

Priama analýza zloženia rastlinných pletív hmotnostnou spektrometriou

DIZERTAČNÁ PRÁCA

Autor:
Študijný program:
Vedúci práce:

Mgr. Monika Zajacová Cechová
Analytická chemie
doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2020

Prehlasujem, že som túto dizertačnú prácu vypracovala samostatne a pod odborným dohľadom vedúceho dizertačnej práce pána doc. RNDr. Petra Bednáře, Ph.D. Všetky použité podklady a literatúra sú uvedené v zozname referencií na konci práce.

V Olomouci dňa

Podpis autorky

Pod'akovanie

Na tomto mieste sa chcem poďakovať svojmu školiteľovi doc. RNDr. Petru Bednářovi, PhD. za trpezlivosť, za mnoho cenných rád, kritických pripomienok a odbornú pomoc nielen pri písaní tejto dizertačnej práce, ale aj počas celého doktorského štúdia. Ďakujem aj doc. Ing. Petru Smýkalovi, PhD. a ďalším kolegom z Katedry botaniky Univerzity Palackého, ktorí sa podieľali na spoluriešení problematiky dormancie hrachu a poskytovali dostatok materiálu. Ďakujem aj prof. Ing. Vladimírovi Havlíčkovi, PhD. a Mgr. Dominike Luptákovéj, PhD., ktorí umožnili doplnkové meranie povrchu osemenia na prístroji Bruker Solarix 12T FTMS. Táto práca mohla vzniknúť tiež vďaka podpore Grantovej agentury České republiky, projektu: 19-07155S (Identifikace regulačních sítí kontrolujících vývoj osemení hrachu pomocí RNA sekvenování, proteinové a metabolické analýzy).

V neposlednom rade ďakujem tiež svojmu manželovi Milanovi za neustálu podporu, trpezlivosť a drobné ústupky zo spoločných aktivít, ktoré boli neraz nutné pri bádání v laboratóriu, svojej rodine a priateľom za rozptýlenie a povzbudenie počas štúdia, a všetkým ostatným kolegom z Katedry analytickej chemie Univerzity Palackého sa priateľské pracovné prostredie a pomoc pri riešení problémov s technikou.

Zhrnutie:

Táto dizertačná práca je zameraná na štúdium chemického zloženia osemenia hrachu siateho (*Pisum sativum*) a interpretáciu získaných dát v kontexte fyzikálnej dormacie semien. Okrem toho bola zameraná pozornosť aj na štúdium chemických zmien v osemeni hrachu siateho po simulácii teplotného cyklovania semien.

Úvod dizertačnej práce v krátkosti poukazuje na význam dormacie semien v prírode a jej nežiadúce pôsobenie v poľnohospodárstve. V teoretickej časti sú zhrnuté techniky, ktoré boli do dnešnej doby využité v analýze rastlinných pletív. Podrobnejšie sú diskutované metódy, ktoré boli zamerané na analýzu rastlinných pletív v osemeni. V tejto časti je tiež prehľadne predstavená stavba osemenia u strukovín a problematika fyzikálnej dormacie a jej regulácie (zameranej najmä na vplyv teploty na chemické zmeny v osemeni).

V experimentálnej časti boli vyvinuté metódy pre analýzu povrchov osemení hrachu založených na hmotnostnej spektrometrii s (matricou asistovanou) laserovou desorpciou/ionizáciou ((MA)LDI-MS) a s ionizáciou priamou sondou pre analýzu pevných látok za atmosferického tlaku (ASAP-MS). Boli optimalizované experimentálne parametre a preštudované možnosti využitia iónovo mobilnej separácie pre identifikáciu látok. Tieto metódy boli aplikované na analýzu semien šiestich vybraných odrôd hrachu siateho, troch dormantných (D) a troch nedormantných (N). Jednalo sa o dormantné (divoké) semená druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* (genotypy JI64, VIR320, L100) a semená nedormantného (kultúrneho) hrachu *Pisum sativum* subsp. *sativum* (genotypy JI92, Cameor, Terno). Následne boli experimenty rozšírené aj o analýzu RIL línií (rekombinantne krížené línie) hrachu siateho, získané vzájomným krížením genotypov JI64 a JI92. Pre štúdium distribúcie analytov na povrchu osemení bolo využité aj hmotnostno spektrometrické zobrazovanie. ASAP-MS bola na priamu analýzu povrchu semien strukovín použitá prvýkrát. (MA)LDI-MS a ASAP-MS v kombinácii s viacrozmernými štatistickými metódami, PCA a OPLS-DA, umožnili meraním osemení zrelých semien klasifikáciu (rozlíšenie) dormantných a nedormantných genotypov hrachu. Týmito technikami boli nájdené markery so signifikantným signálom pre dormantné genotypy hrachu, a to hydroxylované a nasýtené vyššie mastné kyseliny.

V závere experimentálnej časti je riešená problematika zameraná štúdiom chemických zmien v osemeni hrachu po simulovanom teplotnom cyklovaní (periodické zmeny znižovania a zvyšovania teploty, konkrétne na teploty 25 a 60°C). V tejto štúdií bola pozornosť zameraná na dva vybrané genotypy T14/5 (číselný kód 86) a P016 (číselný kód 17), ktoré boli analyzované pomocou techník infračervenej spektroskopie (ATR-FTIR) a hmotnostnej spektrometrie s využitím laserovej desorpsie/ionizácie (LDI-MS) a tiež v spojení s kvapalinovou chromatografiou (LC/ESI-MS). Bolo zistené, že genotypy po teplotnom cyklovaní variujú v obsahu niektorých látok oproti svojim kontrolám. V genotype 86 bol detekovaný vyšší obsah galokatechínu a diméru galokatechínu po teplotnom cyklovaní. Pri genotype 17 bol po cyklovaní pozorovaný pokles obsahu saponínu (chromosaponínu I). Tieto látky sa môžu podieľať na regulácii dormancie u týchto semien.

Techniky LDI-MS a ASAP-MS predstavujú užitočný nástroj v priamej analýze rastlinného materiálu a umožňujú detailnú analýzu profilu mastných kyselín v povrchových vrstvách rastlinných pletív bez nutnosti extrakcie semena rozpúšťadlami, ktorá je pracná a môže byť zdrojom chýb (napr. vznikom nežiadúcich artefaktov, malým extrakčným výťažkom apod.). Veľkou výhodou vyvinutej ASAP-MS techniky je možnosť analyzovať zloženia osemenia na celých kompaktných a neporušených semenách.

Summary:

This dissertation thesis is focused on the study of the chemical composition of *Pisum sativum* and on the interpretation of obtained data in the context of physical dormancy of seeds. In addition, the attention was also focused on the investigation of chemical changes in pea seeds after temperature cycling simulation.

The importance of seed dormancy in the nature and its undesirable features in agricultural field is described in the Introduction. The techniques that have been performed to date in the analysis of plant tissues are summarized as well. Techniques used in the seed coat analysis are also discussed in more details. In this part, the structure of seed coat from legumes and the issue of physical dormancy and its regulation (including the influence of temperature) are also presented.

In the experimental part, methods for the analysis of seed coat surface utilizing mass spectrometry with (matrix assisted) laser desorption / ionization ((MA)LDI-MS) and Atmospheric Solid Analysis Probe (ASAP-MS) were developed. The experimental parameters were optimized and the possibilities of using ion mobility separation for marker identification were investigated. These methods were applied to the analysis of seeds from six selected varieties of pea, three dormant (D) and three nondormant (N). Dormant (wild) seeds *Pisum sativum* subsp. *elatius* (genotypes JI64, VIR320, L100) and nondormant (cultivated) seeds *Pisum sativum* subsp. *sativum* (genotypes JI92, Cameor, Terno) were studied. Subsequently, the experiments were extended by analysis of RIL lines (recombinant cross lines) of pea, obtained with breeding of JI64 and JI92 genotypes. Mass spectrometric imaging was used to study the distribution of analytes on the seed coat surface. ASAP-MS was used for the direct analysis of legume seed coat surface for the first time. (MA)LDI-MS and ASAP-MS in combination with multidimensional statistics, PCA and OPLS-DA, allowed to classify dry and mature seeds with respect to dormancy (separate them into dormant and nondormant group). These techniques revealed markers with significant signal for dormant pea genotypes, namely hydroxylated and saturated very long chain fatty acids.

Besides, chemical changes in the pea seed coats after thermal cycling were investigated. In this study, the attention was focused on genotype T14/5 (code number 86) and P016 (code number 17), that were analyzed using infrared spectroscopy (ATR-FTIR), laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) and

chromatography/mass spectrometry (LC/ESI-MS). It was revealed that genotypes after thermal cycling vary significantly in the content of some substances compared to their controls. In genotype 86, a higher content of gallic catechin and gallic catechin dimer was detected after thermal cycling. In genotype 17, a decrease in saponin (chromosaponin I) content was observed after thermal cycling. These substances may be involved in the regulation of dormancy in these seeds.

LDI-MS and ASAP-MS techniques represent a useful tool in direct analysis of plant material and allow detailed analysis of the fatty acid profile in the surface layers of plant tissues without the solvent extraction of the seeds, that is laborious and can be a source of errors (e.g. a great advantage of the developed ASAP-MS technique is the ability to analyze the composition of the seed coat on intact seeds).

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická časť	2
2.1 Úvod do analýzy rastlinných pletív	2
2.2 Analytické techniky využívané pri výskumu rastlinného materiálu.....	3
2.2.1 Elektroanalytické metódy (voltametria)	3
2.2.2 Mikroskopia atomárnych síl (AFM).....	4
2.2.3 Spektrálne metódy	5
2.3 Analýza osemenia	14
2.3.1. Ambientná hmotnostná spektrometria s priamou sondou v analýze rastlinného materiálu.....	19
2.4. Dormancia semien a jej charakterizácia.....	20
2.4.1 Fyzikálna dormancia a osemenie strukovín	21
2.4.1 Dormancia semien a jej regulácia	24
3. Ciele dizertačnej práce.....	26
4. Experimentálna časť	27
4.1 Chemikálie.....	27
4.2 Prístroje	27
4.3 Rastlinný materiál	28
4.4 Príprava vzoriek pre jednotlivé typy analýz.....	29
4.4.1 LDI a MALDI-MS meranie	29
4.4.2 ASAP-MS meranie.....	30
4.4.3 ATR-FTIR meranie.....	35
4.4.4 LC/MS meranie	36
4.4.5 Analýza pomocou ESI-MS (priama infúzia).....	36
4.5 Optimalizácia parametrov merania a ich nastavenie	37
4.5.1 Podmienky pre LDI a MALDI-MS meranie	37
4.5.2 Podmienky pre hmotnostné zobrazovanie pomocou LDI-MS (MSI analýza)	38
4.5.3 Podmienky pre ASAP-MS meranie	38
4.5.4 Podmienky pri ESI-MS analýze.....	39
4.5.5 Podmienky pre iónovo mobilnú separáciu.....	40
4.5.6 Podmienky pre ATR-FTIR meranie.....	40
4.5.7 Podmienky pre LC-MS meranie	40

4.5.8	Vyhodnotenie LDI, MALDI-MS, ASAP-MS a LC-MS dát.....	41
5.	Výsledky a diskusia.....	43
5.1	Vývoj a optimalizácia metódy LDI-MS a MALDI-MS.....	43
5.2	Analýza osemenia hrachu siateho pomocou LDI-MS a MALDI-MS a zpracovanie dát pomocou PCA a OPLS-DA	50
5.2.1	Identifikácia biomarkerov v osemení hrachu siateho	61
5.2.2	Analýza osemenia rekombinantných linií hrachu pomocou LDI-MS a hmotnostno spektrometrického zobrazovania	70
5.3	Vývoj a optimalizácia ASAP-MS metódy	75
5.3.3.	Možnosti kvantifikácie biomarkerov v osemení hrachu siateho.....	79
5.4	Analýza osemenia hrachu siateho pomocou ASAP-MS a spracovanie získaných dát pomocou PCA a OPLS-DA.....	85
5.4.1	Identifikácia markerov nájdených pomocou techniky ASAP-MS.....	90
5.5	Porovnanie ASAP-MS a MALDI-MS.....	98
5.6	Analýza semien hrachu siateho pomocou ATR-FTIR.....	101
5.7	Štúdium chemických zmien v osemení vplyvom teplotného cyklovania	102
6.	Záver.....	114
	Zoznam skratiek	117
	Referencie	119

1. Úvod

Klíčivosť semien je kľúčovým krokom pri zachovaní a šírení jednotlivých druhov rastlín na Zemi. U rastlinných semien je v prírode bežné, že aj za priaznivých podmienok z nich vyklíči iba určitá časť. Ďalšia časť z nich v rovnakých podmienkach naopak klíčeniu nepodlieha, čo umožňuje rastlinnému druhu napríklad prežiť prípadné budúce nepriaznivé obdobia. Týmto sa zabezpečuje pokračovanie daného rastlinného druhu aj z dlhodobého hľadiska. Tento jav, počas ktorého životaschopné semienko nevstupuje do fázy klíčenia aj napriek optimálnym okolitým podmienkam, sa nazýva dormancia¹. U semien divokých druhov rastlín je dormancia významným faktorom prežívania druhu. Naopak, semená poľnohospodárskych plodín sú šľachtené tak, aby boli nedormantné a dochádzalo k jednotnému klíčeniu so zámerom získania veľkej produktivity v čo najkratšom čase.

Táto dizertačná práca je zameraná na štúdium chemického zloženia povrchovej vrstvy osemenia pomocou inštrumentálnych analytických metód, najmä vysokorozlišujúcou tandemovou hmotnostnou spektrometriou. Látky, ktorých obsah sa významne líšia medzi dormantnými a nedormantnými genotypmi daného rastlinného druhu, sa môžu podieľať na regulácii dormancie, napríklad ovplyvňovať permeabilitu vody a plynov skrz rastlinné osemenie smerom k embryu do vnútri semena (tj. princíp fyzikálnej dormancie)¹. Dormancia semien môže byť ovplyvňovaná tiež exogénnymi podmienkami (UV žiarenie, typ a vlastnosti pôdy, teplota, atď.). Preto bolo chemické zloženie osemenia analyzované aj po simulácii teplotného cyklovania, ku ktorému v prírode často dochádza.

Objektom záujmu sa stali semená hrachu siateho (*Pisum sativum*), ktorého význam v ľudskej strave je aj dnes nepostrádateľný. Hrach siaty je významným zástupcom zo skupiny strukovín a podľa FAO (Food and Agriculture Organization) patrí medzi najväčších producentov hrachu Kanada, Rusko, Čína, USA a Ukrajina. Rastúca svetová populácia, najmä v rozvojových krajinách, neustále poháňa dopyt po tejto komodite. Prehĺbenie poznatkov o látkach, ktoré by mohli ovplyvňovať jeho dormanciu, má význam nielen pre základný výskum a biológiu, ale aj pre poľnohospodárstvo a potravinársky priemysel.

2. Teoretická časť

2.1 Úvod do analýzy rastlinných pletív

Chemická analýza látok je v dnešnej dobe nenahraditeľný nástroj vo všetkých oblastiach života a metódy analytickej chémie nájdeme prakticky v každom odbore prírodných vied. Výnimkou nie je ani rastlinná biológia, v ktorej chemická analýza poskytuje dôležité informácie o rastlinách na molekulárnej úrovni.

Vo všeobecnosti je štúdium chemického zloženia rastlinných pletív veľmi obsiahlou kapitolou analytickej chémie a prináša dôležité poznatky pre biologické, biochemické, enviromentálne a ekologické odvetvia (pri objasňovaní procesov a zmien v rastlinách, napr. pri pôsobení exogénnych činiteľov), ako aj pre farmáciu (pri identifikácii a kvantifikácii terapeuticky významných substancií), pre potravinárske vedy a technológiu (hodnotenie nutrično a chuťovo významných látok), poľnohospodárstvo a biotechnológiu. V analytickej chémii tvorí významné odvetvie analýza organických látok, ktoré sa vyznačujú obrovskou rozmanitosťou. Túto rozmanitosť zároveň rozširujú procesy, ktorým sledované organické látky podliehajú (biotransformácia, premeny účinkom tepla a svetla). Chemická analýza vie poskytnúť informácie o distribúcii látok v rastlinných pletivách. Je užitočná pri objasňovaní ich štruktúry a biologickej funkcie. Nasledujúca kapitola v tejto dizertačnej práci bude zameraná na chemickú analýzu organických zlúčenín v rastlinných pletivách.

V rastlinnej fyziológii sú najčastejšie používané fytochemické analýzy zamerané na stanovenie rastlinných regulátorov rastu. Dôležitou súčasťou je aj stanovenie fytotoxínov a fytoalexínov (ich tvorba je odpoveďou na mikrobiálny/fungálny stress). Veľmi významná je aj analýza fytohormónov², alkaloidov³, fenolických glykozidov⁴ a mnohých ďalších látok⁵, ktoré sú ako signálne molekuly zodpovedné za defenzívu rastliny proti antagonistom⁵. Ďalej, rastlinné steroidy (phytoecdysteroidy⁶) alebo prchavé terpény zase môžu pôsobiť ako kýmne atraktanty, alebo repelenty pre hmyz⁷. Niektoré rastlinné metabolity zo skupiny prchavých terpénov (napr. cineol) sú produkované koreňmi a listami rastlín, čím sa bráni rastu iných druhov rastlín v ich okolí⁸. Chemická analýza bola zameraná aj na štúdie fosílného materiálu za účelom nálezu chemických látok pochádzajúcich z rastlín. Výskum fosílií ihličnanov z doby Eocénu a Miocénu ukázal, že vo fosílnom materiáli môžu byť zachované napríklad prekursori terpenoidov⁹⁻¹⁰. V literatúre sa

objavujú informácie aj o chemickej analýze odolných rastlinných biopolyméroch (kutín, algaenan, sporopollenín, lignín) vo fosílnom materiáli¹¹. Chemickou analýzou sa dá prispieť ku klasifikácii rastlín pokrývajúcich zemský povrch v minulosti. Na taxonomické účely sú najviac využívané profily flavonoidov, ale aj mnohých iných skupín zlúčenín ako sú alkaloidy, neproteínové aminokyseliny a terpény¹².

Je treba dodať, že pre získanie výsledkov dobre popisujúcich procesy prebiehajúce v rastlinných pletivách je veľmi dôležitý aj samotný výber rastlinných vzoriek, ich uskladnenie a dostatočný počet biologických a chemických opakovaní analytických meraní. Veľmi často je k analýze dostupné len malé množstvo rastlinného materiálu a analyty sú dostupné vo veľmi širokom rozsahu koncentrácií od majoritných až po stopové. Tieto aspekty je nutné zohľadniť pri vývoji analytických techník a postupov.

2.2 Analytické techniky využívané pri výskumu rastlinného materiálu

V priebehu času boli vypracované analytické metódy založené na technikách separačných, elektroanalytických i spektrálnych. Metódy založené na extrakcii a analýze separačnými metódami a ich kombinácii so spektrálnou detekciou sú v oblasti analýzy rastlinného materiálu štandardné. Ich možnosti a obmedzenia sú zhrnuté v prehľadových článkoch¹³⁻¹⁴. Cieľom nasledujúcej kapitoly je priblíženie problematiky analýzy rastlinných pletív priamymi technikami a tiež predstavenie látok, ktoré boli týmto spôsobom stanovené.

2.2.1 Elektroanalytické metódy (voltametria)

Mnohé techniky elektroanalytickej chémie boli použité na charakterizáciu chemických zlúčenín v rastlinných extraktoch z ich jednotlivých častí¹⁵⁻¹⁶. V nedávnej dobe sa však objavili elektrochemické práce s pokusmi o priamu elektrochemickú analýzu rastlinného materiálu. Veľmi zaujímavá je štúdia od G. Cebrián-Torrejóna a kol. (2016), v ktorej bola využitá voltametria v analýze canthin-6-onu, 5-methoxycanthin-6-onu (alkaloidov) a trans-avicennolu (derivát kumarínu), látok s antiproliferačným účinkom. Analýza bola prevedená v extrakte ale zároveň priamo v prášku pripravenom z rastlinného materiálu. Prášok bol imobilizovaný na sklenenej uhlíkovej elektróde. Po nanosení prášku bola elektróda vnorená do vodného pufru

(KH_2PO_4 s pH 7.00). Študovaný rastlinný materiál bol pripravený z listov, semien, plodov, koreňov a kôry z rastliny *Zanthoxylum chiloperone*¹⁷. Problémom voltametrickej analýzy pri priamej analýze prášku bola malá citlivosť. Signál uvedených elektroaktívnych látok bol znížený pravdepodobne kvôli veľkému množstvu nevodivých zložiek stále prítomných v rastlinných pletivách, ako je lignín, celulóza, prípadne proteíny. Ďalšia zaujímavá práca bola zameraná na získanie elektrochemického „fingerprintu“ okvetných lístkov zo 14 druhov rastlinného rodu *Lycoris* (čel'ad' amarylkovité), ktorý mal byť použitý na klasifikáciu jednotlivých druhov. Od predchádzajúcej práce sa táto štúdia odlišovala v tom, že k suspenzii obsahujúcej rastlinný materiál a extračné činidlo, bol pridaný vodivý grafén za účelom adsorpcie látok z extraktu a zároveň samotného rastlinného materiálu. Takto pripravená zmes bola nanosená na tenkovrstvovú elektródu pripravenú pomocou technológie sieťotlače (skratka SPE; z ang. screen-printed electrode) a pomocou diferenčne pulznej voltametrie (DPV) boli zaznamenané DPV voltamogramy takto pripravených vzoriek¹⁸. Získané DPV voltamogramy mali jedinečný profil pre každý druh. Postup však nedovoľuje analýzu jednotlivých elektrochemicky aktívnych látok, pretože ide o komplikovanú zmes látok akými sú fenoly, flavonoidy, alkaloidy, karotenoidy a betalainy a ďalšie.

2.2.2 Mikroskopia atomárnych síl (AFM)

Významnou technikou pri štúdiu povrchov je mikroskopia atomárnych síl (Atomic force Microscopy, AFM) poskytujúca vysokorozlišujúce zobrazovanie a tiež meranie mechanických vlastností rôzneho materiálu. AFM je tiež zaujímavým nástrojom na štúdium topografických vlastností intaktného alebo odpreparovaného rastlinného materiálu v nanometrovo meradle. Technika vyžaduje minimálnu prípravu vzorky (je možno pracovať bez fixácie, zmrazenia, dehydratácie alebo nanosenia kovového povlaku).

Výsledné mechanické vlastnosti bunkových stien a teda aj pletív závisia od chemického charakteru jednotlivých stavebných kameňov tvoriacich tieto bunkové steny. Závisia taktiež od priestorovej organizácie a vzájomnej interakcie týchto biopolymérov (napr. polysacharidov) v bunkových stenách¹⁹. S ohľadom na AFM techniku existuje niekoľko prací venovaných štúdiu mechanických vlastností bunkových stien, v ktorých sa však použili izolované rastlinné bunky²⁰⁻²¹. Ksenija

Radojič a kol. (2012) pomocou AFM potvrdili, že mechanické vlastnosti v bunkových stenách *Arabidopsis thaliana* súvisia so zmenou polysacharidov a lignínu v skúmaných bunkových stenách. Tento rastlinný materiál bol súčasne analyzovaný pomocou techniky FTIR²¹.

Je zrejmé, že meranie mechanických vlastností izolovaných buniek sa bude výrazne odlišovať od merania mechanických vlastností integrovaných buniek v rastlinnom pletive, prípadne ešte od buniek, ktoré sú súčasťou pletiva v živej rastline. V práci od L. Kozlovej a kol. (2019) boli pomocou AFM techniky skúmané priamo rastlinné pletivá v rôznych vývinových štádiách v pozdĺžnych a priečnych rezoch koreňa kukurice. Tuhosť bunkových stien u starších vývinových štádií bola vyššia ako u začiatkových štádií²². V tejto práci sa však bližšie nediskutovali látky, ktoré by boli z tohoto hľadiska významné.

2.2.3 Spektrálne metódy

K základným spektrálnym technikám používaným na prvkové stanovenie (napr. N, P, K, Ca, Na, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, B) v rastlinných pletivách patrí atómová absorpčná spektrometria (AAS), atómová emisná spektrometria s atomizáciou pomocou indukčne viazanej plazmy (ICP-AES), hmotnostná spektrometria s ionizáciou pomocou indukčne viazanej plazmy (ICP-MS), plameňová atómová absorpčná spektrometria (F-AAS), elektrotermická atómová absorpčná spektrometria (GF-AAS), röntgenová fotoelektronová spektroskopia (XPS) a röntgenová fluorescenčná spektroskopia (XRF). Vzhľadom na zameranie tejto práce smerom k organickým rastlinným metabolitom sú techniky prvkovej analýzy v rastlinnom materiáli uvedené len týmto krátkym vymenovaním. Podrobnejšie informácie sa dajú nájsť v prehľadovom článku od N. Bhandari a kol. (2018)²³. Nasledujúce kapitoly budú venované využitiu infračervenej a Ramanovej spektroskopie, nukleárnej magnetickéj rezonancii a nakoniec hmotnostnej spektrometrii v analýze rastlinného materiálu používaných predovšetkým pre analýzu organických látok.

2.2.3.1 Infračervená spektroskopia

K výhodám infračervenej spektroskopie (IR) v analýze rastlinného materiálu patrí rýchlosť analýzy, nedeštruktívnosť, ľahká použiteľnosť a nízke prevádzkové náklady. Nevýhodou IR v analýze rastlinného materiálu je veľký maticový efekt a nízka

selektivita látok v zložitých zmesiach. Veľmi rozšírenou technikou je infračervená spektroskopia v strednej oblasti (mid-IR, rozsah vlnočtu od 4000 do 400 cm^{-1}). Na štúdium chemického zloženia rastlinných pletív sa využíva najviac ATR technika (technika zoslabenej totálnej reflektancie, z ang. Attenuated Total Reflectance), ktorá je založená na princípe násobného úplného odrazu žiarenia na fázovom rozhraní meranej vzorky a merného kryštálu vyrobeného z materiálu s vysokým indexom lomu. Konvenčná IR spektroskopia môže poskytnúť len zmesné spektrum všetkých látok (častí molekúl) absorbujúcich v infračervenom svetle. Neposkytuje teda informácie o zastúpení jednotlivých látok, čo je hlavným limitom techniky pri jej využití pre charakterizáciu rastlinného materiálu²⁴. K štúdiu rastlinných pletív sa používa aj IR technika v blízkej oblasti (NIR, near-IR, rozsah vlnočtu od 13500 do 4000 cm^{-1}). Príkladom využitia tejto techniky je práca zameraná na analýzu vybraných prvkov v artičokách od A. Mir-Marqués a kol. (2016), kde je NIR predstavená zároveň ako alternatívna metóda k XRF spektroskopii na prvkové stanovenie v potravinách²⁵. Vzhľadom na nespočetné množstvo publikovaných prací, v ktorých je použitá táto technika v analýze rastlinného materiálu, budú ďalej diskutované v tejto kapitole len metódy používané v analýze strukovín a semien.

Na analýzu veľmi malých objektov a mikroštruktúr v rastlinnom materiáli je vhodná infračervená mikro(spektra)skopia. Infračervená mikrospektroskopia s Fourierovou transformáciou (FT-IRM) a infračervené zobrazovanie (FT-IR Imaging) kombinujú svetelnú mikroskopiu a infračervenú spektroskopiu. Svetelná mikroskopia sa používa na zväčšenie štruktúrnych detailov vo vzorkách, zatiaľ čo infračervená spektroskopia poskytuje informácie o type molekúl a funkčných skupinách prítomných vo vzorke. Príkladom využitia práve tohto usporiadania je práca F. J. Warrena a kol. (2015)²⁶. Ako vzorky boli v tejto práci študované semienka pšenice (*Triticum aestivum*) a listy rastliny *Arabidopsis*²⁶. Prehľad rastlinných vzoriek analyzovaných pomocou tejto techniky uvádza *Tabuľka 1*. Z tejto tabuľky je zrejmé, že v analýze rastlinného materiálu prevláda FT-IRM, ktorá bola najčastejšie volenou technikou pri analýze pletív stoniek a listov. V menšej miere bola táto technika použitá v analýze semien a ich osemenia.

Tabuľka 1. Prehľad techník infračervenej spektroskopie použitých v analýze rastlinného materiálu.

Autor práce	Rastlinný materiál	Technika	Ref.
A. M. Snith-Moritz a kol. (2015)	semená <i>Oryza sativa</i>	FT-IRM	[27]
F. J. Warren a kol. (2015)	semená pšenice, listy rastliny <i>Arabidopsis thaliana</i> po simulovanej digescii	FT-IRM FT-IR Imaging	[26]
S. Dinant a kol. (2019)	phloemové a xylémové pletivo zo stonky <i>Arabidopsis thaliana</i>	FT-IRM Ramanová mikrospektroskopia	[28]
A. Gorszsás a kol. (2011)	drevo z <i>Populus tremula</i>	FT-IRM	[29]
D. Öhman a kol. (2013)	stonka <i>Arabidopsis thaliana</i>	FT-IRM	[30]
J. Vongsvivut a kol. (2019)	listy eukalyptu	ATR-FTIRM	[31]
E. Silvester a kol. (2018)	mach <i>Sphagnum</i>	FT-IRM	[32]
I.R. Willick a kol. (2018)	pletivo zo stonky pšenice	FT-IRM	[33]
W. Azuma a kol. (2017)	listy z <i>Cryptomeria japonica</i>	FT-IRM	[34]
D. Medas a kol. (2019)	koreň a stonka z <i>Juncus acutus</i>	FT-IRM	[35]
H.J. Butler a kol. (2017)	pletivá z <i>Commelina communis</i>	FT-IRM	[36]
P. Roongssattham a kol. (2016)	plod z palmy <i>Elaeis guineensis</i>	FT-IRM	[37]
P.Q. Yu a kol. (2019)	list z <i>Medicago sativa</i>	FT-IRM	[38]
P. Yu a kol. (2007)	Časti z pšeničného semienka	FT-IRM	[39]
P. Yu (2008)	semená z <i>Brassica rapa</i> a <i>Brassica napus</i>	FT-IRM	[40]
C.M. Rico a kol. (2015)	koreň ryže, pšenice, a jačmeňa	FT-IRM	[41]
A. Cao a kol. (2015)	stonka bavlny a kukurice	FT-IR Imaging	[42]
J. Chen a kol. (2013)	list z <i>Ginkgo biloba</i>	FT-IR Imaging	[43]
J. Jiang a kol. (2013)	osemenie z <i>Brassica napus</i>	ATR-FT-IRM	[44]
J.K. Kerr a kol. (2013)	list z <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	FT-IRM	[45]
Y.L. Wang (2012)	stonky z <i>Solanum lyratum</i>	FT-IRM	[46]
H.J. Yan a kol. (2009)	osemenie bavlny	FT-IRM	[47]
P.Q. Yu (2011)	semeno z <i>Sorghum bicolor</i>	FT-IRM	[48]

2.2.3.2 Ramanova spektroskopia

Druhou spektrálnou technikou významnou pre štúdium rastlinného materiálu je Ramanova spektroskopia. Táto technika bola pre tento účel prvý krát použitá v 70. rokoch. Jej veľkým obmedzením bola často výrazná autofluorescencia rastlinného materiálu. S vývojom tejto techniky a tiež s konštrukciou laserov s dlhšou vlnovou dĺžkou sa darí autofluorescenciu do značnej miery potlačiť. Aj u tejto techniky je možné mikroskopické usporiadanie v rôznych technických variáciách (napr. konfokálna Ramanova mikrospektroskopia, CRM; koherentná anti-stokesovská Ramanová rozptylová mikrospektroskopia, CARS; stimulovaná Ramanova rozptylová

mikrospektroskopia, SRS⁴⁹), ďalej povrchovo zosilnená Ramanova rozptylová spektroskopia (SERS)⁵⁰ a tiež je možné aj zobrazovacie usporiadanie (Ramanov Imaging)⁵¹. Prehľad využitia Ramanovej spektroskopie v analýze rastlinných pletív uvádza *Tabuľka 2*. Z tejto tabuľky je badateľné, že v analýze rastlinného materiálu prevláda klasická FT-Ramanova spektroskopia, ktorá bola najčastejšie volenou technikou pri analýze pletív plodov a listov poľnohospodárskych plodín. V poslednej dekáde sa Ramanova spektroskopia aj FT-IR mikrospektroskopia využila aj v analýze semien.

Tabuľka 2. Prehľad techník Ramanovej spektroskopie použitých v analýze rastlinného materiálu.

Autor práce	Rastlinný materiál	Technika	Ref.
H. Schulz a kol. (2005)	pletivá plodov ovocia a zeleniny (detekcia karotenoidov)	NIR-FT-Ramanova spektroskopia	[52]
B. Schrader a kol. (1999)	pletivá plodov zeleniny (detekcia karotenoidov), listy z <i>Acer platanoides</i>	NIR-FT- Ramanova spektroskopia	[53]
V. E. de Oliveira a kol. (2010)	pletivá plodov ovocia a zeleniny (detekcia karotenoidov)	FT- Ramanova spektroskopia	[54]
L. Sanchez a kol. (2019)	semená <i>Vigna unguiculata</i> (monitoring kvality semien)	FT- Ramanova spektroskopia	[55]
H. Wu a kol. (2019)	listy a plody pomaranča (detekcia pesticídov)	povrchovo zosilnená Ramanova rozptylová spektroskopia (SERS)	[50]
G. Yang a kol. (2018)	semená kukurice	Ramanov Imaging	[56]
S.H. Ji a kol.(2018)	osemenie zo špenátových semienok	FT- Ramanova spektroskopia	[57]
A. Ambrose a kol. (2016)	semená kukurice	NIR-FT-Ramanova spektroskopia FT- Ramanova spektroskopia	[58]
Ch. Krafft a kol. (2012)	semená z <i>Prunus armeniaca</i> (detekcia amygdalinu)	Ramanov Imaging	[59]
N. Gierlinger a kol. (2012)	rastlinná bunka	Ramanova mikrospektroskopia	[60]
M. Rys a kol. (2015)	listy sóje	FT- Ramanova spektroskopia	[61]
A. Kolozsvari a kol. (2015)	semená pšenice	FT- Ramanova spektroskopia	[62]
S. Reitzenstein a kol. (2007)	semená repky (bez osemenia)	FT- Ramanova spektroskopia	[63]
H. Lee a kol. (2017)	semená vodného melónu	Ramanov Imaging	[64]
T. A. Ratnikova a kol. (2015)	semená paradajky (rezy)	Ramanov Imaging	[65]

2.2.3.3 Nukleárna magnetická rezonancia

Nukleárna magnetická rezonancia (NMR) je výkonná spektroskopická technika v identifikácii a kvantifikácii zložiek v komplexných zmesiach, akými sú napríklad rastlinné extrakty. V NMR spektre rastlinného extraktu je možné identifikovať viac zlúčenín bez nutnosti predchádzajúcej separácie alebo čistenia⁶⁶. Na analýzu rastlinného materiálu sa dá použiť aj zobrazovacie usporiadanie NMR (tzv. NMR

Imaging), ktorý predstavuje neinvazívny nástroj a je využívaný na získanie obrázkov rastlinného materiálu s vysokým rozlíšením. Poskytuje vizualizáciu priestorového rozloženia látok (metabolitov) v skúmaných rastlinných pletivách, ale je vhodný aj na meranie dynamických javov, napr. transport vody skrz rastlinné orgány⁶⁷. Výhodou tejto metódy oproti technikám spomenutým v predchádzajúcej časti je možnosť využitia sledovania (transportu) chemických zlúčenín označených stabilným izotopom ¹³C alebo deutériom. Podobne ako pri infračervenej a Ramanovej spektroskopii existuje aj u NMR mikroskopická technika. Skúmané vzorky sú potom vizualizované multidimenzionálne. Skrz vzorky je možné vykonať postupný náhľad a tak sledovať distribúciu látok aj v hlbších vrstvách študovaného objektu⁶⁸. Ako doplnkovú techniku k NMR technikám je nutné zmieniť aj MRI (Zobrazovaciu magnetickú rezonanciu), ktorej využitie prevláda skôr pri štúdiu živočíšnych a ľudských tkanív, ale v niektorých prácach bola zvolená aj na štúdium rastlinného materiálu, prípadne semien, za účelom sledovať ich anatomické zmeny počas simulovaného stresu⁶⁹. Krátke zhrnutie dostupných prác k tejto technike použitej v analýze rastlinného materiálu je prezentované v *Tabuľke 3*. Táto technika je v porovnaní s vyššie uvedenými ďaleko menej používanou.

Tabuľka 3. Prehľad využitia nukleárnej magnetickej rezonancie v analýze rastlinného materiálu.

Autor práce	Rastlinný materiál	Technika	Ref.
T.W.J. Scheenen a kol. (2000)	Stonky chryzantémy	NMR imaging	[67]
W. Köckenberger a kol. (2004)	Semená z <i>Brassica napus</i> a fazule	NMR mikroskopia	[68]
R. Sidi-Boulenouar a kol. (2019)	Stonka čirku	NMR imaging	[70]
L. Van Der Weerd a kol. (2002)	Stonka kukurice a z <i>Pennisetum americanum</i>	NMR imaging	[71]
T.W.J. Scheenen a kol. (2007)	Stonka uhorky <i>Cucumis sativus</i>	NMR imaging	[72]

2.2.3.4 Hmotnostná spektrometria

Efektívnym analytickým nástrojom na štúdium rastlinných pletív je hmotnostná spektrometria (MS) a hmotnostne spektrometrické zobrazovanie (MSI). Táto technika vyniká svojou univerzálnosťou (dokáže súčasne podať informácie o stovkách molekúl s rôznou chemickou povahou) a citlivosťou. V dnešnej dobe je hmotnostná spektrometria nenahraditeľnou technikou v rastlinnej biológii, teda pri štúdiu rastlinnej

fyziológie a metabolizmu, prírodných látok, rastlinných metabolitov a ich distribúcií v samotných pletivách, pri štúdiu vplyvu exogénneho stresu na rastliny, atď. V hmotnostnej spektrometrii je k dispozícii mnoho technických prevedení.

V poslednom desaťročí patrí k najrozšírenejším typom MS techník vhodným k priamej analýze organických molekúl hmotnostná spektrometria s maticou asistovanou laserovou desorpciou/ionizáciou (MALDI-MS)⁷³. Pri použití tejto metódy je na povrch analyzovaného materiálu nanášaná matrica uľahčujúca ionizáciu. Na druhú stranu, prítomnosť matrice spôsobuje celý rad balastných signálov v hmotnostnom spektre, ktoré môžu interferovať s analytmi a komplikujú interpretáciu dát. S cieľom vyriešiť tento problém boli vyvinuté mnohé ďalšie prístupy⁷⁴, ako napríklad GALDI-MS (ionizácia s použitím koloidného grafitu), NALDI-MS (s použitím nanočastíc), LDI-MS s použitím „protónovej hubky“, (tj. silnej bázy⁷⁵), ktorá je vhodná pri analýze aniónov. K ďalšiemu obdobnému prístupu patrí napríklad SALDI-MS (povrchovo asistovaná laserová desorpcia/ionizácia s platinovým filmom naneseným na povrch vzorky). Platinový film ako vodivá úprava môže napomôcť desorpcií/ionizácii niektorých látok z rastlinného pletiva (napr. niektoré insekticídy⁷⁶), ktoré sa nedajú detekovať pomocou MALDI-MS kvôli ich slabej ionizácii. Ďalšou významnou technikou je hmotnostná spektrometria sekundárnych iónov (SIMS), ktoré sú vyrazené zo vzorky pri jej bombardovaní primárnymi iónmi (Ar^+ , Ga^+ , Cs^+ , O_2^+)⁷³. Technikou SIMS je možné analyzovať aj hlboké profily pevných vzoriek, vyniká citlivosťou merania a poskytuje výborné plošné rozlíšenie. Z ambientných techník má v analýze rastlinného materiálu významné miesto hmotnostná spektrometria s ionizáciou desorpčným elektrosprejom (DESI-MS)⁷⁷. Medzi ambientnú techniku s menším zastúpením, ktorá bola taktiež použitá v analýze rastlinných materiálov, patrí taktiež kombinácia laserovej ablácie s elektrosprejom (LAESI-MS)⁷⁸.

V *Tabuľke 4* sú uvedené práce zamerané na analýzu rastlinných pletív s využitím hmotnostnej spektrometrie v kombinácii s diskutovanými ionizačnými technikami za posledných 15 rokov. Z *Tabuľky 4* vyplýva, že najväčšie zastúpenie z ionizačných techník hmotnostnej spektrometrie v analýze rastlinného materiálu má MALDI ionizačná technika s UV laserom (viď *Obrázok 1A*).

Medzi hlavné obmedzenia priamej (MA)LDI-MS analýzy patrí nižšia selektivita analýzy (vznik zmesných spektier obsahujúcich signály všetkých ionizovateľných

zložiek vzorky), nižšia presnosť a spoľahlivosť kvantitatívnej analýzy. Pri štúdiu metabolitov v biologických tkanivách/pletivách je prínosom, ak je ich identita a kvantita potvrdená aj inou technikou, napr. kvapalinovou alebo plynovou chromatografiou či elektromigračnými technikami. Možnosť priamej analýzy biologických materiálov je však prínosná hlavne preto, že je možno vynechať zložité spracovanie a prípravu biologickej vzorky (extrakciu/prevedenie do roztoku), ktoré môžu byť zdrojom chýb (ovplyvnenie materiálu rozpúšťadlom, tvorba artefaktov atď.). *Tabuľka 4 a Obrázok 1B* ukazujú, že najčastejšie analyzovaným rastlinným materiálom je list. Ďalším materiálom v poradí podľa počtu publikovaných štúdií je semeno (hlavne jeho priečne rezy), potom stonka a kvety. Väčšina prác využívajúcich hmotnostnú spektrometriu v analýze zložiek rastlinného materiálu využíva postupy necielenej metabolomiky.

Tabuľka 4. (začiatok): Prehľad ionizačných techník hmotnostnej spektrometrie a ich využitie v analýze rastlinného materiálu.

Autor práce	Rastlinný materiál	Detekované látky	Ionizačný zdroj	Ref.
G. Petroselli a kol. (2019)	Listy a stonka z maté z rastliny <i>Ilex paraguariensis</i>	saponíny	MALDI, LDI	[79]
J. Pavlov a kol. (2019)	semená z jabĺka a broskyne, koreň mrkvy	kyanidy, kyanozlúčeniny	MALDI (nanočastice Au ako matrica)	[80]
P. Lorkiewicz a kol. (2009)	rezy semenom sóje a okvetné lístky ruže	lipidy, fenolické látky	MALDI (TiO ₂ ako matrica)	[81]
N. A. dos Santos a kol. (2019)	listy z <i>Cannabis sativa</i>	kanabinoidy	MALDI, LDI	[82]
C.Plancot a kol. (2014)	listy <i>Eragrostis nindensis</i>	arabinoxylány	MALDI	[83]
S.G.Musharraf a kol. (2014)	rozomleté listy, korene, semená <i>Withania somnifera</i>	withaferin A	LDI	[74]
T. Ozawa a kol. (2016)	listy <i>Viola wittrockiana</i>	pesticídy	SALDI (Pt film)	[76]
D.C. Perdian a kol. (2010)	listy a okvetné lístky z <i>Arabidopsis thaliana</i>	antokyaniíny, mastné kyseliny, glyceridy, ceramidy	AP-MALDI(koloidný grafit ako matrica)	[84]
R. L. Hansen a kol. (2019)	koreň a semené kukurice	peptidy, dihexóza, kyseliny oxoadipová, kyseliny kumarová, hydroxyglutamát	MALDI-MSI	[85]

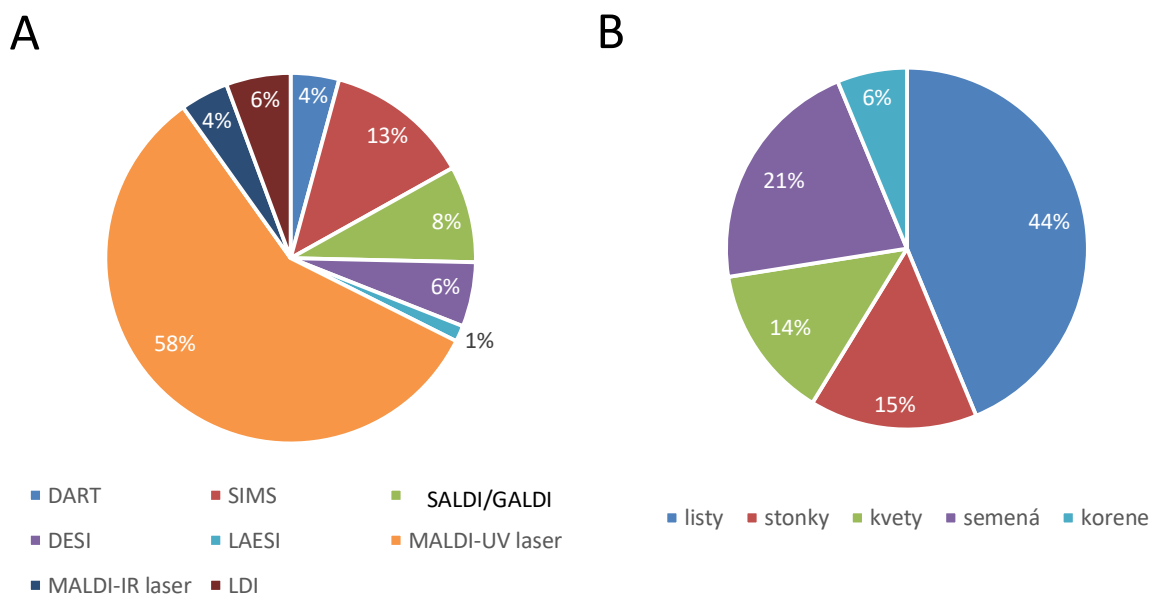
Tabuľka 4. (pokračovanie 1): Prehľad ionizačných techník hmotnostnej spektrometrie a ich využitie v analýze rastlinného materiálu.

Autor práce	Rastlinný materiál	Detekované látky	Ionizačný zdroj	Ref.
Šamec a kol. (2019)	stonka z <i>Psilotum nudum</i>	biflavonoidy, arylpyrónové glykozidy	MALDI-MSI	[86]
X. Pei a kol. (2017)	list sóje a fazule	oligosacharidy	MALDI-MSI	[87]
A.M. Heskes a kol. (2018)	listy a plody <i>Vitex agnus-castus</i>	diterpenoidy	MALDI-MSI	[88]
M.E.Duenas (2018)	listy kukurice	lipidy	MALDI-MSI	[89]
L. Huang a kol. (2016)	listy <i>Cayratia japonica</i>	fytohormóny, mastné kyseliny	MALDI-MSI	[90]
S.P. Annangudi a kol. (2015)	listy pšenice	fungicidy	MALDI-MSI	[91]
A.R. Korte a kol. (2015)	listy kukurice	aminokyseliny, glycerolipidy, kyselina ferulová, kávová, glutámová, askorbová	MALDI-MSI	[92]
A.R. Korte a kol. (2014)	listy kukurice	fenolické látky	MALDI-MSI	[93]
A.K. Mullen a kol. (2005)	listy a stonka sóje	herbicíd mezotrión, fungicíd azoxystrobin	MALDI-MSI	[94]
T. Kondo a kol. (2006)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	peptidy	MALDI	[95]
S. Robinson a kol. (2007)	stonka z <i>Triticum aestivum</i>	oligosacharidy	MALDI-MSI	[96]
M.M. Burell a kol. (2007)	semená pšenice	aminokyseliny, sacharóza, fosforylovaná glukóza	MALDI-MSI	[97]
R. Shroff a kol. (2008)	list z <i>Arabidopsis thaliana</i>	glukosinoláty	MALDI	[98]
Anderson a kol. (2009)	stonka zo slnečnice	pesticidy	MALDI-MSI	[99]
C.N. Goto-Inoue a kol. (2010)	plody z <i>Solanum melongena</i>	amino kyseliny, cukry	MALDI-MSI	[100]
J.H. Jun a kol. (2010)	kvety, listy a korene z <i>Arabidopsis thaliana</i>	lipidy	MALDI (koloidné Ag ako matrica)	[101]
C. Perdian a kol. (2010)	kvety z <i>Arabidopsis thaliana</i>	flavonolglykozidy	MALDI-MSI	[102]
D.V. Vrkoslav a kol. (2010)	list z <i>Arabidopsis thaliana</i>	kutikulárne lipidy	MALDI-MSI	[103]
N. Zaima a kol. (2010)	semená ryže	lipidy	MALDI-MSI	[104]
S. Kaspar a kol. (2011)	semená jačmeňa	proteíny	MALDI-MSI	[105]
K.A. Lunsford a kol. (2011)	stonka z <i>Populus sp.</i>	oligosacharidy, polysacharidy	MALDI-MSI	[106]
M. Peukert a kol. (2012)	semená z <i>Hordeum vulgare</i>	lipidy	MALDI-MSI	[107]
M. Ha a kol. (2012)	<i>Solanum tuberosum</i>	glykoalkaloidy	MALDI-MSI	[108]
P. J. Horn a kol. (2012)	semená z bavlny	lipidy	MALDI-MSI	[109]
Y. Yoshimura a kol. (2012)	plody z <i>Vaccinium ashei</i>	antokyaníny	MALDI-MSI	[110]
P. Franceschi a kol. (2012)	rozličné rezy jablkom odrody Golden delicious (rezy šupkou, dužinou, jadrovnikom)	flavonoidy, dihydrochalkóny	MALDI-MSI	[111]
Hoelscher a kol. (2009)	kvety a listy z <i>Hypericum perforatum</i> , list z <i>Arabidopsis thaliana</i>	naftodiantróny, flavonoidy	LDI	[112]
Y. Li a kol. (2008)	okvetné listy z <i>Lilium candidum</i>	cukry, kyselina giberelínová, L-glutamín	AP-IR-MALDI	[113]
Y. Li a kol. (2007)	plod jahody	monosacharidy	AP-IR-MALDI	[114]
D. J. A. Ibanez a kol. (2010)	listy z <i>Nicotiana tabacum</i>	fenolické látky, alkaloidy, cukry	IR-MALDI	[115]
P. J. Horn a kol. (2013)	<i>Camelina sativa</i>	lipidy	MALDI-MSI	[116]
P. J. Horn a kol. (2014)	<i>Gossypium hirsutum</i>	lipidy	MALDI-MSI	[117]
P. J. Horn a kol. (2014)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	lipidy	MALDI-MSI	[118]
M. Peukert a kol. (2014)	semená z <i>Hordeum vulgare</i>	lipidy	MALDI-MSI	[119]

Tabuľka 4. (pokračovanie 2): Prehľad ionizačných techník hmotnostnej spektrometrie a ich využitie v analýze rastlinného materiálu.

Autor práce	Rastlinný materiál	Detekované látky	Ionizačný zdroj	Ref.
D.R. Bhandari a kol. (2015)	<i>Triticum aestivum</i> a <i>Brassica napus</i>	lipidy, sacharidy, sinapín	MALDI-MSI	[120]
D.S. Dalisay a kol. (2015)	semená z <i>Linum usitatissimum</i>	lignany	MALDI-MSI	[121]
E. Sturtevant a kol. (2017)	semená z <i>Arabidopsis thaliana</i>	fosfatidylcholín, fosfatidylinositol	MALDI-MSI	[122]
H.K. Woodfield a kol. (2017)	semená z <i>Brassica napus</i>	lipidy	MALDI-MSI	[123]
P. Nemes a kol. (2007)	listy, stonka a koreň z <i>Tagetes patula</i>	fenolické látky, glukóza, bestatin, kyselina linolenová	LAESI	[124]
J. Gray a kol. (2009)	listy zo <i>Stevia rebaudiana</i>	diterpény	DESI	[125]
Li a kol. (2011)	listy z <i>Hordeum vulgare</i>	glukozidy	DESI	[126]
B.J. Thunig a kol. (2011)	listy a okvetné lístky z <i>Hypericum perforatum</i>	hyperforin, hypericin	DESI	[127]
D.R. Ifa a kol. (2012)	plod z <i>Myristica malabrica</i>	alkaloidy	DESI	[128]
H. Zhang a kol. (2007)	jablko, jahody	kyselina malónová, askorbová, citrónová	GALDI	[129]
S.W. Cha a kol. (2008)	list, kvet a stonka z <i>Arabidopsis thaliana</i>	fosfolipidy, cerebrosidy, oligosacharidy, flavonoidy	GALDI	[130]
D.C. Perdian a kol. (2010)	okvetné lístky z <i>Arabidopsis thaliana</i>	flavonoidy	GALDI	[131]
S.W. Cha a kol. (2009)	listy a kvety z <i>Arabidopsis thaliana</i>	epikutikulárne vosky	GALDI	[132]
T. Ozawa a kol. (2016)	listy macošky	pesticídy	SALDI	[133]
K. Kuroda a kol. (2012)	drevné pletivo z <i>Cryptomeria japonica</i>	ferruginol	SIMS	[134]
K. Saito a kol. (2008)	drevné pletivo z <i>Chamaecyparis obtuse</i>	ligníny	SIMS	[135]
Seyer a kol. (2010)	semená z <i>Arabidopsis thaliana</i>	fenolické látky, fosfoinositol	SIMS	[136]
Seyer a kol. (2010)	semená z <i>Pisum sativum</i>	fenolické látky	SIMS	[136]
C. Zhou a kol. (2011)	drevné pletivo z <i>Populus trichocarpa</i>	ligníny	SIMS	[137]
K. Saito a kol. (2011)	drevné pletivo z <i>Acer micranthum</i>	ligníny	SIMS	[138]
S. Aoyagi a kol. (2014)	petioly z <i>Wasabi japonica</i>	sinigrín	SIMS	[139]
S.H. Kim a kol. (2017)	semená kukurice	cholín, fosfocholín, fosfatidylinositol, kyselina palmitová	SIMS	[140]
A. P. Kulkarni a kol. (2018)	listy z <i>Populus trichocarpa</i>	nasýtené alkoholy, uhľovodíky, estery voskov	SIMS	[141]
A. D. Lesiak a kol. (2014)	<i>Mitragyna speciosa</i>	psychoaktívne alkaloidy	DART	[142]
Singh a kol. (2015)	<i>Berberis petiolaris</i>	alkaloidy	DART	[143]
R.A. Musah a kol. (2015)	listy, semená z rôznych druhov rastlín (<i>Dalbergia</i> , <i>Datura</i> , <i>Brugmansia</i> , <i>Hyocymus</i> , <i>Eucalyptus</i>)	alkaloidy, metylestery mastných kyselín	DART	[144]

Obrázok 1. Grafické vyjadrenie zastúpenia použitých ionizačných techník hmotnostnej spektrometrie v analýze rastlinného materiálu (A) a zastúpenie analyzovaného rastlinného materiálu (B).



2.3 Analýza osemenia

Osemenie zohráva dôležitú úlohu v životnom cykle rastlín. Na jednej strane sa podieľa na ochrane embrya v samotnom semienku a na druhej strane kontroluje jeho rozvoj, ovplyvňuje dormanciu a klíčenie. V predloženej dizertačnej práci je riešená problematika analýzy osemenia vybraných odrôd hrachu siateho za účelom identifikácie látok v osemení, podieľajúcich sa na regulácii prestupu vody a plynov skrz osemení k embryu (markerov dormancie). Tento mechanizmus je spojený s fyzikálnym typom dormancie semien, ktorá bude vysvetlená bližšie neskôr. V tejto kapitole sú zhrnuté doposiaľ publikované informácie k chemickej analýze osemenia.

Medzi základné techniky štúdia osemenia patrí optická mikroskopia a využitie fluorescencie samotného rastlinného materiálu. V optickej mikroskopii má veľký význam aj histochemické farbenie. Napríklad, na detekciu polysacharidov sa používa činidlo PAS (Periodic acid-Schiff stain), prípadne ruténiová červeň. Na zafarbenie lipidických látok sa zvyčajne používa sudanová červeň¹⁴⁵. V práci od A. Janskej a kol. (2018) boli tieto farbivá použité na zvýraznenie polysacharidických a lipidických zlúčenín v priečných rezoch osemenia hrachu siateho¹⁴⁵.

Použitie ATR-FT-IR techniky na štúdium osemenia repky a horčice je zhrnuté v práci od J. Jianga a kol. (2012). FT-IR spektrum čierneho osemenia repky (*Brassica napus*) sa od žltého osemenia horčice (*Sinapis alba*) odlišovalo v IR oblasti s vlnočtom od 2800 po 3000 cm^{-1} . V žltom osemení neboli prítomné píky pre vibrácie CH_2 (2852 cm^{-1}) a $\text{C}=\text{O}$ (1735 cm^{-1}) skupiny. Tieto signály boli výrazné pre čierne zafarbené osemenie. V oboch typoch osemenia bol zároveň prítomný široký pás s vlnočtom 3300 cm^{-1} odpovedajúci vibráciám $-\text{OH}$ alebo $-\text{NH}$ skupiny pravdepodobne pochádzajúcich zo sacharidov a proteínov v osemení. Rozdiely sa nachádzali aj pri píkoch s vlnočtom 1630 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{O}$, $-\text{CO}-\text{NH}-$, $\text{COO}-$), 1560 cm^{-1} (CH , $\text{C}-\text{N}$, $-\text{NH}-$) a 1240 cm^{-1} (CH , $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$) ukazujúcich prítomnosť látok s amidickou skupinou v osemení. Na základe rozdielov v absorbanciách týchto píkov a ich pomerov (A_{3300}/A_{1630} , A_{3300}/A_{1560} a A_{3300}/A_{1240} , dolný index vyjadruje vlnočtet vybraného píku) bol vyslovený záver, že porovnávané osemenia sa líšia najmä v proteínovom profile. V oblasti s vlnočtom od 1180 do 800 cm^{-1} , ktorá je typická pre sacharidy neboli nájdené rozdiely v skúmaných osemeniach⁴⁴. H. Yan a kol. (2009) rozšírili poznatky o zložení osemenia bavlny s použitím FT-IR mikrospektroskopie. Boli skúmané rezy z osemenia, ktoré malo niekoľko vrstiev. V najvrchnejšej vrstve sa nachádzala vrstva s kutínom. Jej IR spektrum bolo porovnávané s IR spektrom kutínu z jablkovej šupky (referenčný materiál). V spektre kutínu boli prítomné píky s vlnočtom 2923 a 2885 cm^{-1} , odpovedajúce vibráciám $=\text{CH}_2$ a $=\text{CH}-$ skupiny, ktoré už boli v literatúre skôr pripísané kutikulárnym voskom, s majoritným zastúpením mastných alkoholov s $\text{C}_{18}-30$, mastných kyselín a ich esterov s $\text{C}_{16}-34$. V spektre bol prítomný taktiež silný pík s vlnočtom od 1200 do 1000 cm^{-1} , ktorý bol pripísaný absorpcii celulózy a pektínu. Na prítomnosť pektínu môžu poukazovať aj píky s vlnočtom 1745 cm^{-1} (vibrácia $\text{C}=\text{O}$ z galaktourónovej kyseliny), 1445 cm^{-1} ($\text{O}-\text{CH}_3$) a 1234 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$) z esterov pektových kyselín, 1614 cm^{-1} (vibrácia $-\text{COO}^-$) a 1425 cm^{-1} pre pektán vápenatý. Pík s vlnočtom 1732 cm^{-1} a ďalšie píky s vlnočtom 1370 a 1250 cm^{-1} môžu indikovať prítomnosť hemicelulózy, vrátane jej acetylovaných jednotiek. Problémom býva interferencia signálu z iných látok, ktoré obsahujú rovnaké funkčné skupiny. Vo vnútornej vrstve osemenia by mali byť prítomné palisádové bunky s výrazným polysacharidickým profilom. V staršej literatúre sa uvádza, že píky v oblasti „odtlačku palca“ (teda s vlnočtami 1160, 1148, 1108, 1070, 1040, 980, 895 a 811 cm^{-1}) môžu patriť arabinoglukuronoxylánu a galaktoglukomanánu, pochádzajúcim z hemicelulózy. Vo vrstve osemenia bavlny s výraznou pigmentáciou boli v IR spektre nájdené píky s

vlnočtom 1319, 1234 a 1260 cm^{-1} , ktoré by mohli súvisieť s prítomnosťou tanínov alebo s prítomnosťou lignínu, ktorého základné stavebné molekuly sú podobné tanínom. Štruktúry oboch typov zlúčenín sú si podobné - obsahujú aromatické jadro a vyšší počet hydroxyskupín⁴⁷.

Ramanova mikrospektroskopia bola použitá na štúdium osemenia semien z paradajky za účelom študovania prestupu nanomateriálu (uhlíkových trubičiek) do osemenia. Ramanovým mapovaním pričného rezu osemenia bolo potvrdené, že nanotrubičky môžu prenikať do osemenia. Pomocou nanomateriálov by mohol byť uľahčený prestup vody alebo minerálnych prvkov do osemenia, čo by uľahčovalo klíčenie semien⁶⁵. Ramanova spektroskopia sa osvedčila aj v analýze špeciálnej čiernej odrody arašidov, ktoré sú vďaka ich nutričným výhodnejším vlastnostiam oproti obvyčajnej odrode arašidov drahšie, a preto sa bežné svetlejšie odrody častokrát prifarbujujú umelými farbivami (analyzovaná bola šupka na oriešku za účelom odhalenia umelého prifarbovania). V Ramanových spektrách v oblasti od 1650 do 1100 cm^{-1} (pri použití 1064 nm Nd:YVO₄ lasera) boli nájdené výrazné rozdiely. Zvolená metóda dokázala rozlíšiť umelo zafarbené arašidové orechy od prírodných¹⁴⁶.

Významnou analytickou technikou, ktorá umožňuje detailnú analýzu zloženia osemenia je plynová a kvapalinová chromatografia. Jednou z mála prací zameraných konkrétne na analýzu osemenia je aj práca od S. Shao a kol. (2007), kde sa zamerali na chemickú charakterizáciu kutikulárnej vrstvy na osemení zo semena sóje. Pre túto plodinu je typické, že osemenia jednotlivých genotypov sa líšia v schopnosti prepúšťať vodu skrz osemenie. Analýzou niekoľkých osemení genotypov s veľkou a malou permeabilitou pre vodu bolo zistené, že kutikulálne vosky obsahujú mastné kyseliny, 1-alkanoly, n-alkány a stopové množstvá hydroxylovaných mastných kyselín. Extrakcia kutikulárnych látok bola prevedená krátkym povarením semien v 1M NaOH, následným okyslením a vyextrahovaním do chloroformu. Chloroformová fáza bola vysušená za vákua pri 40°C a po prevedení zložiek na metylestery a deriváty trimethylsilyléteru boli vzorky analyzované pomocou GC-FID a GC-MS techniky. Polymérna časť kutikuly prítomná stále vo vyextrahovanom osemení bola narušená zmesou BF₃/MeOH a následne upravená postupom použitým pre voskové látky v prvej extrakcii. Analýzou takto upravenej vzorky boli nájdené mastné kyseliny a 2-hydroxymastné kyseliny. Pre vodu najmenej permeabilný kultivar obsahoval najväčšie množstvo týchto látok, u ostatných množstvo látok nevytvorilo o permeabilite

osemenia. Chemické zloženie kutikuly na semenách sóje bolo porovnané aj so zložením kutikuly prítomnej na listoch sóje¹⁴⁷. K ďalším prácam venovaným analýze látok lipidickej povahy pomocou GC-MS patrí napríklad štúdia od M.P. Valchevy a kol. zameranej na kutín v osemeni jablka¹⁴⁸. V tejto práci boli detekované hydroxylované mastné kyseliny (18-hydroxyoktadec-9-enová; 9,10-epoxy-18-hydroxyoktadekánová; 9,10,18-trihydroxyoktadekanová). V práci od P. Adhikaryho a kol. zameranej na semená z *Lathyrus sativus* (strukovina rozšírená v napr. v Indii, Číne alebo Etiópii) boli stanovené vo voskoch v osemeni voľné mastné kyseliny (palmitová, laurová, hexadec-9-énová)¹⁴⁹.

V roku 1996 bola publikovaná práca od P. Gravena a kol. zameraná na analýzu polysacharidov a lignínu v osemenia z vybraných rastlinných druhov z čeľade banánovníkovitých (*Musaceae*) pomocou plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie (GC/MS)¹⁵⁰. V roku 2007 bola publikovaná práca od T.C.S. Kanya a kol., v ktorej boli charakterizované estery z voskov, voľné mastné kyseliny a mastné alkoholy v osemeni slnečnicových semien tiež pomocou GC/MS. Estery vo voskoch z tohto osemenia obsahovali 38-54 atómov uhlíka. Najzastúpenejšími mastnými alkoholmi boli behenyl, lignoceryl a cerotyl alkohol a abundantnú skupinu metylesterov mastných kyselín tvorili metylarachidát a metylbehenát¹⁵¹.

Štúdie s kvapalinovou chromatografiou sú zvyčajne zamerané na analýzu fenolických látok¹⁵²⁻¹⁵⁸ a iných metabolitov v osemeni¹⁵⁹. Významná je práca od S. Wada, v ktorej je diskutovaná anatomia osemenia ostružiny a tiež obsah proantokyanínov v súvislosti s dormáciou. V osemeni z kultivarov s hrubším osemením bol pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s UV/Vis detekciou stanovený skoro dvojnásobný obsah proantokyanínov oproti osemením tenším. Obsah proantokyanínov prispieva k výslednej tvrdosti semena, čo môže prispievať k (fyzikálnej) dormancii týchto semien¹⁶⁰. Z rovnakej oblasti pochádza aj štúdia od D.T. Vu a kol. (2014), v ktorej sa autori zamerali na obsah epikatechínu v osemeni divokých a kultúrnych semien sóji. Epikatechín bol stanovený tiež pomocou HPLC s UV/Vis detekciou v systéme reverzných fáz. Jeho zvýšený obsah bol nájdený v niektorých odrodách s tvrdým osemením¹⁶¹. Tento záver bol potvrdený aj v práci od S. Zhou a kol. (2010), v ktorej okrem epikatechínu, stanovili pomocou HPLC s UV/VIS detekciou na reverzných fázach v osemeni sóje aj kyanidín-3-O-glukozid a delfinidín-3-O-glukozid.

Avšak, iba epikatechín vykazoval významnú pozitívnu koreláciu s tvrdosťou osemenia¹⁶².

Staršie práce uvádzajú, že v osemení sú syntetizované aj makrozložky ako proteíny, cukry, tuky, ktoré ovplyvňujú celkové vlastnosti semena, a jednak metabolity ako fenolické látky, saponíny, glukosinoláty, ktoré ovplyvňujú jeho obranyschopnosť voči vonkajším patogénom a organizmom, a zvyšujú odolnosť aj voči vonkajším procesom (napr. pôsobenie UV žiarenia). Práca od Merbacha a Mayera z roku 1974 uvádza, že permeabilita osemenia súvisí s obsahom fenolických látok v osemení a so stupňom ich oxidácie. V experimente, v ktorom porovnávali zmenu aktivity katechol oxidázy v osemení hrachu *Pisum sativum* (žltozelené osemenie priepustné pre vodu) a *Pisum elatius* (hnedé osemenie nepriepustné pre vodu), zistili, že aktivita tohto enzýmu je minimálna práve v kultúrnej odrode hrachu počas celého procesu vývinu až po usušenie. V divokej odrode *P. elatius* jeho aktivita stúpa až po fázu, keď osemenie stratí cez 51% vody a zhnedne. Vtedy jeho aktivita prudko klesá¹⁶³. Katecholoxidáza je v rastlinách významným enzýmom, ktorý v prítomnosti O₂ katalyzuje oxidáciu katecholu na príslušný chinón a ten môže následne polymerizovať za vzniku tmavohnedej látky, melanínu¹⁶⁴.

Pre LC a GC analýzy je treba osemenie homogenizovať a využiť interakcie s rozpúšťadlom (extrakcia kvapalinou). Pre úspešnú analýzu sú nutné ďalšie chemické postupy ako hydrolýza, alebo derivatizácia.

Ako už bolo uvedené skôr, pre mnoho štúdií je významné, aby rastlinný materiál nebol ovplyvnený rozpúšťadlom. Niektoré techniky umožňujú priamu analýzu semien a ich osemenia v suchom stave alebo po veľmi krátkej aplikácii rozpúšťadla (tj. napríklad posprejovaním povrchovej vrstvy osemenia roztokom matrice v MALDI-MS), ktoré materiál ovplyvní podstatne menej ako extrakcia. Na analýzu semien sa už využili mnohé spektrometrické techniky ako je práve MALDI-MS, ďalej hmotnostná spektrometria s ionizáciou desorpčným elektrosprejom (DESI-MS), priama analýza v hmotnostnej spektrometrii v reálnom čase (DART-MS), nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia (NMR), infračervená a Ramanova spektroskopia a pre anorganickú analýzu hmotnostná spektrometria s laserovou abláciou a ionizáciou indukčne viazanou plazmou (LA-ICP-MS¹⁶⁵⁻¹⁶⁶). Avšak, žiadna z týchto techník nebola použitá na priamu analýzu povrchu mechanicky oddeleného osemenia od embrya a to

aj napriek tomu, že tieto techniky poskytujú informácie o distribúcii látok na povrchu osemenia. Príklady týchto prací sú uvedené v tabuľkách v predchádzajúcej kapitole.

Najrozšírenejšou a účinnou technikou pre analýzu organických látok v semenách (vrátane ich povrchových vrstiev) je, podobne ako vo všetkých ďalších rastlinných materiáloch, hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou/ionizáciou. Tá bola použitá v mnohých rôznych usporiadaniach vrátane hmotnostného zobrazovania. Ide o veľmi efektívny analytický nástroj v proteomickom a metabolickom mapovaní rastlinných pletív. Technika MALDI-MS kombinovaná s gélovou elektroforézou sa použila pri štúdiu proteomického zloženia semien z *Medicago truncatula*¹⁶⁷, z *Lotus japonicus* a semien iných strukovín¹⁶⁸. Postupy pre MALDI-MS zobrazovanie malých molekúl v nedozretých zrnách jačmeňa sú opísané v práci od M. Peukerta a kol. (2012)¹⁶⁹. Bhandari a kol. publikoval prácu venovanú hmotnostno spektrometrickým zobrazovaním metabolitov v priečných rezoch dvoch druhov semien (repky olejnej a pšenice) a iných rastlinných tkanív (stonka z pšenice, koreň ryže), ktoré sa okrem iného týkajú klíčivosti a dozrievania semien¹⁷⁰. Mapovaním metabolitov v zrnách jačmeňa počas fázy klíčenia pomocou MALDI-MSI sa zaoberal aj Gorzolka a kol.¹⁷¹. (MA)LDI-MS analýzou osemenia strukovín sa zaoberá naša nedávna publikácia (Cechová a kol. 2019), ktorá je detailne popísaná v experimentálnej časti tejto dizertačnej práce.

2.3.1. Ambientná hmotnostná spektrometria s priamou sondou v analýze rastlinného materiálu

Na rýchlu analýzu pevného materiálu a roztokov je možno využiť hmotnostnú spektrometriu s ionizáciou priamou sondou za atmosferického tlaku (ASAP-MS; z angl. Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry). Táto technika umožňuje analýzu prchavých a poloprchavých látok. Príprava vzoriek pre túto analýzu je zvyčajne jednoduchá. Analyzovaný materiál sa naniesie na sklenenú kapiláru a tá sa umiestni do iontového zdroja. Prúd vyhrievaného dusíka odparuje zložky vzorky z povrchu kapiláry, ktoré sú ionizované korónovým výbojom. Táto technika sa stala populárnou najmä v oblasti petroleomiky a charakterizácie polymérov¹⁷²⁻¹⁷³. Technika ASAP-MS sa niekoľkokrát použila na analýzu rastlinných materiálov. McEwen a kol. pomocou ASAP-MS techniky previedli kvalitatívnu analýzu steroidov z extraktov

čerstvej paradajkovej šupky, lístkov mäty, kvetov a paprikových strukov¹⁷⁴. Chen a kol. analyzovali v produktoch obsahujúcich henu látky dráždivé pre pokožku. Výsledky z ASAP-MS merania boli potvrdené pomocou UPLC-MS¹⁷⁵. Okrem toho, táto technika bola použitá aj na charakterizáciu flavonoidov v peľoch¹⁷⁶, pesticídov v zelenine¹⁷⁷ a obilných zrnách¹⁷⁸. ASAP-MS bola použitá aj pre charakterizáciu lignínu vo vzorkách z rastliny *Stipa tenacissima*¹⁷⁹ a pre analýzu ryžových šupiek za účelom charakterizácie lisovaných olejov¹⁸⁰. Nedávno sme publikovali použitie ASAP-MS techniky v priamej analýze povrchu semien¹⁸¹ a táto štúdia je prezentovaná v tejto dizertačnej práci.

2.4. Dormancia semien a jej charakterizácia

Jedným z mnohých zaujímavých javov v životnom cykle rastlín je dormancia. V širšom kontexte sa jedná o obdobie vegetačného pokoja rastlín, v ktorom sa nerozvíjajú napríklad korene¹⁸² alebo je pozastavená tvorba listových alebo kvetných púčikov¹⁸³. V užšom kontexte sa pojem dormancia používa hlavne u rastlinných semien. Dormancia sa u semien prejavuje inhibíciou/pozastavením ich klíčenia aj napriek ich dobrej vitalite a vhodným okolitým podmienkam pre klíčenie¹⁸⁴.

Dormancia semien a jej prekonanie je pre šírenie druhu potrebná záležitosť. V mnohých prípadoch zohráva toto preventívne zastavenie klíčenia semien úlohu pri predchádzaní zániku mnohých rastlín, či rastlinných druhov v prípade nevhodných vonkajších podmienok (zmeny v teplote, svetle, vo vlhkosti, kompetícia druhov v rámci jedného stanovišťa, atď.), prípadne prírodných katastrof. Semená divokých rastlinných druhov bývajú často dormantné¹⁸⁵. Oproti tomu, u semien kultúrnych rastlín je žiadúce rýchle a rovnomerné klíčenie všetkých zasiatych semien za účelom maximálnej poľnohospodárskej produkcie a ich dormancia býva minimálna. Za týmto účelom sú poľnohospodárske rastliny aj šľachtené. Čas, ktorý divoké semená strávia v dormantnom stave môže byť dlhý (u niektorých druhov semien desiatky až stovky rokov)¹⁸⁶.

Prelomenie dormancie u semien je komplikovaných proces, ktorý neraz súvisí s fyziologickými procesmi v jednotlivých častiach semena (v embryu, prípadne v osemeni), tiež s morfológiou semena (hlavne osemenia) a tiež fyzikálno-chemickými

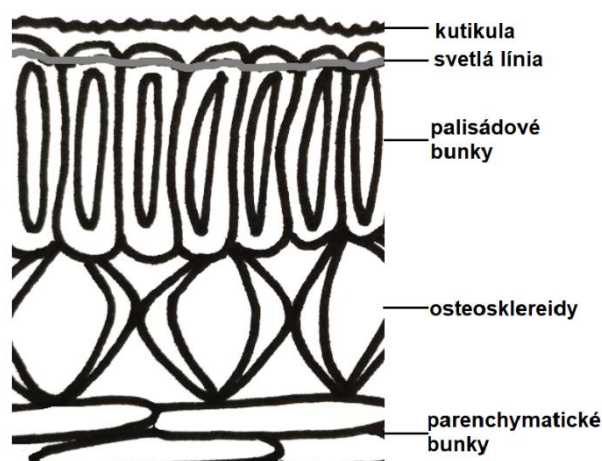
vlastnosťami samotných semenných obalov, ktoré regulujú prestup vody a plynov skrz túto mechanickú bariéru k embryu. Na základe týchto vlastností sa dormancia semien „nahrubo“ delí na fyziologickú, morfológickú a fyzikálnu dormanciu. Avšak v realite sú u semien pravdepodobne prítomné kombinácie týchto typov dormancie a neexistuje medzi nimi jasná hranica¹⁸⁷. Vzhľadom na zameranie tejto práce bude bližšie diskutovaný len fyzikálny typ dormancie semien.

Princíp fyzikálnej dormancie semien spočíva v regulácii prestupu vody a plynov skrz osemenie vďaka jeho chemickým vlastnostiam. Mnohé chemické látky prítomné v osemení dokážu ovplyvňovať penetráciu vody a kyslíka smerom k embryu vo vnútri semena. Tieto dve látky zohrávajú kľúčovú úlohu pri naštartovaní samotného klíčenia. Absorpcia vody vedie k bobtnaniu, a teda k rozrušovaniu samotného osemenia ako mechanickej ochrany semena. Avšak, jej prítomnosť je dôležitá hlavne vo všetkých metabolických procesoch, kde umožňuje správne fungovanie enzýmov a ďalších proteínov, ktoré sa podieľajú na klíčení. Zároveň je univerzálnym rozpúšťadlom pre dôležité plyny (kyslík, oxid uhličitý, či etylén), a rovnako aj pre metabolity a ich transport v rastlinných pletivách. Kyslík je zase potrebný na získanie energie produkovanej v embryu (v mitochondriách), ktorá je taktiež potrebná na klíčenie. Chemické zloženie jednotlivých vrstiev osemenia ovplyvňuje jeho výslednú permeabilitu voči týmto látkam¹.

2.4.1 Fyzikálna dormancia a osemenie strukovín

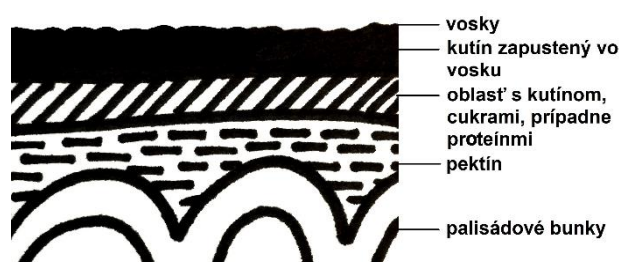
Fyzikálny typ dormancie bol popísaný u semenien strukovín (*Leguminosae*), ale aj ďalších čeľadiach (*Fabaceae*, *Malvaceae*, *Cannaceae*, *Geraniaceae*, *Convolvulaceae*)¹. Schematický nákres osemenia strukovín je ukázaný na *Obrázku 2*. Niekoľko prací uvádza, že tento typ dormancie súvisí s natesno usporiadanými palisádovými bunkami (makrosklereidami) v osemení a u niektorých rastlinných druhov sa uvádza, že majú navyše v tejto vrstve palisádových buniek tzv. “water gap”, teda trhliny, cez ktoré voda a plyny v prvej fáze prenikajú do osemenia^{1,188-189}. Primárnou úlohou palisádových buniek je zabezpečenie mechanickej ochrany.

Obrázok 2. Schématický náčrt osemenia hrachu siateho.



Práca od Spurneho z roku 1964 uvádza, že vrchná časť palisádových buniek v osemení hrachu siateho obsahujú suberínovú vrstvu, avšak v niektorých ďalších strukovinách tomu tak nie je¹⁹⁰. Na ich povrchu sa môže nachádzať vrstva s kutikulou a voskami a existuje niekoľko prací, v ktorých je kutikula uvedená v súvislosti s vodeodolnosťou u tvrdého osemenia ("hard seeds")¹. Schématický náčrt kutikuly prezentuje *Obrázok 3*. Kutikula nie je bunková štruktúra a má predovšetkým ochrannú funkciu rastlinného pletiva a jeho látok. Zaujímavosťou je taktiež to, že u semien sóje môže kutikula obsahovať aj hydrofóbne proteíny pochádzajúce zo stien struku¹⁹¹.

Obrázok 3. Schématický náčrt rastlinnej kutikuly¹⁹¹.



Vďaka rozdielom v chemickom zložení palisádových buniek a teda rozdielom v lome svetla môže byť v nich prítomná svetlá línia (*linea lucida*). V osemení *Medicago* bola svetlá línia vysvetlená na základe nehomogénneho rozloženia celulózy, suberínu a kutínu v makrosklereidoch¹⁹². Harris a kol. (1987) uviedli, že sila tejto svetlej línie súvisí s nepriepustnosťou osemenia¹. U strukovín sa pod vrstvou makrosklereidov

nachádzajú osteosklereidy (ich tvar pripomína tvar stehennej kosti) s výraznými medzibunkovými priestormi. Ich chemické zloženie bunkovej steny sa môže líšiť v závislosti od rôznych druhov rastlín. V jednej z prvotných prác zameraných na histochemické farbenie osemenia z hrachu siateho (práca od R.M. Reevesa z roku 1946), boli v osteosklereidoch detekované pentosany (tvorené arabinózou a xylózou)¹⁹³. Osemenie býva tiež lignifikované¹⁹⁴. Informácie v literatúre poukazujú na to, že tvorba lignínu v rastlinných pletivách môže byť ovplyvnená stresovými podmienkami (napr. účinok patogénov, výkyvy vo vlhkosti, expozícia UV žiareniu, fluktuácia teploty)¹⁹⁵. Avšak, exogénny stres neovplyvňuje len tvorbu lignínu, ale tiež tvorbu fenolických látok, rastlinných metabolitov prítomných taktiež v osemeni strukovín¹⁹⁶. Súčasťou osemenia je aj široká skupina fenolických látok. Fenolické látky sú mnoho krát diskutované ako látky, ktoré by mohli vplývať na mechanizmus fyzikálnej dormancie skrz ich schopnosti oxidovať sa na príslušné chinóny, a tým redukovať prestup kyslíka cez jednotlivé bunkové vrstvy v osemeni až do takej miery, že sa kyslík nedostane k embryu. Jeho význam pre naštartovanie klíčenia bol diskutovaný vyššie.

Lignín a fenolické látky vznikajú fenyylpropanoidovou metabolickou cestou sprevádzanou a riadenou mnohými enzýmami. Je nutné dodať, že dormancia, respektíve klíčenie, môže závisieť aj od týchto enzymatických látok, ktoré regulujú obsah lignínu a fenolických látok v osemeni. Príkladom enzýmu tohto druhu môže byť peroxidáza, ktorá reguluje polymerizáciu lignínu, prípadne katechoxidáza regulujúca oxidáciu fenolických látok. Na spodnej strane osemenia sa môže nachádzať ešte vrstva parenchymatických buniek (prítomná u strukovín), o ktorej sa predpokladá, že zabezpečuje nutrienty pre embryo, avšak o tejto vrstve nie sú doposiaľ informácie, že by mohla priamo súvisieť s fyzikálnou dormanciou u akéhokoľvek osemenia. Výnimkou je menej permeabilné osemenie ďateliny, v ktorom bol stanovený vyšší podiel kalózy v parenchymatickej vrstve osemenia. Autori v práci hovoria, že vrstva živín v parenchýmu môže regulovať priepustnosť osemenia¹⁹⁷.

Okrem charakteru (chemického zloženia) celej plochy osemenia sa na prestupu vody skrz semeno môžu podieľať aj niektoré morfológicko-anatomické útvary ako hilum a strofiola. Hilom sa nazýva nápadné miesto, vďaka ktorému je zabezpečené uchytenie semena k struku (pútka). Cez jeho stred prechádza štrbina, ktorá sa otvára ak je relatívna vlhkosť nízka (tým podporuje schnutie semena). Pri vysokej vlhkosti je táto štrbina uzatvorená. Strofiola je malé vypuklé zakončenie švu

na osemení. U hrachu siateho je strofiola viditeľná ako malá hnedo zafarbená bodka v blízkosti hila. Táto štruktúra sa podľa niektorých považuje za možné miesto pre vstup vody k embryu¹. Analýza chemického zloženia týchto útvarov môže teda poskytnúť dôležité informácie pre detailnejšie porozumenie ranným fázam procesu klíčenia.

2.4.1 Dormancia semien a jej regulácia

Fáza, kedy sa zrelé semienko stane dormantné, nie je však konečná a existuje niekoľko mechanizmov, ktoré dormanciu semien pravdepodobne ovplyvňujú, aby nakoniec dochádzalo k ich vyklíčeniu. Na dormanciu vplyvajú mechanizmy, ktoré sú neoddeliteľnou súčasťou prírody, ako pôsobenie svetla¹⁹⁸, opakujúce sa požiare v horúcich oblastiach¹⁹⁹, samotná vlhkosť²⁰⁰ a typ pôdy (jej pH²⁰¹, abrazivita²⁰², zloženie²⁰², patogény²⁰²), prípadne čiastočný rozklad osemenia v živočíšnych tráviacich traktoch²⁰³. Tieto procesy môžu rozrušovať osemenie priamo, čím dochádza k narušeniu mechanickej bariéry okolo embrya alebo môžu podmieňovať chemické zmeny v osemení, ktoré následne vedú k zmene dormantného stavu semena. V literatúre existuje niekoľko prací zameraných na štúdium zmien v dormancii semien v súvislosti s vyššie uvedenými činiteľmi, avšak je nutné povedať, že ich pôsobenie je vzájomne prepojené a nie je doposiaľ celkom objasnené.

Dormancia semien je podmienená aj samotnou materskou rastlinou a okolitými faktormi, ktoré na ňu vplyvajú v čase tvorby semien. Účinok nízkych teplôt na materskú rastlinu môže podporiť hĺbku dormacie u vznikajúcich semien²⁰⁴. Jedným z cieľov tejto práce bola snaha popísať chemické zmeny v osemení hrachu siateho po jeho teplotnom cyklovaní. Oscilácia teploty v prírode je totiž pravdepodobne rovnako významný parameter ako vyššie spomenuté javy, ktorý môže tiež spôsobovať zmeny v dormancii semien. Práca od Fotitta a kol. (2013)²⁰⁵ poukazuje na vplyv teploty na dormanciu semien u najrozšírenejšej modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana*, u ktorej boli tieto zmeny študované na dvoch ekotypoch. Na narušenie dormacie semien ekotypu *Cvi* (produkuje semená na jeseň) je nutná horúca fáza leta, po ktorej nastáva klíčenie semien. Pri ecotype *Bur* je nutné, aby semena boli vystavené naopak nízkym teplotám, po ktorých začínajú klíčiť. Zaujímavosťou je napríklad to, že striedavé teploty (30 až 60°C) v oblasti Mediteránu narušujú dormanciu semien d'ateliny (*Trifolium subterraneum*), ktorých osemenie sa stane vode priepustné. Tento jav bol pozorovaný aj u niektorých druhov radených k strukovinám (*Vicia hirsuta*, *Lathyrus nissolia*,

Lathyrus aphaca), ktoré na to, aby vyklíčili, potrebujú výrazné výkyvy teplôt. Sezónna oscilácia teplôt je významná aj pre semená austrálskeho rastlinného druhu *Stylosanthes humilis*, ktorý má dormantné semená v období od januára do septembra, kedy v tejto oblasti prevládajú v priemere o niečo nižšie teploty (25-55°C). V období od septembra do decembra, kedy priemerné teploty stúpajú (28-67°C) sa dormancia semien redukuje a semená začínajú klíčiť¹.

Okrem sezónnych výkyvov teplôt sú v literatúre spomínané aj denné teplotné rozdiely v súvislosti s reguláciou dormancie semien. Denná a nočná teplotná fluktuácia býva významná u semien rastlinných druhov *Trifolium hirtum*, *Trifolium cherleri*, *Trifolium cernus*, *Medicago truncatula*, *Medicago littoralis*, *Medicago polymorpha* a *Lupinus varius* vedie k redukcii ich dormancie. Pre predstavu je vhodné uviesť, že tieto teploty oscilujú v rozmedzí od 15°C (cez noc) do 60°C (cez deň)¹. Existuje aj niekoľko prací zameraných na sledovanie génovej expresie s ohľadom na teplotné výkyvy (napríklad²⁰⁵⁻²⁰⁶), avšak interpretácia dát v týchto publikáciách presahujú rámec tejto práce. Vzhľadom na množstvo uvedených faktorov a komplikovanosť sa v experimentoch sleduje väčšinou jeden vybraný faktor samostatne, nie v kombinácii s ďalšími. Štúdium vplyvu teploty a oscilácie a tiež všetkých vyššie uvedených javov, je napriek niekoľkým snahám stále nedostatočne objasnená záležitosť. Zmenami v chemickom zložení osemenia hrachu pri cyklovaní teplôt sa zaoberá aj táto dizertačná práca.

3. Ciele dizertačnej práce

Ciele predloženej dizertačnej práce sú obsiahnuté v nasledujúcich bodoch:

- Charakterizácia chemického zloženia osemenia vrátane jeho povrchu u vybraných genotypov hrachu siateho (*Pisum sativum*) a následná interpretácia identifikovaných látok v kontextu fyzikálnej dormacie týchto semien.
- Vývoj nových metód založených na hmotnostnej spektrometrii umožňujúcich priamu analýzu rastlinného materiálu a optimalizácia podmienok merania. Preštudovanie možností vyhodnotenia dát pomocou nástrojov viacrozmernej štatistickej analýzy.
- Štúdium chemických zmien v osemení hrachu siateho po simulácii teplotného cyklovania a posúdenie týchto zmien v kontexte dormancie týchto semien.

Najvýznamnejšie získané výsledky prezentované v tejto práci boli publikované v troch impaktovaných časopisoch (dva články boli prvoautorské, jeden spoluautorský).

4. Experimentálna časť

4.1 Chemikálie

Metanol (gradient grade), kyselina palmitová (p.a.), kyselina olejová (p.a.), 2',4',6'-trihydroxyacetofenón monohydrát (THAP, p.a.), 4-aminochinolín (AQ, p.a.), 9-aminoacridín ($\geq 99.5\%$, HPLC), acetón (HPLC), acetonitril (HPLC), hexán (HPLC, $\geq 95\%$), kyselina hexakosánová (technická, $\geq 90\%$), kyselina oktakosánová (syntetická, $\geq 98\%$). Ako štandard na kalibráciu hmotnostného spektrometru s MALDI ionizačným zdrojom bol použitý červený fosfor (p.a.) vo forme suspenzie v acetóne (1 mg/ml) a pri ESI a ASAP ionizácii mravenčan sodný (pripravený zmiešaním 100 μ l 0,1 M NaOH s 200 μ l 10% kyseliny mravenčej a 20 ml zmesi acetonitril:voda (80:20, v/v)). Vyššie uvedené chemikálie boli zakúpené vo firme Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Zdrojom ultračistej vody bola stanica Milli-Q (Merck, Kenilworth, NJ, USA).

4.2 Prístroje

Vo všetkých experimentoch bol použitý vysokorozlišujúci hmotnostný spektrometer Synapt G2-S (Waters Corp, Milford, MA, USA) vybavený elektrosprejom (ESI), iónovým zdrojom s priamou sondou za atmosferického tlaku (ASAP) a vákuovým MALDI iónovým zdrojom, hybridným hmotnostným analyzátorom typu Q-TOF, dvoma kolíznymi celami (Trap a Transfer) a iónovo-mobilitnou celou. UV-MALDI ionizačný zdroj bol vybavený laserom typu Nd:YAG (1 kHz, $\lambda=350$ nm). Ovládanie hmotnostného spektrometru a zber dát bolo prevedené pomocou programu MassLynx v.4.1.

Pri LC/MS meraní bol použitý kvapalinový chromatograf UPLC I-Class (Waters Corp, Milford, MA, USA) pozostávajúci z vysokotlakového čerpadla (Waters ACQUITY BSM), autosampleru (Waters ACQUITY Sample Manager FTN) a spektrofotometrického detektoru s diodovým poľom (Waters ACQUITY PDA). Ovládanie LC-MS systému a zber dát bolo prevedené pomocou programu MassLynx v.4.1.

Na meranie FTIR spektier bol použitý infračervený spectrometer Nicolet 6700 (Termo Scientific, DTGS KBr detector, Mid-IR KBr filter) vybavený ATR nádstavcom (kryštál zo ZnSe).

Na prípravu vzoriek a roztokov boli okrem bežného laboratórneho vybavenia použité aj nasledujúce prístroje: ultrazvuková vaňa (Elmasonic, Elma Schmidbauer GmbH, Nemecko), analytické váhy (Kern), sušiareň, guľičkový mlynček (Pulverisette 23, Fritsch, Nemecko), sprejovacie zariadenie na matrice SunCollect (SunChrom GmbH, Friedrichsdorf, Nemecko), trepačka (GFL 3006, GFL, Nemecko), centrifúga (Eppendorf Minispin, Eppendorf, Nemecko).

Na vysušenie vzoriek osemenia bol použitý lyofilizátor (CHRIST, Nemecko).

4.3 Rastlinný materiál

V tejto dizertačnej práci boli hlavným objektom záujmu vzorky osemenia zo semien hrachu siateho (*Pisum sp.*), ktoré poskytol doc. Ing Petr Smýkal, Ph.D. z Katedry botaniky, z Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci. Vo vybraných semenách boli zastúpené tri dormantné genotypy *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Jl64, VIR320, L100) a tri nedormantné genotypy *Pisum sativum* subsp. *sativum* (Jl92, Cameor, Terno). Genotyp Jl64 rastie na území Turecka a Jl92 na území Afganistanu, avšak obidva boli poskytnuté z Centra Johna Innesa v Norwich vo Veľkej Británii. L100 sa vyskytuje v Izraeli a VIR320 bol poskytnutý Vavilovym výzkumným inštitútom v Petrohrade, Rusko. Cameor bol získaný z INRA (French National Institute for Agricultural Research, Národný inštitút pre poľnohospodársky výskum) vo Francúzsku a odroda Terno pochádza z Českej republiky²⁰⁷⁻²⁰⁸. V práci boli analyzované aj osemenia zo semien rekombinantne krížených línií z genotypov Jl64 a Jl92²⁰⁹. Poslednú skupinu vzoriek tvorili semená (osemenia), ktoré boli podrobené teplotnému cyklovaniu (tj. simulovaným výkyvom teploty v 12 hodinovom intervale, s minimálnou a maximálnou teplotou 20°C a 60°C počas 30 dní). Študované genotypy boli získané z Katedry botaniky, PŘF UP Olomouc. Na tomto pracovisku boli prevedené aj experimenty s teplotným cyklovaním. Kontrolné semenka od týchto genotypov boli ponechané v tme a pri teplote 20°C počas 30 dní. Semená genotypu T14/5 (tj. číselný kód 86) boli zvolené ako kandidáti s nadobudnutou dormanciou po teplotnom cyklovaní (porovnané s ich kontrolami) a genotyp P016 (číselný kód 17) reprezentoval opačný jav, kedy sa ich dormancia v porovnaní s kontrolnými semenami po teplotnom cyklovaní výrazne znížila. Dormancia bola hodnotená cez počet semien, ktorý ostáva inaktívny a neklíči (vyjadruje sa v percentách).

4.4 Príprava vzoriek pre jednotlivé typy analýz

4.4.1 LDI a MALDI-MS meranie

Osemenia z vybraných genotypov boli mechanicky odpreparované od embrya, skalpelom nakrájané na menšie časti (približne 2 mm) a takto boli upevnené na kovovú MALDI doštičku s vonkajším povrchom smerom nahor pomocou obojstrannej lepiacej pásky (Ulith, Praha, Česká republika). Meranie bolo uskutočnené v šiestich biologických opakovaníach pri každom genotype. Vzorky boli odpreparované zo zrelých suchých semien a analyzovali sa priamo v neporušenom stave (tj. bez prasklín), buď bez nanosenia matrice (LDI) alebo po jej aplikácii sprejovaním (MALDI) pomocou prístroja SunCollect (v šiestich po sebe nanášaných vrstvách a s prietokom 5 μ l/min, rýchlosť sprejovania bola nastavená danou funkciou v softwaru na "medium"). V pozitívnom ionizačnom móde bola použitá matrica THAP (2',4',6'-trihydroxyacetofenón monohydrát) v koncentrácii 1 mg/ml (rozpustená v zmesi rozpúšťadiel acetonitril:voda, 1:1, v/v) a pre negatívny ionizačný mód boli použité matrice: 4-aminochinolín a 9-aminoakridín v koncentrácii 1 mg/ml (rozpustené v acetóne). Vzorky rekombinantných línií boli analyzované a zobrazovacie experimenty boli prevedené iba v móde LDI-MS (bez nanosenia matrice).

V sérii experimentov boli vykonané merania lyofilizovaného osemenia (odpreparované osemenie bolo lyofilizované 5 dní) a porovnané s kontrolnými vzorkami osemenia (usušené bez lyofilizácie). Takto pripravené vzorky boli zmerané pomocou LDI-MS pri negatívnej ionizácii.

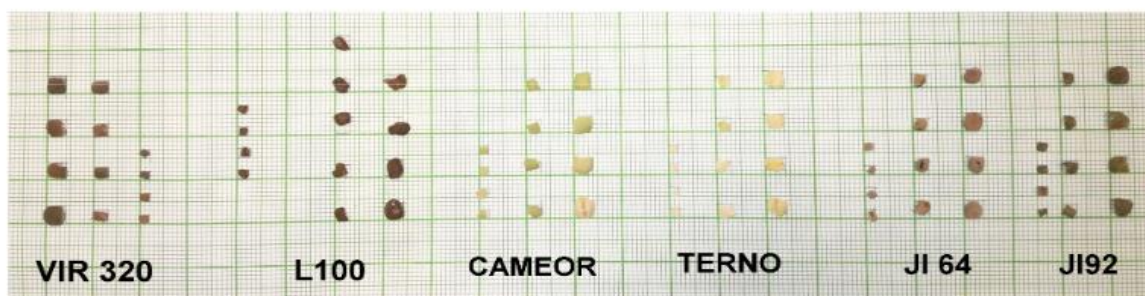
Časť experimentov bola zameraná na štúdium distribúcie analytov v pričnom priereze osemenia. Priečne rezy boli pripravené taktiež zo suchého zrelého semena. Najskôr sa celé semeno nasýtilo 2% roztokom sacharózy vo vákuu, a následne bol pridaný kryogél (Cryomatrix Shandon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nasýtené vzorky sa zmrazili na teplotu -25°C a rozrezali priečne na rezy s hrúbkou 20 μm . Viac detailov obsahuje protokol³⁹. Takto pripravené vzorky boli analyzované pomocou LDI-MS. Všetky semená boli skladované pri laboratórnej teplote, na tmavom a suchom mieste.

4.4.2 ASAP-MS meranie

V prípade priamej ASAP-MS analýzy boli analyzované suché zrelé semená hrachu siateho v neporušenom stave, a tiež vypreparované kúsky osemenia s určitým rozmerom (cca 4 mm², 9 mm², 12 mm², vid' *Obrázok 4*). Pred meraním bol každý kúsok samostatne zvážený. V *Tabuľke 5* sú uvedené hmotnosti vypreparovaných kúskov použitých na priamu ASAP-MS analýzu a ďalšie štatistické spracovanie.

Pre ASAP-MS merania sa štandardne používa sklenená kapilára (glass melting point capillary; priemer 2 mm, dĺžka 100mm). Tá bola využitá pre pilotné meranie extraktov osemenia, avšak kvôli nereprodukovateľným výsledkom pri meraní extraktov bola v ďalších experimentoch zvolená kapilára s inými rozmermi, ako bude uvedené nižšie. Pre priame meranie rastlinného materiálu bez extrakcie bola štandardná kapilára modifikovaná urezaním oboch zatavených koncov. Následne bol cez ňu prestrčený 100 µm medený drôt zakončený buď štvoramennou "klietkou" (na priamu analýzu celých semien vrátane kvantifikácie mastných kyselín na celých semenách pomocou metódy štandardného prídavku, *Obrázok 5A*) alebo s háčikom na konci (na priamu analýzu časti osemenia, *Obrázok 5B*).

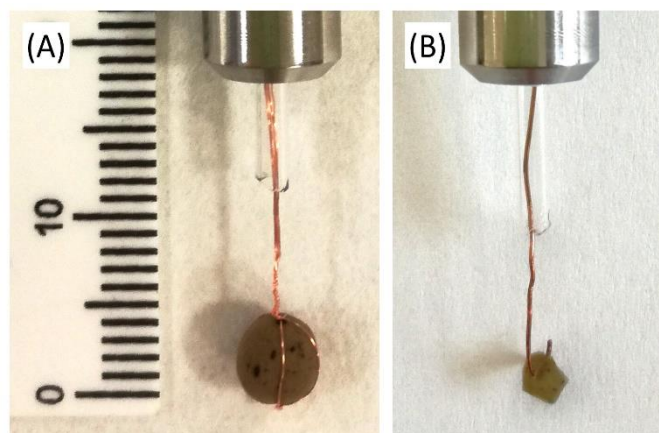
Obrázok 4. Vypreparované časti osemenia zo šiestich genotypov hrachu siateho použitých na priamu analýzu pomocou ASAP-MS techniky. Rozmer vypreparovaného osemenia je približne určený na základe mierky na podkladovom papieri (jeden štvorček na papieri má rozmer 1 mm²).



Tabuľka 5. Hmotnosti vypreparovaných častí osemenia zo šiestich genotypov hrachu siateho použitých na priamu analýzu pomocou ASAP-MS techniky.

		Hmotnosť vypreparovaných kúskov osemenia (mg)					
Rozmer (mm ²)	Kus č.	VIR320	L100	CAMEOR	TERNO	J164	J192
4	1	0.87	1.01	0.35	0.43	2.13	0.29
	2	0.69	0.77	0.49	0.22	0.81	0.40
	3	0.55	0.91	0.41	0.39	0.68	0.81
	4	0.41	0.89	0.30	0.39	0.47	0.89
Priemer		0.63	0.90	0.39	0.36	1.02	0.60
SMODCH		0.20	0.10	0.08	0.09	0.75	0.30
9	1	1.60	2.36	0.86	1.11	2.64	0.62
	2	1.10	2.53	0.87	0.94	2.13	0.86
	3	1.35	3.38	0.72	0.79	3.66	0.73
	4	1.50	5.16	0.81	0.71	3.32	0.70
Priemer		1.39	3.36	0.82	0.89	2.94	0.73
SMODCH		0.22	1.28	0.07	0.18	0.69	0.10
16	1	3.13	10.64	4.35	2.10	5.59	1.98
	2	2.42	5.73	2.81	2.87	4.62	1.60
	3	2.69	4.04	2.07	1.64	6.42	3.72
	4	2.76	4.2	1.61	1.87	2.89	4.45
Priemer		2.75	6.15	2.71	2.12	4.88	2.94
SMODCH		0.29	3.09	1.20	0.53	1.52	1.37

Obrázok 5. Spôsob uchytienia celých semien a vypreparovaných častí osemenia na ASAP próbe (A – štvorramenná kliečka, B – háčik).



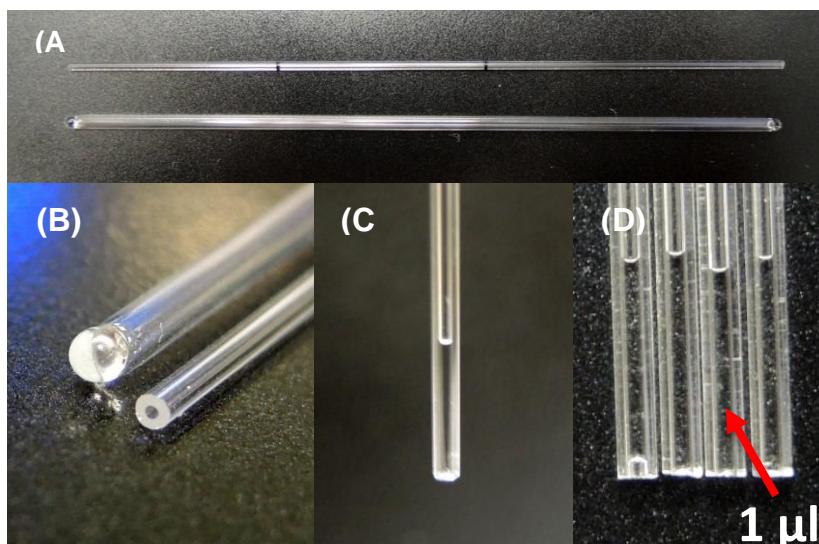
Kyselina dibrómgalová bola vybraná ako štandard na kontrolu odozvy (jej opakovateľnosti) počas ASAP-MS meraní celých semien. Jej odozva (neovplyvnená biologickou variabilitou) poslúžila na sledovanie opakovateľnosti nanášania prídavkov štandardov mastných kyselín na semeno. Jej výhodou bol charakteristický izotopový patern a prchavosť. Na celé semeno bol vždy pipetovaný 1 μ l kyseliny dibrómgalovej (1 mg/ml).

4.4.2.1 Príprava extraktov z osemenia a štandardných roztokov pre ASAP-MS analýzu a kvantifikáciu (metóda kalibračnej krivky)

Za účelom kvantifikácie boli pripravené roztoky štandardov kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej v hexáne s koncentráciou 0.001, 0.01, 0.1 a 0.2 mg/ml. Tieto kalibračné roztoky boli zmerané v štyroch opakovaníach. Ako bolo spomenuté vyššie, štandardná sklenená kapilára bola využitá pre pilotné meranie štandardov a rovnako aj extraktov osemenia, avšak kvôli nereprodukovateľným výsledkom pri meraní bola zvolená kapilára s inými rozmermi. Štandardná kapilára bola nahradená dutou kapilárou s vnútorným priemerom 60 μ m a dĺžkou 10 cm (ďalej uvádzanou ako alternatívna kapilára). Porovnanie štandardnej a alternatívnej kapiláry ukazuje *Obrázok 6A-B*. Otvory v kapiláre a pôsobenie kapilárnych síl umožnili natiahnutie malého množstva roztoku (cca 1 μ l) dovnútra kapiláry (*Obrázok 6C-D*). Extrakty z osemenia hrachu siateho (z dvoch základných genotypov L100 a CAMEOR) boli pripravené podľa nasledujúceho spôsobu. Najskôr bolo vybraných šesť suchých a

zrelých semien z každého genotypu, mikrometricky sa zmeral ich priemer, a potom bolo osemenie z každého semienka opatrne lúpaním oddelené od embrya. Týchto šesť osemení (pre každý genotyp) bolo jednotlivo zvážených a následovne boli zvážené osemenia z rovnakého genotypu rozomleté na prášok. Namletý prášok bol z mlýnka pozbieraný (a opäť zvážený). Návážky osemenia L100 a Cameoru boli podobné (102.2 mg pre L100 a 115.5 mg pre Cameor). Údaje o rozmeroch a hmotnostiach týchto osemení sú prezentované v *Tabuľke 6*. Lipofilné látky boli extrahované z navážky 3 hodiny hexánom pri laboratórnej teplote, za použitia trepačky (2 hodiny) a ultrazvuku (1 hodina). Pomer extrahovaného materiálu a extrakčného činidla bol 70 mg prášku z osemenia na 1 ml hexánu. Táto zmes bola centrifugovaná počas 5 minút pri 14 000 otáčkach za minútu a následne bolo 500 μ l supernatantu odobraného, odfúkaného prúdom dusíka a odparok bol rozpustený v 10 μ l hexánu (prekoncentrácia 50x).

Obrázok 6. Porovnanie štandardnej a alternatívnej sklenenej kapiláry použitej v ASAP-MS meraniach (celkový pohľad – A, detail na koniec kapilár – B, nadávkovanie 1 μ l vzorky pomocou alternatívnej sklenenej kapiláry -C, porovnanie nadávkovania vzorky do niekoľkých alternatívnych kapilár -D).



V ASAP-MS experimentoch s alternatívnou kapilárou bol do hmotnostného spektrometru vždy nadávkovaný 1 μ l extraktu. Analýza bola prevedená v štyroch opakovaníach. Pri dávkovaní roztokov do hmotnostného spektrometru mal každý roztok vždy svoju kapiláru (pre danú koncentračnú úroveň dedikovaná kapilára).

Čistenie kapiláry bolo prevedené prepláchnutím kapiláry a oplachom jej vonkajšej strany pomocou hexánu. Vyčistená kapilára neposkytovala merateľný signál analytov.

Tabuľka 6. Údaje o rozmeroch kompaktných osemení a ich hmotnosti z dvoch genotypov hrachu sietého (L100, CAMEOR) použitých na prípravu extraktov v (semi)kvantitatívnej analýze pomocou ASAP-MS techniky.

		Priemer semienka (mm)	Plocha osemenia (mm ²)	Hmotnosť osemenia pred rozomletím (mg)			Priemer semienka (mm)	Plocha osemenia (mm ²)	Hmotnosť osemenia pred rozomletím (mg)
L100	1	4.00	50.27	27.77	CAMEOR	1	8.00	201.06	19.29
	2	4.58	65.90	27.08		2	8.00	201.06	22.05
	3	4.34	59.17	23.14		3	8.42	222.73	22.47
	4	4.72	69.99	23.37		4	7.66	184.33	18.68
	5	5.10	81.71	21.00		5	7.66	184.33	23.61
	6	5.30	88.25	26.40		6	7.76	189.18	20.40
	Priemer	4.67	69.21	24.79		Priemer	7.92	197.12	21.08
	SMODCH	0.48	14.07	2.68		SMODCH	0.29	14.68	1.93
Σ^*			415.29	148.76	Σ^*			1182.70	126.50
Hmotnosť navážky (mg) a jej odpovedajúca plocha (mm²)			321.60	102.20	Hmotnosť navážky (mg) a jej odpovedajúca plocha (mm²)			1076.40	115.50

(Σ^* = suma plochy, resp. hmotnosti osemenia zo šiestich semien, poznámka: po rozomletí materiálu guľičkovým mlynkom dochádza k stratám materiálu, preto je uvedená aj hmotnosť navážky, teda hmotnosť rozomletého prášku zo 6 semien, ktorý bol extrahovaný; táto hmotnosť bola použitá pri výpočtoch kvantity vybraných látok. V tabuľke je výpočítaná aj priemerná plocha, ktorá by odpovedala danej navážke použitej v extrakcii.)

4.4.2.2 Príprava vzoriek a štandardných roztokov pre ASAP-MS analýzu a kvantifikáciu (metóda štandardného prídavku)

Za druhý kvantifikačný spôsob bola zvolená metóda štandardného prídavku. Na kvantifikáciu pomocou štandardného prídavku boli pripravené tri štandardné roztoky. Tie obsahovali kyselinu hexakosánovú a oktakosánovú s koncentráciou 0.25; 0.50 a 1.00 mg/ml. Štandardný roztok bol 10x naspotovaný po 1 μ l na celé semienko uchytené na ASAP próbe pomocou medeného drôtku (tj. štvorramennej "klietky") ako

popisuje kapitola 4.4.2. Týmto spôsobom bolo získaných sedem biologických opakovaní. Plocha osemenia bola vypočítaná na základe merania priemeru jednotlivých semienok pred ASAP-MS analýzou. Hmotnosť osemenia bola získaná po ASAP-MS analýze celých semien. Tieto údaje sú zhrnuté v *Tabuľke 7*.

Tabuľka 7. Údaje o rozmere kompaktných semien a hmotnosti ich osemenia z dvoch genotypov hrachu siateho (L100, CAMEOR) použitých v ASAP-MS analýzach.

		Priemer semienka (mm)	Plocha osemenia (mm ²)	Hmotnosť osemenia (mg)		Priemer semienka (mm)	Plocha osemenia (mm ²)	Hmotnosť osemenia (mg)	
L100	1	4.21	55.67	21.99	CAMEOR	1	7.47	175.21	18.90
	2	5.16	83.63	23.99		2	7.99	200.46	18.90
	3	5.27	87.21	24.13		3	7.71	186.65	21.35
	4	4.49	63.30	19.69		4	8.20	211.13	21.79
	5	4.52	64.15	21.92		5	7.50	176.63	20.82
	6	4.60	66.44	22.73		6	8.30	216.31	23.06
	7	4.51	63.87	19.30		7	8.23	212.68	22.20
Priemer		4.68	69.18	21.96	Priemer	7.91	197.01	21.00	
SMODCH		0.39	11.63	1.90	SMODCH	0.35	17.45	1.60	

4.4.3 ATR-FTIR meranie

Osemenie základných 6 genotypov bolo bez nutnosti jeho narušenia priamo zmerané aj pomocou techniky ATR-FTIR. Merali sa kompaktné semená. Táto technika bola použitá aj u semien, ktoré boli teplotne cyklované. Meranie bolo prevedené pre strednú IR oblasť (4000-400 cm⁻¹). Každý genotyp bol analyzovaný v šiestich biologických opakovaniach. V priebehu merania sa kládol dôraz na zachovanie kompaktnosti semien, aby boli spektrá získané len z povrchu osemenia (výsledky neboli ovplyvnené vnútornými vrstvami osemenia a v prípade malého množstva semien sa dali následne použiť pre deštruktívnu analýzu hmotnostnou spektrometriou). V prípade analýzy 6 základných genotypov boli pre následný LDI-MS experiment použité nové semienka. Teplotne cyklované semienka hrachu siateho boli predložené iba v piatich biologických opakovaniach a preto každé osemenie bolo zmerané najskôr pomocou ATR-FTIR a následne pomocou LDI-MS techniky (multimodálny experiment).

4.4.4 LC/MS meranie

Pomocou kvapalinovej chromatografie s UV/VIS a hmotnostno spektrometrickou detekciou boli prevedené analýzy v štúdií teplotného cyklovania. LC/MS technika bola použitá ako posledná. Kvôli nedostatku materiálu (dostupných bolo len päť semienok, teda päť biologických opakovaní z každého cyklovaného genotypu a príslušnej kontroly) a nutnosti homogenizácie materiálu na prípravu extraktu, boli kompaktné semená zmerané najskôr pomocou ATR-FTIR. Následne boli tie isté osemenia olúpané a podrobené LDI-MS analýze. Osemenie čo ostalo, bolo zhomogenizované, zvážené, extrahované a analyzované pomocou LC/MS.

Extrakt cyklovaného hrachu (osemenia) a príslušných kontrol boli pripravené z jemne namletého prášku, ktorý bol navážený a extrahovaný zmesou rozpúšťadiel acetón:voda (70:30, v:v) v pomere: 1.5 mg navážky a 80 µl extrakčného činidla. Postup extrakcie bol prevzatý z práce²⁰⁸ a modifikovaný (do extrakčného činidla nebola pridaná kyselina askorbová). Extrakcia prebiehala počas 3 hodín v ultrazvuku za stáleho chladenia pomocou ľadu, aby nedochádzalo k možnému tepelnému rozkladu látok. Extrakt boli po ukončení extrakcie zcentrifugované počas 5 minút pri 14 000 otáčkach za minútu. Následne bolo zo supernatantu odobratých 250 µl do čistej vialky, z ktorej sa prúdom dusíku odfúkalo rozpúšťadlo a vzorka sa nariedila na 500 µl pomocou zmesi metanol:mobilná fáza A (1:1, v:v). Takto pripravené vzorky boli zfiltrované cez membránový PTFE mikrofilter (poréznosť 0.2 µm) a nadávkované do kvapalinového chromatografu. Vedľa extraktov boli merané aj odpovedajúce (analogicky pripravené) slepé vzorky.

4.4.5 Analýza pomocou ESI-MS (priama infúzia)

Pri meraní elektrosprejom boli pripravené extrakt osemenia genotypu L100. Tie boli do iónového zdroja zavedené priamou infúziou. Extrakt bol pripravený podľa extrakčného protokolu použitého aj u LC/MS analýz (kapitola 4.4.4) a bude bližšie popísaný v časti venovanej LC/MS analýze.

4.5 Optimalizácia parametrov merania a ich nastavenie

4.5.1 Podmienky pre LDI a MALDI-MS meranie

Pre (MA)LDI-MS analýzu boli za kľúčové vybrané a následne optimalizované nasledujúce parametre: napätie na hexapóle, napätie vkladané na MALDI plate, “energia laseru”, rýchlosť pohybu MALDI doštičky (vzhľadom na laserový lúč). Optimalizácia bola prevedená za účelom získania čo najlepšieho signálu nájdených markerov na osemení JI64 (pre hmotu s m/z 455.41) a L100 (pre hmoty s m/z 395.38 a 423.42). Napätie na hexapóle vplýva na fokusáciu vygenerovaných iónov a ich transmisiu z MALDI zdroja do analyzátoru hmotnostného spektrometru. Pri optimalizácii prevedenej za účelom získania naintenzívnejšieho signálu mastných kyselín boli testované hodnoty 250, 300, 350, 400 a 450 V. Napätie vkladané na MALDI plate bolo optimalizované vzhľadom na signál vyšších mastných kyselín ako druhé v poradí (zároveň, napätie na hexapóle bolo už nastavnené na jeho optimálnu hodnotu pre dané signály) v rozmedzí od 0 do 25 V. Konkrétne boli testované hodnoty 0; 10; 15; 20 a 25 V. Nasledovalo ladenie tretieho parametru v poradí, ktorým bola “energia laseru” (jej ladenie prebiehalo pri zvolenom optimálnom napätí na hexapóle a napätí vloženom na MALDI plate). V tomto prípade sa jedná o bezrozmerné číslo, ktorého hodnota odráža pozíciu ND (Neutral Density) filtra. Pozícia ND filtra ovplyvňuje transmisiu laserového lúča s $\lambda = 355$ nm. Závislosť transmisie na tomto parametru však nie je lineárna. V rozmedzí arbitrárnych hodnôt “energie laseru” od 300 do 400 je rozsah transmisie zhruba 40-95%. Testované hodnoty parametra “energie laseru” boli 300, 350, 400 a 450. Posledným parametrom (ladeným za optimálnych hodnôt predchádzajúcich troch zvolených parametrov) bola rýchlosť pohybu MALDI doštičky s osemením (parameter “Step Rate”), ktorá môže byť v riadiacom software nastavená na hodnotu od 1 do 50 (poznámka: jedná sa tiež o bezrozmerný parameter). Čím je daná hodnota nižšia, tým pomalší pohyb MALDI doštička vykonáva, vyššia hodnota pohyb urýchľuje. Testované hodnoty boli zvolené ako hodnoty 1, 10, 15, 25 a 30. Pri klasickom (MA)LDI-MS meraní bol použitý priemer laserového lúča 150 μm . Doba analýzy bola 6 minút. Pred meraním vlastného spotu s pripevneným osemením bolo zmerané ešte spektrum z referenčného spotu, na ktorý bol nanosený červený fosfor. Toto referenčné meranie, ktoré je súčasťou získaného datového súboru z danej analýzy bolo použité pre overenie presnej a správnej m/z hmoty látok v MS spektrách. (MA)LDI-MS meranie bolo prevedené v pozitívnom a negatívnom ionizačnom móde v

rozsahu m/z hmôt od 50 do 1200 Da, vždy v minimálne štyroch biologických opakovaníach.

Okrem parametrov nastavenia bola na štandardoch kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej optimalizovaná aj kolízna energia (eV), pri ktorej boli potom prevedené fragmentačné experimenty týchto látok na osemeni L100 a JI64. Pri optimalizácii sa sledoval čo najvyšší výťažok fragmentov s hodnotou m/z 377 (z hexakosanoátu) a 405 (z oktakosanoátu), ktoré korešpondujú so stratou molekuly vody. Optimálna hodnota kolíznej energie pre MSMS experimenty je hodnota 30 eV.

4.5.2 Podmienky pre hmotnostné zobrazovanie pomocou LDI-MS (MSI analýza)

LDI-MS technika bola použitá na analýzu povrchu osemenia vyššie uvedených 6 genotypov hrachu siateho, ich priečných rezov a rekombinantne krížených línií genotypov JI64 a JI92 (RILs). Na vyhodnotenie získaných dát bol použitý HDImaging program (Waters, verzia 1.4). MSI meranie bolo realizované v negatívnom ionizačnom móde. Pri MSI analýzach bol zvolený priemer laserového lúča 60 μm . Veľkosť jedného pixelu bola teda nastavená na 50x50 μm , čo je rozmer s čiastočným prekryvom laserového lúča. Frekvencia laseru a čas skenu neboli pre zobrazovací experiment podrobnejšie optimalizované a ich hodnoty boli nastavené na 1000 Hz a na 1 s. V MSI meraniach nebola použitá matrica. Rozsah hmôt v MS skenu bol nastavený v rozmedzí od 50 do 1000 Da. Významným parametrom vplyvujúcim na výsledok a signály vyšších mastných kyselín bola energia laseru. Boli testované jej štyri hodnoty (tj. 200, 250, 300 a 350).

4.5.3 Podmienky pre ASAP-MS meranie

ASAP-MS analýza zahrňovala analýzy celých kompaktných semien, jednotlivých vypreparovaných kúskov osemenia. Pre všetky typy analýz boli použité nasledujúce nastavenia na hmotnostnom spektrometre. Všetky vzorky boli merané v negatívnom ionizačnom móde v rozsahu hmôt od 50 do 1000 Da (doba analýzy 3 minúty, dĺžka skenu 0.5 s). V ASAP-MS usporiadaní boli pre intenzitu signálu vyšších mastných kyselín významné nasledujúce parametre: doba analýzy, teplota ASAP

próby, prúd na výbojovej ihle a prietok desolvatačného plynu. Teplota na ASAP próbe bola testovaná v rozmedzí od 100 do 600°C (konkrétne pre hodnoty 100, 200, 300, 400, 500, 600°C), prúd na výbojovej ihle v rozmedzí od 0 do 25 μA (vybrané hodnoty boli 0, 5, 10, 15, 20, 25 μA) a prietok desolvatačného plynu v rozmedzí od 0 do 800 l/h (vybrané hodnoty 0, 200, 400, 600 a 800 l/h). Postup ladenie jednotlivých signálov bol podobný ako pri optimalizácii v MALDI-MS s ladením parametrov "krok po kroku". Prvou v poradí bola optimalizovaná teplota na ASAP próbe (za prednastavených východiskových parametrov: prúd na výbojovej ihle 5 μA , teplota zdroja 120°C, a prietok desolvatačného plynu 400 l/h). Druhým optimalizovaným parametrom bol prúd na výbojovej ihle (teplota zdroja a prietok desolvatačného plynu ostali nezmenené, teplota na ASAP próbe bola nastavená na optimálnu hodnotu). Posledným optimalizovaným parametrom bol prietok desolvatačného plynu, ktorý bol sledovaný pri nastavenej optimálnej hodnote predchádzajúcich dvoch parametrov. Teplota v iónovom zdroji bola nastavená na 120°C a tento parameter nebol optimalizovaný.

Pri fragmentačných experimentoch (meranie spektier po izolácii rodičovských iónov v kvadrupóle a kolízne aktivovanej disociácii rodičovských iónov v "Trap" kolíznej cele, MS/MS experimentoch) bola optimalizovaná aj kolízna energia (eV) na základe výťažku vybraného fragmentu zo štandardu hexakosanoátu a oktakosanoátu v rozsahu od 10 do 60 eV za účelom získania najvyššieho výťažku fragmentov. Sledovanými vybranými fragmentami boli hmoty s m/z 377.37 (odpovedá strate vody z hexakosanoátu) a 405.39 (odpovedá strate vody z oktakosanoátu) podobne ako v kapitole venovanej (MA)LDI optimalizácii. So zvyšujúcou sa kolíznou energiou sa sledoval zároveň aj pokles intenzity rodičovských iónov.

4.5.4 Podmienky pri ESI-MS analýze

ESI-MS detekcia prebiehala pri negatívnej ionizácii v rozsahu hmôt od 50 do 1000 Da. Prietok roztoku pri priamej infúzii bol 7 $\mu\text{l}/\text{min}$. Meranie správnej a presnej hmoty látok bolo zabezpečené meraním Lockspray (použitá látka Leucín-Enkefalin, prietok LockSpray 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, napätie na lockspray kapiláre 2 kV). Teplota zdroja bola nastavená na 120°C. Teplota desolvatačného plynu a jeho prietok boli nastavené na hodnotu 200°C a 400 l/hod. Nastavenie ďalších parametrov bolo nasledujúce: Cone Gas Flow (50 l/hod), Nebuliser Gas Flow (6 Bar), Scan Time (0.5 s).

4.5.5 Podmienky pre iónovo mobilnú separáciu

Iónovo mobilná separácia (IMS) bola použitá za účelom oddelenia m/z signálu analytov od interferujúcich látok s veľmi podobnými hodnotami m/z a pre potvrdenie identity detekovanej zlúčeniny na základe zhody v driftových časoch. Driftovací čas analytov z osemnia (L100) bol porovnaný s driftovacím časom príslušného štandardu (tj. hexakosanoátu a oktakosanoátu). Iónovo mobilná separácia bola uskutočnená v ASAP-MS a LDI-MS analýzach. Nastavenie rýchlosti (m/s) a výšky (V) mobilnej vlny pre vybrané analyty (vyjadrené cez m/z hodnoty) je uvedené v nasledujúcej *Tabuľke 8*:

Tabuľka 8. Použité hodnoty rýchlosti a výšky IMS vlny pri iónovo mobilnej separácii vybraných vyšších mastných kyselín.

Technika	m/z analytov	Rýchlosť vlny	Výška vlny
ASAP-MS	m/z 395.39 (L100 a štandard)	300 m/s	2.5V
ASAP-MS	m/z 423.44 (L100 a štandard)	280 m/s	2.4V
LDI-MS	m/z 395.39 (L100 a štandard)	300 m/s	2.5V
LDI-MS	m/z 423.44 (L100 a štandard)	280 m/s	2.4V
LDI-MS	m/z 455.41 (JI64)	350 m/s	2.5V
ESI-MS	m/z 395.39 (L100 a štandard)	300 m/s	2.5V
ESI-MS	m/z 423.42 (L100 a štandard)	280 m/s	2.4V

4.5.6 Podmienky pre ATR-FTIR meranie

Meranie bolo prevedené pre strednú IR oblasť s vlnočtom od 4000 do 400 cm⁻¹ v rozsahu 32 skenov (vrátane priebežného merania pozadia). Štatistické vyhodnotenie nameraných IR dát prebehlo pomocou software OMNIC a TQ ANALYST.

4.5.7 Podmienky pre LC-MS meranie

Separácia látok vyextrahovaných vyššie uvedeným spôsobom z osemnia cyklovaných genotypov a ich kontrol prebiehala na kolóne typu Cogent TYPE-C™ Silica temperovanej na 25°C. Separácia v systéme reverzných fáz prebiehala s

gradientovou elúciou s mobilnou fázou A (voda + 0.1% kyseliny mravčej) a mobilnou fázou B (acetonitril + 0.1% kyseliny mravčej). Mobilné fázy boli pred analýzou 15 minút odplyňované v ultrazvuku. Gradient mobilných fáz bol nastavený podľa nasledujúcej *Tabuľky 9*:

Tabuľka 9. Priebeh gradientovej elúcie.

Gradient mobilných fáz			
Čas (min)	MF-A (%)	MF-B (%)	Prietok MF (ml/min)
0	100	0	0.2
20	0	100	0.2
30	0	100	0.2
33	100	0	0.2
35	100	0	0.2

Pripravené extrakty boli nadávkované vždy v štyroch opakovaníach v objeme 2 µl. Po dvoch nadávkovaníach nasledovala vždy analýza príslušného slepého vzorku. Detekcia látok bola prevedená použitím PDA detektoru (rozsah vlnových dĺžok v rozmedzí od 200 do 750 nm; rozlíšenie 2.4 nm a rýchlosť záznamu 24 bodov/s) a MS detekcie. V hmotnostnom detektore boli m/z hodnoty eluovaných látok korigované pomocou lockspray merania (s látkou leucín-enkefalín s koncentráciou 1 ng/µl v zmesi H₂O:acetonitril 50:50 a s prídavkom 0.1% kyseliny mravčej, v/v/v). Ionizácia látok prebiehala v pozitívnom móde v rozsahu meraných hmôt od 50 do 1200 Da. Čas skenu bol nastavený na 1 s. Ďalšie parametre použité pre MS detekciu boli: napätie na kapiláre 2.5 kV, teplota ionizačného zdroja 120°C, teplota desolvatačného plynu 150°C, prietok desolvatačného plynu 400 l/h, cone gas flow 50 l/hod.

4.5.8 Vyhodnotenie LDI, MALDI-MS, ASAP-MS a LC-MS dát

Zobrazenie MS spektier bolo prevedené pomocou programu MassLynx (Waters). Identifikácia a evaluácia markerov v MS spektrách bola uskutočnená pomocou softwarového rozšírenia MarkerLynx (Waters, verzia 4.1) a štatistického softwaru EZinfo (verzia 2.0, Umetrics Malmö, Švédsko), ktorá je tiež súčasťou

MassLynxu. Tieto nastavbové programy poskytli možnosť vyhodnotenia viacrozmerných MS dát pomocou Analýzy hlavných komponent (PCA) a Diskriminačnej analýzy ortogonálnych projekcií do latentných štruktúr (OPLS-DA). Parametre metódy pre MarkerLynx a EZInfo boli nastavené tak, aby boli z markerov vylúčené signály patriace šumu, ale aby zároveň nedochádzalo k orezaniu menej intenzívnych charakteristických signálov zo spektier. Boli nastavené tieto parametre: prahová hodnota intenzity markerov nastavená na 1000 impulzov, separácia píku pri 0.05 Da, hmotnostný rozsah v rozmedzí od 50 do 1200 Da. V štatistickej metóde pri PCA sa testoval aj typ škálovania a to Univariate a Pareto. Významnosť jednotlivých markerov (m/z hodnot) bola posudzovaná na základe ich polohy ("x" a "y" súradníc) v príslušných S-plotov (S-plot zobrazuje m/z hodnoty markerov; ich významnosť narastá vzdialenosťou od osi x a y) a intenzity v surových MS spektrách. Parametre pre štatistické spracovanie LC-MS dát boli: rozsah retenčných časov 0.5 – 10 min, rozsah m/z hodnôt 50-1200 Da, odchýlka 0.05 Da, prahová hodnota intenzity markerov nastavená na 1000 impulzov, vybrané škálovanie: Pareto.

5. Výsledky a diskusia

Hmotnostne spektrometrické a FTIR experimenty boli zamerané na vybraných šesť základných genotypov (JI64, L100, VIR320, JI92, Terno, Cameor), ktoré boli rozdelené do dvoch skupín podľa úrovne dormancie²⁰⁸. Do skupiny dormantných patrili genotypy JI64, L100 a VIR320. Skupinu nedormantných tvorili genotypy JI92, Terno a Cameor. Vybrané genotypy reprezentujú divoké aj kultúrne odrody hrachu siateho a dormancia týchto semien bola experimentálne určená na Katedre botaniky, PĚF UP Olomouc testovaním bobtnania a začiatku klíčenia semien sledovaných genotypov²⁰⁸.

5.1 Vývoj a optimalizácia metódy LDI-MS a MALDI-MS

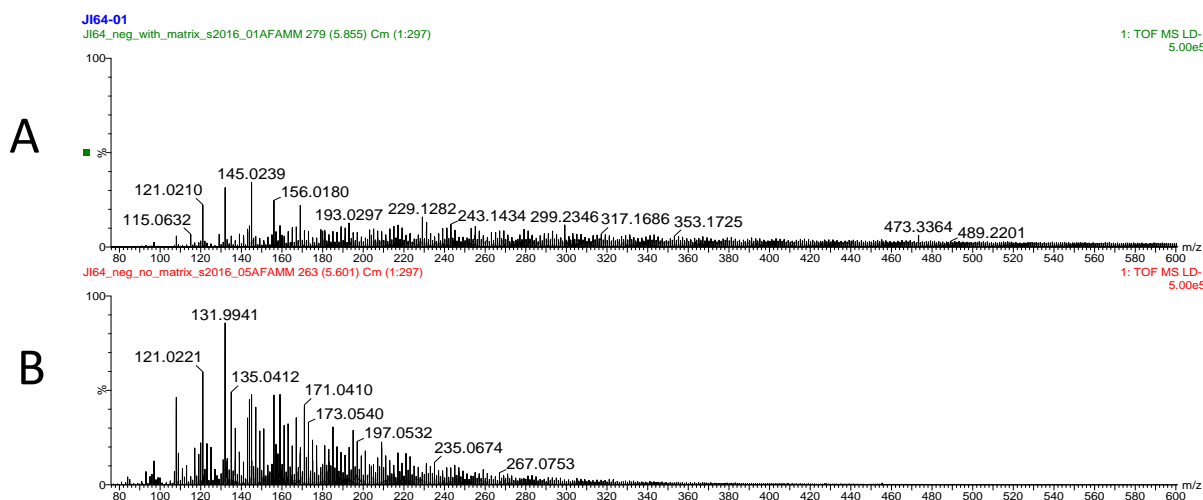
5.1.1. Vplyv spracovania rastlinného materiálu pre LDI-MS experiment

Vývoj a optimalizácia metódy LDI a MALDI-MS zahrňovala dve úlohy. Prvá sa týkala praktickej úpravy a spracovania vzoriek fixovaných na MALDI plate. Druhá úloha zahrňovala nájdenie optimálnych inštrumentálnych podmienok merania, ktoré by poskytovali najlepší signál pre študované chemické markery.

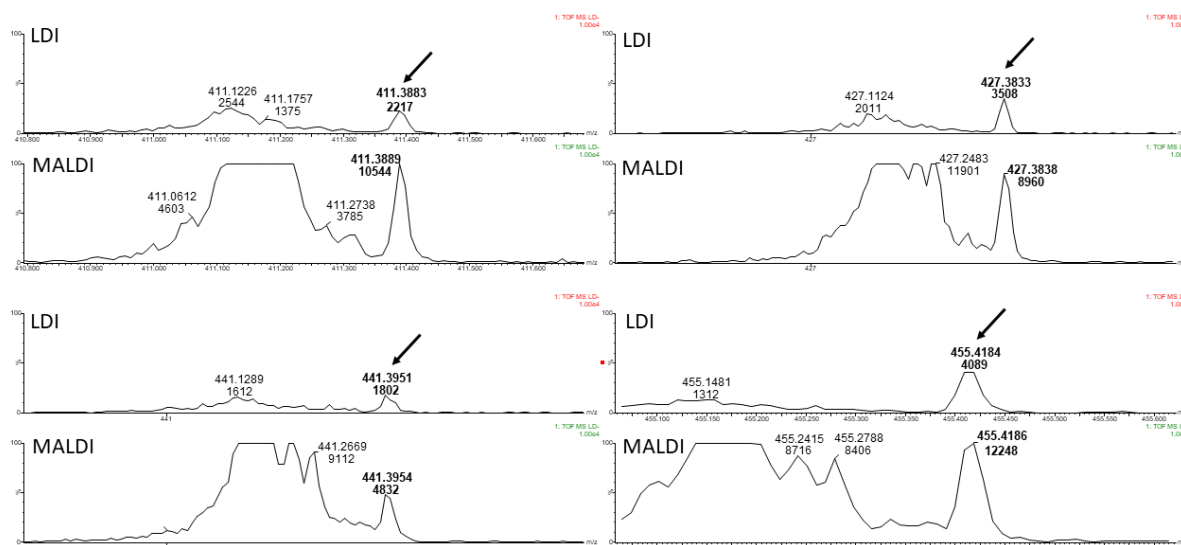
V pilotných LDI-MS meraniach bol testovaný vplyv matrice (THAP pre kladný ionizačný mód, AQ pre negatívny ionizačný mód) na kvalitu a rozdiely v MS spektrách v porovnaní s meraním bez použitia matrice. Vhodne zvolená matrica by mala napomáhať desorpcii/ionizácii látok zo vzoriek. Testovanie sa týkalo aj spôsobu nanosenia matrice pomocou automatickej pipety priamo na osemenia alebo pomocou automatického sprejovania (prístrojom SunCollect). Ukázalo sa, že použitie matrice má vplyv na výsledné MS spektrá. Ich rozdiel je demonštrovaný na osemení genotypu JI64 na *Obrázku 7*. Je badateľné, že použitím matrice dochádza k zmene profilu MS spektra vybraného osemenia JI64 (*Obrázok 7A-B*) a taktiež k ovplyvneniu (zvýšeniu) intenzity signálov vyšších mastných kyselín na osemení JI64 (2.6 – 4.8x, *Obrázok 8*). Ich identifikácia a význam v súvislosti s dormanciou budú diskutované v nasledujúcich kapitolách zameraných na LDI-MS meranie. Hoci malo použitie matrice pozitívny vplyv na celý rad signálov, jej aplikácia pomocou automatickej pipety spôsobovala neželané mechanické krútenie fixovaných kúskov osemenia na MALDI doštičke (odlišné rozpínanie/zmršťovanie jednotlivých vrstiev v osemení vplyvom solvácie rozpúšťadlom ako analogický process k mechanickým zmenám v osemení pri jeho

zbožtnaní v prvej fázi klíčenia semena) a následne odpadávaniu fixovaných kúskov osemenia z obojstrannej lepiacej (fixačnej) pásky. Tento neželaný jav je demonštrovaný na *Obrázku 1* v prílohe. V prípade stečenia roztoku matrice mimo povrch osemenia dochádzalo k ešte výraznejšiemu uvoľňovaniu fixovaného osemenia z fixačnej pásky. Krútenine a riziko odpadnutia materiálu vo vakuovom MALDI zdroji riešilo automatické sprejovanie pomocou SunCollectu. Avšak, automatické sprejovanie muselo prebiehať s malým sprejovacím prietokom roztoku matrice, s dostatočným odstupom sprejovacej kapiláry od osemenia a s dostatočne dlhými odstupmi medzi sprejovaním jednotlivých vrstiev matrice, čo významne predlžuje čas prípravy vzoriek k analýze. V nasledujúcej časti bude komentové bližšie ako sa použitie, či vynechanie, matrice prejavilo pri štatistickom spracovaní dát pomocou viacrozmerých metód (PCA a OPLS-DA). Je dôležité predom uviesť, že kľúčové experimenty v analýze osemenia hrachu siateho boli na základe výsledkov z viacrozmernej štatistiky prevedené bez aplikácie matrice na povrch osemenia, čo viedlo k urýchleniu a zjednodušeniu experimentov s laserovou desorpciou/ionizáciou. Druhým aspektom pri vynechaní aplikácie matrice bola skutočnosť, že aplikácia matrice zvyšuje signál látok interferujúcich so signálom nájdených markerov (markery sú označené šípkou na *Obrázok 8*), čo bol neželaný jav.

Obrázok 7. Porovnanie MALDI-MS spektra (A) a LDI-MS (B) získaného z osemenia J164 pri negatívnej ionizácii.



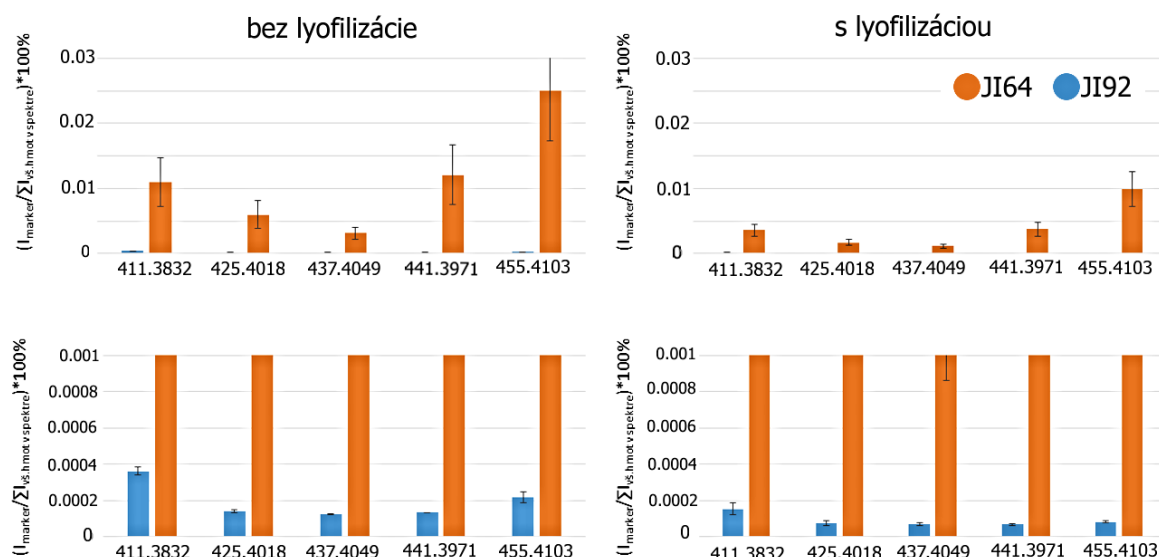
Obrázok 8. Vplyv použitia matrice na signály nájdených markerov (tj. vyšších mastných kyselín, označené šípkou) prítomných na osemeni JI64 (merané pri negatívnej ionizácii).



Vlastnosti materiálu pri meraní môže ovplyvňovať aj spôsob uchovania materiálu. Bežne používaným postupom v biologickom výskume je lyofilizácia. Preto bol skúmaný aj efekt lyofilizácie osemenia na signály látok v LDI-MS spektrách. Lyofilizácia bola aplikovaná na osemenie dvoch vybraných genotypov JI64 (dormantný) a JI92 (nedormantný). Lyofilizácia spôsobuje významné zmeny v procese ionizácie. Celkový iónový prúd sa zväčšil 2.5 krát v prípade JI64 a 2 krát v prípade JI92 (TIC, celkový iónový prúd, je vyhodnotený z MS spektra), avšak intenzita signálov vybraných mastných kyselín ostala rádovo rovnaká. Na *Obrázku 9*. sú prezentované normalizované intenzity vybraných mastných kyselín v osemeni JI64 a JI92, ktoré bolo podrobené 5-dňovej lyofilizácii a v rovnakom osemeni bez tejto úpravy. Kontrolné osemenia umožňujú sledovať, či dochádza lyofilizáciou aj ku kvalitatívnym zmenám v spektrách. Normalizácia bola prevedená vydelením intenzity signálu príslušnej vyššej mastnej kyseliny sumou intenzít všetkých signálov v MS spektre a vynásobením číslom 100 (vyjadrenie v percentách). Bolo pozorované, že po 5 dňovej lyofilizácii dochádza k poklesu normalizovanej intenzity pre signály študovaných mastných kyselín. Vzhľadom na to, že lyofilizované osemenie bolo pri manipulácii krehké, sušenie pri nízkej teplote zrejme spôsobilo zmeny v štruktúre osemenia (mikroskopické praskanie štruktúr). Toto sa potom mohlo prejaviť v náraste celkového iónového prúdu v MS spektrách. Zároveň sa to prejavilo v poklese signálov mastných

kyselín, ktoré sú zrejme prítomné len na povrchu osemenia (cez mikroprasklinky sa teda pri LDI zrejme uvoľňuje a ionizuje materiál z hlbších vrstiev osemenia, ktoré prispievajú k TIC a znižujú relatívnu intenzitu látok z povrchu). Lyofilizáciou sa napríklad zvýšili signály látok s m/z 193.0123, 217.0153, 227.2104, 281.2563, 241.0118, 241.2221, 373.0426, 1040.0724 a iné. Tieto signály neboli v rámci práce identifikované.

Obrázok 9. Normalizované intenzity vybraných mastných kyselín v osemení JI64 a JI92. Naľavo je LDI-MS meranie osemenia bez lyofilizácie, napravo je LDI-MS meranie osemenia s lyofilizáciou. V dolnej časti sú histogramy zväčšené pre os y na lepšie zobrazenie malých hodnôt (zoom).

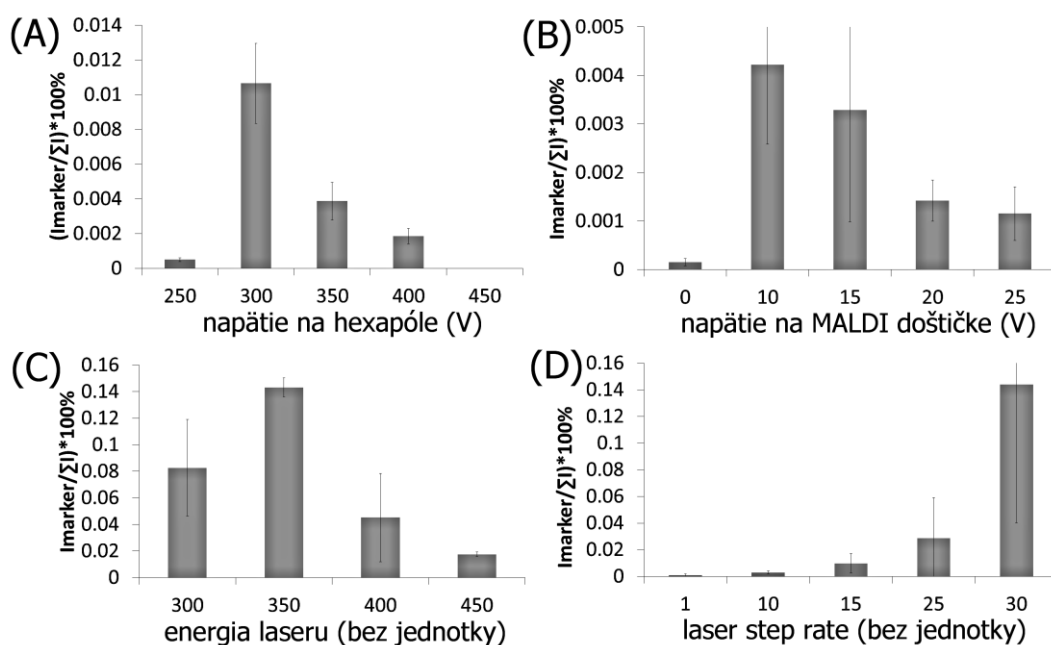


5.1.2. Optimalizácia parametrov LDI-MS merania

Účelom optimalizácie bolo dosiahnutie čo najvyšších intenzít signálov vyšších mastných kyselín pri meraní povrchov osemenia. Detailná optimalizácia bola prevedená na dormantných genotypoch JI64 a L100. Genotypy boli zvolené, lebo práve pre nebol charakteristický signál vyšších mastných kyselín (JI64 – dihydroxyoktakosanoát, L100 – hexakosanoát a oktakosanoát). Postup optimalizácie prístrojových parametrov bol popísaný v kapitole 4.5.1. a 4.5.2. Pre LDI-MS a MSI techniku je významným parametrom napätie na hexapóle, ktoré ovplyvňuje transmisíu vzniknutých iónov z MALDI zdroja do ďalších častí hmotnostného spektrometra. Pre

dihydroxyoktakosanoát bola optimálna hodnota napätia na hexapóle 300 V. Druhým parametrom ovplyvňujúcim signál vyššie spomenutých látok bolo napätie vkladané na MALDI doštičku. Najvyšší signál pre dihydroxyoktakosanoát bol dosiahnutý pri 10 V. Priebeh optimalizácie vyššie spomenutých parametrov je ukázaný na *Obrázku 10*, konkrétne na normalizovanom signále dihydroxyoktakosanoátu v osemení J164.

Obrázok 10. Optimalizácia vybraných parametrov v LDI-MS meraní vzhľadom na signál dihydroxyoktakosanoátu v osemení J164. V grafoch je vynesená hodnota intenzity signálu tohto markeru normalizovanej na celkový iónový prúd (A- napätie na hexapóle, B- napätie na MALDI doštičke, C- energia laseru, D- rýchlosť pohybu laseru po vzorke).

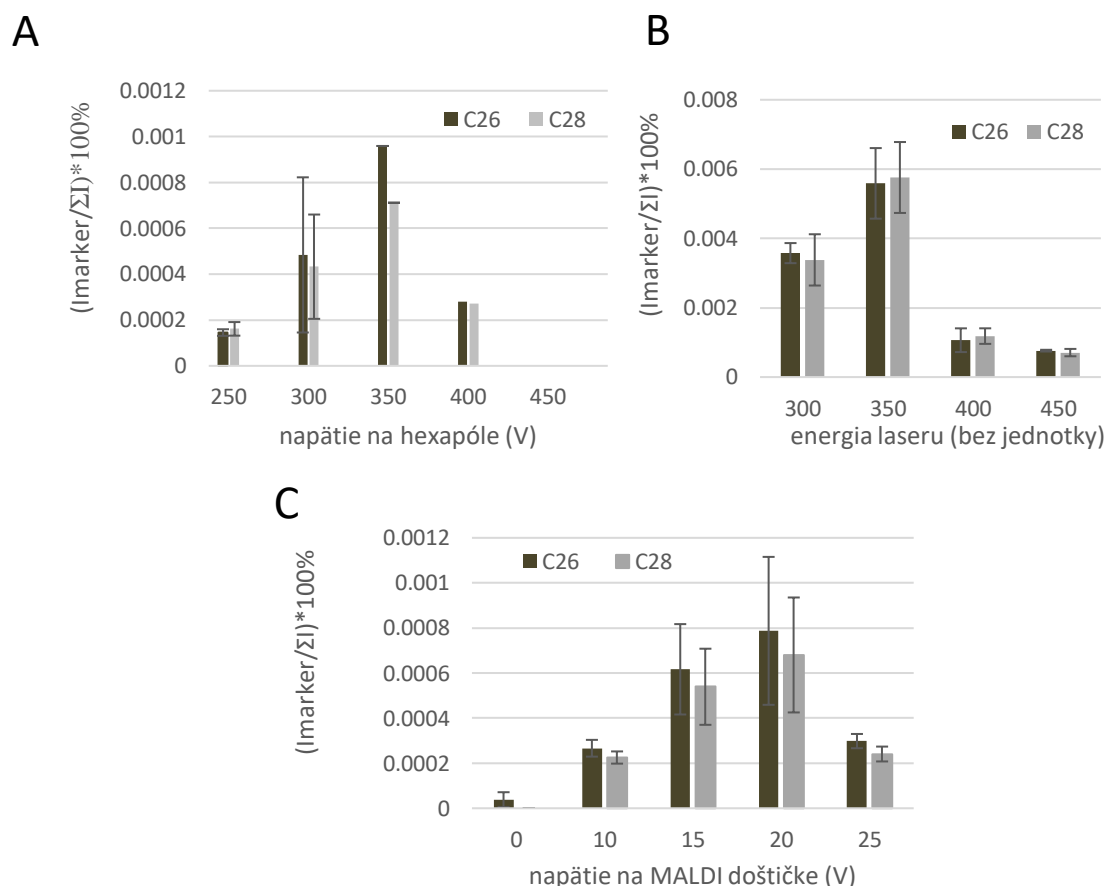


Bolo zistené, že optimálnou hodnotou energie laseru bola v prípade dihydroxyoktakosanoátu hodnota 350 v klasickej LDI-MS analýze, kedy bol použitý 150 μm focus laseru (*Obrázok 10C*). Najvyššia intenzita signálu dihydroxyoktakosanoátu bola dosahovaná pri maximálnej hodnote step rate laseru 30.

V prípade ďalších dvoch markerov (tj. hexakosanoátu a oktakosanoátu na osemení L100) bola ich najvyššia intenzita signálu získaná pri napätí na hexapóle s hodnotou 350V a napätí vložene na MALDI doštičku 20V. Optimálna hodnota energie laseru pre tieto markery bola hodnota 350, teda rovnaká ako v prípade

dihydroxyoktakosanoátu. **Obrázok 11** ukazuje priebeh optimalizácie LDI-MS signálu pre hexakosanoát a oktakosanoát na osemeni genotypu L100.

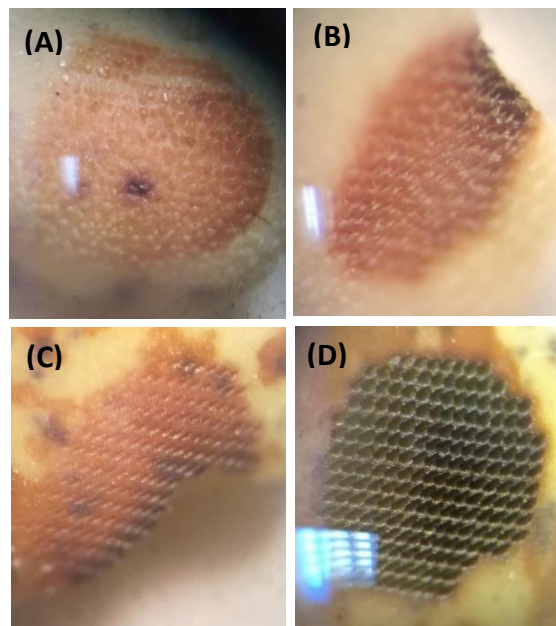
Obrázok 11. Optimalizácia parametrov pri LDI-MS meraní vzhľadom na signál hexakosanoátu (C26) a oktakosanoátu (C28) v osemeni L100. V grafoch je vynesená hodnota intenzity signálu markerov normalizovanej na celkový iónový prúd (A- napätie na hexapóle, B- energia laseru, C- napätie na MALDI doštičke).



Vyššie hodnoty energie laseru spôsobujú nežiadúcu pyrolýzu osemenia, prípadne nežiadúce prepaľovanie sa laserom do hlbších vrstiev v osemeni. Prípadnú pyrolýzu osemenia je možné potlačiť zvýšením hodnoty parametru s názvom “step rate”, ktorý koreluje s rýchlosťou pohybu MALDI doštičky oproti zafixovanej pozícii laseru. Vyššia hodnota “step rate” súvisí s rýchlejšim pohybom doštičky. Pre všetky tri látky platilo, že ich signál bol najintenzívnejší pri hodnote 30. Pri MS zobrazovaní bolo nutné energiu laseru znížiť na hodnotu 300. Energia laseru s hodnotou 300 predstavovala tiež kompromis v účinku laseru pri porovnávacích meraniach medzi jednotlivými genotypmi (tvrdšími dormantnými a mäkšími nedormantnými), kedy

nedochádzalo k prepaľovaniu laserom skrz mäkkšie osemenie (genotypy JI92, CAMEOR a Terno). Vo všeobecnosti, vyššie hodnoty spôsobovali prepálenie laseru skrz osemenia a nižšie hodnoty už nespokoľovali dostatočný signál vyšších mastných kyselín na osemení všetkých genotypov. *Obrázok 12.* ukazuje osemenie JI64 a JI92 po MSI analýze pri dvoch rôznych energiách laseru - optimálnej (300) a vyššej (350).

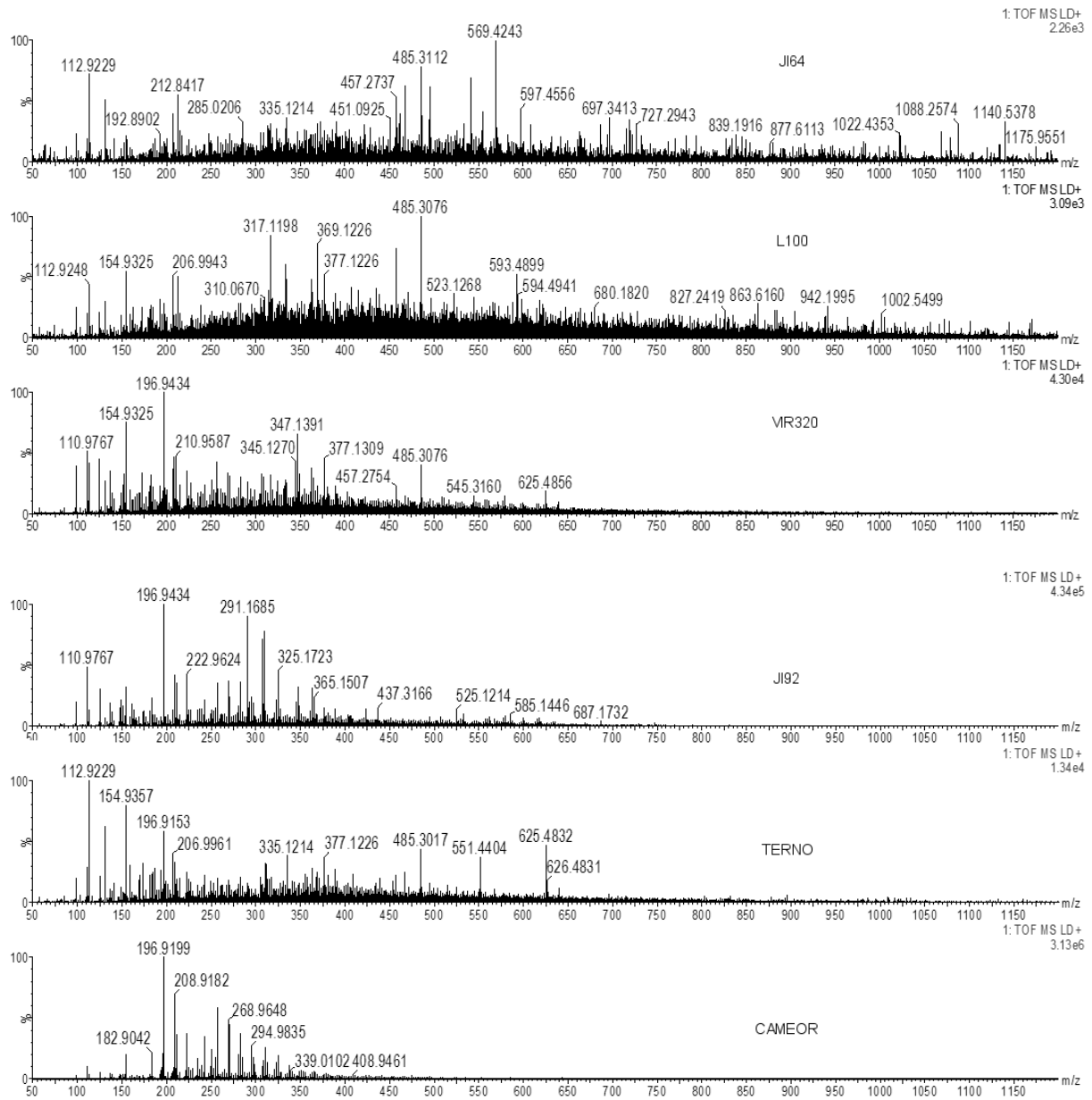
Obrázok 12. Vplyv energie laseru pri MSI analýze osemenia. (dormantné osemenie JI64 (tvrdšie) na obrázku hore (A – energia laseru 300, B – energia laseru 350), nedormantné osemenie JI92 (mäkkšie) dole (C – energia laseru 300, D – energia laseru 350)).



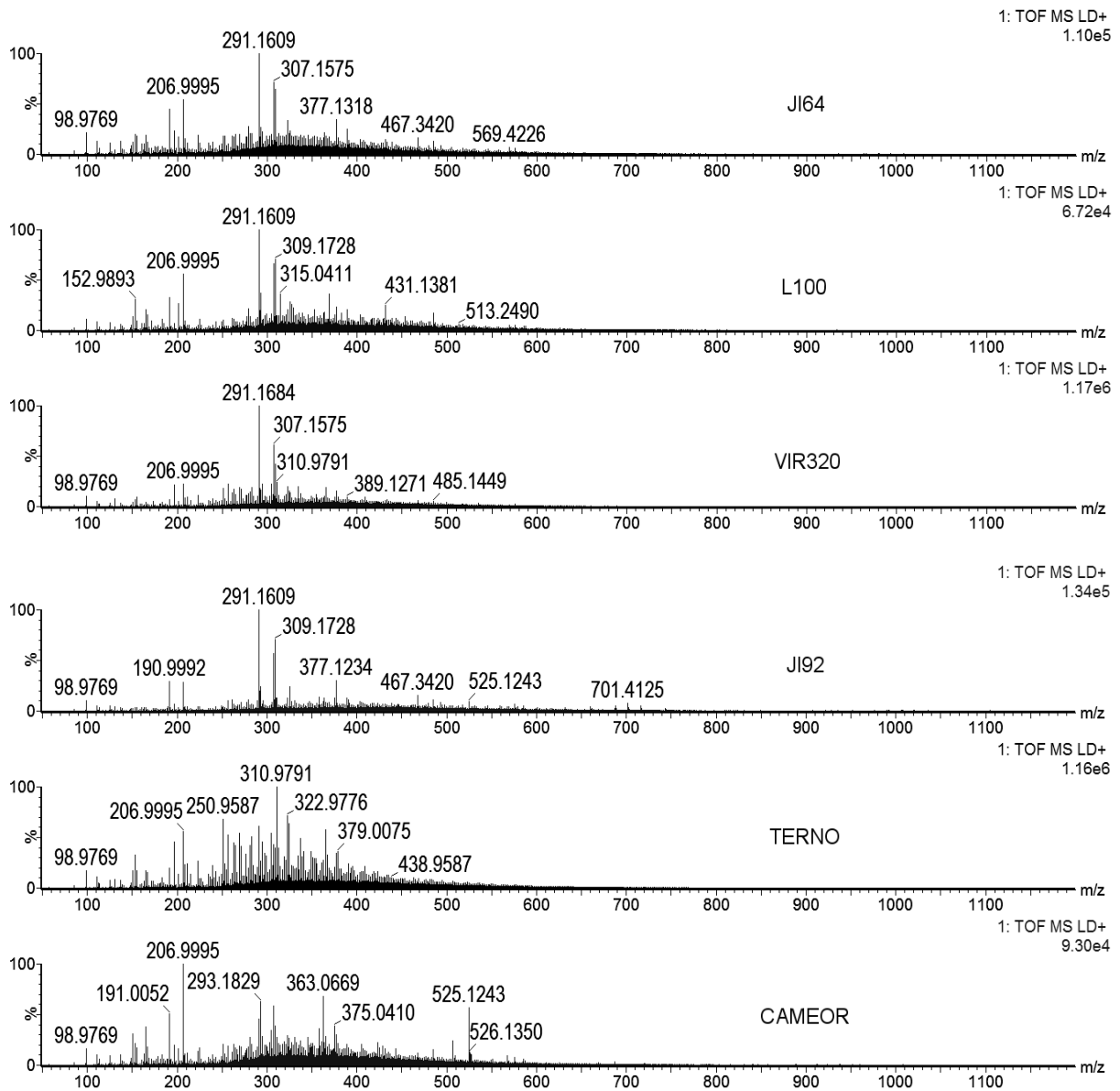
5.2 Analýza osemenia hrachu siateho pomocou LDI-MS a MALDI-MS a zpracovanie dát pomocou PCA a OPLS-DA

Povrch osemení základných vybraných šiestich genotypov hrachu siateho bol zmeraný za optimalizovaných podmienok pomocou LDI a MALDI-MS techniky v oboch ionizačných módoch. V prvom kroku boli porovnávané surové spektrá dormantných genotypov oproti nedormantným vždy pre meranie s pozitívnou (+) alebo negatívnou (-) ionizáciou. Študovaný bol tiež vplyv matrice na spektrum osemenia z jednotlivých genotypov. *Obrázky 13,14,15 a 16* ukazujú surové LDI-MS a MALDI-MS spektrá skúmaných genotypov hrachu siateho pri pozitívnej a negatívnej ionizácii. Rozdiely v spektrách medzi jednotlivými genotypmi sú pozorovateľné v spektrách bez i s použitím matrice. Avšak, ukázalo sa ako veľmi obtiažne priamo podchytiť vzájomné súvislosti (a rozdiely) medzi všetkými signálmi pre šesť genotypov (aj so súčasným sledovaním rozdielov s ohľadom na dormanciu). Táto úloha bola následne riešená pomocou viacerozmernej štatistickej analýzy, ako je popísané ďalej. Pri prvotnom pohľade do surových spektier bolo vidieť, že pri meraní v kladnom ionizačnom móde boli pozorované rozdiely v profile MS spektier medzi jednotlivými genotypmi oveľa významnejšie než pri ionizácii v negatívnom móde. Látka v (MA)LDI-MS(+) spektrách mali cca o dva rády nižšiu intenzitu signálov (tj. $10^3 - 10^4$) oproti negatívnej ionizácii ($10^5 - 10^7$). LDI-MS a MALDI-MS spektrá v pozitívnej ionizácii sú uvedené na *Obrázku 13 a 14*.

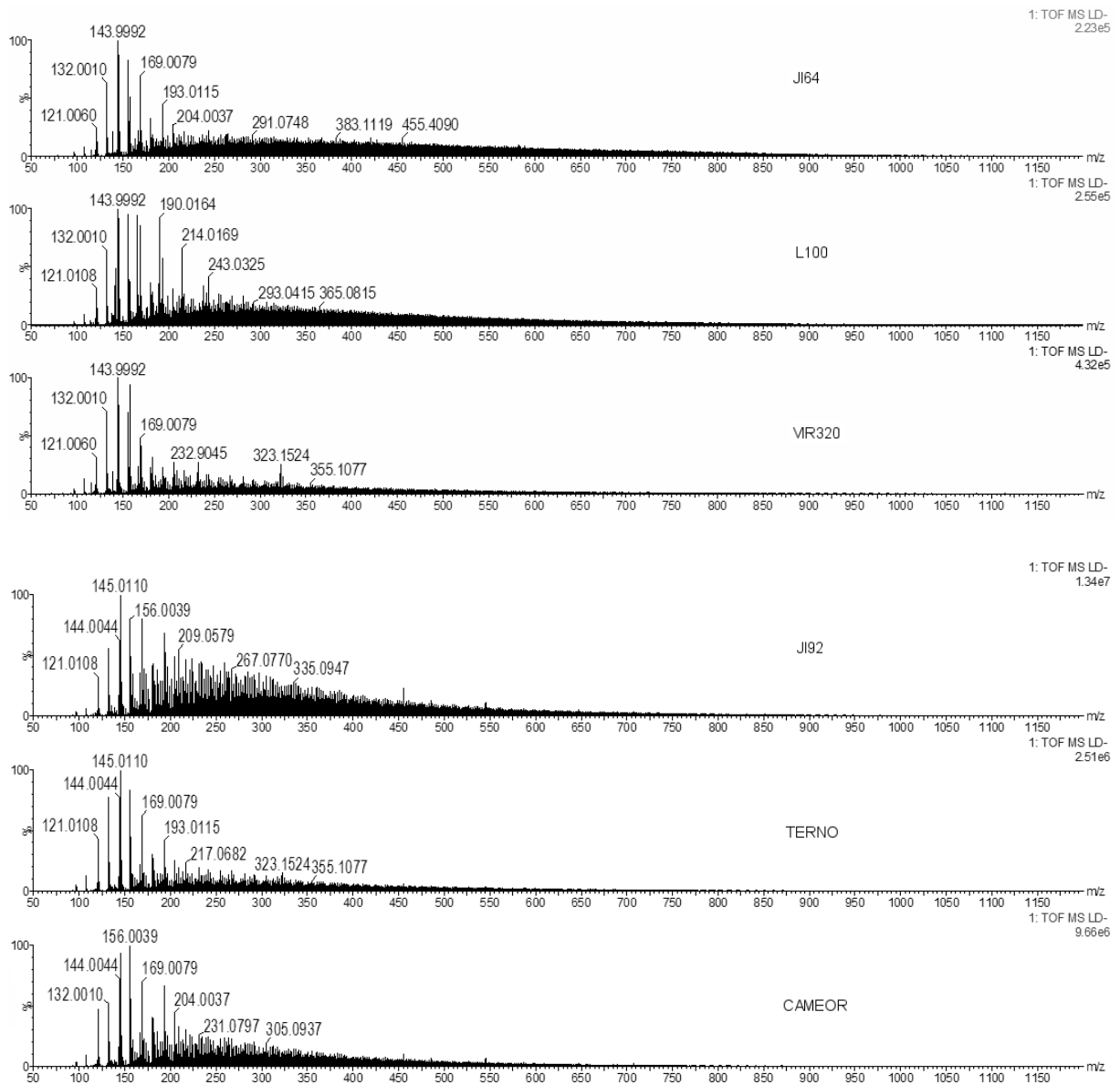
Obrázok 13. LDI-MS(+) spektra povrchu osemenia šiestich genotypov hrachu siateho (JI64, L100, VIR320 sú dormantné, JI92, Terno, CAMEOR sú nedormantné)



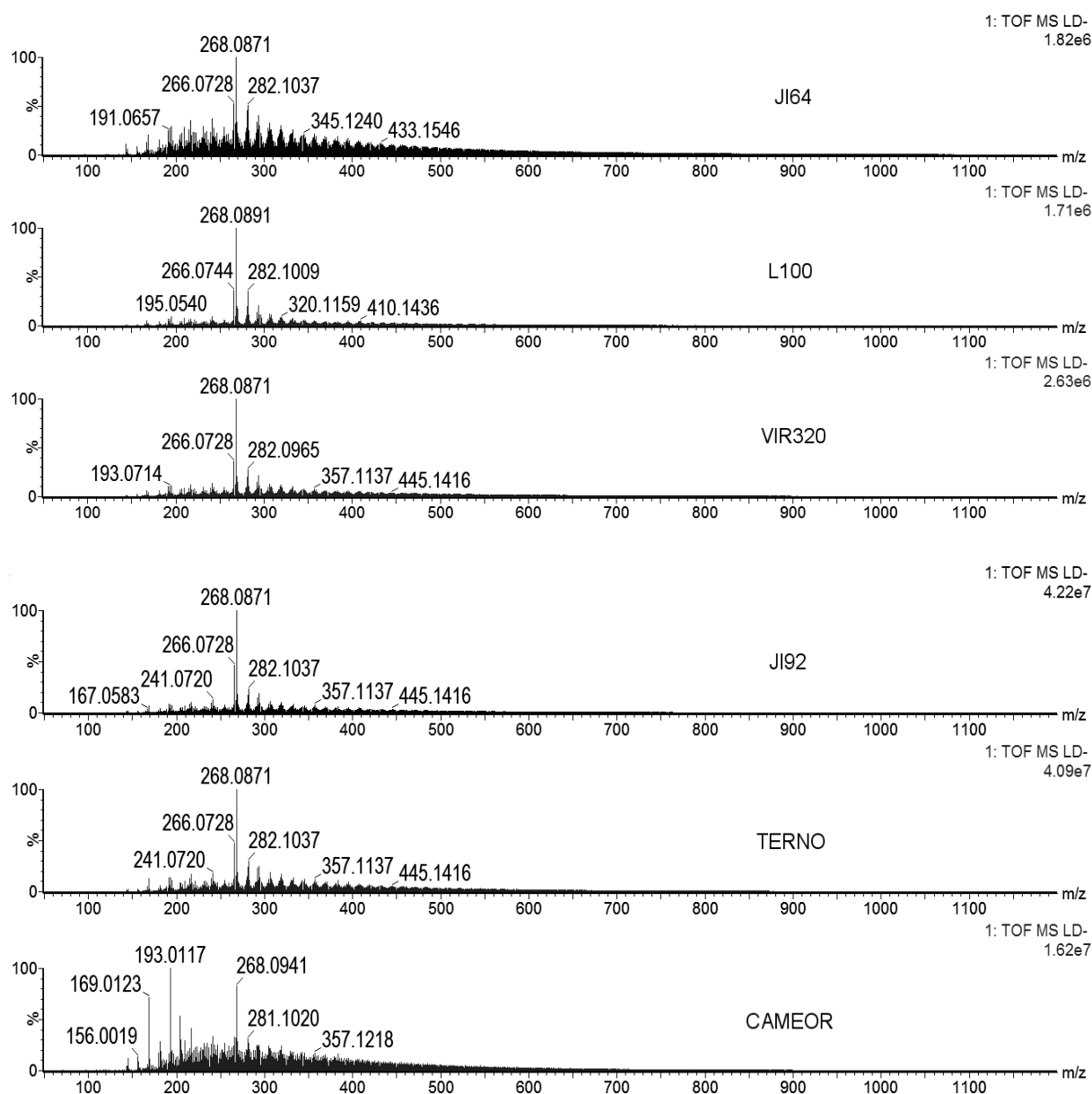
Obrázok 14. MALDI-MS(+) spektra povrchu osemenia šiestich genotypov hrachu siateho (JI64, L100, VIR320 sú dormantné, JI92, Terno, CAMEOR sú nedormantné).



Obrázok 15. LDI-MS(-) spektra povrchu osemenia šiestich genotypov hrachu siateho (JI64, L100, VIR320 sú dormantné, JI92, Terno, CAMEOR sú nedormantné).



Obrázok 16. MALDI-MS(-) spektra povrchu osemenia šiestich genotypov hrachu siateho (JI64, L100, VIR320 sú dormantné, JI92, Terno, CAMEOR sú nedormantné).



Na druhej strane sa dalo očakávať, že celý rad signálov v (MA)LDI-MS spektrách sa bude pre daný ionizačný mód zhodovať pre všetky genotypy (mnohé zložky osemenia sú pre genotypy podobné). Medzi nájdené signály, ktoré boli spoločné pre dormantnú a nedormantú skupinu patrili napríklad signály v pozitívnom ionizačnom móde s m/z: 98.9769, 112.9229, 154.9325, 196.9439, 206.9943, 291.1685, 317.11198, 369.1229, 377.1309, alebo signály v negatívnom ionizačnom

móde s m/z: 121.0060, 132.0010, 143.9992, 156.0039, 169.0079, 193.0115, 204.0037, 214.0169, 217.0682, 268.0770, 282.1081 306.1075, 319.1063, atď..

Podstatne detailnejší prieskum dát a porovnávanie spektier študovaných genotypov dovolili, ako je uvedené vyššie, postupy viacerozmernej štatistickej analýzy (PCA a OPLS-DA). PCA umožnila vizualizáciu všetkých MS dát (MS spektier od vybraných genotypov vrátane ich biologických opakovaní) a poodhalenie rozdielov medzi jednotlivými genotypmi_i rozdielov medzi skupinou dormantných a nedormantných genotypov. V PCA analýze boli využité a porovnané dva typy škálovania: Pareto a Univariate (UV). Spomenuté typy škálovania patria k najviac používaným škálovacím metódam v metabolomických štúdiách. V skratke vysvetlené, UV škálovanie berie signály metabolitov rovnocenne bez ohľadu na ich intenzitu. Pareto škálovanie funguje na princípe zníženia vplyvu intenzívnych signálov, a zároveň sa zdôrazňujú slabšie signály (ktoré však môžu mať niekedy väčší biologický význam než signály silné)²¹⁰. Tieto škálovacie metódy v určitej miere ovplyvňujú PCA analýzu a následne aj diskriminačnú analýzu, počet a pozíciu markerov vygenerovaných v S-plotoch (ich bližšia interpretácia je diskutovaná v kapitole 5.2.1 venovanej identifikácii markerov dormancie).

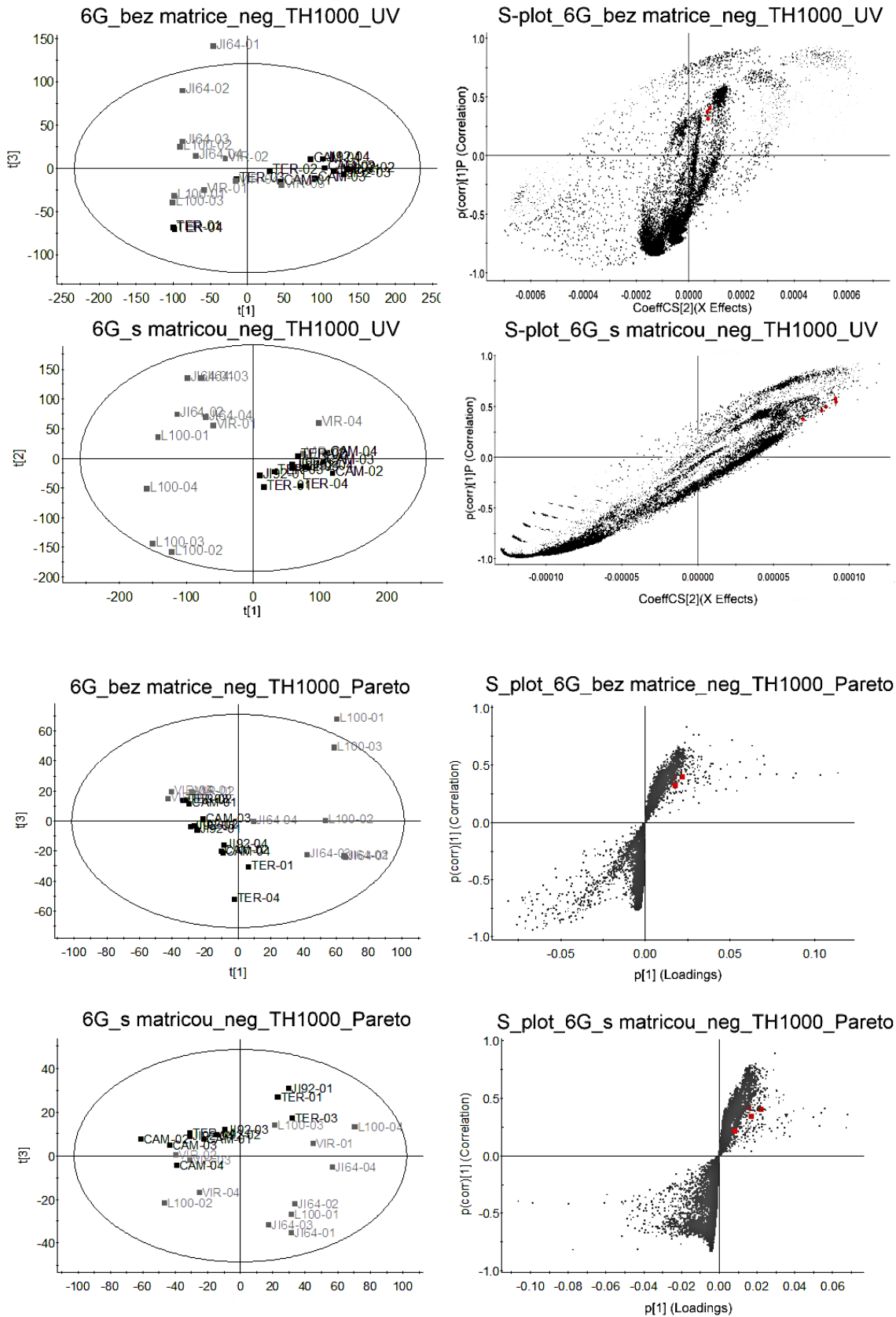
V predloženej práci boli porovnané obidva spôsoby škálovania. *Obrázok 17* ukazuje vplyv UV a Pareto škálovania v PCA a OPLS-DA analýze (MA)LDI-MS dát obsahujúcich šesť genotypov (označenie 6G) pri negatívnej ionizácii. Čierne body v S-plotoch predstavujú m/z hodnoty látok prítomných na osemeni. Červené body v S-plotoch reprezentujú signály niektorých špecifických vyšších mastných kyselín (ich m/z hodnoty), ktoré sa ukázali byť pre túto štúdiu významné. Ich poloha v S-plotoch a teda ich významnosť z hľadiska rozdielov medzi genotypmi nie je rovnaká a závisí významne od zvoleného škálovania. Vedľa toho je významný i vplyv matrice, ktorý bude tiež diskutovaný nižšie. V tomto prípade je zrejmé, že charakteristický tvar S-plotu, teda sigmoida, sa objavuje pri Pareto škálovaní.

Obrázok 18 poukazuje na vplyv škálovania na dáta z dvoch kontrastných genotypov z hľadiska fyzikálnej dormancie, J164 a J192 (označenie ako 2G). Tieto dva genotypy sa málo líšia vzhľadom osemenia^{208,211}, ale sú silno kontrastné práve s ohľadom na dormanciu a prestupnosť ich osemenia pre vodu, preto sa skúmali vo viacerozmernej štatistike aj samostatne. Požadovaný tvar sigmoidy v S-plotoch sa pre

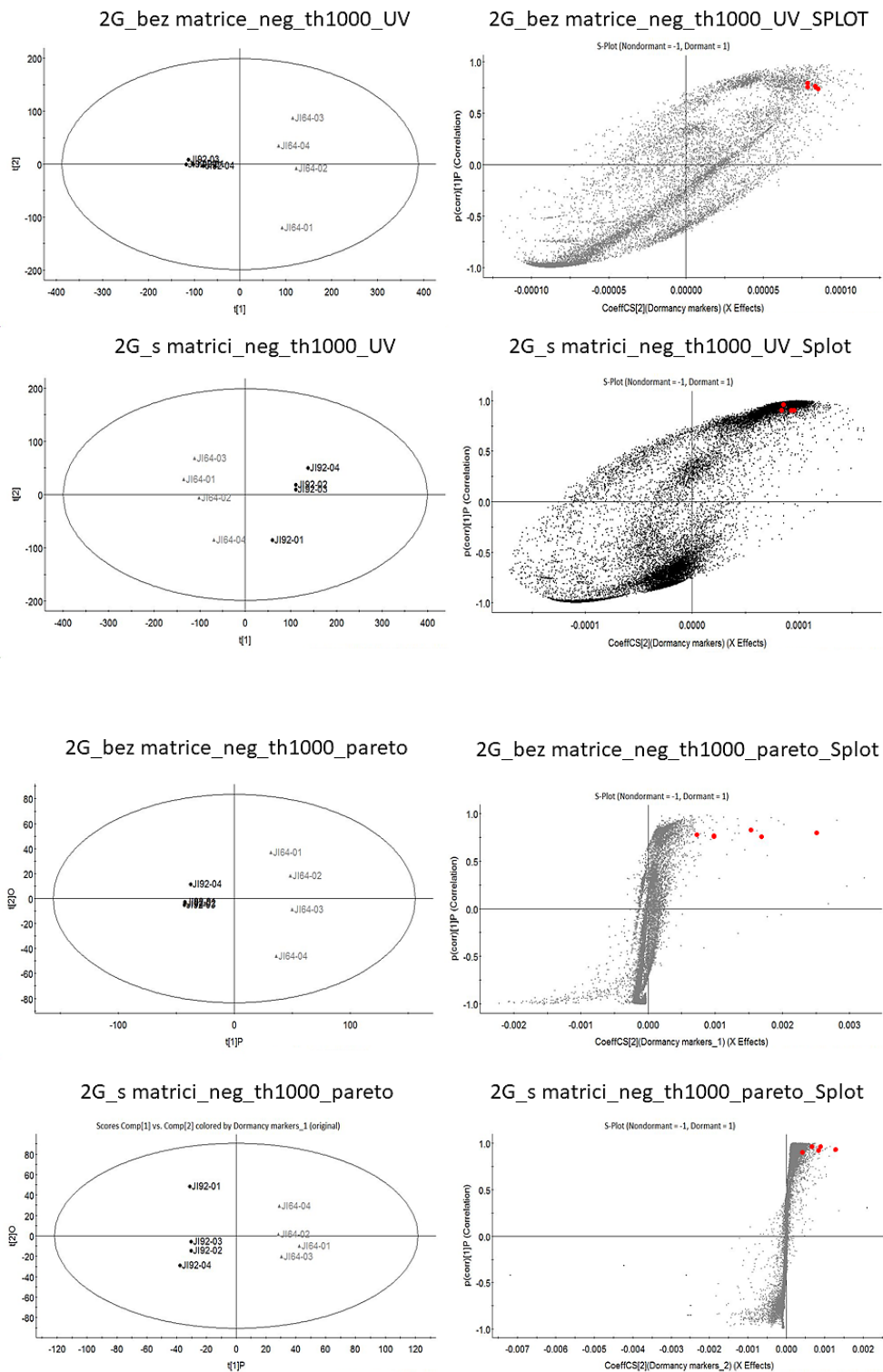
markery najlepšie dosahuje použitím Pareto škálovania aj v tomto prípade (hlavne v S-plotu z dát získaných pri experimentoch bez použitia matrice). Drobné rozdiely v separácii dvoch vybraných genotypov pri použití Pareto alebo UV škálovania sú pozorované aj v PCA plotoch (*Obrázok 18*). Pri každom škálovaní však bolo zachované rozdelenie genotypov na dormantné (JI64) a nedormantné (JI92).

Po výslednom zhodnotení vplyvu škálovania na segregáciu genotypov v PCA plotoch z hľadiska dormancie a tvaru S-plotov s markermi bolo Pareto škálovanie vybrané pre ďalšie experimenty v tejto štúdii zameranej na identifikáciu markerov dormancie. Toto škálovanie poskytuje o niečo lepšiu segregáciu medzi genotypmi z hľadiska dormancie oproti UV škálovaníu a po jeho aplikácii sa v S-plotoch dá lepšie vymedziť oblasť pre významné markery pre danú dormantnú/nedormantnú skupinu hrachu siateho.

Obrázok 17. PCA a S-ploty a vplyv škálovania (UV, Pareto) použitých v (MA)LDI-MS analýze piatich genotypov.



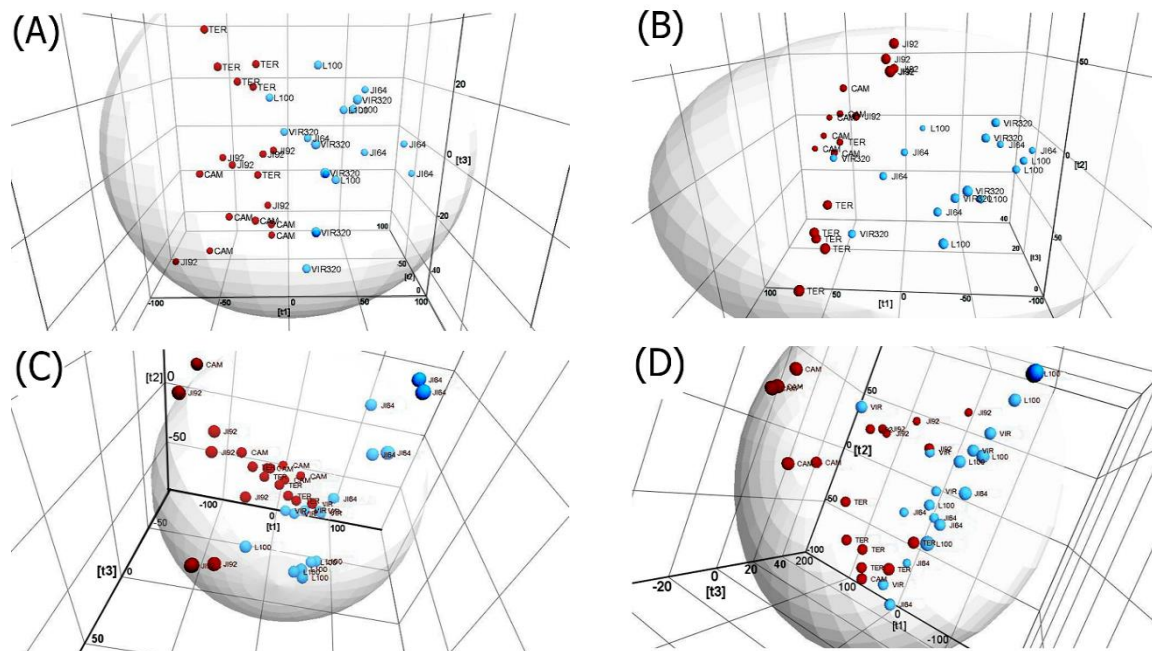
Obrázok 18. PCA a S-ploty a vplyv škálovania (UV, Pareto) použitých v (MA)LDI-MS analýze dvoch genotypov.



Na potvrdenie stability použitého postupu a segregácie dormantných a nedormantných genotypov boli LDI-MS a MALDI-MS experimenty zopakované s väčším počtom vzoriek (6 biologických replík zo zberu z rovnakého ročníka). Na základe vyššie uvedených výsledov týkajúcich sa porovnania dvoch typov škálovania dát boli v tejto rozšírenej štúdii použité už len PCA a OPLS-DA analýzy so škálovaním Pareto. Užitočné na popis systému sa ukázalo byť zobrazenie datového setu pomocou trojrozmerných grafov (3D PCA plotov). *Obrázok 19* ukazuje 3D PCA ploty vygenerované z týchto LDI-MS a MALDI-MS dát. Tieto trojdimenzionálne PCA ploty umožňujú v oboch prípadoch pozorovať súčasne všetky merania s minimálne 75% úrovňou vysvetlenej variability v prvých troch dimenziách, čo je pri popise študovaného javu úroveň z nášho pohľadu akceptovateľná (v ďalších dimenziách je už ukrytá iba štvrtina variability dát). V negatívnom ionizačnom móde (*Obrázok 19A-B*) prvé tri hlavné komponenty v 3D Score plotoch vysvetľujú 76.46% (LDI-MS) a 78.53% (MALDI-MS) variability dát v MS experimentoch. V pozitívnom ionizačnom móde (*Obrázok 19C-D*) prvé tri hlavné komponenty popisujú podobné percento variability, a to 75.58% pre LDI-MS a 80.28% v prípade MALDI-MS dát. V literatúre týkajúcej sa metabolomiky sa neuvádza exaktná minimálna hodnota celkovej vysvetlenej variability, a ani vhodný počet hlavných komponent, ktoré by mali popisovať viarozmerné dáta v PCA analýze. Všeobecne však platí, že s vyšším percentom vysvetlenej variability vzrastá kvalita predikcie daného štatistického modelu a jeho vhodnosť pre interpretáciu získaných dát.

Napriek relatívne veľkému rozptylu medzi jednotlivými študovanými vzorkami osemenia v rámci jednotlivých genotypov je separácia dormantných od nedormantných genotypov evidentná, a to v oboch ionizačných módoch a bez ohľadu na to, či sa pred meraním aplikuje alebo neaplikuje matrica. Nedormantné genotypy na *Obrázku 19* (označené červenou farbou) sú koncentrované naľavo a dormantné (označené modrou farbou) sú na pravej strane každého 3D PCA plotu.

Obrázok 19. 3D PCA ploty získané analýzou hlavných komponent LDI-MS a MALDI-MS dát. Horné grafy ukazujú na MS data v negatívnom ionizačnom móde (A- bez matrice, B- s matricou), spodné grafy ukazujú MS data v pozitívnom ionizačnom móde (C- bez matrice, D- s matricou).



Tieto výsledky ukazujú, že hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou/ionizáciou je užitočnou technikou na klasifikáciu (rozlíšenie) genotypov hrachu s ohľadom na povrchové zloženie a dormanciu. Možnosť využitia LDI-MS analýz na klasifikáciu osemenia hrachu siateho podľa jeho dormancie bola potvrdená aj novými analýzami semien z roku 2020, ktoré boli analyzované pri rovnakom nastavení hmotnostného spektrometru a pri rovnakom škálovaní v PCA analýze. Genotyp VIR 320 bol v tejto recentnej štúdiu nahradený z hľadiska biologických vlastností genotypom s číselným označením 1794. V príslušnom PCA plote dochádzalo k separácii dormantných (JI64 a 1794) genotypov od nedormantných (JI92 a Cameoru) v oboch ionizačných módoch aj v tejto novej šarži semien z roku 2020. LDI-MS technika umožňuje priamu a rýchlu analýzu suchých zreých semien a môže byť alternatívnou technikou vhodnou na štúdium klíčivosti semien a príčin klíčenia. Použitá technika nevyžaduje v prvom kroku znalosť identity signálov, ktoré vykazujú rozdiely medzi genotypmi (ide o necielený metabolomický postup). Identifikácia niektorých signálov je popísaná v ďalších odstavcoch v tejto práci.

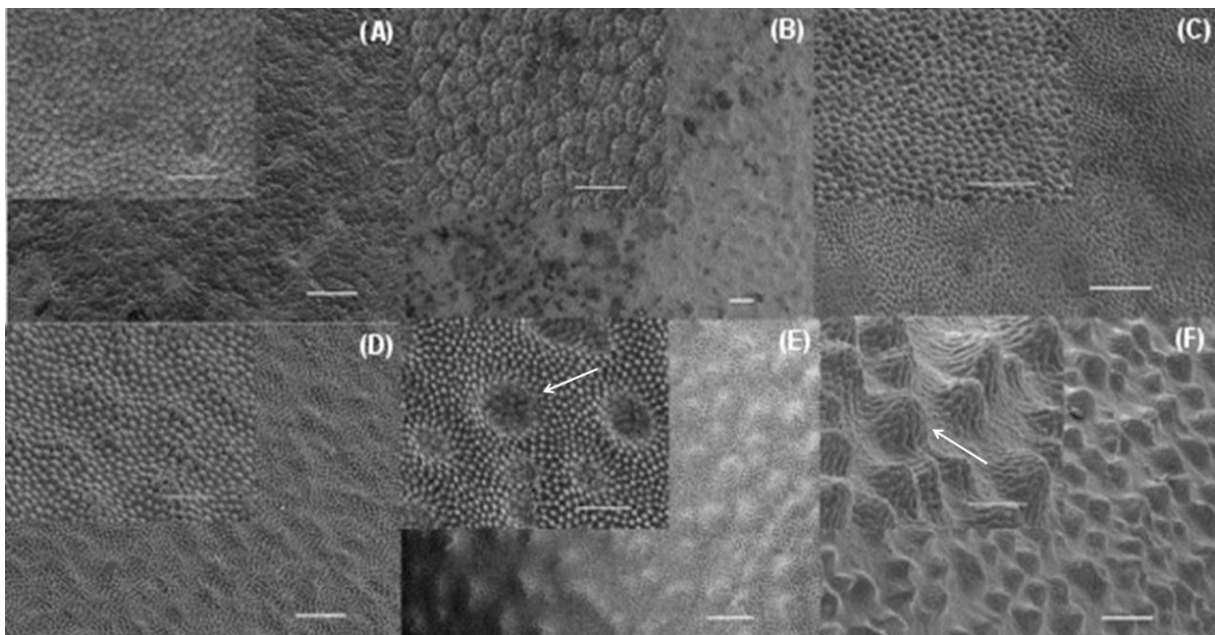
5.2.1 Identifikácia biomarkerov v osemeni hrachu siateho

Rozdiely v chemickom zložení boli podrobnejšie študované pomocou OPLS-DA techniky. Príslušné S-ploty dovolili určiť markery (m/z hodnoty), ktoré sa vo veľkosti signálu najviac líšia medzi dormantnými a nedormantnými genotypmi. Intenzita signálov môže byť ovplyvnená aj povrchovou topografiou osemenia, a preto boli všetky študované osemenia zobrazené pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM). Je voľným okom dobre vidieť, že sa semená jednotlivých genotypov líšia veľkosťou a zafarbením (*Obrázok 20* a detaily v práci²¹¹). SEM však ukázala, že dva dormantné genotypy (JI64 a L100) majú na povrchu osemenia prítomné anatomické hrbolčeky, tzv. gritty. U ostatných osemení (u všetkých nedormantných a jedného dormantného VIR320) je povrch hladký, ako ukazuje *Obrázku 21*. Je preto významné, že (MA)LDI-MS technika dokáže zachytiť rozdiely z hľadiska dormancie (diskutované v predchádzajúcej kapitole) aj napriek drobným odlišnostiam v povrchovej topografii osemenia. Interpretáciu dát môžu komplikovať aj iné vlastnosti semien (napr. geografia pôvodu, iné domestikáčne znaky než je dormancia, atď.). Za povšimnutie v 3D PCA plotoch na *Obrázku 19* stojí napríklad relatívne veľká vzdialenosť medzi nedormantnými genotypmi Terno a Cameor (vzhľadom k topografickej a morfologickej podobnosti týchto semien) vo vertikálnom smere. Príčina a látky, ktorými by sa Terno a Cameor mohli od seba odlišovať však neboli charakterizované. Z hľadiska fyzikálnej dormancie bola pozornosť ďalej zameraná predovšetkým na chemické rozdiely v osemeni dvojice genotypov JI64 a JI92, ktoré sú si z biologického úhla pohľadu veľmi podobné, ale v dormancii sa líšia zásadne (detaily sú uvedené v práci^{1,211}).

Obrázok 20. Genotypy hrachu siateho (horný riadok: zľava L100, VIR320, JI64, dolný riadok: zľava CAMEOR, Terno, JI92).



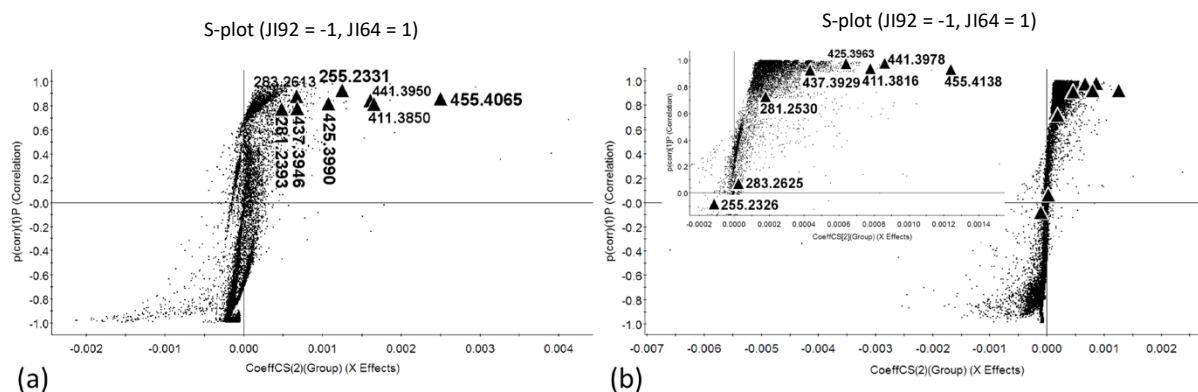
Obrázok 21. SEM snímky povrchu osemenia analyzovaných genotypov (A – CAMEOR, B – TERNO, C - JI92, D – VIR320, E - L100, F - JI64; biela priamka predstavuje 100 μm ; v detailnom priblížení predstavuje biela priamka 50 μm). Anatomické útvary na povrchu L100 and JI64 (tzv.gritty) označuje biela šípka (obrázok bol publikovaný v prác²¹¹).



Obrázok 22 ukazuje S-ploty pre tieto dva genotypy získané meraním v negatívnom móde. Najvýznamnejšie markery (signály analytov najviac postihujúce rozdiely medzi študovanými genotypmi) sú v S-plotoch umiestnené v 1. a 4. kvadrante, teda čo najďalej od počiatku sústavy súradníc. Zjednodušene sa dá povedať, že čím sú body (markery, m/z hodnoty) v S-plotoch ďalej od počiatku sústavy súradníc v ose

x, tým väčšie sú rozdiely signálov medzi genotypmi. Čím sú body ďalej v smere osi y, tým väčšia je ich vierohodnosť. Na nájdenie najvýznamnejších markerov dormancie (signálov zvýšených v dormantnom genotype JI64 oproti nedormantnému JI92) bola v S-plotoch zvolená oblasť obdĺžníka, ktorého strany boli vymedzené na osi x (tj. $\text{coeffCS}(2)$) od 10 po 100% jej dĺžky a z osi y (tj. $\text{p}(\text{corr})(1)$) od 75 do 100% z jej výšky (1. kvadrant). V tejto oblasti sú prítomné markery s m/z 411.3850, 425.3990, 437.3946, 441.3950 a 455.4065 v LDI-MS spektre a 411.3816, 425.3963, 437.3929, 441.3978 a 455.4138 v MALDI-MS spektre. Tieto m/z hodnoty odpovedajú hmotám hydroxylovaných vyšších mastných kyselín vo forme $[\text{M}-\text{H}]^-$ iónov (tj. hydroxyhexakosanoát, hydroxyheptakosanoát, hydroxyoktakosanoát, dihydroxyheptakosanoát a dihydroxyoktakosanoát, majú zavedenú spoločnú skratku HLFA). Vedľa HLFA sú v S-plotoch viditeľné aj bežné mastné kyseliny, resp. ich soli ako palmitát s m/z 255.2331, oleját s m/z 281.2465 a stearát s m/z 283.2613 v LDI-MS experimentoch a s m/z hodnotami 255.2326, 281.2530 a 283.2625 v MALDI-MS experimentoch. Bežné mastné kyseliny sú v S-plotoch však mimo oblasť signifikantných markerov hlavne v prípade MALDI-MS S-plotu (Obrázok 22B). Prítomnosť HLFA markerov získaných z predpožených S-plotov bola následne overená v surových MS spektrách. Ich štruktúra bola primárne navrhnutá na základe merania správnej a presnej hmoty a odchýlky od teoretických hodnôt navrhnutých štruktúr sú uvedené v *Tabuľke 10*. Z MALDI-MS a LDI-MS dát bolo teda preukázané, že dormantný genotyp JI64 obsahuje v povrchových vrstvách osemenia menej bežné, hydroxylované vyššie mastné kyseliny, ktoré sú tam prítomné vo významne vyšších obsahoch v porovnaní s nedormantným genotypom JI92. Súradnice týchto markerov v príslušnom S-plate sú tiež uvedené v *Tabuľke 10*. Hydroxylované vyššie mastné kyseliny prítomné v osemení dormantného genotypu JI64 môžu vplývať na jeho dormanciu skrz ich hydrofóbnu chemickú povahu, vďaka ktorej môže dochádzať k horšiemu prestupu vody skrz osemenie.

Obrázok 22. S-ploty pre genotypy JI64 a JI92 (Pareto škálovanie). (A) LDI-MS meranie, (B) MALDI-MS meranie.



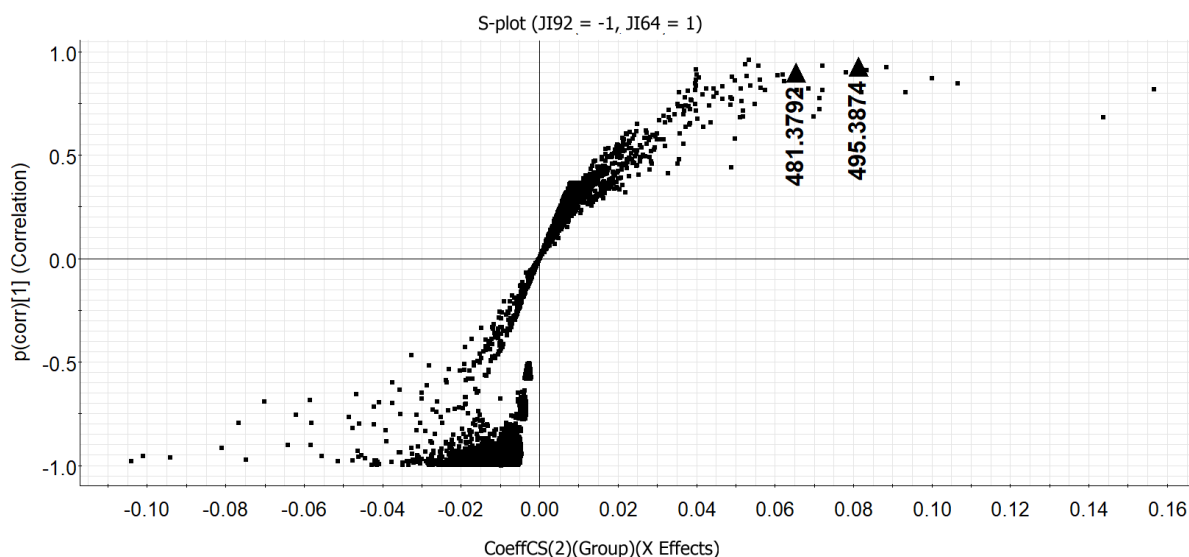
Tabuľka 10. Vyššie mastné kyseliny, ich elementárne zloženie a súradnice v S-plotoch (korešpondujúce s S-plotmi na Obrázkom 22).

Elementárne zloženie	LDI-MS meranie				MALDI-MS meranie			
	[M-H] ⁻	Odchýlka od teoretickej hmoty (ppm)	Súradnice v S-Plote		[M-H] ⁻	Odchýlka od teoretickej hmoty (ppm)	Súradnice v S-Plote	
			CoeffCS(2)	p(corr)(1)			CoeffCS(2)	p(corr)(1)
C ₁₆ H ₃₁ O ₂ ⁻	255.2331	0.78	0.00125	0.90637	255.2326	-1.18	-0.00012	-0.09994
C ₁₈ H ₃₃ O ₂ ⁻	281.2393	-33.07	0.00049	0.74660	281.2530	15.64	0.00017	0.70174
C ₁₈ H ₃₅ O ₂ ⁻	283.2613	-10.24	0.00066	0.85055	283.2625	-6.00	0.00002	0.04306
C ₂₆ H ₅₁ O ₃ ⁻	411.3850	2.67	0.00162	0.80646	411.3816	-5.59	0.00079	0.92125
C ₂₇ H ₅₃ O ₃ ⁻	425.3990	-1.18	0.00107	0.81814	425.3963	-7.52	0.00065	0.96154
C ₂₈ H ₅₃ O ₃ ⁻	437.3946	-11.20	0.00067	0.77322	437.3929	-15.09	0.00042	0.91775
C ₂₇ H ₅₃ O ₄ ⁻	441.3950	1.36	0.00160	0.83272	441.3978	7.70	0.00087	0.96626
C ₂₈ H ₅₅ O ₄ ⁻	455.4065	-7.69	0.00249	0.84469	455.4138	8.34	0.00126	0.91329

Ako už bolo ukázané vyššie, segregácia osemenia na základe fyzikálnej dormancie bola pozorovaná aj v pozitívnom ionizačnom móde (Obrázok 19C-D). Pri štúdiu markerov dormancie v pozitívnom ionizačnom móde sa analogicky zostrojil S-plot pre najkontrastnejšie genotypy JI64 a JI92 (podobne ako v experimentoch s negatívnou ionizáciou) a tento S-plot je ukázaný na Obrázku 23. Medzi markermi

charakteristickými pre osemenie dormantnej JI64 sa pri pozitívnej ionizácii nachádzali hmoty s m/z 495.3874 (odchýlka 12.9 ppm) a 481.3792 (odchýlka 18.5 ppm), ktoré korešpondujú s elementárnym zložením draselného aduktu (ión typu $[M+K]^+$) kyseliny dihydroxyoktakosánovej a dihydroxyheptakosánovej. Draselné adukty odvodené od ostatných hydroxylovaných vyšších mastných kyselín v kladnom ionizačnom móde neboli zachytené. Vysvetlením by mohla byť ich menšia intenzita oproti vymenovaným dvom látkam pozorovaná už v negatívnom ionizačnom móde. (MA)LDI-MS(+) spektrá vo všeobecnosti poskytovali menší celkový iónový prúd a menšie intenzity signálov a ostatné ďalšie markery neboli identifikované, preto bola pozornosť zameraná predovšetkým na MS spektrá v negatívnej ionizácii.

Obrázok 23. S-plot vygenerovaný z LDI-MS(+) dát pre genotypy JI64 a JI92 (Pareto škálovanie).

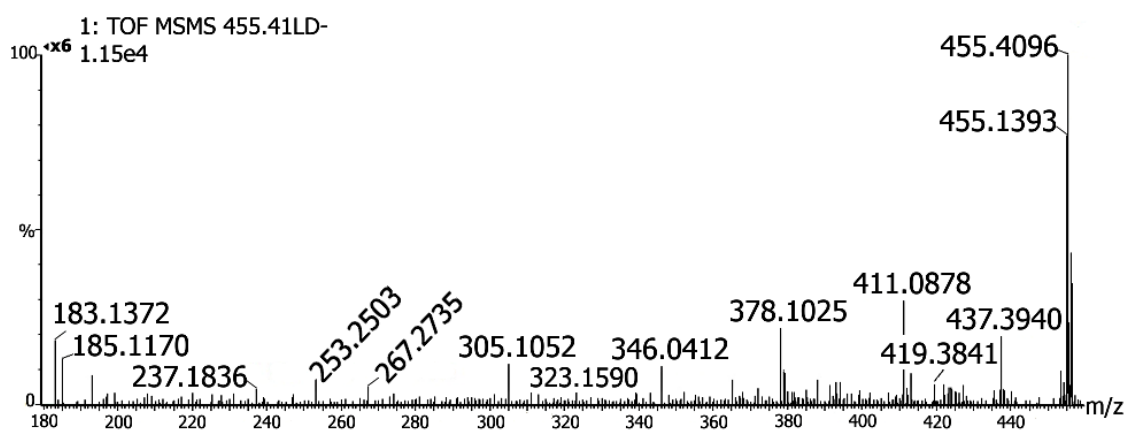


Osemenie dormantného genotypu JI64 a bolo zamerané aj pomocou MALDI-ICR-MS(-) v laboratóriu Mikrobiologického ústavu AV ČR v Prahe, kde boli tieto m/z hodnoty, teda anióny hydroxylovaných mastných kyselín s dlhým alkylovým reťazcom taktiež potvrdené. V osemení nedormantného genotypu JI92 ich signály chýbali. Najintenzívnejší signál mali nasledujúce tri hydroxylované kyseliny: hydroxyheptakosanoát s m/z 425.39923 (odchýlka od teoretickej hmoty, dtm, 0.63 ppm), dihydroxyheptakosanoát s m/z 441.39393 (dtm 1.06 ppm) a dihydroxyoktakosanoát s m/z 455.40936 (dtm 1.41 ppm). Tieto merania teda

jednoznačne podporujú výsledky získané pri meraní s hmotnostným spektrometrom Synapt G2-S.

Identifikáciu týchto látok komplikoval fakt, že na trhu nie sú dostupné štandardy týchto látok. Preto boli na podporu identifikácie vedľa presnej a správnej m/z hodnoty preštudované aj kolízne spektrá a signály pozorovaných fragmentov porovnané s literatúrou. LDI-MS/MS spektrum dihydroxyoktakosanoátu (hydroxylovanej mastnej kyseliny poskytujúcej najvyšší signál), získaného meraním osemení genotypu JI64 pri kolíznej energii 30eV, je ukázané na *Obrázku 24*.

Obrázok 24. LDI-MS/MS spektrum dihydroxyoktakosanoátu na osemení JI64.

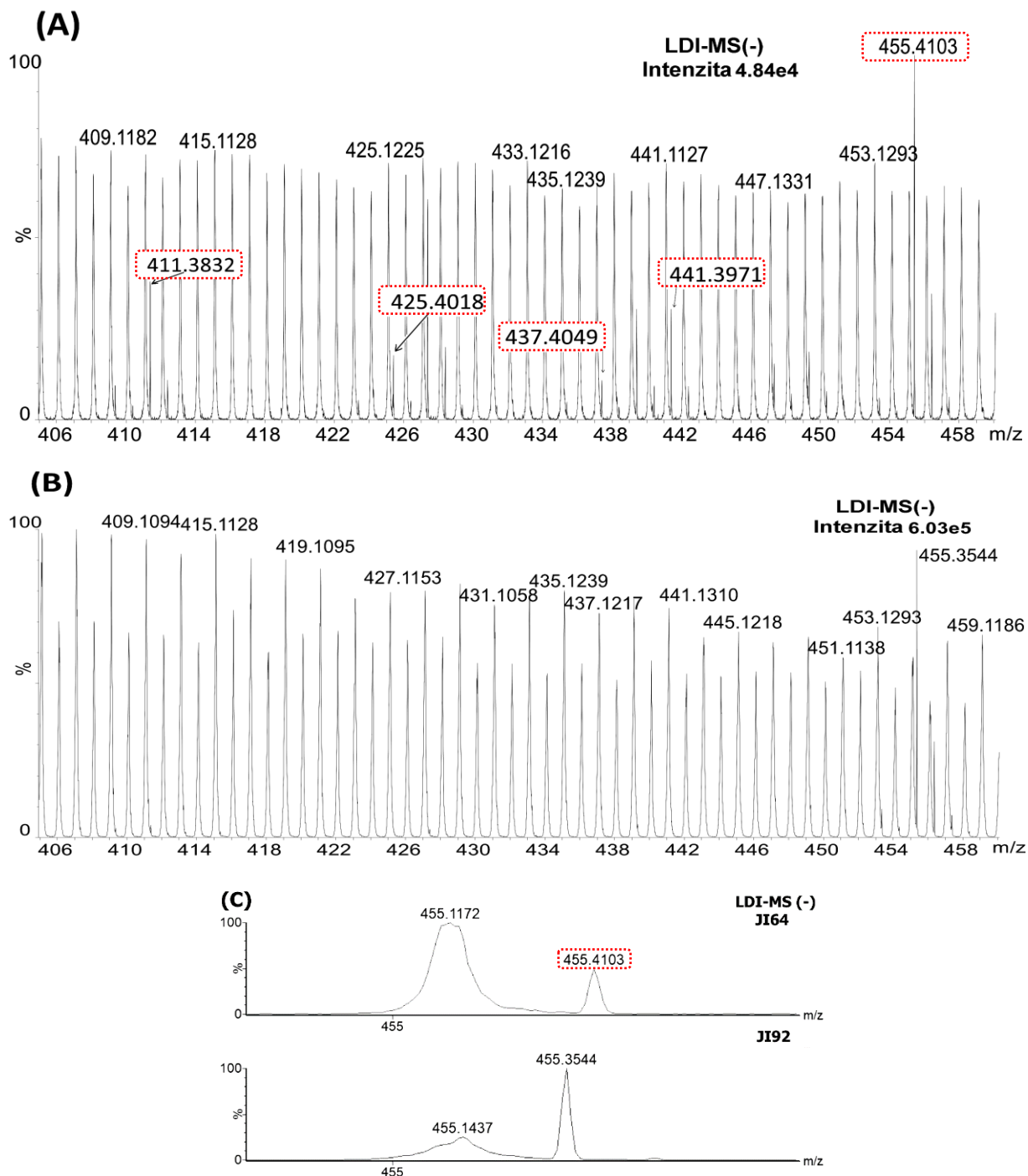


Z rodičovského iónu bol pozorovaný vznik fragmentu s m/z 437.3940, ktorý odpovedá strate molekuly vody. Táto diferenciacia potvrdzuje prítomnosť hydroxylovanej skupiny v materskej molekule dihydroxyoktakosanoátu. S nižšou intenzitou bol v MSMS spektre pozorovaný aj fragment s m/z 419.3841, ktorý odpovedá strate dvoch molekúl vody a poukazuje na prítomnosť dvoch hydroxylovaných skupín v dihydroxyoktakosanoáte. Dá sa usudzovať, že hydroxylová skupina môže odchádzať aj zo samotnej karboxylovej skupiny. Tento typ straty je popísaný napríklad pri fragmentácii kyseliny palmitovej v práci od J. Chena a kol. (2015) pomocou ESI-MSMS²¹². Pri LDI-MSMS(-) experimentoch však tento typ straty nebol pozorovaný. Na druhej strane, pri ASAP-MSMS experimentoch bol tento proces straty vody z nehydroxylovaného skeletu pozorovaný a bude popísaný v kapitole venovanej tejto technike.

Predpokladané odštiepenie CO₂ z karboxylovej skupiny pozorované nebolo. Dôvodom absencie tohto fragmentu korešpondujúceho so stratou CO₂ v kolíznom spektre je pravdepodobne fakt, že prenos náboja na uhľovodíkový reťazec pri strate celej (preferenčne ionizovanej) funkčnej skupiny (COO⁻) je energeticky nevýhodný. V rámci tejto práce však neboli prevedené kvantové výpočty popisujúce tento proces. V LDI-MS/MS spektre boli prítomné fragmenty s m/z 183.1372; 253.2503 a 267.2664. Fragment s m/z 183.1372 môže vznikáť štiepením uhľikového reťazca z karboxylového konca so súčasným odštiepením molekuly vody. Jeho elementárne zloženie bolo navrhnuté ako C₁₁H₁₉O₂⁻ (dtm -7.1 ppm). Fragmentom s m/z 253.2503 a 267.2664 bolo navrhnuté zloženie C₁₇H₃₃O⁻ (dtm -10.7 ppm) a C₁₈H₃₅O⁻ (dtm -9 ppm). Vyššia odchýlka nameraných hodnôt m/z od teoretických je pravdepodobne spôsobená slabým signálom týchto fragmentov v MS/MS spektrách. Fragmentačný vzorec naznačuje hydroxyláciu na C10 alebo C12, avšak podrobné objasnenie polohy hydroxylovej skupiny je stále predmetom výskumu. Tieto výsledky podporuje aj práca od Nilssona a kol. (2010)²¹³, kde boli študované dihydroxylované mastné kyseliny (7,10-dihydroxyoctadecenová, 7,10-dihydroxyhexadecénová a 7,10-dihydroxyikosénová) pomocou LC/MS. Štiepenie uhľikového reťazca bolo pozorované v blízkosti hydroxylov. V MS/MS spektrách pozorovali straty vody a aj CO₂²¹³. Spôľahlivosť merania v tejto práci by mohli zvýšiť aj experimenty s izotopicky značenými látkami, ktoré bohužiaľ neboli dostupné pre náš výskum. Autori v práci demonštrujú MS/MS spektrum kyseliny 7,10-dihydroxyoctadecenovej (m/z 313) s relatívnymi intenzitami fragmentov (vyjadrenými v %). V tomto spektre je prítomný fragment odpovedajúci odštiepeniu CO₂ s 10x menšou intenzitou ako fragment odpovedajúci strate vody. Ako už bolo spomenuté vyššie, výtťažok fragmentov vznikajúcich po strate vody v našich experimentoch je nízky, a ak fragment po strate CO₂ vzniká ešte s menšou intenzitou, tak v našich spektrách už nemôže byť pozorovateľný.

MS/MS experimenty boli prevedené aj pre ďalšie hydroxylované mastné kyseliny. Strata molekuly vody bola pozorovaná aj pri fragmentácii iónov s m/z 411.3865 a 425.3927, ktorým bola navrhnutá štruktúra hydroxyhexakosanoátu a hydroxyheptakosanoátu. Signály hydroxylovaných vyšších mastných kyselín boli s dobrou intenzitou pozorované na povrchu osemenia JI64 (*Obrázok 25A*), ale neboli prítomné v jeho priečných rezoch, a ani na vnútornej strane osemenia tohto genotypu. Na vonkajšom povrchu osemenia JI92 tieto signály taktiež chýbali (*Obrázok 25B*).

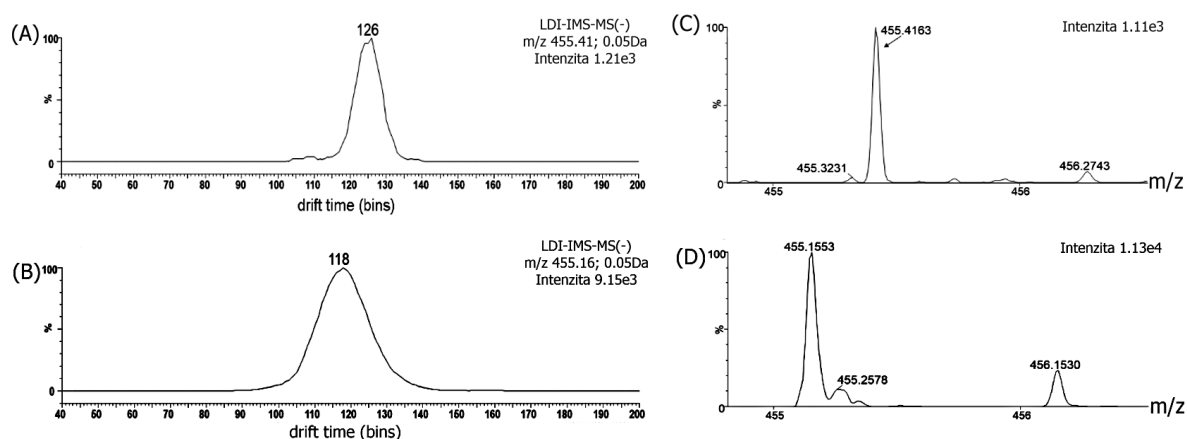
Obrázok 25. Časť LDI-MS(-) spektra z osemenia JI64 (A), JI92 (B) a ich zoom v rozsahu hmôt od 454.8 do 455.8 Da (C). Signály vyšších mastných kyselín sú vyznačené obdĺžnikom.



Signály hydroxylovaných mastných kyselín boli vždy v blízkosti silnejších signálov s nižším mass defektom. Napríklad dihydroxyoktakosanoát s m/z hodnotou 455.4103 na osemení JI64 bol vždy sprevádzaný látkou s m/z 455.1172, tj. látkou s

približne o tri desatiny menšou hodnotou m/z od hmoty danej mastnej kyseliny. Rovnako tomu bolo aj pri iných vyšších mastných kyselinách. V prípade osemenia JI92 bola v spektre prítomná látka poskytujúca signál s m/z hodnotou 455.3544, ktorej identita nebola zistená a zároveň sa nejedná o dihydroxyoktakosanoát. Táto látka bola podobne sprevádzaná hmotou s m/z 455.1437 (s menším mass defektom) ako ukazuje *Obrázok 25C*. Tieto signály s menším mass defectom vznikajú pravdepodobne tepelnou deštrukciou polysacharidov a/alebo lignínu pri pôsobení laseru na osemenie. Odfiltrovanie tohto matricového „balastného“ signálu od signálu hydroxylovaných mastných kyselín bolo prevedené pomocou iónovo mobilitej separácie. Touto analýzou bol získaný čistý signál vyšších hydroxylovaných mastných kyselín na osemení JI64. Vedľa toho bolo možné previesť ich následnú fragmentáciu za iónovo mobilnou celou, čo celkovo zlepšuje selektivitu MS/MS experimentu. Navyše, hodnota driftovacieho času (dt) môže byť ďalším parametrom pre identifikáciu študovaných látok. Poloha mobilného píku dihydroxyoktakosanoátu v mobilograme bola 126 binov a poloha balastného píku 118 binov (pri nastavení rýchlosti vlny 350 m/s, a výšky vlny 2.5V). Iónovo mobilné píky a MS spektra získané pre každý mobilný pík (teda pre dihydroxyoktakosanoát a pre balastnú látku s menším mass defektom) odpočítaním spektier „základnej línie“ pred a za mobilným píkom ukazuje *Obrázok 26*.

Obrázok 26. Mobilná separácia dihydroxyoktakosanoátu (rekonštruovaný mobilogram pre dihydroxyoktakosanoát (A) a látku s m/z 455,16 (B), C- zoom MS spektra z mobilného píku s driftovým časom 126 binov pre látku s m/z 455.41 a D- zoom MS spektra z mobilného píku s driftovým časom 118 binov pre látku s m/z 455.16, spektrá sú vygenerované po odpočítaní základnej línie).



5.2.2 Analýza osemenia rekombinantných línií hrachu pomocou LDI-MS a hmotnostno spektrometrického zobrazovania

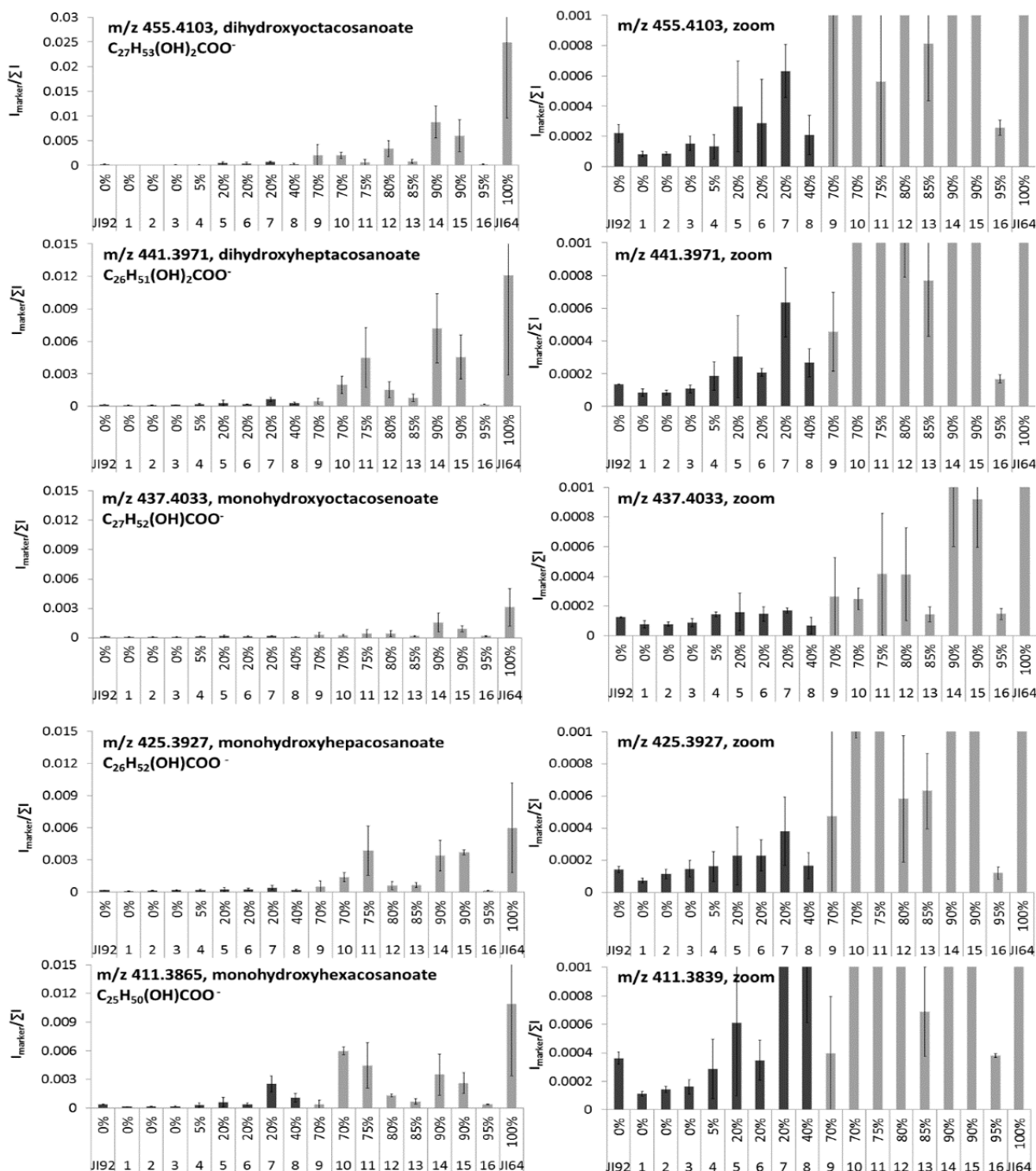
V tejto práci boli analyzované aj osemenia zo semien šestnástich rekombinantne krížených línií pripravených krížením genotypov JI64 a JI92²⁰⁹. Pri každom genotype z RIL línie bola jeho dormancia vyjadrená v percentách (0-95%; čím vyššie percento, tým dormantnejší RIL). Cieľom tohto experimentu bolo zistiť, či sa intenzity signálov nájdených markerov vyšších mastných kyselín na osemení JI64 môžu meniť s meniacou sa úrovňou dormancie. Podobným spôsobom sa uberala aj práca od Bagheri a kol.²¹⁴, v ktorej autori sledovali obsah sekundárnych metabolitov (glukosinolátov, fenylypropanoidov a tokoferolu) v RIL semenách *B. rapa* pomocou LC/MS a NMR. V práci boli zaznamenané rozdiely v obsahu týchto látok v RIL semenách v porovnaní s rodičovskými semenami. V tejto dizertačnej práci bolo osemenie z RIL semien analyzované pomocou LDI-MS a LDI-MSI techník s cieľom povrchovej analýzy RIL osemení. V *Obrázku 27* sú ukázané normalizované signály hydroxylovaných vyšších mastných kyselín nájdených v LDI-MS spektrách z analýz osemení RIL línií a ich rodičovských genotypov JI64 a JI92. Normalizovaný signál na *Obrázku 27* je vyjadrený v percentách a reprezentuje hodnotou získanú z intenzity signálu biomarkeru vydeleného sumou intenzít všetkých signálov v danom spektre. Takto získaný podiel sa priemerovoal pre štyri merania (tj. štyri biologické opakovania). Z grafu je patrné, že intenzita normalizovaného signálu týchto biomarkerov stúpa s rastúcou úrovňou dormancie RIL semien. Výnimkou je RIL označená číslom 16, u ktorej bolo 95% semien dormantných. U tejto vzorky osemenia boli intenzity signálov hydroxylovaných mastných kyselín slabšie, niekde na úrovni ostaných RIL s malou úrovňou dormancie (pod 20%). Podobné odchýlky sa vyskytovali aj u RIL s číslom 8 (40% dormancia) a 13 (85% dormancia). Všetky osemenia (vrátane rodičov JI64 a JI92) boli analyzované aj pomocou hmotnostného zobrazovania (LDI-MSI). *Obrázok 28* ukazuje distribúciu a intenzitu týchto biomarkerov (a tiež kyseliny olejovej, stearovej a palmitovej) na povrchu RIL osemení. Rozdiely v intenzite mastných kyselín zo zobrazovacieho experimentu kvalitatívne odpovedajú výsledkom získaným z „nezobrazovacieho“ LDI-MS merania (*Obrázok 27*). Distribúcia týchto biomarkerov je na povrchu RIL osemení homogénna s výnimkou hila (púčka, miesto úchyty semena k struku) a strofioly (hnedá bodka v blízkosti hila), kde naopak signály hydroxylovaných mastných kyselín boli v porovnaní s okolitým povrchom menej intenzívne. Pozorovaný znížený obsah hydroxylovaných vyšších mastných kyselín v hile a strofioly by mohol

umožňovať ľahší prestup vody cez osemenie v porovnaní s okolitým povrchom. To by poukazovalo na regulačný význam týchto častí na povrchu osemenia v procese bobtnania a klíčenia semien, a následne na ich spojitosť s úrovňou dormancie. Obe štruktúry sú významné pri klíčení aj podľa Karaki a kol. (2012)²¹⁵. Pre predstavu sú tieto štruktúry ukázané tiež na *Obrázku 29*. Rozdiely v chemickom zložení hila a okolitého osemenia môžu byť dôsledkom rozdielnej bunkovej skladby týchto pletív. Viac detailov k ich bunkovej stavbe uvádza práca od P. Smýkala a kol. (2014)¹.

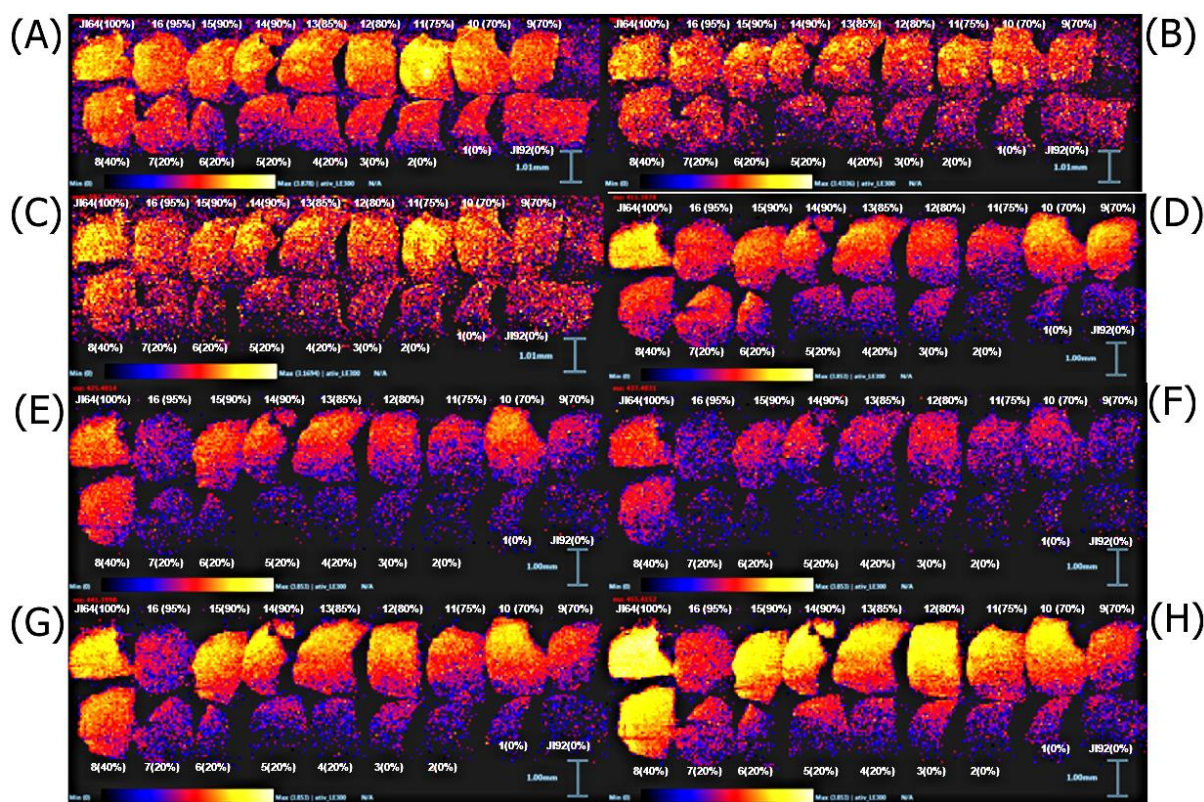
V osemení boli v negatívnej ionizácii detekované aj signály bežných mastných kyselín (palmitovej, stearovej, olejovej). Obsah týchto látok (vyjadrený normalizovaným signálom z LDI-MS meraní) je tiež zvýšený v dormantných genotypoch oproti nedormantným. Aj tieto bežné mastné kyseliny môžu svojimi hydrofóbnymi vlastnosťami vplývať na transport vody skrz osemenie. Tieto výsledky podporuje aj práca Chai a kol.(2016), v ktorej boli študované rozdiely medzi divokými (dormantnými) a nedormantnými semenami *Medicago truncatula*. V práci bolo ukázané, že v nedormantných mutantoch došlo k redukcii obsahu kyseliny hydroxyoktadiénovej²¹⁶. V RIL osemeniach mali tieto bežné mastné kyseliny taktiež silnejší normalizovaný signál. Zvýšený signál korešpondoval s vyšším percentom dormancie. Ich distribúcia na povrchu týchto osemení vykazovala drobné odchýlky v homogenite v porovnaní s vyššie spomenutými hydroxylovanými mastnými kyselinami (*Obrázok 28A-C*).

Hmotnostno spektrometrické zobrazovanie bolo použité aj pre analýzu vnútornej strany študovaných osemení a na analýzu ich priečných rezov. Aj pomocou tohto zobrazovacieho experimentu sa potvrdilo, že signály hydroxylovaných vyšších mastných kyselín nie sú prítomné na spodnej (vnútornej) strane osemenia. MSI analýza priečných rezov osemením preukázala, že tieto mastné kyseliny nie sú prítomné ani vo vnútorných pletivách v osemení. Tieto experimenty podporujú predstavu, že vyššie mastné kyseliny sú prítomné výhradne v povrchových vrstvách osemenia. V prípade hydroxylovaných mastných kyselín môže byť hydrofóbný účinok prehĺbený štruktúrnym zosieťovaním hydroxylových skupín na uhlíkovom reťazci s karboxylovými funkčnými skupinami (*Obrázok 30*).

Obrázok 27. Normalizované signály vyšších mastných kyselín v kontrastných osemeniach J164 a J192 a v osemeniach ich rekombinantne krížených línií z LDI-MS spektier (v grafoch sú vynesené stredné hodnoty normalizovaných signálov vztiahnutých na celkový iónový prúd zo štyroch biologických opakovaní; sivé stĺpčky reprezentujú dormantné semená, čierne reprezentujú nedormantné semená; označenie jednotlivých osemení číslami korešponduje s označením osemení po MSI analýze na Obrázku 27 a percentá vyjadrujú úroveň dormancie semien).



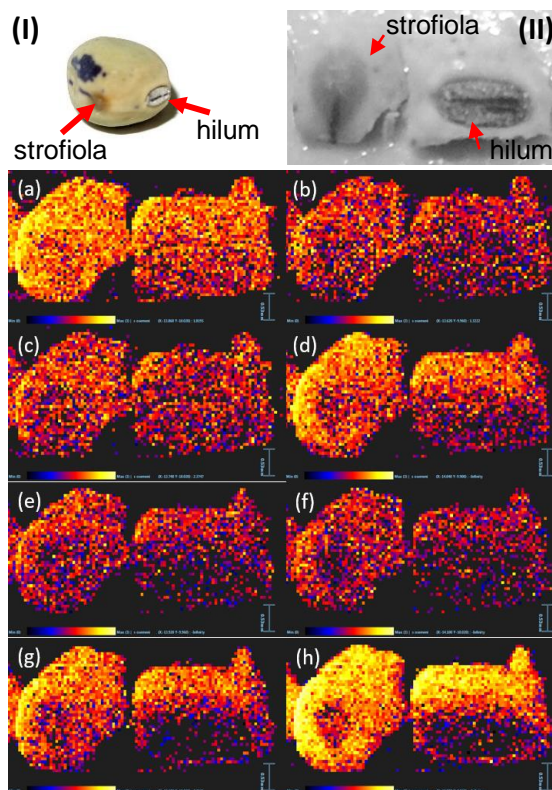
Obrázok 28. LDI-MSI(-) a distribúcia markerov dormancie na povrchu osemenia JI64 a JI92 a na povrchu osemenia ich rekombinantne krížených línií. (A-palmitát, B-oleát, C-stearát, D-hydroxyhexakosanoát, E- hydroxypentakosanoát, F-hydroxyoktakosanoát, G-dihydroxyheptakosanoát, H-dihydroxyoktakosanoát).



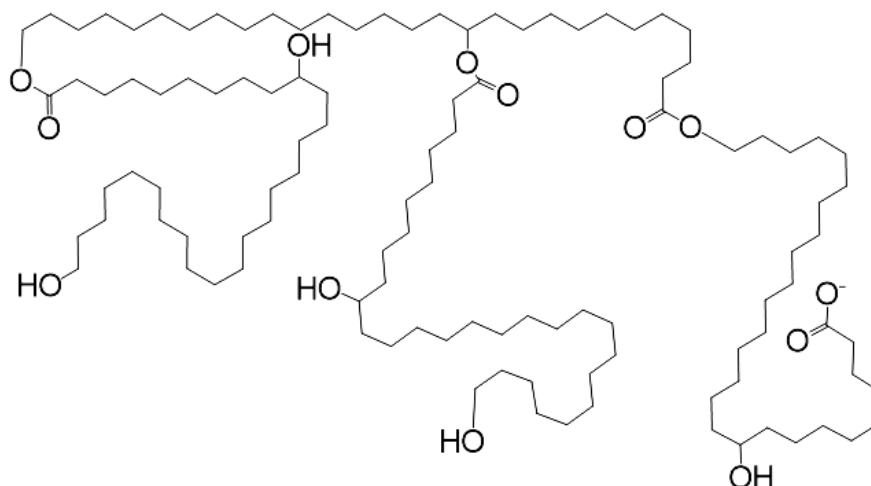
Obrázok 29. Fotografia semena genotypu JI64 s hilom a strofiolou a LDI-MSI(-) analýza jeho osemenia (fotografia celého semena (I), vypreparovaných častí z osemenia pripravených k meraniu (II), LDI-MSI merania (a)-(h).

Časti a-h demonštrujú distribúciu vybraných m/z hodnôt v hile a strofole JI64:

- (a) – palmitát, (b) – oleát, (c) – stearát,
- (d) – hydroxyhexakosanoát,
- (e) – hydroxyheptakosanoát,
- (f) – hydroxyoktakosanoát,
- (g) – dihydroxyheptakosanoát,
- (h) – dihydroxyoktakosanoát.



Obrázok 30. Zosieťovanie hydroxylovaných mastných kyselín.



Experiment s hmotnostným zobrazovaním tiež ukázal, že bežné mastné kyseliny sa nachádzajú na povrchu a rovnako tak aj v hile a v strofirole v osemeni. *Obrázok 29A-C* demonštruje na osemeni J164, že signál bežných mastných kyselín na strofirole a hile je porovnateľný s okolitým osemením. U vyšších mastných kyselín je vidieť rozdiel v signále na osemeni a v strofirole a hile, kde absentuje. Táto skutočnosť poukazuje zrejme na vyšší význam hydroxylovaných mastných kyselín a ich povrchovej distribúcie na osemeni v regulácii dormancie týchto semien oproti bežným mastným kyselinám.

5.3 Vývoj a optimalizácia ASAP-MS metódy

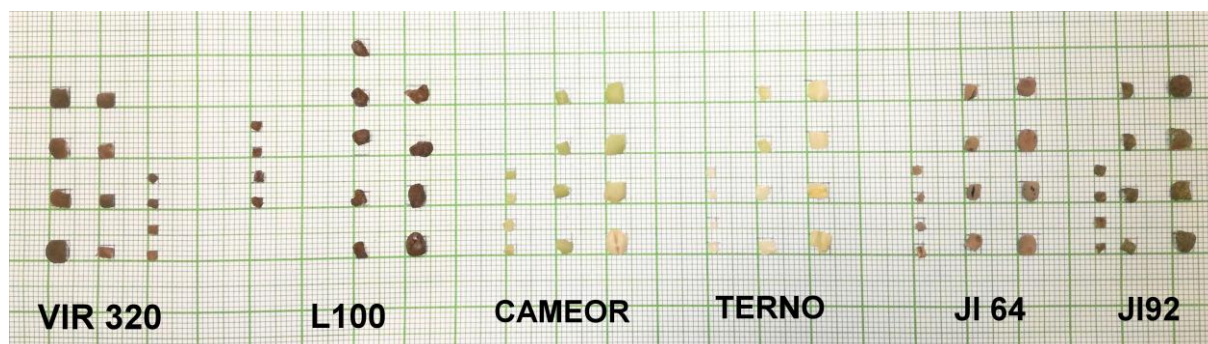
Vývoj a optimalizácia metódy pre ASAP-MS prebiehala v troch krokoch. Prvý sa týkal spracovania a uchytenia vzoriek fixovaných na ASAP próbu tak, aby sa dal rastlinný materiál analyzovať priamo. Na meranie s ASAP próbou sa bežne využíva sklenená kapilára s rozmermi 2 x 100 mm. Táto kapilára bola na priamu analýzu upravená tak, aby sa cez ňu dal prestrčiť drôtik na uchopenie rastlinného materiálu (detaily ohľadom prípravy kapiláry sú v kapitole 4.4.2). Inšpiráciou k úprave kapiláry bola práca od J. Skopalovej a kol. (2018), v ktorej bola sklenená kapilára prerobená na uhlíkovú štetinkovú elektródu pripravenú z vlákien uhlíkovej tkaniny²¹⁷. Druhý krok súvisel nájdením optimálnych inštrumentálnych podmienok merania, ktoré by poskytovali najlepší signál pre nájdené markery. Tretí krok bol smerovaný na možnosti využitia techniky ASAP-MS pre analýzu zloženia osemenia rôznych genotypov hrachu vrátane možností v kvantifikácii nájdených látok (mastných kyselín). Vedľa priamej analýzy pevného materiálu bola testovaná aj možnosť analýzy extraktov osemenia (tá bude popísaná v kapitole 5.3.3).

5.3.1. Spôsob uchytenia rastlinného materiálu v ASAP próbe

Pre priamu analýzu fragmentov osemenia oddeleného od embrya bol medený drôtik na konci ohnutý do tvaru háčika a na jeho koniec boli uchytené kúsky osemenia. Kapilára s takto fixovaným rastlinným materiálom bola vložená do ASAP próby, tá bola zasunutá do ESI zdroja, v ktorom bola vopred inštalovaná výbojová ihla. Po stabilizácii podmienok bola prevedená ASAP-MS analýza. Dôležitým parametrom ovplyvňujúcim meranie sa ukázal byť veľkosť vypreparovaných fragmentov osemenia. Bol skúmaný vplyv plôch kúskov osemenia na signál kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej v osemeni dormantného genotypu hrachu L100. Preštudované boli kúsky osemenia v 3 rozmeroch: 4 mm², 9 mm² a 16 mm². Platilo, že absolútna intenzita signálov rástla s rastúcim rozmerom osemenia. Avšak, s rastúcim rozmerom rástla aj odchýlka absolútnych intenzít v rámci opakovaných meraní. Experimentálnym problémom bol fakt, že väčšie kúsky osemenia sa pri ASAP-MS meraní za vyššej teploty krútia, čo ovplyvňuje plochu, z ktorej sa analyty odparujú, a aj pozíciu materiálu vzhľadom ku vstupe do vakuovanej časti hmotnostného spektrometru (sample cone). Na presnejšie určenie vplyvu veľkosti fragmentu osemenia na signály sa ukázalo byť praktické vzťahovať veľkosť kúsku k jeho hmotnosti. V ďalšom kroku bol preto každý kúsok pred

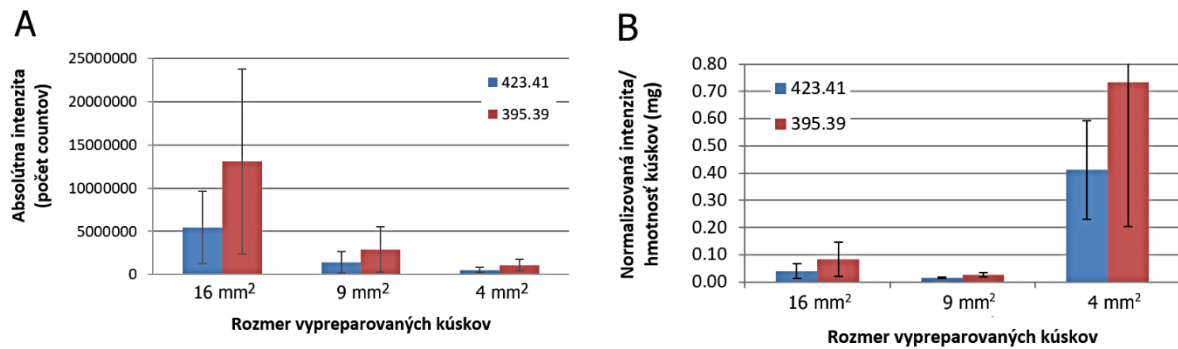
analýzou zvážený. Hmotnosť je presnejší parameter pri optimalizácii ako plocha (tá bola stanovená len približne podľa milimetrového papiera, *Obrázok 31*).

Obrázok 31. Vypreparované kúsky osemenia genotypov s plochou 4, 9 a 16 mm².



Výber najvhodnejšej veľkosti vypreparovaného kúska bol založený na sledovaní absolútnych intenzít kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej v genotype L100 a ich normalizovanom signále. Najväčšie absolútne intenzity dávali najväčšie kúsky. Najväčšie kúsky mali však najväčšie chybové úsečky pri opakovanom meraní. Signál kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej v získaných MS spektrách sa normalizoval na sumu intenzít všetkých signálov v MS spektre (TIC), následne sa táto normalizovaná hodnota intenzity vzťahovala na hmotnosť analyzovaných kúskov. Takto normalizované hodnoty signálu zo štyroch meraní boli priemerované a vypočítala sa z nich smerodatná odchýlka. *Obrázok 32* ukazuje absolútne a normalizované hodnoty intenzít pre tri sledované rozmery fragmentov osemenia. Najlepších výsledkov z hľadiska priebehu merania aj výsledkov bolo dosiahnuté s rozmerom fragmentov 4 mm². Pri meraní bola významná orientácia vzoriek fragmentov osemenia smerom k iónovému zdroju. Pre meranie vonkajšieho povrchu osemenia je nutné vonkajší povrch orientovať smerom k sample cone.

Obrázok 32. Pomer absolútnych (A) a normalizovaných (B) intenzít signálov oktakosanoátu a hexakosanoátu k hmotnosti vypreparovaných kúskov z osemenia genotypu L100 zmeraných technikou ASAP-MS(-).



Pri vývoji ASAP-MS metódy pri meraní celých zrelých semien boli v rámci každého genotypu vybrané semená s približne rovnakou veľkosťou, aby sa potlačil vplyv veľkosti meraného semienka na veľkosť signálu. Obrázok 33 ukazuje celé semená na milimetrovom papieri, ktoré boli zmerané priamo technikou ASAP-MS.

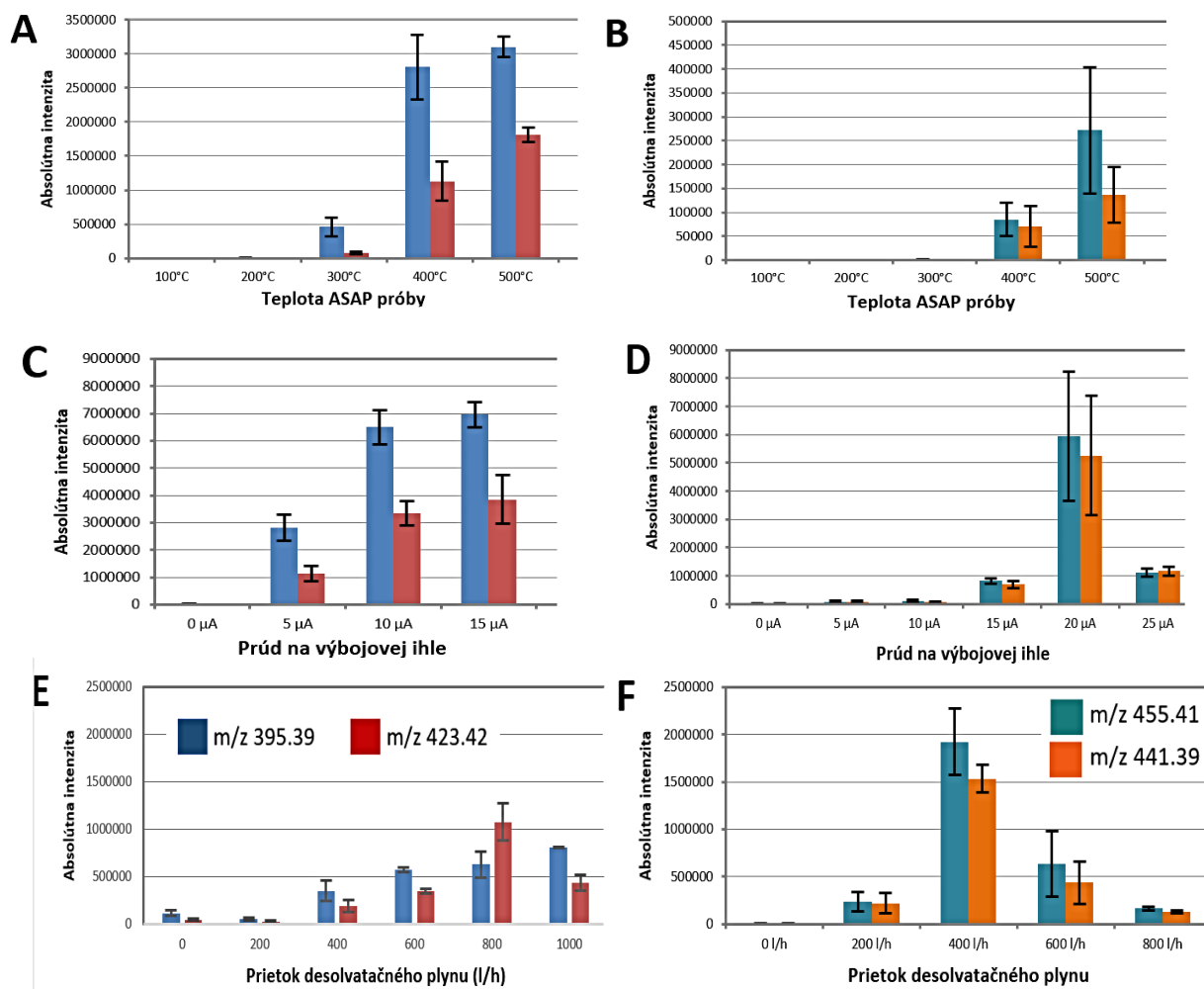
Obrázok 33. Celé zrelé semená hrachu prichystané na priamu ASAP-MS analýzu.



5.3.2. Optimalizácia nastavení iónizačného zdroja

Druhým podstatným krokom pri vývoji ASAP-MS metódy bola optimalizácia jednotlivých inštrumentálnych parametrov pri meraní. Rozsah optimalizácie je popísaný v kapitole 4.5.3. Optimalizácia bola prevedená na celých intaktných semenách genotypov L100 a JI64. Kritériom optimalizácie bol signál hexakosanoátu a oktakosanoátu v osemeni genotypu L100 a signál dihydroxyoktakosanoátu a dihydroxyheptakosanoátu v osemeni JI64, podobne ako v kapitole popisujúcej LDI-MS techniku. Výsledky optimalizácie demonštruje *Obrázok 34*. Najlepší signál hexakosanoátu, oktakosanoátu, dihydroxyoktakosanoátu a dihydroxyheptakosanoátu bol dosiahnutý pri teplote ASAP próby 500°C. Avšak, vzhľadom na opakované nežiadúce praskanie semien ("popcorn efekt") v priebehu merania bola za optimálnu hodnotu zvolená nižšia teplota 400°C, pri ktorej už nedochádzalo k tomuto javu (osemenie ostávalo neporušené a zároveň bola intenzita signálov stále vysoká). Druhým zaujímavým parametrom bol prúd na výbojovej ihle. Signál dihydroxyoktakosanoátu bol však najvyšší pri hodnote prúdu na ihle 20 µA a signály hexakosanoátu a oktakosanoátu pri hodnote od 10 do 15 µA. Pri vysokých hodnotách prúdu na výbojovej ihle však takisto dochádzalo k praskaniu osemenia. Hodnota prúdu, ktorá poskytovala dobrý signál bez narušenia osemenia, bola 5 µA pre obidva typy látok. Táto hodnota bola použitá v ďalších experimentoch. Prietok desolvatačného plynu bol nastavený na hodnotu 400 l/h. Pri tejto hodnote bol signál hydroxylovaných mastných kyselín najvyšší. Okrem toho, táto hodnota poskytovala zároveň dostatočný signál pre nasýtené mastné kyseliny (optimálnou hodnotou pre tieto látky by bola hodnota 800 l/h). Zdánlivo prázdne miesta v grafoch na *Obrázku 34* vypíňajú signály študovaných látok avšak s veľmi malou absolútnou intenzitou (desiatky až stovky impulzov) a nie je ich pri danom rozsahu ox y vidieť.

Obrázok 34. Optimalizácia parametrov v technike ASAP-MS prevedená na celých semenách (genotyp L100 - intenzita hexakosanoátu a oktakosanoátu, naľavo; genotype J164 - intenzita dihydroxyoktakosanoátu a dihydroxyheptakosanoátu, napravo; optimalizácia teploty ASAP próby (A,B), prúdu výbojovej ihly (C,D) a prietoku desolvatačného plynu (E,F).



5.3.3. Možnosti kvantifikácie biomarkerov v osemeni hrachu siatedo

Hmotnostná spektrometria s ASAP ionizáciou je používaná väčšinou pre rýchlu identifikáciu zložiek materiálov a jej použitie na kvantitatívne účely nie je typické. Výsledky získané v tejto štúdii však ukazujú, že ASAP-MS technika môže byť na predbežné (semi)kvantitatívne účely použitá. Pri testovaní možnosti stanovenia mastných kyselín v osemeni boli dostupné štandardy kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej. Na začiatku boli prevedené predbežné experimenty s roztokmi týchto

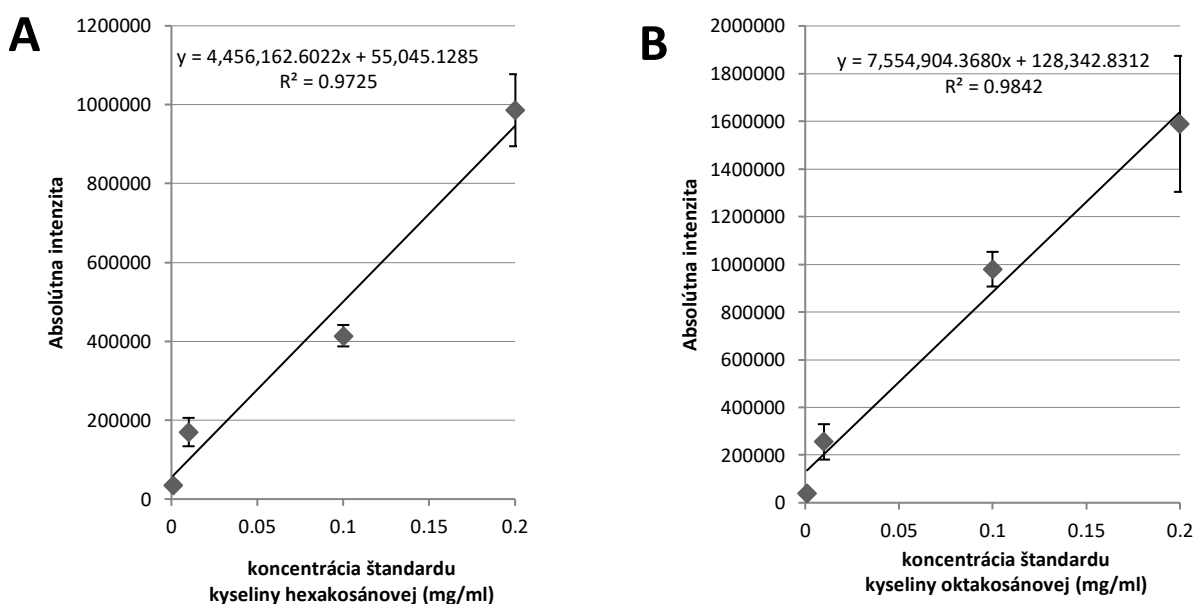
kyselín na štandardnej ASAP kapiláre. Týmto spôsobom sa preukázalo, že získaný signál oboch kyselín ASAP-MS technikou môže byť použitý pre analýzu týchto látok z extraktov osemnia. Nasledovne bola tiež testovaná možnosť použitia tenšej sklenenej kapiláry s otvorenými koncami namiesto štandardnej kapiláry. Technické detaily a spôsob dávkovania boli detailnejšie popísané v kapitole 4.4.2.1. Použitie alternatívnej kapiláry umožnilo vylepšiť opakovateľnosť dávkovania extraktov a kalibračných roztokov do hmotnostného spektrometru a znížiť limit kvantifikácie na 0.001 mg/ml pre obe látky (S/N=10). So štandardnou sklenenou kapilárou so zataveným koncom bol limit kvantifikácie len 0.2 mg/ml (S/N=10). Kalibračné krivky zostrojené meraním kalibračných roztokov pomocou ASAP-MS s alternatívnou sklenenou kapilárou boli pre obe masťné kyseliny lineárne v koncentračnom rozsahu 0.001 mg/ml - 0.2 mg/ml. Hodnota R^2 pre kyselinu hexakosánovú bola 0.97 a pre kyselinu oktakosánovú 0.98. Kalibračné body boli získané ako priemerná hodnota vždy zo štyroch opakovaných meraní. Príslušné kalibračné krivky sú ukázané na *Obrázku 35*. Experimenty teda ukazujú, že ASAP-MS technika môže byť použitá na stanovenie masťných kyselín s dlhým alkylovým reťazcom. Kalibračné závislosti boli použité na určenie koncentrácie oboch týchto masťných kyselín v hexanových extraktoch osemnia genotypov L100 a Cameor.

V extrakte z genotypu L100 bolo nájdené 68.89 mg/kg kyseliny hexakosánovej a 58.35 mg/kg kyseliny oktakosánovej. V extrakte genotypu Cameor bolo stanovené 52.91 mg/kg kyseliny hexakosánovej a 72.67 mg/kg kyseliny oktakosánovej. Semená oboch genotypov sa výrazne odlišujú veľkosťou a hrúbkou osemnia (*Obrázok 36*). Semená L100 sú menšie a ich osemenie je pomerne hrubé. Stredná hodnota (zo šiestich analyzovaných semien) priemeru semena L100 bola 4.7 mm, čo odpovedalo ploche osemnia približne 322 mm² (plocha šiestich semien bez hila).

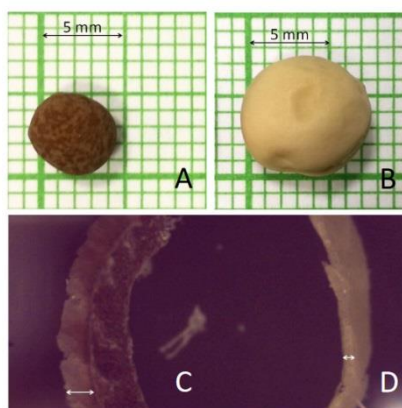
Semená Cameoru sú podstatne väčšie a stredná hodnota ich priemeru bola 7.9 mm, čo odpovedá ploche približne 1076 mm² (plocha šiestich semien bez hila). Osemenie L100 je asi 3x hrubšie a plochou 2x menšie ako osemenie Cameoru (*Obrázok 36*). Ako ukazujú experimenty s hmotnostným zobrazovaním, masťné kyseliny sú sústredené vo veľmi tenkej vonkajšej povrchovej vrstve osemnia. Vzhľadom k väčšej ploche osemnia genotypu Cameor (v porovnaní s genotypom L100) je v jeho povrchovej vrstve menšia koncentrácia masťných kyselín. Prestup vody skrz toto osemenie môže byť preto jednoduchší, čo je v súlade s faktom, že Cameor

je nedormantný a ľahšie nasiaka vodu v porovnaní s dormantným genotypom L100. Ak sa množstvo extrahovateľných mastných kyselín vzťahuje na plochu osemenia, vychádza ich obsah v dormantnom genotype L100 približne 2x vyšší ako v Cameoru. Porovnanie obsahu extrahovateľných vyšších nasýtených mastných kyselín v osemeni L100 a Cameor a prepočet ich obsahu na plochu semien ukazuje *Obrázok 37*.

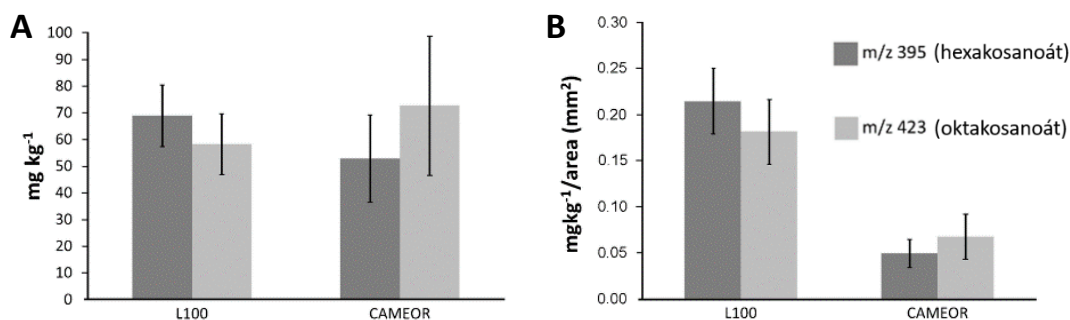
Obrázok 35. Kalibračné krivky pre kyselinu hexakosánovú (A) a oktakosánovu (B) získané v priebehu ASAP-MS(-) merania s alternatívnou sklenenou kapilárou.



Obrázok 36. Ukážka semien vybraných dvoch genotypov na kvantitatívnu analýzu kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej. (A- semeno L100, B- semeno Cameoru, C- hrúbka osemenia L100, D- hrúbka osemenia Cameoru).



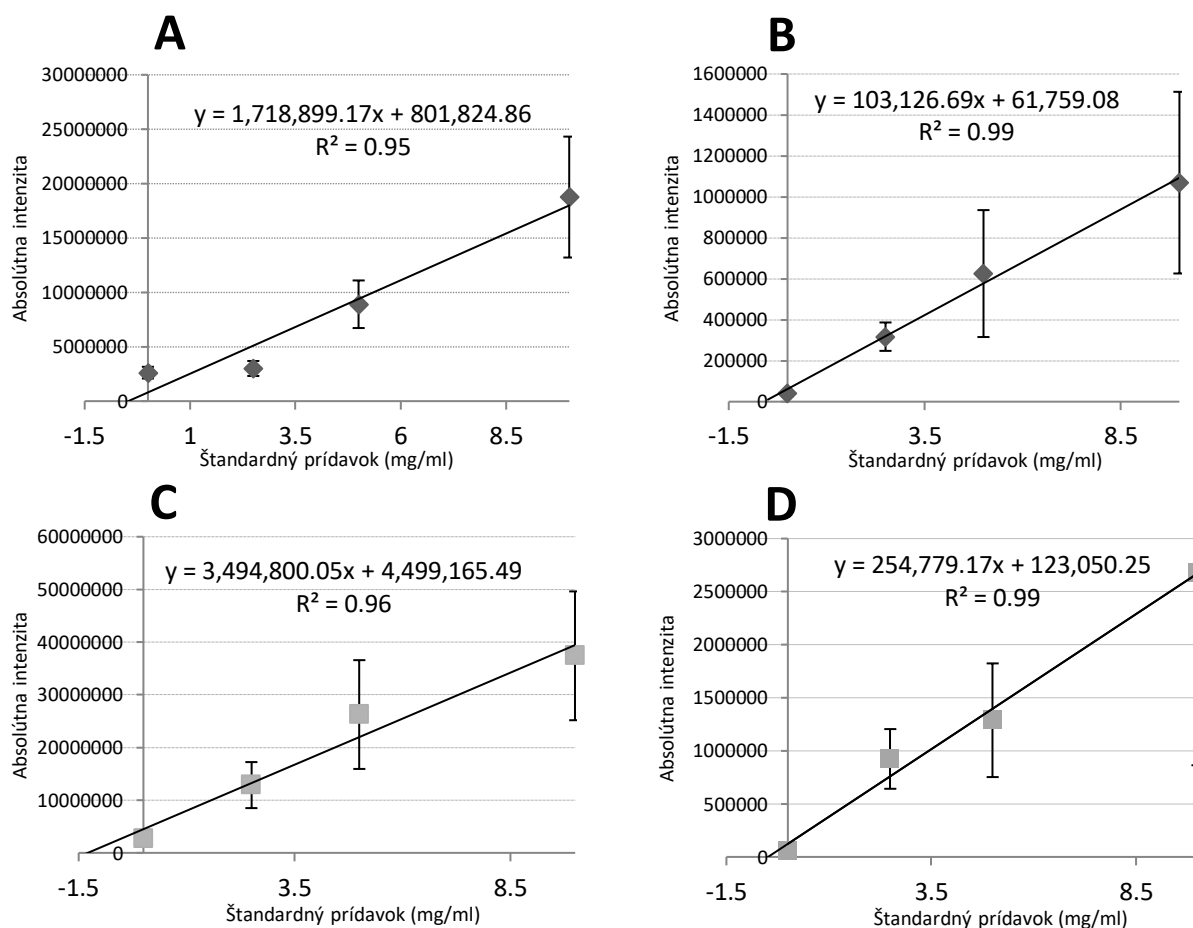
Obrázok 37. Obsah kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej v osemeni L100 a Cameoru stanovený extrakciou do hexánu a technikou ASAP-MS s alternatívnou sklenenou kapilárou. (A- obsah vyjadrený v mg na kg osemenia, B- obsah vzťahnutý na hmotnosť a plochu analyzovaných semien).



Ďalej boli testované možnosti kvantifikácie mastných kyselín priamo na osemeni. V tomto prípade boli analyzované celé semená postupom popísaným v predchádzajúcej kapitole a na stanovenie bola použitá metóda štandardných prídavkov. Štandardné roztoky boli aplikované priamo na vonkajší povrch intaktných semien. Ukotvenie semien na ASAP próbu popisuje kapitola 4.4.2. Tento postup predstavuje rýchlejšiu variantu merania oproti metóde založenej na extrakcii látok do hexánu. Na druhej strane je nutné zvážiť obmedzenia tohto typu kvantifikácie. Tento typ analýzy bude vhodný pre látky vyskytujúce sa voľne na povchu semien, ktoré dokáže desolvatačný (odparovací) plyn desorbovať zo semien a transportovať medzi výbojovú ihlu a vstup do hmotnostného spektrometru. Táto kvantifikácia bola uskutočnená pomocou troch štandardných prídavkov s koncentraciami 0.25; 0.5 a 1 mg/ml vždy na šesť semien vyššie vybraných dvoch genotypov (dormantný L100 a nedormantný Cameor). Na kalibračné body bola aplikovaná lineárna regresia a hodnota koeficientu R^2 bola 0.95 a 0.99 v prípade kyseliny hexakosánovej na osemeni L100 a osemeni Cameoru. V prípade kyseliny oktakosánovej bola hodnota R^2 0.96 pre L100 a 0.99 pre Cameor. Na Obrázku 38 sú zobrazené príslušné závislosti signálu na prídavkoch štandardov kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej na osemenie L100 a Cameor. Väčšie rozptyly medzi opakovanými meraniami sú zrejme spôsobené biologickou variabilitou v populácii semien. To je samozrejme určitou nevýhodou v postupe, ktorý však poskytuje veľmi zaujímavé (a inak obtiažne dostupné) dáta. Merania môžu byť navyše zaťažené i nedokonalou homogenitou rozloženia pridaných

roztokov s analytmi na povrchu semien (viditeľné viac u prídavkov s vyššími koncentraciami).

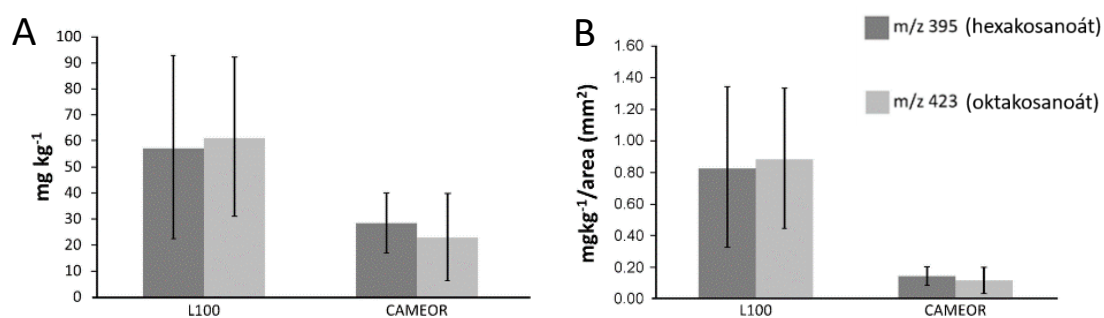
Obrázok 38. Závislosť absolútnej intenzity na štandardnom prídavku kyseliny hexakosánovej (A,B) a oktakosánovej (C,D) získanej pri ASAP-MS meraní celých semien L100 (A,C) a Cameoru (B,D).



Touto metódou bol stanovený obsah kyseliny hexakosánovej v L100 osemení na 57.12 mg/kg a v Cameore na 28.46 mg/kg. Obsah kyseliny oktakosánovej bol v osemení L100 stanovený na 46.49 mg/kg a v osemení Cameoru na 22.77 mg/kg. Množstvo týchto dvoch látok je nižšie v nedormantnom Cameore ako ukazuje Obrázok 39. Po prepočte na plochu povrchu analyzovaných semien sa tento rozdiel medzi dormantnou L100 a nedormantným Cameorom ešte zvýraznil. Za zaujímavý výsledok možno považovať to, že bez ohľadu na metódu kvantifikácie (a vplyvu biologickej variability u metódy štandardného prídavku) sú stanovené množstvá týchto látok pre

genotyp L100 a genotype Cameor porovnateľné. Fakt, že metóda ASAP-MS je schopná (semi)kvantitatívne postihovať rozdiely medzi (teplom uvoľniteľnými) zložkami osemenia, je dôležitý pre aplikáciu viacrozmerných metód v klasifikácii viacerých vzoriek osemení.

Obrázok 39. Obsah kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej v osemeni L100 a Cameoru stanovený priamo z povrchu celých semien technikou ASAP-MS (A- vyjadrený mg/kg osemenia, B- vztiahnutý na hmotnosť a plochu analyzovaných semien).

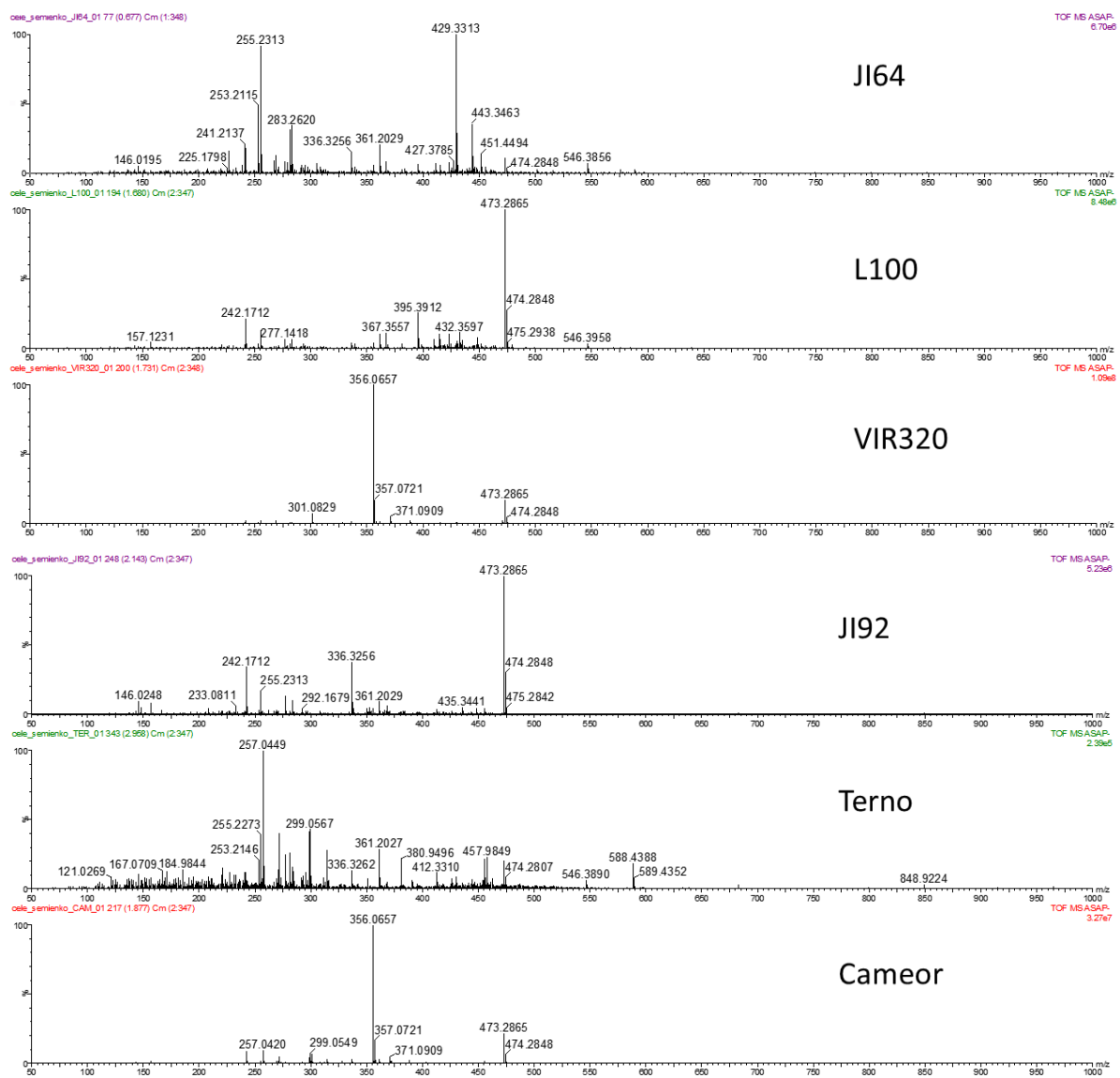


5.4 Analýza osemenia hrachu siateho pomocou ASAP-MS a spracovanie získaných dát pomocou PCA a OPLS-DA

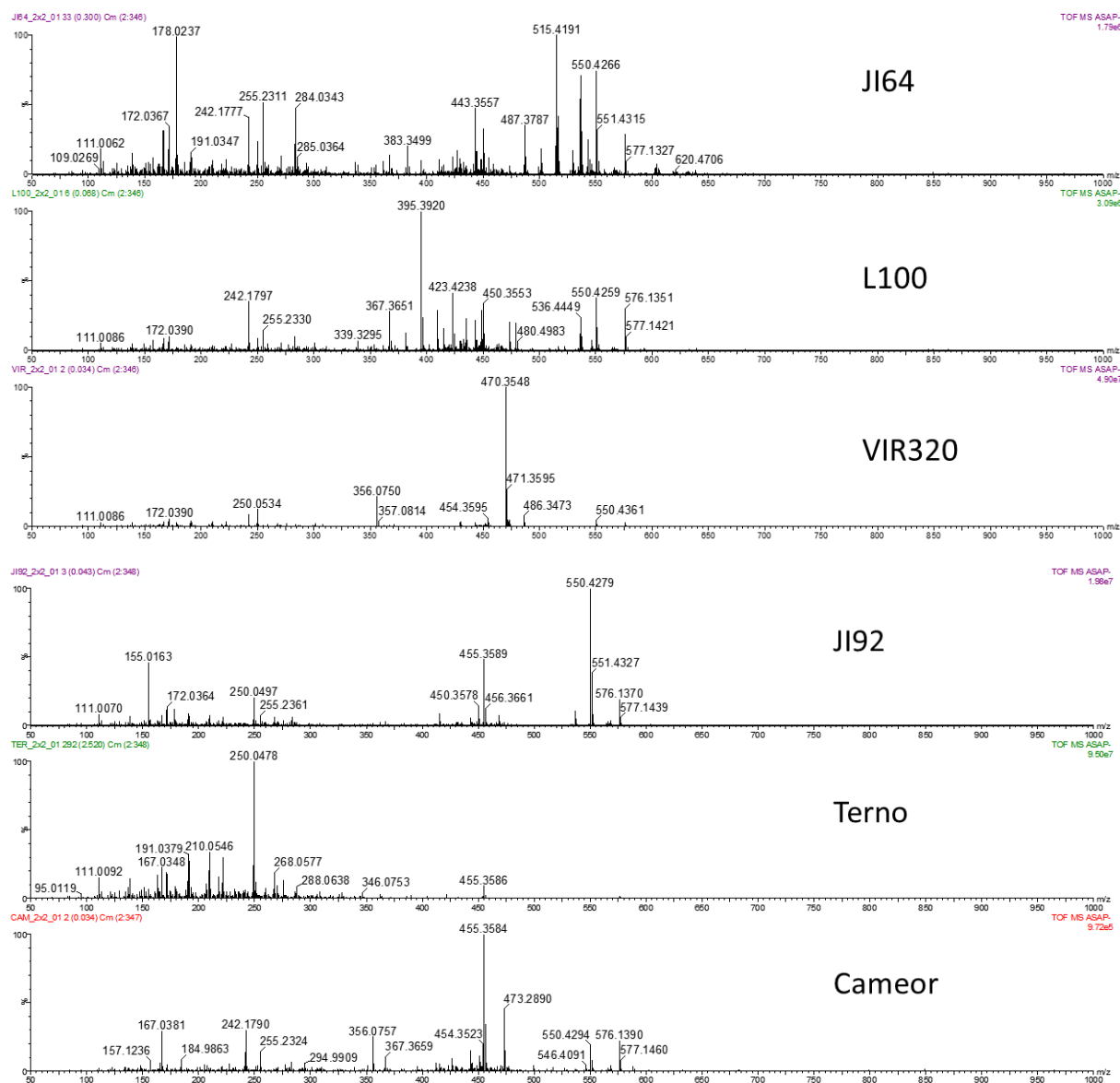
Pomocou techniky ASAP-MS s negatívnou ionizáciou boli zmerané kompaktné semená od všetkých šiestich genotypov hrachu siateho v štyroch biologických opakovaníach. V ďalších experimentoch boli analyzované vypreparované kúsky z ďalších semien (s rozmerom 4 mm²). V prvom kroku boli porovnávané surové spektrá dormantných genotypov oproti nedormantným za účelom nájsť kvalitatívne rozdiely v získaných spektrách. *Obrázky 40 a 41* ukazujú surové ASAP-MS(-) spektrá kompaktných semien a tiež vypreparovaných kúskov osemenia. Je zrejmé, že v sú v nich badateľné mnohé rozdiely v látkach skrz jednotlivými genotypmi hrachu siateho. Podobne ako pri interpretácii (MA)LDI-MS meraní, je obtiažne postihnúť význam rozdielov pri veľkom počte signálov a väčšom počte genotypov súčasne, aj keď je zrejmé, že rozdiely v majoritných signáloch sú pri ASAP-MS spektrách výraznejšie ako pri (MA)LDI-MS spektrách. Detailný popis rozdielov umožnili viacrozmerne metódy, ako bude popísané ďalej. Zaujímavé bolo tiež porovnať ASAP-MS spektrá celých semien so spektrami vypreparovaných kúskov ako bude diskutované ďalej. Vzhľadom k tomu, že semená majú rozdielny genetický pôvod, pri všetkých vzorkách semien ide o rod *Pisum*. Je preto logické, že v ASAP-MS spektrách bude mnoho majoritných signálov spoločných. Medzi spoločné signály pre kompaktné semená a kúsky všetkých genotypov patrili hmoty s hodnotami m/z 255.2313; 283.2620; 299.0567, 356.0657; 361.2029; 371.0909; 473.2865 a iné. Látky s hodnotou m/z 255.2313 a 283.2620 odpovedajú kyseline palmitovej a stearovej. V MS spektrách vypreparovaných kúskov sa nachádzali aj majoritné signály látok s hodnotou m/z 167.0317; 178.0291; 487.3789; 501.3938; 515.4191; 536.4449; 550.4259 a 576.1351, ktoré boli naopak v spektrách celých semien prítomné len s veľmi malou intenzitou – môžu teda patriť ku zložkám z vnútorných častí osemenia. Popísané signály však neboli identifikované.

V ďalšej časti práce sú prezentované výsledky detailnejšieho prieskumu získaných dát pomocou PCA a OPLS-DA s cieľom popísať rozdiely v obsahu látok prítomných v osemení študovaných genotypov hrachu siateho, najmä rozdiely medzi dormantnými a nedormantnými genotypmi. Dáta získané technikou ASAP-MS boli porovnané s dátami získanými pomocou MALDI a LDI-MS.

Obrázok 40. MS spektrá kompaktných semien hrachu získaných pomocou techniky ASAP-MS pri negatívnej ionizácii.



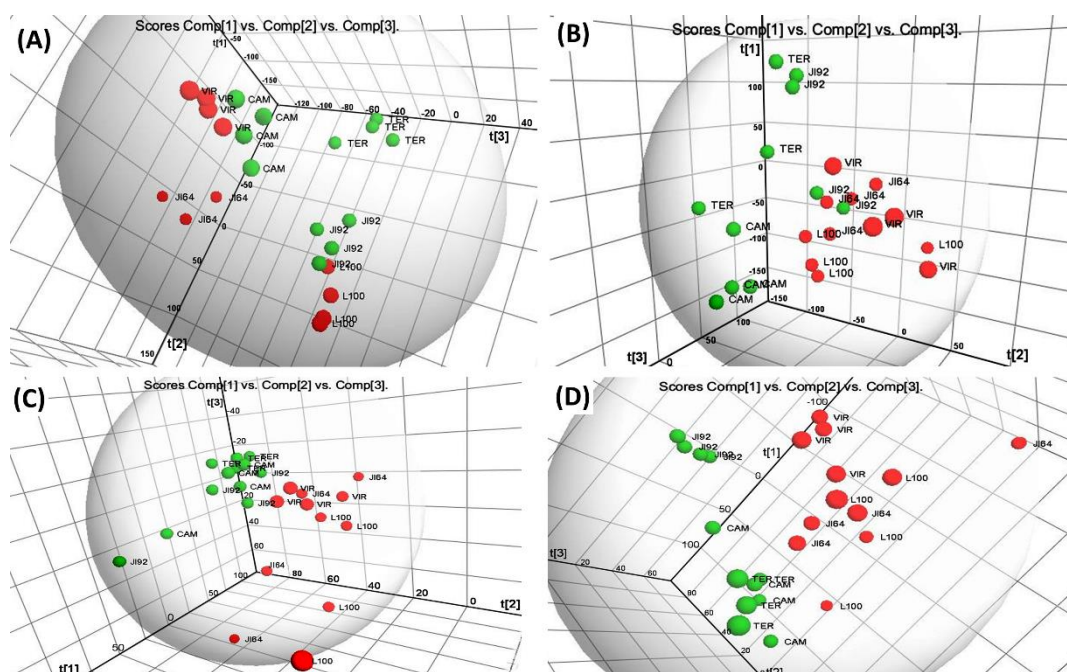
Obrázok 41. ASAP-MS(-) spektrá vypreparovaných kúskov s plochou 4 mm².



PCA a OPLS-DA ako štatistické nástroje boli použité na detailnejší popis ASAP-MS dát celých semien a vypreparovaných kúskov osemenia. Obrázok 42 ukazuje 3D PCA ploty ASAP-MS dát všetkých šiestich základných genotypov a (MA)LDI-MS dát povrchu semien pri negatívnej ionizácii. Vo všetkých prípadoch bola pozorovaná segregácia semien na základe rozdielov v dormancii, vrátane ASAP-MS dát z kúskov osemenia. Hoci je princíp ionizačných techník (MA)LDI a ASAP odlišný, dokáže aj technika ASAP-MS rozlíšiť suché a zrelé semená hrachu siateho na základe

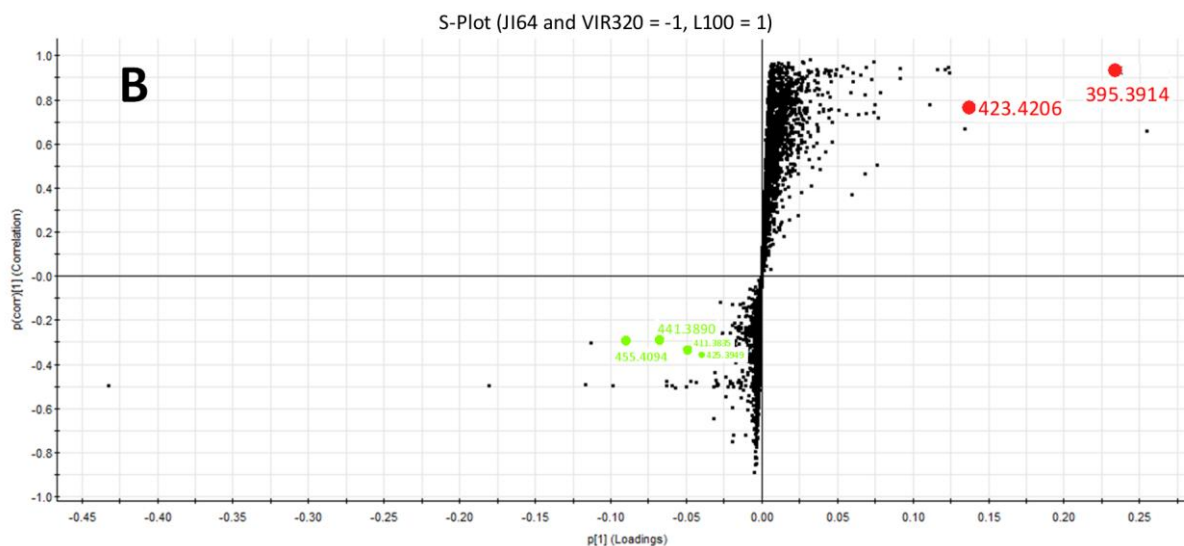
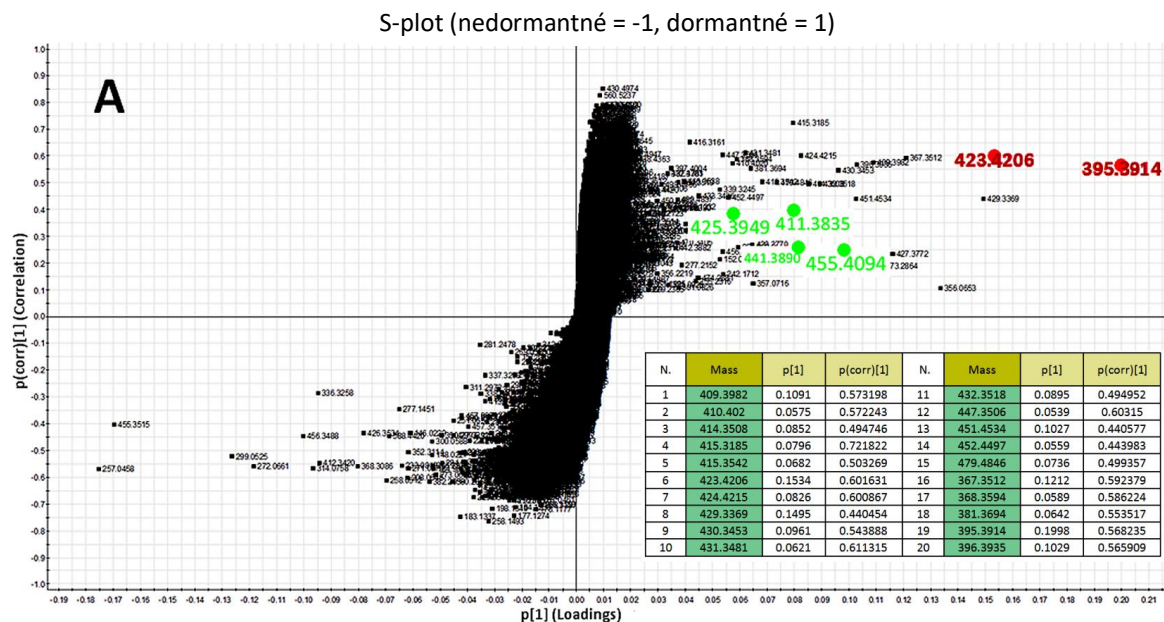
ich dormancie. Porovnaním MS spektier pri negatívnej ionizácii bolo zistené, že ASAP-MS a (MA)LDI-MS spektrá obsahujú celý rad analogických signálov, ktoré sa pravdepodobne podieľajú na segregácii dát v 3D PCA plotoch. Medzi ne patria vyššie diskutované mastné kyseliny. V ASAP-MS spektrách sú prítomné aj nové látky, ktoré môžu byť do určitej miery taktiež zodpovedné za segregáciu dát v PCA. Je zrejmé, že ASAP-MS analýza celých kompaktných semien poskytuje okrem segregácie genotypov podľa dormancie tiež lepšie zoskupovanie jednotlivých genotypov do menších klastrov (jednotlivé biologické opakovania sú v PCA plotoch bližšie pri sebe) v porovnaní s ASAP-MS analýzou kúskov semien. ASAP-MS dáta získané analýzou intaktných semien umožňujú aj lepšiu segregáciu jednotlivých genotypov v porovnaní s (MA)LDI-MS analýzou. Na druhú stranu v 3D PCA plotoch získaných ASAP-MS analýzou celých semien vysvetľujú prvé tri hlavné komponenty 67.7% variability v dátach a v 3D PCA plotoch z ASAP-MS analýzy vypreparovaných kúskov 58.5%. Tieto hodnoty sú nižšie v porovnaní s (MA)LDI-MS dátami (u LDI-MS experimentov je hodnota 74.4% a v MALDI-MS experimentoch 81.7%). (MA)LDI-MS dáta teda popisujú v prvých troch dimenziách študovaný systém o niečo komplexnejšie, ale rozdiel nie je zásadný.

Obrázok 42. 3D PCA ploty vygenerované pre študované genotypy hrachu siateho (A - ASAP-MS(-) analýza celých kompaktných semien, B - ASAP-MS(-) analýza vypreparovaných kúskov, C – LDI-MS(-) analýza povrchu osemení, D – MALDI-MS(-) analýza porchu osemenia (použitá matrica aminoakridín, Pareto škálovanie).



Podobne ako pri (MA)LDI-MS analýzach, chemické diferencie medzi skúmanými osemeniami boli študované pomocou OPLS-DA a príslušných S-plotov zobrazujúcich konkrétne markery. *Obrázok 43A* zobrazuje S-plot vygenerovaný z ASAP-MS(-) dát z merania celých semien zo všetkých genotypov (dormantných vs. nedormantných). Signály s hodnotou m/z 423.4206 a 395.3914 sú prítomné v oblasti signifikantných markerov pre dormantné genotypy (oblasť bola vymedzená na základe literatúry²¹⁰ a je uvedená v kapitole 5.2.1.). Na *Obrázku 43A* sú prehľadne vo vloženej tabuľke uvedené najvýznamnejšie markery pre dormantné osemenia vrátane ich súradníc v príslušnom S-plete. V tomto S-plete je okrem toho vidieť, že ASAP-MS analýzou je možno identifikovať hydroxylované a nasýtené vyššie mastné kyseliny ako markery dormancie (nachádzajú sa v kvadrante s markermi pre dormantné semená). Ďalšie štatistické analýzy, v ktorých boli porovnávané L100 voči JI64 s VIR320, ukázali (*Obrázok 43B*), že hmoty s m/z 395.39 a 423.42 (odpovedajúce nasýteným mastným kyselinám, resp. ich aniónom, hexakosanoátu a oktakosanoátu) sú charakteristické predovšetkým pre povrch dormantného osemenia hrachu L100. Porovnanie dormantného genotypu L100 s ďalšími dvoma dormantnými genotypmi JI64 a VIR320 nám umožnilo lepšie charakterizovať markery typické práve toto osemenie. Hydroxylované mastné kyseliny (v *Obrázku 43B* označené zelenou farbou) sa nachádzali v treťom kvadrante, teda medzi markermi JI64 a VIR320. Tento výsledok korešponduje so získanými výsledkami v (MA)LDI-MS, v ktorých boli tieto markery identifikované ako charakteristické látky pre povrch osemenia JI64. Technika ASAP-MS ukázala, že niektoré hydroxylované mastné kyseliny (s m/z 441.39 a 427.38) sú prítomné aj na osemení z VIR320. Zvolená ionizačná technika ASAP sa teda ukázala ako ďalší vhodný nástroj na štúdium chemických látok na osemení. V prípade celých kompaktných semien sa môže použiť ako doplnková technika k (MA)LDI-MS na dotvorenie detailnejšieho obrazu o povrchu osemenia na semenách.

Obrázok 43. S-ploty z ASAP-MS(-) experimentov s celými intaktnými semenami (A- S-plot popisujúci rozdiely dormantných oproti nedormantným genotypom, B- S-plot popisujúci rozdiely v skupine dormantných genotypov (L100 voči J164 a VIR320)); červená farba označuje markery pre L100, zelená farba označuje signály diskutovaných hydroxylovaných mastných kyselín.



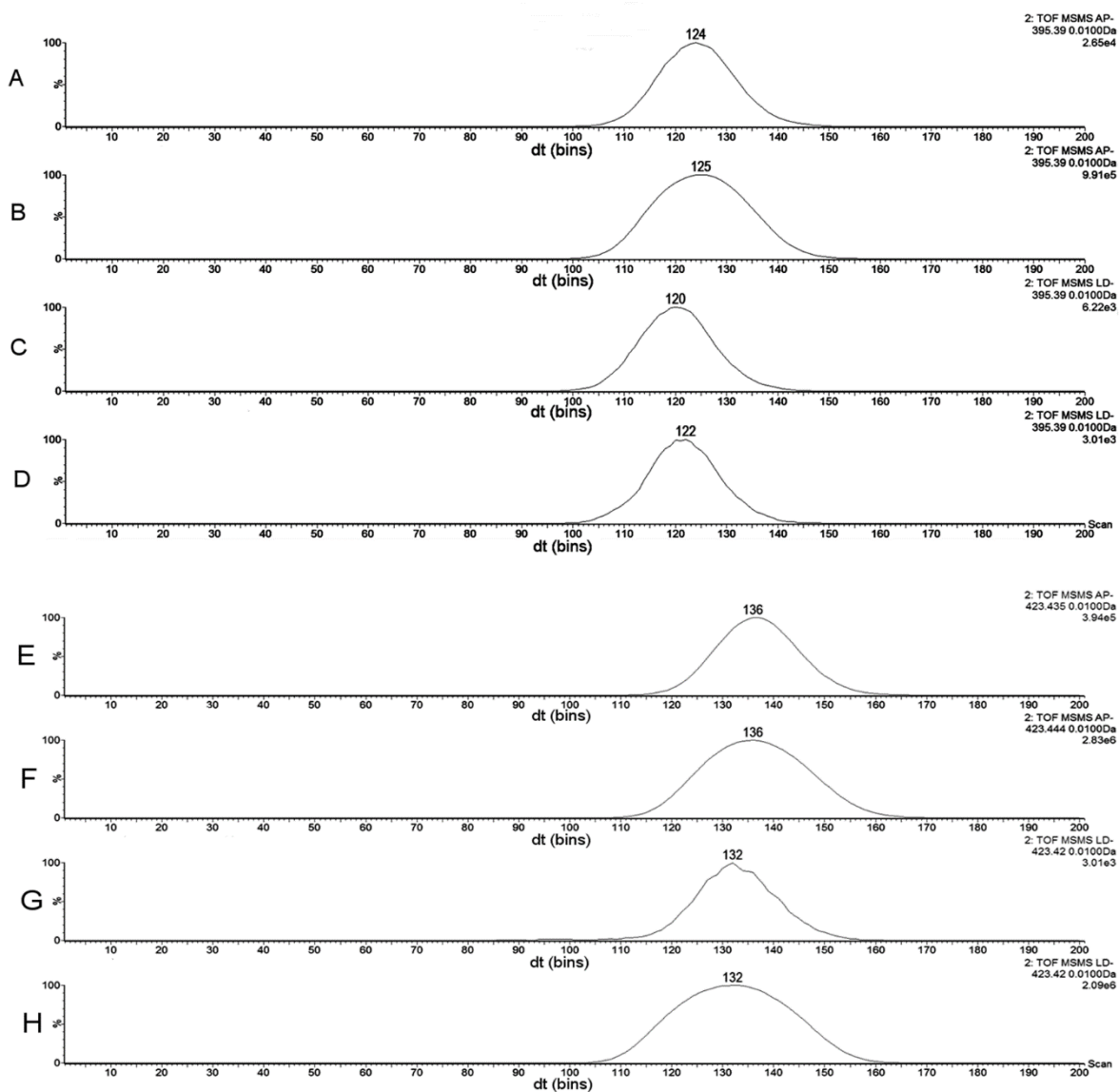
5.4.1 Identifikácia markerov nájdených pomocou techniky ASAP-MS

V tejto kapitole je detailne popísaný postup identifikácie vyššie diskutovaných markerov. Detailne boli pomocou ASAP-MS(-) študované markery s m/z 395.3914 a

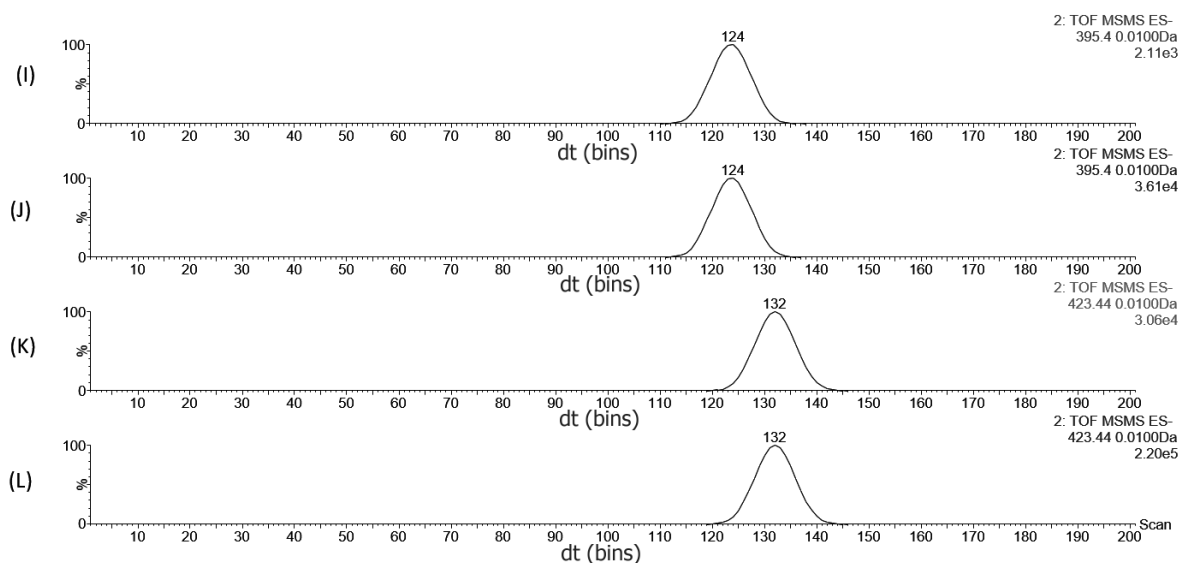
423.4206. Tieto hmoty odpovedajú elementárnemu zloženiu $C_{26}H_{51}O_2^-$ a $C_{28}H_{55}O_2^-$ s odchýlkou od teoretickej hodnoty 6.32 ppm a 0.95 ppm. Elementárnym zložením odpovedajú kyseline hexakosánovej a oktakosánovej. Tieto látky sú komerčne dostupné a boli zaobstarané za účelom potvrdenia identifikácie. Pri analýze týchto štandardov boli v spektrách pozorované odpovedajúce hodnoty m/z. Na ďalšiu identifikáciu bola využitá iónovo mobilitná separácia a porovnanie drift time hodnoty s príslušným štandardom. Vedľa ASAP-MS(-) techniky boli identifikačné experimenty s iónovo mobilitnou separáciou prevedené aj pomocou MALDI-MS(-) a ESI-MS(-). Štandard kyseliny hexakosánovej mal v prípade ASAP-MS merania driftový čas (dt) 125 binov a marker odpovedajúci tejto hmote nájdený v osemeni genotypu L100 124 binov. Pri štandarde kyseliny oktakosánovej mal jej pík v rekonštruovanom mobilograme dt 136 binov a odpovedajúci marker v osemeni L100 mal identickú hodnotu. V prípade MALDI-MS mal štandard kyseliny hexakosánovej dt 122 binov a odpovedajúci marker v osemeni L100 mal dt 120 binov. Štandard kyseliny oktakosánovej mal hodnotu dt 132 binov a odpovedajúci marker v osemeni L100 identickú hodnotu. Zhoda v dt hodnotách sledovaných markerov v osemeni so štandardmi potvrdzuje identitu nájdených markerov. V prípade ESI-MS analýzy bol dt pre hexakosanoát z L100 extraktu 124 binov a oktakosanoátu 132 binov. Všetky tri typy experimentov boli prevedené pri rovnakom nastavení IMS parametrov (uvedených v kapitole 4.5.5). Odpovedajúce mobilogramy pre nájdené markery a štandardy sú prezentované v *Obrázku 44*. Pri porovnaní dt hodnôt medzi jednotlivými ionizačnými technikami sú vidieť mierne rozdiely, ktoré sú dôsledkom rozdielov v dráhe iónov, čo sa zrejme mierne prejaví na ich pohybe iónovou optikou vrátane priechodu mobilitnou celou. Iónovo mobilitná separácia umožnila "očistiť" MS signály študovaných látok od signálov interferujúcich látok prítomných v extrakte osemenia, ktoré sa k nim približovali hodnotou m/z. Tento prístup bol užitočný pri získaní dostatočne selektívnych MS/MS spektier daných látok v extrakte L100. Postup experimentu je stručne popísaný nasledovne. Vybraný marker bol spolu s interferujúcou látkou izolovaný na kvadrupóle (nastavenie izolačného okna na kvadrupóle neumožňovalo izolovať len samotný marker). Potom bola v iónovo mobilitnej cele prevedená najskôr separácia študovaných mastných kyselín od interferentov a následne ich fragmentácia v kolíznej cele umiestnenej za iónovo-mobilitnou celou (kolízna cela "Transfer"). Tento postup umožňuje získať čisté MS/MS spektrá ako mastnej kyseliny, tak interferentu. Bez mobilitnej separácie by nebola

možná izolácia iónov mastnej kyseliny bez interferentu (neumožňuje to nastavenie quadrupólu) a získané MS/MS spektrum by bolo zmesou fragmentov pochádzajúcich ako z mastnej kyseliny, tak z interferentu. Iónovo mobilná separácia prináša benefity pri štúdiu analytov v komplikovaných maticiach aj práve v tomto ohľade. Ako vhodný príklad už bola ukázaná iónovo mobilná separácia dihydroxyhexakosanoátu od interferentu na *Obrázku 26* v predchádzajúcej kapitole venovanej MALDI-MS analýze.

Obrázok 44 (prvá časť). Rekonštruované mobilogramy pre kyselinu hexakosánovú a oktakosánovú na osemeni genotypu L-100 a štandardoch získaných pomocou ASAP-MS, MALDI-MS a ESI-MS. (ASAP-MS: A- hexakosanoát z L100, B – štandard hexakosanoátu, E- oktakosanoát z L100, F- štandard oktakosanoátu, MALDI-MS: C- hexakosanoát z L100, D- štandard hexakosanoátu, G- oktakosanoát z L100, H- štandard oktakosanoátu, ESI-MS: I- hexakosanoát z L100, J – štandard hexakosanoátu, K- oktakosanoát z L100, L- štandard oktakosanoátu). Driftovací čas je vyjadrený v binoch.



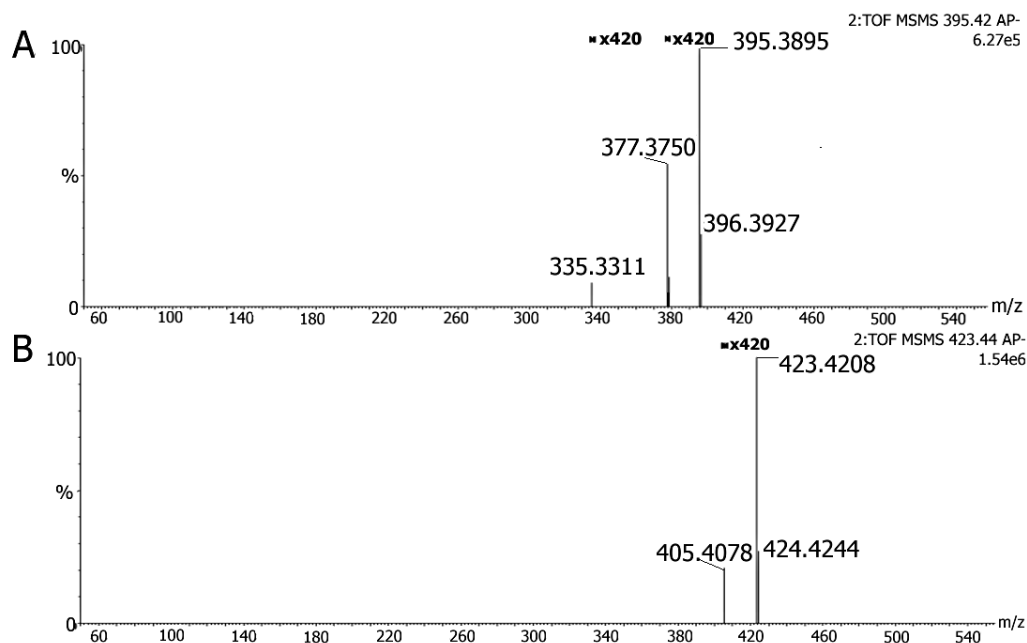
Obrázok 44 (druhá časť). Rekonštruované mobilogramy pre kyselinu hexakosánovú a oktakosánovú na osemeni a štandardoch získaných pomocou ESI-MS (I- hexakosanoát z L100, J – štandard hexakosanoátu, K- oktakosanoát z L100, L- štandard oktakosanoátu). Driftovací čas je vyjadrený v binoch.



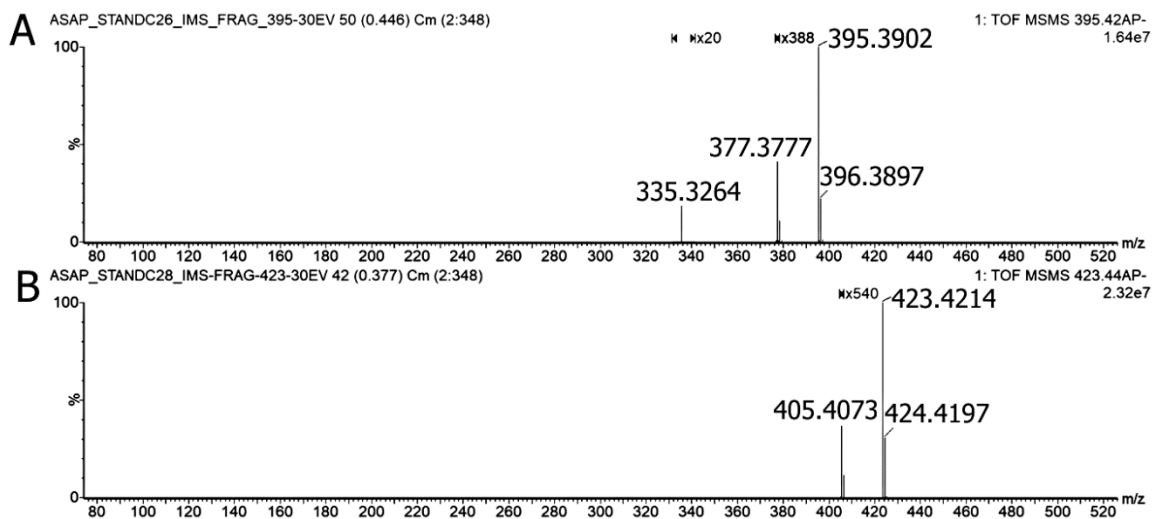
V ASAP-IMS-MS/MS(-) spektre hexakosanoátu (Obrázok 45A) v L100 osemeni bol pozorovaný fragment s m/z 377.3750, ktorý odpovedal strate molekuly vody. Ďalšiemu fragmentu s m/z 335.3311 na základe elementárneho zloženia odpovedala strata C_3H_6 , pravdepodobne pochádzajúca z hlavného uhlíkového reťazca. V MS/MS spektre oktakosanoátu (Obrázok 45B) z L100 osemenia bola analogicky pozorovaná strata molekuly vody vo forme fragmentu s m/z 405.4078. Fragment, ktorý by odpovedal podobnému odštiepeniu C_3H_6 z reťazca bol pozorovaný v stopovom množstve. Rovnaké fragmenty poskytovali aj štandardy kyseliny hexakosánovej a oktakosánovej (Obrázok 46).

Priamym nadávkovaním extraktu pripraveného z osemenia L100 pomocou ESI-IMS-MS/MS(-) bolo potvrdené, že kyseliny hexakosánová a oktakosánová môžu byť z osemenia vyextrahované do menej polárneho rozpúšťadla akým je acetón. Následne boli štandardy a nájdené hmoty v extrakte osemenia L100 separované pomocou IMS (nastavenie rýchlosti a výšky mobilitej vlny boli rovnaké ako pri ASAP a MALDI-IMS-MS meraní popisovanom vyššie) a analogicky fragmentované na kolíznej cele Transfer (kolízna energia 35eV).

Obrázok 45. Fragmentačné spektrum hexakosanoátu (A) a oktakosanoátu (B) získané pri meraní celého semienka L100 technikou ASAP-IMS-MS/MS(-).

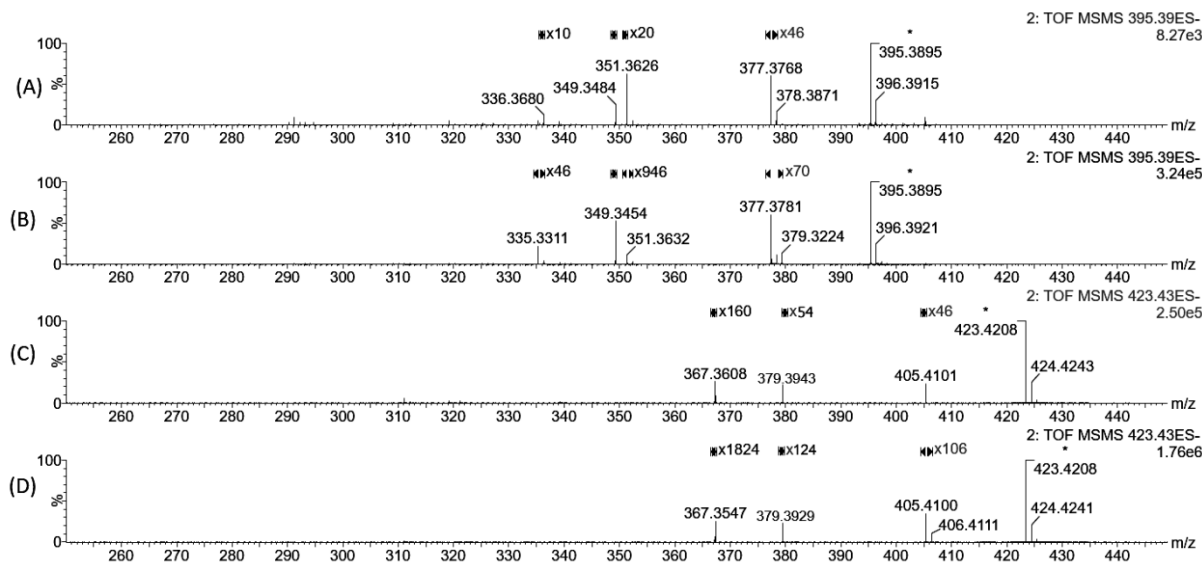


Obrázok 46. Fragmentačné spektrá štandardu hexakosanoátu (A) a oktakosanoátu (B) získané technikou ASAP-IMS-MS/MS(-).



V prípade merania ESI-MS/MS(-) (s využitím priameho zavedenia roztokov vzoriek do iónového zdroja) boli získané kvalitné fragmentačné spektrá týchto látok (Obrázok 47). Je zaujímavé, že ESI-MS/MS spektrá sa od ASAP-MS/MS a (MA)LDI-MS/MS spektier líšia prítomnosťou fragmentu s m/z 351.3632. Prítomnosť tohto fragmentu bola potvrdená pri príslušnej MS/MS analýze extraktu osemenia L100 a rovnako tak v štandarde hexakosanoátu (v ASAP-MS/MS a LDI-MS/MS spektrách z extraktu a štandardu tento fragment nebol zachytený). Prítomnosť fragmentu pri analýze štandardov prakticky vylučuje, že ide o fragment inej molekuly (nečistoty). Mass defektom signál najlepšie odpovedá fragmentu s elementárnym zložením $C_{24}H_{47}O^-$ a ťažko vysvetliteľnej strate oxiránu alebo inej štruktúry s elementárnym zložením C_2O . Iným vysvetlením by mohli byť dva logickejšie, paralelne prebiehajúce, procesy – strata oxidu uhličitého (odštiepenie karboxylovej skupiny za vzniku fragmentu s m/z : 351.3991) a propánu (skrátene uhl'ovodíkového reťazca s presunom jedného vodíka na vznikajúcu neutrálnu molekulu za vzniku fragmentu m/z 351.3263). Obidva fragmenty potom nie sú dobre rozlíšené v kolíznom spektre a pozorujeme ich ako “zmesný” pík s mass defektom medzi oboma hodnotami. Prebiehajúci fragmentačný proces, a ani rozdiely v CID spektrách získané rôznymi ionizačnými technikami, neboli v rámci tejto práce vysvetlené a sú predmetom ďalšieho výskumu. V ESI-MS/MS spektre štandardu boli prítomné aj tri fragmenty s m/z 379.3616, 349.3454 a 335.3311, ktoré zrejme súvisia so skracovaním uhlíkového reťazca pri fragmentácii. Obdobné fragmenty boli prítomné v MSMS nájdennej látky s rovnakou hmotou v extrakte osemenia L100 (tj. m/z 379.3572, 349.3484 a 335.3063, posledný ión mal malú intenzitu). Tieto hmoty odpovedajú štruktúram s elementárnym zložením $C_{25}H_{47}O^-$ (teoretická hodnota m/z 379.3643), $C_{24}H_{45}O^-$ (teoretická m/z 349.3476) a $C_{23}H_{43}O^-$ (teoretická m/z 335.3319). Tieto fragmenty takisto neboli pozorované v korešponujúcich ASAP-MS/MS spektrách a sú predmetom ďalšieho skúmania. V ESI-MS/MS spektre štandardu hexakosanoátu aj extraktu osemenia L100 bol pozorovaný fragment s m/z 377.3781 odpovedajúci strate vody. Tento fragment ako už bolo uvedené vyššie bol pozorovaný aj v korešpondujúcich ASAP-MS/MS spektrách. Fragment s m/z 335 bol zároveň pozorovaný aj v ASAP-MS/MS spektre hexakosanoátu (Obrázok 45 a 46).

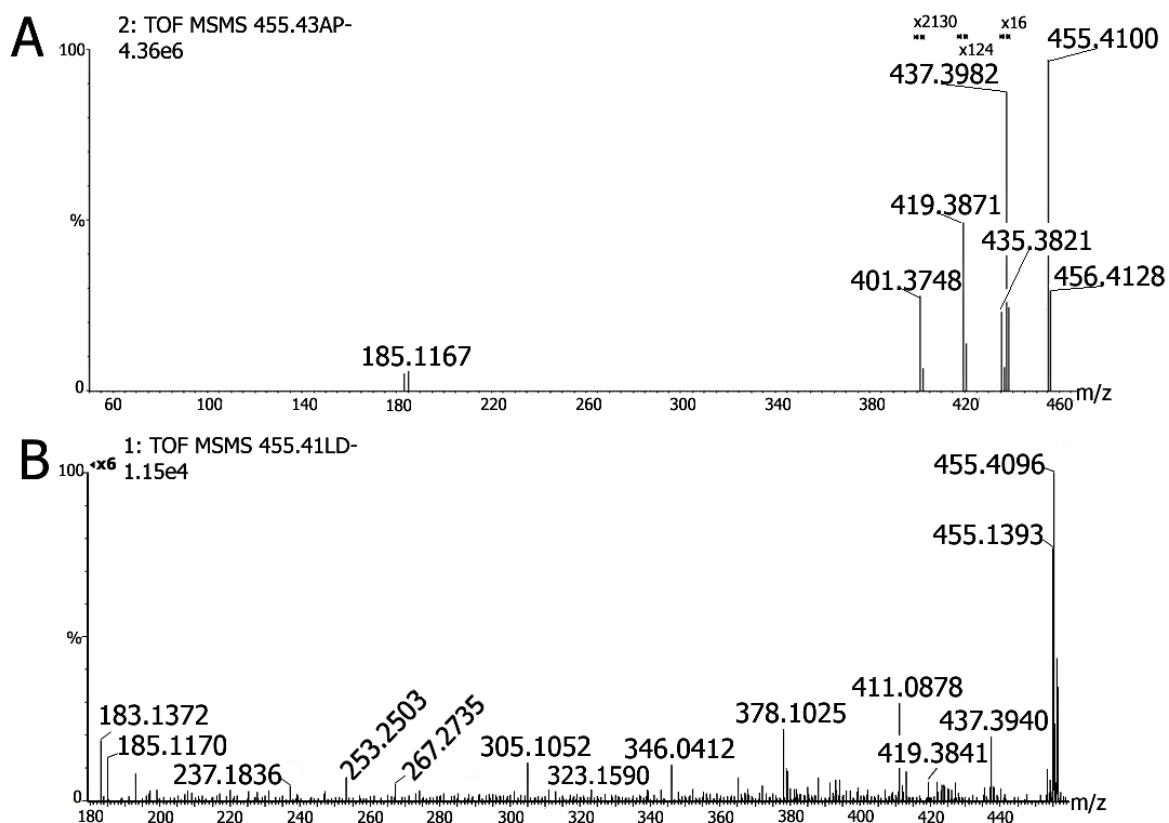
Obrázok 47. Fragmentačné spektrum hexakosanoátu z extraktu osemenia L100 (A), štandardu hexakosanoátu (B), oktakosanoátu z extraktu osemenia L100 (C) a štandardu oktakosanoátu (D) získaných technikou ESI-IMS-MS/MS(-).



Pri fragmentácii štandardu oktakosanoátu (Obrázok 47C-D) boli v jeho ESI-MS/MS spektre pozorované fragmenty s m/z 379.3929, ktorý odpovedá elementárnemu zloženiu $C_{26}H_{51}O^-$ hypoteticky vznikajúci v analogii k fragmentácii hexakosanoátu, následne fragment s m/z 405.4100 odpovedajúci strate molekuly vody a fragment s m/z 367.3547, ktorý pravdepodobne súvisí so skracovaním uhlíkového reťazca (vznik fragmentu s elementárnym zložením $C_{24}H_{47}O^-$). Obdobné fragmenty boli pozorované v MSMS spektre látky s m/z 423.42 nájdenej v extrakte osemenia L100. Pri porovnaní ASAP a ESI-MS/MS spektier týchto látok vidíme, že tieto techniky poskytujú rovnaké fragmenty (stratu vody), ale aj rozličné fragmenty (v dôsledku štiepenia uhlíkového reťazca). Ďalej bola študovaná fragmentácia hydroxylovaných mastných kyselín charakteristických pre dormantné osemenie JI64, ktoré boli diskutované v prvej experimentálnej časti práce. Pomocou ASAP-MS/MS(-) techniky bola na celých semenách genotypu JI64 prevedená aj fragmentácia dihydroxyoktakosanoátu (marker s m/z 455.41). Vzhľadom na to, že technika ASAP-MS poskytovala asi o dva rády vyššiu intenzitu tejto látky v MS spektre ako pri LDI-MS, bolo možné použiť tiež iónovo mobilnú separáciu na získanie čistého MS/MS spektra tohto markeru. ASAP-IMS-MS/MS(-) spektrum je na Obrázku 48A. V tomto spektre sú prítomné fragmenty odpovedajúce stratám jednej (fragment s m/z 437.3982), dvom (fragment s m/z 419.3871) a trom (fragment s m/z 401.3748)

molekulám vody. Pri fragmentácii v LDI-MS boli pozorované iba straty jednej a dvoch molekúl vody (signál fragmentu po troch strtách vody bol na úrovni šumu). Použitie IMS v LDI-MS/MS bolo limitované menšími signálmi pri ďalších hydroxylovaných mastných kyselinách všeobecne, preto boli ich MS/MS spektrá po mobilitej seprácii so slabými vyťažkami fragmentov (straty jednej a dvoch molekúl vody) a nie sú uvedené v práci. Na *Obrázku 48B* je pre porovnanie ukázané LDI-MS/MS(-) bez IMS separácie, v ktorom sú vidieť vyššie diskutované fragmenty (m/z 437.3940 a 419.3841) pre dihydroxyoktakoanoát, avšak aj množstvo ďalších interferujúcich signálov.

Obrázok 48. MS/MS spektrum dihydroxyoktakoanoátu z osemenia genotypu J164 získané technikou ASAP-IMS-MS/MS(-) (A) a LDI-MS/MS(-) (B).

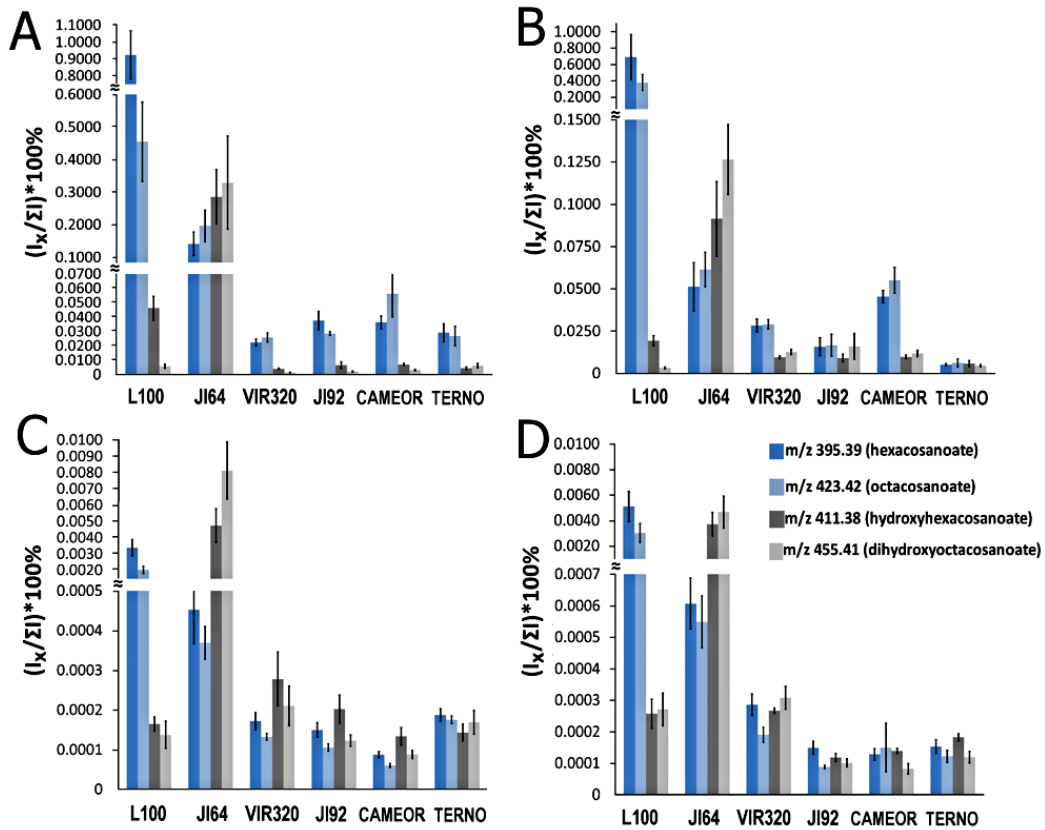


5.5 Porovnanie ASAP-MS a MALDI-MS

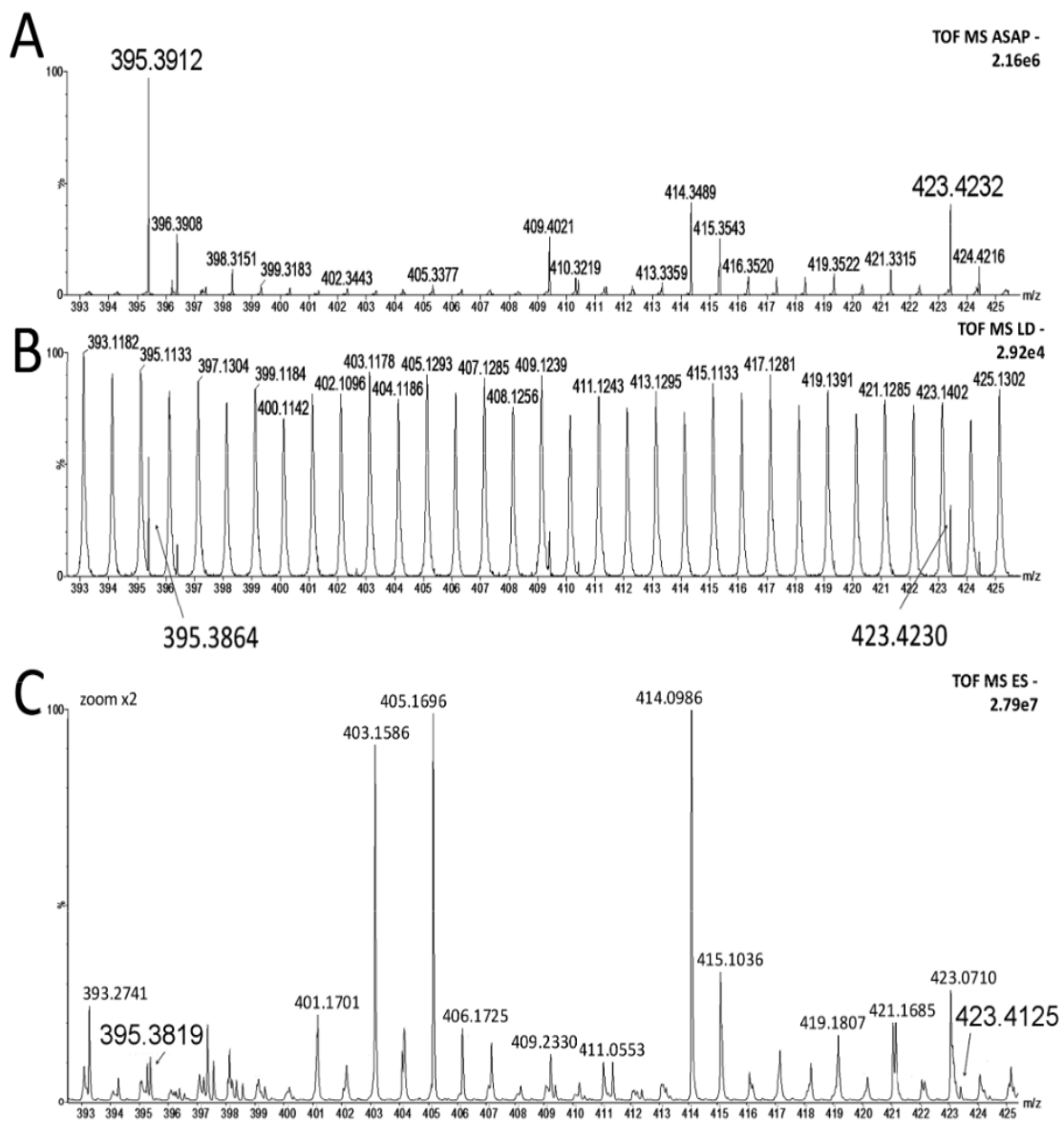
Na základe predchádzajúcich výsledkov bolo ukázané, že obe techniky môžu byť vhodným nástrojom na štúdium lipidických látok (tj. vyšších mastných kyselín) a pri priamej analýze povrchu semien hrachu siateho. Obe techniky umožnili nájdanie charakteristických biomarkerov s výskytom v dormantných osemeniach vybraných genotypov, konkrétne hydroxylovaných a nasýtených vyšších mastných kyselín. Pre porovnanie sa ukázalo vhodné intenzity markerov normalizovať na celkový iónový prúd (hodnota intenzity signálu daného markeru bola vydelená sumou všetkých signálov prítomných v spektre, TIC). Normalizované hodnoty mali lepšiu opakovateľnosť než samostatné absolútne hodnoty intenzít markerov. Umožňovali lepšiu porovnateľnosť medzi genotypmi a lepšie odrážali vzájomné rozdiely medzi jednotlivými markermi. *Obrázok 49* demonštruje normalizované signály vyššie spomenutých látok vo všetkých genotypoch hrachu siateho pomocou ASAP-MS merania a (MA)LDI-MS merania. Obe techniky poskytujú porovnateľné výsledky a to vyšší normalizovaný signál pre biomarkery typu vyšších mastných kyselín a hydroxylovaných vyšších mastných kyselín v dormantných genotypoch L100 a JI64 oproti nedormantným genotypom.

Výhodou techniky ASAP-MS s ohľadom na mastné kyseliny (meranie v negatívnom móde) je omnoho menšia prítomnosť matricových interferencií, ktoré sú pozorované v (MA)LDI a ESI-MS spektrách nachádzajúcich sa v tesnej blízkosti sledovaných biomarkerov (majúcu veľmi blízku hodnotu m/z). *Obrázok 50* ukazuje MS spektrá z troch ionizačných techník (ASAP, MALDI, ESI s priamym nadávkovaním vzorky) a interferencie signálu pochádzajúceho pravdepodobne z lignínových látok alebo cukorných derivátov s biomarkermi (kyselinou hexakosánovou a oktakosánovou) v osemeni L100. Viditeľné sú najmä interferujúce signály s m/z 395.11, 423.14 (v MALDI-MS) a s m/z 395.05 a 423.07 (ESI-MS). Prínosom techniky ASAP-MS je aj možnosť analyzovať povrch kompaktných semien priamo s ohľadom na lipidické látky. Na príklade vyšších matných kyselín je vidieť, že táto technika poskytuje vyšší signál v porovnaní s (MA)LDI-MS pre tieto látky, a preto sa dá, ako bolo ukázané vyššie, lepšie uplatniť na experimenty s iónovou mobilitou (skenovanie s aktívnou iónovou mobilitou – zapnutou mobilitnou celou vedie u študovaných látok ku znižovaniu intenzity 10-100x). Hlavnou výhodou MALDI-MS stále ostáva analýza cielene vybraného povrchu (vonkajší alebo vnútorný) a možnosť hmotnostno spektrometrického zobrazovania.

Obrázok 49. Porovnanie signálu nájdených biomarkerov v študovaných genotypoch hrachu siateho získaného v ASAP-MS a (MA)LDI-MS experimentoch (**A**- ASAP-MS celých semien, **B**- ASAP-MS vypreparovaných kúskov osemnia s veľkosťou 4 mm², **C**- LDI-MS, **D**- MALDI-MS (matrica: 5-aminochinolín); signály sú vyjadrené ako priemerná hodnota normalizovaných intenzít zo štyroch meraní).



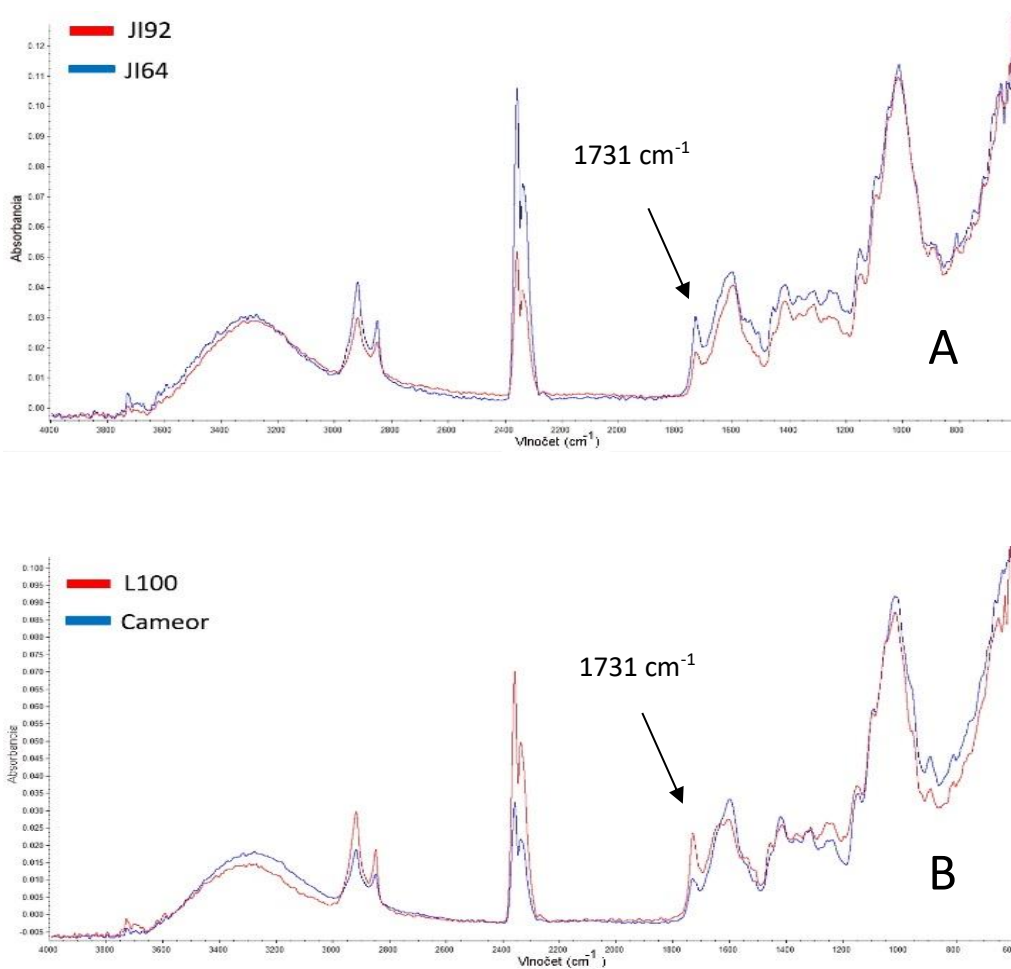
Obrázok 50. Porovnanie signálu interferujúcich látok a biomarkerov (kyseliny hexakosánovej a oktakošánovej) v troch ionizačných technikách: ASAP-MS (A), MALDI-MS (B), a ESI-MS (C). Spektá boli získané pri analýze osemenia L100 v negatívnom ionizačnom móde.



5.6 Analýza semien hrachu siateho pomocou ATR-FTIR

Povrch vybraných šiestich genotypov bol analyzovaný aj pomocou nedeštruktívnej techniky ATR-FTIR. Táto technika však neodhalila trendy v delení genotypov na základe ich dormancie ako ASAP alebo (MA)LDI-MS. ATR-FTIR zrejme nevykazuje dostatočnú selektivitu pre látky, ktoré sa nachádzajú v povrchových vrstvách osemenia hrachu siateho a môžu byť zodpovedné za fyzikálnu dormanciu semien. Za zaujímavé možno považovať, že dormantné genotypy JI64 a L100 mali v IR spektrách prítomný výrazný pík s vlnočtom 1731 cm^{-1} , ktorý poukazuje na prítomnosť karbonylovej skupiny oproti nedormantným genotypom JI92 a Cameoru (Obrázok 51). Na základe predchádzajúceho výskumu sa dajú uvažovať práve vyššie masné kyseliny v povrchových vrstvách osemenia JI64 a L100.

Obrázok 51. IR spektrá pre genotypy JI64 a JI92 (A) a L100 s Cameorom (B).

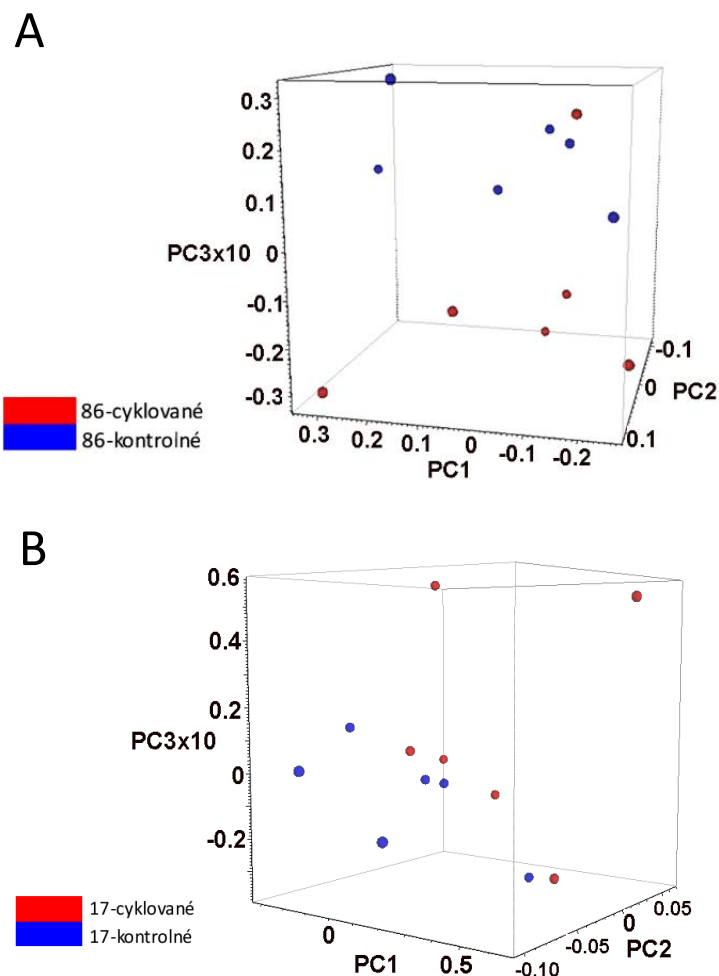


5.7 Štúdium chemických zmien v osemeni vplyvom teplotného cyklovania

V tejto kapitole sú zhrnuté pilotné výsledky týkajúce sa dvoch vybraných genotypov hrachu siateho podrobených teplotnému cyklovaniu (príprava rastlinného materiálu teplotným cyklovaním je popísaná v kapitole 4.3). Jedná sa o genotyp T14/5 (značený číselným kódom 86), u ktorého došlo po teplotnom cyklovaní k výraznému nárastu dormancie oproti kontrolným semenám (responzivita na klíčenie klesla o 90%). Druhým genotypom bol P016 (značený číselným kódom 17), ktorého responzivita na klíčenie vzrástla po teplotnom cyklovaní o 70% oproti jeho kontrolám. Tieto dva genotypy boli posudzované vždy vo vzťahu ku kontrolným semenám (semenám nezaťažovaným teplotným cyklovaním), nie medzi sebou. Chemické zmeny v osemeni pri vybraných vzorkách hrachu boli študované tromi technikami v nasledujúcom poradí: ATR-FTIR, LDI-MS a LC-ESI-MS. Na základe predchádzajúcich výsledkov je zrejmé, že prestup vody a plynov skrz osemenie je kľúčovým procesom pri klíčení a transport týchto látok skrz osemenie môže byť ovplyvnený zložením jeho povrchových vrstiev. Prvé dve zvolené techniky (ATR-FTIR a LDI-MS) boli teda zamerané na štúdium látok z povrchu osemenia a na nájdenie možných chemických zmien v týchto povrchových vrstvách po teplotnom cyklovaní. Technika LC-ESI-MS bola zvolená za účelom sledovania zmien v profile látok v celom osemeni (na povrchu i vo vnútri) po teplotnom cyklovaní v porovnaní s kontrolným materiálom.

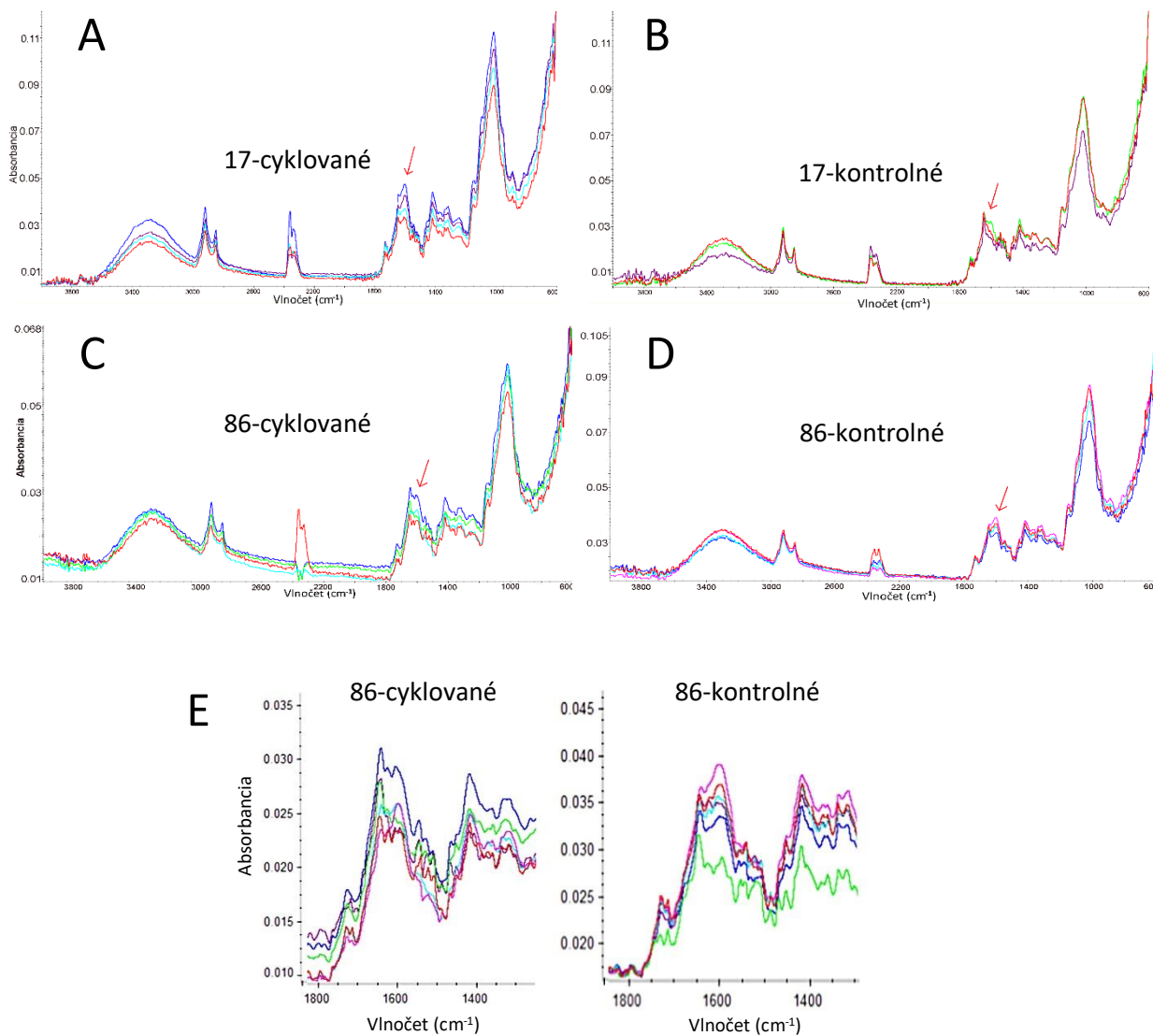
U dát získaných z techniky ATR-FTIR bolo preukázané, že v 3D PCA Score ploch dochádza k viditeľnej separácii genotypu s č. 86 s nadobudnutou dormanciou po teplotnom cyklovaní od kontrolných semienok rovnakého genotypu. Výnimkou bolo jedno meranie (jedno semeno) z 86-cyklovaného genotypu, ktoré sa dá považovať za odľahlé (signál v IR spektre bol na úrovni šumu). V prípade genotypu s číselným kódom 17 (u ktorého sa po teplotnom cyklovaní zvýšila miera klíčenia) bola separácia cyklovaných semien od ich kontrol menej výrazná. Avšak aj v tomto prípade bolo možné v 3D PCA ploch pozorovať delenie. Príslušné 3D PCA Score ploty sú ukázané na *Obrázku 52* pre obidva študované prípady. Dá sa konštatovať, že infračervená spektrometria dokáže odlíšiť vplyv teplotného cyklovania a môže teda do určitej miery reflektovať zmenu chemického profilu látok v povrchových vrstvách osemenia.

Obrázok 52. 3D Score ploty získané PCA analýzou dát z priameho merania povrchu osemenia teplotne cyklovaných semien technikou ATR-FTIR (A- genotyp 86 a jeho kontroly, B- genotyp 17 a jeho kontroly).



Pri detailnejšom pohľade do infračervených spektier boli pozorované rozdiely v páse s vlnčtom od 1650 do 1600 cm^{-1} (vyznačené šípkou na *Obrázku 53*). Zmeny vo výške tohto pásu môžu súvisieť so zmenami týkajúcimi sa lignínu, ktorého FT-IR charakterizácia je naznačená v práci od H. Yana a kol. (2009) zaoberajúca sa FT-IR mikrospektroskopiou osemenia bavlny²¹⁹. Vzhľadom k zložitej matici a malej selektivitě metódy je obtiažne identifikovať konkrétne látky a ich zmeny, ktoré by mohli byť dôsledkom cyklovania teploty a zároveň súvisieť aj s dormanciou semien, prípadne klíčením.

Obrázok 53. ATR-FTIR spektrá genotypu s číselným kódom 17 (A- po teplotnom cyklovaní, B- kontrolné semená) a s kódom 86 (C- po teplotnom cyklovaní, D- kontrolné semená). Výrez od 1800 do 1400 cm^{-1} pre genotyp 86 (E).



LDI-MS analýza bola prevedená v oboch ionizačných módoch. V negatívnom ionizačnom móde bola pozornosť sústredená hlavne na vyššie mastné kyseliny, ktoré však u týchto genotypov neboli preukázané. Znamená to teda, že nie všetky genotypy hrachu majú fyzikálnu dormanciu spojenú s vyššími mastnými kyselinami a mechanizmus prestupu vody skrz osemenie môže byť ovplyvnený aj inak. Na povrchu osemenia boli zachytené len bežné mastné kyseliny ako palmitová a olejová, ktoré nevykazovali odlišnosti z hľadiska intenzít medzi cyklovaným osemením a kontrolami.

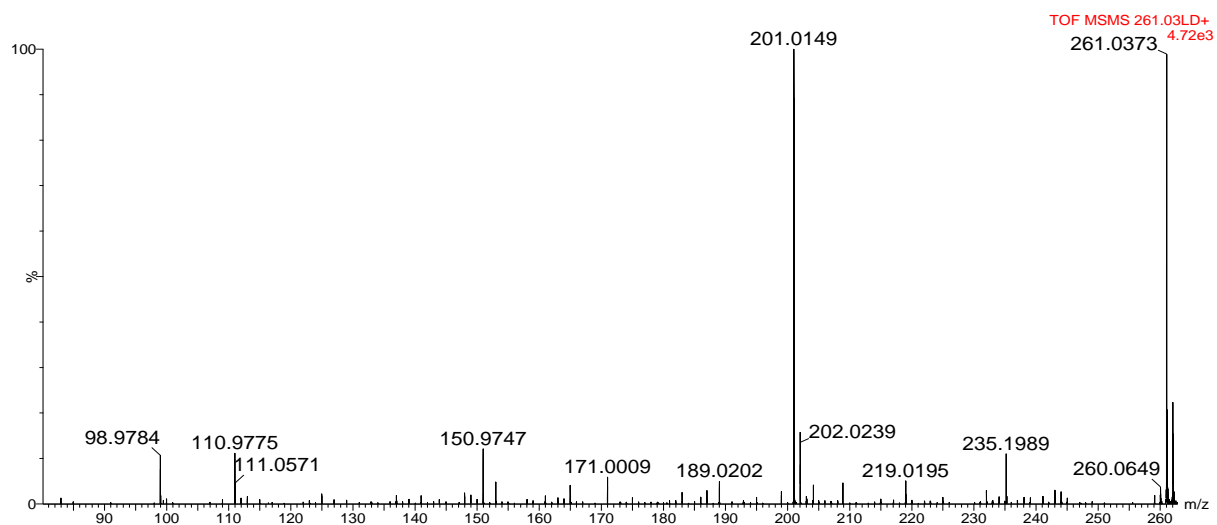
V kladnom ionizačnom móde boli obidva genotypy analogicky podrobené PCA a OPLS-DA analýze, kde dochádzalo k segregácii dát do dvoch skupín na cyklovaný genotyp a kontroly. Pri PCA analýze genotypu 86 a jeho kontrol bolo pomocou prvých troch hlavných komponent vysvetlených 44.36% variability a pri genotype 17 a jeho kontrolách bolo vysvetlených 56.52% variability.

V prípade genotypu 17 boli pomocou OPLS-DA nájdené markery charakteristické pre osemenie cyklovaného genotypu č. 17. Najsignifikantnejšie markery mali následovné m/z hodnoty: 295.1855, 261.0459, 393.1925, 333.1350, 415.1551 a 327.1928. V prípade genotypu 86 boli analogicky pomocou OPLS-DA nájdené markery charakteristické pre povrch cyklovaného genotypu 86. Medzi najsignifikantnejšie markery pre tento cyklovaný genotyp patrili hmoty s m/z 425.2732, 311.2868, 401.1494, 441.1851, 284.3249, 377.1681 a 399.1473. Medzi prvými 20-timi markermi cyklovaného genotypu 86 sa vyskytovala aj hmota s m/z 295.1855 (rovnaká ako u cyklovaného genotypu 17). Vzhľadom na to, že táto hmota vystupuje ako marker v obidvoch cyklovaných genotypoch, jej význam je z hľadiska zosilnenia/potlačenia dormancie diskutabilný. Zrejme sa jedná o hmotu charakteristickú pre proces teplotného cyklovania všeobecne bez ohľadu na reguláciu dormancie týchto semien po teplotnom cyklovaní.

V následných experimentoch sa podarilo čiastočne charakterizovať marker s hodnotou m/z 261.0373 (významný pre cyklovaný genotyp 17), ktorý bol v príslušnom osemení tiež fragmentovaný. Jeho LDI-MS/MS(+) spektrum je demonštrované na *Obrázku 54*. Jedná sa zrejme o fosforylovanú formu hexapyranózy, fosforylovanú formu alkoholického cukru (napr. inositolu), prípadne o formu draselnému aduktu acetylovaného derivátu hexapyranózy alebo ich zmes. Na prítomnosť fosfátu ukazuje signál s m/z 98,9784 odpovedajúci protonizovanej kyseline fosforečnej. V práci od F.F. Hsu a kol. (2003) sa autori zaoberali stanovením inositol monofosfátu pomocou ESI-MS(+) s fragmentačnými experimentami. Inositol monofosfát pozorovali ako [M+H]⁺ ión (m/z 261), ktorý poskytoval fragmenty s m/z 163, 145, 127, 109, 99 a 81 pochádzajúce z následných strát H₃PO₄, HPO₃ a H₂O²²⁰. V práci sú uvedené iba nominálne hodnoty m/z. Dá sa usudzovať, že fragment s m/z 99 odpovedá protonizovanej kyseline fosforečnej a je v zhode s našim fragmentom m/z 98.9784 vo fragmentačnom spektre na *Obrázku 54*. Odlišnosti vo fragmentačnom paterne budú plynúť z použitia odlišných ionizačných techník (LDI-MS oproti ESI-MS), ktoré môžu poskytovať odlišné

fragmentačné výťažky/patery (ako ostatne naznačujú aj vyššie diskutované rozdiely medzi LDI-, ASAP- a ESI-MS/MS spektrami). Dominantný signál s m/z 201.0149 v kolíznom spektre môže byť vysvetlený rozštiepením cukorného skeletu a odštiepením etén-1,2-diolu (a následne stabilizáciou prešmykom na oxalaldehyd). Na prítomnosť acetylu zasa ukazuje prítomnosť fragmentu s m/z 219.0195 (strata kyseliny octovej). Fosforylované hexapyranózy a inositol sú prítomné v rastlinnom materiáli²²¹⁻²²². U acetylovaných derivátov sa popisujú formy odvodené predovšetkým od polysacharidov s viacnásobnou acetyláciou na základnej stavebnej jednotke. Tieto deriváty sa však líšia v štruktúre v závislosti od druhu, buniek a ich vývinového štádia²²³. Indíciou pri navrhovaní štruktúry tohto markeru bol fragment s m/z 201.0149, ktorý sa v literatúre objavuje ako charakteristický fragment pre mnohé sacharidy²²⁴.

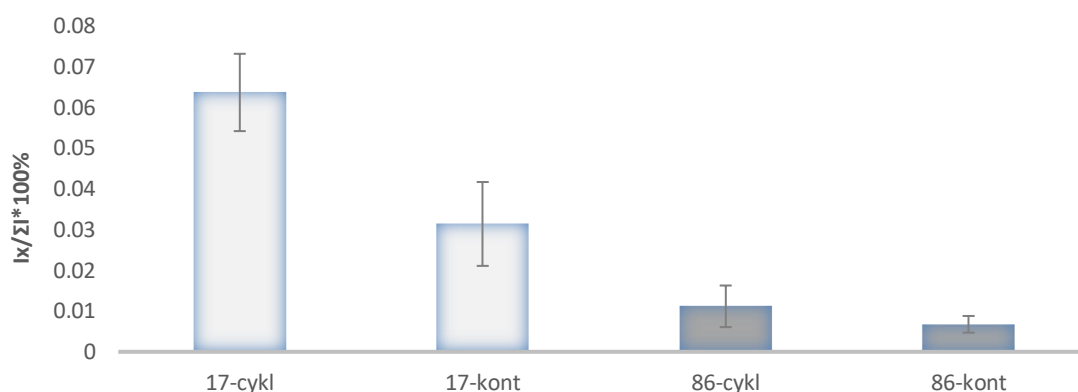
Obrázok 54. LDI-MS/MS(+) spektrum markeru s hodnotou m/z 261.0373 a jeho navrhnuté štruktúry. Fragmentačné spektrum bolo získané z osemenia genotypu 17 po teplotnom cyklovaní.



Intenzita markeru s m/z 261.04 bola normalizovaná na celkový iónový prúd pre obidva študované genotypy a ich kontroly. Z Obrázku 55 vyplýva, že jeho najvyššia intenzita je v cyklovanom genotype 17. Podstatne menšiu intenzitu má v kontrolných semenách genotypu 17. Jeho polárny charakter a jeho zvýšený "obsah" v genotype 17 po teplotnom cyklovaní by mohol súvisieť s ľahším prestupom vody skrz toto osemenie, čo by vysvetľovalo situáciu s intenzívnejším klíčením tohto genotypu po teplotnom cyklovaní. Obrázok 55 ukazuje taktiež intenzitu tohto markeru v genotype č. 86 a v jeho kontrolách, v ktorých je výrazne znížená. Jeho malé množstvo v

kontrolných osemeniach by mohlo súvisieť zase so zložitejším prestupom vody skrz osemenie. Túto hypotézu by podporoval aj fakt, že sa táto látka v genotypy 86 (dormantnom po teplotm cyklovaní) neprejavila s takou intenzitou signálu ako práve v genotypy č. 17.

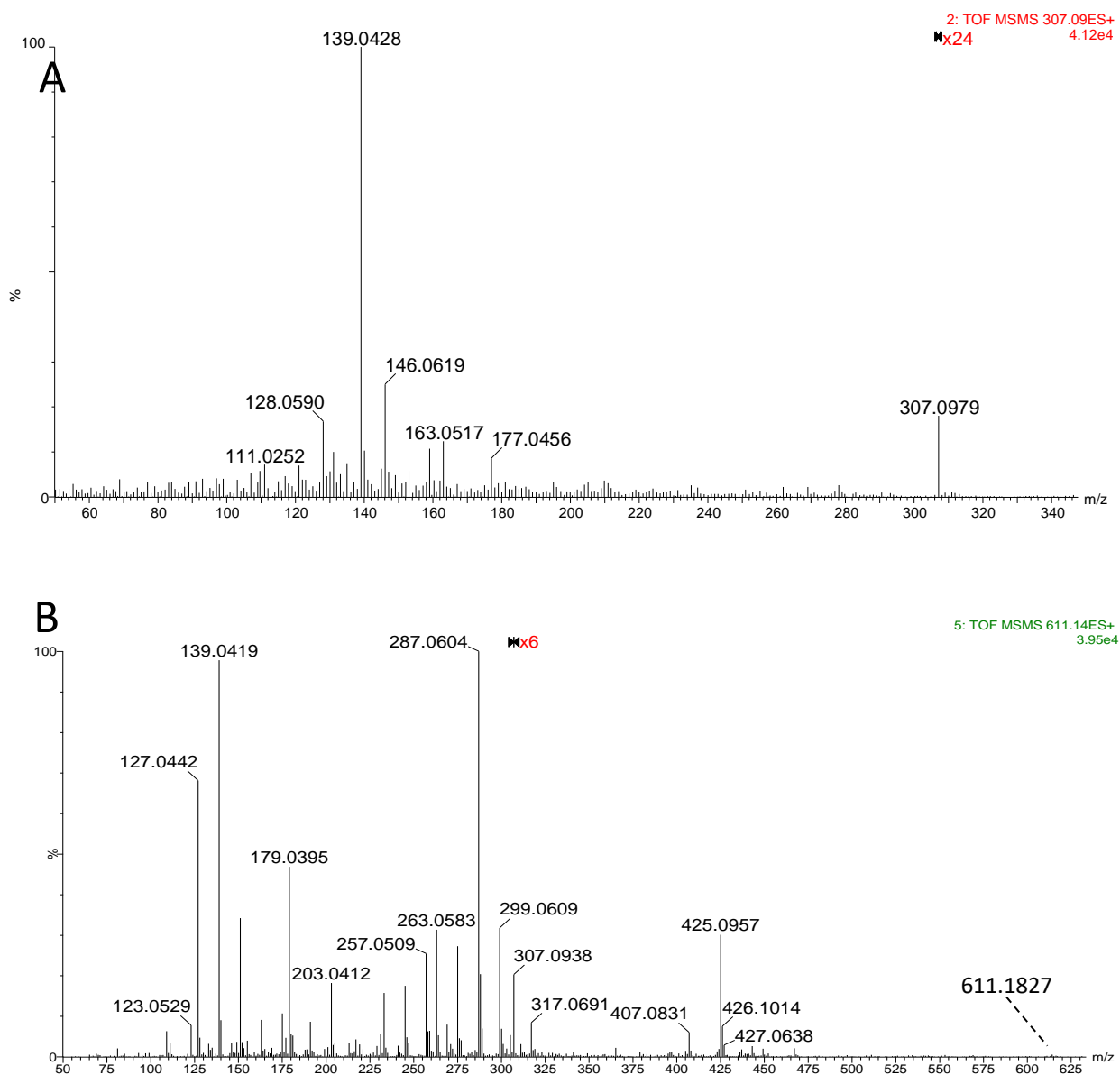
Obrázok 55. Normalizovaná intenzita markeru s hodnotou m/z 261.0373 na celkový iónový prúd pre obidva študované genotypy a ich kontroly.



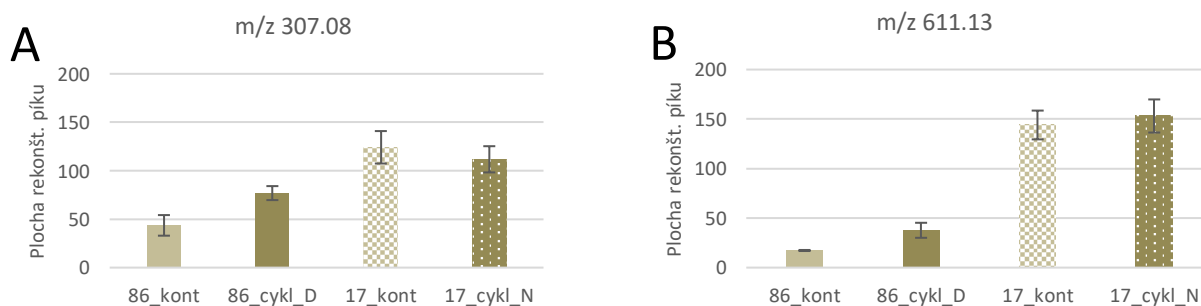
Tretí typ analýzy (LC/MS) bol zameraný na extrakty vybraných dvoch genotypov hrachu po teplotnom cyklovaní a ich kontrol. Za účelom extrakcie polárnejších a tiež menej polárných látok (vrátane fenolických látok) bola ako extrakčné činidlo použitá zmes acetónu a vody v pomere 70:30 (v/v). Získané extrakty boli analyzované s využitím LC/ESI-MS(+). Získané data boli hodnotené pomocou PCA a OPLS-DA analýzy. Pre obidva genotypy platilo, že cyklované semená boli v PCA plotu segregované od kontrolných semen. V prípade genotypu 86 bolo pomocou prvých dvoch hlavných komponent vysvetlených 95.36% variability dát a pre genotyp 17 90.7%. OPLS-DA ukázala, že medzi významné markery genotypu 86 po cyklovaní patria hmoty definované hodnotami retenčného času a m/z , teda $RT_{m/z}$, 1.52_307.0818 a 1.44_611.1339. U nedormantného genotypu 17 po cyklovaní tieto látky nepatrili medzi významné markery. Na základe vzniknutých fragmentov v kolíznom spektre im bola priradená štruktúra galokatechínu a diméru galokatechínu. V kolíznom spektre látky s m/z 307.0979 bol pozorovaný intenzívny fragment 139.0428, ktorý je spomenutý aj v literatúre pri fragmentácii galokatechínu. V kolíznom spektre látky 611.1827 sú pozorované fragmenty 425.0957, 307.0938, 287.0604, 179.0395, 139.0419 a 127.0442 a taktiež celý rad ďalších fragmentov s menšou intenzitou.

Fragment s m/z 425.0957 vzniká zrejme retro-Diels-Alderovým (RDA) štiepením aromatickej štruktúry na jednej galokatechínovej jednotke (stráta 186.09 Da z iontu s m/z 611.1827), fragment s m/z 307.0938 korešponduje so štruktúrou galokatechínu. Fragment s m/z 287.0604 vzniká z fragmentu s m/z 425.0957 pravdepodobne rozštiepením druhého heterocyklického kruhu a odštiepením postranného B-kruhu (s jedným metylom pochádzajúcim z tohto heterocyklického kruhu) za vzniku neutrálnej častice s elementárnym zložením $C_7H_6O_3$ (neutrálna stráta 138.04, dtm 26.1 ppm). Túto variantu podporuje aj prítomnosť komplementárneho iónu 139.0419 v kolíznom spektre. Fragment s m/z 179.0395 odpovedá štruktúre (s elementárnym zložením $C_9H_7O_4^+$) vznikajúcej po odštiepení aromatického kruhu "C" z galokatechínu (stráta 128.05 Da). Fragment s m/z 139.0419 vzniká RDA štiepením už samotného monoméru galokatechínu (charakteristická stráta 168.05 Da od hmoty s m/z 307.0938) a fragment s m/z 127.0442 odpovedá štruktúre s elementárnym zložením $C_6H_7O_3^+$. Štruktúry týchto fragmentov boli navrhnuté na základe práce venovanej fragmentácii týchto fenolických látok²¹⁸. Kolízne spektrá oboch markerov sú ukázané na *Obrázku 56*. Z hľadiska ich obsahu v každom type extraku boli rekonštruované chromatografické píky pre marker 307.08 a 611.13 zintegrované (zo štyroch meraní) a plocha píkov z chromatogramov rekonštruovaných pre m/z 307.08 a 611.13 bola vynesená do histogramov (*Obrázok 57*). Je vidieť, že obsah látok s m/z 307.08 a 611.13 vzrástol po teplotnom cyklovaní v genotype 86 oproti kontrole. Mnohé fenolické látky sú v literatúre popísané v súvislosti s dormanciou (v dormantných semenách sú prítomné vo väčších množstvách). Tieto markery by teda mohli ovplyvňovať fyzikálnu dormanciu po teplotnom cyklovaní u genotypu 86. Na druhej strane, v genotype 17 a v jeho kontrolách sa obsah týchto látok výrazne nezmenil.

Obrázok 56. MS/MS spektrum markeru s hodnotou m/z 307.08 (A) a 611.14 (B).

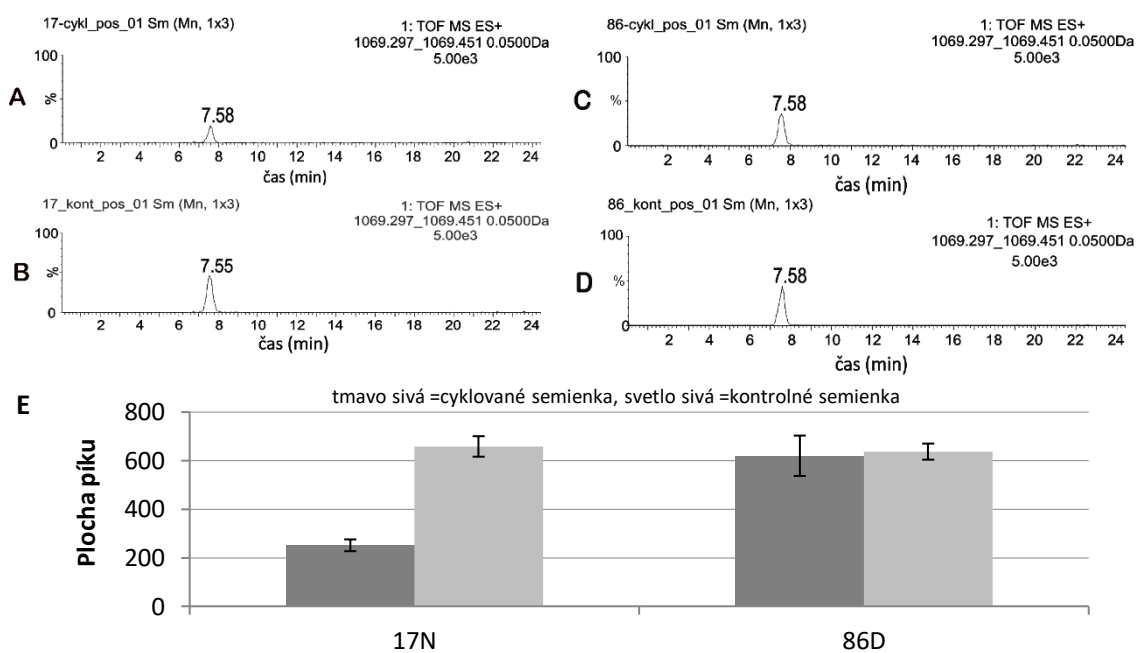


Obrázok 57. Plocha chromatografických píkov získaných z rekonštruovaných chromatogramov pre markery s hodnotou m/z 307.08 (A) a 611.14 (B).



Detailnejším porovnaním chromatogramov boli pozorované odlišnosti medzi študovanými genotypmi pre pík s retenčným časom v 7.6 minúte a m/z hodnotou 1069.56. V genotype 17 po teplotnom cyklovaní bolo pozorované asi o polovicu menšie množstvo tejto látky oproti kontrole. V dormantnom genotype 86 a v jeho kontrolách boli obsahy tejto látky podobné. *Obrázok 58* ukazuje rekonštruované chromatografické píky pre túto látku v oboch genotypoch a ich kontrolách a následne histogramy, ktoré odrážajú tento trend z troch meraní.

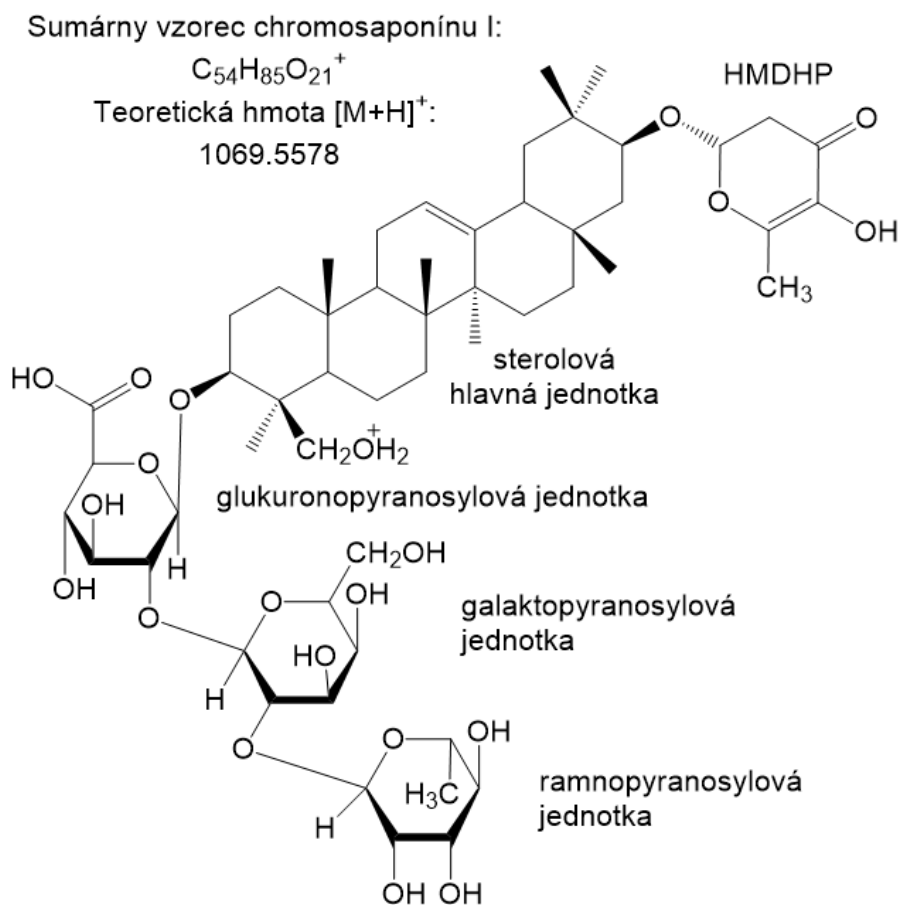
Obrázok 58. Rekonštruované chromatografické píky pre látku s m/z 1069.56 v genotype 17 (A-po cyklovaní, B-kontrola) a 86 (C- po cyklovaní, D- kontrola). Histogram s vynesenu plochou píku látky 1069.56 (E).



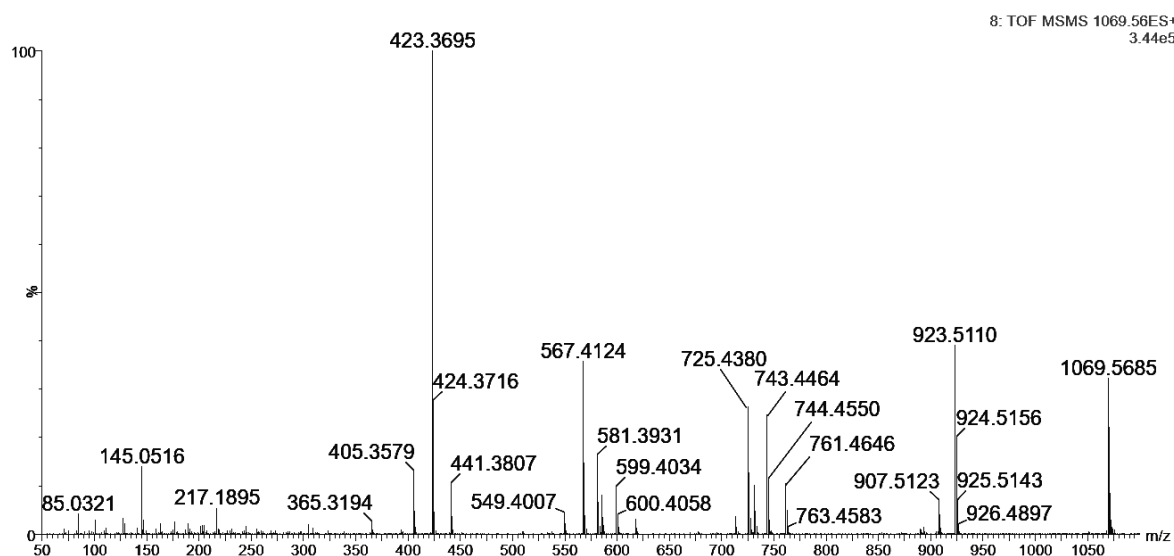
Na základe dát dostupných z literatúry bolo navrhnuté, že sa jedná o druh saponínu (konkrétne) chromosaponín I, ktorý sa podľa literatúry dá izolovať zo semien hrachu a ďalších strukovín²²⁵. Jeho štruktúra je znázornená na *Obrázku 59*. Chromosaponín I obsahuje na hlavnej sterolovej jednotke naviazaný veľmi polárny reťazec pozostávajúci z ramnopyranosylovej, galaktopyranosylovej a glukuronopyranosylovej štruktúry. Okrem toho, obsahuje aj naviazanú jednotku HMDHP (3-hydroxy-2-metyl-5,6-dihydro-pyran-4-ón). V získanom kolíznom spektre bolo pozorovaných mnoho fragmentov (*Obrázok 60*). Fragment s m/z 943.5110

predstavuje odštiepenie ramnopyranosylovej jednotky, stráta galaktopyranosylovej štruktúry je badateľná cez fragment s m/z 761.4646 a odštiepenie glukuronopyranosylovej jednotky je vidieť cez fragment s m/z 585.4247. V kolíznom spektre je následne vidieť tiež odštiepenie poslednej HMDHP štruktúry zo sterolovej hlavnej jednotky, a to cez fragmenty s m/z 441.3807 a 423.3695. Okrem týchto fragmentačných iónov sa dá v kolíznom spektre pozorovať mnoho fragmentov reprezentujúcich straty molekúl vody. Identické kolízne spektrum bolo získané zo saponínu izolovaného zo semien hrachu siateho v práci od Y.D. Daveby a kol. (1998)²²⁶. V tejto práci sa však nezameriavali na saponíny v osemení, ani ich možným významom z hľadiska dormancie.

Obrázok 59. Štruktúra chromosaponínu I.



Obrázok 60. MS/MS spektrum látky s m/z 1069.56 eluovanej v čase 7.58 min (použitá kolízna energia 20eV).



Biologická aktivita saponínov sa zvyčajne pripisuje amfipatickým vlastnostiam týchto molekúl, ktoré pozostávajú z hydrofóbnej triterpénovej alebo sterolovej hlavnej jednotky a hydrofilných cukornatých štruktúr. V literatúre je uvedené mnoho informácií od jejich funkciách v rastlinných pletivách. Boli popísané ako prírodné detergenty, majú antimikrobiálne a antifungálne účinky. Boli im pripísané tiež cytotoxické a hemolytické vlastnosti²²⁷.

Efekt saponínov v súvislosti s reguláciou dormancie semien je spomínaný v práci od U. Marchaima a kol. (1972), v ktorej autori sledovali ako saponíny vplývajú na klíčenie semien bavlny. V práci sa venovali aj premeabilite osemenia bavlny v súvislosti s týmito látkami. V experimente sledovali ako sa mení permeabilita osemenia pre vodu a kyslík po aplikácii saponínov na osemenie. Zistili, že semená ponorené do vody a do vody s malým prídavkom saponínov sa nelíšia v klíčení a teda paradoxne saponíny neovplyvňujú transport vody skrz osemenie. Klíčenie bolo rovnaké aj pri samotných embryách. V druhom prípade skúmali účinok kyslíka (umelo vytvorená kyslíkovaná atmosféra v utesennej banke, kde bol úbytok kyslíku sledovaný pomocou kyslíkovej elektródy) na klíčenie u kompaktných semien predtým ponorených do vody a do vody s prídavkom saponínov. Úbytok kyslíka bol o 60% menší v prípade semien ponorených do saponínov oproti semenám ponoreným do vody bez saponínov. Experiment bol analogicky zopakovaný aj so samotnými embryami bez semenných

obalov, kde bol zaznamenaný rovnaký úbytok kyslíka u embrii ponorenými do vody a do vody s prídavkom saponínov. Autori tejto práce formulovali na základe týchto výsledkov záver, že saponíny dokážu blokovať prestup kyslíka skrz osemenie bavlny, čím dochádza k blokáde klíčenia²²⁸. Vyššie uvedená práca teda podporuje hypotézu, že nízky obsah saponínov v genotype 17 súvisí s ľahším prestupom kyslíka skrz osemenie, čím sa uľahčí klíčenie týchto semien a genotyp sa stáva menej dormantným po teplotnom cyklovaní oproti svojim kontrolám. Pokles obsahu saponínov môže byť dôsledkom teplotného cyklovania. Malý pokles obsahu saponínov sa zrejme dá porozovať aj v prípade genotypu 86, dormantného po teplotnom cyklovaní (*Obrázok 58E*).

6. Záver

Táto dizertačná práca bola zameraná na metódy umožňujúce štúdium chemického zloženia povrchových vrstiev osemenia a analýzu látok, ktoré by mohli ovplyvňovať permeabilitu vody a plynov skrz rastlinné osemenie smerom k embryu vo vnútri semena. Transport vody a plynov skrz osemenie súvisí s fyzikálnym typom dormancie, ktorá hrá významnú úlohu u semien strukovín¹. Prehĺbenie poznatkov o látkach, ktoré by mohli ovplyvňovať dormanciu, má význam nielen pre základný výskum a biológiu, ale aj pre poľnohospodárstvo a potravinársky priemysel.

V experimentálnej časti boli vyvinuté metódy pre analýzu povrchov osemení hrachu využívajúce hmotnostnej spektrometrie s (matricou asistovanou) laserovou desorpciou/ionizáciou ((MA)LDI-MS) a s ionizáciou priamou sondou pre analýzu pevných látok za atmosferického tlaku (ASAP-MS). Bola prevedená optimalizácia experimentálnych parametrov a preštudované možnosti využitia iónovo mobilitej separácie pre identifikáciu látok. Tieto metódy boli aplikované na analýzu dormantných (divokých) semien druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* (genotypy JI64, VIR320, L100) a semien nedormantných (kultúrnych) hrachov *Pisum sativum* subsp. *sativum* (genotypy JI92, Cameor, Terno), ďalej v analýze RIL línií (rekombinantne krížených línií) hrachu siateho, získaných vzájomným krížením genotypov JI64 a JI92. Na štúdium distribúcie analytov na povrchu osemení bolo využité aj hmotnostno spektrometrické zobrazovanie. ASAP-MS bola na priamu analýzu povrchu rastlinného materiálu (tj. celých semien a vypreparovaných kúskov) použitá prvýkrát.

(MA)LDI-MS a ASAP-MS v kombinácii s viacrozmernou štatistikou, PCA a OPLS-DA, umožnili klasifikáciu (rozlíšenie) dormantných a nedormantných genotypov hrachu. Pre obe metódy je charakteristická minimálna úprava vzorky, čo prispieva k časovo menšej náročnosti celej analýzy. Semená môžu byť analyzované priamo v zrelom a suchom (neaktívnom) stave. V (MA)LDI-MS spektrách dormantných genotypov boli nájdené veľké rozdiely v rade signálov. Podrobná štúdia morfológicky podobných, ale z hľadiska dormancie silne odlišných genotypov, t.j. JI64 a JI92 a odvodených RIL línií ukázala významné rozdiely v obsahu hydroxylovaných mastných kyselín s dlhým reťazcom (HLFA, s počtom atómov uhlíka v reťazci od C26 do C28). Signifikantne vyššie signály hydroxylovaných mastných kyselín sa našli v dormantnej JI64 a v dormantných RIL líniách oproti nedormantným RIL líniám a genotypu JI92, čo

bolo potvrdené aj hmotnostne spektrometrickým zobrazovaním. MS zobrazovanie ďalej vizualizovalo homogénnu distribúciu HLFA na povrchu osemenia. Výnimkou na osemení boli miesta nazývané strofiola (hnedá škrvna pod hilom) a hilum (miesto úchyty semienka v struku), kde boli tieto signály HLFA výrazne nižšie. ASAP-MS (rovnako ako (MA)LDI-MS) sa v kombinácii s viacrozmernou štatistikou osvedčila na klasifikáciu genotypov a pri hľadaní markerov dormancie. Hexakosánová a oktakosánová kyselina boli navrhnuté ako dôležité markery, ktoré pravdepodobne ovplyvňujú transport vody cez osemenie v dormantnom genotype L100. Bolo zistené, že ASAP-MS poskytuje aj vyššiu selektivitu a lepší signál mastných kyselín v porovnaní s MALDI-MS, a dá sa využiť aj v semikvantitatívnej analýze týchto látok. Výsledky získané technikami (MA)LDI-MS a ASAP-MS sa navzájom podporujú. Obidve techniky predstavujú užitočný nástroj v priamej analýze rastlinného materiálu a umožňujú detailnú analýzu profilu mastných kyselín v povrchových vrstvách rastlinných pletív bez nutnosti extrakcie semena rozpúšťadlami, ktorá je pracná a môže byť zdrojom chýb (napr. vznikom nežiadúcich artefaktov, malým extrakčným výťažkom a podobne). Veľkou výhodou vyvinutej ASAP-MS techniky je možnosť analyzovať zloženie osemenia na celých kompaktných a neporušených semenách a teda bez ovplyvnenia spektier látkami z vnútorných častí semien.

V záverečnej časti dizertačnej práce je riešená problematika súvisiaca s objasnením možných chemických zmien, ktoré môžu nastať v osemení hrachu pri teplotom cyklovaní. Fluktuácia teplôt je v prírode bežným javom a niekoľko prací poukazuje na jej súvis s narušením dormancie. Pri štúdiu chemických zmien v cyklovaných semenách hrachu siateho boli použité metódy ATR-FTIR, LDI-MS a LC-MS a získané dátá boli porovnané s príslušnými kontrolnými semenami. Bolo zistené, že genotypy po teplotnom cyklovaní variujú v obsahu niektorých látok oproti svojim kontrolám. V genotype 86 bol detekovaný vyšší obsah galokatechínu a diméru galokatechínu po teplotnom cyklovaní. Pri genotype 17 bol po cyklovaní pozorovaný pokles obsahu saponínu (chromosaponínu I). Tieto látky sa môžu podieľať na regulácii dormancie u týchto semien.

Štúdie súvisiace s dormanciou semien hrachu siateho ďalej pokračujú a sú zamerané na charakterizáciu chemického zloženia, metabolitov a ich zmien v rámci vývojových štádií semien hrachu siateho (resp. ich osemenia) v troch pôvodných genotypoch (JI64, JI92, Cameor) a jedného nového dormantného genotypu (1794). Tieto metódy budú zároveň použité v analýze osemenia u iných druhov strukovín

(genotypov šošovice a cíceru) za účelom nájdania biomarkerov zodpovedných za fyzikálnu dormanciu v týchto semenách.

Zoznam skratiek

UV	univariantné škálovanie
FAO	Food and Agriculture Organization
USA	Spojené štáty americké
SPE	screen-printed electrode
DPV	diferenčne pulzná voltametria
AFM	mikroskopia atomárnych síl
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
AAS	atómová absorbčná spektrometria
ICP-AES	atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou
ICP-MS	hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou
F-AAS	atómová absorpčná spektrometria s plameňovou atomizáciou
GF-AAS	atómová absorpčná spektroskopia s elektrotermickou atomizáciou
XPS	Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia
XRF	Röntgenová fluorescenčná spektrometria
IR	infračervená spektroskopia
near-IR	infračervená spektroskopia v blízkej oblasti
mid-IR	infračervená spektroskopia v strednej oblasti
ATR	technika zoslabenej totálnej reflektancie
NIR	infračervená spektroskopia v blízkej oblasti
FTIRM	infračervená mikrospektroskopia
FTIRI	infračervená zobrazovacia spektroskopia
CRM	konfokálna Ramanova mikrospektroskopia
CARS	coherentná anti-stokesovská Ramanová rozptylová mikrospektroskopia
SRS	stimulovaná Ramanova rozptylová mikrospektroskopia
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
MRI	zobrazovacia magnetická rezonancia
MS	hmotnostná spektrometria
MSI	hmotnostne spektrometrické zobrazovanie
LDI-MS	hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou/ionizáciou
MALDI-MS	hmotnostná spektrometria s matricou asistovanou laserovou desorpciou/ionizáciou
SIMS	hmotnostná spektrometrie sekundárnych iónov
DESI-MS	hmotnostná spektrometria s ionizáciou desorpčným elektrosprejom
LAESI-MS	kombinácia laserovej ablácie s elektrosprejom
GALDI-MS	hmotnostná spektrometria laserovou ionizáciou s použitím koloidného grafitu
NALDI-MS	hmotnostná spektrometria s nanočasticami asistovanou laserovou desorpciou/ionizáciou
SALDI-MS	hmotnostná spektrometria s povrchovo asistovanou laserovou desorpciou/ionizáciou

AP	atmosferický tlak
GC-FID	plynová chromatografia s plameňovou ionizáciou
GC-MS	plynová chromatografia s hmotnostnospektrometrickou detekciou
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UV/Vis	ultrafialová/viditeľná oblasť
DART-MS	priama analýza v hmotnostnej spektrometrii v reálnom čase
LA	laserová ablácia
ASAP-MS	hmotnostná spektrometria s ionizáciou priamou sondou za atmosferického tlaku
UPLC	ultraúčinná kvapalinová chromatografia
THAP	2',4',6'-trihydroxyacetofenón monohydrát
AQ	4-aminochinolín
Q-TOF	kombinácia kvadrupólu a detektoru doby letu
PDA	detektor s diodovým poľom
SMODCH	smerodatná odchylka
PTFE	Polytetrafluóretylén
ND	neutral density
MF	mobilná fáza
PCA	analýza hlavných komponent
OPLS-DA	diskriminačná analýza ortogonálnych projekcií do latentných štruktúr
SEM	skenovacia elektrónová mikroskopia
RIL	rekombinantne krížené línie
S/N	pomer signál/šum
HMDHP	3-hydroxy-2-metyl-5,6-dihydro-pyran-4-ón
HLFA	hydroxylované masťné kyseliny
dt	driftový čas
dtm	odchýlka
S/N	signál/šum

Referencie

1. P. Smýkal, V. Vernoud, M. W. Blair, A. Soukup, R. D. Thompson: *Front. Plant Sci.* 30, DOI:10.3389/fpls.2014.00351 (2014).
2. C. M. J. Pieterse, M. Dicke: *Trends Plant Sci.* 12(12), 564-569, DOI:10.1016/j.tplants.2007.09.004 (2007).
3. X. Liu, K. Vrieling, P.G.L. Klinkhamer: *Front Plant Sci.* 8, 903, DOI:10.3389/fpls.2017.00903, (2017).
4. G. A. Boeckler, J. Gershenzon, S. B. Unsicker: *Phytochemistry* 72(13), 1497-1509, DOI:10.1016/j.phytochem.2011.01.038 (2011).
5. A. Mithofer, W. Boland: *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 431–450, DOI:10.1146/annurev-arplant-042110-103854 (2012).
6. Y.Naggar, M. Ghorab, K. Mohamed: *Am. J. Sci.* 5(1), 7-10, DOI:10.11648/j.ajls.20170501.12 (2017).
7. F. Beran, T. G. Köllner, J. Gershenzon: *New Phytologist* 23, 52-67, DOI:10.1111/nph.15718 (2019).
8. F. Chen, D. Ro, J. Petri, J. Gershenzon, J. Bohlmann, E. Pichersky, D. Tholl: *Plant Physiol.* 135, 1956-1966, DOI: 10.1104/pp.104.044388 (2004).
9. A. Otto, V. Wilde: *Bot. Rev.* 67, 141-238, DOI:10.1007/BF02858076 (2001).
10. B. R. Simoneit: *Mass Spectrom. Rev.* 24, 719-765, DOI:10.1002/mas.20036 (2004).
11. D. E. G. Briggs, R. P. Evershed, M. J. Lockheart: *Biomol. Paleontol.* 26, 169-193, DOI:10.1666/0094-8373(2000)26169:TBPOCF.2.0.CO;2 (2000).
12. R. Singh: *J. Med. Plant. Stud.* 4(2), 90-93 (2016).
13. S. Sturm, M. Ganzera: *J. Pharm. Biomed. Sci.* 147, 211-233, DOI:10.1016/j.jpba.2017.07.038 (2018).
14. F. A. Tomás-Barberán: *Phytochem. Anal.* 6(4), 177-192, DOI:10.1002/pca.2800060402 (1995).
15. R. O. Couto, E.S. Gil: *Rev. Braz. Pharmacog.* 23(3), 542-558, DOI: 10.1590/S0102-695X2013005000031 (2013).
16. A. Doménech-Carbó, A. M. Ibars, J. Prieto-Mossi, E. Estrelles, F. Scholz, G. Cebrián-Torrejóna, M. Martini: *New J. Chem.* 39, 7421-7428, DOI:10.1039/C5NJ01233C (2015).
17. G.Cebrián-Torrejón, A. Doménech-Carbó, B. Figadère, E. Poupon, A. Fournet: *Phytochem. Anal.* 28, 171-175, DOI:10.1002/pca.2657 (2017).
18. L.Fua, Y.Zheng, P.Zhangc, H.Zhanga, M.Wua, H.Zhanga, A.Wang, W.Sua, F.Chena, J.Yue, W.Cai, Ch. Lin: *Bioelektrochemistry* 129, 199-205, DOI: 10.1016/j.bioelechem.2019.06.001 (2019).
19. Y.Zeng, M. E Himmel, S. Ding: *Biotechnol. Biofuels* 10:263, DOI:10.1186/s13068-017-0953-3 (2017).

20. S.Digiuni, A. Berne-Dedieu, C. Martinez-Torres, J. Szecsi, M. Bendahmane, A. Arneodo, F. Argoul: *Biophys. J.* 108,(9), 2235-2248, DOI:10.1016/j.bpj.2015.02.024 (2015).
21. K. Radotić, Ch. Roduit, J. Simonović, P. Hornitschek, Ch. Fankhauser, D. Mutavdžić, G. Steinbach, G. Dietler, S. Kasas: *Biophys. J.* 103 (3), 386-394, DOI:10.1016/j.bpj.2012.06.046 (2012).
22. L.Kozlova, A. Petrova, B. Ananchenko, T. Gorshkova: *Plants* 8(6), 172, DOI:10.3390/plants8060172 (2019).
23. A. L. N. Bhandari: *North American Academic Research* 1(2) 94-113 (2018).
24. C. W. Huck, S. Türker-Kaya: *Molecules* 22, 168, DOI:10.3390/molecules22010168 (2017).
25. A. Mir-Marqués, M. Martínez-García, S. Garrigues, M. L. Cervera, M. Guardia: *Food Chem.* 196, 1023-1030, DOI:10.1016/j.foodchem.2015.10.048 (2016).
26. F. J. Warren, B. B. Perston, S.P. Galindez-Najera, C.H. Edwards, P.O. Powell, G. Mandalari, G.M. Campbell, P.J. Butterworth, P.R. Ellis: *Plant J.* 84, 634-646, DOI:10.1111/tpj.13031 (2015).
27. A. M. Smith-Moritz et al.: *Front. Plant Sci.* 6, 628, DOI:10.3389/fpls.2015.00628 (2015).
28. S. Dinant, N. Wolff, F. De Marco, F. Vilaine, L. Gissot, E. Aubry, C. Sandt, C. Bellini, R. Le Hir: *bioRxiv*, DOI: 10.1101/343343 (2019).
29. A. Gorzsás, H. Stenlund, P. Persson, J. Trygg, B. Sundberg: *Plant J.* 66(5), 903-914, DOI:10.1111/j.1365-313X.2011.04542.x (2011).
30. D. Öhman, B. Demedts, M. Kumar, L. Gerber, A. Gorzsás, G. Goeminne, M. Hedenström, B. Ellis, W. Boerjan, B. Sundberg: *Plant J.* 73(1), 63-76, DOI:10.1111/tpj.12018 (2013).
31. J. Vongsvivut, D. Pérez-Guaita, B. R. Wood, P. Heraud, K. Khambatta, D. Hartnell, M. J. Hackett, M. J. Tobin: *Analyst* 144, 3226-3238, DOI: 10.1039/C8AN01543K (2019).
32. E. Silvester, A. R. Klein, K. L. Whitworth, L. Puskar, M. J. Tobin: *Environ. Chem.* 15(8) 513-521 DOI:10.1071/EN18120 (2018).
33. I. R. Willick, D. Takahashi, D. B. Fowler, M. Uemura, K. K. Tanino: *J. Exp. Bot.* 69(5), 1221–1234, DOI:10.1093/jxb/erx450 (2018).
34. W. Azuma, S. Nakashima, E. Yamakita, H. R. Ishii, K. Kuroda: *Tree Physiol.* 37 (10), 1367-1378, DOI: 10.1093/treephys/tpx085 (2017).
35. D. Medas, G. De Giudici, C. Pusceddu, M. A. Casu, G. Birarda, L. Vaccari, A. Gianoncelli, C. Meneghini: *J. Hazard. Mater.* 370, 98-107, DOI:10.1016/j.jhazmat.2017.08.031 (2019).
36. H. J. Butler, S. Adams, M. R. McAinsh, F. L. Martin: *Vib. Spectrosc.* 90, 45-55, DOI:10.1016/j.vibspec.2017.03.004 (2017).
37. P. Roongsattham, F. Morcillo, K. Fooyontphanich, Ch. Jantasuriyarat, S. Tragoonrung, P. Amblard, M. Collin, G. Mouille, J.-L. Verdeil, T. J. Tranbarger: *Front. Plant Sci.* 1, 540, DOI: 10.3389/fpls.2016.00540 (2016).
38. P. Yu, Y. Lei, H. Hu, H. Deng, W. Zhang: *Spectrochimica Acta Part A: Spectrochim. Acta A Mol.* 213, 330-336, DOI:10.1016/j.saa.2019.01.064 (2019).

39. P. Yu, H. Block, Z. Niu, K. Doiron: *J. Synchrotron Rad.* 14, 382-390, DOI:10.1107/S0909049507014264 (2007).
40. P. Yu: *Infrared Phys. Technol.* 51, 473-481, DOI:10.1016/j.infrared.2007.12.028 (2008).
41. C. M. Rico, J. R. Peralta-Videa, J. L. Gardea-Torresdey: *Appl. Spectrosc.* 69 (2), 287-295, DOI: 10.1366/14-07495 (2015).
42. C. Cao, Z. Yang, L. Han, X. Jiang, G. Ji: *Cellulose* 22 (1), 139-149, DOI:10.1007/s10570-014-0525-7 (2015).
43. J. Chen, S. Sun, Q. Zhou: *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (29), 9385-9400, DOI:10.1007/s00216-013-7366-3 (2013).
44. J. Jiang, Y. Shao, A. Li, Y. Zhang, C. Wei, Y. Wang: *J. Sci. Food Agric.* 93, 1898–1902, DOI:10.1002/jsfa.5986 (2013).
45. J. L. Kerr, D. S. Baldwin, M. J. Tobin, L. Puskar, P. Kappen, G. N. Rees, E. Silvester: *PLOS ONE* 8(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0060857 (2013).
46. Y. Wang: *Plant Omics* 5(6), 508-513 (2012).
47. H. Yan, Z. Hua, G. Qian, M. Wang, G. Du, Jian Chen: *Cellulose* 16 (6), 1099-1107, DOI:10.1007/s10570-009-9349-2 (2009).
48. P. Yu: *J. Synchrotron Rad.* 18, 790–801, DOI:10.1107/S0909049511023727 (2011).
49. Y. Zhao, Y. Man, J. Wen, Y. Guo, J. Lin: *Trends Plant Sci.* 24 (9), 867-878, DOI:10.1016/j.tplants.2019.05.009 (2019).
50. H. Wu, Y. Luo, Ch. Hou, D. Huo, W. Wang, J. Zhao, Y. Lei: *Talanta* 200, 84-90, DOI:10.1016/j.talanta.2019.03.004 (2019).
51. U. P. Agarwal: *Molecules* 24, 1659, DOI:10.3390/molecules24091659 (2019).
52. H. Schulz, M. Baranska, R. Baranski: *Biopolymers* 77, 212-221, DOI: 10.1002/bip.20215 (2005).
53. B. Schrader, H.H. Klump, K. Schenzel, H. Schulzd: *J. Mol. Struct.* 509, 201-212, DOI: 10.1016/S0022-2860(99)00221-5 (1999).
54. V. E. de Oliveira, H. V. Castro, H. G. M. Edwards, L. F. C. de Oliveira: *J. Raman Spectrosc.* 41, 642-650, DOI 10.1002/jrs.2493 (2010).
55. L. Sanchez, Ch. Farber, J. Lei, K. Zhu-Salzman, D. Kourouski: *Anal. Chem.* 91(3), 1733-1737, DOI:10.1021/acs.analchem.8b05555 (2019).
56. G. Yang, Q. Wang, Ch. Liu, X. Wang, S. Fan, W. Huang: *Spectrochim. Acta A Mol.* 200, 186-194, DOI:10.1016/j.saa.2018.04.026 (2018).
57. S. H. Ji, S. H. Ki, M. H. Kang, J. S. Choi, Y. Park, J. Oh, S. B. Kim, S. J. Yoo, E. H. Choi, G. Park: *J. Phys. D Appl. Phys.* 51(14), DOI: 10.1088/1361-6463/aab2a2 (2018).
58. A. Ambrose, S. Lohumi, W.-H. Lee, B. K. Cho: *Sens. Actuators B Chem.* 224, 500-506, DOI:10.1016/j.snb.2015.10.082 (2016).
59. Ch. Krafft, C. Cervellati, Ch. Paetz, B. Schneider, J. Popp: *Appl. Spectrosc.* 66 (6), 644-649, DOI:10.1366/11-06521 (2012).

60. N. Gierlinger, T. Keplinger, M. Harrington: *Nat. Protoc.* 7(9), 1694-708, DOI:10.1038/nprot.2012.092 (2012).
61. M. Rys, M. Szalaniec, A. Skoczowski, I. Stawoska, A. Janeczko: *Open Chem.* 13, 1091-1100, DOI:10.1515/chem-2015-0121 (2015).
62. B. Kolozsvari, S. Firth, A. Saiardi: *Mol. Plant* 8 (5) 826-828, DOI:10.1016/j.molp.2015.01.015 (2015).
63. S. Reitzenstein, P. Rösch, M. A. Strehle, D. Berg, M. Baranska, H. Schulz, E. Rudloff, J. Popp: *J. Raman Spectrosc.* 38, 301 – 308, DOI: 10.1002/jrs.1643 (2007).
64. H. Lee, M. S. Kim, J. Qin, E. Park, Y.-R. Song, Ch.-S. Oh, B.-K. Cho: *Sensors* 17(10), 2188, DOI:10.3390/s17102188 (2017).
65. T. A. Ratnikova, R. Podila, A. M. Rao, A. G. Taylor: *Sci. World J.* DOI:10.1155/2015/419215 (2015).
66. K. L. Colson, J. Yuk, M. A. Markus, P. M. Le: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/NMR/brochures/Plant_Extracts_apps_T153287.pdf (prístup 21.6.2020).
67. T.W.J. Scheenen, D. van Dusschoten, P.A. de Jager, H. Van As: *J. Exp. Bot.* 51(351), 1751-1759, DOI: 10.1093/jexbot/51.351.1751 (2000).
68. W. Köckenberger, C. De Panfilis, D. Santoro, P. Dahiya, S. Rawsthorne: *J. Microsc.* 214(2), 182-189, DOI: 10.1111/j.0022-2720.2004.01351.x (2004).
69. P. Mazzei, V. Cozzolino, A. Piccolo: *J. Agric. Food Chem.* 66(11), 2580–2588, DOI:10.1021/acs.jafc.7b04340 (2018).
70. R. Sidi-Boulenouar, M. Cardoso, Ch. Coillot, S. Rousset, E. Nativel, A. Charbit, Ch. Baptiste, E. Alibert, F. Gatineau, J.-L. Verdeil, Ch. Goze-Bac: *Magn. Reson. Chem.* 57 (9), 749-759, DOI: 10.1002/mrc.4905 (2019).
71. L. Van Der Weerd, M. M. A. E. Cleassens, C. Efdé, H. Van As: *Plant Cell Environ.* 25, 1539 – 1549, DOI:10.1046/j.1365-3040.2002.00934.x (2002).
72. T.W.J. Scheenen, F.J. Vergeldt, A.M. Heemskerk, H. Van As: *Plant Physiol.* 144, 1157-1165, DOI:10.1104/pp.106.089250 (2007).
73. B. A. Boughton, D. Thinakaran, D. Sarabia, A. Bacic, U. Roessner: *Phytochem. Rev.* 15, 445–488, DOI:10.1007/s11101-015-9440-2 (2016).
74. S. G. Musharraf, A. Ali, M. I. Choudhary, A. Rahman: *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 25 (4), 530-537, DOI: 10.1007/s13361-013-0812-9 (2014).
75. A. S. R. Shroff: *Anal. Chem.* 81(19), 7954-7959, DOI:10.1021/ac901048z (2009).
76. T. Ozawa, I. Osaka, S. Hamada, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki, R. Arakawa: *Anal. Sci.* 32(5), 587-591, DOI: 10.2116/analsci.32.587 (2016).
77. D. Parrot, S. Papazian, D. Foil, D. Tasdemir: *Planta Med.* 54, 584-593, DOI:10.1055/s-0044-100188 (2018).
78. D. W. Etalo, R. C. H. De Vos, M. H. A. J. Joosten, R. D. Hall: *Plant Physiol.* 169, 1424-1435, DOI:10.1104/pp.15.01176 (2015).

79. G. Petroselli, T. L. Parapugna, M. G. Lagorio, R. Erra-Balsells: *J. Mass Spectrom.* 54, 195–203, DOI:10.1002/jms.4324 (2019).
80. J. Pavlov, A. B. Attygalle: *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 30 (5), 806-813, DOI:10.1021/jasms.8b05992 (2019).
81. P. Lorkiewicz, M. C. Yappert: *Anal. Chem.* 81(16), 6596-6603, DOI: 10.1021/ac9001113 (2009).
82. N. A. dos Santos, L. M. de Souza, F. E. Pinto, C. de J. Macrino, C. M. de Almeida, B. B. Merlo, P. R. Filgueiras, R. S. Ortiz, R. Mohana-Borgese, W. Romão: *Anal. Methods* 11(13), 1757-1764, DOI: 10.1039/c9ay00226j (2019).
83. B. Plancot, G. Vanier, F. Maire, M. Bardor, P. Lerouge, J. M. Farrant, J. Moore, A. Driouich, M. Vicré-Gibouin, C. Afonso, C. Loutelier-Bourhis: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28, 908–916, DOI: 10.1002/rcm.6859 (2014).
84. D. C. Perdian, G. M. Schieffer, R. S. Houk: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (4), 397-402, DOI:10.1002/rcm.4405 (2010).
85. R. L. Hansen, M. E. Dueñas, Y. J. Lee: *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 30(2), 299-308, DOI:0.1007/s13361-018-2081-0 (2019).
86. D. Šamec, V. Pierz, N. Srividya, M. Wüst, B. M. Lange: *Front. Plant Sci.* 10, 868, DOI:10.3389/fpls.2019.00868 (2019).
87. X.-L. Pei, Y.-Y. Huang, C. Gong, X. Xu: *Chinese J. Anal. Chem.* 45 (8), 1155-1163, DOI:10.1016/S1872-2040(17)61031-4 (2017).
88. A. M. Heskes, T.C.M. Sundram, B.A. Boughton, N. B. Jensen, N. L. Hansen, Ch. Crocoll, F. Cozzi, S. Rasmussen, B. Hamberger, B. Hamberger, D. Staerk, B. L. Møller, I. Pateraki: *Plant J.* 93(5), 943-958, DOI:10.1111/tpj.13822 (2018).
89. M. E. Dueñas, L. Carlucci, Y. J. Lee: *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 27(9), 1575-1578, DOI:10.1007/s13361-016-1422-0 (2018).
90. L. Huang, X. Tang, W. Zhang, R. Jiang, D. Chen, J. Zhang, H. Zhong: *Sci. rep.* 6, 24164, DOI: 10.1038/srep24164 (2016).
91. S. P. Annangudi, K. Myung, C. A. Adame, J. R. Gilbert: *Environ. Sci. Technol.* 49 (9), 5579-5583, DOI: 10.1021/es506334y (2015).
92. A. R. Korte, M. D. Yandean-Nelson, B. J. Nikolau, Y. J. Lee: *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(8), 2301-2309, DOI: 10.1007/s00216-015-8460-5 (2015).
93. A. R. Korte, Y. J. Lee: *J. Mass Spectrom.* 49(8), 737-741, DOI: 10.1002/jms.3400 (2014).
94. A. K. Mullen, M. R. Clench, S. Crosland, K. R. Sharples: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19(18), 2507–2516, DOI: 10.1002/rcm.2078 (2005).
95. T. Kondo, S. Sawa, A. Kinoshita, S. Mizuno, T. Kakimoto, H. Fukuda, Y. Sakagami: *Science* 313(5788), 845–848, DOI: 10.1126/science.1128439 (2006).
96. S. Robinson, K. Warburton, M. Seymour, M. Clench, J. Thomas-Oates: *New Phytol.* 173(2), 438–444, DOI:10.1111/j.1469-8137.2006.01934.x (2007).
97. M. M. Burrell, C. J. Earnshaw, M. R. Clench: *J. Exp. Bot.* 58(4), 757–763, DOI: 10.1093/jxb/erl139 (2007).

98. R. Shroff, F. Vergara, A. Muck, A. Svatoš, J. Gershenzon: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(16), 6196–6201, DOI: 10.1073/pnas.0711730105 (2008).
99. D. M. G. Anderson, V. A. Carolan, S. Crosland, K. R. Sharples, M. R. Clench: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23(9), 1321–1327, DOI:10.1002/rcm.3973 (2009).
100. N. Goto-Inoue, M. Setou, N. Zaima: *Anal. Sci.* 26(7), 821–825, DOI:10.2116/analsci.26.821 (2010).
101. J. H. Jun, Z. Song, Z. Liu, B. J. Nikolau, E. S. Yeung, Y. J. Lee: *Anal. Chem.* 82(8), 3255–3265, DOI:10.1021/ac902990p (2010).
102. D. C. Perdian, Y. J. Lee: *Anal. Chem.* 82(22), 9393–9400, DOI: 10.1021/ac102017q (2010).
103. V. Vrkoslav, A. Muck, J. Cvačka, A. Svatoš: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21(2), 220–231, DOI:10.1016/j.jasms.2009.10.003 (2010).
104. N. Zaima, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, M. Setou: *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 24(18), 2723–2729, DOI: 10.1002/rcm.4693 (2010).
105. S. Kaspar, M. Peukert, A. Svatoš, A. Matros, H.-P. Mock: *Proteomics* 11(9), DOI:10.1002/pmic.201000756 (2011).
106. K. A. Lunsford, G. F. Peter, R. A. Yost: *Anal. Chem.* 83(17), 6722–30, DOI:10.1021/ac2013527 (2011).
107. M. Peukert, A. Matros, G. Lattanzio, S. Kaspar, J. Abadía and H. Mock: *New Phytol.* 193, 806–815, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03970.x (2012).
108. M. Ha, J. H. Kwak, Y. Kim, O. P. Zee: *Food Chem.* 133(4), 1155–1162 DOI:10.1016/j.foodchem.2011.11.114 (2012).
109. P. J. Horn, A. R. Korte, P. B. Neogi, E. Love, J. Fuchs, K. Strupat, L. Borisjuk, V. Shulaev, Y.-J. Lee, K. D. Chapman: *Plant Cell* 24, 622–636, DOI:10.1105/tpc.111.094581 (2012).
110. Y. Yoshimura, H. Enomoto, T. Moriyama, Y. Kawamura, M. Setou, N. Zaima: *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1885–1895, DOI:10.1007/s00216-012-5876-z (2012).
111. P. Franceschi, Y. Dong, K. Strupat, U. Vrhovsek, F. Mattivi: *J. Exp. Bot.* 63(3), 1123–1133, DOI:10.1093/jxb/err327 (2012).
112. D. Hölscher, R. Shroff, K. Knop, M. Gottschaldt, A. Crecelius, B. Schneider, D. G. Heckel, U. S. Schubert, A. Svatoš: *Plant J.* 60(5), 907–918, DOI:10.1111/j.1365-313X.2009.04012.x (2009).
113. Y. Li, B. Shrestha, A. Vertes: *Anal. Chem.* 80(2), 407–420, DOI:10.1021/ac701703f (2008).
114. Y. Li, B. Shrestha, A. Vertes: *Anal. Chem.* 79(2), 523–32, DOI: 10.1021/ac061577n (2007).
115. A. J. Ibáñez, J. Scharte, P. Bones, A. Pirkl, S. Meldau, I. T. Baldwin, F. Hillenkamp, E. Weis, K. Dreisewerd: *Plant Methods* 6, 14, DOI: 10.1186/1746-4811-6-14 (2010).
116. P. J. Horn, Ch. N. James, S. K. Gidda, A. Kilaru, J. M. Dyer, R. T. Mullen, J. B. Ohlrogge, K. D. Chapman: *Plant Physiol.* 162(4), 1926–1936, DOI: 10.1104/pp.113.222455 (2013).
117. P. J. Horn, D. Sturtevant, K. D. Chapman: *Biochimie.* 96, 28–36, DOI:10.1016/j.biochi.2013.08.010 (2014).

118. P. J. Horn, K. D. Chapman: *Prog. Lipid Res.* 54, 32-52, DOI: 10.1016/j.plipres.2014.01.003 (2014).
119. M. Peukert, J. Thiel, D. Peshev, W. Weschke, W. Van den Ende, H.-P. Mock, A. Matros: *Plant Cell*. 26, 3728-3744, DOI: 10.1105/tpc.114.130211 (2014).
120. D. R. Bhandari, Q. Wang, W. Friedt, B. Spengler, S. Gottwald, A. Römpf: *Analyst* 140(22), 7696-7709, DOI: 10.1039/C5AN01065A (2015).
121. D. S. Dalisay, K. W. Kim, Ch. Lee, H. Yang, O. Rübél, B. P. Bowen, L. B. Davin, N. G. Lewis: *J. Nat. Prod.* 78(6), 1231-1242, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00023 (2015).
122. D. Sturtevanta, M. E. Dueñas, Y.-J. Lee, K. D. Chapman: *Biochim. Biophys. Acta* 1862(2), 268-281, DOI:10.1016/j.bbalip.2016.11.012 (2017).
123. H. K. Woodfield, D. Sturtevant, L. Borisjuk, E. Munz, I. A. Guschina, K. Chapman, J. L. Harwood: *Plant Physiol.* 173(4), 1998-2009, DOI: 10.1104/pp.16.01705 (2017).
124. P. Nemes, A. Vertes: *Anal. Chem.* 79(21), 8098-8106, DOI:10.1021/ac071181r (2007).
125. J. Gray, M. Bevan, T. Brutnell, C. R. Buell, K. Cone, S. Hake, D. Jackson, E. Kellogg, C. Lawrence, S. McCouch, T. Mockler, S. Moose, A. Paterson, T. Peterson, D. Rokshar, G. M. Souza, N. Springer, N. Stein, M. Timmermans, G.-L. Wang, E. Grotewold: *Plant Physiol.* 149, 4-6, DOI:10.1104/pp.108.128504 (2009).
126. B. Li, N. Bjarnholt, S. H. Hansen, Ch. Janfelt: *J. Mass Spectrom.* 46(12), 1241-1246, DOI:10.1002/jms.2010 (2011).
127. J. Thunig, S. H. Hansen, Ch. Janfelt: *Anal. Chem.* 83(9), 3256-3259, DOI:10.1021/ac2004967, (2011).
128. D. R. Ifa, A. Srimany, L. S. Eberlin, H. R. Naik, V. Bhat, R. G. Cooks, T. Pradeep: *Anal. Methods* 3, 1910-1912, DOI:10.1039/c1ay05295k (2012).
129. H. Zhang, S. Cha, E. S. Yeung: *Anal. Chem.* 79(17), 6575-6584, DOI:10.1021/ac0706170 (2007).
130. S. Cha, H. Zhang, H. Ilarslan, E. S. Wurtele, L. Brachova, B. J. Nikolau, E. S. Yeung: *Plant J.* 55(2), 348-360, DOI:10.1111/j.1365-3113X.2008.03507.x (2008).
131. D. C. Perdian, G. M. Schieffer, R. S. Houk: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24(4), 397-402, DOI:10.1002/rcm.4405 (2010).
132. S. Cha, Z. Song, B. J. Nikolau, E. S. Yeung: *Anal. Chem.* 81(8), 2991-3000, DOI:10.1021/ac802615r (2009).
133. T. Ozawa, I. Osaka, S. Hamada, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki, R. Arakawa: *Anal. Sci.* 32(5), 587-591, DOI: 10.2116/analsci.32.587 (2016).
134. K. Kuroda, T. Fujiwara, T. Imai, R. Takama, K. Saito, Y. Matsushita, K. Fukushima: *Surf. Interface anal.* 45(1), 215-219, DOI:10.1002/sia.4979 (2012).
135. K. Saito, T. Mitsutani, T. Imai, Y. Matsushita, A. Yamamoto, K. Fukushima: *Appl. Surf. Sci.* 255(4), 1088-1091, DOI:10.1016/j.apsusc.2008.05.145 (2008).
136. A. Seyer, J. Einhorn, A. Brunelle, O. Laprévotte: *Anal. Chem.* 82(6), 2326-2333, DOI:10.1021/ac902528t (2010).

137. Ch. Zhou, Q. Li, V. L. Chiang, L. A. Lucia, D. P. Griffis: *Anal. Chem.* 83(18), 7020-7026, DOI:10.1021/ac200903y (2011).
138. K. Saito, Y. Watanabe, M. Shirakawa, Y. Matsushita, T. Imai, T. Koike, Y. Sano, R. Funada, K. Fukazawa, K. Fukushima: *Plant J.* 69(3), 542–552, DOI:10.1111/j.1365-313X.2011.04811.x (2012).
139. S. Aoyagi, N. Kodani, A. Yano, T. Asao, H. Iwai, M. Kudo: *Surf. Interface anal.* 466 (S1), 131-135, DOI:10.1002/sia.5588 (2014).
140. S. H. Kim, J. Kim, Y. J. Lee, T. G. Lee, S. Yoon: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28(8), 1729-1732, DOI:10.1007/s13361-017-1682-3 (2017).
141. P. Kulkarni, M. Dost, Ö. D. Bulut, A. Welle, S. Böcker, W. Boland, A. Svatoš: *Plant J.* 93(1), 193-206, DOI:10.1111/tpj.13763 (2018).
142. A.D. Lesiak, R. B. Cody, A. J. Dane, R. A. Musah: *Forensic Sci Int.* 242, 210-218, DOI:10.1016/j.forsciint.2014.07.005 (2014).
143. A. Singh, V. Bajpai, M. Srivastava, K. R. Arya, B. Kumar: *J. Pharm. Anal.* 5(5), 332-335, DOI:10.1016/j.jpha.2015.05.002 (2015).
144. R. A. Musah, E. O. Espinoza, R. B. Cody, A. D. Lesiak, E. D. Christensen, H. E. Moore, S. Maleknia, F. P. Drijfhout: *Sci. Rep.* 5(11520), DOI:10.1038/srep11520 (2015).
145. A. Janská, E. Pecková, B. Sczepaniak, P. Smýkal, A. Soukup: *Ann. Bot.* 123(5), 815-829, DOI: 10.1093/aob/mcy213 (2018).
146. X. Wang, H. Liu, H. Liu, Ch. Zeng: *Anal. Methods* 6, 2537-2544, DOI: 10.1039/c3ay41889h (2014).
147. S. Shao, Ch. J. Meyer, F. Ma, C. A. Peterson, M. A. Bernards: *J. Exp. Bot.* 58 (5), 1071-1082, DOI:10.1093/jxb/erl268 (2007).
148. M. P. Velcheva, K. E. Espelie, Cha. P. Ivanov: *Phytochemistry* 20(8), 2225-2227, DOI:10.1016/0031-9422(81)80118-5 (1981).
149. P. Adhikary, A. Mukherjee, A. Barik: *J. Stored Prod. Res.* 67, 56–62, DOI:10.1016/j.jspr.2016.01.005 (2016).
150. P. Graven, Ch. G. De Koster, J. J. Boon, F. Bouman: *Ann. Bot.* 77(2), 105-122, DOI:10.1006/anbo.1996.0013 (1996).
151. T.C. S. Kanyaa, L. J. Rao, M.C. S. Sastry: *Food Chem.* 101(4), 1552-1557, DOI:10.1016/j.foodchem.2006.04.008 (2007).
152. S. Ch. Shin, S.-J. Lee, J. I. Chung, D.-W. Bae, S. T. Kim, N.-J. Sung: *Food Sci. Biotechnol.* 18(6), 1470–1475 (2009).
153. C. W. Beninger, L. Gu, R. L. Prior, D. C. Junk, A. Vandenberg, K. E. Bett: *J. Agric. Food Chem.* 53(20), 7777–7782, DOI: 10.1021/jf050051l (2005).
154. J.-K. Jhan, Y.-C. Chung, G.-H. Chen, C.-H. Chang, Y.-C. Lu, C.-K. Hsu: *Int. J. Cosmet. Sci.* 38(3), 319–324, DOI:10.1111/ics.12300 (2016).
155. M. Miralia, S. J. Ambrose, S. A. Wood, A. Vandenberg, R. W. Purves: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 969(15), 149–161, DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.08.007 (2014).

156. M. Mirali, R. W. Purves, A. Vandenberg: *J. Nat. Prod.* 80(5), 1310–1317, DOI:10.1021/acs.jnatprod.6b00872 (2017).
157. N. Kohyama, M. Chono, H. Nakagawa, Y. Matsuo, H. Ono, H. Matsunaka: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81(11), 2112–2118, DOI: 10.1080/09168451.2017.1373589 (2017).
158. Y. Takahata, M. Ohnishi-Kameyama, S. Furuta, M. Takahashi, I. Suda: *J. Agric. Food Chem.* 49(12), 5843–5847, DOI: 10.1021/jf010307x (2001).
159. K. B. Ruiza, B. Khakimov, S. B. Engelsen, S. Bak, S. Biondia, S.-E. Jacobsen: *Ind. Crop Prod.* 104, 156–163, DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.04.007 (2017).
160. S. Wada, J. A. Kennedy, B. M. Reed: *Sci. Hortic.* 130(4), 762–768, DOI:10.1016/j.scienta.2011.08.034 (2011).
161. D. T. Vu, V. Velusamy, E. Park: *Pak. J. Bot.* 46(5), 1847–1857 (2014).
162. S. Zhou, H. Sekizaki, Z. Yang, S. Sawa, J. Pan: *J. Agric. Food Chem.* 58(20), 10972–10978, DOI:10.1021/jf102694k (2010).
163. I. Marbach, A. M. Mayer: *Plant Physiol.* 56, 93–93, DOI: 10.1104/pp.56.1.93 (1975).
164. M. L. Sullivan: *Front. Plant Sci.* 5, 783, DOI:10.3389/fpls.2014.00783 (2014).
165. P. Basnet, D. Amarasiriwardena, F. Wu, Z. Fu, T. Zhang: *Environ. Pollut.* 195, 148–156 DOI:10.1016/j.envpol.2014.08.017 (2014).
166. P. Basnet, D. Amarasiriwardena, F. Wu, Z. Fu, T. Zhang: *Microchem. J.* 127, 152–159, DOI:10.1016/j.microc.2016.02.020 (2016).
167. K. Gallardo, C. Signor, J. Vandekerckhove, R. Thompson, J. Burstin: *Plant Physiol.* 133, 664–682, DOI:10.1104/pp.103.025254 (2003).
168. S. Dam, B. Laursen, J. Ørnfelt, B. Jochimsen, H. Stærfeldt, C. Friis, K. Nielsen, N. Goffard, S. Besenbacher, L. Krusell: *Plant Physiol.* 149, 1325–1340 (2009).
169. M. Peukert, A. Matros, G. Lattanzio, S. Kaspar, J. Abadía and H. Mock: *New Phytol.* 193, 806–815, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03970.x (2012).
170. D. Bhandari, Q. Wang, W. Friedt, B. Spengler, S. Gottwald and A. Römpp: *Analyst* 140(22), 7696–7709, DOI: 10.1039/C5AN01065A (2015).
171. K. Gorzolka, J. Kölling, T. Nattkemper, K. Niehaus: *PLoS ONE*, 11(3), DOI:10.1371/journal.pone.0150208 (2016).
172. L. V. Tose, M. Murgu, B. G. Vaz, W. Romão: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 2401–2407, DOI:10.1007/s13361-017-1764-2 (2017).
173. G. Gaiffe, R. B. Cole, S. Lacpatia, M. C. Bridoux: *Anal Chem.* 90(10), 6035–6042, DOI:10.1021/acs.analchem.7b05116 (2018).
174. CH. N. McEwen, R. G. McKay, B. S. Larsen: *Anal Chem.* 77(23), 7826–7831, DOI:10.1021/ac051470k (2005).
175. W. Chen, T. A.N.Nkosi, S. Combrinck, A. M. Viljoen, C. Cartwright-Jones: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128, 119–125, DOI:10.1016/j.jpba.2016.05.020 (2016).

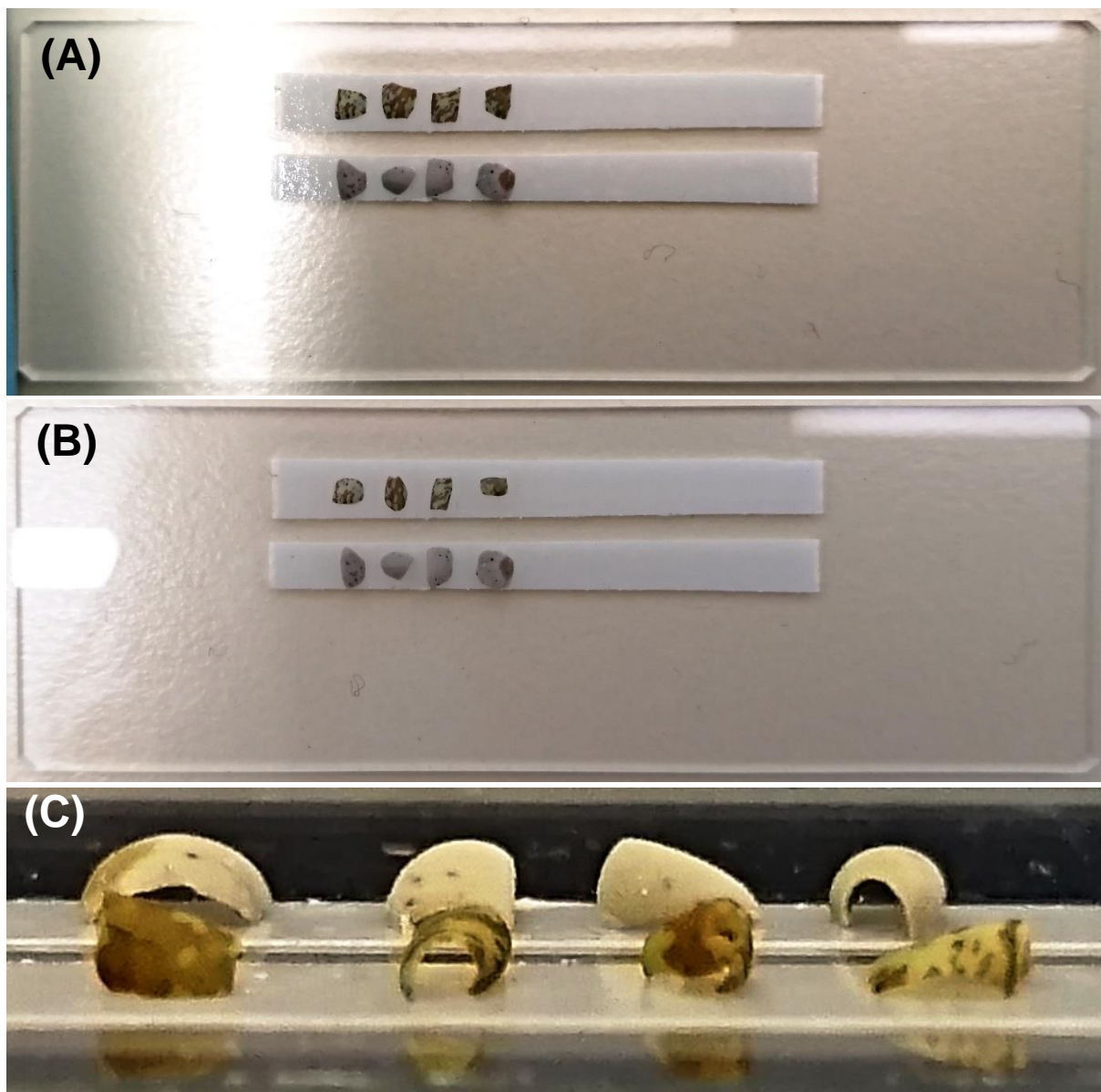
176. X. Xiao, L. L. Miller, K. J. Parchert, D. Hayes, J. M. Hochrein: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30(13), 1639–1646, DOI:10.1002/rcm.7601 (2016).
177. B.Y. Huang, X. H. Ouyang, J. Sun, Z.-Y. Xiao, C.-P. Pan: *Chem. J. Chinese U.* 34(7), 1591–1597, DOI:10.7503/cjcu20130282 (2013).
178. R. J.Fussell, D. Chan, M. Sharman: *Trends Analyt Chem.* 29(11), 1326–1335, DOI:10.1016/j.trac.2010.08.004 (2010).
179. I. Dababi, O. Gimello, E. Elaloui, F. Quignard, N. Brosse: *Polymers* 8, 340, DOI:10.3390/polym8090340 (2016).
180. X.Fan, J.-L.Zhu, A.-L. Zheng, X.-Y. Wei, Y.-P. Zhao, J.-P. Cao, W. Zhao, Y. Lu, L. Chen, Ch.-Y. You: *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 115, 16–23, DOI:10.1016/j.jaap.2015.06.012 (2015).
181. M. Cechová, I. Hradilová, P. Smýkal, P. Barták, P. Bednář: *Anal. Bioanal. Chem.* 411(6), 1169–1180, DOI: 10.1007/s00216-018-1551-3 (2019).
182. A. Dhyani, C. C. Baskin, B. P. Nautiyal, M. Ch. Nautiyal: *Botany*, 97(2), 161–166, DOI:10.1139/cjb-2018-0161 (2019).
183. E.Fadón, M. Herrero, J. Rodrigo: *Front. Plant Sci.* 9, 171, DOI: 10.3389/fpls.2018.00171 (2018).
184. S. Penfield: *Curr. Biol.*, 27, 853–909 (2017).
185. J.M. Baskin, C. C. Baskin, X. Li: *Plant Species Biology* 15(2), 139–152, DOI:10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x (2000).
186. A. Valleriania, K.Tielbörger: *Theor. Popul. Biol.* 70(1), 1–9, DOI:10.1016/j.tpb.2006.02.003 (2006).
187. M. Yildiz, R. Beyaz, M. Gursoy, M. Aycan, Y. Koc, M. Kayan: *Advances in Seed Biology*, DOI:10.5772/intechopen.70571 (2017).
188. N. S. Gama-Arachchige, J. M. Baskin, R. L. Geneve, C. C. Baskin: *Ann. Bot.* 112(1), 69–84, DOI: 10.1093/aob/mct094 (2013).
189. S. R. Turner, A. Cook, J. M. Baskin, C. C. Baskin, R. E. Tuckett, K. J. Steadman, K. W. Dixon: *Ann. Bot.* 104(5), 833–844, DOI: 10.1093/aob/mcp171 (2009).
190. M. Spurný: *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung* 154(4), 547–567 (1964).
191. P. K. Stumpf: *Lipids: Structure and Function: The Biochemistry of Plants*, Elsevier (2014).
192. M. P. Rolston: *Bot. Review* 44(3), 365–396 (1978).
193. R. M. Reeve: *Am. J. Bot.* 33(3), 191–204, (1946).
194. M. A. S. Marles, M. Y. Gruber: *J. Sci. Food Agric.* 84(3), 251 – 262, DOI:10.1002/jsfa.1621 (2004).
195. J. Barros, H. Serk, I. Granlund, E. Pesquet: *Ann. Bot.* 115(7), 1053–1074, DOI:10.1093/aob/mcv046 (2015).
196. A. Sharma, B. Shahzad, A. Rehman, R. Bhardwaj, M. Landi, B. Zheng: *Molecules*, 24(13), 2452; DOI:10.3390/molecules24132452 (2019).

197. P. L. Bhalla, H. D. Slattery: *Ann. Bot.* 53(1), 125-128, DOI:10.1093/oxfordjournals.aob.a086661 (1984).
198. M. P. M. Derkx, C. M. Karssen: *Physiol. Plant.* 89(2), 360-368 DOI:10.1111/j.1399-3054.1993.tb00167.x (1993).
199. B Moreira, J. G. Pausas: *PLOS One* 7(12), DOI:10.1371/journal.pone.0051523 (2012).
200. R. Gao, R. Zhao, Z. Huang, X. Yang, X. Wei, Z. He, J. L. Walck: *Environ. Exp. Bot.* 155, 688-694, DOI:10.1016/j.envexpbot.2018.08.010 (2018).
201. M. Rezvani, F. Zaefarian: *Acta Botanica Brasilica* 31(2), 220-228 DOI:10.1590/0102-33062017abb0001 (2017).
202. P.-C. Zalamea, C. Sarmiento, A. E. Arnold, A. S. Davis, J. W. Dalling: *Front. Plant Sci.* 5, 799, DOI:10.3389/fpls.2014.00799 (2015).
203. S. Penfield: *Curr. Biol.* 27(17), R874-R878, DOI:10.1016/j.cub.2017.05.050 (2017).
204. Z. Huang, S. Footitt, W. E. Finch-Savage: *Ann. Bot.* 113(6), 921-929, DOI:10.1093/aob/mcu014 (2014).
205. S. Footitt, Z. Huang, H. A. Clay, A. Mead, W. E. Finch-Savage: *Plant J.* 74, 1003–1015, DOI:10.1111/tpj.12186 (2013).
206. S. Footitt, H. Ölçer-Footitt, A. J. Hambidge, W. E. Finch-Savage: *Plant Cell Environ.* 40(8), 1474–1486, DOI:10.1111/pce.12940 (2017).
207. J. Kreuzman, M. Liška: *Czech J. Genet. Plant Breed* 42, 73-76 (2006).
208. I. Hradilová, O. Trněný, M. Válková, M. Cechová, A. Janská, L. Prokešová, K. Aamir, N. Krezdorn, B. Rotter, P. Winter, R. K. Varshney, A. Soukup, P. Bednář, P. Hanáček, P. Smýkal: *Front. Plant Sci.* 8, 542, DOI: 10.3389/fpls.2017.00542 (2017).
209. H. North, R. Casey, C. Domoney: *Theor. Appl. Genet.* 77, 805-808, DOI:10.1007/BF00268330 (1989).
210. B. Worley, R. Powers: *Curr. Metabolomics* 1(1), 92-107, DOI: 10.2174/2213235X11301010092 (2013).
211. M. Cechová, M. Válková, I. Hradilová, A. Janská, A. Soukup, P. Smýkal, P. Bednář: *Int. J. Mol. Sci.* 18(10), DOI: 10.3390/ijms18102196 (2017).
212. J. Chen, K. B. Green, K. K. Nichols: *Lipids* 50(8), 821-836, DOI: 10.1007/s11745-015-4044-6 (2015).
213. T. Nilsson, E. Martínez, A. Manresa, E. H. Oliy: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24(6), 777-783, DOI:10.1002/rcm.4446 (2010).
214. H. Bagheri, M. El-Soda, H. K. Kim, S. Fritsche, Ch. Jung, M. G. M. Aarts: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15561-15577, DOI:10.3390/ijms140815561 (2013).
215. T. Karaki, Y. Watanabe, T. Kondo, T. Koike: *Plant Species Biol.* 27, 226-232, DOI: 10.1111/j.1442-1984.2011.00343.x (2012).
216. M. Chai, Ch. Zhou, I. Molina, Ch. Fu, J. Nakashima, G. Li, W. Zhang, J. Park, Y. Tang, Q. Jiang, Z.-Y. Wang: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6997-7002, DOI: 10.1073/pnas.1601256113 (2016).

217. J. Skopalová, P. Barták, P. Bednář, H. Tomková, T. Ingr, I. Lorencová, P. Kučerová, R. Papoušek, L. Borovcová, K. Lemr: *Anal. Chim. Acta.* 999,60-68, DOI: 10.1016/j.aca.2017.11.024 (2018).
218. L. M. de Souza, T. R. Cipriani, M. Iacomini, P. A. J. Gorin, G. L. Sasaki: *J. Pharmaceut. Biomed.* 47(1), 59-67, DOI: 10.1016/j.jpba.2007.12.008 (2008).
219. H. Yan, Z. Hua, G. Qian, M. Wang, G. Du, J. Chen: *Cellulose* 16, 1099-1107, DOI:10.1007/s10570-009-9349-2 (2009).
220. F.-F. Hsu, J. Turk, M. L. Gross: *J. Mass Spectrom.* 38(4), 447–457, DOI:10.1002/jms.457 (2003).
221. D. Granot, R. David-Schwartz, G. Kelly: *Front. Plant Sci.* 4, 44, DOI: 10.3389/fpls.2013.00044 (2013).
222. S. P. Williams, G. E. Gillaspay, I. Y. Perara: *Front. Plant Sci.* 6, 66, DOI: 10.3389/fpls.2015.00067 (2015).
223. M. Pauly, V. Ramírez: *Front. Plant Sci.* 9, 1210, DOI: 10.3389/fpls.2018.01210 (2018).
224. G. L. Sasaki, L. M. de Souza: Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization, DOI:10.5772/55221 (2013).
225. A. Rahman, S. Tsurumi: *Plant Tissue Cult.* 12(2), 181-194 (2002).
226. Y. D. Daveby, P. Åman, J. M. Betz, S. M. Musser: *J. Sci. Food Agric.* 78(1), 141-146, DOI:10.1002/(SICI)1097-0010(199809)78:1<141::AID-JSFA169>3.0.CO;2-6 (1998).
227. M. M. A. El Aziz, A. S. Ashour, A. S. G. Melad: *J. nanomed. res.* 8(1), 6-12, DOI:10.15406/jnmr.2019.08.00199 (2019).
228. U. Marchaim, Y. Birk, A. Dovrat, T. Berman: *J. Exp. Bot.* 23(75), 302-309, DOI:10.1093/jxb/23.2.302 (1972).

Príloha

Obrázok I. Krútenie osemenia po nanesení matrice automatickou pipetou. (A- osemenie bez matrice, B- osemenie s nakvapnutou matricou, C- osemenie s nakvapnutou matricou pri pohľade z boku).





Article

Towards Better Understanding of Pea Seed Dormancy Using Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

Monika Cechová¹, Markéta Válková¹, Iveta Hradilová², Anna Janská³, Aleš Soukup³, Petr Smýkal² and Petr Bednář^{1,*}

¹ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic; monicechova@gmail.com (M.C.); ponizilova.marketa@seznam.cz (M.V.)

² Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic; Hradilova@seznam.cz (I.H.); petr.smykal@upol.cz (P.S.)

³ Department of Experimental Plant Biology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 5, 128 44 Prague, Czech Republic; janska@natur.cuni.cz (A.J.); asoukup@natur.cuni.cz (A.S.)

* Correspondence: petr.bednar@upol.cz; Tel.: +420-585-634-403; Fax: +420-585-634-433

Received: 19 September 2017; Accepted: 16 October 2017; Published: 21 October 2017

Abstract: Seed coats of six pea genotypes contrasting in dormancy were studied by laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS). Multivariate statistical analysis discriminated dormant and non-dormant seeds in mature dry state. Separation between dormant and non-dormant types was observed despite important markers of particular dormant genotypes differ from each other. Normalized signals of long-chain hydroxylated fatty acids (HLFA) in dormant JI64 genotype seed coats were significantly higher than in other genotypes. These compounds seem to be important markers likely influencing JI64 seed imbibition and germination. HLFA importance was supported by study of recombinant inbred lines (JI64xJI92) contrasting in dormancy but similar in other seed properties. Furthermore HLFA distribution in seed coat was studied by mass spectrometry imaging. HLFA contents in strophiole and hilum are significantly lower compared to other parts indicating their role in water uptake. Results from LDI-MS experiments are useful in understanding (physical) dormancy (first phases of germination) mechanism and properties related to food processing technologies (e.g., seed treatment by cooking).

Keywords: pea; fatty acid; seed coat; seed dormancy; seed hardness; laser desorption-ionization mass spectrometry; imaging mass spectrometry; multivariate statistics

1. Introduction

Seed germination is a key step of plant life predetermining spread of particular plant species on the Earth [1]. In a population of wild seeds only a certain fraction of individuals starts to germinate in favorable conditions. Their inactive counterparts can survive adverse periods and thus ensure continuation of given plant species for long time. The extent of seed inactivity is expressed by dormancy [2]. Dormancy is a regulatory and adaptive trait in virtually all seed-plant species. There are several types of seed dormancy, with one of them being physical dormancy, executed by water impermeable seed coat [3]. This type is prevalent in legumes [4]. Its detailed description and classification, importance for agriculture and food industry and connection with other seed properties (i.e., seed hardness, pre-harvest sprouting, etc.) is given in two our recent papers [4,5] and in citations listed therein.

Activation of a seed starts with water imbibition and penetration of gases through the seed coat (their restriction is described as physical dormancy) [3]. These processes are connected with

structure and chemical composition of the most outer cell layers of seed coats [4]. A number of analytical techniques was used for chemical analysis of seed composition (including characterization of separated seed coat) starting with a selective staining [4], over standard instrumental techniques, i.e., gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) [6], high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet/visible (UV/Vis) spectrophotometric detection [7,8] up to hyphenated techniques, first of all gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) [9–11]. All these techniques utilize an interaction of plant material with a solvent (soaking or liquid extraction), often in combination with further chemical treatment (i.e., hydrolysis and derivatization). GC/MS was used for analysis of saponified and methylated seed coats [12]. These techniques dispose with high selectivity towards extractable analytes.

Number of techniques allow direct analysis of seeds in dry state or after a very short contact with a solvent (i.e., spray covering of surface with a matrix prior to a matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis (MALDI-MS), etc.) preventing (or significantly restricting) the initiation of the imbibition processes during sample preparation or (reversely) to study the changes after defined wetting of seed coat. Especially, spectrometric techniques such as MALDI-MS, desorption electrospray mass spectrometry (DESI-MS), direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and laser ablation–inductively coupled plasma–mass spectrometry (LA-ICP-MS) have been already used for analysis of seeds as recently reviewed [13–20]. Notably none of those techniques was used for direct measurement of separated seed coat tissue from embryo and endosperm.

Majority of later methods possesses spatial information (imaging methods). Perhaps the most widespread and powerful technique for the analysis of seed surface layers with respect to organic molecules is laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. It provides high versatility often with acceptable selectivity and sensitivity. Mass spectrometry is very popular technique in proteomic and metabolic profiling of plant tissues. MALDI-MS technique combined with gel electrophoresis was used in study of proteomic composition of *Medicago truncatula* [21], *Lotus japonicas* and other legume seeds [22]. MALDI-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) protocols for the detection of small molecules in cryodissected immature barley grains are described in the work of Peukert et al. [23]. Bhandari et al. published a comprehensive high resolution MS imaging analysis of cryosections of two types of seeds (oil-seed rape and wheat) and other plant tissues (wheat rachis, stem base, rice root) concerning with germination and seed maturation [24]. Besides, Gorzolka et al. have shown the possibility of MALDI-MS imaging for spatial-temporal metabolite profiling during the germination of barley seeds [25].

To the best of our knowledge this is the first report of the utilization of laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) for the analysis of seed coat composition in the relation to the level of seed dormancy. The main aim of this work was to study the potential of laser desorption/ionization mass spectrometry for the surface analysis of pea seed coat in mature dry state with respect to physical dormancy. Multivariate statistics on raw MS data was used for classification of pea genotypes and lines and obtained outputs correlated with level of dormancy. Dormant and non-dormant genotypes (possessing different propensity to imbibition and germination) were profiled and content of hydroxylated long-chain fatty acids (HLFA) was identified as the important discriminating factor. The obtained information is significant also for agricultural and food industry.

2. Results and Discussion

2.1. LDI-MS Measurement and Utilization of PCA and OPLS-DA for Data Analysis

LDI-MS spectra of outer surface of six different genotypes (JI92, Cameor, Terno, JI64, VIR320 and L100) were measured in positive and negative ion mode. These genotypes represent both wild and domesticated pea types commonly used in genetic and biological studies [5]. They contain both pigmented and non-pigmented seed coats. Strong signals at m/z 98.9769, 112.9229, 154.9325, 196.9439,

206.9943, 291.1685, 317.11198, 369.1229, 377.1309 and 485.3076 were observed in positive mode and those at m/z 121.0060, 132.0010, 143.9992, 156.0039, 169.0079, 193.0115, 204.0037, 214.0169, 217.0682, 268.0770, 282.1081 306.1075, 319.1063 and 323.1524 in negative ion mode. Differences in those major signals, however, do not allow a resolution of wild/dormant from cultivated/non-dormant genotypes. Although certain differences among some genotypes are visible (i.e., Terno in positive and Cameor in negative ion modes), the direct interpretation of MS spectra do not allow to find characteristic signals for cultivation/dormancy (raw LDI-MS and MALDI-MS spectra are given in supplemental material, Figure S1a–d). Since comprehensive evaluation of differences by direct raw MS spectra comparison was not possible, multivariate analysis was applied. Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) are generally the most proven methods to differentiate between classes in highly complex data sets. We started with application of classical PCA to visualize the chemical differences among samples by unsupervised (independent) way. Utilization of PCA as starting point during multidimensional data treatment was recommended for instance by Worley and Powers for metabolomics representing similar exploratory area [26]. Figure 1 shows the 3D Score plots obtained by PCA of raw LDI-MS and MALDI-MS data in positive and negative ion modes.

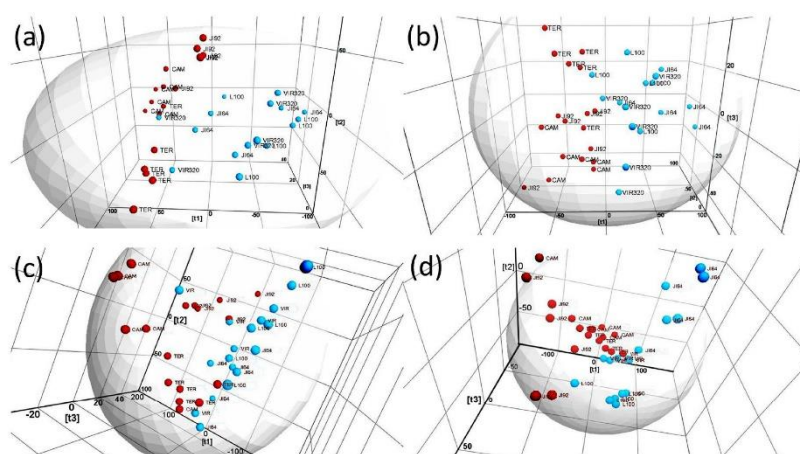


Figure 1. 3D Score plots obtained by Principal Component Analysis of MALDI-MS and LDI-MS data. Upper plots—measurement in negative ionization mode, (a) with matrix and (b) without matrix; bottom plots—measurement in positive ionization mode, (c) with matrix and (d) without matrix; dormant species are marked with blue and non-dormant ones with red bullets; Pareto scaling and marker intensity threshold 1000 was used for data matrix processing.

Despite a relatively large variation of replicated measurements, separation of dormant and non-dormant genotypes is evident in each ionization mode regardless whether matrix is used or not. Roughly, non-dormant samples are located on left and dormant ones on the right side in each 3D Score plot, respectively. These results suggest that laser desorption ionization mass spectrometry can be used for classification (resolution) of pea genotypes with regard to surface composition related to domestication/dormancy by direct analysis of dry matured seeds as alternative method to classical study of germination. It should be emphasized that the resolution can be achieved without selection and knowledge of the origin of markers (signals significantly differing in content between dormant and non-dormant samples). Nevertheless, identification of one important group of markers was successful as described in next Chapters. In negative ion mode (Figure 1a,b), the first three dimensions of the Score plots explain 78.53% and 76.46% of data variability in matrix assisted and matrix free experiments,

respectively. In positive ion mode similar level of explained variability was achieved (80.28% and 75.58%, respectively). Complete datasets related to those Score Plots are given in supplementary material, Table S1a–d. Surface morphology differs significantly among genotypes (e.g., presence of “gritty” surface on seed coats of some genotypes, Figure S2). Such differences at surface can alter the mechanism of water penetration through the seed coat (the mechanism of seed imbibition and consequently dormancy)—from a biological point of view—as well as ionization efficiency during LDI-MS measurement—considering the used analytical methodology. To conclude, the resolution of dormant and non-dormant species was unambiguously achieved but surface morphology affects significantly the distribution of particular data-points.

As already mentioned, the resolution of dormant and non-dormant genotypes is achieved regardless the presence of matrix. Application of matrix using standard automatized solution spraying technique causes torsion of samples attached to MALDI plate. We observed that this process is more pronounced in non-dormant genotypes. Such torsion is connected with a tension among different seed coat cell layers during their contact with water and its extent is possibly due to thinner seed coat of non-dormant compared to dormant species [5]. When occurring on an intact seed in nature, this phenomenon could contribute to seed coat rupture, opening the seed for water and (consequently) accelerating germination [5]—hence the stronger connection of the torsion on MALDI plate with non-dormant (faster germinating) seed coats. Although the measurement of deformed seed coat pieces was possible and similar degree of distinction of samples according to dormancy level was achieved in matrix assisted and matrix free experiments, the changes of the surface cell layers by their swelling with the applied solvent during and after spraying represent a phenomenon negatively affecting both the sample preparation as well as signals in MS spectra. The matrix-free method should be therefore further preferred from methodological point of view. The effect of matrix presence on the significance of identified signals in terms of OPLS-DA (the position of corresponding markers in particular S-plots) will be discussed later.

The differences in chemical composition of individual dormant genotypes were studied against non-dormant genotypes (all three non-dormant genotypes as reference set) by OPLS-DA. Obtained signals almost completely differ when compared particular dormant genotypes with two exceptions (given by italics, Table S2) that could contribute to differences in the process of water imbibition. Signals of particular hydroxylated long-chain fatty acids appeared among the most important markers of JI64 genotype as discussed later in more details.

As already indicated, the distinctness in seed characters (i.e., size, pigmentation, surface properties, etc.) influences the LDI-MS experiment. We therefore further focused on JI64 (D) and JI92 (N) pair that is less contrasting in term of seed coat appearance but strongly different in seed coat permeability and dormancy (for details see Section 3.2. and [5]). Note that those two genotypes are very well separated by unsupervised PCA (see all 3D Score Plots, Figure 1). Data obtained by their measurement were also analyzed by OPLS-DA. Figure 2 shows the S-plots reflecting the differences in signals between both genotypes in negative ion mode (all markers and their coordinates in S-plots are given for both ionization modes in supplemental material, Table S3a–d).

The area of significant signals (further referred as dormancy markers, DM) in each S-plot corresponds with low risk region [27] that is given in this study as a box with following coordinates: $\text{CoeffCS}(2) = 10\text{--}100\%$ and $p(\text{corr})(1) = 75\text{--}100\%$ from the highest value at $\text{CoeffCS}(2)$ -axis (x -axis) and $p(\text{corr})(1)$ -axis (y -axis), respectively, in “dormant” part (the first quadrant) of the S-plot. Signals at m/z 255.2331, 281.2393, 283.2613, 411.3850, 425.3990, 437.3946, 441.3950 and 455.4065 fell into this region and are thus classified as significant DM in matrix free LDI-MS experiments (Figure 2a). Analogous signals were observed in MALDI-MS spectra as well but some of them out of low risk region of related S-plot (Figure 2b).

Those signals correspond well with theoretical m/z values of deprotonated molecules of common fatty acids (palmitic, oleic and stearic acid) and, perhaps more importantly, with hydroxylated long chain fatty acids (HLFA). Table 1 shows details of these markers. HLFA have been already considered as hydrophobic components increasing impermeability of cutin layers for water [5,6].

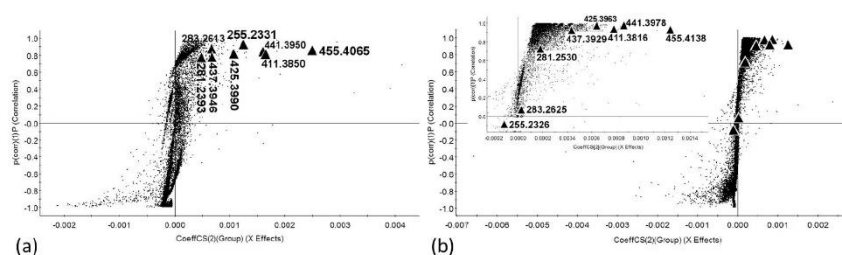


Figure 2. S-plots obtained by OPLS-DA of J164 x J192 genotypes. (a) Matrix free experiments; (b) matrix assisted experiments (inset in (b) shows zoomed dormant part of the appropriate S-plot); enlarged triangles indicate identified markers of physical dormancy.

Table 1. List of fatty acids found among dormant markers by LDI-MS, MALDI-MS and OPLS-DA analysis. (* deviation of measured mass (m/z) from theoretical value calculated from elemental composition).

Elemental Composition	Matrix Free Experiments, Figure 3a				Matrix Assisted Experiments, Figure 3b			
	[M-H] ⁻	dtm (ppm) *	Coordinates in S-Plot		[M-H] ⁻	dtm (ppm) *	Coordinates in S-Plot	
			CoeffCS(2)	p(corr)(1)			CoeffCS(2)	p(corr)(1)
C ₁₆ H ₃₁ O ₂ ⁻	255.2331	0.78	0.00125	0.90637	255.2326	-1.18	-0.00012	-0.09994
C ₁₈ H ₃₃ O ₂ ⁻	281.2393	-33.07	0.00049	0.74660	281.2530	15.64	0.00017	0.70174
C ₁₈ H ₃₅ O ₂ ⁻	283.2613	-10.24	0.00066	0.85055	283.2625	-6.00	0.00002	0.04306
C ₂₆ H ₅₁ O ₃ ⁻	411.3850	2.67	0.00162	0.80646	411.3816	-5.59	0.00079	0.92125
C ₂₇ H ₅₃ O ₃ ⁻	425.3990	-1.18	0.00107	0.81814	425.3963	-7.52	0.00065	0.96154
C ₂₈ H ₅₃ O ₃ ⁻	437.3946	-11.20	0.00067	0.77322	437.3929	-15.09	0.00042	0.91775
C ₂₇ H ₅₃ O ₄ ⁻	441.3950	1.36	0.00160	0.83272	441.3978	7.70	0.00087	0.96626
C ₂₈ H ₅₅ O ₄ ⁻	455.4065	-7.69	0.00249	0.84469	455.4138	8.34	0.00126	0.91329

There are several former reports confirming that LDI-MS is generally suitable technique for analysis of fatty acids. Pirkel et al. dealt with the direct profiling of fatty acids in insect tissues by LDI-MS [28], for instance. Budimir et al. published laser desorption/ionization on porous silicon mass spectrometric analysis of nonadecanoic acid and heneicosanoic acid [29]. Besides, Shroff et al. have shown that MALDI-MS can be used for very sensitive analysis of various acids including fatty acids in negative ion mode [30]. Since the defined standards of HLFA are not commercially available, our LDI-MS method was verified using a mixture of common palmitic and oleic acid. Both acids provided the signal of appropriate anions when measured separately and also when applied at the pea seed coat surface, i.e., signals at m/z 255.2312 and 281.2465 were achieved in both experiments (deviation from theoretical mass, dtm, was 6.7 and 7.5 ppm, respectively, corresponding MS spectra are given in supplementary material, Figure S3a,b). Those results confirm the capability of our method to analyze fatty acids present on the surface of seed coats. Tandem MS/MS experiments confirmed the identity of HLFA markers on seed coat surface (see Figure S4 showing LDI-MS/MS spectrum of dihydroxyoctacosanoate measured with Trap CE 30 eV yielding the highest signal of characteristic fragments). Loss of water from parent ion was observed providing the fragment at m/z 437.3940 (C₂₈H₅₃O₃⁻). This loss suggests the presence of a hydroxyl group in the molecule. The signal of fragment arising by two consequent losses of water (confirming the presence of two hydroxyls in parent ion) was also observed but with low intensity (fragment at m/z 419.3841, C₂₈H₅₁O₂⁻). Loss of CO₂ was not observed. Structure of dihydroxyoctacosanoate fragments at m/z 183.1372, 253.2503 and 267.2664 was considered as well. The fragment at m/z 183.1372 corresponds with mass of undecenoate that can be formed by a cleavage of eleven-carbon chain from carboxyl end of dihydroxyoctacosanoate and elimination of water (C₁₁H₁₉O₂⁻). The latter two fragments could arise by a cleavage of C17 and C18 chain and elimination of water (C₁₇H₃₃O⁻ and C₁₈H₃₅O⁻, respectively). A higher deviation

of measured m/z values from theoretical ones is due to weak signal of rising fragments in MS/MS spectra. The fragmentation pattern suggests the C10 and/or C12 hydroxylation, however, the detailed elucidation of the position of hydroxyl is the objective of future research. Analogous fragmentation pattern was described by Nilsson et al. [31]. Besides, the formation of fragments that do not bear a carboxy group was described also by Kerwin et al. [32]. The presence of the above discussed fragments further confirms the identity of the found HLFA. The other HLFA did not provide utilizable signals of fragments in MS/MS spectra due to lower intensity of corresponding parent ions. Loss of water (but with very low intensity) was observed also in MS/MS spectra of monohydroxylated HLFA (i.e., hydroxyhexacosanoate, parent ion at m/z 411.3865 and hydroxyheptacosanoate, parent ion at m/z 425.3927).

The identified HLFA provided significantly higher signal in spectra of dormant JI64 genotype compared to non-dormant JI92 confirming the results of untargeted multivariate statistics. Figure 3 shows the MS spectra of external and internal surface of seed coat of both in dormancy contrasting genotypes.

Signals of HLFA are visible in the spectrum of external surface of JI64 (Figure 3a). They appear very close to another (stronger) signals with the same nominal mass (arising probably by a thermal destruction of polysaccharides and lignin). These HLFA signals are missing in the other LDI-MS spectra measured on external surface of JI92 genotype as well as on internal seed coat surface and its cross sections of both genotypes (Figure 3b–f). The resolution of the HLFA signals can be improved using ion mobility separation. The signal of dihydroxyoctacosanoate dominates in the spectrum obtained by averaging over its ion mobility peak and baseline correction being well separated from the interfering signal at m/z 455.1493 (Figure 3g shows mobilograms reconstructed for the interfering signal, upper trace and dihydroxyoctacosanoate, bottom trace; Figure 3h shows the spectrum averaged over the whole mobility range, upper spectrum and over the mobility peak with apex at 125 bins, bottom spectrum). Similar ion mobility separation can be achieved for the other HLFA.

The yield of signal of the identified HLFA with respect to sum of all signals present in spectra (normalized signal) was further optimized. The effect of ion source parameters on the normalized response of analytes and on the total ion current in MS spectra was studied in JI64 genotype. The effect of hexapole RF amplitude, sample plate voltage, laser energy and laser step rate on the normalized signal of dihydroxyoctacosanoate as the HLFA with the highest mass and response was studied (supplementary material, Figure S5). The effect of hexapole RF amplitude is quite significant. This parameter is important for focusing and transmission of ions in a lower vacuum region and it is m/z dependent in a broad range. The optimal value of this parameter is 300 V. Besides, the decreasing of sample plate voltage from the default 25 to 10 V caused utilizable improvement of signal. The optimal value of laser energy was set at 300 (dimensionless parameter, the value affects position of neutral density filter that attenuates/amplifies the laser beam to provide energy setting functionality). Laser step rate (velocity of the laser movement) influences the signal of dihydroxyoctacosanoate significantly as well (optimal value is 30). Slower motion of laser burns seed coats and HLFA signals are suppressed probably due to pyrolysis products that rise in more amounts. The effect of this parameter is connected with applied the energy of laser beam. However, for MSI mode (discussed in detail in the next chapter) operating with more focused laser beam to achieve better spatial resolution (beam size 60 μm , pixel size 50 \times 50 μm) the optimal laser energy was lower (250–300). Higher value than 300 rapidly burnt analyzed seed coats.

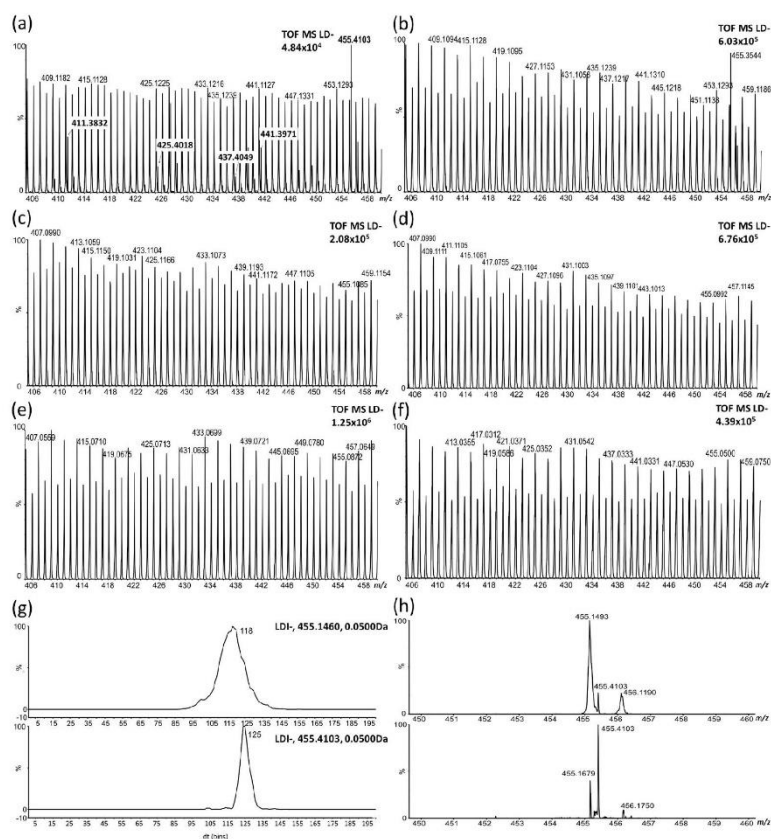


Figure 3. LDI-MS spectra in negative ionization mode. (a) external seed coat surface of JI64 genotype; (b) external seed coat surface of JI92; (c) internal surface of JI 64; (d) internal surface of JI92; (e) seed coat cross section of JI64 (MSI); (f) seed coat cross section of JI92 (MSI); (g) upper mobility scan (record of ion mobility scan) reconstructed at m/z 455.1460 and bottom mobility scan at m/z 455.4103; (h) upper MS/MS spectrum averaged over the whole mobility range and bottom MS/MS spectrum averaged over the second mobility peak (with maximum at 125 bins).

2.2. Study of the Distribution of Hydroxylated Long-Chain Fatty Acids on the Pea Seed Coat Surface

As already mentioned, water penetration through the seed coat is to certain extent driven by the composition of the outermost seed coat layer formed by hydrophobic compounds like cutin [4] and most likely also subcuticular lipids present in the macrosclereids. Low content of HLFA in some parts of seed coat outer surface (inhomogeneity of HLFA distribution over the outer surface) would be a primary place for water intrusion even when other parts of the surface are very homogeneous and rich in fatty acids. Imaging mass spectrometry was used to study the distribution of the HLFA previously detected as the dormancy markers as discussed in the previous chapter. Figure 4b compares the HLFA distribution (signals of particular m/z values) on the surface of dormant JI64 and non-dormant JI92 genotypes (the photo in Figure 4a shows the imaged seed coats). Homogeneous distribution of HLFA over the major parts of seed coats surface of both genotypes was observed and significantly higher signal of HLFA can be seen at the surface of JI64. However, Figure 4d demonstrates that hilum and strophiole

(small brown part occurring near hilum, see Figure 4c) contain a significantly lower content of HLFA (dihydroxyoctacosanoate, m/z 455.4103, in this case, see mass images at Figure 4d). The distribution of the other HLFA exhibits similar pattern as given in supplementary material (Figure S6).

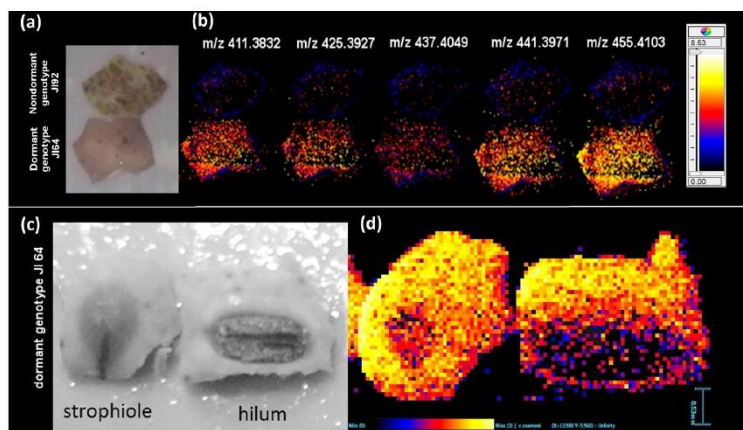


Figure 4. LDI-MSI analysis of external seed coat surfaces. (a) Optical image of analyzed seed coats used for mass imaging; (b) comparison of distribution of signals (m/z values) of hydroxylated fatty acids on seed coat of dormant JI64 (bottom mass images) and non-dormant JI92 (upper mass images); (c) optical image of parts of JI64 seed coats containing strophiole and hilum used for mass imaging; (d) distribution of dihydroxyoctacosanoate (m/z 455.4103) over the external surface containing strophiole and hilum; matrix free MSI measurement. Colors in the mass images, i.e., (b,d), correspond with intensity of particular HLFA markers (their amounts on seed coat surface) in MS spectra (yellow reflects the highest signal and black the lowest one as displayed by inserted color scales).

These differences should be related to anatomical structure—presence of chemically different surface layers (e.g., counterpalisades in hilum area) [4]. Our data point to a possible relationship of strophiole and hilum to the water uptake. Those two anatomical parts were already suggested to play a role during imbibition by Karaki et al. [33]. We should remind that no signal of those hydroxylated fatty acids was observed on internal surface (see Figure 3c,d) of dormant/nondormant testa at the same experimental conditions confirming that the changes in HLFA distribution in seed coat are related only to its outermost layers. Consequently, LDI-MSI was used for analysis of HLFA in seed coat cross-sections. These experiments showed that HLFA signals are not present inside of seed coat tissue (Figure 3e,f). The extracellular lipids rich in hydroxylated fatty acids located in the outermost layers of dormant seed coats are probably connected with blocking effect of seed coat to water transport into the endosperm. Hydrophobic effect might be enhanced with structure crosslinking of hydroxyl groups parted on the carbon chain with carboxyl functional group. The distribution of common non-hydroxylated fatty acids over the all seed coat surface is homogenous and their signals are higher in dormant JI64 compared to nondormant JI92. It should be emphasized that the signal of non-hydroxylated fatty acids in strophiole and hilum is not as different from the rest of surface as it is observed in the case of HLFA (supplementary material, Figure S6). This fact could point out the higher significance of HLFA surface distribution with respect to dormancy compared to the distribution of non-hydroxylated FA.

2.3. LDI-MS Analysis of HLFA in Recombinant Inbred Lines (RILs)

As previously discussed, our analyses clearly confirmed the significantly higher content of HLFA in seed coat surface of dormant (wild) JI64 genotype compared to non-dormant (domesticated) ones.

However, the composition of seed coat (including the fatty acid profile) can be predetermined not only by reproduction regulatory mechanism (physical dormancy) but also by other adaptation traits, i.e., protection from predators, fungi, physicochemical properties of environment. Variance in chemical composition among particular genotypes is expressive as reflected also by visible differences in seed coat morphology. As indicated above, there are certain genotypes relatively similar in morphology but differing strongly in dormancy levels, i.e., JI64 and JI92. Further elimination of differences in another properties and preservation of differences in dormancy at the same time can be achieved genetically by cross of those two genotypes and establishment of recombinant lines (RILs) [5]. The potential of the "RILs approach" for mapping have been demonstrated by Bagheri et al. which used recombinant inbred line (RIL) population for study of *Brassica rapa* seed metabolites. [34].

The seeds from the sufficiently genetically homozygous sixth generation of phenotypically evaluated RILs were analyzed by LDI/MS and LDI/MSI methods. Figure 5a shows signal intensities of HLFA on the seed coat surface of chosen RIL pea genotypes placed in order of increasing dormancy percentage.

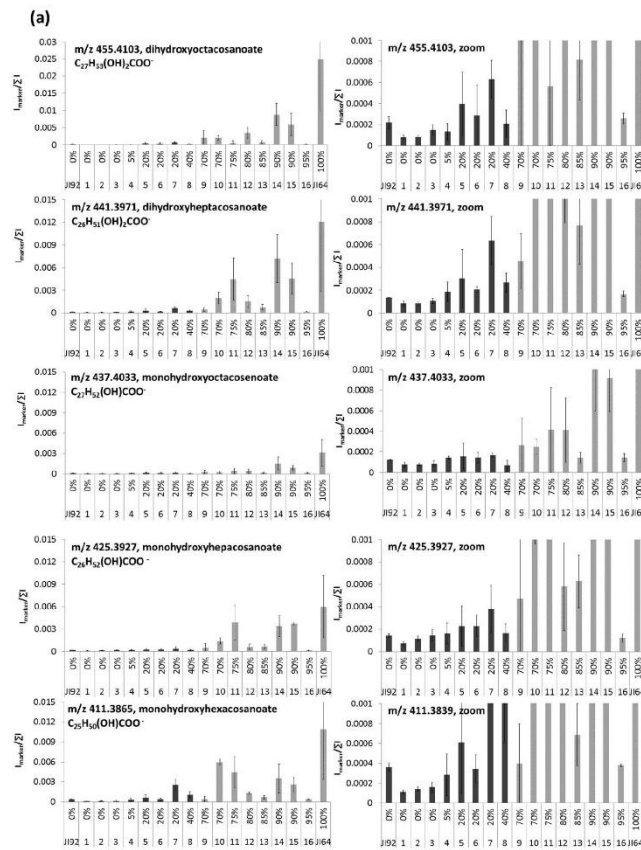


Figure 5. Cont.

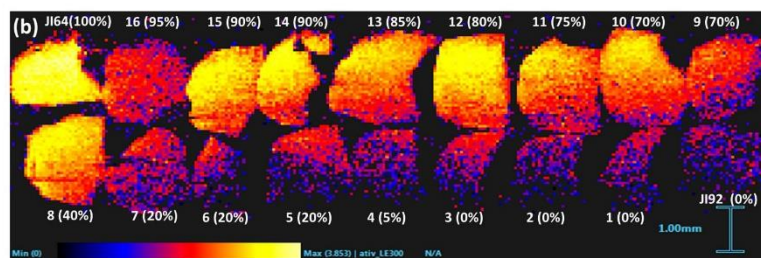


Figure 5. Relationship of HLFA signals to the dormancy level of JI64, JI92 and respective recombinant inbred lines. (a) signals of individual hydroxylated long chain fatty acids in parent genotypes and RILs obtained by LDI-MS measurement, black bars denote non-dormant and gray ones dormant lines; signal is expressed as an average of normalized intensities of four repeated measurements; (b) distribution of dihydroxyoctacosanoate on the RILs' surface; numbers at x-axis denote particular RIL lines (1–16), numbers given above the codes of lines in graphs or in parenthesis in mass images, respectively, reflect the dormancy level in percents.

Generally, the higher dormancy level the higher signal of HLFA is obtained. There are only several exemptions from that rule that deserve a further biological study. Those differences are easily visible from simultaneous mass image (Figure 5b and Figure S7d–h). The distribution of fatty acids over the seed coats of RILs is mostly homogeneous except of strophiole and hilum parts of dormant RILs. Those findings strongly support the significance of HLFA for regulation of water uptake by seed and early stages of germination. Our results are in agreement to the recent work of Chai et al. that studied the differences between *Medicago truncatula* wild (D) and mutant (N) seeds and revealed significant reductions in content of long chain acids (especially 18:2 18-OH at individual monomer level) in non-dormant mutants [35].

Note that also palmitic, stearic and oleic acids exhibit some differences among dormant and non-dormant RILs (Figures S7a–c and S8) although, due to missing hydroxyl groups in their chain, their role in extracellular lipid composition is probably somewhat different (they provide only terminal hydrophobic instead of connecting chains of HLFA).

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Methanol (gradient grade), palmitic acid (p.a.), oleic acid (p.a.), 2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate (THAP, p.a.), 4-aminoquinoline (AQ, p.a.), acetone (for HPLC), acetonitrile (gradient grade) and red phosphorus (p.a., standard for TOF calibration) were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Ultrapure water from Milli-Q apparatus (Merck, Kenilworth, NJ, USA) was used for preparation of all solutions.

3.2. Plant Material

Seeds of *Pisum species*, namely wild dormant (D) pea *Pisum sativum* subsp. *elatius* (JI64, VIR320, L100) and cultivated non-dormant (N) *Pisum sativum* subsp. *sativum* (JI92, Cameor, Terno) [5] were used. *P. elatius* JI64 originates from Turkey and JI92 is cultivated Afghan landrace (e.g., primitive local type) *P. sativum* (both from John Innes Pisum Collection, Norwich, UK). L100 genotype originates from Israel. Wild *P. elatius* VIR320 is from Vavilov Institute Research of Plant Industry (St. Petersburg, Russia) and was used previously for incompatibility study [36]. Cultivated *P. sativum* cv. Cameor (used for pea genome sequencing) originates from INRA France while Czech cv. Terno is commonly used in cultivation and represents modern variety. Cross of cv. Terno with L100 is being used for

establishment of introgression lines [37] while F₆ (sixth generation) recombinant inbred lines (RILs) derived from JI64 and JI92 cross [38] were used for genetic mapping and transcriptomic analysis [5]. JI64 and JI92 pair is less contrasting in term of visual seed coat appearance [4,5] except of differences in seed coat permeability and dormancy. Plants were cultivated in controlled glasshouse conditions during February–April (2016, 2017) and mature seeds were manually harvested.

Mature pea seeds (*Pisum* sp.) were air dried and stored at laboratory temperature in a dark and dry place until the analysis. The dormancy of particular genotypes and lines was measured by standard method [5]. Briefly, twenty five seeds per line were incubated in Petri dishes (9 cm diameter) over two layers of medium speed qualitative filter papers (Whatman, Maidstone, UK, grade 1) wetted with 3 mL of tap water and incubated in a 25 °C incubator in darkness. Imbibition was scored at 24 h intervals based on changes in seed swelling and germination was determined based on the radicle breaking through seed coat. Non germinated seeds were mechanically scarified after 60 days to determine the percentage of viable seeds.

3.3. Sample Preparation for Surface Analysis

Seed coats were mechanically separated from embryos and broken into small pieces. These small pieces (approx. 2 mm in diameter) were fixed on stainless steel MALDI plate with outer surface facing up using a double sided tape (Ulith, Prague, Czech Republic). Six repetitions of each genotype/line were measured. The samples with internal surface oriented up were analyzed for comparison as well. Samples were analyzed directly in dry, intact state (LDI-MS) or after spraying with matrix (MALDI-MS; THAP matrix: 1 mg/mL, dissolved in acetonitrile:water, *v:v*, 1:1 for positive ion mode; AQ matrix: 1 mg/mL, dissolved in acetone for negative ion mode). The matrix solution was sprayed using standard SunCollect sprayer (SunChrom GmbH, Friedrichsdorf, Germany) on the seed coat samples in successive six layers.

For study of distribution of analytes on cross-section (vertical distribution), samples of seed coats were dissected from dry seed and saturated with 2% sucrose solution under vacuum. Equal volume of cryo-gel (Cryomatrix Shandon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to the sample and shaken overnight to improve subsequent sectioning. Saturated samples were mounted into cryo-gel on the alum chuck, frozen down to −25 °C and cut into 20 μm transversal sections [39]. The prepared slices were put on the normal glass slide. The prepared glass slides were stored at laboratory temperature at dark and dry place until analysis.

3.4. Instrumentation

Measurements were done using a high resolution tandem mass spectrometer equipped with a vacuum MALDI ion source, a hybrid QqTOF mass analyzer and an ion mobility cell (Synapt G2-S, Waters, Milford, MA, USA). The MALDI source was equipped with a 350 nm 1 kHz Nd:YAG solid state laser. Mass spectra were collected in positive and negative ionization modes in mass range 50–1200 Da. The effect of laser energy was studied in the range 300–450 and laser step rate in the range 1–30, Hexapole RF amplitude in the range 250–450 V and sample plate voltage in the range 0–25 V. MALDI Extraction voltage was set at 10 V, Hexapole Bias at 10 V and Aperture at 5 V. (MA) LDI-MS analyses were performed for 6 min (300 scans were collected). Acetone solution of red phosphorus was used for TOF calibration (supernatant of suspension prepared at concentration 1 mg/mL). The control of the mass spectrometer and data collection were performed using MassLynx 4.1 software (Waters, Milford, MA, USA). Trap collision energy (TrapCE) was set to 4 eV and transfer collision energy to 2 eV for MS scan. For MS/MS experiments the effect of collision energy in both collision cells on the yield of fragments was tested in the range 10–50 eV (the optimal values for particular experiments are given in Results and Discussion). The exact mass measurement involved external calibration and automatic lock mass measurement (correction) using red phosphorus (see above). Spectra for lock mass correction were collected as a part of each analysis prior to seed sample measurement. The identification of

selected markers (signals differing significantly between dormant and non-dormant samples) was based on exact mass measurement and consequent target MS/MS experiments.

Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry (LDI-MSI)

LDI-MSI technique was used for analysis of surfaces as well as cross sections of seed coats. HDImaging software (version 1.4, Waters) was used for the setup of experiment and the data collection. The LDI-MSI measurement of seed coat surface was taken in negative ionization mode with 60 μm laser beam size. Four laser energies (200, 250, 300, 350) were tested in order to find the highest yield of signals of studied markers (details are given in Results and Discussion). Laser repetition rate was set at 1000 Hz and scan time at 1 s. The Hexapole RF Amplitude was the same as given in Results and Discussion. Filtration of low abundant signals was applied during measurement to decrease the number of datapoints (the number of the most intense peaks included in raw datafile was set to 300,000 and the signal threshold was set to 10 counts). No matrix was used for MSI experiments.

3.5. Data Processing

The raw MS data were firstly processed by MarkerLynx XS software that is an extension of MassLynx platform (Waters). This software provided extraction, normalization and alignment of data (creation of data matrix). Parameters of optimized MarkerLynx XS method were set as follows: marker intensity threshold 1000 (optimal value for resolution of dormant and non-dormant species in PCA plot), peak separation 0.05 Da, mass range 50–1200 Da. “Combined Scan Range” was used as the type of analysis. The obtained data matrices were studied by multivariate statistics. Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) were applied using EZinfo software (version 2.0, Umetrics, Malmö, Sweden) with Univariate or Pareto scaling. Significance of obtained markers was evaluated according to their position in appropriate S-plots.

4. Conclusions

LDI-MS in combination with PCA and OPLS-DA proved to be a useful tool for the classification (distinction) of dormant and non-dormant genotypes of pea by the direct analysis of seed coat outer surface. Minimum sample treatment is necessary, even the application of matrix can be omitted and seeds can be analyzed in dry (inactive) state. Particular dormant genotypes exhibited strong differences in signals of dormancy markers suggesting differences in the process of their water imbibition. Detailed study of morphologically similar but in dormancy levels strongly different pair of genotypes, i.e., JI64 and JI92 and derived RILs, revealed significant differences in content of hydroxylated long chain fatty acids (ranging from C26 to C28). Significantly higher signals of HLFA were found in dormant JI64 and dormant RIL lines.

The effect of experimental conditions on the signal of HLFA was studied in detail. Application of matrix caused mechanical changes of samples and matrix free analysis provided better results. Hexapole RF amplitude, sample plate voltage, laser energy and laser step rate appeared to be significant LDI parameters for HLFA signal and their values were optimized. Ion mobility experiments allow effective filtration of HLFA signals from ballast ones. Laser desorption/ionization mass imaging experiments reveal homogeneous distribution of HLFA on the outer seed coat surface with the exemption of strophiole and hilum in JI64 seed coat that show significantly lower content of HLFA. Analysis of JI64–JI92 recombinant inbred lines strongly supports the relation of physical dormancy with the distribution of HLFA. The obtained information contributes to a deeper insight into the mechanism of water absorption by seed that is important also for food and agricultural research.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2196/s1.

Acknowledgments: The support of the Czech Science Foundation (14-11782S and 16-21053S), Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LO1305) and Palacký University Olomouc (IGA_PrF_2017_020) is gratefully acknowledged.

Author Contributions: Conceived and designed experiments: Aleš Soukup, Petr Smýkal and Petr Bednář. Performed experiments: Monika Cechová, Iveta Hradilová and Anna Janská. Analyzed the data: Monika Cechová, Iveta Hradilová, Anna Janská, Markéta Válková, Aleš Soukup, Petr Smýkal and Petr Bednář. Wrote the paper Aleš Soukup, Petr Smýkal, Petr Bednář and Monika Cechová. All authors have read and approved the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Rodríguez-Gacio, M.C.; Matilla-Vázquez, M.A.; Matilla, A.J. Seed dormancy and ABA signaling. *Plant Signal. Behav.* **2009**, *11*, 1035–1048. [[CrossRef](#)]
- Bentsink, L.; Koornneef, M. Seed Dormancy and Germination. *Arabidopsis Book* **2008**, *6*, e0119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Finch-Savage, W.E.; Leubner-Metzger, G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* **2006**, *171*, 501–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Smýkal, P.; Vernoud, V.; Blair, M.W.; Soukup, A.; Thompson, R.D. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 351. [[PubMed](#)]
- Hradilová, I.; Trněný, O.; Válková, M.; Cechová, M.; Janská, A.; Prokešová, L.; Aamir, K.; Krezdorn, N.; Rotter, B.; Winter, P.; et al. A combined comparative transcriptomic, metabolomic and anatomical analyses of two key domestication traits: Pod dehiscence and seed dormancy in pea (*Pisum* sp.). *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shao, S.; Meyer, C.J.; Ma, F.; Peterson, C.A.; Bernards, M.A. The outermost cuticle of soybean seeds: Chemical composition and function during imbibition. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 1071–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wada, S.; Kennedy, J.A.; Reed, B.M. Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Sci. Hort.* **2011**, *130*, 762–768. [[CrossRef](#)]
- Vu, D.T.; Velusamy, V.; Park, E. Structure and chemical composition of wild soybean seed coat related to its permeability. *Pak. J. Bot.* **2014**, *46*, 1847–1857.
- Fernandez, H.; Doumas, P.; Bonnet-Masimbert, M. Quantification of GA1, GA3, GA4, GA7, GA8, GA9, GA19 and GA20; and GA20 metabolism in dormant and non-dormant bechnuts. *Plant Growth Regul.* **1997**, *22*, 29–35. [[CrossRef](#)]
- Metzger, J.D. Role of Endogenous Plant Growth Regulators in Seed Dormancy of *Avena fatua*: II. Gibberellins. *Plant Physiol.* **1983**, *73*, 791–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- MacGregor, D.R.; Kendall, S.L.; Florance, H.; Fedi, F.; Moore, K.; Paszkiewicz, K. Seed production temperature regulation of primary dormancy occurs through control of seed coat phenylpropanoid metabolism. *New Phytol.* **2015**, *205*, 642–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kanya, T.C.S.; Rao, L.J.; Sastry, M.C.S. Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1552–1557. [[CrossRef](#)]
- Kim, Y.J.; Lee, S.; Lee, H.M.; Lee, B.W.; Ha, T.J.; Bae, D.W.; Son, B.; Kim, Y.H.; Beak, S.; Kim, Y.C.; et al. Comparative proteomics analysis of seed coat from two black colored soybean cultivars during seed development. *Plant Omics.* **2013**, *6*, 456–463.
- Van Malderen, S.J.M.; Laforce, B.; Van Acker, T.; Vincze, L.; Vanhaecke, F. Imaging the 3D trace metal and metalloids distribution in mature wheat and rye grains via laser ablation-ICP-mass spectrometry and micro-X-ray fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2017**, *2*, 289–298. [[CrossRef](#)]
- Kumar, P.M.; Srimany, A.; Ravikanth, G.; Shaanker, R.U.; Pradeep, T. Ambient ionization mass spectrometry imaging of rohitukine, a chromone anti-cancer alkaloid, during seed development in *Dysoxylum binectariferum* Hook.f (Meliaceae). *Phytochemistry* **2015**, *116*, 104–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jiang, J.; Shao, Y.; Li, A.; Zhang, Y.; Wei, C.; Wang, Y. FT-IR and NMR study of seed coat dissected from different colored progenies of *Brassica napus*–*Sinapis alba* hybrids. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 1898–1902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Yan, H.; Hua, Z.; Qian, G.; Wang, M.; Du, G.; Chen, J. Analysis of the chemical composition of cotton seed coat by Fourier-transform infrared (FT-IR) microspectroscopy. *Cellulose* **2009**, *16*, 1099–1107. [[CrossRef](#)]
18. Glidewell, S. NMR imaging of developing barley grains. *J. Cereal Sci.* **2006**, *43*, 70–78. [[CrossRef](#)]
19. Horn, P.J.; Korte, A.R.; Neogi, P.B.; Love, E.; Fuchs, J.; Strupat, K.; Borisjuk, L.; Shulaev, V.; Lee, Y.; Chapman, K.D. Spatial Mapping of Lipids at Cellular Resolution in Embryos of Cotton. *Plant Cell* **2012**, *24*, 622–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lesiak, A.D.; Cody, R.B.; Dane, A.J.; Musah, R.A. Plant Seed Species Identification from Chemical Fingerprints: A High-Throughput Application of Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 8748–8757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gallardo, K.; Signor, C.L.; Vandekerckhove, J.; Thompson, R.D.; Burstin, J. Proteomics of Medicago truncatula Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. *Plant Physiol.* **2003**, *133*, 664–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Dam, S.; Laursen, B.S.; Ørnfelt, J.H.; Jochimsen, B.; Staerfeldt, H.H.; Friis, C.; Nielsen, K.; Goffard, N.; Besenbacher, S.; Krusell, L.; et al. The Proteome of Seed Development in the Model Legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1325–1340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Peukert, M.; Matros, A.; Lattanzio, G.; Kaspar, S.; Abadía, J.; Mock, H.P. Spatially resolved analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI). *New Phytol.* **2012**, *193*, 806–815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bhandari, D.R.; Wang, Q.; Friedt, W.; Spengler, B.; Gottwald, S.; Römpf, A. High resolution mass spectrometry imaging of plant tissues: Towards a plant metabolite atlas. *Analyst* **2015**, *140*, 7696–7709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gorzalka, K.; Kölling, J.; Nattkemper, T.W.; Niehaus, K. Spatio-Temporal Metabolite Profiling of the Barley Germination Process by MALDI MS Imaging. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Worley, B.; Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* **2013**, *1*, 92–107. [[PubMed](#)]
27. Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjöström, L.; Mellerowicz, E.J.; Edlund, U.; Shockcor, J.P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 115–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Pirkel, A.; Meier, M.; Popkova, Y.; Letzel, M.; Schnapp, A.; Schiller, J.; Dreisewerd, K. Analysis of Free Fatty Acids by Ultraviolet Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Using Insect Wings as Hydrophobic Sample Substrates. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10763–10771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Budimir, N.; Blais, J.C.; Fournier, F.; Tabet, J.C. The use of desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry for the detection of negative ions for fatty acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 680–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Shroff, R.; Muck, A.; Svatoš, A. Analysis of low molecular weight acids by negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3295–3300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Nilsson, T.; Martínez, E.; Manresa, A.; Oliw, E.H. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of 7,10-dihydroxyoctadecenoic acid, its isotopomers, and other 7,10-dihydroxy fatty acids formed by *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 777–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kerwin, J.L.; Torvik, J.J. Identification of Monohydroxy Fatty Acids by Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 56–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Karaki, T.; Watanabe, Y.; Kondo, T.; Koike, T. Strophiole of seeds of the black locust acts as a water gap. *Plant Species Biol.* **2012**, *27*, 226–232. [[CrossRef](#)]
34. Bagheri, H.; El-Soda, M.; Kyong Kim, H.; Fritsche, S.; Jung, C.; Aarts, M.G.M. Genetic Analysis of Health-Related Secondary Metabolites in a *Brassica rapa* Recombinant Inbred Line Population. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 15561–15577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Chai, M.; Zhou, C.; Molina, I.; Fu, C.; Nakashima, J.; Li, G.; Zhang, W.; Park, J.; Tang, Y.; Jiang, Q.; et al. A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 6997–7002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bogdanova, V.S.; Galieva, E.R.; Yadrinkinskiy, A.K.; Kosterin, O.E. Inheritance and genetic mapping of two nuclear genes involved in nuclear–cytoplasmic incompatibility in peas (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.* **2012**, *124*, 1503–1512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Zablazková, L.; Smýkal, P. Establishment of wild pea *Pisum fulvum* and *Pisum elatius* chromosome segment substitution lines in cultivated *P. sativum* genetic background. In Proceedings of the 5th International Conference on Next Generation Genomics and Integrated Breeding for Crop Improvement, Telangana, India, 18–20 February 2015; pp. 66–67.
38. North, H.; Casey, R.; Domoney, C. Inheritance and mapping of seed lipoxygenase polypeptides in *Pisum*. *Theor. Appl. Genet.* **1989**, *77*, 805–808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Soukup, A.; Tylová, E. Essential Methods of Plant Sample Preparation for Light Microscopy, Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1080*, 1–23. [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Utilization of atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for analysis of fatty acids on seed surface

Monika Cechová¹ · Iveta Hradilová² · Petr Smýkal² · Petr Barták¹ · Petr Bednář¹

Received: 7 November 2018 / Revised: 6 December 2018 / Accepted: 10 December 2018 / Published online: 7 January 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Atmospheric solids analysis probe mass spectrometry (ASAP-MS) was used for the first time for direct surface analysis of plant material. It can be readily used for surface analysis of whole and intact pea seeds and their seed coats, and for the study of the profile of fatty acids on the outer surface. Furthermore, ASAP-MS in combination with multivariate statistics allowed classification of pea genotypes with respect to physical dormancy and investigation of related biological markers. Hexacosanoic and octacosanoic acids were suggested to be important markers likely influencing water transport through the seed coat into the embryo (with the highest significance for dormant L100 genotype). ASAP-MS provided higher selectivity and better signal of fatty acids compared to (MA)LDI-MS (laser desorption ionization mass spectrometry either matrix free or matrix assisted) providing on the other hand spatial distribution information and results obtained by both methods are mutually supportive. The developed ASAP-MS method and obtained results can be widely utilized in biological, food, and agricultural research.

Keywords Atmospheric solids analysis probe · Mass spectrometry · Fatty acid · Pea · Physical dormancy · Legume seed

Introduction

Seed coat (testa) plays crucial role in seed development from the imbibition to final steps of germination. It acts as a physical barrier between embryo and the environment. As such, it affects seed dormancy, regulates water, oxygen, and nutrients uptake and protects embryo from its predators and diseases [1, 2]. Seed properties are to a great extent determined by seed coat chemical composition. Chemical composition of the whole seed (“average composition”) was investigated in many studies including monitoring of number of metabolites in different stages of development. Concerning its significance for human nutrition, the composition of embryo and endosperm is relatively

well explored for many species. Compared to this, the composition of seed coat is studied considerably less and development of fast and selective techniques allowing its analysis without a complicated sample treatment is highly requested in many biological, food, and agricultural branches.

Several approaches have been applied for this task so far. Perhaps the oldest are histochemical procedures, mostly based on chemical staining and (often microscopic) observation of changes in color and fluorescence [3]. On the other hand, conventional analytical techniques involving sample homogenization/extraction, i.e., gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC), and their hyphenation with mass spectrometry (MS), have been used [4, 5]. The main drawbacks of these methods involve relatively laborious sample preparation, a risk of incomplete extraction of analytes (especially in untargeted studies involving generic procedures) and artifacts formation during contact with extraction media [6–8]. LC studies are usually focused on phenolic [9–14] and other seed coat metabolites [15, 16]. Takahata et al. studied phenolic metabolites present in the seed coat of several soybean varieties by LC [17]. GC/MS was used for profiling of lipophilic compounds in seed coat including fatty acids and cuticle wax components [18–20]. Shao et al. used GC/FID and GC/MS for analysis of cuticle waxes after partial pectinase digestion of cotton seed coat [21]. The utilization of Fourier transformation

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1551-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Petr Bednář
petr.bednar@upol.cz

¹ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

² Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

infrared micro-spectroscopy for the study of waxes and other lipophilic structures in testal layers was also reported [22]. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) is another commonly used technique for plant material analysis. It allows even direct analysis of very small parts of plant tissues (see review by Kaspar et al. [23] and paper by Korte et al. [24], for instance). Besides, the technique allows studying the distribution of particular tissue components on the surface or in prepared sections, i.e., mass spectrometry imaging [25–27]. (MA)LDI-MS (laser desorption ionization mass spectrometry either matrix free or matrix assisted) was recently used for fatty acids profiling in pea seed coat by our group [2, 28].

Atmospheric solids analysis probe mass spectrometry (ASAP-MS) is a popular and fast technique allowing the analysis of volatile and semi-volatile liquids, extracts, and solid materials for roughly a decade [29]. Sample preparation for this technique is usually very easy. Material to be analyzed is deposited on a capillary glass tube and placed into atmospheric-pressure chemical ionization source. Heated nitrogen gas stream vaporizes the sample components that are ionized by corona discharge. The technique became popular especially in petroleomics [30] and characterization of polymers [31]. Interesting applications appeared in the analysis of drugs [32], biological liquids [33, 34], historical samples [35], and many others. The ASAP-MS technique was several times used for analysis of plant materials. McEwen et al. showed qualitative ASAP-MS analysis of steroids in fresh tomato skin, mint leaves, flowers, and pepper pods [36]. Chen et al. analyzed skin irritant in henna products and results from ASAP-MS measurement were confirmed by UPLC/MS [37]. Besides, the technique was used for characterization of flavonoids in pollens [38], pesticides in vegetables [39], and cereal grains [40]. Other papers deal with analysis of extracts from various plant materials, i.e., lignins from *Stipa tenacissima* [41], bio-oils from pyrolysis of rice husk [42], and cell cultures (fungal cells) [43]. To the best of our knowledge, there is no study in the literature dealing with ASAP-MS analysis of legume seeds.

Our study deals with potential of ASAP ionization in combination with high-resolution tandem mass spectrometry and ion mobility separation for direct analysis of fatty acids present in pea seed coats. ASAP ionization technique is used for the first time for this purpose. In addition, the developed method and obtained data are compared with (MA)LDI-MS as a common technique used for direct plant material analysis (without solvent extraction). Some of the detected compounds have proven to be of a key importance for seed germination control. That way, the presented study firstly evidences the possibility to use ASAP-MS for the study of seed dormancy in general which is important for biological and agricultural research and practice.

Materials and methods

Chemicals and plant material

Acetone (for HPLC), 5-aminoquinoline ($\geq 99.0\%$, GC), 9-aminoacridine ($\geq 99.5\%$, HPLC), hexane (for HPLC, $\geq 95\%$), methanol (gradient grade), acetonitrile (gradient grade), red phosphorus ($\geq 99.99\%$), sodium formate ($\geq 99\%$), hexacosanoic acid, and octacosanoic acid were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Red phosphorus (suspension in acetone, 1 mg mL^{-1}) and sodium formate (0.34 mg mL^{-1} , prepared by mixing of $100 \mu\text{L}$ 0.1 M NaOH with $200 \mu\text{L}$ of 10% formic acid and 20 mL of mixture acetonitrile:water, $80:20$, v/v) were used for TOF calibration in MALDI and ASAP experiments, respectively. Studied pea seeds and seed coats, i.e., *Pisum sativum subsp. elatius* (L100, JI64, VIR320, wild, all dormant (D)) and *Pisum sativum subsp. sativum* (JI92, Cameor, Temo, all non-dormant (N)) originating from several genebanks [2], were obtained from plants grown in 5 l pots with peat-sand (90:10) substrate mix (Florcom Profi, BB Com Ltd. CZ), in glasshouse conditions (January–May 2017) day/night temperature of $35\text{--}20/15\text{--}12 \text{ }^\circ\text{C}$, and a natural photoperiod increasing from 6 to 14 h without supplementary light (campus of Palacký University, Olomouc, CZ). After the harvest, mature seeds were cleaned from pods, dried at room temperature, and packed in paper bags until analysis. The seeds harvested from plants grown under the same conditions and from the same year harvest were tested.

Material preparation for ASAP-MS and MALDI-MS analysis

Composition of pea seed coats was analyzed by ASAP-MS either in intact form (the whole seeds were placed into ion source) or after separation from embryo and mechanical disruption of seed coat into small parts. The attachment of whole seeds and seed coats in ASAP probe is shown in Fig. 1. The standard glass tube used for ASAP-MS measurement was shortened by cutting off its closed ends and a clear thin copper wire (diameter $100 \mu\text{m}$) was protruded through the glass tube to hold the analyzed material. A small four-armed wire cage was created to safely hold intact pea seed in ion source (Fig. 1a). The preparation of seed coat parts involved peeling off the seed coats from seeds, their disruption and careful manual fractionation of the disrupted parts to obtain pieces $2 \times 2 \text{ mm}^2$, $3 \times 3 \text{ mm}^2$, and $4 \times 4 \text{ mm}^2$ (see Electronic Supplementary Material (ESM) Fig. S1). Each such piece was weighed before measurement. A thin copper wire hooklet was used to hold seed coat part (disrupted piece) as can be seen on Fig. 1b. All seed coat samples were measured in the same orientation and direction (a sample cone was on the left, corona needle on the right side, and seed coat parts were

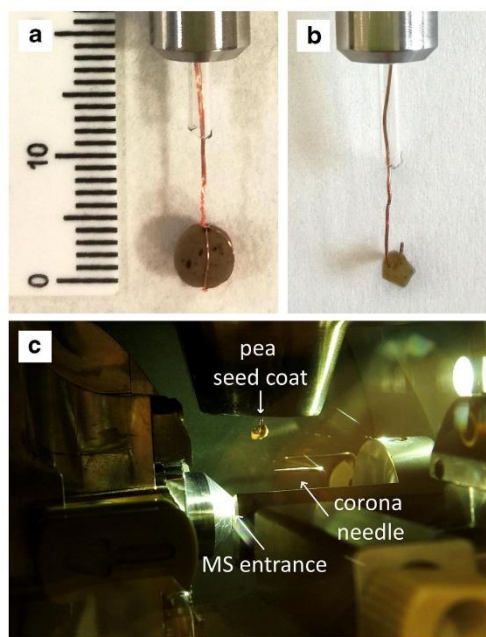


Fig. 1 Pea seed and seed coat sample attachment used in ASAP-MS measurements. **a** Small cage with the whole seed. **b** Hooklet with prepared seed coat part. **c** Position of seed coat in ASAP ion source

inserted between those two parts with external seed coat layer facing to an operator; see Fig. 1c). Seed coat material for MALDI-MS was prepared according to our previous paper [28]. Briefly, small pieces of seed coats separated from embryo were attached on MALDI plate with a common double-sided adhesive tape (Ulith, Prague, Czech Republic). They were analyzed either without matrix or covered homogeneously with matrix solution (SunCollect sprayer, SunChrom GmbH, Friedrichsdorf, Germany). The experiments were reproduced multiple times (at least 4 times) for each genotype and seed coat size.

Instrumentation, parameters, and data processing for ASAP and MALDI mass spectrometry

All experiments were performed using Synapt G2-S high-resolution tandem mass spectrometer (Waters Corp, Milford, MA, USA) equipped with an ASAP and a vacuum MALDI ion sources, a hybrid QqTOF mass analyzer, and T-wave ion mobility cell. Analyses were performed in negative ionization mode. For ASAP-MS, the setup of probe temperature, corona current, and desolvation gas was optimized in the range 100–600 °C, 0–25 μA , and 0–800 L h^{-1} , respectively. Optimal setup was then as follows: probe temperature 400 °C, source

temperature 120 °C, corona voltage 2 kV, corona current 5 μA , source gas flow at 0 mL min^{-1} , cone gas flow at 50 L h^{-1} , desolvation gas flow at 400 L h^{-1} . ASAP-MS spectra were collected 3 min for each analysis in the mass range 50–1000 Da. Trap collision energy (TrapCE) was set to 4 eV and transfer collision energy (TransferCE) to 2 eV for MS scan. TransferCE for MS/MS measurement was set to 30 eV (optimized value).

The MALDI source was equipped with a 350-nm 1 kHz Nd:YAG solid state laser. (MA)LDI-MS measurement was performed with the laser energy set at 350 (dimensionless parameter) and laser step rate set at 30. Hexapole RF amplitude was set at 350 V, sample plate voltage at 20 V, MALDI extraction voltage at 10 V, hexapole bias at 10 V, and aperture at 5 V. TrapCE was set to 4 eV and transfer collision energy to 2 eV for MS scan. Mass spectra were collected in negative ionization mode in mass range 50–1200 Da. Seed coats were fixed on standard stainless steel MALDI plate. More details on MALDI-MS experiments are described in recent paper of our group [28]. The control of the mass spectrometer and data collection were performed using MassLynx 4.1 software (Waters, Milford, MA, USA). The raw MS data were processed by MarkerLynx XS software (software extension of MassLynx platform, Waters). Principal component analysis (PCA) and orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) were applied on the data using EZinfo software (version 3.0, Umetrics, Malmö, Sweden) with Pareto scaling and marker intensity threshold set on 1000.

Preparation of fatty acids solutions and pea seed coat extracts for ASAP-MS

Standard solutions of hexacosanoic (C26) and octacosanoic (C28) acids were prepared in concentrations 1, 10, 100, and 200 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Calibration solutions were analyzed using a glass capillary with smaller external (1.18 mm) and internal (60 μm) diameter compared to standard capillary supplied with ASAP probe (i.e., that with external diameter 1.90 mm and internal diameter 1.50 mm). The length of the used glass capillary was 100 mm. The open capillary allowed sucking of a small volume of sample solution (approx. 1 μL) by capillary forces.

The pea extracts for the measurement were prepared as follows. A dried seed coat was carefully peeled off the embryo and weighed. The separated pieces of six seed coats (removed from six seeds) of particular genotype were homogenized by grinding in a ball mill (Pulverisette 23, Fritsch, Germany) and lipophilic components were extracted with hexane (70 mg of seed coat powder with 1 mL of the solvent) at room temperature for 3 h in a shaker (GFL 3006, GFL, Germany). Supernatant was then separated from sediment by centrifugation (5 min, 14,000 rpm, Eppendorf Minispin, Eppendorf,

Germany). Five hundred microliters of supernatant was evaporated under a fine stream of nitrogen and the resulting residue was redissolved in 10 μL of hexane to concentrate the extract in a defined way. One microliter of the concentrated extract was loaded into the modified glass capillary. Each extract was measured four times. The capillary was properly washed with hexane before each sample loading. The intensity of appropriate signal (at particular m/z) was read from MS spectrum obtained by summation of data points over the whole measurement (analysis time 3 min, scan time 0.5 s, interscan time 0.015 s). The quantitation of extractable fatty acids was done using calibration curve constructed from measurement of calibration solutions of particular fatty acids. Note that before the treatment of seeds the seed diameter of each seed was measured for consequent surface area calculation.

Quantification using standard addition

A mixture of C26 and C28 standards was prepared at concentration levels (0.25; 0.5 and 1 mg mL^{-1} for each standard compound). Each standard solution (containing both fatty acids and internal standard) was spotted on individual whole pea seed (10 μL on each seed, applied repeatedly 10 times of 1 μL for better drying). Measurement was performed in seven repetitions (seven seeds for each calibration point). The seed attachment and experimental parameters are given above in the “Material preparation for ASAP-MS and MALDI-MS analysis” section. Dibromogallic acid that is not present naturally in the pea seed coats was chosen as internal standard to check response variation during measurements. It is sufficiently volatile under the used conditions and has characteristic isotopic pattern. The same amount of dibromogallic acid was added to each measured solution and applied on each measured seed (1 mg mL^{-1} , 1 μL).

Results and discussion

ASAP-MS measurement and mass spectra interpretation

ASAP-MS is a simple but powerful direct technique for the rapid analysis of volatile compounds. Our experiments show that ASAP easily releases and ionizes long-chain saturated fatty acids, LFA (i.e., hexacosanoic and octacosanoic acids) from standard solutions, and pea seed coat extracts as well as directly from the seed coat tissues. Especially the possibility to analyze the whole, compact, and non-disrupted seed is attractive for the study of seed surface with virtually no influence of inner parts and layers of seed coats and embryo. Figure 2 shows full MS spectrum of the whole seed, separated piece of seed coat and standards of hexacosanoic and octacosanoic acid. Note that palmitic acid as a quite common fat component

was found in ASAP-MS spectra of all pea genotypes, its presence was confirmed by analysis of authentic standard, and it was detected as a minor component also in hexacosanoic and octacosanoic acid standards. We suggest that the signal of palmitic acid can be used for the control of exact mass measurement correctness or directly for lock mass correction during LFA analysis. LFAs were observed as deprotonated molecules in MS spectra (i.e., $[\text{M-H}]^-$ ions). Even though several papers have dealt with the analysis of fat components in oils, free long-chain fatty acids were not studied directly in plant material. This result is therefore the first evidence of the possibility to analyze free (non-esterified) fatty acids by ASAP-MS. The deviation of measured mass from theoretical value was calculated from elemental composition (dtm) and expressed in ppm. Hexacosanoic ($\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{COO}^-$) and octacosanoic acid ($\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{COO}^-$) provided signals at m/z 395.3907 and 423.4229 corresponding with dtm 4.55 ppm and 6.38 ppm, respectively.

Consequently, fragmentation processes occurring during collision-activated dissociation were studied in tandem mass spectra (ASAP-MS/MS) for identification purposes. Concerning the structure of the molecule possessing only one carboxyl group a simple fragmentation can be expected (and vice-versa a rich fragmentation would point out the presence of a structurally different compounds). The fragmentation of hexacosanoic acid involves a loss of water providing the fragment at m/z 377.3773 (dtm = -2.65 ppm) and a consequent loss of C_3H_6 that gives rise to dominant fragment at m/z 335.3307 (suggested elemental composition $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{O}^-$, dtm = -2.09 ppm). This process can be tentatively explained by the cleavage of three-carbon chain in the form of propylene. MS/MS experiments were also done with real samples (seed coats) and analogous fragments were observed (e.g., fragments at m/z 377.3750 and 335.3311 in the case of L100 seed coats; dtm -8.74 ppm and -0.89 ppm, respectively). The fragmentation pattern of octacosanoate is similar. During the fragmentation of octacosanoate, the loss of water was observed causing rise of a fragment at m/z 405.4071 (dtm = -6.17 ppm) analogously to the fragmentation of hexacosanoate. The signal of fragment corresponding to the loss of C_3H_6 m/z 363.3742 (suggested elemental composition $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{O}^-$, dtm = 31.65 ppm) was observed as well but in trace level. In the MS/MS spectrum of ion at m/z 423.4229 in L100 seed coat the loss of water was unambiguously observed (i.e., fragment at m/z 405.4078, dtm = -4.44 ppm). Fragment corresponding with the loss of C_3H_6 was not observed due to low yield of parent ion available for fragmentation. For comparison, fragmentation was studied also for dihydroxyoctacosanoate, $\text{C}_{27}\text{H}_{53}(\text{OH})_2\text{COO}^-$ (as an example of hydroxylated derivative of LFA, hereinafter referred to as HLFA) at m/z 455.4123 (dtm = 5.05 ppm). Note that the dihydroxylated analogues have special significance for JI64 pea seed coat properties as discussed later. Collision spectrum

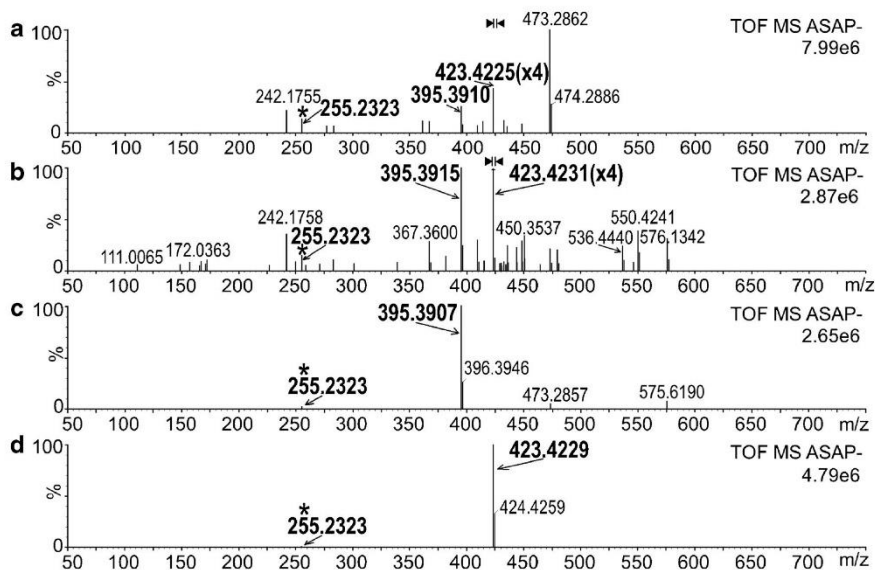


Fig. 2 Full MS spectra obtained by ASAP-MS(-) measurement (whole intact seed (a), separated $2 \times 2 \text{ mm}^2$ piece of L100 genotype seed coat (b), standards of hexacosanoic acid (c), and octacosanoic acid (d); the spectrum segment of 3 Da around octacosanoic acid signal is magnified $\times 4$; signal at m/z 255.2323 corresponds with palmitic acid used for lock mass correction)

of dihydroxyoctacosanoate provided three consequent losses of water indicating the presence of all three hydroxyl groups in its molecule causing formation of fragments at m/z 437.3982 (dtm = -2.97 ppm), 419.3871 (dtm = -4.29 ppm), and 401.3768 (dtm = -3.74 ppm). MS/MS spectra of hexacosanoate, octacosanoate, and dihydroxyoctacosanoate found in seed coat of L100 and J164 genotype are shown in Fig. 3. To conclude this part, ASAP-MS/MS experiments allow identification of LFA and HLFA in pea seed coats.

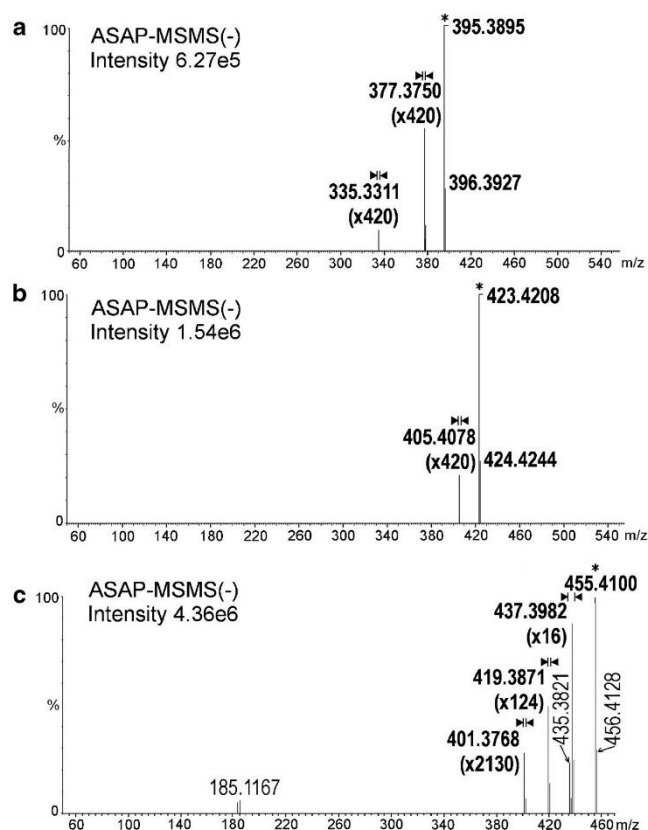
Another possibility how to improve selectivity of ASAP-MS measurement and mass spectra appearance is to utilize ion mobility separation. Ion mobility can also provide additional analytical information about studied analytes based on drift time measurement. This approach has been already used by Zhang et al. [44]. They characterized common fatty acids by their collision cross sections using ESI-IM-MS [44]. Drift time values measured in our samples corresponded very well with standards as can be seen in Fig. 4. It is worth to note that considerable agreement of ASAP and MALDI ion mobility measurement can be achieved (124 vs. 120 and 136 vs. 132 bins in analysis of real sample). This fact is generally important for integration of data from both ionization techniques.

Optimization of ASAP source parameters

Parameters of ASAP ion source, i.e., probe temperature, corona current, desolvation gas, and analysis time were

optimized to reach the highest signal of the studied LFA and HLFA and allow the analysis without damage of intact seed in the same time. It is expectable that probe temperature is one of the most important ASAP source parameter. The increasing signal was achieved by increasing the probe temperature. The highest intensities were obtained at 500°C , but coats of some seeds started to crack at such high temperature (i.e., a “popcorn effect” was observed). Bursting of seed coats was undesirable in ASAP-MS surface analysis due to the risk of releasing compounds from deeper inner layers of seed coat or embryo and their unwanted presence in MS spectra (for differences in spectra of compact and cracked seed coat, see ESM Fig. S2). The probe temperature 400°C can be used as a compromise providing safe analysis of intact seed with still high LFA and HLFA signal (difference between the highest temperature 500°C and 400°C falls in the range 10–218% for all discussed fatty acids). Similarly, the increasing of corona current influenced LFA and HLFA intensities significantly. The highest intensities of LFA and HLFA were obtained with 10–15 μA . However, higher values of corona current than 5 μA (e.g., 10, 15, or 20 μA) led to bursting of seeds as well. Corona current 5 μA combined with 400°C probe temperature represented also the compromise not causing any seed bursting. The value for desolvation gas for those compounds was 400 l/h. Time of sample vaporization (time of analysis) is also parameter that should be taken into account. During a 3-min analysis under optimized conditions, entire analytes

Fig. 3 ASAP-MS/MS(-) spectra of hexacosanoate (a), octacosanoate (b), and dihydroxyoctacosanoate (c) measured in seed coat samples of L100 (a, b) and J164 genotype (C)



releasable from the surface of the seed were consumed (signal dropped to baseline). Under the described conditions, good sensitivity and reproducibility of seed coat measurements was reached. In addition, the response of LFA was studied on fragments of seed coats of different sizes (2×2 , 3×3 and 4×4 mm², see ESM Fig. S1). The most reproducible signal was achieved with 2×2 mm² size likely due to smaller spherical effects in ASAP source compared to larger pieces. To briefly conclude the optimization process, the study of ASAP parameters allowed to significantly improve the signal of LFA and HLFA and find conditions suitable for their analysis in seed coats. Note that also signals of common fatty acids such as palmitic and oleic acids were improved.

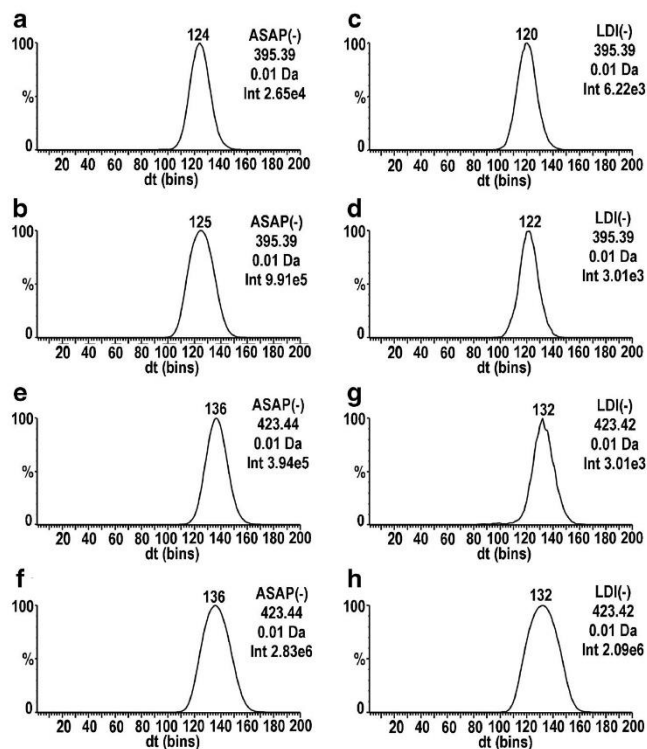
In plant material, a number of ballast signals with m/z values close to the signals of LFA and HLFA was observed in our previous (MA)LDI-MS study [28], i.e., 395.1133, 423.1402, 411.1243, 441.1638, and 455.1733 that belong presumably to oligo/polysaccharides and fragments of lignin and complicate the spectra interpretation. Compared to another,

perhaps the most common “soft” ion sources such as ESI and (MA)LDI, ASAP provides much cleaner MS spectra with respect to direct fatty acid analysis (see ESM Fig. S3 with respect to ESI and [28] with respect to MALDI). Such matrix interferences (usually less volatile) can be effectively suppressed by appropriate settings of probe temperature in ASAP source. Note that although the signals of interferences are insignificant compared to signals of fatty acids in ASAP-MS spectra, their gradual increase with probe temperature was apparent. On the other hand, their signals were not affected by changes of corona current and desolvation gas flow.

Semi-quantitative analysis

In general, the utilization of ASAP-MS is rather in the field of identification and qualitative characterization of materials than for quantification purposes. On the other hand, the possibility of direct study of intact seed surface chemical composition in relatively simple experimental arrangement is attractive and

Fig. 4 Mobilogram reconstructed for hexacosanoate and octacosanoate (m/z 395.39 and 423.42, dt denotes drift time given in bins) found in pea seed coats and standards obtained by ASAP-MS (a hexacosanoate from L100 seed coat, b standard of hexacosanoic acid, e octacosanoate from L100 seed coat, f standard of octacosanoic acid) and MALDI-MS (c hexacosanoate from L100 seed coat, d standard of hexacosanoic acid, g octacosanoate from L100 seed coat, and h standard of octacosanoic acid)



its potential towards (semi) quantification was examined both using seed coat extracts and directly on tissue surface.

ASAP-MS with non-standard glass capillary (described formerly) was used first for the study of linearity and limit of quantification of available two long-chain fatty acid standards (C26 and C28). For measurement, 1 μL of sample solution was sucked into the capillary, attached to ASAP probe, inserted into the APCI source, and measured at defined temperature (400 $^{\circ}\text{C}$ in optimum) without a temperature ramp. The modification of used capillary was necessary to improve the reproducibility of direct sample injection compared to the standard melting point capillary. The ends of standard melting point capillary are closed and analytes are usually deposited on the outer capillary surface; thus, the amount of analytes on capillary surface usually differs and decreases the reproducibility. Our method utilizing the modified capillary provided limit of quantification (LOQ) 1 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ for both fatty acids (signal to noise ratio, $S/N=10$). For comparison, using a common glass capillary submerged into the standard solution the LOQ 200 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ was achieved. The usage of the modified capillary provided also better repeatability compared to the standard one. The relative standard deviation was 3.4 times

(hexacosanoic acid) and 1.6 times (octacosanoic acid) better with modified capillary compared to the standard one (calculated from four repeated measurements). Therefore, the following experiments were performed with the modified capillary. Calibration curves measured for solutions of both LFA were linear ($R^2=0.9725$ for hexacosanoic acid calibration curve, $R^2=0.9842$ for octacosanoic acid) in concentration range from 1 to 200 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Those results suggest that ASAP-MS can be used at least for semi quantification of LFA in extracts.

The developed method and calibration curves were used to determine the amount of both (extractable) LFA and compare their amount in selected dormant and non-dormant genotypes (i.e., L100 and Cameor, Fig. 5a). The amount of studied LFA in both genotypes related to the same weight of material is comparable. Hexacosanoic acid content is 68.89 mg kg^{-1} and 52.91 mg kg^{-1} in L100 and Cameor seed coats, respectively. The amount of octacosanoic acid is also comparable (i.e., 58.35 mg kg^{-1} and 72.67 mg kg^{-1} in L100 and Cameor seed coats, respectively). Those amounts were calculated for entire homogenized and extracted seed coat material (seed coats separated from six seeds and homogenized for each

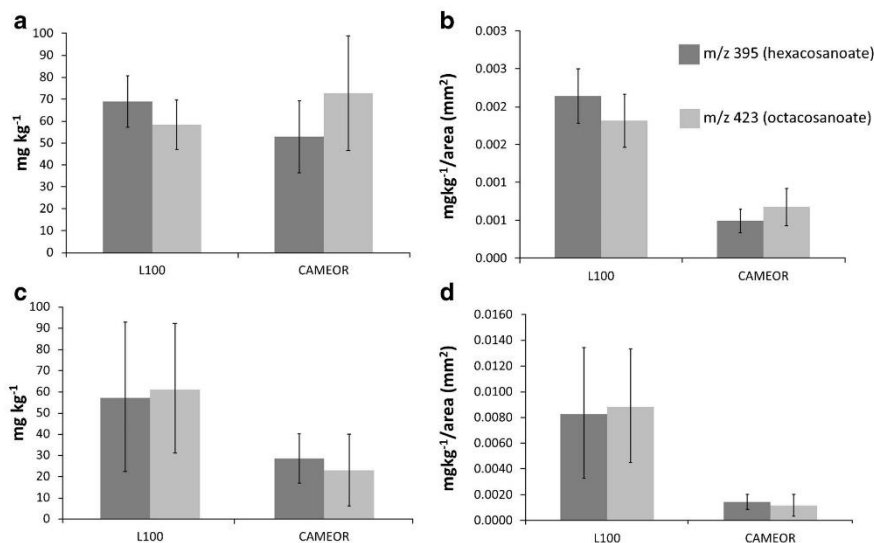


Fig. 5 Content of hexacosanoic and octacosanoic acid in L100 and Cameor seed coats (determined in hexane extracts of seed coats (**a, b**) and directly by the measurement of dry seed coats (**c, d**); related to weight of seed coat (**a, c**) and related to its surface area (**b, d**))

genotype). However, for better understanding of the seed coat surface properties with respect to water absorbability (and consequently physical dormancy of a seed) the differences in the seed size, the seed coat thickness and density should be taken into account. Those seed coat parameters were observed to differ significantly among particular genotypes [28]. For instance, the seeds of dormant L100 genotype are smaller, but their seed coats are relatively thick (average diameter of seed calculated from six individuals was 46.73 mm, average outer seed coat area 32,160 mm², and weight 102.2 mg). The seeds of non-dormant Cameor genotype are larger (The average seed diameter was 79.17 mm, the average area 107,640 mm², and weight 115.5 mg. In other words, seed coat of Cameor is significantly thinner compared to the seed coat of L100 (ESM Fig. S4 shows the differences in the size of L100 and Cameor seed and the thickness of their seed coats). Figure 5b shows the amount of particular LFA related to the seed surface area. Apparently, the content of both LFA is significantly higher on the surface of dormant L100 genotype compared to non-dormant Cameor that is in agreement with expectation that LFAs increases hydrophobicity of seed coat surface and physical dormancy.

Second procedure was based on direct analysis of fatty acids thermally released from dry seed coat and quantification by standard addition method (for details, see the “Quantification using standard addition” section). Two aspects should be considered in this context. First, the direct measurement offers faster sample preparation for analysis compared to the measurement of seed coat extract (the

attachment of seed into the wire cage and standard solution addition on seed coat takes approximately 5 min while preparation of fatty acids extracts takes 3.5 h according to protocol mentioned above). Second, the thermal desorption of analytes from dry plant material provides different profile of analytes (yield of individual analytes) compared to the solvent extraction and thus should provide different information. Three standard additions of both LFA were measured. The dependence of the signal on the standard addition is linear within the concentration range of standard additions (0.25, 0.5, and 1 mg mL⁻¹) for measurements of the two discussed genotypes (R^2 falls in the range 0.98–0.99 for hexacosanoic acid and 0.96–0.99 for octacosanoic acid, respectively; one standard addition (0.25 mg mL⁻¹) was excluded from the measurement of L100 genotype as outlier).

By the direct method, 57.12 mg kg⁻¹ of hexacosanoic acid was found in dormant L100 and 28.46 mg kg⁻¹ in non-dormant Cameor. Similarly, the content of octacosanoic acid was 46.49 mg kg⁻¹ in L100 and 22.77 mg kg⁻¹ in Cameor, respectively (Fig. 5c). The amount of those fatty acids related to the seed coat surface is considerably lower for non-dormant Cameor genotype as shown in Fig. 5d. The data obtained by both quantitation methods are in the order of magnitude in mutual agreement, despite a different process of analytes release takes place and different quantitation procedures (i.e., calibration curve vs. standard addition) were used. The analysis by both procedures confirmed higher content of both LFA in seed coats of dormant genotypes compared to non-dormant ones that corresponds with our former study done by MALDI-MS [28].

The presented data show that ASAP-MS can be used for quantitative considerations. This technique is capable for easy, rapid, and low-cost analysis (although perhaps with a lower precision compared to chromatographic techniques and their hyphenation with mass spectrometry) and it can be used for preliminary quantification of volatile compounds in plant samples.

Multidimensional data analysis

For untargeted exploration of chemical differences in unknown samples various multivariate statistical approaches are widely used. Among them, PCA represents one of the most frequently used methods. This method applies an orthogonal transformation to convert obtained data (a set of observations of possibly correlated variables) into a set of values of linearly uncorrelated variables called principal components. This is arranged in such a way that the first principal component has the largest possible variance and each successive component in turn has the highest variance possible under the constraint that it is orthogonal to the preceding components [45]. Figure 6 shows 3D score plots of PCA performed with raw ASAP-MS data obtained by direct measurement of seeds of six genotypes (three dormant and three non-dormant, each genotype in 4 biological repetitions). The plant material was analyzed either as whole intact seeds (Fig. 6a) or as parts of seed coats (separated from embryo and fractionated to fragments with size $2 \times 2 \text{ mm}^2$, Fig. 6b).

Interestingly, despite the complexity of the studied biological material, biological variability of individual genotypes and variability in chemical composition of seeds of particular genotype (scatter of replicated measurements), the segregation of dormant and non-dormant genotypes is apparent. As a reference technique to the proposed ASAP-MS, (MA)LDI-MS can be considered. Figure 6c and d show 3D score plots obtained by measurement of seed coat fragments without matrix (LDI-MS mode) and with it (deposited by automatic spray of its solution, for details, see the “Material preparation for ASAP-MS and MALDI-MS analysis” section and reference [28]). Although the principle of both techniques is substantially different (i.e., laser vs. thermal desorption of analytes) and thus profile of particular signals (markers) responsible for segregation in 3D score plots is different, both techniques proved potential to segregate dormant from non-dormant seeds in dry mature state. ASAP-MS analysis provided stronger signal of fatty acids compared to (MA)LDI measurement in general. Both ionization techniques show some interesting features. As mentioned above, the (MA)LDI-MS spectrum contains number of signals (presumably sugars and lignin fragments) close to the m/z values of fatty acids. The signals of sugars and lignins are not visible in ASAP-MS spectra suggesting that ASAP ionization would be preferable for analysis focused on hydrophobic seed coat components. On the other hand, the contribution of sugars and lignins present in seed coats to the process of imbibition/

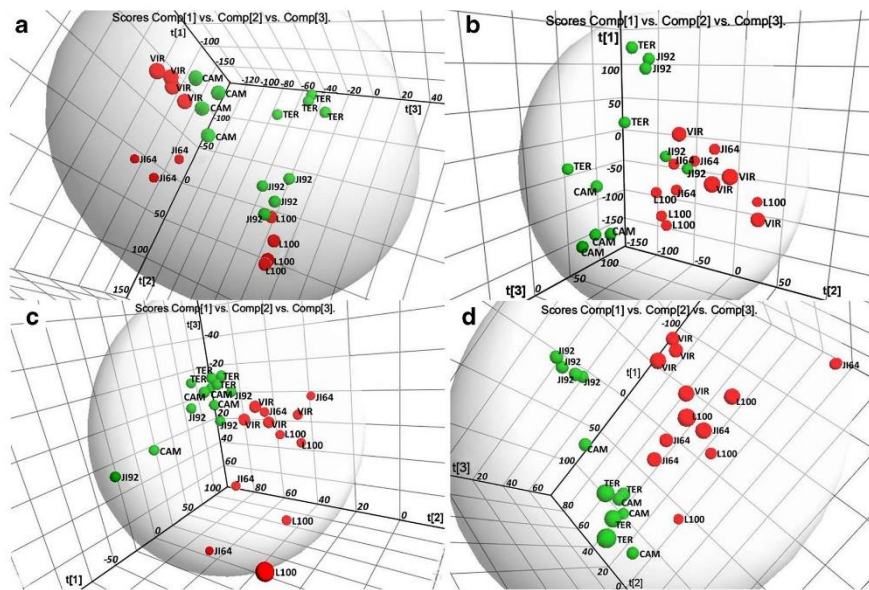


Fig. 6 3D PCA plots created from MS data in negative ionization mode (green points represent non-dormant genotypes, red points describe dormant ones; **a** ASAP-MS measurement of whole seeds, **b** ASAP-MS

measurement of prepared seed coat pieces with size $2 \times 2 \text{ mm}^2$, **c** LDI-MS, **d** MALDI-MS (matrix: 5-aminoquinoline); pareto scaling and marker intensity threshold 1000 was used)

germination is discussed in relevant literature as well [46]. We thus suggest that both ionization techniques are complementary with regard to the study of seed dormancy (domestication) and data obtained by both of them should be interpreted mutually and in a wider context. It is worth noting that ASAP-MS analysis of the whole seeds provides besides separation according to dormancy and also better clustering of individual genotypes compared to analysis of seed coat pieces. Considering the complexity of analyzed material and relative simplicity of the used methods, relatively high level of explained variance in first three principal components was achieved by both methods, i.e., 67.7%, 58.5%, 74.4%, and 81.7% obtained by ASAP-MS of whole seeds, ASAP-MS of seed coat fragments, LDI-MS and MALDI-MS, respectively.

On the other hand, undisputable methodological advantages of (MA)LDI-MS represent (i) the possibility of “oriented analysis” (only selected side of seed coat fragment is oriented towards laser beam which is not possible in ASAP-MS since seed coat constituents can be released from the whole present material) and (ii) direct description of variations of particular compounds over the seed coats (available from mass imaging experiments). The strong differences among the composition of

outer and inner surface of seed coat as well as differences between of some specific parts of seed coat (e.g., attachment of seed to husk called hilum or small brown seed coat part next to hilum named strophiole) and rest of outer surface have been already described [28]. Such variations are not distinguished by ASAP-MS. Potentially, an application of a non-ionizable coating to shield those parts of seed coat would be used in ASAP-MS analysis to minimize their signals. Such procedure, however, deserves further material research and it is beyond the scope of this paper.

The signals (chemical markers) responsible for segregation of dormant and non-dormant genotypes were further studied by orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA; the significance of particular markers is reflected by appropriate S-plot and list of markers given in ESM, Fig. S5A and Table S1). Several LFA (including hexacosanoic and octacosanoic acid) and HLFA belong among the most important markers of dormancy (present in higher content in dormant genotypes compared to non-dormant ones) found by ASAP-MS. Figure 7 shows signals of hexacosanoic and octacosanoic acid and HLFA (dihydroxyoctacosanoate and hydroxyhexacosanoate) measured in all investigated genotypes. Hexacosanoic and

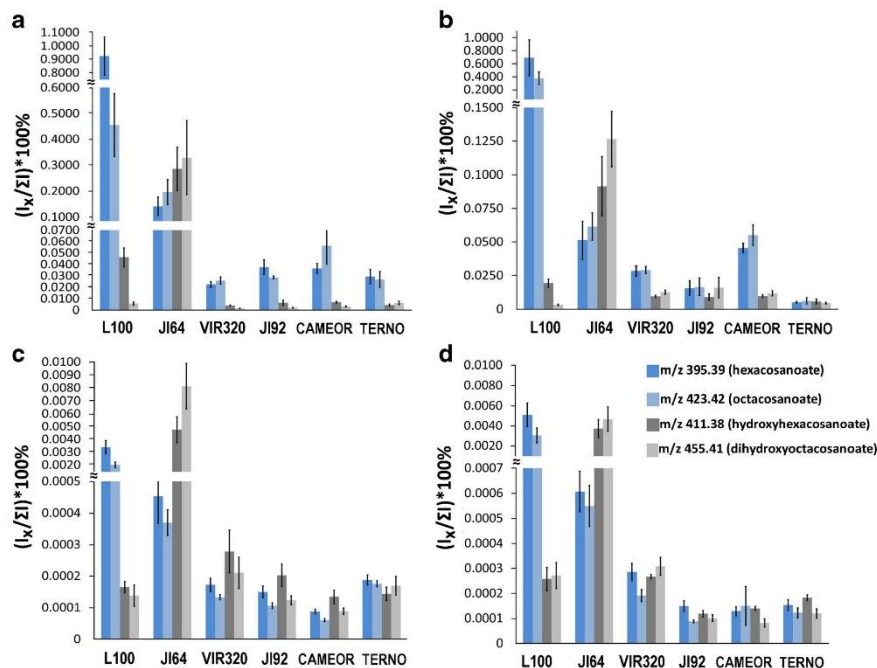


Fig. 7 Comparison of LFA and HLFA signals in studied pea genotypes measured by ASAP-MS and (MA)LDI-MS (**a** ASAP-MS of compact seeds, **b** ASAP-MS of prepared seed coats with 2×2 mm² size, **c** LDI-MS, **d** MALDI-MS (matrix: 5-aminoquinoline); signals are expressed as

average of normalized intensities of four measurements; normalization was done by dividing of a fatty acid signal by the total ion current, TIC; I_x denotes the intensity of particular marker and ΣI is the sum of all signals in related MS spectrum)

octacosanoic acids appeared to be especially important for genotype L100 (that is supported also by OPLS-DA; see ESM Fig. S5B). Normalized signals of hydroxylated long chain fatty acids are enhanced in dormant J164 pea genotype as found by both analytical techniques.

Conclusion

Atmospheric solids analysis probe mass spectrometry was used for the first time as technique for direct surface analysis of lipophilic substances (i.e., long fatty acids) in pea seed coats. ASAP-MS measurement is simple, fast, and relatively low cost and omits a complicated sample treatment. It was proven that ASAP ionization technique can provide cleaner MS spectrum considering signals of fatty acids compared to MALDI-MS as another method used for direct analysis of plant tissues. ASAP-MS technique can be used also for preliminary quantitative purposes. Besides, combination of ASAP-MS data with multivariate statistics can be used for study of physical dormancy of dry mature seeds, either by analysis of intact seeds or seed coat fragments. The relative simplicity of ASAP-MS and potential to analyze plant material directly (without the necessity of solvent extraction) make the method especially suitable in biological fields. Hexacosanoic and octacosanoic acids were suggested as important markers likely influencing water transport mechanism through the seed coat into embryo, seed imbibition, and early phases of germination. Our results are thus interesting for research and practice in agriculture and food industry (processing of edible seeds).

Funding information This study received the support from Operational Programme Research, Development and Education – European Regional Development Fund, project no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754 and Palacký University Olomouc (IGA_PrF_2018_027).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Smýkal P, Vernoud V, Blair MW, Soukup A, Thompson RD. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Front Plant Sci.* 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00351>.
- Hradilová I, Trněný O, Válková M, Cechová M, Janská A, Prokešová L, et al. A combined comparative transcriptomic, metabolomic, and anatomical analyses of two key domestication traits: pod dehiscence and seed dormancy in pea (*Pisum sp.*). *Front Plant Sci.* 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00542>.
- Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological stains: a literature review and case study. *Glob J Health Sci.* 2016;8:72–9.
- Graven P, Koster CG, Boon JJ, Bouman F. Structure and macromolecular composition of the seed coat of the Musaceae. *Ann Bot.* 1996;77:105–22.
- Konar N, Poyrazoglu ES, Demir K, Artik N. Determination of conjugated and free isoflavones in some legumes by LC–MS/MS. *J Food Compost Anal.* 2012;25:173–8.
- Sauerschnig C, Doppler M, Bueschl C, Schuhmacher R. Methanol generates numerous artifacts during sample extraction and storage of extracts in metabolomics research. *Meta.* 2017. <https://doi.org/10.3390/metabo8010001>.
- Cone EJ, Buchwald WF, Darwin WD. Analytical controls in drug metabolic studies. II. Artifact formation during chloroform extraction of drugs and metabolites with amine substituents. *Drug Metab Dispos.* 1982;10:561–7.
- Myjavcová R, Marhol R, Křen V, Simánek V, Ulrichová J, Palíková I, et al. Analysis of anthocyanin pigments in *Lonicera (Caerulea)* extracts using chromatographic fractionation followed by microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2010;1217:7932–41.
- Shin SC, Lee SJ, Lee SJ, Chung JJ, Bae DW, Kim ST, et al. Comparison of anthocyanin content in seed coats of black soybean [*Glycine max(L.) Merr.*] cultivars using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Sci Biotechnol.* 2009;18:1470–5.
- Beninger CW, Gu LW, Prior RL, Junk DC, Vandenberg A, Bett KE. Changes in polyphenols of the seed coat during the after-darkening process in pinto beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *J Agric Food Chem.* 2005;53:7777–82.
- Jhan JK, Chung YC, Chen GH, Chang CH, Lu YC, Hsu CK. Anthocyanin contents in the seed coat of black soya bean and their anti-human tyrosinase activity and antioxidative activity. *Int J Cosmet Sci.* 2016;38:319–24.
- Mirali M, Ambrose SJ, Wood SA, Vandenberg A, Purves RW. Development of a fast extraction method and optimization of liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of phenolic compounds in lentil seed coats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014;969:149–61.
- Mirali M, Purves RW, Vandenberg A. Profiling the phenolic compounds of the four major seed coat types and their relation to color genes in lentil. *J Nat Prod.* 2017;80:1310–7.
- Kohyama N, Chono M, Nakagawa H, Matsuo Y, Ono H, Matsunaka H. Flavonoid compounds related to seed coat color of wheat. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81:2112–8.
- Ruiz KB, Khakimov B, Engelsen SB, Bak S, Biondi S, Jacobsen SE. Quinoa seed coats as an expanding and sustainable source of bioactive compounds: an investigation of genotypic diversity in saponin profiles. *Ind Crop Prod.* 2017;104:156–63.
- Rashid A, Badhan A, Deyholos M, Kav N. Proteomic profiling of the aleurone layer of mature *Arabidopsis thaliana* seed. *Plant Mol Biol Rep.* 2013;31:464–9.
- Takahata Y, Ohnishi-Kameyama M, Furuta S, Takahashi M, Suda I. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *J Agric Food Chem.* 2001;19:5843–7.
- Valcheva MP, Espelie KE, ChP I. Aliphatic composition of cutin from inner seed coat of apple. *Phytochemistry.* 1981;20:2225–7.
- Adhikary P, Mukherjee A, Barik A. Free fatty acids from *Lathyrus sativus* seed coats acting as short-range attractants to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res.* 2016;67:56–62.
- Liu J, Qina W, Wu H, Yanga C, Deng J, Iqbal N, et al. Metabolism variation and better storability of dark- versus light-coloured soybean (*Glycine max L. Merr.*) seeds. *Food Chem.* 2017;223:104–13.

21. Shao S, Meyer CJ, Ma F, Peterson CA, Bernards MA. The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *J Exp Bot*. 2007;58:1071–82.
22. Yan H, Hua Z, Qian G, Wang M, Du G, Chen J. Analysis of the chemical composition of cotton seed coat by Fourier-transform infrared (FT-IR) microspectroscopy. *Cellulose*. 2009;16:1099–107.
23. Kaspar S, Peukert M, Svatos A, Matros A, Mock HP. MALDI-imaging mass spectrometry - an emerging technique in plant biology. *Proteomics*. 2011;11:1840–50.
24. Korte AR, Yagnik GB, Feenstra AD, Lee YJ. Multiplex MALDI-MS imaging of plant metabolites using a hybrid MS system. New York: Humana Press; 2015.
25. Heyman HM, Dubery IA. The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review. *Phytochem Rev*. 2016;15:297–316.
26. Boughton BA, Thinakaran D, Sarabia D, Bacis A, Roessner U. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem Rev*. 2015;15:445–88.
27. Kim YJ, Lee SJ, Lee HM, Lee BW, Ha TJ, Bae DW, et al. Comparative proteomics analysis of seed coat from two black colored soybean cultivars during seed development. *Plant Omics*. 2013;6:456–63.
28. Cechová M, Válková M, Hradilová I, Janská A, Soukup A, Smýkal P, et al. Towards better understanding of pea seed dormancy using laser desorption/ionization mass spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2017; <https://doi.org/10.3390/ijms18102196>.
29. McEwen CN, Lieu T, Saylor S, Twohig M, Balogh MP. Atmospheric samples analysis probe (ASAP) mass spectrometry. In: Domin M, Cody R, editors. *Ambient ionization mass spectrometry*. Cambridge: RSC Adv; 2015. p. 104–19.
30. Tose LV, Murgu M, Vaz BG, Romão W. Application of atmospheric solids analysis probe mass spectrometry (ASAP-MS) in petroleomics: analysis of condensed aromatics standards, crude oil, and Paraffinic Fraction. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017;28:2401–7.
31. GaiFFE G, Cole RB, Laepatia S, Bridoux MC. Characterization of fluorinated polymers by atmospheric-solid-analysis-probe high-resolution mass spectrometry (ASAP/HRMS) combined with Kendrick-mass-defect analysis. *Anal Chem*. 2018;90:6035–42.
32. Doué M, Dervilly-Pinel G, Gicquiau A, Pouponneau K, Monteau F, Bizet B. High throughput identification and quantification of anabolic steroid esters by atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for efficient screening of drug preparations. *Anal Chem*. 2014;86:5649–55.
33. Carrizo D, Nerin I, Domeño C, Alfaro P, Nerin C. Direct screening of tobacco indicators in urine and saliva by atmospheric pressure solid analysis probe coupled to quadrupole-time of flight mass spectrometry (ASAP-MS-Q-TOF-). *J Pharm Biomed Anal*. 2016;124:149–56.
34. Crevelin EJ, Salami FH, Alves MNR, De Martinis BS, Crotti AEM, Moraes LAB. Direct analysis of amphetamine stimulants in a whole urine sample by atmospheric solids analysis probe tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2016;27:944–7.
35. Kramell A, Porbeck F, Kluge R, Wiesner A, Csuk R. A fast and reliable detection of indigo in historic and prehistoric textile samples. *J Mass Spectrom*. 2015;50:1039–43.
36. McEwen CN, McKay RG, Larsen BS. Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. *Anal Chem*. 2005;77:7826–31.
37. Chen W, Nkosi TAN, Combrinck S, Viljoen AM, Cartwright-Jones C. Rapid analysis of the skin irritant p-phenylenediamine (PPD) in henna products using atmospheric solids analysis probe mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;128:119–25.
38. Xiao X, Miller LL, Parchert KJ, Hayes D, Hochrein JM. Atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for the rapid identification of pollens and semi-quantification of flavonoid fingerprints. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2016;30:1639–46.
39. Huang BY, Ouyang XH, Sun J, Xiao ZY, Pan CP. Rapid quantification of 13 pesticides in vegetables by atmospheric-pressure solids analysis probe (ASAP) coupled to tandem mass spectrometry. *Chem J Chinese U*. 2013;34:1591–7.
40. Fussell RJ, Chan D, Sharman M. An assessment of atmospheric-pressure solids-analysis probes for the detection of chemicals in food. *Trends Anal Chem*. 2010;29:1326–35.
41. Dababi I, Gimello O, Elaloui E, Quignard F, Brosse N. Organosolv lignin-based wood adhesive. Influence of the lignin extraction conditions on the adhesive performance. *Polymers*. 2016. <https://doi.org/10.3390/polym8090340>.
42. Fan X, Zhu JL, Zheng A, Wei XY, Zhao YP, Cao JP, et al. Rapid characterization of heteroatomic molecules in a bio-oil from pyrolysis of rice husk using atmospheric solids analysis probe mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrolysis*. 2015;115:16–23.
43. McEwen C, Gutteridge S. Analysis of the inhibition of the ergosterol pathway in fungi using the atmospheric solids analysis probe (ASAP) method. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2007;18:1274–8.
44. Zhang F, Guo S, Zhang M, Zhang Z, Guo Y. Characterizing ion mobility and collision cross section of fatty acids using electrospray ion mobility mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2015;50:906–13.
45. Robotti E, Manfredi M, Marengo E. Biomarkers discovery through multivariate statistical methods: a review of recently developed methods and applications in proteomics. *J Proteomics Bioinform*. 2014. <https://doi.org/10.4172/jpb.S3-003>.
46. Graven P, De Koster CG, Boon JJ, Bouman F. Functional aspects of mature seed coat of the Cannaceae. *Pl Syst Evol*. 1997;205:223–40.



Correction to: Utilization of atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for analysis of fatty acids on seed surface

Monika Cechová¹ · Iveta Hradilová² · Petr Smýkal² · Petr Barták¹ · Petr Bednář¹

Published online: 14 May 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Correction to: Anal Bioanal Chem

<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1551-3>

The authors would like to call the reader's attention to the following correction in the section "Semi-quantitative analysis", page 1176, of the original publication.

Original sentence is:

"For instance, the seeds of dormant L100 genotype are smaller, but their seed coats are relatively thick (average diameter of seed calculated from six individuals was 46.73 mm, average outer seed coat area 32,160 mm², and weight 102.2 mg). The seeds of non-dormant Cameor genotype are larger (The average seed diameter was 79.17 mm, the average area 107,640 mm², and weight 115.5 mg.)"

The error is in the location of the decimal point of average diameter and average area of seeds that should be ten times lower for average diameter and one hundred times lower for average area.

Corrected sentence is:

"For instance, the seeds of dormant L100 genotype are smaller, but their seed coats are relatively thick (average diameter of seed calculated from six individuals was 4.673 mm, average outer seed coat area 321.6 mm², and weight 102.2 mg). The seeds of non-dormant Cameor genotype are larger (the average seed diameter was 7.917 mm, the average area 1076.4 mm², and weight 115.5 mg.)"

Consequently, the range of y-axis of Fig. 5b,d is changed. The range of y-axis in Fig. 5b is 0.00–0.30 and in Fig. 5d is 0.00–1.60. The correct Fig. 5b,d is given below.

This error did not influence other results presented in the article.

The online version of the original article can be found at <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1551-3>

✉ Petr Bednář
petr.bednar@upol.cz

¹ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

² Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

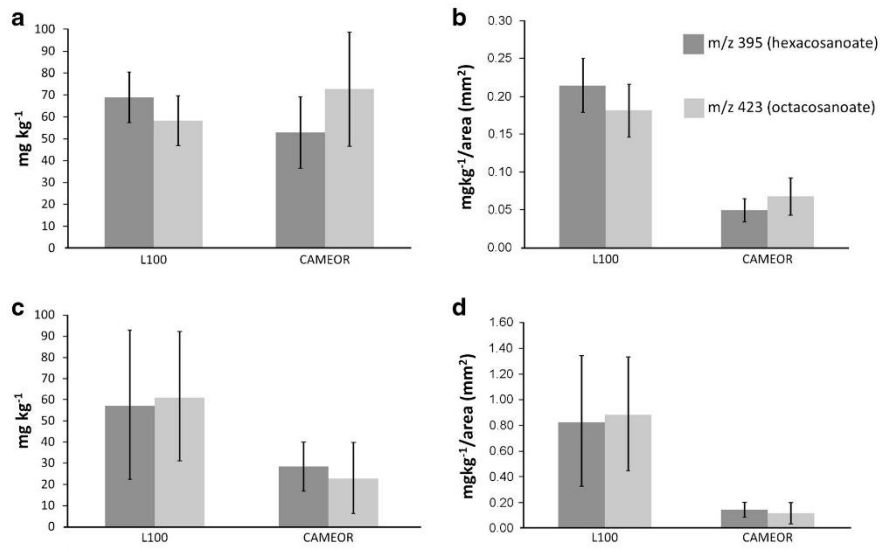


Fig. 5 Content of hexacosanoic and octacosanoic acid in L100 and Cameor seed coats (determined in hexane extracts of seed coats (**a, b**) and directly by the measurement of dry seed coats (**c, d**); related to weight of seed coat (**a, c**) and related to its surface area (**b, d**))

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Curriculum vitae

Meno a priezvisko: Mgr. Monika Zajacová Cechová
Dátum a miesto narodenia: 5.9.1989 Čadca, SR
Trvalé bydlisko: Skalité 1260, 023 14, SR

Vzdelanie:

2015 – 2020 doktorské štúdium v odbore Analytická chémia, Prírodovedecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
2013-2015 magisterské štúdium v odbore Analytická chémia, Prírodovedecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
2010-2013 bakalárske štúdium v odbore Chémia, Prírodovedecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Vedecká stáž:

- 3 mesačná vedecká stáž (2016) v Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Metodologie Chimiche (IMC) v Ríme na Oddelení kvapalinovej chromatografie a elektroforézy (prof. Salvatore Fanali, PhD.)
- 4-mesačná odborná pracovná stáž (2016) na Oddelení kontroly kvality vo farmaceutickej spoločnosti Teva Czech Industries s.r.o. v Opave

Odborné vedecké zameranie:

analytická chémia, hmotnostná spektrometria malých molekúl, MS Imaging, analýza rastlinných materiálov a ich metabolitov

Účasť na výskumných projektoch:

Člen riešiteľského tímu GAČR projektu s názvom „Modern chemical analysis of residues of organic materials in the archaeological context“ (17-17346S).

Člen riešiteľského tímu GAČR projektu s názvom „Seed dormancy and pod dehiscence as the key domestication traits in legumes“ (GAČR 14-11782S).

Člen riešiteľského tímu IGA projektu s názvom: „Matricový efekt a mez detekce“ (IGA_PrF_2017_020).

Člen riešiteľského tímu „Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů“ (CZ.1.05/2.1.00/03.0058).

Pedagogická činnosť:

- **ACH/ACHSB** Aplikovaná analytická chemie (ZS 2016)
- **ACH/ACC** Cvičení z analytické chémie (LS 2017, LS 2018)
- vedenie študentky Veroniky Babyrádová v stredoškolskej súťaži Badatel (2018)
- vedenie študentky Veroniky Babyrádová v stredoškolskej odbornej činnosti SOČ (2019), 1. mi celoštátnom kole

Oponovanie záverečných prací:

- diplomová práca študentky Bc. Pauly Rovňákovej (2018)
- bakalárska práca študenta Zbyňka Žingora (2018)
- diplomová práca študenta Bc. Romana Fryčáka (2017)
- diplomová práca študenta Zbyňka Žingora (2020)

Publikace:

1. **Cechová, M.;** Hradilová I.; Smýkal P.; Barták P.; Bednář P. Utilization of atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for analysis of fatty acids on seed surface. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1551-3>.

2. **Cechová, M.;** Válková, M.; Hradilová, I.; Janská, A.; Soukup, A.; Smýkal, P.; Bednář, P. Towards Better Understanding of Pea Seed Dormancy Using Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, <https://doi.org/10.3390/ijms18102196>.

3. Hradilová I.; Trnený O.; Válková M.; **Cechová M.;** Janská A.; Prokešová L.; Aamir K.; Krezdorn N.; Rotter B.; Winter P.; Varshnev R.K.; Soukup A.; Bednář P.; Hanáček P.; Smýkal P. A Combined Comparative Transcriptomic, Metabolomic, and Anatomical Analyses of Two Key Domestication Traits: Pod Dehiscence and Seed Dormancy in Pea (*Pisum sp.*). *Front. Plant. Sci.* **2017**, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00542>.

Prezentace na odborných konferenciách:

- **Euroanalysis 2019 (Istanbul) – poster**
The application of LDI-MS and XPS techniques for the study of archaeological findings
Monika Cechová, Lukáš Kučera, Tomáš Opletal, Miroslav Králík, Petr Bednář
- **IMSC 2018 (Florenca) – poster**
Mass spectrometry analysis of medieval archaeological jewels
Monika Cechová, Lukáš Kučera, Miroslav Králík, Jaroslav Peška, Petr Bednář
- **CHIRANAL 2018 (Olomouc) – poster**
Advanced seed dormancy research by mass spectrometry
Monika Cechová, Markéta Válková, Vladimír Havlíček, Dominika Luptáková, Petr Smýkal, Petr Bednář
- **Euroanalysis 2017 (Štokholm) – poster**
Application of laser desorption/ionization high resolution mass spectrometry for the study of archaeological findings
Monika Cechová, Lukáš Kučera, Miroslav Králík, Petr Bednář
- **MOVISS 2017 (Vorau) - poster**
Study of seed dormancy by mass spectrometry combined with PCA and OPLS-DA
Monika Cechová, Markéta Válková, Lukáš Kučera, Petr Barták, Petr Smýkal, Iveta Hradilová, Aleš Soukup, Anna Janská, Karel Hron, Kamila Fačevicová and Petr Bednář
- **CHIRANAL 2016 (Olomouc) - poster**
The use of laser desorption/ionization mass spectrometry in a seed dormancy research
Monika Cechová, Petr Bednář, Petr Smýkal, Iveta Hradilová, Aleš Soukup, Anna Janská