

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ PAN

Zakład Biochemii Produktów Naturalnych

**Ocena zmian profili metabolitów jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)
w warunkach niedoboru wody**

Barbara Swarcewicz

Promotor

Prof. dr hab. Maciej Stobiecki

POZNAŃ 2014

Dziękuję promotorowi
prof. dr hab. Maciejowi Stobieckiemu
za udzieloną pomoc podczas realizacji niniejszej pracy
oraz okazaną cierpliwość i życzliwość

Dziękuję
prof. dr hab. Pawłowi Krajewskiemu oraz **dr Anecie Sawikowskiej**
z Zakładu Biometrii i Bioinformatyki Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu
za wykonanie analiz bioinformatycznych i statystycznych

Wszystkim Doktorantom i Pracownikom Zakładu Biochemii Produktów Naturalnych
za pomoc i miłą atmosferę pracy podczas realizacji badań serdecznie dziękuję

Pracę dedykuję Rodzicom



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Przedłożona praca doktorska została zrealizowana w ramach projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę”, zadanie 16: „Analiza zmian jakościowych oraz ilościowych w profilach metabolitów pierwotnych oraz lotnych metabolitów wtórnych w korzeniach i liściach jęczmienia w warunkach niedoboru wody z wykorzystaniem technik GC/MS”, Priorytet 1., Działanie 1.3., Poddziałanie 1.3.1. Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013. Nr projektu: UDA.POIG.01.03.01-00-101/08-00.

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

SPIS RYCIŃ I TABEL.....	7
WYKAZ SKRÓTÓW.....	10
1. WPROWADZENIE LITERATUROWE.....	14
1.1. Metabolomika.....	14
1.1.1. Rys historyczny.....	14
1.1.2. Podejścia metodyczne stosowane w analizie metabolomów.....	16
1.1.3. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas – zasada działania i wykorzystanie w badaniach metabolomicznych roślin.....	27
1.2. Stresy środowiskowe.....	30
1.2.1. Rodzaje stresów i mechanizmy odpowiedzi na stres.....	30
1.2.2. Stres suszy.....	33
1.2.3. Hodowla roślin o zwiększonej tolerancji na stresy abiotyczne.....	39
1.3. Jęczmień.....	41
2. CEL PRACY.....	44
3. MATERIAŁY I METODY.....	45
3.1. Odczynniki.....	45
3.2. Materiał roślinny i warunki prowadzenia suszy.....	46
3.3. Ekstrakcja związków z materiału roślinnego.....	48
3.3.1. Ekstrakcja metabolitów z liści i korzeni.....	48
3.3.2. Ekstrakcja związków znajdujących się na powierzchni liści.....	48
3.4. Derywatyżacja.....	49
3.5. Analiza instrumentalna.....	49
3.6. Analiza danych.....	50
3.6.1. Identyfikacja związków i analiza półilościowa.....	50
3.6.1.1. TargetSearch.....	52
3.6.2. Analiza statystyczna i wizualizacja wyników.....	54
4. WYNIKI.....	56
4.1. Analiza związków wyizolowanych z liści i korzeni jęczmienia.....	56
4.1.1. Analiza jakościowa.....	56
4.1.2. Analiza zmian zawartości metabolitów w liściach i korzeniach siewek jęczmienia w warunkach niedoboru wody.....	77

4.1.2.1.	Analiza zmian zawartości metabolitów w odmianach Maresi, Cam/B1/CI, Sebastian, Stratus.....	77
4.1.2.2.	Analiza zmian zawartości metabolitów w liniach populacji mapującej Maresi×Cam/B1/CI.....	90
4.2.	Analiza związków wyizolowanych z powierzchni liści jęczmienia.....	108
4.2.1.	Analiza jakościowa.....	108
4.2.2.	Analiza zmian ilości metabolitów znajdujących się na powierzchni liści w warunkach niedoboru wody.....	113
5.	DYSKUSJA.....	117
6.	WNIOSKI.....	145
7.	LITERATURA.....	147
	WYKAZ STRON INTERNETOWYCH.....	159
	SUPLEMENT.....	160

SPIS RYCIN I TABEL

Spis rycin

Ryc. 1.1.	Podjęcia stosowane w analizie metabolomów a jakość uzyskanych danych	18
Ryc. 1.2.	Schemat prowadzenia badań metabolomicznych.....	19
Ryc. 1.3.	Uproszczony schemat budowy źródła jonów typu EI.....	27
Ryc. 1.4.	Ogólna koncepcja faz i reakcji wywołanych przez ekspozycję rośliny na stres.....	32
Ryc. 1.5.	Rodzaje odpowiedzi roślin na stres suszy i główne cechy z nimi związane.....	34
Ryc. 1.6.	Schematyczne przedstawienie drogi od wyboru linii rodzicielskich do odkrycia genu.....	41
Ryc. 3.1.	Fazy rozwojowe zbóż według skali BBCH.....	47
Ryc. 3.2.	Przykładowy raport przedstawiający rozkład czasu retencji tetradekanu w 1680 próbkach ekstraktów liści.....	54
Ryc. 4.1.	Uproszczony podział związków wykrytych w próbkach ekstraktów tkanek jęczmienia ze względu na przynależność do danej klasy związków.....	70
Ryc. 4.2.	Klasyfikacja związków wykrytych w siewkach jęczmienia ze względu na strukturę.....	71
Ryc. 4.3.	Koelucja związków podczas analizy chromatograficznej.....	73
Ryc. 4.4.	Chromatogramy oraz widma EI rafinozy i 1-kestozy.....	74
Ryc. 4.5.	Analiza głównych współrzędnych.....	88
Ryc. 4.6.	Wzory strukturalne oraz zmiany zawartości trisacharydów: rafinozy i 1-kestozy, w warunkach deficytu wody w liściu i korzeniu siewek jęczmienia.....	89
Ryc. 4.7.	Rozkład poziomów akumulacji metabolitów w liściach i korzeniach linii populacji Maresi × Cam/B1/CI, w warunkach kontrolnych i deficytu wody.....	91
Ryc. 4.8.	Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca efekt suszy w liściach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI.....	106
Ryc. 4.9.	Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca efekt suszy w korzeniach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI.....	107
Ryc. 4.10.	Widmo mas EI nonakozanu.....	111
Ryc. 4.11.	Widmo mas EI TMS-pochodnej tetrakozanolu.....	112
Ryc. 4.12.	Widmo mas EI TMS-pochodnej kwasu heksakozanowego.....	112
Ryc. 4.13.	Zmiany zawartości alkanoli w warunkach deficytu wody.....	114
Ryc. 4.14.	Zmiany zawartości alkanów w warunkach deficytu wody.....	115
Ryc. 4.15.	Zmiany zawartości kwasów tłuszczowych w warunkach deficytu wody....	116
Ryc. 5.1.	Susza w Polsce w 2011 r.: a) Klimatyczny Bilans Wodny, b) potencjalne zasięgi suszy dla upraw zbóż jarych.....	118

Ryc. 5.2.	Metabolizm proliny u roślin wyższych.....	133
Ryc. 5.3.	Schematyczne przedstawienie budowy kutykuli.....	141
Ryc. S.1.	Przykładowe chromatogramy całkowitego strumienia jonów zarejestrowane dla próbek ekstraktów liści jęczmienia roślin kontrolnych i poddanych stresowi niedoboru wody linii MCam 101.....	162
Ryc. S.2.	Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w liściach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI w warunkach kontrolnych.....	165
Ryc. S.3.	Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w liściach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI w warunkach niedoboru wody.....	166
Ryc. S.4.	Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w korzeniach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI w warunkach kontrolnych.....	167
Ryc. S.5.	Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w korzeniach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI w warunkach niedoboru wody.....	168
Ryc. S.6.	Widmo EI insektycydu obecnego na powierzchni liści jęczmienia – chloropiryfosu.....	169
Ryc. S.7.	Zmiany zawartości związków obecnych na powierzchni liści.....	170
Ryc. S.8.	Jęczmień zwyczajny (<i>Hordeum vulgare</i> L.) a) Cam/B1/CI b) Maresi c) populacja mapująca Maresi × Cam/B1/CI.....	171
Ryc. S.9.	Przykładowe chromatogramy całkowitego strumienia jonów zarejestrowane dla próbek ekstraktów wosków z powierzchni liści jęczmienia roślin kontrolnych i poddanych stresowi niedoboru wody odmiany Maresi.....	172

Spis tabel

Tab. 1.1.	Zestawienie trzech technik analitycznych najczęściej wykorzystywanych w badaniach metabolomicznych.....	22
Tab. 1.2.	Przykładowe bazy danych wykorzystywane w metabolomice.....	25
Tab. 3.1.	Parametry układu GC.....	50
Tab. 3.2.	Parametry układu TOF-MS.....	50
Tab. 3.3.	Poziomy identyfikacji związków zdefiniowane przez MSI.....	52
Tab. 4.1.	Związki wykryte w próbkach ekstraktów liści i korzeni jęczmienia.....	57
Tab. 4.2.	Związki wykryte przy użyciu pakietu TargetSearch.....	67
Tab. 4.3.	Zmiany zawartości metabolitów w próbkach ekstraktów liści odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus związane z odmianą oraz wywołane stresem niedoboru wody oraz efektem interakcji.....	78
Tab. 4.4.	Zmiany zawartości metabolitów w próbkach ekstraktów korzeni odmian	

	Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus związane z odmianą oraz wywołane stresem niedoboru wody oraz efektem interakcji.....	82
Tab. 4.5.	Związki wykryte na powierzchni liści jęczmienia.....	109
Tab. 5.1.	Wpływ dostosowania osmotycznego na wielkość plonu.....	126
Tab. S.1.	Przypisanie nazw bądź identyfikatorów związkom nieznanym na podstawie automatycznej analizy jakościowej i ilościowej z wykorzystaniem pakietu TargetSearch.....	160
Tab. S.2.	Zestawienie nieistotnych i istotnych zmian zawartości metabolitów występujących w odmianach Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus na podstawie tab. 4.3 i tab. 4.4.....	163
Tab. S.3.	Zestawienie metabolitów ze względu na charakterystykę odpowiedzi w warunkach niedoboru wody dla odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus na podstawie tab. 4.3 i tab. 4.4.....	163
Tab. S.4.	Zestawienie liczby wzorów kierunków odpowiedzi metabolitów liści i korzeni pod wpływem niedoboru wody dla odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus na podstawie tab. 4.3 i tab. 4.4.....	164
Tab. S.5.	Zestawienie nieistotnych i istotnych zmian zawartości metabolitów w liściach i korzeniach linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI.....	164

Spis załączników na dołączonej płycie kompaktowej

Tab. CD.1.	Klasyfikacja metabolitów wykrytych w tkankach jęczmienia.
Tab. CD.2a.	Średnie wartości \log_2 (intensywności) metabolitów obecnych w ekstraktach liści i korzeni czterech genotypów jęczmienia zwyczajnego (Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian, Stratus) w warunkach kontrolnych i warunkach stresu niedoboru wody.
Tab. CD.2b.	Średnie wartości \log_2 (intensywności) metabolitów obecnych w ekstraktach liści i korzeni linii jęczmienia populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI w warunkach kontrolnych i warunkach stresu niedoboru wody.

WYKAZ SKRÓTÓW

- ¹³C NMR** – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego z wykorzystaniem ¹³C (ang. carbon-13 nuclear magnetic resonance)
- ¹H NMR** – protonowa spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. hydrogen-1 nuclear magnetic resonance)
- 1-SST** – sacharozo-sacharozo fruktozylotransferaza (ang. sucrose:sucrose fructosyltransferase)
- 5OPase** – 5-oksoprolinaza (ang. 5-oxoprolinase)
- 6-SFT** – sacharozo-fruktano 6-fruktozylotransferaza (ang. sucrose:fructan 6-fructosyltransferase)
- ABA** – kwas abscysynowy (ang. abscisic acid)
- ABF** – czynniki wiążące się z ABRE (ang. ABRE-binding factor)
- ABRE** – element odpowiedzi na kwas abscysynowy (ang. ABA-responsive element)
- ADP** – adenozyno-5'-difosforan (ang. adenosine diphosphate)
- AFLP** – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (ang. amplified fragment length polymorphism)
- ANOVA** – analiza wariancji (ang. analysis of variance)
- APCI** – jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. atmospheric pressure ionization)
- AREB** – białka wiążące się z ABRE (ang. ABRE-binding protein)
- ASCA** – analiza wariancji z jednoczesną analizą składowych (ang. analysis of variance - simultaneous component analysis)
- ATP** – adenozyno-5'-trifosforan (ang. adenosine 5'-triphosphate)
- BAC** – transporter aminokwasów zasadowych (ang. basic amino acid transporter)
- BBCH** – skala rozwojowa zbóż (niem. Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie)
- BSTFA** – N,O-bis(trimetylsililo)trifluoroacetamid (ang. N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide)
- CAM** – kwasowy metabolizm węgla gruboszowatych (ang. crassulacean acid metabolism)
- CE** – elektroforeza kapilarna (ang. capillary electrophoresis)
- CE** – element łączący (ang. coupling element)
- CE-MS** – elektroforeza kapilarna sprzężona ze spektrometrią mas (ang. capillary electrophoresis - mass spectrometry)
- ChEBI** – baza danych substancji chemicznych o znaczeniu biologicznym (ang. Chemical Entities of Biological Interest)
- CI** – jonizacja chemiczna (ang. chemical ionization)
- CoA** – koenzym A (ang. coenzyme A)
- DIMS** – spektrometria mas z bezpośrednim wprowadzeniem próbki (ang. direct infusion mass spectrometry)
- DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)

- ECNI** – jonizacja chemiczna z wychwytem elektronów (ang. electron capture negative ionization)
- EI** – jonizacja elektronami (ang. electron ionization)
- eQTL** – loci cech ilościowych związane z ekspresją genów (ang. expression QTL)
- ESI** – jonizacja przez elektrorozpraszanie (ang. electrospray ionization)
- FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. flavin adenine dinucleotide)
- FAO** – Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- FI** – jonizacja polem (ang. field ionization)
- FTICR** – analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników (ang. Fourier transform ion cyclotron resonance)
- FTIR** – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. Fourier transform infrared spectroscopy)
- GABA** – kwas γ -aminomasłowy (ang. gamma-aminobutyric acid)
- GC** – chromatografia gazowa (ang. gas chromatography)
- GC \times GC** – dwuwymiarowa chromatografia gazowa (ang. two-dimensional gas chromatography)
- GGC** – γ -glutamylcyklotransferaza (ang. γ -glutamyl cyclotransferase)
- GMD** – metabolomiczna baza danych z Golm (ang. Golm Metabolome Database)
- Gols** – syntaza galaktinolu (ang. galactinol synthase)
- GSA** – semialdehyd glutaminowy (ang. glutamate-semialdehyde)
- GUS** – Główny Urząd Statystyczny
- GWD** – dikinaza glukan-woda (ang. glucan:water dikinase)
- HCA** – hierarchiczna analiza klastrow (ang. hierarchical cluster analysis)
- HCAA** – amidy kwasów hydroksycynamonowych (ang. N-hydroxycinnamic acid amide)
- HMDB** – baza danych metabolomu ludzkiego (ang. Human Metabolome Database)
- HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high-performance liquid chromatography)
- HSP** – białko szoku cieplnego (ang. heat shock protein)
- IUNG** – Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
- KBW** – Klimatyczny Bilans Wodny
- KEGG** – encyklopedia genów i genomów z Kioto (ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
- LC** – chromatografia cieczowa (ang. liquid chromatography)
- LEA** – białka późnej embriogenezy (ang. late embryogenesis abundant proteins)
- MALDI** – desorpcja laserowa z udziałem matrycy (ang. matrix-assisted laser desorption ionization)
- MANOVA** – wielowymiarowa analiza wariancji (ang. multivariate analysis of variance)
- METLIN** – baza danych metabolitów i tandemowej spektrometrii mas (ang. Metabolite and Tandem MS Database)
- MFA** – analiza przepływu metabolitów (ang. metabolic flux analysis)
- mQTL** – loci cech ilościowych związane z metabolitami (ang. metabolic QTL)
- MRM** – monitorowanie reakcji następczych (ang. multiple reaction monitoring)
- MS** – spektrometria mas (ang. mass spectrometry)

- MS/MS** – tandemowa spektrometria mas (ang. tandem mass spectrometry)
- MSI** – inicjatywa ds. standardów w metabolomice (ang. Metabolomics Standard Initiative)
- MSⁿ** – tandemowa spektrometria mas n-tego rzędu (ang. multiple stage mass spectrometry)
- MST** – znaczniki widma masowego (ang. mass spectral tags)
- MSTFA** - N-metylo-N-trimetylsililo-trifluoroacetamid (ang. N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide)
- NAD** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. nicotinamide adenine dinucleotide)
- NADP** – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
- NetCDF** – format danych (ang. network common data form)
- NIST** – Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii (ang. National Institute of Standards and Technology)
- NMR** – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. nuclear magnetic resonance)
- P5C** – pirolino-5-karboksylan (ang. pyrroline-5-carboxylate)
- P5CDH** – dehydrogenaza pirolino-5-karboksylanu (ang. pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase)
- P5CR** – reduktaza pirolino-5-karboksylanu (ang. pyrroline-5-carboxylate reductase)
- P5CS** – syntetaza pirolino-5-karboksylanu (ang. pyrroline-5-carboxylate synthetase)
- PCA** – analiza głównych składowych (ang. principal component analysis)
- PCO** – analiza głównych współrzędnych (ang. principal coordinates analysis)
- PDH** – dehydrogenaza prolinowa (ang. proline dehydrogenase)
- PEAMT** – N-metylotransferaza fosfoetanolaminowa (ang. phosphoethanolamine N-methyltransferase)
- PLS** – regresja metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. partial least square regression)
- PMN** – sieć metaboliczna roślin (ang. Plant Metabolic Network)
- pQTL** – loci cech ilościowych związane z białkami (ang. protein QTL)
- PWD** – dikinaza fosfoglukana-woda (ang. phosphoglucan, water dikinase)
- QqQ** – potrójny analizator kwadropolowy (ang. triple quadrupole)
- QTL** – loci cech ilościowych (ang. quantitative trait loci)
- RAPD** – losowa amplifikacja polimorficznego DNA (ang. randomly amplified polymorphic DNA)
- RFLP** – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragments length polymorphism)
- RFO** – oligosacharydy z rodziny rafinozy (ang. raffinose family oligosaccharides)
- RFS** – syntaza rafinozy (ang. raffinose synthase)
- RIL** – zrekombinowane linie wsobne (ang. recombinant inbred line)
- ROS** – reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
- RWC** – względna zawartość wody (ang. relative water content)
- SDC** – dekarboksylaza seryny (ang. serine decarboxylase)
- sHSP** – niskocząsteczkowe białka szoku cieplnego (ang. small heat shock proteins)
- SIMRs** – odpowiedzi morfogenezy indukowane stresem (ang. stress-induced morphogenesis responses)

- SMPD** – baza danych szlaków związków niskocząsteczkowych (ang. Small Molecule Pathway Database)
- SMSR** – System Monitoringu Suszy Rolniczej
- SNP** – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
- SPE** – ekstrakcja do fazy stałej (ang. solid-phase extraction)
- SPME** – mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. solid-phase microextraction)
- ssp.** – podgatunek (łac. subspecies)
- TDC** – dekarboksylaza tyrozyny (ang. tyrosine decarboxylase)
- TIC** – całkowity prąd jonowy (ang. total ion current)
- TMS** – grupa trimetylosililowa (ang. trimethylsilyl)
- TOF** – analizator czasu przelotu (ang. time-of-flight)
- TPP** – fosfataza trehalozo-6-fosforanu (ang. phosphatase trehalose-6-phosphate)
- TPS** – syntaza trehalozo-6-fosforanu (ang. trehalose-6-phosphate synthase)
- UPLC** – ultrasprawa chromatografia cieczowa (ang. ultra performance liquid chromatography)
- UV** – promieniowanie ultrafioletowe (ang. ultraviolet)
- δOAT** – δ-aminotransferaza ornitynowa (ang. ornithine-delta-aminotransferase)

1. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1 Metabolomika

Metabolomika jest dziedziną nauki zajmującą się jakościową i/lub ilościową analizą metabolitów znajdujących się w organizmie, tkance, komórce, organellum, soku roślinnym czy w przypadku zwierząt, płynie ustrojowym. Wraz z pozostałymi „omikami” takimi jak m.in. genomika, transkryptomika, proteomika i epigenomika, odgrywa istotną rolę w badaniach dotyczących biologii systemów. Celem zaś biologii systemów jest integracja istniejącej wiedzy na temat składników biologicznych organizmu, opracowanie na jej podstawie całościowego modelu organizmu z uwzględnieniem złożonych oddziaływań występujących pomiędzy poszczególnymi elementami, a następnie sformułowanie uniwersalnych zasad wyjaśniających budowę i funkcjonowanie żywego organizmu (Coruzzi i in. 2009). Ciągły postęp w zakresie nowych technik analitycznych jak i bioinformatycznych daje nadzieję na rozwiązanie złożonych problemów badawczych i lepsze zrozumienie sieci powiązań między różnymi poziomami molekularnymi.

1.1.1 Rys historyczny

Badania dotyczące związków niskocząsteczkowych oraz ich przemian budziły zainteresowanie ludzi od wieków. Pierwsze z nich miały charakter medyczny, a ich celem było znalezienie związku pomiędzy składem płynów ustrojowych a występowaniem chorób. W czasach starożytnych indyjscy lekarze używali w diagnostyce cukrzycy mrówek jako biologicznych wskaźników wysokiej zawartości glukozy w moczu pacjentów (Zajac i in. 2010). Ponadto wiele wysoko rozwiniętych starożytnych cywilizacji Bliskiego Wschodu (w tym m.in. Sumerowie, Babilończycy, Asyryjczycy, Egipcjanie) oraz Chin i Indii wykorzystywało naturalne właściwości niektórych roślin do produkcji leków stosowanych w profilaktyce i terapii chorób. Wiedza z tego okresu przetrwała w medycynie staroindyjskiej (Ajurweda) i chińskiej, a także została udokumentowana w opisach takich jak np. papyrus Ebersa (1500 r. p.n.e.), będący dwudziestometrowym spisem ponad 850 leków pochodzenia roślinnego (Sumner 2000). Przez kolejne stulecia medycyna wykorzystywała rośliny w celach leczniczych, jednak nadal nie było wiadomo co jest źródłem ich tak specyficznych właściwości. Dopiero rozwój technik analitycznych w XX wieku umożliwił stopniowe poznawanie metabolizmu roślin i zwierząt.

W 1903 roku rosyjski botanik i biochemik Michaił Cwiet, asystent na Uniwersytecie Warszawskim, przedstawił swoje badania nad rozdzieleniem barwników roślinnych.

W trakcie przeprowadzania tych badań, Cwiet opracował technikę rozdzielania składników mieszanin, którą udoskonalał w kolejnych latach; ostatecznie stała się ona znana jako chromatografia (Ettre 2003). W tym samym czasie powstawały pionierskie prace w dziedzinie spektrometrii mas. W 1912 roku Joseph John Thomson skonstruował pierwszy spektrometr mas, a kolejne dekady przynosiły coraz to nowe rozwiązania techniczne, w tym nowe sposoby jonizacji i typy analizatorów, przyczyniając się do gwałtownego rozwoju dyscypliny (de Hoffmann i Stroobant 2007).

W drugiej połowie XX wieku dzięki coraz większej czułości, rozdzielczości i wydajności przyrządów analitycznych, spektrometria mas w połączeniu z technikami chromatograficznymi zaczęła odgrywać znaczącą rolę w rozwoju metabolomiki. Pierwsze próby analizy jakościowej i ilościowej metabolitów przypadły na lata 60. i 70. W 1966 roku Dalgliesh ze współpracownikami przeprowadzili badania nad szeroką grupą związków wchodzących w skład moczu ludzi i szczurów, wykorzystując do tego celu chromatografię gazową (Dalgliesh i in. 1966). W tym samym roku Tanaka i współpracownicy opisali nową, genetycznie uwarunkowaną chorobę związaną z zaburzeniem metabolizmu leucyny – acydemię izowalerianową. Dzięki wykorzystaniu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) badacze wykryli w surowicy i moczu chorych pacjentów katabolit leucyny gromadzący się wskutek bloku metabolicznego – kwas izowalerianowy (Tanaka i in. 1966). Na początku lat 70. ukazały się prace zespołu z Baylor College of Medicine, dotyczące analiz steroidów, kwasów karboksylowych, węglowodanów, alkoholi polihydroksylowych oraz leków i ich metabolitów w moczu i krwi ludzi. Autorzy zasugerowali, że uzyskiwane w ten sposób profile metaboliczne mogą być użyteczne w badaniach nad rozwojem człowieka, a także chorobami oraz terapiami lekowymi (Horning i Horning 1970, 1971a, 1971b, Devaux i in. 1971). W kolejnych latach zainteresowanie problematyką profilowania metabolitów wzrastało, jednak nadal skoncentrowane było wokół zastosowań medycznych. Dopiero w 1991 roku ukazała się praca na temat analizy jakościowej i ilościowej metabolitów roślinnych dotycząca siewek jęczmienia traktowanych herbicydami. Autorzy stwierdzili, że na podstawie uzyskanych charakterystycznych metabolicznych wzorów odpowiedzi możliwe jest śledzenie zmian zachodzących pod wpływem traktowania roślin herbicydami, a także przeprowadzenie klasyfikacji związków na te wywołujące znane i nieznanne – nowe typy odpowiedzi fizjologicznych (Sauter i in. 1991).

Rosnące zainteresowanie badaniami metabolizmu roślin, zwierząt i ludzi wymusiło ujednoczenie pojęć i definicji związanych z coraz to bardziej rozwijającą się dziedziną nauki. W 1998 roku Stephen Oliver ze współpracownikami po raz pierwszy wprowadzili termin

metabolom (analogicznie do pojęć transkryptom i proteom) na opisanie zestawu niskocząsteczkowych związków wchodzących w skład żywych organizmów (Oliver i in. 1998). Następnie w 2002 roku Oliver Fiehn zasugerował, że dziedzina nauki skupiająca się na całościowej analizie (jakościowej i ilościowej) metabolitów badanego organizmu powinna nosić nazwę metabolomiki (Fiehn 2002). Dwa lata później, w 2004 roku została założona międzynarodowa organizacja non profit Metabolomics Society (www.metabolomicsociety.org), której celem jest integrowanie naukowców działających w podobnym obszarze tematycznym, umożliwienie im współpracy oraz publikowania swoich osiągnięć w oficjalnym czasopiśmie towarzystwa oraz prezentowania wyników badań na corocznej konferencji.

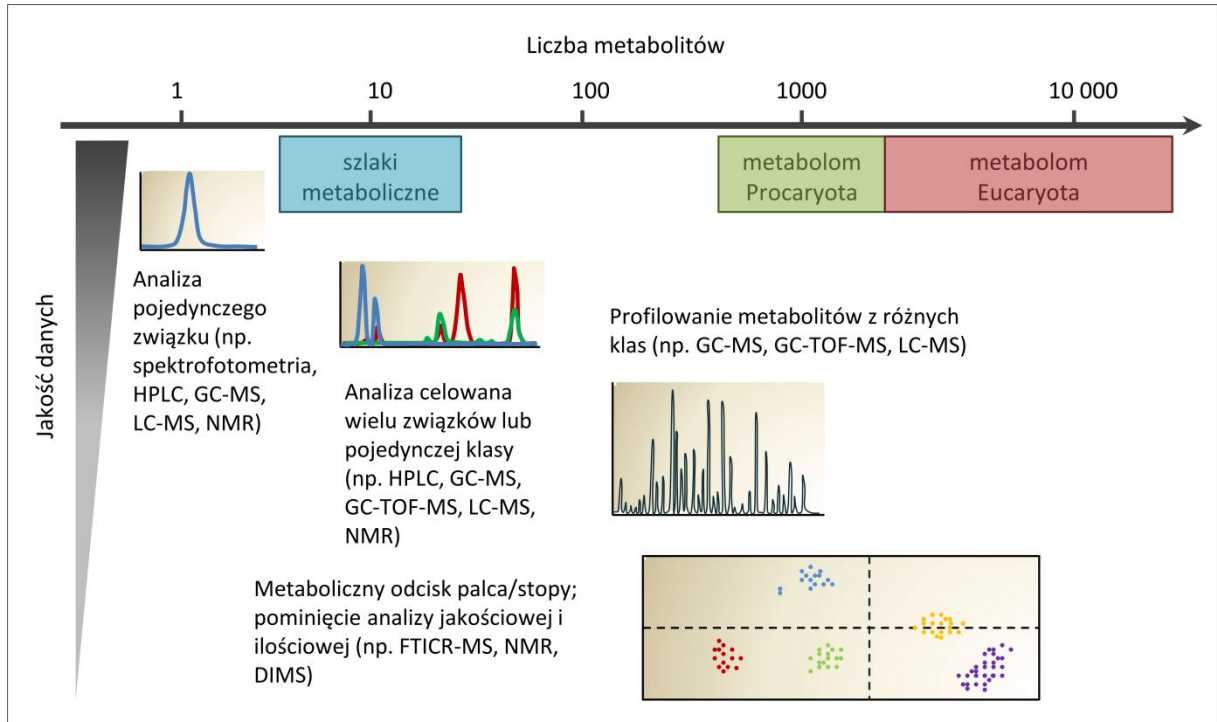
1.1.2 Podejścia metodyczne stosowane w analizie metabolomów

Badania metabolomów ze względu na ich dużą złożoność, zarówno pod względem ilości jak i różnorodności strukturalnej metabolitów, stawiają ambitne zadanie chemii analitycznej. Szacuje się, że w królestwie roślin występuje ponad 200 000 metabolitów, przy czym dla pojedynczego gatunku ich liczba wynosi około kilku tysięcy (Weckwerth 2003, Baker 2011). Początkowo celem badań metabolomicznych było skatalogowanie wszystkich metabolitów obecnych w danym organizmie, jednak szybko okazało się, że zadanie to jest niezwykle trudne. Obecnie zastosowanie nawet najbardziej zaawansowanych technik analitycznych nie pozwala na kompleksową analizę metabolomu nawet najprostszego organizmu. Stąd też z biegiem lat wypracowano kilka podejść badawczych (Fiehn 2002, Goodacre i in. 2004, Dunn i Ellis 2005, Nielsen i Oliver 2005, Hall 2006, Nielsen 2007, Crown i Antoniewicz 2013), które mają za zadanie pomóc w uzyskaniu odpowiedzi na pytania o wpływ stanu w jakim znajduje się organizm na skład i poziom zawartości metabolitów oraz o sposób w jaki związki niskocząsteczkowe oddziałują na komórkę. W celu monitorowania zestawu niskocząsteczkowych związków zawartych w komórce bez konieczności ich identyfikacji i analizy ilościowej wykorzystuje się metaboliczny odcisk palca (ang. *metabolic fingerprinting*). Wszystkie etapy: od przygotowania próbki, metody ekstrakcji i rozdziału, do stosowanej techniki analitycznej powinny być w miarę możliwości proste, szybkie i wysokoprzepustowe. Podejście to często wykorzystywane jest jako wstępny etap do profilowania metabolitów, ponieważ umożliwia wyszukiwanie znaczących zmian, przeprowadzenie szybkiej analizy różnicowej oraz klasyfikacji próbek na podstawie ich pochodzenia bądź znaczenia biologicznego. Zwykle do tego celu stosuje się magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), spektrometrię mas z bezpośrednim wprowadzeniem próbki

(DIMS), spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) lub spektroskopię Ramana; analiza chromatograficzna na ogół jest pomijana ze względu na znaczące wydłużenie czasu badań. Ponieważ w obrębie definicji metabolomu często wyróżniane są dwa pojęcia: endo- i egzometabolomu, opisujące odpowiednio zestaw metabolitów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, analogicznie, w przypadku analizy związków wchodzących w skład płynów ustrojowych, bądź wydzielanych do środowiska zewnętrznego (np. do podłoża hodowlanego) takie globalne podejście nosi nazwę metabolicznego odcisku stopy (ang. *metabolic footprinting*). Profilowanie metabolitów (ang. *metabolite/metabolic profiling*) zawęża badania do wybranej klasy związków, np. węglowodanów, aminokwasów, alkaloidów lub związków wchodzących w skład konkretnego szlaku metabolicznego. Analiza nie musi być ilościowa, ale zazwyczaj jest przynajmniej półilościowa. Przeważnie do tego celu wykorzystuje się techniki łączone: chromatografię cieczową lub gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS, LC-MSⁿ, GC-MS, GC×GC-MS), chromatografię cieczową sprzężoną z magnetycznym rezonansem jądrowym (LC-NMR) oraz elektroforezę kapilarną sprzężoną ze spektrometrią mas (CE-MS). Analiza celowana (ang. *metabolite target analysis, targeted analysis*) ogranicza badania do pojedynczych związków bądź ich niewielkiej grupy, np. substratów i produktów zaangażowanych w określoną reakcję enzymatyczną. Podejście tego rodzaju dostarcza szczegółowych informacji, zarówno jakościowych i ilościowych na temat wybranych związków. Dzięki zastosowaniu optymalnych, dedykowanych metod ekstrakcji, rozdziału i detekcji możliwa jest dokładna analiza interesujących nas metabolitów nawet w próbkach, w których występują one w niskich stężeniach. Analiza przepływu metabolitów (ang. *metabolic flux analysis, MFA*) pozwala na zgłębianie metabolizmu komórkowego poprzez badanie struktury i aktywności szlaków metabolicznych. Kluczowym elementem MFA jest wprowadzenie do badanego *in vitro* lub *in vivo* układu biologicznego związków wyznakowanych stabilnymi (¹³C, ²H, ¹⁵N, ¹⁸O) lub nietrwałymi (promieniotwórczymi) izotopami (¹⁴C, ³H). Po inkubacji przez określony czas izoluje się, a następnie oznacza związki zawierające w swojej strukturze znaczniki izotopowe. Zwykle do tego celu wykorzystuje się techniki MS i NMR.

Każde ze stosowanych w metabolomice podejść charakteryzuje określona selektywność, czułość i precyzja analizy, a tym samym generowanie danych o zróżnicowanej jakości. Najdokładniejszych informacji dostarczają metody dotyczące pojedynczych związków bądź niewielkiej ich grupy (analiza celowana). Z kolei podejścia takie jak profilowanie metabolitów czy metaboliczny odcisk palca/stopy z jednej strony umożliwiają uzyskanie informacji o szerokiej grupie związków bądź o ich profilu, z drugiej ze względu na

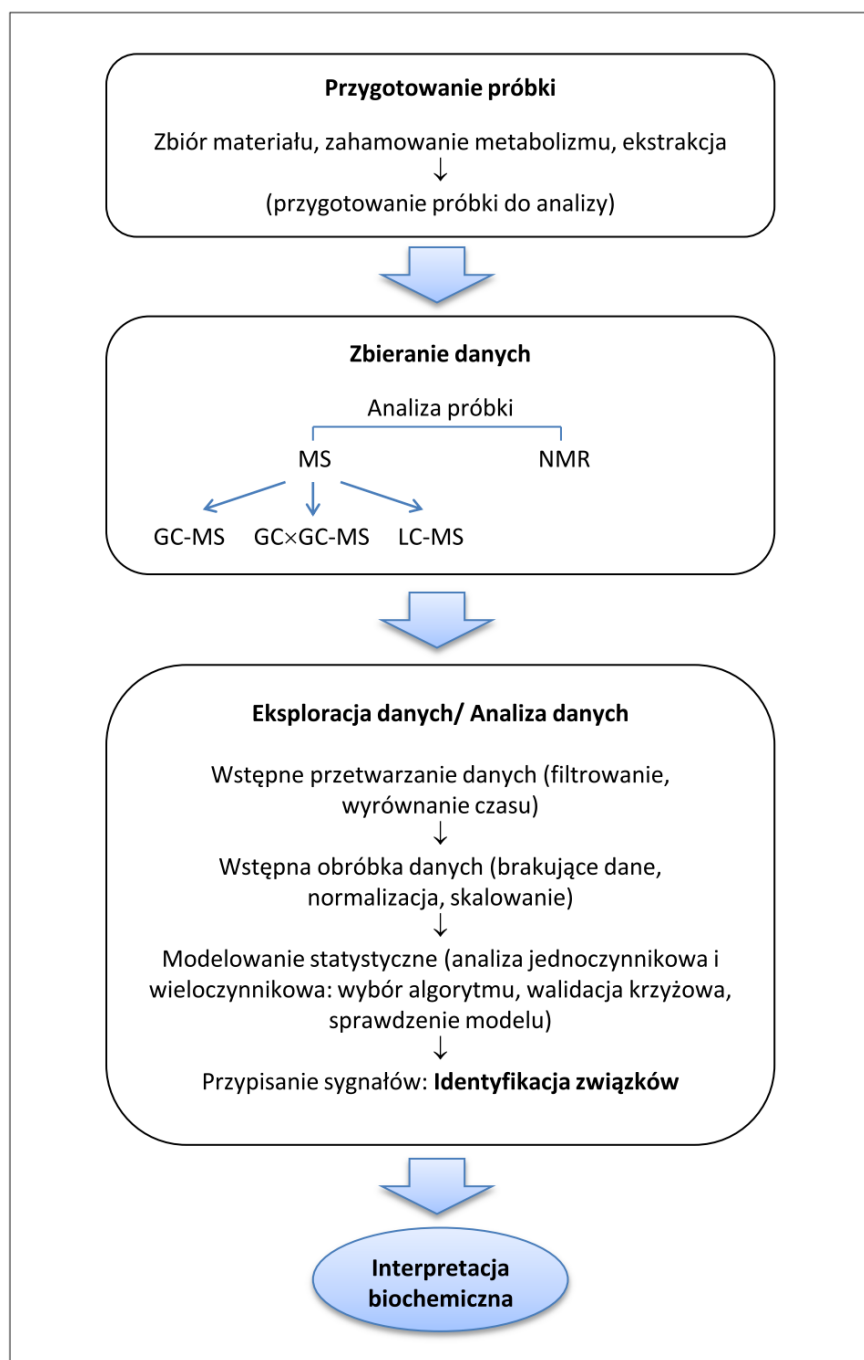
stosowane ogólne techniki przygotowania próbki, nie dostarczają danych tej samej jakości dla wszystkich analizowanych związków. Wykorzystywane strategie stanowią zatem kompromis pomiędzy ilością analizowanych metabolitów, a dokładnością uzyskiwanych danych (ryc. 1.1).



Ryc. 1.1. Podejścia stosowane w analizie metabolomów a jakość uzyskanych danych (według: Fernie i in. 2004).

Na badania z zakresu metabolomiki składają się trzy główne etapy: przygotowanie materiału biologicznego, analiza biochemiczna i analiza statystyczna (ryc. 1.2). Staranne zaplanowanie każdego z nich jest kluczowym elementem wpływającym na wiarygodność i dokładność otrzymanych wyników. Środowisko naukowców zainteresowanych tematyką metabolomiczną szybko dostrzegło konieczność standaryzacji badań, umożliwiającej ich powtarzanie i porównywanie pomiędzy różnymi ośrodkami. Proponowane minimum niezbędnych informacji opisujących metody przeprowadzania analiz metabolomicznych zostało ujęte w zaleceniach Metabolomics Standard Initiative (MSI) (msi-workgroups.sourceforge.net) (Fiehn i in. 2007a, b, 2008, Sumner i in. 2007).

W celu zapewnienia homogeniczności próbek w analizach metabolomu roślinnego niezbędne jest ściśle kontrolowanie warunków hodowli i zbioru materiału (Gibon i Rolin 2012). Ponieważ skład metabolitów w komórce zależy od środowiska, w którym się ona znajduje, ważne jest jak najszybsze zahamowanie procesów biochemicznych zachodzących



Ryc. 1.2. Schemat prowadzenia badań metabolomicznych (według: Tugizimana i in. 2013).

w roślinie. Zwykle osiąga się to poprzez gwałtowną zmianę temperatury lub pH. Najczęściej przebieg procesów metabolicznych hamowany jest przez natychmiastowe zamrożenie materiału roślinnego w temperaturze ciekłego azotu ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) w momencie zbioru, a następnie podczas ekstrakcji z wykorzystaniem gorących lub schłodzonych rozpuszczalników organicznych. Na metabolom każdego organizmu składa się szeroka grupa związków wykazujących odmienne właściwości fizykochemiczne takie jak m.in. masa cząsteczkowa, polarność, lotność, rozpuszczalność czy stabilność termiczna. Obecnie nie jest

znana metoda, która pozwalałaby na jednoczesną ekstrakcję wszystkich związków występujących w komórce czy tkance. Stąd dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, techniki ekstrakcji, czasu jej trwania i temperatury są ważnymi czynnikami, decydującymi o składzie jakościowym i ilościowym ekstraktu. Celem tego etapu jest izolacja z materiału biologicznego maksymalnej liczby metabolitów w pierwotnym stanie, w sposób powtarzalny ilościowo. Zwykle do ekstrakcji metabolitów wykorzystywane są rozpuszczalniki organiczne takie jak: metanol, mieszanina metanol-woda, etanol – do izolacji metabolitów polarnych oraz chloroform, octan etylu, heksan – do ekstrakcji związków lipofilowych (Villas-Bôas 2007, Kim i Verpoorte 2010). Ponadto wybrany rozpuszczalnik powinien zapobiegać konwersji związków i być kompatybilny ze stosowaną w następnym etapie techniką analityczną. Przykładowo w analizach LC-MS w układzie faz odwróconych nie jest wskazane stosowanie rozpuszczalników takich jak octan etylu czy chloroform, gdyż nie rozpuszczają się w fazie ruchomej podczas rozdziału chromatograficznego. Z kolei inne rozpuszczalniki, zawierające np. nietlone sole (fosforany, cytryniany), mogą odkładać się w źródle jonów i zapychać kapilary lub zmniejszać wydajność jonizacji (np. detergenty podczas jonizacji przez elektrorozpraszanie). W przypadku analiz NMR zwykle stosowany może być dowolny rozpuszczalnik (w ^1H NMR najlepiej deuterowany) (Moco i in. 2007). Dodatkowo w celu oczyszczenia i zagęszczenia ekstraktu stosowane są techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Umożliwiają one zagęszczenie metabolitów obecnych w rozpuszczalniku po ekstrakcji poprzez przepuszczenie uzyskanego ekstraktu przez kolumnki wypełnione odpowiednim złożem w przypadku SPE lub inkubację próbki z włóknem z topionej krzemionki pokrytym fazą ekstrakcyjną w przypadku SPME. W zależności od charakteru chemicznego izolowanych związków stosuje się złoża i włókna o różnych właściwościach fizykochemicznych umożliwiające wyizolowanie pożądaných metabolitów. Zatrzymane w fazie stałej związki są następnie wymywane ze złoża odpowiednimi rozpuszczalnikami i zatężane do końcowej mniejszej objętości (SPE) lub ulegają desorpcji z włókna pod wpływem wysokiej temperatury w komorze nastrzykowej chromatografu gazowego (SPME) (Villas-Bôas i in. 2005). Nadmiar rozpuszczalnika w próbkach ekstraktów jest odparowywany w koncentratorach próżniowych i tak przygotowane próbki są przechowywane w $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do czasu analizy. Otrzymane suche ekstrakty w zależności od stosowanej techniki analitycznej są przed analizą przeprowadzane w pochodne lub rozpuszczane w małej objętości rozpuszczalnika organicznego (Allwood i in. 2008).

Wśród stosowanych w metabolomice metod analitycznych dominują techniki spektrometrii mas oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądowego (Villas-Bôas i in. 2005). Główną zaletą technik spektrometrii mas jest wysoka czułość i przepustowość oraz możliwość identyfikacji lub przynajmniej uzyskania informacji strukturalnych na temat związków obecnych w badanych próbkach. Dodatkowo połączenie technik separacyjnych, głównie chromatograficznych, ze spektrometrią mas znacząco poszerza możliwości analizy chemicznej wysoce złożonych próbek biologicznych. Do analizy związków, które są lotne w temperaturze powyżej 250 °C oraz do analizy związków nie wykazujących w stanie naturalnym takich właściwości, ale poddanych modyfikacjom chemicznym w celu uzyskania pochodnych o większej lotności, stosowana jest chromatografia gazowa. Technika ta w połączeniu ze spektrometrią mas jest obecnie najczęściej stosowanym podejściem w analizie polarnych ekstraktów metabolitów pierwotnych (Hall 2011). Z kolei chromatografia cieczowa, najczęściej wysokosprawna (HPLC, ang. *high-performance liquid chromatography*) lub ultrasprawna (UPLC, ang. *ultra performance liquid chromatography*), sprzężona ze spektrometrią mas znajduje zastosowanie w analizie roślinnych metabolitów wtórnych, takich jak flawonoidy, alkaloidy, glukozynolany czy saponiny (Verhoeven i in. 2006). Wymienione techniki separacyjne są sprzężane ze spektrometrami mas w rozmaitych konfiguracjach z zastosowaniem różnych sposobów jonizacji. W przypadku GC-MS jest to najczęściej jonizacja elektronami (ang. *electron ionization*) będąca twardą techniką jonizacji, prowadzącą do uzyskania widma fragmentacyjnego. Z kolei w systemach LC-MS wykorzystywane są miękkie techniki jonizacji, głównie elektrorozpraszanie (ESI, ang. *electrospray ionization*) i jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, ang. *atmospheric pressure ionization*). Porównanie najczęściej wykorzystywanych technik analitycznych: NMR, GC-MS i LC-MS przedstawione zostało w tabeli 1.1. Technika GC-MS jako technika analityczna wykorzystywana w niniejszej pracy zostanie omówiona szerzej w podrozdziale 1.1.3.

Aparatura wykorzystywana w badaniach metabolomicznych generuje duże ilości danych. Zastosowanie odpowiednich narzędzi bioinformatycznych i statystycznych jest niezbędnym elementem integracji i wizualizacji danych, dzięki którym możliwa jest interpretację biologiczną. Eksploracja danych (ang. *data mining*) obejmuje przetworzenie surowych danych, ich wstępną obróbkę oraz modelowanie statystyczne. Ponieważ skład jakościowy i ilościowy metabolomu odzwierciedla aktualny stan komórki w określonych warunkach środowiskowych i punkcie czasowym, celem analizy metabolomicznej jest pomiar

Tab. 1.1. Zestawienie trzech technik analitycznych najczęściej wykorzystywanych w badaniach metabolomicznych (według: Hall 2011).

TECHNIKA ANALITYCZNA	ZALETY	WADY
NMR	<ul style="list-style-type: none"> • niedestrukcyjna • ilościowa • wydajna technika o długiej tradycji stosowania • dobre oprogramowanie i zaplecze w postaci baz danych metabolitów • krótki czas pomiaru • praktycznie nie wymaga przygotowania próbki do analizy • nie wymaga rozdziału • nie wymaga derywatywacji • wykrywa wszystkie klasy związków organicznych • możliwa identyfikacja strukturalna nieznanymi związków • możliwa analiza ciał stałych i cieczy 	<ul style="list-style-type: none"> • stosunkowo niska czułość • droga aparatura i eksploatacja • ograniczenie analizy do związków protonowanych • nie wykrywa soli i związków nieorganicznych • wymagana duża objętość próbki (0,5 ml)
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • stosunkowo tania • ilościowa (przy zastosowaniu standardów) • wymagana niewielka ilość próbki • dobra czułość • dobre oprogramowanie i wsparcie w postaci baz danych metabolitów • detekcja większości związków organicznych i części nieorganicznych • powtarzalność rozdziału 	<ul style="list-style-type: none"> • destrukcyjna • nielotne związki wymagają derywatywacji • nieodpowiednia dla związków termolabilnych • długotrwała procedura przygotowania próbki • długi czas pomiaru wynikający z rozdziału (20-50 min) • trudna identyfikacja związków nieznanymi
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • wszechstronna technika separacji, umożliwia rozdzielanie związków o szerokim zakresie polarności • dobra czułość • detekcja większości związków organicznych i części nieorganicznych • wymagana mała ilość próbki (mg) • możliwa szybka analiza (1-2 min) poprzez bezpośrednie wprowadzenie próbki (DIMS) • ma potencjał detekcji znacznej części metabolomu 	<ul style="list-style-type: none"> • destrukcyjna • ograniczona analiza ilościowa • stosunkowo drogie oprzyrządowanie • obszerna procedura przygotowania próbki • długi czas pomiaru wynikający z rozdzielania (20-50 min) • rozdzielczość i powtarzalność gorsza niż w GC • słabe wsparcie ze strony oprogramowania i baz danych • trudna identyfikacja związków nieznanymi

zmienności biologicznej warunkowanej wpływem czynników zewnętrznych (abiotycznych i biotycznych) lub różnicami rozwojowymi bądź genetycznymi badanych organizmów (Hall 2006). Całkowita zmienność obserwowana w zbiorach danych pochodzących z analiz metabolomicznych wynika nie tylko z naturalnej (np. różnic międzyodmianowych) bądź indukowanej (np. czynnikiem stresowym) zmienności biologicznej, ale jest także efektem zmienności technicznej i analitycznej będącej rezultatem sposobu przygotowania i metody analizy próbki. Etap eksploracji danych ma na celu wstępne przetworzenie i obróbkę danych, tak aby wyeliminować wszystkie zmiany inne niż te wynikające z biologii badanego organizmu. Ponieważ coraz bardziej rozbudowane zadania badawcze i stosowane wysokorozdzielcze techniki analityczne przyczyniają się do powstawania coraz większych wielowymiarowych zestawów danych, uniemożliwiając ich wydajne ręczne przetworzenie, ciągle opracowywane są nowe programy pomocne w automatycznej analizie danych (van den Berg i in. 2006, Katajamaa i Orešič 2007, Sugimoto i in. 2012). W przypadku analiz opartych o techniki MS na otrzymane dane składają się zwykle trzy wielkości: stosunek masy do ładunku (m/z) związków bądź ich fragmentów, intensywność m/z oraz jeden lub dwa wymiary czasu retencji. Aby móc porównywać zestawy danych uzyskane w poszczególnych analizach konieczne jest wyrównanie przesunięć dla tych trzech wielkości. Przesunięcia te są nieodłączną częścią każdego podejścia stosowanego w analizie metabolomów i wynikają z zastosowanych technik analitycznych; mogą być związane ze stanem źródła jonów i zmianami w wydajności jonizacji, stopniem zużycia kolumny chromatograficznej, fluktuacjami ciśnienia czy temperatury w układzie podczas analizy. Na przetwarzanie surowych danych składa się m.in. redukcja szumów, grupowanie, dekonwolucja, normalizacja, skalowanie, korekcja linii bazowej oraz wyrównanie czasów retencji pomiędzy analizami (Liland 2011). Kolejnym etapem jest analiza przetworzonych danych metodami statystycznymi. Klasyczne podejście polega na ocenie różnic pomiędzy grupami obiektów wykorzystując do tego celu analizę jednoczynnikową: np. test t-Studenta, analizę wariancji (ANOVA, ang. *analysis of variance*) lub analizę wieloczynnikową: np. wielowymiarową analizę wariancji (MANOVA, ang. *multivariate analysis of variance*), analizę głównych składowych (PCA, ang. *principal component analysis*), analizę wariancji z jednoczesną analizą składowych będącą połączeniem metod ANOVA i PCA (ASCA, ang. *analysis of variance – simultaneous component analysis*) oraz regresję metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS, ang. *partial least square regression*). Ponadto stosowane są metody grupowania i wizualizacji próbek na podstawie ich podobieństwa takie jak

hierarchiczna analiza klastrow (HCA, ang. *hierarchical cluster analysis*) i grupowanie metodą k-średnich (Bartel i in. 2013).

Interpretacja wyników uzyskanych w analizach metabolomicznych opiera się w dużej mierze na wykorzystaniu informacji zdeponowanych w różnego rodzaju bazach danych. Dotyczy to zarówno identyfikacji związków na podstawie zebranych widm MS lub NMR, jak i umiejscowienia metabolitów w szlakach, a także powiązania ich z innymi poziomami molekularnymi, głównie proteomem i genomem. Przykłady baz danych wraz z ich opisem umieszczono w tabeli 1.2.

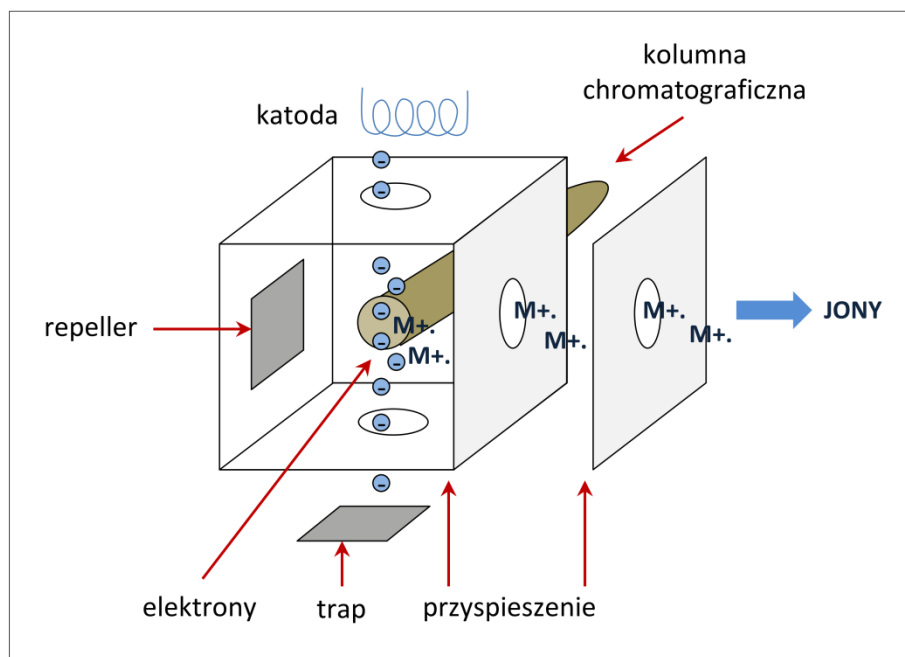
Tab. 1.2. Przykładowe bazy danych wykorzystywane w metabolomice (^[1] Kopka i in. 2005, ^[2] Horai i in. 2010, ^[3] Tautenhahn i in. 2012, ^[4] Caspi i in. 2012, ^[5] Kanehisa i Goto 2000, ^[6] Croft i in. 2013, ^[7] Jewison i in. 2013, ^[8] Degtyarenko i in. 2008, ^[9] Pence i Williams 2010, ^[10] Wishart i in. 2007, ^[11] Shinbo i in. 2006, ^[12] Bolton i in. 2008). Dostęp do wymienionych baz danych jest bezpłatny z wyjątkiem dostępu do komercyjnych baz NIST Mass Spectral Library i Wiley Registry of Mass Spectral Data.

NAZWA BAZY DANYCH	ADRES INTERNETOWY	OPIS BAZY DANYCH
<i>Techniki analityczne</i>		
Golm Metabolome Database (GMD) ^[1]	<i>gmd.mpimp-golm.mpg.de</i>	Baza danych zawierająca widma uzyskane techniką GC-MS oraz indeksy retencji metabolitów i znaczników widma masowego (MST), odnoszących się do często występujących, ale jeszcze nie zidentyfikowanych związków.
MassBank ^[2]	<i>www.massbank.jp</i>	Biblioteka widm uzyskanych m.in. technikami LC-ESI-MS, CE-ESI-MS, EI-MS, MALDI-TOF. Możliwość porównywania otrzymanych widm do widm znajdujących się w bazie poprzez usługę „Spectrum Search”. Możliwość przeszukiwania bazy po nazwie związku, dokładnej masie, składzie elementarnym, wartości m/z, wzorze strukturalnym.
Metabolite and Tandem MS Database (METLIN) ^[3]	<i>metlin.scripps.edu</i>	Baza zawierająca informacje o metabolitach (masa, budowa, wzór sumaryczny) i dane pochodzące z tandemowej spektrometrii mas.
NIST Mass Spectral Library	<i>www.nist.gov/srd/nist1a.cfm</i>	Biblioteka widm EI-MS, MS/MS oraz biblioteka indeksów retencji.
Spectral Database for Organic Compounds, SDBS	<i>sdb.sdb.aist.go.jp</i>	Baza widm związków organicznych uzyskanych technikami EI-MS, ¹ H NMR, ¹³ C NMR, FTIR.
Wiley Registry of Mass Spectral Data	<i>onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470175217</i>	Biblioteka widm EI-MS, NMR (m.in. ¹ H NMR, ¹³ C NMR), FTIR. Możliwość zakupu dostępu online do bazy, bądź wersji instalowanej na komputerze użytkownika.
<i>Szlaki metaboliczne</i>		
BioCyc ^[4]	<i>biocyc.org</i>	Baza zawierająca dane na temat szlaków metabolicznych i genomów poszczególnych organizmów. Każda PGDB (Pathway/Genome Database) w obrębie BioCyc składa się z kompletnego genomu i przewidywanej sieci metabolicznej danego organizmu. Do tego celu wykorzystywane jest narzędzie „Pathway Tool” działające w oparciu o bazę MetaCyc. Wygenerowana w ten sposób sieć składa się z metabolitów, szlaków metabolicznych, reakcji chemicznych i enzymów.
KEGG PATHWAY Database ^[5]	<i>www.kegg.jp/kegg/pathway.html</i>	Na bazę składają się mapy szlaków metabolicznych przedstawiające interakcje pomiędzy poszczególnymi związkami oraz sieci reakcji enzymatycznych obecnych w organizmach żywych.
MetaCyc ^[4]	<i>www.metacyc.org</i>	Baza danych gromadząca dane na temat szlaków metabolicznych i enzymów obecnych w różnych organizmach. Opisane szlaki pochodzą z danych eksperymentalnych i zostały wybrane ze źródłowych publikacji naukowych.
Plant Metabolic Network (PMN)	<i>www.plantcyc.org</i>	PMN łączy bazy danych odnoszące się do roślin. Informacje w niej zawarte pochodzą z publikacji

		naukowych, a także analiz obliczeniowych dotyczących genów, enzymów, związków i reakcji chemicznych oraz szlaków zaangażowanych w metabolizm pierwotny i wtórny roślin.
Reactome ^[6]	www.reactome.org	Recenzowana baza danych zawierająca informacje o szlakach metabolicznych i reakcjach chemicznych zachodzących w organizmie człowieka.
Small Molecule Pathway Database (SMPD) ^[7]	www.smpdb.ca	Baza danych zawierająca interaktywne ilustracje szlaków metabolicznych obecnych w organizmie człowieka.
<i>Związki niskocząsteczkowe</i>		
Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI) ^[8]	www.ebi.ac.uk/chebi	Baza zawierająca dane na temat klasyfikacji związków niskocząsteczkowych (zarówno naturalnych jak i syntetycznych) i relacji między nimi.
ChemSpider ^[9]	www.chemspider.com	Baza danych gromadząca informacje o strukturach i właściwościach ponad 30 milionów cząsteczek, powiązana licznymi odnośnikami z innymi bazami.
Human Metabolome Database (HMDB) ^[10]	www.hmdb.ca	Baza zawierająca szczegółowe informacje o związkach niskocząsteczkowych obecnych w organizmie człowieka.
KEGG LIGAND Database ^[5]	www.kegg.jp/kegg/compound	Baza związków niskocząsteczkowych i biopolimerów istotnych dla organizmów żywych, a także reakcji chemicznych zachodzących w komórkach. Zawiera informacje dotyczące budowy i funkcji poszczególnych związków. Wpisy w bazie mają liczne odnośniki do innych baz w obrębie KEGG jak i baz zewnętrznych.
KNAPSAcK ^[11]	kanaya.naist.jp/KNAPSAcK	Baza, w której gromadzone są dane dotyczące występowania metabolitów w poszczególnych gatunkach.
Pherobase	www.pherobase.com	Baza zawierająca informacje o feromonach i substancjach semiochemicznych. Baza dostarcza informacji na temat wzorów sumarycznych i strukturalnych powyższych związków oraz ich indeksów retencji wraz z przypisami literaturowymi.
PubChem ^[12]	pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	Na bazę danych PubChem składają się trzy bazy: PubChem Substance, PubChem Compound i PubChem BioAssay. Gromadzone są w nich m.in. informacje na temat budowy i aktywności biologicznej związków niskocząsteczkowych. Udostępnione jest także narzędzie, dzięki któremu możliwe jest przeszukiwanie bazy pod kątem podobieństwa budowy związków.

1.1.3 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas – zasada działania i wykorzystanie w badaniach metabolomicznych roślin

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas łączy w sobie wysoką rozdzielczość i powtarzalność rozdziału z wysoką czułością i selektywnością detekcji, pozwalającą na wykrycie związków występujących w stężeniach femtomolowych. Ponieważ chromatografia gazowa zawęża analizę do związków lotnych, techniki jonizacji stosowane w spektrometrii mas sprzężonej z GC ograniczone są do tych, w których analit znajduje się w fazie gazowej. Do tych technik zalicza się jonizację elektronami (EI), jonizację chemiczną (CI), jonizację chemiczną pod zmniejszonym ciśnieniem i jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI), jonizację chemiczną z wychwytem elektronów (ECNI) oraz jonizację polem (FI) (Watson i Sparkman 2007). Obecnie najpowszechniej stosowaną techniką jonizacji w badaniach metabolomicznych jest jonizacja elektronami (EI) (Koek i in. 2011). Polega ona na wytworzeniu jonów molekularnych (powstałych przez przyłączenie lub oderwanie elektronu od cząsteczki obojętnej) w fazie gazowej, które następnie w sposób powtarzalny ulegają wielostopniowej fragmentacji. Ponieważ w widmie EI zwykle nie jest widoczny jon molekularny, identyfikacja możliwa jest dzięki charakterystycznemu dla danego związku wzorowi fragmentacji, nazywanego „odciskiem palca” analitu (ang. *fingerprint*). Na źródło jonów EI (ryc. 1.3) składa się żarnik (katoda) emitujący elektrony, które są przyspieszane w kierunku anody (ang. *trap*) leżącej po drugiej stronie komory jonizacyjnej. Emitowane elektrony zderzają się z cząsteczkami w fazie gazowej,



Ryc. 1.3. Uproszczony schemat budowy źródła jonów typu EI (według Smedsgaard 2007).

wypływającymi z kolumny chromatograficznej prowadząc do powstania jonów. Utworzone jony są później odpychane przez elektrodę (ang. *repeller*) poza źródło jonów i przyspieszane w kierunku analizatora masy (Watson i Sparkman 2007).

Analizatorami mas stosowanymi w układach GC-MS są zazwyczaj kwadrupole lub analizatory czasu przelotu (TOF, ang. *time-of-flight*). Kwadrupol charakteryzuje się wysoką czułością i dobrym zakresem dynamicznym, ale niższą częstotliwością skanowania i dokładnością pomiaru masy niż analizator TOF. Jednak ze względu na jego niższy koszt i większą dostępność, przy jednoczesnej niezawodności, jest często stosowany w analizach metabolomicznych. Z kolei analizator TOF zapewnia wysoką rozdzielczość i dokładność pomiaru masy oraz szybkie skanowanie, dzięki któremu możliwa jest dekonwolucja koelujących pików, co jest szczególnie pomocne przy analizie złożonych mieszanin. Oprócz pojedynczych kwadrupoli i analizatorów TOF stosowane są także potrójne analizatory kwadrupolowe (QqQ, ang. *triple quadrupole*) umożliwiające pracę w trybie monitorowania reakcji następczych (MRM, ang. *multiple reaction monitoring*) co ułatwia analizę ilościową i identyfikację związków obecnych w mieszaninach wieloskładnikowych w śladowych ilościach (np. pestycydów w żywności) (Lei i in. 2011).

Wymogiem stawianym związkom poddawanych analizie GC-MS jest ich lotność i termiczna stabilność. Jednak metabolity stanowią bardzo zróżnicowaną chemicznie grupę związków, z których tylko nieliczne spełniają wyżej wymienione warunki; do tej grupy można zaliczyć alkohole o krótkich łańcuchach, estry, niskocząsteczkowe węglowodory i lipidy. Większość związków wymaga etapu derywatywacji, czyli przeprowadzenia analitu w pochodne. Modyfikacja chemiczna poprzez alkilację, acylację lub silylację polarnych grup funkcyjnych zwiększa lotność związków i ich termiczną stabilność umożliwiając analizę z wykorzystaniem chromatografii gazowej. W analizach metabolomicznych najczęściej wykorzystywana jest metoda dwuetapowej derywatywacji. Pierwszy etap polega na reakcji hydroksyloaminy lub alkoksyaminy z grupami karbonyłowymi, która prowadzi do powstania oksymów. Reakcja ta stabilizuje konformację łańcucha cukrów redukujących oraz chroni α -ketokwasy przed dekarboksylacją. Ponieważ oksymy występują jako izomery przestrzenne *syn* i *anti* (ze względu na obecność podwójnego wiązania między atomami węgla i azotu) podczas analizy chromatograficznej mogą się one rozdzielić dając dwa piki pochodzące od jednego związku. Drugi etap – silylacja – polega na wymianie wodoru w polarnych grupach funkcyjnych (hydroksylowych, aminowych, karboksylowych, tiolowych) na grupę alkilosilylową, głównie trimetylosilylową (TMS, ang. *trimethylsilyl*). Do tego celu stosowane są odczynniki krzemooorganiczne, głównie BSTFA i MSTFA. Przeprowadzenie derywatywacji

nie tylko zwiększa stabilność i lotność związków, ale także dostarcza dodatkowych informacji strukturalnych, dzięki obecności w widmie EI charakterystycznych wzorów fragmentacji posiadających większą wartość diagnostyczną niż fragmentacje uzyskane ze związków pierwotnych, nie przeprowadzonych w pochodne (Dettmer i in. 2007, Zaikin i Halket 2009). Jednakże zastosowanie etapu derywatywacji nie jest wolne od wad i ograniczeń. Wraz ze wzrostem ilości derywatywowanych grup funkcyjnych istnieje ryzyko, że masa wytworzonej pochodnej przekroczy zakres wartości m/z rejestrowanych przez detektor (zwykle 50 do 650-1000 m/z). Ponadto wystąpienie zawady przestrzennej, kiedy to rozmiar grup funkcyjnych w cząsteczce utrudnia zajście reakcji chemicznej, może prowadzić do utworzenia wielu produktów komplikując obraz chromatogramu. Dodatkowo wytworzone pochodne są wrażliwe na wilgoć, rozpadają się w obecności wody, stąd też próbki przed derywatywacją muszą zostać całkowicie wysuszone (Halket i in. 2005).

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas znalazła szerokie zastosowanie w badaniach metabolomicznych. Jest to technika powszechnie wykorzystywana do analizy metabolitów zarówno roślin modelowych m.in. *Arabidopsis thaliana* (Kaplan i in. 2004), *Medicago truncatula* (Broeckling i in. 2005), jak i użytkowych m.in. ziemniaka (Roessner i in. 2000), dyni (Fiehn 2003), pomidora (Roessner-Tunali i in. 2003) oraz zbóż, w tym ryżu (Zhou i in. 2012), kukurydzy (Witt i in. 2012) i jęczmienia (Widodo i in. 2009). Analiza metabolomów z wykorzystaniem GC-MS odgrywa znaczącą rolę w badaniu roślin poddanych transgenecie. Przykładem może być profilowanie metaboliczne transgenicznego ryżu, do genomu którego wprowadzono dwa geny kodujące: δ -endotoksynę z *Bacillus thuringiensis* i inhibitor trypsyny z wpięgi wężowatej (*Vigna unguiculata*), mając na celu zwiększenie odporności rośliny na szkodniki. Przeprowadzona analiza wykazała, że więcej zmian w obrębie metabolomu powstało w wyniku prowadzenia hodowli *in vitro* (zmienności somaklonalnej) niż wprowadzenia transgeny (Zhou i in. 2012). Ponadto podejście z zastosowaniem GC-MS wykorzystywane jest w genomice funkcjonalnej, która ma na celu poznawanie funkcji genów badanych organizmów, szczególnie tych, których ekspresja uruchamiana jest pod wpływem działania różnego rodzaju czynników biotycznych i abiotycznych. Jako przykład może posłużyć profilowanie zmian metabolitów *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na stres niskiej i wysokiej temperatury. Przeprowadzone analizy wykazały, że chłód bardziej wpłynął na metabolizm rośliny niż wysokie temperatury. Dodatkowo zaobserwowano, że podczas gdy w niskich temperaturach większość zmieniających poziom akumulacji metabolitów była charakterystyczna dla tego stresu, stres ciepła powodował mniej specyficznych odpowiedzi, a blisko dwie trzecie reagujących

w stresie wysokiej temperatury metabolitów było tożsamy dla stresu chłodu. Wyniki te wspierają wcześniejsze, pozornie paradoksalne obserwacje, że rośliny hartowane, z nabytą odpornością na stres niskich temperatur są jednocześnie bardziej odporne na stres wysokich temperatur (Kaplan i in. 2004). Kolejnym krokiem w interpretacji danych metabolomicznych jest integracja z danymi pochodzącymi z innych poziomów molekularnych – genomu, transkryptomu i proteomu, będąca nieodłączną częścią biologii systemów. Celem takiego podejścia jest zrozumienie złożoności sieci zależności w komórce poprzez badanie dynamiki zachodzących w niej procesów genetycznych, regulatorowych i metabolicznych (Kitano 2002). Jedną z pierwszych prób podjęcia tego wyzwania dotyczyła ziemniaka i analizy metabolitów z wykorzystaniem GC-MS oraz ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy. Spośród ponad 26 tysięcy możliwych par transkrypt-metabolit, silną korelację wykazało 571 par, z których większość nie była wcześniej znana, co pokazuje jak duże możliwości związane są z tym podejściem (Urbanczyk-Wochniak i in. 2003).

1.2 Stresy środowiskowe

Rośliny rosnące zarówno w warunkach naturalnych jak i środowisku upraw rolniczych narażone są na działanie różnego rodzaju czynników zewnętrznych, których wpływ nie zawsze jest korzystny dla wzrostu i rozwoju rośliny. Stresy środowiskowe znacząco ograniczają produkcję rolną, przyczyniając się do poważnych strat ekonomicznych. Stąd też badanie morfologicznych, fizjologicznych i molekularnych zmian zachodzących w roślinach w odpowiedzi na różnego rodzaju stresy może pomóc w wyjaśnianiu mechanizmów rządzących nabywaniem przez nie tolerancji, a tym samym umożliwić opracowanie strategii służących zwiększeniu produktywności roślin w niesprzyjających warunkach środowiska.

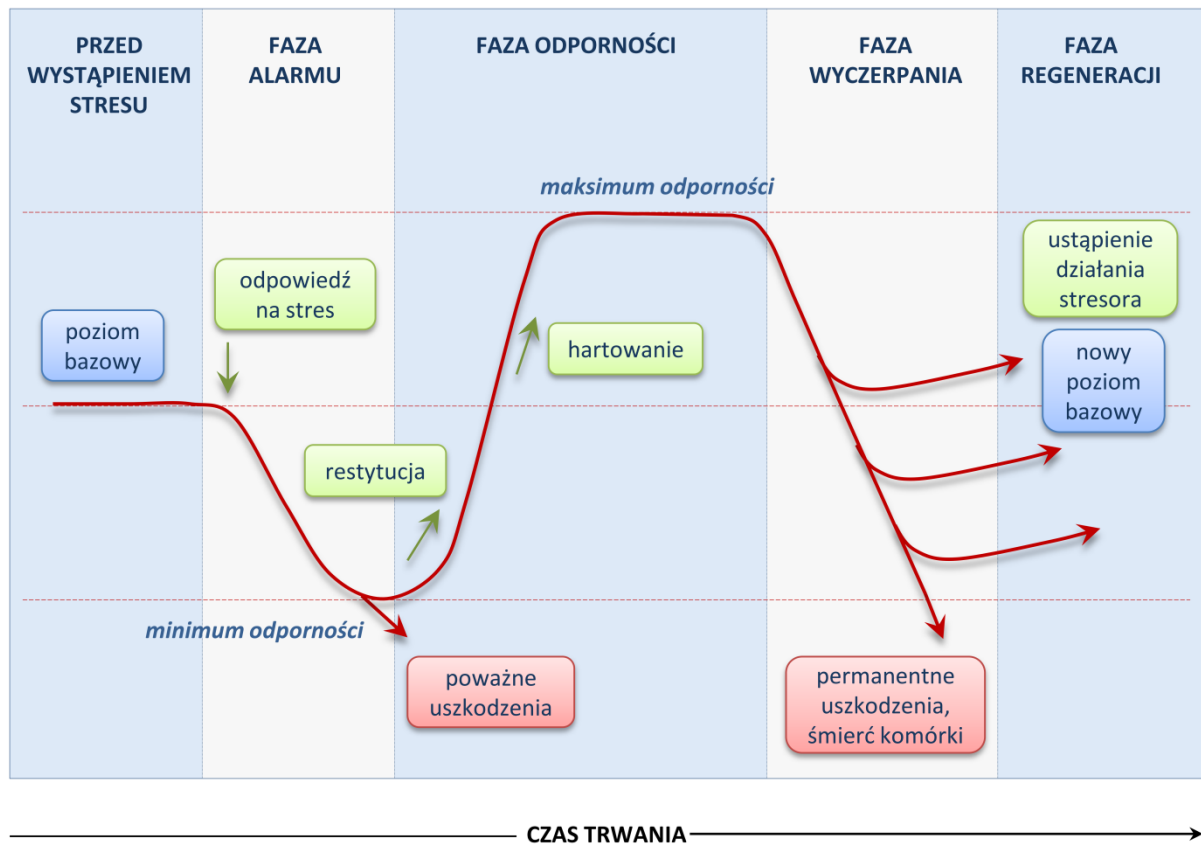
1.2.1 Rodzaje stresów i mechanizmy odpowiedzi na stres

Niesprzyjające warunki środowiskowe, prowadzące do zaburzeń w funkcjonowaniu rośliny, określane są terminami czynników stresowych, stresotwórczych lub stresorów. Z kolei na opisanie odpowiedzi wywołanej ich działaniem używa się pojęcia reakcji stresowej lub stanu stresowego (Kacperska 2012). Czynniki odpowiadające za wystąpienie reakcji stresowej można podzielić na biotyczne i abiotyczne. Do czynników biotycznych negatywnie wpływających na roślinę można zaliczyć: zwierzęta roślinożerne (np. nicienie, owady, gryzonie, przeżuwacze), patogenne bakterie i grzyby, a także inne rośliny konkurujące o miejsce, światło, wodę i składniki pokarmowe. Z kolei oddziałujące na roślinę czynniki abiotyczne mają charakter fizykochemiczny i są to m.in. temperatura, woda, promieniowanie

UV, skład chemiczny atmosfery i gleby (w tym obecność minerałów glebowych i metali ciężkich). Przetrwanie organizmu zależy więc od jego zdolności do dostosowania się do niekorzystnych warunków środowiskowych. W tym celu rośliny rozwinęły rozmaite mechanizmy, opisywane jako zmiany aklimatyzacyjne i adaptacyjne. Zsumowane efekty działania tych mechanizmów, zaangażowanych w ochronę organizmu przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi, decydują o wrażliwości bądź tolerancji (w literaturze czasem nazywanej odpornością, chociaż preferowany jest pierwszy termin) danej rośliny na stresor. Przy czym odpowiedź organizmu będzie uzależniona nie tylko od intensywności i czasu oddziaływania stresu, ale także od gatunku, odmiany i stadium rozwojowego rośliny. Przykładowo ryż jest bardziej wrażliwy na stres zasolenia we wczesnym stadium siewki, niż w fazie reprodukcyjnej (Lutts i in. 1995).

W fizjologii stresu na opisanie strategii dopasowania się roślin do zmieniających się warunków środowiska wyróżniane są dwa pojęcia: adaptacja i aklimatyzacja (Gaspar i in. 2002). Adaptacja dotyczy cech dziedzicznych nabywanych przez populację w ciągu wielu pokoleń. Uzyskanie pożądanej cechy zachodzi w wyniku wieloletniej selekcji, podczas której organizmy z korzystniejszą kombinacją genów (zwiększającą prawdopodobieństwo przetrwania w warunkach stresowych) zaczynają dominować w populacji. Przykładem adaptacji jest fotosynteza CAM (ang. *crassulacean acid metabolism*) zachodząca w roślinach żyjących w klimacie półpustynnym i pustynnym. Ze względu na warunki środowiska rośliny te muszą prowadzić oszczędną gospodarkę wodną, dlatego zamykają aparaty szparkowe w ciągu dnia, a otwierają w nocy, co zapobiega nadmiernej utracie wody (Strzałka 2012). Cechami adaptacyjnymi są także zmiany anatomiczne, jak na przykład pokrycie liści roślin pustynnych włoskami, które wraz z grubą warstwą wosków epikutykularnych chronią roślinę przed nadmierną absorpcją promieniowania słonecznego (Taiz i Zeiger 2002). Z kolei pojęcie aklimatyzacja używane jest do opisu przejściowych zmian fizjologicznych i biochemicznych dotyczących pojedynczego organizmu. Podczas aklimatyzacji dochodzi do uruchomienia mechanizmów, których celem jest przystosowanie organizmu do zmieniających się warunków w środowisku zewnętrznym. Przykładem aklimatyzacji jest zwiększona odporność roślin chłodoodpornych na mróz po ich wcześniejszej długotrwałej ekspozycji na niskie temperatury (Jouve i in. 2000). Do procesów aklimatyzacyjnych można zaliczyć uruchamianie mechanizmów prowadzących do zmian poziomów fitohormonów i innych czynników regulatorowych oraz akumulacji białek i metabolitów w odpowiedzi na czynniki środowiskowe.

W reakcji roślin na stres można wyróżnić cztery fazy (ryc. 1.4) (Lichtenthaler 1996, Kranner i in. 2010). Przed ekspozycją na czynnik stresowy roślina znajduje się w warunkach, które są optymalne pod względem dostępu do światła, wody i składników mineralnych. Poziom czynności życiowych wykazywany przez organizm w tych warunkach opisywany jest jako bazowy. Oddziaływanie czynnika stresowego powoduje, że roślina przechodzi do fazy alarmu, w której rozpoczyna się odpowiedź na stres. Na tym etapie ograniczane są czynności życiowe, m.in. spada aktywność fotosyntetyczna i transport metabolitów. W roślinach, które nie wykazują tolerancji na działający czynnik stresowy dochodzi w tej fazie do ciężkich uszkodzeń. Jednak większość organizmów uaktywnia mechanizmy naprawcze i aklimatyzacyjne, na które składają się zmiany na poziomie metabolizmu i zmiany morfologiczne, prowadzące do przywrócenia stanu bazowego (restytucja). Przedłużający się stres prowadzi do zahartowania roślin i ustanowienia najwyższego poziomu odporności w danych warunkach działania stresora. Trzeci etap – faza wyczerpania – pojawia się gdy dochodzi do przeciążenia mechanizmów aklimatyzacyjnych, zasoby organizmu się wyczerpują i nie jest on w stanie normalnie funkcjonować. Przedłużanie tego stanu prowadzi



Ryc. 1.4. Ogólna koncepcja faz i reakcji wywołanych przez ekspozycję rośliny na stres (według Lichtenthaler 1996).

do trwałych uszkodzeń i ostatecznie śmierci komórek i rośliny. Jeśli jednak działanie czynnika stresowego ustąpi odpowiednio wcześniej, zanim procesy starzenia i obumierania zaczną dominować, wówczas roślina wchodzi w fazę regeneracji. Na tym etapie ustalany jest nowy poziom bazowy fizjologii, który znajduje się pomiędzy wartościami minimum i maksimum odporności.

1.2.2 Stres suszy

Woda stanowi 80-90% biomasy roślin zielnych, tworzy środowisko, w którym zachodzi transport składników odżywczych, niezbędne do przebiegu procesów fizjologicznych (Lisar i in. 2012). Stąd też ograniczona dostępność wody w środowisku powoduje szereg zmian na różnych poziomach organizacji: molekularnym, biochemicznym i fizjologicznym. Z tego powodu rośliny rozwinęły rozmaite mechanizmy obronne i naprawcze, a także przystosowania anatomiczne, które składają się na trzy strategie, dzięki którym mogą przetrwać w warunkach deficytu wody (ryc. 1.5). Pierwsza z nich – ucieczka (ang. *drought escape*) – polega na zakończeniu cyklu życiowego przed okresem suszy, gdy w środowisku jest jeszcze wystarczająca ilość wody (Araus i in. 2002). Kolejna – unikanie suszy (ang. *drought avoidance*) – opiera się na mechanizmach pozwalających roślinie na zachowanie w warunkach suszy wysokiego potencjału wody poprzez zwiększenie pobierania wody przez korzenie i/lub zmniejszenie jej utraty na drodze transpiracji z części nadziemnych (Chaves i in. 2003). Zwykle strategia ta dotyczy zmian morfologicznych takich jak zmniejszenie powierzchni liści lub rozwój obszernego systemu korzeniowego, ale także innych cech jak np. zmniejszenie przewodności szparkowej. Trzecia – tolerancja suszy (ang. *drought tolerance*) – polega na podtrzymywaniu normalnego poziomu funkcji życiowych przy obniżonym potencjale wody. Osiągane jest to poprzez uruchamianie specyficznych mechanizmów biochemicznych i molekularnych, na które składają się m.in. ekspresja genów, akumulacja białek i metabolitów (Lisar i in. 2012).

Morfologia i fizjologia roślin w suszy

Rośliny w odpowiedzi na działanie stresu o umiarkowanej intensywności wykazują specyficzne modyfikacje morfologiczne. Co ciekawe są one wspólne dla wielu gatunków i niezależne od zastosowanych czynników stresowych. Zmiany te opisywane są jako SIMRs (ang. *stress-induced morphogenesis responses*) i składają się na nie: zahamowanie elongacji, lokalna stymulacja podziałów komórkowych oraz różnicowanie komórek. Kluczowymi



Ryc. 1.5. Rodzaje odpowiedzi roślin na stres suszy i główne cechy z nimi związane (według De Leonardis i in. 2012).

elementami w powstawaniu tych odpowiedzi są zależne od stresu gradienty reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), antyoksydantów i hormonów, w tym auksyn i etylenu (Potters i in. 2007). Zahamowanie podziałów i wzrostu komórek w suszy związane jest z obniżoną aktywnością enzymów, utratą turgoru i mniejszym zaopatrzeniem w energię (Kiani i in. 2007). Ponadto spadek turgoru wywołuje redukcję powierzchni liści i ich liczby (Farooq i in. 2010) oraz zmniejszenie ilości pędów bocznych (Farooq i in. 2012). W skrajnych warunkach niedoboru wody, gdy roślina traci wszystkie liście, fotosyntezę przeprowadzają łodygi, zielone gałęzie i ogonki liściowe (De Micco i Aronne 2012). Jedną z pierwszych reakcji roślin na deficyt wody jest zamykanie aparatów szparkowych, które pozwala na szybkie ograniczenie transpiracji. Podczas suszy zmniejsza się nie tylko wielkość aparatów szparkowych, ale także gęstość ich rozmieszczenia. Badając trawy zauważono, że stres niedoboru wody o umiarkowanej intensywności powoduje zwiększenie gęstości rozmieszczenia aparatów szparkowych, natomiast dotkliwy deficyt wody skutkuje spadkiem gęstości (Xu i Zhou 2008). Pod wpływem działania suszy dochodzi także do zmian w obrębie systemu korzeniowego. Skutkiem deficytu wody jest wzrost wskaźnika określającego stosunek biomasy korzenia do biomasy pędu (Zollinger i in. 2006). Przy czym wzrost ten może być spowodowany różnymi czynnikami: (1) redukcją przyrostu pędu bez zmiany

biomasy korzeni, (2) rozbudową systemu korzeniowego pod wpływem suszy lub (3) mniejszym ograniczeniem wzrostu korzenia niż pędu. Mechanizm ten uważany jest za strategię służącą pozyskiwaniu wody z głębszych warstw gleby, niedostępnej dla słabo rozwiniętych korzeni. Jednak dotychczasowe badanie nie wykazały wyraźnego związku pomiędzy tolerancją roślin na stres suszy a stosunkiem masy korzeni do masy pędu (Aroca i Ruiz-Lozano 2012).

Stres suszy w dużym stopniu wpływa na aktywność fotosyntetyczną roślin, która zmniejsza się wraz ze spadkiem względnej zawartości wody (RWC, ang. *relative water content*) w liściach (Lawlor 2002). Obniżenie aktywności fotosyntetycznej wynika z zamykania aparatów szparkowych i związanej z tym mniejszej dyfuzji CO₂ do chloroplastów oraz ze zmian w procesach metabolicznych (Pinheiro i Chaves 2011). Ponadto zmniejszona dostępność wody glebowej skutkuje ograniczonym pobieraniem składników pokarmowych, w tym azotu, fosforu i potasu (Farooq i in. 2012). Dodatkowo stres suszy prowadzi do stresu oksydacyjnego i nadprodukcji reaktywnych form tlenu powodujących uszkodzenia białek, lipidów i DNA. Najpowszechniejszymi ROS wytwarzanymi w stresach abiotycznych są: anionorodnik ponadtlenkowy (O₂^{•-}), tlen singletowy (¹O₂), nadtlenek wodoru (H₂O₂), rodnik hydroksylowy (OH[•]) oraz rodnik alkoksylowy (RO[•]) (Gill i Tuteja 2010). Stres suszy wpływa także na syntezę endogennych regulatorów wzrostu. Zwykle w warunkach stresowych wzrasta stężenie substancji hamujących wzrost (np. kwasu abscysynowego, etylenu) natomiast spada poziom promotorów wzrostu (np. cytokinin, giberelin) (Farooq i in. 2012). Ograniczony dostęp wody zmienia także termin zachodzenia faz rozwojowych w tym m.in. kwitnienia, które w zależności od gatunku może zostać przyspieszone (McMaster i Wilhelm 2003) lub opóźnione (Geerts i in. 2008).

Odpowiedź na poziomie transkryptomu, proteomu i metabolomu

Stres niedoboru wody inicjuje ścieżki sygnałowe, których uruchomienie prowadzi do licznych zmian w ekspresji genów oraz hamowania lub indukowania syntezy białek. W roślinach regulacja transkrypcyjna w odpowiedzi na stres osmotyczny zależy od dwóch głównych klas elementów cis-regulatorowych (ang. *cis-acting element*) leżących w regionach promotorowych genów indukowanych stresem: ABRE i DRE (Kim i in. 2011). Wiele genów, które ulegają ekspresji podczas stresu osmotycznego ulega ekspresji pod wpływem działania fitohormonu – kwasu abscysynowego (ang. ABA, *abscisic acid*) wskazując że związek ten działa jako cząsteczka sygnałowa w stresie. Geny te zawierają w swojej strukturze zakonserwowaną sekwencję (PyACGTGG/TC) nazywaną elementem odpowiedzi na kwas

abscysynowy (ABRE, ang. *ABA-responsive element*). W skład ABRE wchodzi rdzeń ACGT, który jest rozpoznawany przez białka z motywem zamka leucynowego wiążące DNA, nazywane białkami/czynnikami wiążącymi się z ABRE (AREB/ABF, ang. *ABRE-binding protein, ABRE-binding factor*). Na ogół pojedyncza kopia ABRE nie wystarcza żeby uruchomić ekspresję genów indukowanych ABA i wymagane są dodatkowe kopie ABRE albo obecność elementu łączącego (CE, ang. *coupling element*) (Fujita i in. 2011). Drugim elementem dzięki któremu regulowana jest transkrypcja genów w odpowiedzi na stres osmotyczny jest element odpowiedzi na dehydratację (DRE, ang. *dehydration-responsive element*). Ekspresja genów zawierających w promotorze DRE (sekwencję A/GCCGAC) jest uruchamiana pod wpływem działania stresu osmotycznego, przy czym w mechanizm ten nie jest zaangażowany kwas abscysynowy (Narusaka i in. 2003).

Produktami genów, których ekspresja jest uruchamiana pod wpływem stresu niedoboru wody są białka, które można podzielić na dwie grupy: białka regulatorowe i białka pełniące funkcje ochronne i naprawcze podczas suszy. Do pierwszej grupy należą białka zaangażowane w transdukcję sygnału i regulację ekspresji genów. Można wśród nich wyróżnić czynniki transkrypcyjne, kinazy białkowe, fosfatazy białkowe, enzymy związane z metabolizmem fosfolipidów i inne białka biorące udział w przekazywaniu sygnału o zaistniałym stresie takie jak np. białka wiążące kalmodulinę (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 2006). Do drugiej grupy należą białka uczestniczące w procesach transportu wody i jonów, chroniące strukturę błon i białek, enzymy biorące udział w zmiataniu reaktywnych form tlenu, a także białka zaangażowane w syntezę osmolitów. Jedną z klas białek odgrywających ważną rolę w stresach zarówno biotycznych jak i abiotycznych, w tym podczas suszy są białka szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock proteins*). Wśród HSP wyróżnia się pięć głównych rodzin, do których zaklasyfikowano białka ze względu na ich masę cząsteczkową oraz homologię sekwencji aminokwasowej. Są to: niskocząsteczkowe HSP (sHSP, ang. *small heat shock proteins*; 15–30 kDa), HSP60, HSP70, HSP90 oraz HSP100. Białka te biorą udział w fałdowaniu polipeptydów, ale też odpowiadają za degradację nieodwracalnie uszkodzonych białek. Ponadto zapobiegają agregacji nowo syntetyzowanych łańcuchów białkowych, a także pomagają w rozpadzie nierozpuszczalnych agregatów wytworzonych w wyniku działania stresu (Gupta i in. 2010). Kolejną klasą białek o istotnej funkcji w stresie suszy są białka LEA (ang. *late embryogenesis abundant proteins*), które po raz pierwszy zostały wykryte w nasionach bawełny. Białka te nagromadzają się podczas późnej fazy rozwoju zarodka, ale także akumulują się w organach wegetatywnych w warunkach niedoboru wody. W ich strukturze znajduje się wiele hydrofilowych

aminokwasów, poza tym charakteryzują się dużą stabilnością termiczną. Przypisuje im się rolę w ochronie cytoplazmy przed dehydratacją, jednak ich dokładne funkcje nie są jeszcze do końca poznane (Hong-Bo i in. 2005). Z kolei zmiatanie wolnych rodników w roślinach związane jest z obecnością w organizmie dwóch mechanizmów: nieenzymatycznego i enzymatycznego. W pierwszy zaangażowane są m.in. takie związki jak tokoferole, kwas askorbinowy i glutation. Natomiast drugi związany jest z obecnością w komórce szeregu enzymów w tym dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej, peroksydazy glutationowej oraz peroksyredoksyny (Miller i in. 2010). Ponadto w warunkach niedoboru wody zmienia się poziom małych białek membranowych – akwaporyn. Białka te uczestniczą w procesie transportu wody i innych związków przez błony biologiczne. Transport z udziałem akwaporyn zachodzi zarówno przez plazmolemę, czyli pomiędzy wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym, jak i przez błony wewnątrzkomórkowe – między organellami a cytoplazmą. Akwaporyny umożliwiają utrzymywanie wysokiego potencjału wody w komórce podczas suszy, a także odgrywają ważną rolę w procesie rehydratacji po ustaniu okresu niedoboru wody (Maurel i in. 2008).

Stres osmotyczny wywołuje szereg niekorzystnych zmian w roślinie. Jedną z linii obrony przed konsekwencjami tych zmian polega na tzw. dostosowaniu osmotycznym, które zachodzi poprzez zwiększenie w komórce stężenia niskocząsteczkowych związków organicznych. Grupa tych związków nazywana jest substancjami kompatybilnymi, osmoprotektantami lub osmolitami. Uważa się, że dzięki wzrostowi osmolarności w komórce, wynikającemu z nagromadzenia związków kompatybilnych, możliwe jest utrzymywanie wysokiego poziomu wody w komórce. Wynika to z faktu, że obecność osmolitów obniża potencjał wodny w komórce, a ponieważ woda przepływa w kierunku od roztworu o wyższym potencjale do roztworu o niższym potencjale, dochodzi do zwiększenia napływu wody ze środowiska zewnętrznego do komórki i jednocześnie zmniejszenia jej wypływu z komórki (Serraj i Sinclair 2002). Związki kompatybilne oprócz pełnienia głównej roli w utrzymywaniu turgoru w warunkach stresu osmotycznego, zaangażowane są także w stabilizowanie białek i struktur komórkowych, m.in. błon biologicznych. Ponadto biorą udział w zmiataniu reaktywnych form tlenu tworzonych podczas stresu suszy. Wśród substancji kompatybilnych można wyróżnić aminokwasy (prolina, cytrulina), węglowodany w tym monosacharydy (fruktoza) oraz di- i oligosacharydy (sacharoza, trehaloza, fruktany), alkohole polihydroksylowe, poliaminy, czwartorzędowe związki amoniowe (betaina glicynowa) oraz trzeciorzędowe związki sulfonowe (3-dimetylosulfoniopropionian) (Yokota i in. 2006). Jednym z ważniejszych związków syntetyzowanych w stresie niedoboru wody,

któremu przypisywana jest rola w uzyskiwaniu przez rośliny tolerancji na ten stres jest betaina glicynowa (N,N,N-trimetyloglicyna, GlyBet). Zawartość GlyBet znacząco się różni zarówno pomiędzy gatunkami roślin jak i poszczególnymi organami. U wielu gatunków roślin poziom tego związku jest w normalnych warunkach niski i dopiero zaistnienie czynników stresowych prowadzi do jego intensywnej akumulacji (Chen i Murata 2011). Natomiast u innych gatunków, jak np. u ryżu, GlyBet nie jest syntetyzowana ani w zwykłych warunkach środowiskowych, ani w stresowych (Shirasawa i in. 2006). Z dotychczasowych badań wynika, że GlyBet jest zaangażowana w osmoregulację, a także stabilizowanie struktury błon biologicznych i białek oraz ochronę aparatu fotosyntetycznego (Giri 2011). Kolejnym powszechnie występującym w roślinach osmolitem jest prolina, która gromadzi się w tkankach w odpowiedzi na różnego rodzaju stresy środowiskowe. Wykazano jej rolę m.in. w utrzymywaniu homeostazy komórki, w tym równowagi oksydo-redukcyjnej. Poza tym aminokwas ten może działać jako cząsteczka sygnałowa, która moduluje funkcje mitochondriów oraz wpływa na proliferację i śmierć komórek. Oprócz tego prolina może uruchamiać ekspresję genów koniecznych do regeneracji rośliny po ustąpieniu czynnika stresowego (Szabados i Saviouré 2010). Inną grupą związków zaangażowanych w ochronę roślin przed stresem suszy są poliaminy. Najpowszechniej występującymi przedstawicielami tej grupy są: triamina – spermidyna, tetraamina – spermina i jej prekursor diamina – putrescyna. W środowisku pH komórki związki te mają ładunek dodatni, co pozwala na ich interakcje z cząsteczkami obdarzonymi ładunkiem ujemnym takimi jak kwasy nukleinowe, białka i fosfolipidy (Groppa i Benavides 2008). Związki te biorą udział w stabilizowaniu błon biologicznych i kwasów nukleinowych. Poza tym są zaangażowane w zmiatanie wolnych rodników, działają jako cząsteczki sygnałowe w stresie oraz regulują przewodność kanałów jonowych. Poliaminom przypisywana jest także rola w programowanej śmierci komórki (Hussain i in. 2011). Liczne badania wykazują, że pod wpływem stresu osmotycznego dochodzi do akumulacji wielu niestrukturalnych węglowodanów i ich pochodnych w tym heksoz (glukozy, fruktozy), sacharozy i alkoholi cukrowych (Bartels i Sunkar 2005). Wynika to m.in. z faktu, że rośliny w warunkach ograniczonego dostępu energii uwalniają z nagromadzonych wcześniej zapasów skrobi i fruktanów cukry proste. Stresy abiotyczne, w tym susza, powodują zwiększoną hydrolizę skrobi, skutkującą akumulacją rozpuszczalnych cukrów, które pozwalają roślinie na utrzymanie turgoru oraz chronią błony i białka przed degradacją (Kaplan i Guy 2004). Ponadto niektóre węglowodany, takie jak np. trehalozo-6-fosforan, mogą działać jako cząsteczki sygnałowe (Hanson i Smeekens 2009). Poza metabolitami pierwotnymi stres suszy wpływa na syntezę metabolitów wtórnych m.in.

terpenoidów (Parida i in. 2007), związków fenolowych: kwasów fenolowych (Alvarez i in. 2008), flawonoidów i proantocjanidyn (Hernández i in. 2006), a także związków zawierających azot: alkaloidów (Szabó i in. 2003) i glukozyzolanów (Mewis i in. 2012).

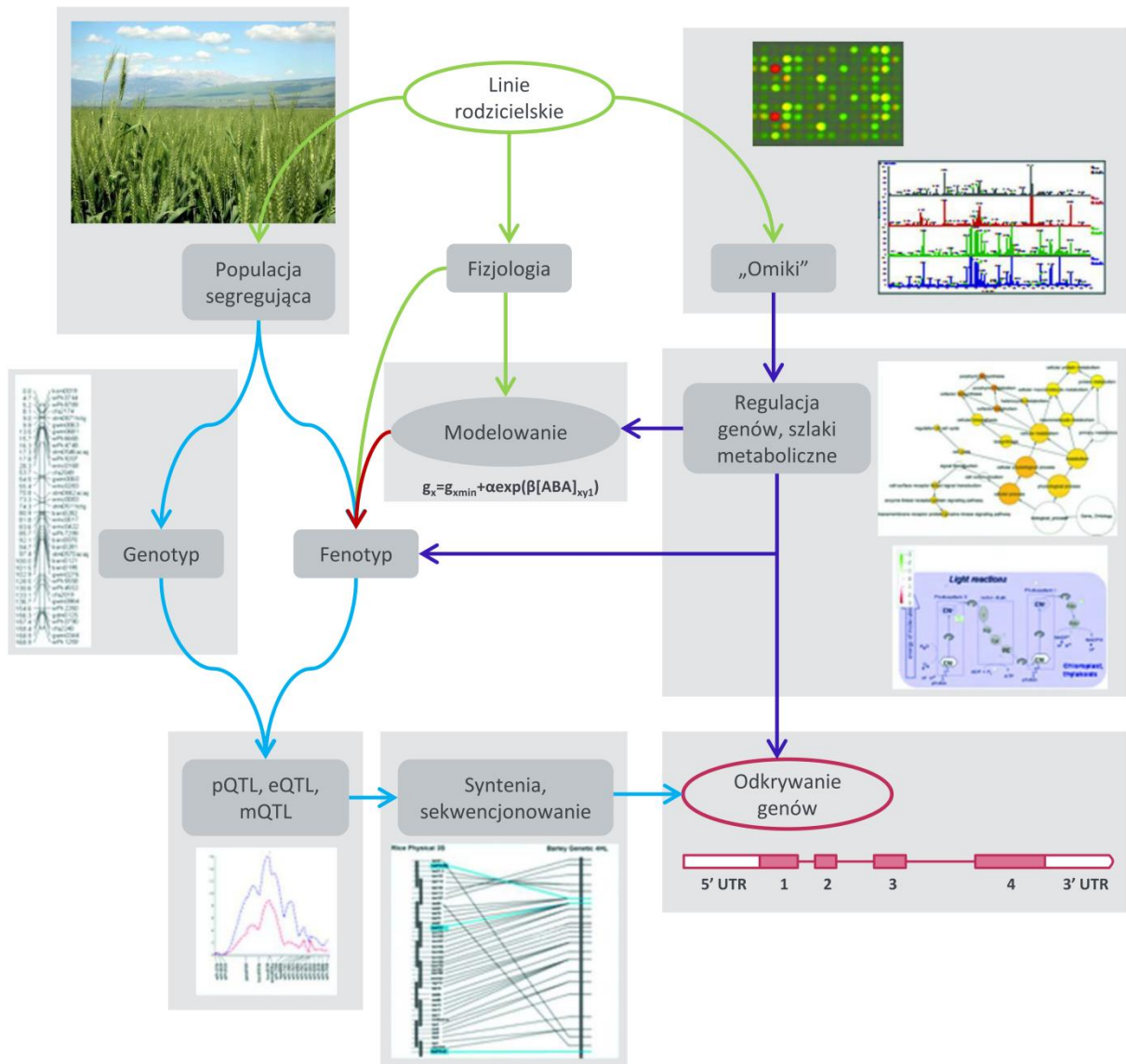
1.2.3 Hodowla roślin o zwiększonej tolerancji na stresy abiotyczne

Stresy abiotyczne, w tym przede wszystkim stres suszy i zasolenia, są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za zmniejszenie produktywności roślin, przyczyniając się do poważnych strat ekonomicznych (Vinocur i Altman 2005). Dlatego też konieczne jest wprowadzanie nowych odmian roślin, które będą charakteryzować się jednocześnie wysokim plonem jak i tolerancją na różne czynniki stresowe. Wprowadzenie do roślin powyższych cech nie jest łatwe, ponieważ większość z nich jest warunkowana poligenowo i zależy od wspólnego działania i poziomu ekspresji indukowanych stresem genów, a także białek i metabolitów (Sinclair 2011).

Wśród metod hodowli mających na celu uzyskanie roślin wykazujących tolerancję na stresy abiotyczne można wyróżnić trzy główne podejścia: hodowlę tradycyjną, hodowlę z wykorzystaniem markerów molekularnych oraz tworzenie nowych odmian przy użyciu technik inżynierii genetycznej (Ashraf 2010). Podejście klasyczne polega na krzyżowaniu roślin blisko spokrewnionych (np. należących do jednej odmiany) lub daleko spokrewnionych (np. pochodzących z innych odmian, gatunków) w celu uzyskania mieszańcowego potomstwa, mającego inne niż formy rodzicielskie kombinacje cech, które może zostać wykorzystane jako materiał wyjściowy do wyprowadzenia nowych odmian (Fiedziuszko i in. 1985). Przykładowo do krzyżowania mogą zostać wybrane rośliny rodzicielskie, z których jedna forma charakteryzuje się wysoką plennością, natomiast druga – niższym plonem, ale wysoką tolerancją na czynnik stresowy. Otrzymane mieszańce testuje się następnie pod kątem wielkości plonu i odporności na stres, mając na celu znalezienie linii, która będzie posiadać obie wartościowe cechy. Strategia ta jest niestety długotrwała i pracochłonna, a przez to kosztowna. Poza tym charakteryzuje ją niska selektywność, ponieważ oprócz cech korzystnych mogą zostać wprowadzone także cechy niepożądane (Cominelli i in. 2013). Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwala na skrócenie cyklu hodowlanego poprzez prowadzenie selekcji roślin w oparciu o różnice genetyczne, a nie jak w podejściu klasycznym tylko na podstawie obserwacji fenotypowych. Jak już wcześniej wspomniano tolerancja na stresy abiotyczne jest cechą złożoną warunkowaną przez poligeny, czyli geny współdziałające ze sobą w wytwarzaniu jednej cechy, których efekty fenotypowe się sumują. Regiony chromosomów kontrolujące te cechy noszą nazwę *loci* cech ilościowych (QTL, ang.

quantitative trait loci) (Ashraf 2010). Podejście opierające się na mapowaniu QTL polega na analizie potomstwa pochodzącego ze skrzyżowania skrajnie różniących się od siebie form rodzicielskich, u którego interesująca cecha podlega segregacji. Otrzymana populacja jest następnie oceniana pod kątem cech fenotypowych i polimorfizmu. Do analizy polimorfizmu wykorzystywane są techniki biologii molekularnej takie jak polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. *restriction fragments length polymorphism*), losowa amplifikacja polimorficznego DNA (RAPD, ang. *randomly amplified polymorphic DNA*), polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (AFLP, ang. *amplified fragment length polymorphism*) czy polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*). Kolejnym krokiem jest skonstruowanie mapy genetycznej, której rozdzielczość będzie tym wyższa, im większa będzie ilość markerów (Mauricio 2001). Podejście wykorzystujące mapowanie QTL, umożliwiające poszukiwanie związku pomiędzy markerem genetycznym a fenotypem, może pomóc w poznawaniu genetycznych podstaw odporności na stres, a tym samym znacznie ułatwić hodowlę roślin. W analizie QTL wyróżniane są także *loci* cech ilościowych związane z ekspresją genów (eQTL, ang. *expression QTL*), białkami (pQTL, ang. *protein QTL*) oraz metabolitami (mQTL, ang. *metabolic QTL*). Analiza zależności między markerami genetycznymi, transkryptami, profilami białkowymi i profilami metabolicznymi a zmiennością fenotypową, taką jak wielkość plonu lub tolerancja danego czynnika stresowego, może przyczynić się do wskazania procesów biochemicznych leżących u podstaw odpowiedzi rośliny na stres oraz pomóc w poszukiwaniu genów kandydatów zaangażowanych w te procesy (ryc. 1.6.) (Fleury i in. 2010). Trzecim podejściem stosowanym w hodowli, mającym na celu zwiększenie tolerancji roślin na stropy abiotyczne, jest transformacja genetyczna, polegająca na przenoszeniu genów do roślin z pominięciem bariery krzyżowania. W przeciwieństwie do klasycznych metod hodowli strategia ta pozwala na wprowadzenie do rośliny jedynie pożądanego genu. Dotychczasowe prace dotyczyły wprowadzania do roślin jednego lub kilku genów zaangażowanych albo w ścieżki sygnałowe lub regulatorowe, albo kodujących białka pełniące funkcje ochronne (np. LEA, HSP), albo kodujących enzymy uwikłane w szlaki metaboliczne prowadzące do syntezy osmolitów i antyoksydantów (Athar i Ashraf 2009). Za przykład rośliny transgenicznej z podwyższoną tolerancją na abiotyczny czynnik stresowy może posłużyć kukurydza transformowana genem pochodzącym z *Escherichia coli*, kodującym dehydrogenazę cholinową, będącą kluczowym enzymem w syntezie betainy glicynowej. Otrzymana transgeniczna kukurydza wykazywała wyższy poziom akumulacji GlyBet i podwyższoną tolerancję na stres suszy w fazie kiełkowania i młodej siewki,

w porównaniu do typu dzikiego. Ponadto w warunkach suszy plon roślin transgenicznych był znacząco wyższy od plonu roślin nietransformowanych (Quan i in. 2004).



Ryc. 1.6. Schematyczne przedstawienie drogi od wyboru linii rodzicielskich do odkrycia genu (według Fleury i in. 2010).

1.3 Jęczmień

Jęczmień to rodzaj zbóż z plemienia *Triticeae*, podrodziny wiechlinowych (*Pooideae*), rodziny wiechlinowatych (*Poaceae*), rzędu wiechlinowców (*Poales*). Do plemienia *Triticeae* zalicza się oprócz jęczmienia jeszcze ok. 350 gatunków, z których najbardziej znanymi przedstawicielami są zboża takie jak: pszenica, żyto, pszenżyto i owies (Barkworth i Bothmer 2009). Z kolei na rodzaj *Hordeum* składa się obecnie 31 gatunków zajmujących rozmaite

siedliska: zarówno suche jak i wilgotne, nizinne i wysokogórskie, solniska oraz kamieniste zbocza (Von Bothmer i Komatsuda 2011).

Jęczmień jest jednym z najstarszych i najważniejszych rodzajów zbóż. Wykopaliska archeologiczne wskazują, że roślina ta była uprawiana już ok. 10 000 lat temu na terenach tzw. Żyźnego Półksiężycy rozciągającego się od Egiptu, przez tereny Izraela i Palestyny, Jordanii, Libanu, Syrii i Iraku, aż po Zatokę Perską. Obecnie uprawiany gatunek – jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) – wywodzi się od dzikiego przodka *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. Obie rośliny charakteryzuje taka sama budowa kłosa, tzn. osadka kłosowa podzielona jest na odcinki, a na każdym odcinku znajdują się trzy jednokwiatowe kłoski: środkowy kłosek główny i dwa kłoski boczne (Von Bothmer i Komatsuda 2011). *H. vulgare* ssp. *spontaneum* ma fenotyp dwurzędowy (w kłosie widoczne są dwa rzędy ziaren) co wynika z faktu, że tylko środkowy kłosek jest płodny, natomiast kłoski boczne są sterylne. Podczas udomawiania jęczmienia doszło do mutacji, skutkującej sześciorzędowym fenotypem u niektórych form jęczmienia. Rośliny takie dają wyższy plon, ponieważ wszystkie kłoski (główne i boczne) są płodne (Komatsuda i in. 2007).

Podstawowa liczba chromosomów jęczmienia, tak jak wszystkich roślin z plemienia *Triticeae*, wynosi $x=7$. W obrębie rodzaju *Hordeum* można wyróżnić diploidy ($2n=14$), tetraploidy ($2n=4x=28$) i heksaploidy ($2n=6x=42$) (Von Bothmer i Komatsuda 2011). Genom jęczmienia jest jednym z największych wśród zbóż genomów i składa się z 5,1 Gpz. W 2012 r. została opracowana fizyczna mapa genomu jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.), reprezentująca ponad 95% genomu (4,98 Gpz) (The International Barley Genome Sequencing Consortium 2012). Można się więc spodziewać, że kolejne lata będą obfitować w badania nad genetyką i ulepszaniem cech hodowlanych tego gatunku.

Szacuje się, że ok. 55-60% produkcji jęczmienia jest wykorzystywane na cele paszowe, 30-40% do produkcji słodu, 2-3% przeznaczane jest do produkcji żywności i około 5% na cele siewne (Ullrich 2011). Mimo że w wielu regionach świata jęczmień był od wieków ważnym dla żywienia ludzi surowcem, od XIX w. jego udział w produkcji żywności zaczął spadać, głównie ze względu na wzrost znaczenia pszenicy i ryżu. Obecnie zboże to służy do wyrobu kasz: pęczaku, kaszy jęczmiennej perłowej i łamanej, płatków, otrąb, mąki jęczmiennej oraz kawy zbożowej (Baik i Ullrich 2008). Ponadto jęczmień jest wykorzystywany do uzyskiwania słodu do produkcji piwa oraz do wyrobu zacieru zbożowego przy produkcji whisky. Jęczmień jest głównie przeznaczany na cele paszowe, a jakość paszy często jest porównywana do kukurydzy i pszenicy przy zastosowaniu odmian nieoplewionych

lub z cienką łuską, i dodatkowo charakteryzujących się wysoką zawartością białka (Ullrich 2011).

Światowa produkcja jęczmienia w 2012 r. według danych statystycznych publikowanych przez Organizację Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO, ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) wynosiła blisko 133 mln ton (z powierzchnią upraw 49,5 mln ha) co plasuje jęczmień na czwartym miejscu wśród zbóż, zaraz po kukurydzy, ryżu i pszenicy. Ponadto prawie 60% produkcji jęczmienia skupiona jest w Europie, przy czym głównym producentem jest Rosja (faostat.fao.org). W Polsce w 2012 r. wyprodukowano 4,18 mln ton jęczmienia (powierzchnia upraw: 1,16 mln ha), z czego według danych Głównego Urzędu Statystycznego 22% produkcji (905,6 tys. ton) pochodziło z Wielkopolski (GUS 2012, www.stat.gov.pl).

2. CEL PRACY

Celem badań jest przeprowadzenie profilowania metabolitów liści i korzeni jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) form rodzicielskich Maresi i Cam/B1/CI oraz populacji mapującej wyprowadzonej z tych genotypów, a także odmian referencyjnych Sebastian i Stratus, w warunkach niedoboru wody z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Ponadto niniejsza praca ma na celu poznanie składu jakościowego i ilościowego związków znajdujących się na powierzchni liści oraz przebadanie wpływu jaki deficyt wody może wywoływać na zawartość tych metabolitów w warstwie kutykularnej.

Postawione zadanie badawcze jest częścią multidyscyplinarnego projektu POLAPGEN-BD, którego celem jest uzyskanie narzędzi molekularnych umożliwiających prowadzenie hodowli w kierunku form wykazujących tolerancję niedoboru wody. Poznanie wzorów zmian profili metabolicznych poszczególnych odmian i linii w odpowiedzi na zadane warunki stresowe pozwoli w przyszłości na połączenie uzyskanych wyników z danymi z pozostałych zadań Projektu dotyczących zmian cech plonu, a także cech morfologicznych, anatomicznych oraz molekularnych (genomu, transkryptomu, proteomu). Zwiększona lub zmniejszona akumulacja metabolitów w tkankach roślin wywołana suszą, potwierdzona i wsparta informacjami z pozostałych poziomów, może dostarczyć cennych markerów determinujących odporność jęczmienia na suszę i być przydatna w selekcji roślin w programach hodowlanych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Odczynniki

Rozpuszczalniki stosowane do ekstrakcji oraz analiz GC-MS:

- chlorek metylenu $\geq 99,9\%$ (cz.d.a.): Sigma-Aldrich (Niemcy)
- heksan $\geq 97,0\%$ (czystość HPLC): Sigma-Aldrich (Niemcy)
- izopropanol $\geq 99,9\%$ (czystość LC-MS): Sigma-Aldrich (Niemcy)
- metanol $\geq 99,9\%$ (czystość LC-MS): Sigma-Aldrich (Niemcy)

Woda dejonizowana w dwustopniowym systemie oczyszczania TKA Pacific (Thermo Fisher Scientific, Niemcy).

Odczynniki do derywatyzacji:

- chlorowodorek metoksyaminy: Sigma-Aldrich (Niemcy)
- MSTFA (N-metylo-N-trimetylsililo-trifluoroacetamid): Sigma-Aldrich (Niemcy)
- pirydyna: Merck (Niemcy)

Standardy wykorzystywane podczas analiz GC-MS:

- heptakozafluorotributyloamina: Apollo Scientific (Wielka Brytania) – do kalibracji spektrometru z analizatorem czasu przelotu sprzężonego z chromatografem gazowym,
- rybitol: Sigma-Aldrich (Niemcy) – standard wewnętrzny dodawany do próbek poddawanych analizie GC-MS,
- dekan, dodekan, tetradekan, heksadekan, oktadekan, eikozan, dokozaan, tetrakozan, heksakozan, oktakozan, triakontan, dotriakontan, heksatriakontan: Sigma-Aldrich (Niemcy) – markery indeksów retencji,
- standardy metabolitów:
 - alanina, β -alanina, asparagina, fenyloalanina, fruktoza, fruktozo-6-fosforan, glicyna, glukoza, glukozo-6-fosforan, glutamina, 1-heksakozanol, histydyna, inozytol, izoleucyna, kampesterol, 1-kestoza, ksyloza, kwas α -ketoglutarynowy, kwas askorbinowy, kwas asparaginowy, kwas bursztynowy, kwas cytrynowy, kwas glutaminowy, kwas jabłkowy, kwas maleinowy, kwas malonowy, kwas mlekowy, kwas piroglutaminowy, kwas p-kumarowy, kwas trans-ferulowy,

kwas γ -aminomasłowy, leucyna, lizyna, melibioza, prolina, putrescyna, rafinoza, ryboza, β -sitosterol, sacharoza, seryna, sorbitol, stigmasterol, trehaloza, treonina, tryptofan, tyramina, tyrozyna, walina: Sigma-Aldrich (Niemcy)

- kwas arachidowy, kwas kapronowy, kwas α -linolenowy, kwas linolowy, kwas palmitynowy, kwas stearynowy: Extrasynthese (Francja)
- kwas chinowy: The British Drughouse Ltd (Wielka Brytania)
- mocznik: BioShop (Kanada)

3.2 Materiał roślinny i warunki prowadzenia suszy

Badania prowadzone były na dwurzędowym jęczmieniu jarym (*Hordeum vulgare* L.). Materiał roślinny stanowiły 104 genotypy:

- 3 odmiany europejskie: Maresi (Niemcy), Sebastian (Dania) i Stratus (Polska),
- 1 linia hodowlana Cam/B1//CI08887/CI05761 (w dalszej części pracy stosowana będzie skrócona nazwa Cam/B1/CI) (Syria),
- 100 zrekombinowanych linii wsobnych (RIL, ang. *recombinant inbred line*) pochodzących z krzyżówki Maresi \times Cam/B1/CI.

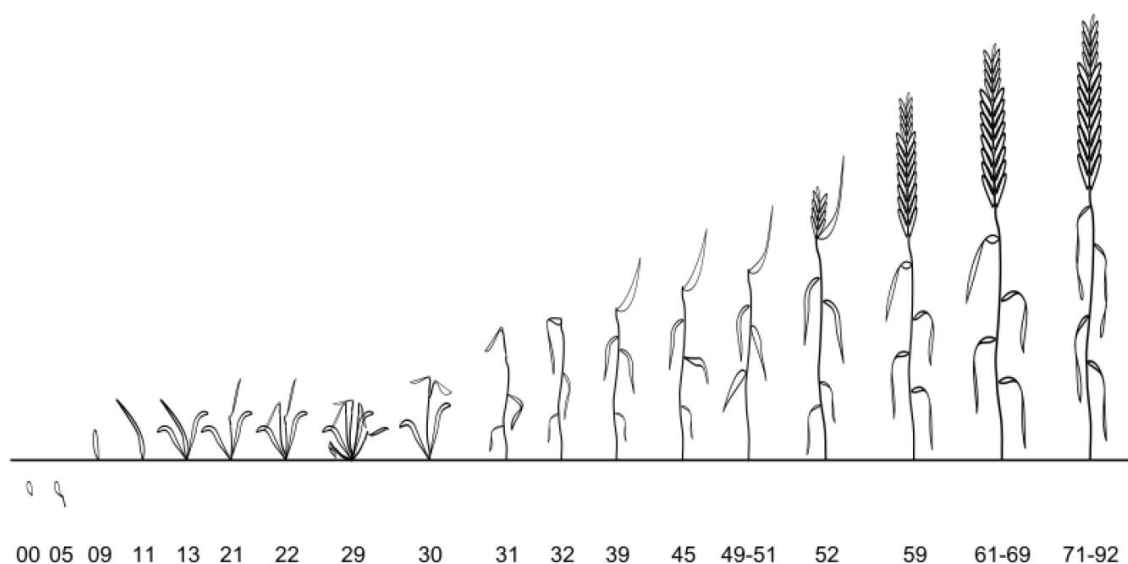
Uprawa jęczmienia prowadzona była w częściowo kontrolowanych warunkach szklarniowych w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Prace szklarniowe, prowadzone dla uczestników projektu POLAPGEN-BD, wykonał Zespół Fenotypowania i Genotypowania Zbóż kierowany przez prof. dr hab. Marię Surmę, wchodzący w skład Zakładu Biotechnologii kierowanego przez prof. dr hab. Tadeusza Adamskiego.

Nasiona były wysiewane do doniczek zawierających 8 kg podłoża będącego mieszanką (w stosunku wagowym 2:7) piasku oraz gleby pochodzącej z pola (piasek gliniasty mocny), dostarczonej przez jednego z wykonawców projektu POLAPGEN-BD – Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa PIB w Puławach. Do każdej doniczki wysiewano po 25 nasion wykorzystując do tego celu znacznik zaprojektowany w IUNG.

Warunki prowadzenia doświadczenia przy optymalnej wilgotności i ograniczonej dostępności wody zostały określone przez prof. dr hab. Grzegorza Józefaciuka z Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie. Rośliny kontrolne wzrastały w optymalnych warunkach wilgotności gleby (pF 2,2). Stres suszy polegał na utrzymaniu pF gleby w obszarze wody trudno dostępnej dla rośliny (pF 3,2-3,8), ale nie przekraczającym wartości odpowiadającej punktowi trwałego wędnięcia (pF 4,2). Pomiar wilgotności podłoża

w doniczkach kontrolowany był codziennie przy użyciu miernika reflektometrycznego typu FOM/mts (ang. *Field Operated Meter for determination of moisture temperature and salinity of soils*) (EasyTest, Polska), a następnie wilgotność gleby doprowadzano do odpowiedniej wartości poprzez dodanie wody.

Jęczmień poddawany był stresowi niedoboru wody od fazy trzeciego liścia przez okres 10 dni. Stadium 3-listnej siewki odpowiada fazie 13 skali BBCH (niem. *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie*) (ryc. 3.1). W przypadku prób przeznaczonych do analizy ogółu metabolitów występujących w tkankach, rośliny kontrolne jak i te poddane stresowi niedoboru wody zbierano po 10 dniach. Zarówno liście jak i korzenie zbierane były w dwóch powtórzeniach biologicznych. Na każde powtórzenie biologiczne składało się około 10 roślin. Liście były ścinane, a następnie natychmiast zamrażane w ciekłym azocie. Z kolei korzenie po wyrwaniu z ziemi najpierw płukano w wodzie, a dopiero później zamrażano. Pobrane próbki przewieziono w suchym lodzie, a następnie przechowywano w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu ekstrakcji. W przypadku prób przeznaczonych do ekstrakcji wosków kutykularnych zbierano po 3 powtórzenia biologiczne liści form rodzicielskich (Maresi i Cam/B1/CI) wzrastających w warunkach kontrolnych i warunkach niedoboru wody przez okres 10 dni (około 6-7 roślin na powtórzenie). Ekstrakcja związków znajdujących się na powierzchni liści następowała natychmiast po ścięciu roślin z doniczek.



Ryc. 3.1. Fazy rozwojowe zbóż według skali BBCH (0. – kielkowanie, 1. – rozwój liści, 2. – krzewienie, 3. – wzrost pędu na długość, 4. – rozwój kłosa w pochwie liściowej, 5. – kłoszenie, 6. – kwitnienie, 7. – rozwój ziarniaków, 8. – dojrzewanie, 9. – zamieranie) (BBCH Monograph 2001).

3.3 Ekstrakcja związków z materiału roślinnego

3.3.1 Ekstrakcja metabolitów z liści i korzeni

Przeprowadzono optymalizację warunków izolacji metabolitów z materiału roślinnego. Przetestowano ekstrakcję z wykorzystaniem schłodzonych (4 °C, -20 °C) oraz gorących (70 °C) rozpuszczalników (metanol, metanol/woda, izopropanol/acetonitryl/woda, metanol/chloroform/woda) (Fiehn i in. 2008, Roessner i in. 2000). W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wybrano optymalne, opisane poniżej, warunki ekstrakcji.

Zamrożone próbki liści i korzeni umieszczano w schłodzonych ciekłym azotem naczyniach ze stali nierdzewnej o pojemności 50 ml z kulkami do homogenizacji (12 mm \varnothing), a następnie rozdrabniano na proszek przy użyciu młynka kulkowego MM 400 (Retsch, Niemcy) przez 45 s z częstotliwością 30 Hz. Rozdrobniony zamrożony materiał ważono (50 mg) w probówkach typu eppendorf (2 ml), po czym natychmiast dodawano 1,4 ml 80 %-owego schłodzonego metanolu (4 °C) oraz roztworu standardu wewnętrznego (odpowiednio w przypadku liści i korzeni: 25 μ l i 10 μ l roztworu rybitolu 1mg/ml). Dla każdego powtórzenia biologicznego wykonano dwa powtórzenia techniczne. Otrzymane mieszaniny były wytrząsane przez 10 min przy 950 rpm w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem termomiksera TS-100 (Biosan, Łotwa). Uzyskane zawiesiny były wirowane przez 10 min przy 11 000 g. Następnie do nowych probówek (1,5 ml) przenoszono po 200 μ l lub 500 μ l (odpowiednio liść i korzeń) supernatantu. Otrzymane ekstrakty odparowywano do sucha w temperaturze pokojowej w koncentratorze próżniowym Concentrator 5301 (Eppendorf, Niemcy). Wysuszone ekstrakty przechowywano w zamrażarce (-80 °C) do czasu analizy.

3.3.2 Ekstrakcja związków znajdujących się na powierzchni liści

Liście jęczmienia zanurzano w 100 ml chlorku metylenu na 20 s i energicznie wytrząsano. Czas ekstrakcji został dobrany tak, aby zapobiec uszkodzeniu komórek i wyciekowi związków znajdujących się w cytozolu. Otrzymany roztwór odparowywano na rotacyjnej wyparce próżniowej (Heidolph, Niemcy) do objętości około 5 ml, następnie przenoszono do szklanych probówek i odparowywano do sucha w strumieniu azotu na bloku grzejmym w 40 °C (Major Science, Stany Zjednoczone). Uzyskany ekstrakt ważono, po czym rozpuszczano w 2 ml chlorku metylenu. Następnie objętość odpowiadającą 2 mg s.m. przenoszono do nowych probówek i odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Wysuszone ekstrakty przechowywano w zamrażarce do czasu analizy (-30 °C).

3.4 Derywatywacja

Zamrożone, wysuszone próbki ekstraktów umieszczano przed derywatyzacją na 30 min w koncentratorze próżniowym, aby pozbyć się pozostałości wody. Próbki poddawano dwuetapowej derywatywacji. W pierwszym etapie ekstrakty rozpuszczano w 50 μ l chlorowodoru metoksyaminy w pirydynie (20 mg/ml), które następnie wytrząsano przy użyciu termomiksera w 37 °C przy 950 rpm przez 1,5 h. Następnie próbki wirowano przez 30 s, dodawano 80 μ l MSTFA i ponownie wytrząsano w 37 °C przy 950 rpm przez 30 min. Próbki wirowano przez 10 min przy 11 000 g, po czym przenoszono do szklanych fiolek.

W przypadku próbek przeznaczonych do analizy ogółu metabolitów w tkankach, przed drugą reakcją derywatywacji dodawano 10 μ l mieszaniny markerów indeksów retencji. Roztwór ten składał się z 13 alkanów w zakresie C10 – C36 rozpuszczonych w heksanie (4 mg/ml) zmieszanych w równych stosunkach objętościowych.

W przypadku ekstraktów pochodzących z powierzchni liści po drugiej reakcji derywatywacji rozcieńczano próbki 3-krotnie dodając chlorek metylenu.

3.5 Analiza instrumentalna

Do analizy metabolitów wyekstrahowanych z korzeni i liści, oraz metabolitów obecnych na powierzchni liści wykorzystano chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas z jonizacją elektronami i analizatorem czasu przelotu (GC-EI-TOF-MS). Na system GC-MS składał się chromatograf gazowy 6890N z automatycznym systemem podawania i nastrzykiwania próbki 7683 (Agilent, Stany Zjednoczone), oraz spektrometr mas GCT Premier (Waters, Stany Zjednoczone).

Analizy prowadzone były przy parametrach wymienionych w tabelach 3.1 i 3.2. Każda próbka była nastrzykiwana dwukrotnie. Całkowity czas trwania analizy wynosił 35 min w przypadku analizy metabolitów liści i korzeni, i 40 min w przypadku analizy wosków kutykularnych.

Tab. 3.1. Parametry układu GC.

AGILENT 6890N	
kolumna	DB-5MS (J&W Scientific, Stany Zjednoczone)
wymiary kolumny	30 m długości × 0,25 mm \varnothing × 0,25 μ m grubość filmu
gaz nośny	hel 6.0 (Linde, Niemcy)
przepływ gazu nośnego	1 ml/min
temperatura portu nastrzykowego	230 °C
objętość nastrzyku	1 μ l
płukanie strzykawki	rozpuszczalniki: chlorek metylenu (A) i izopropanol (B) płukanie wstępne: 2×A, 2×B płukanie próbką: 1 płukanie po nastrzyku: 7×A, 7×B
dozownik	typu <i>split</i> (1:50)
temperatura pieca	70 °C (2 min) → 10 °C/min → 300 °C (10 min w przypadku analizy metabolitów liści i korzeni, 15 min w przypadku analizy wosków kutykularnych)

Tab. 3.2. Parametry układu TOF-MS.

WATERS GCT PREMIER	
temperatura interfejsu	250 °C
temperatura źródła jonów	250 °C
energia elektronów	70 eV
temperatura w rezerwuarze kalibranta	50 °C
temperatura połączenia rezerwuar kalibranta – źródło jonów	150 °C
opóźnienie czasu detekcji (ang. <i>solvent delay</i>)	5 min
tryb jonów	EI+
zakres rejestrowanych mas	50-650 m/z
program do analizy danych	MassLynx v. 4.1, DataBridge

3.6 Analiza danych

3.6.1 Identyfikacja związków i analiza ilościowa

W przypadku analizy związków występujących na powierzchni liści, dane były integrowane ręcznie w programie MassLynx v. 4.1. Obliczenia statystyczne, w tym obliczenie wartości średnich i odchyłeń standardowych, oraz graficzną prezentację danych wykonano w programie Microsoft Office Excel. Jeśli chodzi o analizę metabolitów liści i korzeni część obróbki danych została wykonana ręcznie (jw.), jednak większość, ze względu na duży zbiór danych (ponad 3 tys. próbek), została przetworzona przy pomocy programu do automatycznej

identyfikacji i analizy ilościowej widm uzyskanych techniką GC-MS – TargetSearch (opisany w podrozdziale 3.6.1.1).

Obliczenie indeksów retencji (RI, ang. *retention index*) związków przeprowadzono zgodnie z poniższym wzorem dla analiz chromatograficznych przeprowadzonych w gradiencie temperaturowym z wykorzystaniem jako markerów RI alkanów o parzystej liczbie węgli (Zellner i in. 2008):

$$RI = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{t_r(zw.) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right]$$

przy czym:

$$t_r(n) < t_r(zw.) < t_r(N)$$

gdzie:

RI – indeks retencji Kovátsa,

n – liczba atomów węgla w alkanie wypływającym przed związkiem badanym,

N – liczba atomów węgla w alkanie wypływającym za związkiem badanym,

t_r – czas retencji,

zw. – związek o nieznanym indeksie retencji.

W analizach metabolomicznych pewne wyzwanie stanowi identyfikacja związków, z tego względu że pojedynczy metabolit może być obecny w postaci różnych pochodnych. W analizach opartych o technikę GC-MS z wykorzystaniem chemicznej modyfikacji grup funkcyjnych można przykładowo obserwować aminokwasy z jedną, dwiema lub trzema grupami TMS (Zaikin i Halket 2009). MSI wyróżnia 4 poziomy określające wiarygodność identyfikacji (tab. 3.3). Zgodnie z powyższymi zaleceniami jedynie pierwszy poziom – pełna identyfikacja potwierdzona przez porównanie ze związkiem wzorcowym – został oznaczony w niniejszej pracy gwiazdką (*). Poziom drugi – adnotacja związku – został przypisany na podstawie porównania uzyskanych widm z widmami zdeponowanymi w bazach danych: Wiley Registry of Mass Spectral Data, Golm Metabolome Database oraz MassBank. Związki niezidentyfikowane, opisane są w pracy jako N_x, gdzie x odpowiada indeksowi retencji (zaokrąglonemu do liczby całkowitej) nieznanego związku. Dokładne masy monoizotopowe związków zostały obliczone przy użyciu Molecular Weight Calculator v. 6.49 (www.alchemistmatt.com).

Tab. 3.3. Poziomy identyfikacji związków zdefiniowane przez MSI (Dunn i in. 2013).

	POZIOM IDENTYFIKACJI	PODSTAWA PRZYPISANIA DO DANEGO POZIOMU
1	pełna identyfikacja związku	Porównanie z dwóch lub większej liczby cech względem substancji wzorcowej w tych samych warunkach analitycznych.
2	przypuszczalna adnotacja związku	Opiera się o właściwości fizykochemiczne i/lub podobieństwo widm zdeponowanych w publicznych lub komercyjnych bazach danych, bez odniesienia do związków wzorcowych.
3	przypuszczalna adnotacja klasy związku	Opiera się o charakterystyczne właściwości fizykochemiczne danej klasy związków lub podobieństwo widm do danej grupy.
4	brak identyfikacji – związki nieznane	Pomimo braku identyfikacji i klasyfikacji do danej grupy związków, związki te można odróżnić od innych i obliczyć ich ilość w oparciu o dane zawarte w widmie.

3.6.1.1 TargetSearch

Pakiet TargetSearch (Cuadros-Inostroza i in. 2009) działa w środowisku R (R Development Core Team 2010) i jest narzędziem do wstępnego przetwarzania danych pochodzących z profilowania metabolicznego przeprowadzonego z wykorzystaniem techniki GC-MS. Ponadto program ten umożliwia jednoczesną analizę jakościową i ilościową związków obecnych w próbkach.

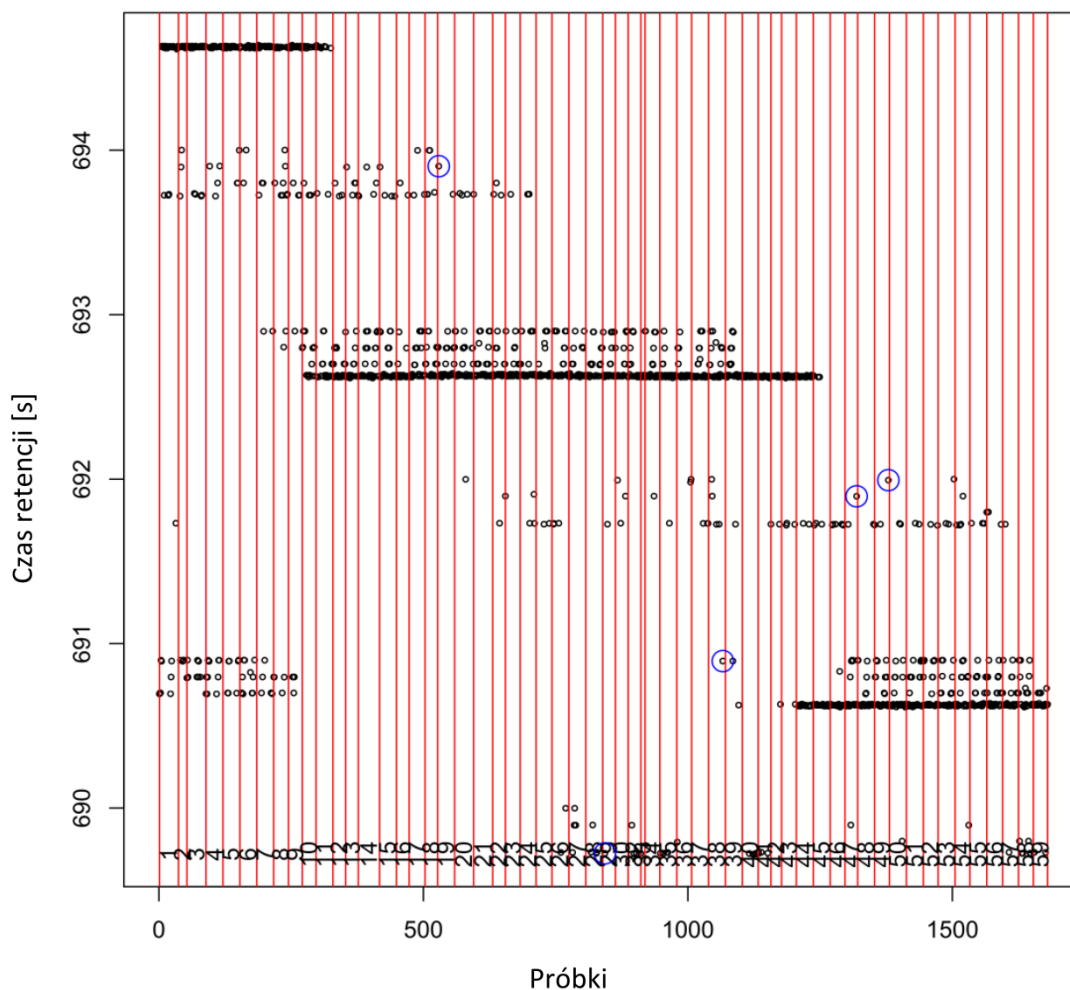
Na dane wejściowe wprowadzone przez użytkownika składały się: pliki z danymi GC-MS, opis próbek oraz biblioteka widm związków. Analiza danych pochodzących z liści i korzeni była wykonana oddzielnie, jako dwa odrębne zestawy danych, jednak przy takim samym ustawieniu parametrów programu. Pierwszym etapem przetwarzania danych była konwersja surowych danych programu MassLynx do powszechnie uznanego i niezależnego od stosowanej platformy obliczeniowej formatu NetCDF (ang. *network common data form*) przy użyciu dodatku DataBridge (Waters). Łącznie wprowadzono do programu 3360 plików (2×1680). Na wymagany do przetworzenia plików opis próbek składała się tabela zawierająca: nazwy wszystkich próbek i ich przypisanie do odpowiednich grup (linia, kontrola/susza, powtórzenie biologiczne/techniczne) oraz czas przeprowadzenia analizy GC-MS liczony w dniach (1-59 dni dla liści i 1-57 dla korzeni). Dodatkowo wprowadzono plik opisujący stosowane jako markery indeksów retencji alkany, tj. przypisany im indeks retencji, zakres czasów retencji podany w sekundach (dolna i górna granica), przy których użyte alkany eluowały, oraz masę charakterystyczną dla tych markerów (85 m/z), względem której miały być wyszukiwane w próbkach. Ostatnim elementem wprowadzonym do programu była biblioteka widm związków. Ze względu na niecelowany charakter analizy wykorzystano publiczną bazę GMD (Kopka i in. 2005) kompatybilną z programem

TargetSearch, zawierającą blisko 2600 wpisów. Wybrana baza: GMD_20120203_VAR5_ALK_TargetSearch.txt (gmd.mpimp-golm.mpg.de/download), oparta jest na indeksach retencji obliczonych na podstawie 9 alkanów (C10-C36) i kolumnie kapilarnej wypełnionej 5%-fenylo-95%-dimetylopolisiloksanem, co najbardziej odpowiada warunkom, w których przeprowadzono analizy instrumentalne.

Analizy bioinformatyczne z wykorzystaniem pakietu TargetSearch zostały przeprowadzone we współpracy z dr Anetą Sawikowską z Zakładu Biometrii i Bioinformatyki Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu i obejmowały następujące etapy:

- i. Konwersja dokładnych mas do mas nominalnych.
- ii. Usunięcie linii bazowej i identyfikacja wierzchołków pików we wszystkich chromatogramach.
- iii. Wyszukanie czasów retencji alkanów i ich konwersja na indeksy retencji. Na tym etapie tworzony jest raport (ryc. 3.2), na który składają się wykresy czasów retencji każdego alkanu we wszystkich próbkach, co pozwala na wyznaczenie obserwacji odstających (w odniesieniu do dnia przeprowadzenia analizy) i ich ewentualne ręczne skorygowanie bądź usunięcie odstających próbek.
- iv. Przeszukiwanie poszczególnych analiz pod kątem obecności związków zawartych w bibliotece widm GMD na podstawie charakterystycznych mas występujących w zadanym okienku czasowym przy oczekiwanym RI.
- v. Utworzenie macierzy zawierających:
 - a. Informacje o metabolitach (w tym: nazwa związku, RI z biblioteki, RI z prób, liczba korelujących mas i ich rzeczywiste wartości oraz współczynnik określający podobieństwo widm pochodzących z biblioteki i prób),
 - b. Intensywności związków w poszczególnych próbkach.

Uzyskane w ten sposób macierze metabolitów były następnie ręcznie sprawdzone pod kątem prawidłowości przypisania identyfikacji. Ostatecznie w próbkach ekstraktów liści zostało adnotowanych 101 związków, z kolei w próbkach pochodzących z korzeni adnotowano 100 związków. Następnie dane normalizowano względem standardu wewnętrznego.



Ryc. 3.2. Przykładowy raport przedstawiający rozkład czasu retencji tetradekanu w 1680 próbkach ekstraktów liści. Niebieskimi kółkami zaznaczono obserwacje odstające. Czerwone linie wyznaczają dni analizy (ok. 30 próbek/dobę).

3.6.2 Analiza statystyczna i wizualizacja wyników

Analizy statystyczne zostały wykonane przez dr Anetę Sawikowską oraz prof. dr hab. Pawła Krajewskiego z Zakładu Biometrii i Bioinformatyki Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu przy użyciu programu R (R Development Core Team 2010) oraz Genstat 16 (VSN International 2011).

W celu przeprowadzenia analizy zmian metabolitów pod wpływem niedoboru wody w formach rodzicielskich, odmianach referencyjnych i liniach wsobnych pochodzących z krzyżówki Maresi × Cam/B1/CI w pierwszej kolejności wykonano logarytmowanie danych (\log_2) w celu zbliżenia ich rozkładu do rozkładu normalnego. Następnie przeprowadzono analizę wariancji mając na celu identyfikację różnic statystycznie istotnych pomiędzy odmianami oraz warunkami prowadzenia uprawy (kontrolnymi i z niedoborem wody), a także

identyfikację interakcji odmiana \times susza oraz interakcji linia \times susza. Efekt suszy obliczono jako różnicę intensywności danego związku w warunkach suszy i kontroli.

Zawartość związków w poszczególnych odmianach została przedstawiona w formie wykresów kolumnowych, a w przypadku populacji mapującej rozkład cech został zobrazowany w postaci wykresów pudełkowych z wąsami (ang. *box-and-whisker plot*). Ponadto przeprowadzono klasyfikację metabolitów opierając się o ontologię związków z baz danych, głównie PubChem i KEGG. Przedstawienie stopnia podobieństwa odpowiedzi na stres niedoboru wody pomiędzy odmianami Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian, Stratus zobrazowano stosując analizę głównych współrzędnych. Aby ukazać związek pomiędzy poszczególnymi metabolitami i liniami w liściu oraz w korzeniu w warunkach kontrolnych i stresowych wykreślono mapy cieplne z dendrogramami.

4. WYNIKI

4.1 Analiza związków wyizolowanych z liści i korzeni jęczmienia

4.1.1 Analiza jakościowa

Identyfikację związków w pierwszym etapie przeprowadzono w oparciu o publiczne i komercyjne biblioteki widm, dane literaturowe oraz dostępne standardy. W analizowanych próbkach ekstraktów tkanek jęczmienia wykryto w ten sposób 141 pochodnych, z czego 129 w liściu i 119 w korzeniu (tab. 4.1). 46 metabolitów o intensywności powyżej 1000, którym nie udało się przypisać struktury chemicznej, zostało opisanych jako N_x (gdzie x to indeks retencji), co stanowiło około 32% wykrytych związków (związków o intensywności mniejszej niż 1000 nie uwzględniono w tym zestawieniu). Dzięki zastosowaniu pakietu TargetSearch w drugim etapie analizy możliwe było przypisanie nazw lub identyfikatorów biblioteki Golm Metabolome Database 34 związkom nieznanym (dane umieszczone w suplemencie, tab. S.1), przy czym w większości przypadków (21 związków) były to jedynie identyfikatory. TargetSearch pozwolił na przypisanie nazw/identyfikatorów 114 pochodnym (101 w liściu i 100 w korzeniu) (tab. 4.2). Pomimo ręcznego sprawdzenia poprawności adnotacji nie zawsze była możliwa jednoznaczna identyfikacja. Powyższa sytuacja dotyczyła czterech par metabolitów (tab. 4.2):

- 1,3-diaminopropanu i 1,2-diaminopropanu [50],
- glukopiranozy i związku podobnego do glukopiranozy [78],
- lumichromu i związku podobnego do lumichromu [21 i 24], oraz
- dwóch związków opisanych jako podobne do pochodnej fruktozy [63 i 65].

Dla dwóch pierwszych par korelacja obserwacji pomiędzy poszczególnymi związkami w danej parze była bardzo wysoka w związku z czym metabolity te zostały opisane jednym numerem. Z kolei analiza korelacji dwóch pozostałych par ujawniła różnice pomiędzy obserwacjami dla par nr 63 i 65 zarówno w liściu jak i w korzeniu oraz w korzeniu dla pary nr 21 i 24. Z powodu powyższych rozbieżności związki z obu tych par zostały potraktowane jako osobne metabolity w dalszych etapach analizy danych.

Wykorzystanie techniki GC-MS pozwoliło na identyfikację wielu związków reprezentujących różne klasy. Większość wykrytych związków występowała w postaci pochodnych trimetylosililowych (opisanych jako TMS), co wynikało z obecności w strukturze chemicznej metabolitów polarnych grup funkcyjnych (hydroksylowych,

Tab. 4.1. Związki wykryte w próbkach ekstraktów liści i korzeni jęczmienia (^A – RI według Golm Metabolome Database, ^B – RI według MassBank, b.d. – brak danych, M – masa monoizotopowa, M_{RI} – marker indeksu retencji, obs. – wartość obserwowana, wytłuszczonym drukiem – charakterystyczne m/z o największej intensywności, czerwony – jon molekularny M⁺, „—“ – brak derywatywacji, „-” – nie wykryto, „+” – wykryto, * – pełna identyfikacja potwierdzona związkiem referencyjnym).

l.p.	RI	RI obs.	Nazwa	Derywatywacja	Wzór sumaryczny pochodnej	M [Da]	Wybrane jony fragmentacyjne obecne w widmie EI	Obecność	
								liść	korzeń
1.	b.d.	<1000	etano-1,2-diol	2 TMS	C8H22O2Si2	206,1158	73, 103, 133 , 147, 191	+	+
2.	1000		dekan	—	C10H22	142,1721	57, 71, 85, 99, 113, 142	M _{RI}	
3.	1031,31 ^A 1033,61 ^B	1032,26	2-hydroksypirydyna	1 TMS	C8H13NOSi	167,0766	59, 78, 97, 122, 136, 152, 166	+	+
4.	1038,21 ^A	1049,68	propano-1,3-diol	2 TMS	C9H24O2Si2	220,1315	73, 103, 115, 130 , 147, 177, 205	+	+
5.	1044,47 ^A 1050,16 ^B	1051,61	kwask mlekowy*	2 TMS	C9H22O3Si2	234,1107	73, 75, 88, 101, 117, 133 , 147, 191, 219	+	+
6.	1062,00 ^A	1069,03	kwask kapronowy*	1 TMS	C9H20O2Si	188,1233	73, 75, 117, 131 , 145, 147, 173, 188	+	+
7.	1062,89 ^A	1069,03	kwask glikolowy	2 TMS	C8H20O3Si2	220,0951	59, 66, 73, 75, 88, 103 , 117, 131, 133 , 147, 161, 177 , 205, 220	+	-
8.	1081,68 ^A 1085,62 ^B	1084,52	walina* (1)	1 TMS	C8H19NO2Si	189,1185	55, 72 , 75, 87, 103, 130, 146, 156, 174	+	+
9.	1087,41 ^A 1094,19 ^B	1096,77	alanina* (1)	2 TMS	C9H23NO2Si2	233,1267	59, 73, 75, 86, 94, 100 , 103, 116 , 128, 131, 133, 147, 174, 190, 218, 233	+	+
10.	1104,93 ^A 1112,40 ^B	1109,68	hydroksyloamina	3 TMS	C9H27NOSi3	249,1400	59, 70, 73, 86, 95, 100, 113, 119 , 130, 133 , 144, 146 , 158, 161 , 171, 188, 204, 205, 249	+	+
11.	b.d.	1135,48	N_1135	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 86, 89, 100, 103, 117, 131, 133 , 147, 160 , 174, 190, 205, 220, 235	+	+
12.	b.d.	1150,97	N_1151	b.d.	b.d.	b.d.	73, 86, 100 , 102, 129, 142 , 160, 174, 216	+	+
13.	1165,67 ^A	1170,32	fosforan metylu	2 TMS	C7H21O4PSi2	256,0716	73, 75, 77, 85, 89, 98, 103, 113, 115, 119, 121, 133, 135, 137, 147, 149, 151, 163 , 165, 167, 169, 181, 195, 211 , 225, 241, 256	+	+
14.	1176,03 ^A	1172,26	prolina* (1)	1 TMS	C8H17NO2Si	187,1029	70, 75, 103, 144, 172, 187	+	+
15.	1197,16 ^A 1302,00 ^B	1198,06	kwask malonowy*	2 TMS	C9H20O4Si2	248,0900	66, 73, 75, 77, 87, 93, 99, 109 , 117, 131, 133 , 143, 147 , 171, 189, 233, 248	+	-
16.	1200		dodekan	—	C12H26	170,2034	57, 71, 85, 99, 113 , 127, 141, 170	M _{RI}	

17.	1207,10 ^A 1207,99 ^B	1210,00	walina* (2)	2 TMS	C11H27NO2Si2	261,1580	73, 75, 100 , 128, 133, 144 , 147, 156 , 188, 202, 218 , 246	+	+
18.	b.d.	1226,43	N_1226	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 84, 86 , 100 , 102, 130 , 133, 147, 174 , 189	+	+
19.	1234,56 ^A 1238,25 ^B	1235,71	mocznik*	2 TMS	C7H20N2OSi2	204,1114	73, 75, 99 , 117, 130, 147, 171 , 189 , 204	+	+
20.	b.d.	1245,71	N_1246	b.d.	b.d.	b.d.	73, 77, 85, 120 , 134, 145, 157 , 170 , 176, 184 , 211	+	-
21.	1252,52 ^A 1251,94 ^B	1252,86	seryna* (1)	2 TMS	C9H23NO3Si2	249,1216	57, 69, 73, 75, 100, 103, 116 , 132 , 144, 147, 159 , 188, 219 , 234	+	+
22.	1259,94 ^A 1261,50 ^B	1262,14	etanoloamina	3 TMS	C11H31NOSi3	277,1713	59, 73, 86 , 100 , 114, 117, 130, 133, 147, 158, 174 , 188 , 262	+	+
23.	1261,98 ^A	1264,29	kwask fosforowy	3 TMS	C9H27O4PSi3	314,0955	59, 73, 75, 103, 115, 119, 133, 135, 147, 151, 163, 165, 167, 177, 179, 181, 189, 191, 193, 207, 211 , 225 , 227, 239, 241, 253, 255, 267, 269, 283 , 299 , 314	+	+
24.	1262,29 ^A 1267,20 ^B	1267,14	glicerol	3 TMS	C12H32O3Si3	308,1659	59, 73, 75, 89, 101, 103 , 117 , 129, 133, 147, 163, 175, 177, 189, 191, 205 , 218, 263, 293	+	+
25.	1264,43 ^A 1265,00 ^B	1267,14	leucyna*	2 TMS	C12H29NO2Si2	275,1737	59, 73, 75, 86, 100, 102 , 116, 128, 133, 142, 147, 158 , 170, 218 , 232 , 260	+	+
26.	1286,54 ^A 1286,70 ^B	1288,57	izoleucyna*	2 TMS	C12H29NO2Si2	275,1737	59, 73, 75, 86, 100 , 114, 128, 133, 142, 147, 158 , 170, 203, 218 , 232 , 260	+	+
27.	1295,77 ^A 1293,85 ^B	1295,71	prolina* (2)	2 TMS	C11H25NO2Si2	259,1424	59, 70, 73, 75, 100, 133, 142 , 147, 170, 172, 175, 216 , 230, 244 , 259	+	+
28.	1300,72 ^A 1297,54 ^B	1300,00	kwask maleinowy*	2 TMS	C10H20O4Si2	260,0900	73, 75, 83, 98, 115, 126, 133, 143, 147, 155, 157, 170 , 201, 215 , 242, 245 , 260	+	+
29.	1302,68 ^A 1302,30 ^B	1302,86	glicyna*	3 TMS	C11H29NO2Si3	291,1506	59, 73, 86 , 100 , 117, 130, 131, 133, 147, 158, 160, 174 , 188, 202, 204, 248 , 276 , 291	+	+
30.	1310,65 ^A 1307,81 ^B	1312,14	kwask bursztynowy*	2 TMS	C10H22O4Si2	262,1057	55, 73, 75, 86, 116, 129 , 133, 143, 147 , 172 , 190, 203, 218, 231, 247 , 262	+	+
31.	1319,94 ^A 1318,94 ^B	1324,29	kwask glicerynowy	3 TMS	C12H30O4Si3	322,1451	55, 59, 73, 75, 89, 103, 117, 133 , 147, 175, 177, 189 , 205 , 217, 221, 265, 279, 292 , 307 , 322	+	+
32.	b.d.	1328,57	N_1329	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 77, 86, 101, 130, 134 , 174 , 184 , 227 , 285 , 300	+	+
33.	1346,94 ^A 1344,89 ^B	1347,86	kwask fumarowy*	2 TMS	C10H20O4Si2	260,0900	73, 75, 83, 98, 113, 115 , 117, 127, 133, 143 , 147, 155, 157, 170, 171, 201, 217 , 245 , 260	+	+
34.	1352,85 ^A 1349,49 ^B	1355,00	seryna* (2)	3 TMS	C12H31NO3Si3	321,1612	59, 69, 73, 75, 84, 100 , 114, 116, 133, 147, 159, 163, 174, 188, 204 , 216, 218 , 278 , 306 , 321	+	+
35.	1356,55 ^A	1355,00	alanina* (2)	3 TMS	C12H31NO2Si3	305,1663	59, 73, 86, 100 , 114 , 133, 147, 158, 172, 188 , 202, 246, 262 , 290	+	+

36.	1365,15 ^A 1363,28 ^B	1362,14	kwas pipekolinowy	2 TMS	C12H27NO2Si2	273,1580	55, 59, 73, 84, 100, 103, 133, 147, 156 , 175, 230	+	+
37.	1372,65 ^A	1369,29	treono-1,4-lakton	2 TMS	C10H22O4Si2	262,1057	55, 59, 66, 73, 75, 83, 87, 89, 101 , 103, 116 , 129, 133, 147, 177, 189, 204, 217 , 219, 233, 247 , 262	+	-
38.	1377,23 ^A 1375,40 ^B	1378,57	treonina*	3 TMS	C13H33NO3Si3	335,1768	57, 59, 73, 75, 84, 86, 100, 101 , 117 , 128, 130, 132, 147, 158, 172, 174, 186, 191, 202, 203, 218 , 219 , 230, 248, 276, 291 , 320	+	+
39.	1400		tetradekan	—	C14H30	198,2347	57 , 71 , 85 , 99 , 113 , 127, 141, 155, 169, 198		M _{RI}
40.	b.d.	1415,75	N_1416	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 101, 103, 110 , 116, 129, 134 , 143, 147, 184 , 217 , 228 , 243, 256	+	+
41.	1424,05 ^A 1422,12 ^B	1423,62	β-alanina*	3 TMS	C12H31NO2Si3	305,1663	59, 73, 75, 86, 100 , 117, 130, 133, 142, 147, 160 , 174 , 188, 190, 200, 204, 216, 218, 232, 248 , 262, 274, 290 , 304	+	+
42.	b.d.	1452,76	N_1453	b.d.	b.d.	b.d.	73, 82, 86, 100, 114, 130 , 147, 154 , 174 , 201, 227, 243 , 281, 327	-	+
43.	b.d.	1466,14	N_1466	b.d.	b.d.	b.d.	70, 73, 100 , 114, 133, 147, 174, 232 , 306 , 334	+	+
44.	1468,99 ^A	1468,50	glutamina* (1)	[-H2O] 2 TMS	C11H24N2O2Si2	272,1376	59, 73, 75, 83, 100, 103, 133, 139 , 147, 155 , 218, 229 , 257	+	+
45.	1479,34 ^A 1478,00 ^B	1481,89	kwask jabłkowy*	3 TMS	C13H30O5Si3	350,1401	45, 55, 59, 73, 75, 93, 101 , 116, 117, 129, 131, 133, 143, 147, 171, 175 , 189 , 203, 217, 221, 233 , 245 , 265, 307 , 319, 335 , 350	+	+
46.	1499,39 ^A	1500,00	asparagina* (1)	[-H2O] 2 TMS	C10H22N2O2Si2	258,1220	59, 73, 75, 86, 100 , 115 , 128 , 131, 142, 147, 158, 201 , 215, 243	+	+
47.	b.d.	1507,87	N_1508	b.d.	b.d.	b.d.	73, 84, 89, 98, 116 , 128, 147, 156 , 188 , 200, 274	+	+
48.	1511,16 ^A 1508,22 ^B	1513,39	kwask asparaginowy* (1)	3 TMS	C13H31NO4Si3	349,1561	59, 73, 75, 100, 117, 130, 133, 142, 147, 160, 163, 172, 174, 188, 202 , 204, 216, 218 , 232 , 244, 262, 292, 306 , 334 , 349	+	+
49.	1521,73 ^A 1519,70 ^B	1518,11	kwask piroglutaminowy*	2 TMS	C11H23NO3Si2	273,1216	58, 59, 66, 73, 75, 84, 100, 103, 107, 112, 117, 121, 133, 140 , 147, 156 , 174, 186, 214, 230 , 258 , 273	+	+
50.	1527,46 ^A 1526,60 ^B	1525,98	kwask γ-aminomasłowy*	3 TMS	C13H33NO2Si3	319,1819	59, 73, 75, 86, 100 , 102, 114, 116, 117, 130, 131, 133, 147, 156, 158, 174 , 216 , 230, 246 , 304	+	+
51.	1528,59 ^A	1531,50	kwask erytronowy	4 TMS	C16H40O5Si4	424,1953	55, 59, 73, 75, 89, 103, 117 , 130, 133, 143, 147, 157, 177, 189, 205 , 217, 220 , 245, 277, 292 , 319 , 379, 409	+	+
52.	1545,94 ^A	1547,24	kwask treonowy	4 TMS	C16H40O5Si4	424,1953	55, 59, 73, 75, 83, 103, 117 , 130, 133, 143, 147, 177, 189, 205 , 217, 220 , 245, 277, 292 , 319 , 379, 409	+	+
53.	1572,85 ^A	1568,50	kwask α-ketoglutarowy*	1 MeOX 2 TMS	C12H25NO5Si2	319,1271	55, 59, 73, 75, 89, 100, 112, 126, 129, 133, 147, 156,	+	+

	1567,76 ^B						170, 186, 198, 202, 229, 244, 288, 304, 319		
54.	b.d.	1570,87	N_1571	b.d.	b.d.	b.d.	73, 103, 117, 131, 133, 147, 157, 189, 191, 205, 218, 231, 234, 259, 277, 291, 306, 321, 333, 393, 423	+	-
55.	1582,78 ^A	1576,38	prolina* (3)	[+CO2] 2 TMS	C13H25NO6Si2	347,1220	59, 73, 75, 99, 117, 126, 133, 142, 147, 170, 186, 216, 244, 288, 303	+	+
56.	1590,07 ^A	1581,10	glutamina* (2)	[-H2O] 3 TMS	C14H32N2O2Si3	344,1771	59, 73, 75, 83, 112, 126, 133, 139, 147, 155, 171, 185, 202, 211, 227, 257, 272, 285, 301, 316, 329, 344	+	+
57.	1594,18 ^A	1592,00	asparagina* (2)	4 TMS	C16H40N2O3Si4	420,2116	59, 61, 73, 75, 100, 115, 130, 133, 142, 147, 163, 169, 172, 188, 190, 202, 204, 206, 216, 231, 243, 257, 262, 278, 287, 290, 305, 315, 331, 347, 405, 420	+	+
58.	1600		heksadekan	—	C16H34	226,2660	57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 226		M _{RI}
59.	1614,59 ^A 1609,03 ^B	1608,97	kwask glutaminowy* (1)	3 TMS	C14H33NO4Si3	363,1717	56, 59, 61, 73, 75, 84, 100, 114, 117, 128, 133, 140, 147, 156, 158, 174, 186, 204, 218, 221, 230, 246, 258, 274, 276, 320, 348, 363	+	+
60.	1621,76 ^A	1614,35	asparagina* (3)	4 TMS	C16H40N2O3Si4	420,2116	59, 73, 75, 84, 100, 114, 116, 133, 141, 147, 163, 172, 188, 202, 204, 216, 231, 281, 290, 303, 315, 330, 333, 405, 420	+	+
61.	1629,63 ^A 1625,10 ^B	1620,63	fenyloalanina*	2 TMS	C15H27NO2Si2	309,1580	73, 75, 91, 100, 120, 133, 147, 160, 192, 204, 218, 266, 294	+	+
62.	1636,76 ^A 1630,25 ^B	1632,29	ksyloza* (1)	1 MeOX 4 TMS	C18H45NO5Si4	467,2375	59, 73, 75, 89, 103, 114, 117, 129, 133, 147, 160, 189, 191, 204, 205, 217, 233, 234, 262, 277, 288, 291, 307	+	+
63.	-	1638,56	N_1639	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 86, 100, 130, 146, 160, 172, 174, 186, 201, 259	+	+
64.	1645,84 ^A 1637,22 ^B	1641,26	ksyloza* (2)	1 MeOX 4 TMS	C18H45NO5Si4	467,2375	59, 73, 75, 89, 103, 114, 117, 129, 133, 147, 160, 189, 191, 204, 205, 217, 233, 234, 262, 277, 288, 291, 307	+	+
65.	1650,62 ^A 1646,10 ^B	1647,53	arabinoza*	1 MeOX 4 TMS	C18H45NO5Si4	467,2375	59, 73, 75, 89, 103, 114, 117, 129, 131, 143, 147, 160, 172, 174, 189, 204, 205, 217, 231, 233, 262, 277, 291, 307	+	+
66.	1666,44 ^A 1661,08 ^B	1659,19	asparagina* (4)	3 TMS	C13H32N2O3Si3	348,1721	59, 73, 75, 100, 116, 132, 141, 147, 154, 159, 172, 188, 202, 218, 231, 243, 258, 316, 333, 348	+	+
67.	1665,99 ^A 1659,20 ^B	1662,78	ryboza*	1 MeOX 4 TMS	C18H45NO5Si4	467,2375	59, 73, 75, 89, 103, 117, 129, 131, 133, 143, 147, 160, 189, 201, 204, 205, 217, 233, 262, 277, 307	+	+
68.	b.d.	1689,69	N_1690	b.d.	b.d.	b.d.	73, 86, 89, 91, 105, 116, 135, 149, 163, 165, 180, 192, 206, 208, 275, 280	-	+
69.	1694,65 ^A 1684,88 ^B	1692,38	ksylitol*	5 TMS	C20H52O5Si5	512,2661	59, 73, 75, 89, 101, 103, 117, 129, 131, 133, 143, 147, 157, 175, 189, 191, 204, 205, 217, 229, 243, 277, 291, 307, 319, 332, 395, 407, 422	+	-

70.	1712,74 ^A 1710,90 ^B	1710,31	rybitol*	5 TMS	C20H52O5Si5	512,2661	59, 73, 89, 101, 103, 117, 129, 133, 147, 157, 175, 177, 189, 205, 217 , 229, 243, 277, 291, 307, 319, 332 , 395, 422	standard wewnętrzny	
71.	1720,58 ^A	1722,87	glutamina* (3)	4 TMS	C17H42N2O3Si4	434,2272	59, 73, 75, 83, 100, 103, 128, 131, 139, 147, 155, 156 , 173, 188, 203 , 216, 227, 317 , 329, 344 , 419, 434	+	+
72.	b.d.	1728,25	N_1728	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 89, 103, 117 , 129, 133, 143, 147, 157, 189, 191, 205, 217 , 221, 229, 232, 245, 257, 305, 319, 333, 394 , 422, 511	+	-
73.	1736,70 ^A 1734,06 ^B	1730,94	putrescyna*	4 TMS	C16H44N2Si4	376,2581	73, 86, 100, 130, 142, 146, 158, 174 , 187, 200, 214 , 361, 376	+	+
74.	b.d.	1739,91	N_1740	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 133, 147, 157, 171, 184, 189, 191, 205, 211, 217, 229 , 245, 277, 285, 292, 307 , 319, 333 , 346, 375, 393 , 421	+	+
75.	1751,51 ^A	1748,87	kwasy rybonowy	5 TMS	C20H50O6Si5	526,2454	73, 75, 89, 101, 103, 117, 131, 133, 147, 157, 189, 205, 217 , 256, 277, 292, 307, 333 , 357, 421	+	+
76.	1750,51 ^A 1740,00 ^B	1748,88	3-fosfoglicerol	4 TMS	C15H41O6PSi4	460,1718	59, 73, 75, 89, 101, 103, 131, 133, 147, 211, 256, 299 , 315 , 328, 341, 357, 370, 387, 445	+	+
77.	b.d.	1755,16	N_1755	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 133, 143, 147, 191 , 203, 217, 232 , 243, 245, 257 , 271, 288, 305 , 318, 331, 345, 435, 450	+	+
78.	b.d.	1761,43	N_1761	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 143, 147, 159, 169, 189, 199, 217 , 230, 257, 289, 379	+	+
79.	1766,72 ^A 1765,26 ^B	1767,71	glutamina* (4)	3 TMS	C14H34N2O3Si3	362,1877	56, 73, 75, 83, 100, 114, 116, 128, 131, 139, 147, 155, 156 , 173, 188, 203 , 229, 245, 273 , 301, 347, 362	+	+
80.	1774,08 ^A 1772,66 ^B	1773,09	fosforan etanoloaminy	4 TMS	C14H40NO4PSi4	429,1772	59, 73, 75, 100, 114, 130, 133, 147, 172, 174 , 188, 207, 211, 225, 283, 299, 315, 328, 414	-	+
81.	b.d.	1776,68	N_1777	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 81, 89, 103, 117, 129, 143, 147, 163, 169, 177, 184, 189, 217 , 229, 244, 257 , 305, 317, 333 , 348, 361, 436, 466	+	+
82.	b.d.	1788,34	N_1788	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 147, 191 , 207, 217 , 230, 245, 257 , 272, 303 , 317, 319, 347, 361, 437	+	+
83.	1794,63 ^A 1791,52 ^B	1797,31	kwasy szikimowy	4 TMS	C19H42O5Si4	462,2109	73, 103, 133, 147, 167, 189, 193, 204 , 221, 239, 243, 254, 255 , 267, 282, 312, 331, 357, 372 , 447, 462	+	-
84.	b.d.	1797,31	N_1797	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 147, 191 , 204, 207, 217 , 230, 245, 257 , 272, 303 , 319, 347, 361, 437	+	+
85.	1800		oktadekan	—	C18H38	254,2973	57, 71, 85, 99, 113, 127, 141 , 155, 169, 183, 197, 211, 225, 254	M _{RI}	

86.	1803,92 ^A 1803,29 ^B	1806,86	kwasy cytrynowy*	4 TMS	C18H40O7Si4	480,1851	67, 73, 75, 117, 129, 131, 133, 143, 147, 157, 183, 211, 217, 221, 229, 231, 257, 273 , 285, 305, 319, 333, 347, 363, 375 , 421, 437, 465	+	+
87.	1838,71 ^A	1839,22	dimer kwasu dehydroaskorbinowego	2 MeOX	C14H18N2O12	406,0860	55, 59, 73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 147, 157, 173 , 189, 204, 217, 231, 245, 316	+	+
88.	1842,69 ^A 1839,88 ^B	1846,08	kwasy chinowy*	5 TMS	C22H52O6Si5	552,2610	73, 75, 115, 117, 129, 133, 147, 191, 204, 217, 239, 255 , 283, 334, 345 , 357, 372, 419, 435 , 447, 462, 537	+	+
89.	1853,93 ^A 1855,50 ^A	1855,88	fruktoza* (1)	1 MeOX 5 TMS	C22H55NO6Si5	569,2876	59, 73, 75, 84, 89, 103, 114, 117, 129, 133, 147, 172, 189, 191, 204, 205, 217 , 231, 277 , 291, 307 , 335, 364 , 554, 569	+	+
90.	1863,13 ^A 1864,30 ^A	1865,69	fruktoza* (2)	1 MeOX 5 TMS	C22H55NO6Si5	569,2876	59, 73, 75, 84, 89, 103, 114, 117, 129, 133, 147, 172, 189, 191, 204, 205, 217 , 231, 277 , 291, 307 , 335, 364 , 554, 569	+	+
91.	1876,44 ^A 1875,30 ^B	1875,49	alantoina (1)	4 TMS	C16H38N4O3Si4	446,2021	73, 75, 100, 116, 130, 147, 171, 188, 201, 243 , 316, 331 , 357, 431, 446	+	+
92.	1880,50 ^A 1881,60 ^B	1881,37	glukoza* (1)	1 MeOX 5 TMS	C22H55NO6Si5	569,2876	59, 73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 147, 157, 160 , 189, 191, 201, 205 , 217, 229 , 262, 274, 277, 291, 305, 319 , 364, 376	+	+
93.	1899,05 ^A 1902,60 ^B	1895,10	glukoza* (2)	1 MeOX 5 TMS	C22H55NO6Si5	569,2876	59, 73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 147, 157, 160 , 189, 191, 201, 205 , 217, 229 , 262, 274, 277, 291, 305, 319 , 364, 376	+	+
94.	1913,02 ^A 1913,44 ^B	1910,78	tyramina*	3 TMS	C17H35NOSi3	353,2026	59, 73, 86 , 100, 117, 130, 174 , 179, 207, 250, 264, 338	+	+
95.	1913,61 ^A 1913,70 ^B	1914,71	lizyna*	4 TMS	C18H46N2O2Si4	434,2636	59, 73, 86, 100, 128, 147, 156, 174 , 186, 200, 214, 218, 228, 230, 258, 317 , 329, 362, 391, 419, 434	+	+
96.	1919,74 ^A 1915,85 ^B	1920,59	sorbitol*	6 TMS	C24H62O6Si6	614,3162	73, 75, 89, 103, 117, 129, 131, 133, 143, 147, 157, 175, 189, 191, 205, 217 , 229, 231, 277, 291, 305, 307, 319 , 331, 345, 421	+	+
97.	1934,12 ^A 1932,30 ^B	1930,39	tyrozyna*	3 TMS	C18H35NO3Si3	397,1925	73, 75, 100, 133, 147, 163, 179 , 192, 203, 218 , 265, 280 , 292, 310, 354, 382	-	+
98.	1937,86 ^A 1935,74 ^B	1934,31	kwasy askorbinowy*	4 TMS	C18H40O6Si4	464,1902	59, 73, 75, 89, 103, 117 , 133, 147, 157, 169, 205, 221, 244, 304, 332 , 345, 359, 374 , 405, 419, 449 , 462	+	-
99.	1947,53 ^A 1945,16 ^B	1937,25	kwasy p-kumarowy*	2 TMS	C15H24O3Si2	308,1264	73, 75, 89, 102, 115, 131, 147, 179 , 191, 203, 219 , 233, 249, 293, 308	-	+
100.	1946,72 ^A	1942,57	asparagina* (5)	[+CO2] (4 TMS)	C17H40N2O5Si4	464,2014	59, 70, 73, 75, 100, 114, 133, 147, 154, 163, 172, 188 , 203, 216, 232 , 244, 257, 287, 331, 334, 347, 359 , 374,	-	+

							449, 464		
101.	b.d.	1944,11	N_1944	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 89, 100, 103, 117, 129, 133, 143, 147, 157, 175, 189, 204, 217 , 229, 231, 243, 247, 271, 299, 319, 332, 361	+	+
102.	b.d.	1963,55	N_1964	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 143, 147, 157, 169, 189, 191, 204, 217 , 231, 243, 291, 305, 317, 319, 345 , 361, 435	+	+
103.	b.d.	1967,49	N_1967	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 143, 147, 189, 205, 217, 245, 277, 307, 333 , 359, 394 , 433	+	+
104.	b.d.	1986,27	N_1986	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 133, 143, 147, 157, 189, 205, 217, 229, 277, 292, 305, 319, 333 , 423, 435	-	+
105.	2000	eikozan	—	C20H42	282,3286		57, 71, 85, 99, 113, 127, 141 , 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 282		M _{RI}
106.	b.d.	2010,75	N_2011	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 84, 89, 103 , 117, 129, 133, 143, 147, 157 , 175, 189, 191, 204 , 217, 220, 231, 243, 305, 319	+	+
107.	2045,44 ^A 2038,40 ^B	2043,01	kwasy palmitynowy*	1 TMS	C19H40O2Si	328,2797	55, 57, 73, 75, 83, 95, 98, 117 , 129, 132, 145 , 159, 171, 185, 187, 201 , 227, 229, 243, 257, 269, 285, 313, 328	+	+
108.	2068,66 ^A	2062,30	alantoina (2)	3 TMS	C13H30N4O3Si3	374,1626	73, 75, 79, 86, 100, 117, 129, 132, 147, 189, 243, 259 , 359, 374	-	+
109.	2080,20 ^A 2075,91 ^B	2078,49	mio-inozytol*	6 TMS	C24H60O6Si6	612,3005	73, 75, 103, 129, 133, 147, 191 , 204, 217, 221, 230, 243, 265 , 291, 305, 318 , 343, 367, 393, 432, 507	+	+
110.	2097,85 ^A 2096,50 ^B	2089,25	kwasy trans-ferulowy*	2 TMS	C16H26O4Si2	338,1370	59, 73, 75, 89, 117, 145, 147, 154, 160, 175, 179, 191, 203, 209, 233, 249, 279, 293, 308, 323, 338	+	-
111.	b.d.	2092,47	N_2092	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 84, 89, 103, 114, 117, 129, 133, 147, 157 , 173, 189, 191, 205 , 217, 229, 262 , 277, 291, 305, 319, 376	+	+
112.	b.d.	2095,08	N_2095	b.d.	b.d.	b.d.	55, 59, 67, 81, 95 , 109, 123, 135, 150, 164, 178, 262 , 294	-	+
113.	b.d.	2096,77	N_2097	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 89, 257, 285, 301, 331, 345 , 358, 373 , 417, 460, 476, 491	+	-
114.	b.d.	2121,51	N_2122	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 147, 157 , 172, 189, 191, 201, 205 , 217, 229, 277, 291, 305, 307, 319	+	-
115.	2150,05 ^A	2145,36	histydyna*	4 TMS	C18H41N3O2Si4	443,2276	73, 75, 84, 100, 147, 154 , 172, 191, 226 , 238, 246, 254, 290 , 310, 326 , 356, 400, 428	-	+
116.	b.d.	2161,29	N_2161	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 147, 189, 191, 200, 204, 217 , 231, 243, 259, 273, 286, 291, 305, 319, 333, 345, 361, 444	+	-
117.	b.d.	2175,27	N_2175	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 101, 103, 116, 129, 131, 147, 227, 243, 257,	+	+

							285, 299, 315, 341, 357, 373, 387, 445, 461, 503, 516		
118.	2200	dokozan	—	C22H46	310,3599		57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 310	M _{RI}	
119.	2209,91 ^A 2209,60 ^B	2208,19	kwasy linolowe*	1 TMS	C21H40O2Si	352,2797	55, 67, 73, 75, 81, 95, 109, 117, 121, 129, 135, 145, 150, 164, 178, 220, 234, 262, 337, 352	+	+
120.	2217,55 ^A 2216,30 ^B	2211,49	tryptofan*	3 TMS	C20H36N2O2Si3	420,2084	73, 75, 100, 130, 147, 172, 190, 200, 202, 218, 230, 291, 303, 377, 405	+	+
121.	2217,41 ^A 2215,60 ^B	2216,09	kwasy α-linolenowe*	1 TMS	C21H38O2Si	350,2641	55, 67, 73, 75, 79, 95, 108, 117, 121, 129, 135, 145, 149, 163, 173, 294, 335, 350	+	+
122.	b.d.	2216,37	N_2216	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 147, 154, 189, 191, 200, 204, 217, 231, 233, 243, 286, 291, 305, 319, 333, 361, 388, 402, 444, 467	+	-
123.	2243,49 ^A 2242,25 ^B	2239,77	kwasy stearynowe*	1 TMS	C21H44O2Si	356,3110	55, 57, 73, 75, 81, 83, 95, 98, 117, 129, 132, 145, 159, 171, 185, 187, 201, 227, 241, 243, 257, 271, 297, 313, 327, 341, 356	+	+
124.	b.d.	2264,71	N_2265	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 89, 103, 117, 133, 147, 189, 191, 205, 217, 246, 290, 305, 307, 319, 346, 358, 392, 404	+	+
125.	2292,48 ^A 2294,41 ^B	2290,06	fruktozo-6-fosforan*	1 MeOX 6 TMS	C25H64NO9PSi6	721,2934	59, 73, 75, 84, 89, 101, 103, 114, 129, 133, 147, 191, 204, 211, 217, 225, 299, 315, 341, 357, 387, 403, 459	+	+
126.	b.d.	2300,00	N_2300	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 101, 103, 117, 129, 147, 189, 191, 204, 217, 243, 305, 337, 361	+	-
127.	2307,34 ^A 2300,20 ^B	2301,75	glukoza-6-fosforan*	1 MeOX 6 TMS	C25H64NO9PSi6	721,2934	59, 73, 75, 89, 101, 103, 116, 129, 133, 147, 157, 160, 189, 191, 204, 211, 217, 230, 247, 299, 315, 331, 341, 357, 387, 471	+	+
128.	b.d.	2345,03	N_2345	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 84, 89, 103, 114, 117, 129, 133, 147, 189, 191, 205, 217, 259, 262, 277, 291, 305, 307, 319, 331, 376, 421	+	+
129.	b.d.	2356,73	N_2357	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 101, 103, 117, 129, 133, 143, 147, 169, 189, 191, 204, 217, 233, 245, 257, 275, 292, 305, 333, 337, 363, 375, 451	+	+
130.	2400	tetrakozan	—	C24H50	338,3912		57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 338	M _{RI}	
131.	b.d.	2400,00	N_2400	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 129, 133, 147, 191, 204, 211, 217, 243, 246, 299, 305, 315, 318, 343, 387, 470	+	+
132.	b.d.	2455,13	N_2455	b.d.	b.d.	b.d.	73, 86, 100, 117, 130, 174, 202, 260, 290, 449	-	+
133.	b.d.	2476,92	N_2477	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 101, 103, 116, 117, 129, 133, 143, 147, 189, 191, 204, 217, 231, 243, 271, 305, 321, 361	+	-

134.	b.d.	2519,23	N_2519	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 101, 103, 117, 129, 131, 143, 147, 189, 191, 204, 219, 231, 245, 319, 335, 361	+	-
135.		2600	heksakozan	—	C26H54	366,4225	57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 323, 337, 366	M _{RI}	
136.	2623,04 ^A 2614,80 ^B	2613,25	sacharoza*	8 TMS	C36H86O11Si8	918,4324	73, 75, 103, 117, 129, 147, 157, 169, 191, 204, 217, 243, 257, 271, 319, 331, 361, 437, 451	+	+
137.	b.d.	2668,49	N_2668	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 147, 173, 189, 191, 204, 205, 217, 230, 257, 277, 307, 361, 437, 480	+	+
138.	b.d.	2682,19	N_2682	b.d.	b.d.	b.d.	59, 73, 75, 89, 103, 117, 129, 133, 147, 173, 189, 191, 204, 205, 217, 230, 257, 277, 307, 361, 437, 480	+	+
139.	2726,30 ^A 2727,10 ^B	2727,40	trehaloza*	8 TMS	C36H86O11Si8	918,4324	73, 75, 103, 117, 129, 147, 169, 191, 204, 217, 243, 271, 305, 319, 331, 361	-	+
140.	b.d.	2794,70	N_2795	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 131, 147, 160, 189, 191, 204, 217, 231, 243, 271, 305, 319, 333, 361, 480	+	-
141.		2800	oktakozan	—	C28H58	394,4538	57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 323, 337, 351, 365, 394	M _{RI}	
142.	2837,47 ^A 2839,40 ^B	2838,46	melibioza*	1 MeOX 8 TMS	C37H89NO11Si8	947,4590	59, 73, 75, 89, 103, 117, 129, 147, 160, 169, 189, 191, 204, 217, 243, 271, 305, 319, 331, 361, 451, 480	+	-
143.	b.d.	2948,72	N_2949	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 91, 147, 167, 191, 236, 239, 249, 255, 345, 447	+	-
144.	b.d.	2968,21	N_2968	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 147, 169, 191, 204, 217, 230, 243, 271, 291, 305, 319, 361, 433	+	+
145.	b.d.	2986,75	N_2987	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 147, 191, 204, 217, 230, 293, 305, 361, 416, 433	+	+
146.		3000	triakontan	—	C30H62	422,4851	57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 323, 337, 351, 365, 379, 393, 422	M _{RI}	
147.	b.d.	3093,72	N_3094	b.d.	b.d.	b.d.	73, 75, 103, 117, 129, 147, 169, 191, 204, 217, 243, 271, 289, 305, 319, 337, 361, 597	+	+
148.	3177,08 ^A	3171,01	kwasklorogenowy	6 TMS	C34H66O9Si6	786,3322	73, 75, 103, 147, 167, 183, 191, 204, 219, 239, 249, 255, 323, 345, 357, 419, 447	+	-
149.		3200	dotriakontan	—	C32H66	450,5164	57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 323, 337, 351, 365, 379, 393, 407, 421, 450	M _{RI}	
150.	3298,18 ^A	3237,36	kampesterol*	1 TMS	C31H56OSi	472,4100	73, 75, 81, 95, 105, 121, 129, 145, 159, 213, 255, 261, 343, 367, 382, 457, 472	+	+

151.	3319,29 ^A	3256,59	stigmasterol*	1 TMS	C32H56OSi	484,4100	55, 69, 73, 75, 83, 91, 95, 105, 119, 129, 133, 145, 159, 173, 199, 213, 227, 239, 255 , 271, 282, 295, 309, 343, 351, 355, 372, 379, 394, 469, 484	+	+	
152.	3385,83 ^A	3302,75	β-sitosterol*	1 TMS	C32H58OSi	486,4257	57, 73, 75, 81, 95, 105, 121, 129, 145, 159, 173, 213, 255, 275, 303, 329, 357, 381, 396, 471, 486	+	+	
153.	3350,64 ^A 3350,88 ^B	3329,12	rafinoza*	11 TMS	C51H120O16Si11	1296,6038	73, 75, 103, 117, 129, 147, 157, 169, 189, 191, 204, 217 , 230, 243, 271, 305, 319, 331, 361, 437, 451	+	-	
154.	3361,28 ^A 3354,34 ^B	3333,52	1-kestoza*	11 TMS	C51H120O16Si11	1296,6038	73, 75, 103, 117, 129, 147, 157, 169, 189, 191, 204, 217 , 230, 243, 271, 305, 319, 331, 361, 437, 451	+	+	
155.	3600		heksatriakontan	—	C36H74	506,5790	57, 71, 85, 99, 113, 127, 141 , 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 323, 337, 351, 365, 379, 393, 407, 421, 435, 449		M _{RI}	
								Liczba pochodnych (141)	129	119

Tab. 4.2. Związki wykryte przy użyciu pakietu TargetSearch („-” – nie wykryto, „+” – wykryto, * – pełna identyfikacja potwierdzona związkiem referencyjnym).

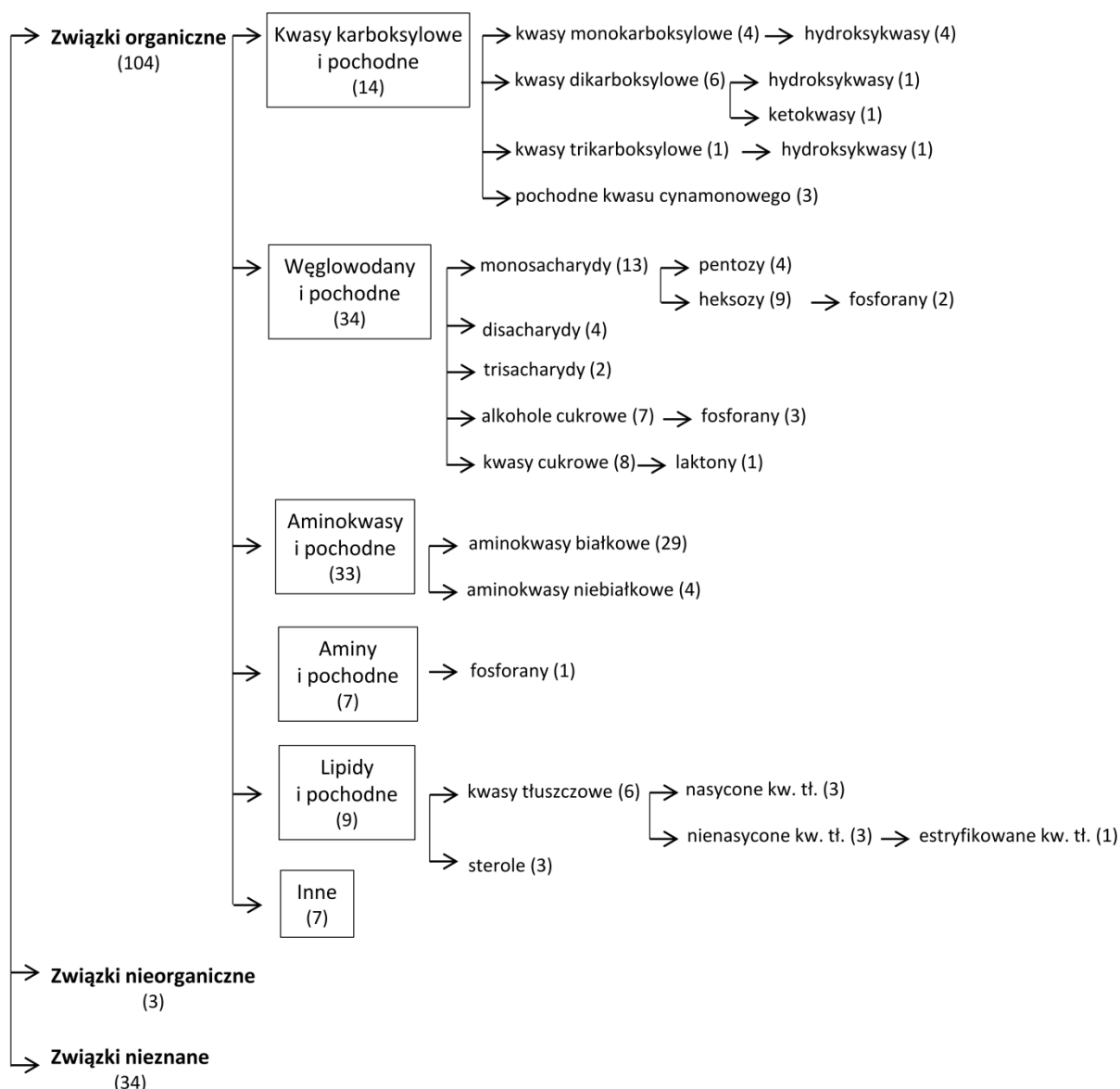
nr	Identyfikator GMD	Nazwa pochodnej	Obecność	
			liść	korzeń
1	A105001	kwask mlekowy* (2 TMS)	+	+
2	A105003	2-hydroksypirydyna (1TMS)	+	+
3	A110001	alanina* (1) (2TMS)	+	+
4	A110002	hydroksyloamina (3TMS)	+	+
5	A114002	kwask węglowy (1MEOX) (2TMS)	+	+
6	A115001	izopentyloamina (2 TMS)	+	+
7	A117006	prolina* (1) (1TMS)	+	+
8	A119001	fosforan metylu (2 TMS)	+	+
9	A122001	walina* (2) (2 TMS)	+	+
10	A122003	kwask malonowy* (2TMS)	+	-
11	A127002	mocznik* (2 TMS)	+	+
12	A128001	seryna* (1) (2 TMS)	+	+
13	A128002	etanoloamina (3 TMS)	+	+
14	A129001	kwask fosforowy (3 TMS)	+	+
15	A129002	leucyna* (2 TMS)	+	+
16	A129003	glicerol (3 TMS)	+	+
17	A132002	izoleucyna* (2 TMS)	+	+
18	A132003	prolina* (2) (2 TMS)	+	+
19	A133001	glicyna* (3 TMS)	+	+
20	A133003	kwask maleinowy* (2 TMS)	+	+
21	A133011	lumichrom (2 MeOX)	+	+
22	A134001	kwask bursztynowy* (2 TMS)	+	+
23	A135003	kwask glicerynowy (3 TMS)	+	+
24	A136002	zw. podobny do lumichromu (2 MeOX)	+	+
25	A137001	kwask fumarowy* (2 TMS)	+	+
26	A137004	kwask pipekolinowy (2 TMS)	+	+
27	A138001	seryna* (2) (3 TMS)	+	+
28	A138002	alanina* (2) (3 TMS)	+	+
29	A140001	treonina* (3 TMS)	+	+
30	A140005	treono-1,4-lakton (2 TMS)	+	-
31	A144001	β-alanina* (3 TMS)	+	+
32	A144004	A144004	+	+
33	A145015	A145015	-	+
34	A148002	glutamina* (1) [-H2O](2 TMS)	+	+
35	A148003	A148003	+	+
36	A149001	kwask jabłkowy* (3 TMS)	+	+
37	A151002	asparagina* (1) [-H2O] (2 TMS)	+	+
38	A152002	kwask asparaginowy* (1) (3 TMS)	+	+
39	A153002	kwask piroglutaminowy* (2 TMS)	+	+
40	A153003	kwask γ-aminomasłowy* (3 TMS)	+	+
41	A154001	kwask erytronowy (4 TMS)	+	+
42	A156001	kwask treonowy (4 TMS)	+	+
43	A158004	kwask α-ketoglutazarowy* (1 MeOX 2 TMS)	+	+
44	A159001	prolina* (3) [+CO2] (2 TMS)	+	+

45	A159003	A159003	+	-
46	A160005	glutamina* (2) [-H ₂ O] (3 TMS)	+	+
47	A163001	kwask glutaminowy* (1) (3 TMS)	+	+
48	A164001	fenyloalanina* (2 TMS)	+	+
49	A164007	asparagina* (3) (4 TMS)	+	+
50	A164010/A164015	1,3-diaminopropan (4 TMS) / 1,2-diaminopropan (4 TMS)	-	+
51	A165001	ksyloza* (2) (1 MeOX 4 TMS)	+	-
52	A168001	asparagina* (4) (3 TMS)	+	+
53	A168002	ryboza* (1 MeOX 4 TMS)	+	+
54	A174008	glutamina* (3) (4 TMS)	+	+
55	A175002	putrescyna* (4 TMS)	+	+
56	A177001	kwask rybonowy (5 TMS)	+	+
57	A177002	3-fosfoglicerol (4 TMS)	+	+
58	A177004	glukopiranoza [-H ₂ O] (4TMS)	+	+
59	A177014	fosforan etanoloaminy (4 TMS)	-	+
60	A178001	glutamina* (4) (3 TMS)	+	+
61	A178003	A178003	+	+
62	A179010	A179010	+	+
63	A180002	zw. podobny do pochodnej fruktozy	+	+
64	A181002	kwask szikimowy (4 TMS)	+	-
65	A181004	zw. podobny do pochodnej fruktozy	+	+
66	A182004	kwask cytrynowy* (4 TMS)	+	+
67	A185001	kwask chinowy* (5 TMS)	+	+
68	A185002	dimer kwasu dehydroaskorbinowego (2 MeOX)	+	+
69	A187002	fruktoza* (1) (1 MeOX 5 TMS)	+	+
70	A189002	glukoza* (1) (1 MeOX 5 TMS)	+	+
71	A189007	alantoina (1) (4 TMS)	+	+
72	A191004	tyramina* (3 TMS)	+	+
73	A192003	lizyna* (4 TMS)	+	+
74	A194002	tyrozyna* (3 TMS)	-	+
75	A195001	kwask p-kumarowy* (2 TMS)	-	+
76	A195002	kwask askorbinowy* (4 TMS)	+	-
77	A196010	asparagina* (5) [+CO ₂] (4 TMS)	-	+
78	A197003/A198006	zw. podobny do glukopiranozy (5 TMS) / glukopiranoza (5 TMS)	+	+
79	A197007	A197007	+	+
80	A199003	A199003	-	+
81	A203003	A203003	+	+
82	A205001	kwask palmitynowy* (1 TMS)	+	+
83	A209001	alantoina (2) (3 TMS)	-	+
84	A209002	mio-inozytol* (6 TMS)	+	+
85	A210001	kwask trans-ferulowy* (2 TMS)	+	-
86	A210010	ester metylowy kwasu linolowego	-	+
87	A211001	A211001	+	+
88	A215003	histydyna* (4 TMS)	-	+
89	A217007	A217007	+	-
90	A218002	glicerolo-fosfoglicerol (5 TMS)	+	+
91	A221003	kwask linolowy* (1 TMS)	+	+
92	A222003	kwask α-linolenowy* (1 TMS)	+	+
93	A223001	tryptofan* (3 TMS)	+	+

94	A225002	kwasy stearynowy* (1 TMS)	+	+
95	A228001	A228001	+	+
96	A231002	zw. podobny do glicerolo-aldo-piranozydu (6 TMS)	+	-
97	A232002	fruktozo-6-fosforan* (1 MeOX 6 TMS)	+	+
98	A233002	glukoza-6-fosforan* (1 MeOX 6 TMS)	+	+
99	A236005	A236005	+	+
100	A237001	A237001	+	+
101	A243003	mio-inozytolo-2-fosforan (7 TMS)	+	+
102	A248001	5-hydroksytryptamina (4 TMS)	-	+
103	A250001	A250001	+	-
104	A254002	A254002	+	-
105	A264001	sacharoza* (8 TMS)	+	+
106	A270003	A270003	-	+
107	A274002	trehaloza* (8 TMS)	-	+
108	A281001	A281001	+	-
109	A296003	A296003	+	-
110	A299002	galaktinol (9 TMS)	+	+
111	A300001	A300001	+	+
112	A311002	A311002	+	+
113	A319001	kwasy chlorogenowy (6 TMS)	+	-
114	A338002	β -sitosterol* (1 TMS)	+	+
Liczba pochodnych (114)			101	100

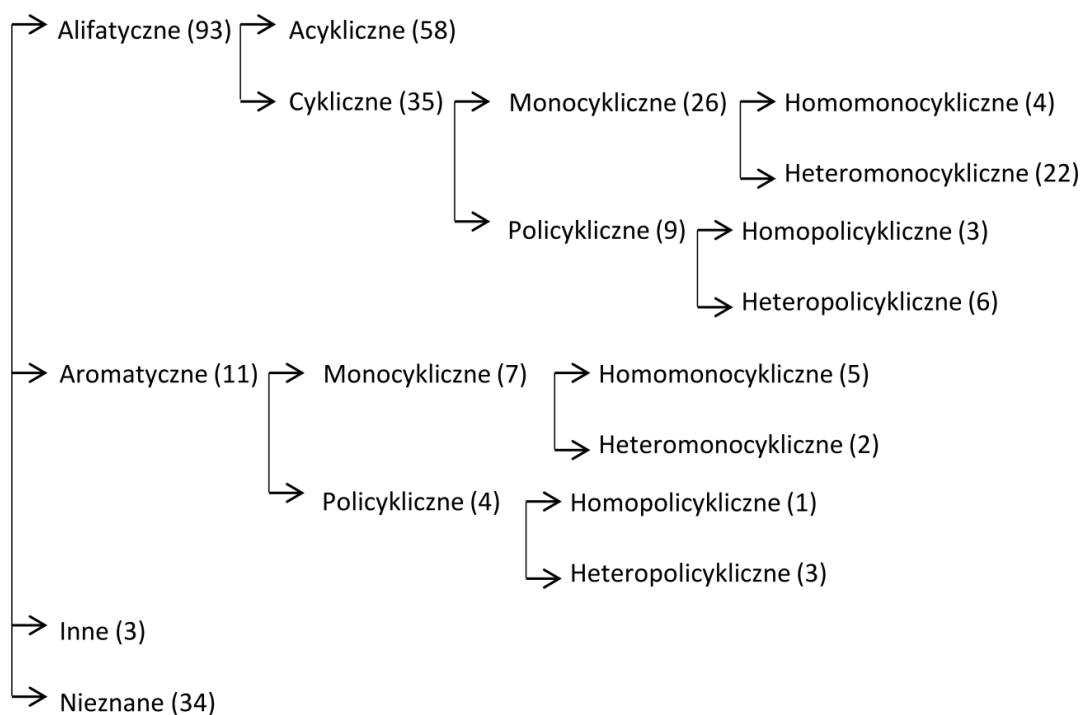
aminowych, karboksylowych). Metabolity zawierające w swojej budowie grupę karbonylową (m.in. kwas α -ketoglutarynowy, fruktoza, glukoza) zostały dodatkowo w pierwszym etapie derywatywacji przekształcone w oksymy (opisane jako MeOX). Ze względu na występowanie oksymów w formie izomerów przestrzennych *syn* i *anti* na otrzymanych chromatogramach zaobserwowano, w przypadku fruktozy i glukozy, po dwa piki pochodzące od jednego związku. W przypadku pozostałych pochodnych przeprowadzonych w oksymy nie zaobserwowano dodatkowych pików, prawdopodobnie ze względu na ich niską intensywność.

Na podstawie przeprowadzonej analizy jakościowej został stworzony podział metabolitów obecnych w próbkach ekstraktów liści i korzeni jęczmienia ze względu na przynależność do odpowiednich klas związków (ryc. 4.1) oraz podział ze względu na ich strukturę (ryc. 4.2) (przypisanie związków do klas: załącznik Tab. CD.1 na płycie kompaktowej). Dla 34 wykrytych związków nie udało się przypisać nazwy, w związku z czym nie zostały one także zaklasyfikowane pod względem budowy chemicznej. Pozostałe – zidentyfikowane metabolity – miały w większości przypadków charakter alifatyczny (93 pochodne), z czego ponad połowę stanowiły pochodne o otwartym łańcuchu (ryc. 4.2). Odnotowano także obecność 11 związków aromatycznych będących pochodnymi



Ryc. 4.1. Uproszczony podział związków wykrytych w próbkach ekstraktów tkanek jęczmienia ze względu na przynależność do danej klasy związków (w nawiasach liczba wykrytych pochodnych związków reprezentujących daną klasę).

aminokwasów, amin oraz pochodnych kwasu cynamonowego. Jeśli chodzi o przypisanie związków do klas, najliczniej reprezentowaną grupą związków w przeprowadzonych analizach były węglowodany i aminokwasy oraz ich pochodne. Wśród węglowodanów odnotowano obecność mono-, di-, i trisacharydów, a także alkoholi cukrowych i kwasów cukrowych. Ponadto zaobserwowano fosforanowe pochodne węglowodanów, w tym m.in. fruktozo-6-fosforan i glukozo-6-fosforan. Pikiem o największej intensywności na chromatogramie był pik pochodzący od sacharozy, której ilość, zarówno w próbkach



Ryc. 4.2. Klasyfikacja związków wykrytych w siewkach jęczmienia ze względu na strukturę (w nawiasach liczba wykrytych pochodnych związków reprezentujących daną klasę).

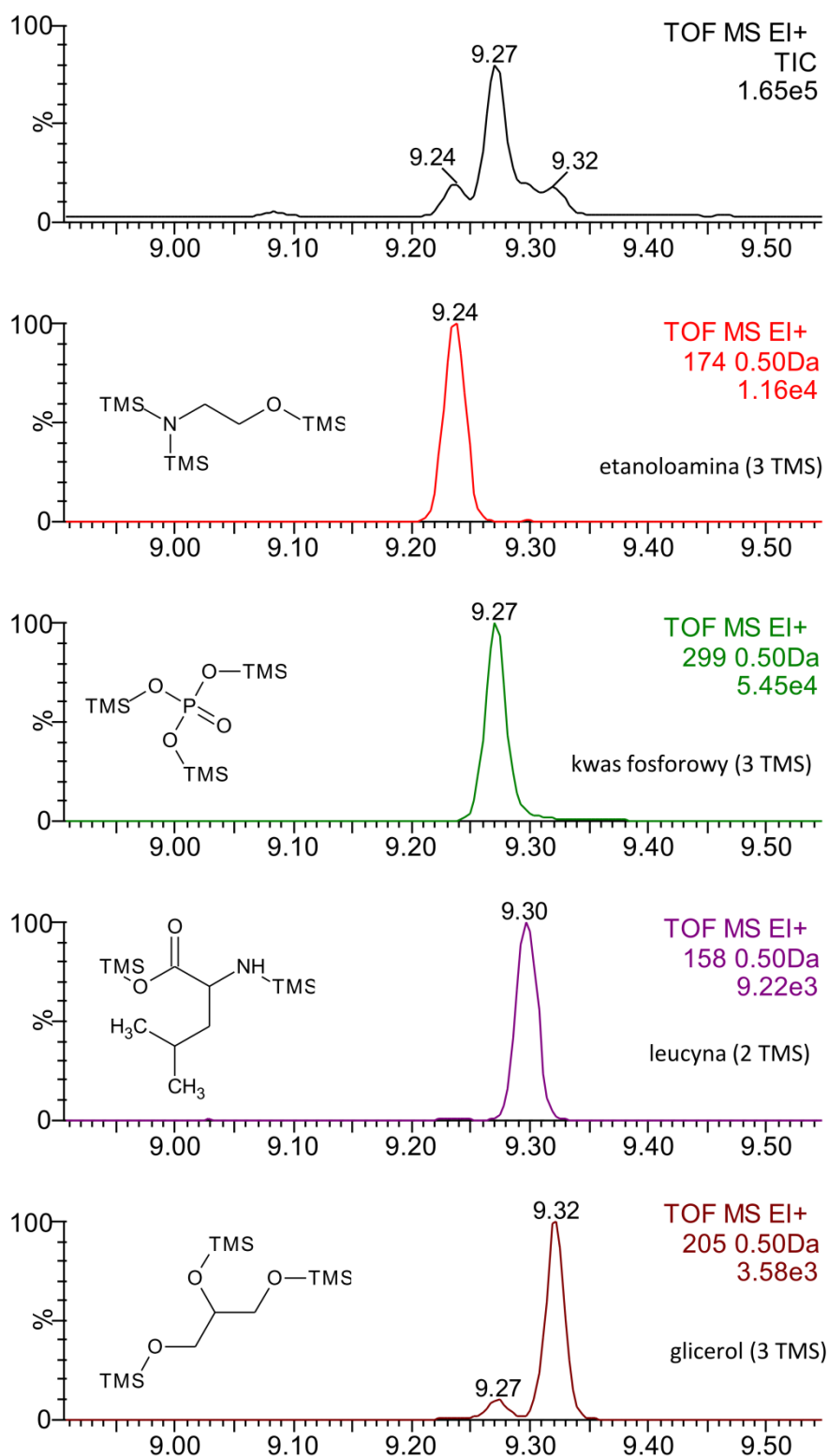
ekstraktów liści jak i korzeni, była w większości przypadków około jednego - dwóch rzędów wielkości większa od ilości pozostałych związków (ryc. S.1). Łącznie przypisano nazwy 30 węglowodanom w postaci 34 pochodnych TMS i MeOX/TMS. 10 pochodnym nie udało się przypisać nazwy przy użyciu pakietu TargetSearch:

- trzem izomerom monosacharydów modyfikowanym do oksymów: fruktozie (2), glukozie (2) i ksylozie (1), ze względu na duże podobieństwo widm i bliskość indeksów retencji odpowiadających im izomerów przestrzennych, skutkujące trudnością rozdzielenia tych sygnałów,
- etano-1,2-diolowi, ze względu na indeks retencji poniżej 1000, przy korzystaniu z markerów indeksów retencji w zakresie C_{10} - C_{36} (RI 1000-3600) i biblioteki GMD opartej na tym zakresie,
- ksylitolowi, melibiozie, sorbitolowi – ze względu na niską abundancję, gorszej jakości widmami, czego efektem było przypisanie niskich współczynników podobieństwa do odpowiadających im wpisów w bibliotece GMD, dyskwalifikujących wymienione metabolity w analizie przy użyciu pakietu,

- trisacharydom: 1-keście i rafinozie ze względu na koelucję i jednocześnie wysokie podobieństwo widm.

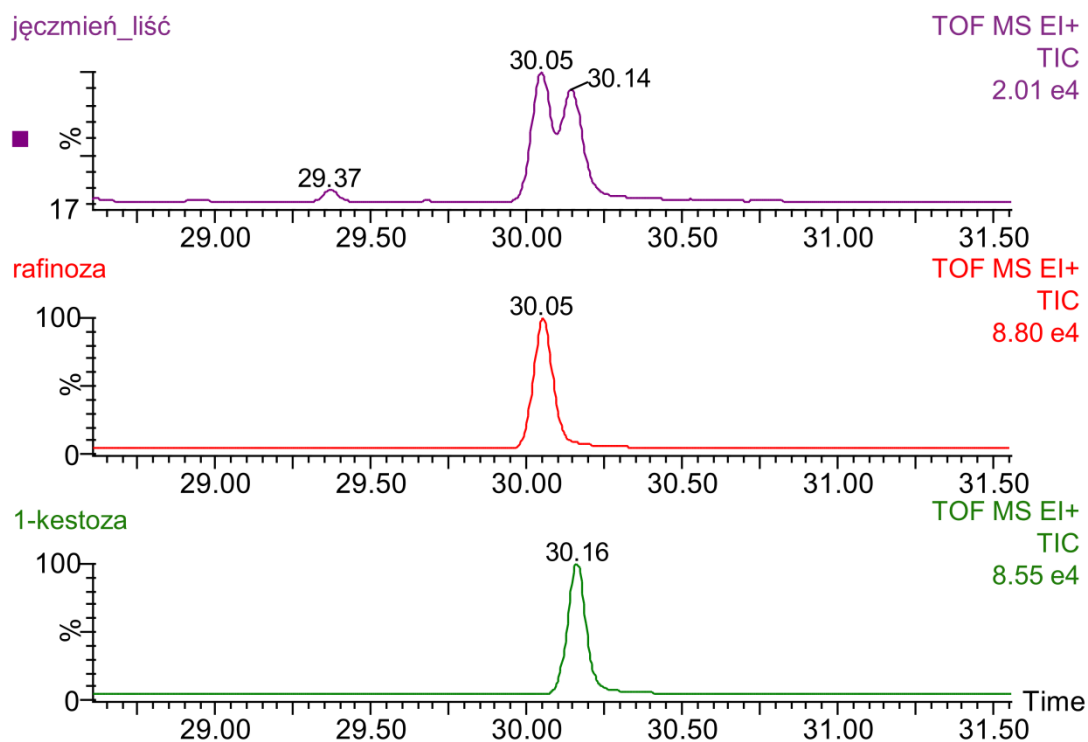
W przypadku koelucji związków różniących się jonami fragmentacyjnymi TargetSearch dobrze rozróżniał poszczególne metabolity. Przykładowo taka sytuacja dotyczyła nie rozdzielonych do końca podczas analizy chromatograficznej pików pochodzących od etanoloaminy, kwasu fosforowego, leucyny i glicerolu, widocznych na chromatogramie całkowitego prądu jonowego (TIC, ang. *total ion current*) przedstawionego na ryc. 4.3. Wykreślenie chromatogramów pojedynczych jonów pozwoliło na odróżnienie sygnałów odnoszących się do tych metabolitów. Jeśli zaś chodzi o niewykryte w TargetSearch trisacharydy: rafinozę (α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-Fruf) oraz 1-keście (β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf(2 \rightarrow 1)- α -D-Glup), nie tylko ich czasy elucji były zbliżone (ryc. 4.4 a), ale także widma charakteryzowały się wysokim stopniem podobieństwa. Główną różnicą pomiędzy zarejestrowanymi widmami rafinozy i 1-keście jest intensywność względna jonu 204, która w przypadku rafinozy stanowi około 30% intensywności pików podstawowych (pików o największej intensywności określanej jako 100%, w tym przypadku m/z 361), a w przypadku keście około 5% (ryc. 4.4 b). 1-keście była obecna zarówno w liściu jak i w korzeniu badanych siewek jęczmienia, jednak obecność drugiego trisacharydu – rafinozy – stwierdzono jedynie w liściu (tab. 4.1).

Kolejną licznie reprezentowaną grupą związków były aminokwasy. Ogółem wykryto 21 aminokwasów białkowych i niebiałkowych w postaci 33 pochodnych TMS (ryc. 4.1). Zarówno w próbkach ekstraktów liści jak i korzeni zidentyfikowano cztery aminokwasy niebiałkowe: β -alaninę, kwas γ -aminomasłowy (GABA, ang. *gamma-aminobutyric acid*), kwas pipekoliny (nazywany też homoproliną) oraz kwas piroglutaminowy (znany również jako 5-oksoprolina). Z wyróżnianych 20 podstawowych aminokwasów białkowych, w badanym materiale roślinnym, zidentyfikowano 17 (nie wykryto argininy oraz aminokwasów siarkowych: cysteiny i metioniny) w formie 29 pochodnych, z czego dla: alaniny, seryny i waliny – po dwie pochodne, proliny – trzy, glutaminy – cztery, a asparaginy – pięć (tab. 4.1). Występowanie wielu pochodnych TMS jest związane z mechanizmem i kinetyką reakcji derywatywacji. Protony grupy aminowej reagują z odczynnikiem silylującym sekwencyjnie i wolniej niż protony grup karboksylowej czy hydroksylowej. Pełna derywatywacja związków zawierających grupę $-\text{NH}_2$ może trwać nawet powyżej doby; jednocześnie wydłużanie czasu reakcji może skutkować degradacją niektórych pochodnych (Kanani i in. 2008). Zazwyczaj w podejściu profilowania metabolitów silylacja jest skrócona

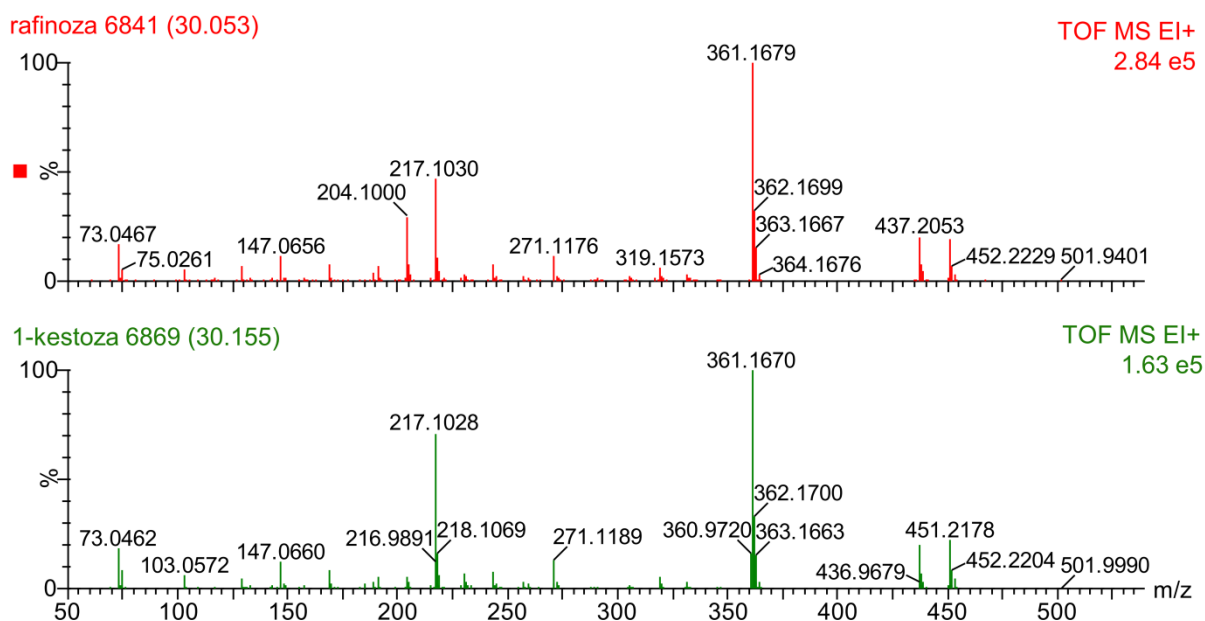


Ryc. 4.3. Koelucja związków podczas analizy chromatograficznej (od góry: chromatogram całkowitego prądu jonowego, chromatogramy pojedynczych jonów poszczególnych związków: etanolaminy m/z 174, kwasu fosforowego m/z 299, leucyny 158 m/z, glicerolu 205 m/z).

a.



b.



Ryc. 4.4. Chromatogramy oraz widma EI rafinozy i 1-kestozy. a) chromatogramy całkowitego prądu jonowego, kolejno (od góry): próbki ekstraktu liścia jęczmienia, oraz związków referencyjnych rafinozy i 1-kestozy b) widma mas zarejestrowane dla związków referencyjnych.

do 30 min (Lisec i in. 2006), przez co przeprowadzenie związków zawartych w próbkach ekstraktów w pochodne nie jest kompletne i na chromatogramie obserwowanych jest wiele pików pochodzących od jednego metabolitu. Ponadto porównanie składu jakościowego próbek ekstraktów części nadziemnych i podziemnych siewek jęczmienia wykazało, że dwa aminokwasy aromatyczne – tyrozyna i histydyna – obecne były jedynie w próbkach ekstraktów korzeni. Wykorzystanie do analizy danych pakietu TargetSearch pozwoliło na identyfikację 31 z 33 pochodnych (nie przypisano nazw dwóm pochodnym aminokwasów o niskich intensywnościach: asparaginie (2) (4 TMS) i walinie (1) (1 TMS)).

W próbkach ekstraktów wykryto także 14 pochodnych kwasów karboksylowych (ryc. 4.1). Do grupy tej przypisano metabolity cyklu Krebsa: kwas cytrynowy, α -ketoglutaryny, kwas bursztynowy, kwas fumarowy oraz kwas jabłkowy. Poza tym zaobserwowano obecność trzech pochodnych kwasu cynamonowego: kwasu p-kumarowego w ekstraktach korzeni oraz kwasu trans-ferulowego i kwasu chlorogenowego w ekstraktach liści. Spośród powyższych trzech związków jedynie identyfikacja kwasu chlorogenowego nie została potwierdzona związkiem referencyjnym. Wykryty kwas chlorogenowy, będący izomerem kwasu kawochinowego z estryfikacją w pozycji 5-OH został zidentyfikowany na podstawie porównania otrzymanego widma i indeksu retencji z widmami i indeksami zdeponowanymi w bibliotekach widm. Zastosowanie pakietu TargetSearch pozwoliło na adnotację 13 z 14 wykrytych pochodnych; ze względu na niską intensywność nie przypisano nazwy kwasowi glikolowemu.

Ponadto wykryto 7 pochodnych amin (ryc. 4.1). Wśród zidentyfikowanych amin znalazły się monoaminy takie jak: etanoloamina będąca aminoalkoholem a także jej fosforan (wykryty jedynie w korzeniach siewek jęczmienia), izopentyloamina (do której identyfikatora GMD została przypisana nazwa w czerwcu 2013 r.) oraz dwie monoaminy aromatyczne tyramina i 5-hydroksytryptamina (wykryta tylko w korzeniu). 5-hydroksytryptamina znana jest również jako serotonina, i w królestwie zwierząt odgrywa ważną rolę jako neurotransmitter, hormon i czynnik indukujący mitozę, natomiast w roślinach przypisuje się jej funkcje w procesach kwitnienia, morfogenezy, adaptacji do zmian warunków środowiska oraz starzenia (Kang i in. 2009). Oprócz wymienionych monoamin wykryto także diaminy takie jak: diaminopropan (z grupami $-NH_2$ pozycji -1,2 lub -1,3, niejednoznaczne przypisanie identyfikacji z biblioteki) oraz putrescynę. Wszystkie aminy zostały adnotowane w programie TargetSearch.

Do grupy lipidów zaklasyfikowano 6 pochodnych kwasów tłuszczowych oraz 3 pochodne steroli (ryc. 4.1). Wśród zidentyfikowanych kwasów tłuszczowych znalazły się 3

nasycone kwasy tłuszczowe takie jak: kwas kapronowy, kwas palmitynowy i kwas stearynowy. Oprócz tego wykryto 3 nienasycone kwasy tłuszczowe: kwas linolowy z dwoma wiązaniami podwójnymi w pozycjach -9,12 i jego ester metylowy, a także kwas α -linolenowy z trzema wiązaniami podwójnymi w pozycjach -9,12,15. Wśród steroli zidentyfikowano kampesterol, stigmasterol i β -sitosterol, których obecność została w pełni potwierdzona przez porównanie otrzymanych widm z widmami i indeksami retencji związków referencyjnych. Jednakże ze względu na bardzo niską intensywność dwóch pierwszych steroli nie zostały one adnotowane przy użyciu pakietu TargetSearch, podobnie jak jeden z nasyconych kwasów tłuszczowych (kwas kapronowy).

Do związków organicznych nie zaklasyfikowanych do żadnej z wyżej wymienionych grup przypisano między innymi mocznik, który w roślinach stanowi źródło azotu i jest albo pobierany przez korzenie z roztworu glebowego, w przypadku zastosowania tego związku jako nawozu, albo pochodzi z przemian katabolicznych argininy mających na celu remobilizację azotu z tkanek (Witte 2011). Oprócz mocznika innym źródłem azotu dla roślin jest pochodna mocznika – alantoina (Desimone i in. 2002), która również została zidentyfikowana w liściach i korzeniach siewek jęczmienia. Ponadto wykryto trzy związki nieorganiczne, w tym hydroksyloaminę oraz dwa kwasy nieorganiczne: kwas fosforowy i kwas węglowy. Kwas węglowy, podobnie jak izopentyloamina został adnotowany w bazie GMD w czerwcu 2013 r. Dzięki zastosowaniu przez Strehmel i wsp. dwóch chromatografów gazowych sprzężonych ze spektrometrami mas, jednego z jonizacją elektronami i kwadropolem (GC-EI-Q-MS), drugiego z jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym i tandemowym analizatorem kwadropol - analizator czasu przelotu (GC-APCI(+)-QTOF-MS), możliwe było połączenie informacji otrzymanych z obu rodzajów widm (w tym składu elementarnego i fragmentacji) i przypisanie 14 nieznanym związkom przypuszczalnych struktur, z czego 7 struktur zostało potwierdzonych przez porównanie z widmami zarejestrowanymi dla związków referencyjnych (Strehmel i in. 2014). Do adnotowanych związków zaliczają się: wspomniany wcześniej kwas węglowy, a także A145015 ([33] tab. 4.2) opisany jako przypuszczalny pierwszorzędowy aminoaldehyd/aminoketon oraz A203003 ([81] tab. 4.2) opisany jako przypuszczalna tioheksoza. Dzięki ciągłemu rozbudowywaniu bibliotek można się spodziewać, że również pozostałe związki opisane identyfikatorami zostaną w przyszłości adnotowane w bazach danych, co umożliwi interpretację biologiczną uzyskanych wyników.

Podsumowując analiza składu ekstraktów liści i korzeni siewek jęczmienia umożliwiła wykrycie 141 pochodnych związków należących do różnych klas, z czego przypisano nazwy stu ośmiu pochodnym, dwudziestu jeden przypisano identyfikatory GMD, natomiast dwanaście wykrytych związków zostało opisanych jako N_x.

4.1.2 Analiza zmian zawartości metabolitów w liściach i korzeniach siewek jęczmienia w warunkach niedoboru wody

Ze względu na dużą ilość danych i związane z tym ograniczone możliwości ich manualnego przetworzenia analiza ilościowa wykrytych związków, zarówno dla form rodzicielskich Maresi, Cam/B1/CI jak i odmian referencyjnych Sebastian, Stratus oraz populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI została przeprowadzona na 114 pochodnych adnotowanych przy użyciu pakietu TargetSearch (101 w liściu i 100 w korzeniu). Znormalizowane względem standardu wewnętrznego wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w badanych odmianach oraz liniach Maresi × Cam/B1/CI zostały zawarte w załącznikach na dołączonej płycie kompaktowej (tab. CD.2a i tab. CD.2b).

4.1.2.1 Analiza zmian zawartości metabolitów w odmianach Maresi, Cam/B1/CI, Sebastian, Stratus

Zestawienie wszystkich związków obecnych w ekstraktach czterech badanych genotypów ukazujące istotne oraz nieistotne zmiany zawartości każdego z metabolitów:

- związane z różnicami biologicznymi między odmianami,
- wywołane stresem niedoboru wody (wraz z kierunkiem tych zmian: spadek, brak zmian, wzrost akumulacji podczas suszy) oraz
- wywołane interakcją Odmiana x Susza (O x S) (wynikające z jednoczesnego wpływu obu wymienionych czynników na akumulację związku)

przedstawiono osobno dla liści i korzeni, odpowiednio, w tabelach 4.3. i 4.4.

Większość wykrytych w liściach i w korzeniach metabolitów wykazała istotne statystycznie zmiany poziomów akumulacji. Przy czym liczba związków, których zawartość nie uległa zmianie pod wpływem żadnego z wymienionych wcześniej czynników (różnice odmianowe, wpływ suszy, interakcja O x S) była dwukrotnie wyższa w korzeniu (36 metabolity) niż w liściu (16 metabolitów) (tab. S.2). Dodatkowo tylko w pięciu przypadkach były to te same metabolity nie wykazujące istotnych zmian zarówno w liściu i w korzeniu. W grupie powyższych związków obserwowano: mocznik, glicerol, izoleucynę, rybozę i mio-

Tab. 4.3. Zmiany zawartości metabolitów w próbkach ekstraktów liści odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus związane z odmianą oraz wywołane stresem niedoboru wody oraz efektem interakcji ($p < 0,05$ – istotna zmiana, „-” – brak istotności statystycznej). Kierunek zmian zawartości metabolitów w warunkach suszy zakodowano w następujący sposób: -1 spadek, 0 brak zmian, 1 wzrost akumulacji.

nr	Metabolit	Liść							
		Wyniki testu ANOVA			Kierunek zmian wywołanych suszą				Wzór reakcji
		p-wartość Odmiana	p-wartość Susza	p-wartość OXS	Cam/B1/CI	Maresi	Sebastian	Stratus	
					Ca	Ma	Se	St!	
1	kw. mlekowy* (2 TMS)	0,0005	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
2	2-hydroksypirydyna (1TMS)	0,0418	-	-	0	0	1	0	0 0 1 0
3	alanina* (1) (2TMS)	0,0414	0,0005	-	-1	-1	0	-1	-1 -1 0 -1
4	hydroksyloamina (3TMS)	-	0,0000	-	-1	-1	-1	-1	-1 -1 -1 -1
5	kw. węglowy (1MEOX) (2TMS)	0,0010	-	-	0	0	1	0	0 0 1 0
6	izopentyloamina (2 TMS)	0,0016	0,0000	0,0006	0	-1	-1	-1	0 -1 -1 -1
7	prolina* (1) (1TMS)	0,0000	0,0000	0,0000	1	1	1	1	1 1 1 1
8	fosforan metylu (2 TMS)	0,0000	0,0000	0,0004	0	1	1	1	0 1 1 1
9	walina* (2) (2 TMS)	0,0002	0,0030	-	0	0	1	1	0 0 1 1
10	kw. malonowy* (2TMS)	0,0043	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
11	mocznik* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
12	seryna* (1) (2 TMS)	0,0006	0,0017	-	-1	-1	0	-1	-1 -1 0 -1
13	etanoloamina (3 TMS)	0,0060	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
14	kw. fosforowy (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
15	leucyna* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
16	glicerol (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
17	izoleucyna* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
18	prolina* (2) (2 TMS)	0,0002	0,0000	0,0001	1	1	1	1	1 1 1 1
19	glicyna* (3 TMS)	0,0029	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
20	kw. maleinowy* (2 TMS)	0,0014	0,0000	0,0014	0	1	1	1	0 1 1 1
21	lumichrom (2 MeOX)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
22	kw. bursztynowy* (2 TMS)	0,0034	0,0390	-	0	-1	0	-1	0 -1 0 -1
23	kw. glicerynowy (3 TMS)	0,0094	0,0021	-	-1	-1	0	0	-1 -1 0 0

24	zw. podobny do lumichromu (2 MeOX)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
25	kw. fumarowy* (2 TMS)	0,0151	0,0007	-	0	-1	-1	-1	0 -1 -1 -1
26	kw. piperolinowy (2 TMS)	0,0084	0,0083	-	-1	0	0	0	-1 0 0 0
27	seryna* (2) (3 TMS)	0,0049	0,0092	-	-1	-1	0	0	-1 -1 0 0
28	alanina* (2) (3 TMS)	0,0011	0,0004	-	-1	-1	0	-1	-1 -1 0 -1
29	treonina* (3 TMS)	0,0053	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
30	treono-1,4-lakton (2 TMS)	0,0007	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
31	β -alanina* (3 TMS)	0,0032	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
32	A144004	0,0131	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
33	A145015	Nie znaleziono							
34	glutamina* (1) [-H ₂ O](2 TMS)	0,0000	0,0000	0,0073	-1	-1	-1	0	-1 -1 -1 0
35	A148003	-	0,0083	-	0	-1	0	-1	0 -1 0 -1
36	kw. jabłkowy* (3 TMS)	-	0,0005	-	0	1	1	0	0 1 1 0
37	asparagina* (1) [-H ₂ O] (2 TMS)	0,0003	0,0017	0,0248	-1	0	-1	0	-1 0 -1 0
38	kw. asparaginowy* (1) (3 TMS)	0,0047	0,0000	-	-1	-1	-1	-1	-1 -1 -1 -1
39	kw. piroglutaminowy* (2 TMS)	0,0094	0,0000	-	-1	-1	0	-1	-1 -1 0 -1
40	kw. γ -aminomasłowy* (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
41	kw. erytronowy (4 TMS)	0,0003	0,0005	-	0	1	1	0	0 1 1 0
42	kw. treonowy (4 TMS)	0,0000	0,0000	0,0000	0	0	-1	0	0 0 -1 0
43	kw. α -ketoglutaryny* (1 MeOX 2 TMS)	0,0055	0,0001	-	1	1	1	1	1 1 1 1
44	prolina* (3) [+CO ₂] (2 TMS)	0,0008	0,0000	0,0226	1	1	1	1	1 1 1 1
45	A159003	0,0022	0,0000	-	1	1	1	1	1 1 1 1
46	glutamina* (2) [-H ₂ O] (3 TMS)	0,0001	0,0005	0,0029	-1	0	0	-1	-1 0 0 -1
47	kw. glutaminowy* (1) (3 TMS)	0,0172	-	-	0	0	1	0	0 0 1 0
48	fenyloalanina* (2 TMS)	0,0046	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
49	asparagina* (3) (4 TMS)	0,0074	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
50	1,3-diaminopropan / 1,2-diaminopropan (4 TMS)	Nie znaleziono							
51	ksyloza* (2) (1 MeOX 4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
52	asparagina* (4) (3 TMS)	0,0002	0,0019	0,0028	-1	0	0	0	-1 0 0 0
53	ryboza* (1 MeOX 4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
54	glutamina* (3) (4 TMS)	0,0034	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
55	putrescyna* (4 TMS)	0,0019	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0

56	kwasy rybonowy (5 TMS)	0,0498	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
57	3-fosfoglicerol (4 TMS)	0,0003	0,0014	0,0203	0	0	1	1	0 0 1 1
58	glukopiranoza [-H ₂ O] (4TMS)	0,0086	0,0030	-	0	0	-1	-1	0 0 -1 -1
59	fosforan etanoloaminy (4 TMS)	Nie znaleziono							
60	glutamina* (4) (3 TMS)	0,0185	0,0000	-	-1	-1	-1	-1	-1 -1 -1 -1
61	A178003	-	0,0112	-	0	0	-1	-1	0 0 -1 -1
62	A179010	-	0,0423	-	-1	0	0	-1	-1 0 0 -1
63	zw. podobny do pochodnej fruktozy	-	0,0282	-	0	0	1	1	0 0 1 1
64	kwasy szikimowy (4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
65	zw. podobny do pochodnej fruktozy	0,0163	0,0003	0,0165	0	1	1	1	0 1 1 1
66	kwasy cytrynowy* (4 TMS)	0,0113	0,0001	0,0083	0	1	1	1	0 1 1 1
67	kwasy chinowy* (5 TMS)	-	0,0172	-	0	-1	0	0	0 -1 0 0
68	dimer kwasu dehydroaskorbinowego (2 MeOX)	0,0069	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
69	fruktoza* (1) (1 MeOX 5 TMS)	0,0002	0,0018	-	1	0	1	0	1 0 1 0
70	glukoza* (1) (1 MeOX 5 TMS)	0,0011	0,0001	0,0126	1	1	1	0	1 1 1 0
71	alantoina (1) (4 TMS)	0,0011	0,0002	0,0024	0	1	1	0	0 1 1 0
72	tyramina* (3 TMS)	0,0065	0,0163	-	0	1	1	1	0 1 1 1
73	lizyna* (4 TMS)	0,0021	-	0,0095	-1	0	0	1	-1 0 0 1
74	tyrozyna* (3 TMS)	Nie znaleziono							
75	kwasy p-kumarowy* (2 TMS)	Nie znaleziono							
76	kwasy askorbinowy* (4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
77	asparagina* (5) [+CO ₂] (4 TMS)	Nie znaleziono							
78	zw. podobny do glukopiranozy (5 TMS) / glukopiranoza (5 TMS)	0,0008	0,0000	0,0057	0	1	1	1	0 1 1 1
79	A197007	0,0196	0,0003	-	0	1	1	0	0 1 1 0
80	A199003	Nie znaleziono							
81	A203003	0,0053	-	0,0288	0	0	1	0	0 0 1 0
82	kwasy palmitynowy* (1 TMS)	0,0064	-	-	0	0	1	0	0 0 1 0
83	alantoina (2) (3 TMS)	Nie znaleziono							
84	mio-inozytol* (6 TMS)	-	0,0001	-	0	1	1	1	0 1 1 1
85	kwasy trans-ferulowy* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
86	ester metylowy kwasu linolowego	Nie znaleziono							
87	A211001	0,0136	0,0025	-	0	0	1	1	0 0 1 1

88	histydyna* (4 TMS)	Nie znaleziono							
89	A217007	0,0000	0,0016	-	0	1	0	1	0 1 0 1
90	glicerolo-fosfoglicerol (5 TMS)	0,0213	0,0033	-	0	1	0	1	0 1 0 1
91	kwask linolowy* (1 TMS)	0,0001	0,0084	0,0325	0	0	1	1	0 0 1 1
92	kwask α -linolenowy* (1 TMS)	0,0006	0,0067	-	0	0	1	1	0 0 1 1
93	tryptofan* (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
94	kwask stearynowy* (1 TMS)	0,0221	-	-	0	0	1	0	0 0 1 0
95	A228001	-	0,0059	-	1	1	0	1	1 1 0 1
96	zw. podobny do glicerolo-aldo-piranozydu (6 TMS)	0,0000	0,0000	0,0189	0	1	1	1	0 1 1 1
97	fruktozo-6-fosforan* (1 MeOX 6 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
98	glukoza-6-fosforan* (1 MeOX 6 TMS)	0,0424	-	-	0	0	1	0	0 0 1 0
99	A236005	0,0307	0,0001	0,0352	0	1	1	1	0 1 1 1
100	A237001	0,0105	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
101	mio-inozytolo-2-fosforan (7 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
102	5-hydroksytryptamina (4 TMS)	Nie znaleziono							
103	A250001	0,0000	0,0001	0,0431	0	1	1	1	0 1 1 1
104	A254002	0,0251	0,0058	-	1	1	0	0	1 1 0 0
105	sacharoza* (8 TMS)	0,0130	0,0042	-	-1	-1	0	-1	-1 -1 0 -1
106	A270003	Nie znaleziono							
107	trehaloza* (8 TMS)	Nie znaleziono							
108	A281001	0,0000	0,0000	0,0000	0	1	1	1	0 1 1 1
109	A296003	-	0,0000	0,0124	-1	-1	0	-1	-1 -1 0 -1
110	galaktinol (9 TMS)	0,0000	0,0000	0,0000	0	1	1	1	0 1 1 1
111	A300001	0,0003	0,0000	0,0047	0	-1	-1	-1	0 -1 -1 -1
112	A311002	0,0020	0,0000	-	1	1	1	1	1 1 1 1
113	kwask neochlorogenowy (6 TMS)	0,0129	0,0000	0,0265	-1	-1	-1	-1	-1 -1 -1 -1
114	β -sitosterol* (1 TMS)	0,0064	-	0,0437	0	0	0	1	0 0 0 1

Tab. 4.4. Zmiany zawartości metabolitów w próbkach ekstraktów korzeni odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus związane z odmianą oraz wywołane stresem niedoboru wody oraz efektem interakcji ($p < 0,05$ – istotna zmiana, „-” – brak istotności statystycznej). Kierunek zmian zawartości metabolitów w warunkach suszy zakodowano w następujący sposób: -1 spadek, 0 brak zmian, 1 wzrost akumulacji.

nr	Metabolit	Korzeń							Wzór reakcji
		Wyniki testu ANOVA			Kierunek zmian wywołanych suszą				
		p-wartość Odmiana	p-wartość Susza	p-wartość OXS	Cam/B1/CI	Maresi	Sebastian	Stratus	
1	kw. mlekowy* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
2	2-hydroksypirydyna (1TMS)	0,0023	-	-	1	-1	0	0	1 -1 0 0
3	alanina* (1) (2TMS)	0,0001	-	-	1	0	0	0	1 0 0 0
4	hydroksyloamina (3TMS)	0,0225	0,0308	-	-1	0	0	0	-1 0 0 0
5	kw. węglowy (1MEOX) (2TMS)	0,0017	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
6	izopentyloamina (2 TMS)	0,0020	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
7	prolina* (1) (1TMS)	-	0,0142	-	1	0	1	1	1 0 1 1
8	fosforan metylu (2 TMS)	-	0,0009	0,0245	1	0	1	1	1 0 1 1
9	walina* (2) (2 TMS)	-	0,0368	-	1	0	0	0	1 0 0 0
10	kw. malonowy* (2TMS)	Nie znaleziono							
11	mocznik* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
12	seryna* (1) (2 TMS)	0,0068	-	-	1	0	0	0	1 0 0 0
13	etanoloamina (3 TMS)	0,0115	-	0,0030	1	0	-1	1	1 0 -1 1
14	kw. fosforowy (3 TMS)	0,0081	-	-	0	-1	-1	0	0 -1 -1 0
15	leucyna* (2 TMS)	0,0133	-	-	0	0	-1	0	0 0 -1 0
16	glicerol (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
17	izoleucyna* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
18	prolina* (2) (2 TMS)	-	0,0128	-	1	0	0	0	1 0 0 0
19	glicyna* (3 TMS)	-	0,0123	-	1	0	1	0	1 0 1 0
20	kw. maleinowy* (2 TMS)	-	0,0251	-	1	0	1	0	1 0 1 0
21	lumichrom (2 MeOX)	0,0000	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
22	kw. bursztynowy* (2 TMS)	-	0,0144	0,0495	0	0	-1	0	0 0 -1 0
23	kw. glicerynowy (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0

24	zw. podobny do lumichromu (2 MeOX)	0,0000	-	-	0	0	0	0	0000
25	kw. fumarowy* (2 TMS)	0,0124	-	-	1	0	0	0	1000
26	kw. pipekolinowy (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
27	seryna* (2) (3 TMS)	0,0015	0,0194	-	1	0	0	0	1000
28	alanina* (2) (3 TMS)	0,0210	0,0305	0,0368	1	0	0	0	1000
29	treonina* (3 TMS)	0,0088	-	-	1	0	0	0	1000
30	treono-1,4-lakton (2 TMS)	Nie znaleziono							
31	β -alanina* (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
32	A144004	0,0000	-	-	0	0	-1	0	00-10
33	A145015	0,0036	-	-	0	0	0	0	0000
34	glutamina* (1) [-H ₂ O](2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
35	A148003	0,0089	-	-	0	0	0	0	0000
36	kw. jabłkowy* (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
37	asparagina* (1) [-H ₂ O] (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
38	kw. asparaginowy* (1) (3 TMS)	0,0108	0,0009	0,0280	1	0	0	1	1001
39	kw. piroglutaminowy* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
40	kw. γ -aminomastowy* (3 TMS)	0,0009	-	0,0263	0	1	-1	0	01-10
41	kw. erytronowy (4 TMS)	0,0000	-	-	0	1	0	0	0100
42	kw. treonowy (4 TMS)	0,0000	-	-	0	0	-1	0	00-10
43	kw. α -ketoglutaryny* (1 MeOX 2 TMS)	-	0,0171	-	1	0	0	1	1001
44	prolina* (3) [+CO ₂] (2 TMS)	-	0,0081	-	1	0	1	1	1011
45	A159003	Nie znaleziono							
46	glutamina* (2) [-H ₂ O] (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
47	kw. glutaminowy* (1) (3 TMS)	0,0129	0,0199	-	1	0	0	1	1001
48	fenyloalanina* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
49	asparagina* (3) (4 TMS)	0,0292	-	-	0	0	0	0	0000
50	1,3-diaminopropan / 1,2-diaminopropan (4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
51	ksyloza* (2) (1 MeOX 4 TMS)	Nie znaleziono							
52	asparagina* (4) (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
53	ryboza* (1 MeOX 4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
54	glutamina* (3) (4 TMS)	0,0449	-	-	0	0	0	0	0000
55	putrescyna* (4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000

56	kwasy rybonowy (5 TMS)	0,0009	-	0,0184	0	0	-1	0	00-10
57	3-fosfoglicerol (4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
58	glukopiranoza [-H ₂ O] (4TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
59	fosforan etanoloaminy (4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
60	glutamina* (4) (3 TMS)	0,0316	-	-	1	0	0	0	1000
61	A178003	-	-	-	0	0	0	0	0000
62	A179010	-	-	-	0	0	0	0	0000
63	zw. podobny do pochodnej fruktozy	-	-	-	0	0	0	0	0000
64	kwasy szikimowy (4 TMS)	Nie znaleziono							
65	zw. podobny do pochodnej fruktozy	-	-	0,0157	1	-1	0	0	1-100
66	kwasy cytrynowy* (4 TMS)	-	0,0080	-	1	0	0	1	1001
67	kwasy chinowy* (5 TMS)	-	0,0173	-	0	-1	0	0	0-100
68	dimer kwasu dehydroaskorbinowego (2 MeOX)	0,0447	0,0294	-	0	0	-1	-1	00-1-1
69	fruktoza* (1) (1 MeOX 5 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
70	glukoza* (1) (1 MeOX 5 TMS)	-	0,0185	0,0099	1	0	1	0	1010
71	alantoina (1) (4 TMS)	-	0,0009	-	1	1	0	0	1100
72	tyramina* (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
73	lizyna* (4 TMS)	0,0003	-	-	0	0	-1	1	00-11
74	tyrozyna* (3 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
75	kwasy p-kumarowy* (2 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
76	kwasy askorbinowy* (4 TMS)	Nie znaleziono							
77	asparagina* (5) [+CO ₂] (4 TMS)	0,0231	-	-	0	0	0	0	0000
78	zw. podobny do glukopiranozy (5 TMS) / glukopiranoza (5 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0000
79	A197007	-	-	-	0	0	0	0	0000
80	A199003	0,0000	-	-	0	0	-1	0	00-10
81	A203003	0,0444	-	0,0053	1	-1	1	0	1-110
82	kwasy palmitynowy* (1 TMS)	0,0288	0,0318	0,0348	1	0	0	0	1000
83	alantoina (2) (3 TMS)	-	0,0184	-	1	0	0	0	1000
84	mio-inozytol* (6 TMS)	-	0,0168	-	1	0	0	0	1000
85	kwasy trans-ferulowy* (2 TMS)	Nie znaleziono							
86	ester metylowy kwasu linolowego	-	-	0,0136	1	0	0	0	1000
87	A211001	-	-	-	0	0	0	0	0000

88	histydyna* (4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
89	A217007	Nie znaleziono							
90	glicerolo-fosfoglicerol (5 TMS)	-	0,0265	0,0174	1	0	0	0	1 0 0 0
91	kwas linolowy* (1 TMS)	0,0032	0,0245	-	1	0	0	0	1 0 0 0
92	kwas α -linolenowy* (1 TMS)	0,0151	0,0078	-	1	0	0	0	1 0 0 0
93	tryptofan* (3 TMS)	0,0008	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
94	kwas stearynowy* (1 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
95	A228001	0,0194	-	-	0	1	0	0	0 1 0 0
96	zw. podobny do glicerolo-aldo-piranozydu (6 TMS)	Nie znaleziono							
97	fruktozo-6-fosforan* (1 MeOX 6 TMS)	0,0137	-	-	0	0	-1	0	0 0 -1 0
98	glukoza-6-fosforan* (1 MeOX 6 TMS)	0,0320	-	-	0	0	-1	0	0 0 -1 0
99	A236005	0,0427	-	0,0024	1	-1	0	0	1 -1 0 0
100	A237001	0,0200	0,0152	-	1	0	0	1	1 0 0 1
101	mio-inozytolo-2-fosforan (7 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
102	5-hydroksytryptamina (4 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
103	A250001	Nie znaleziono							
104	A254002	Nie znaleziono							
105	sacharoza* (8 TMS)	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
106	A270003	-	-	-	0	0	0	0	0 0 0 0
107	trehaloza* (8 TMS)	-	0,0092	-	1	1	0	0	1 1 0 0
108	A281001	Nie znaleziono							
109	A296003	Nie znaleziono							
110	galaktinol (9 TMS)	0,0000	0,0000	0,0000	1	0	1	1	1 0 1 1
111	A300001	0,0021	0,0093	-	-1	0	-1	0	-1 0 -1 0
112	A311002	0,0152	-	-	1	0	0	0	1 0 0 0
113	kwas neochlorogenowy (6 TMS)	Nie znaleziono							
114	β -sitosterol* (1 TMS)	-	0,0092	-	1	0	1	0	1 0 1 0

inozytolo-2-fosforan (tab. 4.3, tab. 4.4). Najwięcej istotnych zmian w poziomie metabolitów wynikało z różnic między odmianami i sytuacja ta dotyczyła tak liści (75 związków) jak i korzeni (44 związki) (tab. S.2). Drugim czynnikiem pod względem ilości metabolitów, które w wyniku jego oddziaływania wykazały największą liczbę zmian, była susza. Niedobór wody spowodował wzrost/spadek 61 metabolitów w liściu i dwukrotnie mniejszy, bo jedynie 30-stu metabolitów, w korzeniu (tab. S.2). Z kolei najmniejszą grupę stanowiły metabolity, które wykazały efekt interakcji O x S i było to 29 związków w liściu i 15 w korzeniu (tab. S.2). Wśród efektów interakcji O x S, opisujących jednoczesny wpływ badanego genotypu i suszy na poziom akumulacji związków, można doszukiwać się genetycznych uwarunkowań tolerancji lub jej braku na stres niedoboru wody. W grupie związków wykazujących efekt interakcji O x S zaobserwowano w przypadku liści (tab. 4.3):

- aminokwasy, w tym trzy pochodne proliny [7, 18, 44] dwie pochodne glutaminy [34, 46], a także dwie pochodne asparaginy [37, 52] i lizynę [73],
- węglowodany: jeden kwas cukrowy – kwas treonowy [42], 3-fosfoglicerol [57], glukozę [70], jeden alkohol cukrowy – galaktinol [110], ale też inne węglowodany nie w pełni zidentyfikowane [65, 78],
- kwasy karboksylowe: kwas maleinowy [30], kwas cytrynowy [66], kwas chlorogenowy [113],
- jedną aminę: izopentyloaminę [6],
- lipidy: kwas linolowy [91] i β -sitosterol [114],
- inne związki organiczne: alantoinę [71] i fosforan metylu [8],
- inne związki o dotychczas nie przypisanych identyfikacjach [81, 96, 99, 103, 108, 109, 111].

Z kolei w korzeniu dla czterech badanych genotypów efekt interakcji wykazywały (tab. 4.4):

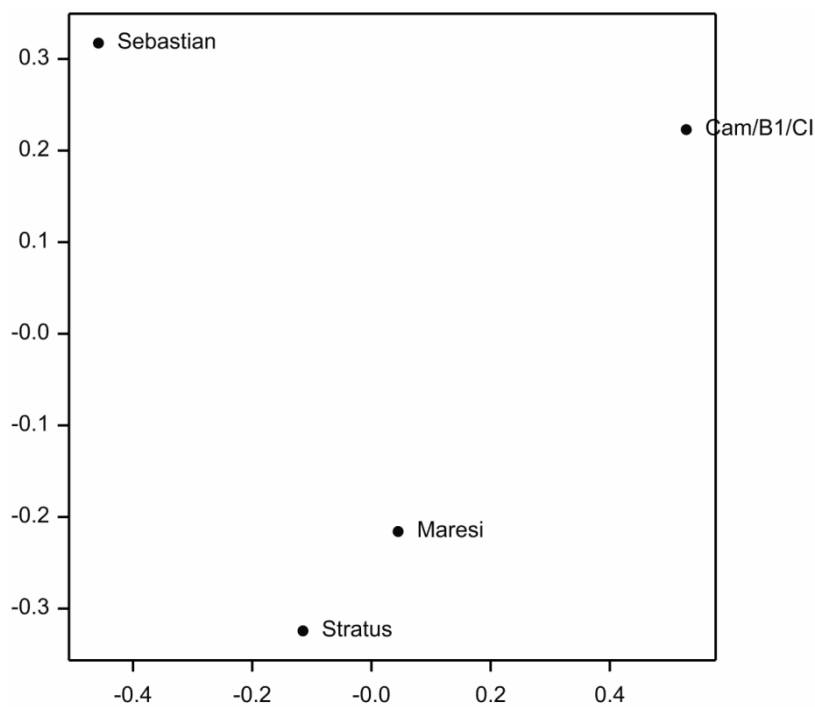
- aminokwasy: alanina [28], kwas asparaginowy [38], GABA [40],
- węglowodany: kwas rybonowy [56], związek podobny do pochodnej fruktozy [65], glukoza [70], glicerolo-fosfoglicerol [90], galaktinol [110],
- lipidy: kwas palmitynowy [82] i ester metylowy kwasu linolowego [86], a także
- fosforan metylu [8], etanoloamina [13], kwas bursztynowy [22] oraz związki nieznane [81, 99].

Ponadto zaobserwowano zróżnicowane zmiany poziomów akumulacji metabolitów w odpowiedzi na stres niedoboru wody pomiędzy czterema badanymi genotypami (tab. S.3). Pod wpływem suszy około 50 metabolitów obecnych w liściach siewek jęczmienia odmian europejskich (Maresi, Sebastian, Stratus) nie zmieniło swojego poziomu. Z kolei w syryjskiej

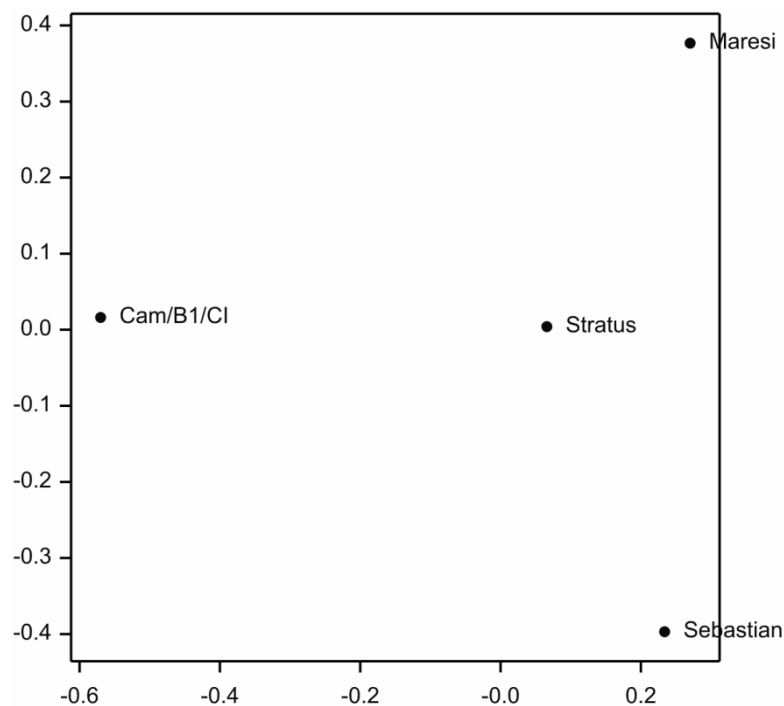
linii hodowlanej (Cam/B1/CI) takich metabolitów, których poziom nie uległ zmianie, było więcej i grupa ta liczyła 72 związki. Zróżnicowanie to wynikało z faktu, że podczas gdy u genotypu Cam/B1/CI zaledwie 10 związków obecnych w liściu zwiększyło poziom akumulacji, dla odmian europejskich grupa metabolitów, których zawartość w warunkach suszy wzrosła była 2,5-3,5 razy większa (27 związków w Maresi, 29 w Stratusie i 37 w Sebastianie). Oprócz tego dla 12 metabolitów wykrytych w liściach odmiany Sebastian i 19 metabolitów pozostałych odmian odnotowano spadek akumulacji w warunkach suszy. Zróżnicowanie reakcji odpowiedzi pomiędzy badanymi genotypami na stres suszy odnotowano także dla metabolitów wykrytych w korzeniach siewek jęczmienia. Reakcja roślin na niedobór wody ze strony metabolitów obecnych w korzeniach w odmianach europejskich była mniejsza od reakcji metabolitów liści. Z kolei u linii Cam/B1/CI odnotowano odwrotną odpowiedź tj. większą w korzeniu niż w liściu. Brak zmian w zawartości metabolitów w wyniku działania suszy dotyczył 77-89 metabolitów odmian Maresi, Sebastian i Stratus, podczas gdy u Cam/B1/CI było to 61 metabolitów. Syryjska linia, w porównaniu z pozostałymi odmianami, charakteryzowała się także najwyższym odsetkiem metabolitów, których poziom wzrósł w korzeniu na skutek suszy (37 metabolitów). Ponadto wśród wzorów kierunku reakcji metabolitów zaobserwowano dwie grupy, po jednej w liściu i w korzeniu, w których to odpowiedź linii Cam/B1/CI na zadany stres abiotyczny była odmienna od pozostałych genotypów (tab. S.4). Podczas gdy w liściu Cam/B1/CI nie zmieniła się zawartość 12 metabolitów, w Maresi, Sebastianie i Stratusie poziom tych metabolitów wzrósł (reakcja 0_1_1_1). Podobnie w korzeniu – poziom 17-stu metabolitów na skutek deficytu wody wzrósł w linii syryjskiej, a u odmian europejskich nie uległ zmianie (reakcja 1_0_0_0). Zróżnicowanie reakcji odpowiedzi metabolitów liścia i korzenia w odmianach zobrazowano na rycinie 4.5, przedstawiającej podobieństwa i różnice pomiędzy badanymi genotypami Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian, Stratus. Odmiany podobne do siebie w reakcji na stres suszy znajdują się bliżej siebie. Najbardziej zbliżoną reakcję wykazały odmiany Maresi i Stratus, jednak podobieństwo to było widoczne jedynie w metabolitach pochodzących z liścia.

Zmiany poziomów akumulacji dwóch trisacharydów, rafinozy i 1-kestozy, które nie zostały wykryte przy użyciu TargetSearch ze względu na koelucję i duże podobieństwo widm EI, przedstawiono na ryc. 4.6. Zarówno ilość rafinozy jak i 1-kestozy wzrastała w roślinach poddanych stresowi suszy w porównaniu do roślin kontrolnych. Szczególnie znaczny wzrost 1-kestozy odnotowano w korzeniach jęczmienia odmian Maresi i Sebastian (ponad 40-krotny

a.

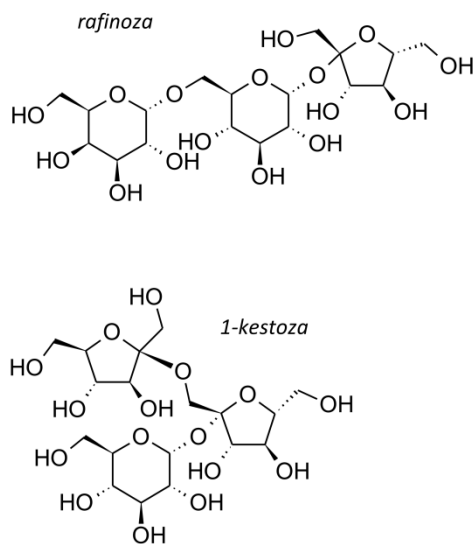


b.

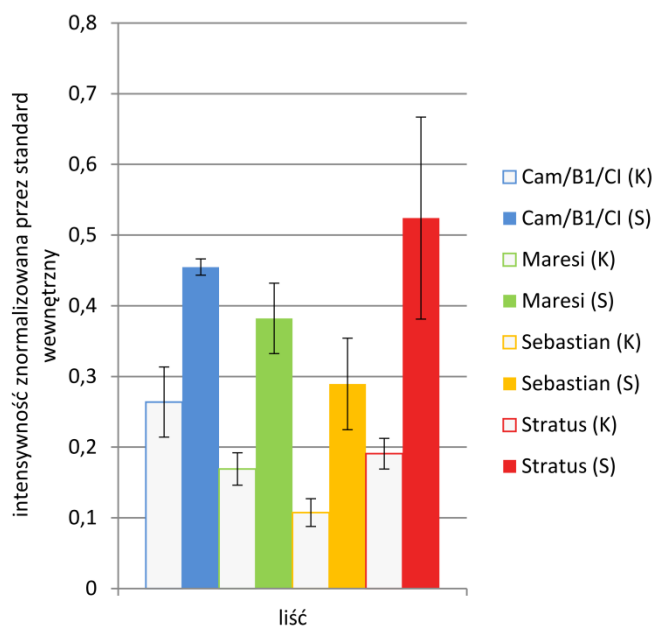


Ryc. 4.5. Analiza głównych współrzędnych (PCO, ang. *principal coordinates analysis*). Formy rodzicielskie (Maresi, Cam/B1/CI) oraz odmiany referencyjne (Sebastian, Stratus) przedstawione w płaszczyźnie pierwszych dwóch głównych współrzędnych obliczonych na podstawie efektu suszy (susza-kontrola) dla a) metabolitów liścia b) metabolitów korzenia.

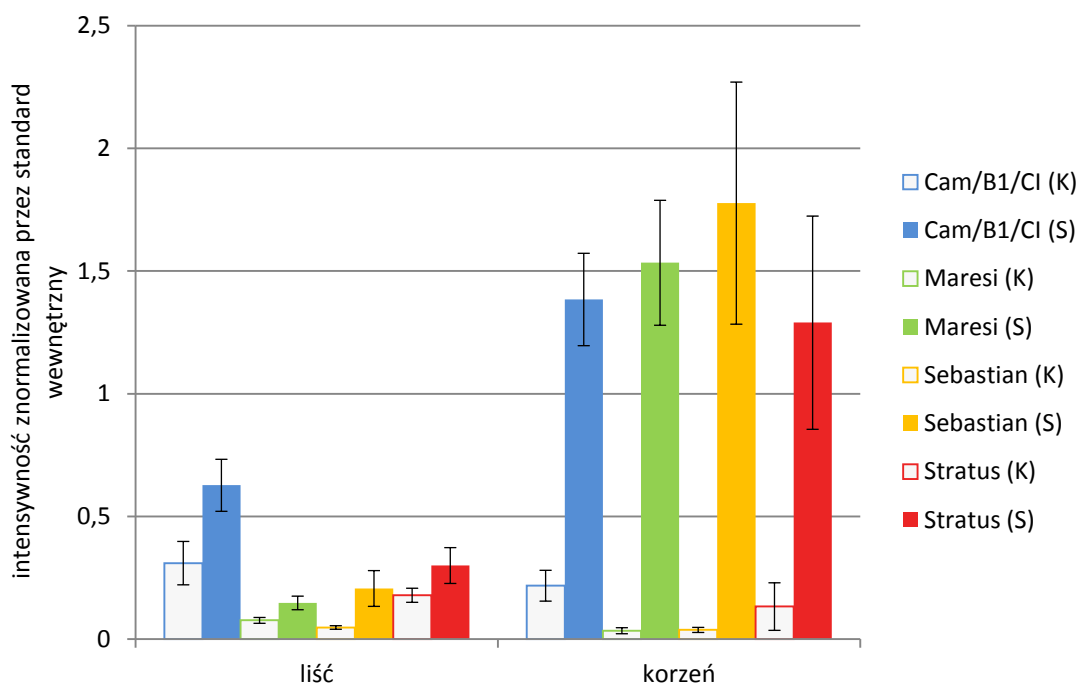
a.



b.



c.



Ryc. 4.6. Wzory strukturalne a) oraz zmiany zawartości trisacharydów: b) rafinozy, c) 1-kestozy, w warunkach deficytu wody w liściu i korzeniu siewek jęczmienia (K – kontrola, S – susza).

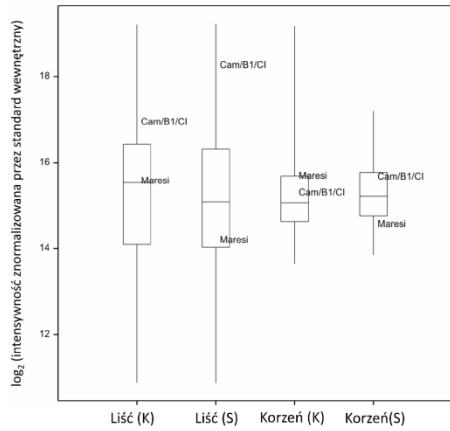
w stosunku do kontroli). Ponadto zaobserwowano różnice międzyodmianowe dotyczące poziomu tego trisacharydu w roślinach kontrolnych, tj. podwyższony poziom w Cam/B1/CI i Stratus w stosunku do pozostałych dwóch genotypów.

4.1.2.1 Analiza zmian zawartości metabolitów w liniach populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI

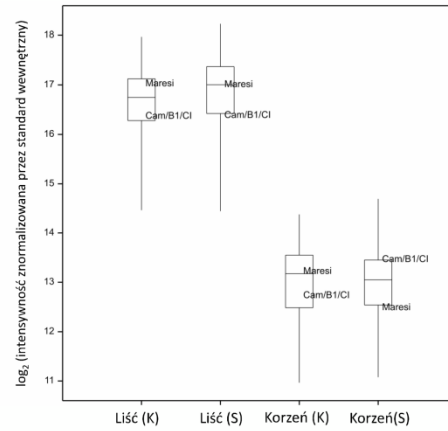
Do oceny ogólnych efektów suszy w populacji linii Maresi×Cam/B1/CI posłużono się analizą wariancji. Porównanie próbek ekstraktów liści i korzeni wykazało, że korzenie siewek jęczmienia charakteryzowały się mniejszą liczbą różnicujących metabolitów niż liście i to zarówno jeśli chodzi o liczbę związków istotnie różnicujących badane linie, a także różnicujących rośliny kontrolne od roślin poddanych stresowi suszy, jak i metabolitów wykazujących efekt interakcji Linia x Susza (L x S) (tab. S.5). Szczególnie widoczne różnice między odpowiedzią ze strony metabolomu liścia a korzenia zaobserwowano dla ostatniej cechy – efektu interakcji. Podczas gdy w korzeniach efekt interakcji wykazało 20 metabolitów, w liściach grupa tych związków była 4-krotnie większa.

Rozkład poszczególnych cech (poziomów akumulacji metabolitów) w populacji Maresi × Cam/B1/CI został zobrazowany w postaci wykresów pudełkowych z wąsami dla liści i korzeni w warunkach kontrolnych i deficytu wody (ryc. 4.7). Ponadto obliczony efekt suszy (różnica między intensywnością danego metabolitu w suszy, a jego intensywnością w tkance w warunkach kontrolnych) został przedstawiony w formie map cieplnych połączonych z dendrogramami, ukazując podobieństwo reakcji pomiędzy badanymi liniami i metabolitami pod względem odpowiedzi na zadany stres niedoboru wody (ryc. 4.8, ryc. 4.9). Mapy cieplne obrazujące poziomy akumulacji metabolitów w liściach i korzeniach w warunkach kontrolnych i deficytu wody umieszczono w załączniku (ryc. S.2 - ryc. S.5).

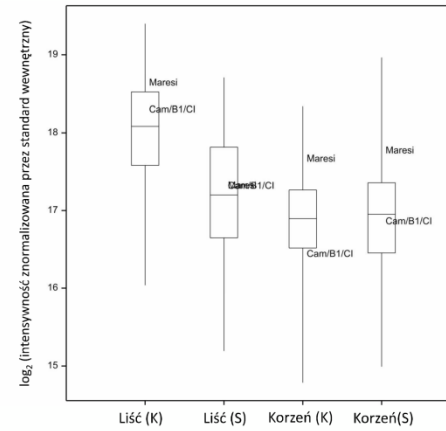
1. Kwas mlekowy* (2 TMS)



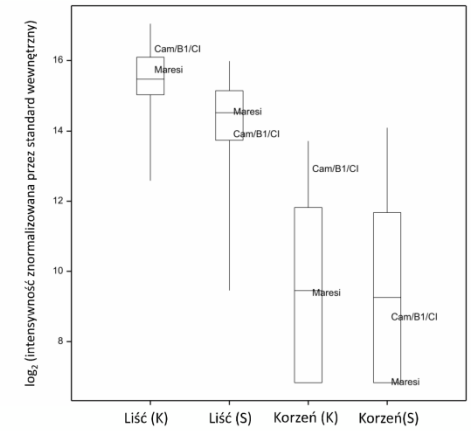
2. 2-hydroksypirydyna (1TMS)



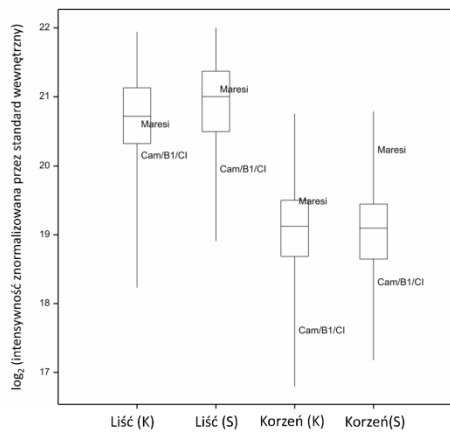
3. Alanina* (1) (2TMS)



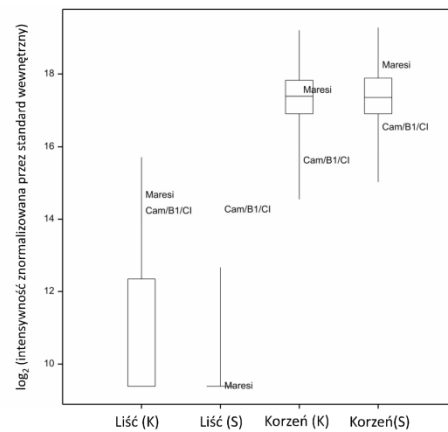
4. Hydroksyloamina (3TMS)



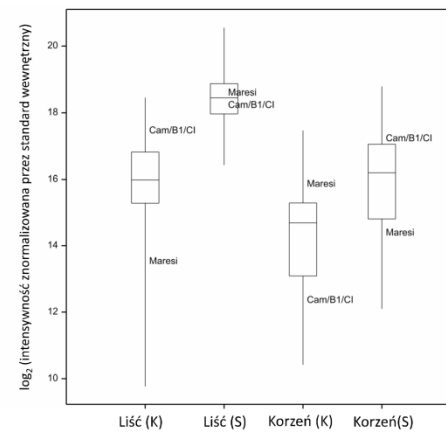
5. Kwas węglowy (1MEOX) (2TMS)



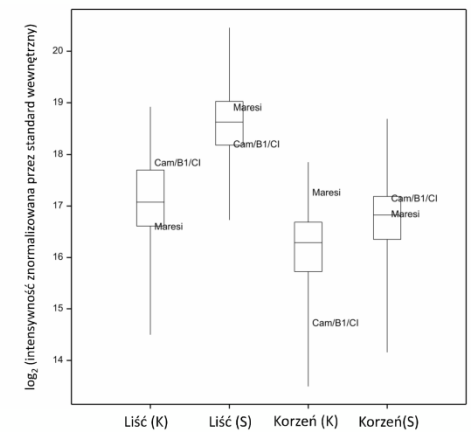
6. Izopentyloamina (2 TMS)



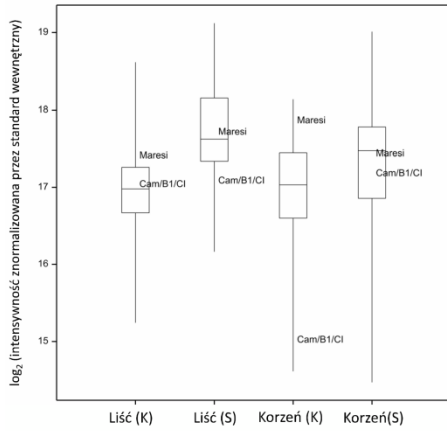
7. Prolina* (1) (1TMS)



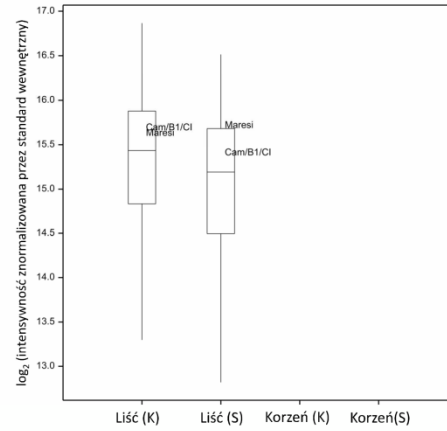
8. Fosforan metylu (2 TMS)



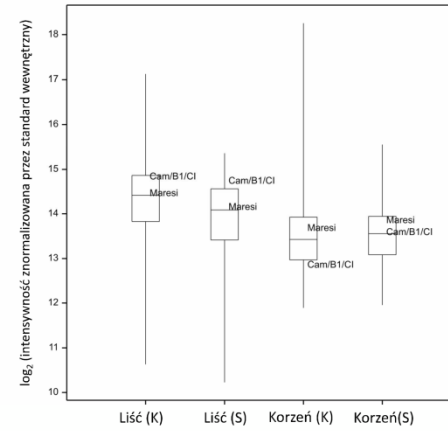
9. Walina* (2 TMS)



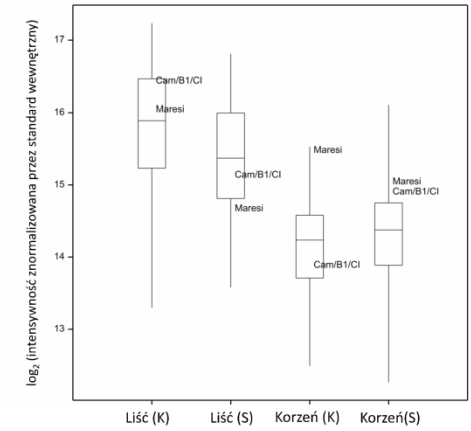
10. Kwas malonowy* (2 TMS)



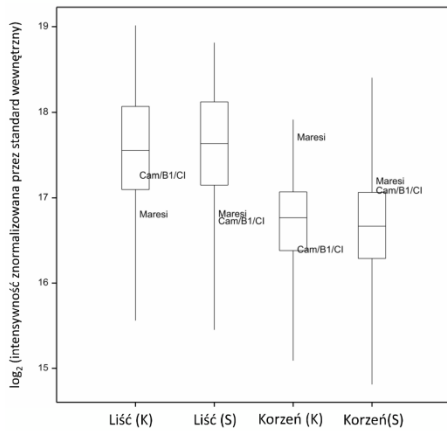
11. Mocznik* (2 TMS)



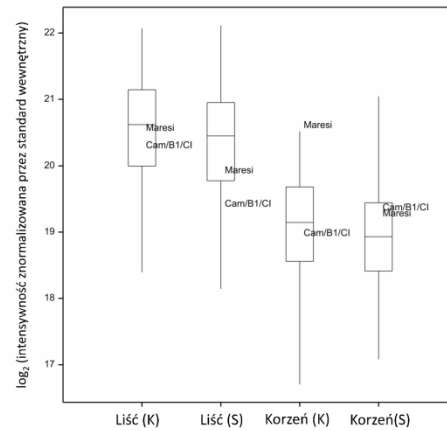
12. Seryna* (1) (2 TMS)



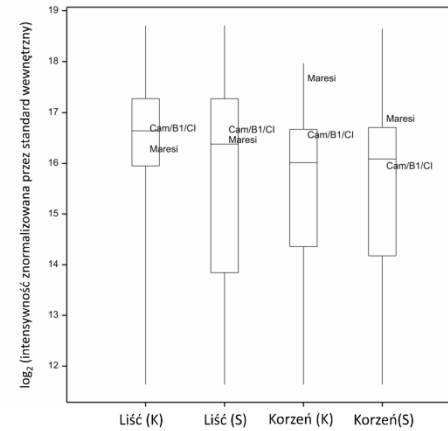
13. Etanoloamina (3 TMS)



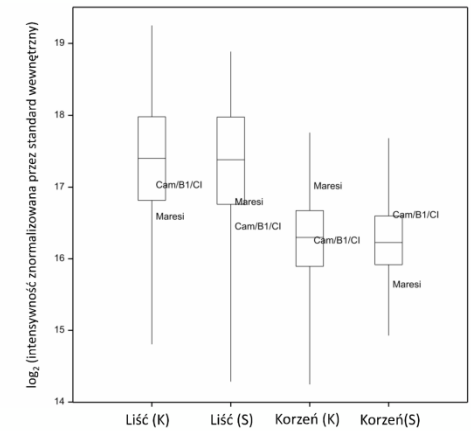
14. Kwas fosforowy (3 TMS)



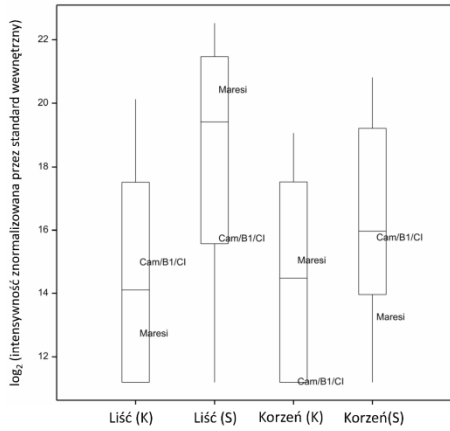
15. Leucyna* (2 TMS)



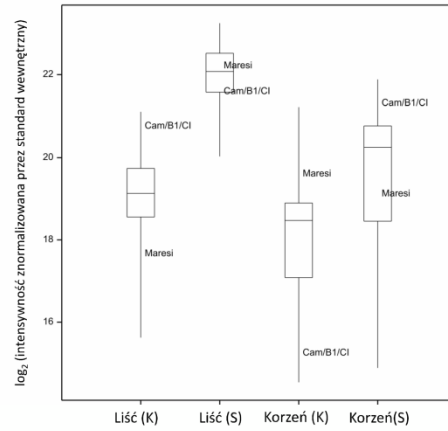
16. Glicerol (3 TMS)



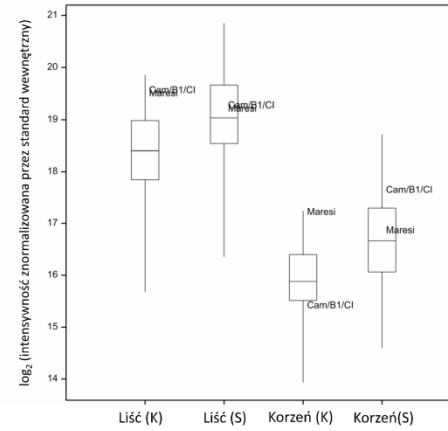
17. Izoleucyna* (2 TMS)



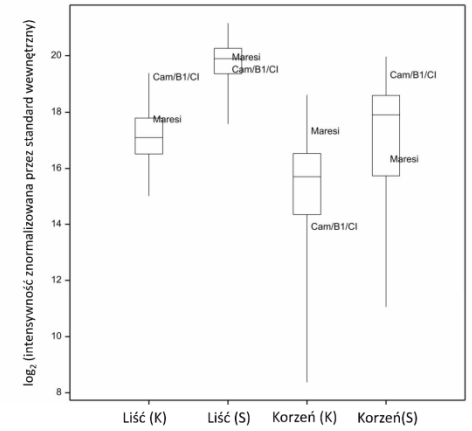
18. Prolina* (2) (2 TMS)



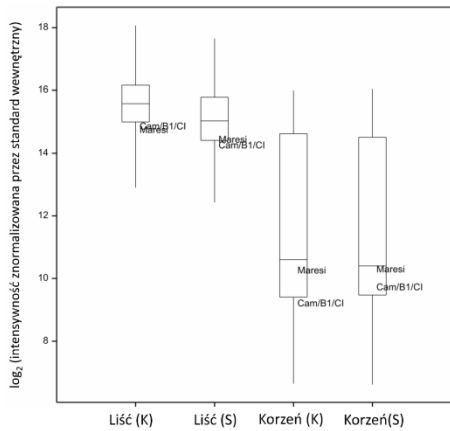
19. Glicyna* (3 TMS)



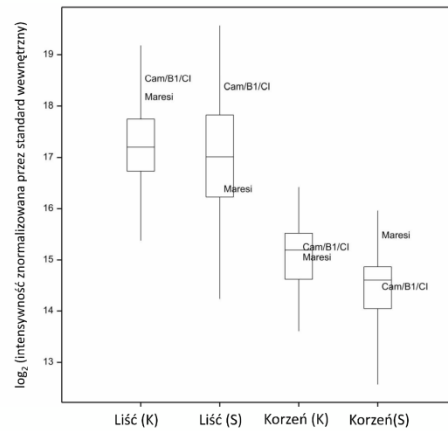
20. Kwas maleinowy* (2 TMS)



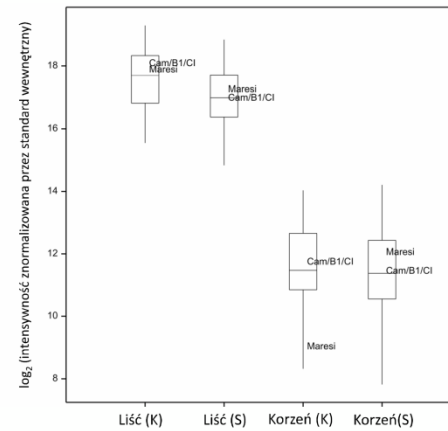
21. Lumichrom (2 MeOX)



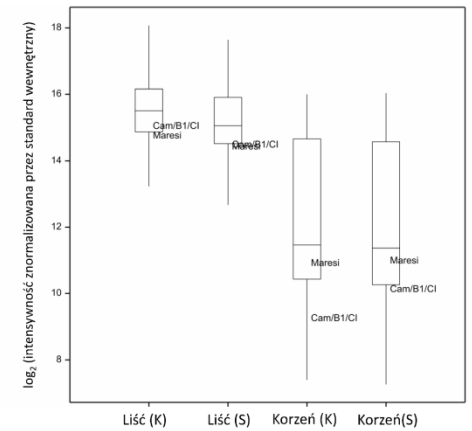
22. Kwas bursztynowy* (2 TMS)



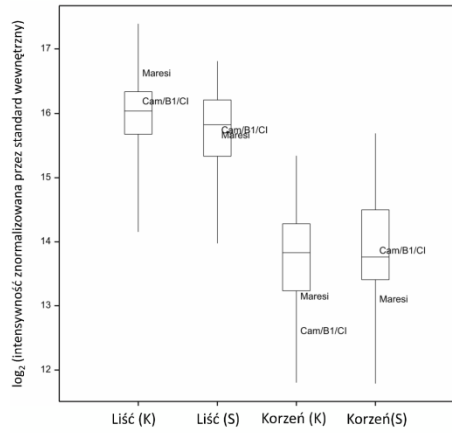
23. Kwas glicerynowy (3 TMS)



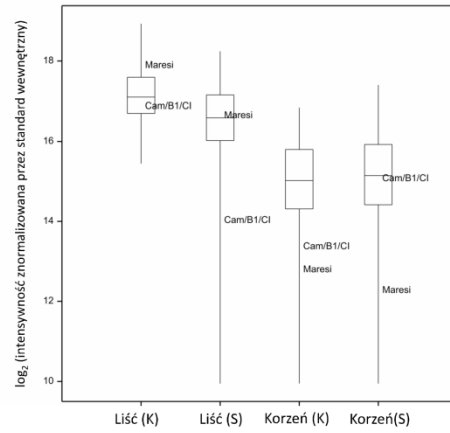
24. Zw. podobny do lumichromu (2 MeOX)



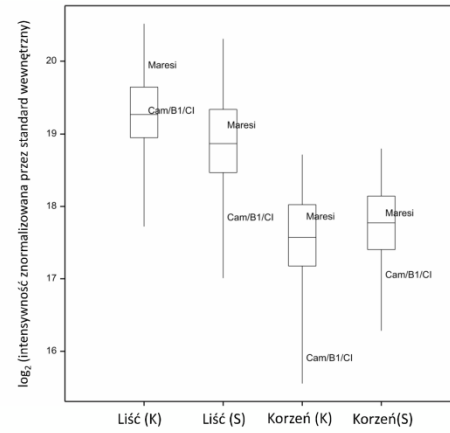
25. Kwas fumarowy* (2 TMS)



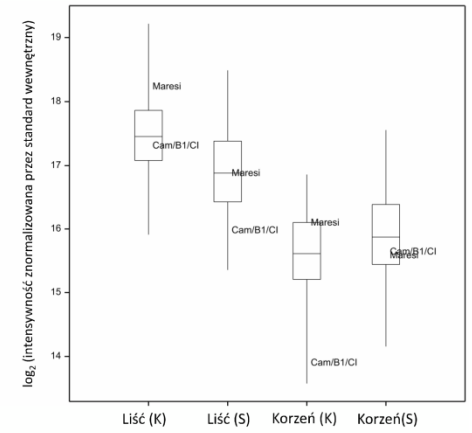
26. Kwas pipekolinowy (2 TMS)



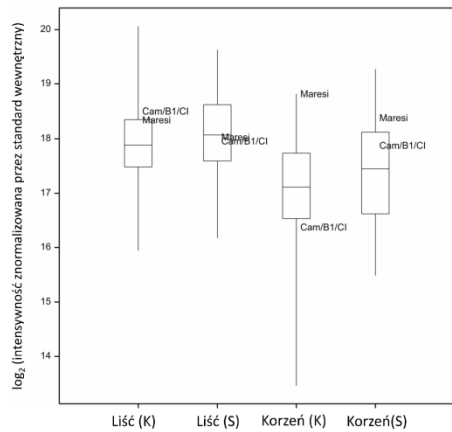
27. Seryna* (2) (3 TMS)



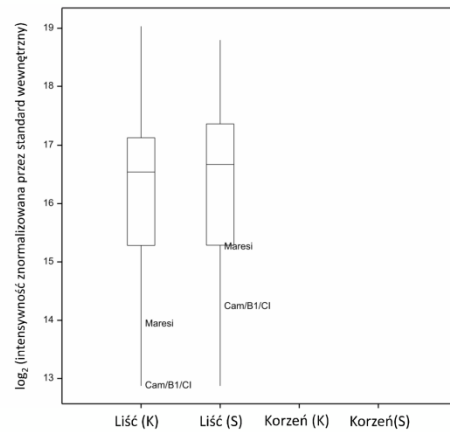
28. Alanina* (2) (3 TMS)



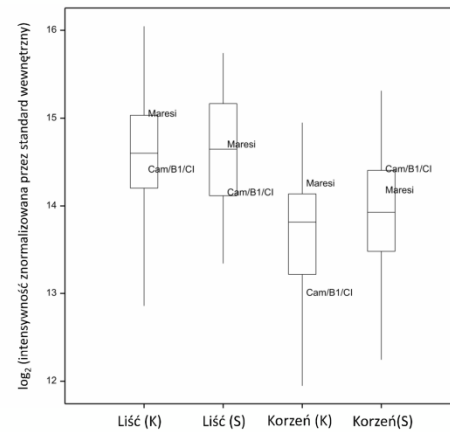
29. Treonina* (3 TMS)



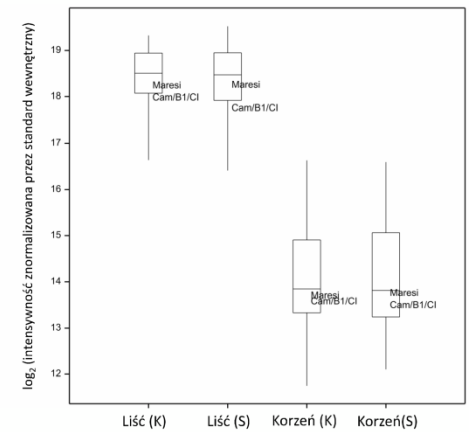
30. Treono-1,4-lakton (2 TMS)



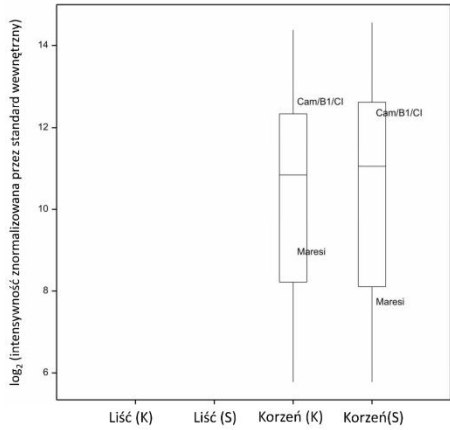
31. β-alanina* (3 TMS)



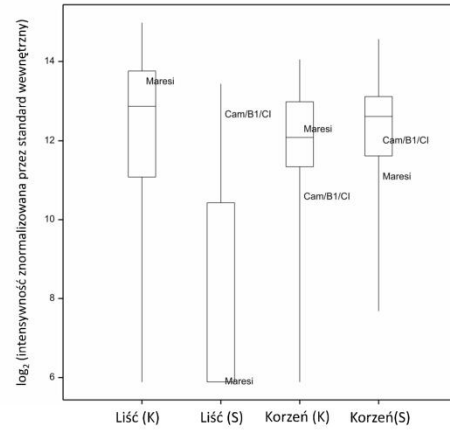
32. A144004



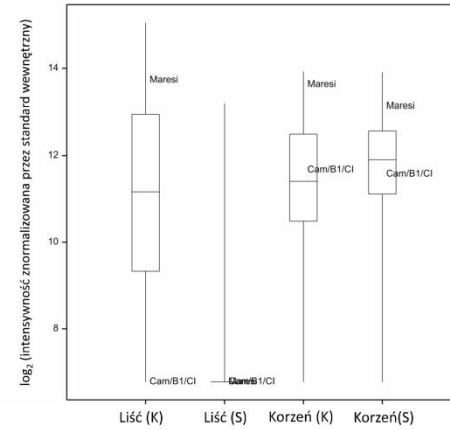
33. A145015



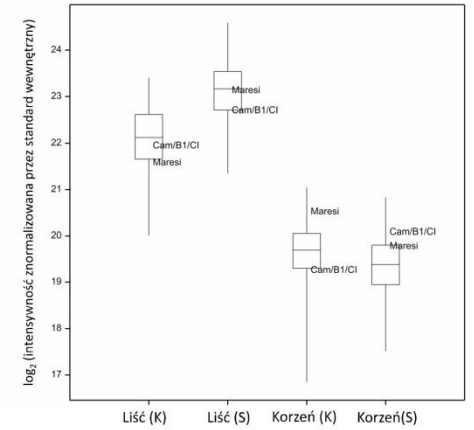
34. Glutamina* (1) [-H₂O](2 TMS)



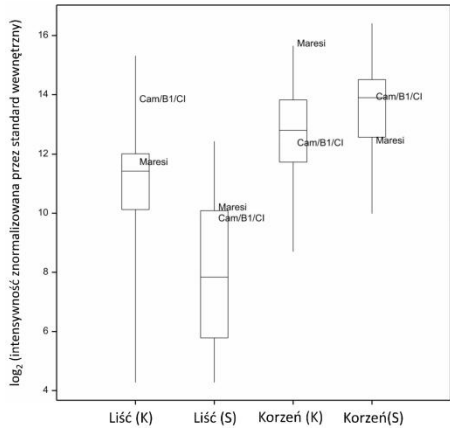
35. A148003



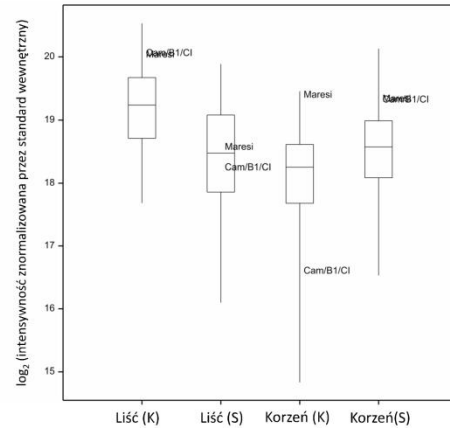
36. Kwas jabłkowy* (3 TMS)



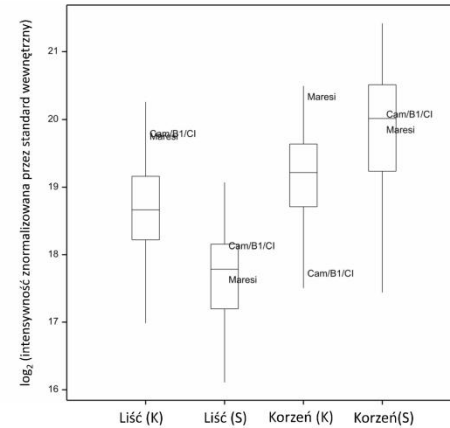
37. Asparagina* (1) [-H₂O] (2 TMS)



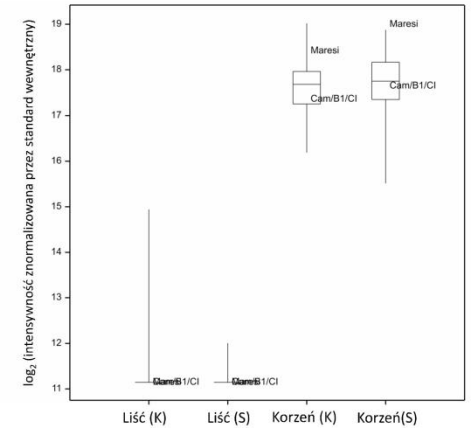
38. Kwas asparaginowy* (1) (3 TMS)



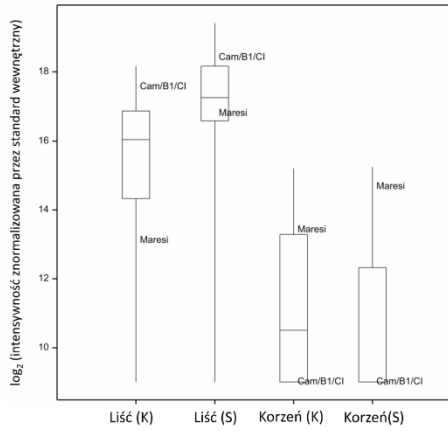
39. Kwas piroglutaminowy* (2 TMS)



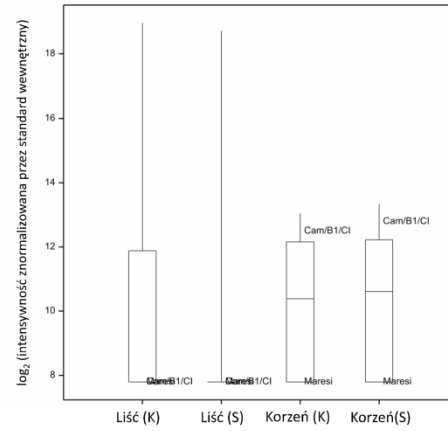
40. Kwas γ-aminomasłowy* (3 TMS)



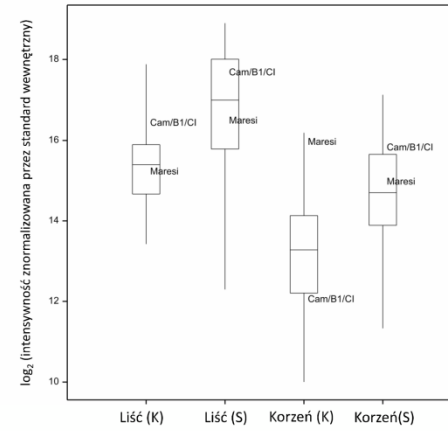
41. Kwas erytronowy (4 TMS)



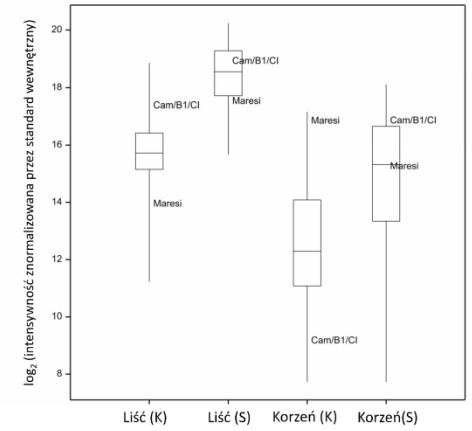
42. Kwas treonowy (4 TMS)



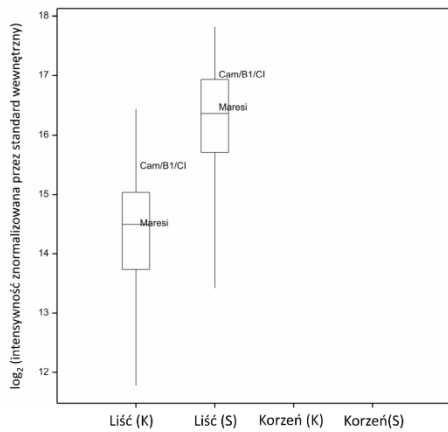
43. Kwas α-ketoglutary* (1 MeOX 2 TMS)



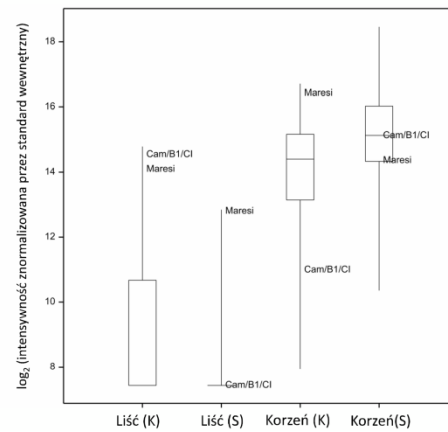
44. Prolina* (3) [+CO₂] (2 TMS)



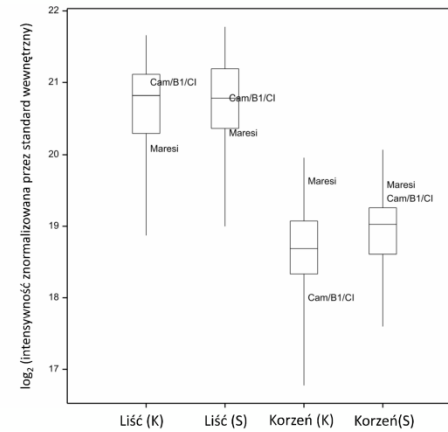
45. A159003



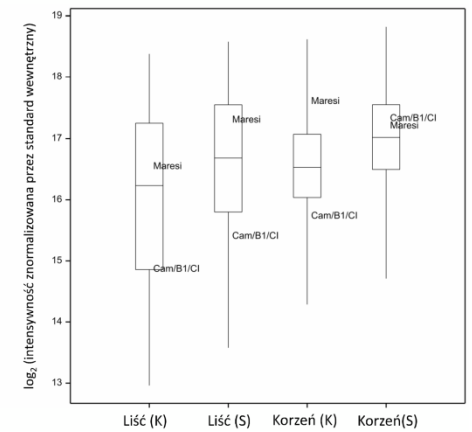
46. Glutamina* (2) [-H₂O] (3 TMS)



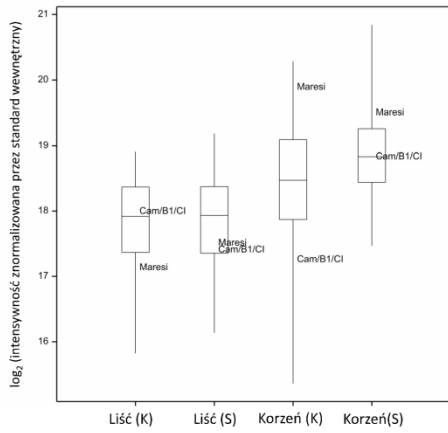
47. Kwas glutaminowy* (1) (3 TMS)



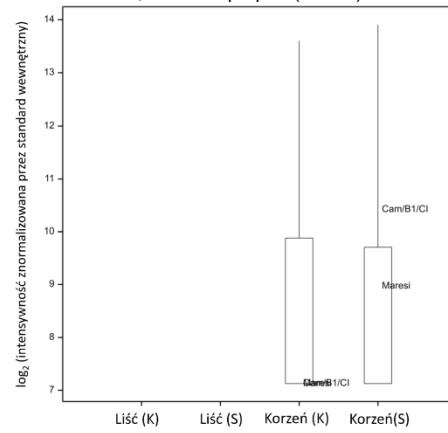
48. Fenyloalanina* (2 TMS)



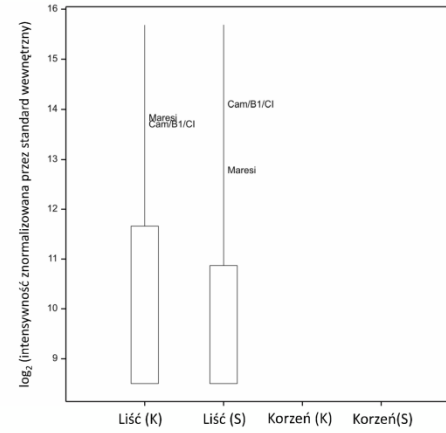
49. Asparagina* (3) (4 TMS)



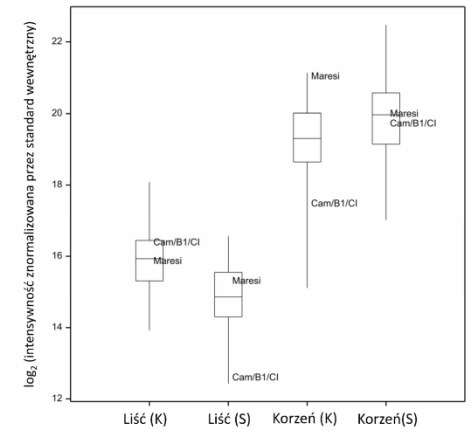
50. 1,3-diaminopropan (4 TMS) / 1,2-diaminopropan (4 TMS)



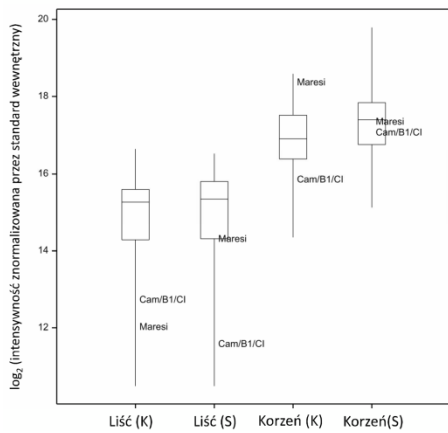
51. Ksyloza* (2) (1 MeOX 4 TMS)



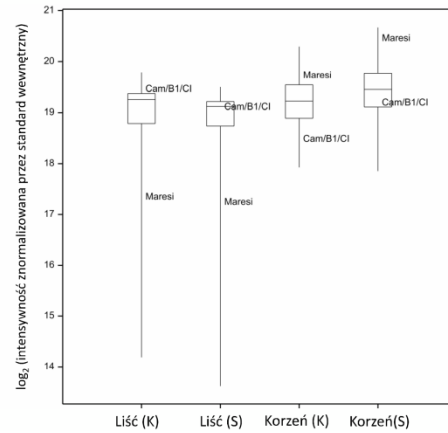
52. Asparagina* (4) (3 TMS)



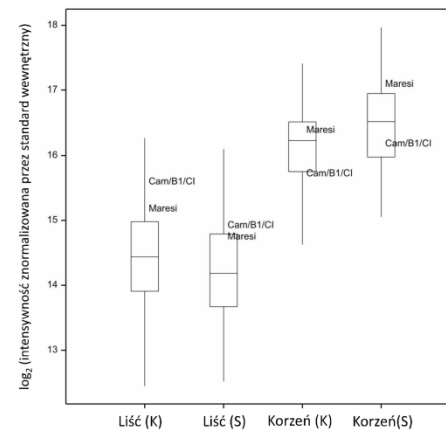
53. Ryboza* (1 MeOX 4 TMS)



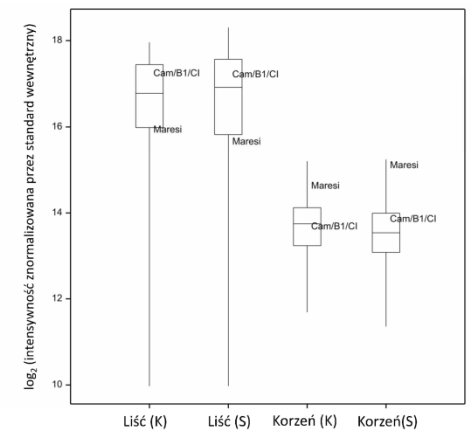
54. Glutamina* (3) (4 TMS)



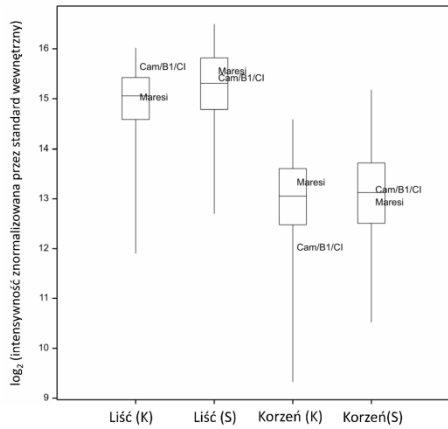
55. Putrescyna* (4 TMS)



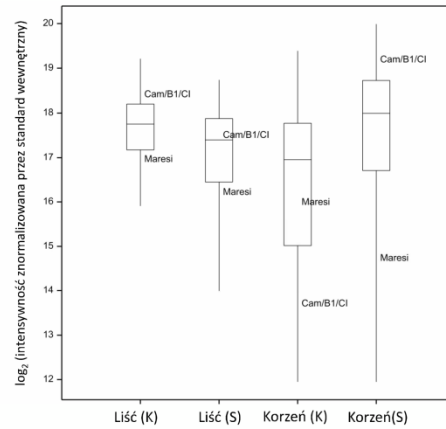
56. Kwas rybonowy (5 TMS)



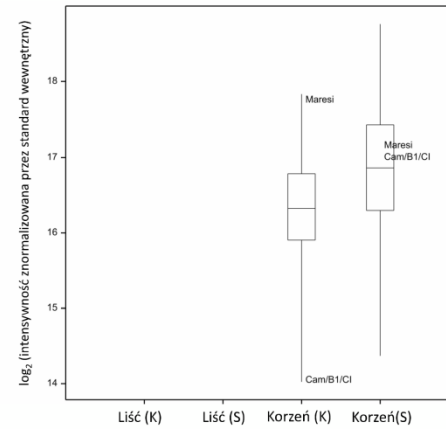
57. 3-fosfoglicerol (4 TMS)



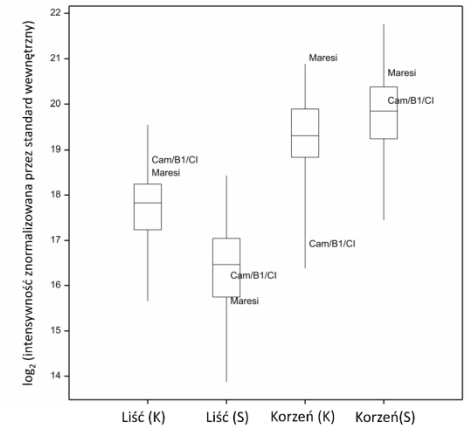
58. Glukopiranoza [H_2O] (4TMS)



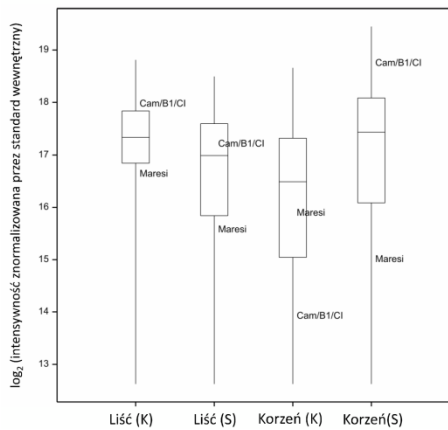
59. Fosforan etanoloaminy (4 TMS)



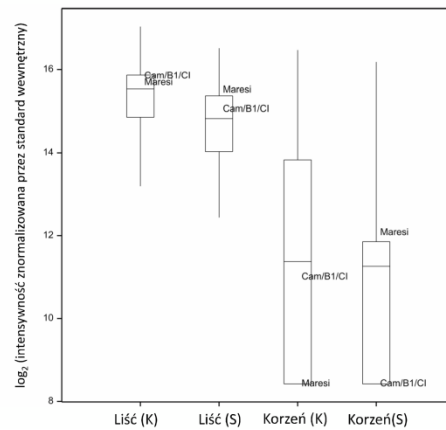
60. Glutamina* (4) (3 TMS)



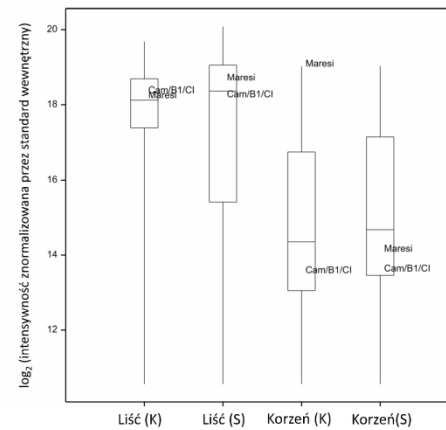
61. A178003



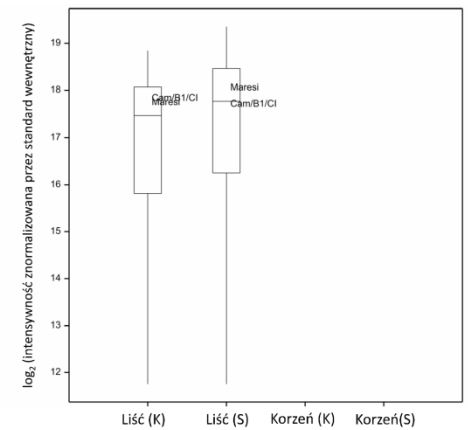
62. A179010



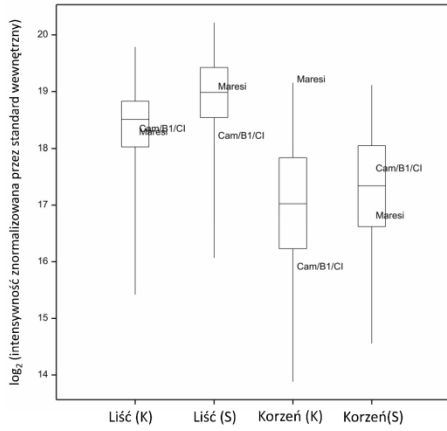
63. Zw. podobny do pochodnej fruktozy



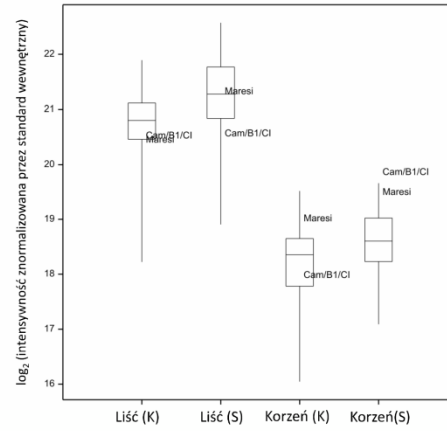
64. Kwas szkimowy (4 TMS)



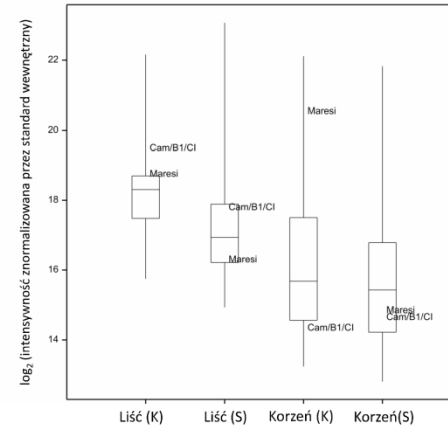
65. Zw. podobny do pochodnej fruktozy



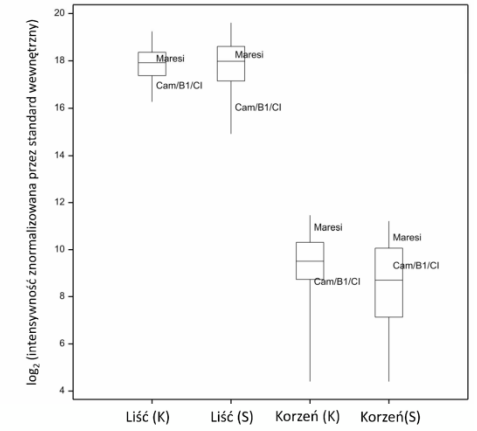
66. Kwas cytrynowy* (4 TMS)



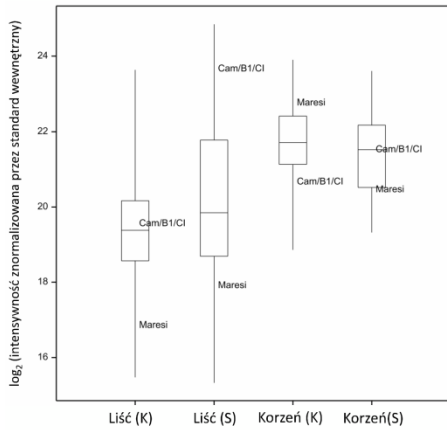
67. Kwas chinowy* (5 TMS)



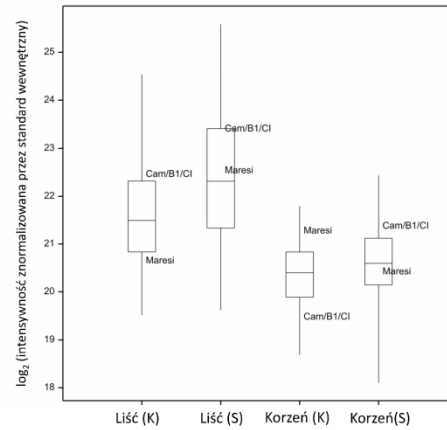
68. Dimer kwasu dehydroaskorbinowego (2 MeOX)



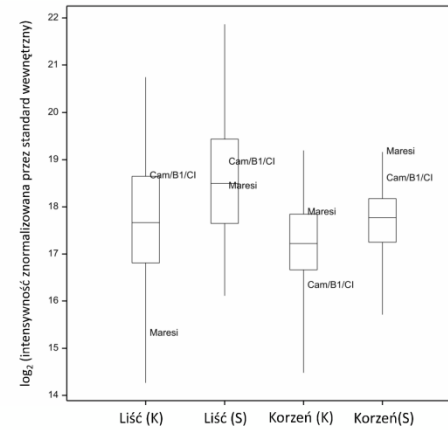
69. Fruktaza* (1) (1 MeOX 5 TMS)



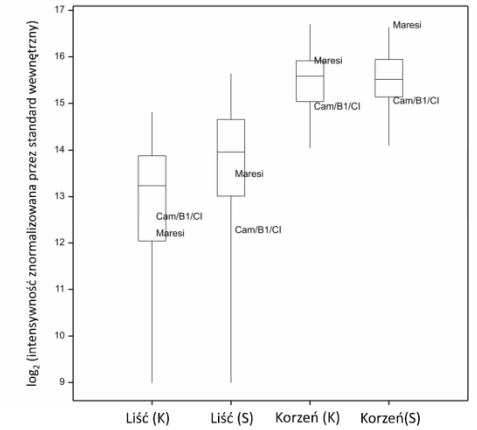
70. Glukoza* (1) (1 MeOX 5 TMS)



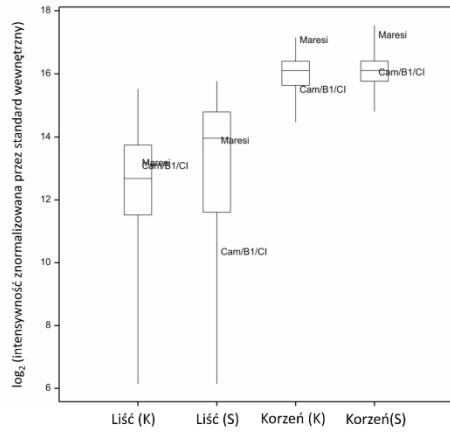
71. Alantoina (1) (4 TMS)



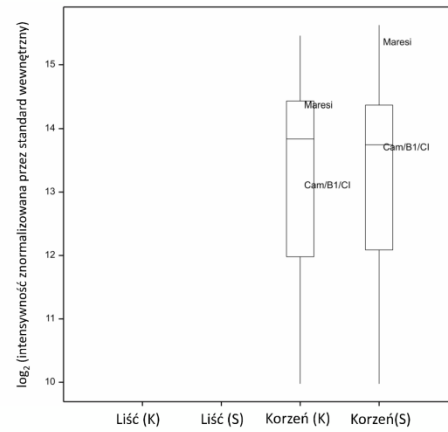
72. Tyramina* (3 TMS)



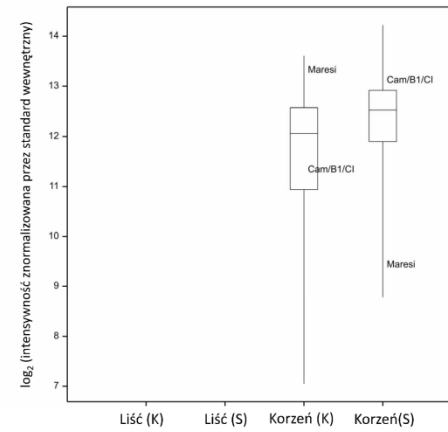
73. Lizyna* (4 TMS)



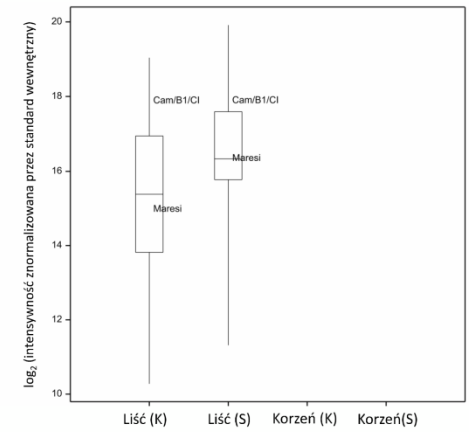
74. Tyrozyna* (3 TMS)



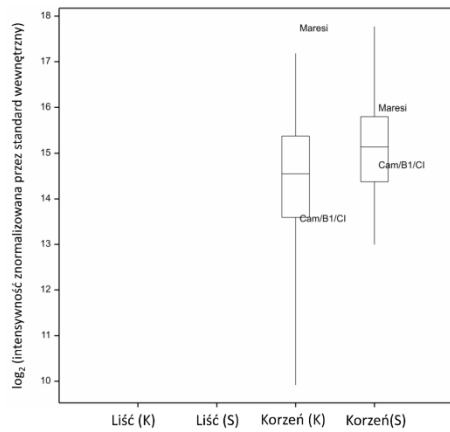
75. Kwas p-kumarowy* (2 TMS)



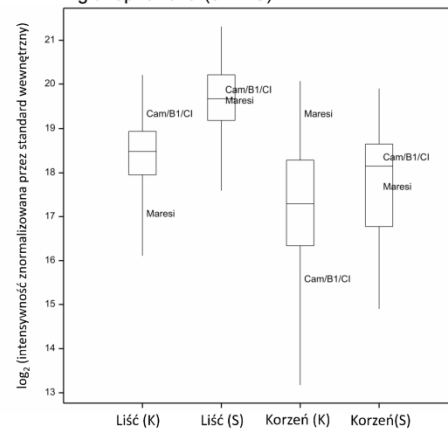
76. Kwas askorbinowy* (4 TMS)



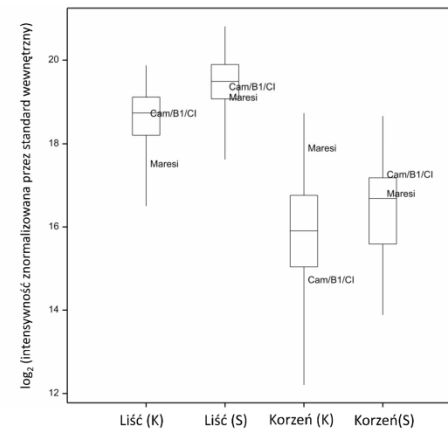
77. Asparagina* (5) [+CO₂] (4 TMS)



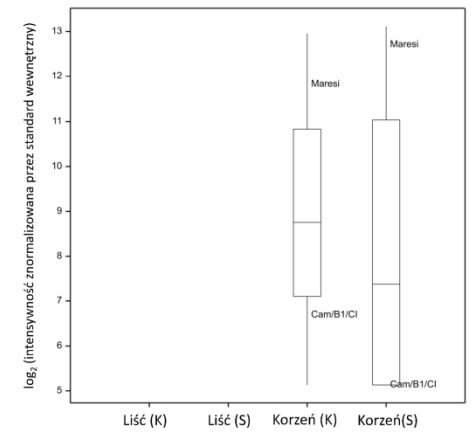
78. zw. podobny do glukopiranozy (5 TMS) / glukopiranoza (5 TMS)



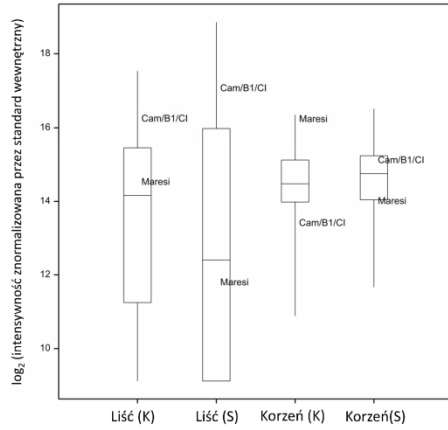
79. A197007



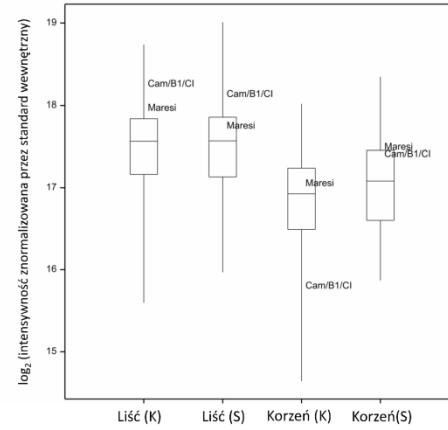
80. A199003



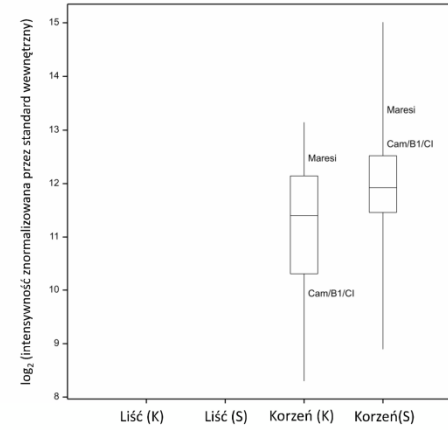
81. A203003



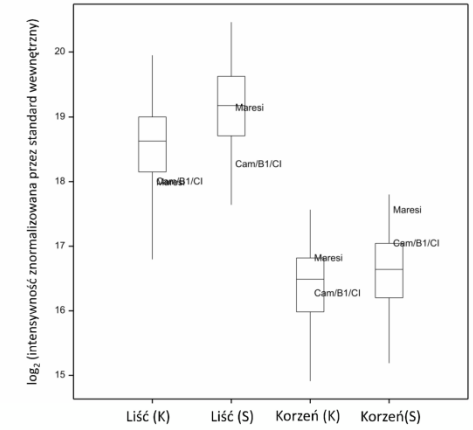
82. Kwas palmitynowy* (1 TMS)



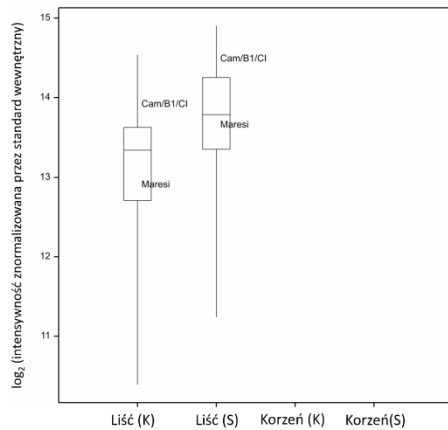
83. Alantoina (2) (3 TMS)



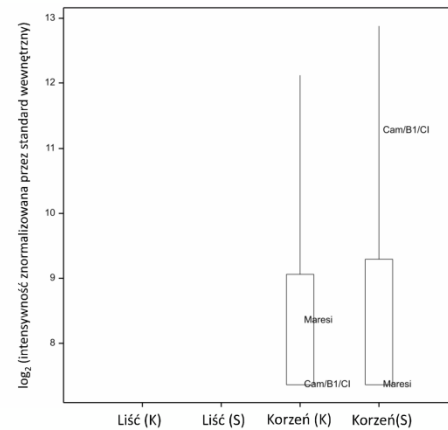
84. Mio-inozytol* (6 TMS)



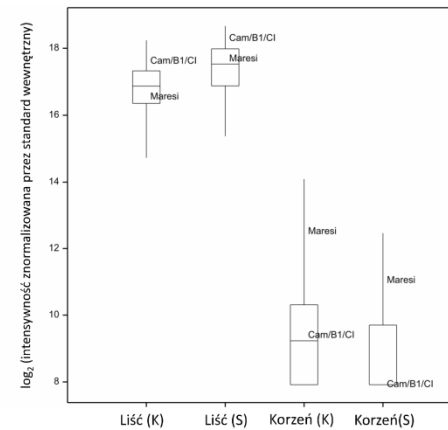
85. Kwas trans-ferulowy* (2 TMS)



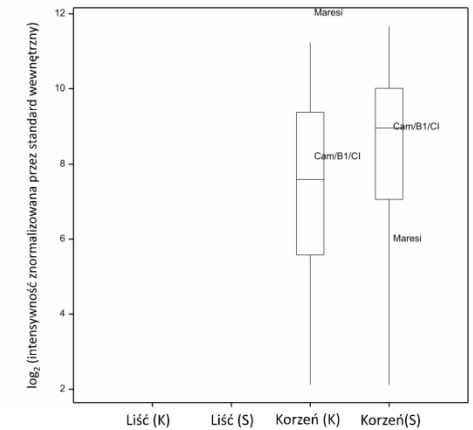
86. Ester metylowy kwasu linolowego



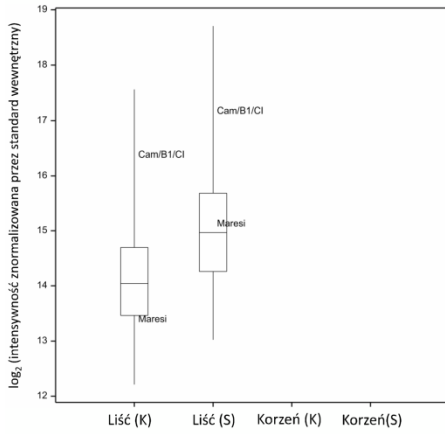
87. A211001



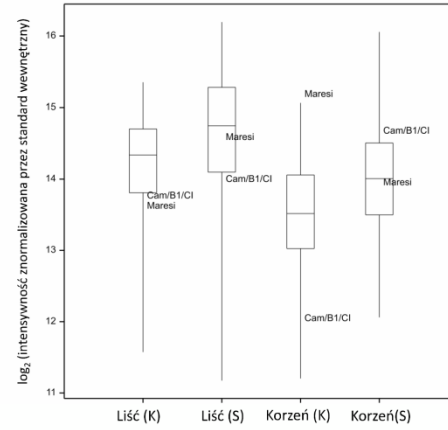
88. Histydyna* (4 TMS)



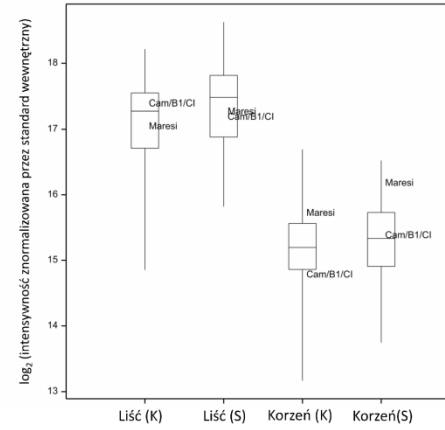
89. A217007



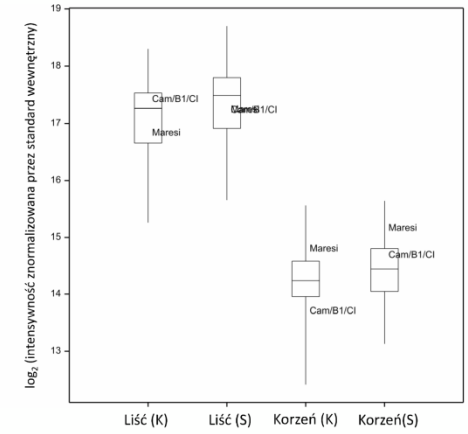
90. Glicerolo-fosfoglicerol (5 TMS)



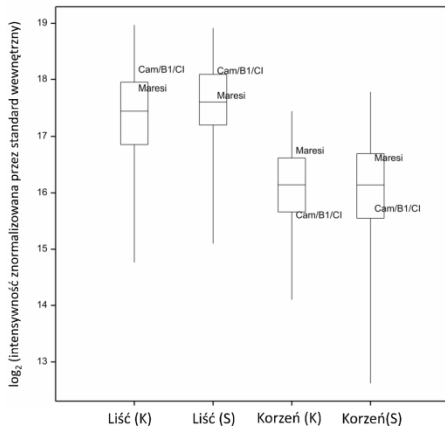
91. Kwas linolowy* (1 TMS)



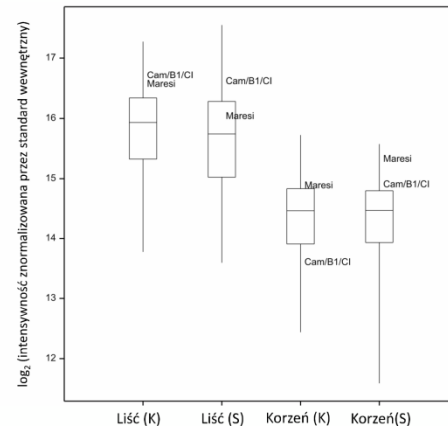
92. Kwas α-linolenowy* (1 TMS)



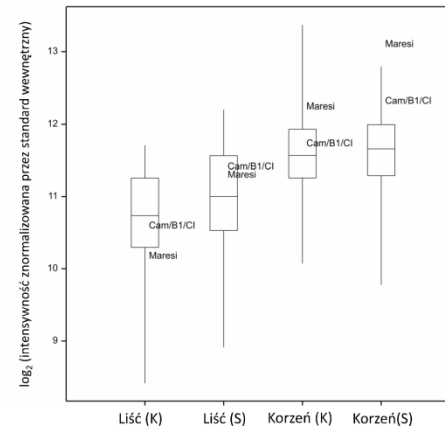
93. Tryptofan* (3 TMS)



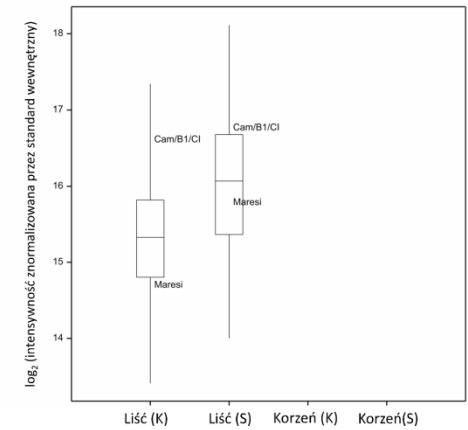
94. Kwas stearynowy* (1 TMS)



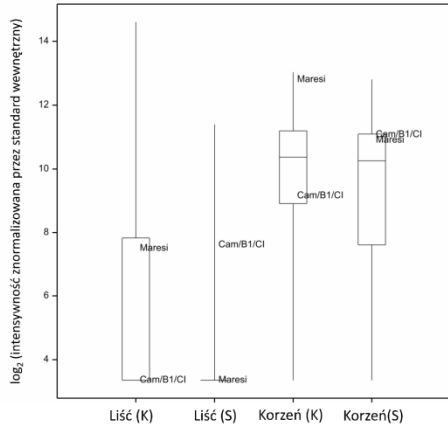
95. A228001



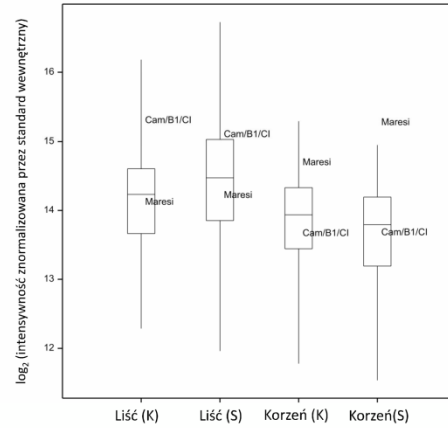
96. Zw. podobny do glicerolo-aldo-piranozydu (6 TMS)



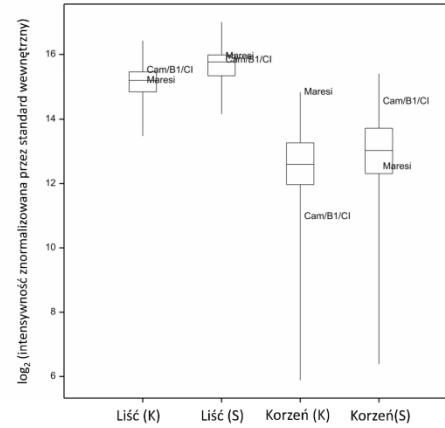
97. Fruktozo-6-fosforan* (1 MeOX 6 TMS)



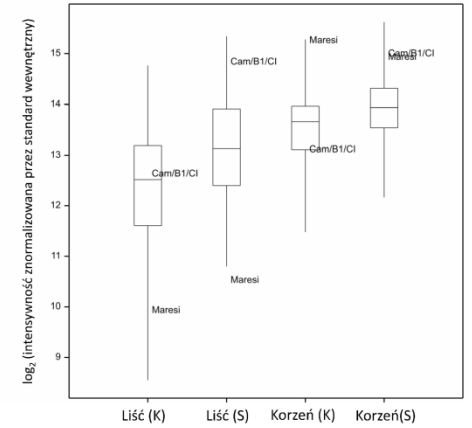
98. Glukoza-6-fosforan* (1 MeOX 6 TMS)



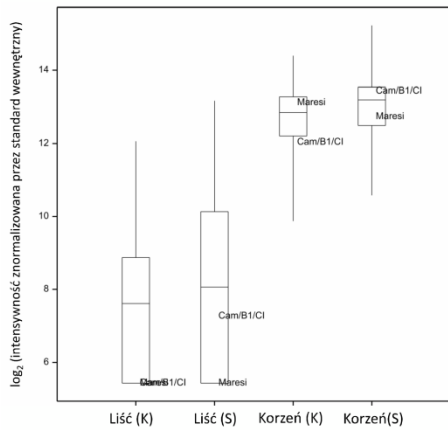
99. A236005



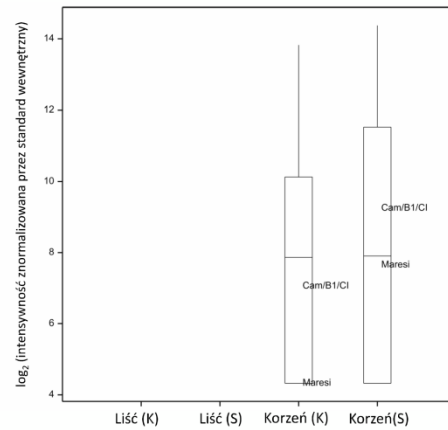
100. A237001



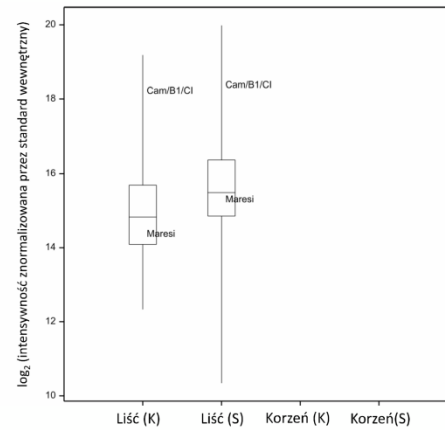
101. Mio-inozytolo-2-fosforan (7 TMS)



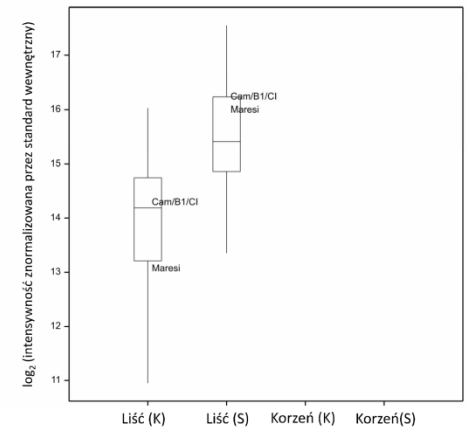
102. 5-hydrokсыtryptamina (4 TMS)



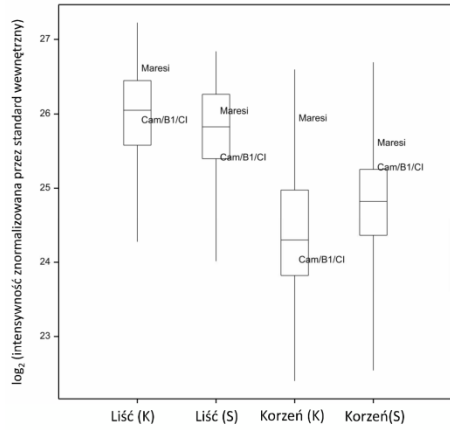
103. A250001



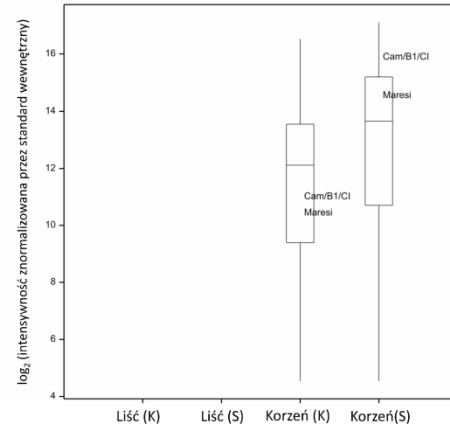
104. A254002



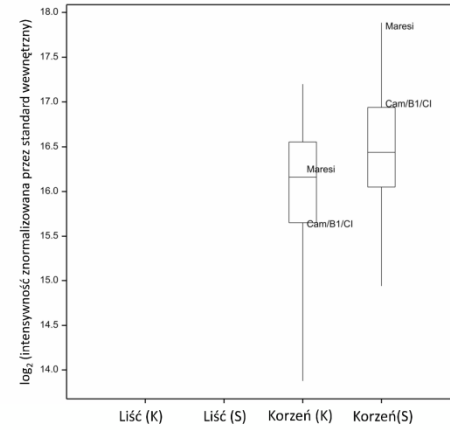
105. Sacharoza* (8 TMS)



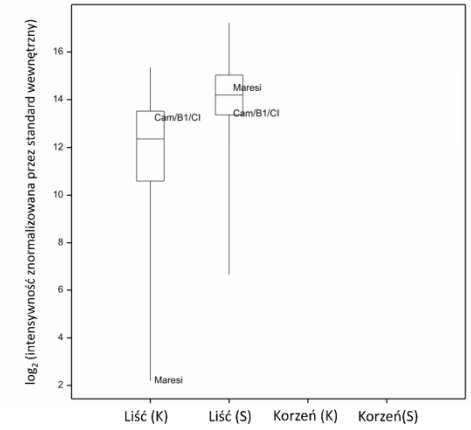
106. A270003



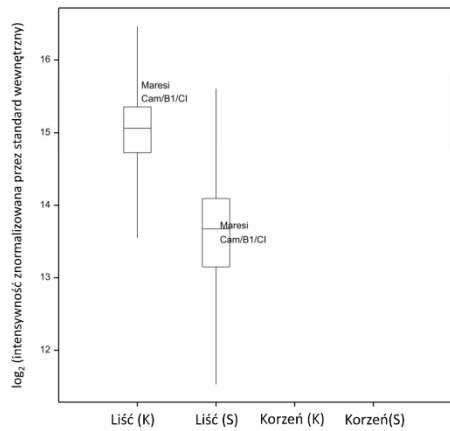
107. Trehaloza* (8 TMS)



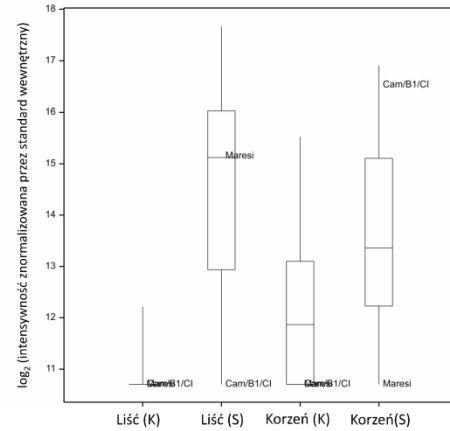
108. A281001



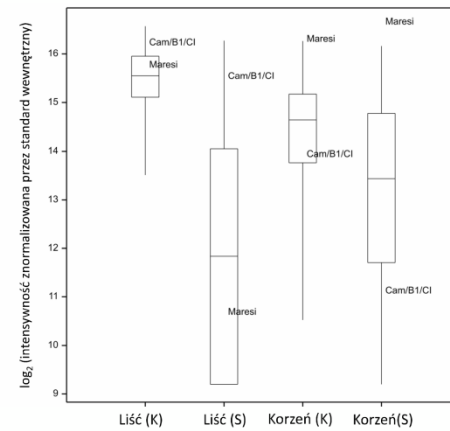
109. A296003



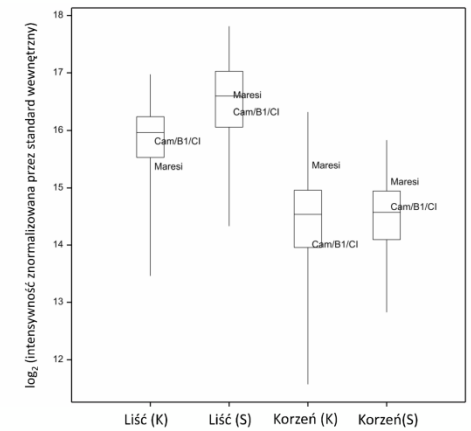
110. Galaktinol (9 TMS)

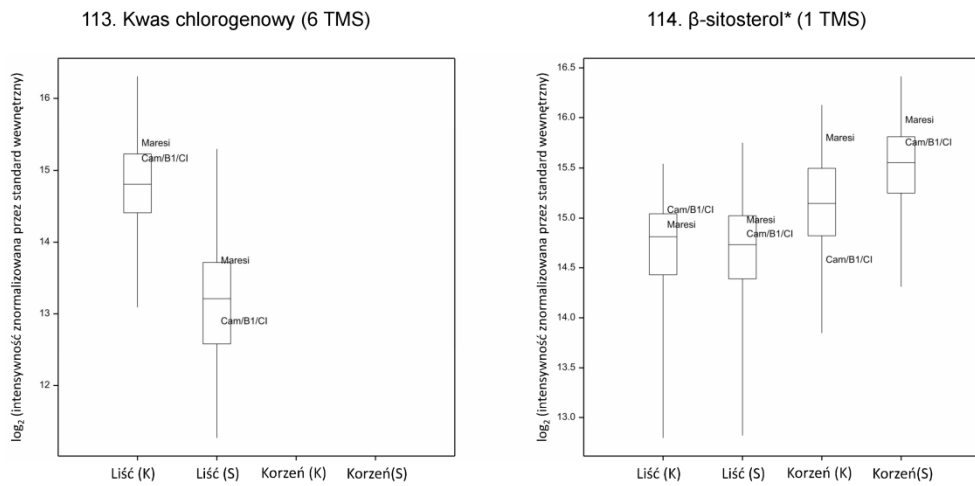


111. A300001

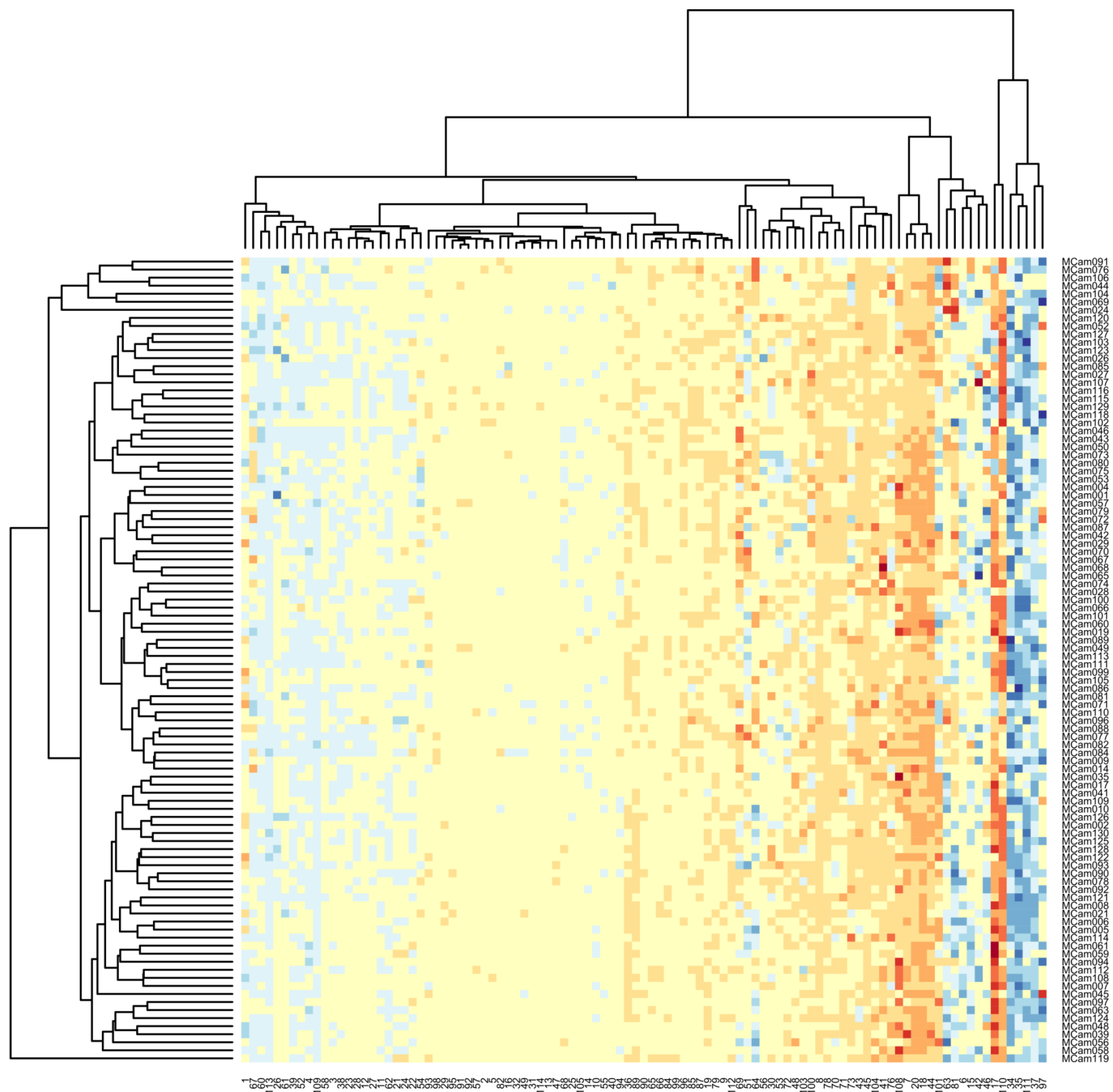


112. A311002

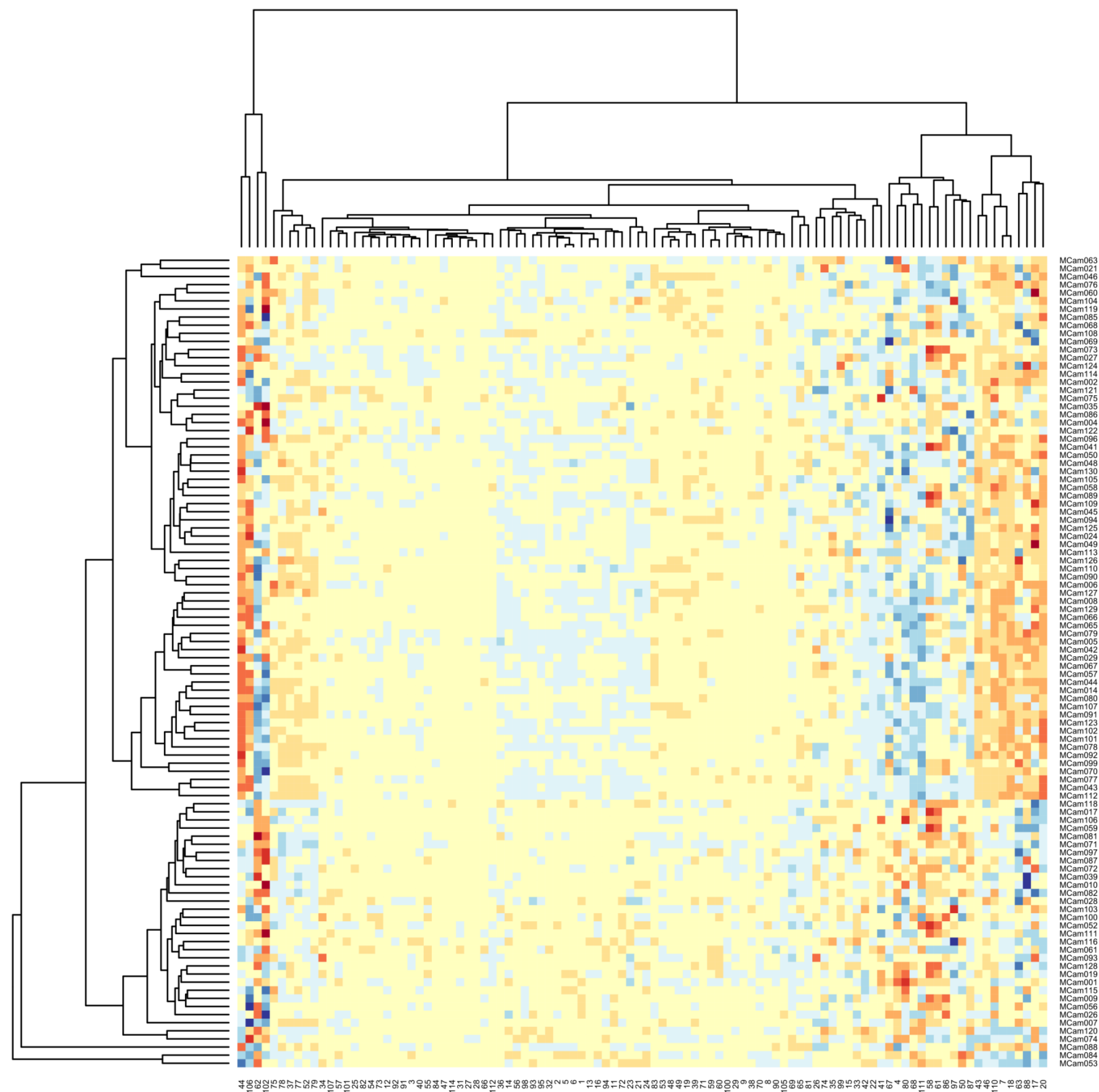





Ryc. 4.7. Rozkład poziomów akumulacji metabolitów w liściach i korzeniach linii populacji Maresi \times Cam/B1/CI, w warunkach kontrolnych i deficytu wody (K – kontrola, S – susza). Dodatkowo na wykresach zaznaczono wartości intensywności poszczególnych metabolitów dla genotypów rodzicielskich Maresi i Cam/B1/CI.



Ryc. 4.8. Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca efekt suszy w liściach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI. W kolumnie po prawej linie jęczmienia ponumerowane od 1 do 130. W dolnym wierszu numeracja metabolitów zgodna z tab. 4.2. Każdy kwadrat odpowiada różnicy pomiędzy wartością średnią intensywności danego metabolitu w suszy a wartością średnią intensywności tego metabolitu w kontroli. Skala kolorów zależna od wartości: od niebieskiego dla najniższych do czerwonego dla najwyższych .



Ryc. 4.9. Mapa ciepłna wraz z dendrogramami obrazująca efekt suszy w korzeniach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI. W kolumnie po prawej linie jęczmienia ponumerowane od 1 do 130. W dolnym wierszu numeracja metabolitów zgodna z tab. 4.2. Każdy kwadrat odpowiada różnicy pomiędzy wartością średnią intensywności danego metabolitu w suszy a wartością średnią intensywności tego metabolitu w kontroli. Skala kolorów zależna od wartości: od niebieskiego dla najniższych do czerwonego dla najwyższych .

4.2 Analiza związków wyizolowanych z powierzchni liści jęczmienia

4.2.1. Analiza jakościowa

Identyfikację związków obecnych na powierzchni liści przeprowadzono dla roślin form rodzicielskich Maresi i Cam/B1/CI. Wykrytym związkom przypisano nazwy na podstawie porównania otrzymanych widm z widmami zarejestrowanymi dla związków referencyjnych oraz widmami zdeponowanymi w bazach danych, a także na podstawie charakterystycznych wzorów fragmentacji poszczególnych klas związków.

W ekstraktach metabolitów z powierzchni liści dla obu genotypów wykryto 35 związków, z czego: 9 zostało w pełni zidentyfikowanych (obecność potwierdzona związkiem referencyjnym), 20 adnotowanych (na podstawie fragmentacji i informacjach zawartych w bazach danych), 6 związkom nie udało się przypisać nazw (tab. 4.5). Wśród wykrytych związków zaobserwowano przede wszystkim alkanony, alkanole i kwasy tłuszczowe.

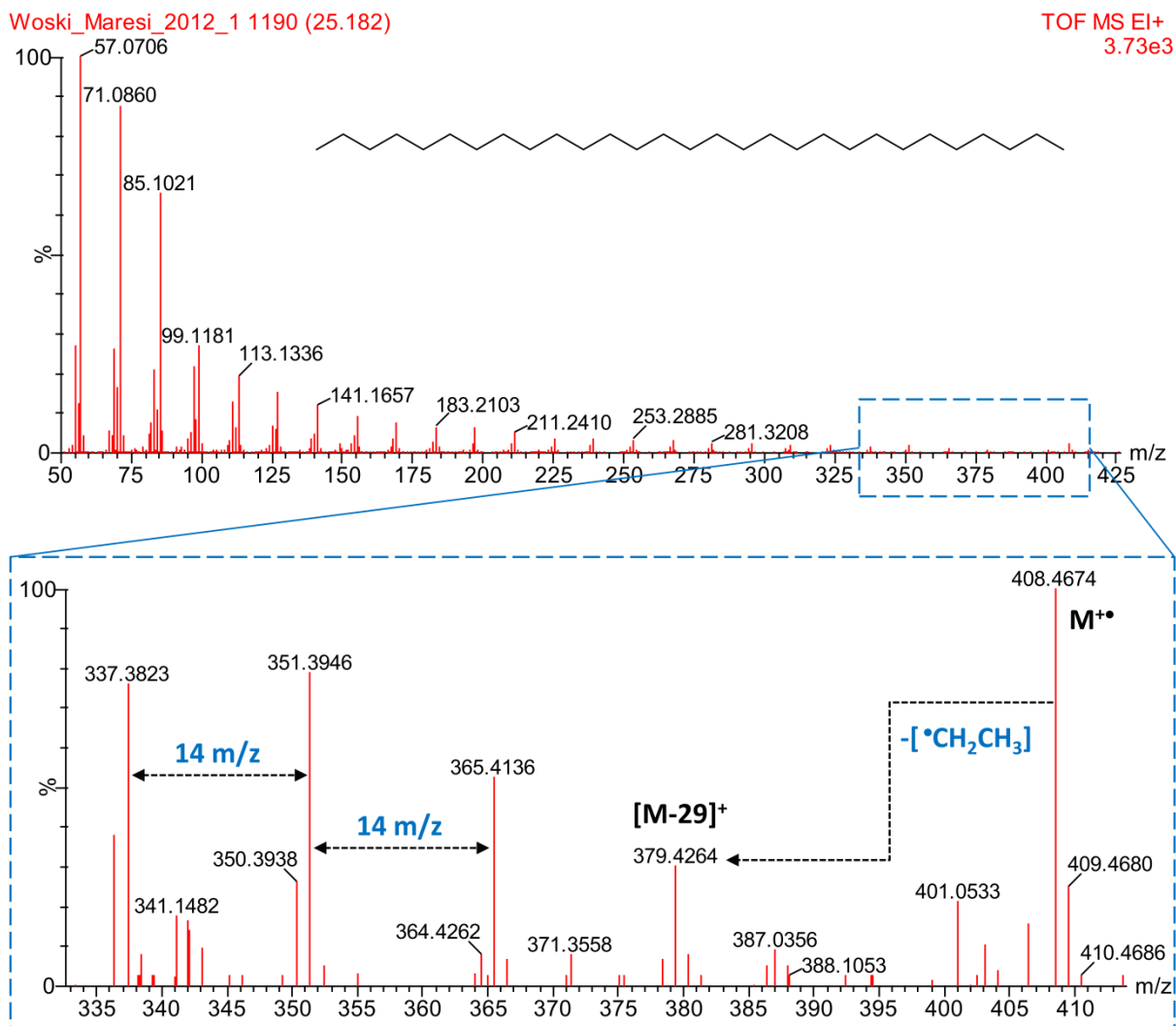
Najliczniej reprezentowaną klasą były n-alkany (12 związków) o długości łańcucha węglowego w zakresie C₂₀-C₃₃, z czego 5 z nich charakteryzowało się parzystą liczbą węgla w łańcuchu i w tej grupie wyróżniono: eikozan (C₂₀), dokozan (C₂₂), tetrakozan (C₂₄), heksakozan (C₂₆) oraz oktakozan (C₂₈). 7 alkanów miało nieparzystą liczbę węgla: heneikozan (C₂₁), trikozan (C₂₃), pentakozan (C₂₅), heptakozan (C₂₇), nonakozan (C₂₉), hentriakontan (C₃₁), tritriakontan (C₃₃). Intensywność jonu molekularnego (M⁺) w widmie EI n-alkanów spada wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego, ale M⁺ jest nadal widoczny nawet dla alkanów o 40 atomach węgla (Sparkman i in. 2011). Zwykle pierwszym fragmentem przed pikiem pochodzącym od jonu molekularnego jest jon [M-29]⁺ odpowiadający utracie •CH₂CH₃. Ponadto na widmie alkanów można zaobserwować serie pików oddalonych od siebie o 14 m/z (43, 57, 71, 85, itd.). Obserwowane coraz mniejsze wartości m/z są wynikiem utraty coraz większych rodników alkilowych. Przykładowe widmo nonakozanu przedstawiono na ryc. 4.10.

Wśród zidentyfikowanych 8-śmiu pochodnych alkanoli obserwowano 6 alkanoli o parzystej liczbie węgla w łańcuchu: eikozanol (C₂₀), dokozanoł (C₂₂), tetrakozanol (C₂₄), heksakozanol (C₂₆), oktakozanol (C₂₈), triakontanol (C₃₀), oraz dwa alkanole o nieparzystej liczbie węgla: pentakozanol (C₂₅) i heptakozanol (C₂₇). W widmie EI alkoholi o długich łańcuchach jon molekularny nie jest widoczny. Jednakże przeprowadzenie alkoholi w pochodne TMS pozwala na określenie masy cząsteczkowej nieznanego alkoholu, pomimo braku obecności M⁺, ponieważ masa najwyższego pików w końcowym zakresie m/z widma

Tab. 4.5. Związki wykryte na powierzchni liści jęczmienia (^A – RI według Golm Metabolome Database, ^B – RI według MassBank, b.d. – brak danych, M – masa monoizotopowa, obs. – wartość obserwowana, **czzerwony** – jon molekularny (M⁺), **niebieski** – [M-CH₃]⁺, „-“ – brak derywatywacji, „-” – brak nazwy zwyczajowej, * – pełna identyfikacja potwierdzona związkiem referencyjnym).

l.p.	RI	RI obs.	Nazwa		Derywatywacja	Wzór sumaryczny pochodnej	M [Da]	Wybrane jony fragmentacyjne obecne w widmie EI, względem których wykonano analizę ilościową
			systematyczna	zwyczajowa				
1.	b.d.	1954,68	benzeno-1,2-dikarboksylan dibutyli	ftalan dibutyli	—	C16H22O4	278,1518	56.1, 76, 104, 149, 205.1, 223.1
2.	b.d.	1976,35	tiofosforan <i>O,O</i> -dietylo- <i>O</i> -3,5,6-trichloropirydyn-2-yl	chloropiryfos	—	C9H11Cl3NO3PS	348,9263	65, 97, 125, 197, 199, 208, 210, 213, 215, 258, 260, 286, 288, 314, 316
3.	2002,55 ^A	2000,00	eikozan*	-	—	C20H42	282,3286	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
4.	2045,44 ^A 2038,40 ^B	2044,32	kwas heksadekanowy*	kwas palmitynowy*	1 TMS	C19H40O2Si	328,2797	117, 129, 132.1, 145.1, 313.3 , 328.3
5.	2102,80 ^A	2102,70	heneikozan	-	—	C21H44	296,3443	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
6.	b.d.	2200,00	dokozan*	-	—	C22H46	310,3599	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
7.	2243,49 ^A 2242,25 ^B	2240,00	kwas oktadekanowy*	kwas stearynowy*	1 TMS	C21H44O2Si	356,3110	117, 129, 132.1, 145.1, 341.3 , 356.3
8.	2301,60 ^A	2302,35	trikozan	-	—	C23H48	324,3756	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
9.	2360,90 ^A	2350,59	eikozanol	alkohol arachydylowy	1 TMS	C23H50OSi	370,3631	75, 83.1, 97.1, 103.1, 111.1, 125.1, 355.3
10.	2400,46 ^A	2400,00	tetrakozan*	-	—	C24H50	338,3912	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
11.	2453,82 ^A	2439,24	kwas eikozanowy*	kwas arachidowy*	1 TMS	C23H48O2Si	384,3423	117, 129, 132.1, 145.1, 369.3 , 384.3
12.	2499,33 ^A	2501,27	pentakozan	-	—	C25H52	352,4069	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
13.	2549,09 ^A	2548,10	dokozanol	-	1 TMS	C25H54OSi	398,3944	75, 83.1, 97.1, 103.1, 111.1, 125.1, 383.4
14.	2605,36 ^A	2600,00	heksakozan*	-	—	C26H54	366,4225	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
15.	2650,64 ^A	2635,62	kwas dokozanowy	kwas behenowy	1 TMS	C25H52O2Si	412,3736	117, 129, 132.1, 145.1, 397.4 , 412.4
16.	2699,20 ^A	2702,74	heptakozan	-	—	C27H56	380,4382	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2

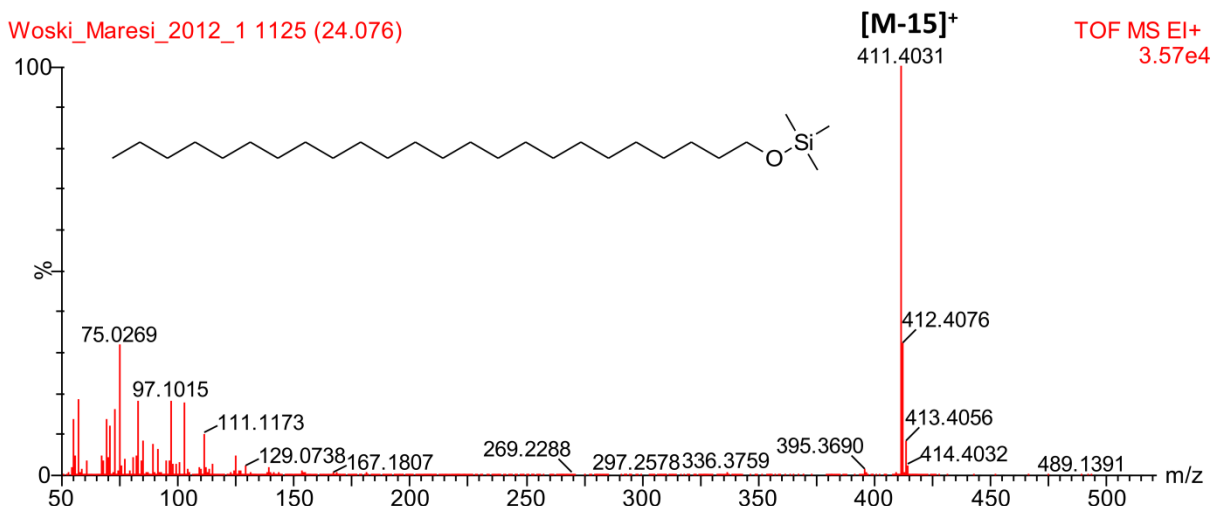
17.	b.d.	2745,21	tetrakozanol	alkohol lignocerylowy	1 TMS	C27H58OSi	426,4257	75, 83.1, 97.1, 103.1, 111.1, 125.1, 411.4
18.	2800,02 ^A	2800,00	oktakozan*	-	—	C28H58	394,4538	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
19.	2834,42 ^A	2833,1034	kwask tetrakozanowy	kwask lignocerynowy	1 TMS	C27H56O2Si	440,4049	117, 129, 132.1, 145.1, 425.4 , 440.4
20.	b.d.	2840,00	pentakozanol	-	1 TMS	C28H60OSi	440,4413	75, 83.1, 97.1, 103.1, 111.1, 125.1, 425.4
21.	2893,87 ^A	2896,55	nonakozan	-	—	C29H60	408,4695	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
22.	b.d.	2915,86	N_2916	-	b.d.	b.d.	b.d.	57.1, 83.1, 97.1, 111.1, 125.1, 138.1, 152.1, 166.2, 180.2, 194.2, 378.4, 409.4
23.	b.d.	2925,52	N_2926	-	b.d.	b.d.	b.d.	57.1, 83.1, 97.1, 111.1, 125.1, 138.1, 152.1, 166.2, 180.2, 194.2, 378.4, 409.4
24.	b.d.	2940,69	heksakozanol*	alkohol cerylowy	1 TMS	C29H62OSi	454,4570	75, 83.1, 97.1, 103.1, 111.1, 125.1, 439.4
25.	3036,31 ^A	3029,19	kwask heksakozanowy	kwask cerotynowy	1 TMS	C29H60O2Si	468,4362	117, 129, 132.1, 145.1, 453.4 , 468.4
26.	b.d.	3034,59	heptakozanol	-	1 TMS	C30H64OSi	468,4726	75, 83.1, 97.1, 103.1, 111.1, 125.1, 453.5
27.	3092,83 ^A	3094,05	hentriakontan	-	—	C31H64	436,5008	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
28.	b.d.	3130,81	oktakozanol	alkohol montanylowy (kluitylowy)	1 TMS	C31H66OSi	482,4883	75, 83.1, 97.1, 103.1, 111.1, 125.1, 467.5
29.	3232,02 ^A	3221,15	kwask oktakozanowy	kwask montanowy	1 TMS	C31H64O2Si	496,4675	117, 129, 132.1, 145.1, 481.4 , 496.5
30.	b.d.	3233,97	N_3234	-	b.d.	b.d.	b.d.	57.1, 83.1, 97.1, 105, 111.1, 123
31.	b.d.	3240,38	N_3240	-	b.d.	b.d.	b.d.	57.1, 83.1, 97.1, 111.1, 125.1, 139.1, 153.2, 167.2
32.	3292,83 ^A	3274,36	tritriakontan	-	—	C33H68	464,5321	57.1, 71.1, 85.1, 99.1, 113.1, 127.1, 141.2, 155.2, 169.2
33.	b.d.	3305,13	triakontanol	alkohol mirycylowy (melisowy)	1 TMS	C33H70OSi	510,5196	75, 83.1, 97.1, 103.1, 111.1, 125.1, 495.5
34.	b.d.	3417,95	N_3418	-	b.d.	b.d.	b.d.	57.1, 83.1, 97.1, 105, 111.1, 123
35.	b.d.	>3600	N_3600+	-	b.d.	b.d.	b.d.	57.1, 83.1, 97.1, 105, 111.1, 123



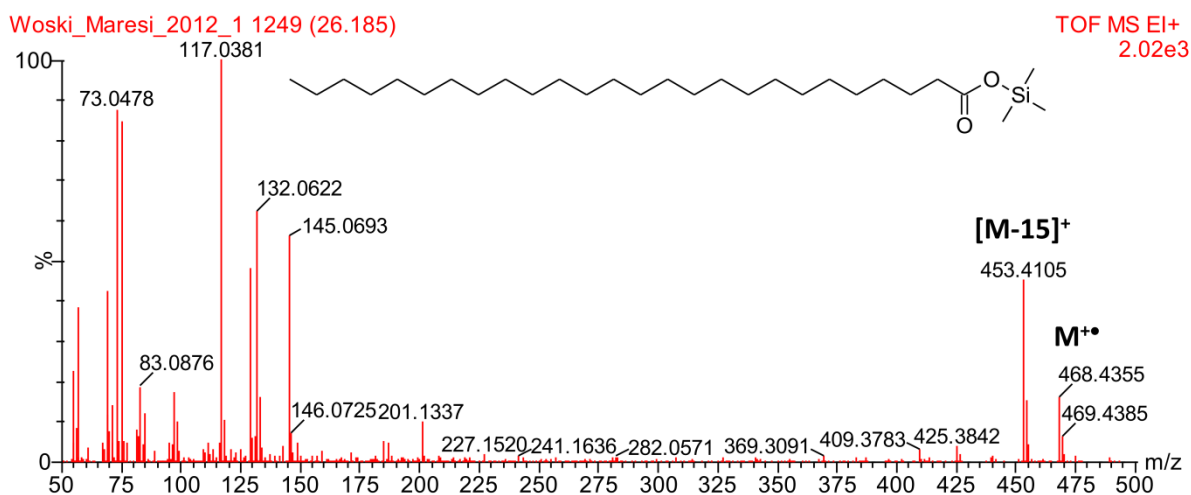
Ryc. 4.10. Widmo mas EI nonakozanu.

odpowiada masie jonu molekularnego pomniejszonej o rodnik metylowy ($\bullet\text{CH}_3$) pochodzący od grupy trimetylosililowej. Ponadto w widmie EI TMS-pochodnych alkoholi widoczne są takie jony jak 73, 89 i 103 (Sparkman i in. 2011). Przykładowe widmo tetrakozanolu przedstawiono na ryc. 4.11.

Zidentyfikowano także 7 pochodnych TMS nasyconych kwasów tłuszczowych, wszystkie o parzystej liczbie węgli: kwas heksadecanowy (C_{16}), kwas oktadecanowy (C_{18}), kwas eikozanowy (C_{20}), kwas dokozanowy (C_{22}), kwas tetrakozanowy (C_{24}), kwas heksakozanowy (C_{26}) oraz kwas oktakozanowy (C_{28}). Główny pik w widmie, podobnie jak w widmie alkanoli, odpowiada masie jonu molekularnego pomniejszonej o rodnik metylowy ($\bullet\text{CH}_3$), jednak w przypadku kwasów tłuszczowych widoczny jest także $\text{M}^{+\bullet}$. Przykładowe widmo kwasu heksakozanowego przedstawiono na ryc. 4.12.



Ryc. 4.11. Widmo mas EI TMS-pochodnej tetrakozanolu.



Ryc. 4.12. Widmo mas EI TMS-pochodnej kwasu heksakozanowego.

Ponadto wśród obecnych na powierzchni liści jęczmienia związków zidentyfikowano fosforoorganiczny środek owadobójczy – chloropiryfos (ryc. S.6) (znany również pod innymi nazwami handlowymi takim jak m.in. dursban czy lorsban) oraz ftalan dibutyłu. Ponadto wśród niezidentyfikowanych związków obserwowano metabolity: N_2916 i N_2926, charakteryzujące się podobnym widmem fragmentacyjnym. Podobnie trzy związki N_3234, N_3418 oraz N_3600+ wykazywały duże podobieństwo widm.

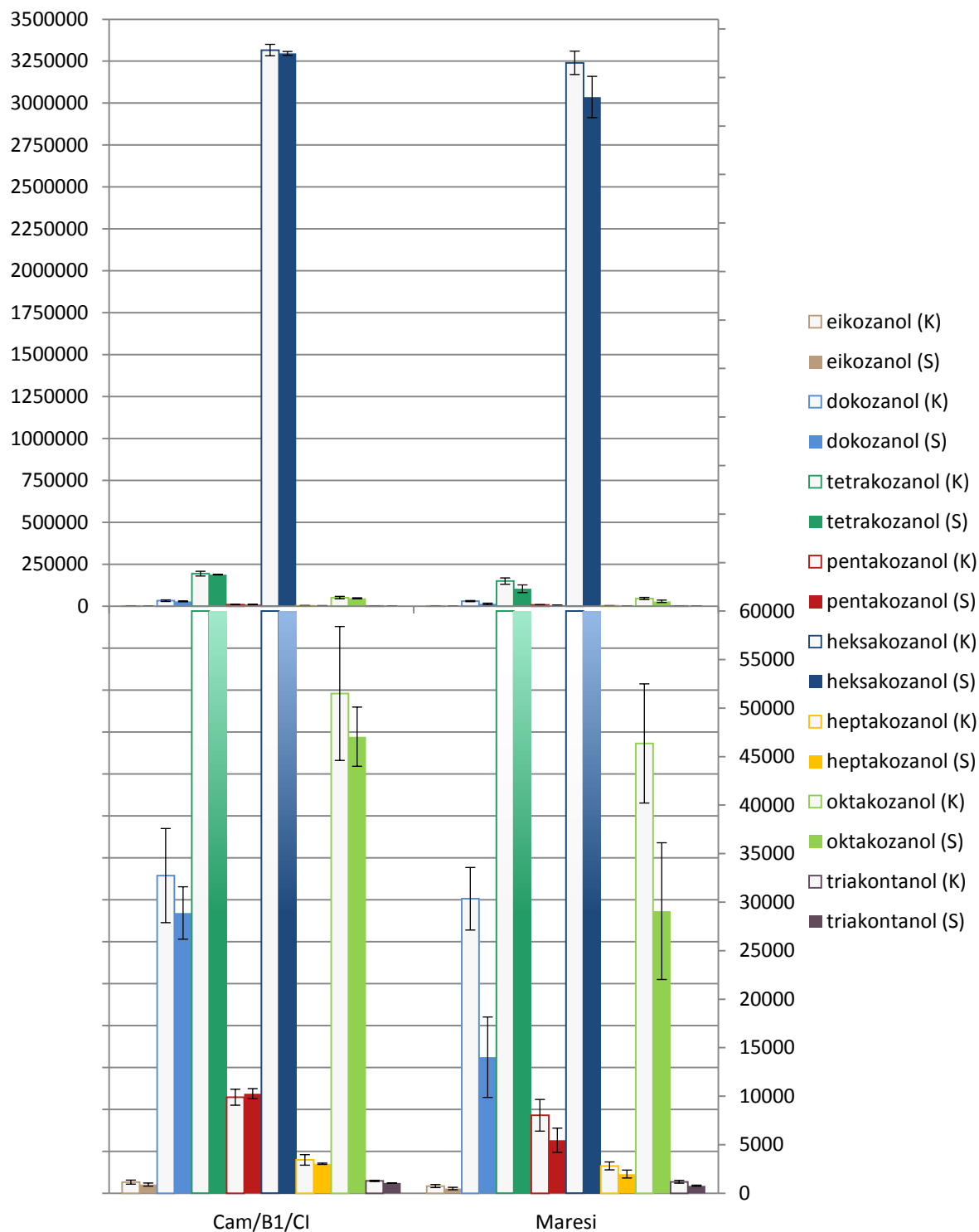
4.2.2. Analiza zmian ilości metabolitów znajdujących się na powierzchni liści w warunkach niedoboru wody

Związkiem o najwyższej intensywności, w próbkach ekstraktów metabolitów z powierzchni liści jęczmienia był heksakozanol. Jednak jego ilość nie zmieniła się pod wpływem suszy w znaczący sposób u obu badanych genotypów. Podobna reakcja cechowała większość wykrytych alkanoli, w tym także drugi co do intensywności – tetrakozanol (ryc. 4.13). Jedynie dla dwóch alkoholi obecnych w próbkach ekstraktów – dokozanolu i oktakozanolu – odnotowano spadek ilości w odmianie Maresi w warunkach niedoboru wody. Ponadto nie zaobserwowano znaczących różnic międzyodmianowych w składzie długołańcuchowych alkoholi obecnych w woskach kutykularnych u roślin kontrolnych badanych genotypów rodzicielskich.

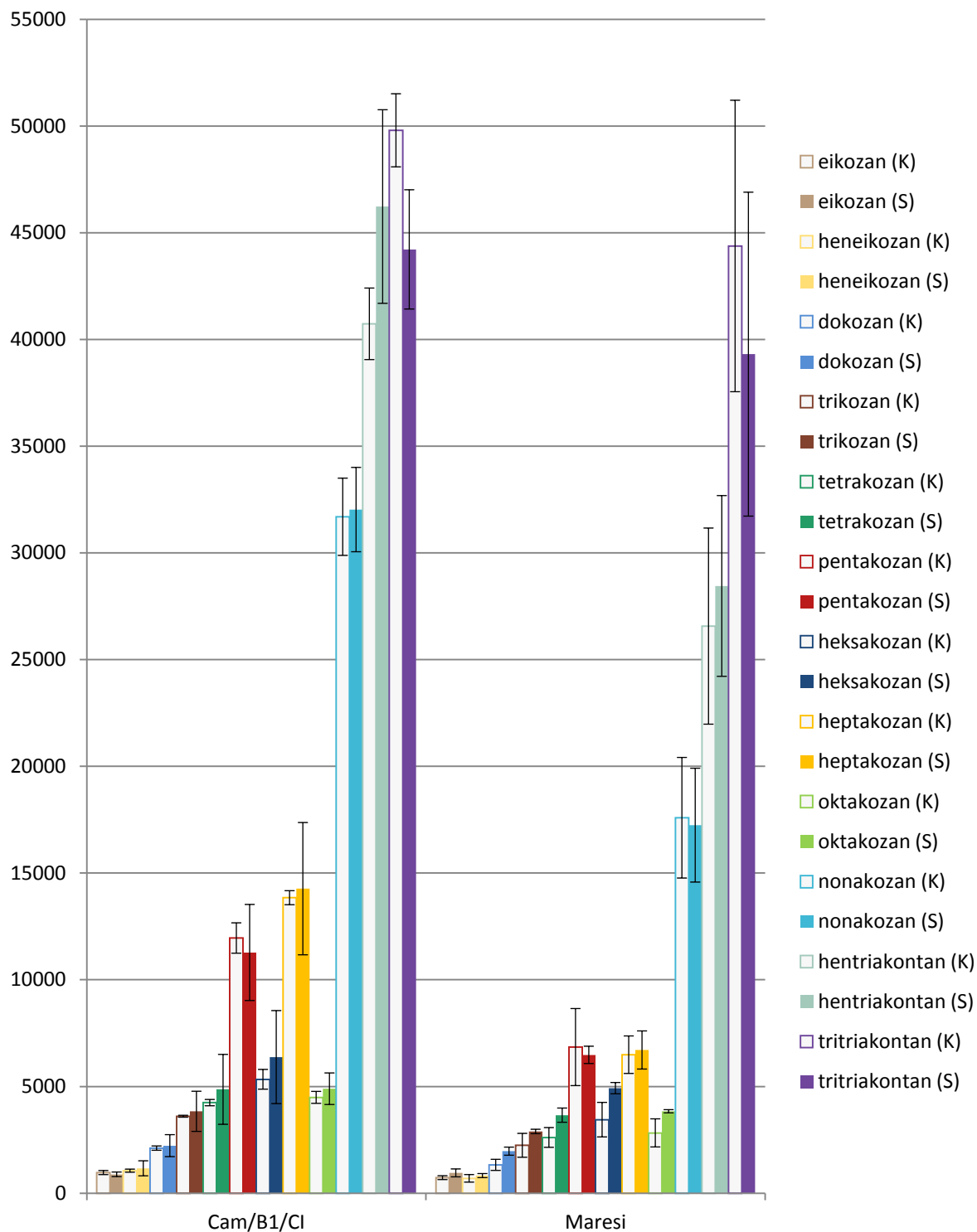
Podobnie jak w przypadku alkanoli deficyt wody nie wpłynął na zmianę ilości wykrytych alkanów (ryc. 4.14). Odnotowano jednak pewne różnice między badanymi genotypami. Zarówno w warunkach kontrolnych jak i niedoboru wody u odmiany europejskiej Maresi w stosunku do linii syryjskiej Cam/B1/CI zaobserwowano obniżoną zawartość alkanów o nieparzystej liczbie węgla w łańcuchu, tj.: pentakozanu, heptakozanu, nonakozanu oraz hentriakontanu.

W przypadku kwasów tłuszczowych nie zaobserwowano u linii Cam/B1/CI zmian wynikających z wpływu suszy na skład metabolitów obecnych na powierzchni liści (ryc. 4.15). Z kolei w odmianie Maresi niewielkie zmiany zawartości kwasów tłuszczowych dotyczyły jedynie kwasów palmitynowego oraz stearynowego, których ilość zwiększyła się na skutek suszy. Nie zaobserwowano także znaczących różnic międzyodmianowych; zarówno Maresi jak i Cam/B1/CI wykazywały podobny skład i ilość kwasów tłuszczowych na powierzchni liści.

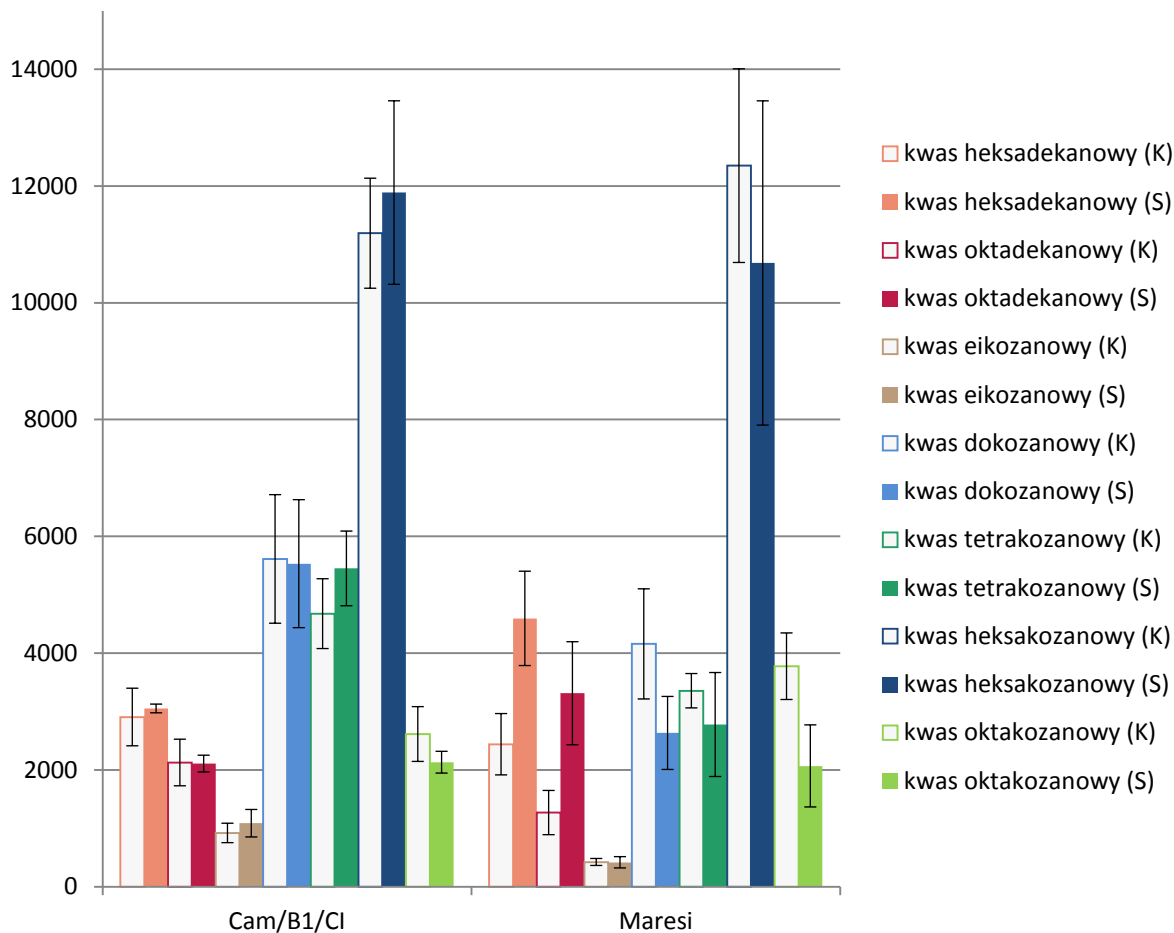
Zmiany zawartości pozostałych związków wykrytych w ekstraktach z powierzchni liści, w tym ftalanu dibutyłu, chloropiryfosu oraz związków niezidentyfikowanych zobrazowano na ryc. S.7.



Ryc. 4.13. Zmiany zawartości alkanoli w warunkach deficytu wody (K – kontrola, S – susza).



Ryc. 4.14. Zmiany zawartości alkanów w warunkach deficytu wody (K – kontrola, S – susza).



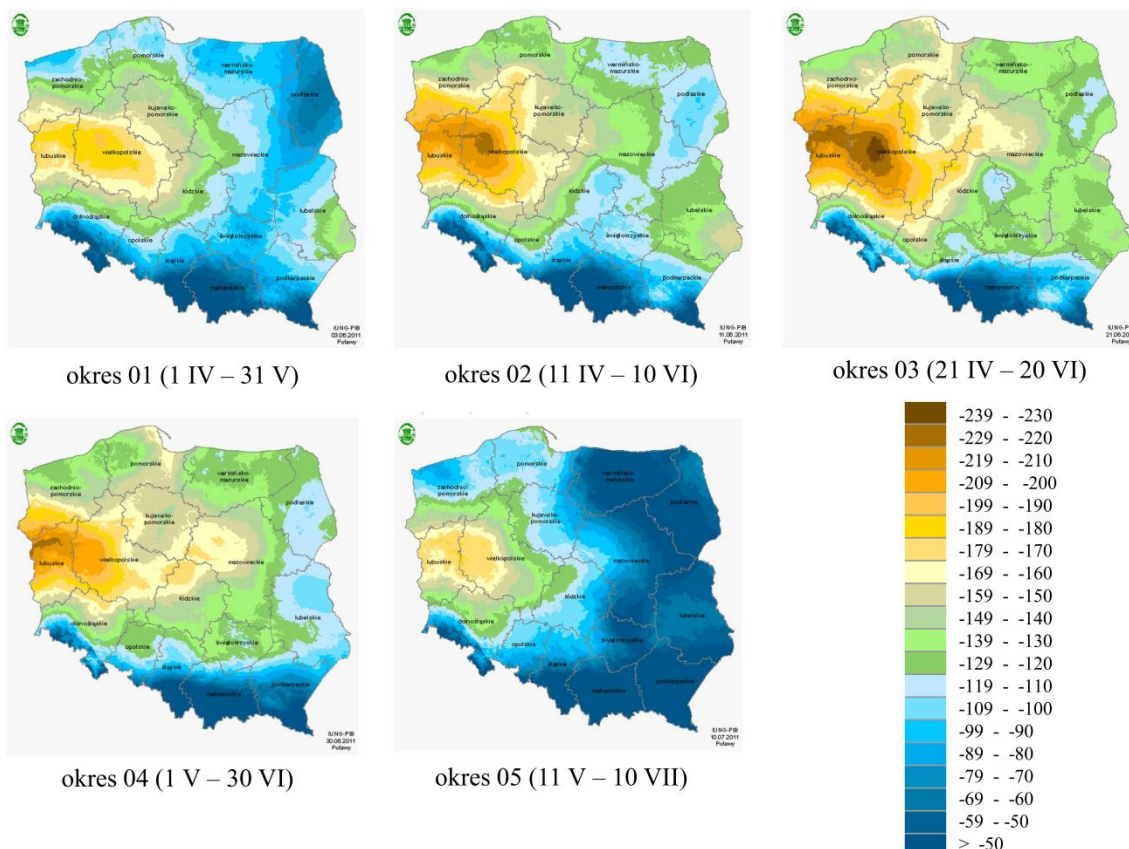
Ryc. 4.15. Zmiany zawartości kwasów tłuszczowych w warunkach deficytu wody (K – kontrola, S – susza).

5. DYSKUSJA

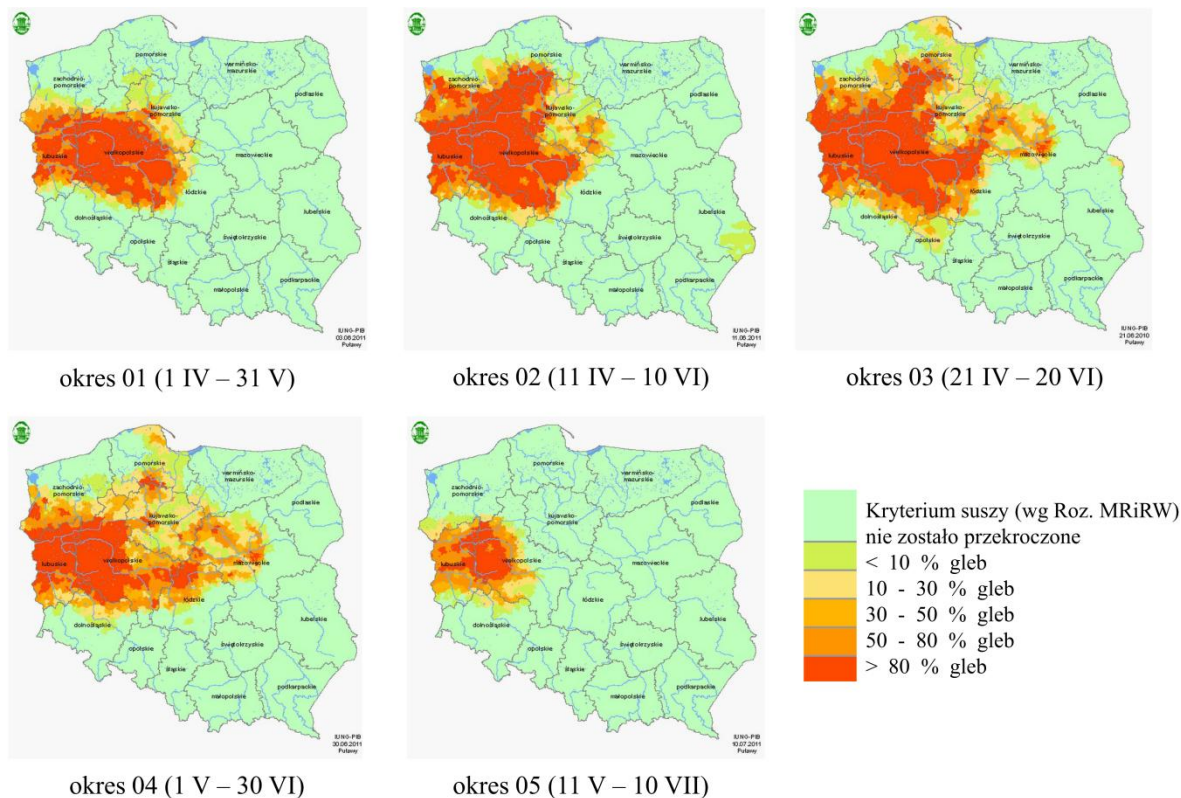
Straty plonów roślin uprawnych wywołanych suszą są poważnym problemem gospodarczym, dotyczącym wiele regionów Polski, w tym Wielkopolskę. W województwie wielkopolskim występują głównie gleby I i II kategorii – są to gleby lekkie i bardzo lekkie, klasyfikowane jako podatne i bardzo podatne na suszę. Na stronach internetowych Systemu Monitoringu Suszy Rolniczej w Polsce (SMSR, www.susza.iung.pulawy.pl) prowadzonej przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa (IUNG) w Puławach na zlecenie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi udostępniane są wyniki monitoringu Klimatycznego Bilansu Wodnego (KBW), na podstawie których dokonywana jest ocena zagrożenia suszą rolniczą na obszarze Polski. KBW jest wskaźnikiem określającym stan uwilgotnienia środowiska i jest obliczany jako różnica pomiędzy opadami atmosferycznymi a ewapotranspiracją (utrata wody przez parowanie). W raportach z ostatnich lat zagrożenie suszą rolniczą na terenie Wielkopolski odnotowywane było wielokrotnie, co ukazuje skalę problemu deficytu wody w regionie. Przykładowo w sprawozdaniach z 2011 roku aż w 5 okresach raportowania (spośród 13 ogółem), obejmujących drugi kwartał roku i początek trzeciego, stwierdzono zagrożenie suszą rolniczą w różnych częściach kraju (ryc. 5.1). We wszystkich 5 okresach Wielkopolska była zaklasyfikowana jako region zagrożony suszą, a zwłaszcza w okresie 2 i 3 (od 11 IV – 20 VI), gdy zagrożenie to dotyczyło wszystkich 316 gmin i ponad 90% gruntów ornych województwa. W raportowanych okresach stwierdzono zagrożenia suszą rolniczą głównie dla krzewów owocowych, truskawek, drzew owocowych, a także zbóż ozimych i jarych, szczególnie na glebach I i II kategorii, stanowiących dominującą część gleb w Wielkopolsce. Według prognozy IUNG z dnia 30 czerwca 2011 r., straty w plonach wywołane niekorzystnymi warunkami pogodowymi w całym okresie wegetacyjnym miały wynieść powyżej 10% dla zbóż ozimych i jarych. Szacunki te potwierdza raport GUS z dnia 19.12.2012 r. (GUS 2012). Plon jęczmienia w województwie wielkopolskim w roku 2011, w którym wystąpiła dotkliwa susza, wynosił 32,6 dt/ha i był mniejszy o około 15% w porównaniu z wynikiem 38,6 dt/ha z roku 2012, w którym zagrożenie suszą rolniczą było mniejsze.

Przygotowana rozprawa doktorska poruszająca problematykę deficytu wody i poszukiwania różnic pomiędzy badanymi genotypami jęczmienia jarego w odpowiedzi na stres suszy, które wraz z danymi z innych poziomów molekularnych mogą przyczynić się do szybszej selekcji form wykazujących odporność na niedobór wody ma duże znaczenie

a.



b.



Ryc. 5.1. Susza w Polsce w 2011 r.: a) Klimatyczny Bilans Wodny, b) potencjalne zasięgi suszy dla upraw zbóż jarych (www.susza.iung.pulawy.pl).

gospodarcze dla regionu również ze względu na strukturę zasiewów Wielkopolski. Powierzchnia zasiewów zbóż w województwie wielkopolskim w 2012 roku była największa w kraju i wynosiła 1080,5 tys. ha dając produkcję w wysokości 4431,1 tys. ton i wyprzedzając województwo mazowieckie. Ponadto powierzchnia zasiewów jęczmienia w województwie wielkopolskim wynosiła 234,6 tys. ha, dając plon w wysokości 905,6 tys. ton, umiejscawiając tym samym Wielkopolskę na pierwszym miejscu w kraju w produkcji jęczmienia, przed województwem kujawsko-pomorskim z powierzchnią zasiewów wynoszącą 161,9 tys. ha i produkcją na poziomie 590,6 tys. ton (GUS 2012).

Mechanizmy, które decydują o tolerancji roślin na stropy abiotyczne są dotychczas słabo poznane, a szczególnie problematycznym zagadnieniem jest stres niedoboru wody (Roy i in. 2011). W przypadku suszy ważny jest moment zaistnienia warunków stresowych, gdyż w zależności od etapu rozwoju rośliny stres może w różny sposób wpływać na przebieg procesów fizjologicznych i biochemicznych, co wymaga uruchomienia odmiennych mechanizmów aklimatyzacyjnych. Ponadto stres suszy często jest związany z wystąpieniem innych czynników stresowych o różnej intensywności, w tym wysokich temperatur, promieniowania, wysokiego zasolenia, obecności substancji toksycznych, czy niskiej dostępności składników pokarmowych. Tolerancja na stres niedoboru wody wynika więc nie tylko z wielu indywidualnych mechanizmów obronnych, ale też kombinacji mechanizmów związanych z odpowiedzią na inne, jednostkowe czynniki stresowe. Złożoność procesów aklimatyzacyjnych i adaptacyjnych sprawia, że hodowla roślin w kierunku uzyskania przez nie tolerancji na dany abiotyczny czynnik stresowy jest niezwykle trudna. Poza tym nie można zapominać, że celem hodowli jest nie tylko uzyskanie roślin zdolnych do przetrwania stresu suszy, ale takich, które w warunkach ograniczonej dostępności wody będą jednocześnie charakteryzowały się zadowalającym plonem. Ponieważ tolerancja na stres jest warunkowana przez działanie wielu genów zastosowanie tzw. odwrotnej genetyki (ang. *reverse genetics*), polegającej na odkrywaniu funkcji genów poprzez analizę efektów fenotypowych wynikających z obecności lub braku konkretnych sekwencji genów (uzyskanych w procesie sekwencjonowania DNA) w organizmie, jest ograniczone. Bardziej wydajnym podejściem jest identyfikacja naturalnie występującej zróżnicowanej tolerancji na stres pomiędzy różnymi genotypami (np. roślinami uprawnymi i ich formami dzikimi, bądź odmianami o różnym pochodzeniu). Analiza genetyczna populacji mapujących, wyprowadzonych z form rodzicielskich o odmiennych cechach, a następnie korelacja wyników z ich cechami fenotypowymi takimi jak np. plon czy odporność na stres, pozwala na odkrycie *loci*

determinujących te cechy. Dodatkowo uzupełnienie tych informacji danymi z innych poziomów molekularnych (proteomu, metabolomu) może pomóc w identyfikacji procesów zaangażowanych w mechanizmy odpowiedzi roślin na stres.

Rośliny będąc narażone na działanie wielu niekorzystnych czynników środowiskowych, chcąc przetrwać w niesprzyjających warunkach, wykształciły złożone mechanizmy umożliwiające percepcję czynnika stresowego, a następnie przetworzenie i przekazanie sygnału o stresorze. Uruchomienie tych mechanizmów pozwala na reakcję rośliny na różnych poziomach organizacji. Na poziomie molekularnym dochodzi m.in. do syntezy wielu niskocząsteczkowych związków, które mogą pełnić rozmaite funkcje w komórce. Dotychczasowe badania wpływu stresów biotycznych i abiotycznych na metabolom jęczmienia dotyczyły analizy zmian składu jakościowego i ilościowego metabolitów związanych z: fuzariozą kłosów – grzybową chorobą wywoływaną przez *Gibberella zeae* (Bollina i in. 2010, Kumaraswamy i in. 2011), tolerancją zasolenia (Chen i in. 2007, Widodo i in. 2009, Wu i in. 2013), suszą (Sicher i in. 2012), niskimi temperaturami (Mazzucotelli i in. 2006), toksycznością boru (Roessner i in. 2006) oraz niedoborem fosforu (Huang i in. 2008) i azotu (Kováčik i in. 2014). Jednak zazwyczaj badacze skupiają się na dwóch lub kilku testowanych genotypach i nadal niewiele jest prac dotyczących analiz metabolomicznych dużych populacji. W ostatnich latach ukazało się zaledwie kilka prac odnoszących się do większej liczby badanych obiektów, w tym populacji RIL, dotyczących m.in. ryżu (Gong i in. 2013, Degenkolbe i in. 2013), kukurydzy (Riedelsheimer i in. 2012, Wen i in. 2014) oraz pomidora (Do i in. 2010, Toubiana i in. 2012). Tematyka przedłożonej pracy dotycząca m.in. analizy metabolitów liści i korzeni siewek linii populacji mapującej jęczmienia zwyczajnego w odpowiedzi na stres niedoboru wody jest zatem dotychczas nieporuszanym problemem badawczym.

Przedstawione w niniejszej pracy doświadczenia dotyczyły profilowania metabolitów liści i korzeni, a także analizy składu jakościowego i ilościowego wosków kutykularnych jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) w warunkach kontrolnych i niedoboru wody. Z tego względu dyskusja zostanie przeprowadzona osobno dla tych dwóch eksperymentów.

Profilowanie metabolitów liści i korzeni jęczmienia

Doświadczenia przeprowadzono na siewkach trzech europejskich odmian jęczmienia jarego: Maresi, Sebastian, Stratus oraz syryjskiej linii hodowlanej Cam/B1/CI, a także liniach populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI, które w stadium 3 liścia poddano stresowi niedoboru wody trwającemu 10 dni (ryc. S.8). Równolegle prowadzono uprawę roślin w warunkach kontrolnych, odpowiadających optymalnej wilgotności gleby. Wybór młodych roślin w stadium 3 liścia był podyktowany tym, że jak dotąd niewiele wiadomo o strategiach obrony roślin przed suszą w początkowych fazach rozwoju rośliny. Jednocześnie kiełkowanie, zdolność do przeżycia i wzrostu na wczesnych etapach rozwoju są krytycznymi etapami decydującymi o sukcesie reprodukcyjnym rośliny, a stres niedoboru wody jest główną przyczyną wysokiej śmiertelności siewek (De Micco i Aronne 2012).

Zastosowanie chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas pozwoliło na wykrycie w ekstraktach liści i korzeni jęczmienia 141 pochodnych (z czego 129 w liściu i 119 w korzeniu). Dodatkowo wykorzystanie publicznie dostępnych programu TargetSearch i bazy danych Golm Metabolome Database pozwoliło na przypisanie nazw i/lub identyfikatorów 34 związkom nieznanym. Jonizacja elektronami zapewnia dość dobrą powtarzalność i podobieństwo uzyskiwanych widm niezależnie od zastosowanego systemu GC-MS, dzięki czemu wraz ze zwiększeniem popularności wykorzystania technik spektrometrii mas zaczęły powstawać bazy danych widm ułatwiające identyfikację związków. 21 przypisanych do wykrytych metabolitów identyfikatorów GMD dotyczyło związków, które były obserwowane już wcześniej w innych badaniach i ich widma wraz z indeksami retencji, opisywane jako znaczniki widm mas (MST, ang. *mass spectral tag*), zostały zdeponowane w bazie GMD. Przypisanie identyfikatorów daje szansę na dopisanie w przyszłości szczegółowych informacji na temat wykrytych metabolitów (takich jak skład elementarny, masa monoizotopowa), dzięki dynamicznemu rozwojowi publicznych bibliotek i ich ciągłemu wzbogacaniu przez użytkowników. Przykładowo w ostatnim czasie zostały adnotowane trzy związki, których obecność zarejestrowano również w przeprowadzonych w niniejszej pracy doświadczeniach i można wśród nich wymienić: kwas węglowy, A145015 – związek opisany jako przypuszczalny pierwszorzędowy aminoaldehyd/aminoketon, a także A203003 – związek opisany jako przypuszczalna tiohekszoza (Strehmel i in. 2014).

Ze względu na dużą ilość danych i wynikającą z tego faktu czasochłonność ręcznego ich przetworzenia w analizie półilościowej uwzględniono 114 pochodnych wykrytych przy

użyciu pakietu TargetSearch (101 w liściu i 100 w korzeniu). Prace dotyczące profilowania metabolitów w roślinach przy użyciu GC-MS zwykle obejmują podobną ilość związków (Widodo i in. 2009, Witt i in. 2012). Należy jednak podkreślić, że nawet zastosowanie różnych podejść eksperymentalnych i technik analitycznych nie pozwala na określenie kompletnego składu i ilości metabolitów w roślinie. Przykładowo szacuje się, że wykorzystanie obecnie dostępnych technik pozwala na adnotację 10% metabolitów pierwotnych i wtórnych z około 5000 występujących w liściu *Arabidopsis* (Bino i in. 2004). Ponadto każda technika ma swoje ograniczenia i nie zawsze dostarcza informacji pozwalających na jednoznaczną identyfikację poszczególnych związków w wieloskładnikowych mieszaninach ekstraktów roślinnych. W przypadku chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas nawet do 70% pików obecnych na chromatogramie może nie zostać zidentyfikowanych (Bino i in. 2004).

Wieloskładnikowe próbki ekstraktów tkanek jęczmienia poddano przed analizą GC-MS dwuetapowej derywatywacji, w związku z czym na zarejestrowanych chromatogramach obserwowano piki reprezentujące związki w postaci pochodnych, a nie w ich naturalnej postaci. Większość wykrytych związków występowała w formie pochodnych trimetylosililowych (ze względu na podstawienie obecnych w badanych związkach grup -OH, -COOH, -NH₂). W przypadku związków posiadających dodatkowo w swojej strukturze grupę karbonylową (-C=O), takich jak kwas α -ketoglutarynowy, fruktoza, glukoza i ksyloza, obserwowano TMS-oksymy. Ponadto w przypadku metabolitów zawierających grupy aminowe (aminokwasów oraz alantoiny), pojedyncze metabolity występowały w formie kilku pochodnych trimetylosililowych. Z kolei część metabolitów przeprowadzonych w oksymy występowała w postaci dwóch pików chromatograficznych, pochodzących od dwóch izomerów przestrzennych *syn* i *anti* powstających na etapie reakcji z metoksyaminą w wyniku obecności podwójnego wiązania między atomami węgla i azotu (-C=N-O-CH₃) (Kanani i Kłapa 2007). Podejścia eksperymentalne oparte na wykorzystaniu techniki GC-MS w większości przypadków wymagają etapu derywatywacji. Związki charakteryzujące się wysoką polarnością oraz związki o dużej masie cechuje jednocześnie niska lotność, a zastosowanie wysokich temperatur w celu przeprowadzenia próbek w stan gazowy może prowadzić do ich rozpadu w komorze nastrzykowej, zanim próbka zostanie wprowadzona na kolumnę chromatograficzną (Zaikin i Halket 2009). Ponieważ polarność metabolitów związana jest z obecnością w cząsteczce grup hydroksylowych, karboksylowych, aminowych i tiolowych, to właśnie te grupy poddawane są chemicznym modyfikacjom w celu zwiększenia lotności i stabilności termicznej analizowanych związków. Obecność kilku

pochodnych reprezentujących jeden metabolit jest wynikiem zastosowania jednakowych warunków derywatywacji próbek w stosunku do wszystkich związków obecnych w ekstraktach, należących do różnych klas, cechujących się odmienną budową i liczbą grup funkcyjnych. Niestety jest to nieodłączna część badań metabolomicznych opierających się na podejściach niecelowanych, których zamysłem nie jest koncentrowanie się podczas analizy na jednej grupie związków o podobnych właściwościach fizykochemicznych, co umożliwiłoby wybór optymalnych warunków analitycznych, ale badanie szerokiej gamy produktów naturalnych reprezentujących różne klasy metabolitów. Rozwiązaniem problemu występowania wielu pochodnych jednego metabolitu jest zastosowanie do każdej klasy związków innego protokołu derywatywacji z wykorzystaniem różnych odczynników blokujących grupy polarne w cząsteczkach, który będzie prowadził do wytworzenia jednej pochodnej (Orata 2012). Jednakże w kontekście wysokoprzepustowych analiz metabolomicznych oznaczałoby to konieczność wykonania serii analiz z różnymi odczynnikami derywatyżującymi, co znacząco wydłużyłoby czas potrzebny do ich przeprowadzenia oraz zwiększyłoby ilość, już i tak obszernych, danych.

Poznany skład jakościowy próbek ekstraktów liści i korzeni jęczmienia posłużył do przeprowadzenia podziału metabolitów ze względu na przynależność do odpowiednich klas związków. Zastosowana metoda izolacji związków z materiału roślinnego oraz technika rozdziału pozwoliła na wykrycie wielu niskocząsteczkowych metabolitów zarówno alifatycznych jak i aromatycznych, w tym węglowodanów, aminokwasów, kwasów karboksylowych, amin, kwasów tłuszczowych i steroli. Najliczniej reprezentowaną grupę związków stanowiły węglowodany oraz aminokwasy. Wśród aminokwasów obserwowano zarówno aminokwasy białkowe jak i niebiałkowe (β -alaninę, kwas γ -aminomasłowy, kwas piperolinowy oraz kwas piroglutaminowy). Z podstawowych 20 aminokwasów wykryto 17 – nie odnotowano obecności argininy oraz aminokwasów siarkowych: cysteiny i metioniny. W innych pracach dotyczących profilowania metabolomu jęczmienia obserwowano podobny skład aminokwasów, w tym brak trzech wymienionych aminokwasów białkowych (Widodo i in. 2009, Wu i in. 2013). Pośród węglowodanów obserwowano głównie monosacharydy, ale też di- i trisacharydy, alkohole i kwasy cukrowe oraz pochodne fosforanowe. Jedynymi wykrytymi trisacharydami były rafinoza i 1-kestoza, przy czym obecność rafinozy stwierdzono jedynie w liściu. Niestety wymienione cukry nie rozdzieliły się całkowicie podczas rozdziału metodą chromatografii gazowej, co utrudniło ich dalszą analizę ilościową. Roessner i in. w pracy dotyczącej zmian w metabolomie jęczmienia wywołanych toksycznym wpływem boru również obserwowali koelucję rafinozy i kestozy, jednakże innego jej izomeru

(6-kestozy) (Roessner i in. 2006). Porównanie widma i czasu retencji zarejestrowanych dla standardu analitycznego 1-kestozy z próbkami ekstraktów tkanek jęczmienia wskazuje jednak na obecność w badanych próbkach 1-kestozy. Ponadto według danych zdeponowanych w bazie GMD 1-kestoza jest oddalona od rafinozy o 10 jednostek RI, natomiast 6-kestoza o 30 RI (podczas gdy w otrzymanych analizach czas pomiędzy koelującymi pikami wynosił 4 jednostki RI) (gmd.mpimp-golm.mpg.de; GMD ID: A337002, A340003, A341001). Dodatkowym potwierdzeniem są dane pochodzące z bazy MassBank, w której rafinoza i 1-kestoza są oddalone od siebie o 4 jednostki RI (www.massbank.jp; MassBank ID: OUF00153 i OUF00007). Poza węglowodanami i aminokwasami wykryto kwasy karboksylowe – z jedną, dwiema i trzema grupami karboksylowymi, hydroksykwasy, ketokwas oraz pochodne kwasu cytrynowego: kwas p-kumarowy w ekstraktach korzeni oraz kwas trans-ferulowy i kwas chlorogenowy w ekstraktach liści. Prace dotyczące profilowania metabolitów jęczmienia z wykorzystaniem techniki GC-MS zwykle skupiają się na metabolitach pierwotnych i najczęściej pomijana jest obecność metabolitów wtórnych takich jak np. kwasy fenolowe. Jednak ich występowanie jest szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin i obecność kwasów fenolowych w tkankach jęczmienia była już wcześniej raportowana przy wykorzystaniu innych niż GC-MS technik analitycznych, głównie LC-MS (Ferrerres i in. 2009, Bollina i in. 2010, Kumaraswamy i in. 2011). Pomędzy wykrytymi metabolitami znalazły się także aminy (monoaminy alifatyczne i aromatyczne oraz diaminy) oraz nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe oraz sterole roślinne.

Doświadczenia przeprowadzone na czterech genotypach (Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus) oraz liniach populacji mapującej Maresi \times Cam/B1/CI ujawniły, że większość wykrytych w liściach i korzeniach jęczmienia metabolitów (64-100%) wykazała istotne statystycznie zmiany poziomów akumulacji ze względu na przynajmniej jeden z badanych czynników, tj. wpływu różnic genotypowych, wpływu niedoboru wody, bądź współdziałania obu powyższych – opisywanych jako interakcje O \times S i L \times S (tab. S.2, tab. S.5). Zaobserwowano także podobne zachowanie metabolitów obecnych w liściach i korzeniach pod względem liczby związków, których zawartość uległa zmianie pod wpływem kolejnych badanych czynników, tj. w przypadku obu badanych tkanek największą liczbę istotnych zmian w zawartości metabolitów wywołanych było różnicami genetycznymi pomiędzy badanymi odmianami/liniami (tab. S.2, tab. S.5). Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że liczba metabolitów liścia wykazujących pod wpływem suszy zwiększoną akumulację była 2,5- 3,5-krotnie mniejsza w linii Cam/B1/CI w porównaniu z trzema pozostałymi odmianami (tab.

S.3). Jednocześnie liczba metabolitów korzenia charakteryzujących się podwyższoną akumulacją była w linii Cam/B1/CI 3- 7-krotnie większa niż u pozostałych odmian, z czego wzrost zawartości 17 metabolitów korzenia był charakterystyczny dla Cam/B1/CI (tab. S.3, tab. S.4). Powyższe wyniki wskazują odwrotny kierunek reakcji w suszy pod względem gromadzonych metabolitów w linii syryjskiej i odmianach europejskich, tj. silniejszą reakcję tkanek podziemnych Cam/B1/CI na stres niedoboru wody i odwrotnie – intensywniejszą reakcję tkanek nadziemnych u pozostałych genotypów. Drugim w kolejności czynnikiem wpływającym na liczbę metabolitów wykazujących istotne różnice akumulacji był stres niedoboru wody (tab. S.2, tab. S.5). Jednak istniały pewne różnice między badanymi tkankami, tzn. w przypadku liści o 20 i 30% , odpowiednio w doświadczeniach z liniami i czterema genotypami, metabolitów więcej wykazywało zmiany zawartości w warunkach stresu deficytu wody niż w przypadku korzeni. Z kolei w grupie interakcji (zarówno O x S i L x S) procent istotnie różnicujących metabolitów był najmniejszy, szczególnie jeśli chodzi o korzenie i wynosił 15 i 20% , odpowiednio w doświadczeniach z czterema genotypami i liniami. W tej grupie związków można doszukiwać się potencjalnych markerów związanych z tolerancją przez roślinę (lub jej brakiem) warunków deficytu wody, które mogłyby posłużyć w selekcji i hodowli roślin, ponieważ to związki wykazujące efekt interakcji świadczą o istnieniu odmiennych odpowiedzi na zadany stres pomiędzy badanymi genotypami. Ponadto na szczególną uwagę zasługują zaobserwowane pomiędzy liniami populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI różnice w profilach akumulacji metabolitów wyizolowanych z korzeni. Mapa cieplna obrazująca efekt suszy w korzeniu (ryc. 4.9), czyli różnicę pomiędzy poziomem akumulacji metabolitów w roślinach poddanych stresowi niedoboru wody i poziomem akumulacji tychże metabolitów w roślinach kontrolnych, pozwala zauważyć wyodrębnioną grupę 33 linii jęczmienia. Linie te w przypadku części metabolitów (m.in. proliny [7, 18, 44], kwasu maleinowego [20], kwasu α -ketoglutazarowego [43] oraz A270003 [106]) wykazywały odwrotną od pozostałych 67 genotypów reakcję na stres niedoboru wody

Wyniki badań dotyczących wpływu stresów abiotycznych na gromadzenie niskocząsteczkowych związków w nadziemnych lub podziemnych częściach roślin nie dają jednoznacznej odpowiedzi co do ich znaczenia w nabywaniu przez rośliny tolerancji na zadany czynnik stresowy. Podwyższona akumulacja związków niskocząsteczkowych w odpowiedzi na stres niedoboru wody uważana jest m.in. za mechanizm aklimatyzacyjny związany, w zależności od badanego organu, z zahamowaniem, albo wręcz odwrotnie – ze stymulowaniem wzrostu. Z jednej strony postuluje się, że zwiększone gromadzenie metabolitów w liściach i łodygach wynika z ograniczenia ich wzrostu podczas suszy, dzięki

czemu możliwe jest dostosowanie osmotyczne oraz magazynowanie źródła węgla i energii (np. w postaci węglowodanów) na czas niesprzyjających warunków środowiskowych, co umożliwiłoby podtrzymanie niezbędnych procesów życiowych oraz szybki powrót metabolizmu do stanu wyjściowego po ich ustąpieniu (Bartels i Sunkar 2005). Z drugiej strony podwyższona akumulacja metabolitów w częściach podziemnych uważana jest za mechanizm związany z podtrzymywaniem wzrostu systemu korzeniowego, który w warunkach suszy ułatwiałby pobór wody z głębszych warstw gleby (Sharp i in. 2004). Dodatkowo liczne badania opisują dostosowanie osmotyczne jako korzystny mechanizm aklimatyzacyjny związany nie tylko z przetrwaniem warunków deficytu wody, ale także ze

Tab. 5.1. Wpływ dostosowania osmotycznego na wielkość plonu („+” korelacja dodatnia, „-” korelacja ujemna).

GATUNEK	WPLYW DOSTOSOWANIA OSMOTYCZNEGO NA PLON	ODNIESIENIE
Ciecierzycza pospolita <i>Cicer arietinum</i> L.	+ + brak korelacji	Morgan i in. 1991 Moinuddin i Khanna-Chopra 2004 Turner i in. 2007
Groch zwyczajny <i>Pisum sativum</i> L.	brak korelacji	Sánchez i in. 1998
Jęczmień zwyczajny <i>Hordeum vulgare</i> L.	- + +	Grumet i in. 1987 Teulat i in. 1997 González i in. 2008
Kukurydza zwyczajna <i>Zea mays</i> L.	brak korelacji	Bolaños i Edmeades 1991
Nikla indyjska <i>Cajanus cajan</i>	+/- ⁽¹⁾	Subbarao i in. 2000
Proso włoskie <i>Setaria italica</i>	+	Karyudi i Fletcher 2003
Pszenica szorstka <i>Triticum turgidum</i> L.	+	Teulat i in. 1997
Pszenica twarda <i>Triticum durum</i> Desf.	+	Hafid i in. 1998
Pszenica zwyczajna <i>Triticum aestivum</i> L.	+ +	Morgan 1995 Blum i in. 1999
Rącznik pospolity <i>Ricinus communis</i> L.	+	Babita i in. 2010
Słonecznik zwyczajny <i>Helianthus annuus</i> L.	+ +	Chimenti i in. 2002 Rauf i Sadaqat 2008
Sorgo cukrowe <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	brak korelacji + +	Flower i in. 1990 Ludlow i in. 1990 Santamaria i in. 1990

¹ w zależności od fazy rozwojowej

zwiększonym plonowaniem roślin (tab. 5.1). Niemniej jednak publikowane są także doniesienia, w których wykazano brak wpływu dostosowania osmotycznego a nawet jego negatywne oddziaływanie na wysokość plonu. Poza tym w przypadku niektórych roślin, m.in. jęczmienia, doniesienia na temat związku pomiędzy dostosowaniem osmotycznym roślin poddanych stresowi niedoboru wody a plonem są niespójne. W przypadku tego gatunku z jednej strony obserwowano pozytywną korelację między dostosowaniem osmotycznym, względną zawartością wody (RWC), potencjałem wody a plonem (González i in. 2008). Z kolei w innych doświadczeniach linie jęczmienia wykazujące wysokie dostosowanie osmotyczne charakteryzowały się wolniejszym wzrostem, niższą produkcją suchej masy i mniejszym plonem niż linie wytypowane jako te o niskim dostosowaniu osmotycznym (Grumet i in. 1987). Dodatkowo eksperymenty przeprowadzone na siewkach jęczmienia przez Schmidhaltera i in. wykazały, że w warunkach niedoboru wody dostosowanie osmotyczne było większe w korzeniach niż w liściach badanych roślin, co korelowało ze zwiększeniem stosunku biomasy korzeni do liści, wynikającym z silnego promowania wzrostu korzeni w warunkach umiarkowanego stresu suszy (Schmidhalter i in. 1992).

Większość ujętych w analizie póliłościowej węglowodanów, obecnych w ekstraktach tkanek odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus, wykazywała różnice w poziomach akumulacji zarówno ze względu na badaną odmianę bądź linię, jak i ze względu na zmiany wywołane niedoborem wody (tab. 4.3, tab. 4.4). W przypadku obu powyższych czynników, wpływających na zawartość tej klasy metabolitów w tkankach jęczmienia, więcej istotnych statystycznie zmian zaobserwowano wśród węglowodanów obecnych w liściu niż w korzeniu. Ponadto zmiany stężeń niektórych związków reprezentujących tę klasę (m.in. glukozy [70] i galaktinolu [110]) związane były z jednoczesnym wpływem genotypu i suszy. Jeśli chodzi o zmiany ilości węglowodanów pomiędzy czterema badanymi genotypami – u linii Cam/B1/CI w liściu odnotowano najmniejszą liczbę związków, których stężenie pod wpływem suszy wzrosło (w grupie tej znajdowały się 4 metabolity: fruktoza [69], glukoza [70], rafinoza i 1-kestoza) (tab. 4.3, ryc. 4.6). Jednocześnie w korzeniu tej linii obserwowano największą liczbę węglowodanów, w porównaniu z pozostałymi odmianami, których ilość w roślinach poddawanych stresowi wzrosła (można tu wyróżnić: związek podobny do pochodnej fruktozy [65], glukozę [70], mio-inozytol [84], glicerolo-fosfoglicerol [90], trehalozę [107], galaktinol [110], 1-kestozę) (tab. 4.4, ryc. 4.6). Również w przypadku linii jęczmienia populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI odnotowano zmiany ilości niektórych węglowodanów wywołane niedoborem wody (ryc. 4.7). Wśród metabolitów obecnych

w ekstraktach liści linii jęczmienia obserwowano przesunięcia rozkładu poszczególnych związków w kierunku wyższych stężeń m.in. dla kwasu erytronowego [41], glukozy [70], związku podobnego do glukopiranozy [78], kwasu askorbinowego [76], mio-inozytolu [84] oraz galaktinolu [110]. Jeśli chodzi o metabolity wyizolowane z korzeni widoczne były przesunięcia w kierunku wyższych stężeń głównie dla trehalozy [107] oraz galaktinolu [110]. Ponadto część wykrytych w tkankach jęczmienia węglowodanów wykazywała wysokie zróżnicowanie pod względem zmian w poziomach akumulacji wywołanych stresem suszy pomiędzy badanymi liniami (zwiększone lub zmniejszone gromadzenie związków) (ryc. 4.8, ryc. 4.9). Wśród metabolitów wykazujących taką niejednakową reakcję można było wyróżnić m.in. fruktozę [69] w liściu oraz fruktozo-6-fosforan [97] w korzeniu. Dodatkowo związek występujący w liściach i korzeniach badanych roślin w najwyższych ilościach – sacharoza [105] – nie wykazywał dużych zmian akumulacji. Jednak ze względu na wysokie stężenie tego metabolitu w próbkach oraz dużą intensywność otrzymanych sygnałów m/z, powodującą wysycenie detektora, wyniki dotyczące analizy półilościowej sacharozy mogą być obarczone błędem.

Gromadzenie w tkankach pod wpływem stresów środowiskowych niestrukturalnych węglowodanów jest skutkiem zmian w metabolizmie węgla. Wielkość tych zmian zależy od wielu czynników, w tym m.in. od gatunku rośliny, czasu oddziaływania, intensywności oraz momentu zaistnienia czynnika stresowego. Wykryta w próbkach ekstraktów liści i korzeni jęczmienia 1-kestoza, wykazująca w warunkach deficytu wody podwyższoną akumulację (ryc. 4.6), należy do grupy związków nazywanych fruktanami, które tak jak skrobia pełnią funkcję materiału zapasowego w roślinie. Jednak w przeciwieństwie do skrobi, która jest gromadzona w plastydach, związki te występują w wakuolach komórek (Ritsema i Smeekens 2003a). U traw fruktany są magazynowane u nasady blaszki liściowej i wykorzystywane m.in. do ponownego wzrostu liści po ich zrzuceniu (Morvan-Bertrand i in. 2001). Ponadto sugeruje się, że w niesprzyjających warunkach środowiska fruktany mogą stabilizować i chronić przed uszkodzeniami błony biologiczne poprzez oddziaływanie z polarnymi główkami lipidów (Vereyken i in. 2001). Fruktany występują u około 15% roślin okrytonasiennych, należących zarówno do roślin dwuliściennych, m.in. z rodzin astrowatych, dzwonkowatych i ogórecznikowatych, jak i roślin jednoliściennych z rodzin liliowatych i wiechlinowatych; przedstawicielem tej ostatniej jest jęczmień (Hendry 1993, Ritsema i Smeekens 2003a). Przebieg syntezy fruktanów jest złożony i zaangażowane są w nią cztery fruktozylotransferazy (Livingston i in. 2009). Wykryta w jęczmieniu 1-kestoza jest trisacharydem będącym najprostszym przedstawicielem jednej z grup fruktanów – inulin

(monocukry połączone wiązaniami β -2,1-glikozydowymi) (Ritsema i Smeekens 2003b). Metabolit ten powstaje w pierwszej reakcji zapoczątkowującej szlak syntezy fruktanów, polegającej na reakcji enzymatycznej dwóch cząsteczek sacharozy, przebiegającej z uwolnieniem glukozy, przy udziale sacharozo-sacharozo fruktozylotransferazy (1-SST, ang. *sucrose:sucrose fructosyltransferase*). U jęczmienia oprócz 1-SST obecny jest także drugi enzym, sacharozo-fruktano 6-fruktozylotransferaza (6-SFT, ang. *sucrose:fructan 6-fructosyltransferase*), który jest zdolny do przeprowadzenia syntezy 6-kestozy, a także formowania polimerów fruktanowych z grupy lewanów poprzez tworzenie wiązań β -2,6-glikozydowych (Livingston i in. 2009). Przeprowadzone doświadczenia wykazały kilkudziesięciokrotny wzrost zawartości 1-kestozy w korzeniach roślin jęczmienia poddanych stresowi niedoboru wody w porównaniu z roślinami kontrolnymi (ryc. 4.6). Wywołaną suszą podwyższoną akumulację zarówno 1-kestozy, jak i 1-SST obserwowali także De Roover i in. w liściach i korzeniach cykorii podróżnik (*Cichorium intybus* L.) (De Roover i in. 2000). Jednakże brak dotychczas doniesień o zachowaniu tego metabolitu w jęczmieniu w warunkach deficytu wody. Badania przeprowadzone przez Sicher i in., dotyczące zmian zawartości metabolitów pierwotnych w korzeniu jęczmienia poddanego suszy, obejmowały 30 związków, w tym 6 węglowodanów, aczkolwiek w grupie monitorowanych metabolitów nie uwzględniono 1-kestozy (Sicher i in. 2012). Ponadto warto nadmienić, że rośliny jęczmienia poddane toksycznemu oddziaływaniu boru wykazywały wzrost zawartości fruktanu z grupy lewanów, dokładnie kilkunastokrotny wzrost 6-kestozy w liściach (Roessner i in. 2006). Wskazuje to na istotną rolę związków należących do tej grupy w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe pochodzące ze środowiska.

W badanych próbkach ekstraktów tkanek jęczmienia obserwowano także wzrost rafinozy (ryc. 4.6) oraz jej prekursorów galaktinolu [110] i mio-inozytolu [84] (tab. 4.3, tab. 4.4, ryc.4.7). Reakcją dającą początek szlakowi metabolicznemu oligosacharydów z rodziny rafinozy (RFO, ang. *raffinose family oligosaccharides*) jest reakcja syntezy galaktinolu z mio-inozytolu i urydynodifosfogalaktozy katalizowana przez syntazę galaktinolu (GolS, ang. *galactinol synthase*). Następnie syntaza rafinozy (RFS, ang. *raffinose synthase*) katalizuje reakcję galaktinolu i sacharozy prowadzącą do powstania rafinozy i mio-inozytolu. Przeprowadzenie nadekspresji GolS w *Arabidopsis* przez Taji i in. skutkowało akumulacją w roślinach zarówno galaktinolu, jak i rafinozy (Taji i in. 2002). Ponadto u roślin poddanych transgenezie stwierdzono obniżoną transpirację w stosunku do roślin typu dzikiego, co przyczyniło się do zwiększonej tolerancji na stres niedoboru wody roślin z nadekspresją GolS. Zwiększoną zawartość węglowodanów z grupy RFO, takich jak trisacharydu – rafinozy,

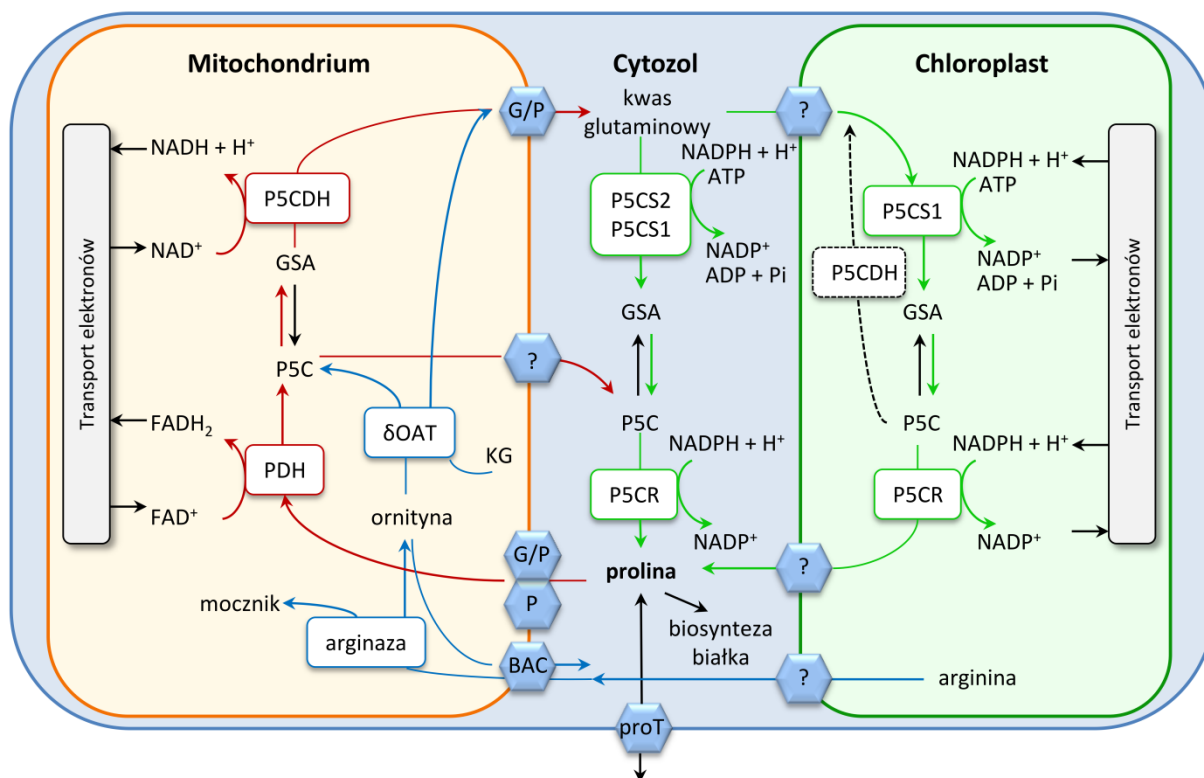
tetrasacharydu – stachiozy oraz pentasacharydu – werbaskozy, obserwowano także u innych gatunków roślin poddanych zarówno stresowi suszy, jak i innym czynnikom abiotycznym, w tym stresom niskich i wysokich temperatur oraz zasolenia (Jouve i in. 2004, Kaplan i in. 2004, Peters i in. 2007, Suguiyama i in. 2014). Węglowodanom z tej rodziny przypisuje się rolę w dostosowaniu osmotycznym, stabilizowaniu błon biologicznych poprzez oddziaływanie z grupami fosforanowymi lipidów oraz w zmiataniu wolnych rodników (Suguiyama i in. 2014).

Poza wyżej wspomnianymi węglowodanami obserwowano także wzrost stężenia glukozy [70] (tab. 4.3, tab. 4.4, ryc. 4.7), co może być związane z degradacją skrobi. Skrobia i sacharoza są produktami fotosyntetycznej asymilacji CO₂ i powstają z fosforanów trioz generowanych w cyklu Calvina. Sacharoza jest syntetyzowana w cytozolu, a następnie rozprowadzana w roślinie poprzez łyko. Z kolei skrobia powstaje w chloroplastach, jest nierozpuszczalna i służy jako materiał zapasowy. Synteza sacharozy i skrobi są konkurującymi ze sobą reakcjami, a uruchomienie odpowiedniego szlaku biosyntetycznego zależy od względnych stężeń kilku metabolitów (ortofosforanu, fruktozo-6-fosforanu, kwasu 3-fosfoglicerynowego oraz fosfodihydroksyacetonu) (Taiz i Zeiger 2002). Niezbędnym etapem poprzedzającym rozpad skrobi jest fosforylacja ziaren skrobi, w której uczestniczą dwa enzymy: dikinaza glukan-woda (GWD, ang. *glucan, water dikinase*) oraz dikinaza fosfoglukan-woda (PWD, ang. *phosphoglucan, water dikinase*). Reakcje te umożliwiają rozpad wierzchniej, krystalicznej warstwy ziaren skrobi, pozwalając na dostęp enzymów hydrolitycznych (takich jak β-amylaza i izoamylaza), które degradują skrobię do maltozy. Maltoza następnie przechodzi do cytozolu, gdzie ulega dalszym przemianom (Kötting i in. 2010). Zawartość skrobi w liściach jęczmienia sięga około 5% suchej masy, a jej ilość zmienia się w rytmie okołodobowym (Sicher i in. 1984). Metabolizm skrobi zależy jednak nie tylko od pory dnia, ale także od zmian zachodzących w środowisku życia rośliny, w tym stresów abiotycznych. Udowodniono, że stresy zasolenia oraz niedoboru wody prowadzą do zmniejszenia zawartości skrobi i jednoczesnego zwiększenia stężenia rozpuszczalnych cukrów w liściach roślin poddawanych tym stresom (Todaka i in. 2000, Basu i in. 2007, Kempa i in. 2008). Uważa się, że gromadzone cukry odgrywają rolę w dostosowaniu osmotycznym pomagając w zachowaniu turgoru oraz chronią błony i białka przed skutkami stresu (Kaplan i Guy 2004). Ponadto Dreier i in. w roślinach jęczmienia poddanych stresom niedoboru wody, zasolenia i wysokich temperatur obserwowali wzrost akumulacji jednego z enzymów biorących udział w hydrolizie skrobi – β-amylazy (Dreier i in. 1995).

W przeprowadzonych doświadczeniach obserwowano również wzrost zawartości trehalozy [107] w korzeniach badanych siewek jęczmienia poddanych stresowi deficytu wody (tab. 4.4, ryc. 4.7). Trehaloza jest nieredukującym disacharydem zbudowanym z dwóch cząsteczek glukozy. U roślin synteza trehalozy zachodzi w dwóch etapach. W pierwszej reakcji, katalizowanej przez syntazę trehalozo-6-fosforanu (TPS, ang. *trehalose-6-phosphate synthase*), z urydynodifosfoglukozy i glukozy-6-fosforanu powstaje trehalozo-6-fosforan. Związek ten jest następnie defosforylowany do trehalozy przy udziale fosfatazy trehalozo-6-fosforanu (TPP, ang. *phosphatase trehalose-6-phosphate*) (Paul i in. 2008). Trehaloza u wielu gatunków bakterii, grzybów oraz bezkręgowców jest zaangażowana w odpowiedź na czynniki stresowe, w tym m.in. stres osmotyczny i stres oksydacyjny (Fernandez i in. 2010). Jednakże u roślin jej funkcja nie jest jeszcze dokładnie poznana, chociaż istnieją doniesienia potwierdzające jej ochronną rolę podczas stresów abiotycznych. Avonce i in. pokazali, że nadekspresja TPS w *Arabidopsis* prowadziła do niewielkiego wzrostu trehalozy i trehalozo-6-fosforanu. Badane mutanty nie wykazywały widocznych zmian morfologicznych poza opóźnionym kwitnieniem, za to charakteryzowały się podwyższoną tolerancją na dehydratację (Avonce i in. 2004). Podobnie, badania nad pomidorami z wprowadzoną drożdżową TPS pokazały, że rośliny transgeniczne cechowały się zwiększoną tolerancją na suszę, zasolenie i stres oksydacyjny w porównaniu z roślinami typu dzikiego (Cortina i Culiáñez-Macià 2005). Jednakże autorzy pracy, poza zmianami w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe, obserwowali także zmiany w morfologii badanych mutantów, takie jak grubsze pędy, sztywniejsze i ciemnozielone liście, wyprostowane gałązki i nietypowy rozwój korzenia. Ponadto transgeniczne pomidory charakteryzowały się podwyższoną zawartością skrobi i chlorofilu w liściach. Niewiele jednak wiadomo o zmianach w syntezie trehalozy lub trehalozo-6-fosforanu w odpowiedzi na stesy abiotyczne w roślinach nie poddawanych transgenezie, szczególnie w roślinach uprawnych. Wynika to z faktu, że trehaloza w roślinach zwykle jest obecna w śladowych ilościach i jedynie grupa roślin nazywana zmartwychwstankami (przedstawicielem jest np. róża jerychońska), zdolnych do przetrwania w warunkach skrajnej suszy, cechuje się podwyższonymi stężeniami tego związku (Paul i in. 2008). Jak dotąd nie udało się także wyjaśnić, na czym dokładnie polega rola trehalozy lub trehalozo-6-fosforanu w odpowiedzi na deficyt wody. Niemniej jednak, wydaje się, że związki te mogą brać udział w osmoregulacji, przekazywaniu sygnałów, zmiataniu wolnych rodników oraz opóźnianiu apoptozy (Fernandez i in. 2010).

Przeprowadzona analiza ilościowa aminokwasów ujawniła zróżnicowaną odpowiedź tej klasy związków pomiędzy badanymi genotypami jęczmienia w warunkach niedoboru wody oraz pomiędzy tkankami: liściem i korzeniem. Jeśli chodzi o zmiany ilości aminokwasów obecnych w tkankach genotypów Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus najwięcej zmian, podobnie jak w przypadku węglowodanów, było konsekwencją różnic odmianowych, a następnie wpływu suszy (tab. 4.3, tab. 4.4). Najmniej różnic związanych było z jednoczesnym wpływem genotypu i suszy na zawartość analizowanych aminokwasów w badanych tkankach (interakcja O x S) (tab. 4.3, tab. 4.4). Odpowiedź linii Cam/B1/CI na warunki niedoboru wody pod względem zmiany poziomów akumulacji aminokwasów, podobnie jak w przypadku węglowodanów, wyróżniała ten genotyp spośród pozostałych. Wśród aminokwasów wykrytych w ekstraktach liści linii syryjskiej odnotowano największą liczbę związków, których akumulacja w warunkach suszy istotnie się zmniejszyła (tab. 4.3). W tej grupie metabolitów można było wyróżnić aminokwasy białkowe: alaninę [3, 28], serynę [12, 27], kwas asparaginowy [38], glutaminę (3 z 4 wykrytych pochodnych wykazywały obniżoną akumulację [34, 46, 60]), lizynę [73] oraz niebiałkowe: kwas piperolinowy [26] i kwas pirolglutaminowy [39]. Jednocześnie korzeń linii Cam/B1/CI cechowała największa liczba związków wykazujących pod wpływem suszy podwyższoną akumulację (tab. 4.4). Grupa ta obejmowała alaninę [3, 28], prolinę [7, 18, 44], walinę [9], serynę [12, 27], glicynę [19], treoninę [29], oraz kwasy asparaginowy [38] i glutaminowy [47]. W przypadku linii jęczmienia populacji mapującej Maresi x Cam/B1/CI również zaobserwowano zmiany w metabolizmie aminokwasów skutkujące podwyższonymi lub obniżonymi stężeniami tych związków w tkankach.

Aminokwasem wysoce różnicującym profile metabolitów roślin poddanych stresowi niedoboru wody od roślin kontrolnych była prolina. Wewnątrzkomórkowe stężenie proliny zależy od stopnia jej biosyntezy, katabolizmu i transportu pomiędzy komórkami i przedziałami komórkowymi (ryc. 5.2). Prolina jest syntetyzowana głównie z kwasu glutaminowego, który w cytozolu jest redukowany do semialdehydu kwasu glutaminowego (GSA, ang. *glutamate-semialdehyde*) przez syntetazę pirolino-5-karboksylanu (P5SC, ang. *pyrroline-5-carboxylate synthetase*). Następnie GSA jest przekształcany do pirolino-5-karboksylanu (P5C, ang. *pyrroline-5-carboxylate*). W kolejnym etapie powstały P5C jest redukowany do proliny przez reduktazę pirolino-5-karboksylanu (P5CR, ang. *pyrroline-5-carboxylate reductase*). U większości gatunków roślin P5CS jest kodowany przez dwa geny, z kolei P5CR przez jeden. Z kolei szlak kataboliczny proliny przebiega w mitochondrium,



Ryc. 5.2. Metabolizm proliny u roślin wyższych. Kolor zielony – szlak syntezy, czerwony – katabolizm, niebieski – szlak ornityny, ? – nieznanne transportery, BAC – transporter aminokwasów zasadowych, G/P – mitochondrialny antyporter kwas glutaminowy/prolina, GSA – semialdehyd glutaminowy, KG – kwas α -ketoglutazarowy, P – mitochondrialny transporter proliny, P5C – pirolino-5-karboksylan, P5CDH – dehydrogenaza P5C, P5CR – reduktaza P5C, P5CS – syntetaza P5C, PDH – dehydrogenaza prolinowa, Pi – fosforan nieorganiczny, ProT – transporter błonowy proliny, δ OAT – δ -aminotransferaza ornitynowa (według Szabados i Savouré 2010).

gdzie na skutek działania dehydrogenazy prolinowej (PDH, ang. *proline dehydrogenase*), prolina jest przekształcana do P5C. Następnie z P5C tworzony jest kwas glutaminowy przy udziale dehydrogenazy pirolino-5-karboksylanu (P5CDH, ang. *pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase*). Ponadto istnieje alternatywny szlak biosyntezy proliny, w którym to syntetyzowana jest ona z ornityny. W pierwszym etapie dochodzi do transaminacji ornityny przez δ -aminotransferazę ornitynową (δ OAT, ang. *ornithine- δ -aminotransferase*) do GSA, który jest następnie spontanicznie przekształcany do P5C (Szabados i Savouré 2010). Przeprowadzone na czterech genotypach (Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus) doświadczenia ujawniły podwyższoną akumulację proliny (trzech zarejestrowanych pochodnych [7, 18, 44]) w warunkach suszy w liściach wszystkich czterech odmian (tab. 4.3). Poziom tego aminokwasu w liściach zmieniał się nie tylko na skutek niedoboru wody, ale także różnicował odmiany w warunkach kontrolnych; ponadto wykazywał efekt interakcji, co

świadczy o niejednakowej odpowiedzi badanych odmian na stres deficytu wody. Linia Cam/B1/CI charakteryzowała się najwyższą zawartością proliny w liściach w warunkach kontrolnych i jej stężenie było 2- 14-krotnie większe niż u pozostałych genotypów (tab. CD.2a.). Jednocześnie u linii syryjskiej obserwowano najmniejsze, bo niespełna dwukrotne, gromadzenie tego aminokwasu na skutek stresu, podczas gdy u odmian Maresi, Sebastian i Stratus poddanych stresowi suszy odnotowano, odpowiednio, 24-, 34- i 7-krotne podwyższenie poziomu akumulacji (tab. CD.2a.). Podobnie w przypadku analizy stu linii jęczmienia, pochodzących z krzyżowania Maresi i Cam/B1/CI, obserwowano przesunięcia rozkładu proliny [7, 18, 44] w badanej populacji w kierunku wyższych stężeń (ryc. 4.7). Dodatkowo odnotowano różnice pomiędzy profilami metabolitów wyizolowanych z tkanek nadziemnych i podziemnych. W przypadku liści wzrost poziomu akumulacji na skutek suszy był widoczny we wszystkich stu liniach (ryc. 4.8). Jeśli zaś chodzi o korzeń, dla kilkunastu linii z populacji Maresi × Cam/B1/CI, obserwowano obniżone, w stosunku do roślin kontrolnych, gromadzenie proliny (ryc. 4.9). Z kolei zaangażowany w metabolizm proliny kwas glutaminowy [47] wykazywał nieznaczne, w porównaniu z proliną, zmiany poziomów akumulacji (ryc. 4.7, ryc. 4.8, ryc. 4.9). Do zwiększenia stężenia proliny w roślinach dochodzi w wyniku działania rozmaitych czynników biotycznych i abiotycznych, w tym stresu zasolenia, suszy, wysokich i niskich temperatur, obecności metali ciężkich i zanieczyszczeń środowiska, promieniowania UV, niedoboru składników odżywczych oraz ataku patogenów (Verbruggen i Hermans 2008). Aminokwasowi temu przypisuje się wiele funkcji i oprócz udziału w biosyntezie białek, prolina pełni funkcje ochronne jako osmolit oraz molekularny chaperon – poprzez stabilizowanie białek i zapobieganie ich agregacji. Ponadto przyczynia się do utrzymania równowagi oksydoredukcyjnej, bierze udział w przekazywaniu sygnałów, a także odgrywa ważną rolę na różnych etapach rozwoju rośliny (m.in. w fazie rozwoju zarodka i kwitnienia) (Mattioli i in. 2009, Szabados i Savouré 2010, Kavi Kishor i Sreenivasulu 2014). Jedną z pierwszych prac, w której zaobserwowano korelację pomiędzy poziomem akumulacji proliny a zwiększoną tolerancją na stres suszy był jęczmień. W doświadczeniach na 10 genotypach autorzy zarejestrowali wielokrotnie wyższą zawartość proliny u odmian wykazujących tolerancję niż u odmian wrażliwych (Singh i in. 1972). Ponadto znaczenie proliny w stresie osmotycznym zostało potwierdzone w licznych doświadczeniach z wykorzystaniem roślin transgenicznych. Jedno z nich polegało na nadekspresji P5CS w tytoniu, która prowadziła do podwyższenia poziomu proliny i mniejszego spadku potencjału osmotycznego w liściach roślin transgenicznych w stosunku do roślin kontrolnych w warunkach niedoboru wody (Kavi Kishor i in. 1995). Aczkolwiek nie

zawsze obserwowana jest dodatnia korelacja pomiędzy akumulacją proliny a tolerancją stresu. Przykładem może być jęczmień poddany stresowi solnemu, w liściach którego co prawda obserwowano podwyższone stężenie proliny w odpowiedzi na zadany czynnik stresowy zarówno u odmian wrażliwych jak i wykazujących tolerancję, jednak w przypadku tych pierwszych akumulacja proliny była dwukrotnie wyższa, co wskazuje na związek proliny ze zwiększoną wrażliwością na stres (Chen i in. 2007). Stąd też zależność między gromadzeniem proliny a aklimatyzacją do niekorzystnych warunków środowiskowych pozostaje niejednoznaczna. Sugeruje się, że nie sam poziom akumulacji proliny, ale jej prawidłowy metabolizm (regulacja syntezy i katabolizmu proliny oraz jej wewnątrz- i zewnątrzkomórkowy transport) pozwalający na utrzymanie homeostazy, jest kluczowy dla tolerancji stresu (Kavi Kishor i Sreenivasulu 2014).

Jeśli chodzi o zmiany w profilach akumulacji pozostałych aminokwasów białkowych w ekstraktach roślin poddanych stresowi niedoboru wody raportowano, w zależności od badanego gatunku i organu, wrażliwości bądź tolerancji badanych roślin na suszę oraz momentu zaistnienia i intensywności działania czynnika stresowego, zarówno podwyższoną, jak i obniżoną zawartość związków z tej klasy. Bowne i in. w badaniach nad pszenicą obserwowali oprócz zwiększonego stężenia proliny w liściach, także wzrost akumulacji tryptofanu oraz aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach: leucyny, izoleucyny i waliny (Bowne i in. 2012). Witt i in. w doświadczeniach dotyczących kukurydzy poddanej stresowi suszy odnotowali podwyższony poziom wielu aminokwasów w badanych liściach, w tym przede wszystkim proliny, tryptofanu, fenyloalaniny i histydyny (Witt i in. 2012). Sanchez i in. badając kilka gatunków roślin z rodzaju *Lotus* obserwowali zróżnicowaną odpowiedź ze strony aminokwasów. Podczas gdy poziom proliny, leucyny i izoleucyny wzrastał na skutek suszy, ilość seryny, glicyny i treoniny spadała. Z kolei część aminokwasów nie wykazywała istotnych różnic, w tym asparagina, lizyna i walina (Sanchez i in. 2012). Podobne zróżnicowanie odpowiedzi na stres suszy było widoczne pod względem reakcji aminokwasów niebiałkowych. W przeprowadzonych w niniejszej pracy doświadczeniach, w tkankach jęczmienia wykryto β -alaninę, GABA, kwas piperkolinowy oraz kwas piroglutaminowy. Spośród powyższych aminokwasów niebiałkowych największe zmiany wywołane suszą odnotowano dla kwasu piroglutaminowego [39], którego ilość w liściach większości przebadanych genotypów poddanych stresowi spadała (tab. 4.3, ryc. 4.7). Kwas piroglutaminowy, nazywany też 5-oksoproliną, jest jednym z produktów metabolizmu glutationu w roślinach. Glutation jest tripeptydem zbudowanym z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny, pełniącym wielorakie funkcje w roślinie; jednak głównie zaangażowany

jest w reakcje oksydo-redukcyjne. Według zaproponowanego przez Ohkamę-Ohtsu i in. szlaku glutationu w *Arabidopsis*, glutation w cytoplazmie jest przekształcany do kwasu piroglutaminowego, a następnie do kwasu glutaminowego w wyniku działania γ -glutamylcyklotransferazy (GGC, ang. *γ -glutamyl cyclotransferase*) oraz 5-oksoprolinazy (5OPase, ang. *5-oxoprolinase*) (Ohkama-Ohtsu i in. 2008). Także Witt i in. we wspomnianej wcześniej pracy dotyczącej kukurydzy obserwowali wzrost ilości kwasu piroglutaminowego pod wpływem suszy w liściach badanych roślin (Witt i in. 2012). Jednak autorzy tego doniesienia odnotowali także zmiany w akumulacji pozostałych aminokwasów niebiałkowych, szczególnie β -alaniny. Z kolei w pracy dotyczącej wpływu niedoboru wody na profil metabolitów obecnych w liściach grochu obserwowano podwyższony poziom GABA (Charlton i in. 2008). Powyższe badania pokazują, że zmiany poziomów akumulacji niektórych aminokwasów są zmianami zachowanymi ewolucyjnie pomiędzy gatunkami, powszechnie występującymi u roślin, zaś część z nich jest gatunkowo-specyficzna.

Profilowanie metabolitów obecnych w próbkach ekstraktów liści i korzeni jęczmienia pozwoliło na analizę zmian ilości siedmiu amin organicznych pod wpływem zastosowanego stresu deficytu wody. Dwie aminy: 5-hydroksytryptamina (serotonina) oraz fosforan etanoloaminy obecne były jedynie w ekstraktach korzeni. W przypadku analizy tkanek 4 genotypów: Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus, obserwowano głównie spadek ilości izopentyloaminy [6] oraz podwyższoną akumulację tyraminy [72] w liściach trzech odmian europejskich (tab. 4.3). Jeśli zaś chodzi o linie jęczmienia uzyskane w wyniku krzyżowania Maresi i Cam/B1/CI, odnotowano jedynie niewielkie przesunięcia rozkładu fosforanu etanoloaminy [59] i tyraminy [72] w badanej populacji w kierunku wyższych stężeń (ryc. 4.7). Etanoloamina w roślinach powstaje głównie w wyniku dekarboksylacji seryny katalizowanej przez dekarboksylazę seryny (SDC, ang. *serine decarboxylase*) (Rontein i in. 2003). Następnie w wyniku działania kinazy etanoloaminy (ang. *ethanolamine kinase*) grupa fosforanowa z ATP zostaje przeniesiona na etanoloaminę prowadząc do powstania fosforanu etanoloaminy (Wharfe i Harwood 1979). Kolejne reakcje (w tym 3 reakcje metylacji) prowadzą do syntezy choliny, która pełni istotne funkcje w roślinie biorąc udział w syntezie lipidu błonowego – fosfatydylocholiny, oraz będąc prekursorem betainy glicynowej, ważnego osmoprotektanta gromadzącego się w roślinach pod wpływem stresów środowiskowych (Chen i Murata 2011). Nadekspresja N-metylotransferazy fosfoetanoloaminowej (PEAMT, ang. *phosphoethanolamine N-methyltransferase*) w tytoniu, katalizującej reakcje metylacji prowadzące do przekształcenia fosforanu etanoloaminy do fosfocholiny, prowadziła do

5-krotnego wzrostu akumulacji fosfocholiny, 50-krotnego choliny i 30-krotnego betainy glicynowej (McNeil i in. 2001). Wyniki te wskazują na możliwość podwyższenia poziomu betainy glicynowej na drodze inżynierii genetycznej w organizmach, u których w warunkach naturalnych związek ten nie występuje w dużych ilościach, a także ukazują istotną rolę jaką etanoloamina i fosfoetanoloamina pełnią w roślinach. Z kolei tyramina powstaje w wyniku dekarboksylacji tyrozyny przy udziale dekarboksylazy tyrozyny (TDC, ang. *tyrosine decarboxylase*). Związek ten następnie bierze udział m.in. w biosyntezie metabolitów wtórnych – amidów kwasów hydroksycynamonowych (HCAA, ang. *N-hydroxycinnamic acid amide*). HCAA powstają w wyniku kondensacji tioestrów hydroksycynamoilo-CoA z aminami aromatycznymi, takimi jak np. tyramina, tryptamina czy serotonina (Kang i in. 2006). HCAA będące pochodnymi tyraminy są obecne w ścianach komórkowych, a ich występowanie w roślinach jest szeroko rozpowszechnione. Przypisuje się im rolę w ochronie przed patogenami oraz właściwości przeciwutleniające (Zacarés i in. 2007). Podczas gdy podwyższony poziom akumulacji poliamin w komórce często jest wiązany z ochroną rośliny przed niekorzystnym wpływem stresów środowiskowych (Hussain i in. 2011), w przypadku próbek ekstraktów metabolitów wyizolowanych z liści i korzeni jęczmienia poddanego stresowi niedoboru wody nie obserwowano dużych zmian w ilości wykrytej putrescyny [55], będącej przedstawicielem tej klasy związków (tab. 4.3, tab. 4.4, ryc. 4.7). Odnotowano jednak duży rozrzut wyników pomiędzy badanymi genotypami (wzrost i spadek akumulacji) dla innej poliaminy – diaminopropanu (1,2- lub 1,3-; niejednoznaczna identyfikacja) [50]. 1,3-diaminopropan jest końcowym produktem degradacji poliamin: triaminy – spermidyny oraz tetraaminy – sperminy. W reakcjach katalizowanych przez oksydazy, ze spermidyny i sperminy powstają 1,3-diaminopropan, aminoaldehydy i nadtlenek wodoru. Powstały w wyniku utleniania poliamin 1,3-diaminopropan może następnie posłużyć do syntezy β -alaniny lub innych, nietypowych poliamin: norsperminy i norspermidyny. Również utworzony w powyższych reakcjach katabolizmu poliamin H_2O_2 odgrywa istotną rolę w obronie rośliny przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Produkcja nadtlenku wodoru wiązana jest z dojrzewaniem i lignifikacją ściany komórkowej, a także jej wzmocnieniem podczas ataku patogenów. Poza tym H_2O_2 będąc cząsteczką sygnałną pośredniczy w przekazywaniu informacji o śmierci komórki, reakcji nadwrażliwości, a także uruchamia ekspresję niektórych genów związanych z obroną komórki (Cona i in. 2006).

Wśród wykrytych kwasów karboksylowych obserwowano 5 kwasów biorących udział w cyklu Krebsa: kwas cytrynowy [66], kwas α -ketoglutarynowy [43], kwas bursztynowy [22],

kwas fumarowy [25] i kwas jabłkowy [36]. Analiza ilościowa tych związków przeprowadzona dla czterech genotypów jęczmienia: Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus, ujawniła odmienną reakcję linii syryjskiej od odmian europejskich w warunkach stresu suszy (tab. 4.3, tab. 4.4). Szczególnie duże różnice były widoczne pomiędzy genotypami rodzicielskimi Maresi i Cam/B1/CI, z których wyprowadzono sto linii jęczmienia stanowiących populację mapującą. Podczas gdy w próbkach ekstraktów korzeni linii Cam/B1/CI trzy kwasy cyklu Krebsa [25, 43, 66], z pięciu wykrytych, wykazywały podwyższony poziom akumulacji, w odmianie Maresi dla żadnego ze wspomnianych pięciu kwasów nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian ilości wywołanych niedoborem wody (tab. 4.4). Jeśli zaś chodzi o analizę ekstraktów liści, odnotowano odwrotną zależność, tj. zmiany poziomów akumulacji wszystkich pięciu kwasów u odmiany Maresi pod wpływem suszy i brak zmian u linii Cam/B1/CI poza wzrostem ilości kwasu α -ketoglutazarowego (tab. 4.3). W przypadku analizy stu linii jęczmienia, pochodzących z krzyżowania Maresi i Cam/B1/CI, największe przesunięcia rozkładu kwasów karboksylowych cyklu Krebsa w liściach badanej populacji w kierunku wyższych stężeń obserwowano dla kwasów jabłkowego [36] i α -ketoglutazarowego [43] (ryc. 4.7). Cykl Krebsa dostarcza komórce energię oraz prekursorów dla wielu szlaków biosyntezy. Zmiany poziomów akumulacji kwasów karboksylowych zaangażowanych w ten cykl mogą świadczyć o zmianach w aktywności metabolicznej badanych tkanek. Podwyższona ilość kwasów biorących udział w cyklu Krebsa w korzeniach linii Cam/B1/CI może być zmianą aklimatyzacyjną, pomagającą roślinie przetrwać w niekorzystnych warunkach ograniczonej dostępności wody. Widodo i in. w badaniach dotyczących wpływu zasolenia na metabolom jęczmienia stwierdzili podwyższony poziom kwasów karboksylowych z cyklu Krebsa u odmiany cechującej się tolerancją na stres zasolenia, co korelowało z kontynuacją wzrostu rośliny pomimo oddziaływania niekorzystnych warunków środowiskowych. Jednocześnie u odmiany nie wykazującej tolerancji na zadany czynnik stresowy badacze obserwowali obniżony poziom kwasów karboksylowych i zahamowanie wzrostu w warunkach stresu. Autorzy zasugerowali, że to energia generowana w cyklu Krebsa posłużyła roślinom z podwyższoną tolerancją na zasolenie na kontynuowanie wzrostu pomimo obecności w środowisku czynnika stresowego (Widodo i in. 2009). Wyniki te nie są jednak zgodne z obserwacjami poczynionymi przez Bowne i in., którzy w liściach odmian pszenicy wykazujących tolerancję na stres niedoboru wody odnotowali niewielkie obniżenie poziomu akumulacji większości wykrytych kwasów organicznych, poza kwasem α -ketoglutazarowym, dla którego obserwowali podwyższoną ilość (Bowne i in. 2012). Z kolei Sanchez i in. w doświadczeniach dotyczących wpływu suszy na

różne gatunki z rodzaju *Lotus* obserwowali istotny wzrost poziomu akumulacji produktów pośrednich w cyklu Krebsa, w tym kwasu bursztynowego i jabłkowego (Sanchez i in. 2012). Zaś Witt i in. w badaniach nad kukurydzą poddaną stresowi deficytu wody raportowali obniżoną ilość kwasu α -ketoglutazarowego i kwasu bursztynowego (Witt i in. 2012).

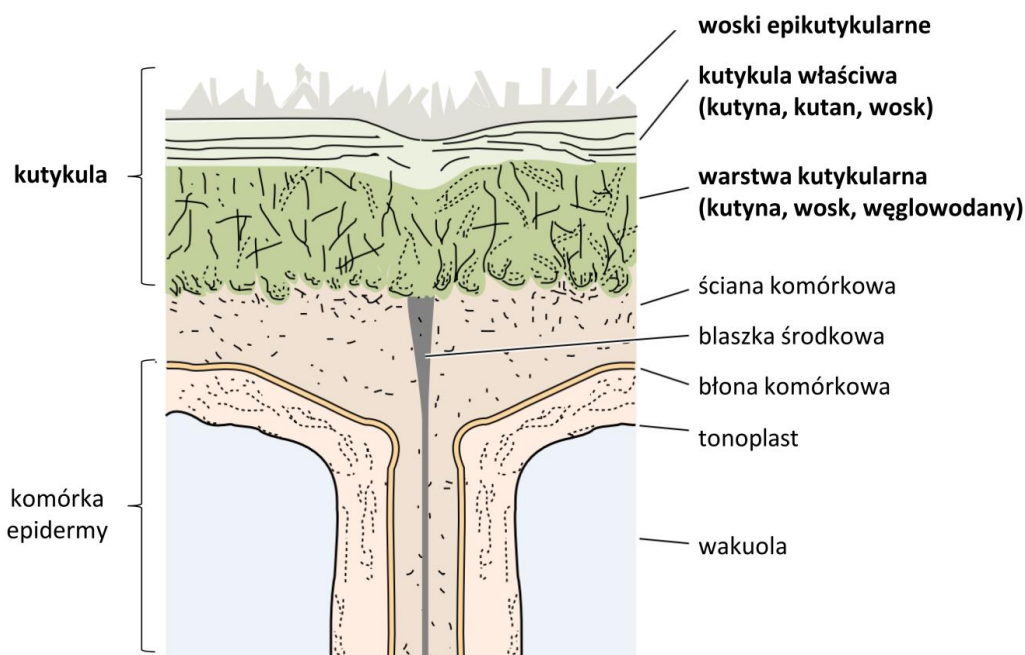
Poza kwasami karboksylowymi biorącymi udział w cyklu Krebsa wykryto pochodne kwasów hydroksycynamonowych: kwas trans-ferulowy [85] i chlorogenowy [113] w liściach oraz kwas p-kumarowy [75] w korzeniach jęczmienia. Jeśli chodzi o kwas trans-ferulowy [85] nie obserwowano znaczących zmian w poziomach akumulacji pomiędzy czterema genotypami: Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus w warunkach niedoboru wody (tab. 4.3); odnotowano jednak przesunięcie rozkładu ilości tego kwasu w populacji stu linii jęczmienia w kierunku wyższych stężeń (ryc. 4.7). Oprócz zmian w poziomach akumulacji kwasu ferulowego pod wpływem suszy obserwowano także zmiany zawartości kwasu chlorogenowego [113]. Jednak w przeciwieństwie do kwasu ferulowego dla większości przebadanych genotypów, w tym dla dwóch genotypów rodzicielskich, dwóch odmian referencyjnych oraz dużej części linii Maresi \times Cam/B1/CI odnotowano obniżoną akumulację tego metabolitu (tab. 4.3, ryc. 4.7). Związki fenolowe ze względu na swoją budowę mogą działać jak swego rodzaju filtr światła, chroniąc aparat fotosyntetyczny przed nadmiernym promieniowaniem (Lichtenthaler i Schweiger 1998). Ponadto metabolity te zaangażowane są w zmiatanie wolnych rodników. Hura i in. w pracy poświęconej wpływowi suszy na ilość kwasu ferulowego w pszenicy stwierdzili istotny wzrost poziomu akumulacji tego związku w warunkach deficytu wody w fazie kwitnienia u roślin wykazujących tolerancję na suszę, w porównaniu z roślinami wrażliwymi na ten stres (Hura i in. 2007). Jednakże ci sami autorzy nie odnotowali zwiększonej ilości wolnego kwasu ferulowego w odpowiedzi na deficyt wody w fazie wegetatywnej pszenicy. Aczkolwiek u odmiany wykazującej tolerancję zaobserwowali podwyższony poziom akumulacji kwasu ferulowego związanego z węglowodanami budującymi ścianę komórkową (Hura i in. 2009). Wykryty kwas chlorogenowy, będący estrem kwasu kawowego i chinowego jest jednym z produktów szlaku fenylopropanoidów u roślin. Wiele stresów biotycznych i abiotycznych, w tym promieniowanie UV, zasolenie, susza oraz niedobór składników mineralnych, może wywoływać zmiany poziomów akumulacji tego związku. Zwykle jednak, w przeciwieństwie do uzyskanych w niniejszej pracy wyników, obserwowana jest podwyższona ilość tego kwasu w warunkach stresu (Del Moral 1972, Kirakosyan i in. 2004).

Przeprowadzona na czterech genotypach jęczmienia Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus analiza ilościowa kwasów tłuszczowych i steroli ujawniła podwyższony poziom akumulacji związków reprezentujących tę klasę w odpowiedzi na stres niedoboru wody w próbkach ekstraktów liści odmian Sebastian i Stratus oraz korzeni linii Cam/B1/CI (tab. 4.3, tab. 4.4). Jednocześnie nie stwierdzono większych różnic w ilości tych związków pomiędzy liniami jęczmienia stanowiącymi populację mapującą Maresi \times Cam/B1/CI (ryc. 4.7). Lipidy w roślinach pełnią rozmaite funkcje: są składnikami błon komórkowych, cząsteczkami sygnałowymi, a także stanowią źródło węgla i energii. Ponadto mogą pełnić funkcje ochronne, tworząc barierę między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym, podczas stresów abiotycznych i biotycznych (Schmid i Ohlrogge 2002). Zachowanie integralności błon komórkowych jest istotnym czynnikiem decydującym o zdolności rośliny do przetrwania w środowisku z ograniczoną dostępnością wody. Z kolei stabilność błon uzależniona jest od składu kwasów tłuszczowych tworzących dwuwarstwę lipidową (Gigon i in. 2004). Zhong i in. w badaniach nad wpływem suszy na skład kwasów tłuszczowych u trawy bermudzkiej stwierdzili różnice w stopniu nasycenia kwasów tłuszczowych pomiędzy genotypami wykazującymi wrażliwość oraz tolerancję na zadany czynnik stresowy. Genotyp cechujący się zwiększoną tolerancją na odwodnienie utrzymywał w warunkach niedoboru wody wyższy poziom RWC, niższy wyciek elektrolitów oraz większą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w stosunku do genotypu wrażliwego na dehydratację (Zhong i in. 2011).

Pośród związków wykazujących zmiany poziomów akumulacji w odpowiedzi na stres niedoboru wody znalazły się także metabolity, jak dotąd niezidentyfikowane, które mogą być interesującymi markerami związanymi z odpowiedzią roślin na suszę. Jako przykład podwyższonego gromadzenia związku na skutek niedoboru wody może posłużyć metabolit opisany identyfikatorem A159003 [45], który obecny był jedynie w liściach jęczmienia. Poziom tego metabolitu wzrósł zarówno u czterech badanych odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus, jak i u linii populacji mapującej jęczmienia (tab. 4.3, ryc. 4.7). Z kolei obniżoną akumulacją w suszy charakteryzował się związek opisany identyfikatorem A296003 [109], także wykryty jedynie w liściach, którego poziom obniżył się pod wpływem deficytu wody u genotypów Cam/B1/CI, Maresi i Stratus oraz u większości linii MCam (tab. 4.3, ryc. 4.7).

Analiza wosków kutykularnych

Kutykula jest wielowarstwową strukturą pokrywającą zewnętrzną ścianę komórkową epidermy naziemnych, niezdrewniałych części roślin. Składa się z wierzchniej warstwy wosku, środkowej warstwy zwanej kutykulą właściwą budowanej przez polimery (kutynę i kutan) osadzone w wosku, oraz dolnej – warstwy kutykularnej – tworzonej przez kutynę i wosk zmieszanych z elementami ściany komórkowej (pektynami, celulozą i węglowodanami) (ryc. 5.3) (Taiz i Zeiger 2002). Głównym składnikiem kutykuli jest kutyna, będąca polimerem wielu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych połączonych ze sobą wiązaniami estrowymi, tworząca sztywną trójwymiarową sieć, swego rodzaju „szkielet” kutykuli. Drugim istotnym składnikiem, stanowiącym 20-60% masy kutykuli, są woski kutykularne, które można wyekstrahować za pomocą rozpuszczalników organicznych (Samuels i in. 2008). Woski kutykularne nie są makrocząsteczkami, ale złożonymi mieszaninami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, węglowodorów, alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów, triterpenów, steroli oraz flawonoidów, których skład różni się pomiędzy gatunkami roślin (Post-Beittenmiller 1996). W niniejszej pracy analizie poddano skład jakościowy i ilościowy wosków kutykularnych dwóch genotypów jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) Maresi i Cam/B1/CI w warunkach optymalnej wilgotności podłoża i w warunkach niedoboru wody. Przeprowadzone analizy metabolitów



Ryc. 5.3. Schematyczne przedstawienie budowy kutykuli (według Taiz i Zeiger 2002).

obecnych na powierzchni liści jęczmienia wykazały, że dominującymi składnikami wosków u tego gatunku są szeregi homologiczne długołańcuchowych związków alifatycznych: alkanoli, alkanów i kwasów tłuszczowych. Ogółem wykryto 35 związków, z czego adnotowano lub zidentyfikowano 29 (tab. 4.5). Związkiem o największej intensywności był heksakozanol (ryc. S.9). W przypadku większości gatunków traw, do których zalicza się także jęczmień, pod względem składu wosków kutykularnych, można wyróżnić dwie grupy roślin: pierwszą, u której dominującym składnikiem jest alkohol pierwszorzędowy (heksakozanol lub oktakozanol) oraz drugą, u której przeważającym związkiem jest β -diketon (hentriakontano-14,16-dion lub tritriakontano-12,14-dion) (Jeffree i in. 2006). Skład wosków kutykularnych roślin z rodzaju *Hordeum* jest bardzo homogeny i w około 90 proc. tworzony jest przez alkohole pierwszorzędowe (Schreiber i Schönherr 2009). W badaniach nad depozycją wosków w rosnącym liściu jęczmienia, w których heksakozanol wykorzystano jako marker odkładania się wosków, stwierdzono, że alkanol ten stanowi ponad 75% składu wosków kutykularnych u tego gatunku (Richardson i in. 2005). Górna warstwa wosków kutykularnych (tzw. woski epikutykularne) często krystalizuje tworząc charakterystyczne wzory (np. rurek, lasek, kokardek) widoczne w obrazowaniu przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej. Woski kutykularne obecne na powierzchni liści jęczmienia wykazują wysoki stopień krystalizacji (około 50% wosków ma charakter krystaliczny) i przybierają postać płytek (Schreiber i Schönherr 2009). Podobne wzory krystalizacji występują u innych roślin, u których odnotowano wysoką zawartość alkoholi pierwszorzędowych np. u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) (wysoka zawartość oktakozanolu) i koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) (wysoka zawartość triakontanolu) (Jeffree i in. 2006). Morfologia wosków epikutykularnych zależy nie tylko od wysokiego stężenia danej klasy związków, ale także od temperatury, intensywności światła oraz wilgotności powietrza. Wyższe temperatury sprzyjają powstawaniu struktur ułożonych równoległe do powierzchni kutykuli (np. płatków), z kolei w niskich temperaturach tworzą się struktury ułożone w kierunku prostopadłym (np. laski, rurki) (Shepherd i Wynne Griffiths 2006). Ponadto u wielu gatunków roślin warunki stresowe wywołują zmianę ilości odkładanych na powierzchni liści wosków kutykularnych. Przykładowo wysokie promieniowanie przyczynia się do zwiększenia ilości wosków epikutykularnych, co związane jest z jedną z funkcji warstwy wosków, tj. odbijaniem promieniowania UV (Blum 2011). Liczne badania wskazują, że do zwiększenia depozycji wosków na powierzchni liści dochodzi również w warunkach deficytu wody (Premachandra i in. 1991, Bondada i in. 1996, Jenks i in. 2001, Kim i in. 2007). W optymalnych warunkach środowiska 94-99% dyfuzji pary wodnej zachodzi przez aparaty szparkowe. Stres suszy

proceeds to the closure of stomata, a decrease in stomatal conductance and thus an increase in the role of cuticular transpiration in water loss from cells (Macková *et al.* 2013). Therefore, the accumulation of waxes as a result of stress can be one of the defense lines of a plant against excessive evaporation of water. In the present doctoral work, it was not confirmed that there are large changes in the content of compounds present on the leaf surface of varieties Maresi and Cam/B1/CI resulting from water deficit. The largest differences concerned two alcohols (dodecanol and octadecanol), the amount of which decreased in plants of the Maresi variety subjected to drought stress (Fig. 4.13) and two fatty acids (palmitic and stearic), the amount of which in this variety increased as a result of water deficit (Fig. 4.15). González and Ayerbe in studies on the effect of water deficit on the accumulation of epicuticular waxes on the leaf surface of barley, confirmed a 9% increase in the total amount of waxes in plants subjected to drought stress compared to control plants (González and Ayerbe 2010). However, this relatively small increase was observed in plants subjected to short-term (22-day) and long-term (22-day) drought stress. It may be that small changes in the composition and amount of waxes as a result of water deficit on the leaf surface of barley result from the characteristic morphology of waxes in this species. As has already been mentioned, barley waxes show a high degree of crystallization. Crystalline areas are considered to be a barrier to water and dissolved substances, so that transport in cuticular waxes occurs only in the amorphous layer on the diffusion path (Shepherd and Wynne Griffiths 2006). Therefore, it can be assumed that in barley it is the structure and form of waxes (their degree of crystallization and arrangement in parallel layers to the leaf surface), and not the thickness of the cuticle (in young leaves 0.4-1.5 μm , in older leaves 2.5-5 μm ; Mehrotra and Aggarwal 2003) that respond to the adaptation of plants to growth in conditions of limited water availability.

In spite of the different origin of the studied varieties (Europe and the Middle East) no significant differences were observed between the analyzed genotypes with respect to the profile of waxes present on the leaf surface. The group of compounds that showed the greatest differences between varieties were alkanes (Fig. 4.14). The analyses revealed a lower content of alkanes with an odd number of carbons in the Maresi variety compared to the Cam/B1/CI variety, which may be a trait allowing the Syrian variety to have better protection against water loss in drought conditions. In studies on the composition of alkanes in leaves of different species of acacia and eucalyptus, it was confirmed that there is a dependence between the concentration and distribution of alkanes with different chain lengths and the climate (Hoffmann *et al.* 2013). In the present work

autorzy analizowali rośliny występujące na przestrzeni 1500 km w północnej i centralnej Australii, rosnące w klimacie od subtropikalnego (roczne opady 2000 mm) do suchego (roczne opady 400 mm). Badacze stwierdzili 10-krotnie większą zawartość alkanów u gatunków zasiedlających obszary bliższe środkowi kontynentu (klimat suchy), od tych leżących bliżej wybrzeża. Ponadto średnia długość łańcucha alkanów u akacji zmniejszała się w gatunkach rozmieszczonych bliżej centrum kontynentu, podczas gdy u roślin rodzaju *Eucalyptus* obserwowano odwrotny kierunek zmian, tj. wzrost średniej długości łańcucha węglowego u gatunków zasiedlających centralny obszar Australii.

Ponadto w analizowanych ekstraktach wosków wykryto znaczące ilości chloropiryfosu i ftalanu dibutyłu (DBP, ang. *dibutyl phthalate*). Pierwszy z nich to fosforoorganiczny insektycyd, z kolei drugi to popularny plastyfikator, a także rozpuszczalnik, powszechnie zanieczyszczający środowisko. Ftalany mogą przedostawać się do powietrza, wody i gleby podczas produkcji i przetwarzania tworzyw sztucznych, z odcieków ze składowisk odpadów, wycieków oleju z maszyn rolniczych, jak również ze zbyt częstego stosowania nawozów organicznych (Vikelsøe i in. 2002). Zanieczyszczenia obecne w środowisku mogą być pobierane przez rośliny zarówno przez system korzeniowy, jak i przez części nadziemne. Badania nad drogami wnikania ftalanów do roślin wskazują na istnienie różnic w sposobie ich pobierania pomiędzy gatunkami. W przypadku papryki obserwowano pobieranie ftalanów z gleby i ich akumulację w korzeniach, łodygach i owocach (Yin i in. 2003). Z kolei doświadczenia nad kukurydzą wykazały, że u tego gatunku nie dochodzi do akumulacji ftalanów w wyniku pobierania ich przez roślinę z zanieczyszczonej gleby. Zaobserwowano jednak, że ekspozycja kukurydzy na zanieczyszczenia powietrza prowadziła do gromadzenia ftalanów w warstwie kutykuli (Müller i Kördel 1993). Ponadto w badaniach nad wykorzystaniem beninkazy szorstkiej w fitoremediacji stwierdzono pobieranie przez tę roślinę ftalanu dwu-2-etyloheksylu (DEHP, ang. *di(2-ethylhexyl) phthalate*) z powietrza i jego akumulację w liściach, łodygach i owocach (Wu i in. 2013). Stąd też obecność w analizowanych ekstraktach wosków jęczmienia DBP w stosunkowo dużych ilościach wynika albo z gromadzenia zanieczyszczeń powietrza na powierzchni liści badanych roślin, albo z pobierania przez roślinę zanieczyszczeń z gleby.

6. WNIOSKI

1. Dzięki wykorzystaniu techniki GC-MS możliwe było przeprowadzenie analiz jakościowych i ilościowych zmian w poziomach metabolitów obecnych w tkankach liści i korzeni jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) w odpowiedzi na stres niedoboru wody.
2. W analizowanych próbkach ekstraktów liści i korzeni jęczmienia wykryto 141 pochodnych związków reprezentujących różne klasy metabolitów. 21 związków (opisanych identyfikatorami GMD) zostało rozpoznanych jako zarejestrowane w bazach danych, ale dotychczas niezidentyfikowane. Wykorzystanie pakietu TargetSearch pozwoliło na analizę ilościową 101 i 100 pochodnych, odpowiednio w ekstraktach liści i korzeni jęczmienia.
3. Rośliny jęczmienia syntetyzują liczne metabolity, których ilość zmienia się zarówno w odpowiedzi na stres niedoboru wody, jak i pomiędzy genotypami, co wskazuje na złożone mechanizmy procesów adaptacyjnych i aklimatyzacyjnych w poszczególnych genotypach w obrębie tego samego gatunku.
4. Istotnie statystycznie efekty interakcji Odmiana/Linia x Susza wskazują potencjalne metabolomiczne markery związane z tolerancją roślin (lub jej brakiem) na stres niedoboru wody. Wśród metabolitów wykazujących efekt interakcji wyróżnić można związki należące do różnych klas, w tym aminokwasy, węglowodany, kwasy karboksylowe, aminy, lipidy oraz związki dotychczas niezidentyfikowane.
5. Odmiany europejskie w odpowiedzi na stres niedoboru wody wykazują silniejszą reakcję ze strony metabolomu liścia, natomiast linia syryjska Cam/B1/CI intensywniejszą reakcję ze strony metabolomu korzenia.
6. Pomędzy liniami jęczmienia populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI można zaobserwować wyodrębnioną grupę 33 linii jęczmienia, u których odpowiedź na stres niedoboru wody pod względem zmian poziomów akumulacji niektórych metabolitów w korzeniach różniła się od pozostałych 67 linii.

7. W analizowanych próbkach metabolitów wyekstrahowanych z powierzchni liści jęczmienia wykryto 35 związków. Analiza składu jakościowego i ilościowego wykazała, że na wosk u tego gatunku składają się przede wszystkim alkanole (głównie heksakozanol), ale także alkany i kwasy tłuszczowe. Jednakże stres niedoboru wody nie wpływa w znaczący sposób na skład wosków obecnych na powierzchni liści jęczmienia.

8. Zmiany poziomów akumulacji metabolitów w liściach i korzeniach jęczmienia powinny zostać skorelowane z wynikami otrzymanymi w pozostałych zadaniach projektu POLAPGEN-BD, w tym z danymi dotyczącymi plonu, a także danymi morfologicznymi, genetycznymi i proteomicznymi. Integracja tychże danych może dostarczyć biomarkerów związanych z tolerancją jęczmienia na stres niedoboru wody.

LITERATURA

- Allwood J.W., Ellis D.I., Goodacre R. (2008) Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant – host interactions. *Physiologia Plantarum*, 132, 117–135.
- Alvarez S., Marsh E.L., Schroeder S.G., Schachtman D.P. (2008) Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell & Environment*, 31, 325–340.
- Araus J.L., Slafer G.A., Reynolds M.P., Royo C. (2002) Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany*, 89, 925–940.
- Aroca R., Ruiz-Lozano J.M. (2012) Regulation of root water uptake under drought stress conditions. W: *Plant Responses to Drought Stress*, Aroca R. (red.), Springer, Berlin, s. 113–127.
- Ashraf M. (2010) Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances*, 28, 169–183.
- Athar H.R., Ashraf M. (2009) Strategies for crop improvement against salinity and drought stress: an overview. W: *Tasks for vegetation sciences vol. 44 - Salinity and water stress: improving crop efficiency*, Ashraf M., Ozturk M., Athar H.R. (red.). Springer Netherlands, s. 1–16.
- Avonce N., Leyman B., Mascorro-Gallardo J.O., Van Dijck P., Thevelein J.M., Iturriaga G. (2004) The Arabidopsis trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology*, 136, 3649–3659.
- Babita M., Maheswari M., Rao L.M., Shanker A.K., Rao D.G. (2010) Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. *Environmental and Experimental Botany*, 69, 243–249.
- Baik B.K., Ullrich S.E. (2008) Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, 48, 233–242.
- Baker M. (2011) Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nature Methods*, 8, 117–121.
- Barkworth M., Bothmer R. (2009) Scientific names in the *Triticeae*. W: *Plant Genetics and Genomics – Crops and Models vol. 7: Genetics and Genomics of the Triticeae*, Muehlbauer G.J., Feuillet C. (red.). Springer US, s. 3–30.
- Bartel J., Krumsiek J., Theis F.J. (2013) Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 4, e201301009.
- Bartels D., Sunkar R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 23–58.
- Basu P.S., Ali M., Chaturvedi S.K. (2007) Osmotic adjustment increases water uptake, remobilization of assimilates and maintains photosynthesis in chickpea under drought. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45, 261–267.
- BBCH Monograph (2001) Growth stages of mono- and dicotyledonous- plants, 2nd edition, Meier U. (red), Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, www.bba.de/veroeff/bbch/bbcheng.pdf
- Bino R.J., Hall R.D., Fiehn O., Kopka J., Saito K., Draper J., Nikolau B.J., Mendes P., Roessner-Tunali U., Beale M.H., Trethewey R.N., Lange B.M., Wurtele E.S., Sumner L.W. (2004) Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science*, 9, 418–425.
- Blum A. (2011) Plant Water Relations, Plant Stress and Plant Production. W: *Plant Breeding for Water-Limited Environments*. Springer, New York, s. 11–52.
- Blum A., Zhang J., Nguyen H.T. (1999) Consistent differences among wheat cultivars in osmotic adjustment and their relationship to plant production. *Field Crops Research*, 64, 287–291.
- Bolaños J., Edmeades G.O. (1991) Value of selection for osmotic potential in tropical maize. *Agronomy Journal*, 83, 948–956.
- Bollina V., Kumaraswamy G.K., Kushalappa A.C., Choo T.M., Dion Y., Rioux S., Faubert D., Hamyehyarghani H. (2010) Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Molecular Plant Pathology*, 11, 769–782.
- Bolton E.E., Wang Y., Thiessen P.A., Bryant S.H. (2008) PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. W: *Annual Reports in Computational Chemistry, vol. 4*, Wheeler R.A., Spellmeyer D.C. (red.) American Chemical Society, Washington DC, s. 217–241.

- Bondada B.R., Oosterhuis D.M., Murphy J.B., Kim K.S. (1996) Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. *Environmental and Experimental Botany*, 36, 61–69.
- Bowne J.B., Erwin T.A., Juttner J., Schnurbusch T., Langridge P., Bacic A., Roessner U. (2012) Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Molecular Plant*, 5, 418–429.
- 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.
- Caspi R., Altman T., Dreher K., Fulcher C.A., Subhraveti P., Keseler I.M., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Mueller L.A., Ong Q., Paley S., Pujar A., Shearer A.G., Travers M., Weerasinghe D., Zhang P., Karp P.D. (2012) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, 40, D742–D753.
- Charlton A., Donarski J., Harrison M., Jones S., Godward J., Oehlschlager S., Arques J., Ambrose M., Chinoy C., Mullineaux P., Domoney C. (2008) Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics*, 4, 312–327.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30, 239–264.
- Chen T.H., Murata N. (2011) Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell & Environment*, 34, 1–20.
- Chen Z., Cuin T.A., Zhou M., Twomey A., Naidu B.P., Shabala S. (2007) Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58, 4245–4255.
- Chimenti C.A., Pearson J., Hall A.J. (2002) Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Research*, 75, 235–246.
- Cominelli E., Conti L., Tonelli C., Galbiati M. (2013) Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*, 30, 355–361.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11, 80–88.
- Cortina C., Culiáñez-Macià F.A. (2005) Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, 169, 75–82.
- Coruzzi G.M., Burga A.R., Katari M.S., Gutiérrez R.A. (2009) Systems biology: principles and applications in plant research. W: *Annual Plant Reviews vol. 35: Plant systems biology*, Coruzzi G., Gutiérrez R. (red.) Wiley-Blackwell, Oxford, s. 3–40.
- Croft D., Mundo A.F., Haw R., Milacic M., Weiser J., Wu G., Caudy M., Garapati P., Gillespie M., Kamdar M.R., Jassal B., Jupe S., Matthews L., May B., Palatnik S., Rothfels K., Shamovsky V., Song H., Williams M., Birney E., Hermjakob H., Stein L., D'Eustachio P. (2014) The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 42, D472–D477.
- Crown S.B., Antoniewicz M.R. (2013) Parallel labeling experiments and metabolic flux analysis: Past, present and future methodologies. *Metabolic Engineering*, 16, 21–32.
- Cuadros-Inostroza A., Caldana C., Redestig H., Kusano M., Lisek J., Peña-Cortés H., Willmitzer L., Hannah M.A. (2009) TargetSearch – a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics*, 10, 428.
- Dalgliesh C.E., Horning E.C., Horning M.G., Knox K.L., Yarger K. (1966) A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochemical Journal*, 101, 792–810.
- De Leonardis A.M., Petrarulo M., De Vita P., Mastrangelo A.M. (2012) Genetic and molecular aspects of plant response to drought in annual crop species. W: *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, Montanaro G., Dichio B. (red.). InTech, Rijeka, s. 45–74.
- De Micco V., Aronne G. (2012) Morpho-anatomical traits for plant adaptation to drought. W: *Plant Responses to Drought Stress*, Aroca R. (red.), Springer, Berlin, s. 37–61.

- De Roover J., Vandenbranden K., Van Laere A., Van den Ende W. (2000) Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta*, 210, 808–814.
- Degenkolbe T., Do P.T., Kopka J., Zuther E., Hincha D.K., Köhl K.I. (2013) Identification of drought tolerance markers in a diverse population of rice cultivars by expression and metabolite profiling. *PLoS ONE*, 8, e63637.
- Degtyarenko K., de Matos P., Ennis M., Hastings J., Zbinden M., McNaught A., Alcántara R., Darsow M., Guedj M., Ashburner M. (2008) ChEBI: a database and ontology for chemical entities of biological interest. *Nucleic Acids Research*, 36, D344–D350.
- Del Moral R. (1972) On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecologia*, 9, 289–300.
- Desimone M., Catoni E., Ludewig U., Hilpert M., Schneider A., Kunze R., Tegeder M., Frommer W.B., Schumacher K. (2002) A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14, 847–856.
- Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26, 51–78.
- Devaux P.G., Horning M.G., Horning E.C. (1971) Benzyloxime derivatives of steroids. A new metabolic profile procedure for human urinary steroids. *Analytical Letters*, 4, 151–160.
- Do P.T., Prudent M., Sulpice R., Causse M., Fernie A.R. (2010) The influence of fruit load on the tomato pericarp metabolome in a *Solanum chmielewskii* introgression line population. *Plant Physiology*, 154, 1128–1142.
- Dreier W., Schnarrenberger C., Börner T. (1995) Light- and stress-dependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: β -amylases are stress-induced proteins. *Journal of Plant Physiology*, 145, 342–348.
- Dunn W.B., Ellis D.I. (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 285–294.
- Dunn W.B., Erban A., Weber R.M., Creek D., Brown M., Breitling R., Hankemeier T., Goodacre R., Neumann S., Kopka J., Viant M. (2013) Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* 9, 44–66.
- Ettre L.S. (2003) M.S. Tswett and the invention of chromatography. *LCGC Europe*, 2–7.
- Farooq M., Hussain M., Wahid A., Siddique K.H.M. (2012) Drought Stress in Plants: An Overview. W: *Plant Responses to Drought Stress*, Aroca R. (red.), Springer, Berlin, s. 1–33.
- Farooq M., Kobayashi N., Ito O., Wahid A., Serraj R. (2010) Broader leaves result in better performance of indica rice under drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1066–1075.
- Fernandez O., Béthencourt L., Quero A., Sangwan R.S., Clément C. (2010) Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends in Plant Science*, 15, 409–417.
- Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer J. (2004) Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 763–769.
- Ferrerres F., Kršková Z., Gonçalves R.F., Valentão P., Pereira J.A., Dušek J., Martin J., Andrade P.B. (2009) Free water-soluble phenolics profiling in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2405–2409.
- Fiedziuszek J., Szarzyńska K., Święcicki W. (1985) Hodowla roślin – podręcznik dla techników hodowli roślin i nasiennictwa. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa
- Fiehn O. (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48, 155–171.
- Fiehn O. (2003) Metabolic networks of *Cucurbita maxima* phloem. *Phytochemistry*, 62, 875–886.
- 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. (2007a) The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*, 3, 175–178.
- Fiehn O., Sumner L.W., Rhee S.Y., Ward J., Dickerson J., Lange B.M., Lane G., Roessner U., Last R., Nikolau B. (2007b) Minimum reporting standards for plant biology context information in metabolomic studies. *Metabolomics*, 3, 195–201.
- Fiehn O., Wohlgemuth G., Scholz M., Kind T., Lee do Y., Lu Y., Moon S., Nikolau B. (2008) Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *The Plant Journal*, 53, 691–704.

- Fleury D., Jefferies S., Kuchel H., Langridge P. (2010) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61, 3211–3222.
- Flower D., Rani A., Peacock J. (1990) Influence of osmotic adjustment on the growth, stomatal conductance and light interception of contrasting sorghum lines in a harsh environment. *Functional Plant Biology*, 17, 91–105.
- Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124, 509–525.
- Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F., Dommes J. (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37, 263–285.
- Geerts S., Raes D., Garcia M., Mendoza J., Huanca R. (2008) Crop water use indicators to quantify the flexible phenology of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in response to drought stress. *Field Crops Research*, 108, 150–156.
- Gibon Y., Rolin D. (2012) Aspects of experimental design for plant metabolomics experiments and guidelines for growth of plant material. W: *Methods in Molecular Biology vol. 860: Plant Metabolomics: Methods and Protocols*, Hardy N.W., Hall R.D. (red.) Springer, New York, s. 13–30.
- Gigon A., Matos A.R., Laffray D., Zuily-Fodil Y., Pham-Thi A.T. (2004) Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany*, 94, 345–351.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.
- Giri J. (2011) Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 1746–1751.
- Gong L., Chen W., Gao Y., Liu X., Zhang H., Xu C., Yu S., Zhang Q., Luo J. (2013) Genetic analysis of the metabolome exemplified using a rice population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1319681110
- González A., Ayerbe L. (2010) Effect of terminal water stress on leaf epicuticular wax load, residual transpiration and grain yield in barley. *Euphytica*, 172, 341–349.
- González A., Martín I., Ayerbe L. (2008) Yield and osmotic adjustment capacity of barley under terminal water-stress conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194, 81–91.
- 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.
- Groppa M.D., Benavides M.P. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, 34, 35–45.
- Grumet R., Albrechtsen R.S., Hanson A.D. (1987) Growth and yield of barley isopopulations differing in solute potential. *Crop Science*, 27, 991–995.
- Gupta S.C., Sharma A., Mishra M., Mishra R.K., Chowdhuri D.K. (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences*, 86, 377–384.
- GUS (2012) Departament Rolnictwa: Badanie produkcji roślinnej – wynikowy szacunek produkcji głównych ziemiopłodów rolnych i ogrodnicych w 2012 r. s. 1-31.
- Hafid R.E., Smith D.H., Karrou M., Samir K. (1998) Physiological attributes associated with early-season drought resistance in spring durum wheat cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 78, 227–237.
- Halket J.M., Waterman D., Przyborowska A.M., Patel R.K., 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.
- Hall R.D. (2006) Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, 169, 453–468.
- Hall R.D. (2011) Plant Metabolomics in a Nutshell: Potential and Future Challenges. W: *Annual Plant Reviews vol. 43: Biology of Plant Metabolomics*, Hall R.D. (red.), Wiley-Blackwell, Oxford, 1–24.
- Hanson J., Smeekens S. (2009) Sugar perception and signaling – an update. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 562–567.

- Hendry G.A.F. (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*, 123, 3–14.
- Hernández I., Alegre L., Munné-Bosch S. (2006) Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants. *Phytochemistry*, 67, 1120–1126.
- Hoffmann B., Kahmen A., Cernusak L.A., Arndt S.K., Sachse D. (2013) Abundance and distribution of leaf wax n-alkanes in leaves of *Acacia* and *Eucalyptus* trees along a strong humidity gradient in northern Australia. *Organic Geochemistry*, 62, 62–67.
- Hoffmann E. de, Stroobant V. (2007) *Mass spectrometry: principles and applications*, 3rd edition. Wiley-Interscience, Chichester, s. 1–10.
- Hong-Bo S., Zong-Suo L., Ming-An S. (2005) LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 10, 131–135.
- Horai H., Arita M., Kanaya S., Nihei Y., Ikeda T., Suwa K., Ojima Y., Tanaka K., Tanaka S., Aoshima K., Oda Y., Kakazu Y., Kusano M., Tohge T., Matsuda F., Sawada Y., Yokota Hirai M., Nakanishi H., Ikeda K., Akimoto N., Maoka T., Takahashi H., Ara T., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Neumann S., Iida T., Tanaka K., Funatsu K., Matsuura F., Soga T., Taguchi R., Saito K., Nishioka T. (2010) MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, 45, 703–714.
- Horning E.C., Horning M.G. (1970) Metabolic profiles: chromatographic methods for isolation and characterization of a variety of metabolites in man. *Methods in Medical Research*, 12, 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.
- Huang C.Y., Roessner U., Eickmeier I., Genc Y., Callahan D.L., Shirley N., Langridge P., Bacic A. (2008) Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate-deficient barley plants (*Hordeum vulgare* L.). *Plant and Cell Physiology*, 49, 691–703.
- Hura T., Grzesiak S., Hura K., Thiemt E., Tokarz K., Wędzony M. (2007) Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes of winter triticale: accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance. *Annals of Botany*, 100, 767–775.
- Hura T., Hura K., Grzesiak S. (2009) Possible contribution of cell-wall-bound ferulic acid in drought resistance and recovery in triticale seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1720–1733.
- Hussain S.S., Ali M., Ahmad M., Siddique K.H.M. (2011) Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances*, 29, 300–311.
- Jeffree C. (2006) The fine structure of the plant cuticle. W: *Annual Plant Reviews vol. 23: Biology of the Plant Cuticle*, Riederer M., Muller C. (red.) Wiley-Blackwell, Oxford, s. 11–125.
- Jenks M.A., Andersen L., Teusink R.S., Williams M.H. (2001) Leaf cuticular waxes of potted rose cultivars as affected by plant development, drought and paclobutrazol treatments. *Physiologia Plantarum*, 112, 62–70.
- Jewison T., Su Y., Disfany F.M., Liang Y., Knox C., Maciejewski A., Poelzer J., Huynh J., Zhou Y., Arndt D., Djoumbou Y., Liu Y., Deng L., Guo A.C., Han B., Pon A., Wilson M., Rafatnia S., Liu P., Wishart D.S. (2014) SMPDB 2.0: Big improvements to the Small Molecule Pathway Database. *Nucleic Acids Research*, 42, D478–D484.
- Jouve L., Franck T., Gaspars T., Cattivelli L., Hausman J.F. (2000) Poplar acclimation to cold during in vitro conservation at low non-freezing temperature: metabolic and proteic changes. *Journal of Plant Physiology*, 157, 117–123.
- Jouve L., Hoffmann L., Hausman J.F. (2004) Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula* L.): Involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. *Plant Biology*, 6, 74–80.
- Kacperska A. (2012) Odpowiedzi na czynniki abiotyczne. W: *Fizjologia roślin*, Kopcewicz J., Lewak S. (red.) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 634–708.
- Kanani H., Chrysanthopoulos P.K., Klapa M.I. (2008) Standardizing GC–MS metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 871, 191–201.

- Kanani H.H., Klapa M.I. (2007) Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography–mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 9, 39–51.
- Kanehisa M., Goto S. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 27–30.
- Kang K., Kim Y.S., Park S., Back K. (2009) Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Physiology*, 150, 1380–1393.
- Kang S., Kang K., Chung G.C., Choi D., Ishihara A., Lee D.S., Back K. (2006) Functional analysis of the amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin n-hydroxycinnamoyltransferases. *Plant Physiology*, 140, 704–715.
- Kaplan F., Guy C.L. (2004) β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*, 135, 1674–1684.
- 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.
- Karyudi, Fletcher R.J. (2003) Osmoregulation in birdseed millet under conditions of water stress II. Variation in F3 lines of *Setaria italica* and its relationship to plant morphology and yield. *Euphytica*, 132, 191–197.
- Katajamaa M., Orešič M. (2007) Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A*, 1158, 318–328.
- Kavi Kishor P., Hong Z., Miao G.H., Hu C., Verma D. (1995) Overexpression of [δ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108, 1387–1394.
- Kavi Kishor P.B., Sreenivasulu N. (2014) Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant, Cell & Environment*, 37, 300–311.
- Kempa S., Krasensky J., Dal Santo S., Kopka J., Jonak C. (2008) A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PLoS ONE*, 3, e3935.
- Kiani P., Talia P., Maury P., Grieu P., Heinz R., Perrault A., Nishinakamasu V., Hopp E., Gentzbittel L., Paniego N., Sarrafi A. (2007) Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science*, 172, 773–787.
- Kim H.K., Verpoorte R. (2010) Sample Preparation for Plant Metabolomics. *Phytochemical Analysis*, 21, 4–13.
- Kim J.S., Mizoi J., Yoshida T., Fujita Y., Nakajima J., Ohori T., Todaka D., Nakashima K., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2011) An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, 52, 2136–2146.
- Kim K.S., Park S.H., Jenks M.A. (2007) Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1134–1143.
- Kirakosyan A., Kaufman P., Warber S., Zick S., Aaronson K., Bolling S., Chul Chang S. (2004) Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiologia Plantarum*, 121, 182–186.
- Kitano H. (2002) Systems biology: a brief overview. *Science*, 295, 1662–1664.
- Koek M.M., Jellema R.H., van der Greef J., Tas A.C, Hankemeier T. (2011) Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics*, 7, 307–328.
- Komatsuda T., Pourkheirandish M., He C., Azhaguvel P., Kanamori H., Perovic D., Stein N., Graner A., Wicker T., Tagiri A., Lundqvist U., Fujimura T., Matsuoka M., Matsumoto T., Yano M. (2007) Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 1424–1429.
- Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmuller E., Dormann P., Weckwerth W., Gibon Y., Stitt M., Willmitzer L., Fernie A.R., Steinhauser D. (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics*, 21, 1635–1638.

- Kötting O., Kossmann J., Zeeman S.C., Lloyd J.R. (2010) Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 320–328.
- Kováčik J., Klejdus B., Babula P., Jarošová M. (2014) Variation of antioxidants and secondary metabolites in nitrogen-deficient barley plants. *Journal of Plant Physiology*, 171, 260–268.
- Kranner I., Minibayeva F.V., Beckett R.P., Seal C.E. (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, 188, 655–673.
- Kumaraswamy K., Kushalappa A., Choo T., Dion Y., Rioux S. (2011) Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*). *Journal of Chemical Ecology*, 37, 846–856.
- Lawlor D.W. (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89, 871–885.
- Lei Z., Huhman D.V., Sumner L.W. (2011) Mass spectrometry strategies in metabolomics. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 25435–25442.
- Lichtenthaler H.K. (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148, 4–14.
- Lichtenthaler H.K., Schweiger J. (1998) Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology*, 152, 272–282.
- Liland K.H. (2011) Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 827–841.
- Lisar S.Y.S., Motafakkerazad R., Hossain M.M., Rahman I.M.M. (2012). Water stress in plants: causes, effects and responses. W: *Water Stress*, Rahman I.M.M. (red.). InTech, Rijeka, s. 1–14.
- 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.
- Livingston D. III, Hinch D., Heyer A. (2009) Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2007–2023.
- Ludlow M., Santamaria J., Fukai S. (1990) Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) Moench under water-limited conditions. II. Water stress after anthesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41, 67–78.
- Lutts S., Kinet J.M., Bouharmont J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*, 46, 1843–1852.
- Macková J., Vašková M., Macek P., Hronková M., Schreiber L., Šantrůček J. (2013) Plant response to drought stress simulated by ABA application: Changes in chemical composition of cuticular waxes. *Environmental and Experimental Botany*, 86, 70–75.
- Mattioli R., Costantino P., Trovato M. (2009) Proline accumulation in plants: Not only stress. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 1016–1018.
- Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., Santoni V. (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 595–624.
- Mauricio R. (2001) Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nature Reviews Genetics*, 2, 370–381.
- Mazzucotelli E., Tartari A., Cattivelli L., Forlani G. (2006) Metabolism of γ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3755–3766.
- McMaster G.S., Wilhelm W.W. (2003) Phenological responses of wheat and barley to water and temperature: improving simulation models. *Journal of Agricultural Science*, 141, 129–147.
- McNeil S.D., Nuccio M.L., Ziemak M.J., Hanson A.D. (2001) Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 10001–10005.
- Mehrotra R.S., Aggarwal A. (2003) *Plant Pathology 2nd edition*. Tata McGraw-Hill, Delhi, s. 56.
- Mewis I., Khan M.A.M., Glawischnig E., Schreiner M., Ulrichs C. (2012) Water stress and aphid feeding differentially influence metabolite composition in *Arabidopsis thaliana* (L.). *PLoS ONE*, 7, e48661.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stress. *Plant, Cell & Environment*, 33, 453–467.

- Moco S., Bino R.J., De Vos R.C.H., Vervoort J. (2007) Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 855–866.
- Moinuddin, Khanna-Chopra R. (2004) Osmotic adjustment in chickpea in relation to seed yield and yield parameters. *Crop Science*, 44, 449–455.
- Morgan J.M. (1995) Growth and yield of wheat lines with differing osmoregulative capacity at high soil water deficit in seasons of varying evaporative demand. *Field Crops Research*, 40, 143–152.
- Morgan J.M., Rodriguez-Maribona B., Knights E.J. (1991) Adaptation to water-deficit in chickpea breeding lines by osmoregulation: relationship to grain-yields in the field. *Field Crops Research*, 27, 61–70.
- Morvan-Bertrand A., Boucaud J., Le Saos J., Prud'homme M.P. (2001) Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. *Planta*, 213, 109–120.
- Müller J., Kördel W. (1993) Occurrence and fate of phthalates in soil and plants. *Science of The Total Environment*, 134, Supplement 1, 431–437.
- Narusaka Y., Nakashima K., Shinwari Z.K., Sakuma Y., Furihata T., Abe H., Narusaka M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal*, 34, 137–148.
- Nielsen J. (2007) Metabolomics in functional genomics and systems biology. W: *Metabolome analysis: an introduction*, Villas-Bôas S.G., Roessner U., Hansen M.A.E., Smedsgaard J., Nielsen J. (red.) Wiley-Interscience, Hoboken, s. 3–14.
- Nielsen J., Oliver S. (2005) The next wave in metabolome analysis. *Trends in Biotechnology*, 23, 544–546.
- Ohkama-Ohtsu N., Oikawa A., Zhao P., Xiang C., Saito K., Oliver D.J. (2008) A γ -glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 148, 1603–1613.
- 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.
- Orata F. (2012) Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. W: *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*; Mohd M.A. (red.). InTech, Rijeka, s. 83–108.
- Parida A., Dagaonkar V., Phalak M., Umalkar G.V., Aurangabadkar L. (2007) Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 37–48.
- Paul M.J., Primavesi L.F., Jhurrea D., Zhang Y. (2008) Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 417–441.
- Pence H.E., Williams A. (2010) ChemSpider: an online chemical information resource. *Journal of Chemical Education*, 87, 1123–1124.
- Peters S., Mundree S.G., Thomson J.A., Farrant J.M., Keller F. (2007) Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1947–1956.
- Pinheiro C., Chaves M.M. (2011) Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62, 869–882.
- Post-Beittenmiller D. (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 405–430.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Palme K.J., Jansen M.A.K. (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12, 98–105.
- Premachandra G.S., Saneoka H., Kanaya M., Ogata S. (1991) Cell membrane stability and leaf surface wax content as affected by increasing water deficits in maize. *Journal of Experimental Botany*, 42, 167–171.
- Quan R., Shang M., Zhang H., Zhao Y., Zhang J. (2004) Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 2, 477–486.

- R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria. ISBN 3-900051-07-0, www.R-project.org.
- Rauf S., Sadaqat H.A. (2008) Identification of physiological traits and genotypes combined to high achene yield in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under contrasting water regimes. *Australian Journal of Crop Science*, 1, 23–30.
- Richardson A., Franke R., Kerstiens G., Jarvis M., Schreiber L., Fricke W. (2005) Cuticular wax deposition in growing barley (*Hordeum vulgare*) leaves commences in relation to the point of emergence of epidermal cells from the sheaths of older leaves. *Planta*, 222, 472–483.
- Riedelsheimer C., Lisec J., Czedik-Eysenberg A., Sulpice R., Flis A., Grieder C., Altmann T., Stitt M., Willmitzer L., Melchinger A.E. (2012) Genome-wide association mapping of leaf metabolic profiles for dissecting complex traits in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 8872–8877.
- Ritsema T., Smeekens S. (2003a) Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 223–230.
- Ritsema T., Smeekens S.C.M. (2003b) Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology*, 160, 811–820.
- Roessner U., Patterson J.H., Forbes M.G., Fincher G.B., Langridge P., Bacic A. (2006) An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics. *Plant Physiology*, 142, 1087–1101.
- 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.
- Roessner-Tunali U., Hegemann B., Lytovchenko A., Carrari F., Bruedigam C., Granot D. Fernie A.R. (2003) Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiology*, 133, 84–99.
- Rontein D., Rhodes D., Hanson A.D. (2003) Evidence from engineering that decarboxylation of free serine is the major source of ethanolamine moieties in plants. *Plant and Cell Physiology*, 44, 1185–1191.
- Roy S.J., Tucker E.J., Tester M. (2011) Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 232–239.
- Samuels L., Kunst L., Jetter R. (2008) Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 683–707.
- Sanchez D.H., Schwabe F., Erban A., Udvardi M.K., Kopka J. (2012) Comparative metabolomics of drought acclimation in model and forage legumes. *Plant, Cell & Environment*, 35, 136–149.
- Sánchez F.J., Manzanares M., Andres E.F. de, Tenorio J.L., Ayerbe L. (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research*, 59, 225–235.
- Santamaria J., Ludlow M., Fukai S. (1990) Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) Moench under water-limited conditions. I. Water stress before anthesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41, 51–65.
- Sauter H., Lauer M., Fritsch H. (1991) Metabolic profiling of plants – a new diagnostic technique. W: *American Chemical Society Symposium Series no. 443*, Baker D.R., Fenyves J.G., Moberg W.K. (red.) American Chemical Society, Washington DC, s. 288–299.
- Schmid K.M., Ohlrogge J.B. (2002) Lipid metabolism in plants. W: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 4th edition*; Vance D.E., Vance J.E. (red.). Elsevier, s. 93–126.
- Schmidhalter U., Evéquo M., Oertli J.J. (1992) Osmotic adjustment of roots and shoots. W: *Root ecology and its practical application, 3. ISSR Symp. Wien, 1991*; Kutschera L., Hübl E., Lichtenegger E., Persson H., Sobotik M. (red.), Verein für Wurzelforschung, Klagenfurt, s. 277–282.
- Schreiber L., Schönherr J. (2009) *Water and Solute Permeability of Plant Cuticles – Measurement and Data Analysis*. Springer, Berlin, s. 148–149, 208.
- Serraj R., Sinclair T.R. (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*, 25, 333–341.

- Sharp R.E., Poroyko V., Hejlek L.G., Spollen W.G., Springer G.K., Bohnert H.J., Nguyen H.T. (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2343–2351.
- Shepherd T., Wynne Griffiths D. (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171, 469–499.
- Shinbo Y., Nakamura Y., Altaf-Ul-Amin M., Asahi H., Kurokawa K., Arita M., Saito K., Ohta D., Shibata D., Kanaya S. (2006) KNApSAC: A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database. W: *Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 57: Plant Metabolomics*, Saito K., Dixon R.A., Willmitzer L. (red.), Springer, Berlin, s. 165–181.
- Shirasawa K., Takabe T., Takabe T., Kishitani S. (2006) Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. *Annals of Botany*, 98, 565–571.
- Sicher R.C., Kremer D.F., Harris W.G. (1984) Diurnal carbohydrate metabolism of barley primary leaves. *Plant Physiology*, 76, 165–169.
- Sicher R.C., Timlin D., Bailey B. (2012) Responses of growth and primary metabolism of water-stressed barley roots to rehydration. *Journal of Plant Physiology*, 169, 686–695.
- Sinclair T.R. (2011) Challenges in breeding for yield increase for drought. *Trends in Plant Science*, 16, 289–293.
- Singh T.N., Aspinall D., Paleg L.G. (1972) Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature New Biology*, 236, 188–190.
- Smedsgaard J. (2007) Analytical tools. W: *Metabolome analysis: an introduction*, Villas-Bôas S.G., Roessner U., Hansen M.A.E., Smedsgaard J., Nielsen J. (red.) Wiley-Interscience, Hoboken, s. 83–145.
- Sparkman O.D., Penton Z.E., Kitson F.G. (2011) *Gas Chromatography and Mass Spectrometry – a practical guide 2nd edition*. Academic Press, Oxford, s. 231–237, s. 331–339.
- Strehmel N., Kopka J., Scheel D., Böttcher, C. (2014) Annotating unknown components from GC/EI-MS-based metabolite profiling experiments using GC/APCI(+)-QTOFMS. *Metabolomics*, 10, 324–336.
- Strzałka K. (2012) Fotosynteza i chemosynteza. W: *Fizjologia roślin*, Kopcewicz J., Lewak S. (red.) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 274–333.
- Subbarao G.V., Chauhan Y.S., Johansen C. (2000) Patterns of osmotic adjustment in pigeonpea – its importance as a mechanism of drought resistance. *European Journal of Agronomy*, 12, 239–249.
- Sugimoto M., Kawakami M., Robert M., Soga T., Tomita M. (2012) Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. *Current Bioinformatics*, 7, 96–108.
- Suguiyama V.F., da Silva E.A., Meirelles S.T., Centeno D. da C., Braga M.R. (2014) Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook. (*Velloziaceae*) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering. *Frontiers in Plant Science*, doi:10.3389/fpls.2014.00096.
- Sumner J. (2000) *The natural history of medicinal plants*. Timber Press, Portland, s. 15–37.
- Sumner L.W., Amberg A., Barrett D., Beale 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., Reily M.D., Thaden J.J., Viant M.R. (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3, 211–221.
- Szabados L., Savouré A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15, 89–97.
- Szabó B., Tyihák E., Szabó G., Botz L. (2003) Mycotoxin and drought stress induced change of alkaloid content of *Papaver somniferum* plantlets. *Acta Botanica Hungarica*, 45, 409–417.
- Taiz L., Zeiger E. (2002) *Plant Physiology 3rd edition*. Sinauer Associates, Sunderland, s. 162–169, s. 171–192, s. 283–308.
- Taji T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29, 417–426.

- Tanaka K., Budd M.A., Efron M.L., Isselbacher K.J. (1966) Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56, 236–242.
- Tautenhahn R., Cho K., Uritboonthai W., Zhu Z., Patti G.J., Siuzdak G. (2012) An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. *Nature Biotechnology*, 30, 826–828.
- Teulat B., Rekika D., Nachit M.M., Monneveux P. (1997) Comparative osmotic adjustments in barley and tetraploid wheats. *Plant Breeding*, 116, 519–523.
- The International Barley Genome Sequencing Consortium (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491, 711–716.
- Todaka D., Matsushima H., Morohashi Y. (2000) Water stress enhances β -amylase activity in cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Botany*, 51, 739–745.
- Toubiana D., Semel Y., Tohge T., Beleggia R., Cattivelli L., Rosental L., Nikoloski Z., Zamir D., Fernie A.R., Fait A. (2012) Metabolic profiling of a mapping population exposes new insights in the regulation of seed metabolism and seed, fruit, and plant relations. *PLoS Genet*, 8, e1002612.
- Tugizimana F., Piater L., Dubery I. (2013) Plant metabolomics: a new frontier in phytochemical analysis. *South African Journal of Science*, 109, 0005.
- Turner N.C., Abbo S., Berger J.D., Chaturvedi S., French R.J., Ludwig C., Mannur D., Singh S., Yadava H. (2007) Osmotic adjustment in chickpea (*Cicer arietinum* L.) results in no yield benefit under terminal drought. *Journal of Experimental Botany*, 58, 187–194.
- Ullrich S.E. (2011) Significance, adaptation, production, and trade of barley. W: *Barley – Production, Improvement, and Uses*, Ullrich S.E. (red.). Wiley-Blackwell, Chichester, s. 3–13.
- Urbanczyk-Wochniak E., Luedemann A., Kopka J., Selbig J., Roessner-Tunali U., Willmitzer L., Fernie A.R. (2003) Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. *EMBO Reports*, 4, 989–993.
- van den Berg R.A., Hoefsloot H.C.J., Westerhuis J.A., Smilde A.K., van der Werf M.J. (2006) Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7: 142.
- Verbruggen N., Hermans C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35, 753–759.
- Vereyken I.J., Chupin V., Demel R.A., Smeekens S.C.M., Kruijff B.D. (2001) Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1510, 307–320.
- Verhoeven H.A., Ric de Vos C.H., Bino R.J., Hall R.D. (2006) Plant Metabolomics Strategies Based upon Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry (QTOF-MS). W: *Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 57: Plant Metabolomics*, Saito K., Dixon R.A., Willmitzer L. (red.), Springer, Berlin, s. 33–49.
- Vikelsøe J., Thomsen M., Carlsen L. (2002) Phthalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils. *Science of The Total Environment*, 296, 105–116.
- Villas-Bôas S.G. (2007) Sampling and sample preparation. W: *Metabolome analysis: an introduction*, Villas-Bôas S.G., Roessner U., Hansen M.A.E., Smedsgaard J., Nielsen J. (red.) Wiley-Interscience, Hoboken, s. 39–83.
- Villas-Bôas S.G., Mas S., Åkesson, Smedsgaard J., Nielsen J. (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 613–646.
- Vinocur B., Altman A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 123–132.
- Von Bothmer R., Komatsuda T. (2011) Barley origin and related species. W: *Barley – Production, Improvement, and Uses*, Ullrich S.E. (red.). Wiley-Blackwell, Chichester, s. 14–62.
- VSN International (2011) GenStat for Windows 14th Edition. VSN International, Hemel Hempstead, Wielka Brytania. GenStat.co.uk
- Watson J.T., Sparkman O.D. (2007) *Introduction to mass spectrometry- instrumentation, applications and strategies for data interpretation, 4th edition*. Wiley, Chichester, s. 315–448, s. 571–638.
- Weckwerth W. (2003) Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 669–689.

- Wen W., Li D., Li X., Gao Y., Li W., Li H., Liu J., Liu H., Chen W., Luo J., Yan J. (2014) Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights. *Nature Communications*, 5, 3438.
- Wharfe J., Harwood J.L. (1979) Lipid metabolism in germinating seeds: Purification of ethanolamine kinase from soya bean. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*, 575, 102–111.
- Widodo, Patterson J.H., Newbiggin E., Tester M., Bacic A., Roessner U. (2009) Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 60, 4089–4103.
- Wishart D.S., Tzur D., Knox C., Eisner R., Guo A.C., Young N., Cheng D., Jewell K., Arndt D., Sawhney S., Fung C., Nikolai L., Lewis M., Coutouly M.A., Forsythe I., Tang P., Shrivastava S., Jeroncic K., Stothard P., Amegbey G., Block D., Hau D.D., Wagner J., Miniaci J., Clements M., Gebremedhin M., Guo N., Zhang Y., Duggan G.E., Macinnis G.D., Weljie A.M., Dowlatabadi R., Bamforth F., Clive D., Greiner R., Li L., Marrie T., Sykes B.D., Vogel H.J., Querengesser L. (2007) HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, 35, D521–D526.
- Witt S., Galicia L., Lisek J., Cairns J., Tiessen A., Araus J.L., Palacios-Rojas N., Fernie A.R. (2012) Metabolic and phenotypic responses of greenhouse-grown maize hybrids to experimentally controlled drought stress. *Molecular Plant*, 5, 401–417.
- Witte C.P. (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180, 431–438.
- Wu D., Cai S., Chen M., Ye L., Chen Z., Zhang H., Dai F., Wu F., Zhang G. (2013) Tissue metabolic responses to salt stress in wild and cultivated barley. *PLoS ONE*, 8, e55431.
- Wu Z., Zhang X., Wu X., Shen G., Du Q., Mo C. (2013) Uptake of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by the plant *Benincasa hispida* and its use for lowering DEHP content of intercropped vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5220–5225.
- Xu Z., Zhou G. (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany*, 59, 3317–3325.
- Yin R., Lin X.G., Wang S.G., Zhang H.Y. (2003) Effect of DBP/DEHP in vegetable planted soil on the quality of capsicum fruit. *Chemosphere*, 50, 801–805.
- Yokota A., Takahara K., Akashi K. (2006) Water stress. W: *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*, Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Janardhan Reddy K., Springer, Dordrecht, s. 15–39.
- Zacarés L., López-Gresa M.P., Fayos J., Primo J., Bellés J.M., Conejero V. (2007) Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 1439–1448.
- Zaikin V., Halket J.M. (2009) *A handbook of derivatives for mass spectrometry*. IM Publications, Chichester, s. xvii–xxiii, 1–32.
- Zajac J., Shrestha A., Patel P., Poretsky L. (2010) The main events in the history of diabetes mellitus. W: *Principles of diabetes mellitus, 2nd edition*, Poretsky L. (red.) Springer, New York, s. 3–16.
- Zellner B., d'Acampora, Bicchi C., Dugo P., Rubiolo P., Dugo G., Mondello L. (2008) Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 297–314.
- Zhong D., Du H., Wang Z., Huang B. (2011) Genotypic variation in fatty acid composition and unsaturation levels in bermudagrass associated with leaf dehydration tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136, 35–40.
- Zhou J., Zhang L., Li X., Chang Y., Gu Q., Lu X., Zhu Z., Xu G. (2012) Metabolic profiling of transgenic rice progeny using gas chromatography–mass spectrometry: the effects of gene insertion, tissue culture and breeding. *Metabolomics*, 8, 529–539.
- Zollinger N., Kjelgren R., Cerny-Koenig T., Kopp K., Koenig R. (2006) Drought responses of six ornamental herbaceous perennials. *Scientia Horticulturae*, 109, 267–274.

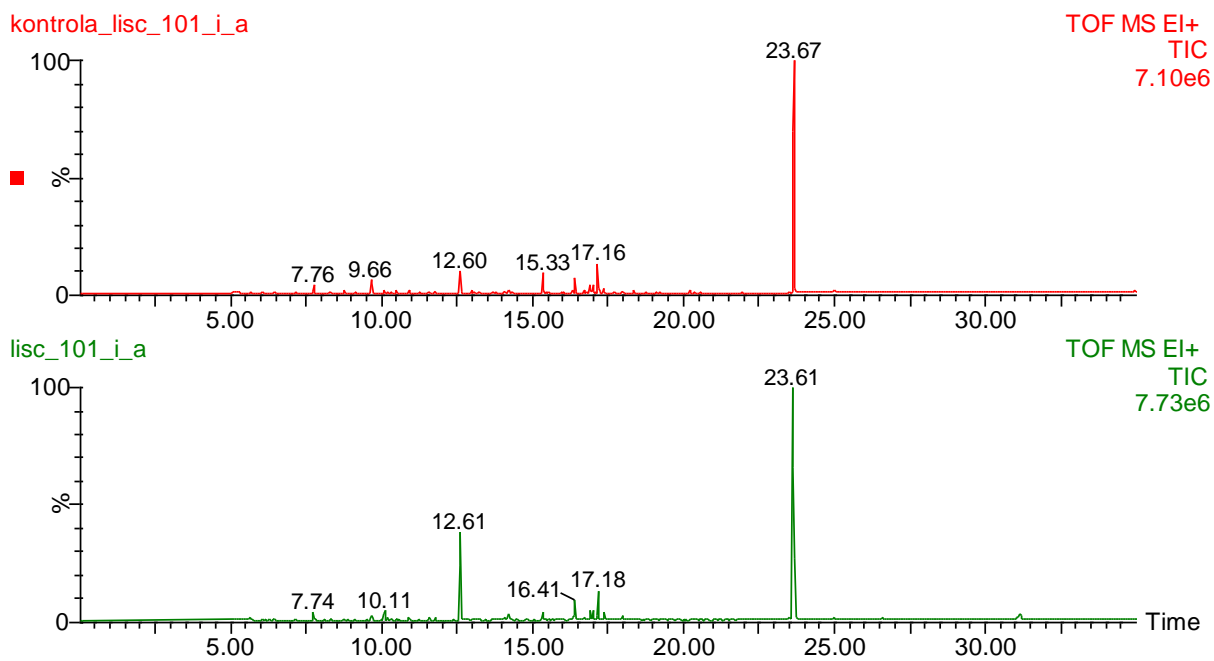
WYKAZ STRON INTERNETOWYCH

- BioCyc: biocyc.org
- Chemical Entities of Biological Interest: www.ebi.ac.uk/chebi
- ChemSpider: www.chemspider.com
- Główny Urząd Statystyczny: www.stat.gov.pl
- Golm Metabolome Database: gmd.mpimp-golm.mpg.de
- Human Metabolome Database: www.hmdb.ca
- KEGG LIGAND Database: www.kegg.jp/kegg/compound
- KEGG PATHWAY Database: www.kegg.jp/kegg/pathway.html
- KNApSAcK: kanaya.naist.jp/KNApSAcK
- MassBank: www.massbank.jp
- Metabolomics Society: www.metabolomicssociety.org
- Metabolomics Standard Initiative: msi-workgroups.sourceforge.net
- MetaCyc: www.metacyc.org
- METLIN: metlin.scripps.edu
- Molecular Weight Calculator v. 6.49: www.alchemistmatt.com
- NIST Mass Spectral Library: www.nist.gov/srd/nist1a.cfm
- Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa: faostat.fao.org
- Pherobase: www.pherobase.com
- Plant Metabolic Network: www.plantcyc.org
- POLAPGEN: www.polapgen.pl
- Program R: www.R-project.org
- PubChem: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
- Reactome: www.reactome.org
- Small Molecule Pathway Database: www.smpdb.ca
- Spectral Database for Organic Compounds, SDBS: sdb.db.aist.go.jp
- System Monitoringu Suszy Rolniczej: www.susza.iung.pulawy.pl
- Wiley Registry of Mass Spectral Data:
onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470175217

Tab. S.1. Przepisanie nazw bądź identyfikatorów związkom nieznanym na podstawie automatycznej analizy jakościowej i ilościowej z wykorzystaniem pakietu TargetSearch (^A – RI według Golm Metabolome Database, b.d. – brak danych, M – masa monoizotopowa).

l.p.	Nazwy związków nieznanymi (tab. 4.1)	Numeracja związków wykrytych przez TargetSearch (tab.4.2)	Identyfikator GMD	RI ^A	Nazwa	Wzór sumaryczny	M [Da]
1.	N_1135	5	A114002	1131,09	kwasy węglowy (1MEOX) (2TMS)	C8H21NO3Si2	235,1060
2.	N_1151	6	A115001	1147,89	izopentyloamina (2 TMS)	C11H29NSi2	231,1838
3.	N_1329	21/24	A133011/ A136002	1332,56	lumichrom (2 MeOX)/ zw. podobny do lumichromu (2 MeOX)	C14H16N6O2/-	300,1335/-
4.	N_1416	32	A144004	1415,51	A144004	b.d.	b.d.
5.	N_1453	33	A145015	1455,48	A145015	b.d.	b.d.
6.	N_1466	35	A148003	1464,64	A148003	b.d.	b.d.
7.	N_1571	45	A159003	1575,36	A159003	b.d.	b.d.
8.	N_1639	50	A164010/A164015	1645,38/1645,55	1,3-diaminopropan (4 TMS) / 1,2-diaminopropan (4 TMS)	C15H42N2Si4	362,2425
9.	N_1755	58	A177004	1755,75	glukopiranoza [-H2O] (4TMS)	C18H44O6Si4	468,2215
10.	N_1761	61	A178003	1762,26	A178003	C19H46O6Si4	482,2371
11.	N_1777	62	A179010	1781,65	A179010	b.d.	b.d.
12.	N_1797	63/65	A180002/ A181004	1789,22/1796,98	zw. podobny do pochodnej fruktozy	C21H52O6Si5	540,2610
13.	N_1964	78	A197003/A198006	1958,51/1959,24	zw. podobny do glukopiranozy (5 TMS) / glukopiranoza (5 TMS)	b.d./C21H52O6Si5	b.d./540,2610
14.	N_1967	79	A197007	1962,09	A197007	b.d.	b.d.
15.	N_1986	80	A199003	1980,30	A199003	C24H60O7Si6	
16.	N_2011	81	A203003	2014,18	A203003	b.d.	b.d.
17.	N_2095	86	A210010	2089,16	ester metylowy kwasu linolowego	C19H34O2	294,2559
18.	N_2092	87	A211001	2098,30	A211001	b.d.	b.d.
19.	N_2161	89	A217007	2160,69	A217007	b.d.	b.d.
20.	N_2175	90	A218002	2173,41	glicerolo-fosfoglicerol (5 TMS)	C21H55O8PSi5	606,2481
21.	N_2265	95	A228001	2265,18	A228001	b.d.	b.d.
22.	N_2300	96	A231002	2298,80	zw. podobny do glicerolo-aldo-piranozydu (6 TMS)	b.d.	b.d.

23.	N_2345	99	A236005	2360,28	A236005	b.d.	b.d.
24.	N_2357	100	A237001	2361,83	A237001	b.d.	b.d.
25.	N_2400	101	A243003	2414,29	mio-inozytolo-2-fosforan (7 TMS)	C27H69O9PSi7	764,3064
26.	N_2455	102	A248001	2471,94	5-hydroksytryptamina (4 TMS)	C22H44N2OSi4	464,2531
27.	N_2477	103	A250001	2484,98	A250001	b.d.	b.d.
28.	N_2519	104	A254002	2530,38	A254002	b.d.	b.d.
29.	N_2682	106	A270003	2691,64	A270003	b.d.	b.d.
30.	N_2795	108	A281001	2798,55	A281001	b.d.	b.d.
31.	N_2949	109	A296003	2951,33	A296003	b.d.	b.d.
32.	N_2968	110	A299002	2966,29	galaktinol (9 TMS)	C39H94O11Si9	990,4719
33.	N_2987	111	A300001	2987,50	A300001	b.d.	b.d.
34.	N_3094	112	A311002	3098,96	A311002	b.d.	b.d.



Ryc. S.1. Przykładowe chromatogramy całkowitego strumienia jonów zarejestrowane dla próbek ekstraktów liści jęczmienia roślin kontrolnych i poddanych stresowi niedoboru wody linii MCam 101. Najwyższy pik na obu chromatogramach pochodzi od sacharozy.

Tab. S.2. Zestawienie nieistotnych i istotnych zmian zawartości metabolitów występujących w odmianach Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus na podstawie tab. 4.3 i tab. 4.4.

Organ	Liczba metabolitów	Liczba metabolitów nie wykazujących istotnych zmian	Liczba metabolitów wykazujących istotne zmiany ze względu na:		
			Odmianę (O)	Suszę (S)	Interakcję (OxS)
Liść	101	16	75	61	29
Korzeń	100	36	44	30	15

Tab. S.3. Zestawienie metabolitów ze względu na charakterystykę odpowiedzi w warunkach niedoboru wody dla odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus na podstawie tab. 4.3 i tab. 4.4.

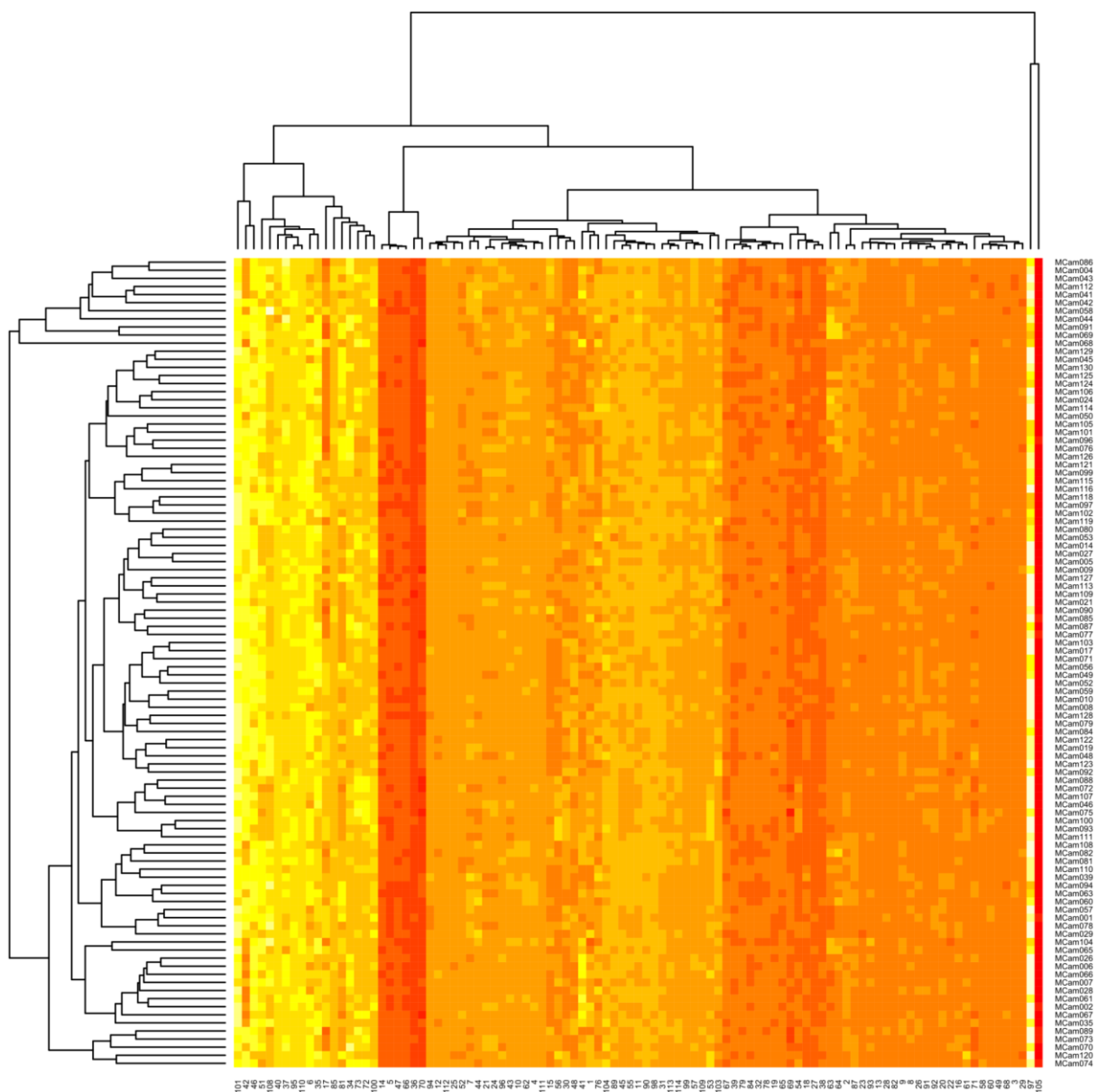
Organ	Odmiana	Liczba metabolitów wykazujących pod wpływem suszy:			Liczba metabolitów
		Spadek (-1)	Brak zmian (0)	Wzrost (1)	
Liść	Cam/B1/CI	19	72	10	101
	Maresi	19	55	27	
	Sebastian	12	52	37	
	Stratus	19	53	29	
Korzeń	Cam/B1/CI	2	61	37	100
	Maresi	6	89	5	
	Sebastian	14	77	9	
	Stratus	1	88	11	


Tab. S.4. Zestawienie liczby wzorów kierunków odpowiedzi metabolitów liści i korzeni pod wpływem niedoboru wody dla odmian Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus na podstawie tab. 4.3 i tab. 4.4 (-1 spadek, 0 brak zmian, 1 wzrost).

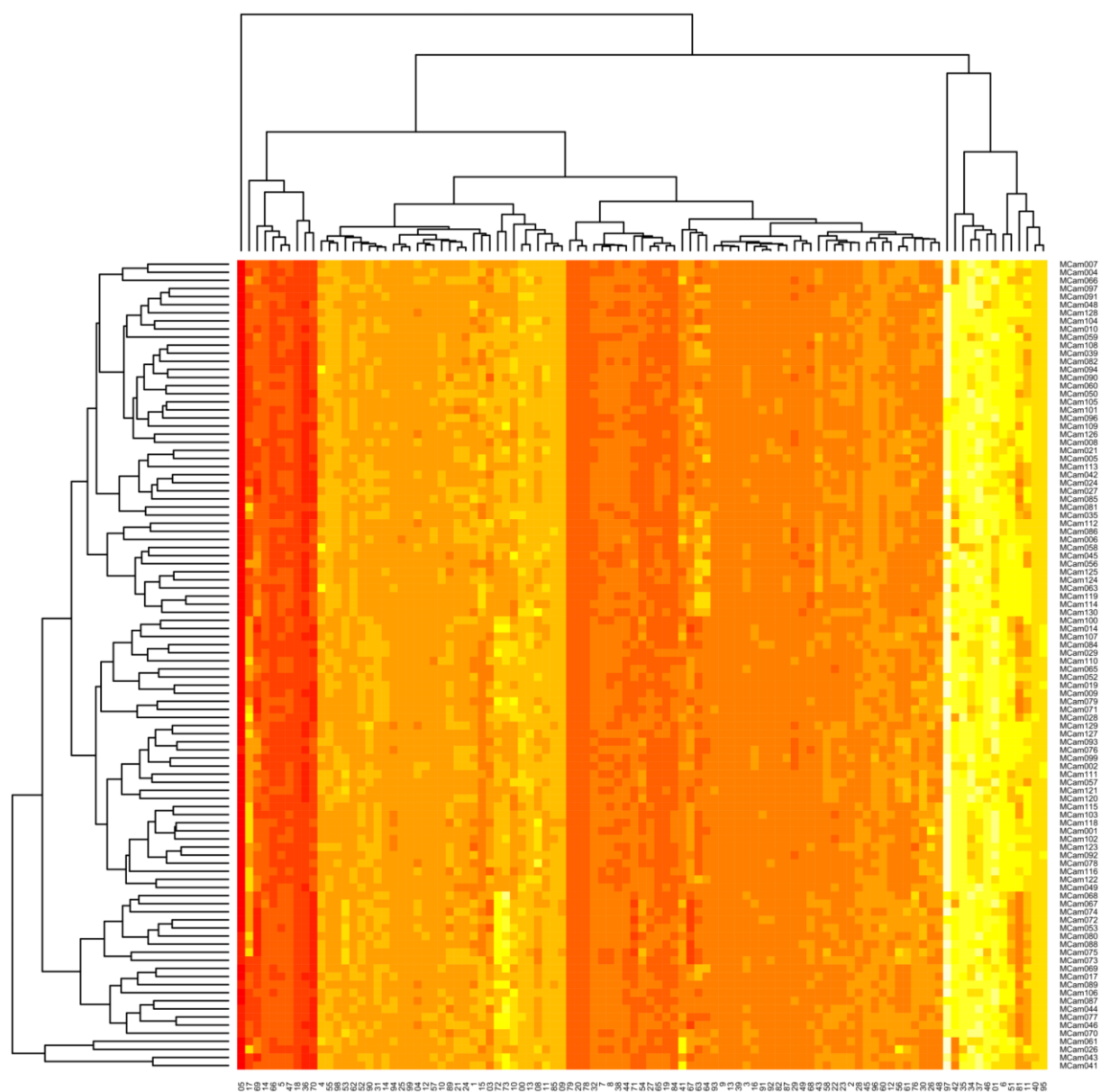
Liść					Korzeń				
Cam/B1/CI	Maresi	Sebastian	Stratus	Liczba reakcji	Cam/B1/CI	Maresi	Sebastian	Stratus	Liczba reakcji
-1	-1	-1	-1	4	-1	0	-1	0	1
-1	-1	-1	0	1	-1	0	0	0	1
-1	-1	0	-1	6	0	-1	-1	0	1
-1	-1	0	0	2	0	-1	0	0	1
-1	0	-1	0	1	0	0	-1	-1	1
-1	0	0	-1	2	0	0	-1	0	8
-1	0	0	0	2	0	0	-1	1	1
-1	0	0	1	1	0	0	0	0	46
0	-1	-1	-1	3	0	1	-1	0	1
0	-1	0	-1	2	0	1	0	0	2
0	-1	0	0	1	1	-1	0	0	3
0	0	-1	-1	2	1	-1	1	0	1
0	0	-1	0	1	1	0	-1	1	1
0	0	0	0	31	1	0	0	0	17
0	0	0	1	1	1	0	0	1	5
0	0	1	0	7	1	0	1	0	4
0	0	1	1	6	1	0	1	1	4
0	1	0	1	2	1	1	0	0	2
0	1	1	0	4					
0	1	1	1	12					
1	0	1	0	1					
1	1	0	0	1					
1	1	0	1	1					
1	1	1	0	1					
1	1	1	1	6					

Tab. S.5. Zestawienie nieistotnych i istotnych zmian zawartości metabolitów w liściach i korzeniach linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI.

Organ	Liczba metabolitów	Liczba metabolitów nie wykazujących istotnych zmian	Liczba metabolitów wykazujących istotne zmiany ze względu na:		
			Linie (O)	Suszę (S)	Interakcję (LxS)
Liść	101	0	101	81	80
Korzeń	100	26	74	60	20

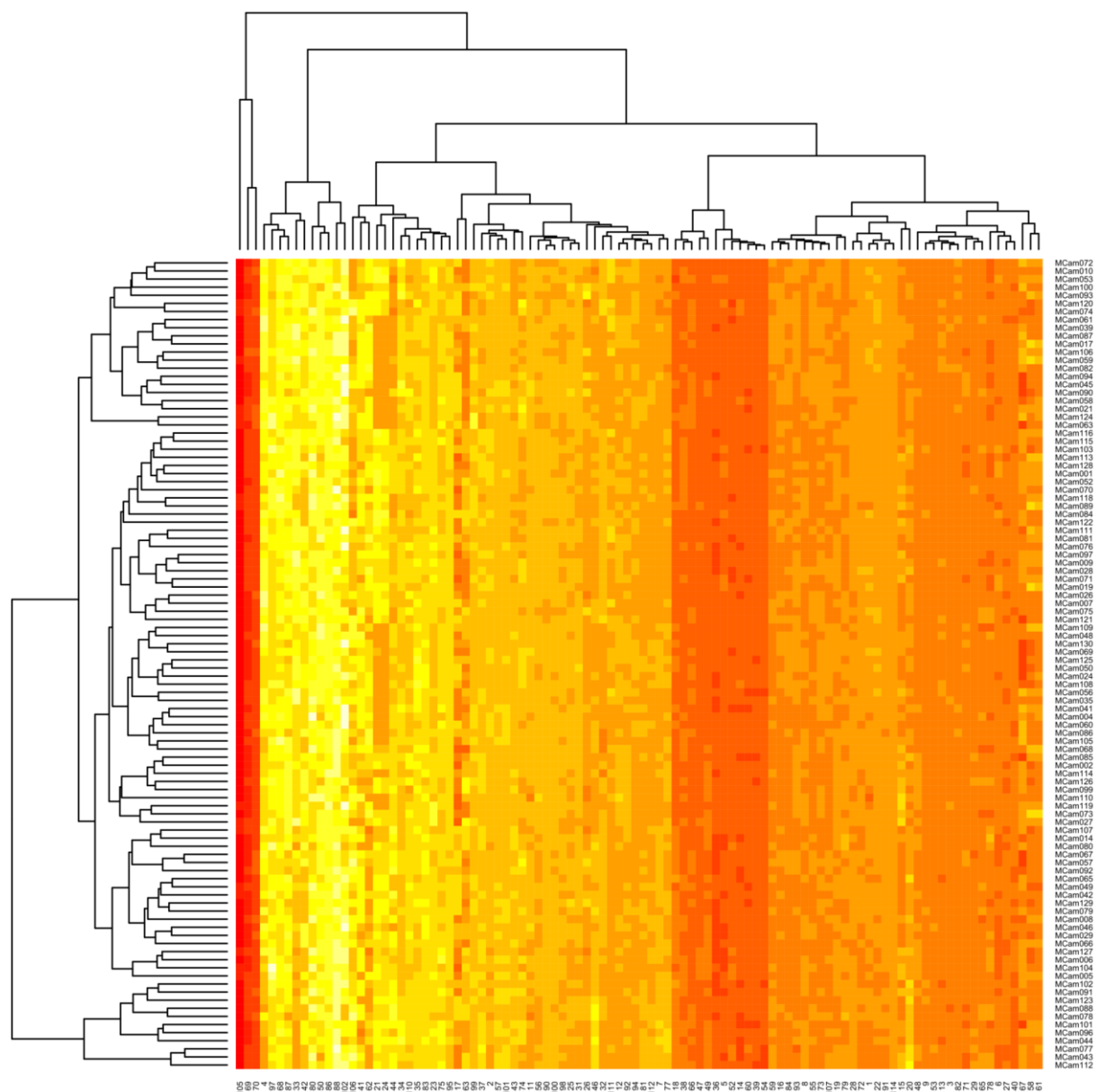



Ryc. S.2. Mapa ciepła wraz z dendrogramami obrazująca wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w liściach siewek linii populacji mapującej Maresi × Cam/B1/CI w warunkach kontrolnych. W kolumnie po prawej linii jęczmienia ponumerowane od 1 do 130. W dolnym wierszu numeracja metabolitów zgodna z tab. 4.2. Skala kolorów zależna od wartości: od kremowego dla najniższych do czerwonego dla najwyższych .

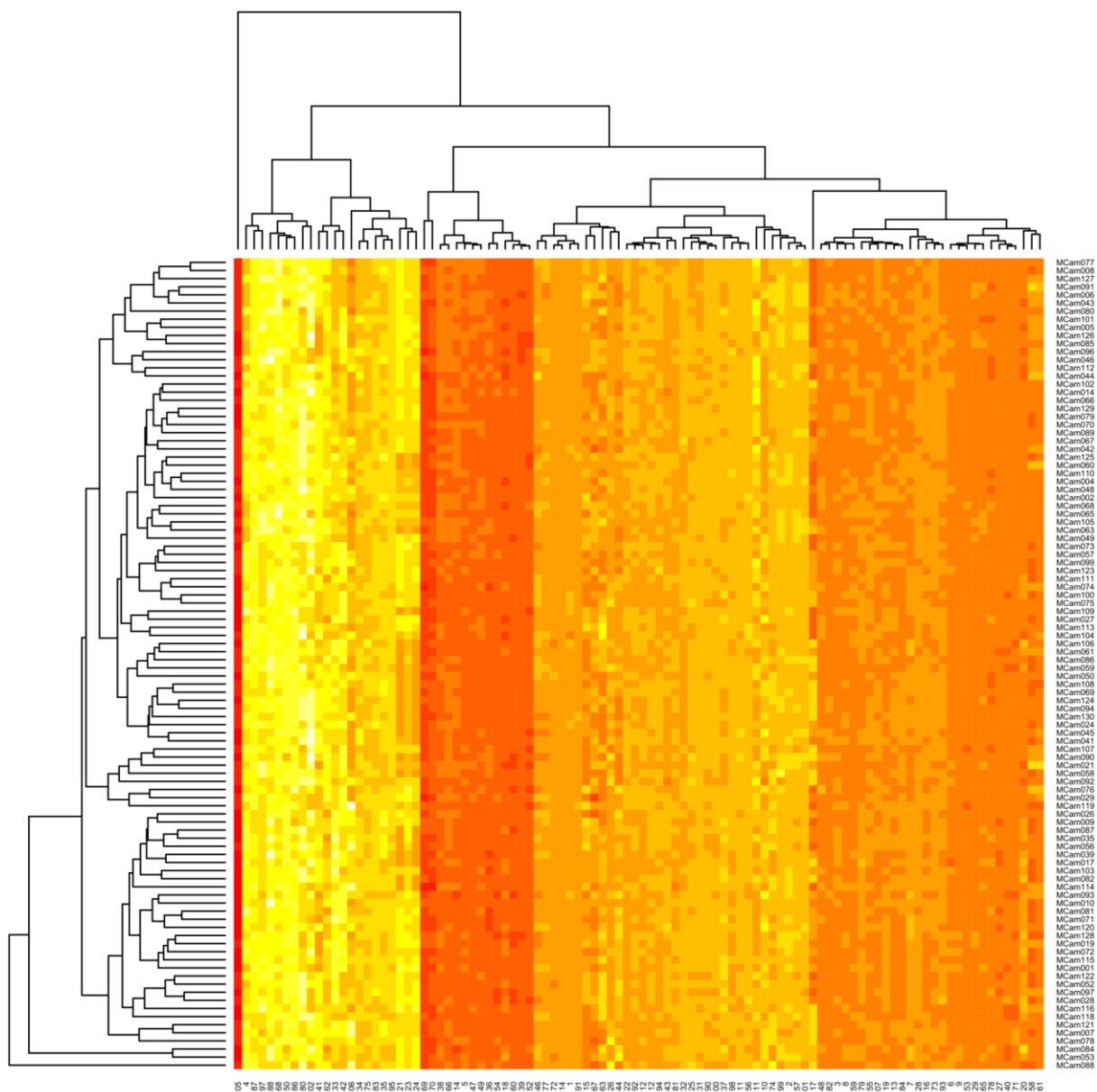


Ryc. S.3. Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w liściach siewek linii populacji mapującej Maresi \times Cam/B1/CI w warunkach niedoboru wody. W kolumnie po prawej linii jęczmienia ponumerowane od 1 do 130. W dolnym wierszu numeracja metabolitów zgodna z tab. 4.2. Skala kolorów zależna od wartości: od kremowego dla najniższych do czerwonego dla najwyższych



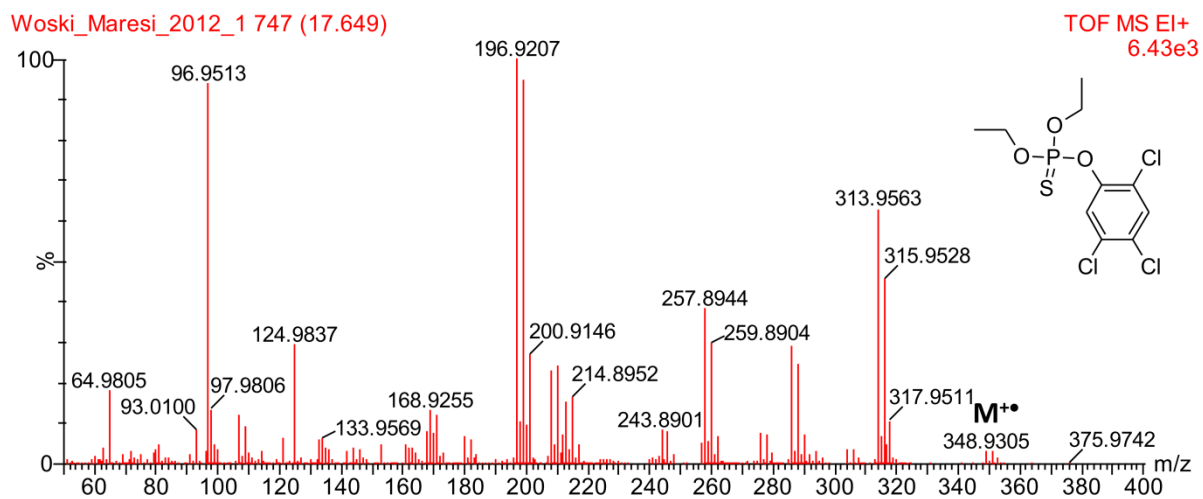


Ryc. S.4. Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w korzeniach siewek linii populacji mapującej Maresi \times Cam/B1/CI w warunkach kontrolnych. W kolumnie po prawej linii jęczmienia ponumerowane od 1 do 130. W dolnym wierszu numeracja metabolitów zgodna z tab. 4.2. Skala kolorów zależna od wartości: od kremowego dla najniższych do czerwonego dla najwyższych .

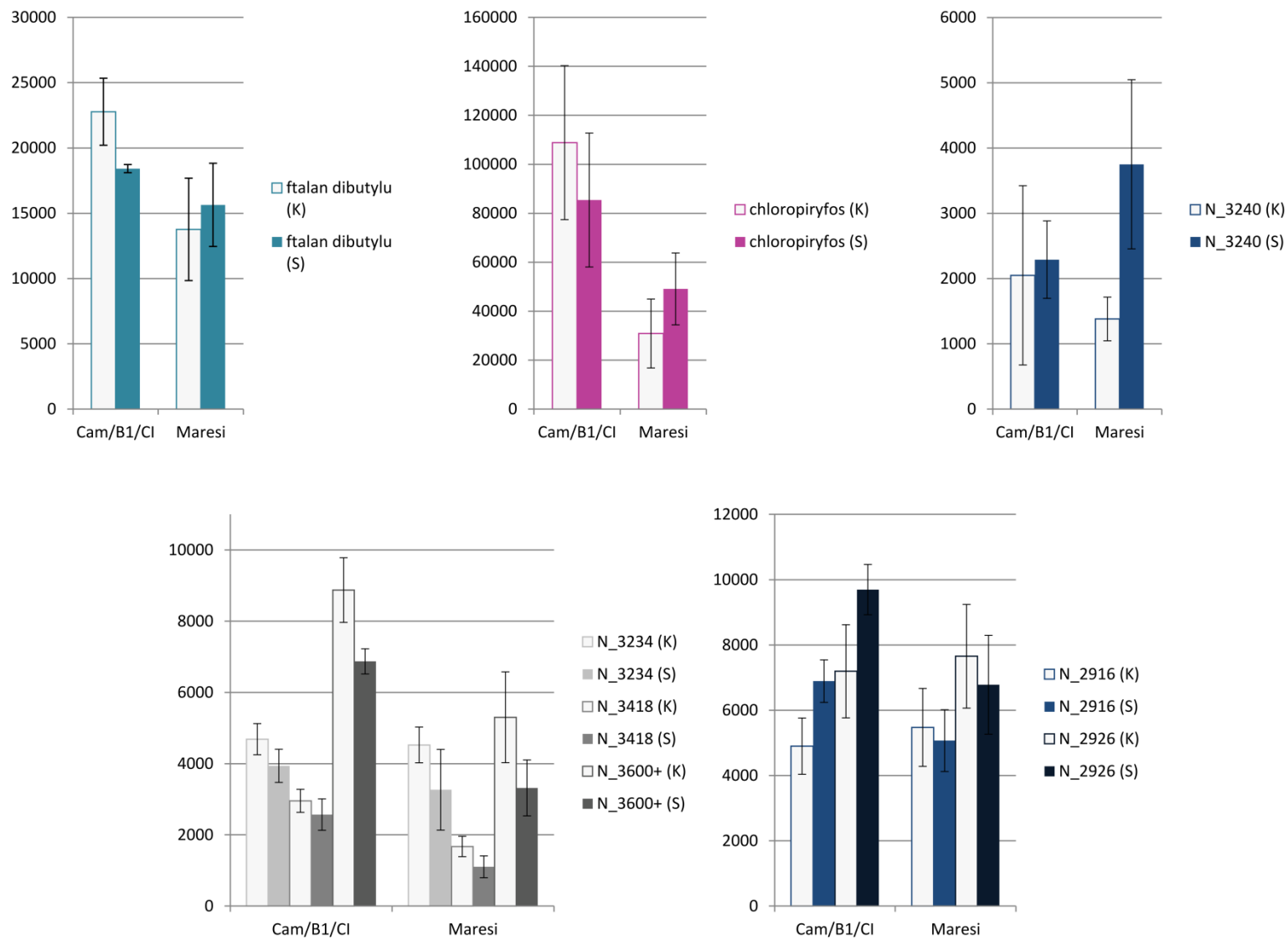


Ryc. S.5. Mapa cieplna wraz z dendrogramami obrazująca wartości średnie poziomu akumulacji metabolitów w korzeniach siewek linii populacji mapującej Maresi \times Cam/B1/CI w warunkach niedoboru wody. W kolumnie po prawej linii jęczmienia ponumerowane od 1 do 130. W dolnym wierszu numeracja metabolitów zgodna z tab. 4.2. Skala kolorów zależna od wartości: od kremowego dla najniższych do czerwonego dla najwyższych





Ryc. S.6. Widmo EI insektycydu obecnego na powierzchni liści jęczmienia – chlorpiryfosu.



Ryc. S.7. Zmiany zawartości związków obecnych na powierzchni liści (K – kontrola, S – susza).

a.



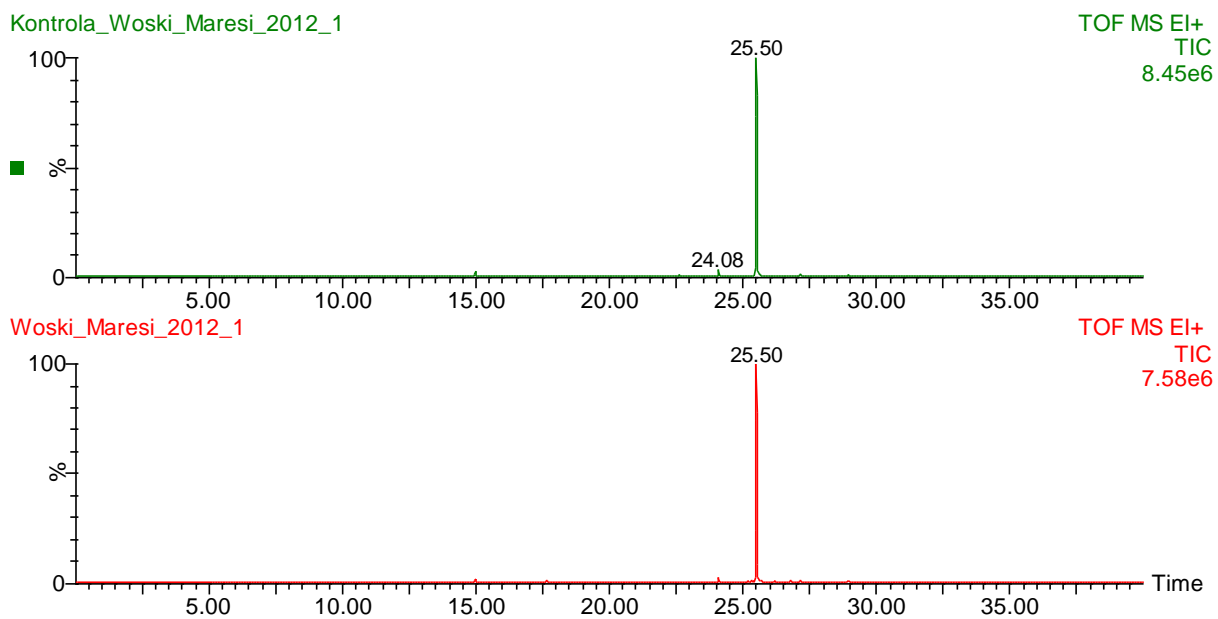
b.



c.



Ryc. S.8. Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) a) Cam/B1/CI b) Maresi c) populacja mapująca Maresi \times Cam/B1/CI (**czzerwony** – rośliny poddane stresowi niedoboru wody, **niebieski** – warunki kontrolne) (fot. Paweł Rodziewicz).



Ryc. S.9. Przykładowe chromatogramy całkowitego strumienia jonów zarejestrowane dla próbek ekstraktów wosków z powierzchni liści jęczmienia roślin kontrolnych i poddanych stresowi niedoboru wody odmiany Maresi. Najwyższy pik na obu chromatogramach pochodzi od heksakozanolu.