

„A búza korai embriófejlődésének mikroanalitikai vizsgálata” című T049312 számú OTKA pályázat szakmai zárójelentése

Mielőtt rátérnék az elvégzett kísérleti munka és az eredmények részletes ismertetésére szeretném hangsúlyozni, hogy jelen pályázatunk támogatásával az OTKA ill. az illetékes OTKA Bizottság nemcsak a munkatervben szereplő feladatok elvégzésének anyagi háttérét teremtette meg, hanem a magyarországi metabolomikai kutatások elindítását is támogatta, amely kutatási terület korábban hazánkban nem igen létezett (pályázatunk időtartama alatt a Pécsi Tudományegyetemen is megkezdődtek, elsősorban a bor metabolomikájával kapcsolatos jelentős kutatások). Így a magyarországi világszínvonalú genomikai, transzkriptomikai és proteomikai kutatások végre kiegészülhettek a hiányzó utolsó láncszemmel a metabolomikával, amelynek színvonala és ismertsége ugyan még nem éri el az előbb említett területekét és az azokat művelő kutatókét, azonban jelen pályázat eredményeivel és a jövőben várható további jelentős eredményekkel a metabolomika irányvonalának a kijelölése hazánkban is megtörtént.

Jelen pályázatunk kutatási előzménye az az általunk kifejlesztett kalluszindukciós rendszer volt búzában, amellyel igazoltuk számos kutató megállapítását, miszerint a legsikeresebben alkalmazható sejt- és szövettenyésztési tápoldatok és táptalajok azok lehetnek, amelyek összetétele legjobban megközelíti az *in vivo* állapotot. Ez különösen igaz akkor, ha magányos sejteket kívánunk tenyészteni. A kalluszindukciós rendszerünk – a mezokotil szövet sejtjei dedifferenciálódását biztosító 2,4-D-n kívül – semmilyen exogén tápanyagforrást nem alkalmazott, a táptalaj maga a csírázó búza szem endospermiuma volt, amely folyamatosan megfelelő összetételben biztosította a tápanyagokat a pajzsocskán (scutellum) keresztül a rajta megmaradó mezokotil csonk (a csírázó búza embrió többi részét szikével eltávolítottuk) sejtjei számára. Ezzel a rendszerrel a kalluszindukció után négy nappal már növényregeneráló táptalajra átoltható méretű kalluszdarabokat nyertünk (Bartók és Sági, 1999). Ezen kalluszindukciós rendszer pozitív tapasztalataiból származott az az ötletünk, hogy jó lenne a búza magkezdemény kémiai összetételét megvizsgálni, mivel az ovulumban található petesejt megtermékenyítés utáni zigótikus gyors sejtszám gyarapodáshoz szükséges minden szervetlen és szerves komponensnek jelen kell lenni a magkezdeményen belül, abban a rendkívül kismennyiségű (búza magkezdemény esetében mindössze 0.1-0.3 μ l) folyékony közegben (ovulum folyadék), amely a fejlődő embriót körülveszi. Azonban a tömegspektrométerek – amelyek nélkülözhetetlenek a kromatográfias elválasztás után az ismeretlen komponensek azonosításához – érzékenysége korábban nem tette lehetővé ilyen kisméretű mintának, mint az ovulumnak a minőségi és

mennyiségi analízisét. A Gabonakutató Kft. pályázati és saját forrásból 4 évvel ezelőtt kb. 25 M Ft értékben beszerzett egy igen érzékeny ún. ioncsapdás analizátorral felszerelt GC/MS berendezést, amely jelen pályázat legjelentősebb műszeres háttérét képezte. A pályázat keretében főként ennek a műszernek a felhasználásával kívántunk olyan mikroanalitikai módszert kidolgozni amelynek segítségével a minimális mennyiségű növényi mintáknak – 1-1 db búza ovulum – lehető legteljesebb metabolom összetétele meghatározható. A pályázati kutatómunkánk előtt még senki nem vizsgálta ill. nem közölte búza magházakból kiperarált egyedi magkezdemények metabolom összetételét. Mindössze a korai embriogenezis során a teljes magházban (közel g-nyi mennyiségű!) lévő szerves és szervetlen komponensek (szénhidrátok, aminosavak, növényi hormonok) változásait vizsgálták (Charman és *mtsai*, 1996; Maës és *mtsai*, 1999; Gusakovskaya és Blintsov 2001, 2004, 2006; Hess és *mtsai*, 2002)

Az alábbiakban részletezzük az elvégzett munkát ill. méréseket és összefoglaljuk a kapott eredményeket, amelyekhez néhány igen érdekes ábrát is mellékelünk a könnyebb értelmezhetőség miatt (az ábrák jelentős része megtalálható a jelentéshez mellékelt ill. a most készülő angol nyelvű kéziratban).

A pályázatban együttműködő partnerünk (MTA MGKI, Martonvásár) fitotronban előállította a búza növényeket, majd folyamatos citológiai kontroll mellett kiperarálták a magkezdeményeket. A magkezdemény kiperarálása a magházból (beporzás után 1 nappal) a jelentés végén található kézirat 1. ábráján látható. A folyamatos citológiai kontroll az egyedi ovulum mikroanalitikai vizsgálatokat megelőzően igen fontos volt, mivel így pontosan tudtuk, hogy milyen korú (beporzás előtt 1 nap – beporzás után 4 nap) magkezdeményeket is analizálunk. A martonvásári partner a pontosan azonosított magkezdeményeket mikrofiolákba helyezte (1 db magkezdemény/mikrofiola) és szárazjégben tárolva leszállította a Gabonakutató Kft.-hez a mikroanalitikai vizsgálatokhoz. A vizsgálatokig a mintákat –80 °C-on tároltuk.

A mikroanalitikai vizsgálatok kidolgozása ill. a rutin vizsgálatok előtt a lefagyasztott magkezdeményeket liofilizáltuk. Ez igen fontos lépés volt, mivel a későbbi származékképzés során a származékok (különösen a trimetilszilil, TMS) még nyomnyi mennyiségű víz hatására is elbomlanak. A növényi metabolomikai vizsgálatok során ahhoz, hogy egy növényi szövetben a tág polaritás tartományban és különböző mennyiségben található lehető legnagyobb számú szerves komponens jellemző metabolit profilt kapjunk („metabolic profiling”) ki kell extrahálni azokat. Azonban ezen komponensek kinyerésére általában egyetlen oldószer nem alkalmazható. A poláris metabolitok kinyerésére általában izopropanolt, metanolt, savas metanolt, etanolt, acetonitrilt (Aharoni és *mtsai*, 2002) vagy a metanol/víz különböző arányú elegyét alkalmazzák

(Roessner és *mtsai*, 2000), míg az apoláris vegyületek kloroformmal nyerhetők ki hatásosan (Gullberg és *mtsai*, 2004). A poláris és apoláris metabolitokat általában egymást követő lépésekben extrahálják, de vannak adatok az egy lépésben történő extrakcióra is adott összetételű kloroform/metanol/víz bifázist alkotó oldószerkeleggyel (Fiehn és *mtsai*, 2000; Colebatch és *mtsai*, 2004; Gullberg és *mtsai*, 2004). Az oldószeres extrakciót általában valamilyen nagy sebességű homogenizálóval végzik, esetenként az extrakció hatékonyságát hagyományos melegítéssel, ultrahangos vagy mikrohullámú kezeléssel javítják. Korábban még senki nem vizsgálta ill. nem közölte búza magházakból kipreparált egyedi magkezdemények metabolit profilját. A búza magkezdemények kis mérete miatt a metabolit profil vizsgálatainkhoz egyéb eljárást kellett kidolgoznunk a minta fizikai feltárásához. A leghatásosabb eljárásnak a mikrofiola aljába helyezett liofilizált magkezdemények egy tű segítségével történő feltörése, az extraháló oldószerrel történő felszuszpendálása, majd az azt követő ultrahangos kezelése bizonyult. Három oldószer ill. oldószer elegy extrakciós hatékonyságát teszteltük az magkezdeményekben is megtalálható három különböző polaritású vegyületcsoporton (aminosavak, szerves savak, zsírsavak). Két tesztelt extrakciós oldószerkeleggy a mások által is már alkalmazott metanol/víz 8/2 (v/v) és a kloroform/metanol/víz 2/6/2 (v/v) voltak. A harmadik vizsgált oldószer a származékképzési reakció elegy oldószer a vízmentes piridin volt. Mindhárom oldószer/oldószerkeleggy esetében a mikrofiolába helyezett 1-1 db magkezdeményt 10 percig ultrahangoztuk. Ezen kísérlet eredményeit bemutató ábra a jelentéshez csatolt kéziratban látható (Fig. 2). Az ábrát áttekintve azonnal szembetűnik, hogy a zsírsavak esetében a piridines extrakcióval kaptuk a legmagasabb koncentrációt. Valójában arról lehet szó, hogy szemben a piridinnel (amely a származékképzési reakció elegy oldószer is volt egyben), a két oldószerkeleggy esetében a származékképzési reakció előtt centrifugális bepárlóban be kellett párolni a mintákat, ami az illékonyabb komponensek egy részének az eltávozását okozta. Továbbá megállapíthatjuk, hogy a különböző extrakciós oldószerkeleggyek az aminosavakat és a szerves savakat hasonló hatékonysággal extrahálták. Ezen kísérlet fontos tanulsága, hogy különösen ilyen kis méretű minták GC/MS metabolomikai vizsgálata előtt nem célszerű külön oldószeres extrakció és bepárlás alkalmazása, hanem elegendő a származékképzési reakció oldószerében (jelen esetben a piridinben) homogenizálni a mintát, ultrahangozni, majd hozzáadni a származékképző reagenst, és végül megfűteni a reakcióelegyet. Vizsgáltuk az extrakció során az ultrahangos kezelés időtartamának (5, 10, 15, 20 perc) hatását is a magkezdemények három előbb említett vegyületcsoportja esetében. Szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a négy különböző időpontnál. A későbbi vizsgálatoknál a 10 perces ultrahangos kezelést alkalmaztuk.

Ahhoz, hogy meghatározzuk az egyes metabolit csoportok visszanyerési százalékát („recovery”), 6 jellemző vegyületcsoportot reprezentáló – a magkezdeményben nem található – egy-egy standard komponenst hozzáadtunk („spiking”) a liofilizált magkezdeményekhez. A visszanyerési százalék 60 és 110% között változott, kivéve a zsírsavakat reprezentáló komponenst az etil-kapronsavat (ethyl-hexanoic acid), amelynél ez az érték 37%-nak adódott. Feltételezzük, hogy ezen alacsony érték mögött is a „spike”-olást követő bepárlási lépés húzódik meg. A visszanyerési kísérlet adatai a jelentés végéhez csatolt kéziratban található (Table 1).

Mivel a növényi metabolitok jelentős része nem illékony, a GC/MS analízis előtt származékképezni kell őket. A metabolomikai vizsgálatokban elsősorban trimetilszililező reagensekkel történik a poláris funkciós csoportok származékképzése. Mivel a cukrok oldatban egyszerre öt tautomer formában vannak jelen közvetlen szililezésük a GC/MS kromatogrammon több csúcs megjelenésével jár együtt, ami megnehezíti mind minőségi mind mennyiségi meghatározásukat. A tautomerek száma a szililezést megelőző oxim képzési reakcióval csökkenthető. A GC/MS metabolomikai vizsgálatokat megelőzően – elsősorban az „electron impact” tömegspektrum könyvtárakban (pl. NIST, Wiley) való kereshetőség miatt – a legszélesebb körben alkalmazott származékképzési reakció a trimetilszililezés (különösen az igen illékony MSTFA reagens használatával). A trimetilszililező reagensek közül a metabolom származékképezhető vegyületei legnagyobb részénél az MSTFA adja a legjobb eredményt és ugyanakkor ez produkálja a legkevesebb mellékterméket (Roessner és *mtsai*, 2000). Azonban szerkezetazonosítási célból találhatunk példát a *terc*-butildimetilszililező reagens, az MTBSTFA metabolomikai alkalmazására is (Fiehn és *mtsai*, 2000; Birkemeyer és *mtsai*, 2003). A mi esetünkben az alábbiak miatt a *terc*-butildimetilszililezés a legtöbb vegyületcsoport esetében indokoltabb volt. A TBDMS származékok öt nap után is stabilak voltak, míg pl. a cukrok TMS származékainál már 1 nap után jelentős jelintenzitás csökkenést észleltünk. Ez azzal függ össze, hogy a TBDMS származékok néhány százalék víz is elviselnek a reakció elegyben, míg a TMS származékok már nyomni mennyiségű víz jelenlétében is bomlanak (Birkemeyer és *mtsai*, 2003). Közismert, hogy a TBDMS származékok EI tömegspektrumaiban $[M-57]^+$ (a *terc*-butil csoport kihasadása a molekulából) m/z értéknél jelentős abundanciával rendelkező fragmens ion figyelhető meg, amely a kisebb intenzitású $[M-15]^+$ (a metil csoport kihasadása a molekulából) fragmens ionnal együtt nagy segítség egy ismeretlen komponens azonosítása során. Továbbá vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a vegyületek jelentős részének TBDMS származéka ugyanakkora injektált mennyiség (on-column) mellett azonos, vagy 2-3x nagyobb jelet adott mint a TMS származék. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy a méréseinket ion csapdás („ion trap”)

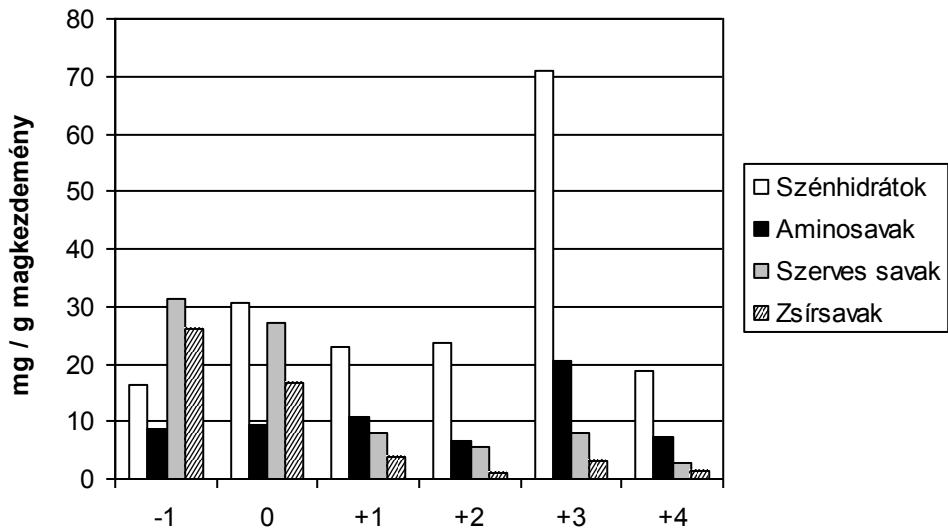
analizátorral felszerelt tömegspektrométerrel végeztük, amely köztudottan nagyobb intenzitású jelet ad magasabb m/z értékeknél. A TMS származékképzést azonban nem tudtuk nélkülözni, mivel a magkezdeményekben „jelentős mennyiségű cukor is található, amelyek esetében a TBDMS származékképzés nem kvantitatív. A felsoroltak miatt mindkét származékképzési reakciót (TMS and TBDMS) elvégeztük a búza kalász középső részéből egymás mellett lévő kalászkákból kipreparált magkezdeményeken. A TMS és TBDMS-származékképzett egy-egy magkezdeményt jellemző GC/IT-MS teljes ion kromatogramok szintén a jelentéshez csatolt kéziratban láthatók (Fig. 3.). Az azonosításhoz a saját TBDMS EI spektrum könyvtárunkat használtuk, amelyet a már különféle növényi szövetekben GC/MS módszerrel azonosított ill. publikált komponensek TBDMS származékképzése és az azt követő GC/IT-MS ún. „full scan” analízise segítségével készítettünk el. Az azonosított komponensek a jelentéshez csatolt publikálásra előkészített kézirat táblázatában (Table 2.) láthatók. Eddig összesen 63 vegyületet azonosítottunk a beporzás után 1 nappal a magházból kipreparált magkezdeményekből. Ezek közül nyolc cukrot ill. cukoralkoholt TMS-származék formában, míg a többit TBDMS származékként azonosítottunk. Ezeket a metabolitokat 5 csoportba soroltuk, úgymint cukrok, aminosavak, szerves savak, zsírsavak és egyéb vegyületek, mely utóbbi megnevezés magában foglalja a nitrogén-tartalmú vegyületeket és a fenolos karbonsavakat. Az eddig közölt, búza magkezdeményekkel kapcsolatos közleményekben a szerves metabolitok közül csak a szénhidrátokat, aminosavakat (Charman és *mtsai*, 1996; Maës és *mtsai*, 1999) és bizonyos növényi hormonokat (Gusakovskaya és Blintsov 2001, 2004, 2006; Hess és *mtsai*, 2002) vizsgálták, nincs még adat az általunk további jellemző komponensként azonosított szerves savakra és zsírsavakra vonatkozóan. A táblázat (Table 2.) adatai szerint a magkezdemény tömegének kb. 2,3%-át (m/m) teszik ki a szénhidrátok a beporzás után 1 nappal. Nagyobb mennyiségben az inozitol (0,7%), a szacharóz (0,8%) és a raffinóz (0,4%) fordult elő, de kimutattuk a fruktózt, a glükózt, a szorbózt, a maltózt és a trehalózt is. A kalászkák pozíciója egyértelmű összefüggést mutatott: az idősebb és fejlettebb kalászkákban (ugyanazon + 1 napos kalászon belül) általában magasabb volt a cukrok koncentrációja. Kivételt képezett a raffinóz, amelynek szintje állandó maradt, és ez a raktározó-tároló funkciójára utal. A szabad aminosavak közel 1% (m/m) mennyiségben fordultak elő, csökkenő sorrendben a főbb komponensek: glutamin (0,35%), aszparagin (0,16%), alanin (0,13%) és glutaminsav (0,11%). A triptofánt kivéve a többi fehérjealkotó aminosav is előfordult a magkezdeményekben 0,01-0,1%-nyi mennyiségben. A szerves savak össz mennyiségüket tekintve a szénhidrátok és az aminosavak után a harmadik legnagyobb mennyiségben előforduló vegyületcsoport volt a

magkezdeményekben (átlagban 0,8% (m/m)). Eddig összesen 16 szerves savat azonosítottunk, a jelentősebb mennyiségben kimutatottak csökkenő sorrendben a következők voltak: citromsav (0,16%, nem meglepő, mivel a citrát kör elején található), almasav (0,15%), *cisz*-akonitsav (0,08%) és izocitromsav (0,07%). Igen érdekes eredmény, hogy a glioxálsavat is kimutattuk, amely a glioxálciklus működésére utal. A negyedik fő vegyületcsoportnak, a zsírsavaknak 12 tagját sikerült kimutatnunk a magkezdeményekben. Össz mennyiségük átlagban 0,4% (m/m) volt. A főbb komponensek csökkenő sorrendben, a sztearinsav (0,13%), a palmitinsav (0,07%), a linolsav (0,06%) és az olajsav (0,03%) voltak. Szintén érdekes, újszerű adat a kapronsav ("hexanoic acid") kimutatása (0,05%) a magkezdeményekben. Az egyéb komponensek közül említést érdemel a benzoésav (0,007%), a 3,4-dihidrobenezoesav (0,002%), a ferulasav (0,003%), az urea (0,004%), a citozin (0,0014%) és a nikotinsav (0,001%) kimutatása. Összefoglalva, a magkezdeményekben (beporzás után 1 nap) található 3 legközönségesebb komponens súly %-ban (lásd feljebb) kifejezve a 3 fő szénhidrát ill. molárisan (nmol/g magkezdemény) kifejezve, az inozitol (38800), a glutamin (24000) és a szacharóz (23500). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az energiaszolgáltatás és az intenzív anyagcsere fenntartása elsődleges szerepet tölt be a megtermékenyítés után a zigóta rendkívül gyors osztódásának biztosításában. Meggyőződésünk, hogy a még eredményesebb egysejttenyésztéshez fenti 3 komponens megfelelő arányban a tápoldathoz történő hozzáadása is nélkülözhetetlen. Az eddig viszonylag nagy mennyiségű magház vizsgálata során kapott (Charman és *mtsai*, 1996; Maës és *mtsai*, 1999) és az általunk mikroanalitikai módszerrel az 1 napos magkezdeményekben meghatározott cukrok és aminosavak mennyisége közel azonos nagyságrendű volt, ami bizonyítja, hogy az általunk kidolgozott eljárás alkalmas egyetlen magkezdemény metabolit profiljának a vizsgálatára.

A poliaminoknak (putreszcin, cadaverin, spermidin, spermin) - ennek a sejtosztódásban igen jelentős szerepet játszó vegyületcsoportnak - a folyadékkromatográfiás mérési eredményeit szándékosan nem közöltük még a jelen kéziratban.

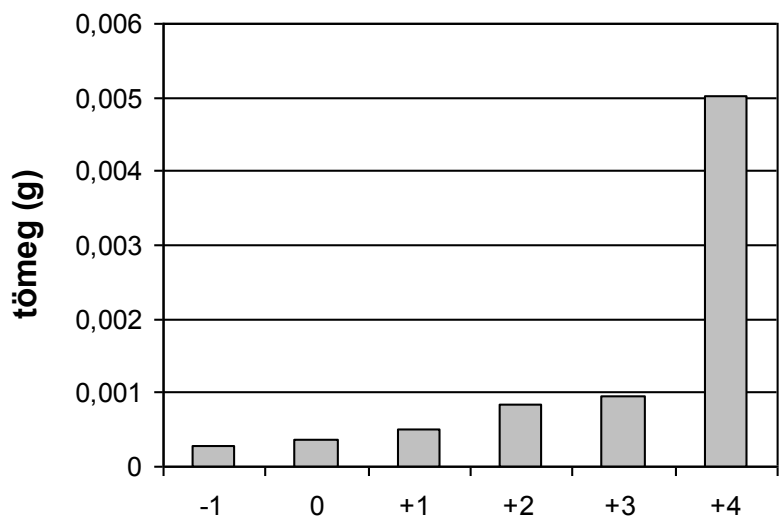
A következő kéziratunk publikálásra történő előkészítése is megkezdődött. Ebben az új kéziratban már mind a 6 különböző korú: beporzás előtt 1 nappal (-1), beporzaskori (0), valamint beporzás után 1-4 nappal (+1, +2, +3, +4) egyetlen magkezdemények mikroanalitikai-metabolomikai vizsgálatának eredményei fognak szerepelni. Ebből a kéziratból 1 táblázatot és 2 ábrát az alábbiakban mutatunk be (itt még magyar nyelvű feliratozással).

A következő ábrán a magkezdemények négy fő vegyületcsoportja komponenseinek összesített átlagát tüntettük fel vegyületcsoportonként a vizsgált 6 időpontban.



1. ábra. Különböző korú búza magkezdemények 4 fő vegyületcsoportja komponenseinek összesített átlag értékei

A következő ábrán a különböző korú magkezdemények ún. félmikro mérlegen mért átlag tömegei láthatók.

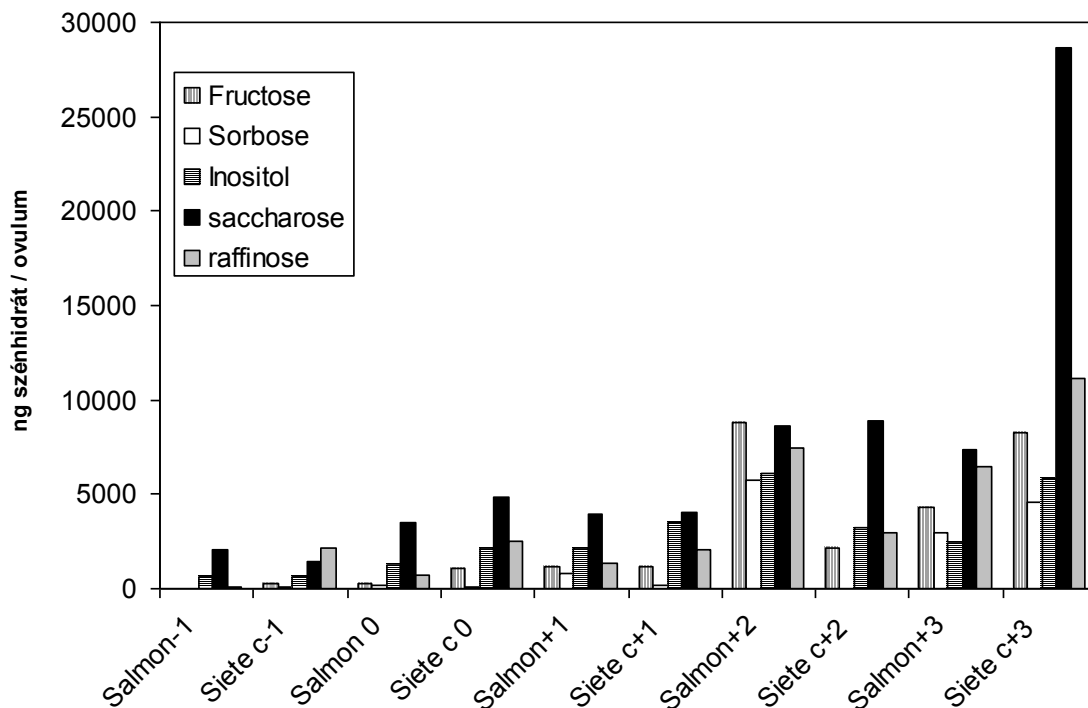


2. ábra. Különböző korú magkezdemények tömegeinek átlaga

A fenti táblázatot és az ábrákat áttekintve megállapítható, hogy a beporzás után 3-4 napos magkezdeményekben jelentős változások történtek. A +3 napos ovulumokban a szénhidrátok és az aminosavak mennyisége megugrott, utalva a magkezdemény intenzíven osztódó sejtjei megnövekedett szén- és nitrogén forrás igényére. A 2. ábrán jól látható, hogy ez az intenzív

sejtosztódás a negyedik napon a magkezdemény jelentős tömegnövekedését okozta. Rendkívül érdekes, hogy a szénhidrátokkal és az aminosavakkal szemben a szerves savak és a zsírsavak koncentrációja szinte folyamatosan csökkent a -1-től +4 napos magkezdeményekben.

Vizsgáltuk a „Salmon” búza euplazmás vonalának hasonló korú (beporzás előtt 1 nap-beporzás után 3 nap) magkezdeményeit is. Jelentős eltéréseket tapasztaltunk az azonos korú „Siete cerros” és „Salmon” ovulumok szerves sav és szénhidrát-tartalma között. A „Salmon” mintákban a szerves savak 1 nagyságrenddel kisebb mennyiségben fordultak elő, de a fő komponensek ezekben a magkezdeményekben is a citromsav és az almasav voltak. Különlegesen alakult a szénhidrátok mennyiségének változása, amit a 3. ábrán tüntettünk fel. Mint korábban részleteztük, a „Siete cerros” esetében beporzás után 3 nappal érte el maximumát a szacharóz koncentrációja, míg a „Salmon”-nál ez a maximum 2 napnál volt. Ugyanakkor – a szerves savakkal ellentétben – az egyes cukor ill. cukoralkohol komponensek mennyisége az azonos korú Siete cerros és „Salmon” ovulum mintákban hasonló volt.



3. ábra. A jellemző szénhidrátok mennyiségének változása különböző korú „Siete cerros” és „Salmon” (ivaros aestivum-Salmon vonal (apa)) magkezdeményekben

A növényi hormonok két igen jelentős csoportjának (auxinok és citokininek) jellemző komponenseit is szeretnénk meghatározni a magkezdeményekben, ezért a már korábban

publikált HPLC/ESI-MS módszerünket (Bartók és mtsai, 1996) továbbfejlesztettük és az új eljárással megvizsgáltuk a különböző fejlettségi állapotú magkezdeményeket, azonban a kiindulási kis mintamennyiség miatt nem tudtuk kimutatni (pedig az ioncsapdás tömegspektrométerünk az egyik legérzékenyebb a műszerpiacon) ezen komponenseket, amelyek több nagyságrenddel kisebb mennyiségben fordulnak elő a növényi szövetekben, mint az ún. „major” komponensek. Ebben az évben megállapodás alapján tovább folytatjuk a munkát, már jelen pályázat keretein túl, amely együttműködés során az MGKI fitotronjában (esetleg tenyészkerti körülmények között) előállítják az ovulumok növényi hormon vizsgálataihoz szükséges növény mennyiséget (kb. 100-200 búza növény), és az ovulumok kipreparálása után már jelentősebb mennyiségből (kb. 100-100 ovulum) fogjuk extrahálni a hormonokat és vizsgálni a mennyiségüket a különböző fejlettségi állapotú magkezdeményekben. A poliaminok mellett természetesen a növényi hormonoknak ill. arányuknak is jelentős szerepe van a sejtosztódás indukálásában és fenntartásában, ami osztódási intenzitás közismerten a zigóta esetében az egyik legjelentősebb a növényi szervezeten belül is.

A különböző korú (fejlettségi állapotú) búza ovulumok kvalitatív és kvantitatív mikroanalitikai vizsgálatai alapján összeállítottunk új, az egyszikűek sejt- és szövettenyésztésében alkalmazható merőben új tenyésztő közeget. Az újdonsága az új tenyésztő közegnek abban rejlik, hogy a makro- és mikroelemeken kívül - a jelenleg is frekvencián alkalmazott táptalajokkal szemben (pl. MS, B5, N6) - jelentősebb számú szerves kiegészítőt tartalmaz. Ez az első olyan tenyésztő közeg, amely teljes egészében mikroanalitikai vizsgálatokon alapul. Mind folyékony, mind szilárd tápoldatokat ill. táptalajokat készítettünk. Mivel a tenyésztő közegek *in vitro* tesztelése hosszadalmas folyamat - amely tesztelést egysejttenyésztésben (petesejt ill. zigóta) és éretlen embrió-eredetű szövettenyésztésekben is elvégezzük - a végleges táptalajkísérleti eredményekről nem tudunk még jelen zárójelentésben beszámolni. Csak a későbbiekben fog eldőlni (a kísérleti eredmények függvényében), hogy a mikroanalitikai mérési eredményekből készült tápoldat ill. táptalaj összetételt célszerű-e szabadalmaztatni és piacrautalás után gyártani és forgalmazni, vagy pedig elegendő csak szakcikkekben közölni a tesztelési eredményeket. **Ezért is tisztelettel kérjük az OTKA Irodát, hogy jelen zárójelentés adatait ne hozza részletesen egyelőre nyilvánosságra mivel az gátolhatná az esetleges szabadalmi bejelentést!** Az egyetlen magkezdemény mikroanalitikai vizsgálatára kidolgozott új módszerünkről készült publikálásra kész kéziratunk (a kéziratot lásd a jelentés után csatolva) csak egy időpontban (beporzás után 1 nappal) vett magkezdemény mérési adatainak egy részét tartalmazza és abban is főleg a vizsgálati metodológiára (extrakció,

származékképzési reakciók, mérési körülmények) helyeztük a hangsúlyt, mivel ilyen kisméretű növényi szerv (egyetlen búza ovulum) metabolomikai vizsgálatát még senki nem végezte el. Ennek a mikroanalitikai módszernek az újdonság értékét ismerte el az elmúlt évben az európai elválasztástudomány egyik legjelentősebb szakmai rendezvénye (8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Science, September 2-4, 2009 Siófok, Hungary) a poszterdíjjal (a poszterdíj másolatát az írásos jelentéshez szintén mellékeljük).

Irodalom

- Aharoni A, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, Goodenowe DB. 2002. Nontargeted metabolom analysis by use of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *Omic* **6**: 217-234.
- Bartók T, Sági F. 1990. A new endosperm-supported callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L). *Plant Cell Tissue Org Cult* **22**: 37-41.
- Bartók T, Börcsök G, Komoróczy R, Sági F. 1996. Characterization of cytokinins by electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry without precursor ion selection. *J Mass Spectrom* **31**: 756-760.
- Birkemeyer C, Kolasa A, Kopka J. 2003. Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J Chrom A* **993**: 89-102.
- Carman JG, Bishop DL, Hess JR. 1996. Carbohydrates, minerals and free amino acids in *Triticum aestivum* L. kernels during early embryony. *J Plant Physiol* **149**: 714-720.
- Colebatch G, Desbrosses G, Ott T, Krusell L, Montanari O, Kloska S, Kopka J, Udvardi MK. 2004. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation. *Plant J* **39**: 487-512.
- Fiehn O, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Identification of uncommon plant metabolites based on calculations of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal Chem* **72**: 3573-3580.
- Gullberg J, Jonsson P, Nordstrom A, Sjoström M, Moritz T. 2004. Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* **331**: 283-295.
- Gusakovskaya MA, Blintsov AN. 2001. Participation of cytokinins in the induction of embryogenesis in amphimicts and apomicts. *Doklady Biochem Biophys* **378**: 162-164.
- Gusakovskaya MA, Blintsov AN. 2004. Spatial and temporal distribution of zeatin and zeatin riboside during the period of egg-cell activity in the ovaries of amphimictic and apomictic plants. *Russian J Plant Physiol* **51**: 222-227.
- Gusakovskaya MA, Blintsov AN. 2006. Spatial and temporal distribution of free and bound ABA in wheat and dandelion ovaries in the period of egg-cell activity. *Russian J Plant Physiol* **53**: 355-358.
- Hess JR, Carman JG, Banowetz GM. 2002. Hormones in wheat kernels during embryony. *J Plant Physiol* **159**: 379-386.

- Maës O, Comeau A, Nadeau P, Simard RR, St-Pierre CA. 1999. Characterization of the natural chemical and osmotic environment of early wheat embryogenesis. *Physiol Plant* **107**: 220-229.
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Technical advance: Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J* **23**: 131-142.

Szeged, 2010. január 21.

Dr. Bartók Tibor

Témavezető

A „Phytochemical Analysis” folyóiratba publikálásra előkészített kéziratunk az alábbiakban látható:

High-resolution metabolic profiling of minute mass of single wheat ovule by capillary gas chromatography/mass spectrometry

Mónika Varga¹, László Sági², Katalin Jäger², Beáta Barnabás², Ákos Mesterházy¹, Tibor Bartók¹

¹Cereal Research Non-Profit Ltd. Co., H-6720 Szeged, P.O.Box 391, Hungary

²Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences
H-2462 Martonvásár, P.O.Box 19, Hungary

Abstract

We developed a new microanalytical procedure including also extraction and derivatization for the qualitative and quantitative determination of organic compounds by GC/IT MS in the metabolome of minute amount of plant organ (wheat ovule). A simple ultrasound-assisted extraction procedure was developed by investigating the effect of the composition of the extraction solvent on the range and the quantity of the detectable metabolites. Amino acids, organic acids, phenolic acids, fatty acids and fatty alcohols were determined in their *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) derivatives after reacting with MTBSTFA. Sugars and sugar alcohols were initially converted to their oximes by reaction with **hydroxylamine-hydrochloride** in pyridine, and finally the oximes were silylated with MSTFA. We established own electron

impact (EI) mass spectrum library of *tert*-butyldimethylsilylated organic compounds being in plant metabolome. Until now, 63 organic compounds including carbohydrates, amino acids, organic acids, fatty acids, phenolics and others have been identified in the ovule samples (1 day post anthesis), based on the comparison of their full scan EI mass spectra with the mass spectra of NIST library as well as with own library created by GC/MS analysis of *tert*-butyldimethylsilylated standards. This is the first report about the metabolic profiling of single wheat ovule (excised from the ovary) with ovule fluid inside by GC/IT-MS.

Keywords: GC/MS, ion trap, wheat ovule, metabolomics, TMS, TBDMS

Introduction

Functional genomics procedures including transcriptomics, proteomics and metabolomics are becoming increasingly important in the life sciences. The aim of these techniques is to gain insights and to obtain new data about the biological functioning of a cell, tissue or a whole organism (van der Werf, 2005). Metabolomics examines the complete set of relatively small molecular mass (< 1000) organic compounds, which take a part in the processes of metabolisms and are varying according to the physiological, developmental or pathological state of the cell, tissue, organ or organism. The sum of these compounds gives the metabolome of the examined biological object. The identification of 20,000-50,000 genes in the plant genome represents a powerful challenge for metabolomics. So far approximately 50,000 metabolites have been identified and their number is expected to increase to about 200,000 (Fiehn 2000a).

For the investigation of the complete metabolome, separation techniques such as capillary gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) coupled with mass spectrometry (MS or MS-MS) are the preferred methods in present days. However, there are interesting data about the application of NMR (Nicholson *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2009; Broyart *et al.*, 2010) and imaging mass spectrometry (McDonnell and Heeren 2006) in metabolomic research of intact cells and tissues, however, these techniques are not quantitative yet, but are very useful for the comparison of the metabolomic fingerprints of cells and tissues originating from different treatments. Among the separation techniques capillary GC provides the best resolving power, because the most effective capillary columns are able to separate up to 1000 peaks during a single run. Therefore, in the case of volatile (numerous unvolatile compounds become volatile after derivatization reaction) and thermally stable

compounds GC, GC/MS and GC/MS-MS are the methods of choice (Fiehn *et al.*, 2000b; Roessner *et al.*, 2002). Additionally, the great advantage of GC/MS based techniques is that commercial electron impact (EI, 70 eV) mass spectral libraries (e.g. Wiley, NIST) make the identification of unknown compounds easier. When the GC/MS or GC/MS-MS can not be used for the investigation, or is not enough alone to obtain detailed metabolic profile about the examined biological object, usually HPLC (Tolstikov and Fiehn, 2002; Tolstikov *et al.*, 2003; Allwood and Goodacre, 2010), UHPLC (Grata *et al.*, 2009) or CE (Sato *et al.*, 2004; Lapainis *et al.*, 2009; Leon *et al.*, 2009) separations are combined with mass spectrometry, especially with TOF (time-of-flight), Q-TOF (quadrupole - time-of-flight) or FT-ICR (Fourier transform-ion cyclotron resonance) mass analyzers. The accurate mass data obtained by TOF and FT-ICR mass analyzers improve positive identification of metabolites.

Though recently generally large-scale metabolomic studies have been initiated in plant biology (Gullberg *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2007; Leon *et al.*, 2009; Palama *et al.*, 2009; Allwood and Goodacre, 2010), such programs are usually prone to one major bottleneck, i.e. plant extracts are prepared by homogenization of bulked tissues or organs. This type of sampling precludes monitoring fine metabolic balances in same types of cells within a tissue, which is a prerequisite for understanding essential metabolite changes during key developmental phases. The two critical factors to this end are individual handling of explants (organs, tissues or cells) and sensitive high-throughput microanalytical procedures. In our present study the effectiveness of gas chromatography/ion trap mass spectrometry (GC/IT-MS) during the analysis of the metabolome of minute mass of single wheat ovule (excised from the ovary) after derivatization reaction(s) has been described. Formerly, only so called target compound analyses were performed, generally on bulk amount of wheat ovaries. These papers described the analyses of carbohydrates (Charman *et al.*, 1996; Maës *et al.*, 1999), amino acids (Charman *et al.*, 1996; Maës *et al.*, 1999) and plant hormones (Gusakovskaya and Blintsov 2001, 2004, 2006; Hess *et al.*, 2002) in wheat ovaries.

Experimental

Chemicals and reagents

The solvents (chloroform, methanol, water, pyridine), the derivatization reagents (hydroxylamine hydrochloride, N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), trimethylchlorosilane (TMCS), N-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA)/1% N-(*tert*-

butyldimethylsilyl-chloride (TBDMS-Cl) and the internal standard (3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid) were purchased from Sigma-Aldrich Ltd. (Budapest, Hungary).

Plant Material and Sampling

Plants of the spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar 'Siete Cerros' were incubated in a growth chamber (Conviron, Winnipeg, Canada) at a 16 h photoperiod. Temperatures were maintained at 25±0.5/15±0.5 °C (day/night). Light intensity provided by fluorescent and incandescent lamps at the canopy surface was 500 µmol m⁻² s⁻¹.

Samples were collected from each spikelet (except for the uppermost and lowest ones) within the main spike. In total, 3 replicates (spikes) were taken. Fertilized ovules were removed from the ovaries by using dissecting microscope and individually collected at 1 day after pollination (Fig. 1). Ovules were immediately frozen at -80 °C, then individually freeze-dried in 100-µL borosilicate screw cap glass microvials and subjected directly to extraction and derivatization reactions.

Extraction and Derivatization Reactions

The lyophilized samples were homogenized in the microvial with a sterile needle in 60 µL of pyridine containing the internal standard (for *tert*-butyldimethylsilylation) or 60 µL of hydroxylamine hydrochloride solution in pyridine (25 mg mL⁻¹) containing the internal standard (for trimethylsilylation). After addition of 40 µl pyridine the mixtures were sonicated (RealSonic RS-16) for 10 min at 25 °C. Prior to TMS derivatization, oxymation was carried out by incubating the hydroxylamine-containing mixtures for 30 min at 65 °C. Trimethylsilylation was done by adding 50 µL of MSTFA/1% TMCS followed by incubation for 30 min at 65 °C. *tert*-butyldimethylsilylation was performed under the same conditions with 50 µL of MTBSTFA/1% TBDMS-Cl.

For extraction experiments the lyophilized ovules were crushed in the microvials (1 ovule/vial) with a sharp needle in 60 µL of extraction solvent (chloroform/methanol/water, 2/6/2 or methanol/water, 8/2) containing the internal standard and after addition of 240 µL another portion of the extraction medium the mixture was sonicated for 10 min. The vial was centrifuged for 5 min at 1500xg. A 200 µL volume of the supernatant was evaporated to dryness and derivatized as described above.

For recovery experiments the lyophilized ovule was spiked with a mixture of norleucine (500 ng), tartaric acid (500 ng), ethyl-hexanoic acid (500 ng), oxamid (100 ng), ribitol (500 ng) and 2,5-dihydroxy-benzoic acid (100 ng). The spiked samples were extracted and derivatized as described above.

GC/IT-MS Analysis

Analyses were performed with a Varian CP-3800 gas chromatograph with a CombiPal autosampler coupled to a Varian 4000 mass spectrometer (Walnut Creek, CA, USA) equipped with ion trap mass analyzer. The chromatographic separations were performed using a Restek RH-5ms⁺ fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm d_f). Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. In the case of the trimethylsilylated samples the initial GC temperature was 70 °C, and increased at 3.5 °C min⁻¹ to 168 °C. After a 6 min hold time the temperature was increased at 3.5 °C min⁻¹ to 300 °C and then held for 5 min. For the *tert*-butyldimethylsilylated samples the initial oven temperature was 70 °C, then increased at 3.5 °C min⁻¹ to 224 °C, held for 10 min, increased at 3.5 °C min⁻¹ to 300 °C and held at that temperature for 5 min. The injector temperature was kept at 250 °C and samples were injected in splitless mode (0.5 μL). The transfer line and ion source temperatures were set at 250 and 200 °C, respectively. Full scan mass spectra were recorded from *m/z* 50 to 800 at 0.81 s scan⁻¹. The ion trap mass analyzer was operated in external EI ionization mode at an electron energy of 70 eV and an emission current of 25 μAmps. MS data were acquired and processed with the Varian MS WorkStation version 6.6 software.

Results and Discussion

The objective of plant metabolical studies is either the study of a particular target compound or group of compounds (target analysis), or the qualitative and quantitative determination of the largest possible number of organic components (metabolic profiling). In order to obtain a characteristic metabolite profile of the organic components present in plant tissues in various amounts and in a wide range of polarities, they have to be extracted. However, one solvent is usually not enough for the extraction of these components. Polar metabolites are usually extracted using isopropanol, methanol, acidified methanol, ethanol, acetonitrile (Aharoni *et al.*, 2002) or methanol/water mixtures of various ratios (Roessner *et al.*, 2000), whereas apolar compounds can be efficiently extracted by chloroform (Gullberg *et al.*, 2004). Polar and apolar

metabolites are usually extracted successively, although single-step extraction using a mixture forming a biphasic chloroform/methanol/water solvent system has also been reported (Fiehn *et al.*, 2000b; Colebatch *et al.*, 2004; Gullberg *et al.*, 2004). Solvent extraction is usually carried out in a high-speed homogenizer; the efficiency of extraction is occasionally enhanced by traditional heating, sonication or microwave treatment. The metabolite profile of individual wheat ovules excised from wheat ovaries has never been studied and reported. Because of the small size of wheat ovules, we had to develop a new procedure for our metabolite profile studies to physically approach the sample. The most efficient method proved to be to use of a needle to break up the lyophilized ovules placed on the bottom of microvials, and to suspend the sample in the extraction solvent, followed by sonication. The extraction efficiencies of three solvents / solvent mixtures were tested in the extraction of three groups of compounds with different polarities (amino acids, organic acids, fatty acids) present in ovules. Two of the extraction solvent mixtures tested were methanol/water 8/2 (v/v) and chloroform/methanol/water 2/6/2 (v/v), previously applied by several laboratories. The third solvent tested was anhydrous pyridine, the solvent of derivatization reactions. In the case of each of the three solvents / solvent mixtures, 1 ovule placed in a microvial was sonicated for 10 min. The results of this experiment are shown in Fig. 2. It is obvious from the figure that in the case of fatty acids, the extract with the highest concentration was obtained by pyridine extraction. The reason for this may be that, unlike in the case of pyridine (which was also the solvent of the derivatization reaction), in the case of the two solvent mixtures the samples had to be evaporated in a centrifugal evaporator prior to derivatization, which must have led to partial loss of the relatively more volatile components. Furthermore, it can be established that amino acids and organic acids were extracted by the three different extraction solvents with similar efficiencies. An important lesson of this experiment is that, especially when handling very small samples, it is not expedient to apply separate steps of extraction and evaporation prior to GC/MS metabolomic studies – it is sufficient to homogenize the sample in the solvent of the derivatization reaction (in the present case, pyridine), to sonicate, to add the derivatizing reagent and finally to heat the reaction mixture. We also studied the effect of the duration of sonication (5, 10, 15 and 20 min) on the extraction of the above-mentioned three groups of compounds from ovules. No significant differences were observed between the four sonication times (data not shown). In later experiments a sonication time of 10 min was applied.

In order to determine recovery in the individual metabolite groups, the lyophilized ovules were spiked with 1 of 6 components not present in the ovule, representing 6 characteristic groups

of compounds (Table 1). Recoveries varied between 60% and 110%, except for ethyl hexanoic acid representing fatty acids, whose recovery was 37%. We assume that this low value was again due to the evaporation step following spiking.

Since the majority of plant metabolites are not volatile, they have to be derivatized prior to GC/MS analysis. Derivatization of polar functional groups in metabolomic studies is mainly done using trimethylsilylating reagents/reagent mixtures. Since sugars are present in solution simultaneously in five different tautomeric forms, their direct silylation gives rise to several peaks in the GC/MS chromatogram, making both their quantitative and qualitative determination difficult. The number of tautomers can be decreased by oxime formation prior to silylation. Mainly due to its searchability in the electron impact (EI) mass spectrum libraries (e.g. NIST, Wiley, Fiehn's EI metabolomic library), the derivatization reaction most commonly used prior to GC/MS metabolomic studies is trimethylsilylation (especially the reaction using the highly volatile reagent MSTFA). MSTFA provides the best results for the majority of the derivatizable compounds of the metabolome and produces the least by-products (Roessner *et al.*, 2000). The *tert*-butyldimethylsilylating reagent MTBSTFA, however, has also been used in metabolomic applications for structure determination purposes (Fiehn *et al.*, 2000b; Birkemeyer *et al.*, 2003). In our case, *tert*-butyldimethylsilylation was more justified for the majority of the compound groups involved for the following reasons. TBDMS derivatives were stable even after 5 days, whereas the derivatives of e.g. sugars showed a significant decrease in signal intensity already within a day. The reason for this is that TBDMS derivatives can tolerate as much as a few percents of water in the reaction mixture, whereas TMS derivatives are disintegrated in the presence of as little as trace amounts of water (Birkemeyer *et al.*, 2003). It is a well-known fact that the EI mass spectra of TBDMS derivatives display a fragment ion of significant abundance at a m/z value of $[M-57]^+$ (loss of the *tert*-butyl moiety), which, together with the fragment ion of lower intensity and a m/z value of $[M-15]^+$ (loss of a methyl moiety) is a great help in the identification of a new component. Furthermore, in the course of our studies we found that, when applying identical on-column amounts, the TBDMS derivatives of a significant fraction of the compounds studied gave signals 2-3 times more intensive than those of the corresponding TMS derivatives. This is mainly due to our use of a mass spectrometer equipped with an ion trap mass analyzer, which is known to give higher signals at higher m/z values. TMS derivatization, however, was indispensable, because the ovules also contain significant amounts of sugar, which are not derivatized quantitatively by MTBSTFA. Due to the above reasons, both derivatization reactions (trimethylsilylation and *tert*-butyldimethylsilylation) were performed on the ovules

excised from neighbouring spikelets situated in the middle region of wheat ears. Typical GC/IT-MS total ion chromatograms of a TMS-derivatized and a TBDMS-derivatized single wheat ovule are shown in Fig. 3. For identification of the compounds detected we used our own TBDMS EI spectrum library, compiled on the basis of TBDMS derivatization and subsequent GC/IT-MS full scan analysis of components previously identified in various plant tissues by GC/MS. The components identified are listed in Table 2. So far altogether 63 compounds have been identified in ovules excised from ovaries 1 day post anthesis. Of these, eight sugars and sugar alcohols were identified as TMS derivatives, and the rest as TBDMS derivatives. These metabolites were classified into 5 groups, namely sugars, amino acids, organic acids, fatty acids and other compounds, the latter including nitrogen-containing compounds and phenolic acids. In reports on target compound analysis of bulk amount of wheat ovaries/ovules published to date, organic metabolites studied have been restricted to carbohydrates, amino acids (Charman *et al.*, 1996; Maës *et al.*, 1999) and certain plant hormones (Gusakovskaya and Blintsov 2001, 2004, 2006; Hess *et al.*, 2002), and no data are available on organic acids and fatty acids identified by us as additional characteristic components. According to the data in Table 2, carbohydrates make up about 2.3% (m/m) of the mass of the ovule 1 day post anthesis. The most abundant carbohydrates were sucrose (0.8%), inositol (0.7%) and raffinose (0.4%). Amino acids and organic acids amount to 1% and 0.8% (m/m), respectively. The most abundant amino acids were: glutamine (0.35%), asparagine (0.16%), alanine (0.13%) and glutamic acid (0.11%). The amount of the other proteinaceous amino acids detected were in the range of (0.01-0.1%). Among the 16 organic acids detected, citric acid (0.16%), malic acid (0.15%), *cis*-aconitic acid (0.08%) and isocitric acid (0.07%) were the most characteristic representatives of their respective groups. The amount of fatty acids was about 0.4% (m/m), the most abundant among them being stearic acid (0.13%), palmitic acid (0.07%), linoleic acid (0.06%), hexanoic acid (0.05%) and oleic acid (0.03%). The amounts of sugars and amino acids determined in the course of the analysis of a relatively large number of ovaries reported in the literature (Charman *et al.*, 1996; Maës *et al.*, 1999) are in the same order of magnitude as the amounts of these compounds determined by our microanalytical method, demonstrating that our method is suitable for studying the metabolite profile of a single ovule. We wish to extend our present studies to the determination of the amount of plant hormones in ovules; however, the concentration of these compounds in various tissues is so low that their qualitative and quantitative analysis will most probably need at least 100 ovules of identical age.

Acknowledgements

This study was supported by the Hungarian Government with research grant NKFP 4/064/04 and by the Hungarian State Research grant OTKA T049312.

References

- Aharoni A, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, Goodenowe DB. 2002. Nontargeted metabolom analysis by use of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *Omics* **6**: 217-234.
- Allwood JW, Goodacre R. 2010. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem Anal* **21**: 33-47.
- Birkemeyer C, Kolasa A, Kopka J. 2003. Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J Chrom A* **993**: 89-102.
- Broyart C, Fontaine JX, Molinie R, Cailleu D, Terce-Laforgue T, Dubois F, Hirel B, Mesnard F. 2010. Metabolic profiling of maize mutants deficient for two glutamine synthetase isoenzymes using H-1-NMR-based metabolomics. *Phytochem Anal* **21**: 102-109.
- Carman JG, Bishop DL, Hess JR. 1996. Carbohydrates, minerals and free amino acids in *Triticum aestivum* L. kernels during early embryony. *J Plant Physiol* **149**: 714-720.
- Colebatch G, Desbrosses G, Ott T, Krusell L, Montanari O, Kloska S, Kopka J, Udvardi MK. 2004. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation. *Plant J* **39**: 487-512.
- Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000a. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnol* **18**: 1157-1161.
- Fiehn O, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000b. Identification of uncommon plant metabolites based on calculations of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal Chem* **72**: 3573-3580.
- Fiehn O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* **48**: 155-171.
- Grata E, Guillarme D, Glauser G, Boccard J, Carrupt PA, Veuthey JL, Rudaz S, Wolfender JL. 2009. Metabolite profiling of plant extracts by ultra-high-pressure-liquid-chromatography at elevated temperature coupled to time-of-flight mass spectrometry. *J Chrom A* **1216**: 5660-5668.
- Gullberg J, Jonsson P, Nordstrom A, Sjostrom M, Moritz T. 2004. Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* **331**: 283-295.
- Gusakovskaya MA, Blintsov AN. 2001. Participation of cytokinins in the induction of embryogenesis in amphimicts and apomicts. *Doklady Biochem Biophys* **378**: 162-164.
- Gusakovskaya MA, Blintsov AN. 2004. Spatial and temporal distribution of zeatin and zeatin riboside during the period of egg-cell activity in the ovaries of amphimictic and apomictic plants. *Russian J Plant Physiol* **51**: 222-227.
- Gusakovskaya MA, Blintsov AN. 2006. Spatial and temporal distribution of free and bound ABA in wheat and dandelion ovaries in the period of egg-cell activity. *Russian J Plant Physiol* **53**: 355-358.

- Hess JR, Carman JG, Banowetz GM. 2002. Hormones in wheat kernels during embryony. *J Plant Physiol* **159**: 379-386.
- Lapainis T, Rubakhin SS, Sweedler JV. 2009. Capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection for single-cell metabolomics. *Anal Chem* **81**: 5858-5864.
- Leon C, Rodriguez-Meizoso I, Lucio M, Garcia-Canas V, Ibanez E, Schmitt-Kopplin P, Cifuentes A. 2009. Metabolomics of maize combining Fourier transform-ion cyclotron resonance-mass spectrometry, capillary electrophoresis mass spectrometry and pressurized liquid extraction. *J Chrom A* **1216**: 7314-7323.
- Maës O, Comeau A, Nadeau P, Simard RR, St-Pierre CA. 1999. Characterization of the natural chemical and osmotic environment of early wheat embryogenesis. *Physiol Plant* **107**: 220-229.
- McDonnell LA, Heeren RMA. 2007. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectr Rev* **26**: 606-643.
- Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. 2002. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discovery* **1**: 153-161.
- Noctor G, Bergot GL, Mauve C, Thominet D, Lelarge-Trouverie C, Prioul JL. 2007. A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics* **3**: 161-174.
- Palama TL, Khatib A, Choi YH, Payet B, Fock I, Verpoorte R, Kodja H. 2009. Metabolic changes in different developmental stages of *Vanilla planifolia* pods. *J Agr Food Chem* **57**: 7651-7658.
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Technical advance: Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J* **23**: 131-142.
- Roessner U, Willmitzer L, Fernie AR. 2002. Metabolic profiling and biochemical phenotyping of plant systems. *Plant Cell Rep* **21**: 189-196.
- Sato S, Soga T, Nishioka T, Tomita M. 2004. Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J* **40**: 151-163.
- Tolstikov VV, Fiehn O. 2002. Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Anal Biochem* **301**: 298-307.
- Tolstikov VV, Lommen A, Nakanishi K, Tanaka N, Fiehn O. 2003. Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics. *Anal Chem* **75**: 6737-6740.
- van der Werf MJ. 2005. Towards replacing closed with open target selection strategies. *Trends Biotechnol* **23**: 11-16.
- Yang SO, Kim SH, Kim Y, Kim HS, Chun YJ, Choi HK. 2009. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* calli according to their relative locations using H-1-NMR and principal component analysis. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 2032-2036.

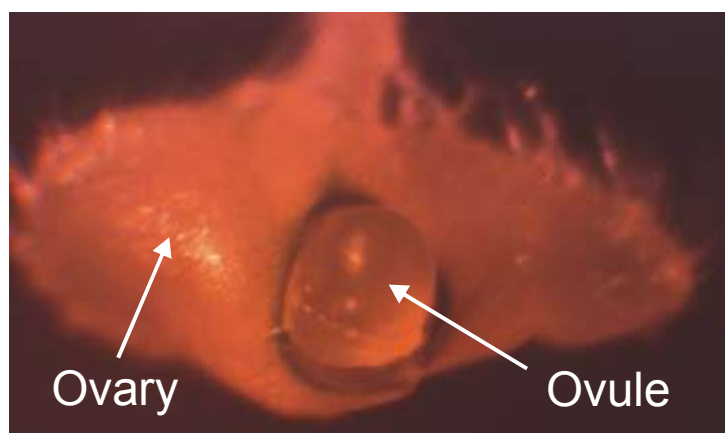


Figure 1. Removal of the ovule from the ovary (1 day post anthesis).

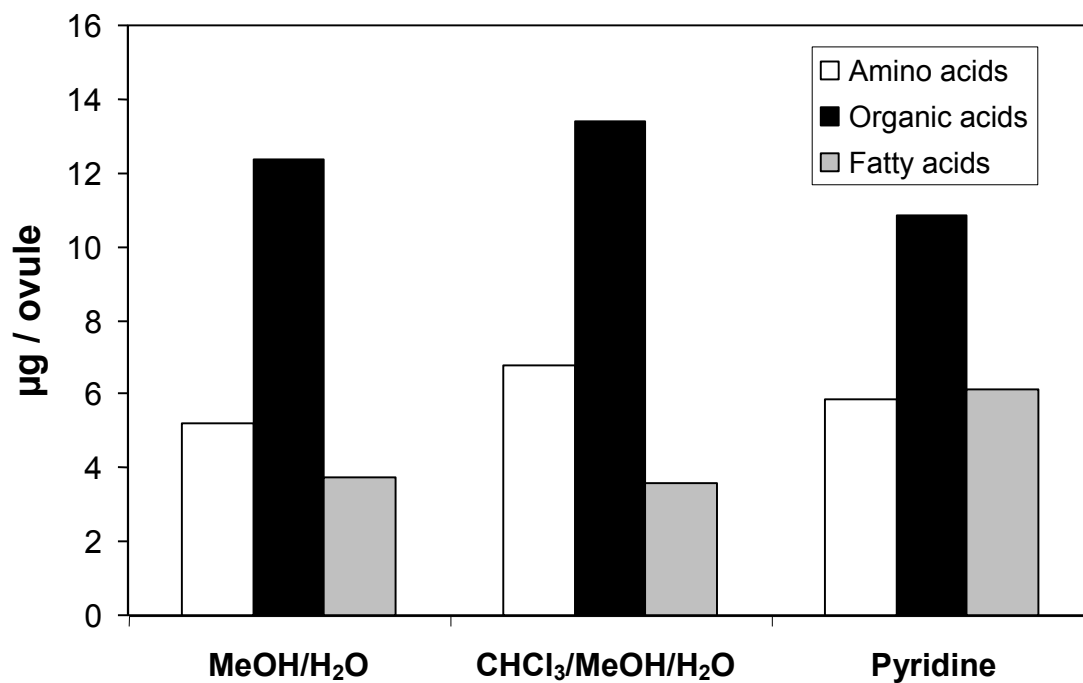


Figure 2. Efficiency of the extraction solvent.

Table 1. Recovery experiment

Metabolite group	Recovery (%)
Carbohydrates (<i>Ribitol</i>)	60.0
Amino acids (<i>Norleucine</i>)	109.7
Organic Acids (<i>Tartaric acid</i>)	98.9
Fatty Acids (<i>Ethylhexanoic acid</i>)	36.6
N-compounds (<i>Oxamide</i>)	88.8
Phenolic compounds (<i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i>)	100.9

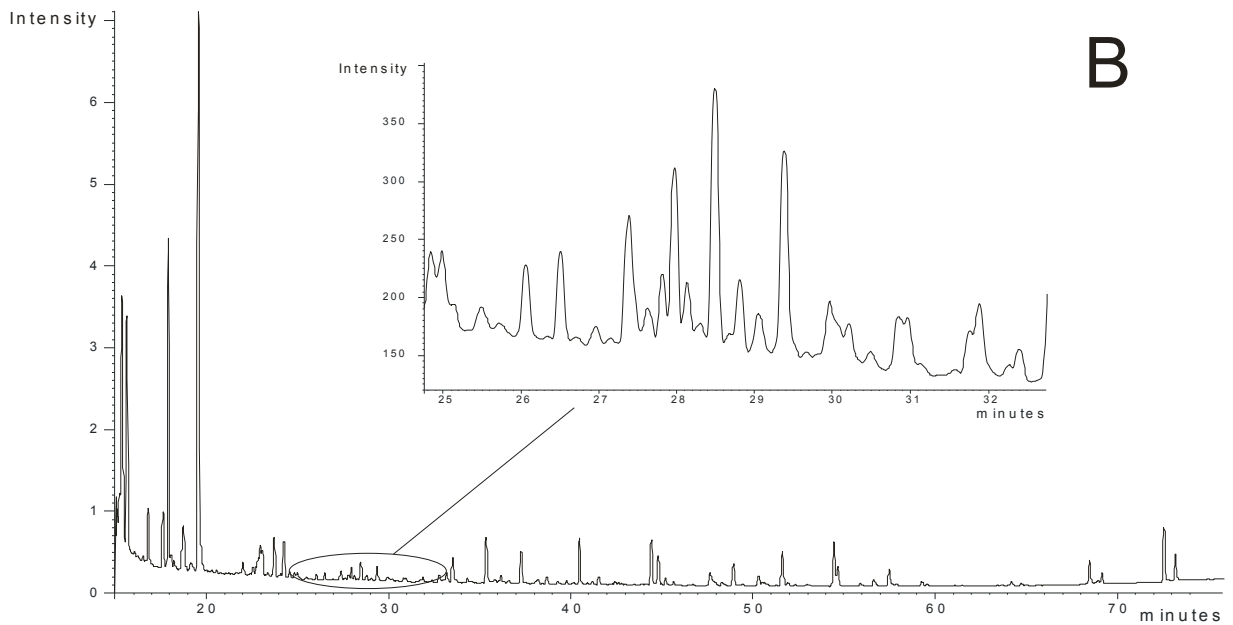
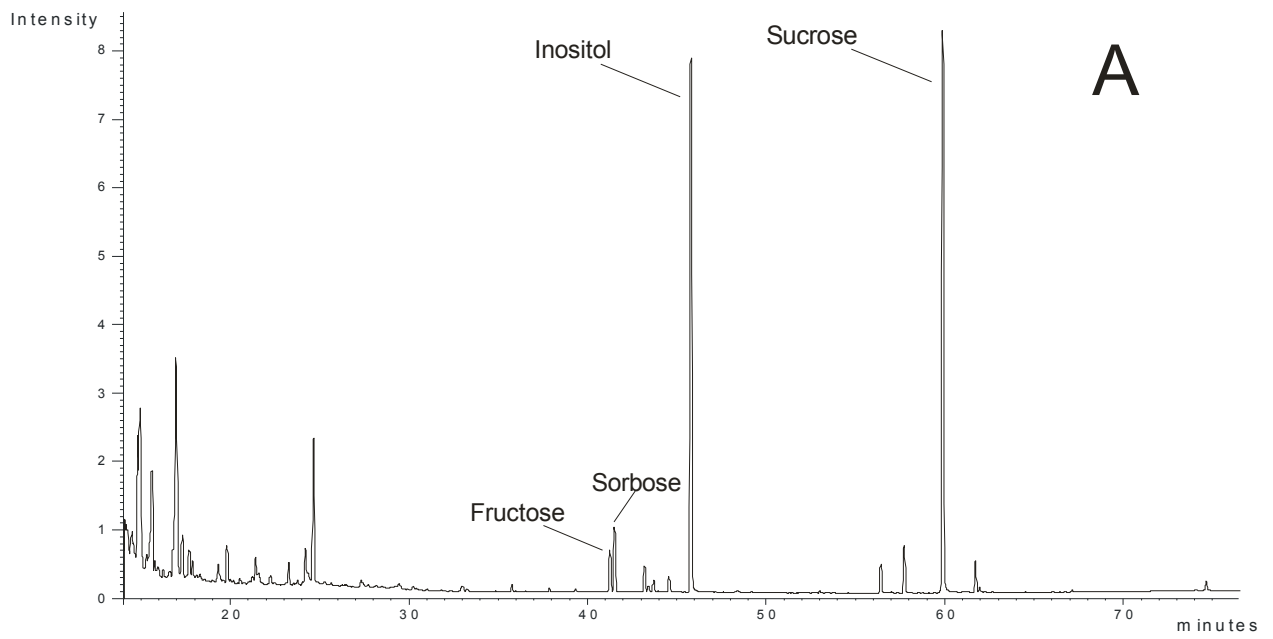


Figure 3. GC/IT MS total ion (full scan) chromatograms of trimethylsilylated (A) and *tert*-butyldimethylsilylated (B) wheat ovules (1 day post anthesis)

Table 2. Identified metabolites, their characteristic *m/z* values and quantities in ovules (1-day post anthesis)

Metabolite	Characteristic ions (<i>m/z</i>)	Amount (µg/g ovule)
CARBOHYDRATES		
Mannitol	319 , 345, 421	0.7
Inositol	265 , 305, 507	6984
Fructose	217 , 422, 612	2360
Sorbose	217 , 422, 612	425
Glucose	217 , 319, 612	473
Trehalose	191, 361 , 435	134
Maltose	204, 361 , 538	388
Saccharose	218, 361 , 437	8034
Raffinose	218, 361 , 437	4171
AMINO ACIDS		
Alanine	158, 232 , 260	1353
Glycine	218 , 246	83
2-Aminobutyric acid	172, 246 , 274	33
Valine	186 , 260, 288	169
Leucine	200 , 274, 302	91
Isoleucine	200 , 274, 302	122
4-Aminobutyric acid	216, 258, 274	43
Proline	184 , 258, 28	533
Methionine	218, 292 , 320	108
Serine	288, 363 , 390	618
Threonine	303 , 376, 404	340
Phenylalanine	302, 308 , 336	134
Homoserine	303, 377 , 404	92
Aspartic acid	377, 390, 418	234
Glutamic acid	273, 331 , 432	1128
Asparagine	257, 400, 417	1580
Lysine	198 , 272, 300	266
Glutamine	271, 385, 431	3518
Arginine	200, 341, 442	218
Tyrosine	244 , 302, 489	142
ORGANIC ACIDS		
Oxalic acid	261	89
Lactic acid	233 , 261	398
Glycolic acid	219, 247	205
Pyruvic acid	231, 259	92
Glyoxylic acid	270, 344 , 372	517
Maleic acid	287	150

Succinic acid	289	131
Oxaloacetic acid	303	573
Glyceric acid	231 , 391	165
Malonic acid	389	402
Malic acid	391, 419	1577
α -Ketoglutaric acid	375 , 431, 473	68
<i>cis</i> -Aconitic acid	327, 459 , 501	775
Citric acid	359, 459, 591	1646
Isocitric acid	432, 459, 591	730
Fumaric acid	246, 287 , 329	359

FATTY ACIDS

Hexanoic acid	131, 173 , 215	482
Octanoic acid	131, 201 , 259	9
Decanoic acid	131, 229 , 247	7
Dodecanoic acid	131, 257 , 275	46
Tetradecanoic acid	129, 285	49
<i>cis</i> -9-hexadecenoic acid	131, 311 , 329	141
Hexadecanoic acid	131, 313 , 331	743
<i>cis</i> -9-octadecenoic acid	131, 339 , 357	340
Linoleic acid	131, 337 , 355	663
Linolenic acid	131, 335	56
Octadecanoic acid	131, 342 , 398	1333
Eiocosanoic acid	131, 369	121

N-COMPOUNDS

Nicotinic acid	106, 136, 180	10
Urea	171, 213, 231	38
Cytosine	98, 282 , 324	14

PHENOLIC COMPOUNDS

Benzoic acid	105, 135, 179	74
Salicylic acid	196, 309 , 351	9
Ferulic acid	293 , 365, 407	35
3,4-dihydroxybenzoic acid	325, 439 , 481	24
