



## ***Medicago truncatula* – roślina modelowa w badaniach metabolomu roślin bobowatych (*Fabaceae*)**

Ireneusz Kapusta

Zakład Biochemii i Jakości Plonów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

### ***Medicago truncatula* – model plant for the study of legume metabolomics (*Fabaceae*)**

#### Summary

Over the past few years, *Medicago truncatula* has emerged as a model legume for the study of plant functional genomics that incorporates profiling of gene expression (transcriptome), protein expression (proteome), and metabolite expression (metabolome) to better understand the biological processes with legumes and their interaction with the environment. It is an excellent species for fundamental studies on the unique secondary metabolism of legumes. Two classes of secondary metabolites are of particular interest: phenylpropanoids, which have been attributed with health-promoting properties, and another important class of secondary metabolites from *M. truncatula* are the triterpene saponins, which possess allelopathic, anti-microbial, anti-insect activity, as well as anti-nutritional effects. Profiling and identification of a large variety of natural products from *M. truncatula* are crucial to metabolomics and functional genomics.

#### Key words:

*Medicago truncatula*, metabolomics, metabolic profiling saponins, flavonoids.

#### Adres do korespondencji

Ireneusz Kapusta,  
Zakład Biochemii  
i Jakości Plonów,  
Instytut Uprawy  
Nawożenia  
i Gleboznawstwa –  
Państwowy Instytut  
Badawczy,  
ul. Czartoryskich 8,  
24-100 Puławy;  
e-mail:  
ikapusta@iung.pulawy.pl

## **1. Wstęp**

Wraz z zaawansowaniem molekularnych technik sekwencjonowania DNA w ciągu ostatnich kilkunastu lat pojawiło się wiele projektów mających na celu poznanie całkowitej informacji genetycznej określonych gatunków. Do najbardziej znanych i waż-

nych osiągnięć należy projekt zsekwencjonowania genomu rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), niewielkiej jednorocznej rośliny, od wielu lat uznawanej za modelową w wielu badaniach molekularnych (1). Był to pierwszy w pełni zsekwencjonowany genom należący do organizmu roślinnego. Kolejnym ważnym osiągnięciem było poznanie sekwencji ryżu (RGP, ang. *Rice Genome Project*) (2). Teraz, gdy dostępne są tak obszerne dane, naukowcy posiadają odpowiednie narzędzia molekularne i możliwości określania funkcji genów dotychczas nie rozpoznanych. Cel ten jest realizowany poprzez analizę poziomu transkrypcji genów na poziomie mRNA (transkryptomika), ekspresji i aktywności białek (proteomika) (3) oraz analizę poziomu syntezy niskocząsteczkowych produktów naturalnych (metabolomika) (4). W badaniach prowadzonych na różnych wymienionych poziomach molekularnych zmierza się z jednej strony do pełniejszego poznania i zrozumienia funkcjonowania systemów biologicznych, a z drugiej do wykorzystania zdobytej wiedzy w celu modyfikacji organizmów w kierunkach pożądanym przez człowieka. Często pomijanym, choć niezwykle ważnym zagadnieniem jest odpowiedź organizmu na poziomie metabolicznym na wszelkie modyfikacje genetyczne jak również różnorokie stresy środowiskowe. Odpowiedź ta przejawia się w zmianach poziomu syntezy (zwiększaniu lub hamowaniu) określonych metabolitów wtórnych. Ważnym wyzwaniem w badaniach biologicznych staje się możliwość szybkiej i wydajnej analizy metabolitów w komórkach organizmów. Temu wyzwaniu ma sprostać nowy kierunek w badaniach naukowych – metabolomika (4). W zakres tego rodzaju studiów wchodzi wysoko wydajne, wszechstronne i precyzyjne analizy metabolitów wtórnych, w celu ich identyfikacji i monitorowania zmian ilościowych jak również jakościowych. Analiza metabolitów wtórnych może obejmować obserwacje jednego lub kilku metabolitów (ang. *target analysis*), analizy profilu metabolicznego – produktów powstających w jednym lub kilku szlaków metabolicznych (ang. *metabolite profiling*) oraz całościowe analizy wszystkich metabolitów wtórnych tzw. „metaboliczny odcisk palca” (ang. *metabolite finger printing*).

*Medicago truncatula* (potocznie nazywana w języku angielskim *barrel medic* ze względu na kształt strąka) jest jednoroczną rośliną powszechnie uprawianą w Australii, z przeznaczeniem na paszę do bezpośredniego skarmiania zwierząt, lub do przemysłowego przetwarzania na koncentraty o dość dobrze zbilansowanym składzie aminokwasowym. Pochodzi ona z basenu Morza Śródziemnego i jest blisko spokrewniona z lucerną siewną (*Medicago sativa*). Małe wymagania dotyczące światła, temperatury, składu podłoża oraz szybki rozwój wegetatywny (12 tygodni), mały genom (454-526 Mbp), jak również łatwość wywoływania modyfikacji genetycznych lub pojedynczych mutacji, a następnie identyfikowania osobników o zmienionych fenotypach pozwalają uznać *M. truncatula* za wyjątkowo dobry obiekt modelowy w odniesieniu do roślin użytkowych z rodziny *Fabaceae*, niegdyś zwanych motylkowatymi, a obecnie według nowej nomenklatury bobowatymi (5). Wprowadzane modyfikacje mają na celu opracowanie mapy genetycznej komponentów odpowiedzialnych za ekspresję niektórych cech użytkowych i na ich podstawie do rozwinięcia ba-

dań z zakresu genomiki funkcjonalnej, tzn. identyfikacji genów mających wpływ na ekspresję cechy ilościowej. Inną ważną cechą tego gatunku, wzbudzającą zainteresowanie ośrodków badawczych na całym świecie jest występowanie różnych klas metabolitów wtórnych biorących udział w realizacji różnych funkcji.

Z powodu złożoności metabolomu *M. truncatula* nie istnieją obecnie metody pozwalające na jednoczesną analizę wszystkich, czy nawet większości metabolitów w pojedynczej próbce ekstraktu. Z tego względu całościowa analiza roślinnych produktów naturalnych stanowi wielkie wyzwanie zarówno pod względem ich identyfikacji jak też określeniu funkcji biologicznej metabolitów. W badaniach związanych z identyfikacją związków organicznych obecnych w mieszaninach powszechnie wykorzystuje się do tego celu techniki chromatograficzne w sprzężeniu z różnego rodzaju detektorami. W tego typu analizach najprzydatniejszym detektorem jest spektrometr mas. Wynika to z możliwości bezpośredniej identyfikacji substancji na podstawie zarejestrowanych widm masowych, poprzez ich porównanie z widmami standardów lub danymi zgromadzonymi w bazach danych. Możliwa jest również analiza dróg fragmentacji związków i na tej podstawie ich identyfikacja.

Profil metaboliczny *M. truncatula* jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Prace nad identyfikacją metabolitów wtórnych ciągle postępują i koncentrują się głównie na dwóch najbardziej zróżnicowanych klasach produktów naturalnych: saponinach triterpenowych i związkach flawonoidowych.

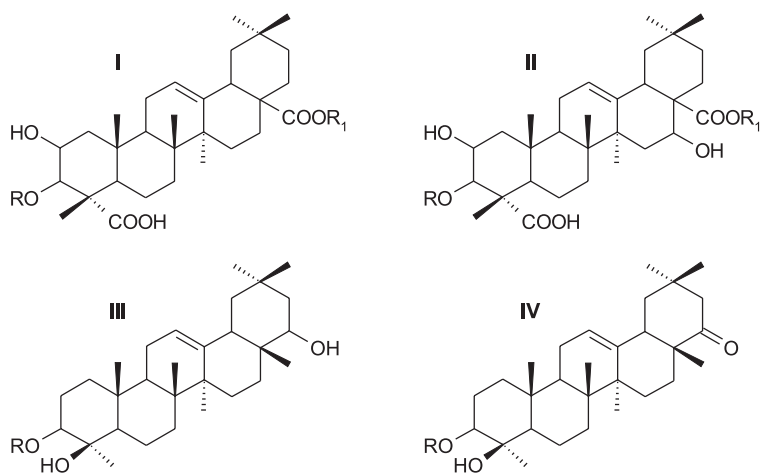
## 2. Analiza profili saponin triterpenowych

Analiza profilu metabolicznego saponin triterpenowych w roślinach z rodzaju *Medicago* stanowi niemałe wyzwanie. Saponiny, co prawda, występują w roślinie w dużych ilościach, jednak stanowią złożoną mieszaninę związków różniącą się rodzajem aglikonu jak i łańcuchów cukrowych. Jeśli zauważyć, że pierścienie cukrowe mogą być podstawione w różnych miejscach aglikonu, jak również mogą zawierać różne cukry i ich sekwencje w łańcuchu, liczba występujących kombinacji jest ogromna. Nawet w jednej roślinie znaleźć można mieszaninę kilkudziesięciu glikozydów, których struktury różnią się w zależności od badanego organu (nasiona, korzenie, części zielone lub kwiaty). Sytuacja taka występuje w lucernie siewnej, gdzie poszczególne części rośliny różnią się zarówno składem chemicznym jak i zawartością tych związków (6).

Wcześniejsze prace nad saponinami polegały na ich ekstrakcji z materiału roślinnego i analizowaniu ich mieszaniny za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Pozwala to na wstępną identyfikację pojedynczych saponin, a przy mniej skomplikowanych mieszaninach na densytometryczne oznaczenie ilościowe. Dla pełnego obrazu struktury związku potrzebne są rozdziały mieszanin saponin na pojedyncze składniki. Niskociśnieniowa chromatografia kolumnowa może przynieść pożądane efekty pod warunkiem, że stosowana jest w kilku kombinacjach. Jednakże prace te

są bardzo żmudne i wymagają stosowania kilku technik. Na przykład saponiny triterpenowe lucerny można rozfrakcjonować na mieszaniny zawierające 1-3 glikozydów stosując kolumnę  $C_{18}$  i gradient liniowy mieszaniny woda-metanol. Następnie do rozdzielenia tych frakcji należy zastosować kolumnę wypełnioną żel krzemionkowym rozwijaną w układzie izokratycznym (7). Jednakże stosując procedurę odwrotną – frakcjonowanie na kolumnie żelowej, a następnie rozdzielenie frakcji na kolumnie  $C_{18}$  w układach izokratycznych można uzyskać bardzo dobre efekty (8). Najbardziej miarodajną metodą pozwalającą oznaczyć pojedyncze glikozydy jest chromatografia cieczowa z detektorem UV. Jednakże zastosowanie tej metody do badania saponin nie jest tak proste. Większość saponin nie zawiera chromoforów niezbędnych do rejestracji rozdzielonych HPLC w świetle UV. Rejestrację wykonuje się zwykle w przedziale długości fal 200-210 nm, który nie jest specyficzny wyłącznie dla saponin i analiza tych związków wymaga dokładnego oczyszczenia ekstraktu od związków towarzyszących przed wprowadzeniem na kolumnę. Próby takie były podejmowane, lecz nie znalazły szerszego zastosowania, gdyż oznaczenia w ekstraktach były utrudnione z uwagi na obecność dużej ilości substancji towarzyszących o podobnym do saponin widmie absorbcyjnym (9). Alternatywnym rozwiązaniem może być przedkolumnowe wykonanie pochodnej pozwalającej wprowadzić układ chromoforowy do cząsteczki saponiny. Metoda ta polega na reakcji saponiny z bromkiem 4-bromofenacylu i może być stosowana do każdej saponiny zawierającej wolne grupy karboksylowe (10). Połączenie spektrometru mas z chromatografem cieczowym pozwala na analizę związków saponinowych bez konieczności przeprowadzania ich w różnego rodzaju pochodne. Zastosowana technika pozwala ponadto na osiągnięcie wysokiego poziomu ufności podczas identyfikacji oraz uzyskania odpowiedniego poziomu detekcji. Na podstawie zarejestrowanego widma możliwe jest określenie masy cząsteczkowej, można także uzyskać dodatkowe informacje strukturalne na podstawie dróg fragmentacji opracowanych po analizie różnic mas rejestrowanych w widmie MS jonów fragmentacyjnych. Jednak nie daje to pełnego obrazu o strukturze cząsteczki saponiny. Na podstawie tych danych nie jest możliwe stwierdzenie sposobu połączenia i kolejności występowania cząstek cukrów w łańcuchu glikozydowym przyłączonym do aglikonu.

Prace nad ustaleniem profilu saponinowego *M. truncatula* były realizowane równolegle w dwóch ośrodkach badawczych i reprezentują odrębne podejście do tego problemu przez co uzyskane wyniki pozostają w sprzeczności (11-13). W pierwszym przypadku przeprowadzone analizy miały na celu ustalenie składu saponinowej części nadziemnych (11). W tym celu wyodrębniono za pomocą technik chromatograficznych 18 glikozydów, których pełną strukturę ustalono na podstawie danych uzyskanych metodami spektroskopowymi (NMR, MS, IR) (11). Związki te zidentyfikowano jako glikozydy kwasu medikagenowego (7 glikozydów), kwasu zanowego (8 glikozydów) i sojasapogenoli B i E (3 glikozydy) (rys. 1). Dwanaście spośród nich było związkami nowymi nie opisanymi dotychczas w literaturze. W dalszej kolejności na podstawie uzyskanych wzorców opracowano metodę ilościowego oznaczania



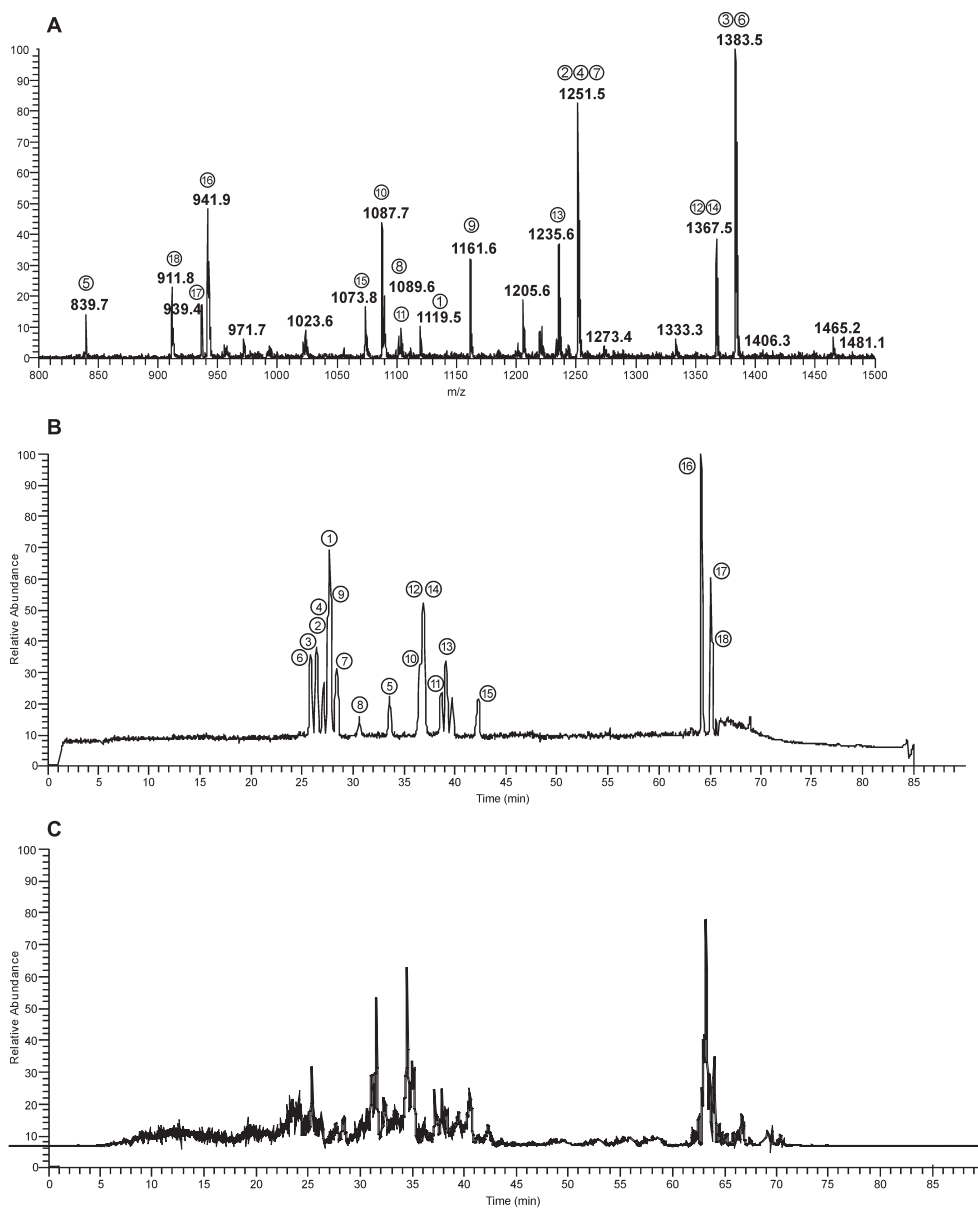
Związek	Aglikon	R	R <sub>1</sub>
1	II	Glc(1→3)-Glc	Ram(1→2)-Ara
2	II	Glc(1→3)-Glc	Api(1→3)-Ram(1→2)-Ara
3	II	Glc(1→3)-Glc	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara Ara(1→3)]
4	II	Glc(1→3)-Glc	Ara(1→3)-Ram(1→2)-Ara
5	I	GlcA	Glc
6	II	Glc(1→3)-Glc	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara Api(1→3)]
7	II	Glc(1→3)-Glc	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara
8	II	Glc	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara
9	II	Glc(1→3)-Glc	Rha(1→2)-Ara
10	I	GlcA	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara
11	I	Glc(1→3)-Glc	Ram(1→2)-Ara
12	I	Glc(1→3)-Glc	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara Ara(1→3)]
13	I	Glc(1→3)-Glc	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara
14	I	Glc(1→3)-Glc	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara Api(1→3)]
15	I	Glc	Ksyl(1→4)-Ram(1→2)-Ara
16	III	Ram(1→2)-Gal(1→2)-GlcA	
17	IV	Ram(1→2)-Gal(1→2)-GlcA	
18	III	Ram(1→2)-Ksyl(1→2)-GlcA	

Rys. 1. Struktury chemiczne saponin wyizolowanych z części nadziemnej *M. truncatula*. (I-kwas medikagenowy, II-kwas zanowy, III-sojasapogenol B, IV-sojasapogenol E; Glc-glukoza, Ara-arabinoza, Ksyl-ksyloza, Ram-ramnoza, Api-apioza, Gal-galaktoza, GlcA-kwas glukuronowy).

saponin w materiale roślinnym z zastosowaniem układu LC-ESI/MS, a następnie wykonano analizy jakościowe i ilościowe w trzech odmianach *M. truncatula* var *truncatula*, *M. truncatula* var *longispina* i *M. truncatula* var *jemalong* A 17 (13). Procentowa zawartość saponin w przeliczeniu na suchą masę w analizowanych odmianach wynosiła odpowiednio 0,22, 0,22 i 0,15%. Procentowa zawartość saponin o poszczególnych grupach aglikonów była bardzo zbliżona w trzech badanych odmianach, udział glikozydów sojasapogenoli był marginalny i nie przekraczał 5%, natomiast glikozydy pozostałych aglikonów pozostawały w stosunku 1:1. Dane te nie pokrywają się z wynikami uzyskanymi przez Huhmana i wsp. (12), według których zawartość glikozydów kwasu zanowego w częściach nadziemnych była śladowa (0,6%). W sprzeczności pozostaje również fakt zasugerowania przez cytowanych autorów obecności tridesmozydu kwasu zanowego, jak również to, że jedynie 3-GlcA-28-Ara-Rha-Xyl kwasu medikagenowego pełni rolę związku dominującego (12) (rys. 2).

Trudno jest jednoznacznie stwierdzić przyczynę tych rozbieżności, ale wydaje się, że wpływ na to może mieć kilka czynników. Po pierwsze – i najbardziej istotne – to brak dostępnych wzorców, co pozwala na pełną charakteryzację profilu badanych saponin, ten fakt miał prawdopodobnie zasadniczy wpływ na interpretację uzyskanych danych. Drugim ważnym czynnikiem, który powinno się brać pod uwagę jest wiek i sposób uprawy badanych roślin. W pierwszym przypadku wykorzystano rośliny uprawiane w warunkach polowych przy dostępie światła słonecznego, podczas gdy w drugim przypadku użyto materiału uprawianego w warunkach szklarniowych. Jak istotny jest to czynnik trudno jednoznacznie stwierdzić, jednak nie można go wykluczyć.

Mniejsze rozbieżności można zaobserwować w przypadku badania profili saponinowych w korzeniach *M. truncatula*. Do tej pory opublikowano dwie prace podejmujące ten problem (14,15). W obydwu pracach autorzy wykorzystali układy LC/ESI/MS do określenia struktury saponin w tymże organie. W pierwszym przypadku użyto spektrometru z detektorem w postaci pułapki jonowej, a na podstawie danych otrzymanych z analizy mas jonów potomnych powstałych po rozpadach jonów macierzystych w wyniku kolizyjnie indukowanej dysocjacji (CID, ang. *collision induced dissociation*), dokonano identyfikacji związków. Zaproponowano struktury 30 saponin będących glikozydami: kwasu medikagenowego, hederageniny, bojageniny i sojasapogenoli B i E (14). W drugim przypadku do badań wykorzystano analizator mas jonowego rezonansu cyklotronowego z transformacją Fouriera (FT-ICR). Prace skupione były na włośnikach korzeniowych, w których zidentyfikowano 26 tych samych struktur (głównie wzorując się na wymienionej pracy), z czego dwie pochodne było malonyłowymi pochodnymi glikozydów sojasapogenoli B i E (15), a których obecność nie została stwierdzona przez poprzednich autorów. Jednak brak autentycznych wzorców, z którymi można by było porównać otrzymane wyniki, czyni je jedynie prawdopodobnymi.



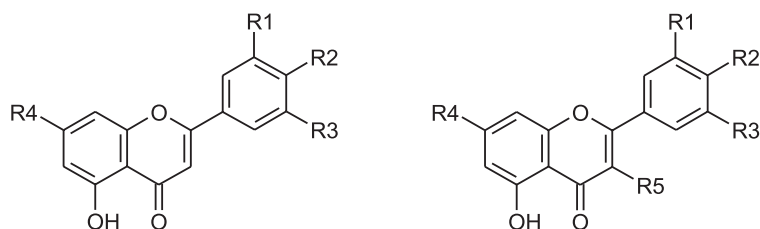
Rys. 2. A – Widmo ESI-MS saponin uzyskane w wyniku bezpośredniego nastrzyku próbki ekstraktu, B – chromatogram HPLC mieszaniny wzorców saponin, C – chromatogram HPLC próbki ekstraktu zawierającego saponiny, uzyskanej w wyniku ekstrakcji do fazy stałej – SPE. (Numeracja związków odpowiada kolejności podanej na rys. 1).

### 3. Profil metaboliczny związków flawonoidowych

Flawonoidy należą do głównej grupy metabolitów wtórnych. Spełniają one w roślinie różne funkcje, ważne w oddziaływaniu ze środowiskiem zewnętrznym. Należy do nich zaliczyć następujące rodzaje aktywności: inhibitorów wzrostu mikroorganizmów (16), inhibitorów kiełkowania nasion innych roślin w allelopatii (17), repelentów, atraktantów owadów (18), antyoksydantów (19). Flawonoidom, a zwłaszcza izoflawonoidom, przypisuje się rolę chemoatraktantów dla rhizobiów i aktywatorów genów związanych z tworzeniem brodawek korzeniowych (20). Dla *M. truncatula* taką rolę pełni, jak się zdaje, medikarpina (21). Rozdział pochodnych flawonoidów metodami chromatografii cieczowej na kolumnach z fazą odwróconą nie sprawia takich trudności jak w przypadku poprzedniej grupy metabolitów wtórnych. Wszystkie aglikony flawonoidowe zawierają pierścień aromatyczny, przez co efektywnie absorbują światło UV. Spektrofotometria UV od kilku już dekad stanowi najczęściej wybierane narzędzie w badaniach roślinnych fenylpropanoidów. Pomimo wyższości technik spektrometrii mas układy HPLC połączone z detektorem PDA lub DAD z powodzeniem są wykorzystywane w badaniach jakościowych i ilościowych. W tych typach detekcji ilość informacji strukturalnych jest jednak niewielka. W przypadku wykorzystania chromatografów cieczowych możliwe jest jednoczesne sprzęganie kilku detektorów szeregowo lub równolegle. Najczęściej konfigurowane są ze sobą detektory absorpcji promieniowania UV oraz spektrometry mas. W takich sytuacjach ilość uzyskiwanych informacji pozwala na bardziej precyzyjne określenie struktury związków w próbkach surowych ekstraktów. W chwili obecnej układy tandemowe LC/ESI/DAD/MS wykorzystano do profilowania składu flawonoidów i izoflawonoidów oraz ich połączeń w materiale roślinnym różnego pochodzenia (22,23). Zostały również zidentyfikowane acylowane pochodne glikozydowych połączeń związków fenolowych (24,25). Obecnie większe możliwości w badaniach spowodowało pojawienie się nowej techniki rozdziału mieszanin substancji: ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC). Tego rodzaju chromatografia, dzięki zwiększonej rozdzielczości, czułości oraz prędkości znacząco zwiększa wydajność, oraz dostarcza znacznie więcej informacji. Przydatna jest przede wszystkim do wykonywania dużej liczby badań, np. przy analizie zmian w składzie metabolomu całych kolekcji mutantów. Pozwala to bardziej całościowo spojrzeć na przebieg procesów biochemicznych.

Profil flawonoidowy *M. truncatula*, podobnie jak saponinowy był przedmiotem intensywnych badań. W części nadziemnej na profil metaboliczny składają się 23 związki, które zostały wyizolowane, a następnie ich strukturę ustalono na podstawie widm NMR i MS (26). Profil ten składa się z 20 połączeń cukrowych flawonów i 3 flawonoli. Najliczniejszą grupę stanowią glikozydy trycyny (9 glikozydów) następnie apigeniny (6 glikozydów), chryzeriolu i luteoliny (po 3 glikozydy), larycytryny (2 glikozydy) oraz jeden glikozyd kwercetyny (rys. 3). Dwanaście związków było wcześniej zidentyfikowanych u blisko spokrewnionego gatunku *M. sativa* niemniej

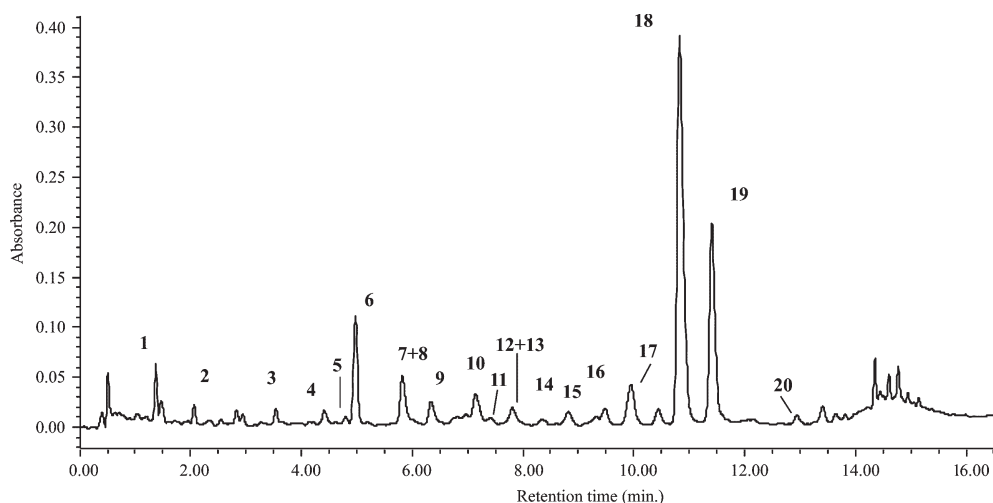




R1	R2	R3	R4	R5	
Flawon					
-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-	trycyna
-	-OH	-	-OH	-	apigenina
-OCH <sub>3</sub>	-OH	-	-OH	-	chryzoeriol
-OH	-OH	-	-	-	luteolina
Flawonol					
-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-OH	-OH	larycetryna
-OH	-OH	-	-OH	-OH	kwercetyna

Związek	R1	R2	R3	R4	R5	[M-H] <sup>-</sup> m/z
1	OCH <sub>3</sub>	OH	OGlc	-OGlc	-OGlc	817
2	OH	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA	H	637
3	H	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA	H	621
4	OCH <sub>3</sub>	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA	H	651
5	OH	OH	H	-OGlcA	H	461
6	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-OGlcA(2→1)GlcA	H	681
7	H	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA-[GlcA(1→3)]-2-O-Fer	H	973
8	OH	OH	H	OH	-Orutynozyd	609
9	H	OH	H	-OGlcA	H	445
10	OCH <sub>3</sub>	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA-[GlcA(1→3)]-2-O-Fer	H	1003
11	H	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA-2-O-Syn	H	827
12	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-OGlcA(2→1)GlcA-[GlcA(1→3)]-2-O-Fer	H	1033
13	OCH <sub>3</sub>	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA-[GlcA(1→3)]-2-O- <i>p</i> -Kum	H	973
14	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-OGlcA(2→1)GlcA-[GlcA(1→3)]-2-O- <i>p</i> -Kum	H	1003
15	H	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA-[GlcA(1→3)]-2-O-Fer	H	959
16	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-OGlcA(2→1)GlcA-2-O-Syn	H	887
17	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-OGlcA	H	505
18	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-OGlcA(2→1)GlcA-2-O-Fer	H	857
19	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-OGlcA(2→1)GlcA-2-O- <i>p</i> -Kum	H	827
20	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-OGlc(2→1)GlcA-2-O-Fer	H	843
21	OCH <sub>3</sub>	OH	OGlc	H	-OGlc	655
22	H	OH	H	-OGlcA(2→1)GlcA(1→3)GlcA	H	797
23	OCH <sub>3</sub>	OGlc	OCH <sub>3</sub>	-OGlcA	H	667

Rys. 3. Struktura chemiczna wyizolowanych flawonoidów z części nadziemnej *M. truncatula*. (GlcA-kwas glukuronowy, Glc-glukoza, Fer-kwas ferulowy, Syn-kwas synapowy, Kum-kwas kumarowy).



Rys. 4. Chromatogram UPLC frakcji flawonoidowej części nadziemnej *M. truncatula* uzyskanej w wyniku oczyszczania związków metodą ekstrakcji do fazy stałej SPE.

jednak osiem związków było nowych nie opisanych dotychczas w literaturze (rys. 4). Cechą różniącą oba te gatunki jest brak flawonoli w części nadziemnej *M. sativa* (27-29), niemniej jednak osiem związków było nowych nie opisanych dotychczas w literaturze. Cechą różniącą oba te gatunki jest brak flawonoli w części nadziemnej *M. sativa*.

Również korzenie *M. truncatula* były przedmiotem szerokich i kompleksowych badań pod kątem identyfikacji związków fenolowych, z zastosowaniem technik LC-MS i GC-MS (15,30). W pierwszej części tych badań dokonano analizy hydrolizatu korzeniowego w celu zidentyfikowania aglikonów. Na podstawie przeprowadzonych analiz można było podzielić frakcję fenolową na 5 grup: izoflawonoidy (10 różnych aglikonów), flawony (3 aglikony), flawanony (2 aglikony), auronony (2 aglikony) i jeden chalkon. Identyfikacji dokonano w pierwszej kolejności na podstawie widm absorbcyjnych UV dla każdej z grup, a następnie na podstawie widm MS. W drugiej części badań skoncentrowano się na pełnej charakterystyce glikozydów obecnych w ekstrakcie. W głównej mierze na podstawie widm masowych powstałych w wyniku kolizyjnie wywołanej dysocjacji (CID MS/MS) dokonano identyfikacji 35 różnych połączeń glikozydowych. Najliczniejszą klasę stanowiły izoflawonoidy (26 glikozydów) i jedynie w przypadku tej grupy związków możemy mówić o wysokim prawdopodobieństwu poprawności zaproponowanych struktur. Izoflawonoidy stanowią bowiem bardzo dobrze przebadaną grupę metabolitów wtórnych, a w literaturze można bardzo łatwo znaleźć dane na temat ich struktury, jak również dostępność wzorców nie nastręcza dużych problemów. Autorzy na podstawie analizy GC-MS hydrolizatu korzeniowego, zwracają również uwagę na fakt, że cząsteczkę cukru

wchodzącą w skład łańcuchów glikozydowych wszystkich związków fenolowych stanowi jedynie glukoza. Stwierdzono również wysoki udział malonylowych połączeń glikozydowych flawonoidów.

#### **4. Zmiany profili metabolicznych w roślinach wystawionych na działanie stresu**

Rośliny mają zdolność skutecznego przeciwstawiania się czynnikom środowiskowym poprzez uruchamianie wieloskładnikowego mechanizmu obronnego, a podstawową rolę ogrywają w tym metabolity wtórne. W warunkach różnorodnych stresów środowiskowych (oddziaływanie z mikroorganizmami, promieniowanie UV, deficyt wody, temperatura) mających wpływ na rośliny, obserwowane są zmiany w profilach metabolitów wtórnych występujących w różnych organach. W miarę postępu prac nad metabolomem *M. truncatula* publikowane są sukcesywnie prace, w których przeprowadza się badania biosyntezy metabolitów wtórnych w zawiesinach komórkowych *M. truncatula* elicytowanych fragmentami ścian komórkowych drożdży oraz estrem metylowym kwasu jasmonowego. Prace te skupiają się w głównej mierze na określeniu aktywności enzymów szlaków biosyntezy fenylopropanoidów, niż na samym profilowaniu zmian metabolitów wtórnych. Niemniej jednak pewne spostrzeżenia zostały zasygnalizowane (31-33).

W obu przypadkach zaobserwowano zmiany w profilach metabolicznych, a zmiany te były bardziej ilościowe niż jakościowe. W przypadku saponin triterpenowych następowała wzmożona akumulacja tych metabolitów od 2 do 5 dni po traktowaniu estrem metylowym kwasu jasmonowego. Niewielkie natomiast zmiany zaobserwowano po ekspozycji na elicytor drożdżowy. Więcej danych dotyczy związków flawonoidowych, gdzie obserwuje się wyraźne różnice w zależności od zastosowanego elicytora. Elicytor drożdżowy powoduje wzrost akumulacji flawanonów (głównie naringeniny i liquirtygeniny), które są prekursorami syntezy flawonów. Wzrost ten skorelowany jest ze wzmożoną akumulacją izoflawonów. W przypadku estru metylowego kwasu jasmonowego obserwuje się jedynie wzrost stężenia izoflawonów głównie medikarpiny i afromozyny. W przypadku tego pierwszego jest on nawet 35-krotny. W innych badaniach tego typu testowano wpływ kwasów abscynowego i salicylowego, które biorą udział w transdukcji sygnału w odpowiedzi na infekcje bakteryjne i zranienia u roślin. W obu przypadkach obserwowano wzmożoną aktywność enzymów szlaku fenylopropanoidowego (amoniakolizy fenyloalaniny i syntazy chalkonu) jednak aktywność ta nie była skorelowana ze wzrostem akumulacji flawonoidów (33). Prace te są we wczesnym etapie rozwoju, a podstawowym czynnikiem limitującym jest niewątpliwie nie w pełni poznany metabolom tego gatunku.

## 5. Podsumowanie

Na przestrzeni ostatniej dekady *M. truncatula* stał się dogodnym modelem w badaniach metabolomu ważnych rolniczo i środowiskowo roślin bobowatych. Dzięki połączonym wynikom badań z zakresu transkryptomiki, proteomiki i metabolomiki oraz pokrewieństwu filogenetycznemu pomiędzy *M. truncatula* a innymi bobowatymi możliwe będzie w przyszłości dostarczenie cennych informacji genetycznych dla programów hodowlanych w celu ulepszenia lub modyfikacji cech użytkowych. Niemniej jednak istnieje konieczność uzupełnienia informacji dla pełniejszego zrozumienia procesów biochemicznych zachodzących w komórce jak i interakcji pomiędzy rośliną a środowiskiem.

## Literatura

1. Theologis A. R., Ecker J. R., Palm C. J., Federspiel N. A., Davis R. W., (2000), *Nature*, 408, 796-815.
2. International Rice Genome Sequencing Project, (2005), *Nature*, 436, 793-800.
3. Somerville C., Somerville S., (1999), *Science*, 285, 380-383.
4. Trethewey R. N., Krotzky A. J., Willmitzer L., (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 83-85.
5. Cook D. R., (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 301-304.
6. Oleszek W., (1996), in: *Saponins used in Food and Agriculture. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 405, Eds. Waller G. R., Yamasaki K., Plenum Press, New York, 15-170.
7. Oleszek W., Price K. R., Colquhoun I. J., Jurzysta M., Płoszyński M., Fenwick G. R., (1990), *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1810-1817.
8. Biały Z., Jurzysta M., Oleszek W., Piacente S., Pizza C., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3185-3192.
9. Domon B., Dorsaz A. C., Hostettman K., (1984), *J. Chromatogr.*, 315, 441-446.
10. Oleszek W., Jurzysta M., Price K. R., Fenwick G. R., (1990), *J. Chromatogr.*, 519, 109-116.
11. Kapusta I., Stochmal A., Perrone A., Piacente A., Pizza C., Oleszek W., (2005), *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2164-2170.
12. Huhman D. V., Berhrov M., Sumner L. W., (2005), *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1914-1920.
13. Kapusta I., Janda B., Stochmal A., Oleszek W., (2005), *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7654-7660.
14. Huhman D. V., Sumner L. W., (2002), *Phytochemistry*, 59, 347-360.
15. Schlieman W., Ammer C., Strack D., (2008), *Phytochemistry*, 69, 112-146.
16. Shaw L. J., Hooker J. E., (2000), *J. Ethnopharm.*, 73, 317-322.
17. Basile A., Sorbo S., Lopez J. A., Castaldo C. R., (2003), *Phytochemistry*, 62, 1145-1151.
18. Fiedler K., Wray V., Proksch P., (1999), *Phytochemistry*, 51, 609-614.
19. Burda S., Oleszek W., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774-2779.
20. He X. Z., Reddy J. T., Dixon R. A., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 36, 43-54.
21. Oldroyd E. D., Long S. R., (2003), *Plant Physiol.*, 131, 1027-1032.
22. Pietta P., Facino R. M., Carini M., Mauri P., (1994), *J. Chromatogr.*, 661A, 121-126.
23. Xiao H. B., Krucker M., Albert K., Liang X. M., (2004), *J. Chromatogr.*, 1032, 117-124.
24. Mullen W., Lean M. J., Crozier A., (2002), *J. Chromatogr.*, 996, 63-70.
25. Prasain J. K., Wong C. C., Bernes S., (2004), *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 1324-1350.
26. Kowalska I., Stochmal A., Kapusta I., Janda B., Pizza C., Piacente S., Oleszek W., (2007), *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2645-2652.
27. Stochmal A., Piacente S., Pizza C., Riccardis F., Leitz R., Oleszek W., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 753-758.
28. Stochmal A., Simonet A., Macias F., Oleszek W., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5310-5314.

29. Stochmal A., Simonet A., Macias F., Oliviera M., Abreu J. M., Nash R., Oleszek W., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 8, 1223-1226.
30. Farag M. A., Huhman D. V., Lei Z., Sumner L. W., (2007), *Phytochemistry*, 68, 342-534.
31. Suzuki H., Achnine L., Xu R., Matsuda S. P., Dixon R. A., (2002), *Plant J.*, 32, 1033-1048.
32. Broeckling C. D., Huhman D. V., Farag M. A., Smith J. T., May D. G., Mendes P., Dixon R. A., Sumner L. W., (2004), *Journal of Experimental Botany*, 56, 323-336.
33. Suzuki H., Reddy M. S., Naoumikina M., Aziz N., May G. D., Huhman D. V., Sumner L. W., Blount J. W., Mendes P., Dixon R. A., (2005), *Planta*, 220, 696-707.