galangina, genisteina, genistyna, genkwanina, glicyteina, izolikwirytygenina, izoramnetyna, izowitekasy, kemferol, 3-O-glukozyd kemferolu, 7-O-glukozyd kemferolu, 7-O-neohesperozyd kemferolu, kwercetyna, likwirytygenina, luteolina, 7-O-glukozyd luteoliny, 4'-O-glukozyd luteoliny, 8-C-glukozyd luteoliny, 6-C-glukozyd luteoliny, mirycetyna, naringenina, 7-O-glukozyd naringeniny, 7-O-neohesperozyd naringeniny, 7-O-rutynozyd naringeniny, prunetyna, rutyna, saponaryna, tricetyna, witekasy: Extrasynthese, Francja,
- luteon, witeon, 2'-hydroksygenisteina: standardy przekazał Profesor Satoshi Tahara (Hokkaido University, Japonia),
- kwas chlorogenowy, kwas cynamonowy, kwas ferulowy, kwas galusowy, kwas kawowy, kwas p-kumarowy, kwas synapinowy, kwas syryngowy, kwas wanilinowy: Sigma-Aldrich, Polska,
- heptakozafuorotributyloamina: Sigma-Aldrich, Polska - do kalibracji spektrometru z analizatorem czasu przelotu, sprzężonego z chromatografem gazowym,

- rybitol: Sigma-Aldrich, Polska - standard wewnętrzny do próbek poddawanych analizie GC/MS.

Odczynniki do derywatywacji:

- chlorowodorek metoksyaminy: Sigma-Aldrich, Polska,
- MSTFA (N-metylo-N-trimetylsililo-trifluoroacetamid): Sigma-Aldrich, Polska,
- pirydyna: Sigma-Aldrich, Polska.

Odczynniki do izolacji RNA, RT-PCR i elektroforezy:

- zestaw do izolacji całkowitego RNA: Promega, Niemcy,
- zestaw do odwrotnej transkrypcji: Novazym, Polska,
- agaroz: Novazym, Polska,
- bromek etydyny: Merck, Polska,
- bufor do elektroforezy TAE, 50x stężony (Tris-octan-EDTA): Merck, Polska.

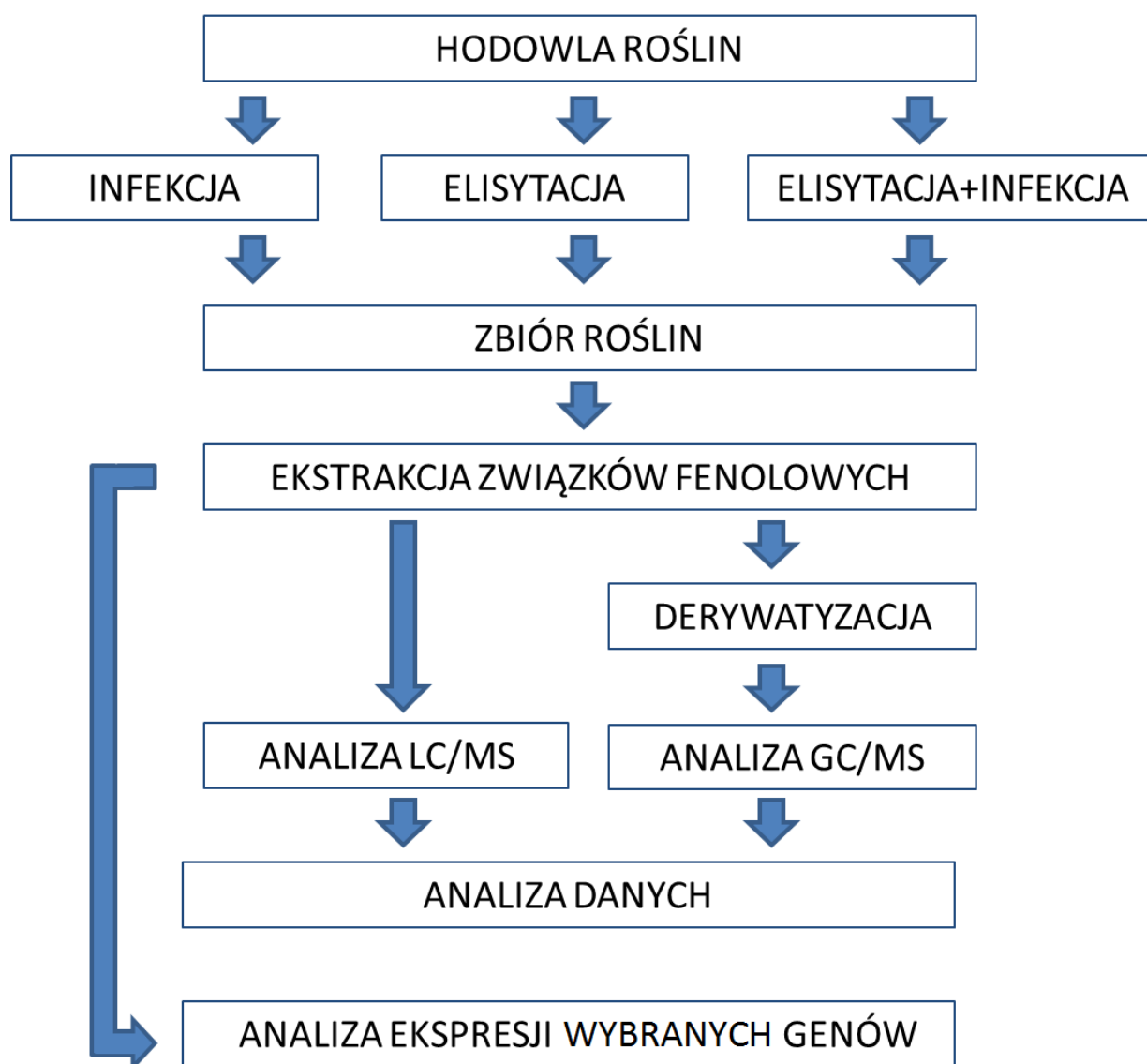
Pozostałe odczynniki:

- kwas mrówkowy: Sigma-Aldrich, Polska - do analiz LC/MS,
- PDA (potato dextrose agar): Argenta, Polska - podłoże do hodowli grzyba *C.lupini*,
- podchloryn sodu: POH, Polska - do sterylizacji nasion łubinu,
- sole: chlorek sodu, magnezu, wapnia oraz azotan srebra, wapnia, magnezu: Sigma-Aldrich, Polska - do eksperymentów z jonami metali,
- Tween 20: Sigma-Aldrich, Polska - do przygotowywania zawiesiny spor grzyba *C.lupini*,
- wodorotlenek sodu: Chempur, Polska - do przygotowywania kalibrantu do spektrometru micrOToF-Q,
- wypełnienia do kolumniek używanych podczas ekstrakcji do fazy stałej (SPE) - SCX (J.T. Baker, USA) i RP C18 (Supelco, USA).

3.2 Opis przebiegu eksperymentów

Przeprowadzono 5 złożonych, niezależnych eksperymentów, w których wykorzystano techniki spektrometrii mas do profilowania i analizy strukturalnej flawonoidów.

3.2.1 Analiza zmian profili fenolowych metabolitów wtórnych łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) w odpowiedzi na infekcję patogennym grzybem (*Colletotrichum lupini*) oraz elisytację zawiesiną toksycznych metabolitów *C.lupini*



Ryc. 3.1 Schemat blokowy przeprowadzonego eksperymentu.

3.2.1.1 Materiał roślinny

Nasiona łubinu wąskolistnego zakupiono w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (Oddział Przebedowo, Polska). Doświadczenia wstępne prowadzono na 12 odmianach łubinu wąskolistnego (Baron, Bojar, Boruta, Cezar, Graf, Kalif, Karo, Mirela, Neptun, Regent, Sonet, Zeus). W dalszej kolejności wytypowano cztery odmiany (słodkie - Baron i Sonet oraz gorzkie - Karo i Mirela), na których przeprowadzane były badania. Ostatnie stadium badań było prowadzone na odmianie Sonet.

Każdorazowo przed wysiewem, nasiona łubinu wąskolistnego sterylizowano w 1,5%-owym roztworze podchlorynu sodu (NaClO) przez 15 minut, po czym płukano je wodą destylowaną. Nasiona wysiewano do doniczek wypełnionych perlitem (po 6 nasion w doniczce). Hodowla roślin prowadzona była w szklarni w kontrolowanych warunkach naświetlania (14/10h dzień/noc), temperatury (22/18°C dzień/noc) oraz odpowiedniej wilgotności podłoża.

Doświadczenia hodowlane przeprowadzono w następujących okresach:

- 19.03.-10.04.2009: hodowla 12 odmian łubinu wąskolistnego/zbiór trzytygodniowych siewek (liść i korzeń)/analizy LC/MS,
- 03.06.-24.06.2009: hodowla 4 odmian łubinu wąskolistnego (Sonet, Baron, Karo, Mirela)/ekstrakcja związków z powierzchni części zielonych trzytygodniowych siewek/analizy GC/MS-opracowanie metodyki,
- 16.09.-14.10.2009: hodowla 12 odmian łubinu wąskolistnego/infekcja dwutygodniowych siewek zarodnikami *C.lupini*/zbiór liści łubinu po 168h od infekcji/ekstrakcja związków z powierzchni części zielonych (dla 4 odmian: Sonet, Baron, Karo, Mirela)/analizy LC/MS i GC/MS,
- 22.03.-20.04.2010: hodowla 4 odmian łubinu wąskolistnego (Sonet, Baron, Karo, Mirela)/infekcja dwutygodniowych siewek zarodnikami *C.lupini*/zbiór liści łubinu po 24, 48, 96, 168, 264h od infekcji/ekstrakcja związków z powierzchni części zielonych/analizy LC/MS i GC/MS /analizy RT-PCR (odmiana Sonet 96 i 168h po infekcji),
- 13.08.-3.09.2010: hodowla łubinu wąskolistnego, odmiana Sonet/nakłucie i oprysk toksyną dwutygodniowych siewek łubinu/zbiór liści po 12, 24, 48h od elisytacji/ekstrakcja związków z powierzchni części zielonych/analizy LC/MS i GC/MS (tylko oprysk), analizy RT-PCR,

- 11.04.-09.05.2011: hodowla łubinu wąskolistnego, odmiana Sonet/nakłucie i oprysk toksyną oraz infekcja zarodnikami dwutygodniowych siewek łubinu/zbiór liści po 168h od infekcji/analizy LC/MS,

- 29.04.-31.05.2011: hodowla łubinu wąskolistnego, odmiana Sonet/nakłucie i oprysk toksyną oraz infekcja zarodnikami dwutygodniowych siewek łubinu/zbiór liści po 168h od infekcji/analizy LC/MS.

3.2.1.2 Przygotowanie zawiesiny zarodników grzyba *C.lupini*

Grzyb *C.lupini* (izolat Col2) został wyizolowany z zaatakowanego przez antraknozę łubinu białego (*L.albus* L.) w 1998 r. w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Przebędowie (Polska) i przekazany do kolekcji grzybowej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk (Poznań, Polska). Został zidentyfikowany zgodnie z metodyką opisaną przez Nirenberga i współpracowników (2002).

Konidialne zarodniki grzyba zostały umieszczone na płytkach Petriego z podłożem hodowlanym PDA i inkubowane przez trzy tygodnie w 28°C. Spory zostały zebrane poprzez omywanie płytek sterylnym roztworem 0.1% (v/v) Tween-u 20 i poddane filtracji, w celu pozbycia się resztek grzybni. Stężenie zarodników zostało określone poprzez zliczenie ich pod mikroskopem. Sporządzono zawiesinę zarodników *C.lupini*, o stężeniu 2×10^6 zarodników/ml, którą wykorzystano do infekcji łubinu.

Zawiesina zarodników grzyba *C.lupini* została przygotowana przez Zespół Metabolomiki IGR PAN (Poznań) pod kierownictwem prof. dr hab. Piotra Kachlickiego.

3.2.1.3 Izolacja i oczyszczanie toksycznych metabolitów *C.lupini*

Hodowlę grzyba prowadzono w butlach Roux na płynnej modyfikowanej pożywce Friesa (120 butli zawierających po 200 ml pożywki każda) w temperaturze pokojowej przez trzy tygodnie. Hodowlę przefiltrowano i zagęszczono na wyparce próżniowej (Heildolph Laborata 4000 efficient, Niemcy) do 1,5 l. Metabolity wtórne ekstrahowano kilkakrotnie octanem etylu. Po odparowaniu do sucha rozpuszczalnika organicznego, toksynę grzybową rozpuszczono w niewielkiej ilości 25%-owego metanolu. Zawiesinę poddano rozdzielaniu na preparatywnej kolumnie chromatograficznej RP-C18 (1,5×85 cm) (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Fazę ruchomą stanowił roztwór metanol/woda. Frakcje (25 ml) wymywano z kolumny roztworem metanol/woda o wzrastającym stężeniu metanolu od 25 do 65%. W celu weryfikacji toksyczności elysatora, 5µl z każdej zebranej frakcji, umieszczano na uprzednio nakłuty igłą liść łubinu (łubinu białego, odmiany Wat oraz łubinu wąskolistnego, odmiany Sonet). Frakcje

zawierające fitotoksyczne metabolity (powodujące powstanie plam nekrotycznych na liściach łubinu-fracje wymywane 55% metanolem) poddano analizie LC/MS w celu identyfikacji, oraz preparatywnej chromatografii kolumnowej, celem uzyskania oczyszczonego roztworu. Sporządzona zawiesina, o stężeniu 1 mg/ml w 10%-owym metanolu, stanowiła elisyltor, którym traktowano łubin wąskolistny. Przeprowadzono próby identyfikacji strukturalnej toksycznych metabolitów z wykorzystaniem metod fizykochemicznych (UV, MS, NMR).

Izolacja i oczyszczanie toksycznych metabolitów *C.lupini*, zostało wykonane przez Zespół Metabolomiki IGR PAN (Poznań) pod kierownictwem prof. dr hab. Piotra Kachlickiego.

3.2.1.4 Infekcja łubinu wąskolistnego zawiesiną zarodników *C.lupini* oraz elisytacja toksyną wyizolowaną z komórek grzyba

Dwutygodniowe siewki łubinu wąskolistnego (*L.angustifolius*) wzrastające w szklarni w doniczkach z perlitem (6 roślin w doniczce) poddawano infekcji lub/i elisytacji:

Eksperyment nr 1-INFЕКCJA: Rośliny, posiadające dwa piętra liści, infekowano sporami *C.lupini*, poprzez oprysk całej rośliny zawiesiną zarodników (2×10^6 zarodników/ml, około 5 ml na roślinę). Rośliny kontrolne opryskiwano wodą destylowaną. W celu zainicjowania procesu infekcji, rośliny umieszczano na 24h pod namiotami foliowymi, utrzymując wysoki stopień wilgotności (około 70%). Liście z trzech pięter, pochodzące z trzech różnych roślin, w czterech powtórzeniach biologicznych, zbierano jako jedną próbkę, w celu zminimalizowania wpływu różnorodności biologicznej. Liście zbierano 24, 48, 96, 168, 264h po infekcji.

Eksperyment nr 2-ELISYTACJA: Dwutygodniowe siewki łubinu elisytowano toksyną, zawierającą metabolity wtórne wyizolowane z grzyba *C.lupini*, na dwa różne sposoby.

W pierwszym przypadku (ELISYTACJA 1-E1), 10 μ l zawiesiny toksyny grzybowej (1mg/ml w 10%-owym metanolu) nakładano na co drugi (uprzednio zraniony igłą) liść dolnego piętra. Kontrolę stanowiły rośliny zranione igłą i traktowane jedynie 10%-owym metanolem w miejscu zranienia. Kontrolę zerową dla efektu zranienia stanowiły rośliny opryskane 10%-owym metanolem. Liście, z każdego z dwóch pięter, zbierano osobno. Na jedną próbkę przypadały 3 różne rośliny. Materiał zbierano 12, 24, 48h po elisytacji.

W drugim wariantcie (ELISYTACJA 2-E2), całe rośliny opryskano toksyną grzybową (100 μ g/ml w 10%-owym metanolu, około 2ml na roślinę). Kontrolę stanowiły rośliny opryskane 10%-owym metanolem. Materiał zbierano 12, 24, 48h po elisytacji.

Eksperyment nr 3-ELISYTACJA+INFEKCJA: Dwutygodniowe siewki poddawano opryskowi toksyną grzybową, a następnie, po 48h od elisytacji, infekowano zarodnikami *C.lupini* poprzez oprysk. Wszystkie liście z trzech różnych roślin zbierano 168h po infekcji (216h po elisytacji). Zebrane próbki stanowiły następujące warianty: rośliny elisyutowane toksyną, rośliny infekowane zarodnikami, rośliny elisyutowane i następnie infekowane, oraz rośliny kontrolne: traktowane 10%-owym metanolem lub opryskiwane wodą destylowaną. Zebrany materiał mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.1.5 Ekstrakcja metabolitów wtórnych wyizolowanych z tkanek łubinu wąskolistnego

Ekstrakcja fenolowych metabolitów wtórnych części zielonych łubinu przebiegała na dwa sposoby. W celu poddania próbek analizie LC/MS, zamrożony materiał homogenizowano w ciekłym azocie, przy pomocy homogenizatora CAT (model X 620, Catepillar Niemcy). Następnie odważano 100 mg tkanki i ekstrahowano w 2 ml 80%-owego metanolu, przez 30 minut w łaźni ultradźwiękowej (Bandelin SONOREX model AK 103H, Niemcy). Na etapie ekstrakcji, do każdej próbki dodawano 10 µl luteoliny (1mg/ml), jako standardu wewnętrznego. Ekstrakty wirowano przez 20 minut przy 30 000 rpm (obr/min) (Universal 320R Hettich, Niemcy), Supernatant zbierano i przenoszono do szklanych probówek, w celu odparowania do sucha w temperaturze 35°C w koncentratorze próżniowym (Savant SPD 121P, Thermo Electron Corporation, USA). Wysuszone próbki następnie rozpuszczano w 300 µl 80%-owego metanolu i wirowano przez 10 minut przy 10 000 rpm (miniSpin, Eppendorf, Niemcy) (Muth, 2010). Tak przygotowane ekstrakty przenoszono do szklanych fiolek i poddawano analizie LC/MS. Dla każdej próby wykonywano dwa powtórzenia techniczne.

Analizie GC/MS poddawano ekstrakty metabolitów wtórnych wyizolowane z powierzchni części zielonych roślin. W tym celu, łodygi wraz z liśćmi łubinu (na 1 próbkę przypadało 5 roślin) zanurzano w 100 ml chlorku metylenu na 20 sekund. Czas ekstrakcji został tak zoptymalizowany, aby zapobiec uszkodzeniu komórek i wyciekowi związków obecnych w cytozolu. Uzyskany w ten sposób roztwór odparowywano do sucha i ważono, a następnie rozpuszczano w 2 ml chlorku metylenu. Objętość odpowiadającą 2 mg s.m. przenoszono do nowych szklanych probówek, dodawano 20 µl rybitolu (1mg/ml) jako standardu wewnętrznego i odparowywano do sucha. Metoda ekstrakcji metabolitów wtórnych z powierzchni liści została zoptymalizowana przez Swarcewicz i Wojakowską z Pracowni Proteomiki i Metabolomiki IChB PAN (Poznań). Podczas procesu optymalizacji stosowano następujące rozpuszczalniki: chlorek metylenu, chloroform, chloroform/metanol (1:1), heksan.

3.2.1.6 Derywatywacja

Próbki ekstraktów metabolitów wtórnych z powierzchni liści poddawano dwuetapowej derywatywacji, bezpośrednio przed analizą GC/MS. W pierwszym etapie do wysuszonej próbki dodawano 40 µl chlorowodoru metoksyaminy w pirydynie (20 mg/ml) i wytrząsano w 40°C przez 90 minut. W następnej kolejności dodawano 70 µl MSTFA i ponownie wytrząsano w 37°C przez 30 minut. Do tak przygotowanych prób dodawano 100 µl suchego chlorku metylenu. Próbki wirowano przez 10 minut przy 10 000 rpm, przenoszono do szklanych fiolek i poddawano analizie GC/MS (de Vos i in., 2007). Dla każdej próby wykonywano dwa powtórzenia techniczne.

3.2.1.7 Analiza LC/MS i GC/MS

Analizy LC/MS zostały przeprowadzone z użyciem układu LC/ESI-Qq-ToF. Część analiz wykonano z wykorzystaniem systemu TriVersa NanoMate (szczegółowy opis w podrozdziałach 3.3.2. i 3.3.5.). System chromatograficzny, sprzężony ze spektrometrem mas, stanowił układ HPLC RR 1200 firmy Agilent. Jako kolumny chromatograficzne stosowano Zorbax Eclipse XDB C18 lub Poroshell 120 EC-C18 (Agilent).

Widma masowe MS zarejestrowano w trybie jonów dodatnich. Dla wybranych próbek zarejestrowano widma MS² i pseudo-MS³ w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

Analiza GC/MS została przeprowadzona w systemie GC/TOF-MS (szczegółowy opis w podrozdziale 3.3.1.).

3.2.1.8 Analiza danych LC/MS i GC/MS

Dane LC/MS normalizowano i integrowano ręcznie przy pomocy programu Data Analysis 4.0 (Bruker) oraz automatycznie przy użyciu ogólnie dostępnych programów MZmine- www.mzmine.sourceforge.net (Pluskal i in., 2010) oraz MetAlign- www.metlign.wur.nl (Lommen, 2009). Analizę PCA przeprowadzono w programie Profile Analysis 2.0 (Bruker). Pozostałe obliczenia statystyczne przeprowadzono w programie Microsoft Office Excel.

Dane uzyskane metodą GC/MS integrowano ręcznie przy pomocy programu MassLynx (Waters). Normalizację i automatyczną integrację danych, a także analizę multizmienności PCA wykonano przy użyciu programu MarkerLynx (Waters). Pozostałe obliczenia statystyczne przeprowadzono w programie Microsoft Office Excel.

3.2.1.9 Analiza RT-PCR

Analizie RT-PCR poddano wybrane próbki liści roślin infekowanych i elisytowanych. Totalne RNA zostało wyizolowane z 50 mg homogenizowanej tkanki roślinnej, przy użyciu zestawu do izolacji, SV Total RNA Isolation System, zgodnie z dołączoną procedurą (Promega). Stężenie RNA dla każdej próbki mierzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, USA), przy długości fali równej 260 nm.

Odwrotna transkrypcja została przeprowadzona (według procedury firmy Novazym) w 20µl mieszaniny reakcyjnej, przy użyciu odwrotnej transkryptazy Verte M-MLV i heksametrów losowych (6-cio nukleotydowych starterów), matrycę stanowiło totalne RNA (2µg).

Reakcję PCR przeprowadzano w 25 µl mieszaniny reakcyjnej, przy użyciu polimerazy Allegro Taq (Novazym) oraz starterów dla amoniakolizazy fenyloalaniny (PAL), syntazy chalkonowej (CHS), syntazy izoflawonowej (IFS) oraz aktyny, matrycę stanowił 1 µl otrzymanego w reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA. Reakcję amplifikacji przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA) w 25 cyklach. Temperatura hybrydyzacji starterów (ang. *annealing*) wynosiła 52°C dla CHS i IFS oraz 56°C dla PAL. Produkty reakcji PCR analizowano przy użyciu elektroforezy w 1%-owym żelu agarozowym (parametry rozdziału: 30 min przy napięciu 100V).

Sekwencje starterów do PCR:

PAL F 5'-CCAAGTCAATTGAGAGGGAG-3'

PAL R 5'-CATCTTGGTTGTGCTGCTC-3'

CHS F 5'-ATCCTGATTTCTACTTCAGA-3'

CHS R 5'-GGTGCCATATAAGCACAAA-3'

IFS R 5'-CACAACAAGACCCTTGATT-3'

IFS F 5'-GGACCTTACTGGAAGTTCAT-3'

aktyna F 5'-GCATTGTTGGTCCTCCTCG-3'

aktyna R 5'-TGTGCCTCATCCCCAACATA-3'

3.2.2 Analiza strukturalna i profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinów meksykańskich w korelacji z gatunkami regionu śródziemnomorskiego

3.2.2.1 Materiał roślinny

Nasiona dziesięciu gatunków łubinów meksykańskich (*Lupinus. elegans*, *L.exaltatus*, *L.hintoni*, *L.madrensis*, *L.mexicanus*, *L.montanus*, *L.reflexus*, *L.rotundiflorus*, *L.stipulates*, *Lupinus sp.*) zostały zebrane w różnych okolicach stanu Jalisco (Meksyk) i scharakteryzowane pod względem taksonomicznym przez dr Jacqueline Reynoso Dueñas z Uniwersytetu w Guadalajarze. Rośliny wznosiły się w doniczkach wypełnionych mieszanką piasku i perlitu (1:1), w kontrolowanych warunkach szklarniowych (25°C, 50% wilgotności, naświetlenie-16/8h-dzień/noc). Rośliny podlewano wodą co drugi dzień, a raz w tygodniu wspomagano nawozem NPK (6:3:6, 3g/l, 25 ml na doniczkę). Sześciotygodniowe rośliny zbierano w celu wyekstrahowania flawonoidów.

Nasiona trzech gatunków łubinów pochodzących z terenu śródziemnomorskiego (*L.albus*, *L.angustifolius*, *L.luteus*) oraz jednego południowoamerykańskiego udomowionego w Europie Środkowej (*L.mutabilis*) zakupiono w Stacji Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Przebędowie. Rośliny wysiewano do doniczek (6 roślin na doniczkę) zawierających mieszankę perlitu, ziemi i piasku. Rośliny wznosiły się w szklarni w kontrolowanych warunkach temperatury (22/18°C dzień/noc), oświetlenia (16/8h dzień/noc) i odpowiednim stopniu nawodnienia. Po trzech tygodniach nastąpił zbiór.

Doświadczenia hodowlane przeprowadzono w następujących okresach:

- styczeń-luty 2009: hodowla 8 gatunków łubinów meksykańskich (*L.exaltatus*, *L.madrensis*, *L.mexicanus*, *L.montanus*, *L.reflexus*, *L.rotundiflorus*, *L.stipulatus*, *Lupinus.sp*) w Meksyku,
- 26.09.-16.10.2009: hodowla 3 gatunków łubinów europejskich (*L.albus*, *L.angustifolius*, *L.luteus*) w Polsce,
- styczeń-luty 2011: hodowla 8 gatunków łubinów meksykańskich (*L.elegans*, *L.exaltatus*, *L.hintoni*, *L.mexicanus*, *L.montanus*, *L.rotundiflorus*, *L.stipulates*, *Lupinus sp.*) w Meksyku,
- 31.03-18.04. 2011: hodowla 4 gatunków łubinów (*L.albus*, *L.angustifolius*, *L.luteus*, *L.mutabilis*) w Polsce.

3.2.2.2 Ekstrakcja i oczyszczanie fenolowych metabolitów wtórych obecnych w liściach i korzeniach łubinu

Liście (200 mg świeżej masy) i korzenie (400 mg świeżej masy), bezpośrednio po zbiorze, mrożono w ciekłym azocie i homogenizowano w 5 ml 80%-owego metanolu. Ekstrakcję prowadzono przez 30 minut w łaźni ultradźwiękowej. Ekstrakty wirowano przez 20 min przy 30 000 rpm. Supernatant przenoszono do nowych szklanych probówek i odparowywano do sucha, w koncentratorze próżniowym, w temperaturze 35°C. Ekstrakty ponownie rozpuszczano w 2 ml 10%-owym metanolu i poddawano ekstrakcji do fazy stałej SPE na złożu SCX (300 mg) w celu pozbycia się alkaloidów (Stobiecki i in., 1997). Złoże aktywowano, poprzez przemywanie kolejno 5 ml metanolu i 5 ml wody. Próbki wymywano 2ml 10%-owego metanolu i 2 ml 100%-owego metanolu i ponownie odparowywano do sucha. Pozbawione alkaloidów ekstrakty rozpuszczano w 600/1000 μ l (liść/korzeń) 80%-owego metanolu, wirowano, po czym przenoszono do szklanych fiolek i poddawano analizie LC/MS.

3.2.2.3 Analiza LC/MS

Analizy LC/MS prowadzono z wykorzystaniem dwóch układów, LC/ESI-IT oraz LC/ESI-Qq-ToF. Część analiz wykonano przy użyciu systemu TriVersa NanoMate. (szczegółowy opis w podrozdziałach 3.3.2, 3.3.3 i 3.3.5). System chromatograficzny, sprzężony ze spektrometrem mas z analizatorem hybrydowym Qq-ToF, stanowił układ HPLC RR 1200 firmy Agilent lub Waters Aquity UPLC. Jako kolumny chromatograficzne stosowano Zorbax Eclipse XDB C18 lub Poroshell 120 EC-C18 (Agilent).

Widma masowe MS rejestrowano w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Dla wybranych próbek zarejestrowano widma MS², pseudo-MS³ i pseudo-MRM (system LC/ESI-Qq-ToF) oraz MSⁿ (system LC/ESI-IT) w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

3.2.2.4 Analiza chemotaksonomiczna

Analiza chemotaksonomiczna była prowadzona na podstawie różnic w zawartości flawonoidów w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinów. Macierze podobieństwa obliczono dla dwóch zestawów profili flawonoidów, osobno dla liścia i korzenia. Dane półilościowe, w postaci obserwowanych intensywności protonowanych cząsteczek w widmie MS (a = intensywność powyżej 1×10⁵; b = intensywność równa od 1×10⁴ do 1×10⁵; c = intensywność poniżej 1×10⁴; nd - nie wykryto) zostały wyrażone jako odpowiednie wartości 5, 4, 3, 0, w odniesieniu do log₁₀. Macierze podobieństwa zostały oparte na odległości euklidesowej między profilami metabolitów (Gower, 1985). Grupowanie

hierarchiczne zestawów profili, zostało przeprowadzone na podstawie obliczonych macierzy podobieństwa, przy użyciu algorytmu UPGMA. Wyniki przedstawiono w formie dendrogramów. Obliczenia przeprowadzono w programie GenStat 14 (Payne i in., 2011).

Obliczenia przeprowadzone zostały przez prof. dr hab. Pawła Krajewskiego z Instytutu Genetyki Roślin PAN (Poznań).

3.2.3 Zastosowanie techniki LC/MS/MS do profilowania glikozylowanych flawonoidów w korzeniach siewek, korzeniach włośnikowatych i zawieszinowych hodowlach komórek korzeniowych modelowej rośliny motylkowatej *Medicago truncatula*

3.2.3.1 Materiał roślinny

Siewki *Medicago* (Jemalong J5) wzrastały, na zwilżanych wodą płytkach Petri'ego wyłożonych bibułą Whatman'a, w kontrolowanych warunkach szklarniowych (temperatura 20°C, wilgotność 50%, naświetlenie-16/8h-dzień/noc). Siedmiodniowe siewki przenoszono na modyfikowaną płynną pożywkę Fahraeus (Boisson-Dernier i in. 2001). Po 24 godzinach następował zbiór korzeni oraz pożywki.

Zawieszinowa hodowla komórek korzeniowych została wyprowadzona z korzeni *M.truncatula* i była utrzymywana w ciemności, w temperaturze 22°C na wyrząsarce (Orbital Shaker-150 rpm). Kultury komórkowe wzrastały na pożywce MSO/2 uzupełnionej o sacharozę (30g/l), kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) (2 mg/l), kinetynę (0.25 mg/l) i hydrolizat kazeiny (250 mg/l). Zawiesinę komórek korzeniowych przeszczepiano co 2 dni na świeżą pożywkę w stosunku 1:2. Siedmiodniowe kultury komórkowe zostały poddawane analizie LC/MS.

Kultury korzeni włośnikowatych wyprowadzono z roślin infekowanych *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 (Quandt i in. 1993). Hodowlę prowadzono w ciemności, w temperaturze 22°C na modyfikowanej pożywce Fahraeus uzupełnionej o sacharozę (10 g/l), mio-inozytol (100 mg/l), tiaminę (10 mg/l), pirydoksynę (1 mg/l), biotynę (1 mg/l), kwas nikotynowy (1 mg/l), glicynę (2 mg/l) oraz auksynę indoloctową (0,5 mg/l). Trzytygodniowe kultury korzeni włośnikowatych przenoszono na świeże płynne podłoże i po 48h następował zbiór korzeni oraz pożywki.

Materiał roślinny został w całości przygotowany i dostarczony przez zespół Fizjologii Molekularnej Roślin IChB PAN (Poznań) pod kierownictwem prof. dr hab. Michała Jasińskiego.

3.2.3.2 Ekstrakcja fenolowych metabolitów z tkanek korzeni *M.truncatula*.

Zamrożony w ciekłym azocie materiał (200 mg korzeni siewek, 250 +/- 50 mg korzeni włóśnikowatych oraz 1 g zawiesinowych hodowli komórek korzeniowych) homogenizowano w 80%-owym metanolu (odpowiednio w 4, 4, i 12 ml) i ekstrahowano w łaźni ultradźwiękowej przez 30 min. Ekstrakty wirowano przez 20 minut przy 30 000 rpm, a supernatant przenoszono do nowych szklanych probówek i odparowywano do sucha w temperaturze pokojowej. Wysuszone ekstrakty ponownie rozpuszczano w 0,5 ml 80%-owego metanolu i poddawano analizie LC/MS.

3.2.3.3 Ekstrakcja do fazy stałej pożywek pohodowlanych

Ekstrakcję do fazy stałej (SPE) przeprowadzano na kolumnkach, wypełnionych złożem RP C-18 (400 mg), które były aktywowane poprzez przemywanie kolejno 5 ml metanolu i 5 ml wody. Umieszczoną na złożu próbkę pożywki (5 ml) przemywano 5 ml wody. Flawonoidy wymywano 4 ml 100%-owego metanolu. Próbki odparowywano do sucha w strumieniu azotu, po czym rozpuszczano w 200 µl 80%-owego metanolu i poddawano analizie LC/MS.

3.2.3.4 Analiza LC/MS

Analizy LC/MS zostały przeprowadzone z użyciem systemu LC/ESI-Qq-ToF (szczegółowy opis w podrozdziale 3.3.2.). System chromatograficzny, sprzężony ze spektrometrem mas, stanowił układ HPLC RR 1200 firmy Agilent. Jako kolumny chromatograficzne stosowano Zorbax Eclipse XDB C18 (Agilent).

Widma masowe MS zarejestrowano w trybie jonów dodatnich. Dla wybranych próbek zarejestrowano widma MS² i pseudo-MS³ w trybie jonów dodatnich.

3.2.4 Wykorzystanie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID) do analizy strukturalnej i profilowania flawonoidów obecnych w liściach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*)

3.2.4.1 Materiał roślinny

Siewki pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L, odmiana. Legenda) wzrastały w komorach hodowlanych w kontrolowanych warunkach światła (16/8h-dzień/noc) i temperatury (15°C) przez trzy tygodnie. Po tym czasie nastąpił zbiór liści (10 liści na próbkę), które zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.4.2 Ekstrakcja i oczyszczanie fenolowych metabolitów z liści pszenicy

600 mg materiału roślinnego rozdrabniano w temperaturze ciekłego azotu w młynku kulowym (Retsch, model 400, Niemcy). Rozdrobniony materiał homogenizowano w 4 ml 80%-owego metanolu w łaźni ultradźwiękowej przez 30 min. Ekstrakty wirowano przez 20 minut przy 30 000 rpm, supernatant przenoszono do nowych szklanych probówek i odparowywano do sucha. Próbkę rozpuszczano w 1,5 ml wody i poddawano ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Wypełnienie kolumnki stanowił żel krzemionkowy RP C-18 (300 mg). Aktywowane kolumnki po nałożeniu próbki przemywano 2 ml wody, a związki fenolowe wymywano 2 ml 100 %-owego metanolu. Próbkę ponownie odparowywano do sucha i rozpuszczano w 600 µl 80%-owego metanolu. Po zwirowaniu i przeniesieniu do szklanych fiolek poddawano analizie LC/MS.

3.2.4.3 Analiza LC/MS

Analizy LC/MS prowadzono z wykorzystaniem systemu LC/ESI-Qq-ToF w połączeniu z systemem TriVersa NanoMate (szczegółowy opis w podrozdziałach 3.3.2 i 3.3.5). System chromatograficzny stanowił układ Waters Aquity UPLC. Rozdział prowadzono na kolumnach Poroshell 120 EC-C18, Acquity UPLC HSS C-18, Bionacom Velocity STR.

Widma masowe MS, MS² i MS³ rejestrowano w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

3.2.5 Zastosowanie kationów metali w procesie jonizacji przez elektrorozpraszanie (ESI), celem uzyskania danych na temat wzorca glikozylacji aglikonów fenolowych.

Sporządzono roztwory metanolowe (1mg/ml) dla czterech standardów flawonoidów: 7-*O*-glukozydu luteoliny, 4'-*O*-glukozydu luteoliny, 8-*C*-glukozydu luteoliny, 6-*C*-glukozydu luteoliny. Standardy rozpuszczano w roztworach (1:1-metanol:woda) soli metali (chlorek wapnia, miedzi, magnezu oraz azotan srebra, magnezu, wapnia) tak, aby końcowe stężenie wynosiło 1×10^{-5} M. Otrzymane roztwory poddawano analizie masowej poprzez bezpośrednie wprowadzenie próbki do źródła ESI i obserwowano rejestrowane widma MS, MS², pseudo-MS³, MSⁿ. Analizy masowe wykonano przy użyciu spektrometrów z analizatorem typu pułapka jonowa oraz analizatorem hybrydowym Qq-ToF (szczegółowy opis w podrozdziałach 3.3.2 i 3.3.4).

3.3 Aparatura analityczna

3.3.1 Chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (GC/TOF-MS)

System GC/MS wykorzystano do analizy metabolitów wyekstrahowanych z powierzchni liści łubinu wąskolistnego. W skład układu wchodził chromatograf gazowy Agilent 6890 N (Agilent, UK) (Tab.3.1) oraz spektrometr z analizatorem czasu przelotu (TOF) (Waters, UK) (Tab.3.2). Analizy prowadzone były przy następujących parametrach układów.

Tab.3.1 Parametry pracy układu GC Agilent 6890 N.

Chromatograf gazowy Agilent 6890 N	
Autosampler	Model 7683
Kolumna	DB-5 (J&W Scientific Co.,USA)
Wymiary kolumny	30 m × 0.25 mm, 0.25 μm grubość filmu
Gaz nośny/przepływ	Hel/1ml/min
Temp. portu nastrzyku	250°C
Objętość nastrzyku	1 μl
Dozownik	typu split (50)

Program temperaturowy pieca podczas rozdziału był następujący: 2 min w 70°C, wzrost temperatury o 10°C/min aż do 300°C i 15 min w 300°C. Całkowity czas rozdziału wynosił 45 min.

Tab.3.2 Parametry pracy układu TOF/MS.

Spektrometr TOF/MS	
Analizator	TOF
Temp. interfejsu	230°C
Temp. źródła	250°C
Energia fragmentacji w źródle	70 eV
Zakres rejestrowanych mas	50-650 m/z
Program do analizy danych	MassLynx 4.1 i MarkerLynx

3.3.2 Chromatograf ciekawy sprzężony ze spektrometrem mas z hybrydowym analizatorem typu kwadrupol-analizator czasu przelotu (LC/ESI-Qq-ToF)

Układ LC/ESI-Qq-ToF wykorzystywany był do analizy flawonoidów we wszystkich wyżej opisanych eksperymentach (Rozdz.3.2). System składał się z chromatografu ciekawego RR1200 SL (Agilent, UK) (Tab.3.3) lub Aquity UPLC (Waters, UK) (Tab.3.4) oraz

spektrometru mas micrOToF-Q II (Bruker Daltonics, Niemcy) (Tab.3.6). Analizy prowadzone były przy następujących parametrach układów.

Tab.3.3 Parametry pracy układu LC RR1200 SL.

Chromatograf cieczowy RR1200 SL	
Sposób wprowadzania próby	Automatyczna komora nastrzyku
Kolumna 1	Zorbax Eclipse XDB C18 (Agilent)
Kolumna 2	Poroshell 120 EC-C18 (Agilent)
Wymiary kolumny 1	2.1 x 100 mm, 1.8 µm średnica ziarna
Wymiary kolumny 2	2.1×100 mm, 2.7 µm średnica ziarna
Temperatura kolumny	35°C
Objętość nastrzyku	5 µl
Przepływ	0,5 / 0,6 ml/min (odpowiednio kolumna1/2)

Tab.3.4 Parametry układu LC Waters Aquity.

Chromatograf cieczowy Waters Aquity	
Sposób wprowadzania próby	Automatyczna komora nastrzyku
Kolumna 1	Poroshell 120 EC-C18 (Agilent)
Kolumna 2	Acquity UPLC HSS C-18 (Waters)
Kolumna 3	Bionacom Velocity STR (Bionacom)
Wymiary kolumny 1	2.1×100 mm, 2.7 µm średnica ziarna
Wymiary kolumny 2	2.1×100 mm, 1.8 µm średnica ziarna
Wymiary kolumny 3	2.1×100 mm, of 1.8 µm
Temperatura kolumny	35°C
Objętość nastrzyku	5 µl
Przepływ	0,6 / 0,6/ 0,4 ml/min (odpowiednio kolumna1/2/3)

Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny rozpuszczalników:

- faza A - 99.5% woda/0.5% kwas mrówkowy (v/v)
- faza B - 99.5% acetonitryl/0.5% kwas mrówkowy (v/v)

Stosowano następujące gradienty :

Dla kolumn: Zorbax Eclipse XDB C18, Poroshell 120 EC-C18, Acquity UPLC HSS C-18 (Tab.3.5a) oraz Bionacom Velocity STR (Tab.3.5b)

Tab.3.5 Gradienty stosowane w układach LC RR 1200 SL (a) i Waters Aquity (b).

a)	Czas [min]	%A	%B	b)	Czas [min]	%A	%B
	0	90	10		0	98	2
	0-5	70	30		1.6	84	16
	5-12	70	30		4.4	82	18
	12-13	5	95		12.1	75	25
	13-15	5	95		15	49	51
	15-19	90	10		17.4	44	56
	19	90	10		17.4-24.6	44	56
					24.7	98	2
					30	98	2

Objętość wycieku z kolumny została rozdzielona w stosunku 3:2 (split postkolumnowy), w wyniku czego, roztwór wprowadzany był do źródła jonów z predkością przepływu równą 0,2 ml/min.

Tab.3.6 Parametry pracy układu micrOToF-Q II.

Spektrometr masowy micrOToF-Q II	
Źródło jonów	ESI
Analizator	Qq-ToF
Napięcie w źródle jonów	+/- 4,5 kV
Temp. w źródle	220°C
Gaz nebulizujący	Azot 1,2 bara / 0,4 bary (bezpośredni nastrzyk)
Przepływ gazu suszącego	8 l/min / 4 l/min (bezpośredni nastrzyk)
Gaz kolizyjny	Argon
Energia kolizji	10-35 eV
ISCID	80-85 eV
Rozdzielczość układu	15 000 FWHM (przy 200 m/z)
Zakres rejestrowanych mas	50-1200 m/z
Kalibracja aparatu	Zewnętrzna i wewnętrzna-klastrami mrówczanu sodu
Program do analizy danych	DataAnalysis 4.0 i ProfileAnalysis 2.0

Analiza strukturalna związków fenolowych została przeprowadzona w oparciu o widma masowe zarejestrowane w trybie MS oraz CID MS/MS i pseudo-MS³ (ISCID) dla jonów dodatnich i ujemnych. Energie kolizji CID i ISCID zostały dobrane odpowiednio do mas cząsteczkowych analizowanych związków. Wysoka rozdzielczość aparatu pozwoliła na określenie dokładnych mas protonowanych i deprotonowanych cząsteczek $[M+H]^+/[M-H]^-$ z błędem poniżej 5 ppm.

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

Układ LC/ESI-IT wykorzystywany był do analizy flawonoidów w liściach i korzeniach łubinów meksykańskich. System składał się z chromatografu ciekowego Agilent 1100 HPLC (Niemcy) (Tab.3.7) oraz spektrometru mas z analizatorem typu pułapka jonowa (Bruker Daltonics, Germany) (Tab.3.9). Analizy prowadzone były przy następujących parametrach układów.

Tab.3.7 Parametry pracy układu LC Agilent 1100.

Chromatograf ciekowy Agilent 1100	
Sposób wprowadzania próby	Pętla nastrzykowa
Kolumna	X-Bridge C-18 (Agilent)
Wymiary kolumny	150 × 2.1 mm, 3.5 μm średnica ziarna
Temperatura kolumny	40°C
Objętość nastrzyku	10 μl
Przepływ	0,2 ml/min

Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny rozpuszczalników:

- faza A - 99.5% woda/0.5% kwas mrówkowy (v/v)
- faza B - 99.5% acetonitryl/0.5% kwas mrówkowy (v/v)

Stosowano następujący gradient (Tab.3.8):

Tab.3.8 Gradient stosowany w układzie LC Agilent 1100.

Czas [min]	%A	%B
0	95	5
0-35	70	30
35-45	5	95
45-52	5	95
52-60	95	5
60	95	5

Tab.3.9 Parametry pracy układu IT/MS.

Spektrometr masowy IT/MS	
Źródło jonów	ESI
Analizator	IT Escuire 3000
Napięcie w źródle	+/- 4,5 kV
Gaz nebulizujący	Azot 1,7 bara
Przepływ gazu suszącego	9 l/min
Temp. gazu suszącego	310°C
Gaz kolizyjny	Hel
Energia kolizji	1V – wartość rampowana w zakresie 40-200%
Zakres rejestrowanych mas	50-1500 m/z
Program do analizy danych	DataAnalysis 3.1

Analizy na układzie LC/ESI-IT przeprowadziła mgr Anna Piasecka z Zespołu Metabolomiki IGR PAN (Poznań) pod kierownictwem prof. dr hab. Piotra Kachlickiego.

3.3.4 Spektrometr mas z analizatorem typu pułapka jonowa (ESI-IT)

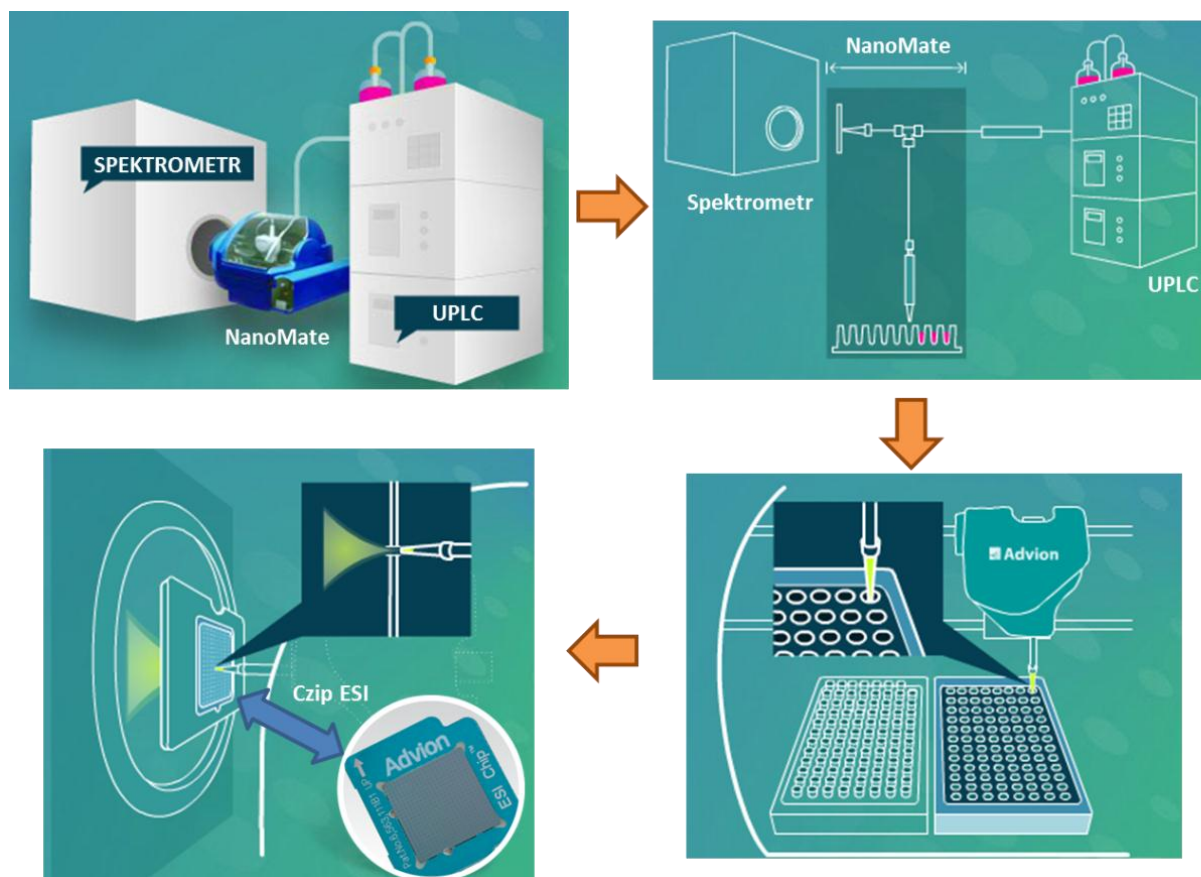
Tab.3.10 Parametry pracy układu IT/MS.

Spektrometr masowy IT/MS	
Źródło jonów	ESI
Analizator	amaZon
Napięcie w źródle	+/- 4,5 kV
Gaz nebulizujący	Azot 15 000 psi
Przepływ gazu suszącego	4 l/min
Temp. gazu suszącego	170°C
Gaz kolizyjny	Hel
Tryb MS ⁿ	Manualny MS ⁿ low mass cut-off (utrata jonów o niskich masach) 27% masy nominalnej prekursora amplituda energii fragm. 0,5 – 1,5 izolacja jonu 1-4 Da
Zakres rejestrowanych mas	200-1400 m/z

3.3.5 System TriVersa NanoMate

System TriVersa NanoMate (Advion, USA) zawiera oparte na formie chipu (zawierającego 384 dysze), źródło typu nano-ESI (Ryc.3.2). Układ działa w trzech różnych trybach, które wykorzystywano podczas prowadzonych eksperymentów, dotyczących analizy fenolowych metabolitów wtórnych. W pierwszym trybie, system NanoMate w sprzężeniu ze spektrometrem micrOTof-Q II, używano do bezpośredniego nastrzyku standardów

flawonoidów podczas badań optymalizacyjnych. W układzie z systemem LC/Qq-ToF pełnił funkcję źródła typu nano. W trzecim trybie, umożliwiał jednoczesną analizę i zbiór frakcji wycieku z kolumny chromatograficznej (Ryc.3.2).



Ryc.3.2 Schemat działania układu LC/MS sprzężonego z systemem NanoMate w trybie z automatycznym zbiorem frakcji. Rycina przedstawia również obraz źródła typu nano, stanowiącego 384-dyszowy chip (widoczny w białym kółku) (źródło www.advion.com).

Podczas analiz MS, napięcie w źródle jonów (HD_A_384 chip, Advion, USA) wynosiło 1,7 kV. W celu przeciwdziałania zapychaniu się dysz podczas analiz, zastosowano tryb wykrywania spreju (ang. *spray sensing*). W przypadku, gdy wartość prądu jonowego spadła poniżej 2 nA lub wzrosła powyżej 7000 nA przez okres dłuższy niż 30 sekund, robot automatycznie zmieniał pozycję nastrzyku na kolejną dyszę (maksymalnie 2 razy podczas jednej analizy). W sprzężeniu z chromatografem ciekowym, wyciek z kolumny rozdzielany był bezpośrednio przed systemem NanoMate, tak że do źródła jonów był kierowany z prędkością przepływu 0,099 $\mu\text{l}/\text{min}$. W trybie z automatycznym zbieraniem frakcji, wyciek z kolumny chromatograficznej był rozdzielony tak, że do kolektora frakcji dostarczany był z prędkością przepływu 86.7 $\mu\text{l}/\text{min}$, a 0,099 $\mu\text{l}/\text{min}$ eluentu było kierowane do źródła nano-

ESI. Frakcje zbierano co 10s na 384-dołkową płytkę (twin. tec. Eppendorf) utrzymywaną w temperaturze 4°C. Następnie próbki zabezpieczano przed odparowaniem, za pomocą termofolii i poddawano analizie *off-line*. Parametry pracy układu Qq-ToF/MS pozostawały jak wyżej opisano (patrz Tab.3.6). Widma MS, MS² i pseudo-MS³ rejestrowano w trybie jonów dodatnich.

IV. WYNIKI

Wyniki doświadczeń, przeprowadzonych w poszczególnych eksperymentach, zostały przedstawione w kolejności zgodnej z opisaną w rozdziale III (Materiały i metody badawcze). Wyniki prac badawczych, wykorzystujących techniki spektrometrii mas do profilowania i analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych w materiale roślinnym (łubin, lucerna, pszenica), przedstawiono począwszy od najbardziej złożonego eksperymentu. Badania optymalizacyjne i metodyczne stanowiły nieodłączną część wszystkich opisanych niezależnych eksperymentów. Opis podsumowujący aspekty metodyczne przedstawiono pod koniec rozdziału IV.

4.1 Analiza zmian profili fenolowych metabolitów wtórnych łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) w odpowiedzi na infekcję patogennym grzybem (*Colletotrichum lupini*) oraz elisytację zawieszoną toksycznych metabolitów *C.lupini*

Eksperymenty, związane z określeniem wpływu stresu biotycznego na zmiany w profilach związków fenolowych łubinu, stanowiły kontynuację i rozszerzenie badań prowadzonych dotychczas w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki IChB PAN (Bednarek i in., 2001, 2003; Muth i in., 2009; Muth, 2010). Prace badawcze zostały poszerzone o analizy zmian w profilach metabolitów łubinu, z wykorzystaniem systemów GC/MS. Zostało również opracowane i zastosowane kompleksowe podejście do analiz związków fenolowych przy użyciu techniki LC/MS. Ponadto badano wpływ trzech różnych sposobów infekcji elisytorem grzybowym, na zmiany profili fenolowych metabolitów wtórnych łubinu wąskolistnego. Określono także zmiany ekspresji genów szlaku fenylopropanoidowego w odpowiedzi na infekcję grzybem *C.lupini*.

4.1.1 Identyfikacja związków fenolowych w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego metodą LC/MS

Sprzężenie wysokosprawnego chromatografu cieczowego z wysokorozdzielczym spektrometrem mas z hybrydowym analizatorem typu Qq-ToF umożliwiło identyfikację 72 flawonoidów, obecnych w ekstraktach otrzymanych z liści łubinu wąskolistnego (Tab. 4.1) (Wojakowska i in., 2012). Podejście metodyczne, zastosowane podczas analizy fenolowych metabolitów wtórnych techniką LC/MS, pozwoliło na podwojenie liczby zidentyfikowanych związków, w stosunku do wcześniej prowadzonych badań (Muth i in., 2008, 2009). Wiele spośród flawonoidów łubinowych, stanowiło związki izomeryczne lub izobaryczne, różniące się pozycją podstawnika hydroksylowego czy metylowego na cząsteczce aglikonu.

Tab.4.1 Glikozylowane pochodne flawonoidów oraz wolne aglikony, zidentyfikowane w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego (*L.angustifolius* odm. Sonet), przy wykorzystaniu systemu LC/ESI-Qq-ToF (według Wojakowska i in., 2012).

Nr	R _t (min)	Mcz	Dokładna masa jonów [M+H] ⁺		Związki zidentyfikowane w liściach <i>L.angustifolius</i>
			Obliczona	Obserwowana	
1	2.7	594	595.1657	595.1705	C-diglukozyd genisteiny
2	3.3	448	449.1078	449.1088	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^{a,d}
3	3.4	696	697.1611	697.1605	malonylowany diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (I) ^a
4	3.5	432	433.1129	433.1122	8-C-glukozyd genisteiny ^{c,d}
5	3.7	680	681.1661	681.1651	malonylowany 4',7di-O-glukozyd genisteiny (I) ^{a,d}
6	3.8	680	681.1661	681.1669	malonylowany 4',7di-O-glukozyd genisteiny (II) ^{a,d}
7	3.9	756	757.2186	757.2187	glukozyd-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu ^d
8	3.9	782	783.1614	783.1615	dimalonylowany 4',7di-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^a
9	4.0	610	611.1607	611.1610	3-O-ramnozyloglukozyd kwercetyny ^d
10	4.2	518	519.1133	519.1136	malonylowany 8-C-glukozyd genisteiny
11	4.2	464	465.1028	465.1015	O-glukozyd kwercetyny
12	4.3	448	449.1078	449.1061	7-O-glukozyd luteoliny ^{a,b}
13	4.3	518	519.1133	519.1138	malonylowany O-glukozyd genisteiny ^a
14	4.3	680	681.1661	681.1661	malonylowany O,C-diglukozyd genisteiny ^b
15	4.3	842	843.2190	843.2203	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (I) ^d
16	4.3	432	433.1129	433.1136	7-O-glukozyd genisteiny ^{a,b,c,d}
17	4.3	534	535.1082	535.1075	malonylowany 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (I)
18	4.4	462	463.1235	463.1230	8-C-glukozyd chryzoeriolu ^c
19	4.4	842	843.2190	843.2183	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (II) ^d
20	4.4	680	681.1661	681.1667	malonylowany diglukozyd genisteiny
21	4.5	842	843.2190	843.2217	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (III) ^d
22	4.5	766	767.1665	767.1669	dimalonylowany 4',7di-O-glukozyd genisteiny (I) ^{a,d}
23	4.6	766	767.1665	767.1662	dimalonylowany 4',7di-O-glukozyd genisteiny (II) ^{a,d}
24	4.6	534	535.1082	535.1075	malonylowany 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (II) ^{a,d}
25	4.6	462	463.1235	463.1230	O-glukozyd chryzoeriolu (I) ^d
26	4.6	448	449.1078	449.1088	3-O-glukozyd kemferolu ^{a,b}
27	4.7	842	843.2190	843.2205	malonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (IV) ^d
28	4.8	564	565.1552	565.1551	O-ksylozyloglukozyd apigeniny ^a
29	4.8	518	519.1133	519.1142	malonylowany C-glukozyd genisteiny
30	4.8	782	783.1614	783.1618	dimalonylowany 7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny
31	4.8	928	929.2194	929.2209	dimalonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (I) ^d
32	4.9	928	929.2194	929.2201	dimalonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (II) ^d
33	4.9	432	433.1129	433.1131	7-O-glukozyd apigeniny ^{a,b,c}
34	5.0	928	929.2194	929.2192	dimalonylowany glukozyd-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (III) ^d
35	5.0	766	767.1665	767.1662	dimalonylowany 4',7di-O-glukozyd apigeniny ^a
36	5.0	696	697.1611	697.1615	malonylowany 7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (II)
37	5.1	666	667.1505	667.1512	malonylowany ksylozyloglukozyd luteoliny ^a
38	5.1	594	595.1657	595.1665	O-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu ^d

39	5.1	548	549.1239	549.1245	malonylowany C-glukozyd chryzoeriolu
40	5.2	534	535.1082	535.1089	malonylowany O-glukozyd kemferolu ^a
41	5.2	518	519.1133	519.1124	malonylowany 7-O-glukozyd genisteiny (I) ^a
42	5.3	650	651.1556	651.1549	malonylowany 7-O- ksylozyloglukozyd genisteiny (I)
43	5.3	462	463.1235	463.1234	O-glukozyd chryzoeriolu (II)
44	5.4	518	519.1133	519.1131	malonylowany 7-O-glukozyd genisteiny (II) ^a
45	5.4	678	679.2233	679.2215	O-diglukozyd luteonu
46	5.5	650	651.1556	651.1551	malonylowany 7-O-ksylozyloglukozyd genisteiny (II) ^d
47	5.5	680	681.1661	681.1678	malonylowany O-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (I) ^d
48	5.6	518	519.1133	519.1139	malonylowany O-glukozyd apigeniny (I) ^a
49	5.6	650	651.1556	651.1553	malonylowany O-ksylozyloglukozyd apigeniny (I) ^a
50	5.7	680	681.1661	681.1678	malonylowany O-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (II) ^d
51	5.8	518	519.1133	519.1136	malonylowany O-ksylozyloglukozyd apigeniny (II) ^a
52	5.8	680	681.1661	681.1681	malonylowany O-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (III) ^d
53	5.9	286	287.0550	287.0547	2'-hydroksygenisteina ^{a,b,c,d}
54	5.9	548	549.1239	549.1253	malonylowany O-glukozyd chryzoeriolu ^d
55	5.9	662	663.2283	663.2269	O-diglukozyd witeonu
56	6.0	680	681.1661	681.1665	malonylowany O-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (IV) ^d
57	6.1	766	767.1665	767.1660	dimalonylowany O-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (I) ^d
58	6.2	766	767.1665	767.1683	dimalonylowany O-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (II) ^d
59	6.2	766	767.1665	767.1776	dimalonylowany O-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (III) ^d
60	6.5	850	851.2240	851.2225	dimalonylowany O-diglukozyd luteonu
61	6.8	748	749.2287	749.2290	malonylowany O-diglukozyd witeonu
62	6.9	516	517.1704	517.1701	7-O-glukozyd luteonu
63	5.9	834	835.2291	835.2285	dimalonylowany O-diglukozyd witeonu
64	7.0	764	765.2237	765.2241	malonylowany O-diglukozyd luteonu
65	7.1	270	271.0601	271.0602	genisteina ^{a,b,c,d}
66	7.2	270	271.0601	271.0603	apigenina ^{a,b,c}
67	7.8	603	603.1708	603.1713	malonylowany 7-O-glukozyd luteonu
68	8.5	500	501.1755	501.1749	7-O-glukozyd witeonu
69	9.8	586	587.1759	587.1767	malonylowany 7-O-glukozyd witeonu
70	7.5	300	301.0707	301.0714	chryzoeriol ^{a,b,c}
71	14.4	354	355.1176	355.1178	luteon ^{a,b,c,d}
72	14.6	338	339.1227	339.1231	witeon ^{a,b,c,d}

a - identyfikacja aglikonów na podstawie widm pseudo-MS³;

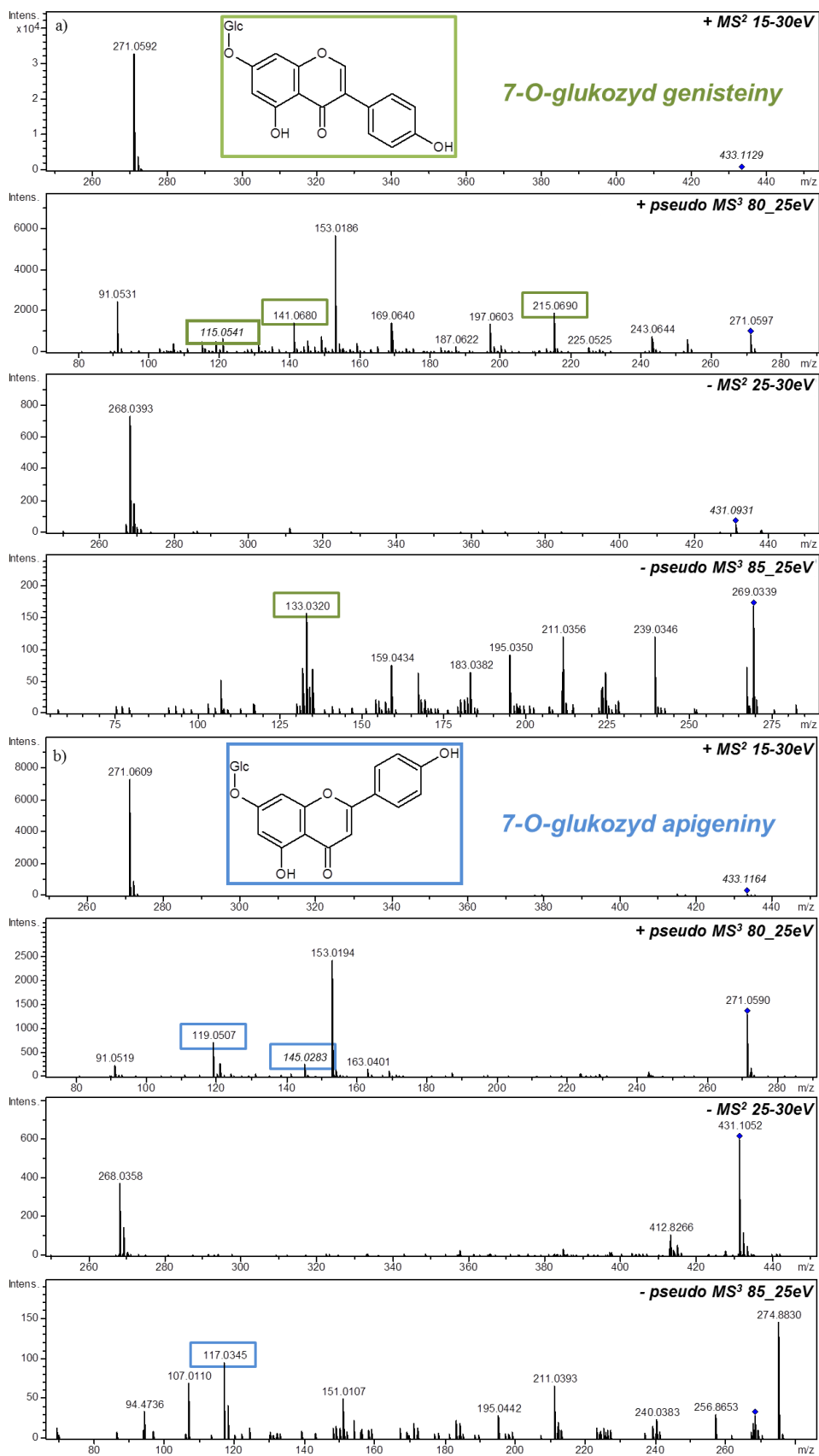
b - identyfikacja związków na podstawie porównania z widmami standardów;

c - numery PubChem zidentyfikowanych związków: 8-C-glukozyd genisteiny – 44257270; 7-O-glukozyd genisteiny – 44257273; 8-C-glukozyd chryzoeriolu – 44258170; 7-O-glukozyd apigeniny – 5280704; 2'-hydroksygenisteina – 5282074; genisteina – 5281377; apigenina – 5280443; chryzoeriol – 5280666; luteon – 5281797; witeon – 5281814;

d - widma CID MS/MS związków ujętych w tabeli, raportowane we wcześniejszych publikacjach: Muth i in., 2008, 2009.

Bogactwo struktur związków fenolowych w ekstraktach z liści łubinu, wynikało również z różnic w podstawieniu pierścieni aglikonu grupami cukrowymi (heksozy, deoksyheksozy, pentozy) i następnie malonyłowymi. Rozdział tak złożonej mieszaniny możliwy był dzięki zastosowaniu wysokosprawnego chromatografu cieczowego, pracującego przy wysokich zakresach ciśnień (wynoszących powyżej 500 barów) oraz kolumn o niewielkiej średnicy uziarnienia. Ponadto, sprzężenie układu LC/MS z systemem TriVersa NanoMate, pozwoliło na poprawę skuteczności prowadzonych analiz. Wykorzystanie trybu z automatycznym kolektorem frakcji pozwoliło na jednoczesną analizę oraz zbiór frakcji wycieku z kolumny chromatograficznej, dzięki czemu z niewielkiej ilości materiału możliwa była zarówno analiza *on-* jak i *off-line*, przy wykorzystaniu różnych parametrów energetycznych podczas prowadzonych eksperymentów.

Identyfikacja związków fenolowych była możliwa dzięki wykorzystaniu spektrometru masowego z analizatorem hybrydowym typu podwójny kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu. Wysokorozdzielcze widma masowe rejestrowane były w trybie jonów dodatnich i ujemnych, co pozwoliło na uzyskanie komplementarnych danych. Wartości stosunku masy do ładunku (m/z) dla jonów protonowanych i deprotonowanych cząsteczek ($[M+H]^+$ oraz $[M-H]^-$) rejestrowane były z dokładnością poniżej 5 ppm-ów, co dało możliwość precyzyjnego określenia składów elementarnych analizowanych związków. Informacje strukturalne, dotyczące rodzaju aglikonu, rodzaju podstawnika cukrowego oraz acylowego a także sposobu i miejsca przyłączenia cząsteczki cukrowej, uzyskane zostały na podstawie przeprowadzonych eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID). Analiza widm fragmentacyjnych MS^2 pozwoliła na identyfikację związków dotąd nieraportowanych w ekstraktach z łubinu wąskolistnego (Tab.4.1). Wiele związków zostało zidentyfikowanych w oparciu o porównanie z widmami CID MS/MS standardów, oraz na podstawie danych literaturowych. Przeprowadzone kompletne analizy pseudo- MS^3 , dały możliwość określenia struktur aglikonów obecnych w analizowanych związkach. Na tej podstawie rozróżniono aglikony o tej samej masie cząsteczkowej ($M_{cz}=286$ dla 2'-hydroksygenisteiny, kemferolu i luteoliny oraz $M_{cz}=270$ dla apigeniny i genisteiny). W przypadku genisteiny obserwowano charakterystyczne jony przy m/z 215 (w trybie jonów dodatnich) oraz przy m/z 133 i m/z 117 (w trybie jonów ujemnych, odpowiednio dla genisteiny i apigeniny). Ponadto, rozróżnienie dwóch aglikonów możliwe było na podstawie różnicy we względnych intensywnościach jonów m/z 115, m/z 119, m/z 141, m/z 145, rejestrowanych w odpowiednich warunkach energii kolizji (Ryc.4.1).



Ryc.4.1 Widma CID MS² i pseudo-MS³ zarejestrowane w trybie jonów dodatnich i ujemnych dla izomerów 7-O-glukozydu genisteiny (a) i 7-O-glukozydu apigeniny (b) (według Wojakowska i in., 2012).

4.1.2 Identyfikacja metabolitów obecnych na powierzchni liści łubinu wąskolistnego metodą GC/MS

Analizę metabolitów, obecnych na powierzchni liści, techniką GC/MS przeprowadzono dla wytypowanych czterech odmian łubinu wąskolistnego: dwóch słodkich (Baron i Sonet) oraz dwóch gorzkich (Karo i Mirela). Metodę ekstrakcji związków z powierzchni liścia opracowano i zoptymalizowano tak, aby przy stosunkowo najwyższej wydajności ekstrakcji, nie dopuścić do rozerwania ścian i błon komórkowych tkanek, co skutkowałoby wyciekaniem struktur cytoplazmatycznych z wnętrza komórek. Spośród czterech testowanych rozpuszczalników ekstrakcyjnych (chlorek metylenu, chloroform, heksan, metanol/chloroform-50/50) do właściwych eksperymentów wybrano chlorek metylenu, który pozwolił na izolację największej ilości metabolitów.

Opracowana metodyka umożliwiła ekstrakcję i identyfikację wielu metabolitów pierwotnych i wtórnych obecnych na powierzchni liści. Spośród szerokiej gamy związków, takich jak aminokwasy, kwasy tłuszczowe, sterole, cukry, węglowodory, istotną grupę stanowiły alkaloidy chinolizydynowe (QA-ang. *quinolizidine alkaloids*). Oprócz wolnych aglikonów angustifoliny i lupaniny, zaobserwowano obecność 13- α -hydroksylupaniny i jej wielu pochodnych estrowych (Tab.4.2). Identyfikację alkaloidów przeprowadzono na podstawie czasów retencji oraz wzoru fragmentacji ich TMS pochodnych (Wink i in., 1995), a także w oparciu o bibliotekę widm masowych NIST. Zawartość ilościowa alkaloidów, pomiędzy odmianami gorzkimi i słodkimi łubinu różniła się znacznie (Ryc.S1). Nie zaobserwowano natomiast znaczących różnic w ilości alkaloidów pomiędzy odmianami kontrolnymi i infekowanymi zarodnikami grzyba *C.lupini* (Ryc.S2).

Na powierzchni liści zidentyfikowano również aglikony antybiotycznych izoflawonoidów (witeon i luteon) w oparciu o wzór fragmentacji TMS pochodnych (Stobiecki i Wojtaszek, 1990)

Tab.4.2 Chinolizydynowe alkaloidy zidentyfikowane na powierzchni liści łubinu wąskolistnego przy użyciu techniki GC/MS (według Wojakowska i in., 2012).

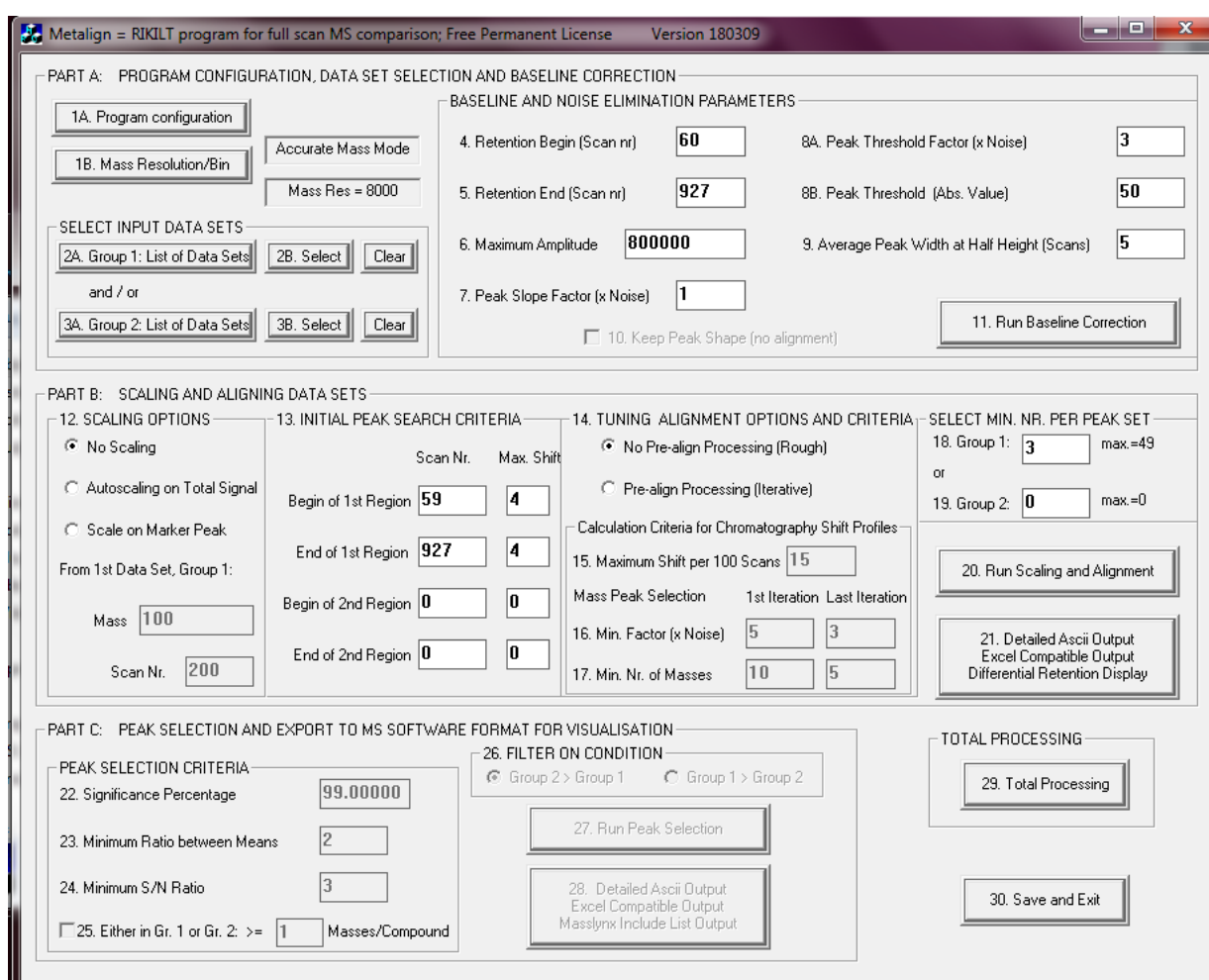
M^+	R_t	Nazwa związku	Nr PubChem
248	19.256	tetrahydrorhombifolina	3083799
234	19.623	angustifolina	21575185
248	19.890	α -izolupanina	119201
246	20.190	11,12-dehydrolupanina	618800
248	20.390	lupanina	91471
246	21.825	multiflorina	5319938
264	22.584	13- α -hydroksylupanina	73404
334	24.027	13- α -butyryloksylupanina	6428446
348	24.328	13- α -izowaleryloksylupanina	6428447
346	25.062	13- α -tigloiloksylupanina	6427214
346	25.429	13- α -angeloyloksylupanina	6427211
368	28.298	13- α -benzyloksylupanina	6430112
394	30.768	13- α -cis-cinnamoyloksylupanina	6427217
394	33.270	13- α -trans-cinnamoyloksylupanina	6427219

4.1.3 Analiza ilościowa fenolowych metabolitów wtórnych

Oznaczenia ilościowe fenolowych metabolitów wtórnych, zidentyfikowanych przy pomocy techniki LC/MS, przeprowadzono na podstawie zintegrowanych chromatogramów pojedynczych jonów (wykreślonych dla protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$), zarejestrowanych z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku. Bardzo duże ilości uzyskanych danych, wynikające ze złożoności eksperymentu, związanej z liczbą analizowanych obiektów oraz ilością powtórzeń w kolejnych punktach czasowych, wymagały użycia zautomatyzowanego systemu analizy wyników. Takie podejście w znaczący sposób usprawniło i przyspieszyło analizę danych, która w przypadku integracji ręcznej zajmowała całe tygodnie. Wstępnej analizy surowych danych dokonywano w programie MetAlign, natomiast dalsze obliczenia przeprowadzono w Excelu.

W pierwszej kolejności surowe widma masowe były kalibrowane względem wewnętrznego kalibrantu w programie DataAnalysis. Następnie pliki danych konwertowano do formatu NetCDF i eksportowano do programu MetAlign. Odpowiedni dobór parametrów programu (Ryc.4.2) pozwalał na korekcję linii bazowej, usunięcie szumów oraz wyrównanie

czasów retencji między setkami analizowanych próbek. Tzw. „wyrównanie” surowych danych jest elementem koniecznym i niezbędnym podczas analizy tak dużych zestawów danych, gdyż niweluje przesunięcia i zmiany pomiędzy poszczególnymi próbkami wynikające z takich czynników jak wahania temperatury czy ciśnienia podczas analiz. Dzięki tak przeprowadzonej wstępnej korekcie uzyskanych danych, możliwy był kolejny etap, a mianowicie automatyczna integracja chromatogramów pojedynczych jonów. Zintegrowane chromatogramy pojedynczych jonów eksportowane były w postaci tabeli do Excela, gdzie przeprowadzono dalszą analizę ilościową. Ilości poszczególnych związków dla każdej próbki odnoszone były do masy próbki oraz ilości standardu wewnętrznego.



Ryc.4.2 Interfejs programu do wstępnej obróbki danych MS, MetAlign. Wartości wprowadzanych parametrów zależne były od uzyskanych chromatogramów oraz widm masowych.

Analiza ilościowa danych uzyskanych przy pomocy układu GC/MS została przeprowadzona na podstawie zintegrowanych chromatogramów pojedynczych jonów dla określonych związków. Obliczeń dokonano ręcznie w przypadku niewielkiej ilości danych. Dla większych zestawów danych obliczenia przeprowadzono z wykorzystaniem programu MarkerLynx.

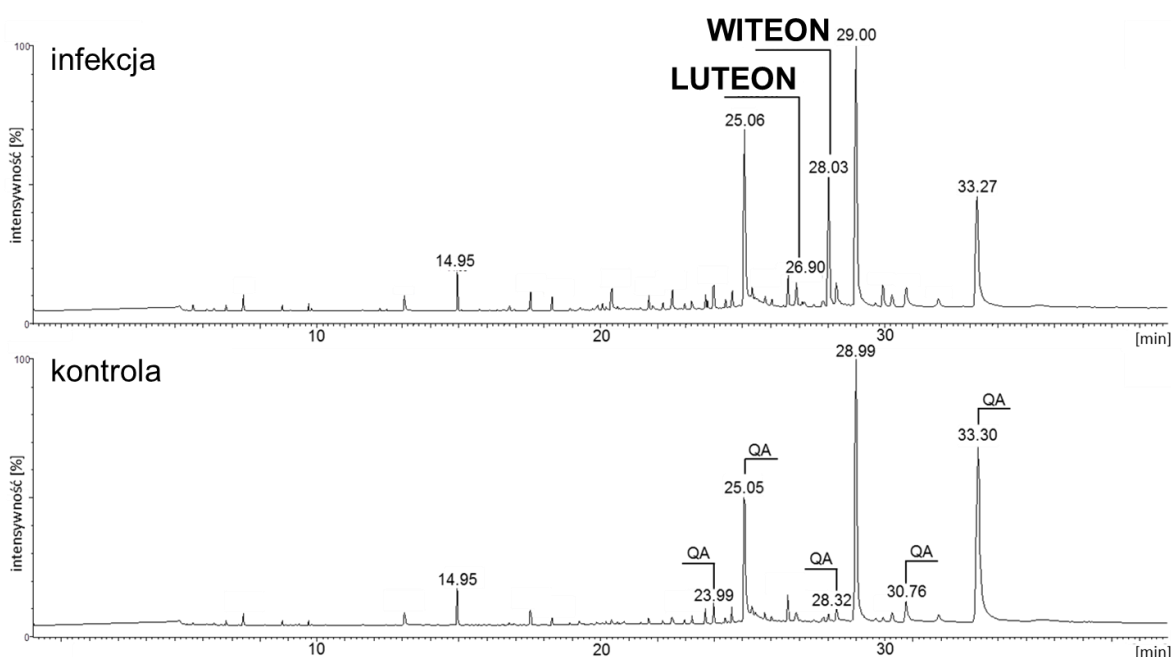
4.1.4 Profile fenolowych metabolitów łubinu w odpowiedzi na stres biotyczny

Wstępne eksperymenty przeprowadzone zostały na 12 odmianach łubinu wąskolistnego (Baron, Bojar, Boruta, Cezar, Graf, Kalif, Mirela, Neptun, Regent, Sonet, Zeus i Karo). Na podstawie stopnia porażenia siewek łubinu sporami grzyba *C.lupini* oraz jakościowych i ilościowych wyników analiz LC/MS dotyczących profili fenolowych metabolitów wtórnych w roślinach kontrolnych i infekowanych, do dalszych analiz wytypowano 4 odmiany łubinu, dwie gorzkie-Mirela i Karo oraz dwie słodkie-Baron i Sonet. Szczegółowe analizy przeprowadzono na odmianie Sonet.

Badano profile fenolowych metabolitów wtórnych i ich pochodnych, obecnych na powierzchni oraz wewnątrz tkanki liści łubinu wąskolistnego, przy wykorzystaniu technik LC/MS i GC/MS, w odpowiedzi na trzy rodzaje infekcji czynnikiem patogennym. W pierwszym eksperymencie rośliny były opryskiwane zawiesiną zarodników grzyba *C.lupini*. Drugi eksperyment dotyczył elisytacji polegającej na oprysku rośliny roztworem toksycznych metabolitów grzybowych lub aplikacji roztworu toksyny na uprzednio zraniony igłą liść. Trzecie doświadczenie polegało na oprysku roślin toksyczną zawiesiną metabolitów grzybowych, a po 48 następował ponowny oprysk zawiesiną zarodników. Rośliny zbierano w różnych odstępach czasu po infekcji, w zależności od zastosowanego sposobu traktowania (patrz Rozdz.3.2.1.4.). Analiza ilościowa fenolowych metabolitów została przeprowadzona na podstawie zintegrowanych chromatogramów pojedynczych jonów $[M+H]^+$ wykreślonych dla poszczególnych związków i znormalizowana w odniesieniu do standardu wewnętrznego (LC/MS-luteolina, GC/MS-rybitol) oraz masy próbki. Na każdą próbkę przypadały dwa lub trzy powtórzenia biologiczne oraz dwa techniczne. W poniższych podrozdziałach przedstawiono wyniki ilościowe antybiotycznych metabolitów w odpowiedzi na infekcję zawiesiną zarodników grzyba bądź elisytację jego toksyną w odniesieniu do kontroli. Wykresy zawierające słupki błędów przedstawiono w materiałach uzupełniających (Rozdz.IX) na Ryc. S3-S5 i S7 odpowiednio dla Ryc. 4.5-4.8.

4.1.4.1 Infekcja łubinu zarodnikami *C.lupini*

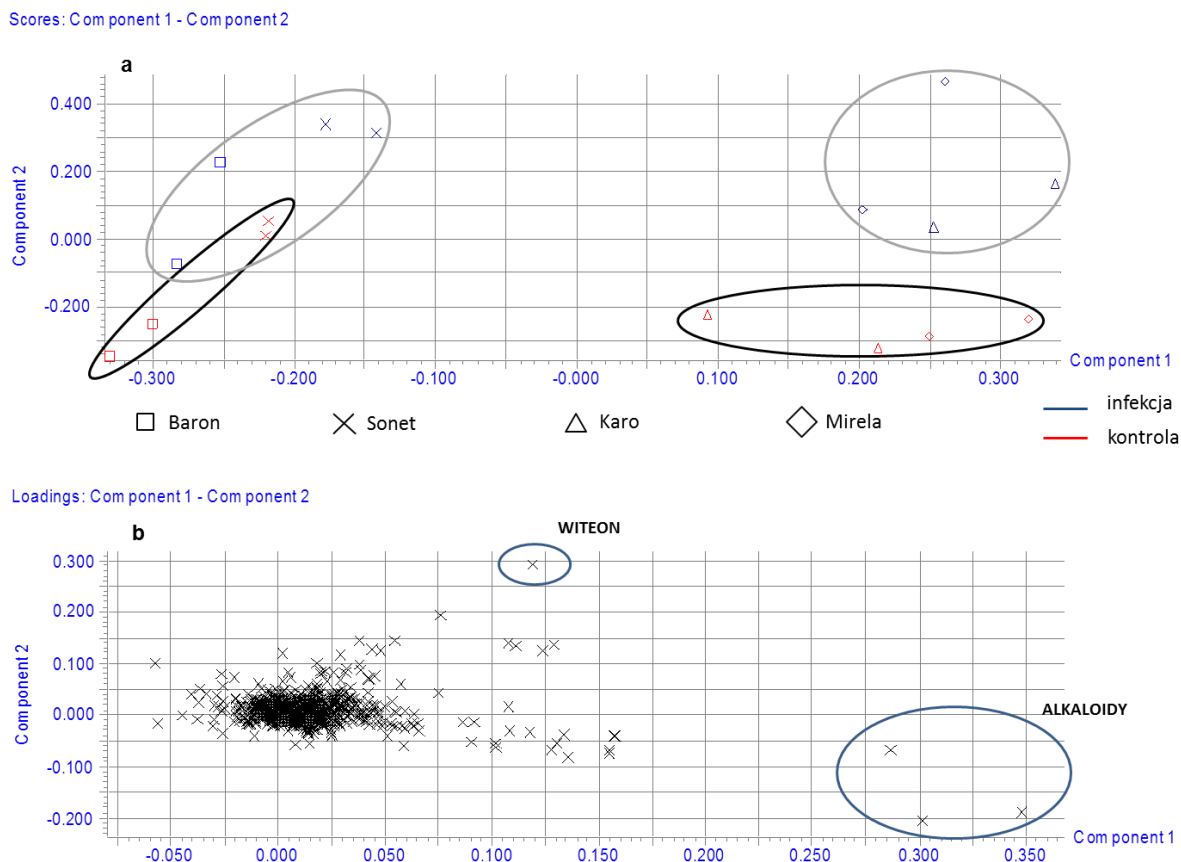
Cztery odmiany łubinu wąskolistnego (Baron, Karo, Mirela, Sonet) zainfekowano zarodnikami *C.lupini* i po 168 h od infekcji, zebrany materiał poddano ekstrakcji, w celu izolacji metabolitów z powierzchni liści. Analiza GC/MS wykazała znaczące różnice pomiędzy roślinami infekowanymi i kontrolnymi, wynikające z obecności luteonu i witeonu-antybiotycznych związków fenolowych, obecnych na powierzchni liści roślin infekowanych zarodnikami grzyba *C.lupini* (Ryc.4.3).



Ryc.4.3 Chromatogram całkowitego prądu jonowego dla związków obecnych na powierzchni liści łubinu (odmiany Mirela) 168 hpo infekcji zarodnikami *C.lupini*, oraz dla rośliny kontrolnej. Analiza GC/MS została przeprowadzona dla każdej próbki w czterech powtórzeniach (2 biologicznych i 2 technicznych). QA-zidentyfikowane alkaloidy chinolizydynowe wyszczególnione w Tab.4.2 (według Wojakowska i in., 2012).

Obecność luteonu i witeonu na powierzchni liści zaobserwowano zarówno w przypadku infekowanych odmian łubinu gorzkiego jak i słodkiego. W przypadku roślin kontrolnych nie zaobserwowano pojawienia się antybiotycznych metabolitów w warstwie wosków epikutylarnych liści. Poziom alkaloidów, obecnych w większej ilości u odmian gorzkich łubinu, nie zmieniał się istotnie w reakcji na infekcję patogennym grzybem. Ryc.4.4 przedstawia wynik analizy składowych głównych (PCA) dla czterech odmian łubinu infekowanych zarodnikami *C.lupini* oraz roślin kontrolnych. Związkiem istotnie różnicującym dwie grupy roślin (infekowane i kontrolne) względem osi OX był witeon, występujący w przeważającej ilości w łubinach poddawanych infekcji. Grupowanie się prób względem osi

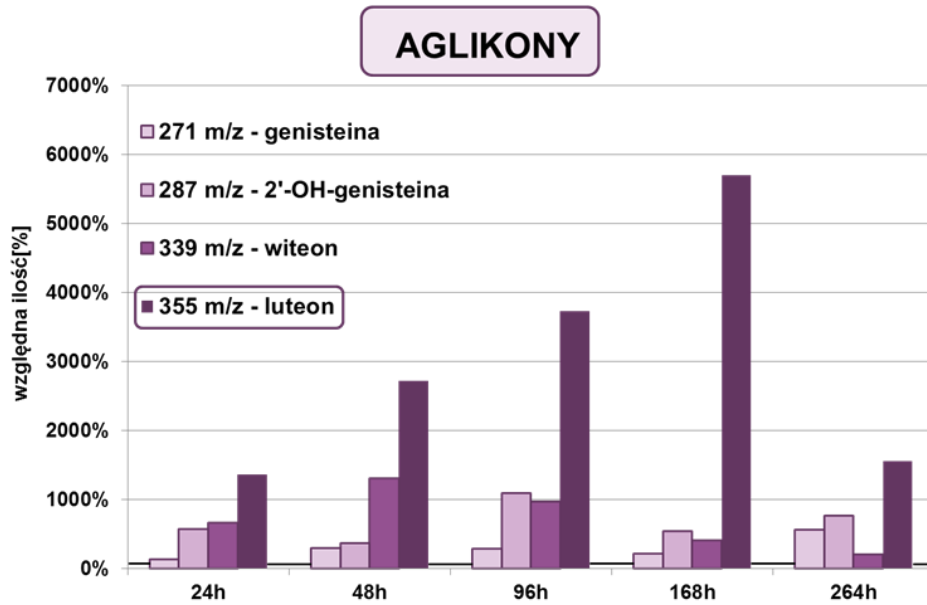
OY wynika z wyższej zawartości alkaloidów w odmianach gorzkich w stosunku do odmian słodkich.



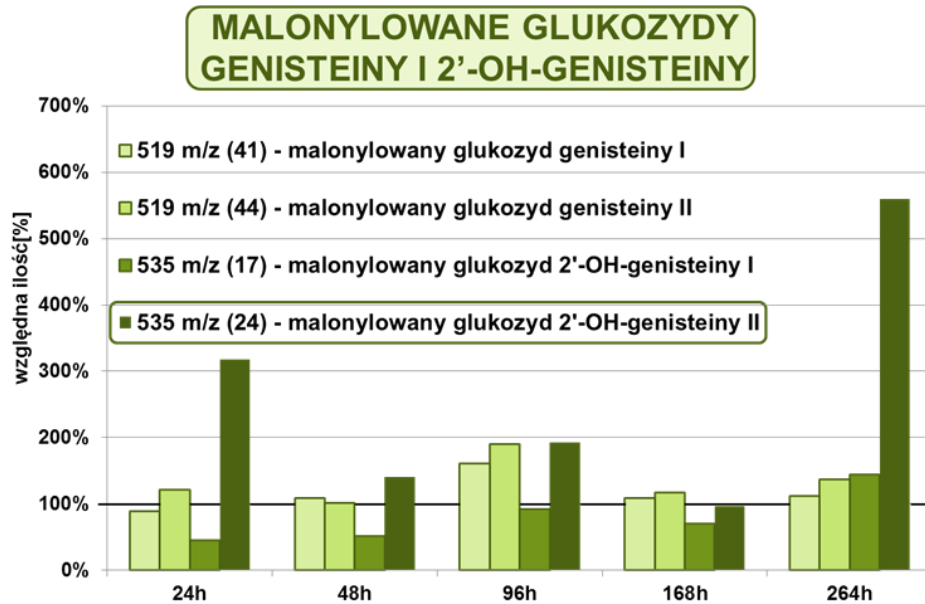
Ryc.4.4 Wyniki analizy składowych głównych (PCA) dla czterech odmian łąbinu wąskolistnego (gorzkich - Karo, Mirela i słodkich - Baron, Sonet) infekowanych zarodnikami *C.lupini* oraz roślin kontrolnych. Zbiór materiału nastąpił 168 h po infekcji.

Analizy LC/MS izoflawonoidów obecnych w ekstraktach z liści łąbinu wąskolistnego przeprowadzono dla próbek zebranych 24, 48, 96, 168 i 264 h po infekcji zawiesiną zarodników *C.lupini* (Ryc.4.5, S3). W przypadku wolnych aglikonów (2'-hydroksygenisteiny oraz fitoaleksyn-luteonu i witeonu) zaobserwowano znaczący wzrost w stosunku do kontroli we wszystkich punktach czasowych, podczas gdy genisteina wzrosła zasadniczo w ostatnim punkcie czasowym eksperymentu. Najwyższy wzrost (bo aż 50-ciokrotny) w stosunku do roślin kontrolnych odnotowano dla luteonu w 7 dniu po infekcji. Spośród malonylowanych glukozydów genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny, jedynie dla jednego izomeru, malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny odnotowano wzrost stężenia w ekstraktach z roślin infekowanych, zebranych 264 h po infekcji (związek nr 24, Tab. 4.1). Ponadto poziomy pochodnych witeonu wzrosły już krótko po infekcji, a ich ilość zaczęła spadać w ostatnim punkcie czasowym.

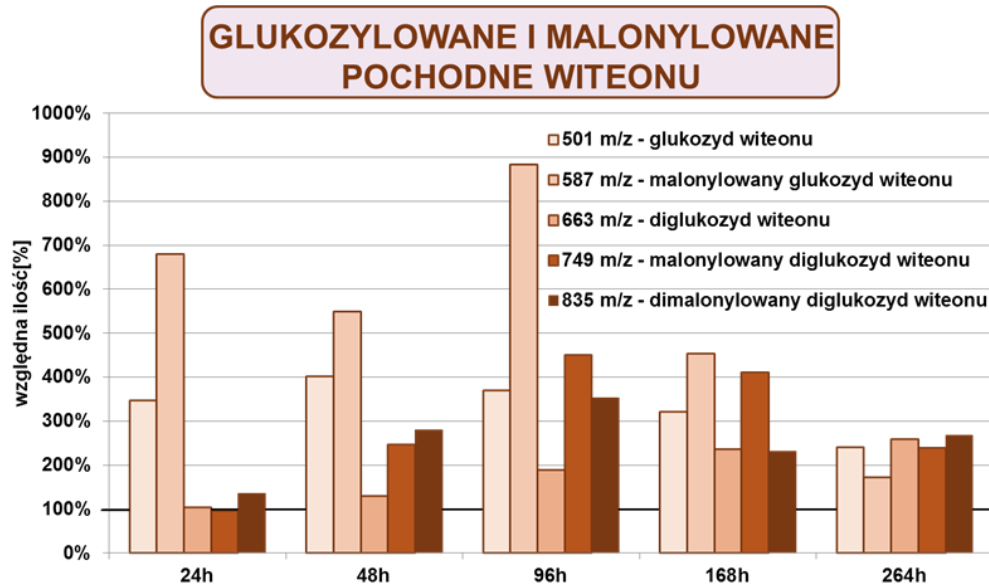
a



b



c

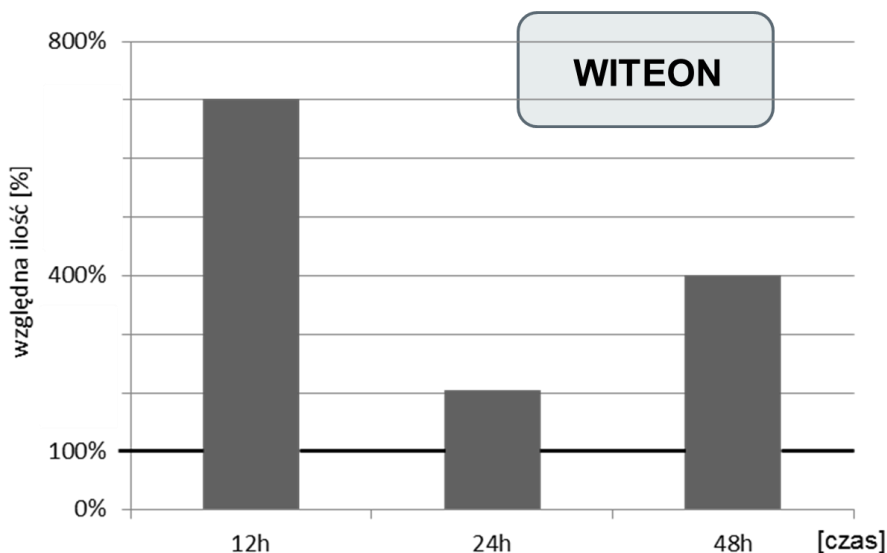


Ryc.4.5 Zawartości wybranych izoflawonoidów, aglikonów i ich glukozydów, w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego (odmiana Sonet) po infekcji grzybem *C.lupini*, wyrażona w stosunku do kontroli (=100%). Punkty czasowe: 24 h, 48 h, 96 h, 168 h i 264 h po infekcji.

Wolne aglikony izoflawonów: genisteina – $[M+H]^+$ przy m/z 271 (**65**), 2'-hydroksygenisteina – $[M+H]^+$ przy m/z 287 (**53**), witeon – $[M+H]^+$ przy m/z 339 (**72**), luteon – $[M+H]^+$ przy m/z 355 (**71**) (a); glukozylowane pochodne izoflawonów: malonylowany 7-O-glukozyd genisteiny – $[M+H]^+$ przy m/z 519 – dwa izomery (**41**, **44**), malonylowany 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny – $[M+H]^+$ przy m/z 535 – dwa izomery (**17**, **24**) (b); pochodne witeonu: O-glukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 501 (**68**), malonylowany O-glukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 587 (**69**), O-diglukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 663 (**55**), malonylowany O-diglukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 749 (**61**) oraz dimalonylowany O-diglukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 835 (**63**) (c). Na każdą próbkę składają się trzy powtórzenia biologiczne i dwa techniczne. Analizy przeprowadzono techniką LC/MS. Numery związków (wytluszczonym drukiem) w odniesieniu do Tab.4.1 (według Wojakowska i in., 2012).

4.1.4.2 Elisytacja łubinu toksyną wyizolowaną z hodowli grzyba *C.lupini*

Po oprysku rośliny zawiesiną toksyny grzybowej, na powierzchni liścia zaobserwowano pojawienie się jedynie witeonu, a nie jak w przypadku infekcji zarodnikami witeonu i luteonu. Wzrost ilości antybiotycznego prenylowanego izoflawonu obserwowano we wszystkich trzech punktach czasowych, tj. 12, 24 i 48 h po elisytacji. Najwyższy, siedmiokrotny wzrost odnotowano w 12 godzinie po elisytacji, a następnie po znacznym spadku w 24 h, zaobserwowano czterokrotny wzrost poziomu witeonu w stosunku do kontroli w ostatnim punkcie czasowym (Ryc.4.6, S4).

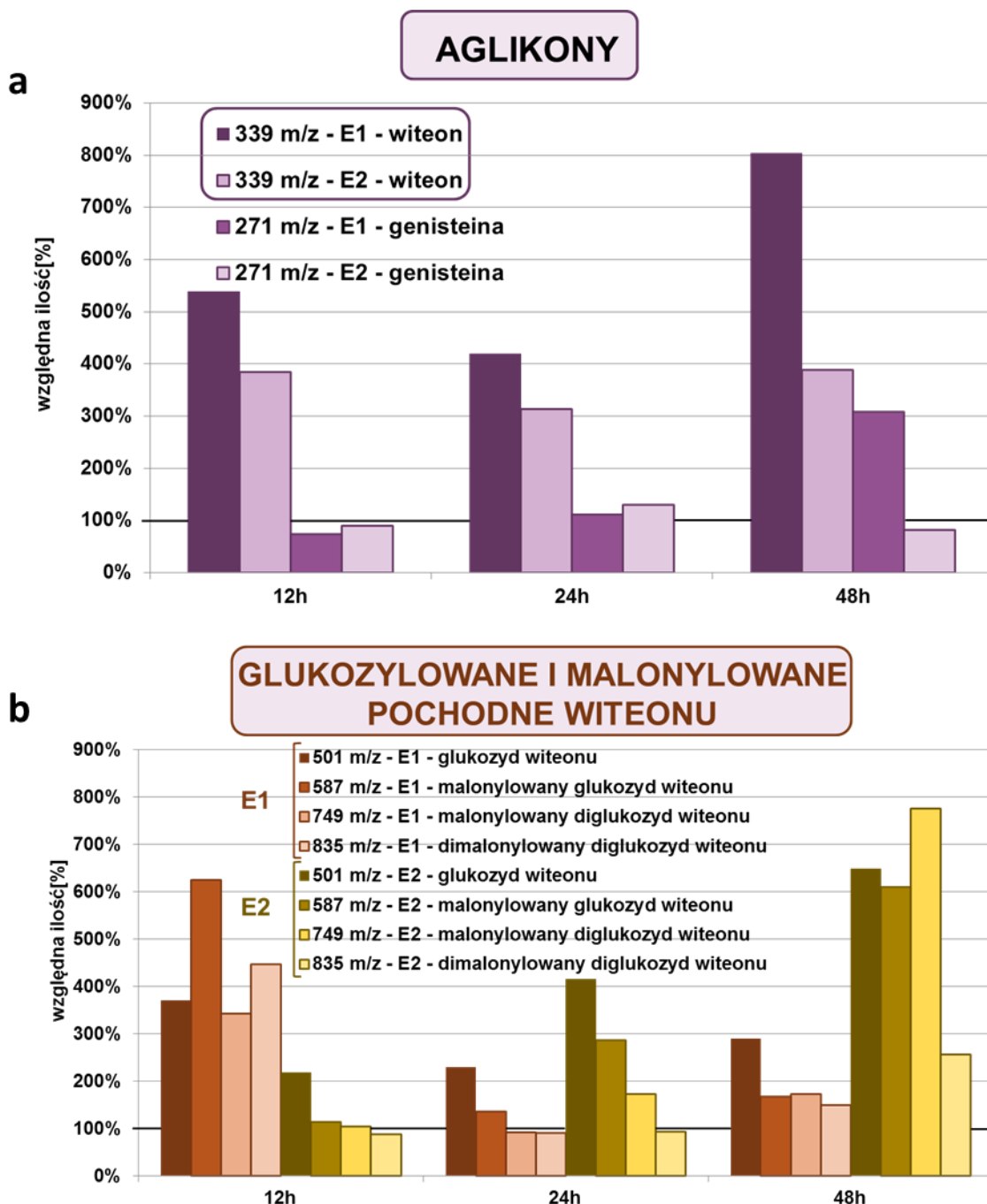


Ryc.4.6 Zawartość witeonu na powierzchni liścia w 12, 24 i 48 h po elisytacji łubinu (*L.angustifolius* odmiana Sonet) zawiesiną toksycznych metabolitów grzybowych (*C.lupini*), wyrażona w stosunku do kontroli (=100%). Na każdą próbkę składają się dwa powtórzenia biologiczne i dwa techniczne. Analizy przeprowadzono techniką GC/MS (według Wojakowska i in., 2012).

Techniką LC/MS badano profile izoflawonoidów obecnych w ekstraktach z liści łubinu elisytowanego toksyną *C.lupini* na dwa sposoby. W pierwszym przypadku (elisytacja 1 – E1) zawieszinę toksycznych metabolitów nakładano na powierzchnię uprzednio zranionego liścia. Drugi sposób elisytacji polegał na oprysku całej rośliny toksyną grzybową. Rośliny zbierano w trzech punktach czasowych, 12, 24 i 48 h po elisytacji. Zaobserwowano istotne różnice w profilach izoflawonoidów w odpowiedzi na dwa sposoby traktowania rośliny elisytorem (Ryc.4.7, S5). Obydwa sposoby elisytacji wywołały wzrost poziomu antybiotycznego witeonu, w stosunku do kontroli, we wszystkich badanych punktach czasowych. W przypadku elisytacji 2 poziom wolnego witeonu wzrósł 4-krotnie w stosunku do roślin kontrolnych i utrzymywał się na podobnym poziomie we wszystkich badanych punktach czasowych. Natomiast po oprysku łubinu toksyną grzybową (elisytacja 1), poziom witeonu wzrósł ośmiokrotnie po 48 godzinach. Tak wysoki skok stężenia możemy w pewnym stopniu tłumaczyć efektem zranienia. W przypadku wolnego aglikonu, genisteiny, jego wzrost w stosunku do kontroli zaobserwowano jedynie 48 h po elisytacji 1 (Ryc.4.8a). Nie obserwowano pojawienia się innych wolnych aglikonów (luteon, 2'-hydroksygenisteina), jak to miało miejsce w przypadku infekcji zarodnikami grzyba *C.lupini*.

Zaobserwowano również różnice w akumulacji pochodnych witeonu (malonylowanych i dimalonylowanych diglukozydów oraz monoglukozydów i monoglukozydów malonylowanych - związki odpowiednio o nr **61**, **63**, **68**, **69** z Tab.4.1) w odpowiedzi na obydwie sposoby elisytacji (E1 i E2). W przypadku elisytacji 1 stężenie tych związków wzrosło w 12 h do 350-600% i stopniowo spadało aż do 48 h po traktowaniu toksyną. Natomiast najwyższy wzrost poziomu pochodnych witeonu (nawet 800%), w reakcji na elisytację 2, zaobserwowano w ostatnim punkcie czasowym (Ryc. 4.8b).

W przypadku elisytacji E1 zbierano osobno dolne liście (nakłuwane i elisytowane toksyną) oraz liście górnego piętra. Profile związków fenolowych badano niezależnie dla każdego piętra liści łubinu. Nie zaobserwowano znaczących różnic w ilości izoflawonoidów pomiędzy dwoma piętrami liści (Ryc.S6), co może świadczyć o nie wystąpieniu zjawiska systemicznej odporności nabytej.

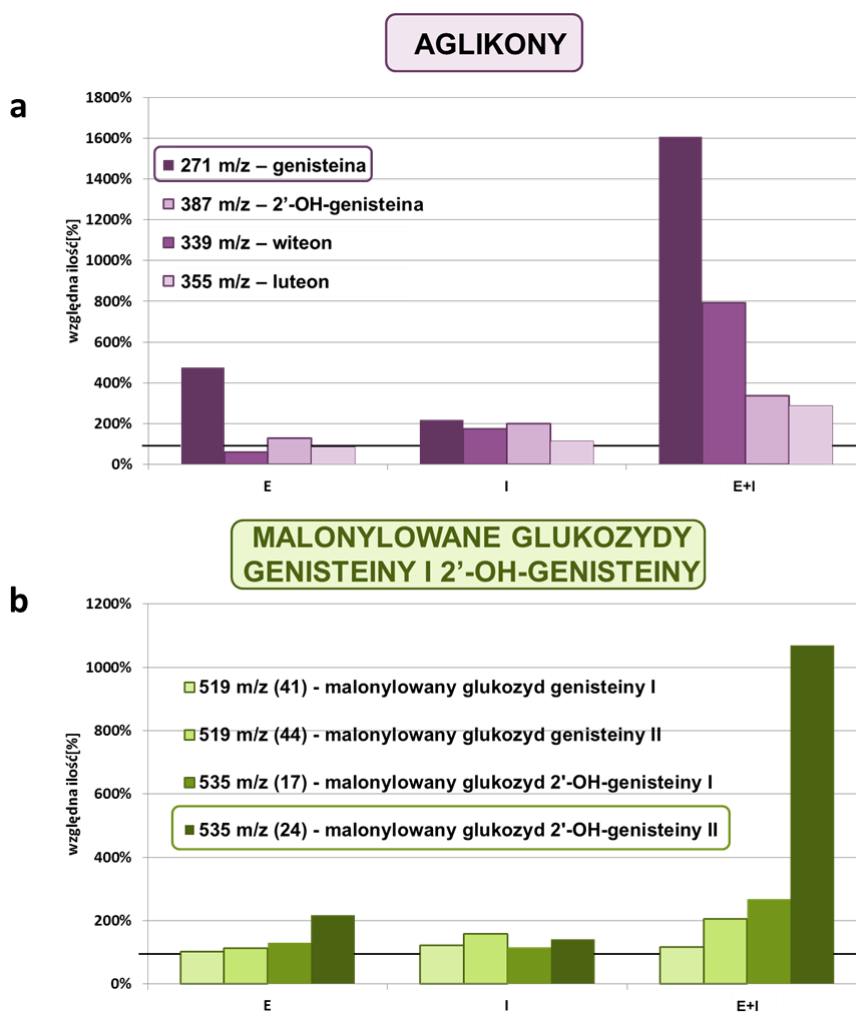


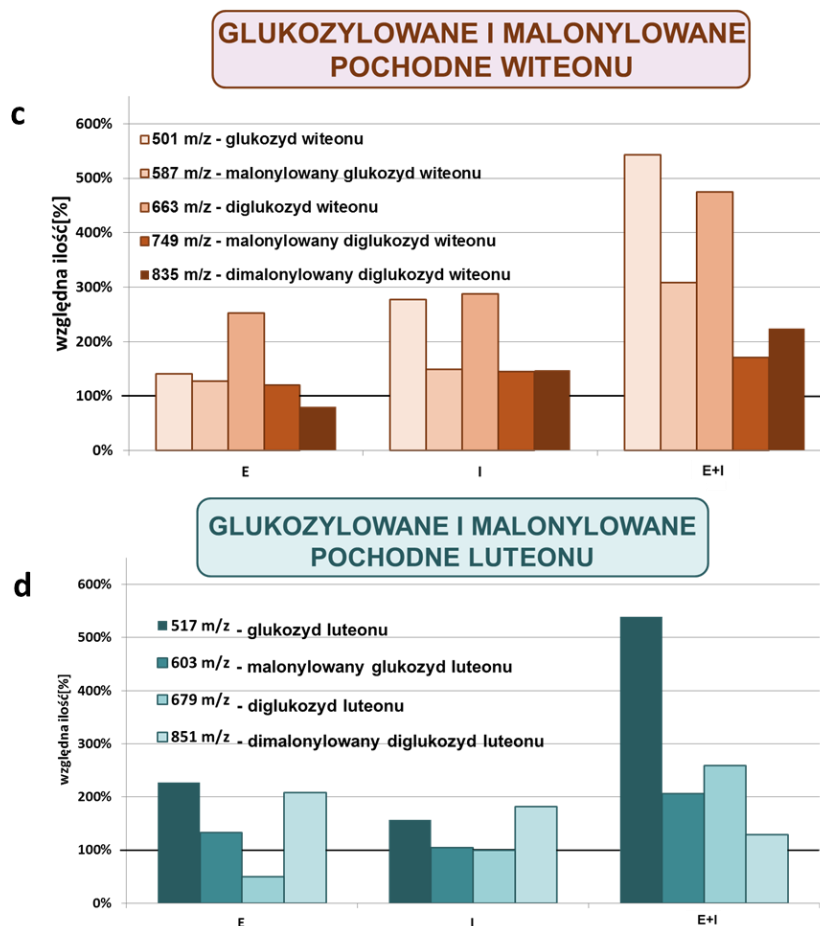
Ryc.4.7 Zawartość witeonu ($[M+H]^+$ przy m/z 339 - 72) i genisteiny ($[M+H]^+$ przy m/z 271 - 65) (a) oraz glukozylowanych pochodnych witeonu (O -glukozyd witeonu $[M+H]^+$ przy m/z 501 (68), malonylowany O -glukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 587 (69), malonylowany O -diglukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 749 (61) oraz dimalonylowany O -diglukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 835) (63) (b) w odpowiedzi na dwa rodzaje elisytacji łubinu wąskolistnego toksyną grzybową, E1- nałożenie kropli zawiesiny toksycznych metabolitów na uprzednio zraniony liść, E2- elisytacja przez oprysk zawiesiną fitotoksycznych metabolitów *C.lupini*. Materiał roślinny zebrany 12, 24, 48 h po elisytacji. Wartości wyrażone w odniesieniu do kontroli (=100%). Na każdą próbkę składają się dwa powtórzenia biologiczne i dwa techniczne. Analizy przeprowadzono techniką LC/MS. Numery związków (wytluszczonym drukiem) w odniesieniu do Tab.4.1. (według Wojakowska i in., 2012).

4.1.4.3 Infekcja i elisytacja łubinu wąskolistnego grzybem i jego toksyną

Przy pomocy techniki LC/MS określono profile aglikonów oraz pochodnych izoflawonów w reakcji na elisytację łubinu wąskolistnego (odmiana Sonet) toksyną grzybową oraz następującą po 48 h infekcję zarodnikami *C.lupini*. Zbiór materiału roślinnego nastąpił 7 dni po infekcji. Rośliny elisytowane, infekowane oraz traktowane dwoma rodzajami czynnika patogenego wraz z obiektami kontrolnymi zbierano jednocześnie w tym samym czasie, a mianowicie 9 dni od rozpoczęcia pierwszego eksperymentu z elisytorem. Czasy zostały dobrane eksperymentalnie i wynikały z wcześniej przeprowadzonych doświadczeń.

Spośród wolnych aglikonów izoflawonoidowych najwyższy wzrost w stosunku do kontroli zaobserwowano dla genisteiny (1600%) i 2'-hydroksygenisteiny (800%) (Ryc.4.8a). Podobne obserwacje poczyniono dla wybranych pochodnych malonylowanych i glikozylowanych takich izoflawonów jak genisteina, 2'-hydroksygenisteina, luteon i witeon (Ryc.4.8b-d). W przypadku niektórych związków ich poziomy nie uległy znacznemu wzrostowi w odpowiedzi na elisytację i następującą po niej infekcję.

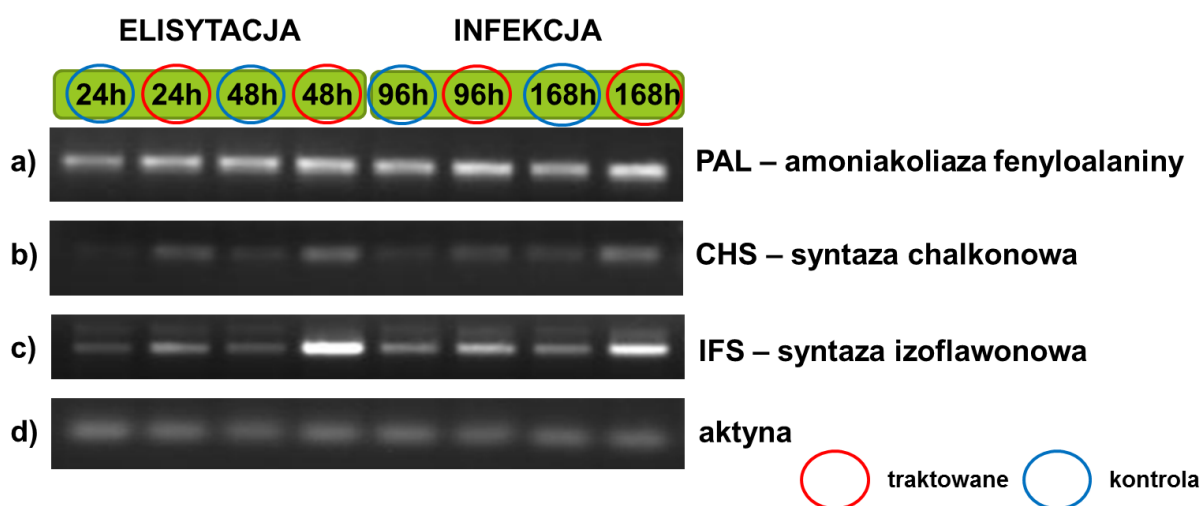




Ryc.4.8 Zawartości wybranych izoflawonoidów i ich glukozydów w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego (*L.angustifolius* odm. Sonet) po elisytacji poprzez oprysk toksyną (E), infekcji sporami *C.lupini* (I) lub elisytacji i następującej po 48 h infekcji (E + I); wartości wyrażone w stosunku do kontroli (=100%). Na wykresach są prezentowane: względne ilości wolnych aglikonów - genisteiny – [M+H]⁺ przy m/z 271 (65), 2'-hydroksygenisteiny – [M+H]⁺ przy m/z 287 (53), witeonu – [M+H]⁺ przy m/z 339 (72), luteonu – [M+H]⁺ przy m/z 355 (71) (a); izomerów malonylowanych glukozydów genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny: (malonylowany 7-O-glukozyd genisteiny – [M+H]⁺ przy m/z 519 – dwa izomery (41, 44), malonylowany 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny– [M+H]⁺ przy m/z 535 – dwa izomery (17, 24) (b); O-glukozyd luteonu – [M+H]⁺ przy m/z 517 (62), malonylowany O-glukozyd luteonu – [M+H]⁺ przy m/z 603 (67), O-diglukozyd luteonu – [M+H]⁺ przy m/z 679 (45) oraz dimalonylowany O-diglukozyd luteonu – [M+H]⁺ przy m/z 851 (60) (c); pochodne witeonu: glukozyd witeonu – [M+H]⁺ przy m/z 501 (68), malonylowany O-glukozyd witeonu – [M+H]⁺ przy m/z 587 (69), O-diglukozyd witeonu – [M+H]⁺ przy m/z 663 (55), malonylowany O-diglukozyd witeonu – [M+H]⁺ przy m/z 749 (61) oraz dimalonylowany O-diglukozyd witeonu – [M+H]⁺ przy m/z 835 (63) (d). Na każdą próbkę składają się dwa powtórzenia biologiczne i dwa techniczne. Analizy przeprowadzono techniką LC/MS. Numery związków (wytluszczonym drukiem) w odniesieniu do Tab.4.1. (według Wojakowska i in., 2012).

4.1.5 Analiza RT PCR wybranych genów szlaku fenylopropanoidowego

Zmiany kluczowych enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę izoflawonoidów (amoniakoliza fenyloalaniny-PAL, syntaza chalkonowa-CHS oraz syntaza izoflawonowa-IFS) badano w odpowiedzi na infekcję zarodnikami *C.lupini* lub elisytację toksycznymi metabolitami grzybowymi. Poziomy transkrypcji badanych genów określono dla wybranych prób, 24 i 48 godzin po elisytacji toksyną oraz 96 i 168 h po infekcji zarodnikami. Dla dwóch genów, CHS i IFS, zaobserwowano wzrost poziomu transkrypcji zarówno w wyniku infekcji jak i elisytacji (Ryc.4.9). Poziom PAL pozostawał taki sam dla roślin kontrolnych i traktowanych czynnikiem patogennym. Na podstawie uzyskanych wyników można jednoznacznie stwierdzić, że kontakt rośliny z organizmem patogennym, takim jak grzyb, czy też jego elisytorem (toksyczne metabolity), aktywuje istotne enzymy biorące udział w szlaku biosyntezy izoflawonoidów.



Ryc.4.9 Agarozowy żel elektroforetyczny przedstawiający względne poziomy ekspresji genów: amoniakolizy fenyloalaniny (a), syntazy chalkonowej (b), syntazy izoflawonowej (c) oraz pozytywną kontrolę w postaci aktyny (d). Wyniki przedstawione dla wybranych prób z eksperymentów z elisytacją poprzez oprysk toksycznymi metabolitami (zbiór po 24 i 48 h) oraz infekcji poprzez oprysk zarodnikami grzyba (zbiór po 96 i 168 h) (według Wojakowska i in., 2012).

4.2 Analiza strukturalna i profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinów meksykańskich w korelacji z gatunkami regionu śródziemnomorskiego

Przeprowadzono szczegółową analizę strukturalną i profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych obecnych w złożonych ekstraktach z korzeni i liści ośmiu gatunków łubinów meksykańskich (*Lupinus elegans*, *L.exaltatus*, *L.hintonii*, *L.mexicanus*, *L.montanus*, *L.rotundiflorus*, *L.stipulatus*, *Lupinus sp.*), trzech gatunków śródziemnomorskich (*L.albus*, *L.angustifolius*, *L.luteus*) oraz jednego południowoamerykańskiego, udomowionego na terenie Europy (*L.mutabilis*). Przed przystąpieniem do powyższego eksperymentu przeprowadzono doświadczenie, polegające na wstępnej charakterystyce związków obecnych w tkankach łubinów Ameryki Północnej, a bliżej przeanalizowano jeden z nich *Lupinus reflexus*.

4.2.1 Analiza strukturalna związków fenolowych

Analiza strukturalna związków fenolowych obecnych w ekstraktach z liści i korzeni różnych gatunków łubinów prowadzona była przy wykorzystaniu dwóch systemów LC/MS. Takie podejście pozwoliło na uzyskanie uzupełniających się informacji na temat struktury analizowanych związków. Niskorozdzielcza pułapka jonowa (IT) umożliwiła prowadzenie eksperymentów fragmentacyjnych MSⁿ protonowanych i deprotonowanych cząsteczek. Wysokorozdzielczy analizator Qq-ToF pozwolił na określenie składów elementarnych badanych związków, na podstawie wartości m/z jonów [M+H]⁺ lub [M-H]⁻ z dokładnością poniżej 5 ppm-ów. Informacje strukturalne uzyskano w oparciu o eksperymenty z kolizyjnie indukowaną dysocjacją MS² i pseudo-MS³. Podczas prowadzonych eksperymentów CID określono odpowiednio parametry energetyczne, pozwalające na uzyskanie najlepszej jakości widm fragmentacyjnych. System TriVersa NanoMate działający w trybie z automatycznym zbiorem frakcji umożliwił zarówno prowadzenie analiz *on-line* jaki i *off-line* bez konieczności ponownego rozdziału ekstraktów. Takie podejście pozwoliło na uzyskanie większej ilości informacji podczas jednego nastroju chromatograficznego.

Zastosowanie systemów LC/ESI-MSⁿ umożliwiło scharakteryzowanie badanych związków pod względem: struktury aglikonu, typu podstawnika cukrowego (heksoza, deoksyheksoza, pentoza), miejsca podstawienia cząsteczki cukrowej do szkieletu aglikonu (C/O-glikozylacja), występowania diglikozydów w formie di-O-glikozydów, O-glikozyloglikozydów lub C,O-diglikozydów, rodzaju podstawnika acylowego. Należy jednak zaznaczyć, że analiza strukturalna prowadzona w oparciu o analizę masowych widm fragmentacyjnych ma swoje ograniczenia. W celu pełnej i jednoznacznej charakterystyki

strukturalnej analizowanych związków często konieczne jest zastosowanie techniki LC/NMR (Cuyckens i Claeys, 2004; van der Hoof, 2011a).

4.2.1.1 Analiza strukturalna flawonoidów obecnych w ekstraktach łubinu meksykańskiego *Lupinus reflexus*

Jednoczesne zastosowanie dwóch systemów LC/MS pozwoliło na identyfikację 62 pochodnych flawonoidów obecnych w korzeniach i liściach łubinu *Lupinus reflexus* (Tab.4.3). W tabeli przedstawiono wyniki uzyskane z wykorzystaniem układu LC/Qq-ToF-MS. Te same jony macierzyste $[M+H]^+$ / $[M-H]^-$ obserwowane były również na widmach zarejestrowanych przy pomocy układu LC/IT-MS.

Tab.4.3 Fenolowe metabolity wtórne zidentyfikowane w ekstraktach z liści i korzeni łubinu *Lupinus reflexus* przy wykorzystaniu układu LC-Qq-ToF/MS (według Stobiecki i in., 2010).

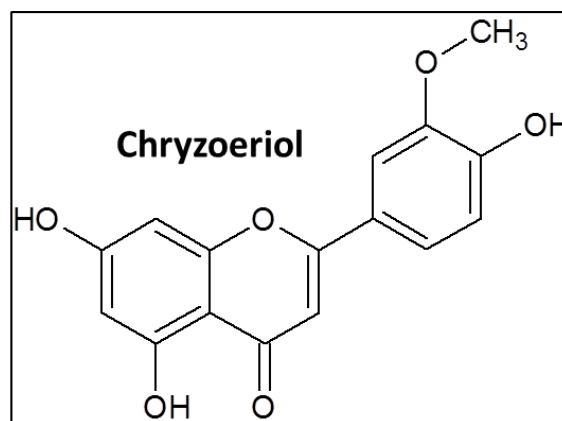
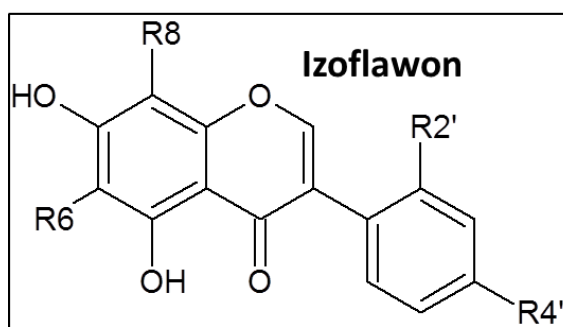
Nr	R _t (min)	Nazwa związku	Korzeń / liść ¹	Mcz	Skład elementarny jonów [M+H] ⁺	Dokładna masa jonów [M+H] ⁺		Błąd [ppm]	Wzór fragmentacji MS/MS	
						Obliczona	Obserwowana		Jony dodatnie [M+H] ⁺ [m/z]	Jony ujemne [M-H] ⁻ [m/z]
1	2.75	4',7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny	b/a	610	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611.1607	611.1612	- 0.8	611, 449, 287	609, 447, 285
2	3.63	7-O-glukozyloglukozyd 2'-hydroksygenisteiny	a/a	610	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611.1607	611.1602	0.8	611, 449, 287	nr
3	4.02	4',7-O-diglukozyd genisteiny	b/a	594	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1657	595.1650	1.2	595, 433, 271	593, 431, 269/268
4	4.33	7-O-glukozylo-8-C-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	a/a	610	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611.1607	611.1617	- 1.6	611, 449, 431, 413	609, 447, 327
5	4.47	4',7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (+116)	a/a	726	C ₃₁ H ₃₅ O ₂₀	727.1716	727.1725	- 1.2	727, 565, 449, 287	725, 609, 489
6	4.58	6,8-C-diglukozyd genisteiny	a/nd	594	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1657	595.1656	0.2	595, 457, 409, 379	593, 503, 473, 383, 353
7	4.68	malonylowany 4',7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (I)	a/a	696	C ₃₀ H ₃₃ O ₁₉	697.1611	697.1611	0.0	697, 535, 449, 287	651, 489
8	4.75	4',7-O-diglukozyd luteonu	b/nd	678	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₆	679.2233	679.2242	- 1.3	679, 517, 461, 355, 299	nr
9	4.89	4',7-O-diglukozyd genisteiny (+116)	a/a	710	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₉	711.1767	711.1760	1.0	711, 549, 433, 271	709, 431
10	5.05	7-O- glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	b/a	448	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.1078	449.1083	- 1.1	449, 287	447, 285/284
11	5.12	C-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	a/c	448	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.1078	449.1095	- 3.8	449, 431, 413, 395, 353, 329	447, 327, 297
12	5.27	7-O-glukozyloglukozyd luteonu	b/nd	678	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₆	679.2233	679.2237	- 0.6	679, 517, 461, 355, 299	nr
13	5.32	malonylowany 4',7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (II)	b/a	696	C ₃₀ H ₃₃ O ₁₉	697.1611	697.1630	- 2.7	697, 535, 449, 287	695, 533, 371, 285
14	5.44	malonylowany 4',7-O-diglukozyd genisteiny	b/a	680	C ₃₀ H ₃₃ O ₁₈	681.1661	681.1660	0.2	681, 519, 433, 287	nr
15	5.56	6-C-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (+116)	nd/b	564	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₅	565.1188	565.1174	2.4	565, 547, 529, 431, 413, 395, 353, 329	563, 447, 357, 327
16	5.61	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (+116)	nd/a	564	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₅	565.1188	565.1200	- 2.1	565, 287	563, 447, 285
17	5.72	4',7-O-diglukozyd genisteiny(+130)	b/nd	724	C ₃₂ H ₃₇ O ₁₉	725.1924	725.1948	- 3.3	725, 563, 433, 271	723, 517, 431, 269/268
18	5.79	4',7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (+100) (I)	a/b	710	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₉	711.1767	711.1767	0.0	711, 549, 449, 287	709, 447, 285
19	5.82	C-glukozyd genisteiny	b/b	432	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.1129	433.1136	- 1.6	433, 415, 397, 379, 313	431, 311, 283
20	5.85	dimalonylowany 4',7-O-diglukozyd	a/a	782	C ₃₃ H ₃₅ O ₂₂	783.1614	783.1671	- 7.3	783, 535, 449, 287	781, 285

		2'-hydroksygenisteiny								
21	5.93	7-O- glukozyd genisteiny	b/b	432	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.1129	433.1132	- 0.7	433, 271	431, 269/268
22	5.98	4',7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (+100) (I)	a/nd	710	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₉	711.1767	711.1803	- 5.1	711, 287	709, 447, 285
23	6.04	4'-O- glukozyd genisteiny	a/nd	432	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.1129	433.1163	- 7.9	433, 271	431, 269/268
24	6.11	malonylowany C-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	nd/a	534	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄	535.1082	535.1111	- 5.4	535, 517, 499, 473, 431 ,413,395,329	533, 429, 357, 327, 297
25	6.19	7-O-glukozyloglukozyd genisteiny	a/a	594	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1657	595.1680	- 3.9	595, 433, 271	593, 431, 269
26	6.27	4',7-O- diglukozyd genisteiny (+100)	b/b	694	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₈	695.1818	695.1825	- 1.0	695, 533, 433, 271	693, 431, 268
27	6.33	dimalonylowany 4',7-O-diglukozyd genisteiny	a/a	766	C ₃₃ H ₃₅ O ₂₁	767.1665	767.1646	- 2.5	767, 681, 519, 433, 271	765, 473, 431, 269/268
28	6.39	4',7-O-diglukozyd 2,3-dehydrokiewitonu	a/nd	678	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₆	679.2233	679.2269	- 5.3	679, 517, 461, 355, 299	677, 515,353/352, 297
29	6.44	malonylowany 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	b/a	534	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄	535.1082	535.1097	- 2.8	535,449,287	nr
30	6.56	malonylowany C-glukozyd genisteiny (I)	nd/b	518	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃	519.1133	519.1143	- 1.9	519, 501, 439, 397, 379, 313	473, 413, 311, 283
31	6.62	7-O-glukozyd genisteiny (+116) (I)	a/a	548	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄	549.1239	549.1249	- 1.8	549, 271	547, 269
32	6.67	malonylowany 7-O-glukozyd genisteiny	c/nd	518	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃	519.1133	519.1139	- 1.2	519, 271	473, 269/268
33	6.72	diglukozyd chryzoeriolu	nd/a	624	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₆	625.1763	625.1771	- 1.3	625, 463, 301	623, 299
34	6.81	4',7-O- diglukozyd genisteiny (+116)	a/nd	710	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₉	711.1767	711.1793	- 3.7	711, 433, 271	nr
35	6.89	diglukozyd chryzoeriolu (+130)	nd/c	740	C ₃₂ H ₃₇ O ₂₀	741.1873	741.1870	0.4	741, 301	nr
36	7.05	diglukozyd chryzoeriolu (+100)	nd/c	710	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₉	711.1767	711.1779	- 1.7	711, 465/464, 301	709, 299
37	7.11	7-O-glukozyd genisteiny (+116) (II)	a/a	548	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄	549.1239	549.1239	0.0	549, 271	547, 269
38	7.27	malonylowany 4',7-O-diglukozyd genisteiny (+100)	a/nd	780	C ₃₄ H ₃₇ O ₂₁	781.1822	781.1847	- 3.2	781, 585, 519, 433, 271	nr
39	7.33	7-O-glukozyloglukozyd 2,3-dehydrokiewitonu	a/nd	678	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₆	679.2233	679.2224	1.3	679, 517, 461, 355, 299	677, 515, 353
40	7.41	malonylowany 7-O-glukozyd genisteiny(I)	b/a	518	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃	519.1133	519.1139	- 1.2	519, 433, 271	473, 269
41	7.53	dimalonylowany diglukozyd chryzoeriolu	nd/b	796	C ₃₄ H ₃₇ O ₂₂	797.1771	797.1796	- 3.1	797, 711, 549, 463, 301	nr
42	7.56	malonylowany diglukozyd chryzoeriolu (+116)	nd/a	826	C ₃₅ H ₃₉ O ₂₃	827.1877	827.1872	0.6	827, 301	825, 781, 299/298
43	7.61	C-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (+100)	c/c	548	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄	549.1239	549.1259	- 3.6	549, 513, 481, 395, 329	547, 269
44	7.72	O-glukozyd chryzoeriolu	nd/a	462	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463.1235	463.1244	- 1.9	463, 301	461, 298
45	7.79	dimalonylowany O-diglukozyd chryzoeriolu (II)	a/a	796	C ₃₄ H ₃₇ O ₂₂	797.1771	797.1768	0,4	797, 711, 549, 463, 301	795, 665, 623, 299, 284
46	7.85	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (+100)	a/a	548	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄	549.1239	549.1267	- 5.1	549, 449, 287	547, 285
47	7.89	O-glukozyd genisteiny (+116)	b/c	548	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄	549.1239	549.1264	- 4.6	549, 271	547, 269
48	8.12	7-O-glukozyd genisteiny (+130)	a/nd	562	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	563.1395	563.1407	- 2.1	563, 401, 271	561, 431, 269

49	8.19	C-glukozyd genisteiny (+100)	nd/a	532	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₃	533.1290	533.1297	- 1.3	533, 453, 411, 393, 311	nr
50	8.35	malonylowany O-glukozyd chryzoeriolu	a/b	548	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄	549.1239	549.1218	3.8	549, 463, 301	547, 299
51	8.53	Malonylowany diglukozyd bioczaniny A (I)	nd/b	694	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₈	695.1818	695.1827	- 1.3	695, 447, 285	693, 649, 607, 589, 529, 283
52	8.65	7-O-glukozyd genisteiny (+100) (I)	b/nd	532	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₃	533.1290	533.1314	- 4.5	533, 271	531, 431, 269
53	8.70	diglukozyd bioczaniny A	nd/a	608	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	609.1814	609.1817	- 0.5	609, 285	607, 283
54	8.84	malonylowany diglukozyd bioczniny A (+116)	nd/b	810	C ₃₅ H ₃₉ O ₂₂	811.1927	811.1927	0.0	811, 563, 285	809, 283
55	9.27	malonylowany diglukozyd bioczniny A (II)	nd/b	694	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₈	695.1818	695.1835	- 2.5	695, 447, 285	693, 649, 607, 589, 529, 283
56	9.42	7-O-glukozyd genisteiny (+100) (II)	b/nd	532	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₃	533.1290	533.1300	- 1.9	533,433, 271	531, 499, 431, 299
57	9.48	O-glukozyd bioczniny A (+116)	nd/b	562	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	563.1395	563.1411	- 2.8	563, 285	561, 283, 268
58	9.69	O-glukozyd bioczniny A	nd/c	446	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀	447.1286	447.1299	- 2.9	447, 285	491(+HCOOH), 283
59	10.02	malonylowany O-diglukozyd bioczaniny A	nd/b	780	C ₃₄ H ₃₇ O ₂₁	781.1822	781.1830	-1.0	781, 695, 533, 447, 285	779, 283
60	11.30	O-glukozyd chryzoeriolu (+100)	a/nd	562	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	563.1395	563.1428	-5.9	563, 463, 301	nr
61	11.70	malonylowany O-glukozyd bioczniny A	nd/c	532	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₃	533.1290	533.1302	-2.2	533, 285	487, 283, 268
62	12.30	O-glukozyd bioczniny A (+130)	nd/b	576	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	577.1552	577.1568	-2.8	577, 285	575, 283, 268

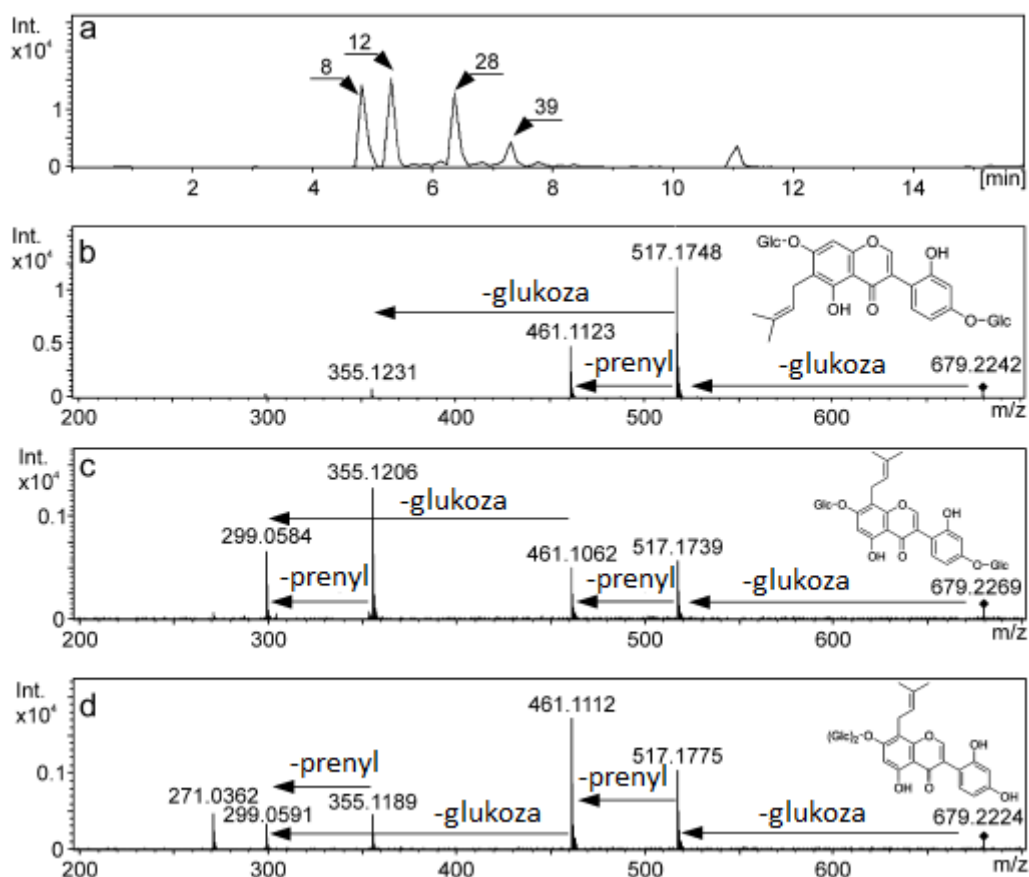
¹ - poziomy intensywności protonowanych cząsteczek zarejestrowanych w trybie MS: a = intensywność powyżej 1×10^5 ; b = intensywność równa od 1×10^4 do 1×10^5 ; c = intensywność poniżej 1×10^4 ; nd - nie wykryto; nr - nie zarejestrowano; (+100) - ester metylowy kwasu malonowego; (+116) - kwas jabłkowy; (+130) - ester metylowy kwasu jabłkowego

W badanych ekstraktach liści i korzeni *L.reflexus* zidentyfikowano sześć różnych aglikonów obecnych w formie glukozylowanej: chryzoeriol, należący do flawonów oraz pięć izoflawonów – genisteinę, 2'-hydroksygenisteinę, bioczaninę A, luteon i 2,3-dehydrokiewiton (Ryc.4.10). Identyfikacja genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny oraz luteonu została przeprowadzona w oparciu o porównanie widm fragmentacyjnych z widmami standardów. Struktury bioczaniny i 2,3-dehydrokiewitonu zostały zaproponowane na podstawie składów elementarnych oraz widm fragmentacyjnych MSⁿ (IT) i pseudo-MS³ (Qq-ToF). Jedynie genisteina i 2'-hydroksygenisteina występowała w ekstraktach w postaci wolnych aglikonów. Prenylowane aglikony luteon i 2,3-dehydrokiewiton (posiadające tę samą masę cząsteczkową, 354 Da) występowały w postaci izomerycznych glukozylowanych pochodnych (Ryc. 4.11).



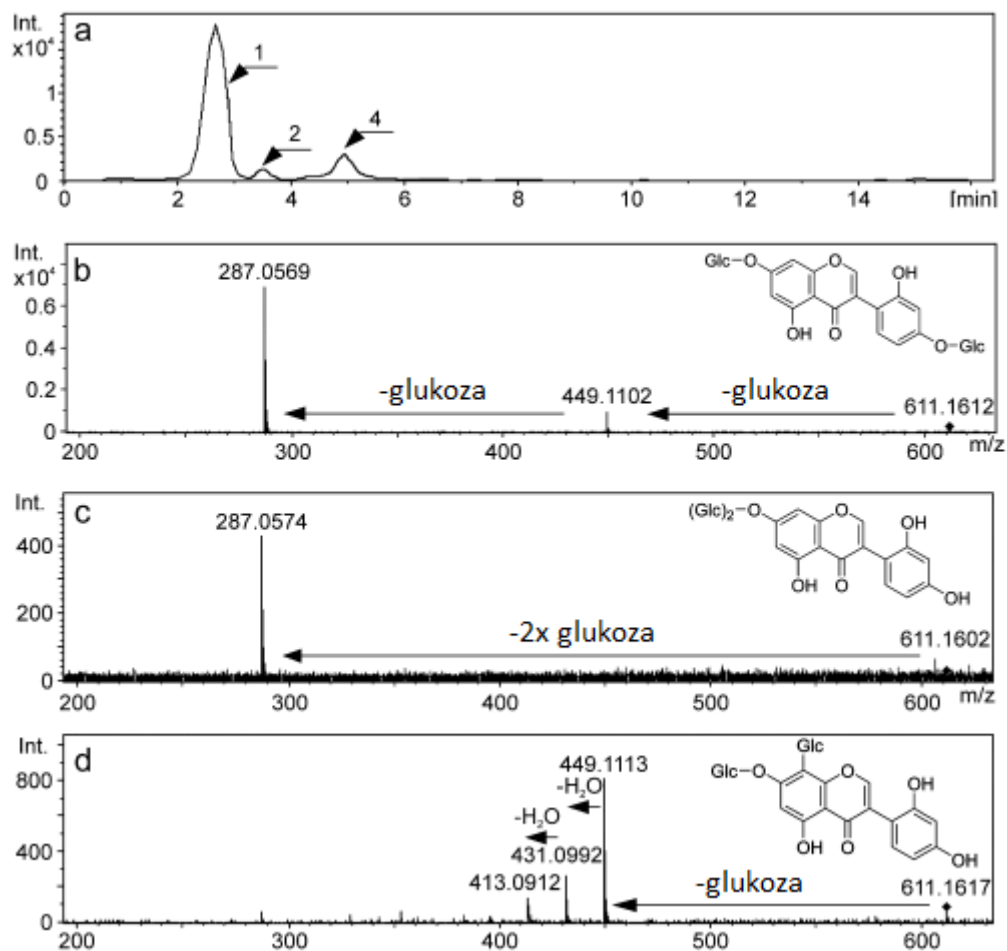
IZOFLAWON	R2'	R4'	R6	R8
Genisteina	H	OH	H	H
2'-hydroksygenisteina	OH	OH	H	H
Bioczanina A	H	OCH ₃	H	H
Luteon	OH	OH	-CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂	H
2,3-dehydrokiewiton	OH	OH	H	-CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂

Ryc.4.10 Proponowane struktury aglikonów obecnych w glukozylowanych pochodnych flawonoidów zidentyfikowanych w ekstraktach z liści i korzeni *Lupinus reflexus* (według Stobiecki i in., 2010).



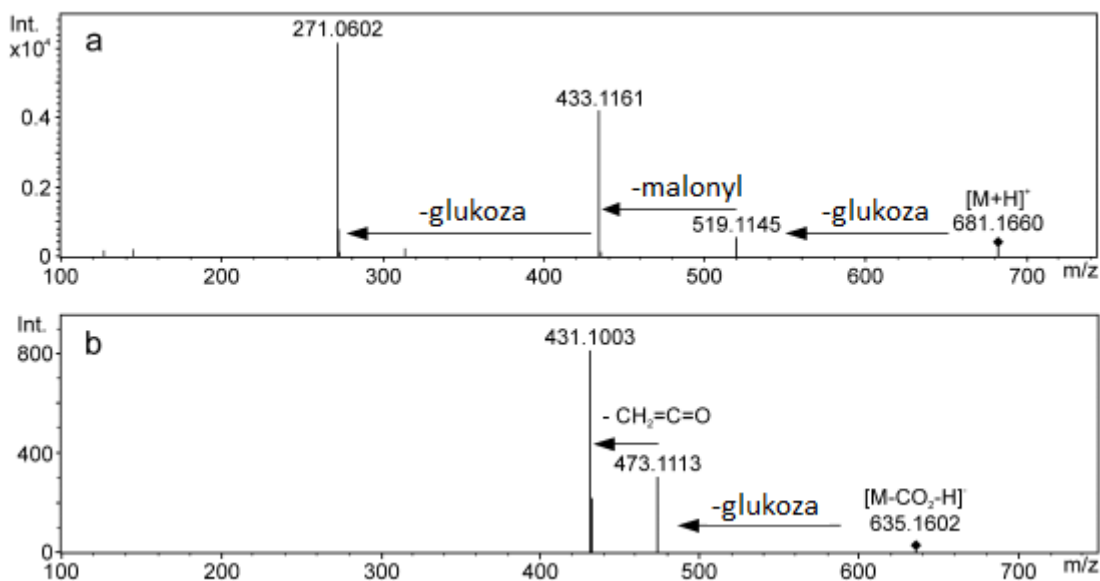
Ryc.4.11 Chromatogram jonów $[M+H]^+$ przy m/z 679 (a) oraz widma CID MS/MS izomerów: 4',7-O-diglukozydu luteonu (**8**) (b), 4',7-O-diglukozydu 2,3-dehydrokiewitonu (**28**) (c), 7-O-glukozyloglukozydu 2,3-dehydrokiewitonu (**39**) (d). Widma zostały zarejestrowane za pomocą systemu LC/ESI-Qq-ToF. Numery związków (wytluszczonym drukiem) odpowiadają Tab.4.3 (według Stobiecki i in., 2010).

Jedyną, obecną w ekstraktach *L.reflexus*, cząsteczką cukrową, wchodzącą w skład pochodnych flawonoidów, była glukoza (masa obojętnego fragmentu 162 Da) (Tab.4.3). Nie zaobserwowano obecności pentozy i deoksyheksozy (masy obojętnych fragmentów odpowiednio 132 i 146 Da), powszechnie występujących w przypadku pochodnych flawonoidowych łubinów europejskich. Można zatem mówić o mono- i di-glukozydach flawonoidów obecnych w korzeniach i liściach łubinu meksykańskiego. Podstawą do określenia sposobu podstawienia aglikonu cząsteczką glukozy były widma CID MS/MS. Względne intensywności jonów fragmentacyjnych protonowanych cząsteczek umożliwiły rozróżnienie trzech izomerów diglukozydu 2'-hydroksygenisteiny (Ryc.4.12). Lokalizacja wiązania C-glikozydowego w pozycji C-8 (4.12d), została określona w oparciu o intensywności względne jonów E_i (-H₂O) na podstawie prac Waridela i współpracowników (2001).



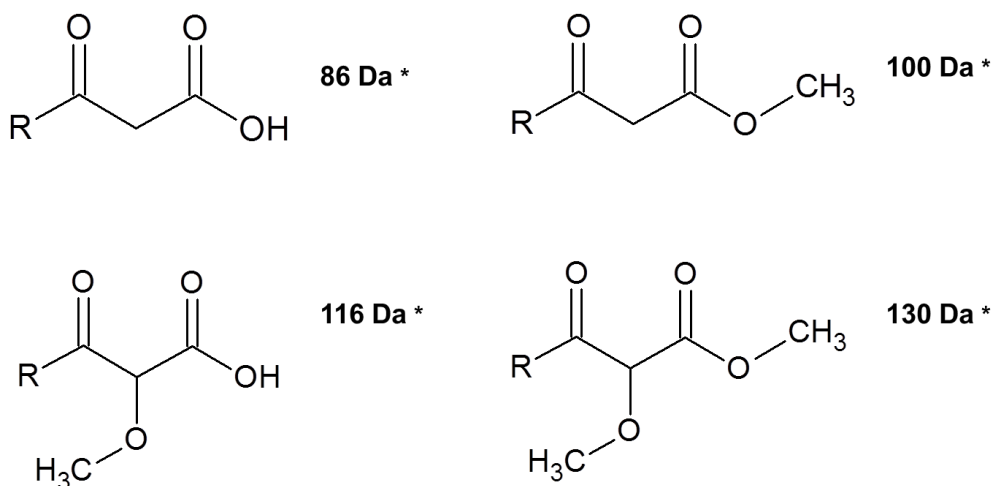
Ryc.4.12 Chromatogram jonów $[M+H]^+$ przy m/z 611 (a) oraz widma CID MS/MS izomerów: 4',7-*O*-diglukozydu 2'-hydroksygenisteiny (**1**) (b), 7-*O*-glukozyloglukozydu 2'-hydroksygenisteiny (**2**) (c), 7-*O*-glukozylo-8-*C*-glukozydu 2'-hydroksygenisteiny (**4**) (d). Widma zostały zarejestrowane za pomocą systemu LC/ESI-Qq-ToF. Numery związków (wytluszczonym drukiem) odpowiadają Tab.4.3 (według Stobiecki i in., 2010).

Glukozylowane flawonoidy podstawiane były cząsteczkami kwasów alifatycznych. Najczęściej występującym sposobem acylacji było podstawienie kwasem malonowym. Obserwowano wystąpienie pojedynczej lub rzadziej podwójnej acylacji (Tab.4.3). Wzór fragmentacji związków podstawionych kwasem malonowym jest różny i charakterystyczny dla trybu jonów dodatnich i ujemnych. W przypadku fragmentacji w jonach dodatnich obserwuje się jednoczesne odejście całej grupy malonylowej (masa obojętnego fragmentu 86 Da). W trybie jonów ujemnych fragmentacji ulegają jony powstające w wyniku uprzedniej dekarboksylacji deprotonowanych cząsteczek $[M-H-CO_2]^-$. W dalszej kolejności podczas fragmentacji następuje eliminacja ketenu ($CH_2=C=O$, 42 Da) (Ryc.4.13). Intensywności względne poszczególnych jonów potomnych są zależne od wykorzystanej energii atomów gazu kolizyjnego.

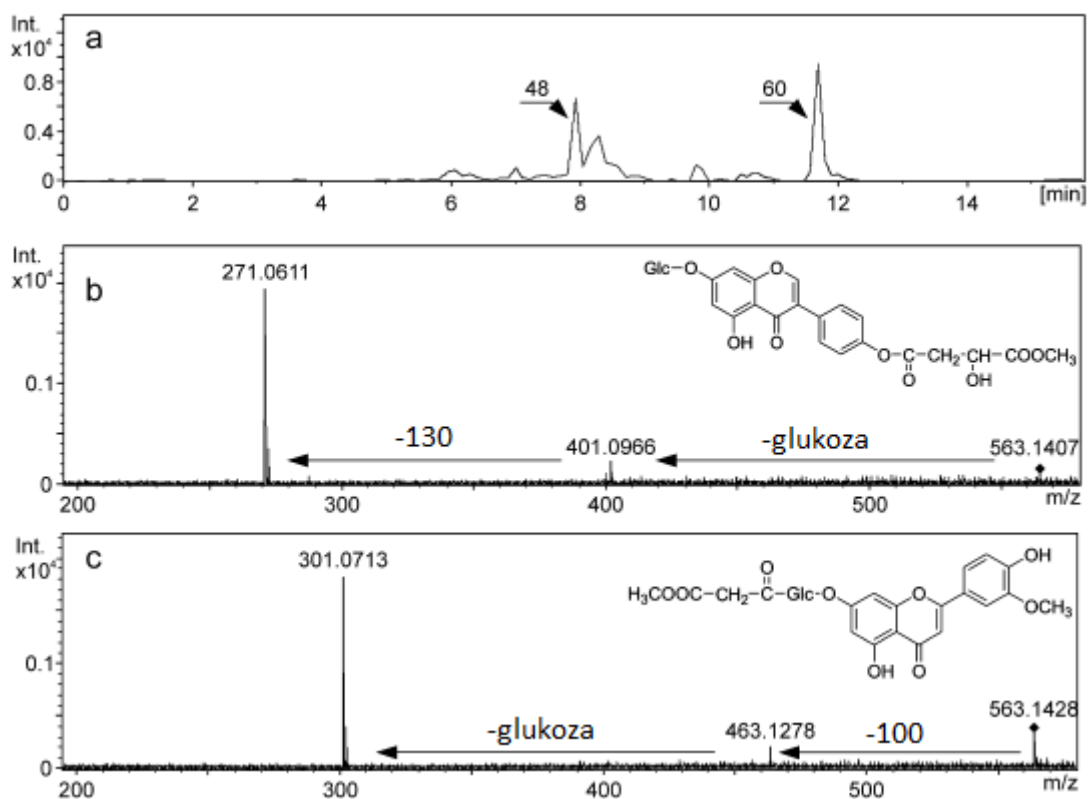


Ryc.4.13 Fragmentacyjne widma masowe malonylowanego 4',7-O-glukozydu genisteiny (nr 14 w Tab.4.3), zarejestrowane w trybie jonów dodatnich (a) i ujemnych (b) za pomocą systemu LC/ESI-Qq-ToF (według Stobiecki i in., 2010).

Kwas malonowy nie był jedynym podstawnikiem acylowym połączeń cukrowych flawonoidów obecnych w ekstraktach *L.reflexus*. Po raz pierwszy w ekstraktach z łubinu zaobserwowano obecność takich podstawników jak ester metylowy kwasu malonowego (100 Da), kwas jabłkowy (116 Da) oraz ester metylowy kwasu jabłkowego (130 Da) (Ryc.4.14). Podstawniki acylowe były przyłączone do cząsteczki flawonoidu poprzez fragment cukrowy lub bezpośrednio związane z rdzeniem aglikonu (Ryc.4.15).



Ryc.4.14 Wzory strukturalne podstawników acylowych, wchodzących w skład pochodnych flawonoidów obecnych w ekstraktach z liści i korzeni *L.reflexus*. * - masa obojętnego fragmentu – 86, 100, 116, 130 odpowiednio dla kwasu malonowego, estru metylowego kwasu malonowego, kwasu jabłkowego oraz estru metylowego kwasu jabłkowego.



Ryc.4.15 Chromatogram jonów $[M+H]^+$ przy m/z 563 (a) oraz widma CID MS/MS izobarów: 7-*O*-glukozydu genisteiny acylowanego estrem metylowym kwasu jabłkowego (130 Da) bezpośrednio na szkielecie aglikonu (**48**) (b), 7-*O*-glukozydu chrysoeriolu acylowanego estrem metylowym kwasu malonowego (100 Da) poprzez cząsteczkę cukrową (**60**) (c). Widma zostały zarejestrowane za pomocą systemu LC/ESI-Qq-ToF. Numery związków (wyłuszczone drukem) odpowiadają Tab.4.3 (według Stobiecki i in., 2010).

4.2.1.2 Analiza strukturalna związków fenolowych w różnych gatunkach łubinów meksykańskich i europejskich

W ekstraktach z liści i korzeni 8 gatunków łubinów meksykańskich (*Lupinus elegans*, *L.exaltatus*, *L.hintonii*, *L.mexicanus*, *L.montanus*, *L.rotundiflorus*, *L.stipulatus*, *Lupinus sp.*), trzech obszaru basenu Morza Śródziemnego (*L.albus*, *L.angustifolius*, *L.luteus*) oraz jednego południowoamerykańskiego udomowionego na terenie Europy (*L.mutabilis*) zidentyfikowano 175 flawonoidów i izoflawonoidów oraz ich glikozylowaniach i acylowanych pochodnych (Tab.4.4). Podstawą do analizy strukturalnej były widma CID MS² i pseudo-MS³ (Qq-ToF) oraz MSⁿ (IT) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich i ujemnych za pomocą dwóch systemów LC/MS.

Tab.4.4 Flawonoidy i izoflawonoidy oraz ich pochodne zidentyfikowane w tkankach różnych gatunków łubinów meksykańskich oraz europejskich za pomocą systemu UPLC/ESI/ Qq-ToF-MS.

Nr	R _t (min)	Nazwa związku	Gatunek łubinu ^d				Mcz	Skład elementarny jonów [M+H] ⁺	Dokładna masa jonów[M+H] ⁺		Błąd [ppm]	Wzór fragmentacji MS/MS:	
			Europejski		Meksykański				Obliczona	Obserwowana		Jony dodatnie [M+H] ⁺ [m/z]	Jony ujemne [M-H] ⁻ [m/z]
			L	K	L	K							
1.	1.1	<i>O</i> -diglukozyd 284 ^x	nd	c	nd	nd	608	C28H33O15	609.1814	609.1813	-0,2	609,447,285	nr
2.	1.3	6,8-C-diglukozyd genisteiny	c	c	nd	nd	594	C27H31O15	595.1657	595.1666	1,5	595,475,433,415,397,379,367	593,503,473,445,431
3.	1.7	<i>C</i> -glukozyd 284 ^x	nd	c	nd	nd	446	C22H23O10	447.1286	447.1288	0,4	447,429,411,393,381,365,327	445,325,297,283/282
4.	1.9	<i>C</i> -glukozyloglukozyd genisteiny (I)	nd	nd	c	c	594	C27H31O15	595.1657	595.1669	2,0	595,577,559,541,523,499,475, 457,427,409,379	nr
5.	1.9	7- <i>O</i> -glukozyloglukozyd genisteiny ^{b,e}	nd	nd	b	c	594	C27H31O15	595.1657	595.1656	-0,2	595,433,271	593,431,269
6.	2.0	<i>O,C</i> -diglukozyd genisteiny	nd	c	b	c	594	C27H31O15	595.1657	595.1659	0,3	595,577,475,433,415,397,379, 367,271	639(+HCOOH),497,473,453, 445,431,415, 311,268
7.	2.0	<i>C,O</i> -diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^c	nd	nd	b	nd	610	C27H31O16	611.1607	611.1608	0,2	611,449,431,413,395,383,353	609,489,447,357,327
8.	2.5	<i>C</i> -diglukozyl-ksylozyd genisteiny ^c	c	c	c	b	726	C32H39O19	727.2080	727.2076	-0,6	727,557,457	725,605,575,505,485,455,383 , 335,307
9.	2.7	<i>C</i> -glukozyloglukozyd genisteiny (II)	c	b	c	b	594	C27H31O15	595.1657	595.1666	1,5	595,577,559,541,523,511,499, 481,475,457,439,427,421,409, 379,355	593,503,473,455,413,383,353
10.	2.9	malonylowany diglukozyd genisteiny	nd	nd	c	nd	680	C30H33O18	681.1661	681.1656	-0,7	681,519	nr
11.	3.0	4'- <i>O</i> -diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^{c,e}	nd	nd	b	b	610	C27H31O16	611.1607	611.1608	0,2	611,449,287	609,447,285
12.	3.0	malonylowany <i>O</i> -diglukozyd 284 ^x	nd	c	nd	nd	694	C31H35O18	695.1818	695.1820	0,3	695,533,447,285	nr
13.	3.1	4'- <i>O</i> -diglukozyd apigeniny ^b	nd	c	b	b	594	C27H31O15	595.1657	595.1663	1,0	595,433,271	639(+HCOOH),431
14.	3.1	<i>O</i> -glukozyd 284 ^x	nd	c	nd	nd	446	C22H23O10	447.1286	447.1285	-0,2	447,285	491,445,283
15.	3.1	7- <i>O</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^{a,b,c,e}	c	c	c	b	448	C21H21O11	449.1078	449.1071	-1,6	449,287	447,285/284
16.	3.2	malonylowany <i>O</i> -diglukozyd genisteiny (I)	nd	c	nd	nd	680	C30H33O18	681.1661	681.1661	0,0	681,561,433	nr
17.	3.4	malonylowany <i>O</i> -diglukozyd gennisteiny (II)	c	c	c	c	680	C30H33O18	681.1661	681.1662	0,1	681,519,433,271	635,473,431
18.	3.4	malonylowany 4'- <i>O</i> - diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (I) ^b	c	c	b	b	696	C30H33O19	697.1611	697.1608	-0,4	697,535,449,287	nr
19.	3.4	8- <i>C</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^{c,e}	nd	nd	a	b	448	C21H21O11	449.1078	449.1081	0,7	449,431,413,395,383,367,353, 329,299	447,412,357,327,397,297,285
20.	3.5	malonylowany <i>O</i> -glukozyd kemferolu (I) ^b	b	nd	nd	nd	534	C24H23O14	535.1082	535.1081	-0,2	535,287	nr
21.	3.5	malonylowany diglukozyd naringeniny ^c	c	nd	c	nd	682	C30H35O18	683.1818	683.1818	0,0	nr	681,632,475,433,271
22.	3.5	<i>O</i> -ramnozylo- <i>O</i> -diglukozyd genisteiny	c	nd	nd	nd	740	C33H41O19	741.2237	741.2238	0,1	741,433	nr

23.	3.6	8-C-glukozyd genisteiny ^e	b	a	c	c	432	C21H21O10	433.1129	433.1130	0,2	433,415,397,379,367,351,337,313,283	431,341,323,311,283
24.	3.6	dimalonylowany diglukozyd eriodiktiolu	nd	c	nd	nd	784	C33H37O22	785.1771	785.1767	-0,5	nr	783,491,449,287
25.	3.7	malonylowany C-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny	c	nd	b	c	696	C30H33O19	697.1611	697.1612	0,1	nr	651,488,447,429
26.	3.8	malonylowany O,C-diglukozyd malonylated ^e	c	nd	c	c	696	C30H33O19	697.1611	697.1605	-0,9	697,535,491,449,431	695,489,447
27.	3.8	malonylowany 4'7-O-diglukozyd genisteiny (I) ^{b,c}	c	c	b	b	680	C30H33O18	681.1661	681.1660	-0,1	681,519,433,271	nr
28.	3.8	malonylowany C-diglukozyd genisteiny	nd	nd	b	c	680	C30H33O18	681.1661	681.1661	0,0	681,663,585,561,517,433,415,397,379,367,313	679,635,515,473,431,311
29.	3.9	malonylowany O-glukozyd luteoliny (I)	nd	nd	b	c	534	C24H23O14	535.1082	535.1076	-1,1	535,287	nr
30.	3.9	malonylowany 4'7-O-diglukozyd genisteiny (II) ^b	b	b	b	b	680	C30H33O18	681.1661	681.1660	-0,1	681,519,433,271	nr
31.	3.9	malonylowany O-diglukozyd izoramnetyny	c	nd	nd	nd	726	C31H35O20	727.1716	727.1721	0,7	727,565,317	nr
32.	3.9	glukozylo-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu	c	nd	nd	nd	756	C33H41O20	757.2186	757.2180	-0,8	757,625,595,463,301	755,593,461,299
33.	3.9	C-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^c	nd	c	b	c	448	C21H21O11	449.1078	449.1073	-1,1	nr	447,327
34.	4.0	6-C-glukozyd genisteiny	c	b	a	b	432	C21H21O10	433.1129	433.1133	0,9	433,415,397,379,367,351,313,283	431,341,311,283
35.	4.0	3',7-O-diglukozyd luteoliny ^{b,e}	nd	nd	b	c	610	C27H31O16	611.1607	611.1610	0,5	611,449,271	609,447,285
36.	4.0	O-diglukozyd chryzoeriolu ^{c,e}	nd	nd	nd	c	624	C28H33O16	625.1763	625.1756	-1,1	625,463,301	nr
37.	4.0	dimalonylowany 4'7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (I)	c	c	nd	nd	782	C33H35O22	783.1614	783.1609	-0,6	783,535,287	781,693,531,489,429
38.	4.0	malonylowany glukozyd eriodiktiolu	nd	c	nd	nd	536	C24H25O14	537.1239	537.1225	-2,6	nr	535,287,259
39.	4.0	malonylowany O-glukozyd chryzoeriolu (I) ^c	c	c	c	b	548	C25H25O14	549.1239	549.1233	-1,1	549,301	nr
40.	4.0	glukozyd naringeniny ^c	c	nd	nd	nd	434	C21H23O10	435.1286	435.1286	0,0	nr	433,271
41.	4.0	dimalonylowany diglukozyd 284 ^x	nd	c	nd	nd	780	C34H37O21	781.1822	781.1824	0,3	781,533,285	nr
42.	4.0	malonylowany 4'7-O-diglukozyd genisteiny (III)	nd	c	nd	nd	680	C30H33O18	681.1661	681.1668	1,0	681,433,271	681,637,475,433,271
43.	4.0	ramnozyloglukozyd kwercetyny ^{b,c}	c	nd	nd	nd	610	C27H31O16	611.1607	611.1607	0,0	nr	609,301/300
44.	4.1	malonylowany C-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (I) ^c	c	nd	a	b	534	C24H23O14	535.1082	535.1086	0,7	535,517,499,473,455,431,413,395,377,353,329,311	533,489,429,493,457,327,299,297,285
45.	4.1	malonylowany 4'7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (II) ^b	c	nd	b	c	696	C30H33O19	697.1611	697.1608	-0,4	697,535,449,287	695,489,447
46.	4.1	dimalonylowany O-diglukozyd izoramnetyny (I)	c	nd	nd	nd	812	C34H37O23	813.1720	813.1739	2,3	813,565,317	nr
47.	4.2	dimalonylowany 4'7-O-diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny (II) ^b	c	c	c	b	782	C33H35O22	783.1614	783.1612	-0,3	783,535,449,287	781,693,489,285

48.	4.2	dimalonylowany <i>O</i> -diglukozyd izoramnetyny (II)	c	nd	nd	nd	812	C34H37O23	813.1720	813.1724	0,5	813,565,317	nr
49.	4.2	malonylowany 8-C-glukozyd genisteiny	c	b	nd	nd	518	C24H23O13	519.1133	519.1132	-0,2	519,501,457,423,415,397,379,367,313	473,431,413,323,311,295,283,269
50.	4.2	malonylowany 4',7- <i>O</i> -diglukozyd genisteiny (IV) ^b	nd	b	b	c	680	C30H33O18	681.1661	681.1662	0,1	681,595,519,433,271	nr
51.	4.2	malonylowany glukozyd kwercetyny (I)	nd	nd	nd	c	550	C24H23O15	551.1031	551.1034	0,5	551,303	505 (-O=C=O),301
52.	4.2	<i>O</i> -glukozyd kwercetyny (I)	c	nd	nd	nd	464	C21H21O12	465.1028	465.1029	0,2	nr	463,301/300
53.	4.2	7- <i>O</i> -glukozyd luteoliny ^{a,b}	c	nd	nd	c	448	C21H21O11	449.1078	449.1072	-1,3	449,287	447,285
54.	4.3	dimalonylowany diglukozyd naringeniny ^c	c	nd	c	nd	768	C33H37O21	769.1822	769.1804	-2,3	nr	767,679,637,457
55.	4.3	<i>O</i> -ramnozyloglukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^{b,c}	c	nd	nd	nd	532	C27H31O15	595.1657	595.1655	-0,3	nr	593,387,285/284
56.	4.3	7- <i>O</i> -glukozyd genisteiny ^{a,b,c}	b	b	b	b	432	C21H21O10	433.1129	433.1132	0,7	433,271	431,269/268
57.	4.3	malonylowany <i>O</i> -glukozyd genisteiny (I)	nd	c	nd	nd	518	C24H23O13	519.1133	519.1132	-0,2	nr	473,431,269
58.	4.3	malonylowany <i>O</i> , <i>C</i> -diglukozyd genisteiny ^{b,c}	c	b	nd	nd	680	C30H33O18	681.1661	681.1662	0,1	nr	679,473,431,311,269
59.	4.3	malonylowany glukozyl-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (I)	c	nd	nd	nd	842	C36H43O23	843.2190	843.2181	-1,1	843,681,625,463,301	nr
60.	4.4	malonylowany <i>C</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (II)	nd	nd	a	b	534	C24H23O14	535.1082	535.1087	0,9	535,517,499,473,455,413,395,353,329,311,287	533,489,429,393,357,327,285
61.	4.4	8- <i>C</i> -glukozyd chryzoeriolu ^c	nd	b	a	b	462	C22H23O11	463.1235	463.1227	-1,7	463,455,427,409,397,385,381,373,367,353,343	371,341,326,313,298
62.	4.4	malonylowany glukozyl-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (II)	c	nd	nd	nd	842	C36H43O23	843.2190	843.2185	-0,6	843,711,681,625,549,463,301	841,635,593,575,473,299
63.	4.4	malonylowany <i>O</i> -glukozyd 284 ^x	nd	a	nd	nd	532	C25H25O13	533.1290	533.1298	1,5	533,285	487,283
64.	4.4	malonylowany diglukozyd chryzoeriolu	nd	c	nd	nd	710	C31H35O19	711.1767	711.1769	0,3	711,549,463,301	nr
65.	4.5	malonylowany glukozyl-ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (III) ^b	a	nd	nd	nd	842	C36H43O23	843.2190	843.2199	1,1	843,711,549,463,301	841,797,635,593,575,503,473,299
66.	4.5	malonylowany <i>C</i> -glukozyd genisteiny (I) ^e	nd	nd	a	b	518	C24H23O13	519.1133	519.1142	1,7	519,501,475,457,439,415,397,379,367,337,313,295,283	473,413,353,323,311,283,267
67.	4.5	7- <i>O</i> -glukozylglukozyd apigeniny ^{b,e}	nd	nd	b	c	594	C27H31O15	595.1657	595.1659	0,3	595,433,271	593,431,269
68.	4.5	dimalonylowany 4',7- <i>O</i> -diglukozyd genisteiny (I) ^{b,c,e}	b	b	b	b	766	C33H35O21	767.1665	767.1648	-2,2	767,519,271	765,515,473,269
69.	4.6	<i>O</i> -glukozyd kwercetyny (II) ^c	nd	nd	nd	c	464	C21H21O12	465.1028	465.1015	-2,8	465,303	nr
70.	4.6	7- <i>O</i> -glukozylglukozyd 2'-hydroksygenisteiny ^{b,c,e}	nd	nd	b	nd	610	C27H31O16	611.1607	611.1607	0,0	611,449,271	609,429,285
71.	4.6	3- <i>O</i> -glukozyd kemferolu ^{a,b,e}	b	nd	nd	nd	448	C21H21O11	449.1078	449.1080	0,4	471,287	447,285/284,255,227
72.	4.6	dimalonylowany 4',7- <i>O</i> -diglukozyd genisteiny (II)	b	b	nd	nd	766	C33H35O21	767.1665	767.1661	-0,5	767,681,519,475,433,271	nr

73.	4.6	malonylowany <i>O</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (I) ^{b,c}	a	a	b	b	534	C24H23O14	535.1082	535.1083	0,2	535,449,287	489,285
74.	4.6	<i>O</i> -glukozyd chryzoeriolu (I)	c	c	nd	nd	462	C22H23O11	463.1235	463.1234	-0,2	463,301	nr
75.	4.6	<i>O</i> -ramnozylogluukozyd kemferolu ^b	c	nd	nd	nd	594	C27H31O15	595.1657	595.1647	-1,7	nr	593,285
76.	4.7	malonylowany glukozylo-ksylozylogluukozyd chryzoeriolu (IV)	b	nd	nd	nd	842	C36H43O23	843.2190	843.2182	-0,9	711,549,463,301	nr
77.	4.7	<i>O</i> -ramnozylogluukozyd izoramnetyny	c	nd	c	nd	624	C28H33O16	625.1763	625.1751	-1,9	nr	623,315
78.	4.7	malonylowany <i>O</i> -glukozyd izoramnetyny	c	c	nd	nd	564	C25H25O15	565.1188	565.1200	2,1	565,317	nr
79.	4.8	<i>O</i> -ksylozylogluukozyd apigeniny ^{b,c}	b	c	c	b	564	C26H29O14	565.1552	565.1559	1,2	565,433,271	563,269
80.	4.8	4'- <i>O</i> -glukozyd luteoliny ^{a,b,e}	nd	nd	a	b	448	C21H21O11	449.1078	449.1077	-0,2	449,287	447,412,284/285
81.	4.8	malonylowany 4'7- <i>O</i> -digluukozyd 2'-hydroksygenisteiny (III) ^b	nd	nd	b	nd	696	C30H33O19	697.1611	697.1616	0,7	697,535,449	nr
82.	4.8	malonylowany <i>C</i> -glukozyd genisteiny (II) ^c	b	a	a	b	518	C24H23O13	519.1133	519.1129	-0,8	519,501,483,457,439,415,397,379,361,337,313,295,283,271,147	517,473,431,413,341,311,283,269
83.	4.8	dimalonylowany glukozylo-ksylozylogluukozyd chryzoeriolu (I)	c	nd	nd	nd	928	C39H45O26	929.2194	929.2190	-0,4	929,797,767,549,463,301	nr
84.	4.8	dimalonylowany digluukozyd 2'-hydroksygenisteiny	nd	c	c	c	782	C33H35O22	783.1614	783.1596	-2,3	nr	781,489,431
85.	4.9	<i>O</i> -glucosyl chryzoeriolu ^b	nd	nd	a	b	624	C28H33O16	625.1763	625.1769	1,0	625,463,301	623,299
86.	4.9	<i>C</i> -glukozyd izoramnetyny ^c	c	nd	nd	c	478	C22H23O12	479.1184	479.1178	-1,3	501,355,317	477,431,357,315,299,285,271,257,243
87.	4.9	dimalonylowany glukozylo-ksylozylogluukozyd chryzoeriolu (II) ^b	b	nd	nd	nd	928	C39H45O26	929.2194	929.2208	1,5	929,767,711,549,463,301	927,677,635,617,593,575,557,545,503,473,299
88.	4.9	7- <i>O</i> -glukozyd apigeniny ^{a,b,e}	c	b	b	b	432	C21H21O10	433.1129	433.1129	0,0	433,271	431,269/268
89.	4.9	malonylowany glukozyd naringeniny ^c	c	nd	c	nd	520	C24H25O13	521.1290	521.1303	2,5	nr	519,271
90.	5.0	<i>O</i> -ramnozylogluukozyd apigeniny ^b	a	nd	nd	nd	578	C27H31O14	579.1708	579.1703	-0,9	579,433,271	577,431,413,269
91.	5.0	malonylowany 7- <i>O</i> -glukozylogluukozyd genisteiny ^{b,c,e}	nd	nd	c	b	680	C30H33O18	681.1661	681.1659	-0,3	681,433,271	nr
92.	5.1	<i>O</i> -trigluukozyd acacetyny	nd	nd	c	nd	770	C34H43O20	771.2342	771.2338	-0,5	771,609,447,285	nr
93.	5.1	malonylowany 8- <i>C</i> -glukozyd chryzoeriolu ^{c,e}	c	c	b	b	548	C25H25O14	549.1239	549.1233	-1,1	549,531,513,505,487,469,427,409,367,343,325	nr
94.	5.1	malonylowany <i>O</i> -glukozylogluukozyd chryzoeriolu (I) ^{b,c}	nd	nd	a	b	710	C31H35O19	711.1767	711.1765	-0,3	711,463,301	709,665,623,605,299
95.	5.1	dimalonylowany glukozylo-ksylozylogluukozyd chryzoeriolu (III) ^b	b	nd	nd	nd	928	C39H45O26	929.2194	929.2192	-0,2	929,797,767,711,681,549,463	927,677,635,617,593,575,299
96.	5.1	dimalonylowany <i>O</i> -digluukozyd apigeniny ^b	b	b	c	c	766	C33H35O21	767.1665	767.1668	0,4	767,681,519,475,271	765,473
97.	5.1	malonylowany <i>O</i> -ksylozylogluukozyd	b	nd	nd	nd	666	C29H31O18	667.1505	667.1515	1,5	667,535,449,287	nr

		luteoliny ^b											
98.	5.1	<i>O</i> -ksylozyloglukozyd chryzoeriolu ^{b,c}	b	nd	c	nd	594	C27H31O15	595.1657	595.1666	1,5	595,463,301	593,299
99.	5.2	malonylowany <i>O</i> -diglukozyd genisteiny (III) ^b	nd	nd	c	c	680	C30H33O18	681.1661	681.1665	0,6	681,519,271	nr
100.	5.2	malonylowany <i>O</i> -glukozyd kemferolu (II) ^b	b	c	b	c	534	C24H23O14	535.1082	535.1103	3,9	535,449,287	nr
101.	5.2	<i>O</i> -ramnozyloglukozyd chryzoeriolu ^{b,c}	b	nd	nd	nd	608	C28H33O15	609.1814	609.1815	0,2	609,463,301	607,299
102.	5.2	<i>O</i> -glukozyd chryzoeriolu (II) ^b	b	c	a	c	462	C22H23O11	463.1235	463.1229	-1,3	463,301	461,299/298
103.	5.3	<i>O</i> -glukozyd luteoliny	nd	nd	a	c	448	C21H21O11	449.1078	449.1071	-1,6	449,287	447,285/284
104.	5.4	4'- <i>O</i> -diglukozyd luteonu ^e	nd	nd	c	b	678	C32H39O16	679.2233	679.2240	1,0	679,517,461,355,299	677,515,353
105.	5.4	8- <i>C</i> -glukozyd acacetyny ^c	nd	nd	a	c	446	C22H23O10	447.1286	447.1282	-0,9	447,429,411,381,351,327,297	445,355,325,297,282
106.	5.4	malonylowany <i>O</i> -glukozyd genisteiny (II) ^b	b	b	b	b	518	C24H23O13	519.1133	519.1126	-1,3	519,271	473,413,269
107.	5.4	malonylowany <i>O</i> -ksylozyloglukozyd genisteiny (I)	c	nd	nd	nd	650	C29H31O17	651.1556	651.1555	-0,2	651,271	nr
108.	5.4	diglukozyd luteonu (I) ^c	c	nd	c	b	678	C32H39O16	679.2233	679.2215	-2,7	nr	677,515,353
109.	5.4	malonylowany <i>O</i> -glukozyloglukozyd chryzoeriolu (II) ^{b,e}	nd	nd	a	c	710	C31H35O19	711.1767	711.1768	0,1	711,625,549,505,463,301	709,665,623,605,553,489,429,299
110.	5.4	malonylowany <i>O</i> -glukozyd luteoliny (II) ^b	nd	nd	a	c	534	C24H23O14	535.1082	535.1088	1,1	535,449,287	489,429,285
111.	5.4	malonylowany 7- <i>O</i> -glukozyd genisteiny ^{b,c}	a	a	b	a	518	C24H23O13	519.1133	519.1133	0,0	519,433,271	473,269
112.	5.5	malonylowany <i>O</i> -ksylozyloglukozyd genisteiny (II) ^b	c	nd	c	c	650	C29H31O17	651.1556	651.1564	1,2	651,519,271	605,563,545,353,269
113.	5.5	malonylowany glukozyd kwercetyny (II) ^c	nd	nd	c	c	550	C24H23O15	551.1031	551.1021	-1,8	551,303	nr
114.	5.5	malonylowany ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (I) ^b	b	nd	c	c	680	C30H33O18	681.1661	681.1671	1,5	681,549,463,301	nr
115.	5.6	dimalonylowany diglukozyd genisteiny ^b	nd	c	b	c	766	C33H35O21	767.1665	767.1660	-0,7	767,271	nr
116.	5.6	malonylowany <i>O</i> -glukozyd chryzoeriolu (II) ^{b,c}	a	c	b	c	548	C25H25O14	549.1239	549.1237	-0,4	549,463,301	nr
117.	5.6	malonylowany <i>O</i> -glukozyd apigeniny (I) ^{b,e}	c	b	a	b	518	C24H23O13	519.1133	519.1132	-0,2	519,271	473,269
118.	5.6	malonylowany <i>O</i> -glukozyd luteoliny (III) ^b	nd	nd	a	b	534	C24H23O14	535.1082	535.1094	2,2	535,517,491,449,287	533,512,489,429,285
119.	5.6	malonylowany <i>O</i> -ksylozyloglukozyd apigeniny ^b	b	b	nd	nd	650	C29H31O17	651.1556	651.1555	-0,2	651,633,607,565,519,501,475,433,271	649,605,563,473,269
120.	5.6	malonylowany <i>O</i> -ramnozyloglukozyd genisteiny (I)	c	nd	nd	nd	664	C30H33O17	665.1712	665.1710	-0,3	nr	619,577,559,455,269
121.	5.7	malonylowany ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (II) ^b	b	nd	nd	nd	680	C30H33O18	681.1661	681.1671	1,5	681,549,301	679,593,575,299
122.	5.7	dimalonylowany <i>O</i> -diglukozyd chryzoeriolu ^{b,c}	nd	nd	a	c	796	C34H37O22	797.1771	797.1774	0,4	797,711,549,301	795,707,665,647,605,299
123.	5.8	malonylowany 8- <i>C</i> -glukozyd acacetyny ^c	nd	nd	a	c	532	C25H25O13	533.1290	533.1292	0,4	533,515,497,471,453,429,411,393,375,351,327,309	531,445,355,325,297,282

124.	5.8	malonylowany <i>O</i> -ramnozyloglukozyd genisteiny (II) ^b	b	c	nd	nd	664	C30H33O17	665.1712	665.1705	-1,1	665,579,519,271	619,577,269
125.	5.8	malonylowany <i>O</i> -glukozyd apigeniny (II) ^{b,e}	b	a	a	b	518	C24H23O13	519.1133	519.1133	0,0	519,433,271	517,269
126.	5.8	malonylowany ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (III) ^b	a	nd	nd	nd	680	C30H33O18	681.1661	681.1670	1,3	681,663,637,595,549,531,505,463,433,343,301	679,635,593,575,503,473,443,341,299
127.	5.9	2'-hydroksygenisteina ^{a,b,c}	nd	nd	c	b	286	C15H11O6	287.0550	287.0548	-0,7	269,231,217,203,199,189,171,161,153,147,133,121,115,107,91	285,240,217,199,187,175,157,149,133,123,107,89
128.	5.9	malonylowany <i>O</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (II) ^{b,e}	nd	nd	c	b	534	C24H23O14	535.1082	535.1083	0,2	535,287	nr
129.	5.9	<i>O</i> -glukozylglukozyd acacetyny ^{b,c}	nd	nd	a	b	608	C28H33O15	609.1814	609.1817	0,5	609,447,285	607,283
130.	5.9	malonylowany <i>O</i> -glukozyd chryzoeriolu (III) ^{b,c}	a	b	a	b	548	C25H25O14	549.1239	549.1238	-0,2	549,531,505,463,301	547,503,299
131.	5.9	malonylowany ramnozyloglukozyd chryzoeriolu	c	nd	nd	nd	694	C31H35O18	695.1818	695.1808	-1,4	695,301	nr
132.	5.9	malonylowany <i>O</i> -diglukozyd luteonu (I) ^{c,e}	nd	nd	c	c	764	C35H41O19	765.2237	765.2240	0,4	765,603,547,517,355	763,719,557,539,515,395,353
133.	6.0	malonylowany <i>O</i> -diglukozyd luteonu (II)	nd	c	c	c	764	C35H41O19	765.2237	765.2221	-2,1	765,603,547,517,355	nr
134.	6.1	malonylowany <i>O</i> -glukozyd chryzoeriolu (IV) ^{b,c}	a	b	nd	nd	548	C25H25O14	549.1239	549.1255	2,9	549,301	nr
135.	6.1	dimalonylowany ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (I) ^b	b	nd	nd	nd	766	C33H35O21	767.1665	767.1664	-0,1	767,749,723,681,549,531,519,505,463,431,301	765,635,617,593,575,503,485,473,443,427,413,395,355,341,313,300/299/298
136.	6.1	diglukozyd luteonu (II)	nd	c	nd	nd	678	C32H39O16	679.2233	679.2213	-2,9	nr	677,623,601,551
137.	6.2	dimalonylowany ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (II) ^b	a	nd	nd	nd	766	C33H35O21	767.1665	767.1677	1,6	767,681,549,301	nr
138.	6.2	dimalonylowany ksylozyloglukozyd chryzoeriolu (III) ^b	a	nd	nd	nd	766	C33H35O21	767.1665	767.1665	0,0	767,681,549,301	nr
139.	6.3	malonylowany <i>O</i> -glukozyd acacetyny (I) ^b	nd	c	b	b	532	C25H25O13	533.1290	533.1294	0,8	533,285	nr
140.	6.3	malonylowany <i>O</i> -glukozylglukozyd acacetyny ^b	nd	nd	a	b	694	C31H35O18	695.1818	695.1822	0,6	695,447,285	693,283
141.	6.4	metylomalonylowany diglukozyd chryzoeriolu	nd	nd	c	nd	724	C32H37O19	725.1924	725.1927	0,4	725,301	nr
142.	6.6	malonylowany diglukozyd witeonu	c	c	c	c	748	C35H41O18	749.2287	749.2295	1,1	749,501,445	nr
143.	6.6	dimalonylowany diglukozyd luteonu	c	c	c	c	850	C38H43O22	851.2240	851.2259	2,2	nr	849,761,559,557
144.	6.6	malonylowany <i>O</i> -diglukozyd acacetyny ^b	nd	nd	a	c	694	C31H35O18	695.1818	695.1820	0,3	695,533,285	649,283
145.	6.6	dimalonylowany <i>O</i> -glukozylglukozyd acacetyny (I) ^b	nd	nd	c	nd	780	C34H37O21	781.1822	781.1825	0,4	781,533,285	nr
146.	6.7	metylomalonylowany <i>O</i> -glukozyd	nd	nd	c	c	532	C25H25O13	533.1290	533.1285	-0,9	533,271	nr

		apigeniny ^{b,c}											
147.	6.7	<i>O</i> -glukozyd acacetyny ^b	nd	nd	a	c	446	C22H23O10	447.1286	447.1283	-0,7	447,285	491,283
148.	6.9	dimalonylowany <i>O</i> -glukozylogluukozyd acacetyny (II) ^{b,c}	nd	nd	a	c	780	C34H37O21	781.1822	781.1821	-0,1	781,695,533,285	779,649,607,487,283
149.	7.0	metylomalonylowany <i>C</i> -glukozyd acacetyny ^c	nd	nd	a	nd	546	C26H27O13	547.1446	547.1452	1,1	547,529,511,597,479,447,429,411,393,375,351,327,309,297,285	545,445,355,337,325
150.	7.0	malonylowany digluukozyd luteonu	nd	c	nd	nd	764	C35H41O19	765.2237	765.2241	0,5	765,517	nr
151.	7.1	naringenina ^{a,b,c,e}	nd	nd	b	nd	272	C15H13O5	273.0757	273.0759	0,7	273,153,147,119,107,97,91	271,151
152.	7.1	genisteina ^{a,b,c}	c	c	b	b	270	C15H11O5	271.0601	271.0602	0,4	271,153,141,91	269,133
153.	7.2	apigenina ^{a,b,c,e,e}	c	c	b	b	270	C15H11O5	271.0601	271.0601	0,0	271,153,145,119,91	269,117
154.	7.2	<i>O</i> -glukozyd luteonu (I) ^e	nd	nd	c	c	516	C26H29O11	517.1704	517.1704	0,0	517,355,299	515,353
155.	7.2	metylomalonylowany <i>O</i> -digluukozyd acacetyny ^b	nd	nd	c	nd	708	C32H37O18	709.1974	709.1982	1,1	709,285	nr
156.	7.4	<i>O</i> -glukozyd witeonu (I) ^e	nd	nd	c	c	500	C26H29O10	501.1755	501.1759	0,8	501,339	nr
157.	7.5	<i>O</i> -glukozyd luteonu (II) ^e	nd	nd	nd	c	516	C26H29O11	517.1704	517.1698	-1,2	517,355	nr
158.	7.5	chryzoeriol ^{a,b,c,e}	c	c	b	c	300	C16H13O6	301.0707	301.0712	1,7	301,286,258,299,153	299,284,256,227,151
159.	7.5	malonylowany <i>O</i> -glukozyd acacetyny (II) ^b	c	nd	a	c	532	C25H25O13	533.1290	533.1294	0,8	533,285	nr
160.	7.7	malonylowany <i>O</i> -glukozyd luteonu (I) ^c	b	b	c	b	602	C29H31O14	603.1708	603.1730	3,6	603,355,299	nr
161.	7.9	<i>O</i> -glukozyd luteonu (III) ^{c,e}	nd	nd	c	b	516	C26H29O11	517.1704	517.1702	-0,4	517,355,299	515,447,353,309
162.	8.1	malonylowany <i>O</i> -glukozyd acacetyny (III) ^c	nd	nd	c	b	532	C25H25O13	533.1290	533.1286	-0,8	533,371,285	531,369,247
163.	8.4	<i>O</i> -glukozyd witeonu (II) ^{c,e}	nd	nd	c	c	500	C26H29O10	501.1755	501.1752	-0,6	501,339,283	nr
164.	8.9	malonylowany <i>O</i> -glukozyd luteonu (II)	nd	nd	nd	c	602	C29H31O14	603.1708	603.1708	0,0	603,355	nr
165.	9.2	malonylowany <i>O</i> -glukozyd luteonu (III)	nd	nd	nd	c	602	C29H31O14	603.1708	603.1710	0,3	603,355,299	nr
166.	9.7	<i>O</i> -glukozyd luteonu (IV) ^e	nd	nd	c	c	516	C26H29O11	517.1704	517.1699	-1,0	517,461,299	nr
167.	9.9	malonylowany <i>O</i> -glukozyd witeonu ^c	nd	c	b	b	586	C29H31O13	587.1759	587.1769	1,7	587,339,283	nr
168.	10.5	izomer luteonu *	nd	c	nd	nd	354	C20H19O6	355.1176	355.1178	0,6	nr	353
169.	11.3	malonylowany <i>O</i> -glukozyd luteonu (IV)	nd	nd	c	nd	602	C29H31O14	603.1708	603.1712	0,7	603,547,355,299	nr
170.	12.0	izomer luteonu *	nd	c	nd	b	354	C20H19O6	355.1176	355.1174	-0,6	299	353
171.	12.1	acacetyna ^{a,b}	nd	nd	b	c	284	C16H13O5	285.0757	285.0760	1,1	270,242,213,193,153,133,118	268,239,211,172,151,107
172.	13.1	izomer luteonu *	nd	nd	nd	c	354	C20H19O6	355.1176	355.1177	0,3	299	297
173.	13.7	izomer luteonu *	nd	nd	c	c	354	C20H19O6	355.1176	355.1176	0,0	299	nr
174.	14.4	luteon ^{a,b,c}	c	c	c	b	354	C20H19O6	355.1176	355.1173	-0,8	355,299,281,229,183,165,121	325,309,285,267,240,219,201,175,151,133,109
175.	14.7	witeon ^{a,b,c}	c	c	c	c	338	C20H19O5	339.1227	339.1221	-1,8	339,283,255,165,121	337,314,293,282,254,238,225,133

^a - związki zidentyfikowane na podstawie porównania ze standardem;

^b - identyfikacja aglikonu na podstawie widm pseudo-MS³;

^c - jony macierzyste obserwowane również na układzie LC/IT-MS;

^d - poziomy intensywności protonowanych cząsteczek zarejestrowanych w trybie MS: a = intensywność powyżej 1×10^5 ; b = intensywność równa od 1×10^4 do 1×10^5 ; c = intensywność poniżej 1×10^4 ; nd - nie wykryto;

^e - widma masowe zdeponowane w bibliotece MassBank (numery ID w Tab.S2);

* - nie zidentyfikowano; likoizoflawon A, 2,3-dehydrokiewiton zaproponowano na podstawie Tahara i Ibrahim (1995);

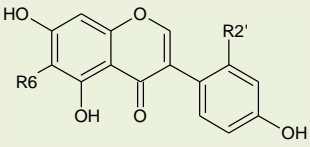
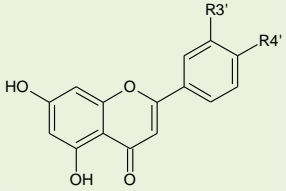
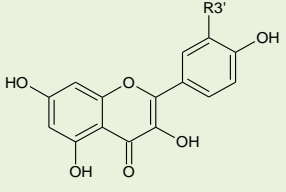
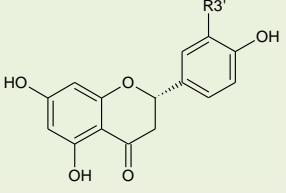
^x – aglikon o masie 284 Da, nie zidentyfikowany;

L-liść; K-korzeń;

nr - nie zarejestrowano.

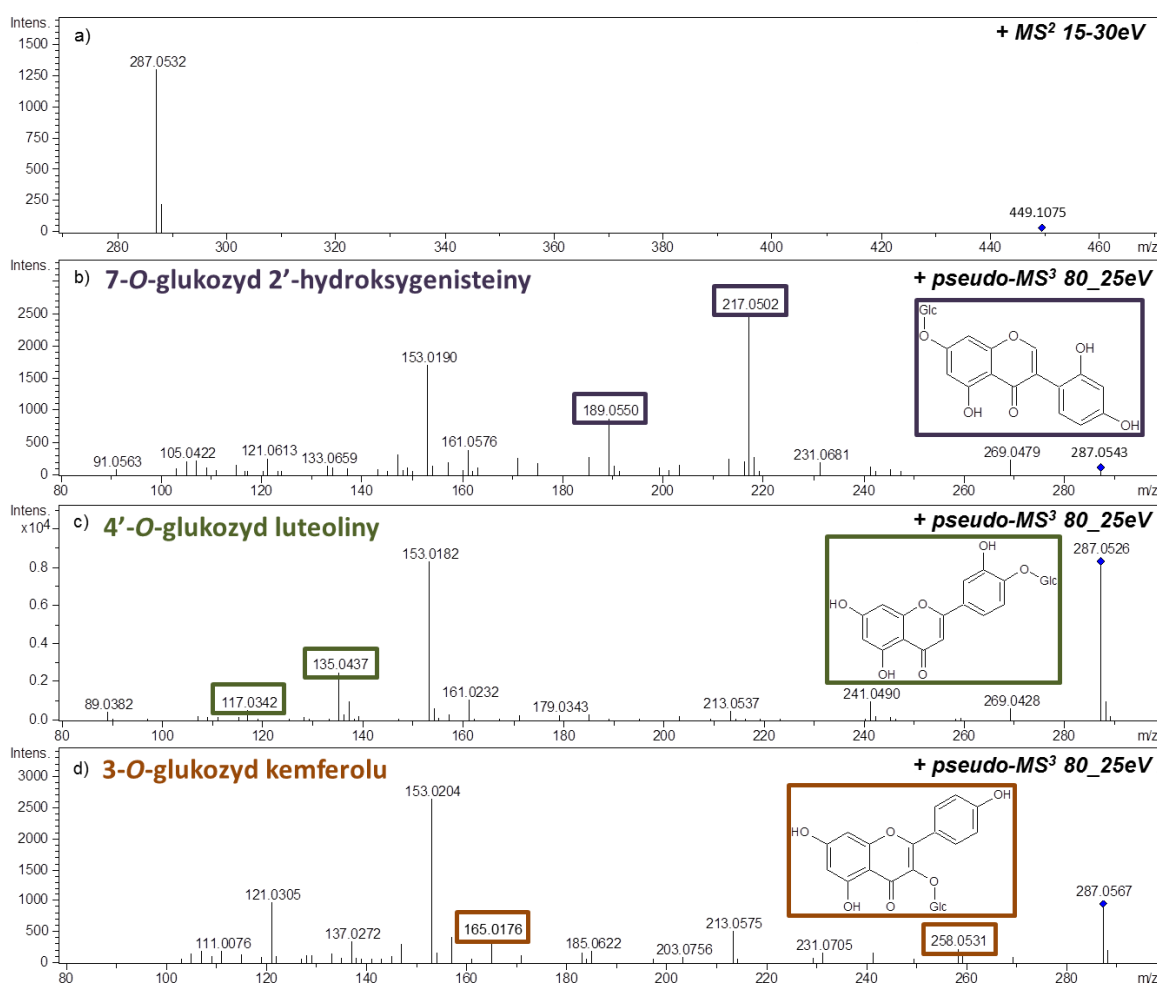
Na podstawie zarejestrowanych widm pseudo-MS³ jonów potomnych (Y₀⁺ oraz Y₀⁻) jednoznacznie zidentyfikowano 13 aglikonów, wchodzących w skład związków fenolowych obecnych w badanych ekstraktach łubinów (Tab.4.5). Otrzymane widma aglikonów glikozylowaniach pochodnych porównywano z widmami zarejestrowanymi dla standardów. Rozpoznane aglikony należały do 4 różnych klas flawonoidów, takich jak flawony, flawonole, flawanony i izoflawony. Zróżnicowanie ich struktur wynikało z odmiennego podstawienia szkieletu aglikonu grupami hydroksylowymi i metoksyłowymi w pozycjach 2'-, 3'-, 4'-, 5'-, 5-, 6-, 7-.

Tab.4.5 Struktury aglikonów flawonoidów i izoflawonoidów zidentyfikowane w tkankach łubinów

KLASA ZWIĄZKU	AGLYCONE	R2'	R3'	R4'	R6
IZOFLAWON 	GENISTEINA	H	-	-	H
	2'-HYDROKSYGENISTEINA	OH	-	-	H
	LUTEON	OH	-	-	-CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂
	WITEON	H	-	-	-CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂
FLAWON 	ACACETYNA	-	H	OCH ₃	-
	APIGENINA	-	H	OH	-
	CHRYZOERIOLOL	-	OCH ₃	OH	-
	LUTEOLINA	-	OH	OH	-
FLAWONOL 	IZORAMNETYNA	-	OCH ₃	-	-
	KEMFEROL	-	H	-	-
	KWERCETYNA	-	OH	-	-
FLAWANON 	ERIODIKTIOL	-	OH	-	-
	NARINGENINA	-	H	-	-

Zastosowane podejście metodyczne pozwoliło na rozróżnienie izomerycznych aglikonów, posiadających jednakowe składy elementarne oraz, co za tym idzie, masy cząsteczkowe, np. 270 Da (apigenina i genisteina) oraz 286 Da (2'-hydroksygenisteina, kemferol, luteolina). Struktury izoflawonu - 2'-hydroksygenisteiny, flawonolu - kemferolu oraz flawonu - luteoliny, określono na podstawie obecności charakterystycznych fragmentów

w widmach pseudo-MS³: przy m/z 189 i 217 dla 2'-hydroksygenisteiny; m/z 117 i 135 dla luteoliny oraz przy m/z 165 i 258 dla kemferolu (Ryc.4.16).



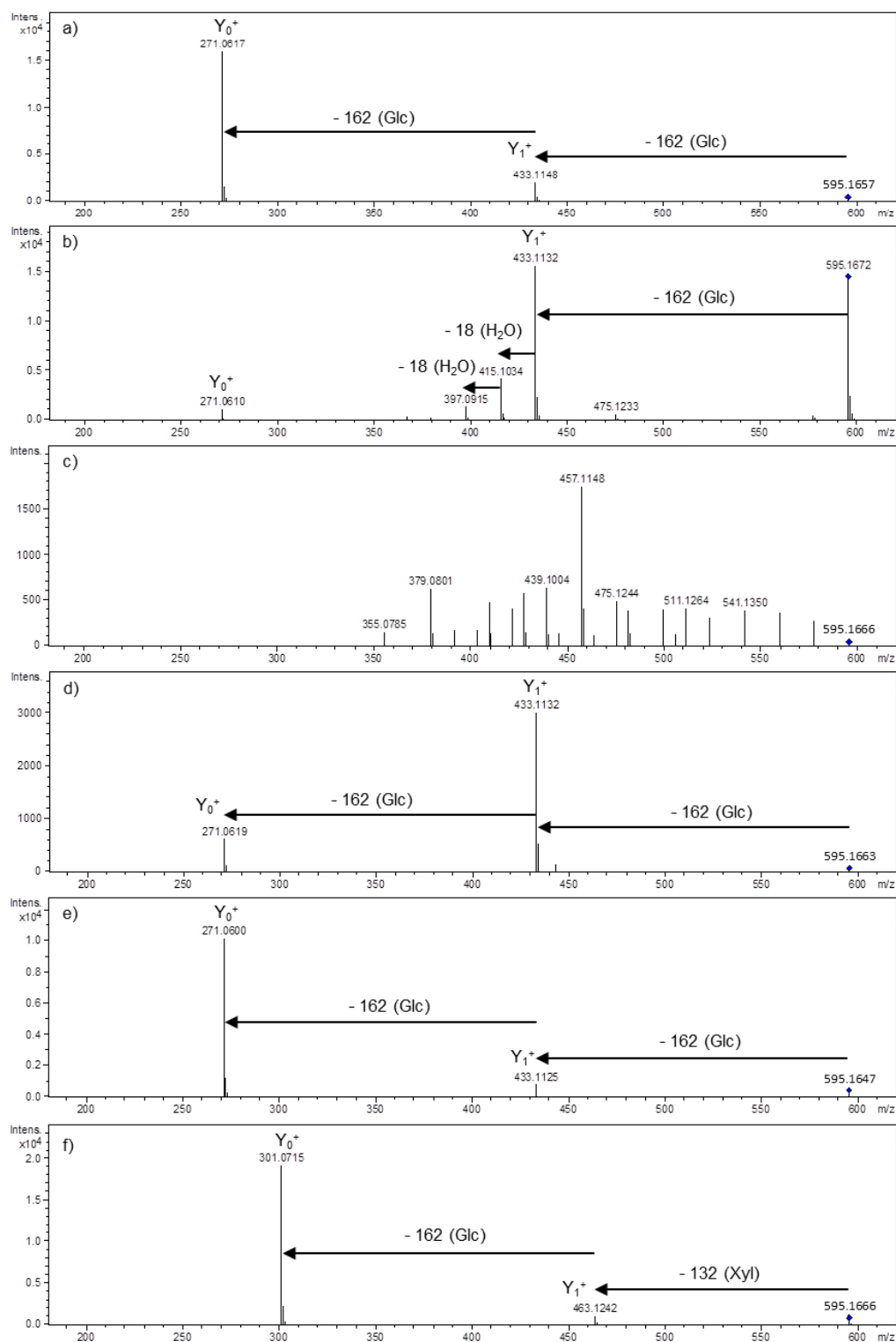
Ryc.4.16 Widmo CID MS/MS jednakowe dla wszystkich trzech izomerycznych związków (a) oraz widma pseudo-MS³ dla ich aglikonów, 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (**15**) (b), 4'-O-glukozyd luteoliny (**80**) (c) oraz 3-O-glukozyd kemferolu (**71**) (d) zarejestrowane na analizatorze Qq-ToF w trybie jonów dodatnich. Zastosowano następujące parametry energii kolizji: +15-30 eV dla MS² i +25 eV dla MS³, ISCID +80 eV. Numery związków (wyłuszczonej druk) zgodne z Tab.4.4.

Cztery spośród zidentyfikowanych aglikonów: genisteina, 2'-hydroksygenisteina, luteon i witeon były obecne zarówno w ekstraktach z liści jak i korzeni niemal wszystkich badanych gatunków łubinów, wchodząc w skład pochodnych glikozylowanych i acylowanych oraz pozostając w postaci wolnych aglikonów. Zidentyfikowano najwięcej pochodnych genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny, występujących powszechnie w różnych gatunkach łubinów europejskich. Pochodne luteonu i witeonu były obecne w mniejszych ilościach. Odnotowano również obecność pięciu izomerów prenylowanych izoflawonów o masie cząsteczkowej 354

Da. Jeden ze związków o tej masie (nr **174** w Tab.4.4) zidentyfikowano jako luteon, po uprzednim porównaniu z widmem standardu. Pozostałe związki o nr **168, 170, 172 i 173** (Tab.4.4) nie zostały scharakteryzowane strukturalnie ze względu na brak standardów. Prawdopodobnie mogły znaleźć się wśród nich raportowane przez Tharę i Ibrahima (1995), prenylowane w pozycji C-5' oraz C-8 likoizoflawon A i 2,3-dehydrokiewiton. Spośród wolnych flawonów zidentyfikowano obecność apigeniny i chryzoeriolu, wcześniej raportowanych przez Bednarka i współpracowników (2001, 2003) oraz Muth i współpracowników (2008, 2009). Flawonem, który po raz pierwszy został zidentyfikowany w łubinie, na podstawie widm MS/MS i porównania z widmem standardu, jest acacetyna (Ryc. S8). Aglikon ten w postaci wolnej i glikozylowanej oraz acylowanej występował jedynie w gatunkach łubinów meksykańskich. Ponadto pozostałe aglikony: flawon-luteolina, flawanony-eriodiktioleol i naringenina oraz flawonole-izoramnetyna, kemferol i kwercetyna, występowały jedynie w formie glikozylowanych lub acylowanych pochodnych. Pochodne izoramnetyny zidentyfikowano w liściach łubinów meksykańskich oraz łubinu białego (*L.albus*) i żółtego (*L.luteus*). Glikozylowane pochodne kemferolu obecne były jedynie w ekstraktach łubinów meksykańskich, podczas gdy pochodne kwercetyny występowały w korzeniach niektórych łubinów Ameryki Północnej oraz w liściach prawie wszystkich badanych gatunków. Zidentyfikowano zaledwie kilka pochodnych glikozylowych flawanonów: eriodiktioleol obecny był w korzeniach łubinu białego, a naringenina w liściach *L.mutabilis* i trzech gatunków łubinów meksykańskich (Tab.S1). Ponadto zaobserwowano obecność glikozylowanych pochodnych nieznanego aglikonu o masie cząsteczkowej 284 Da (związki nr **1, 3, 12, 14, 41, 63** w Tab.4.4) jedynie w korzeniach łubinu żółtego. Zarejestrowane widma MS/MS nieznanego aglikonu nie pokrywały się z żadnymi z posiadanych standardów o tej masie (acacetyna, prunetyna, bioczanina A).

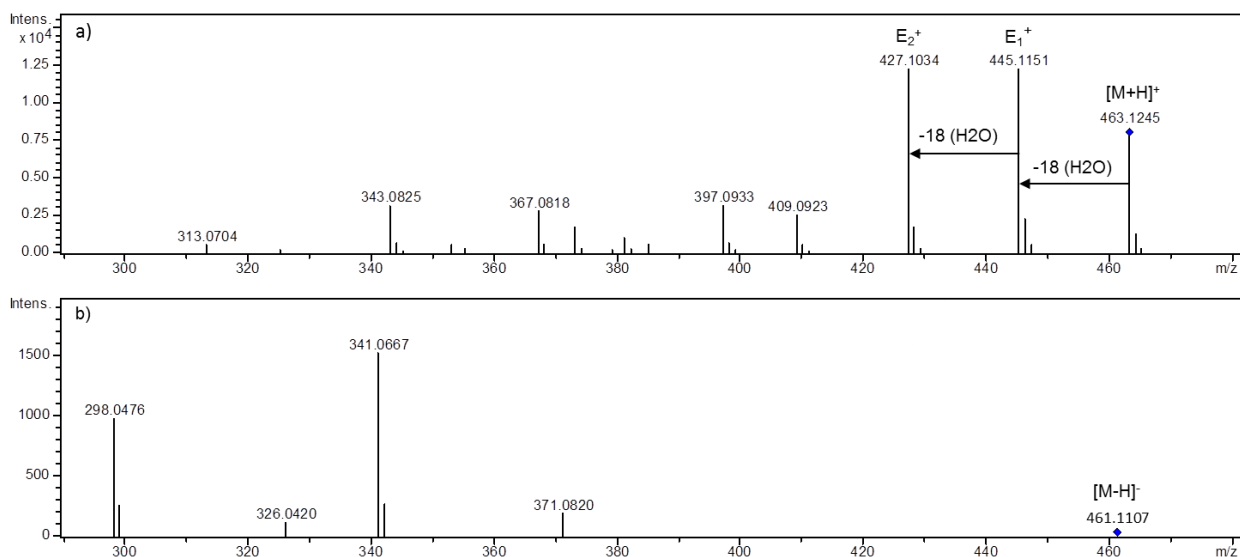
Bogactwo struktur aglikonów oraz obecność podstawników cukrowych i acylowych skutkowało pojawieniem się wielu związków fenolowych będących izomerami lub izobarami (Ryc.4.17, 4.18, 4.20). Zastosowanie wysokorozdzielczego analizatora pozwoliło na określenie składów elementarnych badanych związków na podstawie wartości m/z z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku. Za prawidłowe masy uznano te wartości, które nie różniły się od mas obliczonych więcej niż 5ppm-ów Na podstawie analizy widm fragmentacyjnych MS/MS, rejestrowanych w trybie jonów dodatnich i ujemnych przy odpowiednio dobranych wartościach energii w źródle jonów i komorze kolizyjnej, możliwe było uzyskanie częściowych informacji na temat wzorca glikozylacji aglikonów fenolowych. Nomenklatura opisująca powstałe jony fragmentacyjne została przedstawiona we wstępie teoretycznym

(Rozdz.1.5). Na podstawie obecności i wzajemnego stosunku intensywności charakterystycznych jonów fragmentacyjnych typu Y_0 i Y_1 (dla *O*-diglikozydów) oraz X_i i E_i (dla *C*-glikozydów) (Cuyckens i Claeys, 2004; Vukics i Guttman, 2010) istnieje możliwość rozróżnienia di-*O*-glikozydów, *O*-glikozyloglikozydów oraz *C,O*-diglikozydów. Analiza intensywności względnych jonów fragmentacyjnych Y_0 i Y_1 umożliwiła rozróżnienie di-*O*-glikozydów oraz *O*-glikozyloglikozydów, na podstawie stosunków jonów prezentujących się odpowiednio $Y_0 > Y_1$ oraz $Y_0 < Y_1$. Jony E_i (-18 Da), odpowiadające odejściu obojętnej cząsteczki wody, charakterystyczne są dla fragmentacji *C*-glikozydów (Ryc. 4.17)



Ryc.4.17 Widma CID MS/MS dla izomerycznych związków: 7-O-glukozyloglukozydu genisteiny (**5**) (a), O,C-diglukozydu genisteiny (**6**) (b), 6,8-C-diglukozydu genisteiny (**2**) (c), 4',7-O-diglukozydu apigeniny (**13**) (d), 7-O-glukozyloglukozydu apigeniny (**67**) (e), O-ksylozyloglukozydu chryzoeriolu (**98**) (f), zarejestrowane na analizatorze Qq-ToF w trybie jonów dodatnich. Zastosowano następujące parametry energii kolizji: +15-30 eV dla MS² i +25 eV dla MS³, ISCID +80 eV. Numery związków (wyłuszczone drukami) zgodne z Tab.4.4.

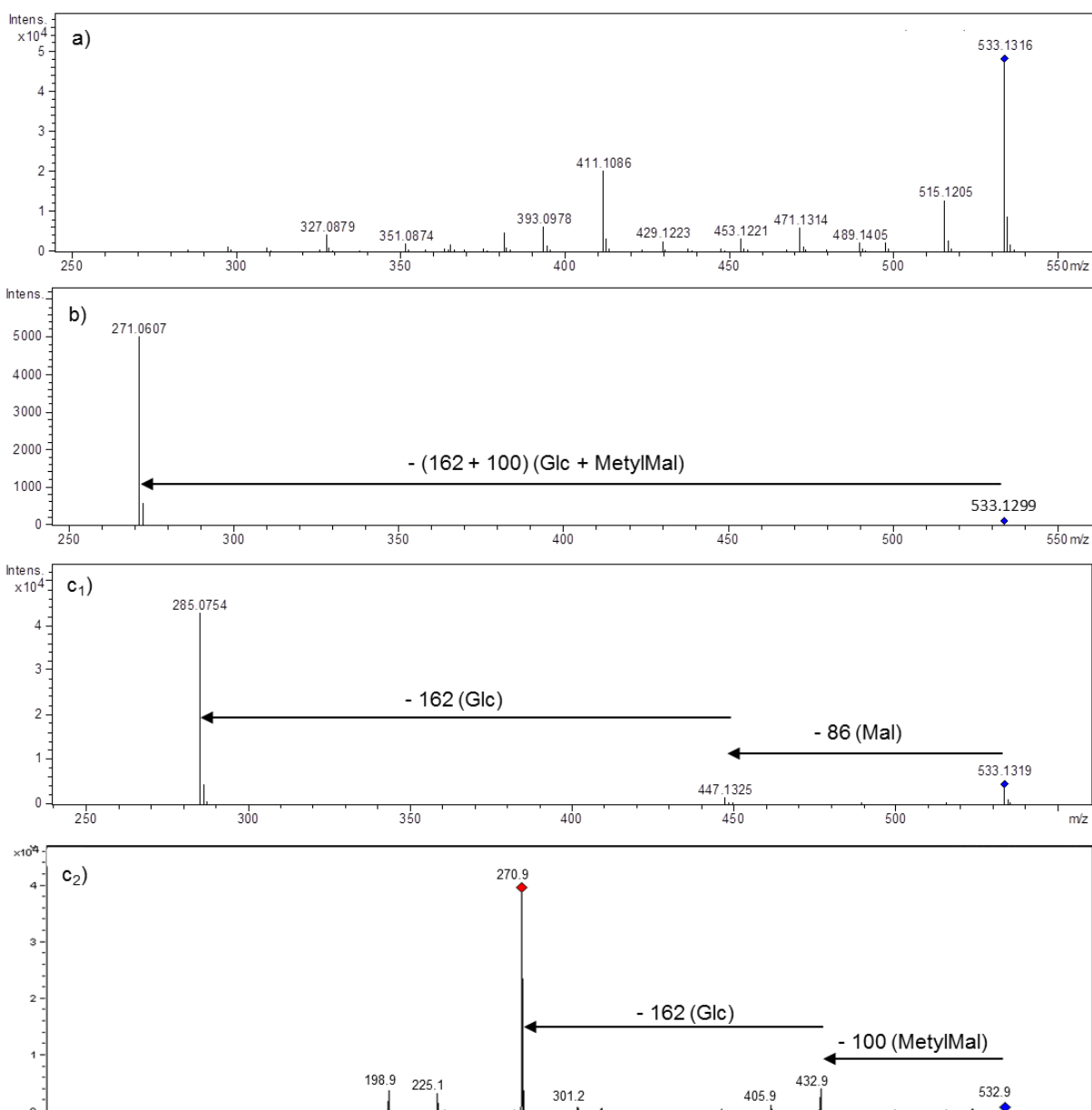
W przeciwieństwie do stosunkowo łatwej możliwości określenia typu glikozylacji C lub O, znacznie trudniejsze wydaje się wskazanie miejsca podstawienia cząsteczki cukrowej na aglikonie. Podstawniki glikozydowe najczęściej połączone są z rdzeniem aglikonu poprzez grupę hydroksylową w pozycji 4' lub 7, bądź bezpośrednio z atomem węgla w pozycji C-6 lub C-8 (Waridel i in., 2001; Kachlicki i in., 2005; García-López i in., 2006). Jednakże, rozróżnienie izomerów położeniowych *O*-glikozydów na podstawie widm MS/MS bez odniesienia do standardów było niemożliwe. Z drugiej strony, na podstawie względnych intensywności jonów fragmentacyjnych E_1^+ i E_2^+ (Waridel i in., 2001), możliwe było w niektórych przypadkach rozróżnienie izomerów C-6 i C-8. W oparciu o porównanie intensywności względnych jonów E_1^+ i E_2^+ , obecnych w widmie zarejestrowanym w trybie jonów dodatnich (dla *C*-glukozydu chryzoeriolu) oraz ich braku w widmie zarejestrowanym dla jonów ujemnych, zaproponowano podstawienie glukozy w pozycji C-8 (Ryc. 4.18).



Ryc.4.18 widma CID MS/MS dla 8-*C*-glukozydu chryzoeriolu (nr **61** w Tab.4.4) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich (a) i ujemnych (b) na analizatorze QqToF.

Jednakże w przypadku *C*-glukozydów genisteiny, na podstawie względnych stosunków jonów E_i , nie dało się rozróżnić izomerów C-6 i C-8, ze względu na brak różnic w widmach fragmentacyjnych (García-López i in., 2006). Identyfikację przeprowadzono na podstawie czasów retencji (Kachlicki i in., 2005).

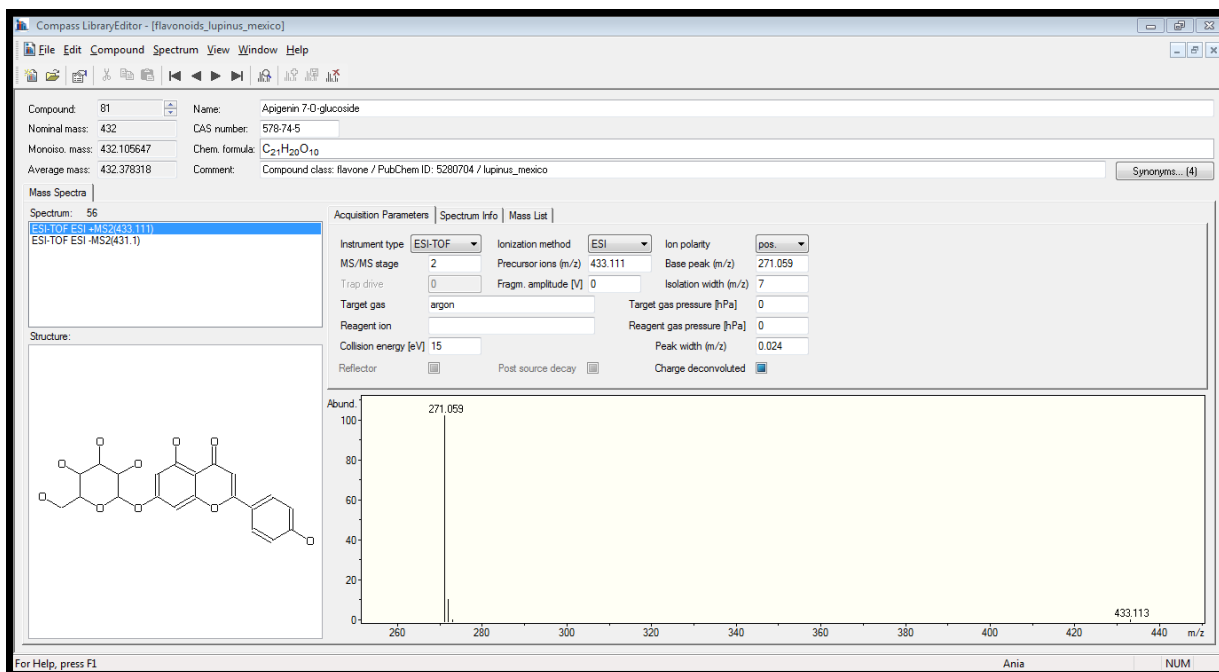
Glikozylowane flawonoidy i izoflawonoidy były również pojedynczo i podwójnie acylowane kwasem malonowym bądź jego metylowym estrem. Było to przyczyną wystąpienia wielu związków w postaci izomerów i izobarów (Ryc. 4.19)



Ryc.4.19 widma MS/MS izomerycznych i izobarycznych związków; malonylowany 8-C-glukozyd acetyny (**123**) (a), malonylowany O-glukozyd acetyny (**159**) (b), O-glukozyd apigeniny acylowany estrem metylowym kwasu malonowego (**146**) (c₁), zarejestrowane przy pomocy analizatora Qq-ToF oraz O-glukozyd apigeniny acylowany estrem metylowym kwasu malonowego (**146**) (c₂) zarejestrowany na IT. Numery związków (wytłuszczonym drukiem) zgodnie z Tab.4.4.

4.2.1.3 Utworzenie biblioteki widm masowych

Zarejestrowane przy pomocy układu LC/ESI-Qq-ToF widma zidentyfikowanych związków, zostały wprowadzone do nowo utworzonej biblioteki widm masowych programu DataAnalysis (Ryc. 4.20).



Ryc.4.20 Interfejs biblioteki widm masowych utworzonej w programie DataAnalysis.

Wybrane widma zidentyfikowanych związków obecnych w ekstraktach łubinów zostały umieszczone w międzynarodowej bazie danych MassBank, <http://www.massbank.jp>. Numery identyfikacyjne (ID) związków wprowadzonych do bazy MassBank wraz z odnośnikami do Tab.4.4 zostały przedstawione w Tab.S2.

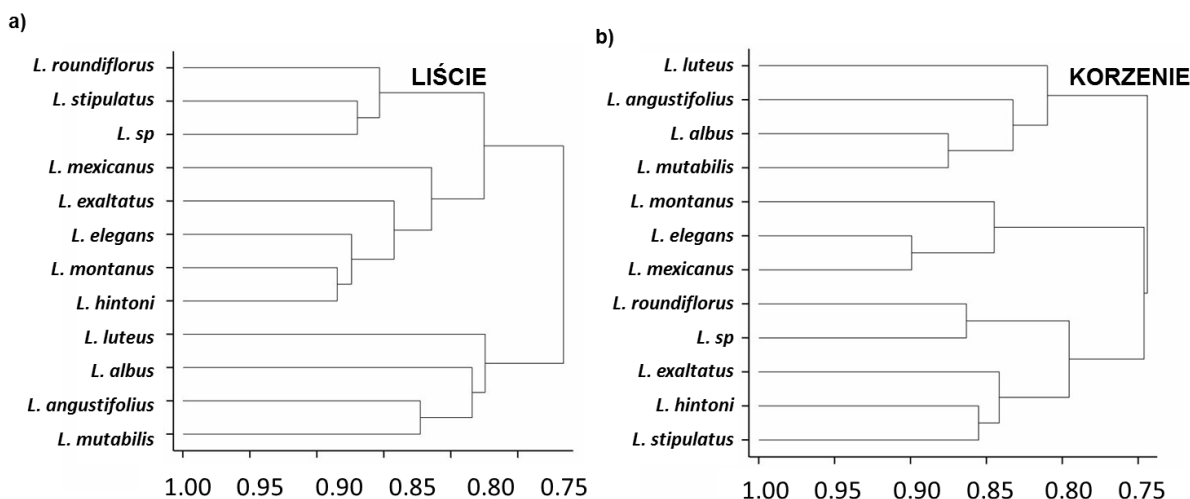
4.2.2 Profilowanie flawonoidów obecnych w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinu

Niespełna 200 fenolowych metabolitów wtórnych zostało zidentyfikowanych w ekstraktach liści i korzeni 8 gatunków łubinów meksykańskich, 3 europejskich i jednego południowoamerykańskiego zamieszkanego na obszarze Europy (Tab.4.4). Analizy przeprowadzono niezależnie na dwóch systemach LC/MS, z analizatorem typu Qq-ToF oraz IT. Obecność flawonoidów i izoflawonoidów w poszczególnych próbkach, została określona w oparciu o widma masowe zarejestrowane w trybie MS, dokładne wartości m/z protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ oraz czasy retencji zidentyfikowanych związków.

Mono-, di- i tri-glikozydy przyłączone do aglikonu w pozycji 3', 4' lub 7 poprzez grupę hydroksylową lub bezpośrednio poprzez węgiel C-6 lub C-8, obserwowano w ekstraktach różnych gatunków łąbinów. Podjednostki cukrowe stanowiły glukoza, ksyloza lub ramnoza, dla których obserwowano oderwanie neutralnych fragmentów o masach wynoszących odpowiednio 162, 132 i 146 Da. Ksyloza występowała w połączeniu z glukozą oraz w niektórych przypadkach, z podstawionym kwasem malonowym. Obserwowano ksylozyloglukozydy chryzoeriolu, genisteiny oraz apigeniny, przy czym pierwszy z nich występował jedynie w liściach łąbinu wąskolistnego (*L.angustifolius*). Ramnoza była obecna głównie w liściach łąbinu żółtego w formie rutynozydu izoflawonów (genisteina, 2'-hydroksygenisteina), flawonów (apigenina, chryzoeriol) i flawonoli (kwercetyna, izoramnetyna). Wiele glikozylowanych flawonoidów i izoflawonoidów acylowanych było pojedynczo lub podwójnie kwasem malonowym lub jego metylowym estrem.

4.2.3 Analiza chemotaksonomiczna

Profile związków fenolowych obecnych w tkankach łąbinów meksykańskich zostały porównane z profilami uzyskanymi dla łąbinów europejskich. Chemotaksonomiczna analiza została przeprowadzona na podstawie jakościowych i ilościowych zawartości scharakteryzowanych związków, obecnych w korzeniach i liściach łąbinów (Ryc.4.22, Tab.S3). Analiza pozwoliła na wyróżnienie dwóch grup roślin. Pierwszą wyodrębnioną grupę stanowiły gatunki łąbinów z Meksyku, drugą łąbinę basenu Morza Śródziemnego. Zaobserwowano istotne różnice w sposobie glikozylacji i acylacji różnych aglikonów pomiędzy ekstraktami z liści i korzeni. Dużą liczbę zidentyfikowanych metabolitów stanowiły związki różnicujące gatunki łąbinu. Obecność pochodnych zawierających ksylozę odnotowano głównie dla liści *L.angustifolius*, podczas gdy ramnozydy dominowały przede wszystkim w liściach *L.luteus*. Obecność metylowego estru kwasu malonowego jedynie w ekstraktach łąbinów meksykańskich była czynnikiem wysoce różnicującym dwie grupy roślin. Różnice wynikały również z obecności innych aglikonów flawonoidów i izoflawonoidów. Glikozylowane pochodne acacetyny i luteoliny występowały prawie wyłącznie w gatunkach meksykańskich, podczas gdy pochodne cukrowe izoramnetyny i eriodiktiolu obecne były głównie odpowiednio w liściach i korzeniach łąbinu białego. Pochodne naringeniny zidentyfikowano głównie w tkankach *L.mutabilis*.



Ryc.4.21 Analiza hierarchiczna meksykańskich i śródziemnomorskich gatunków łubinów na podstawie profili związków fenolowych dla liści (a) i korzeni (b). Oznaczenia fenolowych metabolitów wykonano na systemie Qq-ToF.

4.3 Zastosowanie techniki LC/MS/MS do profilowania glikozylowanych flawonoidów w korzeniach siewek, korzeniach włośnikowatych i zawieszinowych hodowlach komórek korzeniowych modelowej rośliny motylkowej *Medicago truncatula*

Identyfikacja i profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych w korzeniach siewek, korzeniach włośnikowatych i kulturach komórkowych *M.truncatula* oraz pożywkach pochodzących zostały przeprowadzone w oparciu o analizy LC/MS/MS. Skuteczny rozdział metabolitów wtórnych uzyskano na wysokosprawnym chromatografie cieczowym RR HPLC (Agilent), dzięki zastosowaniu kolumny o uziarnieniu poniżej 2 μm . Identyfikację przeprowadzono w oparciu o analizy widm fragmentacyjnych CID MS/MS zarejestrowanych w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Identyfikacja aglikonów możliwa była dzięki porównaniu widm MS/MS i pseudo-MS³ z widmami standardów oraz danymi literaturowymi. Profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych przeprowadzono na podstawie dokładnych mas protonowanych cząsteczek $[\text{M}+\text{H}]^+$ oraz czasów retencji zidentyfikowanych związków. Dokładność rejestrowanych wartości m/z (błąd poniżej 5 ppm-ów) zapewniał wysokorozdzielczy analizator - Qq-ToF.

Na podstawie analizy widm MS² i pseudo-MS³ zaproponowano 53 struktury fenolowych metabolitów (Tab.4.6). Z uwagi na brak części standardów aglikonów oraz niejednoznaczne informacje, wynikające z analizy widm CID/MS/MS, niektóre struktury flawonoidów zostały zaproponowane orientacyjnie na podstawie danych literaturowych (Broeckling i in., 2005; Kowalska i in., 2007; Farag i in., 2007, 2008, 2009; Jasiński i in., 2009; Marczak i in., 2010).

Tab.4.6 Flawonoidy i ich glikozylowane pochodne zidentyfikowane w korzeniach siewek, korzeniach włośnikowatych i kulturach komórkowych *M.truncatula* (według Staszków i in., 2011).

Nr	Nazwa związku i wzór sumaryczny ¹	R _t (min)	obliczona wartość m/z [M+H] ⁺	Jon macierzysty i jony potomne [m/z] na podstawie widm CID MS/MS ²	Obecność		
					KS	KW	HK
1	daidzeina GlcAGlcA (I) - C ₂₇ H ₂₆ O ₁₆ ^a	3.3	607.1294	607.1288 → 431.0904 → 255.0640	+	-	-
2	daidzeina GlcAGlcA (II) - C ₂₇ H ₂₆ O ₁₆ ^a	3.5	607.1294	607.1297 → 431.0904 → 255.0638	+	-	-
3	luteolina GlcAGlcA (I) - C ₂₇ H ₂₆ O ₁₈ ^a	3.8	639.1192	639.1183 → 463.0895 → 287.0559	+	-	-
4	4',7-O-dihydroksyflawon GlcA - C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀ ^b	4.0	431.0973	431.0967 → 255.0642	+	-	-
5	genisteina GlcAGlcA - C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇ ^a	4.4	623.1243	623.1208 → 447.0925 → 271.0592	+	-	-
6	luteolina GlcAGlcA (II) - C ₂₇ H ₂₆ O ₁₈ ^a	4.5	639.1192	639.1179 → 463.0892 → 287.0553	+	-	-
7	genisteina GlcAGlcA (II) - C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇ ^a	4.7	623.1243	623.1208 → 447.0925 → 271.0592	+	-	-
8	luteolina Glc (I) - C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ ^a	4.8	449.1078	449.1084 → 287.0538	+	+	-
9	luteolina GlcA - C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂ ^a	4.9	463.0871	463.0890 → 287.0540	+	-	-
10	daidzeina FerGlcAGlcA (I) - C ₃₇ H ₃₄ O ₁₉ ^a	5.0	783.1767	783.1749 → 431.0931 → 255.0645 → 353.0859	+	-	-
11	daidzeina CouGlcAGlcA (I) - C ₃₆ H ₃₂ O ₁₈ ^b	5.0	753.1661	753.1663 → lack of product ions in MS ⁿ spectra	+	+	-
12	luteolina Glc - C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ ^a	5.1	449.1078	449.1621 → 287.0557	+	+	+
13	daidzeina MalGlc - C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂ ^b	5.2	503.1104	503.1109 → 255.0638	+	-	-
14	daidzeina FerGlcAGlcA (II) - C ₃₇ H ₃₄ O ₁₉ ^b	5.3	783.1767	783.1760 → 431.0937 → 255.0641 → 353.0865	+	-	-
15	daidzeina CouGlcAGlcA (II) - C ₃₆ H ₃₂ O ₁₈ ^b	5.4	753.1661	753.1663 → 431.0931 → 255.0653 → 323.0752	+	-	-
16	2`-hydroksyformonetyna MalGlc (I) - C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃ ^b	5.4	533.1290	533.1291 → 285.0769	+	-	-
17	daidzeina GlcA - C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀ ^b	5.5	431.0973	431.0981 → 255.0649	-	-	+
18	genisteina GlcA - C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ ^a	5.6	447.0922	447.0931 → 271.0587	+	-	-

19	daidzeina FerGlcAGlcA (III) - C ₃₇ H ₃₄ O ₁₉ ^b	5.7	783.1767	783.1777 → 431.0921 → 255.0643 → 353.0855	+	-	-
20	2`-hydroksyformononetyna Mal Glc (II) - C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃ ^b	5.7	533.1290	533.1287 → 285.0764	+	+	-
21	genisteina FerGlcAGlcA (I) - C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀ ^a	5.7	799.1716	799.1712 → 447.0926 → 271.0601 → 353.0876	+	-	-
22	daidzeina CouGlcAGlcA (III) - C ₃₆ H ₃₂ O ₁₈ ^b	5.8	753.1661	753.1656 → 431.0927 → 255.0646 → 323.00752	+	-	-
23	chryzoeriol GlcA - C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂ ^a	5.8	477.1028	477.1019 → 301.0718	+	-	-
24	genisteina CouGlcAGlcA (I) - C ₃₆ H ₃₂ O ₁₉ ^a	5.8	769.1611	769.1589 → 447.0922 → 271.0598 → 323.0769	+	-	-
25	bioczanina A MalGlcGlc - C ₃₁ H ₃₄ O ₁₈ ^b	5.8	695.1818	695.1829 → 533.1246 → 447.0915 → 285.0771	-	+	-
26	daidzeina FerGlcAGlcA (IV) - C ₃₇ H ₃₄ O ₁₉ ^b	5.9	783.1767	783.1777 → 431.0921 → 255.0641 → 353.0855	+	-	-
27	genisteina FerGlcAGlcA (II) - C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀ ^a	6.1	799.1716	799.1714 → 447.0928 → 271.0601 → 353.0876	+	-	-
28	genisteina MalGlc (I) - C ₂₅ H ₂₂ O ₁₃ ^b	6.1	519.1133	519.1179 → 271.0605	-	+	+
29	genisteina CouGlcAGlcA (II) - C ₃₆ H ₃₂ O ₁₉ ^b	6.3	769.1611	769.1589 → 447.0928 → 271.0593 → 323.0769	-	+	-
30	genisteina FerGlcAGlcA (III) - C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀ ^a	6.3	799.1716	799.1722 → 447.0920 → 271.0607 → 353.0876	+	-	-
31	formononetyna Glc - C ₂₂ H ₂₂ O ₉ ^a	6.3	431.1337	431.1353 → 269.0798	+	-	-
32	bioczanina A MalGlc (I) - C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃ ^a	6.5	533.1290	533.1291 → 285.0762	+	+	-
33	genisteina FerGlcAGlcA (IV) - C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀ ^a	6.4	799.1716	799.1697 → 447.0929 → 271.0601 → 353.0873	+	+	+
34	aformozyna Glc- C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀ ^a	6.5	461.1442	461.1418 → 299.0905	+	-	-
35	iryzolidon MalGlc - C ₂₆ H ₂₆ O ₁₄ ^b	6.6	563.1395	563.1398 → 315.0852	+	+	+
36	genisteina CouGlcAGlcA (III) - C ₃₆ H ₃₂ O ₁₉ ^a	6.7	769.1611	769.1589 → 447.0922 → 271.0598 → 323.0769	+	+	+
37	bioczanina A MalGlc (II) - C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃ ^b	6.8	533.1290	533.1296 → 285.0761	+	-	-
38	genisteina FerGlcAGlcA (V) - C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀ ^a	6.8	799.1716	799.1697 → 447.0929 → 271.0601 → 353.0873	+	+	+
39	formononetyna MalGlc (I) - C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ ^a	7.1	517.1341	517.1332 → 269.0804	+	-	-
40	formononetyna MalGlc (II) - C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ ^a	7.3	517.1341	517.1352 → 269.0805	+	+	+

41	afromozyna MalGlc (I) - C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃ ^a	7.4	547.1446	547.1444 → 299.0907	-	+	-
42	afromozyna MalGlc (II) - C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃ ^a	7.7	547.1446	547.1444 → 299.0907	+	+	+
43	medikarpina MalGlc - C ₂₅ H ₂₆ O ₁₂ ^b	8.1	519.1497	519.1484 → 271.0964	+	+	+
	Wolne aglikony^x						
44	daidzeina - C ₁₅ H ₁₀ O ₄ ^{a, c}	6.6	255.0652	255.0649	-	+	+
45	genisteina - C ₁₅ H ₁₀ O ₅ ^{a, c}	8.4	271.0601	271.0596	-	+	+
46	bioczanina A - C ₁₆ H ₁₂ O ₅ ^{a, c}	8.9	285.0757	285.0762	-	+	+
47	naringenina - C ₁₅ H ₁₂ O ₅ ^{a, c}	8.9	273.0757	273.0753	-	+	+
48	likwirytygenina - C ₁₅ H ₁₂ O ₄ ^b	9.7	257.0808	257.0818	-	+	+
49	iryzolidon or dimetoksyluteolina - C ₁₇ H ₁₂ O ₆ ^b	9.7	315.0863	315.0684	-	+	+
50	formononetyna - C ₁₆ H ₁₂ O ₄ ^{a, c}	11.0	269.0808	269.0806	-	+	+
51	chryzoeriol - C ₁₆ H ₁₂ O ₆ ^{a, c}	11.3	301.0707	301.0717	-	+	+
52	afromozyna - C ₁₇ H ₁₂ O ₅ ^a	12.0	299.0914	299.0902	-	+	+
53	medikarpina - C ₁₆ H ₁₄ O ₄ ^b	12.3	271.0965	271.0956	-	-	+

1 – pozycje podstawienia aglikonu grupą cukrową oraz pozycje podstawienia grupy acylowej na cukrze nie zostały określone na podstawie analiz LC/MS; użyte skróty dla grup cukrowych i acylowych: GlcA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, Mal – kwas malonowy, Fer – kwas ferulowy, Cou – kwas kumarowy;

2 – dokładna wartość m/z jonu macierzystego ([M+H]⁺) oraz jonów potomnych (m.in. jonów Y₁⁺ i Y₀⁺);

a – identyfikacja aglikonu na podstawie porównania widma pseudo-MS³ z widmem standardu;

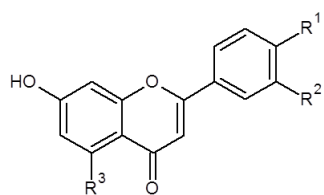
b – identyfikacja aglikonu na podstawie składu elementarnego jonu [M+H]⁺ oraz danych literaturowych;

c – identyfikacja zaiązku na podstawie porównania z czasem retencji standardu;

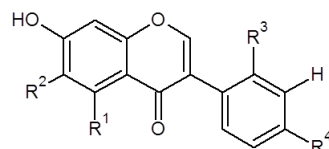
x – wolne aglikony zidentyfikowane w ekstraktach tkankowych oraz żywnościach pochodzących;

Oznaczenia: KS-korzenie siewek, KW-korzenie włośnikowate, HK-hodowle komórkowe.

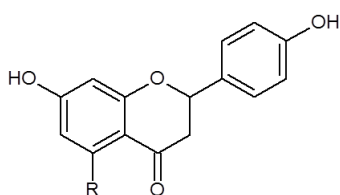
W badanych ekstraktach *M.truncatula* zidentyfikowano aglikony należące do 4 klas związków flawonoidowych: flawony (luteolina, chryzoeriol, 5,3'-dimetoksyluteolina, 7,4'-dihydroksyflawon), flawanony (naringenina, likwirytygenina), izoflawony (2'-hydroksyformononetyna, afrormozyna, bioczanina A, daidzeina, formononetyna, genisteina, iryzolidon) i pterokarpan (medikarpina) (Ryc.4.22). Wiele spośród nich występowało w formie wolnych aglikonów w ekstraktach z korzeni włośnikowatych i kulturach komórkowych oraz pożywkach pochodowlanych. Wolnych aglikonów nie obserwowano w ekstraktach z korzeni siewek. Najwyższe poziomy wolnych aglikonów odnotowano dla pożywek pochodowlanych *M.truncatula*. Daidzeina, formononetyna, genisteina, bioczanina A, afrormozyna, luteolina oraz iryzolidon występowały w formie glikozylowanej. Luteolina, genisteina i daidzeina obecne były ponadto w postaci diglukuronidów. Eksperymenty pseudo-MS³ nie zawsze jednak pozwalały na rozróżnienie pozycyjnych izomerów glikozylowanych aglikonów (luteoliny od 2'-hydroksyformononetyny, daidzeiny od 7,4'-dihydroksyflawonu). Tylko w niektórych przypadkach eksperymenty ISCID umożliwiły jednoznaczne określenie struktury glikozylowanego aglikonu (Ryc.4.23). Powodem tego typu trudności było stosunkowo niskie stężenie badanych związków w ekstraktach, co przekładało się na niższą intensywność jonów powstających w eksperymentach CID.



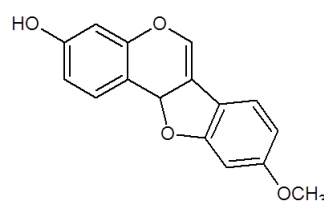
FLAWON	R1	R2	R3
7,4'-Dihydroksyflawon	H	H	H
5,3'-Dimetoksyluteolina	OCH ₃	H	OCH ₃
Chryzoeriol	H	OCH ₃	OH
Luteolina	OH	H	OH



IZOFLAWON	R1	R2	R3	R4
2'-Hydroksyformononetyna	H	H	OH	OCH ₃
Afromozyna	H	OCH ₃	H	OCH ₃
Bioczanina A	OH	H	H	CH ₃
Daidzeina	H	H	H	H
Formononetyna	H	H	H	OCH ₃
Genisteina	OH	H	H	H
Iryzolidon	OH	OCH ₃	H	OCH ₃



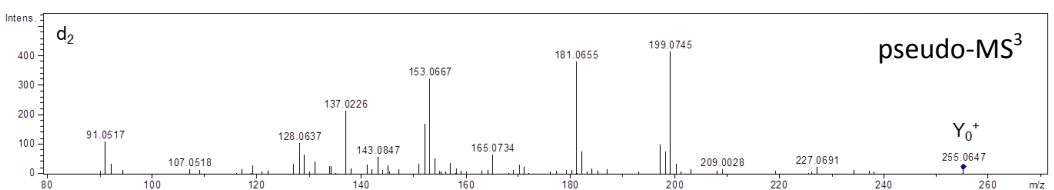
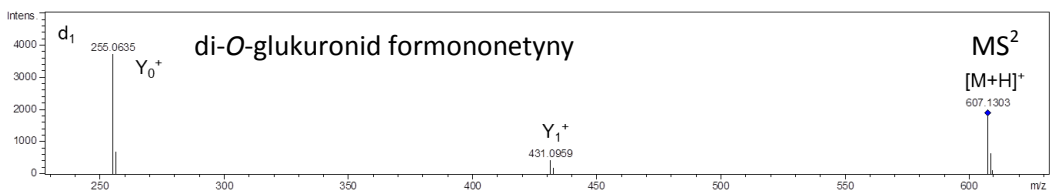
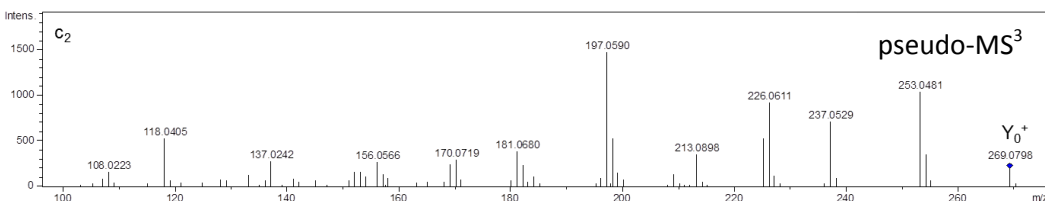
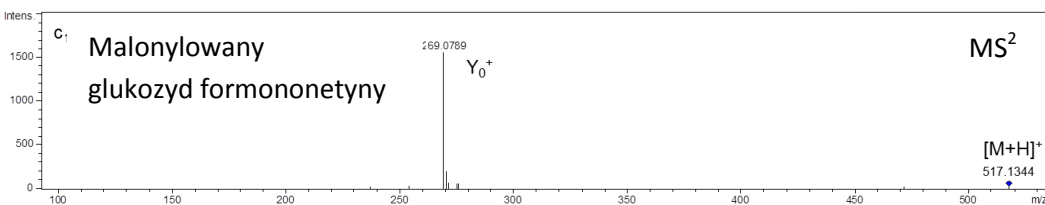
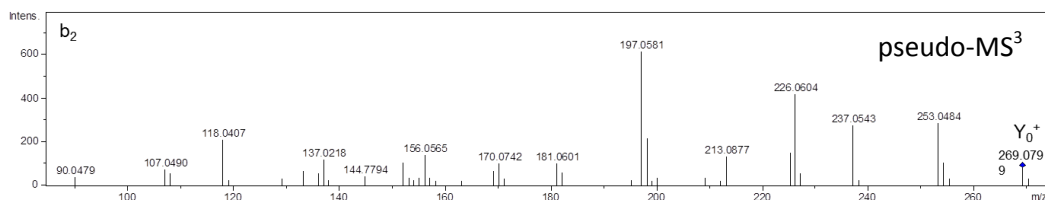
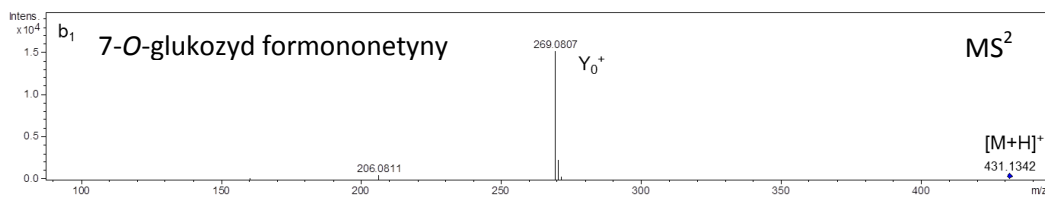
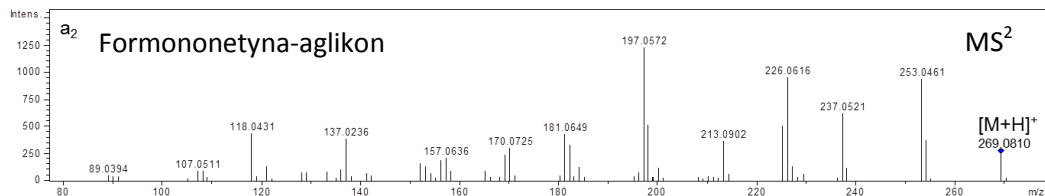
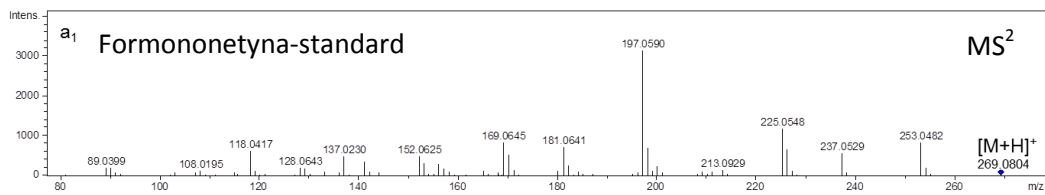
FLAWANON	R
Likwirytygenina	H
Naringenina	OH



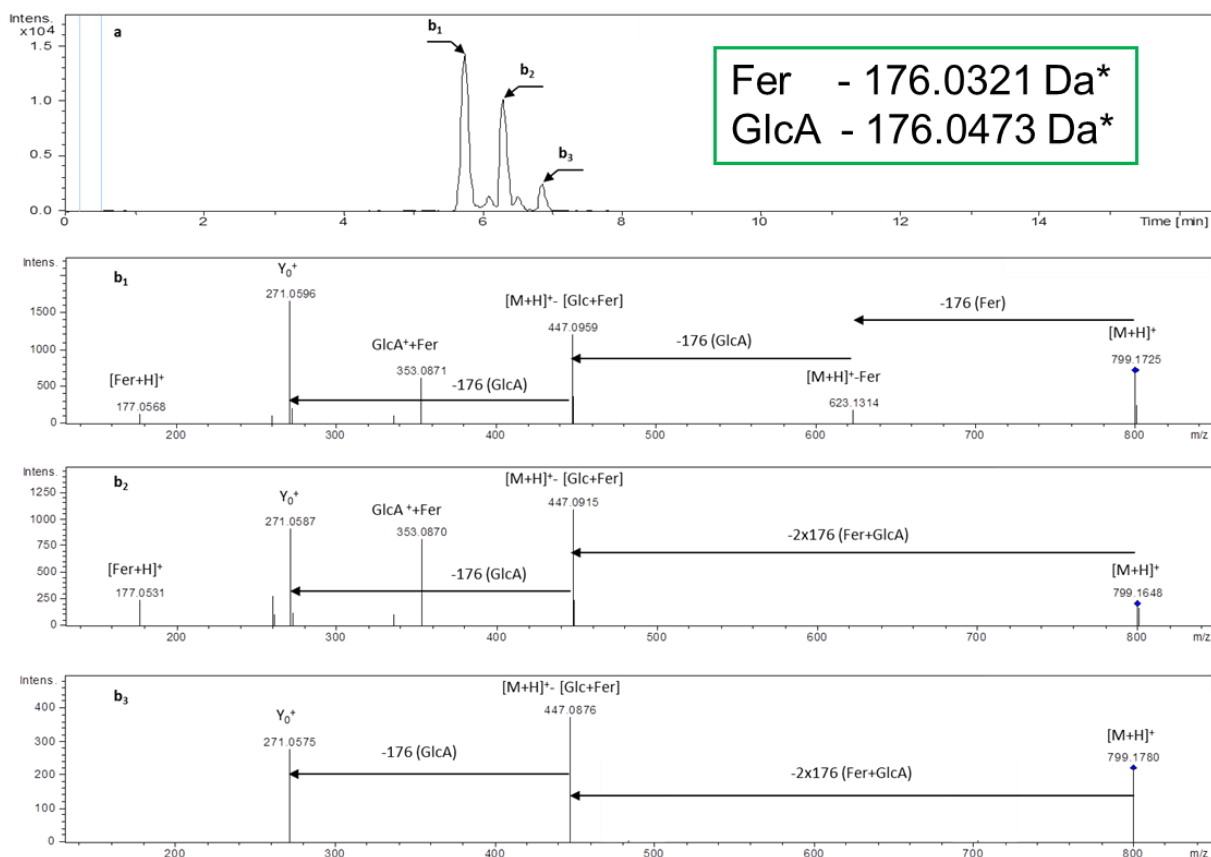
PTEROKARPAN - Medikarpina

Ryc.4.22 Struktury aglikonów związków fenolowych obecne w ekstraktach z *M.truncatula*.

→ **Ryc.4.23** Widma masowe wybranych związków zidentyfikowanych w ekstraktach *M.truncatula*: widmo CID MS/MS standardu formononetyny (a_1) w porównaniu z widmem wolnego aglikonu formononetyny (**50**) obecnego w pożywce pochodzącej z kultur korzeni włośnikowatych (a_2); widmo MS² 7-O-glukozydu formononetyny – [M+H]⁺ przy m/z 431 (**31**) zidentyfikowanego w ekstrakcie z korzeni siewek *M.truncatula* (b_1) oraz widmo pseudo-MS3 jonu Y₀⁺ przy m/z 269 – aglikon formononetyny (b_2); widmo MS² malonylowanego 7-O-glukozydu formononetyny – [M+H]⁺ przy m/z 517 (**40**) zidentyfikowanego w ekstrakcie z korzeni włośnikowatych *M.truncatula* (c_1) oraz widmo pseudo-MS3 jonu Y₀⁺ przy m/z 269 – aglikon formononetyny (c_2); widmo MS² di-O-glukoronid daidzeiny - [M+H]⁺ przy m/z 607 (**1**) zidentyfikowanego w ekstrakcie z korzeni siewek *M.truncatula* (d_1) oraz widmo pseudo-MS3 jonu Y₀⁺ przy m/z 255 – aglikon daidzeiny (d_2). Numery związków (wyświetlonym drukiem) zgodnie z Tab.4.6 (według Staszaków i in., 2011).

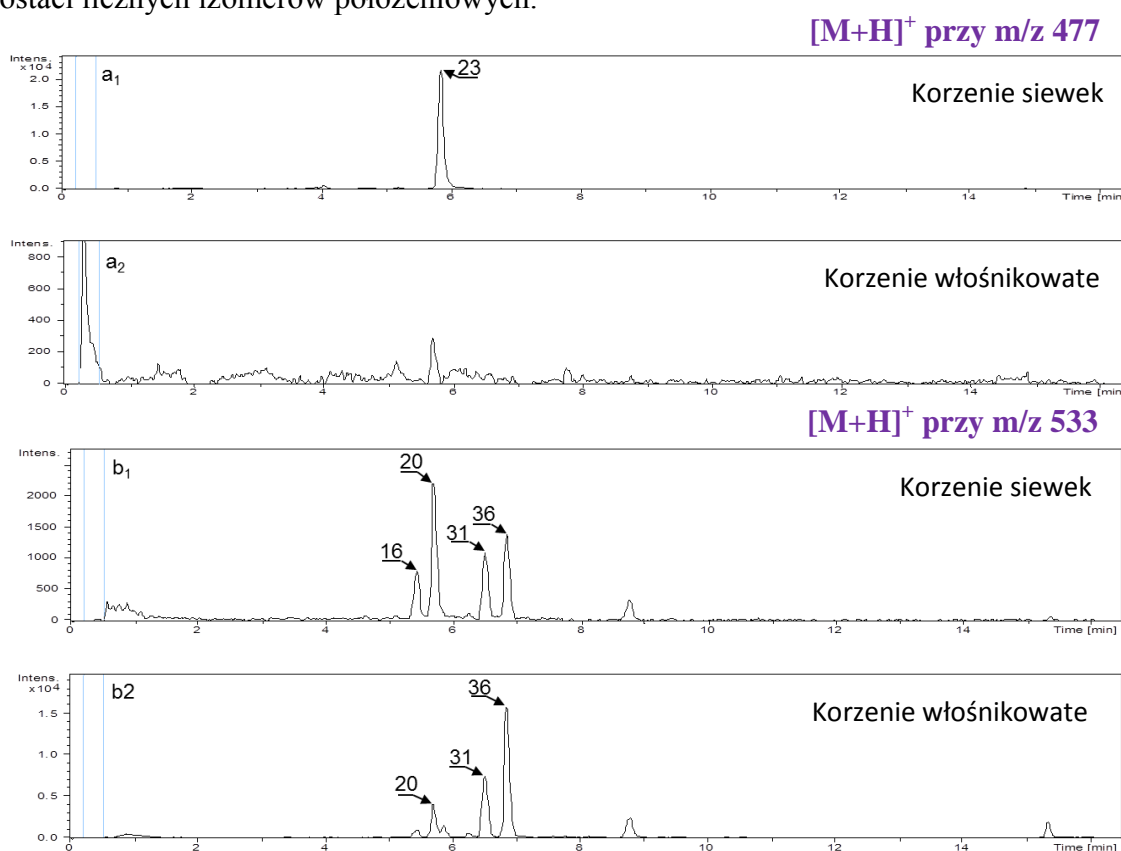


Wiele spośród zidentyfikowanych metabolitów stanowiło związki izomeryczne, co wynikało z obecności podstawników cukrowych w postaci mono- lub di-glukozy/kwasu glukuronowego, oraz podstawników acylowych: kwasu malonowego, ferulowego i kumarowego. Dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczego analizatora podczas prowadzonych eksperymentów CID, możliwe było rozróżnienie podstawników posiadających tę samą masę nominalną obojętnego fragmentu, 176.0321 i 176.0473 Da odpowiednio dla kwasu ferulowego i kwasu glukuronowego. Ponadto w przypadku obecności w cząsteczce kwasu ferulowego, w widmie MS/MS obserwowano obecność charakterystycznego jonu $[\text{Fer}+\text{H}]^+$ przy m/z 177. W badanych ekstraktach zaobserwowano obecność pięciu izomerów diglukuronidu genisteiny acylovanego kwasem ferulowym (Ryc.4.24), jednak na podstawie widm MS/MS nie było możliwe wskazanie miejsca przyłączenia podstawników cukrowych i acylowych do szkieletu aglikonu. Przy użyciu systemu LC/QqToF-MS rozdzielono i zidentyfikowano cztery izomery diglukuronidu daidzeiny acylovanego kwasem ferulowym. Pochodne glukuronowe obecne były jedynie w ekstraktach z korzeni siewek *M.truncatula*. Nie obserwowano ich w korzeniach włośnikowatych oraz kulturach komórkowych (Ryc.S9). Glukuronowe pochodne genisteiny, luteoliny oraz daidzeiny nie były dotąd raportowane w ekstraktach korzeniowych z *M.truncatula* (Schliemann i in. 2008; Farag i in. 2007, 2008, 2009).



← **Ryc.4.24** Chromatogramy pojedynczych jonów protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ przy m/z 799 odpowiadających izomerom diglukuronidu genisteiny acylovanego kwasem ferulowym (**21**, **27**, **30**, **33**, **38**) obecnych w ekstraktach z korzeni *M.truncatula* (a) oraz widma CID MS/MS dla trzech z nich o nr **21** (b₁), **30** (b₂) i **38** (b₃). Numery związków (wytluszczonym drukiem) zgodne z Tab. 4.6. *-dokładna masa obojętnego fragmentu, GlcA- kwas glukuronowy, Fer- kwas ferulowy (według Staszaków i in., 2011).

Zaobserwowano różnice ilościowe jak i jakościowe w profilach flawonoidów obecnych w ekstraktach z korzeni siewek, korzeni włośnikowatych oraz kultur komórkowych *M.truncatula* (Fig.4.25). Wolnych aglikonów nie obserwowano w korzeniach siewek. Najbardziej różnicującymi związkami były mono- i diglukuronidy genisteiny, luteoliny oraz daidzeiny a także ich pochodne acylowane kwasem ferulowym. Związki te występowały w postaci licznych izomerów położeniowych.

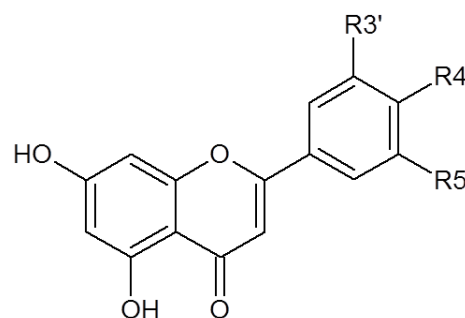


Ryc.4.25 Chromatogramy pojedynczych jonów protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ przy m/z 477 dla 7-*O*-glukuronidu chryzoeriolu (**23**) obecnego w korzeniach siewek (a₁) i korzeniach włośnikowatych (a₂) *M.truncatula*; oraz przy m/z 533 dla izomerów malonylowanego 7-*O*-glukozydu 2'-hydroksyformononetyny (**16**, **20**) i malonylowanego 7-*O*-glukozydu bioczaniny A (**32**, **37**) obecnych w korzeniach siewek (b₁) i korzeniach włośnikowatych (b₂) *M.truncatula*. Numery związków (wytluszczonym drukiem) zgodne z Tab. 4.6 (według Staszaków i in., 2011).

4.4 Wykorzystanie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID) do analizy strukturalnej i profilowania flawonoidów obecnych w liściach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*)

W ekstraktach z liści siewek pszenicy zwyczajnej zidentyfikowano 42 pochodne flawonów, na podstawie widm CID MS/MS oraz pseudo-MS³, zarejestrowanych na analizatorze Qq-ToF. Ponad połowa z nich (24 związki) nie była wcześniej raportowana w literaturze, w kontekście ich obecności w tkankach zbóż (Tab.4.7). Struktury większości ze zidentyfikowanych związków zostały zaproponowane w oparciu o analizę widm fragmentacyjnych oraz porównanie z danymi literaturowymi. Dzięki analizie widm MS/MS dla aglikonów i pseudo-MS³ dla glikozylowanych pochodnych, oraz ich odniesieniu do widm standardów, jednoznacznie zidentyfikowano 5 aglikonów flawonowych: apigeninę, chryzoeriol, luteolinę, trycynę, trycetynę oraz eter trimetylowy trycetyny (Ryc.4.26). Trzy z nich zawierały grupy metoksyłowe przyłączone do grupy hydroksylowej pierścienia B szkieletu aglikonu.

Aglikon	R3'	R4'	R5'
Apigenina	H	OH	H
Chryzoeriol	OCH ₃	OH	H
Luteolina	OH	OH	H
Trycetyna	OH	OH	OH
Eter trimetylowy trycetyny	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
Trycyna	OCH ₃	OH	OCH ₃



Ryc.4.26 Struktury falwonów zidentyfikowane w liściach pszenicy zwyczajnej *T.aestivum*.

Jednoznaczne określenie struktury aglikonu, występującego w połączeniu z cząsteczkami cukrowymi, możliwe było na podstawie eksperymentów pseudo-MS³ przeprowadzonych dla jonów Y₀^{+/-}. Uzyskane widma fragmentacyjne porównywano z widmami standardów (Ryc.4.27). W przypadku mono- i di-*O*-glikozydów potwierdzenie struktury aglikonu nie było kwestią problematyczną, w przeciwieństwie do *C*-glikozydów, gdzie nie obserwowano jonu Y₀^{+/-}.

Tab.4.7 Flawony i ich glikozylowane pochodne zidentyfikowane w ekstraktach z liści pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*).

Nr	Nazwa związku	R _t [min]	Mcz	Skład elementarny	[M+H] ⁺ m/z obliczona	błąd [ppm]	jony macierzyste i pochodne [M+H] ⁺ [m/z]	jony macierzyste i pochodne [M+H] ⁺ [m/z]	poziom identyfikacji metabolitów ^f
1.	<i>O,C</i> ,-triheksozyd luteoliny(I) ^{a,x} ,	0.9	772	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	773.2135	- 0.1	773.2136/ 611,593,575, 545, 491, 449	771.1971/ 609, 519, 489	3
2.	<i>O,C,C</i> - triheksozyd luteoliny (II) ^{a,x,z}	1.2	772	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	773.2135	- 0.5	773.2139/ 611,593,491,431, 381, 209	771.1974/ 609,383	3
3.	<i>C</i> -heksozylo- <i>O</i> -heksozyd luteoliny ^{b,y}	1.2	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1607	0.0	611.1607/ 593,575,545,515,491, 461,431,413,395,383, 353, 329, 299	609.1492/ 447,429,357,327	3
4.	<i>C</i> -heksozylo- <i>O</i> -heksozyd <i>O</i> -deoksyheksozyd luteoliny ^{a,x,y}	1.3	756	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	757.2186	0.4	757.2183/ 611,593,491,449,431, 413,383,353,329	nr	3
5.	<i>O</i> -heksozyd <i>C</i> -heksozyd luteoliny (I) ^{a,b,y}	1.5	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1607	1.1	611.1600/ 449,431,413,395,383, 353,329,299,287	609.1471/ 447,429,411,393,387, 369,357,327,297	2
6.	6- <i>C</i> -heksozyd trycetyny ^b	1.5	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1028	-0.4	465.1030/ 447,429,411,399,393, 381,369,345,315	463.0871/ 385,373,355, 343,301, 193,165,149	2
7.	<i>C</i> -heksozyd <i>C</i> -pentozyd luteoliny ^{a,c,y}	1.7	580	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	581.1501	-0.5	581.1504/ 563,545,527,515,509, 497,485,473,463,461,455,449,443, 437,425,413,407,395,365,353,341, 323,311	579.1334/561,543,519,501, 489, 471,459,441,429,411, 399, 369, 339, 327	3
8.	<i>O</i> -heksozyd <i>C</i> -heksozyd luteoliny (II) ^{a,b,y}	1.8	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1607	0.5	611.1604/ 449,431,395, 383,377,365,353,329,299	609.1492/ 591,531,489,429, 411,393,369,357,351,327	3
9.	<i>C</i> -heksyzylo- <i>O</i> -deoksyheksozyd luteoliny ^{a,y}	1.9	594	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1657	1.0	595.1651/ 449,431,413, 395, 383, 353,329,299	593.1508/ 473,431	2
10.	<i>C</i> -heksozyd <i>C</i> -pentozyd apigeniny ^{b,y}	2.0	564	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.1552	0.7	565.1548/ 547, 529, 511	563,1408/545,503,485,473,455, 443,425,413,383,353	2

11.	<i>C</i> -heksozyd <i>O</i> -heksozyd chryzoeriolu ^{a,y}	2.0	624	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.1763	1.9	625.1751/ 607,589,559, 529, 505, 463,445,427,409,397, 367,343,313	623.1619/ 503,461,371, 341	2
12.	6- <i>C</i> -glukozyd luteoliny ^{b,c,y}	2.1	448	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1078	-0.4	449.1080/431,413,395,377,365, 353,329,299	447.0933/429,399,369,357, 339, 327,311,297	2
13.	<i>C</i> -[<i>O</i> -kafeloilo-heksozylo)- <i>O</i> -heksozyd] luteoliny ^{a,x,y}	2.2	772	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₉	773.1924	-0.1	773.1925/ 611,449,431,413, 395, 383,365,353,329,163	771.1757/ 651,609,429, 401	2
14.	<i>C</i> -deoksyheksozylo- <i>O</i> -heksozyd luteoliny ^{a,x,y}	2.2	594	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1657	2.9	595.1640/ 577,559,541,511,499, 487,475,457,433,415,397,367,355, 337,313	593.1504/ 575,503,485,473, 443, 413,383,357	2
15.	<i>O</i> -heksozyd <i>C</i> -heksozyd chryzoeriolu ^{a,c,y}	2.5	624	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.1763	0.5	625.1760/463,445,427,409, 397, 367,343,313	623.1621/443,383,341, 323	2
16.	6- <i>C</i> -glukozyd apigeniny ^{c,y}	2.5	432	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1129	0.7	433.1126/ 415,397,379,349, 337, 313,283	nr	2
17.	7- <i>O</i> -[<i>O</i> -feruloilo-deoksyheksozylo)- <i>O</i> -heksozyd] trycyny ^{e,x,y}	2.6	814	C ₃₉ H ₄₂ O ₁₉	815.2393	2.5	815.2373/ 669,493,331,177	813.2090/ 483,329	2
18.	<i>O</i> -[<i>O</i> -kafeloilo-pentozyd]- <i>C</i> -heksozyd luteoliny ^{a,x,y}	2.7	742	C ₃₅ H ₃₄ O ₁₈	743.1818	0.5	743.1814/ 581,449,431,395, 383, 353,329,295,163	741.1669/ 579,429	2
19.	<i>O</i> -deoksyheksozylo- <i>C</i> -heksozyd chryzoeriolu ^{a,x,z}	2.7	608	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	609.1814	0.0	609.1814/ 463,445,427, 409, 397, 391,379,367,353,343, 313	607.1657/ 487,461,443, 428, 407,383,371,365,353,341, 323	2
20.	<i>C</i> -[<i>O</i> -kafeloilo-heksozylo)- <i>O</i> -heksozyd] chryzoeriolu ^{a,x,y}	2.8	786	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₉	787.2080	-0.5	787.2084/ 625,463,445,427, 409, 397,367,343,163	785.1932/ 665,609,429	2
21.	6- <i>C</i> -glukozyd chryzoeriolu ^{c,x}	2.8	462	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.1235	-0.2	463.1236/ 445,427,409,397,391, 379,367,353,343,313	461.1660/ 383,371,353,341, 311, 298	2
22.	7- <i>O</i> -glukuronylo- <i>O</i> -heksozyd trycyny ^{a,x,y}	2.8	668	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	669.1661	-0.7	669.1666/ 493,331	667.1504/ 329	2

23.	<i>O</i> -(<i>O</i> -kafeloilo-heksozyd) <i>C</i> -heksozyd luteoliny ^{a,x,y}	2.9	772	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₉	773.1924	0.0	773.1924/ 449,431,413, 395, 383, 353,329,163	771.1773/609,357,327, 299	2
24.	7- <i>O</i> -heksozylo- <i>O</i> -heksozyd trycyny ^{c,e,x,y}	2.9	654	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₇	655.1869	-0.9	655.1875/ 493,331	653.1700/ 329	2
25.	<i>C</i> -[pentozylo- <i>O</i> -(feruloilo- <i>O</i> -heksozyd)] luteoliny ^{a,x,y}	3.1	756	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₈	757.1974	0.8	757.1968/ 449,431,413, 383, 353, 329,309,177	755.1804/ 635,593,579,447, 429, 411,369,357	2
26.	7- <i>O</i> -pentozyd <i>O</i> -diheksozyd trycyny ^x	3.1	800	C ₃₅ H ₄₄ O ₂₁	801.2448	-1.7	801.2462/ 655,493,331	nr	2
27.	<i>O</i> -deoksyheksozylo- <i>O</i> -heksozyd chryzoeriolu ^e	3.2	608	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	609.1814	0.3	609.1812/ 463,301	607.1657/ 299	2
28.	7- <i>O</i> -deoksyheksozylo- <i>O</i> -heksozyd trycyny ^{e,x}	3.3	638	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	639.1920	-0.3	639.1922/ 493,331	nr	2
29.	<i>O</i> -heksozyd <i>C</i> -(<i>O</i> -feruloilo-heksozyd) chryzoeriolu ^{a,x}	3.3	800	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₉	801.2448	-1.0	801.2456/ 639,463,445,427, 177	799.2204/ 623,443	2
30.	7- <i>O</i> -heksozyd trycyny ^{b,e,x,y}	3.5	492	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	493.1341	0.0	493.1341/ 331	nr	2
31.	<i>O</i> -heksozyd chryzoeriolu ^e	3.6	462	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.1235	1.5	463.1228/ 301	461.1060/ 299	2
32.	7- <i>O</i> -heksozylo-heksozyd eteru trimetylowego trycetyny ^{e,x}	4.2	668	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₇	669.2025	0.9	669.2031/ 507, 345	nr	2
33.	malonylowany7- <i>O</i> -heksozyd trycyny ^{e,x}	4.3	578	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₅	579.1344	-1.0	579.1350/ 493,331	nr	2
34.	7- <i>O</i> -deoksyheksozylo-heksozyd eteru trimetylowego trycetyny ^{e,x,y}	4.7	652	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₆	653.2076	0.2	653.2075/ 507, 345	nr	2
35.	luteolina ^{d,x,y}	4.7	286	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.1550	1.7	287.0545/ 269,241,213,179,161, 153,135,117,107,89	285.0383/ 201,175,151,133, 121, 107	1
36.	7- <i>O</i> -glukozyd eteru trimetylowego trycetyny ^{d,e,x}	5.0	506	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₂	507.1497	0.6	507.1494/ 345	nr	2

37.	apigenina ^d	5.6	270	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.0601	1.1	271.0598/ 243,229,197, 163, 153, 145,131,119,91	269.0467/ 227,183,159,151, 117, 107	1
38.	malonylowany 7- <i>O</i> -heksozyd eteru trimetylowego trycetyny ^{e,x}	5.7	592	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₅	593.1501	-0.2	593.1502/ 345	nr	2
39.	trycyna ^{d,x,y}	5.8	330	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	331.0812	0.6	331.0810/ 315,301,287, 270,258,242,153	329.0629/314,299,285, 271,227,203,185,161	1
40.	chryzoeriol ^d	5.9	300	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.0707	0.3	301.0706/286,258,229, 212,201,184,153	nr	1
41.	eter trimetylowy trycetyny ^d	10.2	344	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	345.0969	0.3	345.0968/ 329,315,284, 255	343.0817/ 327,313,309, 285,270	1

a – pozycja podstawienia grupy cukrowej na szkielecie aglikonu (C-6 lub C-8) nie została określona;

b – związek raportowany w literaturze (Cummins i in., 2006);

c – związek raportowany w literaturze (Ioset i in., 2007);

d – związek raportowany w literaturze (Dinelli i in., 2011);

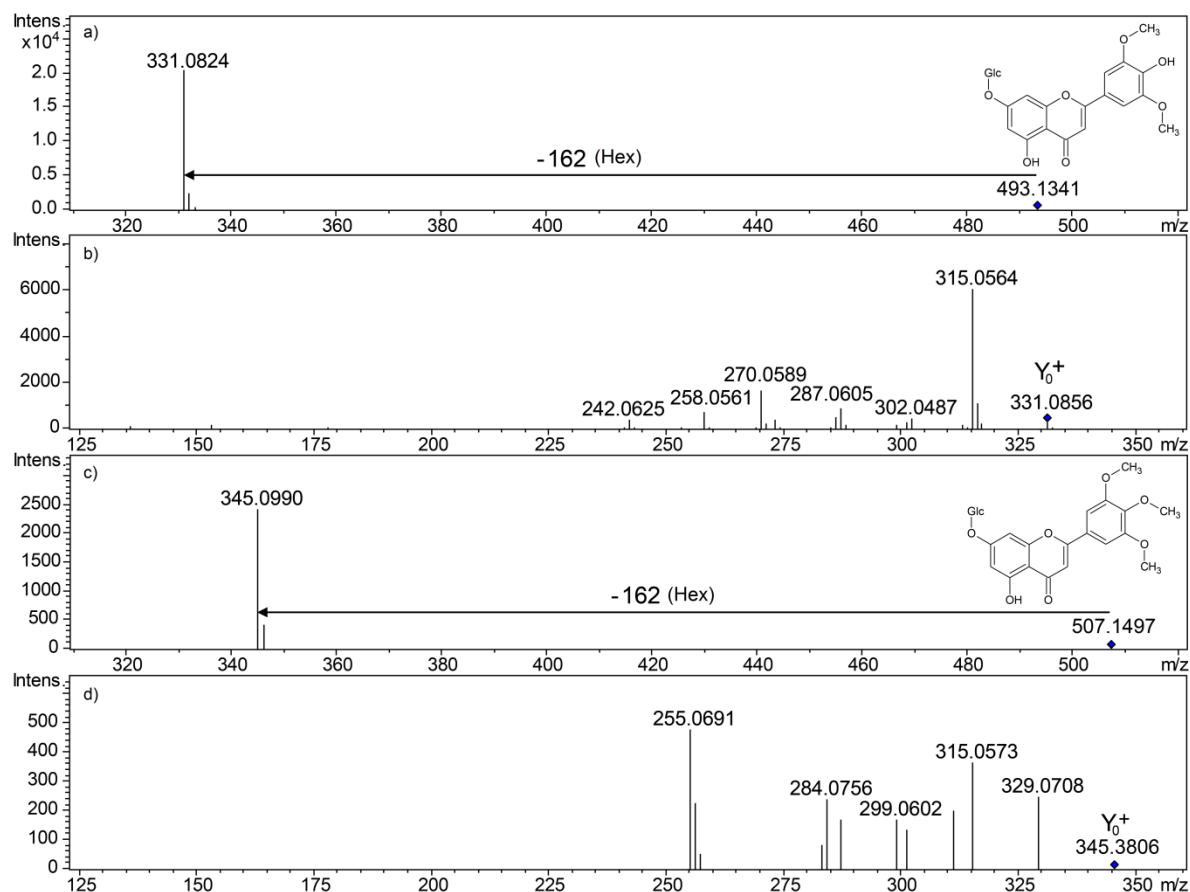
e – miejsce podstawienia cząsteczki cukrowej zaproponowane przy uwzględnieniu zawady przestrzennej na pierścieniu B aglikonu;

f – poziom identyfikacji metabolitów zgodnie z wytycznymi MSI (Sumner i in., 2007);

nr – widmo nie zostało zarejestrowane;

x – związek dotąd nieraportowany w *Triticum aestivum*;

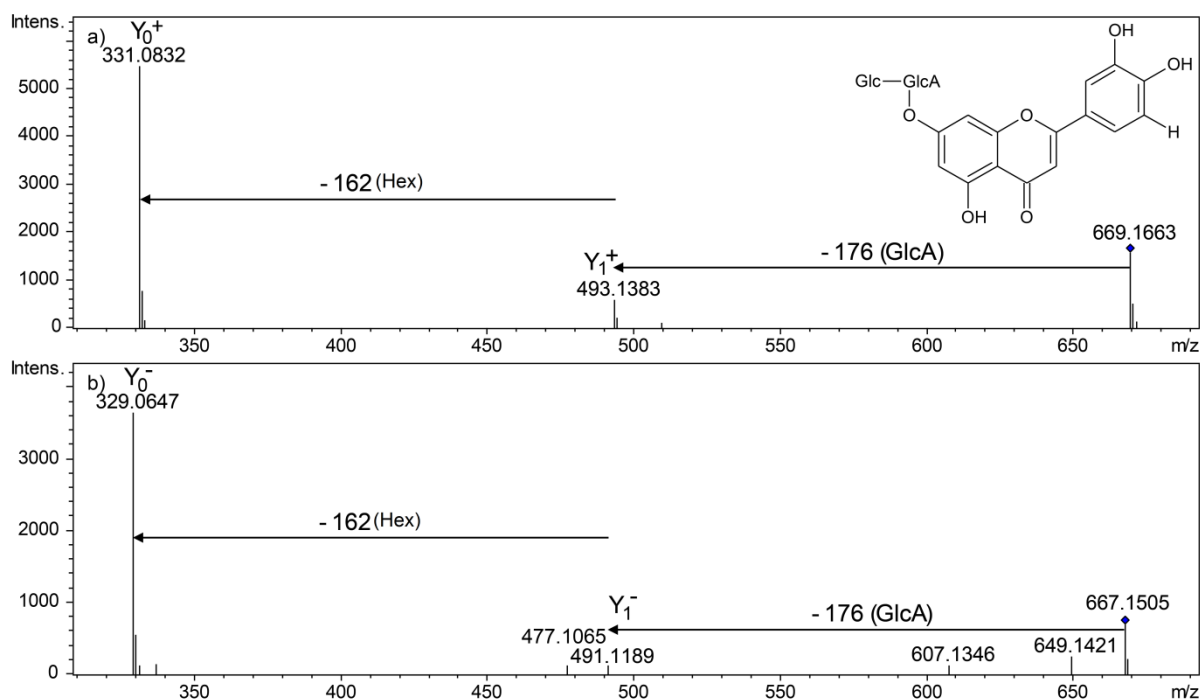
y – związek obserwowany również z wykorzystaniem systemu TriVersa NanoMate.



Ryc.4.27 Widma masowe 7-*O*-heksozydu trycyny (**30**) (Mcz=492) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich: MS² (a) oraz pseudo-MS³ dla jonu aglikonu (Y₀⁺) (b), a także widma 7-*O*-heksozydu eteru metylowego trycetyny (**36**) (Mcz=506) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich: MS² (c) oraz pseudo-MS³ dla jonu aglikonu (Y₀⁺) (d). Oznaczenie Hex-heksoza. Numery związków (wyłuszczone drukiem) zgodne z Tab.4.7.

Spośród badanych związków, obecnych w ekstraktach liści *T.aestivum*, zidentyfikowano mono-, di- i tri-glikozydy (Tab.4.7). Wiele z nich stanowiło związki izomeryczne oraz izobaryczne. W skład pochodnych cukrowych wchodziły heksozy, deoksyheksozy i pentozy. W przypadku pszenicy nie było możliwe jednoznaczne wskazanie np. heksozy jako glukozy czy pentozy jako ksylozy, gdyż w literaturze raportowane były, obecne w tkankach zbóż, zarówno glukoza jak i galaktoza, ksyloza i arabinoza. Poza heksozami, deoksyheksozami i pentozami, obecnymi w zidentyfikowanych połączeniach flawonowych w ekstraktach z liści pszenicy, innym podstawnikiem cukrowym był kwas glukuronowy. Na podstawie widm fragmentacyjnych rejestrowanych w trybie jonów dodatnich i ujemnych określono strukturę 7-*O*-glukuronyloheksozydu trycyny (Ryc.4.28). W wyniku pęknięcia wiązania *O*-glikozydowego powstały jony typu Y₁ and Y₀ przy m/z 493 i 331 (jonizacja dodatnia) oraz 491 i 329 (jonizacja ujemna). Wzór podstawienia grup

hydroksylowych i metoksyowych cząsteczki aglikonu wskazuje na prawdopodobieństwo glikozylacji w pozycji C-7 (poprzez grupę OH).

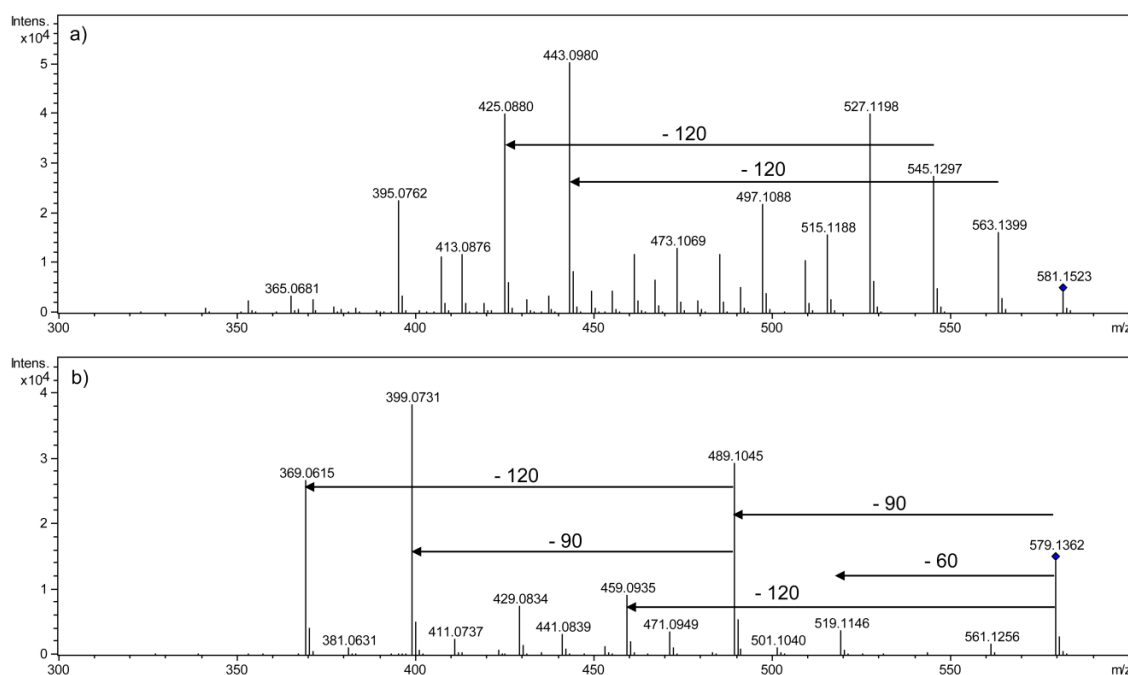


Ryc.4.28 Widma CID MS/MS 7-*O*-glukuronylo-*O*-heksozydu trycyny (Mcz=668) (nr 22 w Tab.4.7) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich (a) i ujemnych (b) na analizatorze Qq-ToF. Oznaczenia: Hex-heksoza, GlcA-kwas glukuronowy.

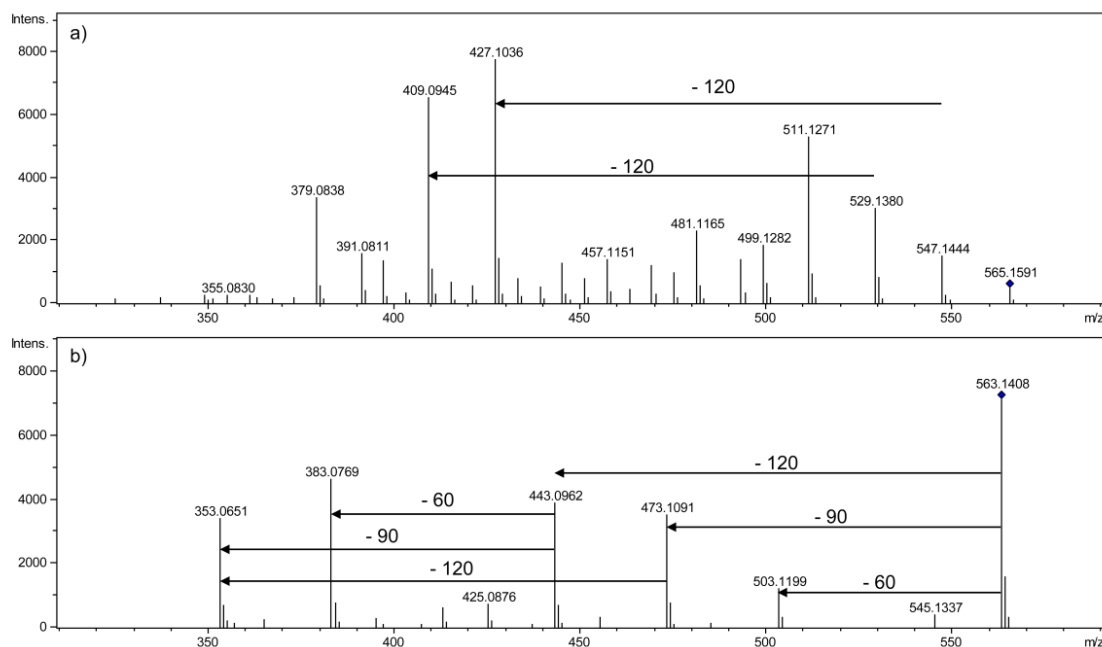
Cząsteczki cukrowe podstawione były na szkielecie aglikonu w formie *C*, *O* oraz *C/O*-glikozydów. Jednakże, na podstawie analizy widm MS/MS w większości przypadków niemożliwe było jednoznaczne określenie dokładnego miejsca podstawienia cukrów na aglikonie. W przypadku *O*-glikozydów trycyny (nr 17, 22, 24, 26, 28, 30, 33 w Tab.4.7) i eteru metylowego trycetyny (nr 32, 34, 36, 38 w Tab.4.7) zaproponowano pozycję glikozylacji przy atomie węgla C-7, w oparciu o tworzoną zawadę przestrzenną i w związku z tym brak możliwości podstawienia grupy cukrowej na pierścieniu B (Ryc.4.26). W przypadku *C*-monoglikozydów określono pozycję przyłączenia grup cukrowych jako C-6 (nr 6,12,16,21 w Tab.4.7) na podstawie zaproponowanej przez Wridela i współpracowników (2001) metody analizy widm (w oparciu o stosunki intensywności jonów fragmentacyjnych X_i^+ oraz $E_i^{+/-}$).

W przypadku *C*-diglikozydów przy dużej złożoności widm fragmentacyjnych rejestrowanych zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych, jednoznaczne określenie pozycji podstawienia grup cukrowych było niemożliwe. Dla związków nr 7 i 10, na podstawie składów elementarnych określono podstawienie luteoliny i apigeniny (odpowiednio) heksozą i pentozą. W oparciu o analizę widm fragmentacyjnych, obecność jonów E_i oraz odejście

obojętnych cząsteczek o masach 60, 90 i 120 Da, nie można było stwierdzić czy cząsteczki cukrowe przyłączone są do szkieletu aglikonu w pozycji C-6 lub/i C-8 (Ryc.4.29 i 4.30).

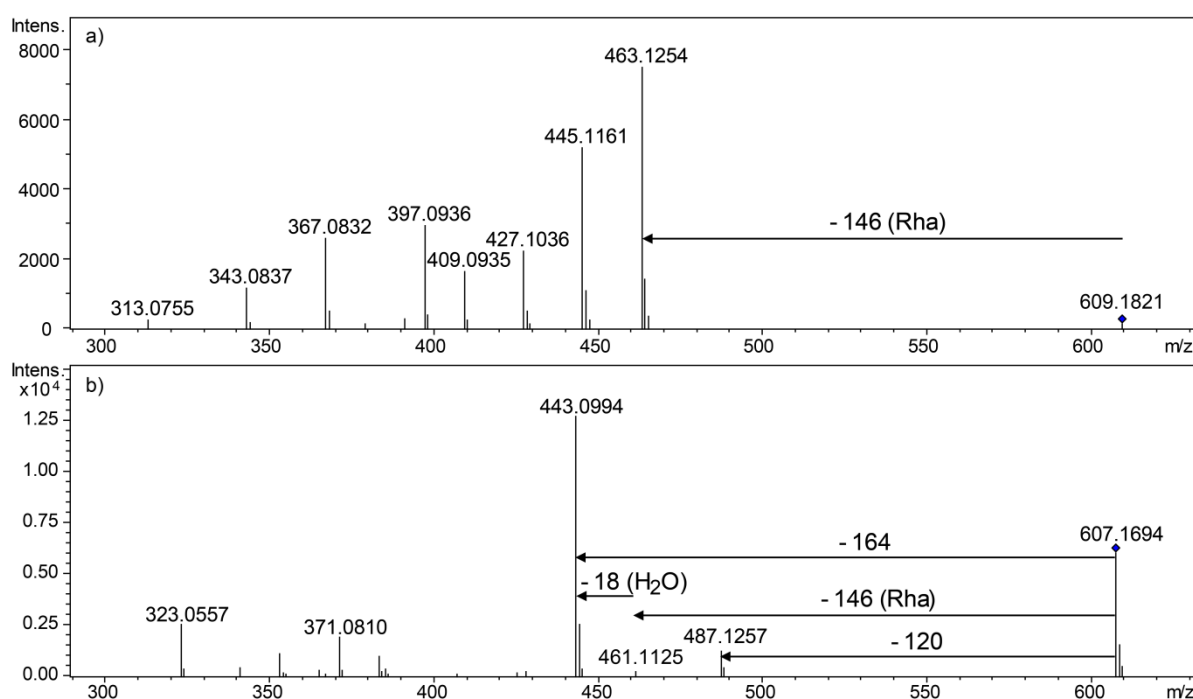


Ryc.4.29 Widma CID MS/MS C-heksozydu C-pentozydu luteoliny (**7**) (M.cz.=580) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich (a) i ujemnych (b) na analizatorze Qq-ToF.



Ryc.4.30 Widma CID MS/MS C-heksozyd C-pentozydu apigeniny (**10**) (M.cz.=564) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich (a) i ujemnych (b) na analizatorze Qq-ToF.

W analizowanych ekstraktach obecne były również *C,O*-diglikozydy. Jako przykład może posłużyć diglikozyd chryzoeriolu (nr **19** w Tab.4.7). Na podstawie wartości *m/z* jonów fragmentacyjnych, określono podstawienie aglikonu heksozą i deoksyheksozą (prawdopodobnie glukozą i ramnozą). Względne intensywności jonów $E_i^{+/-}$ sugerują przyłączenie heksozy w pozycji C-8 do szkieletu aglikonu (Waridel i in., 2001). Z drugiej strony obecność, na widmie zarejestrowanym w trybie jonów dodatnich, głównego jonu typu Z_1 przy *m/z* 443 przy stosunkowo niskim jonie ($[M-H]^- - 146$) sugeruje przyłączenie cząsteczki deoksyheksozy do szkieletu aglikonu poprzez grupę hydroksylową przy węglu C-7 (Ryc.4.31) (Ferrerres i in., 2004).

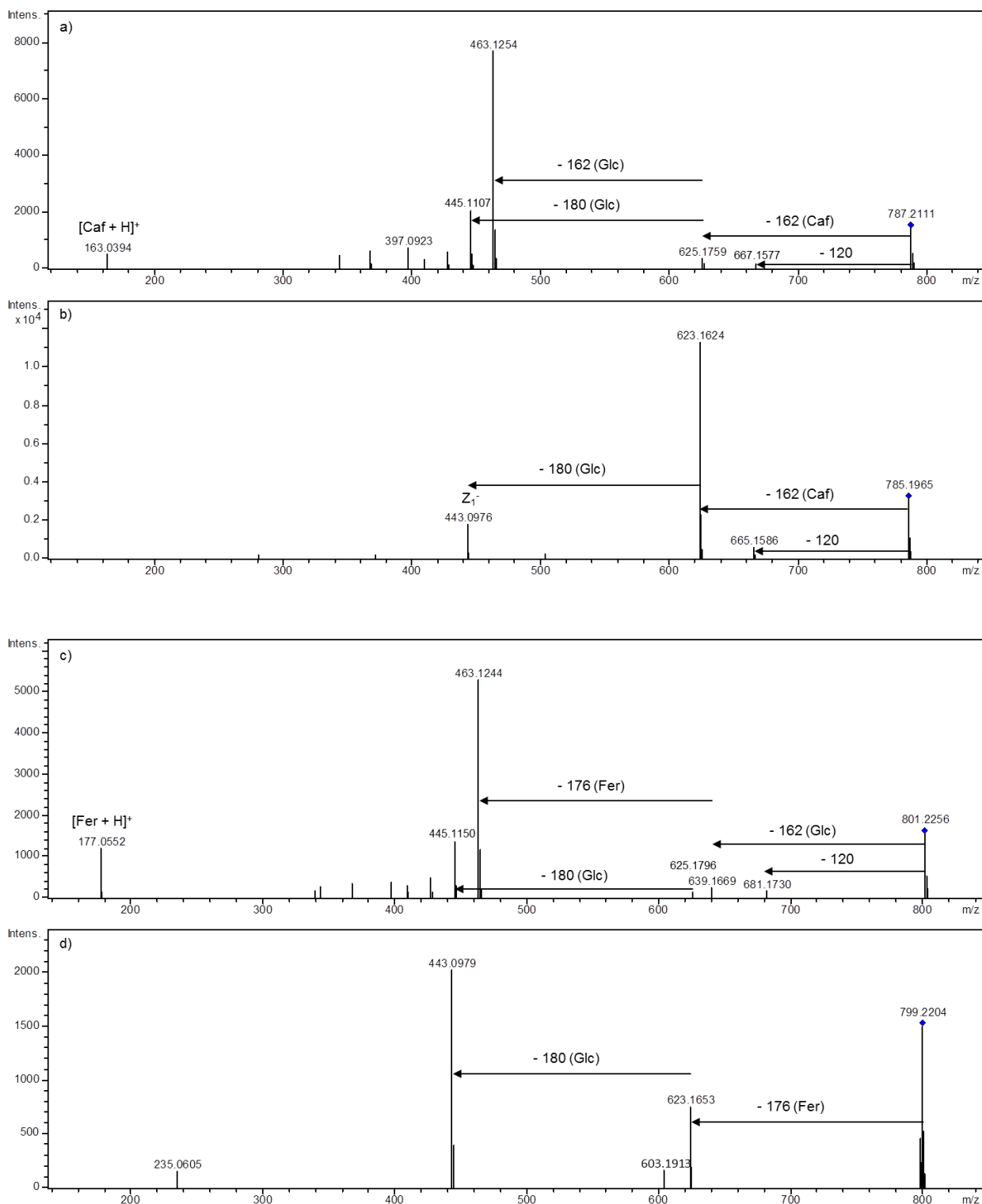


Ryc.4.31 Widma CID MS/MS *O*-deoksyheksozylo-*C*-heksozydu chryzoeriolu (**19**) (Mcz=608) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich (a) i ujemnych (b) na analizatorze Qq-ToF. Oznaczenie Rha-deoksyheksoza.

Ciekawym przykładem izomerów są związki o nr **3, 5, 8** (Ryc.S10) odpowiadające diglikozydom luteoliny. Widma zarejestrowane w jonach dodatnich (Ryc.S10a) oraz ujemnych (Ryc.S10b) pozwoliły uzyskać komplementarne informacje, które jednak były niewystarczające dla pełnej charakterystyki strukturalnej badanych związków. Z widm fragmentacyjnych zarejestrowanych w trybie jonów dodatnich wynika, że w przypadku każdego z izomerów, przynajmniej jedna heksoza jest połączona z aglikonem poprzez wiązanie C-C. Takie same wnioski można wysnuć z analizy widm dla jonów ujemnych. Dodatkowo jon zarejestrowany w trybie ujemnym przy *m/z* 447 oznacza pęknięcie wiązania

O-glikozydowego. Dla każdego izomeru intensywności jonu Y_1^- są różne. Ponadto obserwowane są jony typu Z_1 przy $m/z = 429$ (odejście obojętnego fragmentu 180 Da). Można przypuszczać, że związki nr **5** i **8** stanowią *O*-heksozylo-*C*-heksozyd luteoliny. W trybie jonów dodatnich dla związku nr **3** obserwujemy intensywny jon przy m/z 593 powstały w wyniku odejścia wody od protonowanej cząsteczki $[M+H]^+$ oraz niewielki jon fragmentacyjny przy m/z 449, którego obecność może wskazywać pęknięcie wiązania *O*-glikozydowego pomiędzy dwiema cząsteczkami glukozy. Na tej podstawie zaproponowano dla izomeru nr **3** strukturę *C*-heksozylo-*O*-heksozydu luteoliny.

Cukrowe pochodne aglikonów acylowane były aromatycznymi kwasami: ferulowym bądź kumarowym. Jedynie w dwóch przypadkach zaobserwowano obecność alifatycznego kwasu malonowego (**33**, **38**). Różnice w obecności grupy feruloilowej i kumaroilowej, a obecnością cząsteczki kwasu glukuronowego i heksozy, które posiadają te same masy obojętnych fragmentów (odpowiednio 176 i 162 Da), określano na podstawie dokładnej wartości m/z jonów fragmentacyjnych oraz składu elementarnego jonów $[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$. Ponadto, w przypadku wystąpienia w cząsteczce badanego związku aromatycznego podstawnika acylowego, w widmie MS/MS rejestrowanym w trybie jonów dodatnich obserwowano jon fragmentacyjny pochodzący od grupy feruloilowej lub kumaroilowej odpowiednio przy m/z 177 i 163 (Ryc.4.32).



Ryc.4.32 Widma CID MS/MS dla *C*-[(*O*-kafeloilo-heksozylo)-*O*-heksozydu] chryzoeriolu (**20**) (Mcz=786) rejestrowane w trybie jonów dodatnich (a) oraz ujemnych (b), a także widma CID MS/MS dla *O*-heksozydu *C*-(*O*-feruloilo-heksozydu) chryzoeriolu (**29**) (Mcz=800) rejestrowane w trybie jonów dodatnich (c) oraz ujemnych (d). Oznaczenia: Glc-heksoza, Caf-kwas kawowy, Fer-kwas ferulowy. Numery związków (wytluszczonym drukiem) zgodne z Tab.4.7.

4.5. Wykorzystanie techniki spektrometrii mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją do analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych - aspekty metodyczne

W trakcie prowadzonych badań, dotyczących identyfikacji i analizy strukturalnej związków fenolowych obecnych w ekstraktach roślinnych, najczęściej wykorzystywany był system LC/ESI/QqToF-MS. W wybranych eksperymentach, system LC/MS sprzężony był z układem TriVersa NanoMate. Zastosowanie takiego połączenia narzędzi analitycznych wymagało optymalizacji parametrów prowadzonych analiz.

Metoda rozdzielania chromatograficznego opierała się na programie opracowanym przez Muth i współpracowników (2008, 2009). Metodę przeniesiono na dwa rodzaje układów chromatograficznych, RR HPLC-Agilent oraz UPLC Waters Aquity. Testowano kolumny chromatograficzne o różnym wypełnieniu i stopniu uziarnienia. Rodzaj kolumny oraz program rozdzielania dobierano każdorazowo do charakteru analizowanej próbki (łubin, lucerna, pszenica). Podczas analizy próbek pszenicy wykorzystywano trzy rodzaje kolumn (Tab.3.4, Ryc.4.33), co pozwoliło na uzyskanie komplementarnych wyników (Tab.4.8). Najpowszechniej wykorzystywaną kolumną we wszystkich prowadzonych eksperymentach była Poroshell (Agilent) - nowoczesna kolumna, pozwalająca uzyskiwać stabilność rozdzielania i powtarzalność czasów retencji. Zaletą tego typu kolumny jest również możliwość uzyskania rozdzielania UPLC na aparaturze HPLC przy stosunkowo niższych wartościach ciśnień.

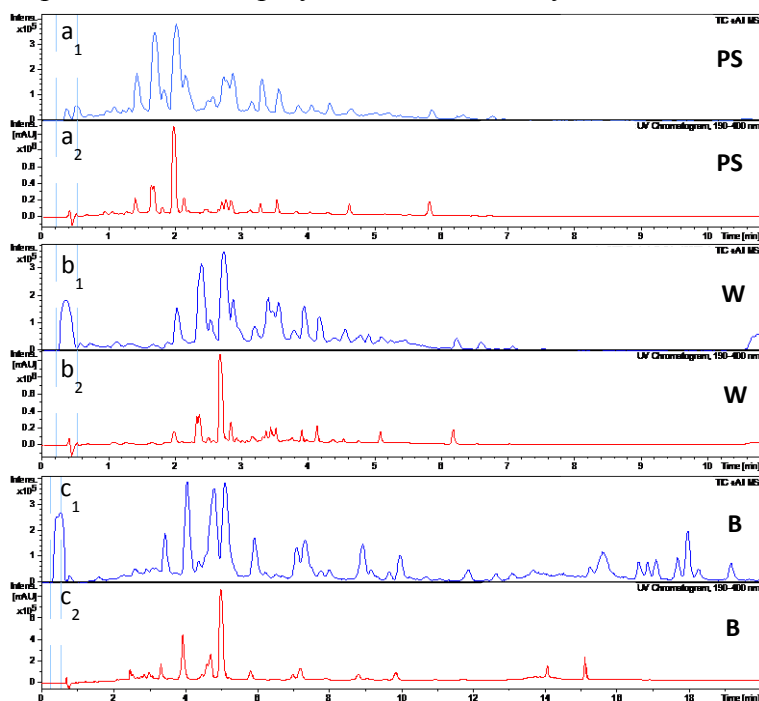


Fig.4.33 Chromatogramy całkowitego prądu jonowego (TIC a_1 - c_1) oraz UV (a_2 - c_2) uzyskane dla próbki z liści pszenicy na trzech kolumnach chromatograficznych: Poroshell Agilent (PS) (a), Waters Aquity (W) (b), Bionacom Velocity (B) (c). Parametry kolumn oraz warunki rozdzielania opisane w Rozdz.3.3.2.

Tab.4.8 Związki scharakteryzowane w liściach pszenicy z wykorzystaniem rozdziału na 3 różnych kolumnach (W-Waters Aquity, PS-Poroshell Agilent, B-Cionacom Velocity), w systemie LC/QqToF-MS.

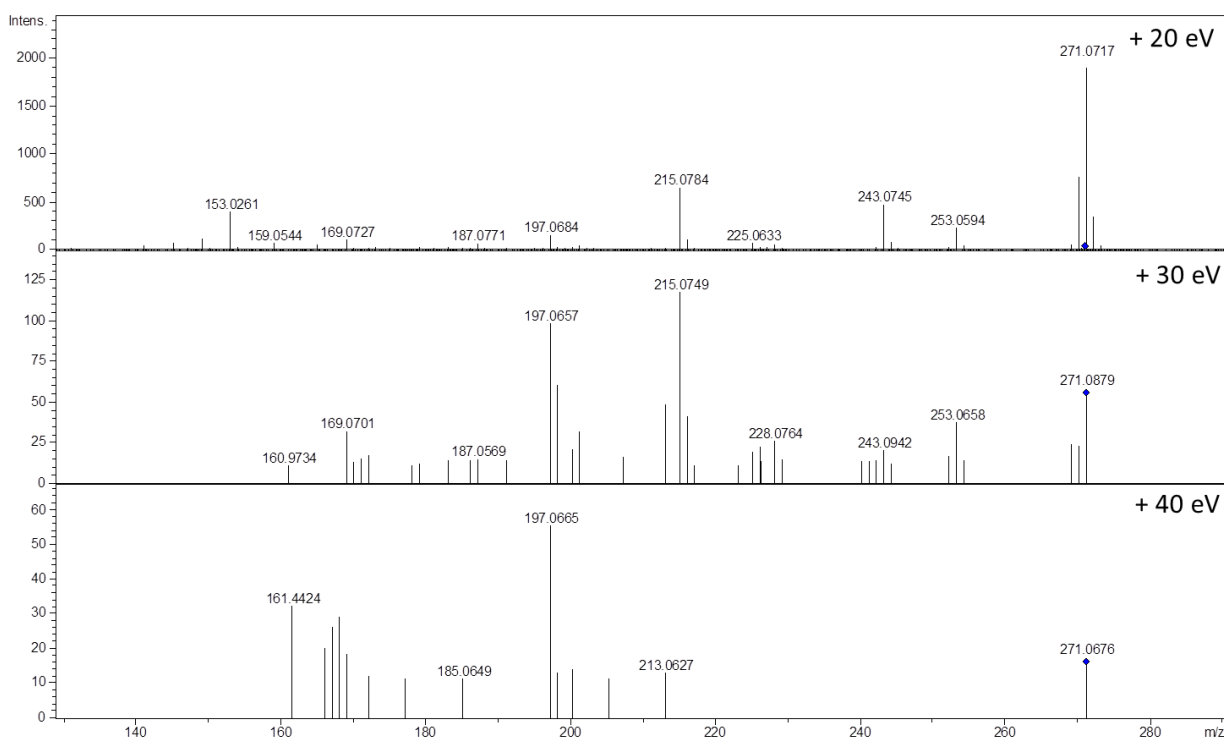
Nr	Rt (min)			Mcz	Nazwa związku	Intensywność ¹		
	W	PS	B			W	PS	B
1	0,9	0,9	2,6	772	<i>O,C</i> -trihexsozyd luteoliny(I)	c	c	c
2	1,5	1,2	2,9	772	<i>O,C,C</i> - trihexsozyd luteoliny (II)	c	c	c
3	1,7	1,2	3,2	610	<i>C</i> -heksozylo- <i>O</i> -heksozyd luteoliny	c	b	b
4	1,9	1,3	3,2	756	<i>C</i> -heksozylo- <i>O</i> -heksozylo- <i>O</i> -deoksyheksozyd luteoliny	b	b	c
5	2,1	1,5	3,4	610	<i>O</i> -heksozyd <i>C</i> -heksozyd luteoliny (I)	b	a	a
6	2,2	1,5	3,9	464	6- <i>C</i> -heksozyd trycetyny	c	c	c
7	2,4	1,7	4,0	580	<i>C</i> -heksozyd <i>C</i> -pentozyd luteoliny	a	a	a
8	2,5	1,8	4,6	610	<i>O</i> -heksozyd <i>C</i> -heksozyd luteoliny (II)	b	b	b
9	2,8	1,9	4,3	594	<i>C</i> -heksyzylo- <i>O</i> -deoksyheksozyd luteoliny	b	b	c
10	2,8	2,0	4,8	564	<i>C</i> -heksozyd <i>C</i> -pentozyd apigeniny	b	b	a
11	2,8	2,0	4,9	624	<i>C</i> -heksozyd <i>O</i> -heksozyd chryzoeriolu	b	b	b
12	2,8	2,2	5,0	448	6- <i>C</i> -glukozyd luteoliny	a	a	a
13	2,9	2,2	5,8	772	<i>C</i> -[(<i>O</i> -kafeloilo-heksozylo)- <i>O</i> -heksozyd] luteoliny	a	b	a
14	2,9	2,2	5,8	594	<i>C</i> -deoksyheksozylo- <i>O</i> -heksozyd luteoliny	b	b	b
15	3,3	2,5	6,2	624	<i>O</i> -heksozyd <i>C</i> -heksozyd chryzoeriolu	b	b	b
16	3,3	2,5	6,5	432	6- <i>C</i> -glukozyd apigeniny	b	c	c
17	3,3	2,6	6,3	814	7- <i>O</i> -[<i>O</i> -feruloilo-deoksyheksozylo)- <i>O</i> -heksozyd] trycyny	b	b	b
18	3,4	2,7	7,9	742	<i>O</i> -[<i>O</i> -kafeloilo-pentozyd]- <i>C</i> -heksozyd] luteoliny	b	b	b
19	3,4	2,7	7,1	608	<i>O</i> -deoksyheksozylo- <i>C</i> -heksozyd chryzoeriolu	b	b	b
20	3,4	2,8	7,7	786	<i>C</i> -[(<i>O</i> -kafeloilo-heksozylo)- <i>O</i> -heksozyd] chryzoeriolu	b	b	b
21	3,5	2,8	7,1	462	6- <i>C</i> -glukozyd chryzoeriolu	b	b	b
22	3,5	2,8	7,5	668	7- <i>O</i> -glukuronylo- <i>O</i> -heksozyd trycyny	b	b	b
23	3,5	2,9	9,1	772	<i>O</i> -(<i>O</i> -kafeloilo-heksozylo)- <i>C</i> -heksozyd luteoliny	c	b	b
24	3,5	2,9	7,3	654	7- <i>O</i> -heksozylo- <i>O</i> -heksozyd trycyny	b	b	b
25	3,9	3,1	9,7	756	<i>C</i> -[pentozylo- <i>O</i> -(feruloilo- <i>O</i> -heksozyd)] luteoliny	b	b	b
26	-	3,3	8,8	800	7- <i>O</i> -pentozyd <i>O</i> -diheksozyd trycyny	-	b	b
27	3,9	3,2	8,8	608	<i>O</i> -deoksyheksozylo- <i>O</i> -heksozyd chryzoeriolu	c	c	c
28	4,0	3,3	8,9	638	7- <i>O</i> -deoksyheksozylo- <i>O</i> -heksozyd trycyny	b	b	b
29	4,1	3,3	8,9	800	<i>O</i> -heksozyd <i>C</i> -(<i>O</i> -feruloilo-heksozyd) chryzoeriolu	b	b	b
30	4,2	3,5	8,9	492	7- <i>O</i> -heksozyd trycyny	b	b	b
31	4,2	3,6	9,8	462	<i>O</i> -heksozyd chryzoeriolu	c	c	c
32	4,7	4,1	11,9	688	7- <i>O</i> -heksozylo-heksozyd eteru trimetylowego trycetyny	b	b	b
33	4,8	4,3	13,1	578	malonylowany7- <i>O</i> -heksozyd trycyny	c	c	c
34	5,1	4,7	14,2	286	7- <i>O</i> -deoksyheksozylo-heksozyd eteru trimetylowego trycetyny	b	b	b
35	5,2	4,7	12,6	652	luteolina	b	b	b
36	5,5	5,0	13,7	506	7- <i>O</i> -glukozyd eteru trimetylowego trycetyny	c	c	c
37	6,0	5,6	-	270	apigenina	c	c	-
38	6,1	5,7	14,5	592	malonylowany 7- <i>O</i> -heksozyd eteru trimetylowego trycetyny	c	c	c
39	6,2	5,8	15,2	330	trycyna	b	b	b
40	6,3	-	-	300	chryzoeriol	c	-	-
41	10,6	10,2	16,5	344	eter trimetylowy trycetyny	c	c	c

¹ - poziomy intensywności protonowanych cząsteczek zarejestrowanych w trybie MS: a = intensywność powyżej 1×10^5 ; b = intensywność równa od 1×10^4 do 1×10^5 ; c = intensywność poniżej 1×10^4 ; „-” - nie wykryto.

W przypadku charakterystyki strukturalnej związków fenolowych, z wykorzystaniem spektrometru micrOToF-Qq, niezwykle istotną kwestią był dobór właściwych parametrów prowadzonych analiz (Rozdz.3.3.2, Tab.3.6). Największy wpływ na widma fragmentacyjne, uzyskiwane w eksperymentach z kolizyjnie indukowaną dysocjacją, miały energie kolizji oraz potencjały stosowane w źródle jonów. Budowa wykorzystywanego aparatu umożliwia prowadzenie analiz fragmentacyjnych typu CID MS/MS. Dzięki zastosowaniu odpowiedniej wartości energii kolizji w drugim kwadrupolu, pełniącym funkcję komory kolizyjnej, możliwa jest fragmentacja jonów (na skutek zachodzących zderzeń z atomami gazu kolizyjnego) izolowanych w pierwszym kwadrupolu (Ryc.1.13). Istnieje również możliwość uzyskania fragmentacji typu pseudo-MS³. Tego rodzaju eksperymenty zachodzą dzięki przyłożeniu podwyższonego napięcia pomiędzy szczelinami ogniskującymi w źródle jonów, co prowadzi do rozpadu jonów molekularnych glikozylowanych cząsteczek na jony potomne - m.in. aglikonu. W dalszej kolejności, jony Y₀ (aglikon) ulegają fragmentacji, dając charakterystyczny wzór jonów potomnych danego aglikonu. Tak zwana kolizyjnie indukowana dysocjacja zachodząca w źródle jonów (ISCID) jest niezwykle pomocna przy charakterystyce strukturalnej aglikonów glikozylowanych flawonoidów.

Przeprowadzono liczne eksperymenty, zarówno dla standardów aglikonów jak i ich glikozylowanych pochodnych, w celu właściwego doboru warunków energetycznych prowadzonych analiz. Optymalna energia fragmentacji dla różnych związków fenolowych była inna, w zależności od właściwości fizykochemicznych i masy cząsteczkowej danego związku. W przypadku wolnych aglikonów, optymalna energia kolizji pozwalająca na uzyskanie informatywnych widm fragmentacyjnych typu MS/MS, wynosiła 25-30eV (Ryc.4.34). Energie kolizji różniły się nieznacznie dla poszczególnych klas aglikonów. Należy podkreślić, że w przypadku eksperymentów prowadzonych w trybie jonów ujemnych, każdorazowo konieczne było zastosowanie wyższych energii w stosunku do jonizacji dodatniej.

W celu identyfikacji aglikonów glikozylowanych flawonoidów i izoflawonoidów konieczne było przeprowadzenie analizy ISCID. Energia w źródle, pozwalająca na intensywny rozpad jonów [M+H]⁺ lub [M-H]⁻ do wolnych aglikonów (jony typu Y₀^{+/-}), wynosiła odpowiednio 80/85 eV w zależności od polaryzacji. W dalszej kolejności, w pierwszym kwadrupolu izolowane były jony Y₀ aglikonów i poddawane fragmentacji w komorze kolizyjnej (przy energii 20/25 eV) (Ryc. 4.1).

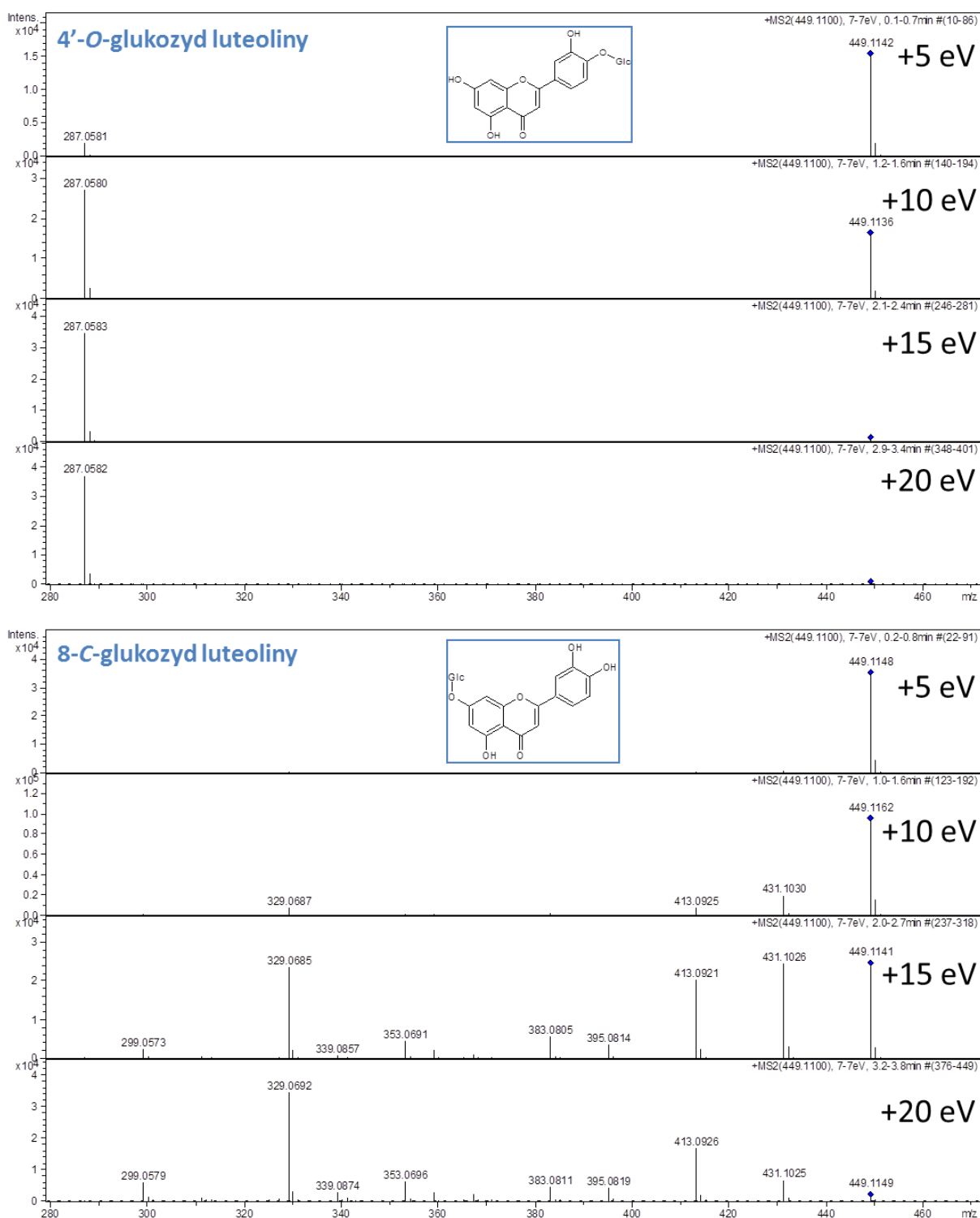


Ryc.4.34 Widma CID MS/MS zarejestrowane w trybie jonów dodatnich dla standardu genisteiny przy różnych wartościach energii kolizji (20,30,40eV).

W przypadku monoglikozydów, średnia energia kolizji wynosiła 10-20 eV, w zależności od klasy związku i sposobu glikozylacji. Dla *O*-glikozydów wymagana była nieznacznie niższa energia, niż dla *C*-glikozydów (Ryc.4.35). W przypadku jonizacji w trybie jonów ujemnych (podobnie jak podczas analizy aglikonów) wartości energetyczne, konieczne do osiągnięcia informatywnych widm fragmentacyjnych były wyższe. Ponadto, odpowiednie wartości energii podczas eksperymentów CID MS/MS dla diglikozydów i ich acylowanych pochodnych były różne. Z tego też względu, podczas analiz fenolowych metabolitów wtórnych, używano szerszych zakresów energii kolizji (tzw. *ramping*), co umożliwiło rejestrację jonów fragmentacyjnych, powstających zarówno przy wysokiej jak i niskiej energii kolizji. W trybie jonów dodatnich stosowano wartości energii kolizji w zakresie 15-30eV, a dla jonów ujemnych 25-30eV (Ryc.4.1). Wartości te zostały dobrane eksperymentalnie.

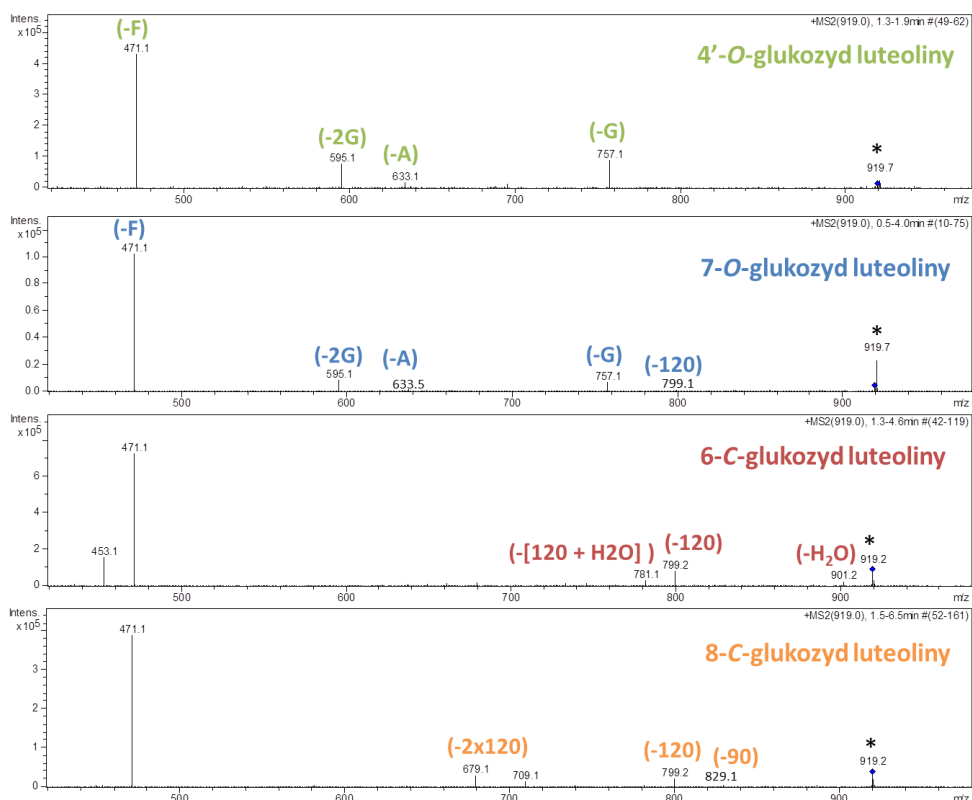
W niektórych przypadkach, szczególnie dotyczących związków malonylowanych lub acylowanych innymi alifatycznymi grupami, konieczne było przeprowadzenie eksperymentów typu pseudo-MRM (ang. *multiple reaction monitoring*). Tego typu analiza pozwalała na wybór kilku interesujących jonów, spośród wszystkich związków obecnych w próbce, które następnie poddawano analizie MS/MS w ściśle kontrolowanych warunkach energetycznych. Ester

metylowy kwasu malonowego w trybie jonów dodatnich, przy standardowo dobranych wartościach energii kolizji (15-30eV) fragmentował razem z podstawnikiem cukrowym. W celu zaobserwowania odejścia obojętnego fragmentu cząsteczki acylowej (100 Da) konieczne było zastosowanie niższych wartości energii kolizji (Ryc.4.15).



Ryc.4.35 Widma MS/MS zarejestrowane przy różnych wartościach energii kolizji dla 4'-O-glukozydu luteoliny oraz 8-C-glukozydu luteoliny.

Szczegółowa analiza widm fragmentacyjnych związków fenolowych pozwala uzyskać dodatkowe informacje strukturalne. Możliwe jest określenie struktury aglikonu, typu jednostki cukrowej czy podstawnika acylowego. Znacznie trudniejsze jest natomiast wnioskowanie w kwestii miejsca podstawienia cząsteczki cukru na aglikonie. W tym celu przeprowadzono analizy z wykorzystaniem kompleksów z jonami metali. Wybrane standardy glikozylowanych aglikonów (7-*O*-glukozydu luteoliny, 4'-*O*-glukozydu luteoliny, 8-*C*-glukozydu luteoliny, 6-*C*-glukozydu luteoliny) kompleksowano z solami metali dwuwartościowych (Cu^{2+} , Mg^{2+}) (Davis i Brodbelt, 2004) oraz jonami srebra (Ag^+) (Zhang i Brodbelt, 2005). Otrzymane jony $[\text{Mg}/\text{Cu}(\text{II}) (\text{flawonoid} - \text{H}) (\text{flawonoid})]^+$ oraz $(\text{Ag} + \text{flawonoid})^+$ poddawano analizie MS/MS na układzie Qq-ToF. W wyniku fragmentacji kompleksów poszczególnych standardów nie uzyskano jonów diagnostycznych, pozwalających na rozróżnienie izomerów glukozydu luteoliny. Eksperyment z wykorzystaniem kompleksów z jonami magnezu powtórzono przy wykorzystaniu układu IT-MS. Przeprowadzone analizy pozwoliły na otrzymanie jonów diagnostycznych, na podstawie których możliwe było rozróżnienie badanych izomerów (zgodnie z Davis i Brodbelt (2004)) (Ryc.4.36).



Ryc.4.36 Widma fragmentacyjne kompleksu $[\text{Mg}(\text{II}) (\text{flawonoid} - \text{H}) (\text{flawonoid})]^+$ (*) dla czterech izomerów glukozydu luteoliny. Jony diagnostyczne, oznaczone jako: G-odejście reszty cząsteczki glukozy, 2G- odejście dwóch reszt cząsteczek glukozy, A-odejście obojętnej cząsteczki aglikonu, F- odejście obojętnej cząsteczki glukozydu luteoliny.

V. DYSKUSJA

Przedmiotem przedłożonej pracy doktorskiej było określenie możliwości wykorzystania układów LC/MS do profilowania i analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych obecnych w materiale roślinnym. Obiektem badań był różnorodny materiał biologiczny pozyskany z łubinu, lucerny oraz pszenicy. Prace eksperymentalne z wykorzystaniem układów LC/MS do analizy flawonoidów przebiegały wielotorowo. Opracowaną metodykę prowadzenia eksperymentów wykorzystano podczas badań nad rolą, jaką pełnią fenolowe metabolity wtórne podczas infekcji oraz elisytacji różnych odmian łubinu wąskolistnego patogennym grzybem *C.lupini*. Niezbędnym elementem we wszystkich pracach badawczych, zapewniającym wiarygodność i skuteczność analityczną przedsięwziętych eksperymentów, był etap optymalizacji warunków prowadzonych doświadczeń. Z uwagi na zakres powyżej przedstawionych problemów badawczych, dyskusja zostanie przeprowadzona osobno dla każdego eksperymentu, stanowiącego odrębną całość, a zarazem wpisującego się w ogólną tematykę pracy doktorskiej.

5.1 Analiza zmian profili fenolowych metabolitów wtórnych łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) w odpowiedzi na infekcję patogennym grzybem (*Colletotrichum lupini*) oraz elisytację jego toksyną

Przedmiotem zainteresowania podczas prowadzonych badań był łubin wąskolistny (*Lupinus angustifolius*). Roślina ta, należąca do rodziny bobowatych, ze względu na zdolność wiązania azotu atmosferycznego, odgrywa niezwykle istotną rolę w procesie poprawy stanu gleby, jej żyzności, właściwości chemicznych i biologicznych. Ze względu na stan gleb uprawnych w Wielkopolsce, które należą do lekkich, słabych i nisko urodzajnych, a także o zniszczonej strukturze spowodowanej intensywną uprawą m.in. zbóż, rzepaku czy ziemniaków, istnieje konieczność wprowadzania płodozmianu w postaci roślin motylkowatych. Łubin, ze względu na swoje właściwości proekologiczne oraz system korzeniowy pozwalający na wzrost i aklimatyzację na glebach charakterystycznych dla regionu Wielkopolski, jest rośliną idealnie nadającą się do tego celu. Istotny wpływ na obecny spadek zasiewów w postaci łubinu ma antraknoza – choroba grzybowa powodująca wysokie straty plonu w wyniku porażenia plantacji. Z tego też względu za cel przyjęto poszerzenie wiedzy w kwestii procesów odpornościowych łubinu w odpowiedzi na antraknozę, poprzez analizę zmian profili fenolowych metabolitów wtórnych w tkankach infekowanych patogennym grzybem *Colletotrichum lupini*. Zdobyta w tym zakresie wiedza może być pomocna podczas

opracowywania strategii prac hodowlanych, prowadzących do otrzymania odmian o zwiększonej odporności na antraknozę.

Rośliny w toku ewolucji wykształciły różnorodne mechanizmy obronne w odpowiedzi na atak patogena, poczynając od wytworzenia ściany komórkowej i kutykuli, które stanowią pierwszą linię obrony przed wniknięciem mikroorganizmu do komórki. Rośliny posiadają również wysoce wyspecjalizowane mechanizmy molekularne, regulujące na poziomie komórkowym procesy związane z patogenezą (Somssich i Hahlbrock, 1998). Do takich mechanizmów możemy zaliczyć pojawienie się wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, prowadzących do wystąpienia reakcji nadwrażliwości i w konsekwencji apoptozy (Dangl i in., 1996; Greenberg i in., 1997; Wojtaszek, 1997). W dalszej kolejności ma miejsce wytworzenie substancji sygnałnych (kwas salicyłowy, jasmonowy, etylen) (Małamy i in., 1990; Enyedi i in., 1992; Creelman i Mullet, 1995), które wpływają na regulację ekspresji genów związanych z reakcjami obronnymi (Dixon i in., 1994), produkcję fitoaleksyn i uwolnienie fitoantycypin (Hahlbrock and Scheel, 1989; Van Etten i in., 1994 Dixon and Paiva, 1995) czy też białek związanych z patogenezą (PR) (Linthorst, 1991). W następstwie tych procesów można czasami zaobserwować pojawienie się systemicznej odporności nabytej (SAR), w przypadku której następuje indukcja reakcji obronnych w niezainfekowanych częściach rośliny (Durrant i Dong, 2004).

Molekularne mechanizmy obrony roślin przed mikroorganizmami patogennymi są wynikiem sprawnie działającego roślinnego układu immunologicznego. Wyróżnia się dwie formy odporności wrodzonej: odporność indukowaną przez wzorce - PTI oraz przez efekторы - ETI (Chisholm i in., 2006; Jones i Dangl, 2006). Pierwsza linia obrony (PTI) uruchamiana jest przez związane z błoną komórkową receptory PRR rozpoznające wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP/MAMP) (Zhang i Zhou, 2010). Wzorce molekularne mogą stanowić różnego rodzaju elitytory grzybowe czy bakteryjne. Jednak mikroorganizmy, na przestrzeni lat, wykształcają mechanizmy przełamania bariery obronnej rośliny. W szczególności dotyczy to specyficznych oddziaływań patogen-gospodarz (Jones i Dangl, 2006). Roślina jest przygotowana na taką sytuację i jest w stanie uruchomić bardziej wyspecjalizowany mechanizm obronny - ETI, zwany również odpowiedzią „gen na gen” (Flor, 1971). Jednym z efektów reakcji obronnej jest wytworzenie metabolitów wtórnych o właściwościach antybiotycznych zwanych fitoaleksynami (van Etten i in., 1994).

W przypadku roślin bobowatych (Fabaceae) rolę fitoaleksyn pełnią zazwyczaj izoflawonoidy: medikarpina w przypadku lucerny (*Medicago truncatula*) (Farag i in., 2008; Jasiński i in., 2009), gliceolina w soi (*Glycine max*) (Lozovaya i in., 2004), oraz luteon i witeon

w łubinie (*Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*) (Bednarek i in., 2003; Muth i in., 2009). Ilościowe i jakościowe zmiany w poziomach fitoaleksyn w odpowiedzi na różnego rodzaju elisytory, były przedmiotem wielu prac eksperymentalnych dotyczących *M.truncatula*, modelowej rośliny z rodziny Fabaceae. Zmiany w profilach antybiotycznych izoflawonoidów i ich glikozylowanych pochodnych zaobserwowano w ekstraktach lucerny po uprzednim zranieniu, traktowaniu elisytorem grzybowym lub drożdżowym, kwasem jasmonowym czy też infekcji zarodnikami grzybów patogennych (Suzuki i in., 2004; Broeckling i in., 2005; Naoumkina i in., 2007; Farag i in., 2008).

Badania dotyczące wpływu infekcji zarodnikami grzyba bądź elisytacji toksyną grzybową na poziom antybiotycznych metabolitów w tkankach łubinu były przedmiotem badań w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki (PAN, Poznań). Bednarek i współpracownicy (2003) obserwowali indukcję syntezy antybiotycznych aglikonów izoflawonowych, genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny oraz ich prenylowanych pochodnych witeonu i luteonu, w odpowiedzi na infekcję łubinu zarodnikami grzyba *Pleiochaeta setosa*. Muth i współpracownicy (2009) podjęli próbę wyjaśnienia roli procesu malonylowania glikozydów izoflawonoidów w odpowiedzi na infekcję łubinu wąskolistnego zarodnikami *C.lupini* lub elisytację jego toksyną. Prowadzone były również analizy strukturalne związków fenolowych obecnych w tkankach liści i korzeni trzech gatunków łubinu *Lupinus angustifolius* (łubin wąskolistny), *Lupinus albus* (łubin biały) oraz *Lupinus luteus* (łubin żółty) (Bednarek i in., 2003; Bednarek i in., 2001; Frański i in., 1999 a, b, Kachlicki i in., 2005).

Przedmiot realizowanych w ramach pracy doktorskiej badań stanowił kontynuację, rozszerzenie i uzupełnienie prac prowadzonych dotychczas w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki (PAN, Poznań). Wstępne badania prowadzono na 12 odmianach łubinu wąskolistnego (Baron, Bojar, Boruta, Cezar, Graf, Kalif, Karo, Mirela, Neptun, Regent, Sonet, Zeus). Na podstawie obserwacji porażenia roślin w wyniku infekcji zarodnikami grzyba *C.lupini* oraz zmian poziomów fenolowych metabolitów wtórnych, do dalszych badań wytypowano cztery odmiany (słodkie - Baron i Sonet oraz gorzkie - Karo i Mirela) o najwyższej odporności na antraknozę. Ostatnie stadium badań prowadzono na odmianie Sonet, wykazującej najwyższą odporność na patogennego grzyba.

Rośliny infekowano hemibiotroficznym grzybem *C.lupini*, wyizolowanym i scharakteryzowanym zgodnie z procedurą opisaną Nirenberga i współpracowników (2002). Patogen ten zaraz po wniknięciu do tkanek gospodarza zachowuje się jak biotrof, czerpiąc substancje odżywcze z żywych komórek, a następnie przechodząc w fazę nekrotroficzną doprowadza do śmierci komórek i odżywia się martwą tkanką. Grzyb ten jest specyficzny dla

rodziny łubinu. W pierwszej kolejności atakuje wiązki przewodzące liści i odcina drogi transportu substancji odżywczych. W następstwie tego dochodzi do obumierania komórek, którymi odżywia się grzyb wywołujący antraknozę (Ryc.S11). Wynikiem infekcji jest zamieranie i śmierć rośliny. Patogen najlepiej rozwija się w warunkach ciepłego i wilgotnego klimatu, dlatego najintensywniejsze objawy choroby obserwowane są na polach uprawnych w Polsce wiosną. Z tego też względu proces infekcji w warunkach laboratoryjnych przeprowadzano w pierwszej dobie pod namiotami foliowymi (zgodnie z metodyką opracowaną przez Muth, (2010).

Elisytację łubinu prowadzono na dwa sposoby. Pierwsza metoda polegała na nałożeniu zawiesiny toksycznych metabolitów, wyizolowanych z hodowli grzyba *C.lupini*, na co drugi zraniony igłą liść dolnego piętra rośliny. Obydwa piętra liści zbierano osobno. Celem tego typu elisytacji była weryfikacja możliwości wystąpienia w roślinie systemicznej odporności nabytej. Drugi sposób elisytacji polegał na oprysku całej rośliny zawiesiną toksyny grzybowej. Prowadzono również następującą po sobie elisytację toksyną oraz infekcję zarodnikami, celem weryfikacji możliwości indukcji przez toksyczne metabolity wzmożonej odpowiedzi obronnej. Ekstrakt toksycznych metabolitów wtórnych wyizolowano z płynnej hodowli *C.lupini* i po oczyszczeniu poddano testowi na fitotoksyczność. W celu weryfikacji toksyczności ekstraktu, zawiesinę w 55% metanolu nałożono na powierzchnię liścia *L.angustifolius*. Po kilku godzinach od elisytacji zaobserwowano pojawienie się nekrotycznych plam na liściu (Ryc.S12). Z przeprowadzonej analizy LC/IT-MS wynika, że toksyczne metabolity wtórne stanowią mieszaninę kilku związków o różnych masach cząsteczkowych i charakteryzują się podobnym wzorem fragmentacji (Ryc.S13). Analiza z wykorzystaniem wysokorozdzielczego analizatora Qq-ToF pozwoliła na określenie składów elementarnych wyizolowanych związków A-H (Tab.S4). Największą intensywność spośród toksycznych metabolitów posiadał związek B. Niestety niewielkie ilości materiału nie pozwoliły na ich rozdział oraz analizę NMR, w celu pełnej charakterystyki strukturalnej toksycznych metabolitów *C.lupini*.

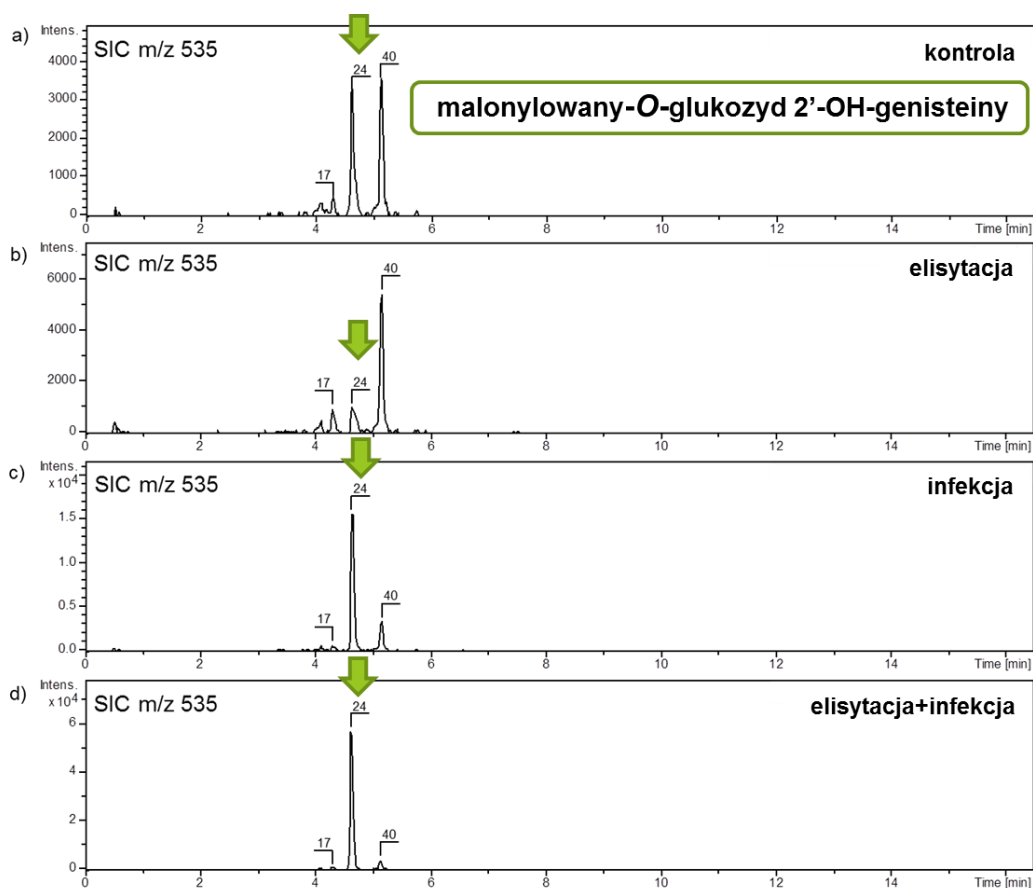
Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu różnych metod infekcji lub/i elisytacji patogenem grzybowym na odpowiedź obronną rośliny, przejawiającą się w postaci akumulacji metabolitów wtórnych o właściwościach antybiotycznych. Zmiany ilościowe i jakościowe związków fenolowych, obecnych zarówno na powierzchni liści jak i w ekstraktach tkankowych, badano za pomocą systemów LS/MS i GC/MS. Identyfikację flawonoidów i izoflawonoidów przeprowadzono na podstawie widm masowych MS² i pseudo-MS³ zarejestrowanych na wysokorozdzielczym analizatorze Qq-ToF. Zbadano również poziomy transkrypcji wybranych genów biorących udział w szlaku biosyntezy flawonoidów.

Analiza GC/MS wykazała pojawienie się antybiotycznych izoflawonoidów luteonu i witeonu (Ingham i in., 1983) na powierzchni liści łubinu po infekcji zarodnikami grzyba *C.lupini*. Najwyższe poziomy fitoaleksyn odnotowano w 96 i 168 godzinie po infekcji. Po siedmiu dniach od infekcji (168h) obserwowano pierwsze widoczne objawy antraknozy. Najwyższe poziomy prenylowanych aglikonów odnotowano w zbliżonym czasie po infekcji także w ekstraktach otrzymanych z tkanek liściennych (50-krotny wzrost luteonu w stosunku do kontroli). Można zatem wnioskować, że roślina broni się poprzez zwiększenie poziomów antybiotycznych metabolitów (luteonu i witeonu), akumulowanych nie tylko wewnątrz tkanek ale również na ich powierzchni. Ponadto musi ona posiadać wydajny system transportu fenolowych fitoaleksyn. Podobny mechanizm obrony rośliny przed atakiem patogennego grzyba zaobserwowano dla winogrona infekowanego *Plasmopara viticola* (Hamm i in., 2010). Na powierzchni liści *Vitis vinifera* zidentyfikowano antybiotyczne metabolity fenolowe (resweratrol i inne fenolowe pochodne stilbenu).

Analiza GC/MS ekstraktów z powierzchni liścia łubinu po elisytacji toksyną *C.lupini* wykazała jedynie obecność witeonu. Najwyższe jego stężenie zaobserwowano 12 godzin po elisytacji (7-krotny w stosunku do kontroli) a następnie po niewielkim spadku w 24 godzinie, ponowny wzrost nastąpił po 48 h (czterokrotny). Również w przypadku analizy LC/MS ekstraktów tkankowych po elisytacji patogennymi metabolitami nieobserwowano obecności luteonu, podczas gdy witeon pojawiał się w najwyższym stężeniu 48 h po traktowaniu elisytozem grzybowym (ośmiokrotny wzrost). Reakcja rośliny na elisytację toksyną jest szybsza niż w przypadku infekcji, co wynika z faktu, iż patogenny mikroorganizm potrzebuje więcej czasu na infekcję, poprzez wniknięcie w struktury tkankowe łubinu, podczas gdy toksyna działa znacznie szybciej. Obydwa sposoby patogenezы wywołują w roślinie odmienne reakcje odpornościowe, w postaci akumulacji obydwu antybiotycznych prenylowanych izoflawonów (witeonu i luteonu w przypadku infekcji) lub tylko jednego (witeonu-w przypadku elisytacji). Nie zaobserwowano istotnego wpływu odmian (słodkich i gorzkich) na zmiany poziomów antybiotycznych metabolitów w wyniku infekcji zarodnikami. Infekcja patogenem nie wpłynęła również znacząco na zmiany alkaloidów chinolizydynowych.

Optymalizacja warunków prowadzenia analiz LC/MS związków fenolowych w ekstraktach roślinnych, pozwoliła na identyfikację blisko dwukrotnie większej ilości metabolitów niż do tej pory (Muth i in., 2008, 2009). Eksperymenty pseudo-MS³ umożliwiły rozróżnienie aglikonów glikozylowanych cząsteczek, posiadających jednakową masę. Wynikiem tego była identyfikacja pochodnych luteoliny, których obecność w ekstraktach łubinu wąskolistnego nie była wcześniej raportowana. Ponadto zidentyfikowane zostały mono-

i di-glikozydy kemferolu, luteonu i witeonu oraz ich malonylowane pochodne. Możliwe było rozróżnienie związków izomerycznych i izobarycznych. Zidentyfikowano dwa izomery malonylowanego glukozydu 2'-hydroksygenisteiny (związek nr **17** i **24**, zgodnie z Tab.4.1) oraz malonylowany glukozyd kemferolu (związek nr **40**), wszystkie o masie 534 Da. Istotnie różnicującym rośliny elisytowane i infekowane był tylko jeden z izomerów nr **24** (Ryc.5.1). Malonylowany glukozyd 2'-hydroksygenisteiny był już wcześniej raportowany, jako związek odgrywający istotną rolę w odpowiedzi obronnej łubinu na atak grzybowy (Muth i in., 2009). Monitorowano zmiany w poziomach wszystkich zidentyfikowanych związków, w odpowiedzi na różne sposoby infekcji lub/i elisytacji. Dzięki zastosowaniu programu MetAlign do automatycznej obróbki i analizy danych, możliwe było obserwowanie zmian ilościowych i jakościowych dla dużej liczby próbek. W części wynikowej przedstawiono i omówiono jedynie profile istotnie różnicujących związków - glukozylowanych i malonylowanych pochodnych izoflawonów oraz ich aglikony.



Ryc.5.1 Chromatogramy pojedynczych jonów $[M+H]^+$ zarejestrowane przy m/z 535 dla dwóch izomerów malonylowanego *O*-glukozydu 2'-hydroksygenisteiny (**17,24**) oraz malonylowanego *O*-glukozydu kemferolu (**40**). Analizy LC/QqToF-MS przeprowadzono dla ekstraktów z liści łubinu wąskolistnego (odmiana Sonet) – rośliny kontrolne (a), elisytowane toksyną (b) infekowane zarodnikami *C.lupini* (c) oraz elisytowane i infekowane (d). Numery związków (wytluszczonym drukiem) zgodnie z Tab.4.1 (według Wojakowska i in., 2012).

Zaobserwowano istotne zmiany w profilach aglikonów izoflawonów (luteonu, witeonu, genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny), malonylowanych glukozydów genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny oraz malonylowanych i glikozylowanych pochodnych luteonu i witeonu, obecnych w liściach roślin infekowanych zarodnikami grzyba, elisytowanych toksyną *C.lupini* oraz traktowanych zarówno zarodnikami jak i toksyną w odniesieniu do kontroli. Odpowiedź łubinu na trzy odmienne sposoby patogenez, była różna i przebiegała w innych ramach czasowych.

W przypadku infekcji zarodnikami *C.lupini*, najwyższą odpowiedź zaobserwowano pomiędzy 96 i 264h, jednak pierwsze zmiany stężenia związków fenolowych wystąpiły już po 24h od momentu infekcji. Odnotowano znaczący wzrost witeonu i luteonu oraz ich prekursorów genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny. Najwyższy wzrost stężenia zaobserwowano dla luteonu (pięćdziesięciokrotny w stosunku do kontroli) po 168h od infekcji. Istotnie różnicujący był również malonylowany *O*-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny, dla którego w 264 godzinie po infekcji obserwowano ponad pięciokrotny wzrost w stosunku do kontroli. Odnotowano ponadto zmiany stężenia glikozylowanych i malonylowanych pochodnych witeonu, z których najwyższe stężenie (ponad 8-krotny wzrost w stosunku do kontroli) w tkankach liści wykazywał malonylowany glukozyd witeonu.

Odmienne oraz znacznie szybsza odpowiedź, w postaci wzrostu stężenia pochodnych izoflawonów w tkankach liści, następowała w przypadku elisytacji łubinu toksycznymi metabolitami *C.lupini*. Pomędzy 24 a 48 godziną po elisytacji, zaobserwowano obecność tylko dwóch wolnych aglikonów, genisteiny i witeonu, spośród których najwyższy wzrost odnotowano dla prenylowanego związku. Ośmiokrotny wzrost stężenia witeonu w stosunku do kontroli, zaobserwowano po elisytacji poprzez nałożenie kropli zawiesiny toksyny na uprzednio nakłuty igłą liść, a tylko czterokrotny po elisytacji poprzez oprysk. Różnicę tą można w pewnym stopniu wytłumaczyć efektem zranienia, mogącym powodować indukcję reakcji obronnej. W przeciwieństwie do infekcji, po elisytacji nie zaobserwowano istotnych zmian w akumulacji malonylowanych glukozydów genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny. Wystąpiły natomiast zmiany poziomów malonylowanych i glikozylowanych pochodnych witeonu. Odnotowano różnice w odpowiedzi pomiędzy dwoma wariantami elisytacji, przejawiające się w odmiennych poziomach pochodnych witeonu. W przypadku elisytacji poprzez nałożenie toksyny na zraniony uprzednio liść, najwyższy wzrost pochodnych witeonu zaobserwowano po 12 h, a w przypadku oprysku zawiesiną toksycznych metabolitów, najwyższa odpowiedź nastąpiła po 48 h od elisytacji. Nie zaobserwowano natomiast znaczących różnic w akumulacji izoflawonoidów pomiędzy dwoma badanymi oddzielnie

piętrami liści, co może wskazywać na brak wystąpienia systemicznej odporności nabytej (SAR), która to odpowiedź raportowana była przez Muth i in. (2009).

W przypadku łączonego traktowania rośliny (w pierwszej kolejności elisytozem toksyny, a następnie po 48h od elisytacji zarodnikami grzyba), w 168h po infekcji zaobserwowano wzmożoną indukcję odpowiedzi obronnej rośliny. Przejawiała się ona wzrostem stężenia izoflawonów o właściwościach antybiotycznych, zarówno w stosunku do kontroli, jak również w odniesieniu do poprzednich dwóch, osobno stosowanych sposobów wywołujących odpowiedź obronną (elisytacji lub infekcji). Zaobserwowano wzrost stężenia wszystkich czterech wolnych aglikonów izoflawonowych (luteonu, witeonu, genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny), przy czym najwyższy dla genisteiny (16x) i 2'-hydroksygenisteiny (8x). Znaczący wzrost (dziesięciokrotny w stosunku do kontroli) odnotowano również dla malonylowanego *O*-glukozydu 2'-hydroksygenisteiny. Istotne zmiany stężenia zaobserwowano ponadto dla niektórych glukozylowanych i malonylowanych pochodnych witeonu. W sposób znaczący wzrosły również glukozylowane i malonylowane pochodne luteonu, czego nie obserwowano dla dwóch pierwszych sposobów wywołania odpowiedzi obronnej.

Różnice w poziomach akumulacji fitoaleksyn, luteonu i witeonu, oraz malonylowanych glikozydów izoflawonów, w odpowiedzi na trzy różne sposoby traktowania rośliny patogenem lub/i elisytozem, świadczą o różnych przebiegach reakcji obronnych. Wniosek ten potwierdzają również obserwacje różnic w poziomach transkrypcji genów biorących udział w szlaku biosyntezy flawonoidów (PAL, IFS, CHS) a także w odmiennych czasach wyzwolonej reakcji obronnej (24-48 h po elisytacji oraz 168 h (najwyższa odpowiedź) po infekcji). Odpowiedź przebiega szybciej i intensywniej w przypadku elisytacji toksyną grzybową. Na tej podstawie można przypuszczać, że różne wzorce, w postaci zarodników bądź toksyny grzybowej, rozpoznawane przez różne receptory roślinne, wywołują odmienną reakcję obronną rośliny. Może ona się przejawiać w aktywacji różnych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za syntezę, transport i akumulację fenolowych metabolitów wtórnych biorących udział w procesie odpowiedzi na infekcję lub/i elisytację.

Różny mechanizm odpowiedzi roślin na infekcję/elisytację patogenem zaobserwowały wcześniej inne grupy badawcze. Wspomniana już Muth (2010) obserwowала zmiany w poziomach fitoaleksyn luteonu i witeonu w odpowiedzi na elisytację lub infekcję łubinu wąskolistnego *C.lupini*. Prezentowane w pracy doktorskiej wyniki potwierdziły te obserwacje, a ponadto wykazały obecność fitoaleksyn na powierzchni liścia. Podobne obserwacje poczyniła grupa badająca wpływ elisytora grzybowego i kwasu jasmonowego na zawiesiny komórkowe *M.truncatula* (Frag i in., 2008). Odnotowano wzrost stężenia wolnych aglikonów

izoflawonowych w przypadku elisytacji grzybem oraz fitoaleksyny-medikarpiny po traktowaniu kwasem jasmonowym. Wzrost stężenia malonylowanych glikozydów izoflawonów w wyniku patogenezы, wykazany w przedłożonej pracy, obserwowany był również w przypadku *M.sativa* (Kessmann i in., 1990; Jasiński i in., 2009). Ponadto w przypadku lucerny (*M.truncatula*) poddawanej stresowi biotycznemu, wykazano wystąpienie systemicznej odporności nabytej (SAR) (Naoumkina i in., 2007; Farag i in., 2008, 2009), czego nie odnotowano w prezentowanych w pracy doktorskiej badaniach.

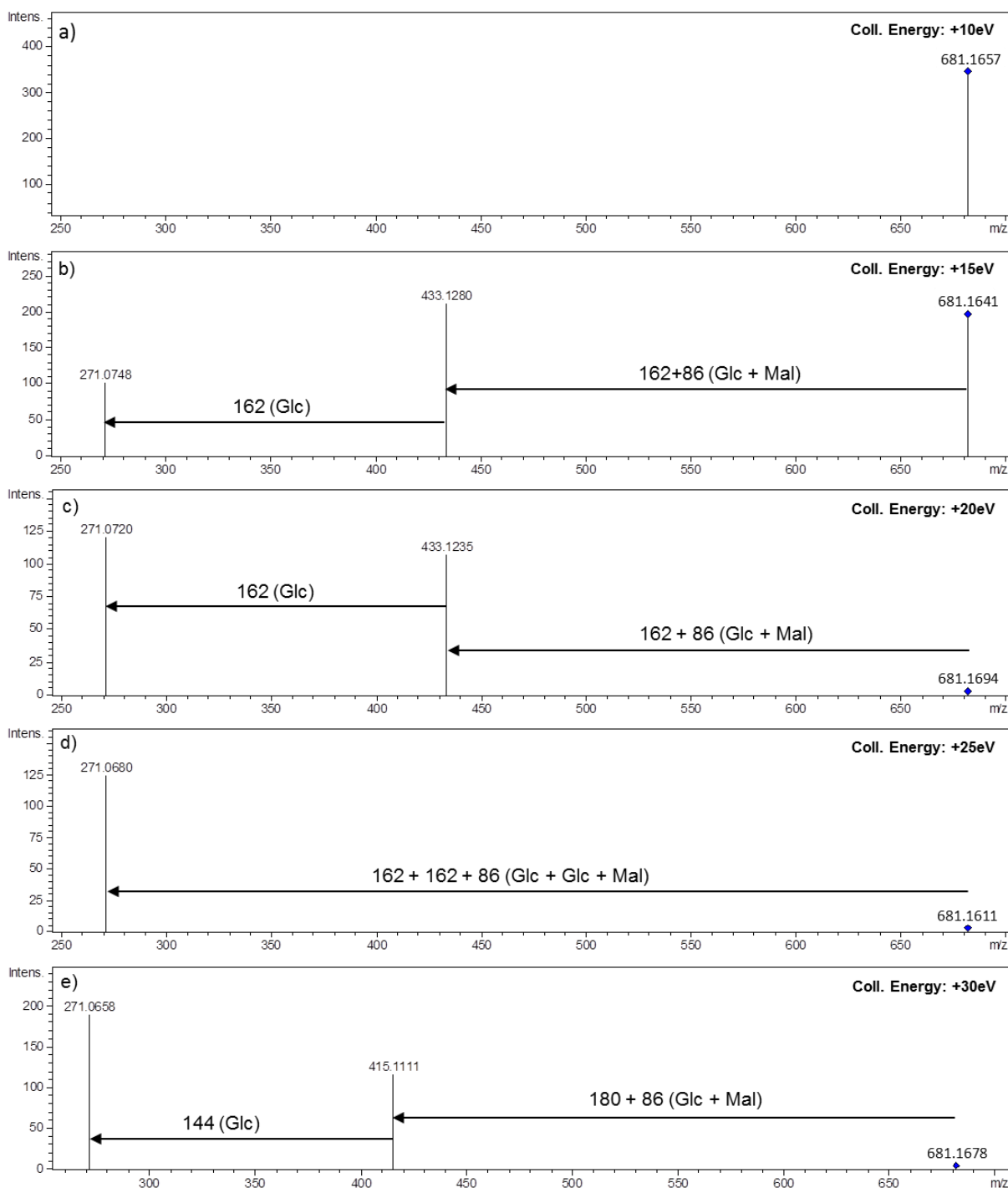
Rola prenylowanych izoflawonów w procesie obrony rośliny przed infekcją jest znana (Ingham i in., 1983, Tahara i Ibrahim, 1995). Prenylacja nadaje związkom właściwości przeciwgrzybiczne i przeciwbakteryjne, poprzez zwiększenie ich lipofilowości i przepuszczalności przez błony biologiczne. Wiadomo również, że flawonoidy i izoflawonoidy przechowywane są w wakuoli w postaci glikozylowanej, jako prekursorы fitoaleksyn (Dixon i Steele, 1999). Postuluje się, że malonylacja, katalizowana przez *O*-malonylotransferazy, wpływa na transport flawonoidów do poszczególnych przedziałów komórkowych (Nakayama i in., 2003). Mechanizm transportu flawonoidów nie został jeszcze do końca poznany. Wiadomym jest, że transport przez błony biologiczne zachodzi przy udziale transporterów ABC. Jedną z podklas tej grupy transporterów są transportery MRP. Białka te umożliwiają transport glutationowych pochodnych flawonoidów (Lu i in., 1997, 1998). Być może, malonylacja glikozydu flawonoidu ma wpływ na jego przenoszenie przez transportery anionowe ABC typu MRP (Liu i in., 2006). Acylowane flawonoidy przenoszone są przez błony za pomocą transporterów MATE. Wykazano, że malonylacja odgrywa istotną rolę w transporcie flawonoidów w przypadku poddawanej stresowi lucerny (*M.truncatula*) (Zhao i in., 2011). Przedstawione w pracy doktorskiej badania wykazały obecność fitoaleksyn na powierzchni tkanki liściennej. Musiały one być zatem tam przetransportowane. Podwyższone poziomy malonylowanych izoflawonów w roślinach stresowanych, mogą świadczyć o istotnej funkcji w procesach obronnych rośliny przed patogenem, w tym również funkcji cząsteczek sygnalnych w procesach transportu produktów naturalnych w obrębie komórek czy tkanek.

5.2 Analiza strukturalna i profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych w liściach i korzeniach różnych gatunków łubinów meksykańskich w korelacji z gatunkami regionu śródziemnomorskiego

Łubin należy do powszechnie występującego rodzaju roślin z rodziny bobowatych (Fabaceae). Liczy od 200 do 500 gatunków, które wyewoluowały niezależnie na obszarze śródziemnomorskim (łubiny Starego Świata) oraz obu Ameryk (łubiny Nowego Świata)

(Aïnouche i in., 2004). Charakterystyczną cechą wszystkich gatunków łubinów jest obecność w komórkach i tkankach alkaloidów chinolizydynowych, których stężenie może się znacznie różnić pomiędzy odmianami. Alkaloidy chronią roślinę przed roślinożercami, pełnią również funkcje związków allelopatycznych w stosunku do kompetycyjnych roślin (Wink, 1993). Różnice pomiędzy poziomami zawartości alkaloidów w tkankach łubinów Starego i Nowego Świata są znaczące (Planchuelo-Ravelo i Wink, 1993). Na przestrzeni lat profile alkaloidów w różnych gatunkach łubinu zostały dokładnie określone (Hatzold i in., 1983; Planchuelo-Ravelo i in., 1993; El-Shazly, 2001; Lee i in., 2007). Z drugiej strony, obecne w łubinie w znacznej ilości związki fenolowe nie zostały tak dobrze poznane. Gatunki śródziemnomorskie zostały stosunkowo dokładnie przebadane pod kątem zawartości flawonoidów przy pomocy układów LC/MS (Bednarek i in., 2001, 2003; Kachlicki i in., 2005, 2008; Muth i in., 2008, 2009). Łubiny Ameryki Północnej scharakteryzowano jedynie w niewielkim stopniu w kwestii zawartości związków fenolowych (Kamel, 2003; García-López i in., 2006).

Celem realizowanych w ramach pracy doktorskiej badań, była analiza struktury i profili flawonoidów, obecnych w ekstraktach korzeni i liści różnych gatunków łubinów Starego Świata, w korelacji z gatunkami europejskimi. Eksperymenty przeprowadzono przy użyciu dwóch systemów LC/MS. Przeważająca część wyników dotyczyła wykorzystania układu UPLC sprzężonego z wysokorozdzielczym analizatorem Qq-ToF, który rejestrował stosunki m/z jonów protonowanych i deprotonowanych cząsteczek $[M+H]^+/[M-H]^-$, z dokładnością poniżej 5 ppm, dzięki czemu możliwe było precyzyjne określenie składów elementarnych badanych związków. Eksperymenty CID MS/MS pozwoliły na rozróżnienie licznych izomerów i izobarów związków fenolowych, w oparciu o różnice w widmach kolizyjnych protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek. Na tej podstawie możliwe było określenie rodzaju podjednostki cukrowej (heksoza, pentoza, deoksyheksoza), rodzaju glikozytacji (O,C,C/O), a w niektórych przypadkach również miejsca podstawienia cząsteczki cukrowej na pierścieniu aglikonu. Analiza widm fragmentacyjnych MS^2 pozwoliła również na określenie rodzaju podstawnika acylowego. Widma pseudo- MS^3 były niezastąpione przy określaniu struktury aglikonu glikozyłowanych cząsteczek, poprzez porównanie z dostępnymi standardami. W celu otrzymania informatywnych widm fragmentacyjnych konieczny był odpowiedni dobór energii kolizji w komorze kolizyjnej (CID) oraz w regionie szczelin ogniskujących w sektorze źródła jonów (ISCID). Przykład wpływu różnych wartości tych parametrów na rejestrowane widma przedstawia Ryc.5.2.



Ryc.5.2 Zależność intensywności powstałych jonów fragmentacyjnych od energii kolizji w komorze kolizyjnej (+ 10-30 eV), w wyniku fragmentacji MS/MS malonylowanego 4',7-O-glukozydu genisteiny (nr 27 w Tab.4.4). Analiza przeprowadzona została na aparacie microQq-ToF.

Sprzężenie układu LC/Qq-ToF-MS z systemem NanoMate pozwoliło na analizę *on-* i *off-line* wybranych frakcji związków fenolowych. Takie połączenie okazało się szczególnie pomocne podczas eksperymentów optymalizacyjnych oraz w analizach strukturalnych wybranych flawonoidów. Zidentyfikowane związki fenolowe zostały częściowo umieszczone

w międzynarodowej bazie danych widm masowych MassBank (Tab.S2) oraz w bibliotece utworzonej w programie DataAnalysis (Bruker) na potrzeby własne. Istnieje stosunkowo niewiele ogólnie dostępnych baz danych, zawierających widma masowe związków fenolowych rejestrowanych na analizatorze Qq-ToF. Wynika to z faktu średnio osiągalnej powtarzalności warunków prowadzonych analiz na różnych aparatach. Zgodnie z wytycznymi MSI (Metabolomics Standard Initiative) oraz Metabolomics Society, dąży się do wymiany zdobywanych informacji w dziedzinie metabolomiki i spektrometrii mas, w celu utworzenia jednej kompleksowej, ściśle znormalizowanej bazy danych widm masowych metabolitów pierwotnych i wtórnych (podobnej do bazy proteomicznej). Władze towarzystwa przewidują jednak, że proces ten zajmie jeszcze kilka lat.

Uzupełnieniem informacji, uzyskanych przy użyciu analizatora wysokorozdzielczego, były widma MSⁿ zarejestrowane w trybie jonów dodatnich i ujemnych na niskorozdzielczym analizatorze typu pułapka jonowa (IT). W wielu jednak przypadkach, uzyskane dane LC/MS nie pozwoliły na pełną charakterystykę strukturalną analizowanych związków. Do tego celu należałoby wykorzystać sprzężone techniki LC/NMR lub LC/MS/NMR (van der Hooft, 2011). Pomimo niezaprzeczalnych zalet takich układów, do których należy możliwość ustalenia jednoznacznej struktury badanych związków, częstym powodem rezygnacji z nich na rzecz układów LC/MS, jest złożoność składu analizowanych mieszanin, niewielkie stężenie badanych związków oraz wysoki koszt analiz.

Przed przystąpieniem do kompleksowej analizy profili związków fenolowych, obecnych w większej liczbie gatunków łubinu, przeanalizowano szczegółowo jeden z nich - *Lupinus reflexus* (Stobiecki i in., 2010). Zaobserwowano istotne różnice w składzie flawonoidów obecnych w korzeniach i liściach tego gatunku, w stosunku do łubinów Starego Świata. Spośród 62 scharakteryzowanych związków, wiele stanowiło izomery i izobary. Analiza aglikonów wykazała obecność genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny w stanie wolnym oraz w formie glikozylowanych i acylowanych pochodnych, podobnie jak w przypadku łubinów śródziemnomorskich. Zaobserwowano również obecność pochodnych luteonu oraz jego izomeru. Obecność luteonu potwierdzono poprzez porównanie uzyskanych widm fragmentacyjnych ze standardem, natomiast jako związek izomeryczny zaproponowano 2,3-dihydrokiewiton. Obydwa te związki zostały bowiem wyizolowane, jako wolne aglikony, z korzeni łubinu białego i żółtego (Ingham i in., 1983; Hashidoko i in., 1986). Nie obserwowano jednak ich obecności w postaci glikozylowanej w łubinach europejskich. Luteon oraz jego pochodne obecne były w tkankach liści łubinu wąskolistnego w związku z odpowiedzią na infekcję grzybem *C.lupini* (Muth i in., 2009). Dla aglikonu o masie 284 Da

zaproponowano, na podstawie dokładnej masy i składu elementarnego (przy braku standardu), strukturę biocyaniny A, która podobnie jak powyższe związki nie była dotąd raportowana w ekstraktach łubinu. Poza aglikonami izoflawonów, w tkankach *Lupinus reflexus* zaobserwowano także obecność chryzoeriolu, należącego do klasy flawonów.

Cząsteczką cukrową wchodzącą w skład pochodnych flawonoidów była jedynie glukoza, w przeciwieństwie do obserwowanych w łubinach regionu śródziemnomorskiego zarówno heksoz jak i deoksyheksoz oraz pentoz (Bednarek i in., 2001, 2003; Kachlicki i in., 2005; Muth i in. 2008, 2009). Heksoza obecna w *Lupinus reflexus* nie została zidentyfikowana jednoznacznie jako glukoza. Jej obecność zasugerowano na podstawie wcześniejszych identyfikacji w pochodnych flawonoidów występujących w łubinach europejskich (Frański i in, 1999a,b; Bednarek i in., 2001, 2003). Obserwowano mono- i di-glukozydy, występujące w przeważającej mierze, w formie *O*-, rzadziej *C*-pochodnych cukrowych. Glukozylowane flawonoidy acylowane były jedną lub dwiema grupami malonyłowymi. Najistotniejszą różnicą pomiędzy *L.reflexus* a zbadanymi dotychczas łubinami europejskimi, była obecność innych niż grupa malonylowa, pochodnych acylowych: estru metylowego kwasu malonowego, kwasu jabłkowego oraz jego metylowego estru. Grupy te przyłączone były bezpośrednio do szkieletu aglikonu lub poprzez cząsteczkę cukrową. Jest to pierwsze doniesienie o obecności tego typu podstawników flawonoidów w łubinie. Kwas malonowy raportowany był w połączeniach z antocyjaninami (Andersen i Markham, 2006) oraz glikozydami apigeniny i kemferolu w goździku (Fukui i in., 2003). Należy jednak zaznaczyć, że grupy acylowe zostały określone jedynie na podstawie masy obojętnego fragmentu (100, 116 i 130 Da) a ich struktura nie była zweryfikowana przy użyciu NMR, ze względu na zbyt małą ilość związku potrzebną do analizy.

Podobne podejście analityczne, podczas badań flawonoidów, zastosowano w przypadku większej liczby ekstraktów korzeni i liści łubinów. W tkankach 8 gatunków łubinów meksykańskich (*Lupinus elegans*, *L.exaltatus*, *L.hintonii*, *L.mexicanus*, *L.montanus*, *L.rotundiflorus*, *L.stipulatus*, *Lupinus sp.*), trzech obszaru basenu Morza Śródziemnego (*L.albus*, *L.angustifolius*, *L.luteus*) oraz jednego południowoamerykańskiego udomowionego na terenie Europy (*L.mutabilis*), zidentyfikowano 175 flawonoidów i izoflawonoidów oraz ich glikozylowanych pochodnych. W badanych próbkach jednoznacznie scharakteryzowano 13 aglikonów należących do 4 klas związków flawonoidowych: izoflawony, flawony, flawonole i flawanony. Poza raportowanymi już w postaci wolnej jak i glikozylowanej, genisteiną i 2'-hydroksygenisteiną, zaobserwowano obecność witeonu i luteonu oraz ich pochodnych w tkankach niemal wszystkich analizowanych gatunków łubinu. Stężenie

pochodnych witeonu i luteonu w tkankach łubinów europejskich było zdecydowanie niższe ale możliwe do wykrycia. Odnotowano również obecność czterech izomerów luteonu. Na podstawie raportowanych wcześniej przez Tharę i Ibrahima (1995), prenylowanych w pozycji C-5' oraz C-8 aglikonów o masie 354 Da, zaproponowano możliwość wystąpienia likoizoflawonu A oraz 2,3-dehydrokiewitonu. W postaci wolnych aglikonów obecne były również flawony, apigenina i kemferol (Bednarek i in., 2001, 2003; Muth i in., 2008, 2009). Po raz pierwszy zidentyfikowano w łubinie acacetynę, flawon występujący zarówno w postaci wolnej i glikozyłowanej jedynie w łubinach meksykańskich. Pozostałe aglikony luteolina, eriodiktioł, naringenina, izoramnetyna, kemferol i kwercetyna występowały jedynie w formie glikozyłowanych lub acylowanych pochodnych. Ponadto, zaobserwowano obecność aglikonu o masie 284 Da, który nie został zidentyfikowany, gdyż jego widma MS³ nie pokrywały się z żadnymi z posiadanych standardów o tej masie (acacetyna, prunetyna, bioczanina A). Nie potwierdzono natomiast obecności bioczaniny A w żadnym z badanych gatunków łubinu.

Pochodne cukrowe i acylowe występowały w badanych ekstraktach w wielu formach izomerycznych i izobarycznych. Zidentyfikowano mono-, di- i tri-glikozyłowane pochodne flawonoidów i izoflawonoidów. Podjednostki cukrowe, heksozy, pentozy lub deoksyheksozy, przyłączone były do aglikonu w pozycji 3, 4' lub 7, poprzez grupę hydroksylową lub bezpośrednio poprzez węgiel C-6 lub C-8. Grupy cukrowe (heksozy, pentozy i deoksyheksozy) zostały jednoznacznie zidentyfikowane jako glukoza, ksyloza i ramnoza (odpowiednio), w *O*-glikozyłowanych pochodnych obecnych w łubinach europejskich (Frański i in., 1999a,b; Bednarek i in., 2001, 2003). W przypadku łubinów meksykańskich, możemy jedynie sugerować wystąpienie tych samych podstawników cukrowych. Pozycja podstawienia grupy cukrowej *O*-glikozydów była niemożliwa do określenia, jedynie na podstawie analizy widm fragmentacyjnych. Charakterystyki strukturalnej *O*-glikozydów dokonywano poprzez porównanie otrzymanych widm masowych z widmami standardów i danymi literaturowymi. W przypadku *C*-monoglikozydów możliwe było rozróżnienie izomerów C-6 i C-8 w oparciu o porównanie intensywności względnych jonów E_i⁺ oraz E_i⁻ (odejście cząsteczki wody) (Waridel i in., 2001). Wyjątek stanowiły izomery *C*-glukozydu genisteiny, w przypadku których, przy braku różnic w widmach fragmentacyjnych dla obu związków, identyfikację przeprowadzono na podstawie czasów retencji (Kachlicki i in., 2005). Diglikozyłowane pochodne (*O,C,C/O*) rozróżniano na podstawie wzajemnych stosunków intensywności jonów Y₀^{+/-} i Y₁^{+/-}. Wiele glikozyłowanych związków acylowanych było pojedynczo lub podwójnie kwasem malonowym lub jego estrem. Nie zaobserwowano acylacji kwasem jabłkowym ani jego estrem, jak nastąpiło to w przypadku *L.reflexus*.

Na podstawie profili fenolowych metabolitów wtórnych zidentyfikowanych w korzeniach i liściach łubinów Starego i Nowego Świata przeprowadzono analizę taksonomiczną, która pozwoliła na wyodrębnienie dwóch grup roślin, różniących się istotnie pod względem zawartości flawonoidów i izoflawonoidów. Zaobserwowano różnice w sposobie glikozytacji i acylacji oraz w obecności aglikonów fenolowych, pomiędzy łubinami meksykańskimi oraz obszaru śródziemnomorskiego. Ksylozyloglukozydy chryzoeriolu występowały wyłącznie w liściach łubinu wąskolistnego, podczas gdy ramnozydy obecne były głównie w liściach łubinu żółtego. Pochodne acylowane estrem kwasu malonowego występowały wyłącznie w ekstraktach łubinów meksykańskich i były grupą związków wysoce różnicujących badane gatunki. Glikozylowane pochodne acetyny i luteoliny występowały prawie wyłącznie w ekstraktach łubinów meksykańskich, podczas gdy pochodne cukrowe izoramnetny i eriodiktiolu obecne były przede wszystkim, odpowiednio w liściach i korzeniach łubinu białego. Pochodne naringeniny zidentyfikowano głównie w tkankach *L.mutabilis*. Podobne wyniki uzyskano dla dwóch niezależnie przeprowadzonych eksperymentów. Na tej podstawie stwierdzić należy, że profile fenolowych metabolitów wtórnych stanowią dobrą podstawę do przeprowadzenia analizy chemotaksonomicznej.

5.3 Zastosowanie techniki LC/MS/MS do profilowania glikozylowanych flawonoidów w korzeniach siewek, korzeniach włósnikowatych i zawieszinowych hodowlach komórek korzeniowych modelowej rośliny motylkowatej *Medicago truncatula*

Medicago truncatula jest rośliną z rodziny bobowatych (motylkowatych-Fabaceae), która wyewoluowała z obszaru basenu Morza Śródziemnego. Powszechnie uprawiana jest w Australii z przeznaczeniem na paszę lub stosowana jako dodatek do żywności. Ze względu na niewielkie wymagania hodowlane, mały diploidalny genom oraz łatwość wprowadzania modyfikacji genetycznych, roślina ta stała się modelowym obiektem badań z zakresu genomiki funkcjonalnej (Cook, 1999). Szeroko wykorzystywana jest również w projektach badawczych dotyczących oddziaływań roślina-patogen (Farang i in., 2008), symbiozy z bakteriami brodawkowymi (Barker i in., 1990) czy też grzybami mikoryzowymi (Hassan i Mathesius, 2011). W oddziaływaniach tych ważną rolę pełnią flawonoidy, z tego też względu podejmowane są liczne prace badawcze, których przedmiotem jest analiza fenolowych metabolitów wtórnych w komórkach i tkankach *M.truncatula* (Farang i in., 2007, 2008, 2009; Jasiński i in., 2009; Wasson i in., 2009, Zhao i in., 2011). Najczęściej wykorzystywanymi do tego celu narzędziami są układy chromatograficzne sprzężone ze spektrometrami mas (Kapusta, 2009).

W przedłożonej pracy, na podstawie eksperymentów MS/MS i pseudo-MS³, przeprowadzonych na analizatorze Qq-ToF, zidentyfikowano 53 związki flawonoidowe, obecne w korzeniach siewek, korzeniach włośnikowatych i kulturach komórkowych *M.truncatula* (Staszków i in., 2011). Ze względu na brak części standardów oraz niedostateczne informacje strukturalne wynikające z analizy widm fragmentacyjnych, niektóre związki scharakteryzowano w oparciu o dane literaturowe (Broeckling i in., 2005; Kowalska i in., 2007; Farag i in., 2007, 2008, 2009; Jasiński i in., 2009; Marczak i in., 2010). Zaobserwowano różnice jakościowe i ilościowe, dotyczące profili flawonoidów, pomiędzy badanymi ekstraktami. Wiele spośród zidentyfikowanych aglikonów (Ryc.4.22) występowało w postaci wolnej w korzeniach włośnikowatych oraz kulturach komórkowych, przy czym najwyższe ich poziomy odnotowano dla pożywek. Wolnych aglikonów nie zaobserwowano dla ekstraktów korzeni siewek. Różnice te mogą wynikać z działania stresu abiotycznego podczas hodowli materiału (przeszczepianie na świeże pożywki) i ekstrakcji.

Wiele aglikonów obecnych było również w postaci glikozylowanej i acylowanej. Możliwość podstawienia cząsteczek cukrowych i acylowych w różnych pozycjach na szkielecie aglikonu, było przyczyną wystąpienia wielu izomerów i izobarów flawonoidów. Podstawniki cukrowe, glukoza i kwas glukuronowy, występowały w połączeniach z aglikonem w postaci mono- i di-glikozydów. Cząsteczki kwasu malonowego, ferulowego i kumarowego stanowiły podstawniki acylowe. Zastosowanie wysokorozdzielczego analizatora pozwoliło na rozróżnienie podstawnika w postaci kwasu ferulowego i kwasu glukuronowego (związki o tych samych masach nominalnych obojętnych fragmentów) na podstawie składów elementarnych i dokładnych mas protonowanych cząsteczek. Obecność glikozylowanych flawonoidów acylowanych kwasem ferulowym obserwowana była również wcześniej w ekstraktach z liści *M.truncatula* (Marczak i in., 2010). Izomery glukuronowych pochodnych flawonoidów stanowiły związki różnicujące badane ekstrakty. Obecność glukuronowych pochodnych zaobserwowano jedynie w tkankach korzeni siewek. Nie zidentyfikowano ich w korzeniach włośnikowatych oraz kulturach komórkowych. Glukuronowe pochodne genisteiny, luteoliny oraz daidzeiny nie były dotąd raportowane w ekstraktach korzeniowych z *M.truncatula* (Schliemann i in. 2008; Farag i in. 2007, 2008, 2009).

Różnice w składzie związków fenolowych (w szczególności wolnych aglikonów oraz ich glukuronowych i acylowanych pochodnych) pomiędzy ekstraktami korzeni siewek, włośnikowatych oraz kultur komórkowych, mogą być wynikiem odmiennej kontroli szlaku biosyntezy flawonoidów. Zmiany mogą wynikać z różnego charakteru próbek oraz warunków hodowli i wzrostu materiału. Izoflawonoidy były syntezowane w większej ilości w kulturach

komórkowych niż w korzeniach. Stopień glikozylacji glukozą i/lub kwasem glukuronowym oraz acylacji aglikonu był różny, w zależności od typu analizowanej tkanki. W korzeniach siewek glukuronowane aglikony acylowane były przeważnie kwasami aromatycznymi. Glukozylowane flawonoidy podstawiane kwasem malonowym obecne były zarówno w kulturach korzeni włośnikowatych oraz zawiesinach komórkowych. W większości przypadków malonylacji ulegały glukozydy izoflawonów. Związkami najistotniej różnicującymi analizowane ekstrakty, były glukuronowe pochodne izoflawonoidów acylowane kwasem ferulowym lub kumarowym. Występowały one jedynie w korzeniach siewek.

Należy zaznaczyć że analiza widm fragmentacyjnych w wielu przypadkach nie pozwoliła na określenie pełnej struktury badanych związków. Ze względu na niedostateczną liczbę standardów, nie zawsze możliwe było jednoznaczne określenie struktury aglikonu poprzez porównanie wzorców fragmentacji MS³. Typ podjednostki cukrowej oraz podstawników acylowych został określony na podstawie dokładnego stosunku m/z protonowanych cząsteczek. W celu określenia rodzaju podstawnika cukrowego (np. heksoza-glukoza) posłużono się również danymi literaturowymi. W wielu przypadkach nie było możliwe określenie pozycji podstawienia szkieletu aglikonu cząsteczką cukrową, podobnie jak określenie typu wiązań wewnątrzglikozydowych. W celu pełnej charakterystyki strukturalnej należałoby przeprowadzić analizę NMR.

5.4 Wykorzystanie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID) do analizy strukturalnej i profilowania flawonoidów obecnych w liściach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*)

Przy użyciu sprzężonych technik wysokosprawnej chromatografii cieczonej oraz spektrometrii mas z wysokorozdzielczym hybrydowym analizatorem Qq-ToF, możliwe było zaproponowanie 42 struktur flawonoidów obecnych w liściach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*). Ponad połowa z nich nie była dotąd raportowana w literaturze, w kontekście ich obecności w tkankach zbóż (Cummins i in., 2006; Ioset i in., 2007; Liu i in., 2010; Dinelli i in., 2011, Moheb i in., 2011) Analiza strukturalna związków fenolowych przeprowadzona została na podstawie widm MS, MS² i pseudo-MS³ zarejestrowanych zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych. Niezależnie przeprowadzone analizy pozwoliły na częściową charakterystykę strukturalną złożonej mieszaniny związków obecnych w badanych ekstraktach. Zidentyfikowano mono- di- i tri-glikozydy pięciu aglikonów flawonowych, apigeniny, chryzoeriolu, luteoliny, trycyny, trycetyny oraz eteru trimetylowego trycetyny. Struktury aglikonów określono jednoznacznie na podstawie porównania widm MS² dla

wolnych aglikonów oraz pseudo-MS³ dla *O*-glikozydów z widmami standardów. W przypadku *C*-glikozylowanych flawonów uzyskanie widma pseudo-MS³ aglikonu nie było możliwe. W takich przypadkach aglikon określano na podstawie dokładnego stosunku *m/z* analizowanych protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek. Również na tej podstawie określano typ podjednostki cukrowej (hekszoza, pentoza, deoksyhekszoza, kwas glukuronowy) oraz grupy acylowej (kwas malonowy, ferulowy, kumarowy). Dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczego analizatora możliwe było rozróżnienie cząsteczki cukru od grupy acylowej o tej samej masie obojętnego fragmentu (np. 162 Da dla heksozy oraz kwasu kumarowego, 176 Da dla kwasu glukuronowego oraz kwasu ferulowego). Wykorzystanie hybrydowego kwadrupola sprzężonego z analizatorem czasu przelotu, pozwoliło na określenie składów elementarnych badanych związków, z błędem poniżej 5 ppm-ów. Na podstawie wzoru fragmentacji widm CID MS/MS zarejestrowanych w trybie jonów dodatnich i ujemnych możliwe było określenie sposobu glikozylacji (*O*, *C*, *C/O*). W przypadku monoglikozydów, w oparciu o obecność i wzajemne stosunki intensywności jonów Y_0 , Y_1 oraz E_i wnioskowanie jest stosunkowo proste. Sytuacja komplikuje się podczas analizy fragmentacji diglikozydów. W wielu przypadkach na podstawie uzyskanych jonów fragmentacyjnych dla protonowanych i deprotonowanych cząsteczek glikozylowanych flawonoidów nie uzyskano jednoznacznej odpowiedzi w kwestii charakterystyki strukturalnej. Określenie miejsca podstawienia grup cukrowych do szkieletu aglikonu również często było niejednoznaczne, a w wielu przypadkach niemożliwe, szczególnie jeśli chodzi o *O*-glikozylację. Z tego też powodu, jedynie dla *O*-glikozydów trycyny i eteru metylowego trycetyny zaproponowano pozycję glikozylacji przy atomie węgla C-7, w oparciu o tworzoną zawadę przestrzenną i w związku z tym brak możliwości podstawienia grupy cukrowej na pierścieniu B. W przypadku *C*-monoglikozydów zaproponowano pozycję przyłączenia podstawnika cukrowego jako C-6 lub C-8, w oparciu o względne intensywności jonów E_i (Waridel i in., 2001). Podczas prowadzenia eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją należy zwracać uwagę na odpowiedni dobór parametrów energii kolizji, w celu uzyskania dobrej jakości informatywnych widm, pozwalających wyciągać wnioski dotyczące charakterystyki strukturalnej badanych związków. W celu pełnej i jednoznacznej analizy struktury związków obecnych w mieszaninach ekstraktów roślinnych konieczne jest ich wyizolowanie, oczyszczenie i poddanie analizie NMR. W badaniach metabolomicznych dotyczących identyfikacji związków z wykorzystaniem spektrometrii mas przyjęło się od niedawna określanie poziomów identyfikacji metabolitów (Tab.4.7) zgodnie z wytycznymi MSI (Sumner i in., 2007)

5.5 Wykorzystanie techniki spektrometrii mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją do analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych - aspekty metodyczne

Flawonoidy, ze względu na rolę jaką pełnią w roślinie oraz korzystny wpływ na zdrowie człowieka, stały się obiektem badań wielu grup badawczych (Middleton i in., 2000; Heim i in., 2002; Hodek i in., 2002; Veitch i Grayer, 2008). Badania metabolomiczne, dotyczące fenolowych metabolitów wtórnych, są niezbędnym narzędziem wykorzystywanym w biologii systemów, umożliwiającym poznanie złożonych oddziaływań i zależności zachodzących w systemach biologicznych. Analiza składu i struktury związków flawonoidowych daje możliwość wnioskowania w kwestii funkcji, jakie pełnią one w roślinie, podczas procesów odpornościowych, mechanizmów obronnych oraz adaptacyjnych. Badanie zmian w profilach fenolowych metabolitów wtórnych różnych gatunków i odmian roślin, wzrastających w odmiennych warunkach fitopatologicznych jest konieczne, w celu lepszego zrozumienia procesów biochemicznych i fizjologicznych zachodzących na poziomie komórkowym.

Jednak strukturalna analiza flawonoidów nie należy do zadań prostych, ze względu na złożony skład ekstraktów roślinnych. Wiele z tych naturalnych produktów to związki będące izomerami lub izobarami. Pomimo, iż posiadają one różny wzór podstawników glikozydowych, ich zbliżone właściwości fizykochemiczne utrudniają właściwy rozdział chromatograficzny. Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) pozwala na skuteczny rozdział izomerycznych związków fenolowych, obecnych w mieszaninach roślinnych. W trakcie prowadzonych badań wykorzystywano dwa układy chromatograficzne, umożliwiające pracę przy podwyższonych wartościach ciśnień (w granicach 600 barów). Parametry rozdziału zostały opracowane w oparciu o metodykę zaproponowaną do analizy związków fenolowych obecnych w ekstraktach łubinu wąskolistnego przez Muth (2010). W przypadku badanych mieszanin flawonoidów wyizolowanych z różnych gatunków i odmian roślin (łubin, pszenica, lucerna) konieczne były nieznaczne modyfikacje parametrów analiz LC. Testowano również różne kolumny chromatograficzne, które pozwoliły na uzyskanie komplementarnych danych. Poza spektrometrami mas stosowanymi jako analizatory w prowadzonych badaniach, pomocne były również detektory UV, pozwalające rozróżnić klasy flawonoidów na podstawie maksimów absorpcji promieniowania UV. Flawony posiadają dwa maksima absorpcji (przy długości fali równej 260 i 350 nm) natomiast izoflawony jedno (przy $\lambda=260$ nm) (Andersen i Markham, 2006).

Sprzężone techniki chromatografii cieczowej i spektrometrii mas są obecnie najczęściej wykorzystywane podczas profilowania i analizy strukturalnej fenolowych metabolitów

wtórnych obecnych w ekstraktach roślinnych. Pozwalają one na rozdział i identyfikację stosunkowo dużej ilości związków (Justesen i in., 1998; Lin i in., 2000; Gu i Gu, 2001; Klejduś i in., 2001; Waridel i in., 2001; Prasain i in., 2004; Wu i in., 2004; de Rijke i in., 2004, 2006; Stobiecki i Kachlicki, 2006; van der Hooft i in., 2011b). Najczęściej do tego celu wykorzystywane są spektrometry wyposażone w źródło typu elektrosprej (ESI), które pozwala na jonizację pod ciśnieniem atmosferycznym, w wyniku czego powstają protonowane lub deprotonowane cząsteczki. Analiza strukturalna może być prowadzona na podstawie analizy widm, zarejestrowanych na niskorozdzielczych analizatorach typu kwadrupol czy pułapka jonowa. Analizator czasu przelotu pozwala na uzyskanie wysokorozdzielczych widm masowych. Najczęściej jednak, w celach analizy strukturalnej badanych związków, wykorzystuje się tandemowe układy Qq-ToF lub Orbitrap. Pozwalają one na uzyskiwanie wysokorozdzielczych widm fragmentacyjnych.

W przedstawionych w rozprawie doktorskiej eksperymentach, stosowano dwa układy LC/MS do analizy związków fenolowych obecnych w ekstraktach roślinnych. Niskorozdzielczy spektrometr mas typu pułapka jonowa, pozwalał na przeprowadzenie eksperymentów MSⁿ. Przy wystąpieniu odpowiednio wysokiego stężenia badanego związku, możliwe było uzyskanie fragmentacji rzędu MS⁵, zazwyczaj jednak uzyskiwano fragmentację stopnia MS³. Widma takie były pomocne podczas analizy strukturalnej związków fenolowych i stanowiły uzupełnienie dla informacji, uzyskanych na podstawie widm zarejestrowanych na analizatorze Qq-ToF. Podstawowe narzędzie analityczne stanowił jednak układ LC/ESI/Qq-ToF-MS. Wysokorozdzielczy analizator pozwalał na prowadzenie eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją CID MS/MS i pseudo-MS³. Widma fragmentacyjne, rejestrowane zarówno w trybie jonów dodatnich [M+H]⁺ jak i ujemnych [M-H]⁻, przy różnych wartościach energii kolizji, pozwoliły wnioskować w kwestii struktury badanych związków.

W celu uzyskania informatywnych widm fragmentacyjnych konieczne było przeprowadzenie szeregu analiz, pozwalających na dobór odpowiednich parametrów energetycznych. Optymalizacji dokonywano wykorzystując do tego celu zarówno standardy flawonoidów jak i ekstrakty tkanek roślinnych, które analizowano metodą bezpośredniego nastrzyku oraz w układzie LC/MS. Należy podkreślić, że odpowiednie wartości energii kolizji były zależne zarówno od masy cząsteczkowej analizowanych związków jak i od ich właściwości fizykochemicznych. Z tego też względu właściwe eksperymenty fragmentacyjnie przeprowadzano wykorzystując tzw. *ramping*. Oznacza to, że widma nie były rejestrowane przy jednej energii kolizji, ale stosowano określone zakresy energetyczne. Wolne aglikony w celu fragmentacji wymagały bowiem zastosowania wyższych wartości energii kolizji niż ich

pochodne glikozyłowane lub acylowane. Wolne aglikony ulegały fragmentacji przy energii w granicach 25-30eV, przy czym różniły się nieznacznie stopniem fragmentacji w zależności od klasy. W trybie jonów ujemnych konieczne było zastosowanie wyższych wartości energetycznych niż w przypadku jonizacji dodatniej. Podczas analizy monoglikozydów średnia energia kolizji wynosiła 10-20 eV, w przypadku zastosowania jonizacji dodatniej. Wartości te zależały od klasy związku i sposobu glikozylacji. Dla *O*-glikozydów należało zastosować nieznacznie wyższą energię, niż w przypadku *C*-glikozydów. W celu określenia struktury aglikonów *O*-glikozyłowanych pochodnych, konieczne było dodatkowo zastosowanie podwyższonego potencjału energetycznego w źródle jonów (ISCID). Przyłożenie wysokiego napięcia w regionie szczelin ogniskujących pozwalało na rozpad pochodnych flawonoidowych do aglikonów, które następnie po izolacji w pierwszym kwadrupolu, ulegały fragmentacji w komorze kolizji w warunkach podwyższonej energii CID.

Z powyższych względów, w celu uzyskania informatywnych widm fragmentacyjnych dla wszystkich związków obecnych w badanych ekstraktach, każdą próbkę analizowano w 4 różnych programach energetycznych. Analizy MS/MS jonów dodatnich prowadzone były przy energii kolizji w granicach 15-30 eV oraz 30-35 eV dla jonów ujemnych. W celu określenia struktury aglikonów *O*-glikozyłowanych cząsteczek, eksperymenty ISCID prowadzono przy energii w źródle wynoszącej 80/85 eV oraz energii kolizji 20/25 eV (odpowiednio dla jonów dodatnich i ujemnych). Powyżej zaproponowane podejście pozwoliło na uzyskanie widm fragmentacyjnych, na podstawie których można było wnioskować o strukturze analizowanych związków.

Widma zidentyfikowanych metabolitów umieszczono w nowo utworzonej (w programie DataAnalysis, Bruker Daltonics), wewnętrznej bibliotece związków fenolowych (która została udostępniona firmie Bruker Daltonics i rozesłana zainteresowanym użytkownikom systemów Qq-ToF). I chociaż dostępnych jest obecnie wiele bibliotek widm masowych, korzystanie z nich bywa ograniczone, ze względu na problemy z uzyskaniem powtarzalnych i porównywalnych wyników. Przyczyną tego typu trudności jest brak standaryzacji warunków prowadzonych eksperymentów fragmentacyjnych przez niektóre grupy badawcze, rejestrujące widma z wykorzystaniem różnych analizatorów. Własna biblioteka z pewnością ułatwi przyszłe analizy związków. Uzyskane widma umieszczone zostały ponadto w międzynarodowej bazie widm masowych MassBank (<http://www.massbank.jp>). Pomimo faktu, iż powtarzalność widm masowych uzyskanych przy użyciu technik LC/MS jest znacznie niższa niż w przypadku analiz GC/MS, istnieje konieczność upowszechniania danych eksperymentalnych z zakresu metabolomiki. Ważne jest

aby prezentowane i udostępniane dane były jak najbardziej porównywalne, dlatego konieczne jest przestrzeganie zasad standaryzacji warunków prowadzonych analiz, zaproponowanych przez MSI, zarówno na etapie hodowli, ekstrakcji materiału, przygotowywania próbek oraz analiz metabolomicznych przy użyciu technik LC/MS i GC/MS (Keurentjes i in., 2006; Weckewerth, 2007; Goodacre i in., 2007; Sanson i in., 2007; Fiehn i in., 2007, 2008). Takie podejście zostało zastosowane na każdym etapie prowadzonych eksperymentów przedstawionych w niniejszej pracy.

Podczas analiz związków fenolowych układ LC/Qq-Tof-MS wykorzystywano również w sprzężeniu z systemem NanoMate firmy Advion. Urządzenie to, spełniające rolę nano-źródła, umożliwiło prowadzenie analiz z wykorzystaniem nano-przepływów, co jednak nie wpłynęło znacząco na poprawę czułości oraz rozdzielczości. Ponadto urządzenie pełniło rolę automatycznego kolektora frakcji wycieku chromatograficznego, dzięki czemu możliwe było prowadzenie analiz wybranych frakcji związków, bez konieczności ponownego nastrzyku mieszaniny. Analiza *off-line* umożliwiała przeprowadzenie eksperymentów kolizyjnych, dla wybranych związków, przy różnych wartościach parametrów energetycznych w stosunkowo krótkim czasie. Niestety ze względu na niewielkie stężenia badanych związków (μg), a co za tym idzie niskie intensywności powstałych jonów, nie zawsze istniała możliwość uzyskania zadowalającego widma masowego.

Na podstawie analizy wysokorozdzielczych widm fragmentacyjnych, możliwe jest uzyskanie informacji strukturalnych, dotyczących: struktury aglikonu, rodzaju podjednostki cukrowej (heksoza, deoksyheksoza, pentoza), typu wiązania między aglikonem a podstawnikiem cukrowym (*O*- lub *C*-glikozyłacja), typu wiązania wewnątrzglikozydowego, miejsca podstawienia cząsteczki cukrowej na szkielet aglikonu, rodzaju podstawnika acylowego (Waridel i in., 2001; Ferreres i in., 2004, 2008; Kachlicki i in., 2005; Stobiecki i Kachlicki, 2006; Vukics i Guttman, 2010; Abrankó i in., 2011). W prezentowanej pracy, struktury aglikonów obecnych w badanych ekstraktach roślinnych określono w oparciu o porównanie widm MS^2 i pseudo- MS^3 uzyskanych dla wolnych aglikonów oraz ich glikozydów z widmami standardów. Generalnie, klasę aglikonu możemy również wskazać na podstawie maksimów absorpcji światła UV. Istnieje ponadto możliwość wnioskowania co do struktury na podstawie charakterystycznych jonów fragmentacyjnych ${}^{i,j}\text{A}^+$ i ${}^{i,j}\text{B}^+$ (Ryc.1.14), powstających w wyniku rozerwania wiązania C-C pierścienia C (reakcja retro Dielsa-Aldera) w pozycjach 1/3, 0/2, 0/3, 0/4 lub 2/4 cząsteczki aglikonu. Wzór fragmentacji aglikonu zależy od klasy flawonoidu i odpowiednio dobranej energii kolizji (około 30eV). W wyniku fragmentacji flawonoli, w trybie jonów dodatnich, powstają charakterystyczne jony ${}^{0,2}\text{A}^+$, ${}^{0,2}\text{A}^+$

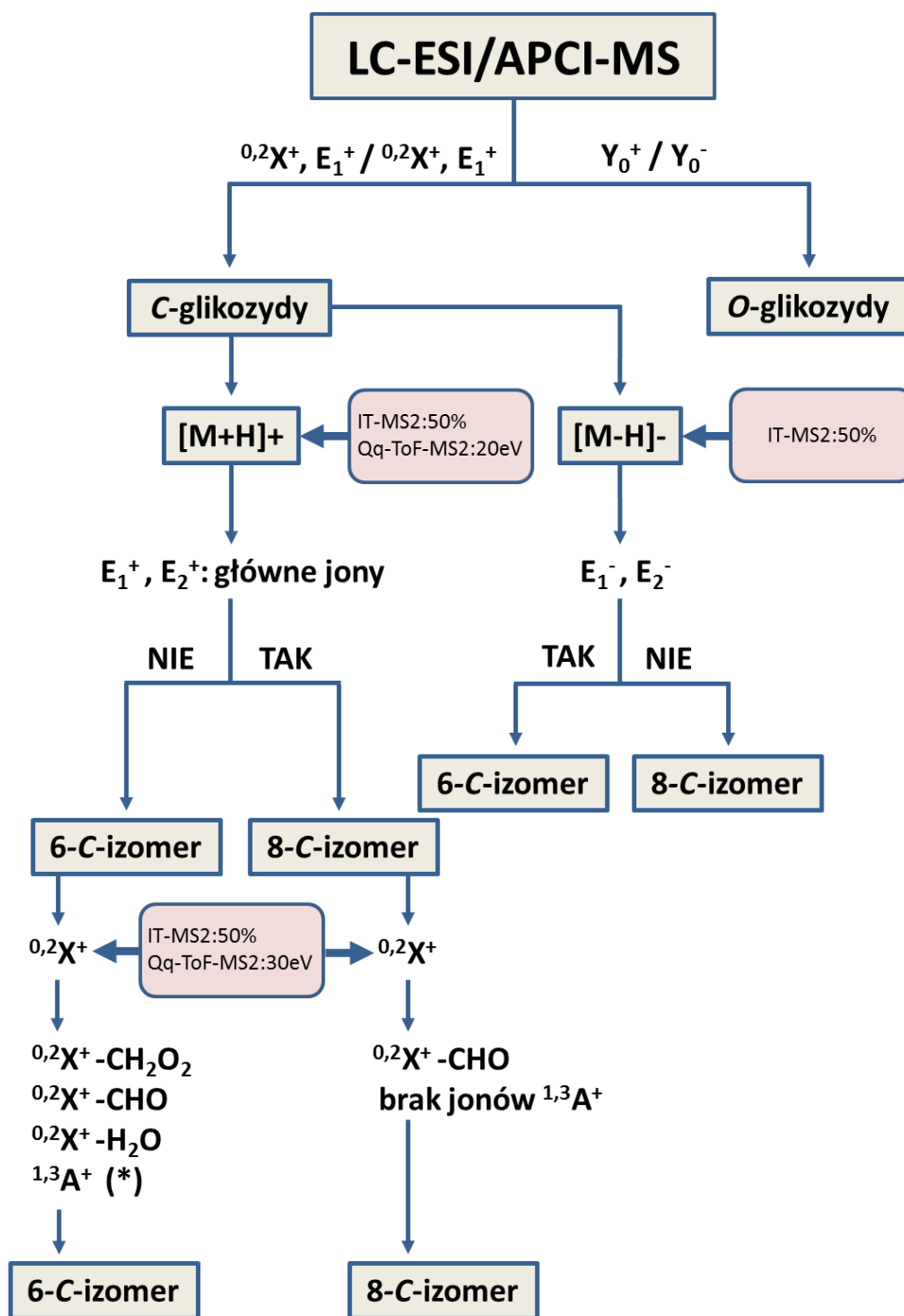
- CO, $^{1,4}A^+$ + 2H, $^{1,3}B^+$ - 2H, natomiast rozpad flawonów prowadzi do powstania fragmentów $^{1,3}B^+$, $^{0,4}B^+$, $^{0,4}B^+$ - H₂O. Analiza widm fragmentacyjnych aglikonów, zarejestrowanych w trybie jonów ujemnych, wymaga stosowania wyższej energii kolizji. Pomimo wyższej czułości widma takie są trudniejsze do interpretacji. Charakterystycznym jonom powstającym w wyniku fragmentacji jest $^{-1,3}A^-$, przy czym dla izoflawonów obserwujemy fragment $^{0,3}B^-$ (Cuyckens i Claves, 2004). Należy przy tym pamiętać, że stopień hydroksylacji pierścienia B aglikonu ma istotny wpływ na jego fragmentację. W przypadku fragmentacji w trybie jonów ujemnych obserwujemy również charakterystyczne jony rodnikowe. Inny wzór fragmentacji niż w trybie jonów dodatnich umożliwia uzyskanie komplementarnych informacji.

Na podstawie charakterystycznych jonów fragmentacyjnych, uzyskanych w trybie jonów dodatnich i ujemnych, możliwe jest również określenie miejsca podstawienia cząsteczki cukrowej na szkielecie aglikonu, poprzez grupę hydroksylową lub bezpośrednio przez węgiel C-6/C-8 (glikozylacja typu *O,C,C/O*). Należy podkreślić, że stosunkowo łatwe jest wnioskowanie o lokalizacji grupy cukrowej w przypadku monoglikozydów. Sytuacja komplikuje się wraz ze wzrostem liczby podjednostek cukrowych. W przypadku *O*-glikozydów, w wyniku przyłożenia małej lub średniej energii kolizji, dochodzi do pęknięcia wiązania hemi-acetalowego O-C i powstania charakterystycznych jonów Y_i . Dla *C*-glikozydów, niska energia kolizji jest niewystarczająca, średnia energia kolizji powoduje natomiast pękanie wiązań wewnątrz pierścienia cukrowego lub utratę cząsteczek wody. W tej sytuacji powstają charakterystyczne fragmenty: $^{i,j}X_i$ oraz E_i . W przypadku *C,O*-glikozydów powstają zarówno jony $^{i,j}X_i$ jak i Y_i . W prezentowanej pracy określenie różnicy między *O* i *C*-glikozylacją nie sprawiało problemów. W niektórych przypadkach stosunkowo trudne było określenie rozmieszczenia grup cukrowych w przypadku diglikozydów. Informacje uzyskane z analizy widm rejestrowanych w trybie jonów dodatnich i ujemnych bywały niejednoznacznie i nie zawsze pokrywały się z danymi literaturowymi. Może to świadczyć o fakcie, że wraz ze wzrostem skomplikowania struktury cząsteczki rośnie możliwość przebiegu fragmentacji według różnych mechanizmów. Związane jest to również z dużą liczbą izomerów obecnych w analizowanych próbkach. W teorii różnice między *di-O*-, *O-di*- oraz *O,C*-glikozydami można wskazać na podstawie analizy intensywności jonów fragmentacyjnych Y_1 , Y_0 , Z_1 oraz charakterystycznych jonów rodnikowych. Typ jednostki cukrowej (heksoza, deoksyheksoza, pentoza) określa się na podstawie charakterystycznych fragmentów X_i , Y_i , Z_i (Vukics i Gutman, 2010). W przypadku *O*-glikozylacji obserwowano obojętne fragmenty -162, -146, -132, -176 Da, odpowiadające heksozie, deoksyheksozie, pentozie oraz kwasowi glukuronowemu. Z kolei dla *C*-glikozydów typ podstawnika

cukrowego określano na podstawie wartości m/z protonowanych i deprotonowanych cząsteczek. Ponadto, wysokorozdzielczy analizator umożliwił określenie wartości m/z powstających jonów $[M+H]^+/[M-H]^-$ z dokładnością poniżej 5 ppm-ów. Uzyskane wartości mieściły się przeważnie w granicach 1-3 ppm-ów, dzięki czemu możliwe było rozróżnienie podstawnika cukrowego od acylowego, na podstawie odczytanego składu elementarnego jonów.

Największy problem stanowiło określenie miejsca podstawienia cząsteczki cukrowej, w oparciu o analizę widm fragmentacyjnych zarejestrowanych zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych. W przypadku *C*-glikozydów pozycję podstawienia cukru na szkielecie aglikonu, C-6 lub C-8, wskazano w oparciu o algorytm zaproponowany przez Waridela i współpracowników (2001) (Ryc.5.3). Jedynie w przypadku izomerów *C*-glukozydu genisteiny model ten się nie sprawdzał. Schematy fragmentacji dla obydwu izomerów wyglądały identycznie. Z tego też powodu izomeryczne związki scharakteryzowano na podstawie czasów retencji (Kachlicki i in., 2005). Znacznie trudniej było określić pozycję *O*-glikozylacji, C-3, C-7, lub C-4'. W przypadku izoflawonów *O*-glikozylacja zachodzi najczęściej w pozycjach C-7 oraz C-4'. Jednak na podstawie analizy widm fragmentacyjnych zarejestrowanych na analizatorze Qq-ToF trudno jest jednoznacznie określić pozycję podstawienia cząsteczki aglikonu podjednostką cukrową.

W celu rozwiązania problemów, związanych z określeniem miejsca podstawienia cukrów na aglikonie, przeprowadzono analizy kompleksów glikozylowaniach flawonoidów z kationami metali dwuwartościowych (Cu^{2+} , Mg^{2+}) (Davis i Brodbelt, 2004) oraz srebra (Ag^+) (Zhang i Brodbelt, 2005). Jony potomne kompleksów, rejestrowane w wyniku eksperymentów CID na analizatorze Qq-ToF, nie pozwoliły na rozróżnienie izomerów glikozylowanego aglikonu luteoliny. Eksperyment z wykorzystaniem kompleksów z jonami magnezu powtórzono przy wykorzystaniu analizatora typu pułapka jonowa. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia otrzymano jony diagnostyczne (według Davis i Brodbelt, 2004), na podstawie których możliwe było rozróżnienie badanych izomerów. Przeprowadzony eksperyment wskazuje na fakt, że uzyskana fragmentacja dla kompleksów flawonoidów z kationami metali w eksperymentach CID, jest w dużym stopniu zależna od rodzaju stosowanego analizatora w spektrometrze mas.



(*) obserwowane głównie na analizatorze Qq-ToF

Ryc.5.3 Algorytm identyfikacji izomerycznych C-glikozydów flawonoidów na podstawie widm CID MS/MS (według Waridel i in., 2001).

Wykorzystanie układów chromatograficznych w sprzężeniu ze spektrometrami mas, pozwala na prowadzenie na szeroką skalę profilowania metabolitów obecnych w próbkach biologicznych. Przy zastosowaniu odpowiedniego podejścia metodycznego, podczas prowadzonych eksperymentów dotyczących fragmentacji badanych związków, możliwe jest

uzyskanie informacji odnośnie struktury analizowanych metabolitów. Niezaprzeczalnym faktem jest przewaga specyficzności analiz wykonywanych przy użyciu magnetycznego rezonansu jądrowego nad spektrometrem masowym. Jednak ze względu na wysokie koszty analizy NMR, konieczność dostarczenia próbki w formie wysoce oczyszczonej i w stosunkowo wysokiemu stężeniu, spektrometry mas pozostają najczęściej wykorzystywanymi analizatorami podczas badań metabolomicznych dotyczących profilowania i identyfikacji związków fenolowych (Cuyckens and Claeys, 2004; van der Hooft, 2011). W związku z powyższym konieczne jest prowadzenie eksperymentów związanych z możliwościami wykorzystania technik spektrometrii mas do analizy szerokiej gamy produktów naturalnych.

VI. WNIOSKI

1. Na podstawie analizy związków fenolowych, obecnych w ekstraktach materiału roślinnego różnego pochodzenia (łubin, lucerna, pszenica) wykazano, że zastosowanie wysokorozdzielczych technik spektrometrii mas pozwala na uzyskanie precyzyjnych informacji na temat składu elementarnego badanych cząsteczek oraz istotnych informacji strukturalnych.
2. Opracowane podejście metodyczne prowadzenia eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją, CID MS/MS oraz pseudo-MS³, pozwoliło na identyfikację i charakterystykę strukturalną fenolowych metabolitów wtórnych obecnych w ekstraktach roślinnych.
3. Wykorzystanie eksperymentów pseudo-MS³ było szczególnie pomocne podczas rozróżniania licznych izomerów i izobarów flawonoidów, występujących w próbkach materiału roślinnego.
4. Dzięki wykorzystaniu dwóch systemów, LC/MS i GC/MS, możliwe było przeprowadzenie kompleksowych analiz ilościowych i jakościowych zmian w poziomach fenolowych metabolitów wtórnych, występujących w tkankach łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) w odpowiedzi na infekcję lub/i elisytację patogennym grzybem (*Colletotrichum lupini*) lub/i toksyną grzybową.
5. Odpowiedź łubinu wąskolistnego na infekcję lub/i elisytację, przejawia się w obecności antybiotycznych metabolitów wtórnych, zarówno w komórkach tkanek jak i na powierzchni liścia, co wskazuje na sprawne funkcjonowanie systemu odpornościowego rośliny.
6. W zależności od sposobu przeprowadzonej infekcji lub/i elisytacji patogennym grzybem lub/i jego toksyną, roślina uruchamia różne mechanizmy obronne, przejawiające się w poziomie syntezy i akumulacji fenolowych metabolitów wtórnych oraz zmianami w poziomie ekspresji genów szlaku ich biosyntezy.
7. Elisytacja łubinu poprzedzająca proces infekcji wywołuje intensyfikację odpowiedzi obronnej rośliny, przejawiającej się we wzroście poziomu syntezy metabolitów wtórnych wykazujących działanie antybiotyczne wobec infekującego patogena.
8. Wykazano znaczący udział prenylowanych izoflawonów oraz ich pochodnych w procesach obronnych łubinu przed infekcją lub/i elisytacją patogennym grzybem lub/i jego toksyną.

9. Wykazano udział procesu acylacji kwasem malonowym fenolowych metabolitów wtórnych w procesach związanych z patogenezą.

10. Profile związków fenolowych obecnych w tkankach różnych gatunków łubinu, określone przy wykorzystaniu technik spektrometrii mas, stanowią dobrą podstawę do przeprowadzenia analizy chemotaksonomicznej.

11. Wykazano istnienie istotnych różnic w składzie połączeń flawonoidowych, występujących w tkankach korzeni siewek *Medicago truncatula* oraz w tkankach wyprowadzonych przy wykorzystaniu metod biotechnologicznych (korzenie włośnikowate, korzeniowe kultury komórkowe). Świadczy to o wpływie sposobu prowadzenia hodowli tkanki korzeniowej na poziom aktywacji i akumulacji fenolowych metabolitów wtórnych.

VII. STRESZCZENIE

W ramach przedłożonej pracy doktorskiej przeprowadzono badania z zakresu wykorzystania technik spektrometrii mas, w szczególności eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją, CID MS/MS oraz pseudo-MS³, do analizy strukturalnej i profilowania związków fenolowych obecnych w złożonych ekstraktach roślinnych. Materiał biologiczny stanowiły korzenie i liście różnych gatunków łubinu, tkanki korzeniowe modelowej rośliny *Medicago truncatula* oraz liście pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*).

Nadrzędnym celem prac doświadczalnych było opracowanie metodyki prowadzenia eksperymentów CID MS/MS oraz pseudo-MS³, pozwalającej na uzyskanie istotnych informacji dotyczących charakterystyki strukturalnej badanych związków.

Zoptymalizowane podejście metodyczne prowadzenia eksperymentów, wykorzystano podczas badań nad rolą, jaką pełnią fenolowe metabolity wtórne podczas infekcji lub/i elisytacji różnych odmian łubinu patogennym grzybem *C.lupini* lub/i jego toksyną. Do badań jakościowych i ilościowych zostały wykorzystane sprzężone układy chromatografii cieczowej i gazowej z detektorami mas (LC/ESI/MS/MS i GC/MS). Poziomy metabolitów wtórnych zostały określone zarówno w ekstraktach z części zielonych łubinów jak i na powierzchni liści. W zależności od sposobu przeprowadzonej infekcji lub/i elisytacji patogennym grzybem lub/i jego toksyną, roślina uruchamia różne mechanizmy obronne, przejawiające się w poziomie syntezy i akumulacji fenolowych metabolitów wtórnych oraz ekspresji genów szlaku ich biosyntezy. Wykazano także udział prenylacji oraz acylacji kwasem malonowym izoflawonów oraz ich pochodnych w procesach związanych z patogenezą.

Ponadto w ramach pracy doktorskiej prowadzone były badania z zakresu analizy strukturalnej i profilowania fenolowych metabolitów wtórnych w ekstraktach tkankowych z niebadanego dotychczas materiału roślinnego. Zastosowanie dwóch układów LC/MS: z niskorozdzielczym analizatorem typu pułapka jonowa oraz wysokorozdzielczym podwójnym kwadrupolem sprzężonym z analizatorem czasu przelotu, pozwoliło na zidentyfikowanie 175 flawonoidów, obecnych w korzeniach i liściach ośmiu gatunków łubinów meksykańskich (*Lupinus elegans*, *L.exaltatus*, *L.hintonii*, *L.mexicanus*, *L.montanus*, *L.rotundiflorus*, *L.stipulatus*, *Lupinus sp.*), trzech gatunków obszaru śródziemnomorskiego (*L.albus*, *L.angustifolius*, *L.luteus*) oraz jednego Północnoamerykańskiego uprawianego powszechnie w Europie (*L.mutabilis*). Zaobserwowano istotne różnice w składzie związków fenolowych pomiędzy poszczególnymi gatunkami i na tej podstawie przeprowadzono analizę chemotaksonomiczną.

Przeprowadzono również badania z zakresu wykorzystania technik tandemowej spektrometrii mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (CID MS/MS) do profilowania i analizy strukturalnej związków fenolowych obecnych w korzeniach włośnikowatych, korzeniach siewek oraz zawieszinowych kulturach komórkowych modelowej rośliny *Medicago truncatula* a także w liściach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*). Przy użyciu opracowanych wydajnych metod analizy MS² i pseudo-MS³ zidentyfikowano odpowiednio 53 i 41 pochodnych flawonoidowych, spośród których wiele stanowiło izobary i izomery różniące się wzorem podstawników glikozydowych i acylowych. Uzyskane widma masowe wybranych związków umieszczono w międzynarodowej bazie danych MassBank.

ABSTRACT

The subject of doctoral thesis was usage of mass spectrometry techniques, in particular experiments with collision induced dissociation, CID MS/MS and pseudo-MS³, for structural analysis and profiling of phenolic compounds present in complex plant extracts. The roots and leaves of various lupine species, root tissues of model plant *Medicago truncatula* as well as leaves of wheat (*Triticum aestivum*), were used as biological material.

The primary objective of the experimental work was to develop a methodology for conducting CID MS/MS and pseudo-MS³ experiments, which allowed to obtain relevant information about the structural characteristics of the studied compounds.

Optimized methodological approach was used in the study about the role of phenolic secondary metabolites during infection or/and elicitation of different lupine varieties with pathogenic fungus *C.lupini* or/and its toxin. For qualitative and quantitative analysis, liquid and gass chromatographic systems coupled with mass detectors (LC/ESI/MS/MS and GC/MS) has been used. The levels of secondary metabolites has been identified in extracts from both the green parts and on the leaf surface of lupine. Depending on the way of infection or/and elicitation by pathogenic fungus or/and its toxin, the plant triggers a variety of defense mechanisms, as evidenced by the level of synthesis and accumulation of phenolic secondary metabolites and gene expression. Furthermore, the contribution of prenylation and malonic acid acylation of isoflavones derivatives in the process of pathogenesis has been shown.

Moreover, structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites in tissue extracts from unknown plant material were carried out. The use of two LC/MS systems, low-resolution ion trap instrument and high-resolution quadrupole-time of flight spectrometer, allowed the identification of 175 flavonoids present in roots and leaves of eight Mexican species of lupine (*Lupinus elegans*, *L.exaltatus*, *L.hintonii*, *L.mexicanus*, *L.montanus*, *L.rotundiflorus*, *L.stipulatus*, *Lupinus sp*), three of the Mediterranean species (*L.albus*, *L.angustifolius*, *L.luteus*) and one species from South America, cultivated in Europe (*L.mutabilis*). On the basis of significant differences in the composition of the phenolic compound between different species chemotaxonomic analysis was carried out.

Additionally, study on the usage of tandem mass spectrometry techniques with collision induced dissociation (CID MS/MS) for profiling and structural analysis of phenolic compounds present in hairy roots, seedling roots and suspension cell cultures of model plant *Medicago truncatula* as well as in the leaves of wheat (*Triticum aestivum*) was carried out. Using developed, efficient methods of MS² and pseudo-MS³ analysis, 53 and 41 flavonoids

respectively, were identified. Many of them were isobaric and isomeric compounds with different pattern of glycosyl and acyl substituents. The obtained mass spectra for selected compounds were placed in international data base MassBank.

VIII. LITERATURA

Abrankó L., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A., (2011) In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46, 478-488.

Aïnouche A., Bayer R.J., Misset M.-T., (2004) Molecular phylogeny, diversification and character evolution in *Lupinus* (Fabaceae), with special attention to Mediterranean and African lupines. *Plant Systematics and Evolution*, 246, 211-222.

Akashi T., Sasaki K., Aoki T., Ayabe S., Yazaki K., (2009) Molecular Cloning and Characterization of a cDNA for Pterocarpan 4-Dimethylallyltransferase Catalyzing the Key Prenylation Step in the Biosynthesis of Glyceollin, a Soybean Phytoalexin1. *Plant Physiology*, 149, 683-693.

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

Allwood J.W., Goodacre R., (2010) An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical Analysis*, 21, 33-47.

Andersen, Ø.M., Markham, K.R., (2006) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, New York,.

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

Baker M., (2011) Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nature Methods*, 8, 117-121.

Barker D.G., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Essad S., Flament P., Gallusci P., Génier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Dénarié J., Huguet T., (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8, 40-49.

Bedair M., Sumner L.W. (2008) Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 238-250.

Bednarek P., Franski 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. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 1127-1142.
- Bird A.E., Marshall A.C., (1969) Structure of chlorflavonin. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 19, 2418-2420.
- Birt D.F., Hendrich S., Wang W., (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90, 157-77.
- Bohm B.A., (1975) Chalcones, aurones and dihydrochalcones. *The Flavonoids*. Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry H. (Red.), Chapman & Hall, Londyn, 442-504.
- Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Bécard G., Rosenberg C., Barker D.G., (2001) Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14, 693-700.
- Bristow A.W.T., Webb K., (2003) Intercomparison study on accurate mass measurements of small molecules in mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14, 1086-1098.
- Broeckling C.D., Huhman D.V., Farag M.A., Smith J.T., May G.D., Mendes P., Dixon R.A., Sumner L.W., (2005) Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 56, 323-336.
- Brown M.H., Paulsen I.T., Skurray R.A., (1999) The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular Microbiology*, 31, 394-395.
- Cao J., Xia X., Chen X., Xiao J., (2013) Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 242-250.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J., (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124, 803-814.
- Churchwell M., Twaddle N., Meeker L., Doerge D.R., (2005) Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 825, 134-143.
- Cook D., (1999) *Medicago truncatula* — a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 301-304

- Cook D., Fowler S., Fiehn O., Thomashow M.F., (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15243-15248.
- Cornwell T., Cohick W., Raskin I., (2004) Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65, 995-1016.
- Creelman R.A., Mullet J.E., (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4114-4119.
- Cummins I., Brazier-Hicks M., Stobiecki M., Frański R., Edwards R., (2006) Selective disruption of wheat secondary metabolism by herbicide safeners. *Phytochemistry*, 67, 1722-1730.
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J., (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- Cuyckens F., Claeys M., (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 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, *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 364-372.
- Cuyckens F., Ma Y.L., Pocsfalvi G., Claeys M., (2000) Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. *Analisis*, 28, 888-895.
- Dangl J.L., Dietrich R.A., Richberg M.H., (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, 8,793-807.
- Davis B.D., Brodbelt J.S., (2004) Determination of the Glycosylation Site of Flavonoid Monoglucosides by Metal Complexation and Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15, 1287-1299.
- De Hoffmann E., Stroobant V., (2007) Mass Spectrometry/Chromatography Coupling. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. De Hoffmann E., Stroobant V. (Red.) John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, 217-232.
- de Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T., (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112,31-63.

de Rijke E., Zappey H., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A., (2004) Flavonoids in Leguminosae: analysis of extracts of *T.pratense* L., *T.dubium* L., *T.repens* L., and *L.corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 995-1006.

Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D., (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26, 51-78.

de Vos R., Moco S., Lommen A., Keurentjes J.J.B., Bino R., Hall R. (2007) Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature. Protocols*, 2, 778-791.

Devaux P.G., Horning M.G., Horning E.C., (1971) Benzyl-oxime derivative of steroids; a new metabolic profile procedure for human urinary steroids. *Analytical Letters*, 4, 151-161.

Dinelli G., Segura-Carretero A., Di Silvestro R., Marotti I., Arraez-Roman D., Benedettelli S., Ghiselli L., Fernandez-Gutierrez A., (2011) Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1218, 7670-7681.

Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C.J., (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 479-501.

Dixon R.A., Paiva N.L., (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7, 1085-1097.

Dixon R.A., Sumner L.W., (2003) Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology*, 131, 878-885.

Dixon R.A., Steele C.L., (1999) Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4, 394 - 400.

Dodds P.N., Rathjen J.P., (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 539-548.

Domon B., Costello C.E., (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5, 397-409.

Du H., Huang Y., Tang Y., (2010) Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1293-1312.

Dunn W.B., Ellis D.I., (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 285-294.

- Durrant W.E., Dong X., (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185-209.
- El-Shazly, A., Ateya, A.M., Wink, M., (2001). Quinolizidine alkaloid profiles of *Lupinus varius orientalis*, *L.albus albus*, *L.hartwegii*, and *L.densiflorus*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 56c, 21-30.
- Enkerli J., Bhatt G., Covert S.F., (1998) Maackiain detoxification contributes to the virulence of *Nectria haematococca* MP VI on chickpea. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 11, 317-326.
- Enyedi A.J., Yalpani N., Silverman P., Raskin I. (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell*, 70, 879-886.
- Farag M.A., Deavours B.E., de Fatima A., Naoumkina M., Dixon R.A., Sumner L.W., (2009) Integrated metabolite and transcript profiling identify a biosynthetic mechanism for hispidol in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiology*, 151, 1096-1113.
- Farag M.A., Huhman D.V., Dixon R.A., Sumner L.W., (2008) Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiology*, 146, 387-402.
- Farag M.A., Huhman D.V., Lei Z., Sumner L.W., (2007) Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC–UV–ESI–MS and GC–MS. *Phytochemistry*, 68, 342-354.
- Ferrerres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A., (2004) Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- nad pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 312-321.
- Ferrerres F., Valentão P., Pereira J.A., Bento A., Noites A., Seabra R.M., Andrade P.B., (2008) HPLC-DAD-MS/MS-ESI screening of phenolic compounds in *Pieris brassicae* L. reared on *Brassica rapa* var. *rapa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 844-853.
- Fiehn O., (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 48, 155-171.
- Fiehn O., Robertson D., Griffin J., van der Werf M., Nikolau B., Morrison N., Sumner L.W., Goodacre R., Hardy N.W., Taylor C., Fostel J., Kristal B., Kaddurah-Daouk R., Mendes P., van Ommen B., Lindon J.C., Sansone S.A., (2007) The metabolomics standards initiative. *Metabolomics*, 3, 175-178.

- Fiehn O., Wohlgemuth G., Scholz M., Kind T., Lee D.Y., Lu Y., Moon S., Nikolau B., (2008) Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *MSI*, 53,691-704.
- Fisher R.F., Long, S.R., (1992) *Rhizobium*–plant signal exchange. *Nature*, 387, 655-660.
- Flor H.H., (1971) Current status of the gene-for-gene interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 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 Biochimica Polonica*, 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. *Journal of Mass Spectrometry*, 34, 486-495.
- Frison-Norrie S., Sporns P., (2002) Identification and Quantification of Flavonol Glycosides in Almond Seedcoats Using MALDI-TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2782-2787.
- Fukui Y., Tanaka Y., Kusumi T., Iwashita T., Nomoto, K., (2003) A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry*, 63, 15–23.
- García-López P. M., Kachlicki P., Zamora-Natera F., Ruiz-Moreno J., Stobiecki M., (2006) Profiling isoflavone conjugates in different organs of *Lupinus exaltatus* Zucc. *Phytochemical Analysis*, 17, 184-191.
- Gaxiola R.A., Fink G.R., Hirschi K.D., (2002) Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiology*, 129, 967-973.
- Glinski M., Weckwerth W., (2006) The role of mass spectrometry in plant systems biology. *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 173-214.
- Go E.P., (2010) Database Resources in Metabolomics: An Overview. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5, 18-30.
- Gomez-Gomez L., Boller T., (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 5, 1003-1011.
- Gomez-Gomez L., Boller T., (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7, 251-256.

Goodacre R., Broadhurst D., Smilde A.K., Kristal B.S., Baker J.D., Beger R., Bessant C., Connor S., Capuani G., Craig A., Ebbels T., Kell D.B., Manetti C., Newton J., Paternostro G., Somorjai R., Sjoström M., Trygg J., Wulfert F., (2007) Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics*, 3, 231-241.

Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W.B., Harrigan G.G, Kell D.B., (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*, 22, 245-252.

Gower J.C., (1985) Measures of similarity, dissimilarity and distance. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. Kotz S., Johnson N.L., Read C.B. (Red.), John Wiley & Sons, Inc, Nowy Jork, 397-405.

Górecki T., Harynuk J., Panić O., (2004) The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC). *Journal of Separation Science*, 27, 359-379.

Greenberg J.T., (1997) Programed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 48, 525-545.

Gu L., Gu W., (2001) Characterization of soy isoflavones and screening for novel malonyl glycosides using high performance liquid chromatography electrospray ionisation-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 12, 377-382.

Hahlbrock K., Scheel D., (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 347-369.

Halket J.M., Waterman D., Przyborowska A.M., Patel R.K.P., Fraser P.D., Bramley P.M., (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*, 56, 219-243.

Hamm G., Carré V., Poutaraud A., Maunit B., Frache G., Merdinoglu D., (2010) Determination and imaging of metabolites from *Vitis vinifera* leaves by laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 335-342.

Harborne J.B., Williams C.A., (2000) Advances in favonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Harrison M.J., Dixon R.A., (1993) Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6, 643-654.

Hashidoko Y., Tahara, S., Mizutani, (1986) Isoflavonoids of yellow lupin, Part 1. New complex isoflavones in the roots of yellow lupin (*Lupinus luteus* L. ev. Baprine). *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 1797-1807.

Hassan S., Mathesius U., (2012) The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3429-3444.

Hatzold T., Elmadfa I., Gross R., Wink M., Hartmann T., Witte L., (1983) Quinolizidine Alkaloids in Seeds of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 934-930.

He J., Ruan Y., Straney D., (1996) Analysis of determinants of binding and transcriptional activation of the pisatin-responsive DNA binding factor of *Nectria haematococca*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 9, 171-179.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

Hodek P., Trefil P., Stiborová M., (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139, 1–21.

Hopp W., Seitz H. U., (1987) The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*. *Planta*, 170, 74-85.

Horning E.C., Horning M.G., (1970) Metabolic profiles: chromatographic methods for isolation and characterization of a variety of metabolites in man, w *Methods in Medical Research*, Olson R.E., (Red.), Year Book Medical Publishers, Chicago, 369-371.

Horning E.C., Horning M.G., (1971a). Human metabolic profiles obtained by GC and GC/MS. *Journal of Chromatographic Science*, 9, 129-140.

Horning E.C., Horning M.G., (1971b). Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clinical Chemistry*, 17, 802–809.

Ibrahim R.K., De Luca V., Khouri H.E., Latchinian L., Brisson L., Charest P.M., (1987) Enzymology and compartmentation of polymethylated flavonol glucosides in *Chrysosplenium americanum*. *Phytochemistry* 26, 1237-1245.

Ingham J.L., Tahara S., Harborne J.B., (1983) Fungitoxic isoflavones from *Lupinus albus* and other *Lupinus* species. *Zeitschrift für Naturforschung*, 38c, 194-200.

Ioset J.R., Urbaniak B., Ndjoko-Ioset K., Wirth J., Martin F., Gruissem W., Hostettmann K., Sautter C., (2007) Flavonoid profiling among wild type and related GM wheat varieties. *Plant Molecular Biology*, 65, 645-654.

Iwashina T., (2000) The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113, 287-299.

Iwashina T. (2003) Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biological Sciences in Space*, 17, 24-44.

Jasiński M., Kachlicki P., Rodziewicz P., Figlerowicz M., Stobiecki M., (2009) Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with the fungal pathogen, *Phoma medicaginis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 847-853.

Jay M., (1994) The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Harborne J.B. (Red.) Chapman & Hall, Londyn, 57-93.

Jones J.D.G, Dangl J.L., (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.

Jung W., Yu O., Lau S.C., O'Keefe D.P., Odell J., Fader G., McGonigle B. (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnology*, 18, 208-212.

Justesen U., Knuthesen P., Leth, T., (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799, 101-110.

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. *Journal of Mass Spectrometry*, 43, 572-586.

Kachlicki P., Marczak L., Kerhoas L., Einhorn J., Stobiecki M., (2005) Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSn systems. *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 1088-1103.

Kamel M.S., (2003) Flavone C-glycosides from *Lupinus hartwegii*. *Phytochemistry*. 63, 449-452.

Kaplan F., Kopka J., Haskell D.W., Zhao W., Schiller K.C., Gatzke N., Sung D.Y., Guy C.L., (2004) Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136, 4159-4168.

Kapusta I., (2009) *Medicago truncatula* – roślina modelowa w badaniach metabolomu roślin bobowatych (Fabaceae). *Biotechnologia*, 1, 119-131.

Kebarle P., Verkerk U.H., (2010) On the Mechanism of Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS). *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry Fundamentals*,

Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications 2nd edition. Cole R.B. (Red.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 4-19.

Kessmann H., Edwards R., Geno P.W., Dixon R.A., (1990) Stress responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*, 94,227-232.

Keurentjes J.J.B., Fu J., de Vos C.H.R., Lommen A., Hall R.D., Bino R.J., van der Plas L.H.W., Jansen R.C., Vreugdenhil D., Koornneef M., (2006) The genetics of plant metabolism. *Nature Genetics*, 38, 842-849.

Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R., (2011) NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in Biotechnology*, 29, 267-275.

Kim H.K., Verpoorte R., (2010) Sample Preparation for Plant Metabolomics, *Phytochemical Analysis*, 21, 4-13.

Kitamura S., (2006) Transport Of Flavonoids: From Cytosolic Synthesis to Vacuolar Accumulation. *The Science of Flavonoids*. Grotewold E. (Red.), Springer Science & Business Media, Inc., 123-147.

Kitano H., (2002a) Computational systems biology. *Nature*, 420, 206-210.

Kitano H., (2002b) Systems Biology: A Brief Overview. *Science*, 295,1662-1664.

Klejdus B., Vitamvasova-Sterbova D., Kuban V., (2001) Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography–mass spectrometry after two-dimensional solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 450, 81-97.

Knekt P., Kumpulainen J., Järvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A., Hakulinen T., Aromaa A., (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Society for Clinical Nutrition*, 76, 560-8.

Kowalska I., Stochmal A., Kapusta I., Janda B., Pizza C., Piacente S., Oleszek W., (2007). Flavonoids from barrel medic (*Medicago truncatula*) aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2645-2652.

Last R.L., Jones A.D., Shachar-Hill Y. (2007) Towards the plant metabolome and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 167-174.

Lee, A.J., Pate, J.S., Harris, D.J., Atkins, C.A., (2007). Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *L.angustifolius* L. *Journal of Experimental Botany*, 58, 935-946.

- Leiss K.A., Choi Y.H., Verpoorte R., Klinkhamer P.G.L. (2011) An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance, *Phytochemistry Reviews*, 10, 205-216.
- Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J.-M., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., Caboche M., (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 405-430.
- Liland K.H., (2011) Multivariate methods in metabolomics - from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 827-841.
- Lin L.Z., He X.G., Lindenmaier M., Yang J., Cleary M., Qiu S.X., Cordell G.A., (2000) LC/ESI/MS study of the flavonoid glycoside malonates of red clover (*Trifolium pratense*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 354-356.
- Linthorst H.J.M., Van Loon L.C., (1991) Pathogenesis related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10, 123-150.
- Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A.R., (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1, 387 -396.
- Liu C.J., Deavours B.E., Richard S.B., Ferrer J.L., Blount J.W., Huhman D., Dixon R.A., Noel J.P., (2006) Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant defense responses. *Plant Cell*, 18, 3656-3669.
- Liu Q., Qiu Y., Beta T., (2010) Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9235-9241.
- Lommen A., (2009) MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing. *Analytical Chemistry*, 81, 3079-3086.
- Long S.R., (1996) Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *The Plant Cell*, 8, 1885-1898.
- Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Li S.X., Hartman G.L., Widholm J.M., (2004) Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 671-679.
- Lu Y.-P., Li Z.-S., Drozdowicz Y.M., Hörtensteiner S., Martinoia E., Rea P. A., (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell*, 10, 267-282.

Lu Y.-P., Li Z.-S., Rea P.A., (1997) *AtMRP1* gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione *S*-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8243-8248.

Ma Y.L., Li Q.M., Van den Heuvel H., Claeys M., (1997) Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11, 1357-1364.

Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer-Verlag, 354.

Maeshima M., (2001) Tonoplast transporters: organization and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 469-497.

Maier W., Schmidt J., Wray V., Walter M.H., Strack D., (1999) The arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, induces the accumulation of cyclohexenone derivatives in tobacco roots. *Planta*, 207, 620-623.

Malamy J., Carr J.P., Klessig D.F., Raskin I., (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to tobacco mosaic virus. *Science*, 250, 1002-1004.

Manetti C., Bianchetti C., Casciani L., Castro C., Di Cocco M.E., Micheli A., Motto M., Conti F., (2006) A metabonomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2613-2625.

Marais J.P.J., Deavours B., Dixon R.A., Ferreira D. (2006) The stereochemistry of flavonoids. *The Science of Flavonoids*. Grotewold E. (Red.), Springer Science & Business Media, Inc., 1-46.

March R.E, Brodbelt J., (2008) Analysis of flavonoids: tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR. *Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 43, 1581-1617.

March R.E., Lewars E.G., Stadey C.J., Miao X.-S., Zhao X., Metcalfe C.D., (2006) A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 248,61-85.

Marchelli R., Vining L.C., (1973) The biosynthetic origin of chlorflavonin, a flavonoid antibiotic from *Aspergillus candidus*. *Canadian Journal of Biochemistry*, 51, 1624-1629.

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 Communications in Mass Spectrometry*, 22, 3949-3956.

Marczak Ł., Stobiecki M., Jasiński M., Oleszek W., Kachlicki P., (2010) Fragmentation pathways of acylated flavonoid diglucuronides from leaves of *Medicago truncatula*. *Phytochemical Analysis*, 21, 224-233.

Merken H.M., Beecher G.R., (2000) Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897, 177-184.

Markham K.R., Tanner G.J., Caasi-Lit M., Whitecross M.F., Nayudu M., Mitchell K.A., (1998) Possible protective role for 3',4'- dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. *Phytochemistry*, 49, 1913-1919.

Marrs K.A., Alfenito M.R., Lloyd A.M., Walbot V., (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375, 397-400.

Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K., Amrhein N., (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364, 247-249.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C., (2000) The Effects Of Plant Flavonoids On Mammalian Cells: Implications For Inflammation, Heart Disease, And Cancer *Pharmacological Reviews*, 52,673-751.

Moheb A., Ibrahim R.K., Roy R., Sarhan F., (2011) Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation. *Phytochemistry*, 72, 2294-2307.

Morita M., Shitan N., Sawada K., Van Montagu M.C.E., Inzé D., Rischer H., Goossens A., Oksman-Caldentey K.-M., Moriyama Y., Yazaki K., (2009) Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 2447-2452.

Muth D., (2010) Rola fenolowych metabolitów wtórnych w reakcji obronnej łubinu podczas antraknozy powodowanej przez grzyb *Colletotrichum lupini*. *Praca doktorska*, Poznań 2010.

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.

Muth D., Marsden-Edwards E., Kachlicki P., Stobiecki M., (2008) Differentiation of isomeric malonylated flavonoid glyconjugates in plant extracts with UPLC-ESI/MS/MS, *Phytochemical Analysis*, 19, 444-452.

- Nakayama T., Suzuki H., Nishino T., (2003) Anthocyanin acyltransferases: specificities, mechanism, phylogenetics, and application. *Journal of Molecular Catalysis A*, 23, 117-132.
- Naoumkina M., Farag M.A., Sumner L.W., Tang Y., Liu C.-J., Dixon R.A., (2007) Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17909-17915.
- Nielsen J., Oliver S., (2005) The next wave in metabolome analysis. *Trends in Biotechnology*, 23, 544-546.
- Nirenberg H.I., Feiler U., Hagedorn G., (2002) Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia*, 94, 307-320.
- Nordström A., (2008) Data Mining for Metabolomics. *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*. Griffiths W.J. (Red.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 273-289.
- Nürnberg T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L., (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198, 249-266.
- Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F. (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16, 373-378.
- Payne R.W., Harding S.A., Murray D.A., Soutar D.M., Baird D.B., Glaser A.I., Channing I.C., Welham S.J., Gilmour A.R., Thompson R., Webster R., (2011) The Guide to GenStat Release 14, Part 2: Statistics. VSN International, Hemel Hempstead.
- Peer W.A., Bandyopadhyay A., Blakeslee J.J., Makam S.N., Chen R., Mason P., Murphy A., (2004) Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16, 1898-1911.
- Peer W.A., Murphy A.S., (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*, 12, 556-563.
- Pietta P.G., (2000) Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Planchuelo-Ravelo A.M, Wink, M., (1993) Alkaloid Composition of *Lupinus albescens* (Fabaceae) from South America. *Zeitschrift für Naturforschung*, 48c, 414-416.
- Planchuelo-Ravelo A.M, Witte L., Wink M., (1993) Quinolizidine alkaloid profiles of South American lupins: *Lupinus linearis* and the *Lupinus gibertianus* complex. *Zeitschrift für Naturforschung*, 48c, 702-706.

Pluskal T., Castillo S., Villar-Briones A., Orešič M., (2010) MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11, 1-11.

Prasain J.K., Jones K., Kirk M., Wilson L., Smith-Johnson M., Weaver C., Barnes S., (2003) Profiling and quantification of isoflavonoids in kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 4213-4218.

Prasain J.K., Wang C.C., Barnes S., (2004) Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 1324-1350.

Quandt H. J., Puhler A., Broer I., (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6, 699-706.

Quattrocchio F., Baudry A., Lepiniec L., Grotewold E., (2006) The Regulation Of Flavonoid Biosynthesis. *The Science of Flavonoids*. Grotewold E. (Red.), Springer Science & Business Media, Inc., 97-122.

Ramautar R., Somsen G.W., de Jong G.J., (2009) CE-MS in metabolomics *Electrophoresis*, 30, 276-291.

Ravindranath M.H., Muthugounder S., Presser N., Viswanathan S., (2004) Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Advances in experimental medicine and biology*, 546, 121-65.

Roessner U., (2007) Plant Metabolomics. *Metabolome analysis: an introduction*. Villas-Bôas S.G., Roessner U., Hansen M.A.E., Smedsgaard J., Nielsen J. (Red.) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 215-238.

Roessner U., Luedemann A., Brust D., Fiehn O., Linke T., Willmitzer L., Fernie, A.R. (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems, *The Plant Cell*, 13, 11-29.

Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R.N., Willmitzer L., (2000) Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *The Plant Journal*, 23, 131-142.

Roowi S., Crozier A., (2011) Flavonoids in Tropical Citrus Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12217-12225.

Sanduja R., Martin G.E., Weinheimer A.J., Alam M., Hossain M.B., van der Helm D., (1984) Secondary metabolites of the coelenterate *Echinopora lamellose*. *Journal of heterocyclic chemistry*, 21, 845-848.

Sanson S.A., Schober D., Atherton H.J., Fiehn O., Jenkins H., Rocca-Serra P., Rubtsov D.V., Spasi I., Soldatova L., Taylor C., Tseng A., Viant M.R., Ontology Working Group Members, (2007) Metabolomics standards initiative: ontology working group work in progress. *Metabolomics*, 3, 249-256.

Sauter H., Lauer M., Fritsch H., (1991) Metabolic profiling of plants a new diagnostic technique. *American Chemical Society Symposium Series* No. 443. Baker D.R., Fenyves J.G., Moberg W.K. (Red.), Washington DC, 288-299.

Schauer N., Semel Y., Roessner U., Gur A., Balbo I., Carrari F., Pleban T., Perez-Melis A., Bruedigam C., Kopka J., Willmitzer L., Zamir D., Fernie A.R., (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology*, 24, 447-454.

Schliemann W., Ammer C., Strack D., (2008) Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, 69, 112-146.

Schnitzler J.P., Jungblut T.P., Heller W., Feicht C., Köfferlein M., Hutzler P., Heinzmann U., Schmelzer E., Ernst D., Langebartels C., Sandermann Jr H., (1996) Tissue localization of UV-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytologist*, 132, 247-258.

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 Physiology*, 48, 1652-1657.

Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R., (2008) Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132, 199-208.

Skaltsa H., Verykokidou E., Harvala C., Karabourniotis G., Manetasi, Y., (1994) UV-B protective potential and favonoid content of leaf hairs in *Quercus ilex*. *Phytochemistry*, 37, 987-990.

Smedsgaard J., (2007) Analytical tools. *Metabolome analysis: an introduction*. Villas-Bôas S.G., Roessner U., Hansen M.A.E., Smedsgaard J., Nielsen J. (Red.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 83-146.

Somssich I.E., Hahlbrock K., (1998) Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3, 86-90.

Stafford H.A., (1981) Compartmentation in natural product biosynthesis by multienzyme complexes. *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. Stumpf P.K., Conn E.E. (Red.), Academic Press, New York 117-137.

Stafford H.A., (1990) *Flavonoid Metabolism*. CRC, Boca Raton, USA.

Staszków A., Swarczewicz B., (2011) Metody analizy metabolitów roślinnych w wykorzystaniu spektrometrii mas. *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, tom XXVI. Koroniak H., Barciszewski J. (Red.), Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 193-215.

Staszków A., Swarczewicz B., Banasiak J., Muth D., Jasiński M., Stobiecki M., (2011) LC/MS profiling of flavonoid glycoconjugates isolated from hairy roots, suspension root cell cultures and seedling roots of *Medicago truncatula*. *Metabolomics*, 7, 604-613.

Steele C.L., Gijzen M., Qutob D., Dixon R.A. (1999) Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 367, 146-150.

Stobiecki M., (2000) Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 54, 237-256.

Stobiecki M., Kachlicki P., (2006) Isolation and identification of flavonoids. *The Science of Flavonoids*. Grotevold E. (Red.), Springer Science and Business Media, Inc., Nowy Jork, . 47-69.

Stobiecki M., Skiryycz 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., Staszków A., Piasecka A., Garcia-Lopez P.M, Zamora-Natera F., Kachlicki P., (2010) LC-MSMS Profiling of Flavonoid Conjugates in Wild Mexican Lupine, *Lupinus reflexus*. *Journal of Natural Products*, 73, 1254-1260.

Stobiecki M., Wojtaszek P., (1990) Application of gass chromatography-mass spectrometry to the identification of isoflavonoids in lupine root extracts. *Journal of Chromatography*, 508, 391-398.

Stobiecki M., Wojtaszek P., Gulewicz K., (1997) Application of solid phase extraction for profiling quinolizidine alkaloids and phenolic compounds in *Lupinus albus*, *Phytochemical Analysis*, 8, 153-158.

Sumner L.W., Amberg A., Barrett D., Bealle M.H., Beger R., Daykin C.A., Fan T.W-M., Fiehn O., Goodacre R., Griffin J.L., Hankemeier T., Hardy N., Harnly J., Higashi R., Kopka J., Lane A.N., Lindon J.C., Marriott P., Nicholls A.W., Reilly M.D., Thaden J.J., Viant M.R., (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3, 211-221.

Sumner L.W., Mendes P., Dixon R.A., (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62, 817-836.

Suzuki H., Nishino T., Nakayama T., (2007) cDNA cloning of a BAHD acyltransferase from soybean (*Glycine max*): isoflavone 7-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase. *Phytochemistry*, 68, 2035-2042.

Suzuki H., Sawada S., Watanabe K., Nagae S., Yamaguchi M., Nakayama T., Nishino T., (2004) Identification and characterization of a novel anthocyanin malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers: an enzyme that is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. *The Plant Journal*, 38, 994-1003.

Swain T., (1976) Nature and properties of flavonoids. *Chemistry and Biochemistry in Plant Products*. Goodwin T.W. (Red.), Academic Press, Nowy York, 425-463.

Sze H., Li X., Palmgren M.G., (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis, *The Plant Cell*, 11, 677-689.

Tahara S., Ibrahim R. K., (1995) Prenylated Isoflavonoids-An Update. *Phytochemistry*, 38, 1073-1094.

Vaidyanathan S., Gaskell S., Goodacre R. (2006) Matrix-suppressed laser desorption/ionisation mass spectrometry and its suitability for metabolome analyses. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 1192-1198.

Van der Hoof J.J.J, Mihaleva V., de Vos R.C.H, Binoe R.J, Vervoort J., (2011a) A strategy for fast structural elucidation of metabolites in small volume plant extracts using automated MS-guided LC-MS-SPE-NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49, S55-S60.

Van der Hoof J.J.J, Vervoort J., Bino R.J., Beekwilder J., de Vos R.C.H., (2011b) Polyphenol Identification Based on Systematic and Robust High-Resolution Accurate Mass Spectrometry Fragmentation. *Analytical Chemistry*, 83, 409-416.

Van Etten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A., Farmer E.E., (1994) Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell*, 6, 1191-1192.

Veitch N.C., Grayer R.J., (2008) Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 25, 555–611.

Villas-Bôas S.G., (2007) Sampling and sample preparation. *Metabolome analysis: an introduction*. Villas-Bôas S.G., Roessner U., Hansen M.A.E., Smedsgaard J., Nielsen J. (Red.) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 39-83.

- Villas-Bôas S.G., Mas S., Åkesson M., Smedsgaard J., Nielsen J. (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 613-646.
- Von Röpenack E., Parr A., Schulze-Lefert P., (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 9013-9022.
- Vukics V., Guttman A., (2010) Structural Characterization Of Flavonoid Glycosides By Multi-Stage Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 1-16.
- Walle T., Vincent T.S., Walle U.K., (2003) Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochemical Pharmacology*, 65, 1603-1610.
- Waridel P., Wolfender J.-L., Ndjoko K., Hobby K.R., Major H.J. , Hostettmann K., (2001) Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *Journal of Chromatography A*, 926, 29-41.
- Wasmann C.C., Van Etten H.D., (1996) Transformation-mediated chromosome loss and disruption of a gene for pisatin demethylase decrease the virulence of *Nectria haematococca* on Pea. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 9, 793-803.
- Wasson A.P., Pellerone F.I., 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.
- Watson J.T., Sparkman O.D., (2007) *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation 4th ed.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, West Sussex, 317-320.
- Weckewerth W., (2007) *Metabolomics: Methods and rotocols*. Humana Press Inc. New Jersey.
- Wink, M., (1993) Quinolizidine alkaloids. *Methods in Plant Biochemistry*. Waterman, P.G. (Red.), Academic Press, London, 197-239.
- Wink M., Meissner C., Witte L., (1995) Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38, 139-153.
- Winkel-Shirley B., (2001) Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126, 485-493.
- Winkel-Shirley B. (2006) The Biosynthesis of Flavonoids. *The Science of Flavonoids*. Grotewold E. (Red.), Springer Science & Business Media, Inc., 71-96.

Wojakowska A., Muth D., Narożna D., Mądrzak C., Stobiecki M., Kachlicki P., (2012) Changes of phenolic secondary metabolite profiles in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupini* fungus or treatment with its toxin. *Metabolomics*, DOI 10.1007/s11306-012-0475-8

Wojtaszek P., (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 322, 681-692.

Wu W., Yan C., Li L., Liu Z., Liu S., (2004) Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1047, 213-220.

Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y., (2009) Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry* 70,1739-1745.

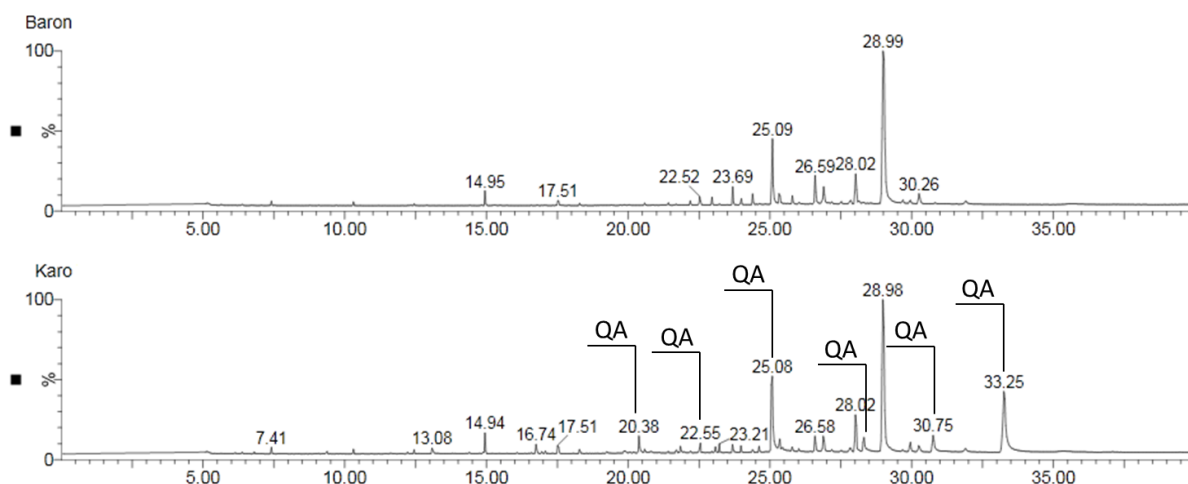
Zhang J., Brodbelt J., (2005) Silver complexation and tandem mass spectrometry for differentiation of isomeric flavonoid diglycosides. *Analytical Chemistry*, 77, 1761-1770.

Zhang J., Zhou J.M., (2010) Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Molecular Plant*, 3, 783-793.

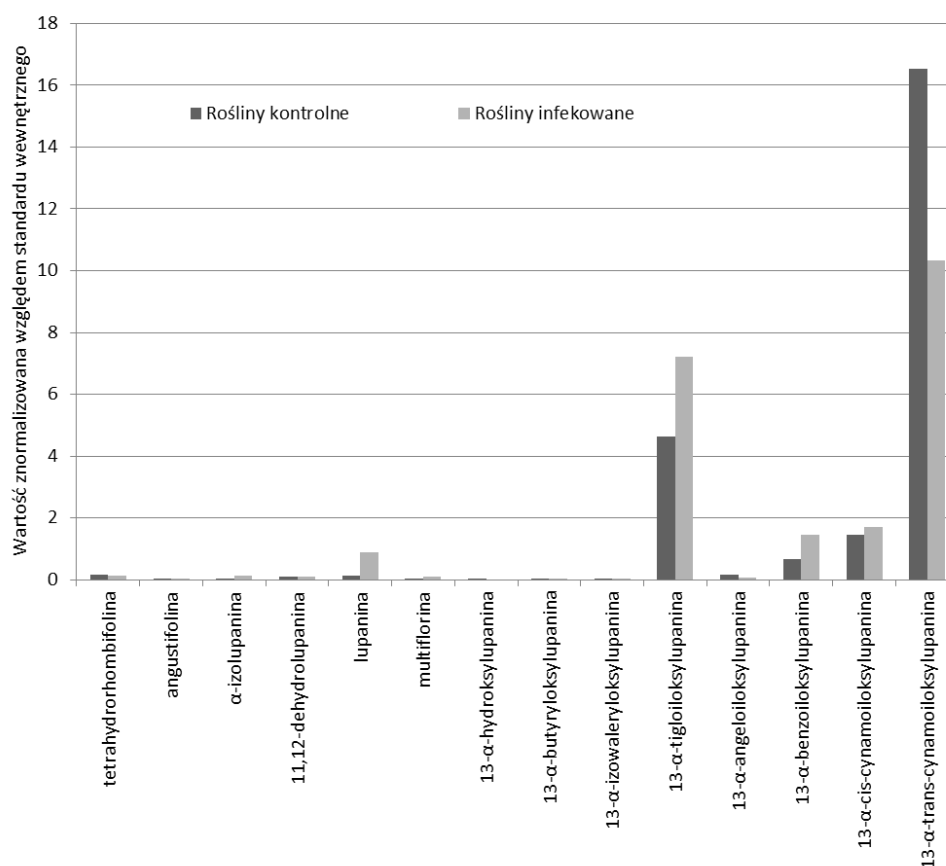
Zhao J., Dixon R.A., (2010) The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, 15, 72-80.

Zhao J., Huhman D., Shadle G., He X.Z., Sumner L.W., Tang Y., Dixon R.A., (2011) MATE2 mediates vacuolar sequestration of flavonoid glycosides and glycoside malonates in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 23, 1536-1555.

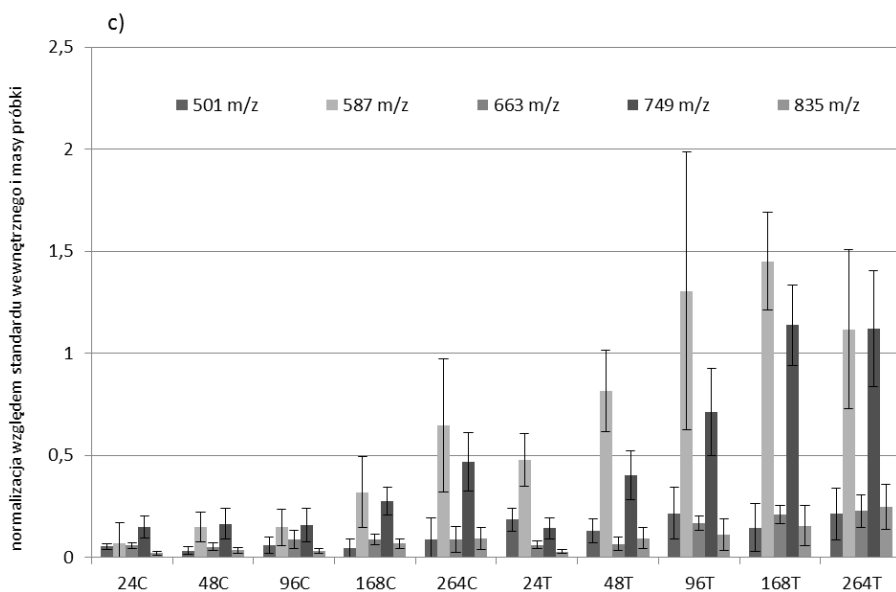
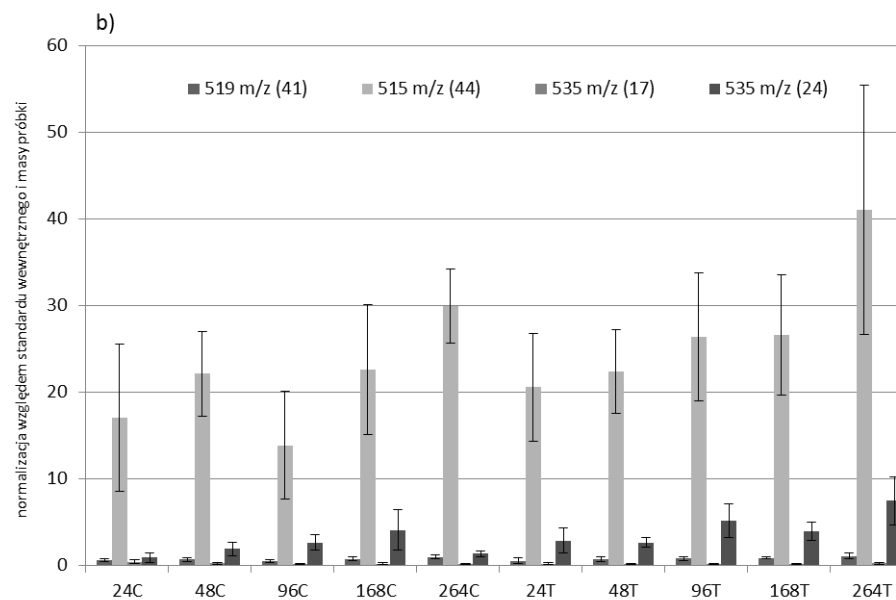
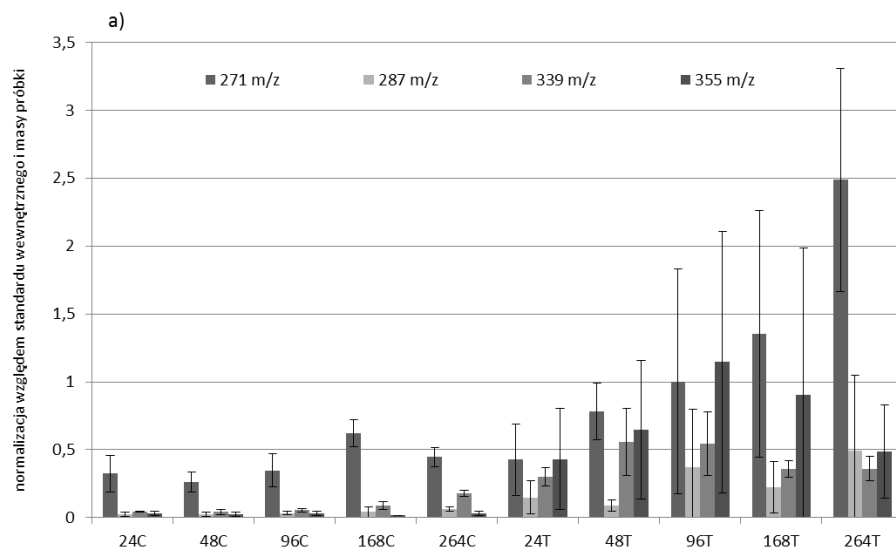
IX. SUPPLEMENT



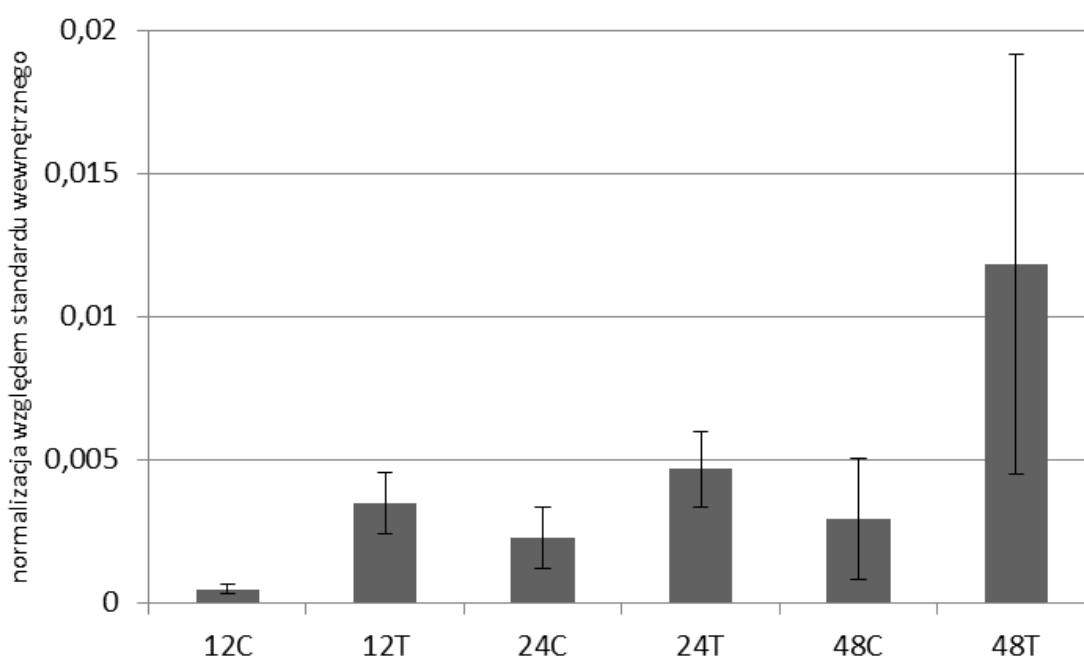
Ryc.S1 Chromatogramy całkowitego prądu jonowego (GC/MS) obrazujące różnice w zawartości alkaloidów chinolizydynowych (QA) pomiędzy odmianą słodką (Baron) i górką (Karo) łubinu wąskolistnego. Zidentyfikowane związki ujęto w tabeli 4.2.



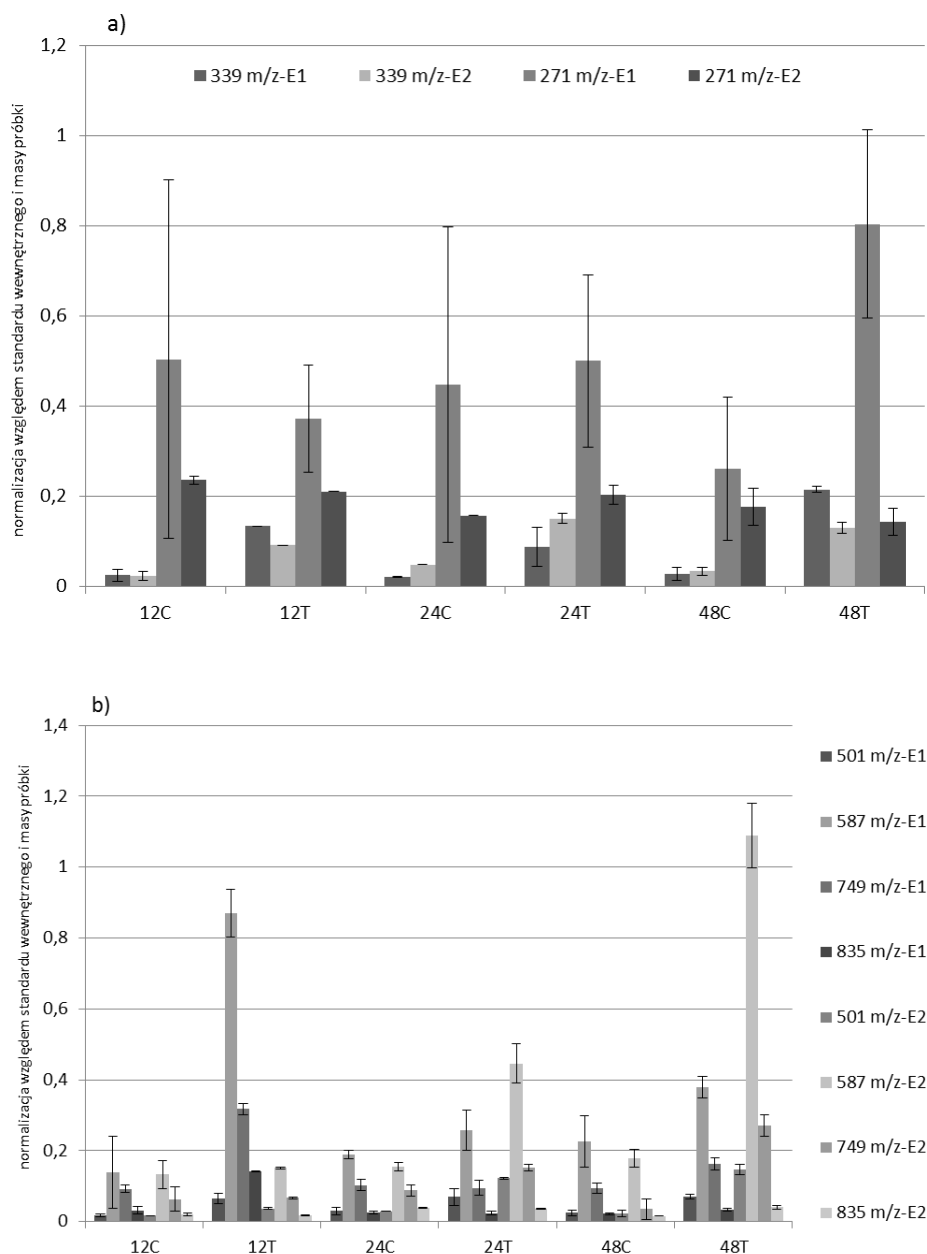
Ryc.S2 Ilościowa zawartość alkaloidów chinolizydynowych, obecnych na powierzchni liści łubinu wąskolistnego odm. Mirela, w odpowiedzi na infekcję zarodnikami grzyba *C.lupini* w odniesieniu do kontroli. Zbiór roślin nastąpił po 168h od infekcji. Analizy przeprowadzono techniką GC/MS. Zidentyfikowane związki ujęto w Tab.4.2.



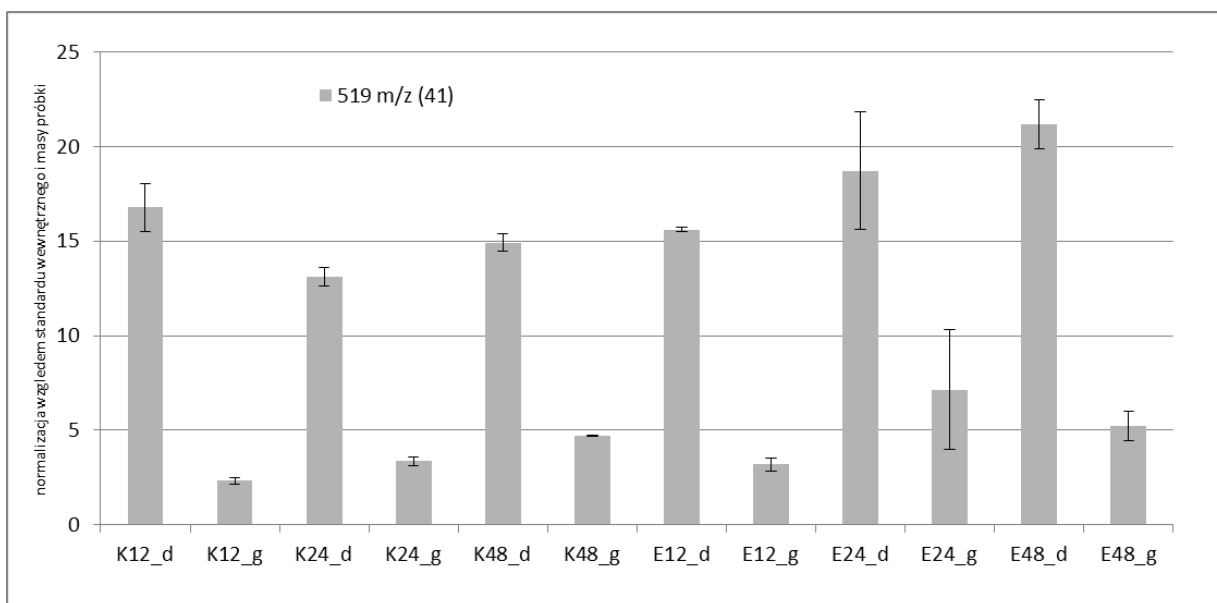
← **Ryc.S3** Zawartości wybranych izoflawonoidów, aglikonów i ich glikozydów, w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego (odmiana Sonet) po infekcji grzybem *C.lupini*, wyrażona względem standardu wewnętrznego (luteolina) i masy próbki. Punkty czasowe: 24 h, 48 h, 96 h, 168 h i 264 h po infekcji; C-rośliny kontrolne, T-rośliny traktowane zawiesiną zarodników *C.lupini*. Wolne aglikony izoflawonów: genisteina – $[M+H]^+$ przy m/z 271 (**65**), 2'-hydroksygenisteina – $[M+H]^+$ przy m/z 287 (**53**), witeon – $[M+H]^+$ przy m/z 339 (**72**), luteon – $[M+H]^+$ przy m/z 355 (**71**) (a); glikozylowane pochodne izoflawonów: malonylowany 7-O-glikozyd genisteiny – $[M+H]^+$ przy m/z 519 – dwa izomery (**41**, **44**), malonylowany 7-O-glikozyd 2'-hydroksygenisteiny – $[M+H]^+$ przy m/z 535 – dwa izomery (**17**, **24**) (b); pochodne witeonu: O-glikozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 501 (**68**), malonylowany O-glikozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 587 (**69**), O-diglikozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 663 (**55**), malonylowany O-diglikozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 749 (**61**) oraz dimalonylowany O-diglikozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 835 (**63**) (c). Na każdą próbkę składają się trzy powtórzenia biologiczne i dwa techniczne. Analizy przeprowadzono techniką LC/MS. Numery związków (wytluszczonym drukiem) w odniesieniu do Tab.4.1. (według Wojakowska i in., 2012).



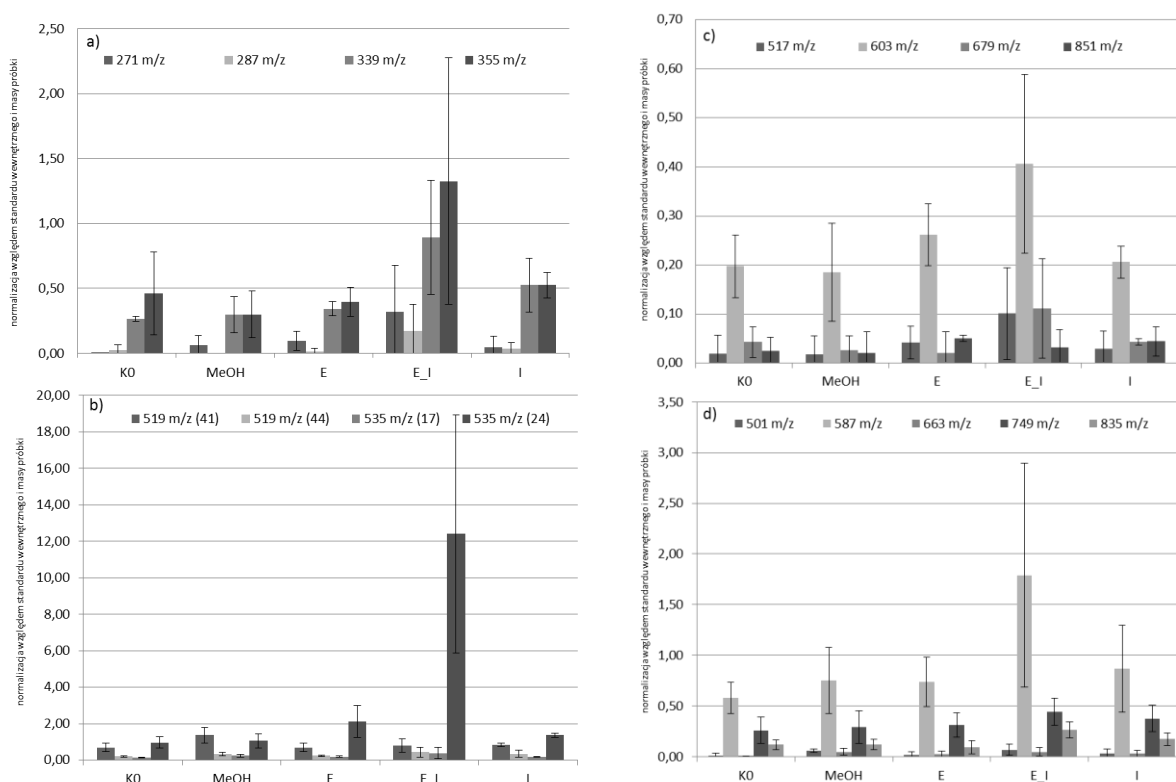
Ryc.S4 Zawartość witeonu na powierzchni liści w 12, 24 i 48 h po elisytacji łubinu (*L.angustifolius* odm. Sonet) zawiesiną toksycznych metabolitów grzybowych (*C.lupni*). Na każdą próbkę składają się dwa powtórzenia biologiczne i dwa techniczne. Analizy przeprowadzono techniką GC/MS (według Wojakowska i in., 2012).



Ryc.S5 Zawartość witeonu ($[M+H]^+$ przy m/z 339 - **72**) i genisteiny ($[M+H]^+$ przy m/z 271 - **65**) (a) oraz glikozylowanych pochodnych witeonu (*O*-glikozyd witeonu $[M+H]^+$ przy m/z 501 (**68**), malonylowany *O*-glikozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 587 (**69**), malonylowany *O*-diglikozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 749 (**61**) oraz dimalonylowany *O*-diglikozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 835 (**63**) (b) w odpowiedzi na dwa rodzaje elisytacji łubinu wąskolistnego toksyną grzybową, E1- nałożenie kropli zawiesiny toksycznych metabolitów na uprzednio zraniony liść, E2- elisytacji przez oprysk zawiesiną fitotoksycznych metabolitów *C.lupini*; C-rośliny kontrolne, T-rośliny elisytywane. Materiał roślinny zebrany 12, 24, 48 h po elisytacji. Wartości wyrażone w odniesieniu do kontroli (=100%). Na każdą próbkę składają się dwa powtórzenia biologiczne i dwa techniczne. Analizy przeprowadzono techniką LC/MS. Numery związków (wytluszczonym drukiem) w odniesieniu do Tab.4.1. (według Wojakowska i in., 2012).

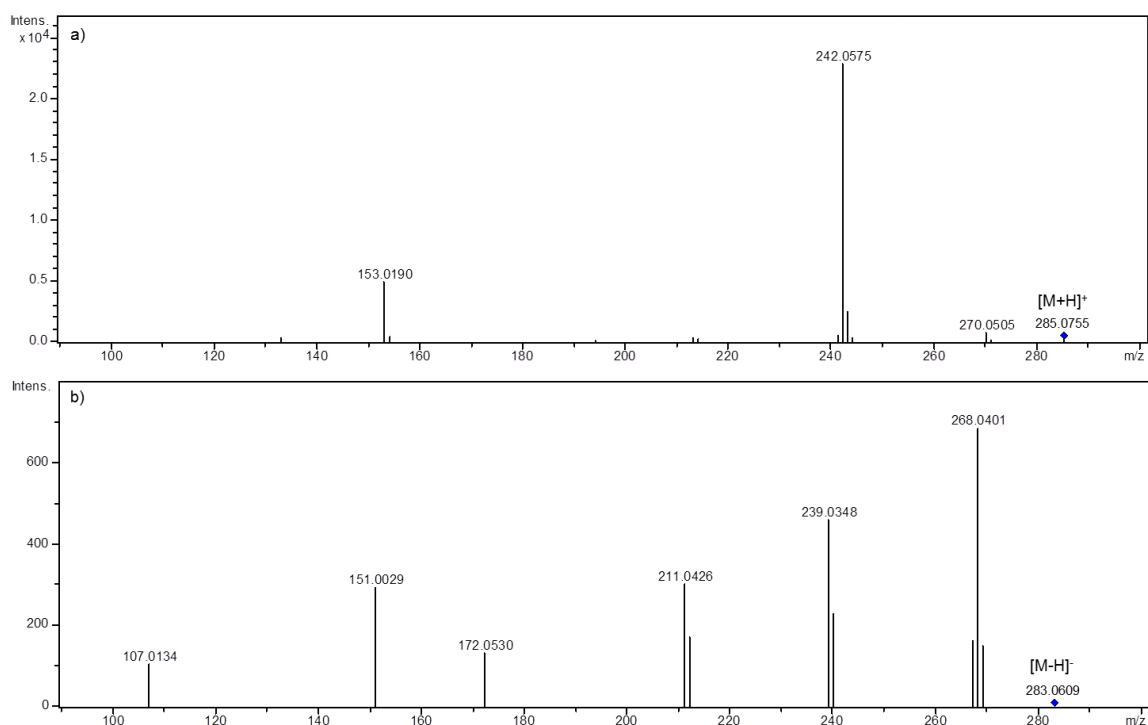


Ryc.S6 Poziomy malonylowanego 7-O-glukozydu genisteiny – $[M+H]^+$ przy m/z 519 (związek nr 41-Tab.4.1) w ekstraktach z górnych i dolnych liści łubinu wąskolistnego (odm. Sonet) po elisytacji 1. Zbiór 12, 24, 48 h po elisytacji. K-kontrola, E-elisytacja, d-liść dolny, g-liść górny.



Ryc.S7 Zawartości wybranych izoflawonoidów i ich glukozydów w ekstraktach z liści łubinu wąskolistnego (*L.angustifolius* odm. Sonet) po elisytacji poprzez oprysk toksyną (E), infekcji sporami *C.lupini* (I) lub elisytacji i następującej po 48 h infekcji (E + I); K0-kontrola zerowa (woda), MeOH-kontrola metanolowa. (%). Na wykresach są prezentowane: względne ilości wolnych aglikonów - genisteiny – $[M+H]^+$ przy m/z 271 (65), 2'-hydroksygenisteiny –

$[M+H]^+$ przy m/z 287 (**53**), witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 339 (**72**), luteonu – $[M+H]^+$ przy m/z 355 (**71**) (a); izomerów malonylowanych glukozydów genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny: (malonylowany 7-*O*-glukozyd genisteiny – $[M+H]^+$ przy m/z 519 – dwa izomery (**41**, **44**), malonylowany 7-*O*-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny – $[M+H]^+$ przy m/z 535 – dwa izomery (**17**, **24**) (b); *O*-glukozyd luteonu – $[M+H]^+$ przy m/z 517 (**62**), malonylowany *O*-glukozyd luteonu – $[M+H]^+$ przy m/z 603 (**67**), *O*-diglukozyd luteonu – $[M+H]^+$ przy m/z 679 (**45**) oraz dimalonylowany *O*-diglukozyd luteonu – $[M+H]^+$ przy m/z 851 (**60**) (c); pochodne witeonu: *O*-glukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 501 (**68**), malonylowany *O*-glukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 587 (**69**), *O*-diglukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 663 (**55**), malonylowany *O*-diglukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 749 (**61**) oraz dimalonylowany *O*-diglukozyd witeonu – $[M+H]^+$ przy m/z 835 (**63**) (d). Na każdą próbkę składają się dwa powtórzenia biologiczne i dwa techniczne. Analizy przeprowadzono techniką LC/MS. Numery związków (wyłuszczone drukiem) w odniesieniu do Tab.4.1. (według Wojakowska i in., 2012).



Ryc.S8 Widmo CID MS/MS acetylony (nr **171** w Tab.4.4) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich i ujemnych przy pomocy systemu LC/ESI/Qq-ToF-MS.

Tab.S1 Występowanie glikozydów izoflawonów, flawonów, flawonoli i flawanonów w ekstraktach z liści (L) i korzeni (K) różnych gatunków łubinu na podstawie analizy z wykorzystaniem UPLC/ESI/ qToF-MS.

Aglikon	Genisteina		2'-OHgenisteina		Luteon		Witeon		Acacetyna		Apigenina		Chryzoeriol		Luteolina		Izoramnetyna		Kemferol		Kwercetyna		Eriodiktioł		Naringenina		
	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	
<i>L.montanus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>L.elegans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>L.mexicanus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>L.exaltatus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
<i>L.hintoni</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
<i>L.stipulatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>L.rotundiflorus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>Lupinus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>L.angustifolius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>L.albus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	
<i>L.luteus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
<i>L.mutabilis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	

Tab.S2 Numery identyfikacyjne (ID) związków wprowadzonych do bazy MassBank wraz z odnośnikami (Nr) do Tab.4.4.

Nr	Nazwa związku	numer ID MassBank
5	7- <i>O</i> -glukozyloglukozyd genisteiny	PN000052
11	4'7- <i>O</i> -diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny	PN000011
15	7- <i>O</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	PN0000116/117
19	8- <i>C</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	PN000012/13
23	8- <i>C</i> -glukozyd genisteiny	PN000014/15
26	malonylowany <i>O</i> , <i>C</i> -diglukozyd 2'-hydroksygenisteiny	PN000029/30
29	malonylowany <i>O</i> -glukozyd luteonu (I)	PN000064
35	3',7- <i>O</i> -diglukozyd luteoliny	PN000057/58
36	<i>O</i> -diglukozyd chryzoeriolu	PN000036
53	7- <i>O</i> -glukozyd luteoliny	PN000059/60
61	8- <i>C</i> -glukozyd chryzoeriolu	PN000016/17
66	malonylowany <i>C</i> -glukozyd genisteiny	PN000040
67	7- <i>O</i> -glukozyloglukozyd apigeniny	PN000055/56
68	dimalonylowany 4',7- <i>O</i> -diglukozyd genisteiny	PN000042
70	7- <i>O</i> -glukozyloglukozyd 2'-hydroksygenisteiny	PN000044
71	3- <i>O</i> -glukozyd kemferolu	PN000124
80	4'- <i>O</i> -glukozyd luteoliny	PN000061/62
88	7- <i>O</i> -glukozyd apigeniny	PN000066/67
91	malonylowany 7- <i>O</i> -glukozyloglukozyd genisteiny	PN000039
93	malonylowany 8- <i>C</i> -glukozyd chryzoeriolu	PN000049
100	malonylowany <i>O</i> -glukozyd kemferolu	PN000063
104	4',7- <i>O</i> -diglukozyd luteonu	PN000020
109	malonylowany <i>O</i> -glukozyloglukozyd chryzoeriolu	PN000076/79
117	malonylowany <i>O</i> -glukozyd apigeniny (I)	PN000069
125	malonylowany <i>O</i> -glukozyd apigeniny (II)	PN000070
127	2'-hydroksygenisteina	PN000005/6
128	malonylowany <i>O</i> -glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	PN000045
132	malonylowany <i>O</i> -diglukozyd luteonu	PN000087/90
141	metylomalonylowany diglukozyd chryzoeriolu	PN000095
151	naringenina	PN000003/4
152	genisteina	PN000050/51
153	apigenina	PN000009/10
154	<i>O</i> -glukozyd luteonu (I)	PN000099/103
156	<i>O</i> -glukozyd witeonu (I)	PN000106
157	<i>O</i> -glukozyd luteonu (II)	PN000100
158	chryzoeriol	PN000007/8
161	<i>O</i> -glukozyd luteonu (III)	PN000102/104
163	<i>O</i> -glukozyd witeonu (II)	PN000107
166	<i>O</i> -glukozyd luteonu (IV)	PN000101

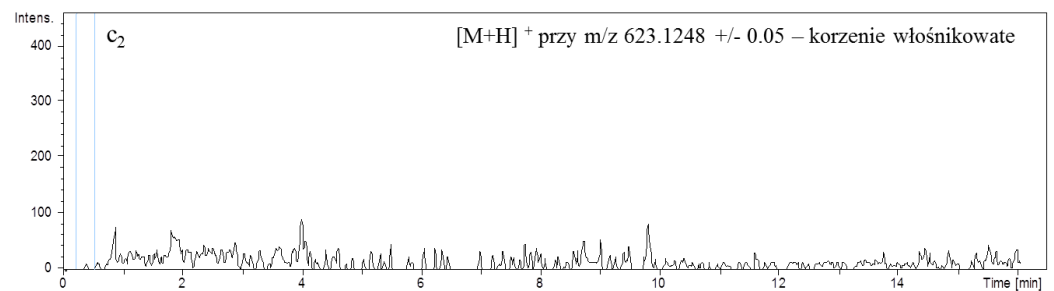
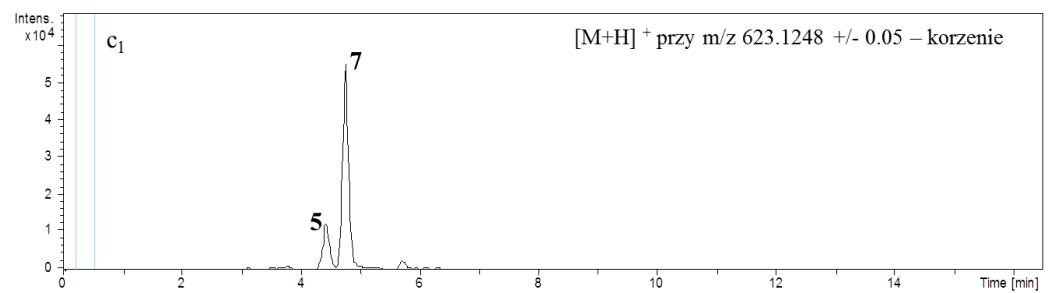
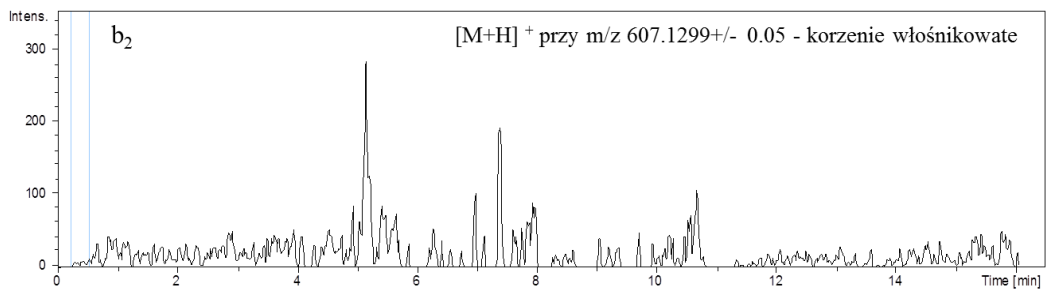
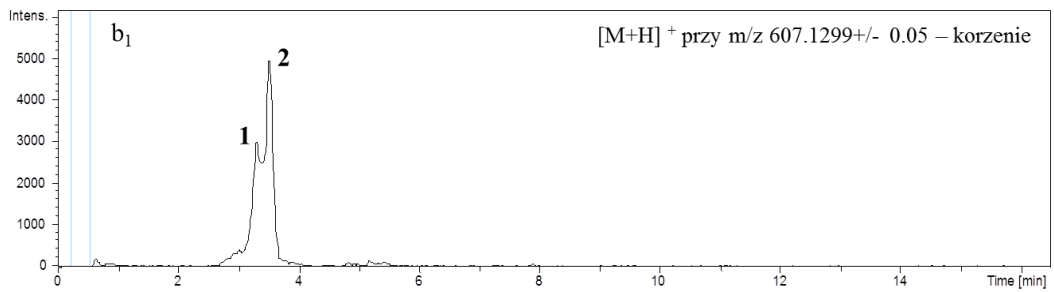
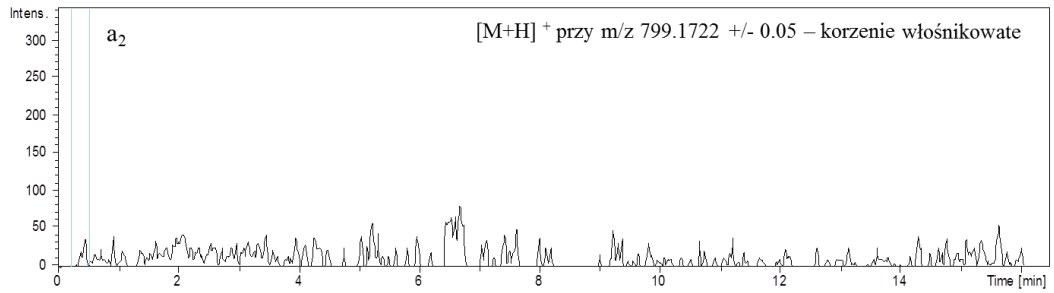
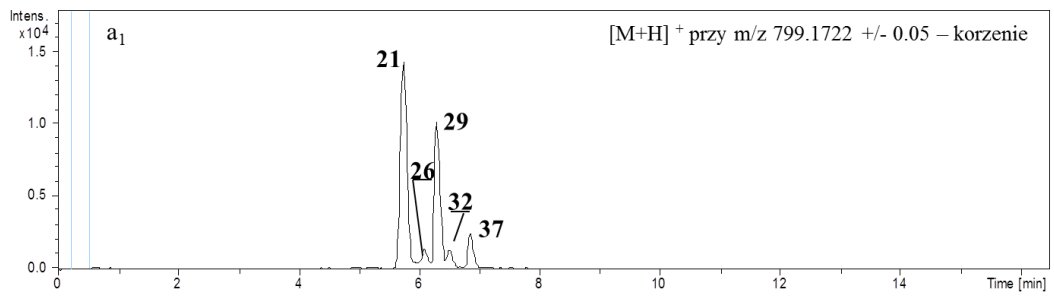
Tab.S3 Ilościowe zawartości flawonoidów i izoflawonoidów oraz ich pochodnych w korzeniach i liściach badanych gatunków łubinów. Oznaczenia wykonano za pomocą systemu UPLC/ESI/Qq-ToF-MS. Poziomy intensywności protonowanych cząsteczek zarejestrowanych w trybie MS: a = intensywność powyżej 1×10^5 ; b = intensywność równa od 1×10^4 do 1×10^5 ; c = intensywność poniżej 1×10^4 ; „-” nie wykryto. L-liść, K-korzeń, ML-młody liść, MK-młody korzeń.

Nr	R _t	Mcz	<i>L. montanus</i>		<i>L.elegans</i>				<i>L.mexicanus</i>				<i>L.exaltatus</i>				<i>L.hintoni</i>		<i>L. stipulatus</i>		<i>L.rotundiflorus</i>				<i>L.sp.</i>		<i>L.angustifolius</i>		<i>L.albus</i>		<i>L.luteus</i>		<i>L. mutabilis</i>			
			L	K	L	K	ML	MK	L	K	ML	MK	L	K	ML	MK	L	K	L	K	L	K	ML	MK	L	K	L	K	L	K	L	K				
1	1.1	608	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-		
2	1.3	594	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	-	-		
3	1.7	446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-			
4	1.9	594	c	c	-	c	-	-	c	-	-	-	c	-	c	-	-	c	-	-	c	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	1.9	594	c	c	-	c	-	-	b	-	-	c	c	-	c	-	-	-	c	c	c	-	c	-	-	-	-	c	b	c	c	-	-			
6	2.0	594	-	-	-	c	-	-	b	-	b	-	c	c	b	-	-	-	-	c	-	-	c	c	-	-	-	-	c	-	c	-	-			
7	2.0	610	c	c	c	-	c	-	b	-	b	-	c	-	c	-	-	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8	2.5	726	c	c	-	c	c	c	-	c	c	b	-	c	c	c	c	c	-	c	-	-	c	c	-	c	c	c	c	-	c	-	c			
9	2.7	594	-	c	-	c	c	c	-	b	c	b	c	c	c	c	c	c	-	c	-	c	c	c	-	b	-	c	-	-	-	c	-	c		
10	2.9	680	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
11	3.0	610	c	c	c	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	-	b	-	-	b	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12	3.0	694	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	
13	3.1	594	b	c	b	c	b	-	b	c	c	b	-	c	-	-	c	-	-	b	c	c	c	c	b	c	-	c	-	-	-	-	-	c		
14	3.1	446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-
15	3.1	448	c	c	c	c	c	-	c	c	c	b	c	c	c	c	-	c	c	c	c	-	-	-	c	-	-	c	c	c	-	-	-	-	c	
16	3.2	680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-
17	3.4	680	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	c	-	c	
18	3.4	696	c	-	-	-	-	-	c	-	b	-	-	c	-	-	c	-	-	c	-	c	-	c	-	-	-	-	c	c	-	-	-	-	c	
19	3.4	448	a	c	b	c	b	-	a	c	a	c	a	c	a	b	b	c	b	c	b	-	a	c	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	3.5	534	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-
21	3.5	682	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-
22	3.5	740	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-
23	3.6	432	-	-	-	-	c	-	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	b	-	-	-	b	a	-	-	-	
24	3.6	784	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-
25	3.7	696	-	-	-	-	-	-	c	-	b	-	-	c	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	
26	3.8	696	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	c	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-
27	3.8	680	c	c	c	c	-	-	-	-	b	-	c	b	c	-	c	c	-	c	c	b	-	c	c	-	c	c	c	c	c	c	c	c	-	c
28	3.8	680	c	c	c	c	-	-	b	-	b	-	c	-	c	-	c	c	-	c	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	3.9	534	b	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	c	c	-	c	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	3.9	680	c	-	c	c	-	-	b	-	-	-	c	c	b	-	-	c	c	-	b	b	-	c	c	c	c	c	c	c	b	c	b	c	b	c

73	4.6	534	-	-	-	c	-	-	b	-	c	-	-	b	c	c	c	b	b	b	b	c	-	c	b	b	-	b	a	a	-	c	b	b		
74	4.6	462	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	-	-	-	-	-		
75	4.6	594	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-		
76	4.7	842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-		
77	4.7	624	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	-		
78	4.7	564	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	-	-	-	-		
79	4.8	564	c	b	-	b	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	-	-	b	-	-	-	c		
80	4.8	448	a	b	a	-	a	-	c	-	-	c	-	c	-	-	a	c	-	c	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
81	4.8	696	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
82	4.8	518	a	-	-	-	b	-	a	-	a	c	a	b	a	b	b	c	-	-	b	-	c	c	-	-	c	b	-	-	b	a	c	-	-	
83	4.8	928	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-		
84	4.8	782	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	c	-	c	c	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	c	
85	4.9	624	-	-	-	c	a	-	-	b	a	b	-	c	c	-	c	c	a	b	a	b	a	c	a	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
86	4.9	478	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	-		
87	4.9	928	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-		
88	4.9	432	c	b	b	c	a	-	c	c	c	c	c	c	c	-	b	c	c	c	c	c	c	c	c	-	c	c	b	c	b	c	-	c		
89	4.9	520	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	
90	4.9	578	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	
91	5.0	680	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	-	-	c	c	-	-	c	b	c	-	-	c	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
92	5.1	770	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
93	5.1	548	b	-	-	-	-	-	b	-	b	-	c	b	c	b	c	-	-	c	-	-	-	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	
94	5.1	710	-	-	-	c	a	-	-	-	a	b	c	c	c	c	c	a	c	a	b	a	c	a	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
95	5.1	928	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	5.1	766	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	c	-	-	-	c	-	c	-	c	-	-	-	c	c	b	b	c	-	c	-	-	b	
97	5.1	666	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
98	5.1	594	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	c	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
99	5.2	680	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	c	c	c	-	c	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
100	5.2	534	b	-	c	-	-	-	-	-	-	c	c	c	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	b	-	c	-	c	c	b	-	-		
101	5.2	608	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
102	5.2	462	a	c	b	c	b	-	c	c	b	c	a	-	c	-	b	-	b	c	b	c	c	-	c	-	b	-	c	-	-	-	-	-	-	
103	5.3	448	-	-	b	c	b	-	-	-	-	c	-	c	-	-	a	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
104	5.4	678	c	c	c	b	-	-	c	c	-	b	c	-	c	-	c	-	c	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	5.4	446	-	-	-	-	-	c	a	-	a	c	a	-	b	-	-	-	c	-	b	-	b	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	5.4	518	c	c	b	-	-	-	b	-	c	-	b	c	c	c	b	b	c	b	-	b	-	c	b	b	-	c	b	b	-	b	-	-	b	
107	5.4	650	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
108	5.4	678	-	-	-	b	c	-	c	c	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-
109	5.4	710	-	-	-	-	a	-	-	-	a	c	-	c	-	-	-	a	c	a	c	c	c	c	a	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
110	5.4	534	c	-	a	-	b	-	c	-	-	-	c	-	-	-	a	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	5.4	518	c	-	b	c	c	-	c	c	c	-	c	a	-	-	c	c	-	c	b	c	-	b	-	c	b	a	a	a	-	a	c	a	-	
112	5.5	650	c	c	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	5.5	550	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	5.5	680	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

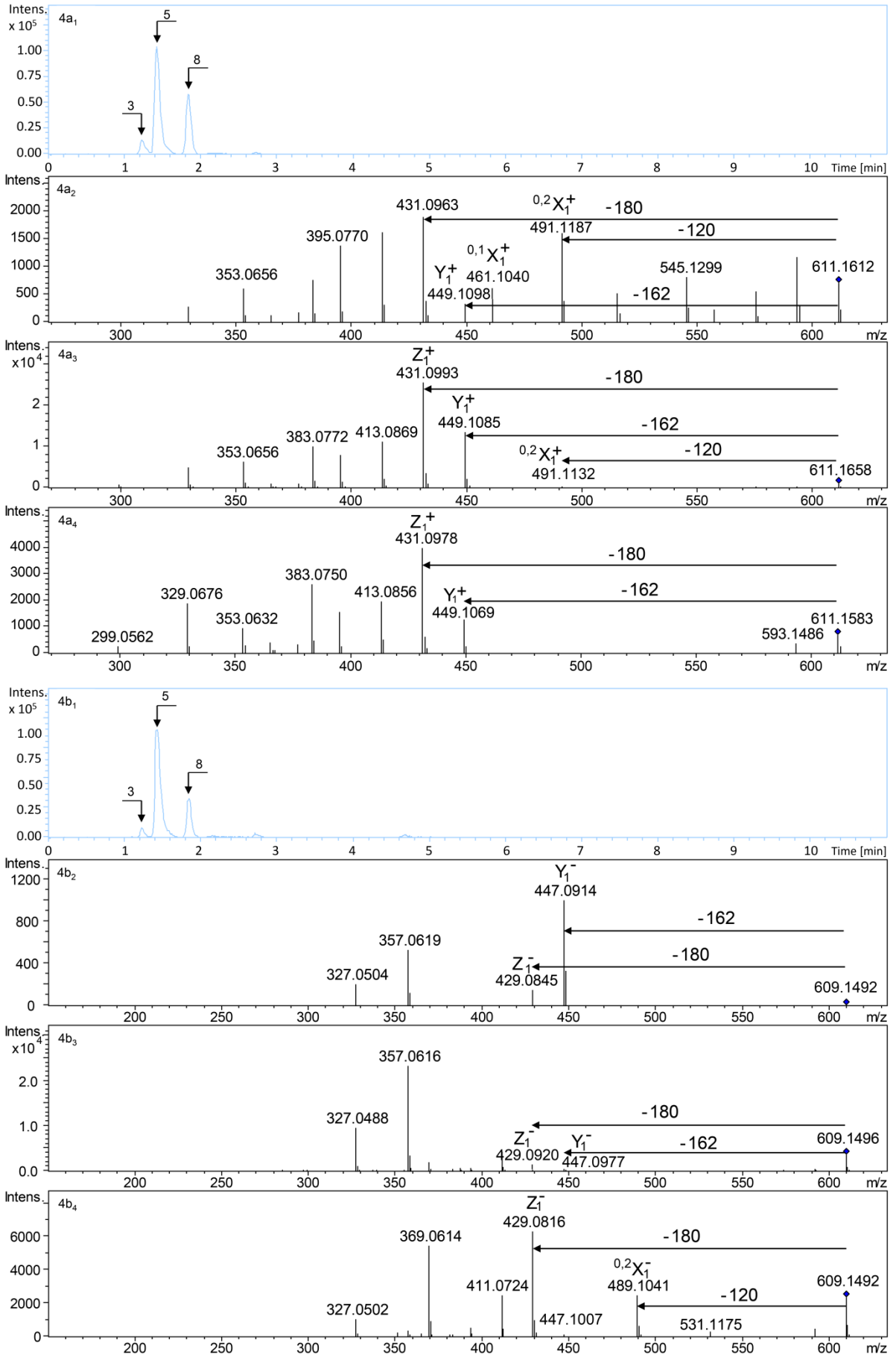
115	5.6	766	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	c	c	b	c	-	c	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	-		
116	5.6	548	c	-	-	-	c	-	c	-	c	-	-	c	-	-	b	c	-	c	c	c	-	c	-	-	-	c	a	c	-	-	c	c		
117	5.6	518	a	c	a	c	b	-	c	c	c	c	b	b	-	-	a	b	c	b	-	b	-	b	-	b	-	b	c	-	c	c	-	b		
118	5.6	534	b	c	a	-	a	-	-	-	-	-	-	c	-	-	a	b	-	c	-	c	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
119	5.6	650	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	b	-	-	-	-	c	c		
120	5.6	664	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-		
121	5.7	680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-		
122	5.7	796	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
123	5.8	532	-	-	-	-	-	-	a	-	a	c	a	c	b	-	-	c	-	-	c	c	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
124	5.8	664	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	c	-	-	
125	5.8	518	-	-	-	-	a	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	c	b	b	a	c	b	c	a	c	a	-		
126	5.8	680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	b	-		
127	5.9	286	-	c	-	b	-	c	-	b	-	b	-	-	c	c	-	-	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
128	5.9	534	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	c	-	-	c	b	-	b	-	-	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
129	5.9	608	-	-	-	b	c	-	-	b	c	c	b	-	a	-	c	c	a	-	a	b	c	c	b	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
130	5.9	548	b	-	-	b	-	-	-	c	-	b	c	b	c	-	-	a	c	a	b	b	c	-	c	b	c	a	c	c	c	c	c	-	b	
131	5.9	694	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	
132	5.9	764	c	-	c	c	-	-	c	-	-	c	c	c	-	-	c	c	-	c	c	c	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
133	6.0	764	c	-	c	c	-	-	c	-	-	c	c	b	-	-	c	c	-	c	c	c	-	c	c	c	-	c	-	-	-	-	-	-	c	
134	6.1	548	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	b	a	-	-	
135	6.1	766	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	c	-	
136	6.1	678	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
137	6.2	766	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	
138	6.2	766	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	
139	6.3	532	-	-	b	-	-	-	c	-	c	-	-	c	-	-	-	c	-	c	c	b	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	c	
140	6.3	694	-	-	-	c	c	-	-	-	c	c	c	-	b	c	c	-	a	-	a	c	a	c	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
141	6.4	724	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
142	6.6	748	c	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	c	
143	6.6	850	c	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	c	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	
144	6.6	694	-	-	-	c	c	-	-	-	c	c	c	c	c	-	c	-	b	-	a	c	b	c	b	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
145	6.6	780	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
146	6.7	532	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	c	-	-	-	c	-	c	c	c	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
147	6.7	446	-	-	-	c	-	-	b	c	a	-	a	-	a	-	-	-	b	-	b	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
148	6.9	780	-	-	-	c	-	-	-	-	c	c	c	c	-	-	c	c	b	-	a	c	c	c	b	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
149	7.0	546	-	-	-	-	-	-	a	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	7.0	764	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	
151	7.1	272	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
152	7.1	270	c	b	-	b	-	b	-	b	b	b	-	c	b	b	c	c	b	c	c	c	c	b	-	b	c	-	c	c	c	c	-	c	-	c
153	7.2	270	c	b	b	b	b	b	c	b	c	b	c	c	b	b	c	c	c	c	c	c	c	b	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
154	7.2	516	-	c	-	c	-	-	c	c	-	c	-	c	-	-	c	c	c	c	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
155	7.2	708	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156	7.4	500	-	c	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

157	7.5	516	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
158	7.5	300	c	c	c	c	c	c	-	c	c	c	-	c	c	c	c	b	c	c	c	b	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c			
159	7.5	532	-	-	-	-	-	-	a	-	a	-	a	-	-	-	c	-	b	c	a	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	
160	7.7	602	c	-	-	-	-	-	b	-	c	-	-	b	-	-	c	b	c	b	b	c	-	c	c	c	-	-	c	-	-	-	c	b		
161	7.9	516	-	b	c	c	-	-	-	c	-	c	-	c	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
162	8.1	532	-	c	-	c	-	-	-	c	c	b	-	c	-	-	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
163	8.4	500	-	c	-	-	-	-	c	c	c	c	-	-	-	c	-	c	-	c	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
164	8.9	602	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
165	9.2	602	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
166	9.7	516	c	-	-	c	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
167	9.8	586	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	c	-	-	-	b	c	c	c	-	-	-	b	-	-	-	-	-	c	-	c	-	c	
168	10.5	354	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	
169	11.3	602	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
170	12.0	354	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	c	-	c	-	b	-	-	-	-	-	c	-	c	-	c	-	c		
171	12.1	285	-	-	-	-	-	-	c	-	c	c	-	c	-	c	-	-	b	-	c	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
172	13.1	354	-	-	-	c	-	-	-	c	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
173	13.7	354	-	-	-	-	-	-	c	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
174	14.4	354	-	c	-	b	-	c	c	c	c	c	-	c	-	c	c	c	-	c	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	c	c	-	-	
175	14.7	338	-	c	-	-	-	-	c	c	-	-	-	-	c	-	c	-	-	-	-	-	-	-	c	c	-	c	-	c	-	c	c	c	-	c



← **Ryc.S9** Chromatogramy pojedynczych jonów dla izomerów diglukuronidu genisteiny acylowanego kwasem ferulowym (**21**, **27**, **30**, **33**, **38**) (a), izomerów diglukuronidu daidzeiny (**1,2**) (b), izomerów diglukuronidu genisteiny (**5,7**) (c) obecnych w korzeniach siewek (a₁-c₁) oraz korzeniach włośnikowatych (a₂-c₂). Numery związków (wytluszczonym drukiem) zgodne z Tab. 4.6 (według Staszaków i in., 2011).

→ **Ryc.S10** Chromatogramy pojedynczych jonów (4a₁ i 4b₁) oraz widma MS/MS zarejestrowane w trybie jonów dodatnich (a) i ujemnych (b) dla izomerów: *C*-heksozylo-*O*-heksozydu luteoliny (**3**) (a₂ i b₂), *O*-heksozydu *C*-heksozydu luteoliny (**5**) (a₃ i b₃) oraz *O*-heksozydu *C*-heksozydu luteoliny (**8**) (a₄ i b₄). Numery związków (wytluszczonym drukiem) zgodne z Tab. 4.7.

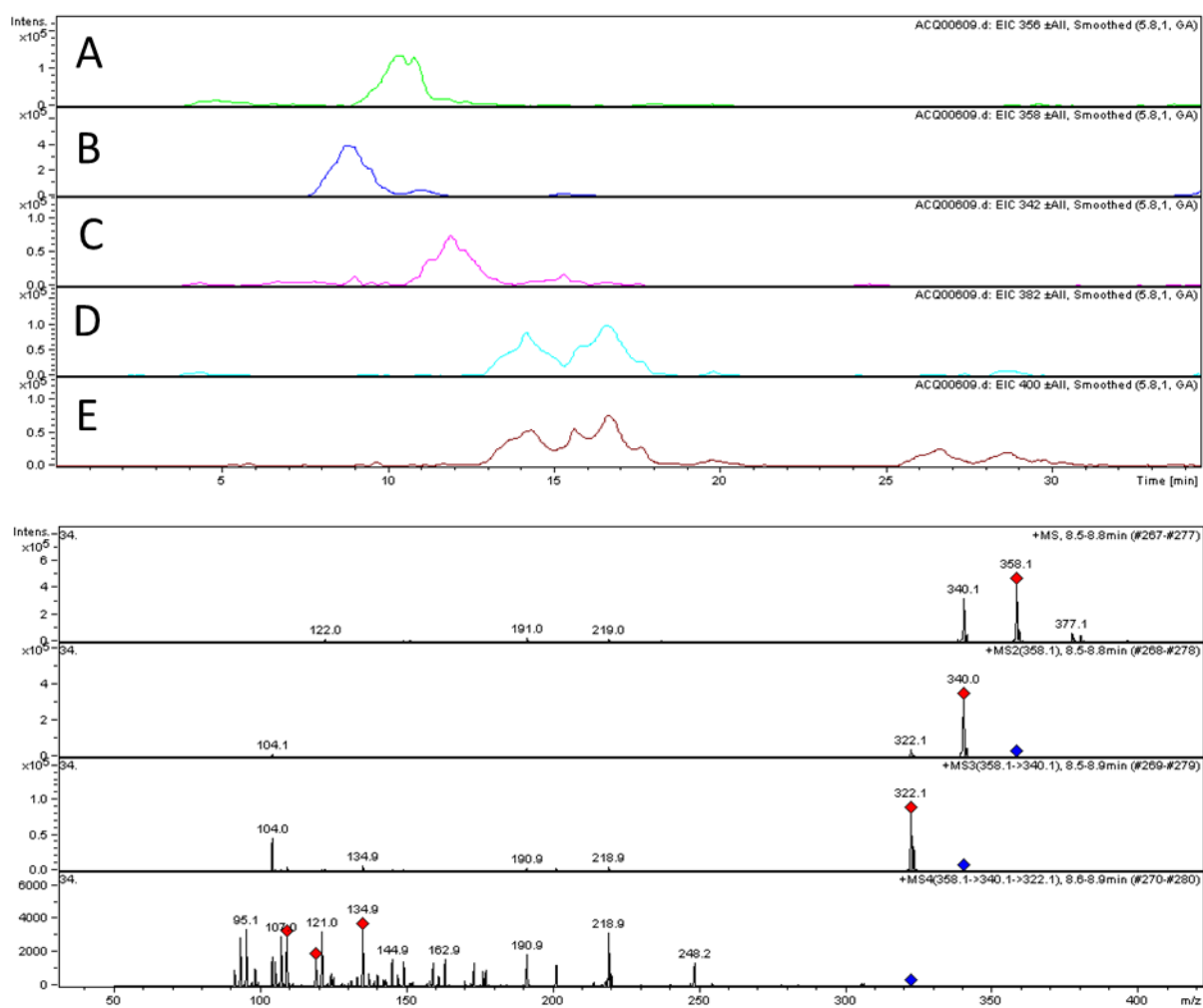




Ryc.S11 Czterotygodniowa siewka łubinu wąskolistnego (odmiana Sonet) po infekcji zarodnikami *C.lupini* (b₁ i b₂) oraz roślina kontrolna (a).



Ryc.S12 Ocena fitotoksyczności metabolitów, wyizolowanych z płynnej hodowli grzyba *C.lupini*, na przykładzie liści łubinu wąskolistnego. Toksyna została wyizolowana i oczyszczona przez Zespół Metabolomiki IGR PAN (Poznań) pod kierownictwem prof. dr hab. Piotra Kachlickiego (według Wojakowska i in., 2012) (© Piotr Kachlicki).



Ryc.S13 Chromatogramy pojedynczych jonów dla toksycznych metabolitów wtórnych wyizolowanych z zawiesiny *C.lupini*, zarejestrowanych w trybie jonów dodatnich przy m/z 356 (A), m/z 358 (B), m/z 342 (C), m/z 382 (D), m/z 400 (E) oraz widmo MSⁿ dla jonu [M+H]⁺ przy m/z 358 (B). Oznaczenia A-E zgodne z Tab.S4. Analiza przeprowadzona na systemie LC/IT-MS przez Zespół Metabolomiki IGR PAN (Poznań) pod kierownictwem prof. dr hab. Piotra Kachlickiego (według Wojakowska i in., 2012) (© Piotr Kachlicki).

Tab.S4 Składy elementarne oraz dokładne wartości m/z jonów $[M+H]^+$ toksycznych metabolitów wyizolowanych z hodowli grzyba *C.lupini*. Analiza przeprowadzona na systemie LC/Qq-Tof (według Wojakowska i in., 2012) (© Piotr Kachlicki).

Związek	Skład elementarny	Wartość m/z dla jonu $[M+H]^+$		Błąd (ppm)
		zmierzona	obliczona	
A	$C_{19}H_{35}NO_4$	342.2630	342.2639	2.73
B	$C_{19}H_{33}NO_5$	356.2437	356.2431	-1.43
C	$C_{19}H_{35}NO_5$	358.2588	358.2588	-0.05
D	$C_{21}H_{37}NO_5$	384.2733	384.2744	2.99
E	$C_{21}H_{39}NO_5$	386.2896	286.2901	1.21
F	$C_{21}H_{35}NO_6$	398.2536	398.2537	0.22
G	$C_{21}H_{37}NO_6$	400.2693	400.2694	0.04
H	$C_{23}H_{39}NO_7$	442.2789	442.2799	2.36