



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Studium biosyntézy benzoových kyselin v rostlinách pomocí izotopově značených
prekurzorů**

Bakalářská práce

Autor: Klára Supíková
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Klára Supíková
Název práce: Studium biosyntézy benzoových kyselin v rostlinách pomocí izotopově značených prekurzorů
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce: Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt: Ke studiu biosyntézy a metabolismu benzoových kyselin v rostlinách bylo využito izotopicky značených prekurzorů, kyselin benzoové (BA) a *trans*-skořicové (*tCA*). Byly studovány i metabolity skořicových kyselin, jelikož jsou do biosyntézy benzoových kyselin zapojeny. Prekurzory byly přidány k semenáčkům ovsa setého (*Avena sativa*), který byl ke studii vybrán jako zástupce jednoděložných rostlin. Extrakty ovsa byly analyzovány pomocí diferenční LC-MS/MS. Nejprve byl studován obsah benzoových a skořicových kyselin v kontrolních rostlinách, kdy bylo detekováno 5 derivátů BA a *tCA*. Volné kyseliny v ovsu nebyly detekovány. Překvapivě byly v ovsu detekovány sulfatované deriváty BA a *tCA*. Při studiu inkorporace necílenou analýzou bylo detekováno 18 metabolitů pocházejících z aplikovaných prekurzorů, z nichž 5 bylo detekováno také cílenou analýzou. U 10 metabolitů došlo k inkorporaci BA a u 8 metabolitů *tCA*. Inkorporace prekurzorů nebyla detekovaná u sulfatovaných derivátů BA a *tCA*. Metabolity *tCA* byly převážně konjugované hydroxy/methoxy deriváty, zatímco metabolity BA byly konjugovány výhradně přes karboxylovou skupinu a nedocházelo u nich k hydroxylaci.

Klíčová slova: Biosyntéza benzoových kyselin, skořicové kyseliny, fenolické metabolity, inkorporační studie, *Avena sativa*
Počet stran: 58
Počet příloh: 0
Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and Suriname: Klára Supíková

Title of thesis: Study of biosynthesis of benzoic acids in plants using isotopically labeled precursors

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of growth regulators

Supervisor: Mgr. Jiří Grúz, Ph.D

The year of presentation: 2018

Abstract: To study the biosynthesis and metabolism of benzoic acids in plants, isotopically labeled precursors, benzoic acid (BA) and *trans*-cinnamic (*t*CA), were used. Cinnamic acid metabolites have also been studied as they are involved in the benzoic acid biosynthesis. Precursors were applied to seedlings of oat (*Avena sativa*) which was selected as a representative of monocotyledonous plants. Oats were analyzed by differential LC-MS/MS. Firstly, the analysis of benzoic and cinnamic acids in control plants was performed, resulting in the detection of 5 derivatives of BA and *t*CA, including sulfated derivatives. Free acids were not detected. Secondly, non-target analysis of plants feeded with precursors resulted in the detection of 18 metabolites of applied precursors from which 5 metabolites were also detected by targeted method. BA was incorporated in 10 metabolites, and *t*CA in 8 metabolites. Incorporation of precursors in sulfated derivatives of BA and *t*CA was not detected. The metabolites of *t*CA were predominantly hydroxy/methoxy derivatives and conjugates with other substances, whereas hydroxylation of BA did not occur. BA was conjugated exclusively via its carboxyl group.

Keywords: Biosynthesis of benzoic acids, cinnamic acids, phenolic metabolites, feeding experiment, *Avena sativa*

Number of page: 58

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za využití citované literatury.

V Olomouci,

.....

Podpis

Děkuji svému vedoucímu práce Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, rady a mnoho znalostí a dovedností, které mi předal. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Lucii Slobodianové za pomoc v laboratoři.

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod	10
2. Teoretická část	11
2.1. Biosyntéza benzoových kyselin a jejich derivátů	11
2.1.1. Dráha kyseliny šikimové/chorismové	11
2.1.1.1. Kyselina šikimová	11
2.1.1.2. Biosyntéza kyseliny šikimové	11
2.1.1.3. Biosyntéza kyseliny gallové	13
2.1.1.4. Biosyntéza chorismátu	13
2.1.1.5. Biosyntéza kyseliny <i>para</i> -aminobenzoové a anthranilové	13
2.1.1.6. Biosyntéza prephenátu	14
2.1.2. Biosyntéza kyseliny benzoové (BA) a salicylové (SA)	14
2.1.2.1. Vznik SA z isochorismátu	14
2.1.2.2. Vznik BA a SA z L-fenylalaninu	16
2.2. Modifikace benzoových kyselin	18
2.2.1. Glykosylace	18
2.2.2. Methylace	20
2.2.3. Sulfatace	20
2.2.4. Konjugace s aminokyselinami	22
2.2.5. Hydroxylace	22
2.3. Výskyt benzoových kyselin a jejich derivátů	23
2.3.1. Oves setý	24
2.4. Zástupci benzoových kyselin	25
2.4.1. Kyselina benzoová	25
2.4.2. Kyselina salicylová	26
2.4.3. Kyselina <i>para</i> -hydroxybenzoová	28
2.4.4. Kyselina gentisová	28
2.4.5. Kyselina skořicová	28
2.4.6. Kyseliny kumarové	29
2.5. Metabolomika	29
2.5.1. Cílená a necílená analýza	29
2.5.2. Princip LC-MS	31
3. Experimentální část	35
3.1. Rostlinný materiál	35

3.2.	Chemikálie	35	
3.3.	Příprava extraktů ovsu setého na UHPLC-MS	35	
3.3.1.	Pěstování a ošetření rostlin prekurzory	35	–
3.3.2.	Extrakce	36	
3.4.	UHPLC-MS/MS	37	
3.5.	Vyhodnocení dat	38	
4.	Výsledky	39	
4.1.	Detekce benzoových a skořicových kyselin v ovsu setém	39	
4.2.	Studium inkorporace	40	
4.2.1.	Detekce metabolitů s pozměněným izotopovým profilem	41	
4.2.2.	Anotace a identifikace metabolitů	43	
5.	Diskuze.	52	
6.	Závěr	56	
7.	Použitá literatura	57	

Seznam zkratek

2,3-DHBA	kyselina 2,3-dihydroxybenzoová
2,5-DHBA	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
4CL	kumarát-CoA-ligáza
AAO4	<i>Arabidopsis</i> aldehyd oxidáza 4
ADCL	aminodeoxychorismát lyáza
ADCS	aminodeoxychorismát syntáza
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BA	kyselina benzoová
BAE	glukosylester kyseliny benzoové
CI	chemická ionizace
CM	chorismát mutasa
DAHP	3-deoxy-D-arabinoheptulosonát-7-fosfát
DAHPS	3-deoxy-D-arabinoheptulosonát-7-fosfát syntáza
DHD-SDH	dehydrochinátdehydratáza-šikimátdehydrogenáza
DHQS	3-dehydrochinátsyntáza
E4P	D-erythrosa-4-fosfát
EI	elektronová ionizace (Electron Impact)
EPSP	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát
ERLIC	Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography
ESI	ionizace elektrosprejem
ES+	ionizace elektrosprejem v negativním módu
ES-	ionizace elektrosprejem v pozitivním módu
FAB	bombardování rychlými atomy
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICS	isochorismát syntáza

JA	kyselina jasmonová
LC	kapalinová chromatografie
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MeBA	methylester kyseliny benzoové
MeJA	methylester kyseliny jasmonové
MeSAG	methylester glukosidu kyseliny salicylové
MS	hmotnostní spektrometrie
MW	hmotnost molekuly (molecular weight)
<i>p</i> ABA	kyselina <i>para</i> -aminobenzoová
PAL	<i>L</i> -fenylalaninamoniumlyáza
PEP	fosfoenolpyruvát
<i>p</i> HBA	kyselina <i>para</i> -hydroxybenzoová
<i>Ph</i> CNL	<i>Petunia</i> hybrida cinnamoyl-CoA ligáza
<i>Ph</i> CHD	<i>Petunia</i> hybrida cinnamoyl-CoA hydratáza-dehydrodenáza
<i>Ph</i> KAT1	<i>Petunia</i> hybrida 3-ketoacyl-CoA thioláza
RT	retenční čas
S3H	kyselina salicylová 3-hydroxyláza
SABP2	Salicylic Acid Binding Protein 2
SAG	glukosid kyseliny salicylové
SAR	systémová získaná odolnost (Systemic Acquired Resistance)
SAS	kyselina salicylová syntáza
SCX	kolony s kationtově výměnnou fází (Strong Cation Exchange)
SGE	glukosylester kyseliny salicylové
SOT	sulfotransferáza
<i>t</i> CA	kyselina <i>trans</i> -skořicová
THF	tetrahydrofolát
TOF	průletový analyzátor (Time Of Flight)
UGT	uridindifosfát-glukosyltransferáza
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

1. Úvod

Fenylpropanoidy tvoří jednu z nejpočetnějších skupin sekundárních metabolitů vyskytujících se ve vyšších rostlinách. Základní podskupinou fenylpropanoidů jsou skořicové kyseliny, které jsou strukturně i biosynteticky propojeny s benzoáty. Slouží primárně k obraně vůči širokému spektru abiotických i biotických stresových faktorů zahrnujících např. patogeny, býložravce, mechanické poškození, UV záření, působení ozonu nebo znečištění prostředí (Korkina et al., 2011). Dále jsou klíčové při vzniku rezistence rostlin vůči pesticidům (La Camera et al., 2004). Kromě obranné funkce mají některé odvozené polymery i funkci strukturní. Např. lignin, který vzniká polymerací alkoholů skořicových kyselin, je základním stavebním prvkem suchozemských rostlin. Vzhledem k vysokému obsahu fenolických kyselin a flavonoidů v řadě zemědělských plodin jsou navíc významnou složkou lidské stravy a jejich obsah je spojován s funkčností a kvalitou potravin. Pochopení jejich biosyntézy proto může být zásadní nejen pro zemědělské aplikace zaměřené na zvýšení odolnosti plodin vůči environmentálnímu stresu, ale současně i pro produkci kvalitnějších potravin příp. nutraceutik.

Cílem této práce je studium biosyntetických drah benzoových kyselin včetně jejich navázání na metabolismus fenylpropanoidů. Jako modelová rostlina byl zvolen oves setý, který je významnou kulturní plodinou a zástupcem poměrně málo prozkoumaných jednoděložných rostlin. Základním postupem pro studium byla metabolická analýza rostlin ošetřených izotopově značenými prekurzory.

2. Teoretická část

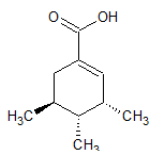
2.1. Biosyntéza benzoových kyselin a jejich derivátů

Benzoové kyseliny a jejich deriváty jsou rostlinami syntetizovány jako sekundární metabolity a signální molekuly. Jejich funkcemi je např. zprostředkování odpovědi rostliny na biotické a abiotické stresory. Jejich biosyntéza může probíhat v různých rostlinných, popř. živočišných či bakteriálních, druzích odlišným způsobem. Také v rámci jednoho organismu může biosyntéza probíhat více možnými dráhami (Dempsey et al., 2011). Úvodem je nutno zmínit, že biosyntetická dráha benzoových kyselin dosud nebyla zcela popsána a řada reakcí, enzymů a genů stále čeká na objasnění (Widhalm & Dudareva, 2015).

2.1.1. Dráha kyseliny šikimové/chorismové

2.1.1.1. Kyselina šikimová

Kyselina šikimová, jejíž strukturu lze vidět na obrázku 1, byla prvně izolována z plodu badyánu posvátného (*Illicium religiosum*) (Obr. 2) Johanem Fredrikem Eykmanem v roce 1885 v Japonsku, kde se rostlina nazývá shikimi-noki (Eykman, 1885). Kyselina šikimová v rostlinách slouží především jako prekurzor aromatických aminokyselin L-fenylalaninu, L-tyrozinu a L-tryptofanu. Dále je výchozí látkou pro biosyntézu benzoových kyselin, alkaloidů, indolů, fenylpropanoidů, vitamínu K1, vitamínu B9, taninů nebo ligninů (Tzin & Galili, 2010, Maeda & Dudareva, 2012). Kyselina se vyskytuje ve velké koncentraci především v anýzu, plodech stromu *Illicium verum*, který je hlavním přírodním zdrojem kyseliny šikimové pro preparativní extrakci (Payne & Edmonds, 2005). Šikimová kyselina je využívána ve farmaceutickém průmyslu k výrobě léčivých látek, neboť bylo zjištěno, že má antikoagulační, protizánětlivé, analgetické, antioxidační, protirakovinné a antibakteriální účinky na lidský organismus (Chen et al., 2014). Podle této kyseliny je pojmenována celá biosyntetická dráha kyseliny šikimové, též někdy podle výsledného produktu označována jako dráha kyseliny chorismové (Widhalm & Dudareva, 2015).



Obr. 1 Kyselina šikimová

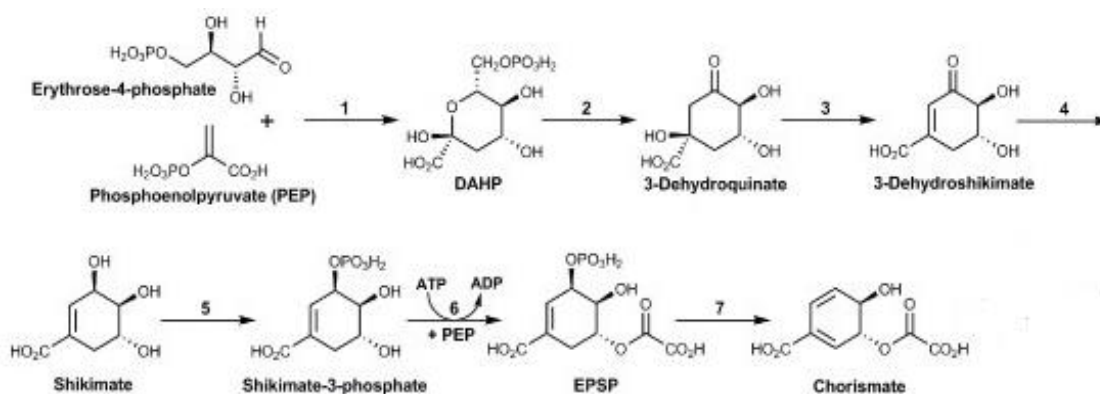


Obr. 2 Plod badyánu pravého, převzato od Wang et al., 2011

2.1.1.2. Biosyntéza kyseliny šikimové

Šikimátová dráha zahrnuje sedm reakcí lokalizovaných v plastidech. V prvním kroku reaguje fosfoenolpyruvát (PEP) pocházející z glykolýzy s D-erythrosa-4-fosfátem (E4P) z pentosofosfátového cyklu za vzniku 3-deoxy-D-arabinoheptulosonát-7-fosfátu (DAHP). Reakci katalyzuje DAHP syntáza (DAHPS, EC 2.5.1.54), která je prvním enzymem účastnícím se biosyntetické dráhy vzniku benzoových kyselin. Aktivita tohoto enzymu je zpětnově inhibována aromatickými aminokyselinami (Tzin & Galili, 2010, Maeda & Dudareva, 2012). Bylo zjištěno, že pro DAHPS jsou u rostlin přítomny dva geny, z nichž jeden je exprimován trvale a druhý pouze při obranné reakci rostliny jako zdroj benzoových kyselin (Maeda & Dudareva, 2012).

Při konjugaci PEP a E4P dochází k uvolnění jednoho fosfátu. Druhý fosfát je uvolněn v následujícím kroku za vzniku 3-dehydrochinátu, kde katalyzujícím enzymem je 3-dehydrochinát syntáza (DHQS). Následuje vznik 3-dehydrošikimátu pomocí dehydrochinátdehydratázy-šikimátdehydrogenázy (DHD-SDH; EC 4.2.1.10 a EC 1.1.1.25). Tento enzym katalyzuje zároveň dvě reakce na jedné molekule, kterými jsou dehydratace 3-dehydrochinátu za vzniku 3-dehydrošikimátu a redukce oxo-skupiny na třetím uhlíku 3-dehydrošikimátu pomocí NADPH. Průběh těchto reakcí je zobrazen na obrázku 3. Výsledkem reakcí je vznik šikimátu. (Maeda & Dudareva, 2012).



Obr. 3 Dráha kyseliny šikimové, převzato a upraveno podle Zucko et al., 2010

2.1.1.3. Biosyntéza kyseliny gallové

Enzym DHD-SDH má dvě domény. Doména šikimát SDH může 3-dehydrošikimát přeměnit na kyselinu gallovou. Tato reakce byla prokázána v rostlinách a v bakterii *Escherichia coli* (Miur et al., 2011). Další způsob biosyntézy kyseliny gallové byl nalezen ve fazolích mungo, kde biosyntéza

probíhá ve dvou krocích. Nejdříve je 3-dehydrošikimát transformován na kyselinu protokatechovou (3,4-dihydroxybenzoovou) (Dewick, 2009). Posléze je kyselina protokatechová metabolizována na kyselinu gallovou (Tateoka, 1968). Mechanismy obou reakcí jsou však zatím neznámé (Widhalm & Dudareva, 2015).

2.1.1.4. Biosyntéza chorismátu

Kyselina šikimová může být dále kromě kyseliny gallové metabolizována na chorismát, jak je patrné na obrázku 3. Kyselina šikimová podléhá fosforylaci hydroxy skupiny na třetím uhlíku za pomoci šikimát kinázy. Šikimát-3-fosfát je poté konjugován s fosfoenolpyruvátem (PEP), reakce je katalyzovaná enzymem 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázou (EPSP syntázou) za vzniku EPSP. Konečným krokem dráhy kyseliny šikimové je defosforylace EPSP a vznik chorismátu, průběh reakce umožňuje chorismátu syntáza (Maeda & Dudareva, 2012). Chorismát je zdrojem aromatických aminokyselin L-Phe, L-Tyr a L-Trp. Dále slouží také jako prekurzor phyllochinonu (vitamín K₁). Chorismát je metabolizován isochorismát syntázou (ICS) za vzniku isochorismátu (Wildermuth, 2001). Ten je následně transformován enzymem PHYLLO na kyselinu *ortho*-sukcinylbenzoovou (Gross et al., 2006). Kyselina *ortho*-sukcinylbenzoová je enzymaticky transformována na phyllochinon, který je využíván fotosyntetizujícími organismy ve fotosystému I při transportu elektronů. U červených řas a eubakterií se místo phyllochinonu tvoří menachinon (vitamín K₂) (Widhalm & Dudareva, 2015).

2.1.1.5. Biosyntéza kyseliny *para*-aminobenzoové a anthranilové

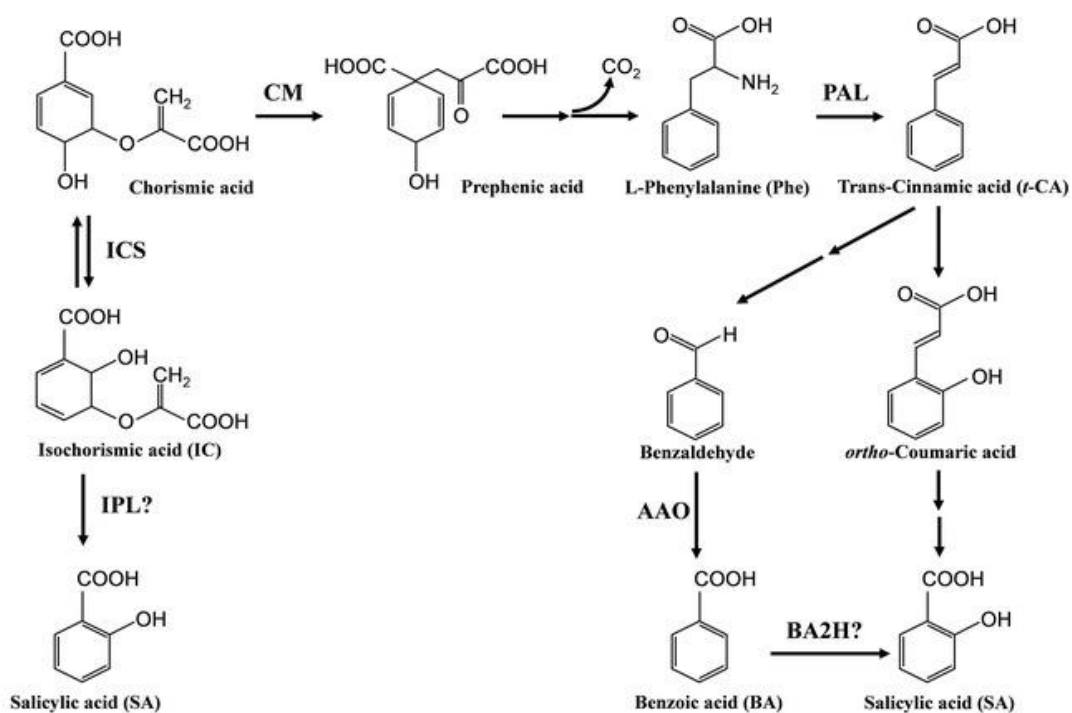
Dále je z chorismátu biosyntetizována kyselina *para*-aminobenzoová (*p*ABA). Nejdříve vzniká v mezikroku aminodeoxychorismát, tato reakce je katalyzovaná aminodeoxychorismát syntázou (ADCS), a následně enzym aminodeoxychorismát lyáza (ADCL) odštěpí pyruvyl z třetího uhlíku benzenového kruhu za vzniku *p*ABA (Widhalm & Dudareva, 2015). Spolu s pterinem a glutamátem je *p*ABA součástí kofaktoru tetrahydrofolátu (THF, vitamín B₉), sloužícího jako přenašeč jednouhlíkatých zbytků. Tato biosyntetická dráha byla prokázána v huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) a v rajčeti (*Lycopersicon esculentum*) (Basset et al., 2002). Navázání amino skupiny do *ortho* pozice chorismátu je katalyzováno anthranilát syntázou za vzniku kyseliny anthranilové (kyselina *ortho*-aminobenzoová). Kyselina anthranilová souží jako prekurzor L-Trp, auxinů nebo indolového alkaloidu camalexinu (Dempsey et al., 2011).

2.1.1.6. Biosyntéza prephenátu

Poslední možnou přeměnou chorismátu je transformace na prephenát chorismát mutasou (CM). Prephenát je prekurzorem aromatických aminokyselin L-Phe a L-Tyr, z nichž L-Phe je prekurzorem benzoových a jiných fenolických kyselin (Dempsey et al., 2011).

2.1.2. Biosyntéza kyseliny benzoové (BA) a salicylové (SA)

Kyselina salicylová může být v rostlinách syntetizována dvěma cestami, a to buď z L-Phe pomocí L-fenylalaninamoniumlyázy (PAL, E.C. 4.3.1.24) nebo z isochorismátu, který může být metabolizován více možnými enzymy (Widhalm & Dudareva, 2015). Obě tyto cesty mají společný prekurzor chorismát, který vzniká jako konečný produkt v šikimátové dráze (Dempsey et al. 2011). Biosyntézu BA a SA z chorismátu lze vidět na obrázku 4.



Biosyntéza SA přes isochorismát

Biosyntéza BA a SA přes PAL

Obr. 4 Biosyntetické cesty vzniku BA a SA skrz PAL a isochorismát; převzato a upraveno podle Dempsey & Klessig, 2017

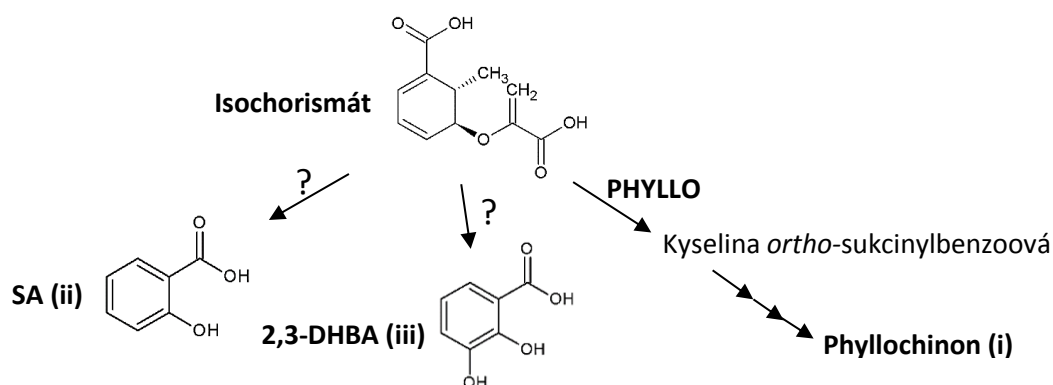
2.1.2.1. Vznik SA z isochorismátu

Při vzniku isochorismátu z chorismátu hrají důležitou roli enzymy isochorismát syntáza 1 (ICS1) a isochorismát syntáza 2 (ICS2) (Dempsey et al. 2011). Enzymy ICS1 a ICS2 byly prvně objeveny

v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). Původně však byl vznik isochorismátu z chorismátu objeven v bakteriích, kde se na vzniku podílí buď enzym isochorismát syntáza (EC 5.4.4.2), např. u druhů *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, nebo SA synthasa (SAS), který se vyskytuje u *Yersinia enterocolitica* nebo *Mycobacterium tuberculosis* (Pelludat et al., 2003; Kerbarh et al., 2005; Harrison et al., 2006). Jelikož plastidy mají původ v endosymbiotických bakteriích, předpokládalo se, že také biosyntetické dráhy v plastidech mohou být podobné bakteriálním dráhám. Tudíž v rostlinách mohl vznikat isochorismát přímo z chorismátu (Verbene et al., 1999). Tato domněnka byla potvrzena objevem genů pro ICS1 a ICS2 v *Arabidopsis*. Že je SA syntetizována právě přes isochorismát potvrdilo studium exprese ICS1 genu. Listy rostliny byly inokulovány houbovými plísněmi nebo bakteriemi, což vedlo k akumulaci SA a indukci exprese genů PR-1 (Pathogen related) a ICS1 (Wildermuth, 2001). Bylo zjištěno, že ne pouze rostlinné patogeny, ale i stresory zahrnující UV záření, ozon nebo exogenní aplikace SA indukují expresi ICS1 genu (Dempsey et al., 2011).

Je velmi pravděpodobné, že ICS gen mají všechny rostlinné druhy. Doposud byly homology ICS identifikovány v rostlinných druzích: barvínkovec růžový (*Catharanthus roseus*), paprika setá (*Capsicum annuum*), tabák virginský (*Nicotiana tabacum*), réva vinná (*Vitis vinifera*), čirok obecný (*Sorghum bicolor*), skočec obecný (*Ricinus communis*), rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*), rýže setá (*Oryza sativa*), sója luštinatá (*Glycine max*) nebo topol chlupatoplodý (*Populus trichocarpa*) (van Tegelen et al., 1999a; Ogawa et al., 2005; Uppalapati et al., 2007; Catinot et al., 2008; Yuan et al., 2009).

Isochorismát může být metabolizován třemi způsoby (Obr. 5), první za vzniku phyllochinonu (i), druhý za vzniku SA (ii) a třetí za vzniku kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové (2,3-DHBA) (iii). Všechny tři přeměny probíhají v plastidech. Kroky vedoucí ke vzniku SA a 2,3-DHBA dosud nebyly objasněny (Wildermuth, 2001; Widhalm & Dudareva, 2015).



Obr. 5 Schéma třech možných metabolizací isochorismátu na SA, 2,3-DHBA nebo phyllochinon

2.1.2.2. Vznik BA a SA z L-fenylalaninu

Biosyntéza BA, a její možná konverze na SA, může probíhat biosyntetickou cestou skrz enzym PAL (viz. Obr. 4). Biosyntéza začíná transformací L-Phe za vzniku kyseliny *trans*-skořicové (*tCA*) mechanismem neoxidativní deaminací za současného uvolnění amoniaku (Adámková et al., 2006).

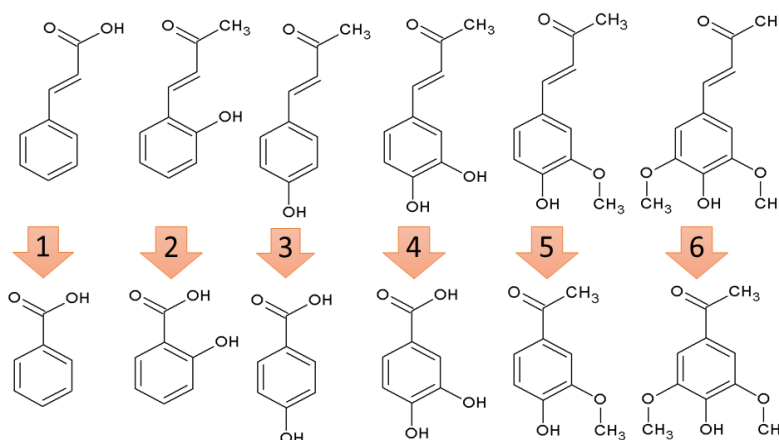
L-Phe je výchozí látkou pro tvorbu fenylpropanoidů. Fenylpropanoidy obsahují v základní struktuře kyselinu skořicovou (např. kyseliny kumarová a ferulová) a jsou základem fenolických sloučenin jako jsou lignin, lignany, suberin, kutin, flavonoidy, stilbeny a také benzoové kyseliny. Biosyntéza všech těchto látek začíná právě transformací L-Phe na *tCA* pomocí PAL (Adámková et al., 2006).

Při biosyntéze BA může následně *tCA* reagovat třemi možnými způsoby: β -oxidací (i), neoxidativní cestou závislou na koenzymu A (CoA) (ii) a neoxidativní cestou nezávislou na CoA (iii). Další možností je konverze *tCA* na kyselinu *para*-kumarovou (kyselinu *para*-hydroxyskořicovou), která poté β -oxidací reaguje podobně jako *tCA* s tím rozdílem, že z kyseliny *para*-kumarové vzniká *pHBA*, zatímco z *tCA* vzniká BA a následně SA (Wildermuth, 2006).

- (i) β -oxidace L-Phe v rostlinách probíhá v peroxisomech. Jedná se o reakci analogickou β -oxidaci mastných kyselin (Qualley et al., 2012). Zkoumána byla především v okvětních lístcích rostliny petúnie (*Petunia* hybrida cv Mitchell) pomocí radioizotopů a stabilních izotopů značeného [²H₅] Phe. Petúnie je pro studium biosyntetických drah benzoových kyselin ideálním modelovým organismem, neboť produkuje velké množství volatilních benzenoidních látek (Boatright et al., 2004). V petúnii byl popsán následující mechanismus β -oxidace. V prvním kroku dojde k aktivaci *tCA* enzymem cinnamoyl-CoA ligáza (PhCNL) za vzniku thioesteru *tCA*-CoA (Klempien et al., 2012). Následují tři kroky, které končí formací BA-CoA. Třetí uhlík na postranním řetězci *tCA* je hydroxylován za vzniku 3-hydroxy-3-fenylpropionyl-CoA, který je poté oxidován na 3-oxo-3-fenylpropionyl-CoA. Oba kroky jsou katalyzovány bifunkčním enzymem cinnamoyl-CoA hydratasa-dehydrogenasou (PhCHD) (Qualley et al., 2012). V poslední fázi 3-ketoacyl-CoA thioláza (PhKAT1) katalyzuje vznik benzoyl-CoA (Van Moerkercke et al., 2009). V peroxisomech je BA-CoA hydrolyzován, a následně je BA volnou difúzí nebo pomocí transportéru uvolněna do cytosolu buňky (Widhalm & Dudareva, 2015). Obdobná cesta β -oxidace s homologními enzymy byla identifikována také v *Arabidopsis*. Zároveň bylo zjištěno, že také další skořicové kyseliny podléhají β -oxidaci stejným mechanismem a za vzniku příslušné benzoové kyseliny (Bussell et al., 2014). V tabulce 1 jsou vypsané jednotlivé skořicové kyseliny a jejich produkty β -oxidace. Na obrázku 6 jsou pak reakce schematicky zobrazeny se vzorci jednotlivých kyselin.

Tab. 1 Výchozí látky β -oxidace skořicových kyselin a jejich deriváty - benzoové kyseliny, podle Widhalm & Dudareva, 2015

	Výchozí látka β -oxidace (skořicová kys.)		Derivát skořicové kyseliny (benzoová kys.)
1	kyselina skořicová	→	kyselina benzoová
2	kyselina <i>ortho</i> -kumarová	→	kyselina salicylová
3	kyselina <i>para</i> -kumarová	→	kyselina <i>para</i> -hydroxybenzoová
4	kyselina kávová	→	kyselina protokatechová
5	kyselina ferulová	→	kyselina vanilová
6	kyselina sinapová	→	kyselina syringová



Obr. 6 Schéma β -oxidace skořicových kyselin za vzniku benzoových kyselin podle Tabulky 1

- (ii) Alternativní neoxidativní cesta závislá na CoA začíná aktivací *t*CA enzymem 4-kumarát CoA-ligasa (4CL). Působením hydratasy je třetí uhlík postranního řetězce hydroxylován. 3-hydroxy-3-fenylpropionyl-CoA je poté podléhá reverzní aldolové reakci za vzniku acetyl-CoA a benzaldehydu (Widhalm & Dudareva, 2015).
- (iii) Benzaldehyd je meziproduktem také neoxidativní cesty nezávislé na CoA. V prvním kroku dochází k hydroxylaci třetího uhlíku postranního řetězce *t*CA. 3-hydroxy-3-fenylpropanová kyselina je následně štěpena reverzní aldolovou reakcí na kyselinu octovou a benzaldehyd (Widhalm & Dudareva, 2015).

Benzaldehyd vznikající cestami (ii) a (iii) může být transformován na BA enzymem *Arabidopsis* aldehyd oxidáza 4 (AAO4), tato reakce byla zaznamenána u klíčících semen *Arabidopsis*. AAO4 spadá do rodiny enzymů aldehyd oxidáz (Ibdah et al., 2009). BA může být hydroxylována do *ortho* pozice BA 2-hydroxylasou (BA2H), enzymem s monooxygenázovou aktivitou, za vzniku SA (León et al., 1995). Ke vzniku SA dochází zejména při stresových

podmínkách. Pokud na rostlinu žádné stresové faktory nepůsobí, pravděpodobně dojde spíše ke konjugaci BA např. s glukosinolátem za vzniku benzoylglukosinolátu (Ibdah et al., 2009).

Na modelové rostlině *Petunia* hybrida bylo inkorporačním experimentem s deuteriem značeným Phe zjištěno, že BA je častěji syntetizována bez využití CoA přes meziprodukt benzaldehyd. V petúnii je biosyntéza BA touto cestou dvakrát intenzivnější než přes β -oxidaci a benzoyl-CoA (Boatright et al., 2004).

2.2. Modifikace benzoových kyselin

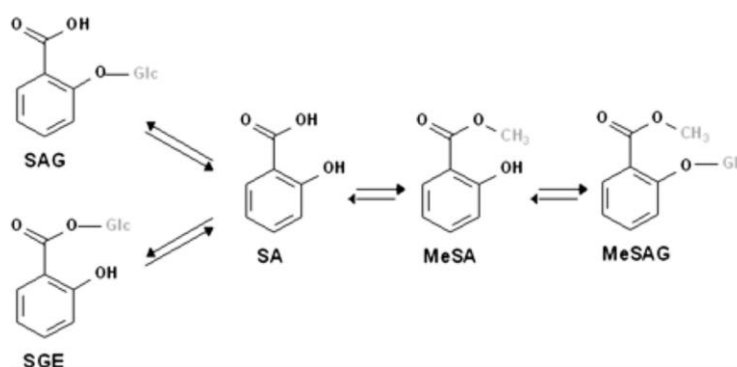
Biosyntézy kyselin salicylové, gallové, para-aminobenzoové, protokatechové, anthranilové, 2,3-dihydroxybenzoové probíhají v plastidech, z kterých jsou následně transportovány do cytosolu. Většina transportérů těchto kyselin není známa, v *Arabidopsis* byl identifikován transportér pro SA v membráně plastidu EDS5. Kyselina benzoová vzniká neoxidativními cestami v cytosolu a β -oxidací v peroxisomu (Widhalm & Dudareva, 2015). Benzoové kyseliny mohou být v cytoplasmě modifikovány. Modifikace regulují množství aktivního hormonu SA v cytoplasmě, upravují vlastnosti benzoových kyselin jako je těkavost, stabilita nebo biologická aktivita. Biologická aktivita SA a ostatních benzoových kyselin je modifikacemi obvykle utlumena, proto mají tyto deriváty zpravidla funkci uskladňovací (Dempsey & Klessig, 2017). Opačně tomu je u modifikace koenzymem A, která typicky vede ke zvýšení reaktivity cílové molekuly. Konkrétní význam modifikací však není objasněn, např. není známo, proč v rostlinách dochází k sulfonaci. Mezi nejčastější modifikace benzoových kyselin patří modifikace glykosylací, methylací, konjugací s aminokyselinami, hydroxylací, sulfatací nebo aktivací CoA. Výše zmiňovaným modifikacím podléhá nejen samotná BA, ale také řada jejich derivátů zahrnující SA, kyselinu anthranilovou nebo 3-hydroxybenzoovou (Wildermuth, 2006).

2.2.1. Glykosylace

Účel glykosylace benzoových kyselin v rostlinách není dosud plně definován. Pravděpodobně slouží k zvýšení rozpustnosti benzoových kyselin, aby mohly být následně transportovány k uskladnění do vakuol. Dále glykosylace omezuje volnou difúzi benzoových kyselin přes membrány, zpřístupňuje molekuly transportérům, které rozpoznávají glykosylované molekuly, nebo je glykosylací snižována toxicita BA a SA (Bowles & Lim, 2010). Glykosylovaná SA, spolu s nemoifikovanou SA, byla detekována zejména při abiotickém a biotickém stresu rostliny, kdy se celkové množství SA v rostlině zvyšuje až 10-krát (Wildermuth et al., 2006). Benzoové kyseliny mohou být glykosylovány do různých poloh. UDP-glukosyltransferázou může být BA modifikována připojením glukózy na karboxylový kyslík za vzniku glukosylesteru kyseliny benzoové

(BAE). Tento metabolit byl identifikován např. v tabáku (Lee & Raskin, 1999). Stejně tak může být SA glykosylována UDP-glukosyltransferázou za vzniku glukosylesteru kyseliny salicylové (SGE) (Obr. 7). Může také dojít ke konjugaci glukózy na hydroxy skupinu SA za vzniku glukosidu SA (SAG) (Obr. 7). I tuto reakci katalyzuje UDP-glukosyltransferáza (UGT) (Dean & Delaney, 2008). V rostlinách se nachází velké množství enzymů patřících do skupiny UGT, např. *Arabidopsis* má UGT celkem 107 (Wildermuth, 2006). V *Arabidopsis* katalyzují vznik SAG hned dva UGT enzymy kódované geny UGT74F1 a UGT74F2, kde enzym kódovaný genem UGT74F2 katalyzuje také esterifikaci SA na SGE. Oba enzymy se uplatňují také při konjugaci glukózy s dalšími deriváty benzoových kyselin jako jsou kyselina anthranilová nebo methylsalicylát (MeSA) (Dean & Delaney, 2008).

Při syntéze SA indukované reakcí rostliny na patogen je potřeba nadbytek SA uschovat a inaktivovat, protože volná SA má fytotoxický účinek. V tomto případě je SA glykosylována a transportována ve formě SAG z cytoplazmy do vakuol (Dean et al., 2005). Glykosylace propůjčuje SA hydrofilitu, stabilitu, bioaktivitu a určuje rozmístění SA v rostlinné buňce na základě transportu SAG do vakuol (Bowles et al., 2005). V případě potřeby může být SAG hydrolyzována za uvolnění aktivní molekuly SA a glukózy (Dean et al., 2005). Přesný mechanismus hydrolyzy SAG v rostlinách není dosud znám (Dempsey et al., 2011). Jak bylo zjištěno u *Arabidopsis*, SAG je pro dlouhodobější uskladnění převážně transportován do vakuol, zatímco SGE zůstává volně v cytoplasmě. V případě potřeby SA je SGE rychlejším zdrojem než SAG, jelikož hydrolyza SA z konjugátu probíhá v cytoplasmě (Vaca et al., 2017).



Obr. 7 Glukosid SA (SAG), glukosylester SA (SGE), metyl salicylát (MeSA), metylsalicylát glukosid (MeSAG); převzato z Vincente & Plasencia, 2011

Další glykosylovanou benzoovou kyselinou v rostlinách je kyselina gallová, která může být konjugovaná s glukózou za vzniku β -glukogallinu. β -glukogallin je glukosylester kyseliny gallové. K této reakci dochází za účasti UGT v prvním kroku biosyntézy gallotaninů a ellagitaniinů (Niemetz & Gross, 2005).

2.2.2. Methylace

Methylaci benzoových kyselin u *Arabidopsis* zprostředkovávají BA/SA karboxyl methyltransferázy 1, které patří do rodiny enzymů SABATH. Methylovou skupinu transferují z koenzymu S-adenosyl-L-methionu na karboxyl BA nebo SA za vzniku methylesterů, tj. methylbenzoátu (MeBA) a methylsalicylátu (MeSA) (Obr. 7). Methylován může být také SAG za vzniku methylsalicylát glukosidu (MeSAG). Methylestery jsou oproti samotným benzoovým kyselinám těkavé. Rostliny využívají těkavých vlastností methylesterů (např. MeBA, MeSA), produkují je zejména v květech, které díky methylesterům specificky voní a lákají opylovače (Wildermuth, 2006). Nicméně také v listech dochází k syntéze MeSA, a to za účelem spuštění obranné reakce při napadení rostliny. Obranná reakce spočívá v lákání predátorů, kteří zbaví rostlinu parazitů či býložravců. Tato kooperace rostliny, parazita či býložravce a predátora se nazývá tritrofická interakce (Dempsey & Klessig, 2012). Rostlina může např. reagovat na napadení housenkami, konkrétně na její slinné sekrety, které se při okusování listů dostávají do rostlinné tkáně a jsou signálem pro obrannou reakci. Dojde k syntéze MeSA, který se díky své volatilitě dostává do ovzduší a láká potenciální predátory housenky (Taiz & Zeiger, 2010)

MeSA přispívá ke spouštění systémové získané odolnosti (SAR, Systemic Acquired Resistance) při napadení rostliny mikrobiálními patogeny (Park et al., 2007). MeSA také pravděpodobně reguluje, jestli se při odpovědi na stresový podnět uplatní SA nebo kyselina jasmonová (JA) (Robert-Seilaniantz et al., 2011), jelikož JA a SA se uplatňují při rozdílných typech stresů a vůči sobě působí antagonisticky (Dempsey & Klessig, 2017).

Dále MeSA umožňuje meziorostlinnou komunikaci vzduchem. Mechanismus byl prokázán exogenní aplikací MeSA značeného radioaktivním izotopem uhlíku [¹⁴C] na rostlinu tabáku. MeSA se vzdušnou cestou dostal do rostliny, ve které hydrolyzoval na [¹⁴C]SA (Shulaev et al., 1997). Pomocí MeSA tak mohou rostliny napadené patogenem transportovat SA do nenapadených rostlin a vyvolat v nich SAR ještě před napadením patogenem (Park et al., 2007). Hydrolyza MeSA na SA je v rostlinách umožněna enzymy s esterasovou aktivitou SABP2 (SA Binding Protein 2) (Kumar, 2014). Mechanismus transportu MeSA mezi rostlinami je znázorněn na obrázku 13 v kapitole 2.4.2.

2.2.3. Sulfatace

Sulfatované aromatické kyseliny byly objeveny v řase *Dasycladus vermicularis* (Obr. 8) z čeledi *Dasycladaceae* a u čeledi mořských tav *Zosteraceae*, konkrétně u druhu *Zostera marina* (Obr. 9) (Kurth et al., 2015). U savců je známá sulfatace neurotransmiterů a hormonů (thyroidní hormony, estrogenery). Sulfatací se tyto molekuly aktivují nebo deaktivují, dále dochází ke snížení toxicity

nebo zvýšení rozpustnosti a hydrofilicity hydrofobních molekul (Gidda et al., 2003). U *Arabidopsis* existují sulfatované deriváty fytohormonů (JA, MeJA, brassinosteroidy) a dalších sekundárních metabolitů (např. flavonoidy, glukosinoláty) (Baek et al., 2010). Za sulfataci jsou zodpovědné sulfotransferázy (SOT), které transferují sulfátové skupiny z donoru, což je nejčastěji 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát, na hydroxy nebo amino skupiny molekul (Paul et al., 2012). Sulfatované benzoové kyseliny v rostlinách nejsou dobře prozkoumané. U *Arabidopsis* bylo zjištěno, že dochází k sulfataci hydroxy skupiny SA, konkrétně enzymem SOT12, za vzniku kyseliny 2-(sulfooxy)benzoové. SOT12 sulfatuje v rostlinách také brassinosteroidy. Enzym je pravděpodobně exprimován při salinním stresu nebo při biosyntéze kyseliny abscisové při klíčení. Při sulfataci SA v rostlině *Arabidopsis* dochází k biosyntéze volné SA a zvyšování hladiny koncentrace SA za účelem zvýšení rezistence rostliny (Baek et al., 2010).



Obr. 8 *Dasycladus vermicularis*, záliv Pagasitikos, Řecko; zdroj: <http://www.projectnoah.org/spottings/2005286002>

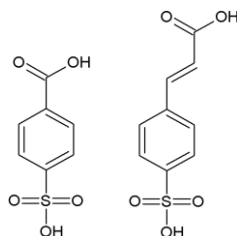


Obr. 9 *Zostera marina*, Ostrovní moře, jihozápadní Finsko; zdroj: <https://www.nature.com/articles/nature16548/figures/1>

Sulfatované benzoové kyseliny jsou spíše rozšířené u mořských organismů z říše řas. V mořské trávě *Zostera marina* byla objevena kyselina 4-(sulfooxy)*trans*-skořicová (Obr. 10), která se též triviálně nazývá kyselina zosterová. V řase *Dasycladus vermicularis* byla objevena 4-(sulfooxy)benzoová (Obr. 10) (Kurth et al., 2015). U této řasy je znám také metabolit trihydroxykumarin, jehož sulfonylovaná forma je využita pro skladování (Welling et al., 2011).

Kyselina zosterová se díky svým vlastnostem v nedávné době stala předmětem vědeckého zájmu. Bylo zjištěno že dobře likviduje a inhibuje vrstvu biofilmu, především inhibuje růst bakterií (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*) a hub (*Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*) (Villa et al., 2010). Dále bylo zjištěno že účinně odstraňuje biofilmovou vrstvu (drobní korýši, bakterie, řasy apod.) na lodích, čehož může být využito při ošetřování povrchu lodí, které jsou kolonizací ponořeného

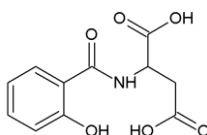
povrchu lodi poškozovány. Kyselina zosterová je tedy vhodná pro inhibici množení a růstu mikroorganismů a dalších drobných organismů. Avšak bylo zjištěno, že účinnější antimikrobiální a „protibiofilmovou“ aktivitu má funkční hydroxy derivát kyseliny zosterové - kyselina kumarová (Kurth et al., 2015).



Obr. 10 Zleva kyseliny 4-(sulfooxy)benzoová a zosterová

2.2.4. Konjugace s aminokyselinami

Konjugace benzoových kyselin s aminokyselinami u rostlin není příliš prozkoumaná. U některých rostlinných druhů (např. hroznové víno, fazole, *Arabidopsis*) byl detekován salicyloyl-L-aspartát (Obr. 11), jehož přesný účinek není definován. Protein umožňující konjugaci Asp a SA je GH3.5 (Zhang et al., 2007). Byla objevena také aktivita PBS3 proteinu, který konjuguje aminokyseliny na benzoové kyseliny substituované na 4. uhlíku, např. *p*HBA, *p*ABA (Okrent et al., 2009).



Obr. 11 Salicyloyl-L-aspartát

Více toho víme o konjugaci aminokyselin s fytohormony JA a IAA, kdy mají oba konjugáty odlišné funkce. Konjugát isoleucin s JA hormon aktivuje (Suza et al., 2010). Naopak konjugace IAA s více druhy aminokyselin tento auxin inaktivuje (Woodward & Bartel., 2005).

2.2.5. Hydroxylace

SA může být hydroxylovaná na třetím nebo pátém uhlíku. U *Arabidopsis* k reakcím dochází zejména při infekci patogenem. Rostlina na infekci reaguje tvorbou kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové (2,3-DHBA), v menším množství se tvoří též kyselina

2,5-dihydroxybenzoová (gentisová). Transformace SA na 2,3-DHBA je katalyzována enzymem SA 3-hydroxylasou (S3H), tato reakce je pro rostlinu důležitá pro udržování normální hladiny koncentrace SA v cytosolu, což bylo zjištěno při experimentu s *s3h* mutantními rostlinami, ve kterých byla koncentrace SA v cytosolu nepřiměřeně vysoká (Zhang et al., 2013).

2.3. Výskyt benzoových kyselin a jejich derivátů

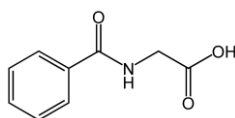
V rostlinách je z benzoových kyselin nejrozšířenější a klíčovou molekulou SA, fytohormon uplatňující se při abiotickém a biotickém stresu. Nachází se v nesčetném množství rostlinných druhů. Např. deriváty MeSA a MeBA byly detekovány v květech u více než 30 čeledí (Wildermuth, 2006). Zajímavým příkladem jsou kyseliny gallová a gentisová, které se spolu nachází v rostlině citlivka stydlivá (*Mimosa pudica*). Koncentrují se buňkách pulvinisu v oblasti řapíku listu a ovlivňují turgor, který při změně podněcené např. dotykem, větrem nebo deštěm spouští seismonastické pohyby listů citlivky (Macholán, 2003). Kyselina gallová se v rostlinách též často vyskytuje v polymerní formě hydrolyzovatelných taninů (Ossipov et al., 2003). Hydrolyzovatelné taniny jsou obsaženy v čaji, víně, kávě a řadě dalších přírodních produktů a způsobují trpkou chuť (Velíšek & Hajšlová, 2009, I). Další deriváty BA, které se v konkrétních rostlinných druzích vyskytují ve značné koncentraci, jsou zaznamenány v tabulce 2.

Tab. 2 Příklady rostlinných druhů obsahující vybrané deriváty benzoových kyselin (zdroj: Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases)

Kyselina	Rostlinný druh, popř. orgán
benzoová	sturač (<i>Styrax sp.</i>) - pryskyřice benzoe; pivoňka čínská (<i>Paeonia lactiflora</i>) – kořen; brusinka velkoplodá (<i>Vaccinium macrocarpon</i>); jabloň domácí (<i>Malus domestica</i>)
para-hydroxy-benzoová	jalovec obecný (<i>Juniperus communis</i>); vanilka pravá (<i>Vanilla planifolia</i>) – plod; tis červený (<i>Taxus baccata</i>); koriandr setý (<i>Coriandrum sativum</i>)
salicylová	lékořice lysá (<i>Glycyrrhiza glabra</i>) - oddenek a kořen; pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>) - obilná zrna; zlatobýl obrovský (<i>Solidago gigantea</i>); tis červený (<i>Taxus baccata</i>) - list
gentisová	heřmánek pravý (<i>Matricaria chamomilla</i>); pelyněk estragon (<i>Artemisia dracuncululus</i>); křen selský (<i>Armoracia rusticana</i>) – kořen; šalvěj (<i>Salvia sp.</i>) - semínka
skořicová	skořice cejlonská (<i>Cinnamomum verum</i>) – kůra; ambroň západní (Liquidambar styraciflua) - pryskyřice, exudát; vavřín vznešený (<i>Laurus nobilis</i>); aloe vera
kumarová	pomerančovník čínský (<i>Citrus sinensis</i>) – plody; levandule lékařská (<i>Lavandula angustifolia</i>); jabloň domácí (<i>Malus domestica</i>)
sinapová	slunečnice roční (<i>Helianthus annuus</i>) – semínka; bazalka posvátná (<i>Ocimum tenuiflorum</i>); ořešák vlašský (<i>Juglans regia</i>) - ořechová skořápka

Benzoové kyseliny jsou využívány též bakteriemi pro biosyntézu sideroforů, látek vážících železo. Např. SA a 2,3-DHBA jsou prekurzory pro výrobu sideroforu phyochelinu v bakterii *Pseudomonas aeruginosa* nebo enterobactinu v druhu *Escherichia coli* (Serino et al., 1995; Gehring et al., 1997).

Lidský organismus a organismy živočišné říše nedokáží syntetizovat aromatický kruh, tudíž nesyntetizují ani benzoové kyseliny (Macholán, 2003). Benzoové kyseliny a další fenolické látky přijímané v potravě se v organismu transformují na kyselinu hippurovou (konjugát BA s glycinem), která je vylučována močí (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00714>).



Obr. 12 Kyselina hippurová

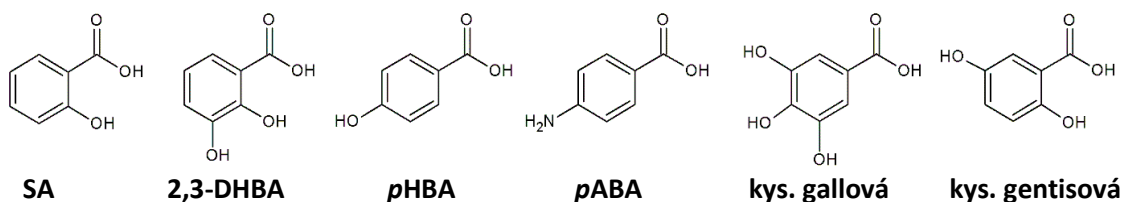
2.3.1. Oves setý

Oves setý (*Avena sativa*) byl vybrán jako modelová rostlina a zástupce jednoděložných rostlin pro experimentální část, kdy na ovsu byla zkoumána biosyntéza a metabolismu benzoových a skořicových kyselin. Oves setý je jednoděložná (*Monocotyledonae*), jednoletá rostlina z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) a ze skupiny tráv *Gramineae*. Oves má 60 až 150 cm vysoká stébla, ploché čepele listů, květenství lata s typem květů dvoukvěte klásky, které jsou sevřeny v plevách s pluchou. Roste hojně v polohách mírného pásma. Oves patří mezi obilniny a zároveň píce. Ovesné vločky jsou získávány drcením obilky ovsa. V minulosti se z ovsa také vyráběl alkohol, pivo (např. v Belgii) nebo se z ovsa dokonce mlela mouka (Tříška, 1979). V současnosti je každý rok sklizeno průměrně 23 mil. tun ovsa ročně. Největší výnosy sklizně ovsa byly zaznamenány v severní Evropě (Boczkowska et al., 2016). Z výživového hlediska oves obsahuje především škrob, cukry, dextriny, mnoho vlákniny (0,8-2,6%) a lipidů (2-12 %), kterých je až trojnásobné množství oproti jiným obilninám (např. pšenici), a bílkovin s mnoha esenciálními aminokyselinami, ze kterých je nejbohatší z obilnin na beta-glukany, které jsou součástí vlákniny, ve struktuře obsahují lineární nerozvětvené řetězce polysacharidů, a mají vlastnost dobře absorbovat tekutiny (Gajdošová & Šturdík, 2004; ASP et al., 1999, Tříška, 1979). Vláknina má proto dobrý vliv na trávení a působí preventivně proti střevním onemocněním (Vojtaššáková et al., 1999). Při konzumaci ovesných výrobků je snižován obsah cholesterolu v krvi. Oves je také vhodná potravina pro diabetiky, pro osoby trpící problémy s trávením, s žaludkem, se zapálenými žálky nebo pro některé pacienty

s chudokrevností (Åman & Graham, 1986; Davidson, 1999). Z hlediska obsahu fenolických kyselin byly v ovsu detekovány např. kyseliny vanilová, 2,4-dihydroxybenzoová, *para*-kumarová, ferulová, skořicová, syringová, *ortho*-kumarová nebo syringaldehyd. Vyskytují se jak volně, tak konjugované s dalšími látkami (Multari et al., 2018). Fenolické kyseliny mají stejně jako ostatní fenolické látky silnou antioxidační aktivitu, a tím pádem mohou v lidském organismu působit protektivně proti oxidaci DNA, proteinů nebo membránových lipidů v buňkách (Yu et al., 2002).

2.4. Zástupci benzoových kyselin

Benzoové kyseliny patří do skupiny sekundárních metabolitů - fenolických látek. Jsou to látky obsahující karboxylovou skupinu navázanou na šestiuhlíkatý aromatický kruh. Mohou být substituovány hydroxy-, amino-, methoxy- nebo metylovými funkčními skupinami. Mezi benzoové kyseliny patří BA, SA, 2,3-DHBA, *p*HBA, *p*ABA, kyselina gentisová nebo gallová (Obr. 12). Benzoové kyseliny mohou být modifikovány za vzniku jejich derivátů, např. glukosidů, glukosinolátů, glukosylesterů, methylesterů nebo konjugátů s aminokyselinami. Metabolity biosynteticky odvozené od benzoových kyselin, které již ve struktuře přímo neobsahují skelet kyseliny benzoové, zahrnují např. vitamín B9 (kyselina listová), ubichinon, fenylypropanoidy (kyselina skořicová, *ortho*-kumarová, kávová, chlorogenová), aromatické aminokyseliny (Tyr, Phe, Trp), *meta*-tropolin, gallotaniny, ellagitaniny a mnoho dalších látek (Widhalm & Dudareva, 2015).



Obr. 13 Zástupci benzoových kyselin

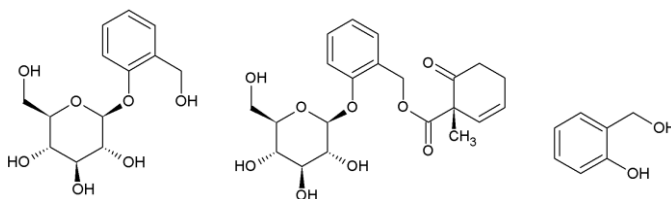
2.4.1. Kyselina benzoová

BA, sumárním vzorcem C_6H_5COOH , je bezbarvá krystalická látka rozpustná ve vodě. Monoizotopická molekulární hmotnost BA je 122.0368 Da. Je nejjednodušší aromatickou karboxylovou kyselinou. Soli BA se využívají pro konzervaci potravin, jelikož BA má dobré fungicidní vlastnosti. V lidském organismu BA reaguje s glycinem za vzniku kyseliny hippurové nacházející se v moči, která má podobně jako BA baktericidní efekt (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00714>; Del Olmo et al., 2017). V přírodě se BA vyskytuje volně nebo také ve formě esterů s glukosou. Většina benzoových kyselin v rostlinách existuje

převážně ve formě esterů, např. estery kyseliny gallové v hydrolyzovatelných taninech (Ossipov et al., 2003). Redukční produktem BA je benzaldehyd (C_6H_5CHO). Má charakteristický zápach po hořkých mandlích. Je bezbarvý až nažloutlý, rozpustný ve vodě. Využíván je hlavně v průmyslu při výrobě anilinových barev, parfémů, kosmetiky a farmaceutických přípravků. Snadno prostupuje kůží, plícemi a distribuje se v organismu, nicméně se v něm nekumuluje, je metabolizován na BA a vyloučen močí (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Dalšími deriváty BA mohou být benzyl alkohol, amidy, chloridy, anhydridy nebo parabeny (Del Olmo et al., 2017).

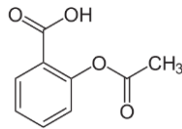
2.4.2. Kyselina salicylová

SA, strukturně kyselina 2-hydroxybenzoová, je fenolická látka a hydroxy derivát BA. Je syntetizovaná rostlinami, kde plní funkci fytohormonu. SA ovlivňuje celou řadu fyziologických procesů zahrnující růst, vývoj, kvetení, fotosyntézu, transpiraci, produkci ethylenu, senescenci, rezistenci rostliny vůči patogenům a odpověď na abiotické stresové faktory, jako jsou chlad, sucho, působení ozonu nebo UV záření (Vlot et al., 2009). Jakožto základní signální molekula se SA vyskytuje ve většině známých rostlin, avšak v různých koncentracích závislých na rostlinném druhu, zkoumaném orgánu i environmentálních podmínkách. Mechanismy, kterými rostlina reguluje aktivitu volné SA, jsou esterifikace a glykosylace, popř. některé další modifikace. Kromě SAG, SGE, MeSA a MeSAG jsou zajímavými, dosud nezmíněnými, přírodními deriváty SA salicin, salicortin a saligenin (salicyl alkohol) (Obr. 14). Spolu s SA se nachází zejména ve vrbě (*Salix sp.*) a topolu (*Populus sp.*) (Dempsey & Klessig, 2017; Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases). Salicin a salicortin jsou deriváty glukózy. Saligenin je často součástí salicinu.



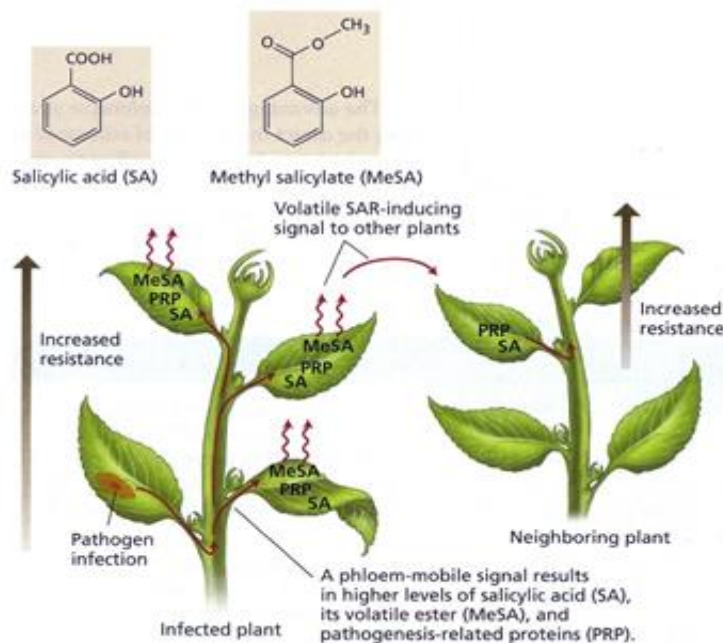
Obr. 14 Zleva salicin, salicortin a saligenin

V současnosti se v medicíně nejčastěji používá derivát SA, kyselina acetylsalicylová (aspirin) (Obr. 15), která působí jako antipyretikum (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Významné medicínské účinky má ale i samotná SA, používá se k léčbě kožních nemocí a bradavic. SA se využívá také v kosmetice v přípravcích na vlasy a pokožku (<https://www.drugbank.ca>). Léčivé účinky SA na lidský organismus jsou zkoumány již stovky let, zatímco její efekt na fyziologii rostlin byl objeven relativně nedávno.



Obr. 15 Kyselina acetylsalicylová

SA v rostlině indukuje systémovou získanou odolnost (SAR) indukovanou mikrobiálními patogeny. Nejprve dochází k lokální obraně proti patogenu, v místě napadení se syntetizuje a akumuluje SA. SA je posléze methylovaná a ve formě MeSA se šíří floémem i do vzdálených lisů a částí rostliny, kde zatím nedošlo k napadení, a zde spouští obranné reakce ještě před případným napadením dané části rostliny. Díky své těkavosti se MeSA vzduchem šíří i do sousedních rostlin, kde spouští obranné reakce. Výsledkem je zvýšení koncentrace SA a systémové odolnosti i v sousedních rostlinách. Tento mechanismus SAR byl popsán v tabáku, jak lze vidět na obrázku 13 (Park et al., 2007). Při SAR se dále exprimují PR geny (Pathogen Related) za syntézy PR proteinů přispívajících k rezistenci rostlin proti patogenu (Taiz & Zeigler, 2010). Dochází také k biosyntéze JA, která má většinou oproti SA antagonistické účinky. SA obvykle zodpovídá zaobranu vůči biotrofním patogenům, zatímco JA reguluje obranu vůči nekrotrofním patogenům a hmyzu (Dempsey et al., 2017). Jedním z regulátorů, který rozhoduje, jaký hormon bude při konkrétním stresu napadením patogenu využit, je pravděpodobně MeSA. Přesný mechanismus tohoto děje však není jasný (Robert-Seilaniantz et al., 2011).



Obr. 16 Mechanismus zvyšování rezistence rostlin při napadení patogeny, syntéza PRP, SA a MeSA a mezirostlinná komunikace přes MeSA; převzato z Taiz & Zeigler, 2010

2.4.3. Kyselina *para*-hydroxybenzoová

Dalším isomerem hydroxy derivátů BA je kyselina *para*-hydroxybenzoová (pHBA). Jejím hlavním zdrojem v rostlinách je reakce zkracování postranního řetězce kyseliny *para*-kumarové. Známé a průmyslově využívané deriváty pHBA jsou alkylestery neboli parabeny. Parabeny mají antimikrobiální vlastnosti a používají se jako aditiva s konzervačními účinky. S délkou jejich alkylového řetězce roste antimikrobiální účinnost a klesá rozpustnost parabenu ve vodě (Velíšek & Hajšlová, 2009 II.). pHBA je zapojena do biosyntézy ubiquinonu, kterému poskytuje své benzenové jádro (Block et al., 2014; Tohge et al., 2014). Ubichinon neboli koenzym Q10 je kofaktorem v dýchacím řetězci. pHBA slouží jako prekurzor také pro biosyntézu šikoninu, u kterého byla zjištěna protinádorová aktivita a schopnost inhibovat HIV virus (Gaisser & Heide, 1996; Chen et al., 2011).

2.4.4. Kyselina gentisová

Kyselina gentisová je dihydroxy derivát BA (2,5-DHBA). V lidském organismu vzniká degradací aspirinu a SA v ledvinách. Má protizánětlivé, antirevmatické a antioxidační vlastnosti (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000152>). V rostlinách vzniká 2,5-DHBA hydroxylací SA (Dean & Delaney, 2008). 2,5-DHBA lze též syntetizovat uměle karboxylací hydrochinonu (Hudnall, 2000 Hydroquinone. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry). 2,5-DHBA je využívána v hmotnostní spektrometrii při ionizaci pomocí MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation = matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace), kde slouží jako matrice pro vzorek. Kromě tohoto derivátu BA se používají jako matrice i deriváty skořicových kyselin, např. kyselina sinapová (Manz et al., 2015).

2.4.5. Kyselina skořicová

Kyselina skořicová ($C_6H_5CH=CHCOOH$) je bílá krystalická látka mírně rozpustná ve vodě. Její monoizotopická molekulová hmotnost je 148.0524 Da. Existuje ve formě *trans* a *cis* isomerů, v přírodě je běžný *trans* isomer. tCA patří do skupiny fenyylpropanoidů. tCA je spolu se svým derivátem *trans*-cinnamaldehydem přítomna hlavně ve skořicovníku (*Cinnamomum sp.*). Obě látky jsou složkou esenciálního oleje získávaného z kůry skořicovníku. *Trans*-cinnamaldehyd je viskózní kapalina žluté barvy a je nositelem specifické skořicové vůně. Dále se tCA vyskytuje např. v brusinkách (Velíšek & Hajšlová, 2009, I.). V přírodních produktech se tCA velmi často vyskytuje ve formě esterů s glukosou.

2.4.6. Kyseliny kumarové

Kyseliny *para*-kumarová, *ortho*-kumarová a *meta*-kumarová jsou isomery a hydroxy deriváty tCA. V přírodě je nejrozšířenější kyselina *para*-kumarová, běžně se vyskytující v rostlinách a jejich plodech. Kyselina *ortho*-kumarová tvoří základ struktury kumarinů, kterých v přírodě existuje přes 1000 druhů (Velíšek & Hajšlová, 2009, II.).

2.5. Metabolomika

Metabolomika je jedním z „-omics“ přístupů studia organismů. Zkoumá celkový metabolom, soubor všech metabolitů účastnících se metabolických drah na úrovni buněk, tkání nebo organismů. Metabolity jsou charakterizovány nízkou molekulární hmotností, která je většinou menší než 1 kDa. Látky s velkou molekulovou hmotností, což jsou zejména proteiny, už jsou předmětem studia proteomiky nebo dalších „-omics“ technologií. Stanovení metabolitů má informační hodnotu vypovídající o expresi genomu a o stimulech z vnějšího prostředí působící na buňky. Metabolomika tedy odráží aktuální stav buňky (Musilová & Glatz, 2011). Celkový metabolom dosud nebyl definován u žádného z organismů, oproti tomu např. v genomice byl kompletně identifikován genom již mnoha organismů (Viant et al., 2017).

Metabolity nacházející se v intracelulárním prostředí zkoumá endometabolomika, jejich rychlou analýzou bez potřeby identifikace metabolitů je „fingerprinting“ (otisk prstu). Metabolity v extracelulárním prostředí se zabývá exometabolomika, a jejich kompletní analýzou bez identifikace metabolitů je „footprinting“ (otisk nohy). Identifikaci a kvantifikaci metabolitů, popř. jejich zapojení do společné metabolické dráhy, zahrnuje metoda „Metabolite profiling“ (profilování metabolitů) (Musilová & Glatz, 2011). Mezi identifikační metody využívané v metabolomice patří ^1H - nebo ^{13}C -nukleární magnetická rezonance, plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry), vysokoúčinná kapalinová chromatografie s MS (HPLC-MS, High Performance Liquid Chromatography-MS), kapilární elektroforéza s MS, MS s přímou infuzí vzorku do iontového zdroje, Ramanova spektrometrie nebo infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací. Metody analýzy metabolomu můžeme podle přístupů rozdělit na cílenou a necílenou analýzu (Roberts et al., 2013).

2.5.1. Cílená a necílená analýza

Cílenou analýzou rozumíme kvalitativní a kvantitativní analýzu chemicky a strukturně charakterizovaného metabolitu (Roberts et al., 2013). Vybranou skupinu metabolitů je třeba ze vzorku co nejlépe separovat. Mnoho metabolických informací o vzorku je tak z analýzy

vyřazeno. Necílená analýza je naopak analýza celého metabolomu v komplexním vzorku. Necílená analýza tak může sloužit jako metoda objektivního výzkumu. (Internetový článek: Targeting the untergeted, <https://theanalyticalscientist.com/issues/0614/targeting-the-untargeted/>).

Při necílené analýze metabolomu je navržen experiment, připraven vzorek, z kterého jsou metabolity vhodnou metodou extrahovány, a následně je vzorek podle svého charakteru separován. Metabolity jsou většinou semipolárního charakteru, proto je vhodná HPLC na reverzní fázi. Měření separovaných analytů probíhá nejčastěji v hmotnostním spektrometru. Získávány jsou hrubá data, která je potřeba zpracovat a vyhodnotit. MS/MS spektra a data z chromatogramu mohou být zpracována pomocí programových nástrojů, existují např. MetAlign, MZmine nebo XCMS, které umožňují rozpoznání signálů, jejich separaci od pozadí a kvantifikaci (Commisso et al., 2013). Často je nutné využít chemometrické techniky zahrnující vícerozměrnou analýzu pro redukci velkého objemu získaných dat na menší podskupiny (Roberts at al., 2013). Změřený signál, tzv. feature, může být porovnán se spektry a daty z databází jako jsou MassBank, Metlin nebo MS2T (Commisso et al., 2013). Tyto databáze obsahují experimentálně změřená data nebo počítačově generované *in silico* knihovny spekter (Roberts at al., 2013). Cílem je feature/metabolit identifikovat nebo anotovat. Vlivem velké diverzity metabolomu se může jednat o látku neznámou, kterou lze identifikovat pouze po její izolaci v dostatečném množství. Pro identifikaci metabolitů byly zavedeny čtyři úrovně (The Metabolomics Society <http://metabolomicsociety.org>; Summer et al., 2007):

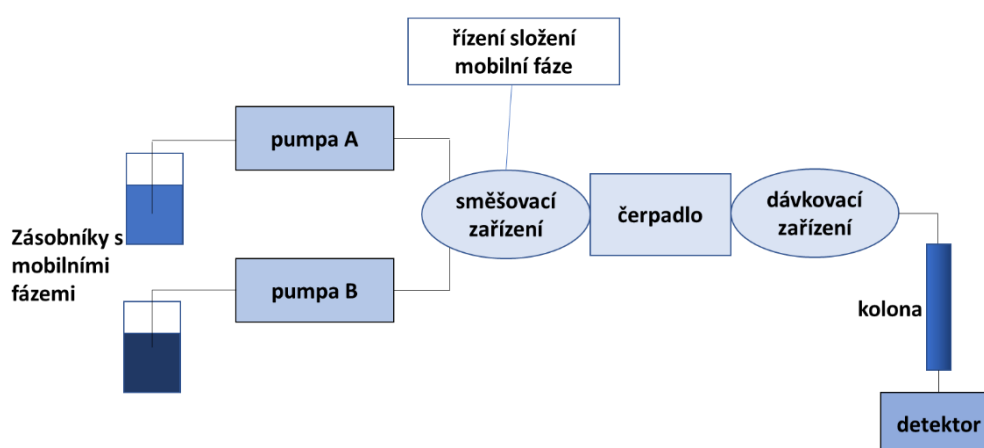
- 1) Identifikace (Identification)
- 2) Předběžná identifikace (anotace) látky (Putatively annotated compounds) - pro látky nejsou standardy pro srovnání, anotace je založená na fyzikálně-chemických vlastnostech, a na podobnosti spekter s podobnými látkami z databází;
- 3) Předběžná charakterizace strukturních skupin (Putatively characterized compound classes) - založeno na charakteristických fyzikálně-chemických vlastnostech nebo na spektrální podobnosti se známými látkami z databází;
- 4) Neznámé látky (Unknown compounds) – známý může být sumární vzorec.

Pro identifikaci metabolitu ve vzorku je potřeba porovnání s autentickým standardem, kdy standard a analyzovaný metabolit se musí ve dvou nezávislých/orthogonálních veličinách, získaných za stejných experimentálních podmínek. Nezávislými veličinami míněny např. hmotnostní spektra a retenční čas nebo NMR spektra a retenční čas. Dodatečná data jako jsou selektivní extrakce rozpouštědlem, spektrum fotodiodového pole, přesná hmota, infračervené spektrum nebo isotopické značení poskytují důkaz k identifikaci metabolitu a často jsou také nutná pro určení stereo konfigurací sloučenin (Summer at al., 2007).

2.5.2. Princip LC-MS

Běžně využívanou separační technikou pro necílenou i cílenou analýzu je kapalinová chromatografie (LC). Analyzovaný vzorek je nutné převést do roztoku s kapalnou mobilní fází, která je pumpována skrz pevnou stacionární fázi v koloně. Jedna fáze je obvykle hydrofobní a druhá hydrofilní. Díky rozdílné polaritě analytů ve směsi dochází k různě silným interakcím analytů se stacionární fází. Analyty jsou stacionární fází v koloně zadržovány a z kolony jsou eluovány ve specifickém retenčním čase. Komponenty směsi a jejich intenzity jsou detekovány na detektoru v čase a zaznamenány v chromatogramu (Manz et al., 2015). Pro lepší účinnost je dnes využívána HPLC nebo ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC).

Existují dva módy LC, normální a na reverzní fázi. U normální chromatografie jsou kolony plněny hydrofilními, polárními materiály (např. křemičité částice) a mobilní fáze je nepolární (např. hexan). LC na reverzní fázi (RP-LC) má naopak kolony plněné hydrofobními materiály a mobilní fáze je polární (např. směs vody, acetonitrilu a methanolu). RP kolony bývají plněny částicemi s navázanými uhlovodíkovými řetězci o různé délce (např. C18 - oktadecyl silan; C8 – oktyl silan), velikost částic je obvykle 3,5-5 μm . RP-LC je při metabolické analýze často využívanou technikou pro separaci, jelikož se metabolity díky své polární a netěkavé povaze dobře rozpouští v polární mobilní fázi a v koloně jsou poté zadržovány podle interakcí s hydrofobní stacionární fází (Manz et al., 2015). Kromě kolony je součástí LC pístové nebo membránové čerpadlo, směšovací zařízení pro mobilní fáze a dávkovací zařízení pro vzorek (Klouda, 2003). Schéma HPLC je zobrazeno na obrázku 17.

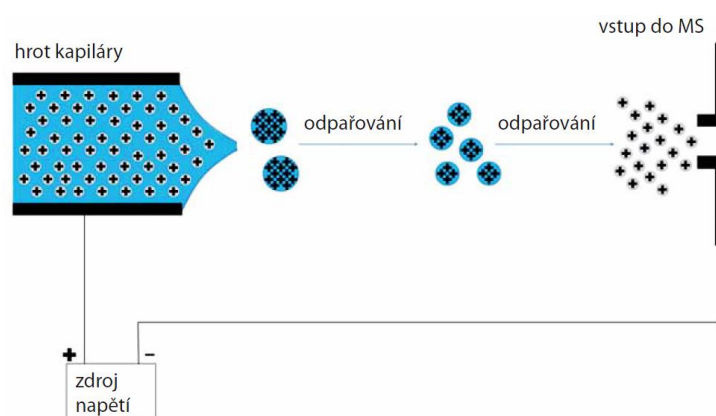


Obr. 17 Schéma HPLC, podle Manz et al., 2015 a Klouda, 2003

Separace analytů na LC kolonách je založena na různých mechanismech. Kromě RP kolon a kolon plněných polárními fázemi byly zavedeny také kolony s kationtově výměnnou fází (SCX,

Strong Cation Exchange), kolony založené na hydrofilní interakci (HILIC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) nebo kolony s elektrostaticky odpuzovanými hydrofilními interakcemi (ERLIC, Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography) (Choi, 2012). Výběr kolony ovlivňuje účinnost separace, která roste s větší délkou kolony (25-50 cm) a s menším průměrem kolony (1-2 mm) (Klouda, 2003). Detektory v LC využívají metod UV-spektroskopie, měření indexu lomu, fluorescence, elektrochemické metody a především MS (Manz et al., 2015). Při LC-MS rozlišujeme off-line separaci, kdy je možné provést zvlášť separaci a zvlášť detekci, a on-line separaci, která je přímo spojená s MS analýzou (Dvořáková et al., 2014).

Princip hmotnostní spektrometrie je založen na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Základní části hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Prvním krokem je ionizace látek v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru za vzniku molekulárních nebo aduktových iontů, popřípadě u málo stabilních látek fragmentů. Při analýze metabolomu se analyty nejčastěji ionizují elektrosprejem (ESI) (Friedecký & Lemr, 2012). Princip ESI je uveden na obrázku 18.



Obr. 18 Mechanismus elektrospreje: vznik nábojů v kapiláře vlivem vysokého napětí, odpařování kapek a zmenšování jejich povrchu vlivem odpařování rozpouštědla, uvolňování plynného nabitého vzorku, převzato z Dvořáková et al., 2014

ESI řadíme mezi měkké ionizační techniky, protože při ionizaci většiny látek nedochází k jejich fragmentaci. ESI má proti ostatním ionizačním technikám téměř univerzální využití. Pracuje za atmosférického tlaku, je vhodná pro ionizaci látek středně polárních až iontů a ionizuje velké i malé molekuly (Friedecký & Lemr, 2012). K ionizaci analytu dochází aplikací vysokého napětí (1-5 kV) mezi kapilárou a protielektrodou. Průtok mobilní fáze kapilárou je obvykle 1 - 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. V kapalině se vlivem vysokého napětí tvoří náboje. Ve výstupu kapiláry se kapalina formuje do tvaru Taylorova kužele (Obr. 18). Z vrcholu kužele se uvolňují aerosol s

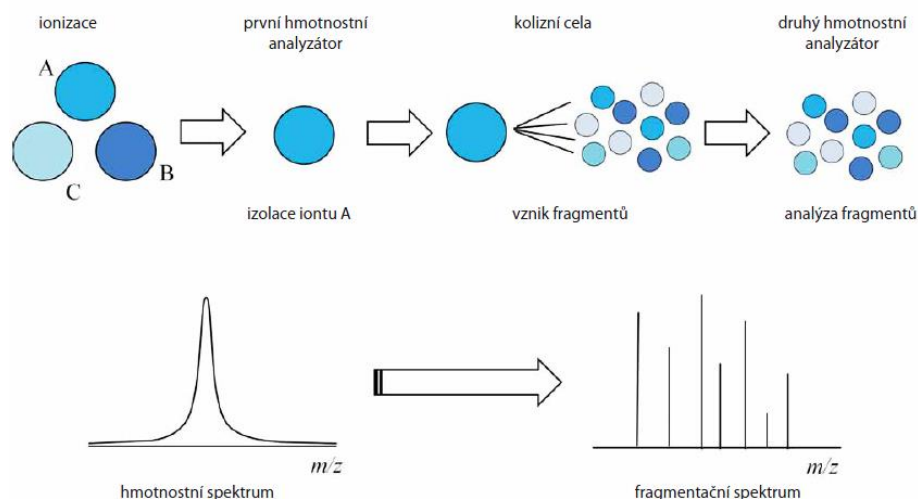
náboji, kdy se kapky postupně rozpadají na menší kapičky. Vlivem odpařování rozpouštědla se povrch kapek zmenšuje, hustota náboje a elektrického pole na povrchu se zvyšuje. Elektrosprej se tvoří při překročení povrchové hustoty náboje dané Rayleighovým limitem, kdy se nabitě kapičky se rozpadají na molekulární ionty v plynné fázi (Hoffman & Stroobant, 2007).

Pro nepolární látky je vhodnější elektronová ionizace (EI), což je tvrdá ionizační technika vedoucí k hojně fragmentaci molekul. Kombinuje se s GC-MS. Další technikou ionizace je chemická ionizace (CI), což je měkká ionizační technika a pracuje stejně jako EI ve vakuu. Při CI je ionizován reakční plyn, např. methan, amoniak, který poté reaguje s analytem za vzniku molekulárních iontů. Byla vyvinuta také CI pracující za atmosférického tlaku (APCI), kdy je primárně ionizován reakční plyn výbojovou jehlou (Hoffman & Stroobant, 2007). Mezi měkké ionizační techniky patří i MALDI, využívá se hlavně pro analýzu peptidů a proteinů. Při MALDI dochází k absorpci energie laseru matricí s analytem, desorpci matrice s analytem a ionizaci matrice, která předává náboj analytu (Friedecký & Lemr, 2012). Další ionizační techniky jsou např. bombardování rychlými atomy (FAB) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) (Manz et al., 2015).

Hmotnostní analyzátoři jsou založeny na různých fyzikálních principech, všechny však pracují za vysokého vakua. Podstatou je separace iontů podle jejich hodnoty m/z (hmotnost/náboj) (Dvořáková et al., 2014). V analyzátořích doby letu (TOF, Time Of Flight) dochází k separaci iontů při průletu dráhy mezi zdrojem a detektorem. Ionty mají každý jinou dobu letu, podle které je vypočtena hodnota m/z . Rozlišení TOF analyzátořů může být vylepšeno zařazením reflektoru (iontového zrcadla), které otáčí směr letu iontů o 180° a prodlužuje tak dráhu letu, která se projeví lepším rozlišením s užšími píky v chromatogramu. Analyzátoři lineární nebo sférická iontová past, elektrostatická iontová past (orbitrap) nebo iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) pracují na principu zachycování iontů v cele, kde jsou separovány podle rezonanční frekvence. Kvadrupól separuje a vysílá ionty o určité m/z k detektoru. Ionty se pohybují po stabilní trajektorii podélně uprostřed mezi čtyřmi tyčemi, na které je vloženo stejnosměrné nebo střídavé napětí a polarita dvou protějších tyčí se střídá s danou frekvencí. Ionty se vlivem střídání napětí pohybují po trajektorii k detektoru a ionty s nestabilní trajektorií na detektor nedoletí (Friedecký & Lemr, 2012; Dvořáková et al., 2014; Holčapek et al., 2012). Detektor může být např. elektronový násobič, který je buď ve formě sady dynod nebo kontinuálního dynodového elektronového násobiče (channeltron). V FT-ICR nebo orbitrapu jsou ionty detekovány v analyzátoři při dopadu na elektrody, kdy je indukován proud, jehož velikost je převedena Fourierovou transformací na intenzitu (Friedecký & Lemr, 2012).

Pro identifikaci molekulárních iontů v metabolické analýze jsou potřebná fragmentační MS/MS (také MS^2) spektra generovaná při tandemové MS. V tandemovém uspořádání se

kombinují alespoň dva hmotnostní analyzátory, kde na první analyzátor navazuje disociační proces způsobující fragmentaci (Hoffman & Stroobant, 2007). Uspořádání v tandemové MS jsou např. dva kvadrupóly (QqQ) nebo kvadrupól a průletový analyzátor (QqTOF) (Dvořáčková et al., 2014).



Obr. 19 Schéma tandemové hmotnostní spektrometre, převzato z Dvořáčková et al., 2014

Na obrázku 19 je zobrazeno schéma principu tandemového hmotnostního spektrometru, který může představovat např. QqTOF. V prvním hmotnostním analyzátoru je selektován jeden molekulární ion. Za prvním hmotnostním analyzátozem je zařazen další analyzátor, který je kolizní celou, kde dochází ke kolizí indukované disociaci prekurzorových iontů (Manz et al., 2015). Selektovaným prekurzorovým iontům je dodána kolizní energie (10-60 eV), což způsobí srážky urychlených iontů s kolizním plynem, nejčastěji argonem, a vznik produktových iontů, které jsou analyzovány druhým analyzátozem. Podle fragmentačních spekter pak můžeme molekulu identifikovat. Fragmentační spektrum molekuly se může lišit podle použité kolizní energie (Dvořáčková et al., 2014; Hoffman & Stroobant, 2007; Manz et al., 2015).

Produkce fragmentačních spekter je spojena s nastavením získávání dat. Sběr dat může být nastaven na DDA (Data Dependent Acquisition) nebo DIA (Data Independent Acquisition) mód. Při DDA dochází k detekci molekulárních iontů v prvním analyzátoru, poté jsou vybrané nejintenzivnější prekurzorové ionty fragmentovány. V dalším hmotnostním analyzátoru jsou detekovány produktové ionty vybraných prekurzorových iontů. Při DIA metodě jsou detekovány všechny ionty vstupujícího do hmotnostního spektrometru (Liebler, 2004).

3. Experimentální část

3.1. Rostlinný materiál

Oves setý (*Avena sativa*) - semínka (nemořená), od Seva-SEED (Olomouc, Czech republic)

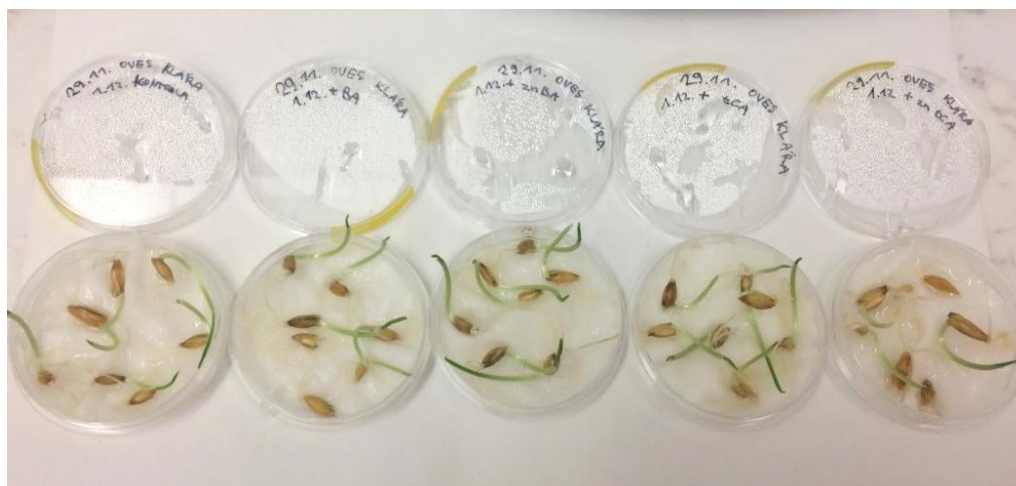
3.2. Chemikálie

Jako prekurzory byly použity kyseliny benzoová (BA), *trans*-skořicová (*t*CA) (obě Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), [2,3,4,5,6-²H₅] BA, [ring-¹³C₆] *t*CA (obě Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA) a zosterová (získaná darem od prof. dr. Rona Wevera z Van 't Hoff Institute for Molecular Sciences, Universiteit van Amsterdam). Pro přípravu mobilních fází byly použity kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ≥99,9% acetonitril pro LC-MS (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany) a ≥99,9% methanol (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany). Semenáčky byly homogenizovány kapalným dusíkem (Linde, Munich, Germany). Jako lockspray sloužil leucin-enkefalin o koncentraci 5 ng/μl (Waters, Milford, USA).

3.3. Příprava extraktů ovsu setého na UHPLC-MS

3.3.1. Pěstování a ošetření rostlin prekurzory

Semínka ovsu setého (*Avena sativa*) byla pěstována na Petriho miskách, na které byla umístěna buničina tak, aby pokrývala celý povrch misky. Na buničinu bylo rozmístěno cca 7 semínek a přidáno 10 ml kohoutkové vody. Misky přiklopené víčkem byly umístěny na denní světlo, teplota byla nastavena na 23 °C. Po 48 h byla semínka ošetřena prekurzory. Nejprve byla semínka přenesena na nové Petriho misky s buničinou a k semínkům bylo přidáno 5 ml 600 μM roztoku vybraného prekurzoru v destilované vodě. Použité prekurzory byly BA, *t*CA, deuterii značená [2,3,4,5,6-²H₅] BA nebo na jádře značená [ring-¹³C₆] *t*CA. Do jedné Petriho misky bylo napipetováno 5 ml destilované vody (kontrola). Misky byly přiklopeny víčky, oblepeny parafilmem, aby bylo zamezeno ztrátám vlhkosti, a umístěny na denní světlo. Teplota byla nastavena na 23 °C. Doba působení prekurzorů byla 72 h. Na obrázku 20 jsou vyfoceny pětidenní rostliny ovsu před sklizením. Po 72 h byly do mikrozkušavek sklizeny rostlinné orgány (cca 100 mg), zvláště kořeny a zvláště nadzemní části – děložní lístky (cotyledon). V tabulce 3 jsou zaznamenány navážky vzorků (Analytické váhy Pioneer PA214C, Ohaus, Parsippany, USA). Navážený rostlinný materiál byl před další manipulací uskladněn v - 80 °C.



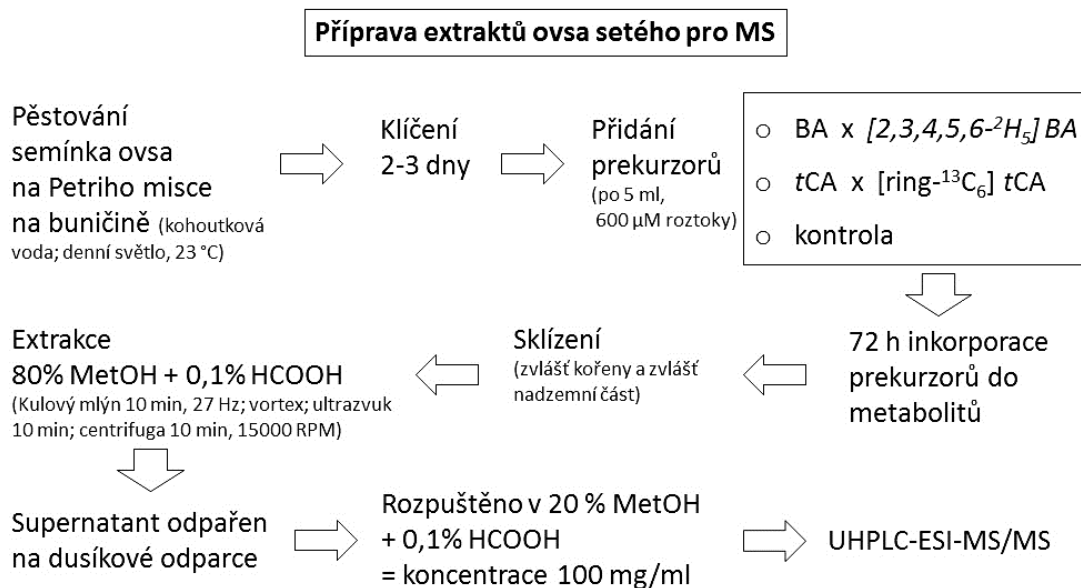
Obr. 20 Pětidenní rostliny ovesa setého po 72 h inkubaci s prekurzorovými látkami

Tab. 3 Navážky sklizeného rostlinného materiálu ovesa setého z pěti vzorků na Petriho miskách, po 72 h působení prekurzorových látek

Prekurzor	BA	[2,3,4,5,6- ² H ₅] BA	tCA	[ring- ¹³ C ₆] tCA	Kontrola
Sklizený materiál - kořeny [mg]	92.4	91.0	96.9	63.9	79.1
Sklizený materiál – děložní lístky [mg]	133.5	114.4	135.5	111.5	112.9

3.3.2. Extrakce

Schéma extrakce je zobrazeno na obrázku 21. Do mikroskopické misky obsahující rostlinný materiál byl přidán 1 ml extrakčního činidla (80% methanol a 0,1% kyselina mravenčí). Vzorky byly 10 min homogenizovány na kulovém oscilačním mlýnu Verder MM 400 (Retsch, Haan, Germany) s kovovými kuličkami při frekvenci 27 Hz, a následně 10 min sonifikovány na ultrazvukové lázni (VWR International, Radnor, USA). Extrakty byly centrifugovány na centrifuze 5424 (Eppendorf, Hamburg, Germany) při 20238 g po dobu 10 min. Supernatanty byly odpařeny na dusíkové odparce TurboVap LV (Caliper LifeScience, Hopkinton, USA) a odparky byly následně rozpuštěny v 20% methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí tak, aby koncentrace extraktu byla 100 mg/ml. 200 µl extraktu bylo zfiltrováno na membránovém 0,2 µm mikrofiltru Micro Spin Filter (Circ Bio, Deerfield Beach, USA) z recyklované celulózy pomocí centrifugy 5424 (Eppendorf) při 4136 g po dobu 5 min. Filtráty byly přeneseny do vialek pro UHPLC-MS/MS analýzu.



Obr. 21 Schéma přípravy extraktů ovsa setého (*Avena sativa*) pro analýzu UHPLC-ESI-MS/MS

3.4. UHPLC-MS/MS

Extraktly byly separovány na reverzní fázi na koloně Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm (Waters, Milford, USA), rozměry kolony byly 150 x 2,1 mm. Systém UHPLC byl složen PDA detektoru (Acquity Ultra Performance), Sample manageru (FTN Acquity UPLC) a pump (Quaternary Solvent manager Acquity UPLC Class H) (vše Waters). Teplota kolony byla nastavena na 30 °C. Teplota vzorků v Sample Manageru byla nastavena na 4 °C. Nástřikový objem vzorku byl 5 μl . Použity byly mobilní fáze $\geq 99,9\%$ acetonitril (A) a 5 mM kyselina mravenčí v deionizované vodě (B). Deionizovaná voda byla připravena v přístroji Simplicity 185 (Millipore Corp., Billerica, USA). Gradient složení mobilních fází je zaznamenán v tabulce 4.

Tab. 4 Gradient složení mobilních fází A (acetonitril) a B (5 mM kyselina mravenčí)

Čas (min)	Průtok (ml/min)	Obsah A (%)	Obsah B (%)
0	0.25	5	95
0.1	0.25	5	95
1	0.25	10	90
12	0.25	35	65
17	0.25	70	30
17.5	0.25	100	0
19	0.25	100	0
19.5	0.25	5	95
22	0.25	5	95

Detekce separovaných analytů probíhala na hmotnostním spektrometru Synapt G2-Si (Waters). Jako iontový zdroj sloužil ESI a analyzátory byly kvadrupól a TOF v tandemovém uspořádání (QqTOF). Měření vzorků proběhlo v pozitivním i negativním módu. Jako zmlžující plyn a plyn na vstupní štěrbině byl použit dusík. Jako lockspray byl použit leucin-enkefalin (5 ng/μl). Další parametry nastavení hmotnostního spektrometru jsou vypsány v tabulce 5. Sběr dat probíhal v DDA (Data Dependent Acquisition) režimu, kolizní energie při MS² byla 20 eV. Data byla zaznamenávána ve formátu centroid. Celková doba analýzy jednoho vzorku byla 22 min.

Tab. 5 Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru při detekci

Parametr	Nastavení
Rozsah měřených hmotností	50-1500 Da
Kapilární napětí	2 kV
Teplota iontového zdroje	120 °C
Cone voltage	15 V
Desolvatační teplota	500 °C
Průtok cone gas	30 l/h
Průtok desolvatačního plynu	600 l/h

3.5. Vyhodnocení dat

Automatická metabolická analýza surových dat byla provedena pomocí programu vyvinutého v Laboratoři Růstových Regulátorů (UP, Olomouc). Pro účely necíleného vyhledávání metabolitů s pozměněným izotopovým profilem byly srovnány plochy features v rostlinách ošetřených izotopově značenými a neznačenými prekurzory. Srovnání spočívalo ve výběru features, které vykazují minimálně 300 násobný rozdíl a maximální plochu >5000. Vybraná data byla dále manuálně vyhodnocena v programu MassLynx, ver. 4.0 (Micromass, Manchester, UK).

4. Výsledky

Předmětem této bakalářské práce bylo studium biosyntézy a metabolismu benzoových kyselin v rostlinách pomocí izotopově značených prekurzorů. Jako prekurzory byly vybrány látky, u kterých se předpokládá, že jsou zapojeny v biosyntéze benzoových/skořicových kyselin.

4.1. Detekce benzoových a skořicových kyselin v ovsu setém

V kontrolních rostlinách ovsu setého byla cíleně zjišťována přítomnost vybraných benzoových a skořicových kyselin. Analýza byla provedena v negativním ionizačním módu, v chromatogramech byly vyhledávány následující kyseliny a jejich deriváty: BA (m/z 121), SA (m/z 137), dihydroxy-BA (m/z 153) a kyseliny vanilová (m/z 167) a gallová (m/z 179). V dalším kroku byly stejným způsobem analyzovány skořicové kyseliny v ovsu: CA (m/z 147), kyseliny kumarová (m/z 163), kávová (m/z 179), ferulová (m/z 193) a sinapová (m/z 223). U všech detekovaných m/z benzoových a skořicových kyselin šlo pouze o fragmenty molekulárních iontů. Benzoové a skořicové kyseliny se v ovsu volně nevyskytovaly. Kyseliny byly ve formě konjugátů s jinými látkami. Celkem bylo v kořenech a děložních lístcích ovsu setého detekováno 5 metabolitů odvozených od BA a *t*CA, které jsou shrnuty v tabulce 6.

Tab. 6 Kyseliny benzoové, skořicové a jejich deriváty detekované v negativním ionizačním módu v kořeni a děložních lístcích kontrolních rostlin ovsu setého (*Avena sativa*).

benzoová/skořicová kyselina (nebo jejich derivát)	m/z	RT (min)	část rostliny
benzoyl malát	237	9.06	kořen
hexosylester kyseliny benzoové	283	6.68	kořen
hexosid/hexosylester kyseliny vanilové	329	3.73	děložní lístky, kořen
kyselina hydroxy,sulfooxy-benzoová	217	4.3	děložní lístky
kyselina zosterová ^A	243	6.03	děložní lístky, kořen

^A též 4-(sulfooxy)-*trans*-skořicová, identifikace kyseliny je v kapitole 1.2.2.

4.2. Studium inkorporace

4.2.1. Detekce metabolitů s pozmeněným izotopovým profilem

Pro detekci metabolitů s pozmeněným izotopovým profilem byly aplikovány dvě strategie. První využívala cílené posouzení izotopových profilů u benzoových/skořicových kyselin detekovaných

v kontrolních rostlinách ovsu. Druhá strategie využívala srovnání ploch všech features detekovaných v rostlinách ošetřených značeným vs. neznačeným prekurzorem.

a) Cílená analýza

Byly vyhledávány deriváty benzoových a skořicových kyselin, které byly detekovány v kontrolních rostlinách (Tab. 6), a u těchto metabolitů bylo dále pomocí diferenční analýzy zjišťováno, zda metabolity obsahují inkorporovaný prekurzor. Nejprve byly v chromatogramech s neznačenými metabolity byly vyhledávány m/z metabolitů benzoových/skořicových kyselin a následně byly v chromatogramech s přídáním [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$] BA vyhledávány odpovídající $m/z + x$, kde $x \in \{1; 5\}$. U rostlin ošetřených [ring- $^{13}\text{C}_6$] *tCA* byly hledány metabolity skořicových kyselin $m/z + 6$. V ovsu bylo cílenou analýzou detekováno 5 metabolitů s inkorporovanými prekurzory, a to pouze v kořenech ovsu. Byly hledány také další m/z běžných derivátů benzoových/skořicových kyselin jako v předešlé kapitole, které však nebyly detekovány v kontrolní rostlině. To vedlo k detekci dvou nových metabolitů, a to derivátu kyseliny benzoové (m/z 371, ES-) a hexosidu/hexosylesteru kyseliny ferulové (m/z 355, ES-), u kterých také došlo k inkorporaci prekurzorů. Metabolity jsou zaznamenány v tabulce 7. Všechny metabolity byly detekovány také při necílené analýze a jsou zmíněny v následující kapitole v tabulkách 9 a 10.

Tab. 7 Metabolity, u kterých byla detekovaná inkorporace kyseliny benzoové (600 μM) nebo kyseliny *trans*-skořicové (600 μM) v kořeni ovsu setého (*Avena sativa*) pomocí cílené analýzy. Detekovány byly v negativním módu (ES-). Hodnoty m/z odpovídají molekulárnímu iontu $[\text{M}-\text{H}]^-$.

m/z	RT (min)	Prekurzor	Anotace
371	6.93	BA	derivát kyseliny benzoové ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$)
237	9.4	BA	benzoyl malát
283	6.72	<i>tCA</i>	hexosylester kyseliny benzoové
329	3.64	<i>tCA</i>	hexosid/hexosylester kyseliny vanilové
355	6.44	<i>tCA</i>	hexosid/hexosylester kyseliny ferulové

b) Necílená analýza

Celkový počet detekovaných features v obou ionizačních módech byl 55 546 v kořenech i nadzemní části. Metabolity, u kterých pravděpodobně došlo k inkorporaci celé nebo části prekurzorové molekuly byly vybrány na základě rozdílů v plochách features detekovaných

v rostlinách ošetřených značeným a neznačeným prekurzorem. Protože signifikantně rozdílných features byly řádově stovky, byla stanovena další podmínka včetně minimálně 300-násobného rozdílu v plochách a minimální plocha > 5000. Tento seznam kandidátů obsahoval < 100 položek a byl dále manuálně vyhodnocen. Především bylo potřeba potvrdit, že skutečně dochází k inkorporaci vyhodnocením izotopových profilů metabolitů v rostlinách ošetřených značeným a neznačeným prekurzorem. Přibližně 5 % kandidátů bylo vyřazeno, protože nebyla potvrzena inkorporace. Dalším krokem byla redukce dimensionalit v datech seskupením všech features pocházejících z jednoho metabolitu. Tím došlo k redukci počtu kandidátů na přibližně 60 %. Tabulka 1 obsahuje seznam metabolitů, u kterých došlo k inkorporaci prekurzorů, detekovaných v pozitivním ionizačním módu v kořeni ovsa setého. Všechny metabolity detekované v ES+ jsou vypsány v tabulce 8. S výjimkou m/z 606.1639 byly tyto metabolity detekované v obou ionizačních módech. Metabolity detekované v ES- jsou vypsány v tabulkách 9 a 10 (metabolity s inkorporovanou BA v Tab. 9; metabolity s inkorporovanou *t*CA v Tab. 10).

Tab. 8 Metabolity, u kterých byla detekována inkorporace kyseliny benzoové (600 μ M) nebo kyseliny *trans*-skořicové (600 μ M) v kořeni ovsa setého, ionizace analytů v pozitivním módu (ES+). Hodnoty m/z odpovídají molekulárnímu iontu $[M+H]^+$ pokud není uvedeno jinak.

m/z	Δ ppm ^A	Vzorec ^B	RT (min)	Anotace	Prekurzor	Fragmenty v MS ¹	Fragmenty v MS ²
429.1393 ^C [M-H ₂ O] ⁻	-0.9	C ₁₉ H ₂₄ O ₁₀	5.9	derivát kyseliny benzoové ^D	BA	267	105, 267, 193
429.1392 ^C [M-H ₂ O] ⁻	-0.5	C ₁₉ H ₂₄ O ₁₁	5.98	derivát kyseliny benzoové ^D	BA	267	105, 267, 193
547.1448 ^E [M-Hex+H] ⁺	-0.7	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	5.7	hexosylrhamnosyl- scopoletin ^F	<i>t</i> CA	193	-
308.1971	-1	C ₁₆ H ₂₅ N ₃ O ₃	5.16	derivát kyseliny skořicové ^D	<i>t</i> CA	147	204, 147
606.1639	-1	C ₂₈ H ₃₁ NO ₁₂ S	9.91	derivát scopoletinu ^D	<i>t</i> CA	113	193, 131, 275, 414, 378

^A odchylka naměřené hmoty m/z od teoretické hmoty sumárního vzorce m/z

^B Sumární vzorec neutrální molekuly metabolitu (v nenabitém stavu)

^C [M-H₂O]⁻ (molekulární ion po odštěpení vody), prekurzorový ion m/z 447 nebyl v ES+ detekován

^D předběžná charakterizace strukturní skupiny metabolitu

^E [M-Hex+H]⁺ (molekulární ion po odštěpení hexosy), prekurzorový ion m/z 709 nebyl v ES+ detekován

^F předběžná identifikace metabolitu; detekován jako fragment po ztrátě hexosy

Tab. 9 Metabolity, u kterých byla detekována inkorporace kyseliny benzoové (600 μ M) v kořeni ovsu setého, ionizace analytů v negativním módu (ES⁻). Hodnoty *m/z* odpovídají molekulárnímu iontu [M+H]⁻.

<i>m/z</i>	Δ ppm ^A	Vzorec ^B	RT (min)	Anotace	MS ¹ : Fragmenty; adukty; dimery	Fragmenty v MS ²
237.0408 ^C	3.8	C ₁₁ H ₁₀ O ₆	9.08	benzoyl malát ^D	121	121
283.0819	0.4	C ₁₃ H ₁₆ O ₇	6.72	hexosylester kyseliny benzoové ^E	121; 329 [M+HCOOH-H] ⁻ ; 319 [M+Cl] ⁻	121, 175, 214
427.1242	0.5	C ₁₉ H ₂₄ O ₁₁	9.62	derivát kyseliny benzoové ^E	305; 855 [M+M-H] ⁻	121, 125, 305, 409
589.1764 ^F	-0.8	C ₂₅ H ₃₄ O ₁₆	8.34	derivát hexosylesteru kyseliny benzoové ^E	305, 427; 635 [M+HCOOH-H] ⁻ ; 625 [M+Cl] ⁻ ; 1179 [M+M-H] ⁻	427, 305, 121, 161
371.0981 ^G	0.8	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	6.5	derivát kyseliny benzoové ^E	746 [M+M-H] ⁻	249, 121
413.1453	1.2	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₁	9.38	derivát kyseliny benzoové ^E	827 [M+M-H] ⁻	269, 161
575.1978	0.3	C ₂₅ H ₃₆ O ₁₅	8.07	derivát kyseliny benzoové ^E	413 [M-Hex-H] ⁻ ; 621 [M+HCOOH-H] ⁻ ; 611, 1151 [M+M-H] ⁻	-
445.1353	1.6	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	6.9	derivát kyseliny benzoové ^E	121, 179, 283, 351; 491 [M+HCOOH-H] ⁻ ; 481 [M+Cl] ⁻	121, 161, 175, 323
445.135	0.9	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₃	6.76	derivát kyseliny benzoové ^E	121, 179, 283, 351; 491 [M+HCOOH-H] ⁻ ; 481 [M+Cl] ⁻	121
445.1346	0	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	5.62	derivát kyseliny benzoové ^E	323, 145, 545; 491 [M+HCOOH-H] ⁻	121, 125, 161, 400

^A odchylka naměřené hmoty *m/z* od teoretické hmoty sumárního vzorce *m/z*

^B Sumární vzorec neutrálním molekuly metabolitu (v nenabitém stavu)

^C benzoylmalát byl detekován také v nadzemní části ovsu (v děložních lístcích)

^D předběžná identifikace metabolitu

^E předběžná charakterizace strukturální skupiny metabolitu

^F *m/z* 589.1764 obsahuje hexosu a fragment 305, které jsou obě navázané na BA;

^G fragment *m/z* 249 by podle databáze Yeast Genome mohla být 4,6-pyruvylated galaktose

Tab. 10 Metabolity, u kterých byla detekována inkorporace kyseliny *trans*-skořicové (600 μ M) v kořeni ovsu setého, ionizace analytů v negativním módu (ES⁻). Hodnoty *m/z* odpovídají molekulárnímu iontu [M+H]⁻.

<i>m/z</i>	Δ ppm ^A	Vzorec ^B	RT (min)	Anotace	MS ¹ : Fragmenty; adukty; dimery	Fragmenty v MS ²
341.0878	1.5	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	4.89	hexosid/hexosylester kyseliny kávové ^C	179, 161; 683 [M+M-H] ⁻	161, 179, 139, 203
503.1408	1.4	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₄	4.5	derivát hexosidu/hexosylesteru kyseliny kávové ^C	197; 1007 [M+M-H] ⁻	341, 179, 161,
325.0932	2.8	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	5.94	hexosid/hexosylester kyseliny kumarové ^C	145; 651 [M+M-H] ⁻	145, 163
355.1033	1.1	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	6.46	hexosid/hexosylester kyseliny ferulové ^C	175, 160; 711 [M+M-H] ⁻	175, 160, 217
367.103 ^D	0.3	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	5.85	derivát kyseliny ferulové ^C	193; 735 [M+M-H] ⁻	193, 134, 117, 173, 149, 265, 325
707.1814	-	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	5.76	hexosylrhamnosyl-scopoletin ^E	191, 399, 176, 161, 545	191, 176
306.1818	0	C ₁₆ H ₂₅ N ₃ O ₃	5.16	derivát kyseliny skořicové ^C	147	119, 173, 217, 288

^A odchylka naměřené hmoty *m/z* od teoretické hmoty sumárního vzorce *m/z*

^B Sumární vzorec neutrálním molekuly metabolitu (v nenabitém stavu)

^C předběžná charakterizace strukturní skupiny metabolitu

^D pravděpodobně kyselina ferulová (C₁₀H₁₀O₄) konjugovaná s kyselinou chinovou (C₇H₁₂O₆)

^E předběžná identifikace metabolitu

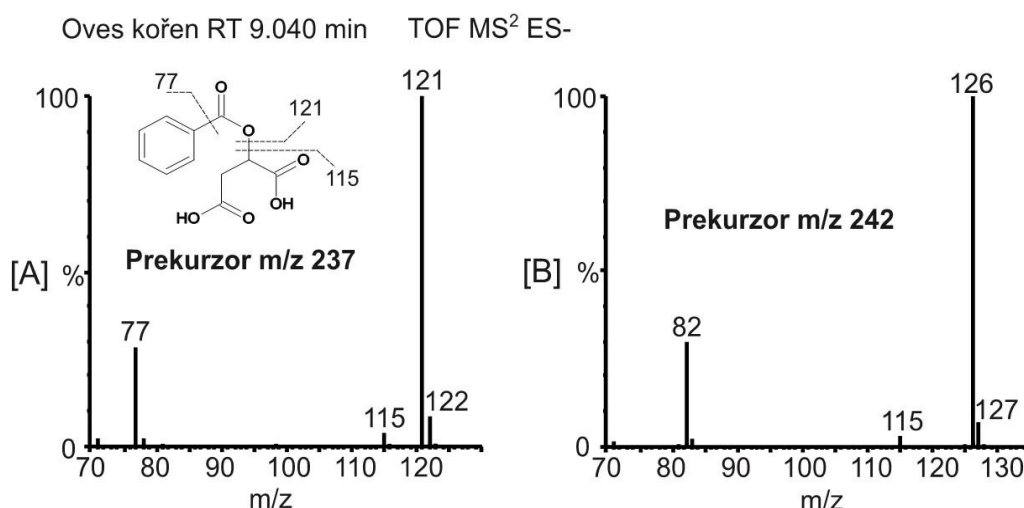
4.2.2. Anotace a identifikace metabolitů

Molekulární ionty, které jsou vypsány v tabulkách předešlé kapitole, byly určeny na základě chromatogramů a MS¹, případně MS², spekter. Strukturní charakterizace těchto detekovaných molekulárních iontů byla založena na srovnání MS² spekter a sumárních vzorců metabolitů s online databázemi (např. Metlin). Kromě srovnání s databázemi byly hodnoceny rozdíly mezi produktovými ionty, které odpovídaly typicky neutrálním ztrátám: hexosa (-162), pentosa (-142), voda (-18) apod. Dalším nástrojem pro stanovení struktury bylo určování sumárních vzorců na základě přesné hmoty a přirozeného izotopového profilu. Kombinace elementárního složení a MS² spekter byla porovnávaná s MS databázemi za účelem předběžné anotace metabolitů.

Vybraná spektra detekovaných molekulárních iontů z tabulek 8 - 10 jsou popsány níže v této kapitole. Na fragmentačních spektrech je zaznamenán postup identifikace nebo předběžné identifikace (anotace) metabolitů. Jsou zde popsána MS¹ spektra, na kterých je znázorněno, jak byly rozpoznávány molekulární ionty. V MS¹ spektrech jsou ukázány typické adukty nebo dimery, které se tvoří v iontovém zdroji. Detekce dimerů nebo aduktů molekulárního iontu je často jedinou možností určení molekulárního iontu. V negativním módu (ES-) tvoří molekulární ion často adukty s kyselinou mravenčí [M+HCOOH-H]⁻ nebo s chlórem [M+Cl]⁻. V pozitivním módu se vyskytují adukty molekulárního iontu se sodíkem [M+Na]⁺ a draslíkem [M+K]⁺, a také se z molekulárního iontu odštěpuje molekula vody [M-H₂O+H]⁺; např. derivát kyseliny benzoové (MW 446), kde zcela chybí molekulární ion (Obr. 27A).

Benzoyl malát (*m/z* 237)

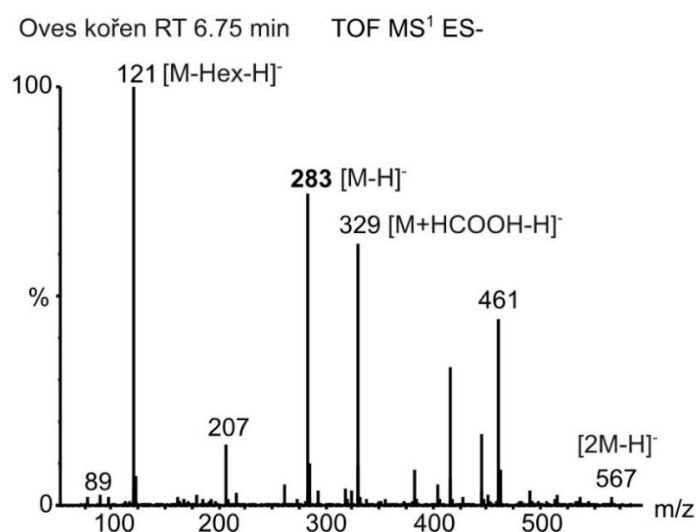
Z fragmentačních spekter na obrázku 22 je patrné, že molekulární ion *m/z* 237 (Obr. 22A) strukturně odpovídá molekulárnímu iontu *m/z* 242 (Obr. 22B), jejich izotopový profil je však pozměněný. Metabolit byl předběžně charakterizován jako malát kyseliny benzoové. Malát je konjugován na karboxylové skupině BA. Fragment malátu ve spektrech [A] a [B] představuje pík 115. Píky 121 a 126 rozdílem 5 Da představují neznačenou a deuterii značenou BA, kdy je 5 deuterií navázáno na uhlících C2 až C6. Rozdíl 5 Da je patrný také u píků 77 [A] a 82 [B], což jsou fragmenty BA po odštěpení karboxylové skupiny. Malát je ke karboxylu BA vázán esterovou vazbou přes hydroxyl na uhlíku C2 podobně, jako je malát vázán např. v látce sinapoyl-(S)-malát.



Obr. 22 [A] Fragmentační spektrum molekulárního iontu *m/z* 237 detekovaného v kořeni a v nadzemní části ovsu setého po ošetření 600 μM BA. [B] Fragmentační spektrum molekulárního iontu *m/z* 242 detekovaného v kořeni a v nadzemní části ovsu po ošetření 600 μM [2,3,4,5,6-²H₅] BA. Retenční čas (RT) detekce byl 9.04 min. Količní energie při fragmentaci byla 20 eV.

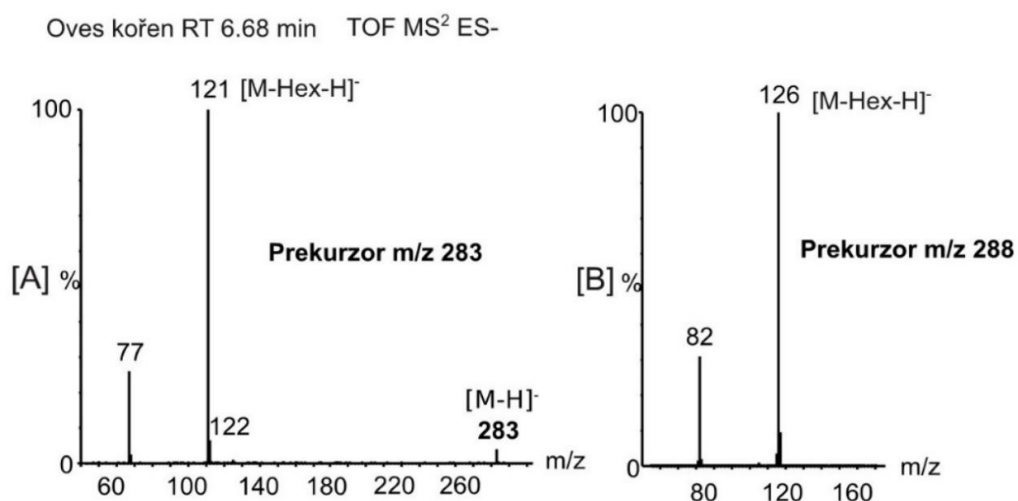
Hexosylester kyseliny benzoové (m/z 283)

Na obrázku 23 je zobrazeno MS¹ spektrum hexosylesteru kyseliny benzoové. Ve spektru lze vidět adukt molekulárního iontu s kyselinou mravenčí [M+HCOOH-H]⁻ s m/z 329. Adukt s chlorem [M+Cl-H]⁻ s m/z 319 byl ve spektru přítomen také, ale s menší relativní intenzitou, proto není zobrazen. Na základě přítomnosti aduktů je potvrzeno, že m/z 283 je molekulární ion. Dalším důkazem, že se jedná o molekulární ion, je dimer [2M-H]⁻ s m/z 567. Fragment BA odpovídá m/z 121, kde u molekulárního iontu došlo k neutrální ztrátě 162 Da, což je ztráta hexosy.

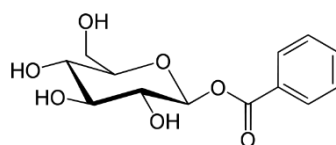


Obr. 23 Určení molekulární iontu z MS¹ spektra vzorku kořene ovsu setého po ošetření 600 μ M BA. Molekulární ion je m/z 283 [M-H]⁻, předběžně byl identifikován jako hexosylester kyseliny benzoové. Detekce v RT 6.75 min.

Na obrázku 24 jsou zaznamenána fragmentační spektra molekulárních iontů s m/z 283 a s m/z 288. Jedná se o jeden metabolit, který však má v rostlině s deuterii značenou BA o 5 Da větší hmotnost. V MS^2 spektrech lze vidět neutrální ztráty 162 Da odpovídající hexose. Hexosa je zjevně navázaná přes karboxyl (hexosylester), což je potvrzeno rozdílem 5 Da mezi značeným a neznačeným metabolitem. Fragменты m/z 121 [A] a m/z 126 [B] odpovídají BA a deuterii značené BA. Po odštěpení COOH skupin vznikly fragmenty m/z 77 [A] a m/z 82 [B] odpovídají benzenu. Na obrázku 4 je možná struktura metabolitu m/z 283. Podle přesně změřené hmoty 283,0819 Da, programem vygenerovaného sumárního vzorce $C_{13}H_{16}O_7$ s odchylkou hmoty 0,4 ppm od (Tab. 1) a podle fragmentačního spektra byl metabolit předběžně identifikován jako hexosylester BA. Hexosa je s velkou pravděpodobností v rostlinách běžně se vyskytující glukóza. Strukturální vzorec glukosylesteru BA je na obrázku 25.



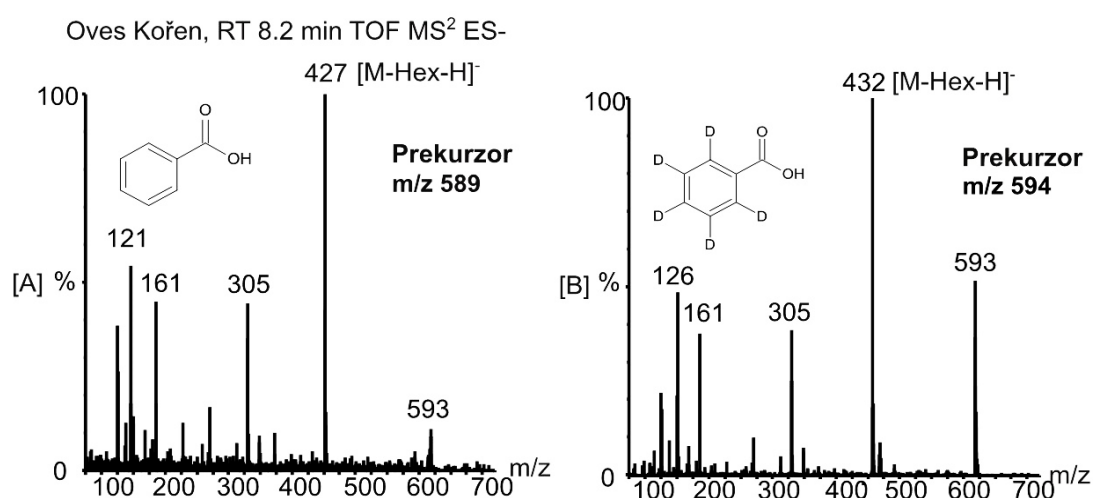
Obr. 24 [A] Fragmentační spektrum molekulárního iontu m/z 283 detekovaného v kořeni ovsa po ošetření 600 μ M BA. [B] Fragmentační spektrum molekulárního iontu m/z 288 detekovaného v kořeni ovsa po ošetření 600 μ M [2,3,4,5,6-²H₅] BA. Detekce v RT 6.68 min. Kolizní energie při fragmentaci byla 20 eV.



Obr. 25 Benzoyl- β -D-glukosid

Derivát hexosylesteru kyseliny benzoové (m/z 589)

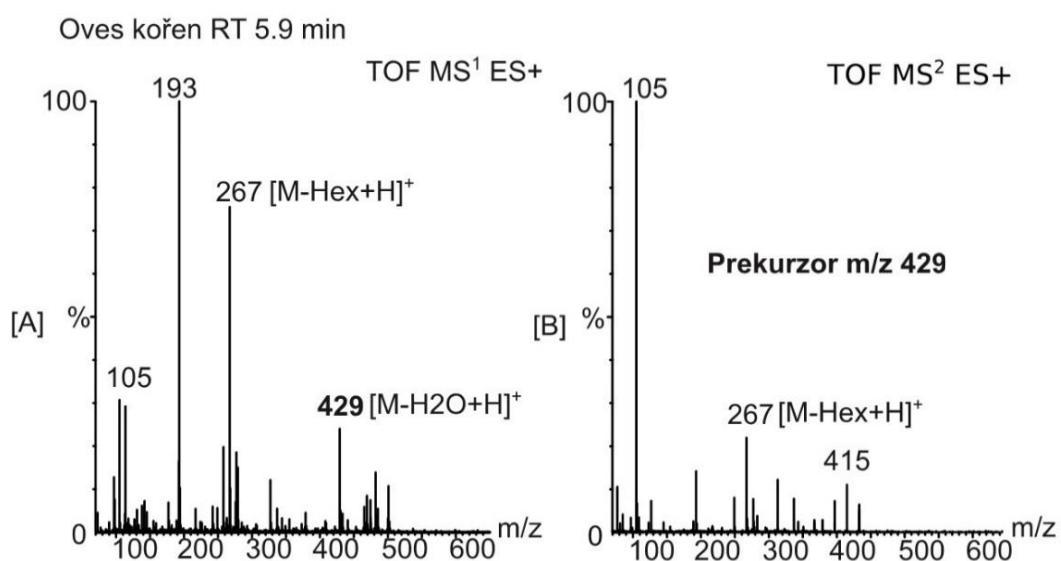
Na obrázku 26 jsou zobrazena fragmentační spektra molekulárních iontů m/z 589 a m/z 594. Jedná se o neznámý metabolit, do kterého byla inkorporována BA. Fragment BA ve fragmentačních spektrech obou m/z je zastoupen píky 121 na obrázku 26A a píkem 126 s deuterii značeným jádrem na obrázku 26B. Látka obsahuje také hexosu, jejíž neutrální ztráta 162 Da je patrna na rozdílu mezi m/z 589 a m/z 427. Po odštěpení hexosy a BA z m/z 589 zůstává fragment m/z 305, jehož struktura není známá. Pro fragment m/z 305 byl stanoven sumární vzorec molekuly $C_{12}H_{18}O_7$. Přesně změřená hmotnost iontu m/z 305 je rovna 305,0873 Da.



Obr. 26 [A] Fragmentační spektrum molekulárního iontu m/z 589 detekovaného v kořeni ovsa po ošetření 600 μ M BA. [B] Fragmentační spektrum molekulárního iontu m/z 594 detekovaného v kořeni ovsa po ošetření 600 μ M [2,3,4,5,6-²H₅] BA. Detekce v RT 8.2 min. Kolizní energie při fragmentaci byla 20 eV.

Derivát kyseliny benzoové (m/z 429)

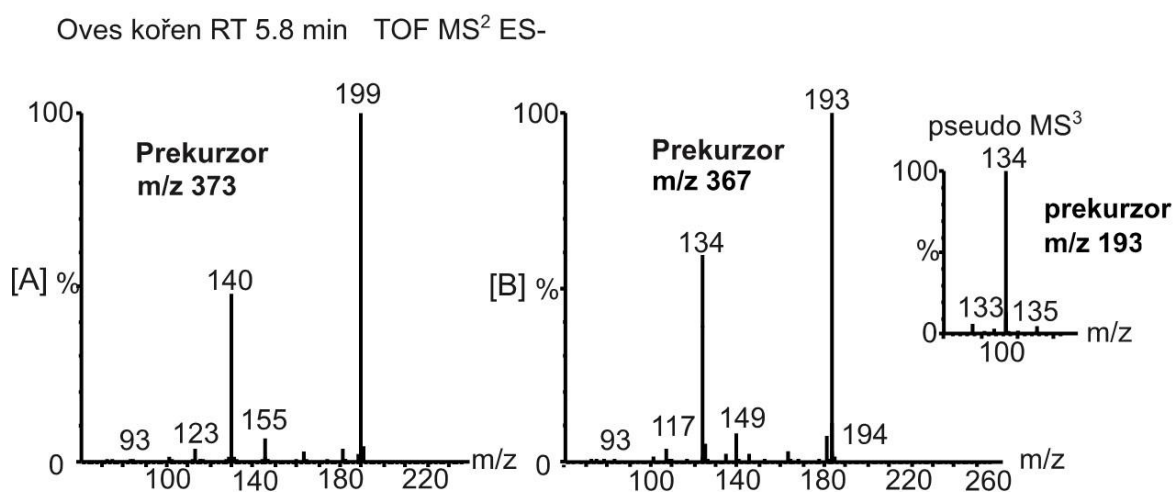
U následujícího derivátu BA byl v ES+ detekován pouze fragmentový ion po odštěpení molekuly vody $[M-H_2O+H]^+$, jehož m/z bylo 429. Molekulární ion by měl být m/z 447, ten však v ES+ detekován nebyl. Molekulární ion se však podařilo detekovat v ES- s m/z 445. Na obrázku 27A je spektrum MS¹, kde byl metabolit detekován. Pík 193 k metabolitu nepatří, je to nejspíš fragment z jiné látky. Fragmentační spektrum m/z 429 detekovaného v ES+ je zobrazeno na obrázku 27 [B]. Tento metabolit obsahuje BA a dvě molekuly hexosy, pravděpodobně glukosy, které jsou nejrozšířenějším cukrem v rostlinách. Rozdíl m/z 267 a m/z 429 je 162 Da, odpovídá neutrální ztrátě jedné hexosy, ve fragmentačním spektru na obrázku 27B lze vidět $[M-Hex+H]^+$ u píku 267. Proto je také zřejmé, že ztráta vody u m/z 447 nebyla na této hexose. Při odštěpení dalšího fragmentu hexosy o 162 Da z m/z 267 vzniká fragment m/z 105, který pozorujeme ve fragmentačním spektru na obrázku 27B. Pokud bychom k fragmentu 105 připočetli vodu s hmotností 18 Da, získáme 123, což je prekurzorová BA. V molekulárním iontu m/z 447 byla tedy voda odštěpena z BA.



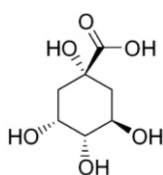
Obr. 27 [A] Určení molekulárního iontu z MS¹ spektra vzorku kořene ovsa setého po ošetření 600 μ M tCA. [B] Fragmentační spektrum molekulárního iontu m/z 429 detekovaného v kořeni ovsa po ošetření 600 μ M tCA. Detece v RT 5.9 min. Kolizní energie při fragmentaci byla 20 eV.

Derivát kyseliny ferulové (m/z 373)

Derivát kyseliny ferulové byl identifikován pomocí MS² spekter metabolitů m/z 373 a 367 (Obr. 28). V struktuře metabolitu je pravděpodobně obsažena kyselina chinová konjugovaná s kyselinou ferulovou (Obr. 19). Kyselina chinová je odvozená od 3-dehydrochinátu, který je prekurzorem aromatických aminokyselin, fenyylpropanoidů a fenolických kyselin (Maeda & Dudareva, 2012). Kyselina chinová se vyskytuje zejména v chinovníku a v kávě, kde výrazně ovlivňuje kyselou chuť. Zda je vazba kyselin ferulové a chinové přes kyslík nebo přes uhlíky nelze u značení na kruhu určit. Na obrázku 28 pozorujeme v obou fragmentačních spektrech molekulárních iontů neutrální ztráty 174 Da, což je podle přesné hmoty kyselina chinová. M/z 193 zastupuje kyselinu ferulovou a m/z 199 kyselinu [ring-¹³C₆] ferulovou. Identifikace kyseliny ferulové byla provedena pomocí pseudo MS³ spektra tak, že bylo v retenčním čase metabolitu m/z 367 zobrazeno MS¹ spektrum, v kterém byl nalezen fragment m/z 193, a jeho fragmentační spektrum bylo porovnáno s fragmentačním spektrem kyseliny ferulové z databáze Metlin. Kyselina ferulová fragmentuje za vzniku m/z 134, a méně intenzivních m/z 133 a 135. M/z 134 je i ve spektru metabolitu m/z 367.



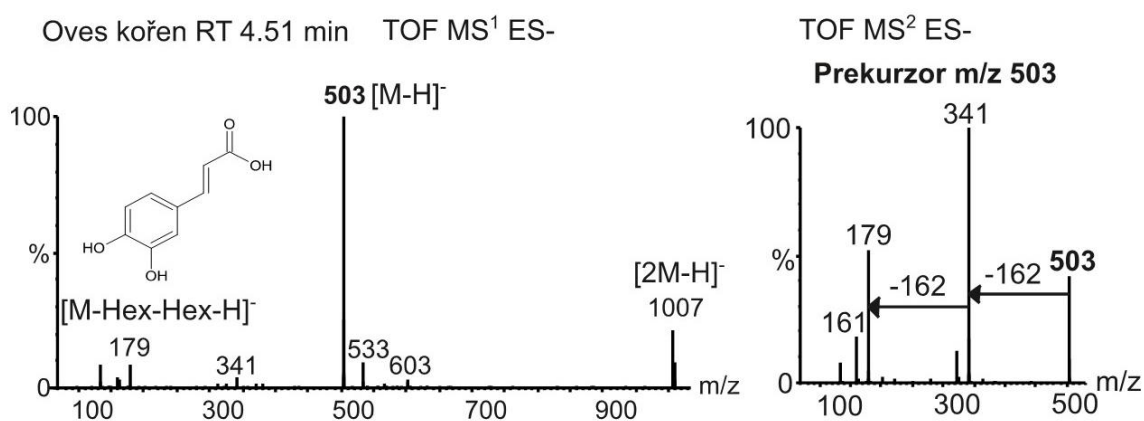
Obr. 18 [A] Fragmentační spektrum molekulárního iontu m/z 373 detekovaného v kořeni ova po ošetření 600 μ M [ring-¹³C₆] *t*CA. [B] Fragmentační spektrum molekulárního iontu m/z 367 detekovaného v kořeni ova po ošetření 600 μ M *t*CA a pseudo MS³ spektrum fragmentu m/z 193. Detekce v RT 5.8 min. Kolizní energie byla 20 eV.



Obr. 2 Kyselina chinová

Derivát hexosidu/hexosylesteru kyseliny kávové (m/z 503)

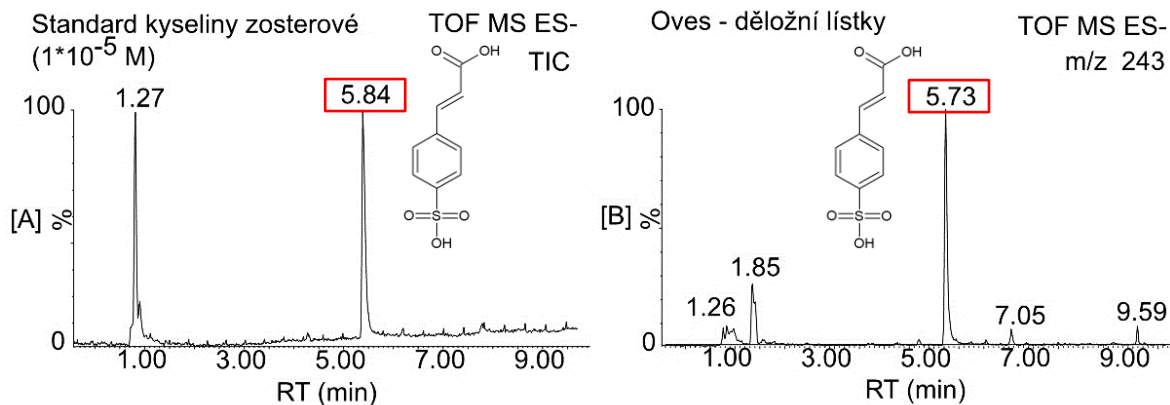
V MS¹ spektru na obrázku 29 nalevo lze vidět postup identifikace molekulárního iontu. Molekulární ion byl určen na základě přítomnosti m/z 1007, což je dimer [2M-H]⁻ molekulárního iontu m/z 503 [M-H]⁻. V ovsu ošetřeném izotopicky značenou *t*CA byl detekován stejný metabolit m/z 509 s pozměněným izotopovým profilem, což potvrzuje inkorporaci přidaného prekurzoru. Molekulární ion byl identifikován pomocí MS² spektra, které je zobrazeno vpravo na obrázku 7. Rozdíl m/z 503 a m/z 341 je 162, který značí ztrátu hexosy. Stejný rozdíl je mezi m/z 341 a m/z 179, proto lze usuzovat, že metabolit obsahuje dvě hexosy. Následně bylo identifikován ion m/z 179. Jedná o kyselinu kávovou, jejíž vzorec je zakreslen v spektru MS¹ na obrázku 29. Jedná fragment molekulárního iontu po ztrátě dvou hexos, lze jej tedy zapsat jako [M-Hex-Hex-H]⁻.



Obr. 29 MS¹ spektrum (nalevo) při určování molekulárního iontu m/z 503 detekovaného v kořeni ovsa po ošetření 600 μ M *t*CA, a fragmentační spektrum m/z 503 (napravo). Detekce v RT 4.51 min. Kolizní energie při fragmentaci byla 20 eV.

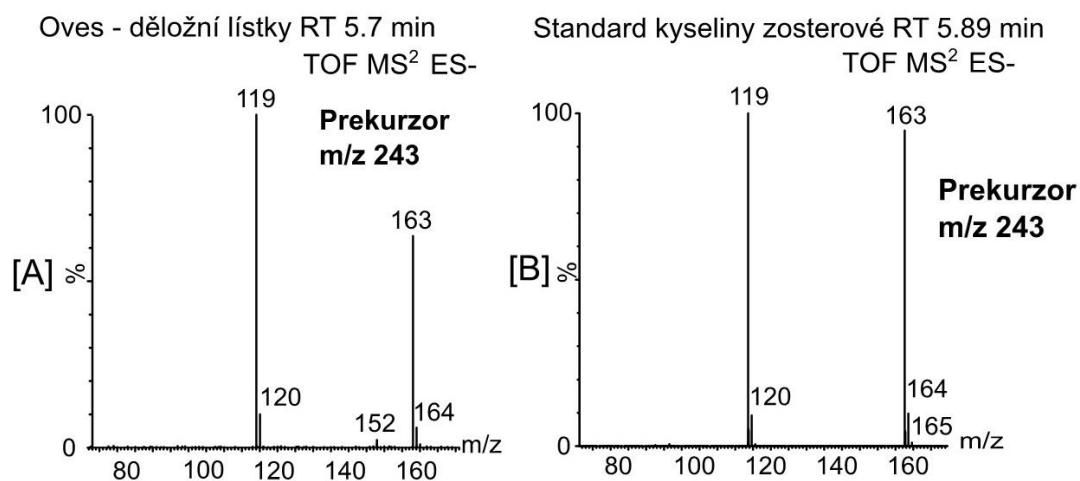
Kyselina zosterová (m/z 243)

V děložních lístcích ovsa setého byl identifikován sulfatovaný metabolit *t*CA. Byl objeven při analýze obsahu *t*CA v kontrolní rostlině ovsa, kdy bylo zjištěno, že m/z *t*CA v RT 5,7 min je pouze fragment *t*CA, a jeho molekulární ion je m/z 243. Metabolit byl podle sumárního vzorce a MS² spektra určen jako sulfooxy-*t*CA. Srovnáním retenčního času se standardem kyseliny 4-(sulfooxy)-*trans*-skořicové (zosterové) bylo potvrzeno, že skupina (HSO₃)⁻ je připojená přes kyslík vázaný na C4 (Obr. 30). Dále byly porovnány fragmentační spektra standardu a detekovaného metabolitu. Spektra jsou zobrazena na obrázku 31. Standard kyseliny zosterové byl poskytnut prof. dr. Ronem Weverem z Van 't Hoff Institute for Molecular Sciences, Universiteit van Amsterdam, který kyselinu zosterovou nasyntetizoval.



Obr. 30 [A] Část chromatogramu standardu kyseliny zosterové o koncentraci 1·10⁻⁵ M při zobrazení TIC – Total Ion Current (všechny detekované *m/z*). Pík kyseliny zosterové se nachází v RT 5.84 min. [B] Zobrazení vybraného píku kyseliny zosterové (*m/z* 243) v chromatogramu extraktu z děložních lístků ova setého v RT 5.73 min.

Jak lze vidět na obrázku 31, spektrum kyseliny zosterové (*m/z* 243) z extraktu děložních lístků ova v ES- je stejné jako spektrum standardu kyseliny zosterové ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$). Při fragmentaci kyseliny zosterové vzniká fragment *m/z* 163 (kyselina kumarová). Dochází k neutrální ztrátě 80 Da, která je typickou pro sulfooxy skupinu (Holčapek et al., 2007). Další fragmentací vzniká fragment *m/z* 119, kde došlo k neutrální ztrátě -44, tj. odštěpení CO₂.



Obr. 31 [A] Fragmentační spektrum kyseliny zosterové (*m/z* 243) detekované v děložních lístcích ova setého. RT detekce byl 5,7 min. Kolizní energie při fragmentaci byla 20 eV. [B] Fragmentační spektrum kyseliny zosterové (*m/z* 243) detekované v standardu o koncentraci 1·10⁻⁵ M. Detekce v RT 5.89 min. Kolizní energie při fragmentaci byla 20 eV.

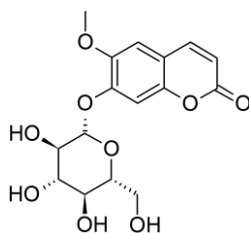
5. Diskuze

Doposud bylo provedeno několik fytochemických studií ovsa setého zaměřených na analýzu fenolických kyselin. Tyto byly ovšem analyzovány výhradně v zrnech (ovesných vločkách/cereáliích a mouce) a ne v semenáčcích jako v této bakalářské práci, čímž lze vysvětlit většinu zjištěných rozdílů. Zásadním zjištěním, které nebylo zřejmé z publikovaných prací je to, že většina rozpustných kyselin je přítomná v konjugované formě (estery, glykosidy). Důvodem může být prakticky výhradní použití cílených metod pro analýzu fenolických kyselin v publikovaných pracích (Sosulski et al., 1982; Multari et al., 2018; Emmons et al., 1999; Durkee & Thivierge, 1977). Např. kyselina ferulová, která se podle těchto publikací vyskytuje v ovsu volně běžně a ve značné koncentraci, jsem volnou nedetekovala. U kyseliny ferulové jsem detekovala její deriváty až po aplikaci prekurzoru *t*CA, která byla v ovsu hydroxylována a konjugována, a to dokonce se dvěma látkami, s hexosou (*m/z* 355,1033; ES-) a s kyselinou chinovou (*m/z* 367,103; ES-). Překvapivě jsem v klíčovém ovsu detekovala benzoyl malát (*m/z* 237,0408; ES-) a hexosylester kyseliny benzoové (*m/z* 283,0819; ES-) a především sulfooxy deriváty BA a *t*CA.

Sulfatované fenolické kyseliny, tzn. kyseliny zosterová a 4-(sulfooxy)-benzoová, jsou známé z mořských organismů jako je mořská tráva *Zostera marina* nebo zelená řasa *Dasyclades siphonous*. Úloha sulfatovaných metabolitů pravděpodobně spočívá ve skladování inaktivovaného metabolitu (Kurth et al., 2015), ale nelze vyloučit ani mnohem specifitější funkci. Kromě přítomnosti kyseliny zosterové mají oves a *Zostera marina* společné zařazení do jednoděložných rostlin. Je tedy možné, že se kyselina zosterová vyskytuje ve více druzích jednoděložných rostlin. Před analýzou benzoových/skořicových kyselin ovsa jsem provedla stejný experiment s modelovou dvouděložnou rostlinou *Arabidopsis thaliana*, která však kyseliny zosterovou ani sulfooxy-benzoovou neobsahovala. Při studiu inkorporace jsem zjistila, že prekurzory v ovsu nebyly inkorporované ani do jedné ze sledovaných sulfatovaných kyselin. Je tedy možné, že se kyseliny vyskytují v ovsu jako původní metabolity už v semínku, nebo jejich biosyntéza probíhá příliš pomalu, a proto nebyla inkorporace po 72 h detekovatelná. Poslední možností je, že prekurzorem jejich biosyntézy jsou jiné látky než *t*CA nebo BA.

Při necílené analýze bylo v ovsu celkem detekováno 18 nových metabolitů u nichž došlo k inkorporaci molekuly BA nebo *t*CA. Žádný z těchto metabolitů nebyl podle dostupné literatury v ovsu detekován. Tyto metabolity byly obvykle konjugáty prekurzoru s hexosou (glukosou), např. hexosylester BA, hexosylrhamonosyl-scopoletin, a hexosid/hexosylester kyseliny kávové. Je známo, že glykosylace je hlavním způsobem metabolizace např. při inaktivaci fytohormonu SA (Dempsey et al., 2011). Prekurzory byly tedy v ovsu glykosylací pravděpodobně inaktivovány a transportovány do vakuol k uskladnění (Vaca et al., 2017). Přirozeným derivátem BA, u kterého

došlo k inkorporaci BA je benzoyl malát, který se vyskytoval ve značné koncentraci i v kontrolní rostlině neošetřené prekurzory. Mezi zajímavé metabolity, u kterých došlo k inkorporaci *tCA*, jsou derivát scopoletinu (*m/z* 606,1639; ES+) a hexosylrhamnosyl-scopoletin (též rhamnosylscopolin) (*m/z* 707,1814; ES-). Jde o deriváty kumarinu, což je látka odvozená od kyseliny *ortho*-kumarové. Prekurzorová *tCA* zde byla pravděpodobně hydroxylována a následně byl propanový postranní řetězec izomerován na *cis* formu, aby mohlo dojít k cyklizaci. V *Arabidopsis* je scopolin syntetizován při osmotickém stresu v kořenech a při nízké teplotě v listech (Döll et al., 2018).



Obr. 3 Scopolin

Zatímco hydroxylace/methoxylace byla běžná u prekurzoru *tCA*, např. hexosid/hexosylester kys. ferulové (*m/z* 355,1033; ES-), u BA nebyla hydroxylace detekovaná u žádného metabolitu. To naznačuje, že hydroxybenzoové kyseliny nejsou biosyntetizovány postupnou hydroxylací BA, a tedy analogicky ke vzniku kyselin hydroxyskořicových. Současně nebyl detekovaný vznik benzoových kyselin z *tCA* ani skořicových kyselin z BA. Tyto indicie naznačují, že v ovsu nejsou benzoové kyseliny biosyntetizovány zkrácením C_3 řetězce kyseliny skořicové jako např. v *Arabidopsis*, ale spíše přes intermediáty šikimátové dráhy.

Téměř všechny metabolity s pozměněným izotopovým profilem byly detekovány v kořeni. Při studiu inkorporace byly kořínky ovsa ošetřeny prekurzorovou látkou po dobu 72 h, což nejspíš nebyla dostatečně dlouhá doba pro transport prekurzorů nebo metabolitů do děložních lístků (nadzemní části). Jediný metabolit detekovaný v děložních lístcích a obsahující prekurzor byl benzoyl malát. Je ale také možné, že rostlina cizorodé látky primárně metabolizuje v kořeni, a i jejich metabolity v kořeni uskládá. Benzoyl malát je však v ovsu přítomen přirozeně, a proto mohl být distribuován i do jiných orgánů.

V tabulce 11 je shrnut přehled některých doposud provedených inkorporačních studií zabývajících se biosyntézou benzoových/skořicových kyselin v různých rostlinách. Ve studiích byly analyzovány např. SA, BA, *tCA*, kyselina gallová nebo L-Phe za využití různých izotopově nebo radioaktivně značeného prekurzorů. Pro experimenty byly voleny jak modelové rostliny (tabák,

Arabidopsis, okurka), tak i méně známí zástupci rostlinné říše (např. škumpa orobincová). Všechny rostliny v dohledných experimentech jsou však dvouděložné. Jednoděložný oves doposud pro inkorporační studie fenolických kyselin použit nebyl.

Tab. 11 Přehled vybraných inkorporačních studií metabolismu fenolických látek v rostlinách (popř. houbách), kde prekurzor je látka aplikovaná na modelový organismus a studovaný metabolit je látka, do které se prekurzor inkorporoval.

Prekurzor	Modelový organismus	Studovaný metabolit	Metoda	Autor
[¹⁴ C] SA	různé druhy rostlin	2,3-DHBA, kys. gentisová	?	Ibrahim & Towers, 1959
[1- ¹³ C] glukosa, [U- ¹³ C ₆] glukosa	houba <i>Phycomyces blakesleeanus</i> , škumpa orobincová	kys. gallová	NMR	Werner et al., 1997
[¹⁴ C] SA	různé druhy rostlin	2,3-DHBA; kys. gentisová	NMR	Shulaev et al, 1997
[² H ₆ , ¹⁸ O] kyselina 3-hydroxy-3-fenylpropanová	okurka, tabák	BA, SA	GC-MS	Jarvis et al., 2000
[² H ₅] Phe	<i>Petunia hybrida</i> cv Mitchell	BA	GC-MS, LC-MS	Boatright et al., 2004
[¹⁴ C] BA, [¹⁴ C] tCA, [¹⁴ C] Phe	prvosienka bezlodyžná, libavka poléhavá	SA, BA, kys. kumarová	NMR	Chen et al., 2009
[¹⁴ C] tCA, [¹⁴ C] Phe	tabák, okurka	SA, BA	NMR	Chong et al, 2001
[7- ¹⁴ C] SA	sója	kys. gentisová, MeSA, SAG	TLC, HPLC	Dean et al., 2003
[1- ¹³ C] glukosa	barvínek růžový	SA	NMR	Mustafa et al., 2009
[7- ¹⁴ C] SA	tabák	SAG, MeSA, MeSAG	HPLC kapalinová scintilační spektrometrie	Dean et al., 2004 a 2005
[² H] SA	<i>Arabidopsis</i>	2,3-DHBA; pentosid a 3-O-β-D-xyloside kyseliny gentisové	HPLC-MS	Bartsch et al., 2010
[¹⁴ C] MeSA	tabák	SA	HPLC, kapalinová scintilační spektrometrie	Dean & Delaney, 2008
[¹³ C ₆] CA, [² H ₅] BA, [² H ₆] CA, [¹³ C ₆] salicylaldehyd a další	topol černý	salicortin, salicilin, fenolické glykosidy	HPLC-MS	Babst et al., 2010

6. Závěr

Teoretická část této bakalářské práce shrnuje biosyntetické cesty a metabolizace skořicových a benzoových kyselin v rostlinách. Na teoretickou část je navázáno v experimentální části, kdy byla pomocí izotopicky značených prekurzorů a diferenční LC-MS/MS analýzy zkoumána metabolizace kyselin benzoové (BA) a *trans*-skořicové (*tCA*) v ovsu setém. V první fázi experimentu byly analyzovány benzoové a skořicové kyseliny a jejich deriváty, které se v ovsu vyskytují přirozeně. Bylo zjištěno, že majoritní fenolické kyseliny jsou konjugované s dalšími látkami, např. hexosou nebo malátem. Nečekaným zjištěním byla detekce sulfatovaných derivátů BA a *tCA*. U těchto sulfatovaných metabolitů se ale v druhé fázi experimentu nepodařilo prokázat inkorporaci aplikovaných prekurzorů. Inkorporaci se podařilo prokázat u 18 metabolitů detekovaných téměř výhradně v kořenech. Bylo zjištěno, že metabolity odvozené od *tCA* jsou typicky hydroxylovány/methoxylovány a konjugovány, např. s hexosou (např. hexosidy/hexosylestery kyselin kávové a ferulové). Naproti tomu po aplikaci BA nebyl detekován žádný hydroxylovaný derivát, ale výhradně konjugáty (estery). Současně nebyl detekován žádný derivát kyseliny benzoové, jehož prekurzorem by byla *tCA*. Tyto výsledky naznačují, že benzoové kyseliny jsou v ovsu pravděpodobně biosyntetizovány z meziproductů šikimátové dráhy spíše než zkracováním propanového řetězce skořicových kyselin.

Použitá literatura

1. Adámková, Š., Luhová, L., Petřivalský, M., & Peč, P. (2006). Role L-fenylalaninamoniumlyasy při obranné reakci rostlin. *Chemické Listy*, 100, 486-494.
2. Åman, P., & Graham, H. (1986). Mixed-linked β -(1-3),(1-4)-D-glucans in the cell walls of barley and oats – chemistry and nutrition. *Nutrition Reports International*, 34, 1089-1096.
3. Asp, N. G., Mattsson, B., & Önning, G. (1999). Variation in dietary fibre, β -glucan, starch, protein, fat and hull content of oats grown in Sweden. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, 31-37.
3. Baek, D., Pathange, P., Chung, J. S., Jiang, J., Gao, L., Oikawa, A., Hirai, M. Y., Saito, K., Pare, P. W., & Shi, H. (2010). A stress-inducible sulphotransferase sulphonates salicylic acid and confers pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell & Environment*, 33(8), 1383-92.
4. Basset, G., Quinlivan, E. P., Ziemak, M. J., Díaz de la Garza, R., Fischer, M., Schiffmann, S., Bacher, A., Gregory, III, J. F., & Hanson, A. D. (2002). Folate synthesis in plants: The first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12489–12494.
5. Block, A., Widhalm, J. R., Fatihi, A., Cahoon, R. E., Wamboldt, Y., Elowsky, C., Mackenzie, S. A., Cahoon, E. B., Chapple, C., Dudareva, N., & Basset, G. J. (2014). The Origin and Biosynthesis of the Benzenoid Moiety of Ubiquinone (Coenzyme Q) in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(5), 1938–1948.
6. Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C. M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D., & Dudareva, N. (2004). Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in Petunia Petal Tissue. *Plant Physiology*, 135(4), 1993–2011.
7. Boczkowska, M., Podyma, W., & Łapiński, B. (2016). Genetic and Genomic Resources for Grain Cereals Improvement. Mohar Singh and Hari D. Upadhyaya: 4- Oat; 159–225.
8. Bowles, D., & Lim, E. (2010). Glycosyltransferase of small molecules: their roles in plant biology. *Encyclopedia of Life Science (eLS)*, John Wiley, Chichester, England, pp. 1-10, <http://www.els.net/WileyCDA/>
9. Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E. K., & Poppenberger, B. (2005). Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(3), 254-63.
10. Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E., & Métraux, J. P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*, 582(4), 473-8.
11. Collins, F. W., McLachlan, D. C., & Blackwell, B.A. (1991). Oat phenolics Avenaluminic acids, a new group of bound phenolic acids from oat groats and hulls. *Cereal Chemistry*, 68, 184-189.
12. Comisso, M., Strazzer, P., Toffali, K., Stocchero, M., & Guzzo, F. (2013). Untargeted metabolomics: an emerging approach to determine the composition of herbal products, *Computational and Structural Biotechnology*. Research Network of Computational and Structural Biotechnology, 4(5), 1–7.
13. Davidson, M. H. (1999). The hypocholesterolemic effects of beta-glucan in oatmeal and oat bran. *J. Clinical Nutrition*, 70, 208-212.

14. Dean, J. V., & Delaney, S. P. (2008). Metabolism of salicylic acid in wild type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum*, 132(4), 417-425.
15. Dean, J. V., & Mills, J. D. (2004). Uptake of salicylic acid 2-O- β -D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiologia plantarum*, 120, 603-612.
16. Dean, J. V., Mohammed, L. A., & Fitzpatrick, T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 221, 287–296.
17. Dean, J. V., Shah, R. P., & Mohammed, L. A. (2003). Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean cell suspension cultures. *Physiologia Plantarum*, 118, 328–336.
18. Del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2017). Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3084-3103.
19. Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2012). SOS – too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, 17, 538–545.
20. Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2017). How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology*, 15(1), 1–11.
21. Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., & Klessig, D.F. (2011). Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *Arabidopsis Book* 9, e0156.
22. Dewick, P.M. (2009). The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 5. vydání, pp. 137–186., <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470742761.ch4>
23. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>
24. Drug Bank, <https://www.drugbank.ca/drugs/>
25. Durkee, A.B., & Thivierge, P.A. (1977). Ferulic acid and other phenolics in oat seeds (*Avena sativa* L. var Hinoat). *Journal of Food Science.*, 42, 551–552.
26. Dvořáková, P., Hernychová, L., & Vojtěšek, B. (2014) Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klinická Onkologie*, 27 (1), 104-109.
27. Emmons, C. L., Peterson, D. M., & Paul, G. L. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 4894-8.
28. Eykman, J. F. (1885). Sur les principes constituants de *Illicium religiosum* (Sieb.) (Shikimi-no-ki en japonais) *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas*, 4(2), 32–54.
29. Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 20 (41), No. 3, 152–157.
30. Gaisser, S. & Heide, L. (1996) Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*. *Phytochemistry*, 41, 1065-1072.

31. Gajdošová, A., & Štrudlík, E. (2004). Biologické, chemické a nutrično-zdravotné charakteristiky pekárskycvh cerealií. *Nova Biotechnologica.*, VI-1, 133 – 154.
32. Gehring, A. M, Bradley, K. A, & Walsh, C. T. (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*, 36, 8495-8503.
33. Gidda, S. K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., & Varin, L. (2003). Biochemical and Molecular Characterization od Hydroxyjasmonate Sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *The journal of biological chemistry*, 278(20), 17895-17900.
34. Gross, J., Cho, W. K., Lezhneva, L., Falk, J., Krupinska, K., Shinozaki, K., Seki, M., Herrmann, R. G., & Meurer, J. (2006). A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. *The journal of biological chemistry*, 281(25), 17189-96.
35. Harrison, A. J., Yu, M., Gårdenborg, T., Middleditch, M., Ramsay, R. J., Baker, E. N., & Lott, J. S. (2006). The structure of MbtI from *Mycobacterium tuberculosis*, the first enzyme in the biosynthesis of the siderophore mycobactin, reveals it to be a salicylate synthase. *Journal of Bacteriology*, 188, 6081–6091.
36. Hoffman, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass spektrometry*. 3. vydání, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England
37. Holčapek, Jirásko, R., Lísa, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography-mass spektrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1259, 3-15.
38. Holčapek, M., Volná, K., & Vaněrková, D. (2007). Effects of functional groups on the fragmentation of dyes in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spektra. *Dyes and Pigments*, 75, 156–165.
39. Hudnall, P. M. (2000). Hydroquinone. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/14356007>
40. Chen, J., Xie, J., Jiang, Z., Wang, B., Wang, Y., & Hu, X. (2011). Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene*, 30, 4297–4306.
41. Chen, X., Li, M., Zhou, L., Shen, W., Algasan G., Fan, Y., & Wang, Z. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving shikimate synthesis from glucose. *Bioresource Technology*, 166, 64-71.
42. Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4, 493–496.
43. Choi, Y., S. (2012). Reaching for the depp proteome: recent nano liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry-based studies on the deep proteome. *Archives of pharmacal research*, 35(11), 1861-1870.
44. Ibdah, M., Chen, Y., Wilkerson, C.G., & Pichersky, E. (2009). An aldehyde oxidase in developing seeds of *Arabidopsis* converts benzaldehyde to benzoic acid. *Plant Physiology*, 150, 416–423.
45. Internetový článek: Targeting the Untargeted, by McLean, J. A., <https://theanalyticalscientist.com/issues/0614/targeting-the-untargeted/>, staženo 15.3.2018

46. Bussell, J. D., Reichelt, M., Wiszniewski, A. A. G., Gershenzon, J., Smith S. M. (2014). Peroxisomal ATP-binding cassette transporter COMATOSE and the multifunctional protein abnormal INFLORESCENCE MERISTEM are required for the production of benzoylated metabolites in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, 164, 48-54.
47. Kerbarh, O., Chirgadze, D. Y., Blundell, T. L., & Abell, C. (2006). Crystal structures of *Yersinia enterocolitica* salicylate synthase and its complex with the reaction products salicylate and pyruvate. *Journal of Molecular Biology*, 357, 524–534.
48. Klempien, A., Kaminaga, Y., Qualley, A., Nagegowda, D. A., Widhalm, J. R., Orlova, I., Shasany, A. K., Taguchi, G., Kish, C. M., Cooper, B. R., D’Auria, J. C., Rhodes, D., Pichersky, E., & Dudareva, N. (2012). Contribution of CoA Ligases to Benzenoid Biosynthesis in Petunia Flowers. *The Plant Cell*, 24(5), 2015–2030.
49. Klouda, P. (2003). *Moderní analytické metody*. Druhé, upravené a doplnné vydání, pp. 10-32., Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, Česká republika
50. Korkina, L. G. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology*, 53(1), 15-25.
51. Kurth, C., Welling, M., & Pohnert, G. (2015). Sulfated phenolic acids from *Dasycladales siphonous* green algae. *Phytochemistry*, 117, 417–423.
52. La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffman, L., Frittig, B., Legrand, M., & Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contribution of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews*, 198, 267-284.
53. Lee, H. I., & Raskin, I. (1999). Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: Salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *The journal of biological chemistry*, 274(51), 36637-42.
54. León, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M. A., & Raskin, I. (1995). Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Plant Biology* 92, 10413-10417.
55. Lim, E. K., Doucet, C. J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S. P., Ross, J., & Bowles, D. J. (2002). The Activity of *Arabidopsis* Glycosyltransferases toward Salicylic Acid, 4-Hydroxybenzoic Acid, and Other Benzoates. *The journal of biological chemistry*, 277, 586-592.
56. Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 73–105.
57. Macholán, L. (2003). *Sekundární metabolity*, 2., doplňující vydání, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika
58. Manz, A., Dittrich, P. S., Pamme, N., & Iossifidis, D. (2015) *Bioanalytical chemistry*, 2. vydání, Imperial College Press, London, UK
59. Metlin, https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage

60. Muir, R. M., Ibáñez, A. M., Uratsu, S. L., Ingham, E. S., Leslie, C. A., McGranahan, G. H., Batra, N., Goyal, S., Joseph, J., Jemnis, E. D., & Dandekar, A. M. (2011). Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). *Plant Molecular Biology*, 75(6), 555–565.
61. Mulsilová, J., & Glatz, Z. (2011). *Metabolimika – základní pojmy, strategie a metodologie*, Chemické Listy, 105, 745–751.
62. Multari, S., Pihlava, J.-M., Ollenu-Chuasam, P., Hietaniemi, V., Yang, B., & Suomela, J.-P. (2018). Identification and Quantification of Avenanthramides and Free and Bound Phenolic Acids in Eight Cultivars of Husked Oat (*Avena sativa* L) from Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (11), 2900–2908.
63. Niemetz, R., & Gross, G.G. (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*, 66(17), 2001-11.
64. Ogawa, D., Nakajima, N., Sano, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kanna, M., Ioki, M., Kamada, H., & Saji, H. (2009). Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. *Plant and Cell Physiology*, 46, 1062–1072.
65. Okrent, R. A., Brooks, M. D., & Wildermuth, M.C. (2009). *Arabidopsis* GH3.12 (PBS3) conjugates amino acids to 4-substituted benzoates and is inhibited by salicylate. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 9742–9754.
66. Ossipov, V., Salminen, J.-P., Ossipova, S., & Pihlaja, K. (2003). Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(1), 3-16.
67. Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D. F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), 113-6.
68. Paul, P., Suwan, J., Liu, J., Dodrick, J. S., & Linhardt R. J. (2012). Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(6), 1491-1500.
69. Payne, R., & Edmonds, M. (2005). Isolation of shikimic acid from star aniseed. *Journal of Chemical Education*, 82(4), 599–600.
70. Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, 228, 127-134.
71. Pelludat, C., Brem, D., & Heesemann, J. (2003). Irp9, encoded by the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*, is able to convert chorismate into salicylate, the precursor of the siderophore yersiniabactin. *Journals of Bacteriology*, 185, 5648–5653.
72. PubChem, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>
73. Qualley, A. V., Widhalm, J. R., Adebisin, F., Kish, C. M., & Dudareva, N. (2012). Completion of the core β -oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 16383-8.
74. Renger, A., & Steinhart, H. (2000). Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fiber. *European Food Research and Technology*, 211, 422–428.
75. Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, Unit30.2.

76. Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 317-43.
77. Serino, L., Reimann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P., & Haas, D. (1995). Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular & General Genetics*, 249, 217-228.
78. Shulaev, V., Silverman, P., & Raskin, I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385, 718-721.
79. Sosulski, F., Krygier, K., & Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 337-340.
80. Summer, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., 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 Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*, 3, 211-221.
81. Suza, W. P., Rowe, M. L., Hamberg, M., & Staswick, P. E. (2010). A tomato enzyme synthesizes (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine in wounded leaves. *Planta*, 231, 717-728.
82. Tateoka, T.N. (1968). Formation of protocatechuic acid from 5- dehydroshikimic acid in the extract of mung bean seedling. *The Botanical magazine*, 81, 103-104.
83. The Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/metabolites/>
84. The Metabolomics Society, <http://metabolomicssociety.org>
85. Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., & Fernie, A. R. (2013). Shikimate and Phenylalanine Biosynthesis in the Green Lineage. *Frontiers in Plant Science*, 4, 62.
86. Tříška, J. (1979). *Evropská flóra*. Artia, Praha, Česká republika, pp. 170
87. Tzin, V. and Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. In K. Torii (Ed.) *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, e0132.
88. Taiz, L., & Zeigler, E. (2010). *Plant Physiology*. 5th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates
89. Uppalapati, S. R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B. N., Anand, A., Mysore, K. S., & Bender, C. L. (2007). The Phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 20, 955-965.
90. Vaca, E., Behrens, C., Theccanat, T., Choe, J. Y., & Dean, J. V. (2017). Mechanistic differences in the uptake of salicylic acid glucose conjugates by vacuolar membrane-enriched vesicles isolated from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 161(3), 322-338.
91. Van Moerkercke, A., Schauvinhold, I., Pichersky, E., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2009). A plant thiolase involved in benzoic acid biosynthesis and volatile benzenoid production. *Plant Journal*, 60(2), 292-302.

92. Van Tegelen, L. J. P., Moreno, P. R. H., Croes, A. F., Verpoorte, R., & Wullems, G. J. (1999a). Purification and cDNA cloning of isochorismate synthase from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*, 119, 705–712.
93. Velíšek, J., & Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin I. Osis – Ing. Václav Šedivý*, 3. vydání, Tábor, Česká republika, pp. 227.
94. Velíšek, J., & Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin II. Osis – Ing. Václav Šedivý*, 3. vydání, Tábor, Česká republika, pp. 59-60 & 150.
95. Verberne, M.C., Budi Muljono, R.A., & Verpoorte, R. (1999). Salicylic acid biosynthesis. In: Hooykaas P.P.J., Hall M.A., Libbenga K.R., editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science B.V., Amsterdam; The Netherlands, pp. 295–314.
96. Vicente, M. R., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321-3338.
97. Villa, F., Albanese, D., Giussani, B., Stewart, P. S., Daffonchio, D., & Cappitelli, F. (2010). Hindering biofilm formation with zostric acid. *Biofouling*, 26(6), 739-752.
98. Viant, M. R., Kurland, I. J., Jones, M. R., & Dunn, W. B. (2017) How close are we to complete annotation of metabolomes? *Current Opinion in Chemical Biology*, 36, 64–9.
99. Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2-20.
100. Vlot, A.C., Dempsey, D.A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177-206.
101. Vojtaššáková, A., Kováčiková, E., Simonová, E., & Holčíková, K. (1999). *Obilniny a strukoviny. Potravinové tabučky. VÚP*, pp. 268.
102. Wang, G. W., Hu, W. T., Huang, B. K., & Qin, L. P. (2011). *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(1), 10–20.
103. Welling, M., Ross, C., & Pohnert, G. (2011). A desulfatation-oxidation cascade activates coumarin-based cross-linkers in the wound reaction of the giant unicellular alga *Dasycladus vermicularis*. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 7691-7694.
104. Widhalm, J. R., & Dudareva N. (2015). A Familiar Ring to It: Biosynthesis of Plant Benzoic Acids. *Molecular Plant*, 8(1), 83-97.
105. Widhalm, J. R., Ducluzeau, A.-L., Buller, N. E., Elowsky, C. E., Olsen, L. J., & Gilles, J. C. (2012). Phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis in plants: two peroxisomal thioesterases of *Lactobacillales* origin hydrolyze 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coa. *The Plant Journal*, 71, 205-215.
106. Wildermuth, M. C. (2006). Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Current Opininn in Plant Biology*, 9(3), 288-96.
107. Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562-565.
108. Woodward A.W., & Bartel B. (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95, 707-735.
109. Yu, L. L., Haley, S., Perret, J., Harris, M. (2002). Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. *Food Chemistry*, 78: 457–461.

110. Yuan, Y., Chung, J.-D., Fu, X., Johnson, V. E., Ranjan, P., Booth, S. L., Harding, S. A., & Tsai, C.-J. (2009). Alternative splicing and gene duplication differentially shaped the regulation of isochorismate synthase in *Populus* and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 22020–22025.
111. Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P.E., Wang, M., Zhu, Y., & He, Z. (2007). Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiology*, 145, 450-464.
112. Zhang, K., Halitschke, R., Yin, C., Liu, C., & Gan, S. (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 14807-14812.
113. Zucko, J., Dunlap, W. C., Shick, J. M., Cullum, J., Cercelet, F., Amin, B., Hammen, L., Long, P.F., Lau, T., Williams, J., & Hranueli, D. (2010). Global genome analysis of the shikimic acid pathway reveals greater gene loss in host-associated than in free-living bacteria. *BMC Genomics*, 11, 628.
114. *Dasycladus vermicularis* obrázek, <http://www.projectnoah.org/spottings/2005286002>, staženo 25.12.2017
115. *Zostera marina* obrázek, <https://www.nature.com/articles/nature16548/figures/1>, staženo 25.12.2017
116. Liebler, D. C. (2004). Shotgun mass spec goes independent. *Nature methods*, 1(1), 16–17.