

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Fyziologická a metabolická charakterizace  
vybraných genotypů bazalky pravé pěstovaných  
za kontrolovaných podmínek**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Karolína Komzáková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Ing. Sanja Ćavar Zeljković, Ph.D.</b>
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 26. 4. 2022

.....



Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce, Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, poskytnuté konzultace při vypracovávání teoretické i praktické části diplomové práce a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala Ing. Kataríně Kaffkové, Ph.D. za pomoc se získáním semen bazalky pravé a odborný názor a pomoc s pěstováním rostlin. Poděkování patří také doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D., Mgr. Onřeji Vrobelovi a Mgr. Dominice Kaczorové za cenné rady, které mi pomohly s vypracováním diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Nurii De Diego Sanchez, Ph.D. za cenné rady a pomoc s pěstováním rostlin. Rovněž bych ráda poděkovala všem zaměstnancům oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Olomouci za milý přístup a výpomoc při práci v laboratoři.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Karolína Komzáková
Název práce	Fyziologická a metabolická charakterizace vybraných genotypů bazalky pravé pěstovaných za kontrolovaných podmínek
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; pracoviště Olomouc
Vedoucí práce	Ing. Sanja Čavar Zeljković, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

V posledních letech dochází po celém světě ke změně klimatu, zasolování půd a působení různých environmentálních vlivů na produkci plodin. Pomocí hydroponického pěstování je možné sledovat vliv vybraných abiotických stresů na růst a nutriční složení rostlin a plodin, díky čemuž je možné nalézt optimální podmínky pro jejich růst. V této diplomové práci byl zkoumán vliv příjmu dusíku a působení solného stresu na fyziologický vzhled rostlin, obsah aminokyselin a obsah vybraných sekundárních metabolitů u genotypů bazalky pravé 'Litra', 'Chládek červená' a 'Mánes'. Nejvíce zastoupené terpenoidy detekované analýzou GC-MS byly u všech tří genotypů linalool, eugenol, geraniol a methyleugenol. Byla provedena analýza UHPLC-MS/MS pro obsah aminokyselin, polyaminů a fenolických sloučenin. Při zvýšeném příjmu dusíku byl u genotypu 'Litra' a 'Mánes' sledován nárůst obsahu aminokyselin a polyaminů, rostlinám se dařilo i z fyziologického hlediska. Při nízkém příjmu dusíku byl sledován nárůst fenolických sloučenin u všech tří genotypů, u genotypu 'Mánes' vzrostl i obsah terpenoidů. Při použití kontrolního 1/2 Hoaglandova roztoku byl pozorován nejvyšší obsah terpenoidů u genotypu 'Litra'. Při aplikaci solného stresu došlo u všech tří genotypů k nárůstu obsahu prolinu, jakožto osmolytu, jehož akumulace vede ke zmírnění účinků solného stresu. Genotyp 'Chládek červená' vykazoval celkově nízkou odolnost vůči solnému stresu, při jeho aplikaci obsahoval však nejvíce terpenoidů a polyaminů. Genotyp 'Mánes' se naopak jevil jako vysoce odolný vůči solnému stresu, kdy obsahoval také nejvíce fenolických látek stejně jako genotyp 'Litra'.

Klíčová slova	<i>Ocimum basilicum</i> L., podmínky pěstování rostlin, sekundární metabolity, GC-MS, LC-MS
Počet stran	123
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Karolína Komzáková
Title	Physiological and metabolomics characterization of selected basil genotypes currently grown under controlled conditions
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, v.v.i. Olomouc
Supervisor	Ing. Sanja Čavar Zeljković, Ph.D.
The year of presentation	2022

### Abstract

In recent years, climate change, soil salinisation and various environmental impacts on crop production have taken place around the world. With hydroponic cultivation, it is possible to control the influence of selected abiotic stresses on the growth and nutritional composition of plant and crops, thans to which it is possible to find optimal conditions for their growth. In this diploma thesis, the influence of nitrogen intake and salt stress on the physiological appearance of plants, amino acid content and content of selected secondary metabolites in the basil genotypes 'Litra', 'Chládek červená' and 'Mánes' was investigated. The most contained terpenoids detected by GC-MS analysis in all three genotypes were linalool, eugenol, methyleugenol and geraniol. UHPLC-MS/MS analysis was performer for amino acids, polyamines and phenolic compounds. With a high nitrogen intake, an increase in the content of amino acids and polyamines was detected for genotype 'Litra' and 'Mánes', and the plants also prosper from a physiological point of view. With a low nitrogen uptake, an increase in phenolic compounds was detected in all three genotypes, and the terpenoid content for genotype 'Mánes' also increased. With using the control ½ Hoagland's solution, the highest terpenoid content was detected for genotype 'Litra'. During the application of salt stress, the content of proline, as an osmolyte, the accumulation of which leads to the mitigation of the effects of salt stress, increased in all three genotypes. The genotype 'Chládek červená' showed an averall low resistance to salt stress, but when applied, it contained the most terpenoids and polyamines. The genotype 'Mánes', on the other hand, appeared to be highly resistant to salt stress, as it also contained the most phenolic compounds as well as the genotype 'Litra'.

Keywords	<i>Ocimum basilicum</i> L., plant growing conditions, secondary metabolites, GC-MS, LC-MS
Number of pages	123

Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>12</b>
2.1	<i>Ocimum</i> L.	12
2.1.1	<i>Ocimum basilicum</i> L.	12
2.1.1.1	<i>Ocimum basilicum</i> 'Chládek červená'	13
2.1.1.2	<i>Ocimum basilicum</i> 'Litra'	13
2.1.1.3	<i>Ocimum basilicum</i> 'Mánes'	13
2.2	Pěstování a růst rostlin	14
2.2.1	Pěstování bazalky pravé	14
2.2.2	Hydroponie	14
2.2.2.1	Hydroponické systémy	15
2.2.2.1.1	Knotový systém	15
2.2.2.1.2	Systém odlivu a přílivu	15
2.2.2.1.3	Odkapávací systém	16
2.2.2.1.4	Hluboká vodní kultura	16
2.2.2.1.5	Technika nutričního filmu	16
2.2.2.1.6	Aeroponie	16
2.2.2.2	Živné roztoky používané v hydroponii	17
2.2.2.2.1	Složení živných roztoků	17
2.2.2.2.2	pH živných roztoků a elektrická vodivost	19
2.2.2.3	Substráty používané v hydroponii	20
2.2.2.4	Výhody a využití hydroponie	20
2.3	Rostlinné metabolity	22
2.3.1	Metabolismus dusíku u rostlin	22
2.3.1.1	Asimilace dusičnanů	23
2.3.1.2	Přeměna amonných iontů	24
2.3.1.3	Metabolismus glutaminu a glutamátu	25
2.3.1.4	Vliv světla na metabolismus dusíku	26
2.3.2	Sekundární metabolity	26
2.3.2.1	Polyaminy	26
2.3.2.1.1	Biosyntéza polyaminů	27
2.3.2.1.2	Katabolismus polyaminů	28
2.3.2.2	Fenolické sloučeniny	28
2.3.2.2.1	Základní cesta syntézy fenyylpropanoidů	28
2.3.2.2.2	Polyfenoly	30
2.3.2.2.2.1	Fenolové kyseliny	30
2.3.2.2.2.2	Flavonoidy	31
2.3.2.2.2.3	Stilbeny	32
2.3.2.2.2.4	Lignany	32
2.3.2.3	Terpenoidy	32
2.3.2.3.1	Biosyntéza terpenoidů	33
2.3.2.3.2	Klasifikace terpenoidů	34
2.4	Abiotický stres a jeho vliv na produkci vybraných sekundárních metabolitů	36
2.4.1	Polyaminy jako reakce na abiotický stres	37
2.4.2	Fenolické sloučeniny jako reakce na abiotický stres	37
2.4.3	Terpenoidy jako reakce na abiotický stres	38
2.5	Metody studia rostlinných metabolitů	39
2.5.1	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS)	39

2.5.1.1	Příprava vzorku pro GC-MS - derivace	40
2.5.1.2	Princip plynové chromatografie	40
2.5.1.2.1	Injektor	40
2.5.1.2.2	Pec a kapilární kolona	41
2.5.1.3	Princip hmotnostní spektrometrie	42
2.5.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS)	43
2.5.2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	43
2.5.2.1.1	Kolony používané v HPLC	43
2.5.2.1.2	Stacionární a mobilní fáze	44
2.5.2.1.3	Injektor	45
2.5.2.1.4	Detektory	45
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	46
3.1	Použitý materiál	46
3.1.1	Chemikálie	46
3.1.2	Biologický materiál	47
3.2	Přístrojové vybavení	48
3.3	Použité metody	49
3.3.1	Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope	49
3.3.2	Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system	52
3.3.3	Zpracování rostlinného materiálu pro další experimenty	53
3.3.4	Analýza terpenoidů pomocí GC-MS	53
3.3.5.1	Analýza aminokyselin pomocí UHPLC-MS/MS	55
3.3.5.2	Analýza polyaminů pomocí UHPLC-MS/MS	60
3.3.6	Analýza fenolických sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS	63
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	67
4.1	Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope	67
4.3	Analýza terpenoidů pomocí GC-MS	77
4.3.1	Rostliny bazalky pravé vypěstované za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope	77
4.3.2	Rostliny bazalky pravé vypěstované za kontrolovaných podmínek ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system	82
4.4	Analýza dusíkatých sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS	87
4.5	Analýza fenolických sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS	96
4.5.1	Analýza fenolických sloučenin u rostlin bazalky pravé vypěstovaných za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope	96
4.5.2	Analýza fenolických sloučenin u rostlin bazalky pravé vypěstovaných za kontrolovaných podmínek ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system	101
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b>	106
5.1	Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope a ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system	106
5.2	Analýza terpenoidů pomocí GC-MS	107
5.3	Analýza dusíkatých sloučenin	110
5.4	Analýza fenolických sloučenin	113

<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>123</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část:**

Vypracování literární rešerše s využitím klíčových slov: *Ocimum basilicum* L., podmínky pěstování rostlin, sekundární metabolity, GC-MS, LC-MS.

### **Experimentální část:**

Posouzení vlivu kultivačních podmínek na produkci sekundárních metabolitů.



# 1 ÚVOD

V posledních několika desetiletích je zemědělská produkce plodin negativně ovlivňována různými environmentálními vlivy. Dochází ke změnám klimatu, zasolování půd a uvolňování různých znečišťujících látek. Tyto i jiné abiotické stresy, jako je nedostatek živin či jejich nadbytek v důsledku používání hnojiv, představují příčinu ztráty výnosů plodin po celém světě.

Rostliny neustále reagují a přizpůsobují se změnám prostředí tak, aby se vyrovnaly s těmito stresujícími podmínkami. Dochází ke změnám genové exprese látek, které pomáhají rostlinám se vyrovnat s různými druhy abiotického stresu. K přizpůsobení se působení abiotického stresu přispívá produkce různých polyaminů (Alcázar *et al.*, 2006), polyfenolů jako jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany (Šamec *et al.*, 2021) a terpenoidů (Boncan *et al.*, 2020).

Jelikož je sledování vlivů stresových podmínek při pěstování plodin na polích příliš složité z důvodu působení mnoha různých druhů stresu zároveň, jako je nepříznivé počasí a působení škůdců a nemožnost přesně kontrolovat složení půdy a dostupnost živin u jednotlivých rostlin, je nejlepší strategií pěstování plodin za kontrolovaných podmínek. Tímto přístupem je možné zlepšovat přístup pěstování plodin, sledovat vliv jednotlivých stresů na růst, vývoj a nutriční složení rostlin, a díky tomu je možné následně zlepšit kvalitu pěstovaných plodin a jejich výnos.

Sekundární metabolity, jako jsou polyaminy, fenolické sloučeniny a terpenoidy, jsou nejen obranou rostlin proti abiotickému stresu, ale pro konzumenty plodin představují také zdroj látek s antimikrobiálními a antioxidačními účinky.

Jednou z rostlin obsahující látky mající antioxidační a antimikrobiální účinky je bazalka pravá. Díky svým vlastnostem nachází využití v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Putievsky a Galambosi, 1999; Sienkiewicz *et al.*, 2013).

Tato diplomová práce se zabývá vlivem podmínek pěstování na růst bazalky pravé a obsah aminokyselin, polyaminů, fenolických sloučenin a vybraných terpenoidů v bazalce pravé. Cílem práce je posoudit vliv nedostatečného a nadměrného přísunu dusíku a vliv solného stresu na obsah vybraných metabolitů ve třech různých genotypech bazalky pravé.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 *Ocimum* L.

Rod *Ocimum*, tedy bazalka, patří do čeledi *Lamiaceae*, tedy hluchavkovité. Tento rod zahrnuje přes 60 různých druhů. Rostliny řadící se k tomuto rodu se přirozeně vyskytují v tropických oblastech Afriky, Ameriky a Asie. Dnes jsou rozšířeny po celém světě. Pro svůj růst vyžadují teplo, je potřeba je chránit proti mrazu. Jednou z charakteristických vlastností tohoto rodu je aromaticita rostlin způsobená obsahem silic složených převážně z monoterpenů, seskviterpenů a fenypropanoidů (Paton *et al.*, 1999).

#### 2.1.1 *Ocimum basilicum* L.

Bazalka pravá, *Ocimum basilicum* L., je jedním z nejvíce využívaných druhů rodu *Ocimum*. Jedná se o jednoletou bylinu dorůstající výšky až 0,6 metrů. Její čtyřhranný stonek může být lysý nebo puberulentní s nepatrnými chloupky soustředěnými na protilehlých stranách stonku. Má pouze hlavní kořen bez oddenků. Její listy mohou být řapíkaté či přisedlé, často na okrajích ozubené. Květenstvím je thyrus složený z jednoho až tří vrcholíků (Paton *et al.*, 1999).

Bazalce pravé vyhovují dlouhé slunečné dny. V laboratorních podmínkách je optimální doba osvětlení 15–21 hodin (Skrubis a Markakis, 1976). Optimální teplota pro růst v laboratorních podmínkách je 24–27 °C ve dne a 19–22 °C v noci (Putievsky, 1983). Optimální půda pro pěstování bazalky je jílovitá či písčité-jílovitá s dobrou kapacitou zadržování vody. Ideální je půda bohatá na humus či mírně hnojená půda (Putievsky a Galambosi, 1999). Vyžaduje kontinuální přísun vody a k nedostatku vody je netolerantní (Simon *et al.*, 1992). Množení je nejlepší provádět pomocí semen. Zralá semena jsou černá či tmavě hnědá a velmi drobná. Klíčení semen je obecně rychlé a při laboratorních podmínkách a optimální denní a noční teplotě vyklíčí 80 % semen do čtyř dnů (Putievsky, 1983).

Bazalka pravá nachází využití v mnoha odvětvích. V potravinářském průmyslu se využívá čerstvá i sušená, jsou využívány i její silice. Dále se využívá v alternativní medicíně k léčbě onemocnění jako jsou bolesti hlavy, kašel, zažívací obtíže a porucha funkce ledvin (Wome, 1982; Giron *et al.*, 1991). Silice bazalky pravé, především ty s obsahem kafru, mají antibakteriální účinky (Putievsky a Galambosi, 1999).

#### **2.1.1.1 *Ocimum basilicum* 'Chládek červená'**

Tento genotyp bazalky pravé pochází z území Československa (GRIN Czech 1.10.3: <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/accessiondetail.aspx?id=68924> (29.3.2021).).

Pro tento genotyp je charakteristické tmavozelené až fialové zbarvení stonku i listů. Stonek je hladký. Listy jsou podlouhlé, zvlněné podél žilnatiny a na okrajích mírně pilovité. Mohou dorůstat velikosti až 10 cm.

#### **2.1.1.2 *Ocimum basilicum* 'Litra'**

Tento genotyp bazalky pravé pochází také z území Československa a dorůstá výšky 41-60 cm. Stonek i listy rostliny jsou jasně zelené. Stonek je ochlupený, podlouhlé pilovité listy jsou zvlněné podél žilnatiny a dorůstají velikosti až 6 cm. Bílá květenství dosahují velikosti okolo 1,5 cm (GRIN Czech 1.10.3: <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/accessiondetail.aspx?id=36034> (29.3.2021).).

#### **2.1.1.3 *Ocimum basilicum* 'Mánes'**

Genotyp bazalky pravé 'Mánes' je kompaktního vzrůstu. Rostliny mají charakteristicky tmavozelenou barvu. Tento genotyp je vhodný pro pěstování v květináčích, truhlících i v půdě (SEMO.cz: <https://www.semo.cz/eshop/bazalka-prava-manes-prodej-osivo-semena-p5894/> (29.3.2021).). Jedná se o rostlinu s drobnými, velmi početnými listy. Listy jsou podlouhlé, pilovité na okrajích. Dorůstají velikosti do 4 cm.

## 2.2 Pěstování a růst rostlin

Růst rostlin je přirozeným výsledkem určitých chemických reakcí a změn, které probíhají ve všech živých organismech. Tento postup budování živé hmoty vyžaduje vhodné prostředí a dostatečný přísun živin. Pro rostliny jsou základními faktory pro růst voda, vzduch, světlo, minerální soli a podpora pro kořeny (Douglas, 1977).

### 2.2.1 Pěstování bazalky pravé

Bazalka pravá je jednoletá bylina, která pochází z teplých a tropických oblastí jako jsou jižní Asie, Indie a Afrika, ale v dnešní době se pěstuje po celém světě. Bazalka pravá je velmi tolerantní k variabilním ekologickým podmínkám. Roste v oblastech chladných vlhkých lesů i tropických deštných pralesů při teplotách v rozmezí 6-24 °C při dostatečném množství srážek (Duke a Hurts, 1975).

Navzdory tomu, že bazalka pravá roste ve variabilních podmínkách, nejpříznivější podmínky pro růst jsou v oblastech s teplým podnebím. Dostatek tepla, světla a vlhkosti jsou pro růst bazalky pravé základní podmínky. Je známo, že bazalka pravá je náchylná k mrazu (Sørensen a Henriksen, 1992).

Bazalka pravá nejlépe roste při dlouhém přísunu světla. Při kontrolovaných podmínkách vyhovuje nejvíce 15-21 hodin světla (Skrubis a Markakis, 1976).

### 2.2.2 Hydroponie

Hydroponie je technika pěstování rostlin v živném roztoku bez nebo s použitím inertního média. Jako inertní médium může být využit písek, šterk, vermikulit, perlit, minerální vata, rašelina, kokosové vlákno nebo piliny. Inertní médium slouží především jako mechanická podpora pro rostliny. Kapalné hydroponické systémy nemají žádné podpůrné médium, agregované systémy mají jako oporu právě pevné inertní médium (Jensen, 1997; Kaul *et al.*, 2017; Rodríguez-Delfín *et al.*, 2017).

Hydroponické pěstování využívá toho, že rostliny mohou čerpat z živného roztoku anorganické ionty, které dále spolu s vodou, oxidem uhličitým a slunečním či umělým zářením využívají k syntéze všech důležitých živin. Do živného roztoku mohou být přidány esenciální a stopové prvky v anorganické či organické, pevné či kapalné formě, a díky tomu mohou být kontrolovány a upravovány podmínky pro růst daných rostlin. Díky tomu mohou být vytvořeny jak přirozené, tak i nepřirozené podmínky pro růst rostlin (Kaul *et al.*, 2017). Během pěstování v hydroponickém systému je potřeba

dbát na další důležité faktory růstu rostlin, jako je teplota vzduchu a světelné záření (Jensen, 1997).

Hydroponické systémy se dělí na otevřené, kdy je přebytečný živný roztok odváděn od kořenů pryč a není znovu použit pro zavlažování, a uzavřené, kdy je přebytečný živný roztok regenerován, doplněn a znovu použit pro zavlažování (Jensen, 1997).

Výběr hydroponické metody je pro kultivaci rostlin velice důležitý a záleží na mnoha faktorech. Záleží zejména na velikosti prostoru pro pěstování, počtu a velikosti pěstovaných rostlin, času dostupného pro údržbu hydroponického systému a době, po jakou chceme rostliny pěstovat (Kaul *et al.*, 2017).

### **2.2.2.1 Hydroponické systémy**

#### **2.2.2.1.1 Knotový systém**

Jedná se o nejjednodušší hydroponický systém, u kterého není potřeba žádná elektřina, čerpadlo ani provzdušňovač. Rostliny jsou umístěny v inertním médiu, u jejich kořenů je knot, který vede skrz nádobu s rostlinami až do nádrže s živným roztokem. Živný roztok je přiváděn ke kořenům rostlin pomocí kapilárních sil. Tento systém funguje pro malé rostliny, pro větší množství rostlin je však neefektivní (Sharma *et al.*, 2018).

#### **2.2.2.1.2 Systém odlivu a přílivu**

V tomto hydroponickém systému jsou rostliny ukotveny k plovoucímu podkladu nebo jsou ukotveny v inertním médiu. Tento systém funguje na principu dočasného zaplavení živným roztokem a následného odplavení přebytečného živného roztoku. Živný roztok je nejprve pomocí čerpadla přiveden ke kořenům rostlin do určité úrovně a po nějakou dobu je zde ponechán. Poté dojde k odplavení vody pomocí gravitačních sil do nádrže. Průtok vody je regulován pomocí čerpadla s časovačem, kdy zaplavení a následné odplavení roztoku probíhá několikrát za den (Kaul *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018).

Mohou být rozlišovány dva druhy tohoto systému, které se liší umístěním a počtem nádob na živný roztok. V prvním z nich je pouze jedna nádrž s živným roztokem, která je umístěna přímo pod květináči s rostlinami, aby do ní mohl být zpětně odváděn živný roztok. Jeho nevýhodou je potřeba velkého prostoru pro pěstování a také limitace množství rostlin, které v něm lze vypěstovat. Druhou možností je využít 2 různých nádrží, kdy z jedné je pumpován živný roztok k rostlinám a do druhé, menší, je odváděn. Větší

nádrž může být umístěná jinde než přímo u květináče s rostlinami, díky čemuž je tento systém méně křehký než předchozí, ale stále prostorově náročný (Kaul *et al.*, 2017).

#### **2.2.2.1.3 Odkapávací systém**

V tomto hydroponickém systému je živný roztok přiváděn pomalu pomocí malých trubiček a pump z hlavní nádrže až ke kořenům rostlin, které jsou většinou zasazeny ve středně savém inertním médiu, aby živný roztok pomalu odkapával. Tento systém je velice dobrý pro pěstování plodin a je výhodný pro menší spotřebu vody (Kaul *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018).

#### **2.2.2.1.4 Hluboká vodní kultura**

Tento systém je nejčastěji využívaným hydroponickým systémem. Živný roztok je v systému přítomen stále a rostlina je ukotvena k podkladu plovoucím na vodě či pomocí inertního média. Živný roztok je do systému dodáván ručně a vzduch je přiváděn pomocí vzduchového čerpadla a vzduchového kamene do prostoru pod kořeny rostlin (Kaul *et al.*, 2017). Kořeny jsou neustále ponořeny v živném médiu a mohou tak stále čerpat živiny (Sharma *et al.*, 2018).

#### **2.2.2.1.5 Technika nutričního filmu**

Technika nutričního filmu je hydroponický systém, kdy jsou rostliny umístěny na nakloněný táč a ukotveny pomocí inertního média. Kořeny rostlin jsou umístěny v kanálech, ve kterých konstantně cirkuluje mělký proud vody s veškerými živinami potřebnými k růstu. Voda je odváděna zpět do zásobní nádrže s využitím gravitačních sil. Tento systém je méně objemný a vyžaduje menší prostor pro zásobu vody (Kaul *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018).

#### **2.2.2.1.6 Aeroponie**

Aeroponie je hydroponický systém využívaný pro rostliny, které mají vzdušné kořeny. Rostliny jsou ukotveny v polystyrenové destičce a jejich kořeny jsou zavěšeny ve vzduchu pod polystyrenovou destičkou (Sardare a Admane, 2013). Živný roztok je přiváděn pomocí pumpy a rozprašován na kořeny, které díky tomu mohou čerpat i vzdušný kyslík z okolního prostředí. Rozprašování živného roztoku probíhá v několikaminutových intervalech. Přebytečná voda je odváděna zpět do nádrže přes odtokové potrubí (Kaul *et al.*, 2017).

### **2.2.2.2 Živné roztoky používané v hydroponii**

Živné roztoky pro hydroponické pěstování jsou vodné roztoky obsahující převážně anorganické ionty z rozpustných solí obsahující esenciální prvky pro rostliny. V živných roztocích mohou být přítomny také organické sloučeniny, jako jsou cheláty železa. Prvky nezbytné pro život rostlin jsou uhlík, vodík, kyslík, dusík, síra, fosfor, draslík, vápník, hořčík, selen, železo, měď, zinek, mangan, molybden, bor, chlor a nikl. S výjimkou uhlíku a kyslíku, které jsou získávány z atmosféry jsou esenciální prvky přijímány z živného roztoku. Dále existují prvky, které nejsou nezbytné pro život rostlin, ale jsou prospěšné pro růst. Patří mezi ně sodík, křemík, vanad, selen, kobalt, hliník a jód. Základní živné roztoky se zaměřují pouze na ty nejdůležitější prvky, tedy dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík, síru a jsou doplněny o stopové prvky (Trejo-Télez a Gómez-Merino, 2012; Patil *et al.*, 2020a).

Voda je jedním z nejdůležitějších faktorů pro růst rostlin. Chemicky čistá voda je zdrojem pouze vodíku a kyslíku, ale běžně se ve vodě nachází i rozpuštěné minerální látky. Rostliny přijímají vodu i s rozpuštěnými minerálními látkami kořenovými vlásky a ta cirkuluje skrz celou rostlinu. Voda je pro rostliny hlavním zdrojem vodíku a spolu s oxidem uhličitým přijímaným z atmosféry zdrojem kyslíku (Douglas, 1977).

#### **2.2.2.2.1 Složení živných roztoků**

Minerální soli jsou pro rostliny hlavním zdrojem stavebních prvků. Mezi makroprvky rostlin patří uhlík, kyslík, vodík, dusík, fosfor, draslík, vápník a hořčík. Dusík je důležitý pro tvorbu proteinů, podporuje růst listů a stonků, přispívá k celkovému zdravému vzhledu rostliny. Fosfor stimuluje růst a vývoj květů a plodů, podporuje růst kořenů, urychluje proces dozrávání plodů a obecně přispívá ke správnému vývoji rostliny. Draslík hraje důležitou roli při syntéze cukrů a škrobů v rostlině, přispívá ke zpevnění a posílení pletiv rostlin. Vápník stimuluje růst kořenů a přispívá ke zpevnění buněčných stěn. Hořčík je důležitou složkou chlorofylu a je spojen s tvorbou rostlinných olejů. Rostliny pro růst potřebují také stopové prvky, kterými jsou síra, železo, bor, měď, mangan a zinek. Dalšími stopovými prvky důležitými pro vývoj a růst rostlin mohou být křemík, chlór, hliník, sodík a jód (Douglas, 1977).

Při nedostatku živin se projevují symptomy v závislosti na tom, jaký makroprvek rostlinám chybí. Nedostatek dusíku se projevuje zpomalením růstu, špatným vývojem rostliny a světláním až žloutnutím listů. Při nedostatku fosforu jsou listy naopak tmavě zelené, někdy se může objevovat až fialové a šedé zabarvení listů. Nedostatek draslíku

způsobuje skvrnitost spodních listů, jejich následné hnědnutí a spálení. Při nedostatku vápníku jsou rostliny zakrslé s tmavými a zvlněnými listy. Nedostatek hořčíku způsobuje žloutnutí listů, oddaluje kvetení a na listech se objevují bílé až hnědé skvrny. Při nedostatku síry se objevuje žluté zbarvení podél žilnatin listu a u báze listu se objevuje fialové zbarvení (Douglas, 1977).

Živné roztoky obvykle obsahují 6 základních makroživin, a to dusík, fosfor, síru, draslík, vápník a hořčík. Je důležité, aby byl v živném roztoku udržován vzájemný iontový poměr mezi anionty  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  a  $\text{SO}_4^{2-}$  a kationty  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Pro udržení iontové rovnováhy roztoku tedy není možné přidat některý z kationtů bez přidání některého z aniontů. Při kontinuální aplikaci živného roztoku není potřeba dodávat vysoké množství živin, používají se tedy živné roztoky s nízkou koncentrací živin (Trejo-Téllez a Gómez-Merino, 2012).

Nejčastěji používané látky pro přípravu živných roztoků jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1). Existuje nespočetné množství živných roztoků, několik z nich je uvedených v tabulce (Tab. 2) (Trejo-Téllez a Gómez-Merino, 2012).

Tab. 1: Nejčastěji používané sloučeniny pro přípravu živných roztoků v hydroponii.

Sloučenina	Chemický vzorec	Procentuální zastoupení významných makroprvků [%]
Dusičnan vápenatý pentahydrát	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	N: 15,5 ; Ca: 19
Dusičnan draselný	$\text{KNO}_3$	N: 13 ; K: 38
Dusičnan hořečnatý hexahydrát	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	N: 11 ; Mg: 9
Dusičnan amonný	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	N: 35
Dihydrogenfosforečnan draselný	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	P: 23 ; K: 28
Dihydrogenfosforečnan amonný	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	N: 12 ; P: 60
Síran draselný	$\text{K}_2\text{SO}_4$	K: 45 ; S: 18
Síran hořečnatý heptahydrát	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Mg: 10 ; S: 13
Síran amonný	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	N: 21 ; S: 24
Chlorid draselný	$\text{KCl}$	K: 60 ; Cl: 48



Tab. 2: Obsah jednotlivých prvků ve vybraných živných roztocích vhodných pro hydroponii.\*

Prvek	Hoagland & Arnon (1938) [mg.L <sup>-1</sup> ]	Hewitt (1966) [mg.L <sup>-1</sup> ]	Cooper (1979) [mg.L <sup>-1</sup> ]	Steiner (1984) [mg.L <sup>-1</sup> ]
N	210	168	200-236	168
P	31	41	60	31
K	234	156	300	273
Ca	160	160	170-185	180
Mg	34	36	50	48
S	64	48	68	336
Fe	2,5	2,8	12	2-4
Cu	0,02	0,064	0,1	0,02
Zn	0,05	0,065	0,1	0,11
Mn	0,5	0,54	2,0	0,62
B	0,5	0,54	0,3	0,44
Mo	0,01	0,04	0,2	Neuvažováno

\* Tabulka převzata z Trejo-Téllez a Gómez-Merino, 2012.

#### 2.2.2.2.2 pH živných roztoků a elektrická vodivost

Hodnota pH označuje vztah mezi koncentrací volných iontů H<sup>+</sup> a OH<sup>-</sup> přítomných v roztoku. Změna pH živného roztoku ovlivňuje jeho složení, rozložení prvků mezi jejich různé chemické a fyzikální formy a dostupnost látek rozpuštěných v roztoku. Pro příjem látek rostlinami je důležité, aby se látky nacházely v roztoku ve formě iontů, což úzce souvisí s regulací pH. Každá živina vykazuje rozdílné reakce na změny pH živného roztoku (Trejo-Téllez a Gómez-Merino, 2012). Vhodné pH roztoku by se mělo pohybovat v rozmezí 5,6-6,5. To je dáno tím, že celková dostupnost živin je optimální při mírně kyselém pH (Patil *et al.*, 2020a).

Celková koncentrace iontů v živném roztoku určuje růst a vývoj rostlin. Elektrická vodivost roztoku je dalším limitujícím faktorem pro růst rostlin, u různých druhů je však optimální elektrická vodivost rozdílná. Pomocí elektrické vodivosti je možné odhadnout osmotický tlak živného roztoku, který je závislý na celkovém množství rozpuštěných látek. Příliš vysoká elektrická vodivost může způsobit zabránění příjmu živin rostlinami zvýšením osmotického tlaku, naopak nižší elektrická vodivost roztoku může vážně ovlivnit zdraví rostliny a výnos (Trejo-Téllez a Gómez-Merino, 2012).

Dalším faktorem ovlivňující růst je salinita roztoku, kdy po překročení prahu pro danou rostlinu může salinita růst ovlivňovat negativně (Trejo-Téllez a Gómez-Merino, 2012).

### **2.2.2.3 Substráty používané v hydroponii**

Substrátů používaných v hydroponii je mnoho, patří mezi ně štěrk, písek, rašelina, perlit, vermikulit, piliny, kokosové vlákno a minerální vata. Substráty používané v hydroponii by měla být inertní média, která zaručují lepší podmínky pro zakořenění a růst rostlin a ukotvení kořenového systému. Substráty také pomáhají dodávat vodu a živiny ke kořenům a tvoří vhodné provzdušňovací prostředí pro kořeny. U substrátů sledujeme důležité vlastnosti, a to velikost částic, objemovou hustotu, smáčivost, kapacitu zadržování vody, pórovitost, vodivost a pH (Patil *et al.*, 2020b).

### **2.2.2.4 Výhody a využití hydroponie**

Hydroponické pěstování se stává více a více oblíbené, jelikož se jedná o čistou, relativně jednoduchou metodu, u které je minimální šance napadení plodin škůdci a hmyzem v půdě, což zároveň snižuje potřebu použití pesticidů. Rostliny pěstované touto metodou mají kratší dobu růstu, jelikož zde nejsou žádné mechanické překážky bránící kořenům v čerpání živin a živiny jsou tak pro rostliny snadno dostupné (Sharma *et al.*, 2018).

Velkou výhodou hydroponického pěstování je snadná kontrolovatelnost přístupu živin. Lze snadno sledovat a kontrolovat množství živin obsažených v živném roztoku a následně upravovat podmínky pro růst rostlin. U rostlin pěstovaných v půdě to není tak snadné, jelikož se živiny obsažené v živném roztoku vážou na částice půdy a jemné kořeny rostlin a vytváří tak nezávislé mikroprostředí. Tato heterogenita pak sledování spotřeby živin a kontrolování růstu rostlin komplikuje. Kořeny navíc mohou být mechanicky poškozeny. U hydroponického pěstování je kořen volně zavěšen a riziko mechanického poškození je tak při vytahování kořene minimální. Dostupnost živin je v každé části hydroponického systému rovnoměrná. Při pěstování v půdě je pro vizualizaci a hodnocení stavu rostliny k dispozici pouze vrchní část rostliny, zatímco v případě hydroponického pěstování je možné sledovat celou rostlinu i s kořeny (Kaul *et al.*, 2017).

Hydroponické pěstování rostlin může být dobrou alternativou díky stabilnímu a monitorovanému přísunu živin rostlinám. Hydroponický systém může být využit v místech, kde není dostatečné množství úrodné půdy pro pěstování rostlin a plodin,

v místech, kde není příznivé klima pro pěstování plodin, či ve velkých městech, kde je celkový nedostatek zelených ploch. Právě ve městech je hydroponie často využívána pro instalaci rostlin na stěny domů, což napomáhá v oblastech s teplým klimatem snižovat teplotu vzduchu uvnitř budov (Kaul *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018).

Hydroponické systémy šetří velké množství vody, protože živný roztok je přiváděn přímo ke kořenům rostlin a jeho přebytek může být sbírán a využit opakovaně. Dále je eliminován problém s půdními škůdci a plevelem, jelikož jsou do inertního média vysazovány jen rostliny, které jsou žádané. V dnešní době je hydroponie velmi využívána v zemědělství, kdy je dosahováno vyšších výnosů plodin oproti klasickému pěstování na poli (Sharma *et al.*, 2018).

## 2.3 Rostlinné metabolity

Rostliny produkují ve srovnání s ostatními organismy obrovské množství rozmanitých metabolitů. V primárním metabolismu jsou syntetizovány metabolity nezbytně nutné pro život, růst a vývoj rostlin. Sekundární metabolity častokrát hrají roli v odolnosti a toleranci vůči biotickému a abiotickému stresu.

### 2.3.1 Metabolismus dusíku u rostlin

Dusík je pro rostliny jednou z nejdůležitějších minerálních živin pro růst a tvorbu biomasy. Podílí se na syntéze aminokyselin, nukleových kyselin, lipidů, chlorofylu a dalších dusík obsahujících metabolitů. Rostliny dusík přijímají převážně v anorganické formě, v organické formě je dusík pro rostliny většinou nedostupný. Dostupnost dusíku v půdě není stálá a mění se v závislosti na vlastnostech půdy, jako jsou pH, vlhkost, textura a obsah mikroorganismů v půdě (Kusano *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

Dusík je přijímán z půdy kořenovými vlásky zejména ve formě dusičnanů v aerobních půdách a amonných iontů v půdách kyselých či v mokřadech (Guohua *et al.*, 2012). Dusičnany jsou náchylné k vyplavování z půdy, pokud nejsou využívány rostlinami či půdními mikroorganismy, jelikož obtížně tvoří povrchové komplexy s částicemi půdy. Rostliny si proto vyvinuly systém regulace transportérů dusičnanů k vychytávání dusičnanů z půdy a transportu v rostlině. Koncentrace amonných iontů v půdě bývá často nižší než koncentrace dusičnanů, ale i přesto jsou pro rostliny amonné ionty převládajícím dostupným zdrojem dusíku. Vysoký obsah amonných iontů v půdě je však pro většinu rostlin toxický (Wang *et al.*, 2014). U bobovitých rostlin mohou být tvořeny amonné ionty přímou fixací vzdušného dusíku  $N_2$  v kořenových hlízkách pomocí symbiotických bakterií (Lam *et al.*, 1996).

Část přijatého dusíku ve formě dusičnanů je asimilován v kořenech, ale většina je transportována do nadzemní části rostliny, zejména do listů (Guohua *et al.*, 2012). Dusičnany jsou transportovány xylémem pomocí transpiračního proudu. Dusičnany jsou skladovány ve vakuolách a při snížení externí dostupnosti dusičnanů jsou exportovány z vakuol a transportovány do rostoucích částí rostlin. Dalším místem, kde se dusičnany nachází, jsou chloroplasty a endoplazmatické retikulum. Amonné ionty jsou po absorpci uloženy v kořenových vakuolách, kde mohou být asimilovány na aminokyseliny, nebo jsou transportovány do nadzemních částí rostlin symplastickou či apoplastickou cestou (Wang *et al.*, 2014).

### 2.3.1.1 Asimilace dusičnanů

Před začleněním dusíku z dusičnanů do organických struktur musí být dusičnany nejprve redukovány na amonné ionty. Většina amonných iontů je poté využita na tvorbu aminokyselin v kořenech (Lam *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2014).

Dusičnany jsou redukovány na amonné ionty pomocí dvou enzymů, nitrátreduktasy a nitritreduktasy. Nitrátreduktasa katalyzuje dvouelektronovou redukci dusičnanového aniontu  $\text{NO}_3^-$  na dusitanový aniont  $\text{NO}_2^-$ . Dusitanový aniont je pak redukován nitritreduktasou na amonný iont  $\text{NH}_4^+$  za přenosu šesti elektronů. Redukce dusičnanů probíhá v kořenech i v nadzemních částech rostlin a je prostorově oddělena od redukce dusitanů. K redukci dusičnanů dochází v cytoplazmě, k redukci dusitanů dochází v plastidech a chloroplastech (Lam *et al.*, 1996; Guohua *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014).

Nitrátreduktasa je cytosolický enzym skládající se ze dvou identických podjednotek. Každá z podjednotek obsahuje tři kofaktory, flavinadenindinukleotid, molybdenový kofaktor a hem, které se účastní přenosu elektronů z NADH či NADPH na dusičnanový aniont  $\text{NO}_3^-$ . Nitrátreduktasa je indukována dostupností  $\text{NO}_3^-$ . Její aktivita je proto regulována několika mechanismy, aby se zabránilo akumulaci  $\text{NO}_2^-$ , které jsou pro rostlinné buňky toxické. Mezi tyto mechanismy patří degradace samotného enzymu, reverzibilní inaktivace enzymu či regulace efektoru a koncentrace substrátu. Koncentrace nitrátreduktasy je stimulována světlem, sacharosou a cytokininy, inhibována je glutaminem, který je primárním produktem asimilace dusíku (Wang *et al.*, 2014).

Vzniklý  $\text{NO}_2^-$  je transportován do chloroplastu, kde je následně redukován na  $\text{NH}_4^+$  enzymem nitritreduktasa. Nitritreduktasa je kromě v chloroplastech listů lokalizována také v plastidech kořenů (Lam *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2014). V chloroplastech je donorem elektronů pro redukci redukovaný ferredoxin, který je generován fotosystémem I během fotosyntézy. Elektrony jsou přenášeny z redukovaného ferredoxinu na  $\text{NO}_2^-$  přes doménu vázající ferredoxin, [4Fe-4S] centrum a sirohemový kofaktor vázaný na nitritreduktasu. V plastidech kořenů pochází redukovaný ferredoxin z NADPH, který je produkován v pentosofosfátové dráze a je spojen s ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reduktasou, která přeměňuje oxidovaný ferredoxin na redukovaný. Exprese genu nitritreduktasy je regulována světlem a dostupností dusíku (Wang *et al.*, 2014).

### 2.3.1.2 Přeměna amonných iontů

Anorganický dusík je asimilován na aminokyseliny glutamin, glutamát, asparagin a aspartát, které slouží jako důležité přenašeče dusíku v rostlinách. Enzymy podílející se na asimilaci anorganického dusíku do organické formy jsou klíčové pro růst rostlin (Lam *et al.*, 1996).

Amonné ionty mohou mít různý původ. Vznikají redukcí dusičnanů, jsou přijímány kořeny z půdy nebo vznikají fixací vzdušného dusíku pomocí symbiotických bakterií. Mohou také pocházet ze syntézy ligninu, z fotorespirace a z remobilizace dusíku indukované stárnutím. Veškeré tyto amonné ionty mohou být přeměňovány v plastidech či chloroplastech na aminokyseliny prostřednictvím glutaminyntetasa/glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasového cyklu (GS/GOGAT) (Guohua *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Glutaminyntetasa existuje ve více enzymových formách umístěných v cytoplasmě a v plastidech. Cytoplasmatická forma hraje hlavní roli v asimilaci i recyklaci  $\text{NH}_4^+$  iontů. Glutaminyntetasa katalyzuje reakci amonných iontů  $\text{NH}_4^+$  s glutamátem na glutamin. Glutamin následně reaguje s 2-oxoglutarátem, což je produkt cyklu trikarboxylových kyselin, za katalýzy glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasou. Během reakce dochází k přenosu aminové skupiny glutaminu na 2-oxoglutarát. Reakcí vznikají dvě molekuly glutamátu. Existují dvě různé isoformy glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasy, ferredoxin-glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasa (Fd-GOGAT) přijímá elektrony z redukovaného ferredoxinu pocházejícího z fotosystému I z fotosyntézy a nachází se zejména v chloroplastech listů. Druhou formou enzymu je nikotinamidadeninindinukleotid-glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasa (NADH-GOGAT), která využívá jako donor elektronů NADH z respiračního cyklu. Tato forma enzymu se nachází převážně v plastidech nefotosyntetických tkání, jako jsou etiolované tkáně listů a kořeny (Lam *et al.*, 1996; Coruzzi, 2003; Forde a Lea, 2007; Guohua *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Enzym glutamádehydrogenasa (GDH) katalyzuje aminační reakci 2-oxoglutarátu na glutamát a deaminační reakci glutamátu na 2-oxoglutarát a amoniak. Nachází se převážně v mitochondriích a příležitostně v cytoplasmě doprovodných buněk floému (Forde a Lea, 2007). Ve spojení s NADH-GOGAT je zásadní pro kontrolu homeostázy glutamátu v listech, který hraje ústřední roli v transportu dusíku v rostlině. Důležitou roli hraje tento enzym při zvýšení koncentrace  $\text{NH}_4^+$  iontů v cytoplasmě, kdy po překročení

určitého limitu začleňuje  $\text{NH}_4^+$  ionty do glutamátu, jelikož zvýšená koncentrace  $\text{NH}_4^+$  iontů je pro buňky toxická (Lam *et al.*, 1996; Coruzzi, 2003; Foyer *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014).

### 2.3.1.3 Metabolismus glutaminu a glutamátu

Glutamát vzniklý v glutaminsynthetasa/glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasovém cyklu (GS/GOGAT) je centrální molekulou v metabolismu aminokyselin vyšších rostlin a je prekurzorem pro syntézu chlorofylu. Po přeměně  $\text{NH}_4^+$  iontů na glutamin a glutamát slouží tyto dvě aminokyseliny jako donory dusíku v mnoho buněčných reakcích včetně aminotransferasových reakcí (Forde a Lea, 2007; Wang *et al.*, 2014).  $\alpha$ -aminoskupina glutamátu může být převedena na širokou škálu 2-oxokyselin za vzniku různých aminokyselin reverzibilními reakcemi za katalýzy aminotransferasami (Forde a Lea, 2007).

Na oxalacetát lze přenést  $\alpha$ -aminoskupinu glutamátu za vzniku aspartátu za katalýzy aspartátaminotransferasou. Aspartát je nedílnou součástí malát-aspartátového člunku, který zajišťuje přenos redukčních ekvivalentů z mitochondrií a chloroplastů do cytoplasmy a zpět. Asparagin je důležitý pro transport a skladování dusíku díky své relativní stabilitě (Forde a Lea, 2007; Wang *et al.*, 2014). Aspartát je prekurzorem asparaginu a dalších aminokyselin jako jsou lysin, threonin, methionin a isoleucin (Forde a Lea, 2007).

Asparaginsynthetasa je glutamin-dependentní enzym, který katalyzuje ATP-dependentní přenos  $\alpha$ -aminoskupiny glutaminu na aspartát za vzniku glutamátu a asparaginu (Lam *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2014). Substrátem pro asparaginsynthetasu mohou být i samotné amonné ionty. Asparaginsynthetasa slouží jako detoxifikační enzym při vysokých koncentracích amonných iontů v rostlinách, nachází se i v kořenových hlízkách bobovitých rostlin, kde je její aktivita velice vysoká (Lam *et al.*, 1996).

Z glutamátu může být přenesena  $\alpha$ -aminoskupina také na pyruvát za vzniku alaninu za katalýzy alaninaminotransferasou (Forde a Lea, 2007).

Nereverzibilní reakcí může být přeměněn glutamát na kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) za katalýzy glutamádekarboxylasou. Reakce probíhá v cytoplasmě. GABA se hromadí v rostlinách při působení různých druhů stresu jako jsou nedostatek kyslíku, nízká teplota, nedostatek vody, napadení patogeny či tepelný šok (Forde a Lea, 2007).

Glutamát je také prekurzorem argininu, který vzniká v cyklu přes acetylované deriváty ornitin, citrulin a arginosukcinát. Arginin spolu s asparaginem slouží jako hlavní zásobní

sloučenina dusíku u rostlin, vyskytuje se v proteinech i v rozpustné formě. Arginin má klíčovou roli ve zrání a klíčení semen a hromadí se při zvýšeném stresu. Spolu s ornitinem může být prekurzorem pro polyaminy, které mají důležitou roli v reakci rostlin na stres (Forde a Lea, 2007).

Glutamát slouží jako prekurzor také pro prolin. Prolin je cyklická aminokyselina hromadící se v reakci na abiotický stres (Forde a Lea, 2007).

#### **2.3.1.4 Vliv světla na metabolismus dusíku**

Světlo působí na metabolismus dusíku pozitivně. Má pozitivní vliv na expresi genů zapojených do dusíkového metabolismu a asimilace amonných iontů na glutamin a glutamát. Naopak potlačuje expresi genů enzymů asparaginsynthetasy a glutamátdehydrogenasy (Lam *et al.*, 1996).

#### **2.3.2 Sekundární metabolity**

Rostliny produkují velké množství různorodých metabolitů. Sekundární metabolity nejsou pro rostliny životně důležité, ale pomáhají rostlinám k přežití v různých stresových podmínkách. V rostlinách mohou zastávat mnoho funkcí od pigmentace buněk za účelem přitahování opylovačů a rozptylovačů semen po ochranu proti UV záření nebo jiným abiotickým a biotickým stresům. Jejich účinky se využívají ve farmaceutickém průmyslu, kde mohou být základem některých léčiv, či v kosmetickém průmyslu (Thoma *et al.*, 2020).

##### **2.3.2.1 Polyaminy**

Polyaminy jsou přírodní sloučeniny s alifatickou strukturou obsahující několik molekul dusíku. Jsou přítomné téměř ve všech organismech a hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech jako je buněčný růst a vývoj, účastní se také reakce na environmentální stres (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010; Hussain *et al.*, 2011). Polyaminy jsou přítomné ve všech částech rostlinné buňky včetně jádra, což naznačuje jejich roli v řízení různých základních buněčných procesů. V rostlině se nejvíce vyskytují v aktivně rostoucích tkáních (Hussain *et al.*, 2011).

Mezi nejčastěji se vyskytující polyaminy u vyšších rostlin patří putrescin, spermidin a spermin. Mezi méně časté polyaminy patří homospermidin, 1,3-diaminopropan, kadaverin a kanavalmin. Polyaminy se při fyziologické hodnotě pH nacházejí v podobě kationtů. Jejich polykationtová povaha ovlivňuje jejich biologickou aktivitu (Gill a Tuteja, 2010; Hussain *et al.*, 2011). Mohou se nacházet v buňkách volně



nebo v rozpustné konjugované či v nerozpustné vázané formě. Rozpustné konjugované polyaminy jsou kovalentně konjugovány na malé molekuly, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010; Hussain *et al.*, 2011).

Polyaminy se podílejí na regulaci mnoha základních buněčných procesů včetně replikace DNA, transkripce, translace, buněčné proliferace a modulace enzymových aktivit. Hrají roli také při klíčení semen, vývoji květů a plodů rostlin a reakci na biotický a abiotický stres. Podílejí se na získávání tolerance vůči různým druhům stresu, jako jsou vysoké a nízké teploty, salinita, hypoxie a hyperosmóza (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010; Hussain *et al.*, 2011).

### **2.3.2.1.1 Biosyntéza polyaminů**

Prvním krokem v biosyntéze polyaminů u vyšších rostlin je tvorba putrescinu. Putrescin je diamin a může být syntetizován dvěma cestami. Jeho přímá syntéza zahrnuje přeměnu ornitinu na putrescin za katalýzy ornitindekarboxylasou (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010; Munoz-Esparza *et al.*, 2019). Nepřímá syntéza putrescinu se sestává z několika reakcí. Nejprve je arginin přeměněn na N-karbamoylputrescin pomocí arginindekarboxylasy. N-karbamoylputrescin je přeměněn za katalýzy N-karbamoylputrescinamidohydrolasou na agmatin a ten je následně pomocí agmatindeiminasy převeden na putrescin. Putrescin je pak prekurzorem pro další polyaminy (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010).

Spermidin je triamin, který je syntetizovaný z putrescinu pomocí spermidinsynthasy přidáním aminopyrolové skupiny z dekarboxylovaného S-adenosylmethioninu. Dekarboxylovaný S-adenosylmethionin vzniká z methioninu, kdy nejprve vzniká S-adenosylmethionin pomocí S-adenosylmethioninsynthasy, poté je S-adenosylmethionin převeden za katalýzy S-adenosylmethionindekarboxylasy na dekarboxylovaný S-adenosylmethionin (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010; Munoz-Esparza *et al.*, 2019).

Prekurzorem pro tetraamin spermin je spermidin. Reakcí spermidinu s dekarboxylovaným S-adenosylmethioninem za katalýzy sperminsynthasy vzniká spermin (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010).

### **2.3.2.1.2 Katabolismus polyaminů**

Může docházet ke vzájemné konverzi polyaminů, hlavně putrescinu, sperminu a spermidinu. Jedná se o cyklický proces, který řídí jejich přeměnu a reguluje intracelulární homeostázu. Nejprve je kterýkoli ze tří polyaminů acetylován pomocí enzymu acetyltransferasy za účasti acetylkoenzymu A. Následně vzniká putrescin odstraněním propylaminové skupiny pomocí polyaminoxidasy (Munoz-Esparza *et al.*, 2019).

Putrescin může být katabolizován diaminoxidasami, kdy je přeměňován na  $\Delta 1$ -pyrrolin, amoniak a peroxid vodíku. K této reakci dochází převážně ve stěnách rostlinných buněk a vznikající peroxid vodíku je využíván při lignifikaci za normálních a stresových podmínek.  $\Delta 1$ -pyrrolin je katabolizován na kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou, která je nakonec přeměněna na kyselinu jantarovou, která je součástí Krebsova cyklu (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010; Munoz-Esparza *et al.*, 2019).

### **2.3.2.2 Fenolické sloučeniny**

Fenolické sloučeniny jsou skupinou rostlinných metabolitů, která je velice početná. Všechny fenolické sloučeniny obsahují vždy alespoň jednu hydroxylovou skupinu připojenou na fenylový kruh. V rostlinách plní mnoho rozmanitých funkcí. Mohou být důležité jako strukturní složky pro stabilizaci buněčných stěn rostlin, jsou vyplavovány v reakci na mechanické poškození rostlin, slouží jako obrana proti biotickému i abiotickému stresu, některé fenolické sloučeniny jsou využity jako barviva (Bunzel a Schendel, 2017).

#### **2.3.2.2.1 Základní cesta syntézy fenylypropanoidů**

Biosyntéza fenylypropanoidů začíná šikimátovou dráhou, která vede ke vzniku aromatických aminokyselin, jako jsou fenylalanin a tyrosin, které jsou dále výchozími produkty pro další syntézu. Šikimátová dráha probíhá v plastidech rostlinných buněk a zahrnuje 7 metabolických reakcí (Herrmann a Weaver, 1999).

Nejdříve dochází ke kondenzaci fosfoenolpyruvátu a erytroza-4-fosfátu za vzniku 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu a anorganického fosfátu. Tato reakce je katalyzována 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátsynthasou. Druhou reakcí je eliminace fosfátové skupiny ze vzniklého 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu za vzniku 3-dehydrochinátu. Vznik 3-dehydrochinátu probíhá za katalýzy 3-dehydrochinátsynthasou, která je aktivována vzniklým anorganickým fosfátem

z předešlé reakce a vyžaduje pro svou aktivitu dvojmocný kation  $Zn^{2+}$  a katalytické množství  $NAD^+$ , i když je enzymem katalyzovaná reakce redoxně neutrální (Herrmann a Weaver, 1999; Maeda a Dudareva, 2012).

Třetí reakce zahrnuje dehydrataci 3-dehydrochinátu za vzniku 3-dehydrošikimátu, který je ve čtvrtém kroku redukován na šikimát. Obě tyto reakce jsou katalyzovány bifunkčním enzymem 3-dehydrochinátdehydratasa-šikimátdehydrogenasou. V následujícím kroku dochází k fosforylaci šikimátu na šikimát-3-fosfát za katalýzy šikimátkinasou. Šestou reakcí je kondenzace dalšího fosfoenolpyruvátu s šikimát-3-fosfátem za vzniku 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátu a anorganického fosfátu. Tato reakce je reverzibilní a je katalyzována 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasou. Posledním krokem šikimátové dráhy je eliminace fosfátu z 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátu za vzniku chorismátu. Tato reakce je katalyzována chorismátsynthasou a pro svou aktivitu vyžaduje katalytické množství  $FADH_2$ , i když je katalyzovaná reakce redoxně neutrální (Herrmann a Weaver, 1999; Maeda a Dudareva, 2012).

Chorismát vzniklý šikimátovou dráhou je mimo jiné výchozí sloučeninou pro další kroky syntézy aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu. Prvním společným krokem je přeměna chorismátu na prefenát za katalýzy chorismátmutasou. Prefenát je reverzibilní transaminací převeden za katalýzy prefenátaminotransferasou na arogenát (Maeda a Dudareva, 2012).

Fenylalanin může vznikat dvěma způsoby, a to buď z prefenátu nebo arogenátu. Prefenátdehydratasa katalyzuje dekarboxylaci a dehydrataci prefenátu na fenylpyruvát. Fenylpyruvát je pomocí fenylpyruvátaminotransferasy převeden na fenylalanin pomocí reverzibilní transaminace za využití pyridoxalfosfátu jako kofaktoru. Druhou možnou cestou je přeměna arogenátu na fenylalanin pomocí arogenátdehydratasy (Maeda a Dudareva, 2012).

Tyrosin může být syntetizován podobně. Arogenátdehydrogenasa katalyzuje přeměnu arogenátu na tyrosin a prefenátdehydrogenasa katalyzuje oxidační dekarboxylaci prefenátu na 4-hydroxyfenylpyruvát. Pomocí 4-hydroxyfenylpyruvátaminotransferasy je 4-hydroxyfenylpyruvát převeden reverzibilní transaminací na tyrosin (Maeda a Dudareva, 2012).

Syntéza fenylpropanoidů z fenylalaninu, popř. tyrosinu, je zahájena neoxidační deaminací fenylalaninu na kyselinu trans-skořicovou pomocí fenylalaninamoniaklyasy a tyrosinamoniaklyasy. Trans-skořicová kyselina je následně hydroxylována na kyselinu

*para*-kumarovou pomocí cinnamát-4-hydroxylasy a 4-kumaroylCoAlygasy. Kyselina *para*-kumarová je pak výchozí sloučeninou pro syntézu všech různých fenyylpropanoidů (Vogt, 2010).

### **2.3.2.2.2 Polyfenoly**

Polyfenoly jsou podskupinou fenolických sloučenin, obsahují alespoň dvě fenolické skupiny. Existuje mnoho podskupin rozdělených na základě síly fenolového kruhu, hlavními podskupinami jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, stibeliny a lignany. Polyfenoly jsou přijímány v potravě ve formě ovoce, zeleniny, nachází se také v obilovinách a kávě. Jsou známé pro své účinky, jako je prevence proti degenerativním onemocněním, mají antioxidační vlastnosti, využívají se při léčbě kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy, neurodegenerativních onemocněních, rakoviny a diabetes mellitus (Abbas *et al.*, 2017).

#### **2.3.2.2.2.1 Fenolové kyseliny**

Fenolové kyseliny jsou fenolické sloučeniny mající alespoň jednu karboxylovou skupinu. Nachází se v semenech, slupkách ovoce a v listech zeleniny. Fenolové kyseliny mají velmi vysokou antioxidační aktivitu. Dělí se do dvou skupin, a to na hydroxyskořicové kyseliny a hydroxybenzoové kyseliny (Abbas *et al.*, 2017; Kumar a Goel, 2019; Rashmi a Negi, 2020).

Hydroxyskořicové kyseliny, odvozené od kyseliny skořicové, jsou v rostlinách přítomny ve formě jednoduchých esterů s kyselinou chinovou nebo s glukosou. Nejvíce se vyskytující hydroxyskořicovou kyselinou je kyselina chlorogenová, což je ester kyseliny kávové a kyseliny chinové, dále pak kyselina felurová, kyselina kávová, kyselina *para*-kumarová a kyselina sinapová (Kumar a Goel, 2019; Rashmi a Negi, 2020).

Hydroxybenzoové kyseliny, odvozené od kyseliny benzoové, se nachází v rostlinách v rozpustné formě konjugované s cukry nebo organickými kyselinami nebo vázané s frakcemi buněčné stěny. Na rozdíl od hydroxyskořicových kyselin jsou v jedlých rostlinách zastoupeny v nízkých koncentracích. Vyskytují se v červeném ovoci, cibuli a černé ředkvi. Mezi nejznámější zástupce hydroxybenzoových kyselin patří *para*-hydroxybenzoová kyselina, kyselina protokatechuová, kyselina vanilová, kyselina syringová, kyselina gallová a kyselina salicylová (Kumar a Goel, 2019; Rashmi a Negi, 2020).

### 2.3.2.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nízkomolekulární polyfenolické sloučeniny vyskytující se v rostlinách převážně jako květinové pigmenty a aroma pro přilákání opylovačů. Jejich funkce je mimo zbarvení a aroma květů ochrana proti biotickému a abiotickému stresu. Rostlinám pomáhají ve zvýšení mrazuvzdornosti, odolnosti proti suchu či aklimatizaci na zvýšené teploty (Cushnie a Lamb, 2005; Panche *et al.*, 2016).

Základní strukturou flavonoidů je flavanové jádro složené ze dvou benzenových kruhů spojených přes heterocyklický pyranový kruh (Cushnie a Lamb, 2005). Jejich klasifikace je založena na základě biosyntetického původu. Podskupiny flavonoidů jsou flavony, flavonoly, flavanony, flavanonoly, chalkony a antokyany (Cushnie a Lamb, 2005; Panche *et al.*, 2016; Ku *et al.*, 2020).

Flavony jsou široce zastoupeny v listech, květech a plodech jako glykosidy. Mezi hlavní zdroje flavonů patří celer, petržel, červená paprika, máta, citrusové plody a heřmánek (Panche *et al.*, 2016; Ku *et al.*, 2020). Mezi zástupce patří například luteonin, apigenin a tangeritin (Panche *et al.*, 2016).

Flavonoly jsou nejpočetnější skupinou flavonoidů. Vyskytují se v různých druzích ovoce a zeleniny, např. cibule, kapusta, jablka, rajčata a hroznové víno. Nejznámějšími zástupci skupiny flavonolů jsou kvercetin, myricetin a kaempferol (Panche *et al.*, 2016; Ku *et al.*, 2020).

Flavanony, nazývané také dihydroflavony, mají schopnost zachycovat volné radikály a mají protizánětlivé účinky. Vyskytují se často v citrusových plodech a hroznovém vínu (Panche *et al.*, 2016; Ku *et al.*, 2020). Mezi nejznámější zástupce patří naringenin, hesperidin a eriodictyol (Panche *et al.*, 2016).

Flavanonoly, nazývané také katechiny, jsou 3-hydroxyderiváty flavanonů. Vyskytují se v banánech, jablkách, borůvkách, hruškách a broskvích (Panche *et al.*, 2016). Jedním ze známých flavanonolů je taxifolin, který má širokou škálu farmaceutických vlastností jako je zlepšení kapilární mikrocirkulace a předcházení poškození cévních struktur pacientů s diabetem. Jsou zastoupeny hojně také v citrusových plodech (Ku *et al.*, 2020).

Antokyanidiny mají od ostatních flavonoidů mírně odlišnou strukturu. Liší se absencí ketonové skupiny v hlavní struktuře řetězce. Jsou nestabilní, proto se ve volné formě běžně nevyskytují. Nejčastěji se vyskytují v glykosylované formě jako antokyany (Ku *et al.*, 2020). Antokyany jsou pigmenty, které jsou zodpovědné za barvu rostlin, květů a ovoce. Vyskytují se převážně ve vnějších buněčných vrstvách ovoce,

jako jsou brusinky, borůvky, ostružiny, jahody, maliny, červené hrozny či černý rybíz. Jejich barva závisí na pH a také methylaci či acylaci jejich hydroxylových skupin. Mezi zástupce antokyanů patří kyanidin, malvidin či delphinidin (Panche *et al.*, 2016).

Chalkony jsou podtřídou flavonoidů vyznačující se absencí heterocyklického pyranového kruhu. Proto se také označují jako flavonoidy s otevřeným řetězcem. Vyskytují se v rajčatech, hruškách, jahodách a některých pšeničných produktech. Mezi hlavní zástupce patří floridzin, arbutin a chalkonaringenin (Panche *et al.*, 2016).

### **2.3.2.2.2.3 Stilbeny**

Stilbeny jsou podskupinou polyfenolů, které ve své struktuře obsahují 1,2-difenylethylenové jádro (Dubrovina a Kiselev, 2017; Filippis *et al.*, 2019). V rostlinách se podílí na ochraně rostlin proti patogenům a škůdcům, vykazují také silné léčivé účinky, čehož se využívá při vývoji a výrobě léků. Mezi velmi známé zástupce stilbenů patří resveratrol spolu s jeho deriváty, jako jsou pterostilben, oxyresveratrol a viniferiny (Dubrovina a Kiselev, 2017). Existuje přes 400 různých derivátů stilbenů, jejich struktury mohou být monomery až oktamery s různými substituenty v různých polohách, mohou nést glykosylové, hydroxylové, methylové či isopropylové skupiny. Některé stilbeny mohou vykazovat také antioxidační aktivitu (Khawand *et al.*, 2018).

### **2.3.2.2.2.4 Lignany**

Lignany jsou podskupinou polyfenolů, nacházejí se v kořenech, oddencích, stoncích, listech, semenech i plodech rostlin. Strukturu lignanů tvoří dvě či více fenylpropanoidových jednotek s různými stupni oxidace v části propanového řetězce a různými substituovanými skupinami v části aromatických kruhů. Vykazují různé biologické aktivity, především antibakteriální a insekticidní účinky. Lignany se využívají ve farmaceutickém průmyslu pro své protinádorové, antioxidační, imunosupresivní a antiastmatické účinky (Runeberg *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2020).

### **2.3.2.3 Terpenoidy**

Terpenoidy neboli isoprenoidy jsou nejpočetnější skupinou sekundárních metabolitů rostlin a jsou na bázi isoprenu. Přestože jsou pro život rostlin neesenciální, mají v jejím růstu, vývoji a životě velmi důležitou roli. Jsou základem pro mnoho ekologických interakcí mezi rostlinami a ostatními organismy, přitahují opylovače, a naopak odpuzují býložravce. Rostlinné terpenoidy jsou velmi rozmanité, v rostlinách se vyskytují v nízkých koncentracích (Cheng *et al.*, 2007; Bergman *et al.*, 2019). Mnoho terpenoidů

má léčivé účinky a nachází své využití ve farmaceutickém průmyslu (Jaeger a Cuny, 2016). Terpenoidy rostlinám pomáhají přežít ve stresových podmínkách, jako je sucho, vysoká salinita či vystavení vysokým dávkám UV záření (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2019).

### 2.3.2.3.1 Biosyntéza terpenoidů

Uhlíková kostra terpenoidů vzniká kondenzací isopentenylidifosfátu a dimethylallyldifosfátu. Tyto prekurzory terpenoidů vznikají dvěma různými cestami, které jsou od sebe prostorově odděleny. Jedná se o mevalonátovou dráhu a methylerythritolfosfátovou dráhu (Cheng *et al.*, 2007; Jaeger a Cuny, 2016; Liao *et al.*, 2016; Bergman *et al.*, 2019).

Mevalonátová dráha probíhá v cytosolu, jejím produktem je jedna molekula isopentenylidifosfátu a skládá se ze šesti enzymatických kroků. Nejprve dochází ke kondenzaci dvou jednotek acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA za katalýzy acetoacetyl-CoA thiolasy. V druhé reakci dochází opět ke kondenzaci s další jednotkou acetyl-CoA za katalýzy 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthasy (HMGS) a vzniká 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Následně dochází k redukci HMG-CoA na mevalonát za katalýzy HMG-CoA reduktasy, která spotřebovává na reakci 2 molekuly NADPH (Liao *et al.*, 2016; Bergman *et al.*, 2019). K této reakci dochází na povrchu endoplasmatického retikula a jedná se o hlavní regulační krok mevalonátové dráhy (Bergman *et al.*, 2019). Mevalonát je fosforylován mevalonátkinasou na mevalonát-5-fosfát, který je následně opět fosforylován na mevalonát-5-difosfát pomocí fosfomevalonátkinasy. V posledním kroku mevalonátové dráhy dochází k ATP-dependentní dekarboxylaci mevalonát-5-difosfátu na isopentenylidifosfát za katalýzy mevalonát-5-difosfát karboxylasy (Liao *et al.*, 2016; Bergman *et al.*, 2019). Isopentenylidifosfát pak může být reverzibilně izomerován na dimethylallyldifosfát pomocí isopentenylidifosfát izomerasy (Bergman *et al.*, 2019).

Methylerythritolfosfátovou dráhu je další možnou cestou biosyntézy isopentenylidifosfátu a dimethylallyldifosfátu. Tato dráha probíhá v plastidech a skládá se ze 7 enzymatických reakcí (Liao *et al.*, 2016; Bergman *et al.*, 2019). Nejprve kondenzuje D-glyceraldehyd-3-fosfát s pyruvátém pomocí deoxyxylulosafosfát synthasy na 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát. Následně dochází k redukci na 2C-methyl-D-erythritol-4-fosfát (MEP) pomocí deoxyxylulosafosfát reduktasy, která je závislá na NADPH. 2C-methyl-D-erythritol-4-fosfát je poté aktivován vazbou cytidindifosfátu a fosforylací a vzniká 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát

pomocí methylerythritolcyklodifosfátsynthasy. Následně dochází k redukci na 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)butenyl-4-difosfát železo-sírovým proteinem hydroxymethylbutenyldifosfátsynthasou a další redukci hydroxymethylbutenyldifosfátreduktasou na isopentenyldifosfát a dimethylallyldifosfát v poměru 5:1 (Bergman *et al.*, 2019).

Cytosolový isopentenyldifosfát slouží jako prekurzor pro farnesyldifosfát (FDP) pro tvorbu seskviterpenů a triterpenů. Plastidový isopentenyldifosfát slouží pro syntézu geranyldifosfátu (GDP) a geranylgeranyldifosfátu pro syntézu monoterpenů, diterpenů a tetraterpenů. Mezi těmito drahami však existuje křížová komunikace, zejména ve směru od plastidů do cytosolu (Cheng *et al.*, 2007).

V druhé části syntézy terpenoidů jsou isopentenyldifosfát a dimethylallyldifosfát přeměňovány kondenzačními reakcemi na geranyldifosfát, farnesyldifosfát a geranylgeranyldifosfát za katalýzy prenyltransferasami. Geranyldifosfátsynthasa katalyzuje reakci isopentenyldifosfátu a dimethylallyldifosfátu za vzniku geranyldifosfátu. Farnesyldifosfátsynthasa katalyzuje reakci dvou molekul isopentenyldifosfátu a jedné molekuly dimethylallyldifosfátu za vzniku farnesyldifosfátu, který je prekurzorem seskviterpenů a triterpenů. Geranylgeranyldifosfátsynthasa katalyzuje reakci tří molekul isopentenyldifosfátu a jedné molekuly dimethylallyldifosfátu za vzniku geranylgeranyldifosfátu, který je prekurzorem diterpenů a tetraterpenů (Cheng *et al.*, 2007; Bergman *et al.*, 2019).

### 2.3.2.3.2 Klasifikace terpenoidů

Terpenoidy se dělí na základě své velikosti a struktury na hemiterpeny, monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny (Paduch *et al.*, 2007).

Hemiterpeny jsou odvozeny od C<sub>5</sub> prekurzorů isopentenyldifosfátu a dimethylallyldifosfátu (Beller *et al.*, 2015). V rostlinách jsou často modifikovány na deriváty obsahující kyslík zvané hemiterpenoidy. Zástupcem hemiterpenoidů je kyselina isovalerová (Paduch *et al.*, 2007). V rostlinách se příliš nevyskytují, izolovány byly z listů *Prinsepia utilis* (Stephane a Jules, 2020).

Monoterpeny mají C<sub>10</sub> strukturu skládající se ze dvou isoprenových jednotek. Jedná se o těkavé látky a často jsou součástí rostlinných silic (Bergman *et al.*, 2019). Podle struktury se mohou dělit na lineární, např. myrcen a geraniol, nebo cyklické, např. thymol, mentol a  $\alpha$ -pinen (Paduch *et al.*, 2007). Monoterpeny se využívají



ve farmaceutickém průmyslu díky své antibakteriální aktivitě a v kosmetickém průmyslu pro výrobu parfémů (Perveen, 2018).

Seskviterpeny jsou strukturně odvozeny od C<sub>15</sub>-farnesyldifosfátu pomocí seskviterpensynthas, obsahují tedy tři isoprenové jednotky (Paduch *et al.*, 2007; Bergman *et al.*, 2019). Mohou se dělit na acyklické, např. farnesol, a cyklické s mnoha dalšími modifikacemi, např.  $\delta$ -kadinen (Paduch *et al.*, 2007).

Diterpeny se skládají ze čtyř isoprenových jednotek. Často bývají složkami rostlinných pryskyřic, ale mohou se nacházet i v rostlinných silicích (Stephane a Jules, 2020). Mají protizánětlivé, antimikrobiální, protirakovinné a antifungální účinky (Perveen, 2018). Mezi zástupce diterpenů patří cembren a retinal, což je základní chromofor zapojený do transdukce světla na vizuální signály (Paduch *et al.*, 2007).

Triterpeny se skládají ze šesti isoprenových jednotek a v rostlinách se řadí mezi biologicky aktivní látky (Paduch *et al.*, 2007). Triterpeny jsou odvozeny od skvalenu a obsahují mnoho methylových skupin, mohou být oxidovány na alkoholy, aldehydy a karboxylové kyseliny. Některé triterpeny se nachází v glykosylované formě (Perveen, 2018).

Tetraterpeny obsahují osm isoprenových jednotek. Významnými zástupci jsou lykopen nacházející se v rajčatech a karoteny (Paduch *et al.*, 2007).

Polyterpeny se skládají z dlouhého řetězce složeného z mnoha isoprenových jednotek. Příkladem je přírodní kaučuk, což je polyisopren s několika *cis*-dvojnými vazbami (Paduch *et al.*, 2007).

## 2.4 Abiotický stres a jeho vliv na produkci vybraných sekundárních metabolitů

Ve světě je neustále se zvětšující problém s klimatickými změnami, což má za následek ovlivňování růstu a produktivity rostlin a plodin vlivem působení abiotického stresu. Mezi nejvíce vyskytující se abiotický stres působící na rostliny patří extrémní teploty, sucho, vysoká salinita půdy, znečištění půdy a nedostatek živin v půdě (Zhu, 2016; Minhas *et al.*, 2017; Alcázar *et al.*, 2020; Gong *et al.*, 2020). Všechny typy abiotických stresů způsobují oxidační stres (Groppa a Benavides, 2007). Při působení abiotického stresu dochází ke zvýšené expresi genů, které řídí syntézu ochranných metabolitů (Alcázar *et al.*, 2020).

Jedním z nejvíce škodlivých abiotických stresů je sucho, jelikož globální klima je obecně teplejší a sušší. Více se objevující extrémní teploty, nízké či vysoké, nepříznivě ovlivňují růst a vývoj rostlin a viditelně snižují produkci plodin. Rostliny se se suchem vyrovnávají produkcí kyseliny abscisové, uzavřením průduchů a osmotickou změnou, což nakonec vede k adaptivnímu růstu a vývoji (Zhu, 2016; Gong *et al.*, 2020).

Příliš vysoká salinita půdy je dalším globálním problémem omezujícím využívání půdy a pěstování plodin. Většina rostlin je na salinitu velice citlivá, proto není možné v příliš slaných půdách rostliny pěstovat. Pro pěstování rostlin v původně slaných půdách lze snížit salinitu půdy zlepšením zemědělství či fytořemediací. Další možností je šlechtění odrůd či genetická úprava rostlin tak, aby byly odolné vůči vysoké salinitě (Gong *et al.*, 2020). Solný stres má dvě fáze, fázi osmotickou, kdy je snižován vodní potenciál půdního roztoku, což brání gradientu vodního potenciálu, který je potřebný pro příjem vody z půdního roztoku. Druhou fází je iontová fáze, kdy se přebytečné soli dostanou do citlivých tkání rostlin pomocí transpiračního proudu, což způsobuje specifické buněčné deformace a snížení růstu rostlin (Minhas *et al.*, 2017).

Poškození suchem i nadměrnou salinitou má komplexní účinky a zahrnuje oxidační stres, poškození buněčných komponent, jako jsou membránové lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, a metabolickou dysfunkci (Zhu, 2016).

Půdy jsou často znečištěné těžkými kovy, které narušují průběh fotosyntézy, způsobují oxidační poškození a celkově narušují vývoj a růst rostlin. Těžké kovy se v rostlinách hromadí a po konzumaci takových rostlin ohrožují zdraví zvířat i lidí. Rostliny si vyvinuly mechanismy pro minimalizaci příjmu těžkých kovů a pro detoxifikaci prostřednictvím

modifikace či kompartmentizace. Tyto ochranné mechanismy zahrnují zejména transportéry těžkých kovů (Gong *et al.*, 2020).

#### **2.4.1 Polyaminy jako reakce na abiotický stres**

Při abiotickém stresu dochází ke zvýšené produkci a k akumulaci polyaminů v rostlinách. Vysoké hladiny polyaminů korelují s rostlinnou tolerancí v široké řadě abiotických stresů (Walters, 2003; Groppa a Benavides, 2007; Gill a Tuteja, 2010; Alcázar *et al.*, 2020). Polyaminy jsou prospěšné pro proteinovou homeostázu, detoxifikaci reaktivních forem kyslíku a aktivaci antioxidantního aparátu, čímž poskytují širokospektrální toleranci vůči různým druhům stresu (Alcázar *et al.*, 2020). Podílejí se na získávání tolerance vůči stresům jako je teplotní stres, vysoká salinita, hyperosmóza, hypoxie a atmosférické polutanty (Gill a Tuteja, 2010).

Polyaminy mohou hrát specifickou roli v reakci na abiotický stres tím, že chrání před oxidačním poškozením fotosyntetického aparátu rostlin. Jejich antioxidantní účinek je způsoben kombinací jejich aniontových a kationtových vazebných vlastností zahrnující funkci vychytávání radikálů a schopnost inhibovat peroxidaci lipidů. Spermin, spermidin i putrescin snižují hladinu superoxidových radikálů generovaných senescencí rostlinných buněk (Groppa a Benavides, 2007). Putrescin, spermin a spermidin produkované při solném stresu mají pozitivní vliv na klíčení semen pod vlivem vysoké salinity (Groppa a Benavides, 2007; Alcázar *et al.*, 2020).

#### **2.4.2 Fenolické sloučeniny jako reakce na abiotický stres**

Fenolické sloučeniny, zejména polyfenoly, působí v rostlinách pozitivně proti abiotickým stresům jako jsou sucho, vysoká salinita, obsah těžkých kovů, extrémní teplota, UV záření a pesticidy. V důsledku působení abiotického stresu se hromadí v rostlinách a pomáhají rostlinám se adaptovat na nepříznivé podmínky. Ovlivňují růst a vývoj rostlin, klíčení semen a zlepšení metabolismu rostlin (Dicko *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2019).

Rostliny při vystavení abiotickému stresu produkují více fenolických sloučenin, které mají antioxidantní účinky a jsou schopné vychytávat volné radikály, které mohou způsobovat peroxidaci buněčných membrán (Sharma *et al.*, 2019; Šamec *et al.*, 2021). Mezi produkované fenolické látky patří fenolické kyseliny jako jsou kyselina kávová, kyselina felurová a kyselina vanilová (Šamec *et al.*, 2021).

Lignin hraje důležitou roli v reakci na abiotický stres způsobený chladem, kdy se hromadí v rostlinách a pomáhá jim přežít při nízkých teplotách (Šamec *et al.*, 2021).

### **2.4.3 Terpenoidy jako reakce na abiotický stres**

Při abiotickém stresu dochází u rostlin ke zvýšení exprese genů, které vedou k syntéze některých terpenoidů. Těkavé terpenoidy mají schopnost zmírňovat účinky oxidačního stresu způsobeného reaktivními formami kyslíku (Boncan *et al.*, 2020).

Jako reakce na abiotický stres jsou často produkovány monoterpeny a isopren. Biosyntéza je však přísně regulována, jelikož produkce terpenoidů k ochraně rostlin představuje významnou ztrátu fotosyntetického uhlíku (Loreto a Schnitzler, 2010).

Při tepelném stresu dochází k destabilizaci tylakoidní membrány, což vede k její fragmentaci a následnému rozpadu proteinových komplexů. Díky amfipatické povaze isoprenu je stres zmírňován přechodným vložením terpenoidů do membrány, což zvyšuje hydrofobní interakce velkých proteinových komplexů a fotosyntetických aparátů mezi sebou či s membránovými lipidy (Loreto a Schnitzler, 2010; Boncan *et al.*, 2020).

V ochraně proti antioxidačnímu stresu mohou membránově vázané antioxidanty, jako jsou tokoferol a karotenoidy, přímo vycytávat reaktivní formy kyslíku v reakci na fotoinhibici (Boncan *et al.*, 2020).

Abiotickým stresem indukovaná produkce a emise těkavých terpenoidů může iniciovat signální dráhy vedoucí k senescenci, apoptóze a předčasný opad listů rostlin (Boncan *et al.*, 2020).

## 2.5 Metody studia rostlinných metabolitů

Metabolomika je komplexní analýza všech metabolitů v biologickém systému. Poskytuje kvantitativní hodnocení analytů s nízkou molekulovou hmotností, které definují metabolický stav systému. Může být kategorizována do dvou komplementárních metod, a to cílené a necílené. Cílený přístup se zaměřuje na identifikaci a kvantifikaci vybraných metabolitů či tříd metabolitů, kdy jsou známy chemické vlastnosti zkoumaných sloučenin. Cílený přístup je tedy založen na hypotézách, naopak necílená analýza nám dává informaci o všech metabolitech v daném biologickém systému a může vytvořit novou hypotézu pro další zkoumání (Zhou *et al.*, 2012).

### 2.5.1 Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS)

Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem je nepostradatelná metoda v oblasti vědy o životním prostředí, forenzních věd, zdravotní péče a medicínského a biologického výzkumu (Sparkman *et al.*, 2011). Je to dáno její robustností, vynikající separační schopností, selektivitou, citlivostí a reprodukovatelností (Beale *et al.*, 2018). Je vhodná pro analýzu relativně těkavých a tepelně stabilních sloučenin do relativní molekulové hmotnosti 1000 (McNair a Miller, 2009; Bouchonnet, 2013).

Plynový chromatograf separuje jednotlivé sloučeniny ze směsi. Směs látek je převedena do plynné fáze a mísí se s nosným plynem, který představuje mobilní fázi. Mobilní fáze je transportována do analytické kolony, jejíž povrch je pokryt stacionární fází. Molekuly jsou oddělovány v čase, protože migrují kolonou různými rychlostmi. Délka každého cyklu jednotlivého analytu závisí na jeho těkavosti a interakcích mezi molekulou a stacionární fází. Na výstupu z kolony jsou analyty detekovány. Každá molekula je charakterizována retenčním časem, který odpovídá době, která uplynula mezi injekcí analytu a jeho příchodem do detektoru. Rychlost, kterou sloučenina migruje v koloně úzce souvisí s její molekulovou hmotností a polaritou. Čím rychleji projde sloučenina kolonou, tím nižší má molekulovou hmotnost a polaritu. Složitější je interakce mezi stacionární fází a jednotlivými analyty, proto je potřeba vhodně zvolit typ stacionární fáze podle povahy molekul, které je potřeba oddělit (McNair a Miller, 2009; Bouchonnet, 2013).

### 2.5.1.1 Příprava vzorku pro GC-MS - derivace

Chemická derivace vzorků se často používá k analýze molekul s nízkou těkavostí, které jsou příliš polární. Dochází k náhradě atomu vodíku karboxylové, aminové či alkoholové skupiny, což má za následek snížení nežádoucích vazeb na stacionární fázi a zabránění tepelné degradace termolabilních sloučenin v injektoru či koloně (Sparkman *et al.*, 2011; Bouchonnet, 2013).

Nejčastějšími reakcemi pro derivace jsou silylace, methylace, esterifikace a acetylace. Při silylaci dochází k nahrazení atomu vodíku silylovou skupinou  $R_3Si$ , čehož se využívá pro derivaci alkoholů, fenolů, cukrů, aminů, thiolů, steroidů a karboxylových kyselin. Při methylaci dochází k nahrazení atomu vodíku methylovou skupinou  $-CH_3$ , čehož se využívá pro derivaci fenolů. Nejpoužívanějším methylačním činidlem je jodmethan. Esterifikace se využívá pro velmi polární karboxylové kyseliny, kdy je pomocí Fisherovy esterifikace zaváděn do molekuly alkohol, který se váže na karboxylovou skupinu místo vodíku. Při acetylaci dochází k náhradě vodíků za acetylovou skupinu u alkoholů, fenolů a primárních a sekundárních aminů. Jako činidla se používají anhydridy kyselin, jako jsou kyselina octová, propionová či trifluoroctová (Sparkman *et al.*, 2011; Bouchonnet, 2013).

### 2.5.1.2 Princip plynové chromatografie

Plynový chromatograf se skládá ze 3 základních částí: injektoru, kapilární kolony a detektoru (McNair a Miller, 2009; Bouchonnet, 2013).

#### 2.5.1.2.1 Injektor

Injektor je vyhřívaná zóna, kam se pomocí injekční stříkačky zavádí roztok vzorku. Po zavedení se vzorek odpaří a smíchá s nosným plynem, který představuje mobilní fázi. Nejčastěji používaným nosným plynem je helium. Nosný plyn je inertní a nemá žádnou jinou funkci než umožnit eluci sloučenin v analytické koloně. Plynná mobilní fáze se vzorkem poté putuje do analytické kolony. Průtok nosného plynu kolonou se s teplotou mění, při konstantním tlaku se zvyšující se teplotou průtok kolonou klesá. Injektory jsou vybaveny zařízením, které upravuje tlak v koloně tak, aby byl průtok kolonou konstantní, díky čemuž se potlačí snížení rychlosti eluce analytů způsobené zvyšující se teplotou a následné snížení kvality chromatografické analýzy (McNair a Miller, 2009; Bouchonnet, 2013).

Existuje několik režimů vstřikování vzorku. Jedním z režimů vstřikování vzorku je režim Split neboli režim děleného vstřikování vzorku. Nástřik v režimu Split se používá pro analýzu koncentrovaných roztoků. Nástřik vzorku se provádí při vysoké teplotě nad body varu analytů a rozpouštědla. Vzorek je rychle vložen do injektoru, kde je okamžitě odpařen a smíchán s nosným plynem. Tento postup umožňuje oddělit část proudu plynu a snížit tak množství vzorku, které vstupuje do kolony, čímž se zabrání nasycení stacionární fáze (Sparkman *et al.*, 2011; Bouchonnet, 2013).

Dalším druhem režimu vstřikování vzorku je režim Splitless. Nástřik ve Splitless režimu se používá pro analýzu vzorků zředěných roztoků. Ventil se po injekci vzorku uzavře na 1 až 2 minuty, aby do kolony mohlo vstoupit co největší množství analytů. Poté se ventil otevře, aby se injektor vyčistil od případných zbytků vzorku. Vzorek je vstřikován při teplotě, při které se rozpouštědlo a rozpuštěné látky okamžitě odpaří. Během vstřikování je teplota 20-30 °C pod bodem varu rozpouštědla, aby došlo ke kondenzaci a zachycení molekul v hlavní části kolony. Tento režim je nejpoužívanější z důvodu své jednoduchosti a lehké implementace (Sparkman *et al.*, 2011; Bouchonnet, 2013).

#### **2.5.1.2.2 Pec a kapilární kolona**

V peci je uložen klíčový prvek chromatografu – analytická kolona. V plynové chromatografii s hmotnostním spektrometrem se v dnešní době využívají výhradně kolony kapilární, které jsou velmi dlouhé a tenké. Kapilární kolony jsou robustní a vysoce účinné z hlediska chromatografického rozlišení (McNair a Miller, 2009; Bouchonnet, 2013).

Kapilární kolona se skládá z trubice z tavného křemene a její vnitřní povrch je pokrytý stacionární fází. Vnější povrch je potažen polyimidem, který koloně dodává flexibilitu a robustnost. Stacionární fáze je charakterizována chemickými funkcemi naroubovanými na potažený nosič na bázi oxidu křemičitého. Druhů kapilárních kolon je nepřeberné množství, ale lze je rozdělit do tří skupin podle typu stacionární fáze na nepolární, semi-polární a polární (McNair a Miller, 2009; Bouchonnet, 2013).

### 2.5.1.3 Princip hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr je jeden z informačně nejbohatších detektorů. Poskytuje data jak o kvalitativní identifikaci neznámé sloučeniny – strukturu, elementární složení a molekulovou hmotnost; tak i data o jejím kvantitativním zastoupení ve vzorku. Spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií je velmi snadné (McNair a Miller, 2009).

Hmotnostní spektrometr se skládá ze systému zavádění analytu, ionizačního zdroje, analyzátoru, detektoru a systému získávání a zpracování dat. Systémem zavádění analytu je v případě plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem plynový chromatograf (McNair a Miller, 2009; Bouchonnet, 2013). Ionizačních zdrojů je několik druhů, ve spojení s plynovou chromatografií se nejvíce využívá elektronová ionizace, která je nejjednodušší a také nejstarší. Ionizační zdroj je zahříván a udržován pod vakuem, díky čemuž jsou vzorky lépe ionizovány (McNair a Miller, 2009). Elektronová ionizace spočívá ve vystavení molekul vysokoenergetickému elektronovému paprsku, což vede ke vzniku fragmentovaných iontů, které proudí do analyzátoru (Bouchonnet, 2013).

Ionty produkované v ionizačním zdroji jsou v analyzátoru separovány podle jejich poměru hmotnosti k náboji. Nejběžnějším analyzátozem je kvadrupólový analyzátor, přesto nejsou kvadrupólové hmotnostní spektrometry nejučinnější, protože se jedná o zařízení s nízkým rozlišením. Jejich výhodou je však lepší cenová dostupnost, robustnost, všestrannost a jednoduché použití. Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř paralelních kovových elektrod spojených po dvou, hyperbolického válce či válcového průřezu. Méně často se ve spojení s plynovou chromatografií používá analyzátor doby letu (McNair a Miller, 2009; Sparkman *et al.*, 2011; Bouchonnet, 2013).

Detektory mají v hmotnostní spektrometrii dvojí funkci. Detekují ionty úměrně jejich počtu a zesilují jejich proud tak, aby byl detekován elektronikou systému. Obvykle se jedná o spojitě dynodové elektronové násobiče. Dynoda je kovová destička pokrytá slitinou tvořenou většinou z olova či oxidu olova a je velmi bohatá na elektrony. Dynoda emituje elektrony v závislosti na příchodu iontů z analyzátoru. Příchod skupiny iontů na detektor se překládá jako signál na výstupním zařízení ve tvaru Gaussovy křivky, která je tak tenká, jako jsou současné příchody iontů. Vytváří se tak tedy hmotnostní spektra, pomocí kterých jsou detekované analyty identifikovány srovnáváním daných



hmotnostních spekter s databází. Výstupním zařízením je počítač společný pro plynový chromatograf i pro hmotnostní spektrometr (Sparkman *et al.*, 2011; Bouchonnet, 2013).

Hmotnostní spektrometr pracuje za podmínek vakua, tedy pod tlakem nižším, než je atmosférický tlak. Využívá vakuum primární a sekundární. Vakuum mění retenční časy analytů ve srovnání s časy získanými za stejných podmínek pomocí detektorů, které pracují pod atmosférickým tlakem či mírným přetlakem. Podtlak v hmotnostním spektrometru vede k nasávání nosného plynu a následně i analytů. Zrychlení eluce se promítá do zkrácení retenčních časů sloučenin (Bouchonnet, 2013).

## **2.5.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS)**

Kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru je velice výkonná analytická technika. Propojení je však náročnější než u plynové chromatografie. Hmotnostní spektrometrie poskytuje vysokou citlivost s velkým množstvím informací o struktuře pro analýzu organických sloučenin. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie má oproti plynové chromatografii výhodu, že sloučeniny nejsou vystaveny nadměrnému teplu, není potřeba tak čistý vzorek a obvykle nebývá nutná derivatizace vzorku (Covey *et al.*, 1986).

### **2.5.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je vhodná pro analýzu vzorků, které nejsou těkavé nebo jsou tepelně nestabilní. Kapalný nebo pevný vzorek je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle je nesen chromatografickou kolonou pomocí mobilní fáze. Separace probíhá na základě interakcí rozpuštěného vzorku se stacionární fází (Harvey, 2000; Nováková *et al.*, 2021).

#### **2.5.2.1.1 Kolony používané v HPLC**

Při vysokoúčinné kapalinové chromatografii se využívají většinou dvě různé kolony, a to kolona analytická a ochranná. Analytická kolona je zodpovědná za separaci látek ve vzorku a ochranná kolona chrání analytickou kolonu před kontaminací. Nejdříve je vždy umístěna ochranná kolona a za ní následuje kolona analytická. Analytické kolony jsou obvykle tvořeny z nerezové oceli, plněné porézními částicemi oxidu křemičitého nepravidelného či kulovitého tvaru a jejich délka je v rozmezí 30-300 mm. Existují také mikrokolony, které používají méně rozpouštědla, a protože je vzorek ředěn v menší

míře, tak vznikají na detektoru větší signály. Mikrokolony jsou vyrobeny z křemenného skla (Harvey, 2000).

Ochranné kolony slouží k zachycování látek, které by mohly nenávratně poškodit analytickou kolonu vazbou na stacionární fázi, a také pro minimalizaci možnosti ucpání analytické kolony částicemi vstříkovaného vzorku. Obvykle jsou složeny ze stejné stacionární fáze jako analytická kolona, ale jsou výrazně kratší a levnější (Harvey, 2000).

### **2.5.2.1.2 Stacionární a mobilní fáze**

Při chromatografii, kdy je použita jako stacionární fáze kapalina, je stacionární fází kapalný film potažený obalovým materiálem sestávajícím z 3-10  $\mu\text{m}$  porézních částic oxidu křemičitého. Stacionární fáze může být v mobilní fázi částečně rozpustná, což způsobí, že časem „vytéká“ z kolony. Tomu se brání kovalentní vazbou na částice oxidu křemičitého. Vlastnosti stacionární fáze jsou dány připojenými alkylovými skupinami. Jestliže jsou alkylové skupiny polární, pak je polární i stacionární fáze. S polární fází se používá mobilní fáze buď nepolární či mírně polární, tato kombinace se nazývá chromatografie na normální fázi. Další možností je chromatografie na reverzní fázi, kdy je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární. Většina separací na reverzní fázi se provádí za použití pufrovaného vodného roztoku jako mobilní fáze, jelikož křemičitý substrát podléhá hydrolyze v zásaditých roztocích, a tak musí být pH mobilní fáze udržováno pod hodnotou 7,5 (Harvey, 2000; Snyder *et al.*, 2010).

Pořadí eluce látek v HPLC je řízeno polaritou. Při separaci na normální fázi je nejprve eluována látka s nejmenší polaritou. Retenční časy jsou řízeny výběrem mobilní fáze, přičemž méně polární mobilní fáze vede k delším retenčním časům. Při separaci na reverzní fázi je nejprve eluována látka s největší polaritou. Zvýšení polarity mobilní fáze vede k delším retenčním časům, zatímco snížení vede k retenčním časům kratším (Harvey, 2000; Snyder *et al.*, 2010).

Před použitím musí být z mobilní fáze odstraněny rozpuštěné plyny jako jsou  $\text{O}_2$  a  $\text{N}_2$ , malé částice a prach, aby nedocházelo ke zkreslení signálu na detektoru či ucpání kolony. Mobilní fáze je čerpána pomocí pístových čerpadel, která dokážou udržet konstantní průtok až několik mililitrů za minutu, a tak získat vysoký vstupní tlak potřebný k průchodů mobilní fáze (Harvey, 2000; Snyder *et al.*, 2010; Nováková *et al.*, 2021).

### **2.5.2.1.3 Injektor**

Vzorek je zaváděn do systému pomocí smyčkového injektoru o objemu 0,5-2 ml. Na začátku vzorkovací smyčky není přítomná mobilní fáze a je otevřena do atmosféry. Vzorek je do smyčky umístován pomocí injekční stříkačky s objemem mnohem větším, než je vzorkovací smyčka. Veškerý vzorek, který je nad rámec objemu smyčky, vytéká odpadním potrubím. Po vložení vzorku se injektor otočí do polohy vstřikování, mobilní fáze se v této poloze dostane přes vzorkovací smyčku a vzorek je unášen mobilní fází na kolonu (Harvey, 2000; Nováková *et al.*, 2021).

### **2.5.2.1.4 Detektory**

Pro HPLC existuje mnoho druhů detektorů. Nejpoužívanějšími z nich jsou detektory založené na spektroskopických měřeních včetně UV/Vis absorbance a fluorescence. Další známé detektory jsou elektrochemické založené na elektrochemických měřeních jako je ampérometrie, voltametrie, coulometrie a vodivost. Dalšími detektory mohou být detektor indexu lomu a hmotnostní spektrometr (Harvey, 2000).

Spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem poskytuje kvalitativní strukturní informace, které mohou být užitečné při identifikaci analytu. Spojení je technicky složitější než u GC-MS kvůli nekompatibilitě kapalné mobilní fáze a potřebou vysokého vakua u hmotnostního spektrometru (Harvey, 2000).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použitý materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

Acetonitril (hypergrade for LC-MS; Sigma-Aldrich, USA)

Benzoylchlorid (Sigma-Aldrich, USA)

Diethylether (p.a.; Lachner, Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan amonný (Lachner, Česká republika)

Dusičnan draselný (Lachner, Česká republika)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát (Lachner, Česká republika)

Ethanol (absolute, Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol 50 % (VWR, USA)

Ethylendiamintetraacetát disodný dihydrát (Na<sub>2</sub>-EDTA) (Sigma Aldrich, USA)

Hexan (p.a; Sigma Aldrich, USA)

Hydroxid amonný (Sigma Aldrich, USA)

Hydroxid sodný (Lachner, Česká republika)

Chlorid manganatý tetrahydrát (Lachner, Česká republika)

Chlorid sodný (Sigma Aldrich, USA)

Kyselina boritá (Lachner, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (Sigma Aldrich, USA)

Kyselina mravenčí (Merck, Německo)

Methanol (hypergrade for LC-MS; Sigma-Aldrich, USA)

Methanol 80 % (VWR, USA)

Molybdenan sodný dihydrát (Lachner, Česká republika)

Mravenčan amonný (Sigma Aldrich, USA)

Síran hořečnatý heptahydrát (Lachner, Česká republika)

Síran měďnatý pentahydrát (Lachner, Česká republika)

Síran zinečnatý heptahydrát (Lachner, Česká republika)

Síran železnatý heptahydrát (Lachner, Česká republika)

Standardy aminokyselin nejvyšší čistoty (Sigma Aldrich, USA): 2-aminoadipová kyselina,  $\beta$ -aminomáselná kyselina,  $\gamma$ -aminomáselná kyselina, alanin,  $\beta$ -alanin, N-acetylorнитin, arginin, asparagin, asparagová kyselina, citrulin, cystein, cystin, fenylalanin, glutamin, glutamová kyselina, glycin, histidin, hydroxyprolin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, ornitin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin.

Standardy fenolických sloučenin nejvyšší čistoty (Sigma Aldrich, USA): kyselina 5-hydroxyfelurová, kyselina gallová, kyselina 4-hydroxybenzoová, 2-O- $\beta$ -D-glukosid kyseliny salicylové, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, katechin, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina vanilová, kyselina 3-hydroxybenzoová, kyselina syringová, kyselina *para*-kumarová, kyselina ferulová, kyselina sialová, rutin, kyselina salicylová, kvercetin, naringin, myricetin, kyselina rozmarýnová, hesperetin, morin, luteonin, kvercetin, *para*-methyl kumarát, kyselina *trans*-skořicová, naringenin, apigenin, kaempferol, chrysin, pinocembrin a galantin.

Standardy polyaminů nejvyšší čistoty (Sigma Aldrich, USA): agmatin, 1,6-diaminohexan, 1,3-diaminopropan, histamin, homospermidin, kadaverin, norspermidin, putrescin, spermidin, spermin, termospermin, tryptamin a tyramin.

Standardy terpenoidů nejvyšší čistoty (Sigma Aldrich, USA): eugenol, geraniol, linalool a methyleugenol.

Tridekan (Sigma Aldrich, USA)

### **3.1.2 Biologický materiál**

Pro tuto diplomovou práci byla jako biologický materiál použita semena tří různých genotypů bazalky pravé. Jednalo se o genotypy 'Litra' (ECN 09A6800010), 'Mánes' a 'Chládek červená' (ECN 09A6800073). Semena genotypu 'Litra' a 'Chládek červená' byla získána z genobanky Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. v Olomouci. Semena získaná z genobanky mají svá identifikační čísla ECN. Semena genotypu 'Litra' byla sklizena v roce 2013. Semena genotypu 'Chládek červená' byla sklizena v roce 2018. Semena genotypu 'Mánes' byla zakoupena v běžném obchodě. Jednalo se o semena od firmy Semo.

### **3.2 Přístrojové vybavení**

Analytické váhy (Radwag, Česká republika)

Centrifugační filtry (Pragolab, Česká republika)

Fytotronová komora Fytoscope FS-WI-WIU (Photon Systems Instruments, Česká republika)

Kulový mlýn MM 400 (Retsch, Německo)

Lyofilizátor Beta 1-8 LD plus (Christ, Německo)

Mikrocentrifuga Microspin 12 (Biosan, Litva)

Pipety (Eppendorf, Německo)

Plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostním spektrometrem 5975C (Agilent Technologies, USA)

UHPLC Nexera X2 s hmotnostním spektrometrem LCMS-8050 (Shimadzu, Japonsko)

Ultrazvuková čistička Sonorex (Bandelin, Německo)

Vakuový koncentrátor Centrivap (Labconco, USA)

Vortex V-1 plus (Biosan, Česká republika)

Vysokokapacitní fenotypizační platforma Plantscreen Conveyor system FS-WI-PS (Photon system instruments, Česká republika)

### 3.3 Použité metody

#### 3.3.1 Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope

Pěstování bazalky pravé ve vysokokapacitní fytotronové komoře Fytoscope (zkr. fytotronu) probíhalo od druhé poloviny května do druhé poloviny července roku 2020.

Pro pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronu bylo použito přibližně 50 semen od každého genotypu. Semena byla zaseta do plastového květináče s děravým dnem a s miskou. Květináč byl naplněn vermikulitem, pro každý genotyp byl použit samostatný květináč. Do každého z květináčů bylo přidáno 125 ml kohoutkové vody a jeden den byly květináče ponechány za laboratorních podmínek. Další den byly květináče přeneseny do fytotronu. Podmínky ve fytotronu byly následující: teplota 24 °C po dobu 24 hodin denně, 50% vlhkost, 20 hodin světla (20 % bílého světla) a 4 hodiny tmy.

Rostliny byly zalévány kohoutkovou vodou každé dva až tři dny po dobu čtrnácti dnů. Během celého experimentu byly rostliny pravidelně kontrolovány, byl zaznamenáván jejich vzhled, jejich výška a počet a velikost listů.

Po čtrnácti dnech začaly být rostliny zavlažovány namísto kohoutkovou vodou kontrolním ½ Hoaglandovým roztokem připraveným dle tabulky (Tab. 4).

Po dvaceti dnech byly rostliny přesazeny do nových květináčů s vermikulitem, vždy po pěti rostlinách stejného genotypu do jednoho květináče. Pro každý genotyp bylo určeno 5 různých květináčů. Rostliny byly zalévány kontrolním ½ Hoaglandovým roztokem opět každé dva až tři dny.

Po třiceti dnech byly květináče s rostlinami rozděleny do skupin a rostliny začaly být stresovány. Květináče každého genotypu byly rozděleny do 5 různých skupin. První skupina představovala kontrolní skupinu a byla zalévána po celou dobu pouze kontrolním ½ Hoaglandovým roztokem. Druhá skupina byla zalévána ½ Hoaglandovým roztokem s vysokým obsahem dusíku, třetí skupina byla zalévána ½ Hoaglandovým roztokem s nízkým obsahem dusíku. Čtvrtá skupina byla zalévána ½ Hoaglandovým roztokem s obsahem 50 mM NaCl a pátá skupina byla zalévána ½ Hoaglandovým roztokem s obsahem 100 mM NaCl. Pro přípravu všech použitých roztoků byly nejprve připraveny zásobní roztoky uvedeny v tabulce (Tab. 3). Obsažené látky a jejich množství ve všech použitých roztocích jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4).

Vždy po 30 minutách od zalití byl přebývajícím nevsáknutý roztok z misky pod květináčem odstraněn.

Po sedmi dnech od začátku stresování rostlin ½ Hoaglandovým roztokem s různou koncentrací dusíku a NaCl, tzn. 37. den od začátku pěstování, byla odebrána nadzemní část jedné rostliny z každého květináče. Takto byly v dalších týdnech postupně odebírány nadzemní části rostlin z jednotlivých květináčů v pravidelných sedmidenních intervalech, tzn. 44., 51. a 58. den od začátku pěstování. Poslední odebrání rostlinného materiálu proběhlo po 10 dnech od posledního odebrání, a to 68. den od začátku pěstování.

Veškerý odebraný rostlinný materiál byl zamrazen a skladován při teplotě – 80 °C pro další experimenty. V tomto experimentu byl rostlinný materiál z každé rostliny uchováván zvlášť v samostatném sáčku.

Tab. 3 Zásobní roztoky pro přípravu ½ Hoaglandových roztoků.

<b>Zásobní roztoky</b>	<b>Složky zásobních roztoků</b>	<b><math>\gamma</math> (g.l<sup>-1</sup>)</b>
<b>N-MACRO</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	295
	KNO <sub>3</sub>	126,5
<b>MACRO</b>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	57,5
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	246,5
<b>MICRO</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,81
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,22
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,08
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,11
	Fe-EDTA	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
<b>NaCl</b>	Na <sub>2</sub> -EDTA	5,52
	NaCl (3 M)	175,32



Tab. 4 Koncentrace použitých látek a objemy použitých roztoků pro přípravu ½ Hoaglandova roztoku, ½ Hoaglandova roztoku s vysokou koncentrací dusíku, ½ Hoaglandova roztoku s nízkou koncentrací dusíku, ½ Hoaglandova roztoku s obsahem 50 mM NaCl a ½ Hoaglandova roztoku s obsahem 100 mM NaCl.

Zásobní roztoky	Složení roztoků	zásobních	½ Hoaglandův roztok (kontrola)		½ Hoaglandův roztok s vysokou konc. dusíku (1)		½ Hoaglandův roztok s nízkou konc. dusíku (1/8)		½ Hoaglandův roztok s obsahem 50 mM NaCl		½ Hoaglandův roztok s obsahem 100 mM NaCl	
			$\gamma^*$ (mg.l <sup>-1</sup> )	V <sup>†</sup> (ml)	$\gamma$ (mg.l <sup>-1</sup> )	V (ml)	$\gamma$ (mg.l <sup>-1</sup> )	V (ml)	$\gamma$ (mg.l <sup>-1</sup> )	V (ml)	$\gamma$ (mg.l <sup>-1</sup> )	V (ml)
<b>N-MACRO</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O		590		1181		147,63		590		590	
	KNO <sub>3</sub>		253	2	506	4	63,25	0,5	253	2	253	2
<b>MACRO</b>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		115		115		115		115		115	
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O		493	2	493	2	493	2	493	2	493	2
<b>MICRO</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		2,86		2,86		2,86		2,86		2,86	
	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O		1,81		1,81		1,81		1,81		1,81	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O		0,22	1	0,22	1	0,22	1	0,22	1	0,22	1
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O		0,08		0,08		0,08		0,08		0,08	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O		0,11		0,11		0,11		0,11		0,11	
<b>Fe-EDTA</b>	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O											
	Na <sub>2</sub> -EDTA		10,06	1	10,06	1	10,06	1	10,06	1	10,06	1
<b>NaCl</b>	NaCl (3 M)		-	-	-	-	-	-	2920,83	16,66	5842,75	33,33

\*koncentrace daných látek v připravovaném roztoku

†objem zásobního roztoku přidány do připravovaného roztoku

### **3.3.2 Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system**

Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system (zkr. konveju) probíhalo od první poloviny října do začátku prosince roku 2020.

Pro pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek v konveju bylo použito přibližně 50 semen od každého genotypu. Do tří různých plastových květináčů s vermikulitem byla zasazena semena bazalky pravé a byla zalita 125 ml kohoutkové vody. Květináče byly uloženy v konveju za kontrolovaných podmínek. Podmínky v konveju byly následující: 16 hodin světla (20 % bílého a 80 % infračerveného světla) a 8 hodin tmy, teplota 24 °C během doby světla, teplota 22 °C během doby tmy, vlhkost udržována okolo 60 %. Rostliny byly zalévány každé dva až tři dny po dobu 25 dní, kdy byla vždy přebývající voda z předešlého zalévání odstraněna před dalším zaléváním.

Dvacátý šestý den byla voda nahrazena kontrolním ½ Hoaglandovým roztokem připraveným stejně jako v předešlém experimentu, viz tabulka (Tab. 4).

Dvacátý devátý den byly rostliny přesazeny do samostatných plastových květináčů s děrovaným dnem vždy po jedné rostlině. Pro každý genotyp bylo vybráno celkem 16 rostlin, tzn. 16 květináčů. Květináče byly rozděleny do skupin, kdy danou skupinu tvořili vždy čtyři rostliny jednoho genotypu. Pro každou skupinu byla vyhrazena miska, ve které byly květináče uloženy a po dobu dalších 10 dnů byly rostliny zavlažovány 500 ml kontrolního ½ Hoaglandova roztoku.

Třicátý devátý den byly misky s květináči rozděleny do čtyř různých skupin, kdy každá skupina obsahovala jednu misku se čtyřmi květináči od každého genotypu. První kontrolní skupina byla nadále zalévána 500 ml kontrolního ½ Hoaglandova roztoku. Druhá skupina byla zalévána 500 ml ½ Hoaglandova roztoku s vysokým obsahem dusíku, třetí skupina byla zalévána 500 ml ½ Hoaglandova roztoku s nízkým obsahem dusíku. Čtvrtá skupina byla zalévána 500 ml ½ Hoaglandova roztoku s obsahem 100 mM NaCl. ½ Hoaglandův roztok s obsahem 50 mM NaCl nebyl v tomto experimentu použit. Roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků dle tabulky (Tab. 4).

Padesátý pátý den byly nadzemní části rostlin sklizeny, zamrazeny a uchovány při teplotě – 80 °C pro další experimenty. Rostlinný materiál jednoho genotypu stejné skupiny z tohoto experimentu byl uchováván dohromady v jednom sáčku.

### 3.3.3 Zpracování rostlinného materiálu pro další experimenty

Pro další experimenty byl rostlinný materiál z předešlých dvou experimentů zpracován pomocí lyofilizace a homogenizace.

Rostlinný materiál uchovávaný při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  byl přenesen do 15 ml plastových zkumavek. Takto připravený rostlinný materiál byl vložen do lyofilizátoru a byl lyofilizován po dobu 72 hodin.

Lyofilizovaný rostlinný materiál byl zhomogenizován pomocí kulového mlýnu. Zhomogenizovaný rostlinný materiál byl uložen v mrazáku při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v mikrozkuškových pro následující experimenty.

### 3.3.4 Analýza terpenoidů pomocí GC-MS

Analýza terpenoidů pomocí GC-MS byla provedena podle Čavar Zeljković *et al.* (2020), postup byl modifikován dle potřeby.

Pro analýzu terpenoidů byl použit rostlinný materiál získaný z pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronu i v konveju.

Pro analýzu bylo naváženo 50 mg zhomogenizovaného rostlinného materiálu od každého vzorku. Jelikož u některých vzorků bylo rostlinného materiálu pouze omezené množství, bylo váženo různé množství pro různé vzorky. U některých vzorků nebyly terpenoidy z důvodu nedostatku rostlinného materiálu analyzovány vůbec.

K naváženému množství vzorku v mikrozkuškové byl přidán 1 ml roztoku 0,01% tridekanu v hexanu, který zde sloužil jako interní standart pro kvantifikaci. Směs byla ponechána 15 minut v ultrazvuku a poté byla směs centrifugována po dobu 10 minut při 12 400 g pomocí mikrocentrifugy. Vzniklý supernatant byl přenesen do skleněné vialky, která byla posléze uzavřena víčkem se septem pro GC-MS.

Dále byla připravena kalibrační řada roztoku vybraných standardů s koncentracemi v rozsahu od 0,1 mM do 50 mM. Vybranými standardy byly eugenol, geraniol, linalool a methyleugenol. Nejprve byl připraven zásobní roztok směsi standardů. Do vialky bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  od každého roztoku standardu o koncentracích 1000  $\text{mmol.l}^{-1}$  a ke směsi bylo přidáno 600  $\mu\text{l}$  hexanu. Samotná kalibrační řada byla připravena do vialek z roztoku směsi standardů, 0,01% tridekanu v hexanu, kdy tridekan sloužil jako interní standard, a hexanu dle tabulky (Tab. 5).

Tab. 5 Kalibrační řada pro kvantifikaci nejzastoupenějších terpenoidů ve vzorcích bazalky pravé.

Koncentrace kalibračního roztoku (mmol.l <sup>-1</sup> )	Zásobní roztok o koncentraci 100 mmol.l <sup>-1</sup> (μl)	0,01% roztok tridekanu v hexanu (μl)	Hexan (μl)
50	500	100	400
25	250	100	650
10	100	100	800
5	50	100	850
2,5	25	100	875
1	10	100	890

Dále byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>. Kalibrační roztok o koncentraci 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> byl připraven ze 100 μl kalibračního roztoku o koncentraci 5 mmol.l<sup>-1</sup>, 90 μl roztoku 0,01% tridekanu v hexanu a 810 μl hexanu. Kalibrační roztok o koncentraci 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> byl připraven obdobně, ale místo 100 μl kalibračního roztoku o koncentraci 5 mmol.l<sup>-1</sup> bylo přidáno 100 μl kalibračního roztoku o koncentraci 1 mmol.l<sup>-1</sup>.

Pro samotnou GC-MS analýzu byl využit plynový chromatograf 7890A s hmotnostním spektrometrem 5975C. Analýza probíhala v režimu Splitless a jako interní standart byl použit tridekan. Parametry analýzy plynovou chromatografií byly: kolona Agilent 19091S-433: K01 HP-5MS 5% Fenyl methyl siloxan, délka 30 m x 250 μm x 0,25 μm, nosný plyn He (1,1 ml/min), teplotní program: 3 °C/min od 60 °C do 300 °C, dávkovaný objem: 1 μl. Teplota detektoru byla 230 °C.

Pro zpracování dat byl využit program Massfinder 4.51 – 11 Computer Software. Jednotlivé chromatogramy byly porovnávány vizuálně s pomocí počítačové databáze NIST MS SEARCH 2.0. Nejprve byly identifikovány nejvíce zastoupené terpenoidy v jednotlivých vzorcích a poté byla provedena kvantifikace nejvíce zastoupených terpenoidů pomocí porovnávání plochy píků jednotlivých látek s interním standardem, poté se standardy jako takovými a následně byly porovnávány jednotlivé vzorky mezi sebou.

### 3.3.5 Analýza dusíkatých sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS

Pro analýzu dusíkatých látek byl použit rostlinný materiál získaný z pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek v konvejeoru.

#### 3.3.5.1 Analýza aminokyselin pomocí UHPLC-MS/MS

Analýza aminokyselin byla prováděna podle Spanik *et al.* (2007). Metoda byla dle potřeby upravena.

Pro analýzu aminokyselin bylo naváženo 5 mg homogenizovaného rostlinného materiálu do mikrozkušavky pro každý vzorek. Do každé zkumavky byl k rostlinnému materiálu přidán 1 ml 50% ethanolu a směs byla ponechána po dobu 10 minut v ultrazvuku. Poté byly vzorky centrifugovány při 12 400 g po dobu 5 minut. Bylo odebráno 200  $\mu$ l supernatantu do nové mikrozkušavky a roztok byl odpařen do sucha pomocí centrifugačního koncentrátoru.

Po odpaření bylo do mikrozkušavek přidáno 50  $\mu$ l mobilní fáze. Směs byla ponechána v ultrazvuku po dobu 5 minut. Poté byla směs centrifugována po dobu 5 minut při 12 400 g. Do insertů ve vialkách bylo napipetováno vždy 25  $\mu$ l odebraného supernatantu.

Samotná UHPLC analýza aminokyselin byla provedena pomocí UHPLC Nexera X2 spojeným s hmotnostním spektrometrem LCMS-8050. Chromatografická separace probíhala za použití systému HILIC na koloně Acquity UPLC BEH AMIDE (50 x 2,1 mm; 1,7  $\mu$ m průměr) s příslušnou předkolonou. Teplota byla udržována v kolonách na 40 °C, průtok byl 0,4 ml/min. Vstříkovaný objem vzorku byl 2  $\mu$ l. Mobilní fáze byla tvořena roztoky 20 mM mravenčanu sodného o pH = 3 (mobilní fáze A) a 0,02% kyseliny mravenčí v acetonitrilu (mobilní fáze B). Binární gradienty pro gradientovou eluci aminokyselin jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6).

Jako standardy byly použity použity 10 mM roztoky připravené rozpuštěním příslušného množství dané aminokyseliny v 0,1 M HCl. Danými aminokyselinami byly: 2-aminoadipová kyselina,  $\beta$ -aminomáselná kyselina,  $\gamma$ -aminomáselná kyselina, alanin,  $\beta$ -alanin, N-acetylornitin, arginin, asparagin, asparagová kyselina, citrulin, cystein, cystin, fenylalanin, glutamin, glutamová kyselina, glycin, histidin, hydroxyprolin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, ornitin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin.

Jako interní standardy byly použity deuteriem značené aminokyseliny:  $\gamma$ -aminomáselná kyselina-2,2,3,3,4,4-d<sub>6</sub>, glutamová kyselina- 2,3,3,4,4-d<sub>5</sub>,

glutamin-2,3,3,4,4-d<sub>5</sub>, leucin-2,3,3,4,5,5,5,5',5',5'-d<sub>10</sub>, prolin<sup>13</sup>C<sub>5</sub>,<sup>15</sup>N  
 a threonin-<sup>13</sup>C<sub>4</sub><sup>15</sup>N,2,3,4,4,4-d<sub>5</sub>. Tyto interní standardy byly ve formě 10 mM roztoků  
 tvořených příslušným množstvím daných standardů rozpuštěným v 0,1 M HCl.

Získaná data byla vyhodnocována s využitím programu ChemStation E 02.02.1431.  
 V tabulce (Tab. 7) jsou uvedeny retenční časy všech použitých standardů aminokyselin  
 a interních standardů, jejich MRM (multiple reaction monitoring) přechody a relativní  
 intenzita.

Tab. 6 Binární gradienty gradientové eluce aminokyselin.

Čas (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,0	90
2,0	90
4,0	85
6,0	65
7,0	55
7,2	55
7,3	90
12,0	konec analýzy

Tab. 7 Retenční časy použitých standardů aminokyselin a interních standardů, MRM přechody vyjádřené jako (m/z) prekurzorového iontu > (m/z) produkovaného iontu a jejich relativní intenzita na koloně Acquity UPLC BEH AMIDE.

Standard	Retenční čas (min) Průměr ± SD (RDS (%))	MRM přechody (kolizní energie) (V)	Relativní intenzita (%)
Tryptamin (TRYP)	1,116±0,020 (1,81)	160,95>144,10 (14)	100
		160,95>115,10 (34)	46
		160,95>116,95 (24)	41
Tyramin (TYRA)	1,502±0,030 (2,02)	137,90>121,05 (14)	100
		137,90>77,00 (28)	85
		137,90>91,05 (23)	36
Leucin (Leu)	2,945±0,058 (1,97)	132,10>86,05 (12)	100
		132,10>44,15 (23)	20
Leucin (Leu – interní standard)	2,957±0,061 (2,07)	141,95>96,10 (12)	100
Fenylalanin (Phe)	3,030±0,058 (1,92)	165,90>120,10 (15)	100
		165,90>103,10 (27)	58
		165,90>77,00 (40)	56
Isoleucin (Ile)	3,275±0,0162 (1,90)	132,10>86,15 (12)	100
		132,10>68,95 (16)	20
Tryptofan (Trp)	3,335±0,062 (1,86)	205,10>188,20 (11)	100
		205,10>118,00 (25)	81
		205,10>146,00 (18)	71
γ-aminomáselná kyselina (GABA – interní standard)	3,368±0,081 (2,41)	110,15>93,00 (14)	100
		110,15>49,05 (22)	69
		110,15>46,00 (23)	26
β-aminomáselná kyselina (BABA)	3,370±0,058 (2,03)	104,10>45,05 (24)	100
		104,10>41,00 (30)	57
γ-aminomáselná kyselina (GABA)	3,372±0,083 (2,45)	104,10>87,10 (14)	100
		104,10>45,05 (23)	60
		104,10>69,00 (16)	37
Methionin (Met)	3,838±0,054 (1,40)	149,90>56,10 (17)	100
		149,90>61,00 (23)	85
		149,90>104,00 (13)	56
Valin (Val)	4,126±0,066 (1,60)	118,00>72,00 (10)	100
		118,00>55,05 (20)	42

*Pokračování:* Tab. 7 Retenční časy použitých standardů aminokyselin a interních standardů, MRM přechody vyjádřené jako (m/z) prekurzorového iontu > (m/z) produkovaného iontu a jejich relativní intenzita na koloně Acquity UPLC BEH AMIDE.

Standard	Retenční čas (min) Průměr ± SD (RDS (%))	MRM přechody (kolizní energie) (V)	Relativní intenzita (%)
Prolin (Prolin – interní standard)	4,149±0,064 (1,55)	122,10>75,00 (16)	100
		122,10>46,10 (30)	3
		122,10>30,10 (38)	3
Prolin (Pro)	4,157±0,069 (1,66)	116,10>70,05 (7) 116,10>43,05 (22)	100 4
Cystein (Cys)	4,590±0,082 (1,78)	121,90>38,85 (14) 121,90>81,00 (7)	100 42
β-alanin (BAla)	4,623±0,105 (2,27)	90,10>72,10 (12)	100
		90,10>30,10 (13)	97
		90,10>45,15 (33)	33
Tyrosin (Tyr)	4,703±0,051 (1,09)	182,10>91,10 (28)	100
		182,10>136,00 (15)	48
		181,10>165,15 (13)	35
Alanin (Ala)	5,460±0,059 (1,08)	90,10>44,10 (12)	100
		90,10>45,00 (31)	8
Hydroxyprolin (Hpr)	5,501±0,025 (0,45)	132,90>87,10 (15)	100
		132,90>69,00 (22)	86
		132,90>68,05 (22)	23
Threonin (Thr – interní standard)	5,703±0,021 (0,37)	129,90>80,00 (13)	100
		129,90>65,10 (18)	24
Threonin (Thr)	5,706±0,055 (0,97)	120,10>74,00 (14)	100
		120,10>102,10 (15)	22
2-aminoadipová kyselina (AAA)	5,776±0,021 (0,36)	161,90>98,00 (15)	100
		161,90>55,10 (26)	53
		161,90>121,00 (10)	9
Glycin (Gly)	5,794±0,027 (0,47)	76,10>30,00 (11)	100
		76,10>48,00 (14)	3
Glutamová kyselina (Glu – interní standard)	5,965±0,017 (0,28)	152,95>88,00 (18)	100
		152,95>89,20 (16)	60
		152,95>135,10 (14)	28
Glutamová kyselina (Glu)	5,978±0,035 (0,58)	147,90>84,10 (17)	100
		147,90>56,00 (20)	17
Glutamin (Gln – interní standard)	6,065±0,012 (0,20)	151,90>88,00 (18)	100
		151,90>135,10 (14)	88
		151,90>89,20 (19)	72



*Pokračování:* Tab. 7 Retenční časy použitých standardů aminokyselin a interních standardů, MRM přechody vyjádřené jako (m/z) prekurzorového iontu > (m/z) produkovaného iontu a jejich relativní intenzita na koloně Acquity UPLC BEH AMIDE.

<b>Standard</b>	<b>Retenční čas (min) Průměr ± SD (RDS (%))</b>	<b>MRM přechody (kolizní energie) (V)</b>	<b>Relativní intenzita (%)</b>
Glutamin (Gln)	6,065±0,0141 (0,68)	146,90>84,10 (18)	100
		146,90>130,10 (15)	37
		146,90>56,05 (29)	25
Serin (Ser)	6,096±0,077 (1,26)	106,00>60,00 (15)	100
		106,10>88,00 (11)	14
Asparagin (Asn)	6,156±0,020 (0,32)	132,90>74,00 (16)	100
		132,90>87,15 (11)	53
		132,90>88,10 (12)	11
Asparagová kyselina (Asp)	6,287±0,072 (1,14)	134,00>88,00 (10)	100
		134,00>74,00 (12)	82
Citrulin (Cit)	6,296±0,008 (0,12)	175,90>70,05 (23)	100
		175,90>159,20 (14)	39
		175,90>113,05 (17)	24
Histidin (His)	6,847±0,019 (0,27)	155,90>110,15 (16)	100
		155,90>83,10 (24)	45
Arginin (Arg)	6,850±0,009 (0,12)	175,00>70,05 (23)	100
		175,00>116,10 (15)	67
Lysin (Lys)	6,927±0,012 (0,18)	146,90>84,10 (18)	100
		146,90>130,00 (15)	20
		146,90>56,15 (28)	18
Ornitin (Orn)	6,967±0,014 (0,20)	133,10>70,00 (22)	100
		133,10>116,00 (15)	84
		133,10>43,15 (33)	59
Cistin (Cis)	7,185±0,025 (0,18)	241,00>74,00 (29)	100
		214,00>151,95 (14)	62

### 3.3.5.2 Analýza polyaminů pomocí UHPLC-MS/MS

Analýza polyaminů byla prováděna podle Taibi *et al.* (2000) a Spanik *et al.* (2007). Metody byly dle potřeby upraveny.

Pro analýzu polyaminů bylo využito 200  $\mu\text{l}$  supernatantu získaného z první centrifugace při analýze aminokyselin. Těchto 200  $\mu\text{l}$  supernatantu bylo napipetováno do čisté mikrokumavky a bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  NaOH o koncentraci 2  $\text{mol.l}^{-1}$  a 2  $\mu\text{l}$  benzoylchloridu. Směs byla zvortexována a ponechána po dobu 40 minut při laboratorní teplotě.

Po 40 minutách bylo ke směsi přidáno 500  $\mu\text{l}$  nasyceného roztoku NaCl a 500  $\mu\text{l}$  diethyletheru. Směs byla zvortexována a po oddělení byla etherová vrstva přenesena do nové mikrokumavky. Opět bylo ke směsi přidáno 500  $\mu\text{l}$  diethyletheru. Směs byla opět zvortexována a etherová vrstva byla přenesena do mikrokumavky s předchozí etherovou vrstvou. Tento etherový roztok byl odpařen do sucha pomocí centrifugačního koncentrátoru.

Po odpaření bylo do mikrokumavek přidáno 200  $\mu\text{l}$  mobilní fáze a směs byla ponechána 5 minut v ultrazvuku. Směs byla poté centrifugována po dobu 5 minut při 12 400 g. Do insertu ve vialce bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$  supernatantu. Takto byly připraveny všechny vzorky.

Samotná UHPLC analýza polyaminů byla provedena pomocí UHPLC Nexera X2 s hmotnostním spektrometrem LCMS-8050. Chromatografická separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$  velikost částic) s příslušnou předkolonou. Teplota byla udržována v kolonách na 40  $^{\circ}\text{C}$ , průtok byl 0,4 ml/min. Vstříkovaný objem vzorku byl 2  $\mu\text{l}$ . Mobilní fáze byla tvořena roztoky 15 mM kyselinou mravenčí o pH = 3 (mobilní fáze A) a methanolem (mobilní fáze B). Binární gradienty pro gradientovou eluci polyaminů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 8).

Jako standardy polyaminů byly použity 10 mM roztoky tryptaminu a tyraminu připravené rozpuštěním příslušného množství v 0,1 M HCl. Zbylé standardy polyaminů byly použity jako 10 mM roztoky v deionizované vodě. Jednalo se o tyto polyaminy: agmatin, 1,3-diaminopropan, histamin, homospermidin, kadaverin, norspermidin, putrescin, spermidin, spermin a termospermin. Jako interní standard byl použit 1,6-diaminohexan.

Získaná data byla vyhodnocována s využitím programu ChemStation E 02.02.1431. V tabulce (Tab. 9) jsou uvedeny retenční časy všech použitých standardů polyaminů, jejich MRM (multiple reaction monitoring) přechody a relativní intenzita.

Tab. 8 Binární gradienty gradientové eluce polyaminů.

Čas (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,0	30
0,5	57
3,0	57
3,5	95
4,0	95
4,1	30
6,0	konec analýzy

Tab. 9 Retenční časy použitých standardů polyaminů, MRM přechody vyjádřené jako (m/z) prekurzorového iontu > (m/z) produkovaného iontu a jejich relativní intenzita na koloně Acquity UPLC BEH C18.

<b>Standard</b>	<b>Retenční čas (min) Průměr ± SD (RDS (%))</b>	<b>MRM přechody (kolizní energie) (V)</b>	<b>Relativní intenzita (%)</b>
Histamin (HIST)	0,649±0,005 (0,81)	215,75>95,10 (16)	100
		217,75>77,00 (38)	87
Putrescin (PUT)	1,697±0,002 (0,10)	297,10>105,10 (25)	100
		297,10>77,05 (50)	75
		297,10>176,00 (16)	53
1,3-diaminopropan (DAP)	1,749±0,003 (0,15)	282,95>104,95 (25)	100
		282,95>77,00 (55)	78
		282,95>162,05 (15)	67
Kadaverin (CAD)	1,815±0,002 (0,11)	311,10>104,95 (24)	100
		311,10>77,05 (52)	71
		311,10>190,20 (15)	32
Norspermidin (NorSPD)	2,214±0,003 (0,13)	444,15>105,05 (46)	100
		444,15>162,00 (23)	87
		444,15>322,00 (29)	77
Spermidin (SPD)	2,390±0,003 (0,11)	458,20>105,10 (44)	100
		458,20>162,16 (29)	65
		458,20>336,30 (19)	64
Homospermidin (HomoSPD)	2,617±0,004 (0,16)	472,20>274,20 (22)	100
		472,20>105,05 (43)	78
		472,20>176,05 (29)	40
Termospermin (ThSPM)	3,456±0,007 (0,21)	619,25>105,00 (54)	100
		619,25>162,00 (34)	65
		619,25>337,20 (25)	31
Spermin (SPM)	3,689±0,007 (0,19)	619,25>497,30 (26)	100
		619,25>162,00 (40)	81
		619,25>105,00 (55)	9
Agmatin (AGM)	4,350±0,004 (0,10)	443,00>104,85 (33)	100
		443,00>375,00 (13)	15

### 3.3.6 Analýza fenolických sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS

Analýza fenolických sloučenin byla prováděna podle Čavar Zeljković *et al.* (2020), pracovní postupy byly částečně upraveny dle potřeby.

Pro analýzu fenolických sloučenin byl využit rostlinný materiál získaný z pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronu i v konvejeoru.

Pro analýzu bylo do mikrozkušavky vždy naváženo 10 mg homogenizovaného rostlinného materiálu. Pro některé vzorky bylo naváženo do mikrozkušavky méně, jelikož bylo nedostatek rostlinného materiálu daného vzorku. U některých vzorků nebyla analýza fenolických sloučenin provedena vůbec z důvodu nedostatku rostlinného materiálu.

K rostlinnému materiálu v mikrozkušavce byl přidán 1 ml 80% methanolu a směs byla ponechána 10 minut v ultrazvuku. Poté byla směs centrifugována po dobu 5 minut při 12 400 g. Bylo odebráno 400 µl supernatantu do centrifugačního filtru v nové mikrozkušavce a supernatant byl centrifugován po dobu 3 minut. Do nové mikrozkušavky bylo odebráno 250 µl zfiltrovaného supernatantu a pomocí centrifugačního koncentrátoru byl zfiltrovaný supernatant odpařen do sucha. Poté bylo přidáno 25 µl mobilní fáze a směs byla ponechána 5 minut v ultrazvuku. Poté byla směs znovu centrifugována po dobu 5 minut při 12 400 g a supernatant byl odebrán do insertu ve vialce.

Samotná UHPLC analýza fenolických sloučenin byla provedena pomocí UHPLC Nexera X2 s hmotnostním spektrometrem LCMS-8050. Chromatografická separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm velikost částic) s příslušnou předkolonou. Teplota byla udržována v kolonách na 40 °C, průtok byl 0,4 ml/min. Vstřikovaný objem vzorku byl 2 µl. Mobilní fáze byla tvořena roztoky 15 mM kyselinou mravenčí o pH = 3 (mobilní fáze A) a acetonitrilem (mobilní fáze B). Hodnota pH mobilní fáze byla upravena přidávkem hydroxidu amonného. Binární gradienty pro gradientovou eluci fenolických sloučenin jsou uvedeny v tabulce (Tab. 10).

Jako standardy fenolických sloučenin byly použity: kyselina 5-hydroxyfelurová, kyselina gallová, kyselina 4-hydroxybenzoová, 2-O-β-D-glukosid kyseliny salicylové, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, katechin, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina vanilová, kyselina 3-hydroxybenzoová, kyselina syringová, kyselina *para*-kumarová, kyselina ferulová, kyselina sialová, rutin, kyselina salicylová, kvercetin, naringin, myricetin, kyselina rozmarýnová, hesperetin, morin, luteonin, kvercetin,

*para*-methyl kumarát, kyselina *trans*-skořicová, naringenin, apigenin, kaempferol, chrysin, pinocembrin a galantin. Jako interní standardy byly použity izotopicky značené standardy kyselina salicylová – d<sub>4</sub> a kyselina *p*-kumarová -d<sub>6</sub>.

Získaná data byla vyhodnocována s využitím programu ChemStation E 02.02.1431. V tabulce (Tab. 11) jsou uvedeny retenční časy všech použitých standardů fenolických sloučenin a jejich MRM (multiple reaction monitoring) přechody.

Tab. 10 Binární gradienty gradientové eluce fenolických sloučenin.

Čas (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,0	5
0,7	5
2,0	15
3,0	15
4,5	30
6,0	30
7,5	70
7,6	100
8,1	100
8,2	5
12,0	konec analýzy

Tab. 11 Retenční časy použitých fenolických sloučenin a MRM přechody vyjádřené jako (m/z) prekurzorového iontu > (m/z) produkovaného iontu na koloně Acquity UPLC BEH C18.

Standard	Retenční čas (min)	MRM přechody (kolizní energie) (V)
Kyselina gallová (GA)	0,65	169,00>125,05 (10) 169,00>79,05 (23) 169,00>97,10 (21)
Kyselina 4-hydroxybenzoová (4HBA)	1,92	137,00>93,00 (15) 137,00> 65,00 (31) 137,00> 41,00 (53)
2-O-β-D- glukosid kyseliny salicylové (SaAG)	2,15	298,70>137,10 (12) 298,70> 93,10 (38)
Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová (23DHBA)	2,15	153,10>108,80 (10) 153,10> 108,15 (25) 153,10> 91,10 (26)
Katechin (CATH)	2,25	288,60>245,25 (15) 288,60>123,20 (29) 288,60>109,10 (26)
CGA (Chlorogenová kyselina)	2,26	352,70>190,80 (10) 352,70> 85,15 (43) 352,70> 93,10 (95)
Kyselina vanilová (VA)	2,43	167,20> 152,25 (18) 167,20>108,15 (21)
Kyselina kávová (CA)	2,46	178,80>134,75 (15) 178,80>134,25 (25) 178,80>107,15 (23)
Kyselina 3-hydroxybenzoová (3HBA)	2,53	137,00>93,00 (14) 137,00>64,90 (36) 137,00>90,90 (29)
Kyselina syringová (SyA)	2,66	197,10>182,25 (16) 197,10>123,20 (24) 197,10>95,10 (31)
Kyselina <i>p</i> -kumarová -d <sub>6</sub> (pCA-d <sub>6</sub> , interní standard)	3,04	169,10>124,85 (15) 169,10>97,15 (33) 169,10>213,30 (25)
Kyselina ferulová (FA)	3,54	193,10>134,25 (25) 193,10>178,25 (16)
Kyselina sialová (SiA)	3,63	222,70>208,30 (18) 222,70>193,20 (22) 222,70>164,30 (17)
Rutin (RUT)	3,76	609,15>300,03 (18) 609,15>271,03 (23) 609,15>255,03 (18)
Salicylová kyselina – d <sub>4</sub> (SaA-d <sub>4</sub> , interní standard)	3,79	141,10>96,80 (16) 141,10>69,10 (31) 141,10>78,10 (35)
Salicylová kyselina (SaA)	3,84	137,10>92,70 (19) 137,10>65,00 (29) 137,10>75,05 (35)

*Pokračování:* Tab. 11 Retenční časy použitých fenolických sloučenin a MRM přechody vyjádřené jako (m/z) prekurzorového iontu > (m/z) produkovaného iontu na koloně Acquity UPLC BEH C18.

Standard	Retenční čas (min)	MRM přechody (kolizní energie) (V)
Kvercetin (QCIT)	4,48	447,10>343,25 (28) 447,10>297,25 (29)
Naringin (NGIN)	4,61	579,20>459,25 (28) 579,20>271,30 (32) 579,20>151,30 (44)
Kyselina rozmarýnová (RA)	4,62	358,70>161,20 (15) 358,70>133,15 (39) 358,70>197,30 (18)
Myricetin (MYR)	4,63	317,00>151,10 (20) 317,00>149,15 (16) 317,00>137,10 (24)
Hesperetin (HESP)	4,75	609,00>301,20 (25) 609,00>149,15 (16) 609,00>164,25 (55)
Morin (MOR)	4,98	301,00>151,10 (19) 301,00>125,05 (21) 301,00>149,15 (26)
Luteolin (LUT)	5,29	284,60>133,20 (34) 284,60>151,25 (26) 284,60>175,25 (27)
Kvercetin (QTIN)	5,30	301,20>151,25 (21) 301,20>179,25 (19) 301,20>107,05 (28)
<i>p</i> -Methyl kumarát (pMEC)	5,45	176,70>146,80 (25) 176,70>118,10 (21) 176,70>145,25 (21)
Kyselina <i>trans</i> -skořicová (tCA)	5,50	147,10>103,50 (15) 147,10>77,15 (25)
Naringenin (NGEN)	5,81	271,10>119,25 (25) 271,10>151,25 (19) 271,10>107,05 (24)
Apigenin (API)	5,83	268,60>117,10 (37) 268,60>151,25 (24) 268,60>149,25 (25)
Kaempferol (KAE)	5,97	285,60>117,05 (42) 285,60>239,20 (28) 285,60>93,05 (37)
Chrisin (CHR)	7,57	252,60>63,00 (34) 252,60>143,30 (27) 252,60>209,30 (23)
Pinocembrin (PIN)	7,63	254,70>213,30 (22) 254,70>151,25 (23) 254,70>171,30 (26)
Galangin (GAL)	7,66	268,60>169,25 (27) 268,60>171,30 (28) 268,60>213,30 (25)



## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope

Rostliny všech genotypů byly ve fytotronu vypěstovány ze semen a postupně sklizeny. První sklizení bylo provedeno týden po aplikaci stresu, tedy 37. den od začátku pěstování. Sklizení probíhalo postupně každý týden. Všechny zaznamenané údaje o růstu rostlin před i během aplikace stresu jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 12, Tab. 13). Na fotce (Obr. 1) lze vidět malé rostlinky v 15. den pěstování, které ještě nebylo možné přesadit do jednotlivých květináčů z důvodu příliš malé velikosti. Na fotce (Obr. 2) lze vidět rostliny již větší, rozdělené do květináčů před aplikací stresu.

U genotypu 'Litra' se rostlinám nejvíce dařilo při zavlažování  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s vysokým obsahem dusíku a také při zavlažování  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s obsahem 50 mM NaCl. V obou případech rostliny dosahovaly největší výšky a největšího počtu listů. Rostliny zavlažované kontrolním  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem dosahovaly také největší velikosti listů. Naopak nejméně se dařilo rostlinám zavlažovaným  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s nízkým obsahem dusíku a rostlinám zavlažovaným  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s obsahem 100 mM NaCl.

Pro rostliny genotypu 'Chládek červená' se zdál být nejvhodnější kontrolní  $\frac{1}{2}$  Hoaglandův roztok. Rostliny zavlažované kontrolním  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem dosahovaly největší výšky, počtu i velikosti listů. Nejméně vyhovoval rostlinám genotypu 'Chládek červená'  $\frac{1}{2}$  Hoaglandův roztok s obsahem 100 mM NaCl.

U rostlin genotypu 'Mánes' lze pozorovat, že rostliny zavlažované kontrolním  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem,  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s vysokým obsahem dusíku,  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s nízkým obsahem dusíku i  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s obsahem 50 mM NaCl dosahovaly téměř stejné výšky. Rostliny zavlažované  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s obsahem 100 mM NaCl dosahovaly výšky o přibližně 1 cm menší. Největší počet listů měly rostliny zavlažované kontrolním  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem a  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s nízkým obsahem dusíku. Největší velikosti listů dosahovaly rostliny zavlažované kontrolním  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem a rostliny zavlažované  $\frac{1}{2}$  Hoaglandovým roztokem s obsahem 50 mM NaCl. Celkově nejvhodnější se zdá být kontrolní  $\frac{1}{2}$  Hoaglandův roztok. Genotyp 'Mánes' se však zdá být velmi odolný vůči stresům aplikovaným v tomto experimentu, jelikož rostliny rostly velice dobře při zavlažování všemi použitými roztoky.

Tab. 12 Popis rostlin jednotlivých genotypů během pěstování za kontrolovaných podmínek ve fytotronu před aplikací stresu.

Den	Genotyp	Počet rostlin	Barva listů a stonku	Počet listů	Velikost listů (mm)
8. 28.5.2020	‘Litra‘	35-45	Světle zelená	2	2-4
	‘Mánes‘	35-45	Světle zelená	2	1-3
	‘Chládek červená‘	40-50	Tmavě zelená až fialová	2	2-4
15. 4.6.2020	‘Litra‘	35-45	Světle zelená	2-4	2-7
	‘Mánes‘	35-45	Green	2-4	3-5
	‘Chládek červená‘	40-50	Tmavě zelená až fialová	2-4	5-7
21. 10.6.2020	‘Litra‘	5 (v každém květináči)	Světle zelená	4	5-15
	‘Mánes‘	5 (v každém květináči)	Zelená	4	5-10
	‘Chládek červená‘	5 (v každém květináči)	Tmavě zelená až fialová	4	5-15
23. 12.6.2020	‘Litra‘	5 (v každém květináči)	Světle zelená	4	5-15
	‘Mánes‘	5 (v každém květináči)	Zelená	6-8	2-10
	‘Chládek červená‘	5 (v každém květináči)	Tmavě zelená až fialová	4	5-15
26. 15.6.2020	‘Litra‘	5 (v každém květináči)	Světle zelená	4	5-15
	‘Mánes‘	5 (v každém květináči)	Zelená	6-8	2-10
	‘Chládek červená‘	5 (v každém květináči)	Tmavě zelená až fialová	4	5-15
28. 17.6.2020	‘Litra‘	5 (v každém květináči)	Světle zelená	6-8	5-25
	‘Mánes‘	5 (v každém květináči)	Zelená	10-14	10-15
	‘Chládek červená‘	5 (v každém květináči)	Tmavě zelená až fialová	4-6	5-18
30. 19.6.2020	‘Litra‘	5 (v každém květináči)	Světle zelená	6-8	5-30
	‘Mánes‘	5 (v každém květináči)	Zelená	12-18	2-15
	‘Chládek červená‘	5 (v každém květináči)	Tmavě zelená až fialová	4-6	5-20

Tab. 13 Popis rostlin jednotlivých genotypů během pěstování za kontrolovaných podmínek ve fytotronu po aplikaci stresu.

Den	Genotyp	Typ stresu	Počet rostlin	Výška rostlin (cm)	Počet listů	Velikost listů (cm)
34. 23.6.2020	‘Litra‘	Kontrola	4	1-4,5	4-8	0,8-2,5
		Zvýšení příjem dusíku	5	1,5-5,5	4-22	1-3
		Snížený příjem dusíku	5	1-4,5	6-16	0,8-3
		50 mM NaCl	5	0,5-6	2-12	0,5-3,5
		100 mM NaCl	5	2,5-5	6-8	1-3
	‘Mánes‘	Kontrola	5	2- 2,5	~26	0,5-1,8
		Zvýšení příjem dusíku	4	1,5-2	~30	0,5-1,5
		Snížený příjem dusíku	5	2-3	~40	0,5-1,8
		50 mM NaCl	5	1-2,5	~22	0,5-1,5
		100 mM NaCl	5	1,5-2,5	~50	0,5-1,5
	‘Chládek červená‘	Kontrola	5	2,5-5	6-8	0,5-3
		Zvýšení příjem dusíku	4	2-4	4-6	0,5-3
		Snížený příjem dusíku	5	2-5	4-8	0,5-3
		50 mM NaCl	5	4	6	0,5-3
		100 mM NaCl	5	3-3,5	4-6	0,5-2,5
41. 30.6.2020	‘Litra‘	Kontrola	3	1-9	4-18	1-5
		Zvýšení příjem dusíku	4	1,5-10	4-28	1-6
		Snížený příjem dusíku	4	1-9	6-20	1-4
		50 mM NaCl	3	2-11,5	4-24	1-6
		100 mM NaCl	4	2,5-9	4-14	1-5
	‘Mánes‘	Kontrola	4	4,5	~42	0,5-3
		Zvýšení příjem dusíku	3	3,5	~60	0,5-2
		Snížený příjem dusíku	4	4	~60	0,5-1,5
		50 mM NaCl	4	2-3,5	10-35	0,5-3
		100 mM NaCl	4	2,5-3	20-80	0,5-2
	‘Chládek červená‘	Kontrola	4	3,5-10	6-12	2,5-5,5
		Zvýšení příjem dusíku	3	3-7,5	4-8	1,5-4
		Snížený příjem dusíku	4	2-8,5	4-8	1-4
		50 mM NaCl	4	5-8	8	3-4
		100 mM NaCl	4	3,5-6	6-8	2-3
44. 3.7.2020	‘Litra‘	Kontrola	3	1-11	4-18	1-6
		Zvýšení příjem dusíku	4	2-11,5	4-38	1-7
		Snížený příjem dusíku	4	1-10	4-24	1-4,5
		50 mM NaCl	3	2,5-13	6-34	2-6,5
		100 mM NaCl	4	2,5-9,5	4-18	2-4,5
	‘Mánes‘	Kontrola	4	5	~50	1-3
		Zvýšení příjem dusíku	3	4,5	~80	1-2
		Snížený příjem dusíku	4	5	~65	0,5-1,5
		50 mM NaCl	4	4	~50	1-3

*Pokračování:* Tab. 13 Popis rostlin jednotlivých genotypů během pěstování za kontrolovaných podmínek ve fytotronu po aplikaci stresu.

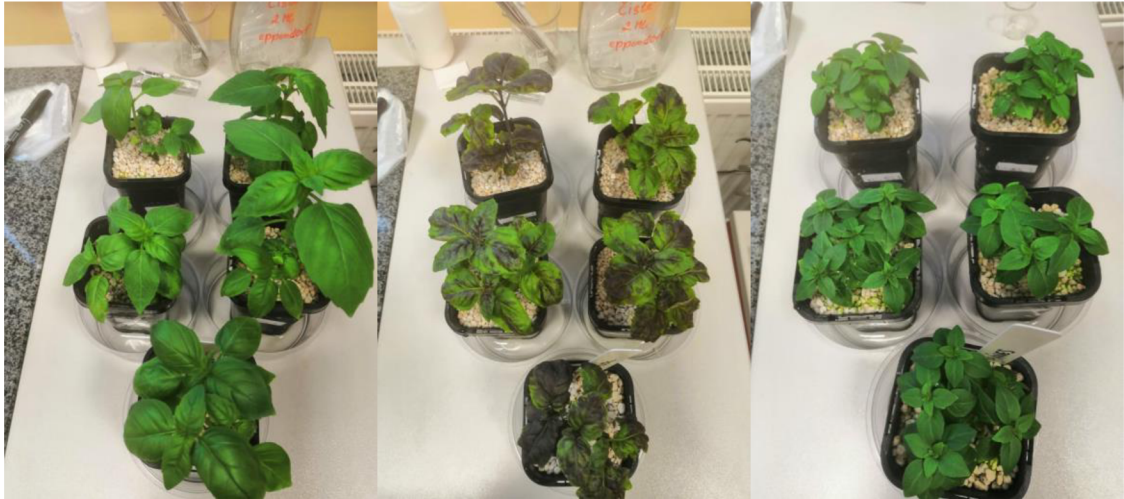
Den	Genotyp	Typ stresu	Počet rostlin	Výška rostlin (cm)	Počet listů	Velikost listů (cm)	
44. 3.7.2020	‘Mánes‘	100 mM NaCl	4	3,5	~80	1-2	
		Kontrola	4	3,5-11,5	6-20	2,5-6	
	‘Chládek červená‘	Zvýšení příjem dusíku	3	4-9,5	4-10	1,5-4	
		Snížený příjem dusíku	4	2-10	6-10	1-4	
		50 mM NaCl	4	6-9	8-10	3-4	
51. 10.7.2020	‘Litra‘	100 mM NaCl	4	6-7	6-8	2-3	
		Kontrola	1	15,5	26	1-7,5	
		Zvýšení příjem dusíku	2	5,5; 18,5	8; 62	2-8	
		Snížený příjem dusíku	3	1-15	4-28	1-4,5	
		50 mM NaCl	2	3; 22	66; 6	2-6,5	
	‘Mánes‘	100 mM NaCl	2	3; 15	26; 6	2-4,5	
		Kontrola	3	7	~100	1-3	
		Zvýšení příjem dusíku	2	7	~90	1-2	
		Snížený příjem dusíku	3	6,5	~100	0,5-1,5	
		50 mM NaCl	3	4-6	~80	1-3	
		100 mM NaCl	3	4-6,5	~90	1-2	
		‘Chládek červená‘	Kontrola	3	4-17	24; 8; 6	2,5-6
			Zvýšení příjem dusíku	2	4,5; 14,5	20; 6	1,5-5
			Snížený příjem dusíku	3	2,5-13	22; 8; 6	1-4,5
			50 mM NaCl	3	8-14	20; 10; 12	2,5-4,5
100 mM NaCl	3		6-8,5	14; 12; 8	2-4		
58. 17.7.2020	‘Litra‘	Kontrola	0	-	-	-	
		Zvýšení příjem dusíku	1	24 (začíná kvést)	80	2-8,5	
		Snížený příjem dusíku	2	1,5; 19	34; 4	1-6,5	
		50 mM NaCl	1	29 (začíná kvést)	84	2-8	
		100 mM NaCl	1	18,5 (začíná kvést)	34	2-7	
	‘Mánes‘	Kontrola	2	8	~130	1-3,5	
		Zvýšení příjem dusíku	1	8,5	~120	1-2	
		Snížený příjem dusíku	2	8	~130	1-2	
		50 mM NaCl	2	4; 8	~90	1-4	
		100 mM NaCl	2	5; 7	~100	1-2,5	
		‘Chládek červená‘	Kontrola	2	23; 6	6; 28	3-8
			Zvýšení příjem dusíku	1	21 (začíná kvést)	32	2-8,5
			Snížený příjem dusíku	1	17	26	1,5-6,5
			50 mM NaCl	2	9; 18,5	12; 26	2-7,5
			100 mM NaCl	2	7,5; 10	10; 20	2-6

*Pokračování:* Tab. 13 Popis rostlin jednotlivých genotypů během pěstování za kontrolovaných podmínek ve fytotronu po aplikaci stresu.

Den	Genotyp	Typ stresu	Počet rostlin	Výška rostlin (cm)	Počet listů	Velikost listů (cm)
65. 27.7.2020	‘Litra‘	Kontrola	0	-	-	-
		Zvýšení příjem dusíku	0	-	-	-
		Snížený příjem dusíku	1	1,5	6	1-1,5
		50 mM NaCl	0	-	-	-
		100 mM NaCl	0	-	-	-
		‘Mánes‘	Kontrola	1	9,5	~160
	Zvýšení příjem dusíku		0	-	-	-
	Snížený příjem dusíku		1	9	~140	1-2
	50 mM NaCl		1	9	~110	1-4
	100 mM NaCl		1	8	~130	1-2,5
	‘Chládek červená‘	Kontrola	1	30	50	3-9
		Zvýšení příjem dusíku	0	-	-	-
		Snížený příjem dusíku	1	23,5	36	2-7
		50 mM NaCl	1	25	48	2-8
			100 mM NaCl	1	14	30



Obr. 1 Rostliny jednotlivých genotypů pěstované ve fytotronu v 15. den pěstování.



Obr. 2 Rostliny genotypu 'Litra', 'Chládek červená' a 'Mánes' (zleva doprava) před aplikací stresu.

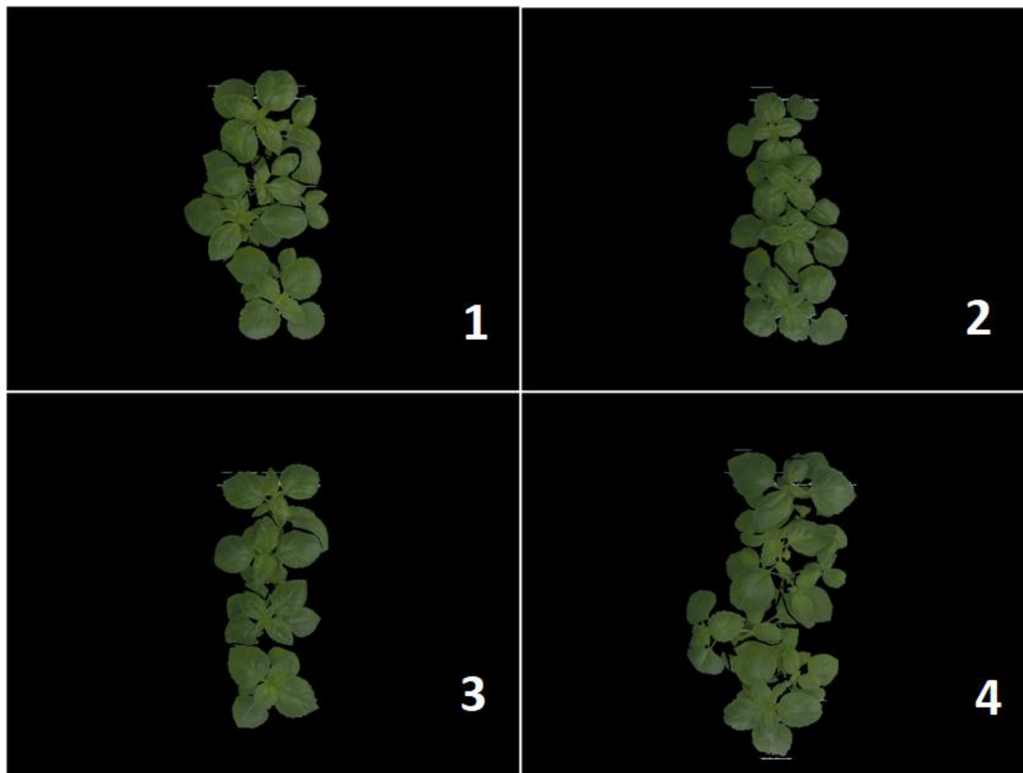
## 4.2 Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system

Všechny rostliny pěstované v konveju byly vypěstovány ze semen a byly sklizeny naráz. Během pěstování bylo při aplikaci stresu provedeno vrchní a postranní snímání jednotlivých skupin rostlin.

U genotypu ‘Litra’ nebyly pozorovány příliš signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami rostlin. Dle vrchních (Obr. 3) a postranních (Obr. 4) snímků lze usoudit, že všechny rostliny byly odolné vůči použitým stresům.

U genotypu ‘Chládek červená’ lze pozorovat, že nejvíce výrazný rozdíl byl u rostlin, na které byl aplikován solný stres. Z vrchních (Obr. 5) a postranních (Obr. 6) lze vidět, že rostliny pěstované při solném stresu dosahovaly menšího vzrůstu a byly oproti ostatním skupinám méně olistěné. Mezi ostatními skupinami nebyly pozorovány signifikantní rozdíly.

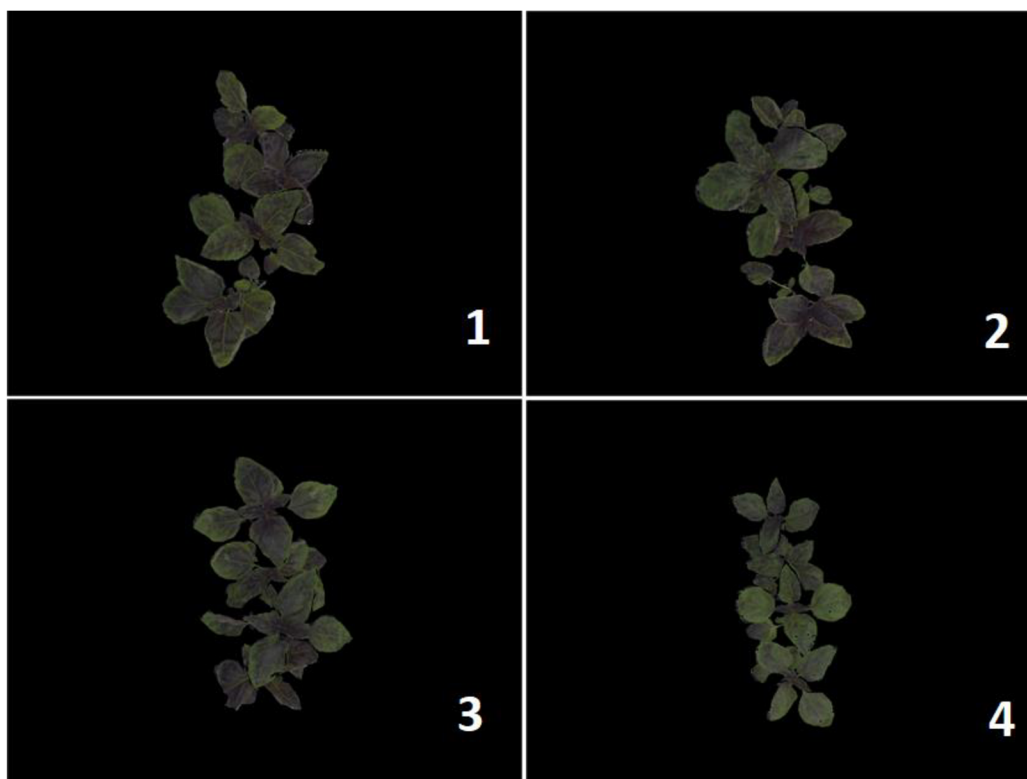
U rostlin genotypu ‘Mánes’ nebyly signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami, což lze vidět na vrchních (Obr.7) a postranních (Obr. 8) snímcích.



Obr. 3 Vrchní snímky rostlin genotypu ‘Litra’ pěstovaných v konveju, 1 – kontrolní skupina, 2 – rostliny se zvýšeným příjmem dusíku, 3 – rostliny se sníženým příjmem dusíku, 4 – rostliny, na které byl aplikován solný stres.



Obr. 4 Postranní snímky rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných v konveju, 1 – kontrolní skupina, 2 – rostliny se zvýšeným příjmem dusíku, 3 – rostliny se sníženým příjmem dusíku, 4 - rostliny, na které byl aplikován solný stres.

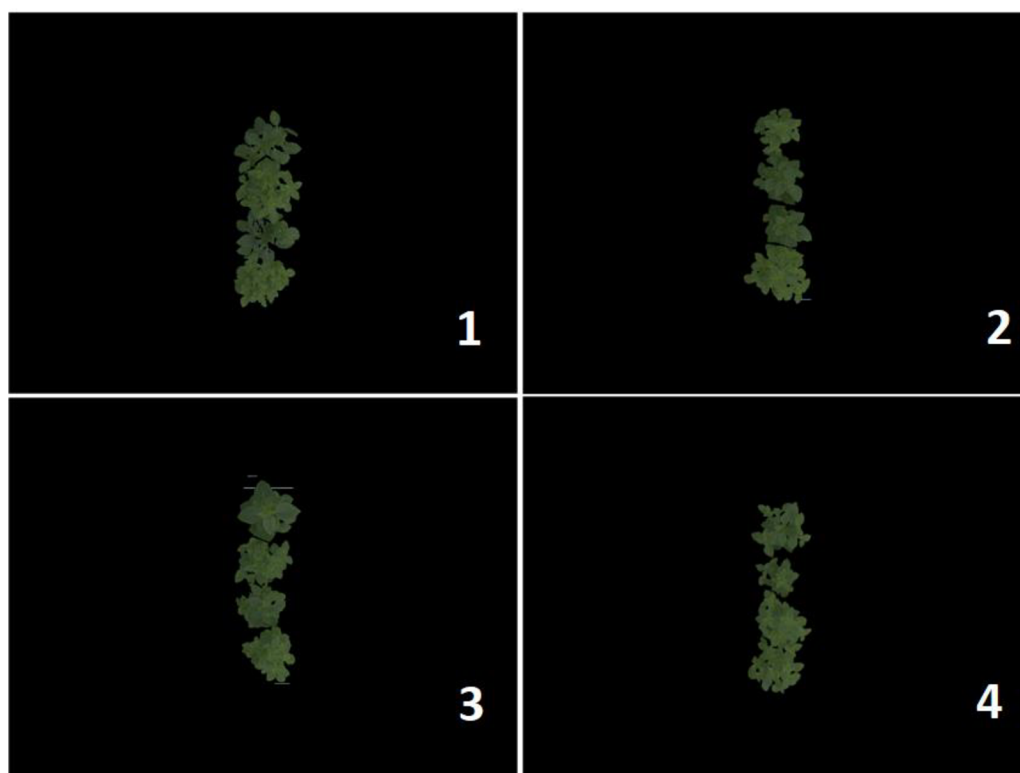


Obr. 5 Vrchní snímky rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných v konveju, 1 – kontrolní skupina, 2 – rostliny se zvýšeným příjmem dusíku, 3 – rostliny se sníženým příjmem dusíku, 4 - rostliny, na které byl aplikován solný stres.





Obr. 6 Postranní snímky rostlin genotypu ‘Chládek červená’ pěstovaných v konveju, 1 – kontrolní skupina, 2 – rostliny se zvýšeným příjmem dusíku, 3 – rostliny se sníženým příjmem dusíku, 4 – rostliny, na které byl aplikován solný stres.



Obr. 7 Vrchní snímky rostlin genotypu ‘Mánes’ pěstovaných v konveju, 1 – kontrolní skupina, 2 – rostliny se zvýšeným příjmem dusíku, 3 – rostliny se sníženým příjmem dusíku, 4 - rostliny, na které byl aplikován solný stres.



Obr. 8 Postranní snímky rostlin genotypu 'Mánes' pěstovaných v konveju, 1 – kontrolní skupina, 2 – rostliny se zvýšeným příjmem dusíku, 3 – rostliny se sníženým příjmem dusíku, 4 - rostliny, na které byl aplikován solný stres.

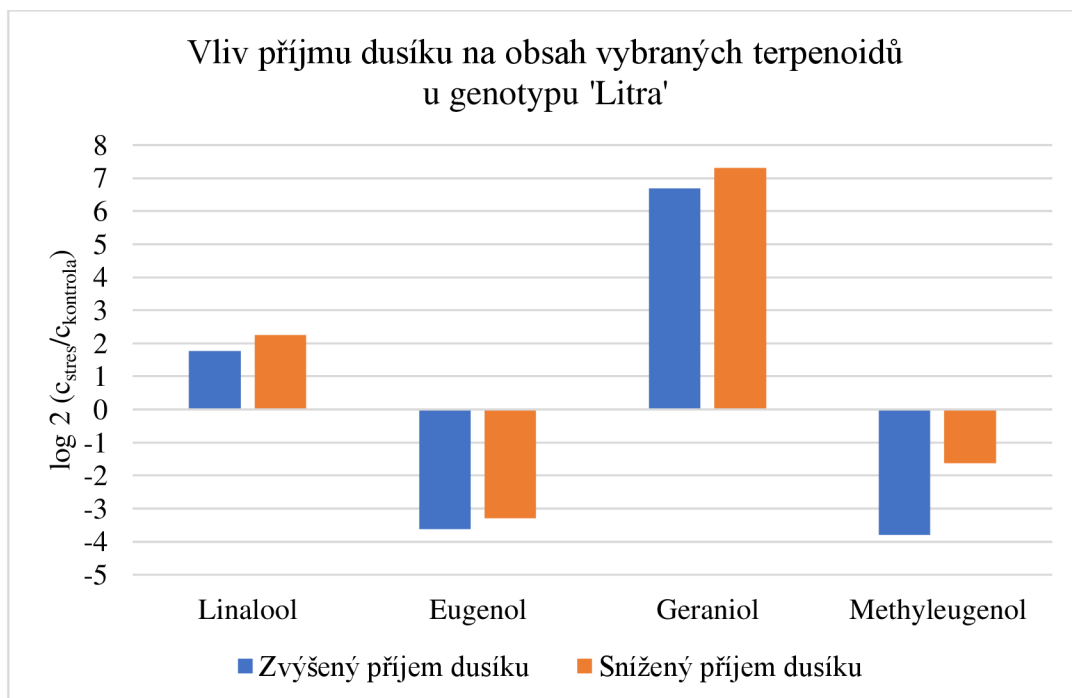
### 4.3 Analýza terpenoidů pomocí GC-MS

Analýza terpenoidů v rostlinách vypěstovaných ve fytotronu a konvejueru byla provedena pomocí GC-MS analýzy. Ke zpracování výsledků byl použit program Massfinder 4.51-11 Computer Software. Byly vizuálně porovnávány chromatogramy jednotlivých analyzovaných látek s využitím počítačové databáze NIST MS SEARCH 2.0.

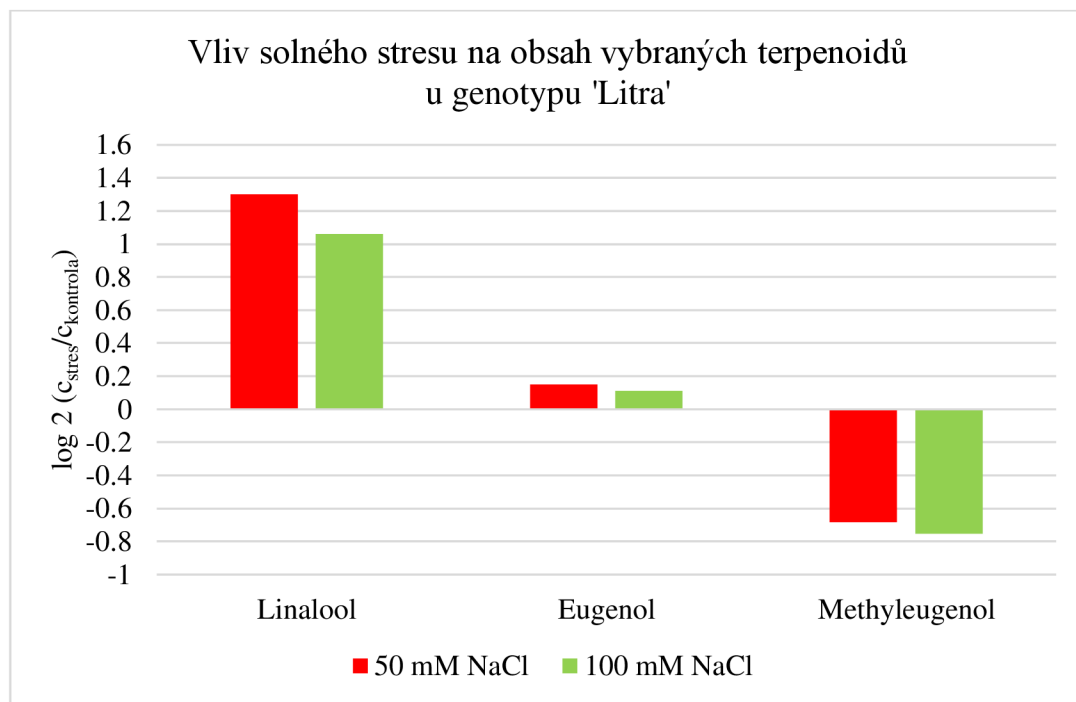
#### 4.3.1 Rostliny bazalky pravé vypěstované za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope

Vzorky rostlin vypěstované ve fytotronu byly porovnávány jednotlivě v závislosti na změně množství obsažených látek oproti kontrolnímu vzorku. Výsledky jsou uvedeny zvlášť pro jednotlivé genotypy a jednotlivé druhy stresu v grafech. Jelikož nebylo dostatek rostlinného materiálu pro všechny týdny sběru rostlin, byl vybrán vždy jeden týden sběru, kdy byl rostlinný materiál pro všechny typy stresu a bylo provedeno porovnání pouze ve vybraném týdnu sběru rostlin.

Pro genotyp 'Litra' byl vybrán rostlinný materiál ze 3. týdne od začátku stresování rostlin. Pouze kontrolní vzorek byl použit ze druhého týdne, jelikož ve třetím týdnu bylo rostlinného materiálu nedostatek.



Obr. 9 Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných ve fytotronu.



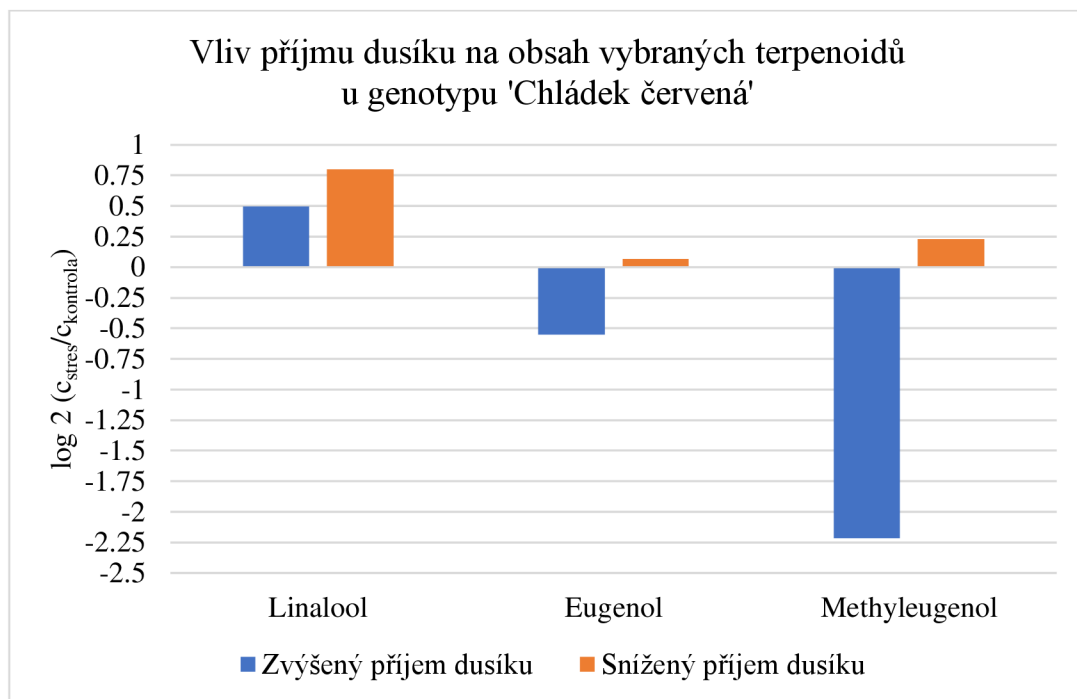
Obr. 10 Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných ve fytotronu.

U genotypu 'Litra' byly vybrány 4 nejvíce zastoupené terpenoidy, a to linalool, eugenol, geraniol a methyleugenol. Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 9). Zvýšený i snížený příjem dusíku se projevil velmi výrazným zvýšením obsahu geraniolu a zvýšením obsahu linaloolu. Naopak obsah eugenolu a methyleugenolu výrazně klesl.

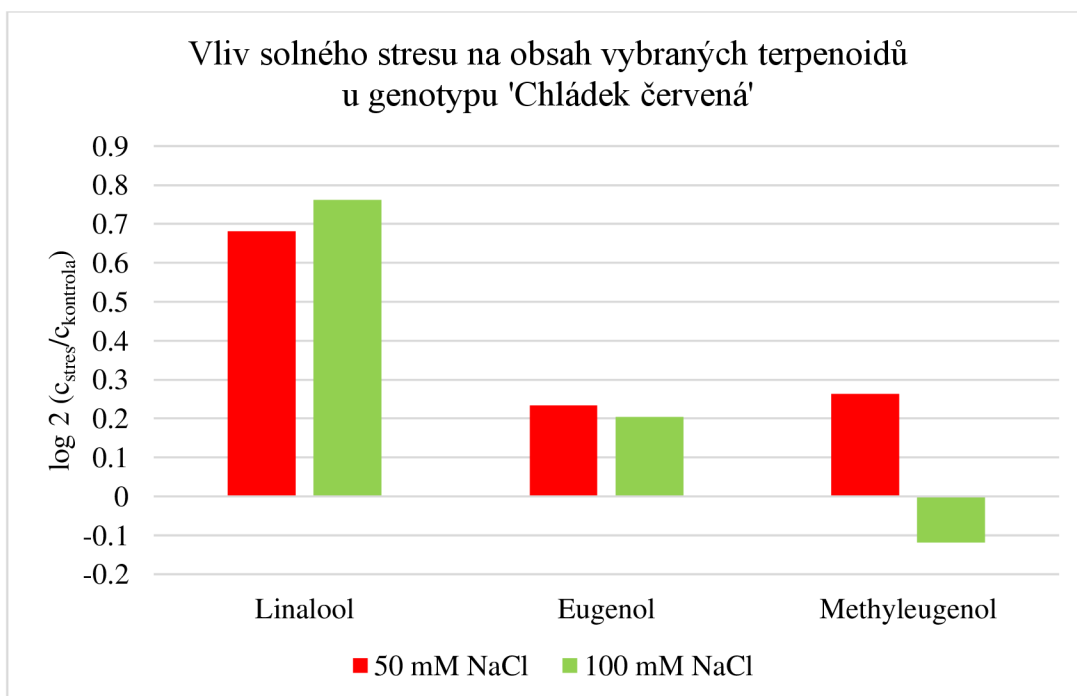
Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 10). Při solném stresu nebyl geraniol detekován vůbec. Při použití 50 mM i 100 mM NaCl došlo ke zvýšení obsahu linaloolu a zároveň ke snížení obsahu methyleugenolu. Obsah eugenolu se signifikantně nezměnil.

U genotypu 'Chládek červená' byl použit rostlinný materiál ze 4. týdne od začátku aplikace stresu. Pouze pro zvýšený příjem dusíku byl použit rostlinný materiál ze 3. týdne, jelikož ze 4. týdne nebylo dostatek rostlinného materiálu. Byly vybrány 3 nejvíce zastoupené terpenoidy, a to linalool, eugenol a methyleugenol.

Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u genotypu 'Chládek červená' je uveden v grafu (Obr. 11). Zvýšený příjem dusíku měl negativní vliv na obsah methyleugenolu a eugenolu. Naopak hladina linaloolu se mírně zvýšila. Při sníženém příjmu dusíku došlo k mírnému nárůstu obsahu eugenolu a methyleugenolu. Byl pozorován signifikantní nárůst obsahu linaloolu.



Obr. 11 Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných ve fytotronu.



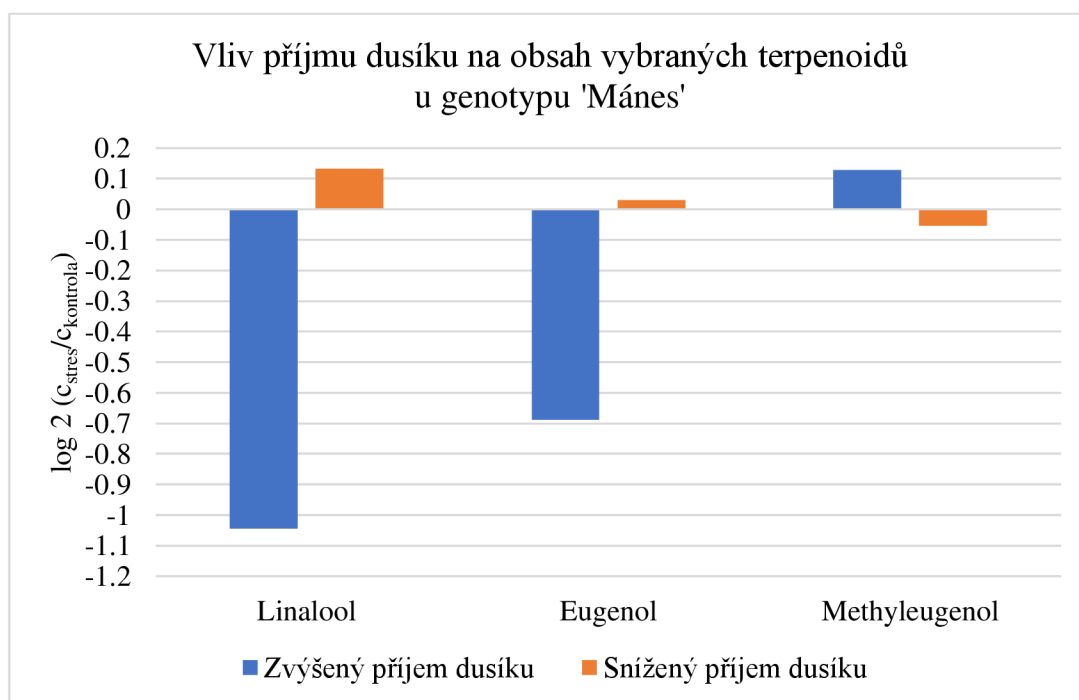
Obr. 12 Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných ve fytotronu.

Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u genotypu ‘Chládek červená‘ je uveden v grafu (Obr. 12). Vliv solného stresu měl u genotypu ‘Chládek červená‘ převážně pozitivní účinek na obsah terpenoidů v rostlinách. Při 50 mM i 100 mM koncentraci NaCl došlo k signifikantnímu nárůstu obsahu linaloolu a k mírnému nárůstu obsahu eugenolu. Při použití 50 mM NaCl došlo k mírnému nárůstu obsahu methyleugenolu, při použití 100 mM NaCl se obsah methyleugenolu mírně snížil.

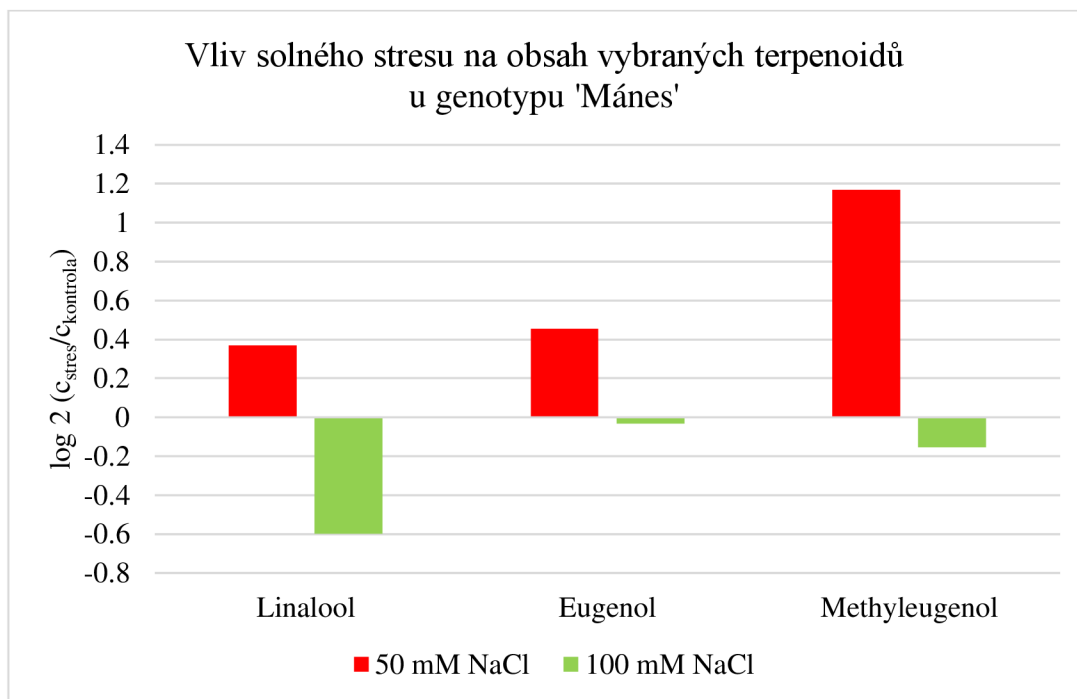
Pro genotyp ‘Mánes‘ byl použit rostlinný materiál ze 3. týdne od začátku aplikace stresu. Vybranými, nejvíce se vyskytujícími terpenoidy u genotypu ‘Mánes‘ byly linalool, eugenol a methyleugenol.

Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u genotypu ‘Mánes‘ je uveden v grafu (Obr. 13). Zvýšený příjem dusíku měl negativní vliv na obsah linaloolu a eugenolu. Obsah methyleugenolu se při zvýšeném příjmu dusíku signifikantně nezměnil. Snížený příjem dusíku na obsah vybraných terpenoidů neměl výrazný vliv.

Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u genotypu ‘Mánes‘ je uveden v grafu (Obr. 14). Při použití 50 mM NaCl došlo k nárůstu obsahu všech vybraných terpenoidů, nejvíce k nárůstu methyleugenolu. Při použití 100 mM NaCl došlo ke snížení obsahu linaloolu, na ostatní terpenoidy solný stres neměl vliv. Použití 50 mM NaCl mělo tedy pozitivní vliv na obsah terpenoidů u genotypu ‘Mánes‘.



Obr. 13 Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu ‘Mánes‘ pěstovaných ve fytotronu.



Obr. 14 Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Mánes' pěstovaných ve fytotronu.

### **4.3.2 Rostliny bazalky pravé vypěstované za kontrolovaných podmínek ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system**

Vzorky rostlin vypěstované v konvejeoru byly porovnávány jednotlivě v závislosti na změně množství obsažených látek oproti kontrolnímu vzorku. Výsledky jsou uvedeny zvlášť pro jednotlivé genotypy a jednotlivé druhy stresu v grafech. U všech tří použitých genotypů byly nejvíce zastoupenými terpenoidy linalool, eugenol, geraniol a methyleugenol.

Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných, nejvíce zastoupených terpenoidů u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 15). Při zvýšeném příjmu dusíku došlo u genotypu 'Litra' ke zvýšení obsahu linaloolu oproti kontrolnímu vzorku. U zbytku vybraných terpenoidů došlo naopak ke snížení. K nejvýraznějšímu snížení došlo u geraniolu. Při sníženém příjmu dusíku došlo taktéž k nárůstu obsahu linaloolu oproti kontrolnímu vzorku, obsah geraniolu také vzrostl. Obsah methyleugenolu se mírně snížil a obsah eugenolu se téměř nezměnil.

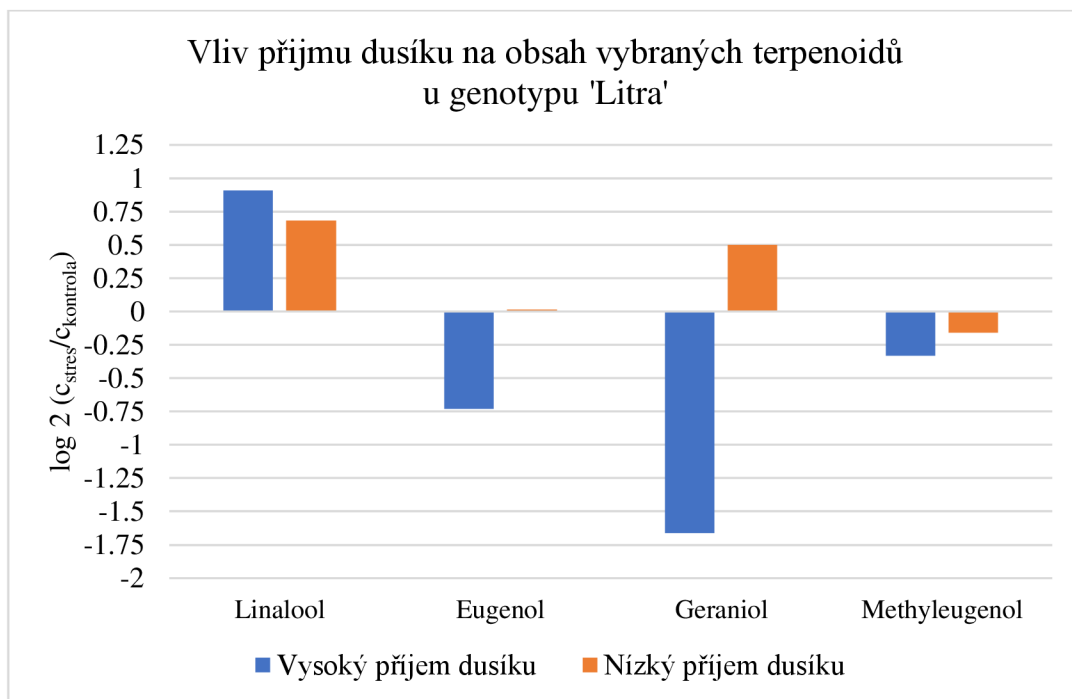
Z analýzy vyplývá, že zvýšený příjem dusíku měl na rostliny genotypu 'Litra' spíše negativní vliv, snížený příjem dusíku měl mírně pozitivní vliv především na obsah linaloolu a geraniolu.

Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 16). Při solném stresu došlo k nárůstu obsahu linaloolu a geraniolu, naopak obsah methyleugenolu se oproti kontrolnímu vzorku výrazně snížil. Z grafu vyplývá, že solný stres měl pozitivní vliv na obsah některých terpenoidů v rostlinách.

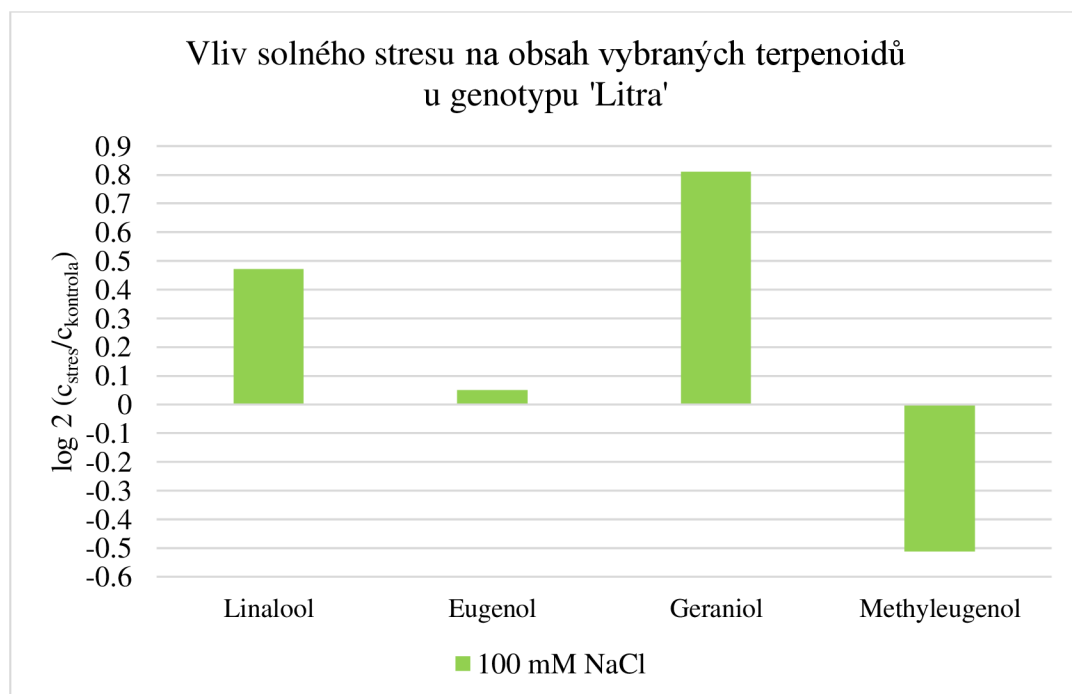
U genotypu 'Chládek červená' došlo při zvýšeném příjmu dusíku k mírnému nárůstu obsahu methyleugenolu a eugenolu. Obsah linaloolu a geraniolu je mírně snížil. Při sníženém příjmu dusíku došlo taktéž k nárůstu obsahu methyleugenolu a eugenolu, na obsah geraniolu a linaloolu měl snížený příjem dusíku negativní vliv, kdy došlo především k výraznému snížení obsahu geraniolu. Zvýšený příjem dusíku neměl na obsah terpenoidů u genotypu 'Chládek červená' výrazný vliv. Snížený příjem dusíku měl vliv negativní, a to především na obsah geraniolu. Vliv příjmu dusíku na všechny vybrané terpenoidy u genotypu 'Chládek červená' je uveden v grafu (Obr. 17).

Vliv solného stresu na obsah terpenoidů u genotypu 'Chládek červená' je uveden v grafu (Obr. 18). Z grafu vyplývá, že solný stres měl pozitivní vliv na obsah linaloolu a methyleugenolu. Obsah eugenolu a geraniolu se nijak výrazně nezměnil.

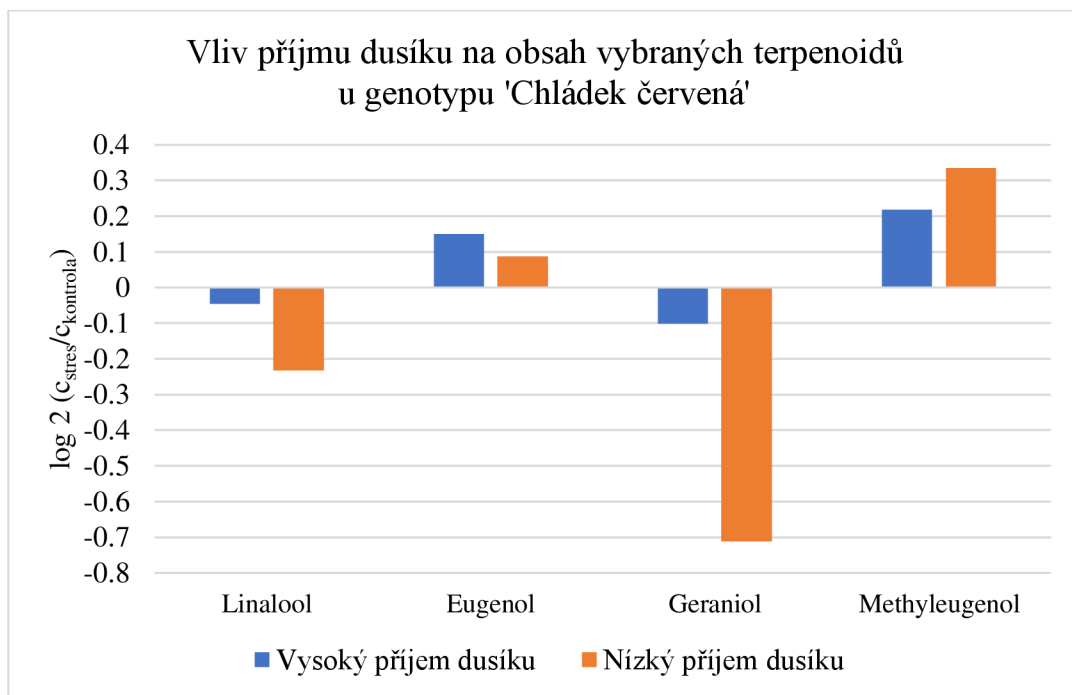




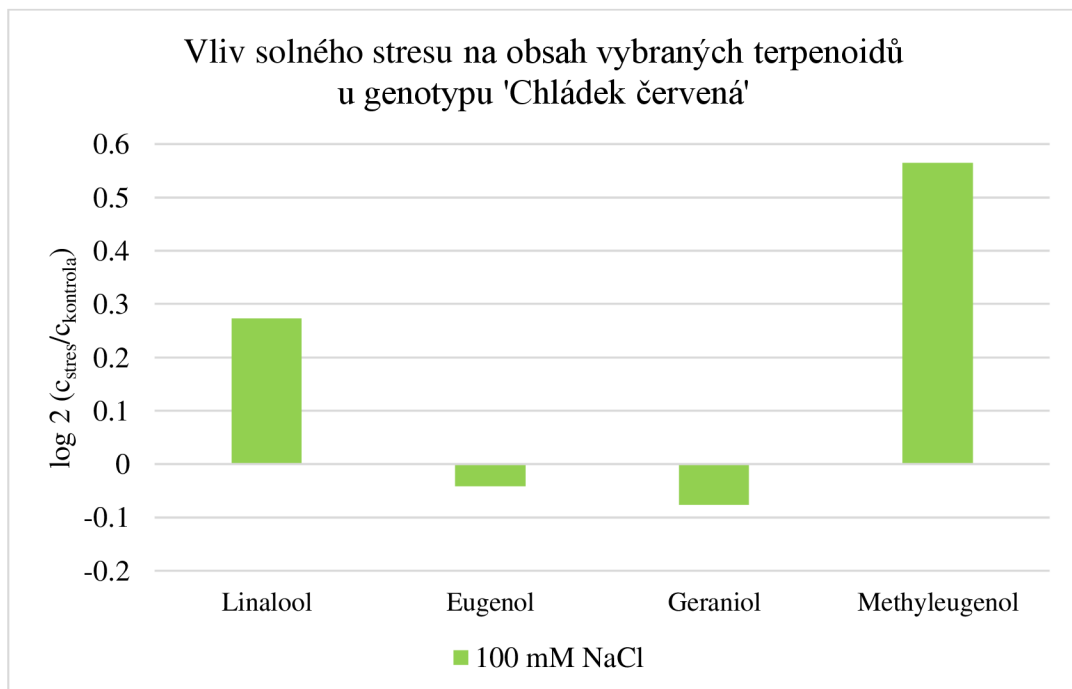
Obr. 15 Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných v konveju.



Obr. 16 Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných v konveju.



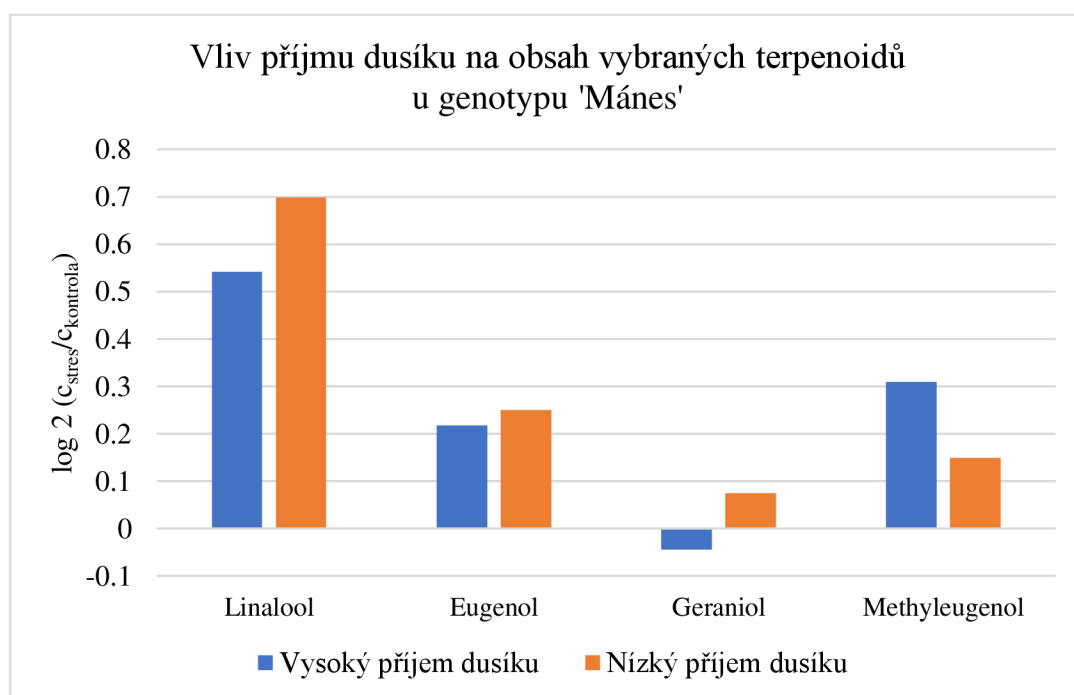
Obr. 17 Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných v konveju.



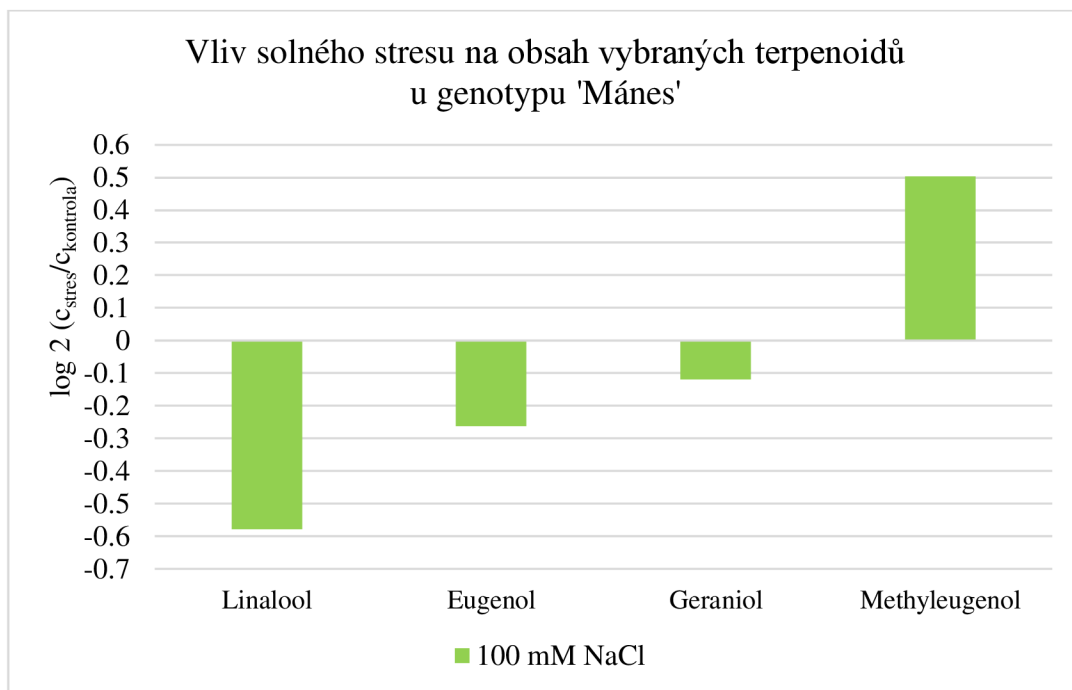
Obr. 18 Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných v konveju.

Vliv příjmu dusíku na vybrané terpenoidy u genotypu 'Mánes' je uveden v grafu (Obr. 19). Zvýšený příjem dusíku měl pozitivní vliv na obsah terpenoidů, zejména na obsah linaloolu, methyleugenolu a eugenolu. V případě geraniolu došlo pouze k nepatrnému snížení obsahu oproti kontrolnímu vzorku. Snížený příjem dusíku měl pozitivní vliv na obsah všech vybraných terpenoidů, nejvíce na obsah linaloolu.

Vliv solného stresu na obsah terpenoidů u genotypu 'Mánes' je uveden v grafu (Obr. 20). Při aplikaci solného stresu došlo ke snížení obsahu většiny vybraných terpenoidů, a to linaloolu, eugenolu a geraniolu. Obsah methyleugenolu se naopak zvýšil oproti kontrole. Z analýzy vyplývá, že solný stres má na obsah terpenoidů u genotypu 'Mánes' negativní účinky.



Obr. 19 Vliv příjmu dusíku na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Mánes' pěstovaných v konveju.



Obr. 20 Vliv solného stresu na obsah vybraných terpenoidů u rostlin genotypu 'Mánes' pěstovaných v konveju.

#### 4.4 Analýza dusíkatých sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS

Byla provedena analýza aminokyselin a polyaminů obsažených v rostlinách bazalky právě pěstovaných v konvejeoru pomocí UHPLC-MS/MS analýzy. Získaná data byla vyhodnocena v programu ChemStation E 02.02.1431. Vliv podmínek pěstování rostlin byl posuzován dohromady pro aminokyseliny i polyaminy.

Vliv příjmu dusíku na obsah polyaminů a aminokyselin u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 21).

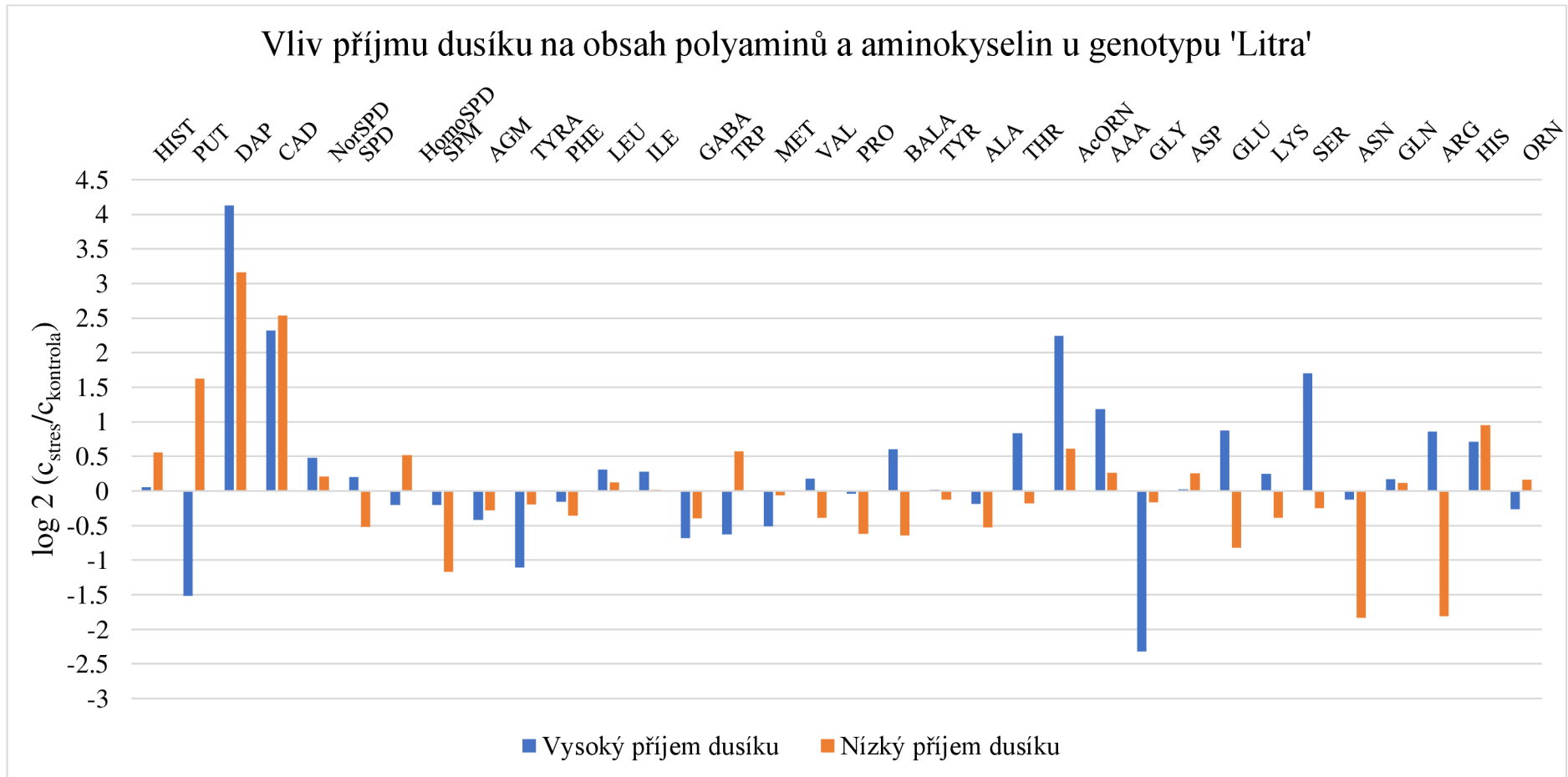
Zvýšený i snížený příjem dusíku měl na obsah polyaminů převážně pozitivní vliv. Při zvýšeném příjmu dusíku došlo k signifikantnímu snížení obsahu pouze u putrescinu, agmatinu a tyraminu. Při sníženém příjmu dusíku došlo k výraznému snížení obsahu pouze u spermidinu, sperminu a taktéž agmatinu.

Zvýšený příjem dusíku způsobil nárůst obsahu mnoha aminokyselin, nejvíce se zvýšil obsah  $\beta$ -alaninu, threoninu, N-acetylornitinu, kyseliny 2-aminoadipové, kyseliny glutamové, serinu, argininu a histidinu. Při zvýšeném příjmu dusíku došlo k poklesu obsahu kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné, tryptofanu, methioninu, ornitinu a největší snížení bylo pozorováno u glycinu. I přes snížení obsahu glycinu a několika aminokyselin se zdá být vliv zvýšení příjmu dusíku u genotypu 'Litra' pozitivní.

Vliv solného stresu na obsah jednotlivých polyaminů a aminokyselin u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 22). Solný stres způsobil u genotypu 'Litra' zvýšení některých polyaminů, nejvíce histaminu, 1,3-diaminopropanu a kadaverinu. Zároveň došlo ke snížení obsahu putrescinu a agmatinu. Přestože došlo ke snížení obsahu některých polyaminů, měl solný stres pozitivní vliv na jejich celkový obsah.

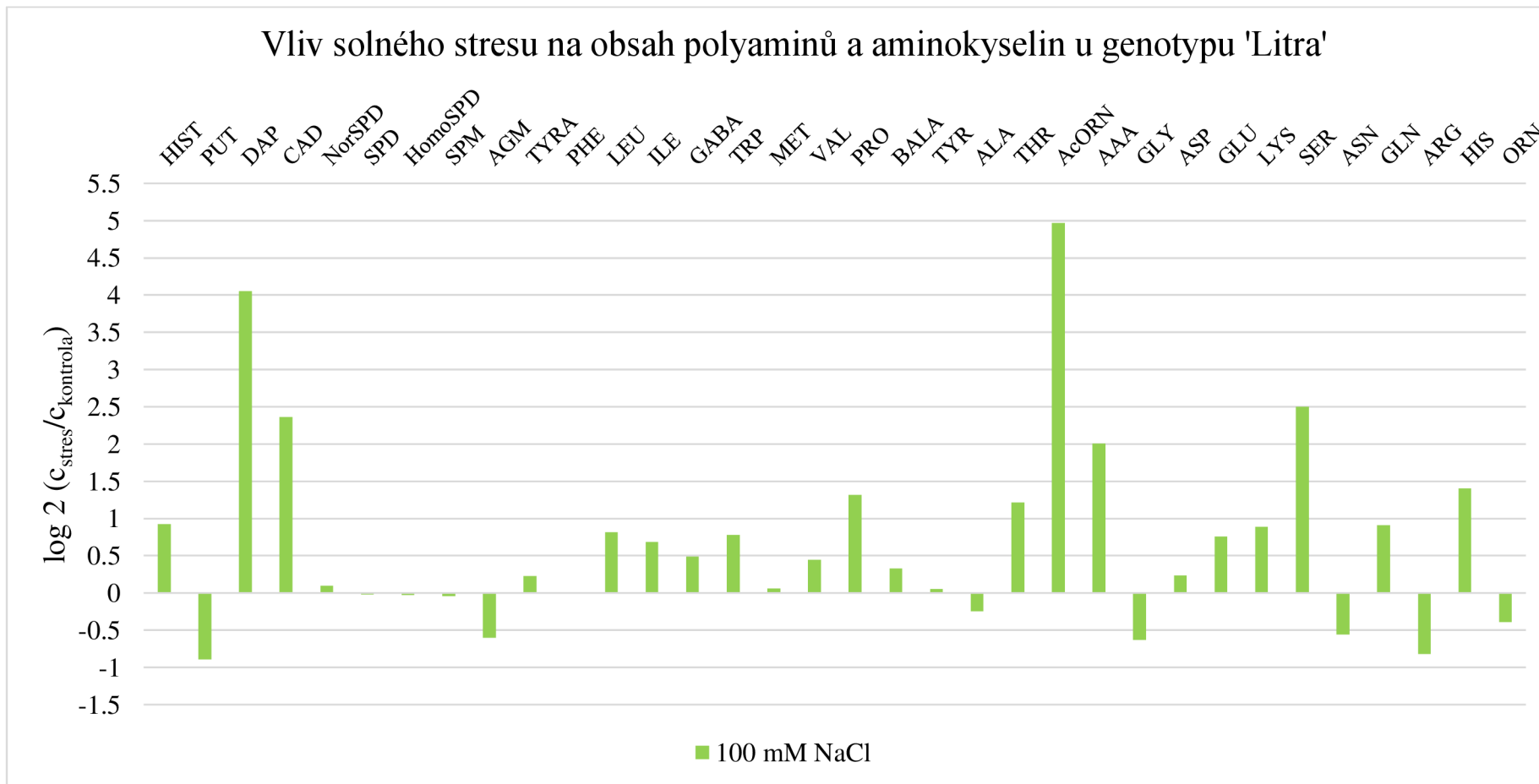
Obsah většiny aminokyselin se při aplikaci solného stresu u genotypu 'Litra' zvýšil, nejvíce obsah N-acetylornitinu. Mírně se snížilo obsažené množství alaninu, glycinu, asparaginu, argininu a ornitinu. Celkově měl solný stres u genotypu 'Litra' velmi pozitivní vliv na obsah aminokyselin.

Vliv příjmu dusíku na obsah polyaminů a aminokyselin u genotypu 'Chládek červená' je uveden v grafu (Obr. 23). Vysoký příjem dusíku měl na rostliny genotypu 'Chládek červená' negativní vliv, jelikož došlo ke snížení obsahu téměř všech polyaminů a téměř všech aminokyselin. U polyaminů se nejvíce snížil obsah kadaverinu a tyraminu. K mírnému zvýšení obsahu došlo pouze u putrescinu a nor-spermidinu.



Obr. 21 Vliv příjmu dusíku na obsah aminokyselin a polyaminů u rostlin genotypu 'Litra'.

### Vliv solného stresu na obsah polyaminů a aminokyselin u genotypu 'Litra'



Obr. 22 Vliv solného stresu na obsah aminokyselin a polyaminů u rostlin genotypu 'Litra'.

U aminokyselin se nejvíce snížil obsah fenylalaninu, leucinu, isoleucinu, methioninu, valinu, glycinu, asparaginu, glutaminu a argininu. Ke zvýšení obsahu došlo pouze u tryptofanu, kyseliny 2-aminoadipové a kyseliny asparagové.

Při sníženém příjmu dusíku došlo ke zvýšení obsahu putrescinu, homospermidinu a tyraminu. Na ostatní polyaminy mělo snížení příjmu dusíku efekt negativní, nejvíce se snížil obsah histaminu, 1,3-diaminopropanu, kadaverinu a sperminu.

Při sníženém příjmu dusíku došlo k nárůstu obsahu některých aminokyselin, nejvíce tryptofanu, lysinu, asparaginu a glutaminu. Snížený obsah byl nejvíce pozorován u kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné a argininu.

Vliv solného stresu na jednotlivé analyzované polyaminy a aminokyseliny je uveden v grafu (Obr. 24). Solný stres měl negativní vliv na všechny analyzované polyaminy. K největšímu snížení obsahu došlo u histaminu, putrescinu, kadaverinu a spermidinu. Na většinu aminokyselin měl solný stres pozitivní vliv, kdy k největšímu nárůstu obsahu došlo u N-acetylnitinu a serinu. U některých aminokyselin došlo ke snížení obsahu, nejvíce u glycinu a argininu.

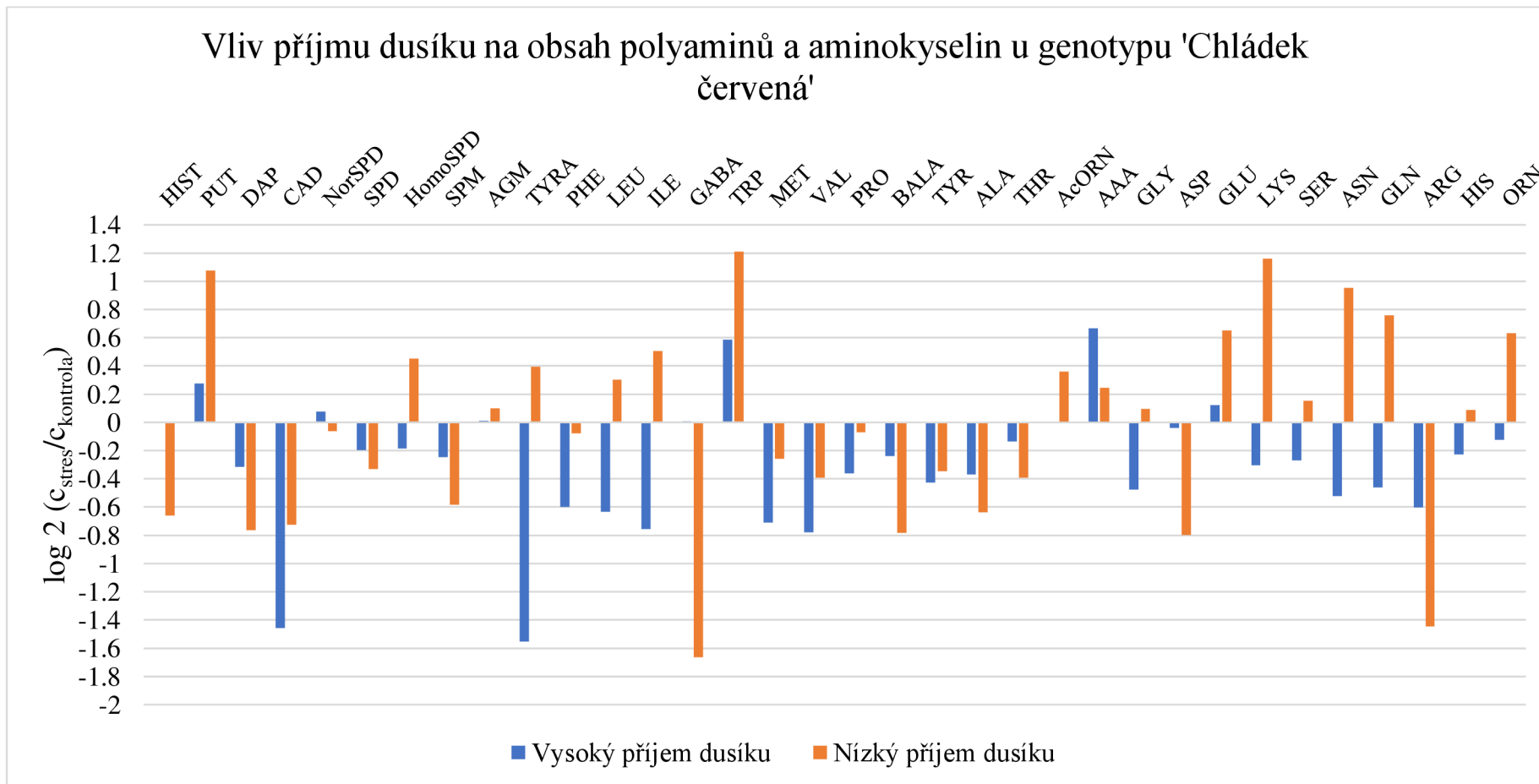
Vliv příjmu dusíku na obsah jednotlivých aminokyselin a polyaminů u genotypu 'Mánes' je uveden v grafu (Obr. 25). Zvýšený příjem dusíku měl na obsah polyaminů negativní vliv, kdy se snížil obsah všech polyaminů kromě 1,3-diamopropanu a tyraminu. Nejvíce se snížil obsah histaminu, putrescinu, kadaverinu, spermidinu a homospermidinu. Při sníženém příjmu dusíku došlo k mírnému zvýšení obsahu putrescinu, 1,3-diaminopropanu a tyraminu. Snížil se obsah histaminu a kadaverinu. Obsah ostatních polyaminů se při sníženém příjmu dusíku u genotypu 'Mánes' významně nezměnil.

Zvýšený příjem dusíku měl u genotypu 'Mánes' pozitivní vliv na obsah aminokyselin, kdy se nejvíce zvýšil obsah tryptofanu, kyseliny 2-aminoadipové, glycinu, glutaminu, serinu, asparaginu, argininu, histidinu a ornitinu. Došlo ke snížení obsahu leucinu a isoleucinu. U ostatních analyzovaných aminokyselin nebyly změny v obsahu oproti kontrolnímu vzorku významné.

Snížený příjem dusíku měl negativní vliv na obsah aminokyselin u genotypu 'Mánes'. Došlo ke snížení obsahu většiny aminokyselin, nejvíce se snížil obsah kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné, N-acetylnitinu a lysinu. Obsah některých aminokyselin se zvýšil, a to obsah tryptofanu, histidinu a ornitinu.

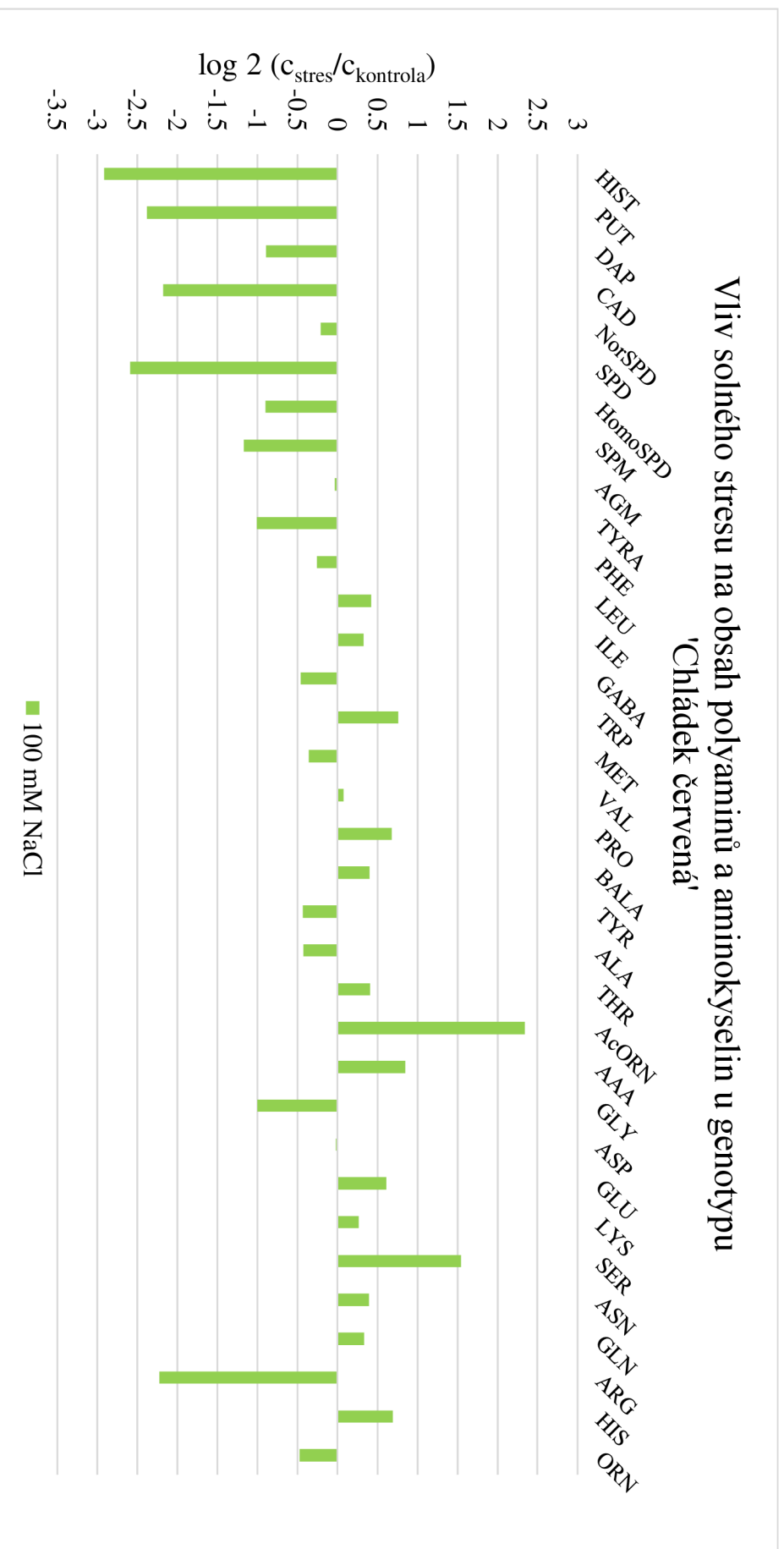


### Vliv příjmu dusíku na obsah polyaminů a aminokyselin u genotypu 'Chládek červená'

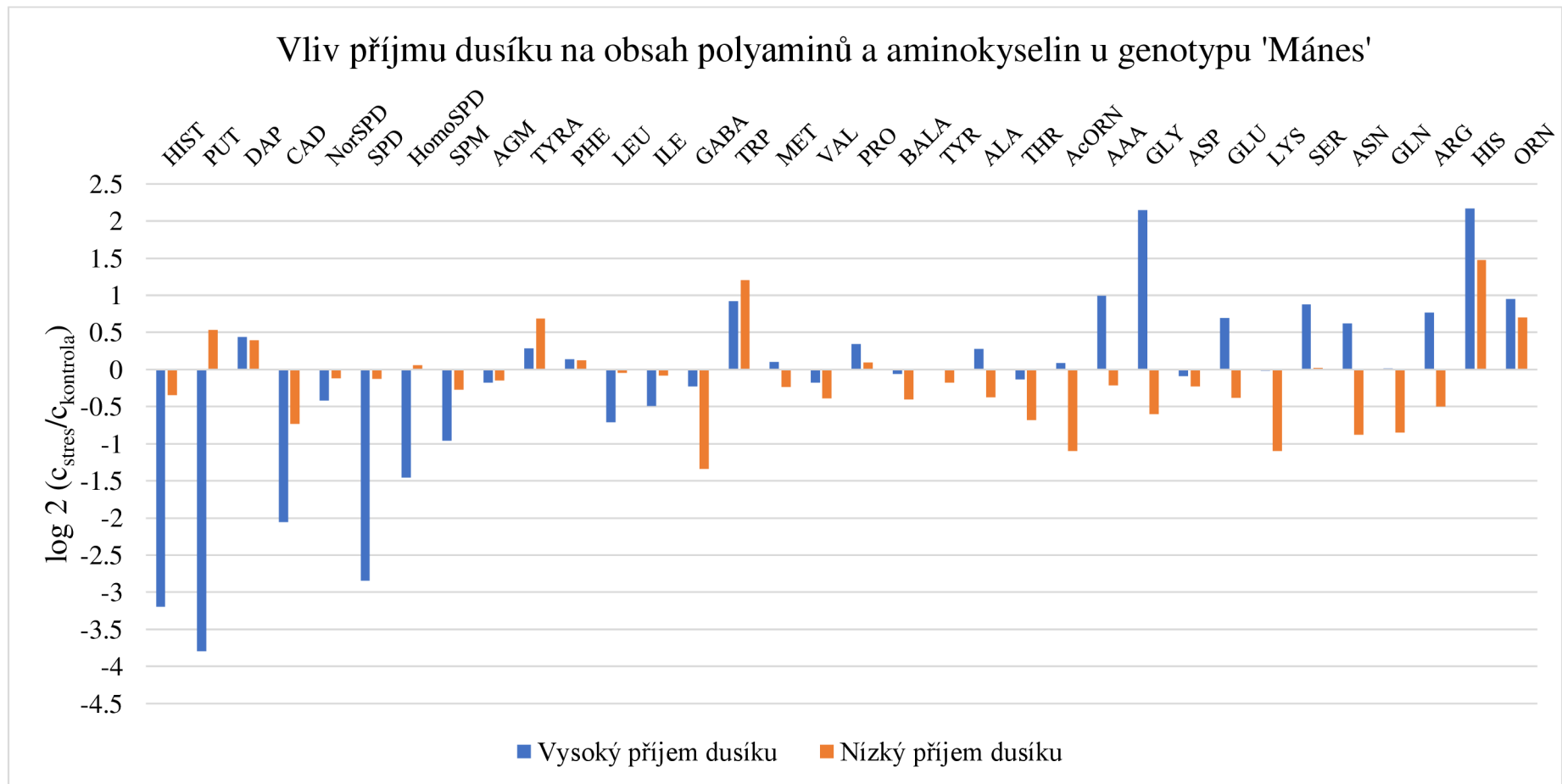


Obr. 23 Vliv příjmu dusíku na obsah aminokyselin a polyaminů u rostlin genotypu 'Chládek červená'.

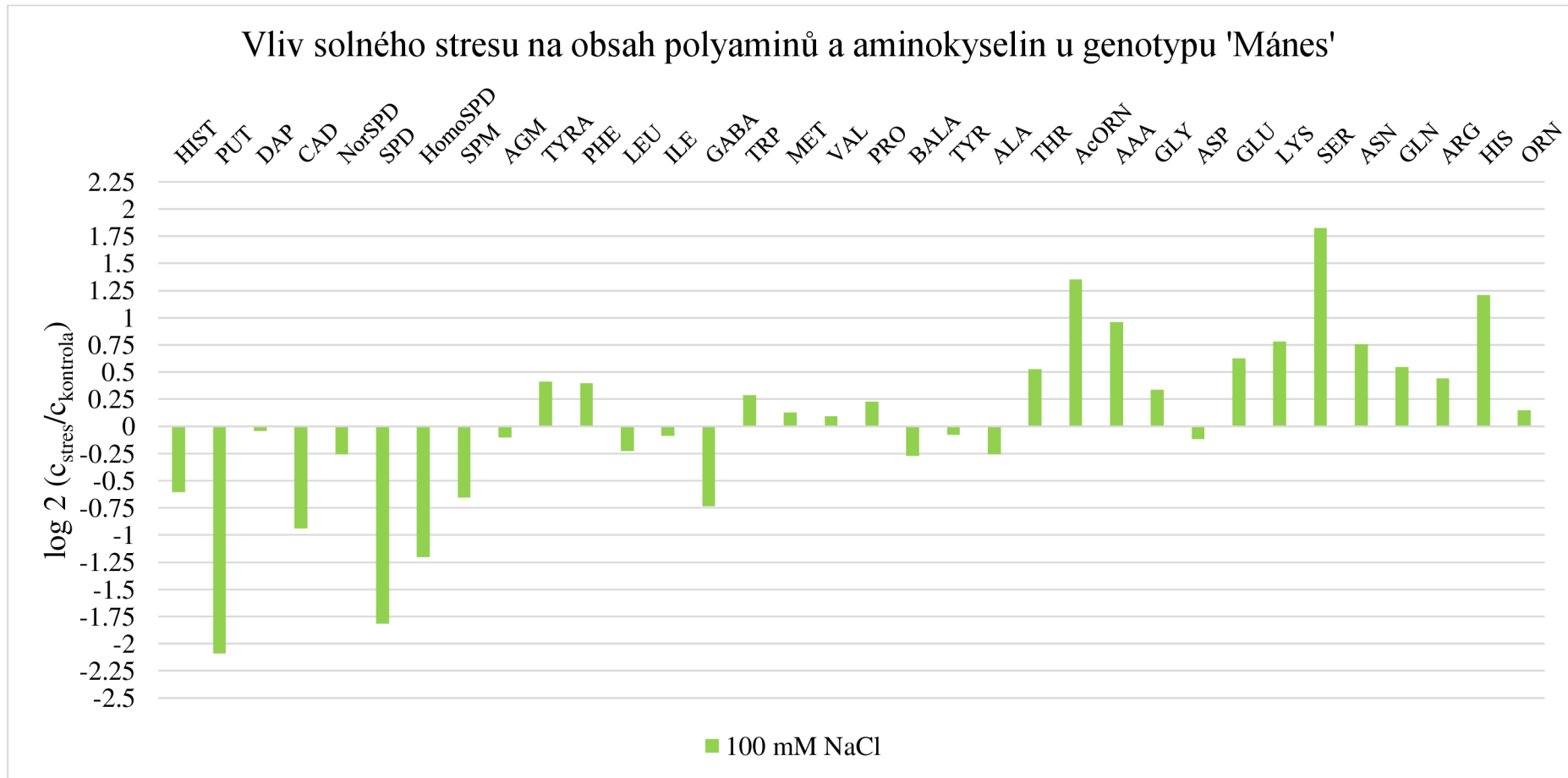
## Vliv solného stresu na obsah polyaminů a aminokyselin u genotypu 'Chládek červená'



Obr. 24 Vliv solného stresu na obsah aminokyselin a polyaminů u rostlin genotypu 'Chládek červená'.



Obr. 25 Vliv příjmu dusíku na obsah aminokyselin a polyaminů u rostlin genotypu 'Mánes'.



Obr. 26 Vliv solného stresu na obsah aminokyselin a polyaminů u rostlin genotypu 'Mánes'.

Vliv solného stresu na obsah jednotlivých polyaminů a aminokyselin je uveden v grafu (Obr. 26). Solný stres měl negativní vliv na obsah všech polyaminů kromě tyraminu, u kterého se obsah mírně zvýšil. K největšímu snížení došlo u putrescinu a spermidinu. Vliv solného stresu na obsah většiny aminokyselin byl pozitivní. Největší nárůst byl pozorován u N-acetylnitinu, serinu a histidinu. Ke největšímu snížení obsahu u kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné.

## 4.5 Analýza fenolických sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS

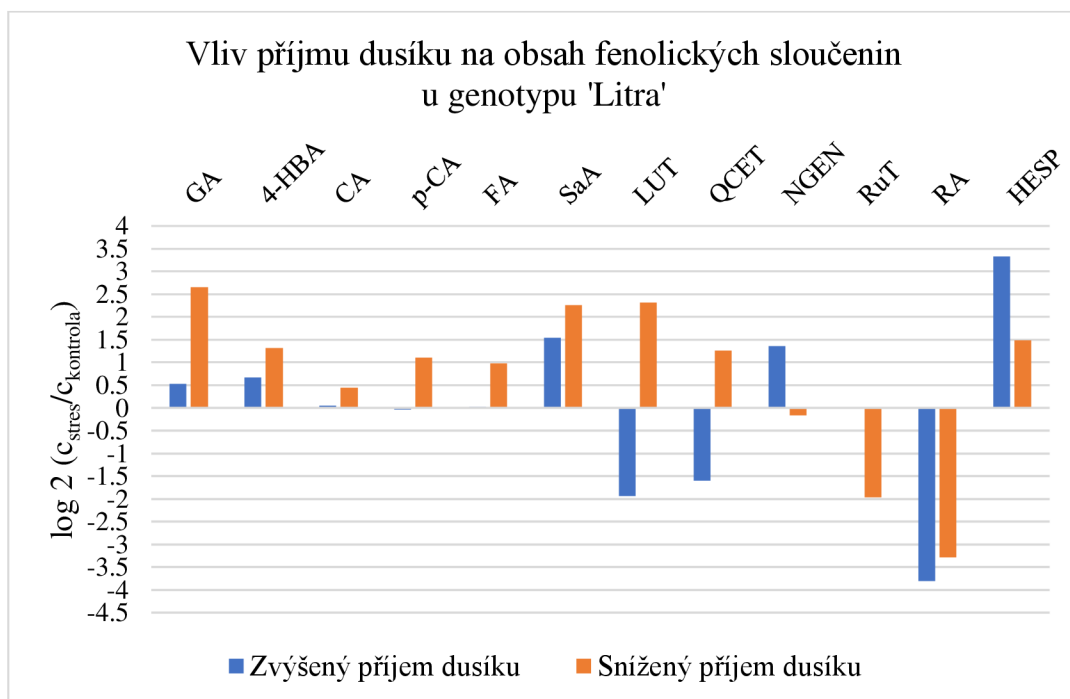
Analýzy fenolických sloučenin byla provedena pomocí UHPLC-MS/MS a získaná data byla vyhodnocena v programu ChemStation E 02.02.1431. Analýza fenolických sloučenin byla provedena pro rostlinný materiál získaný během pěstování ve fytotronu i v konveju.

Obsah fenolických sloučenin v jednotlivých genotypích byl porovnáván v závislosti na změně množství obsažených fenolických látek oproti kontrolnímu vzorku. Výsledky byly porovnávány zvlášť pro jednotlivé genotypy a jednotlivé druhy stresu.

### 4.5.1 Analýza fenolických sloučenin u rostlin bazalky právě vypěstovaných za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope

Pro všechny tři genotypy byl vybrán rostlinný materiál sklizený druhý týden od začátku aplikace stresu. Pouze u genotypu 'Chládek červená' byl pro vzorek při sníženém příjmu dusíku použit vzorek ze třetího týdne od aplikace stresu, jelikož rostlinného materiálu z druhého týdne bylo nedostatek.

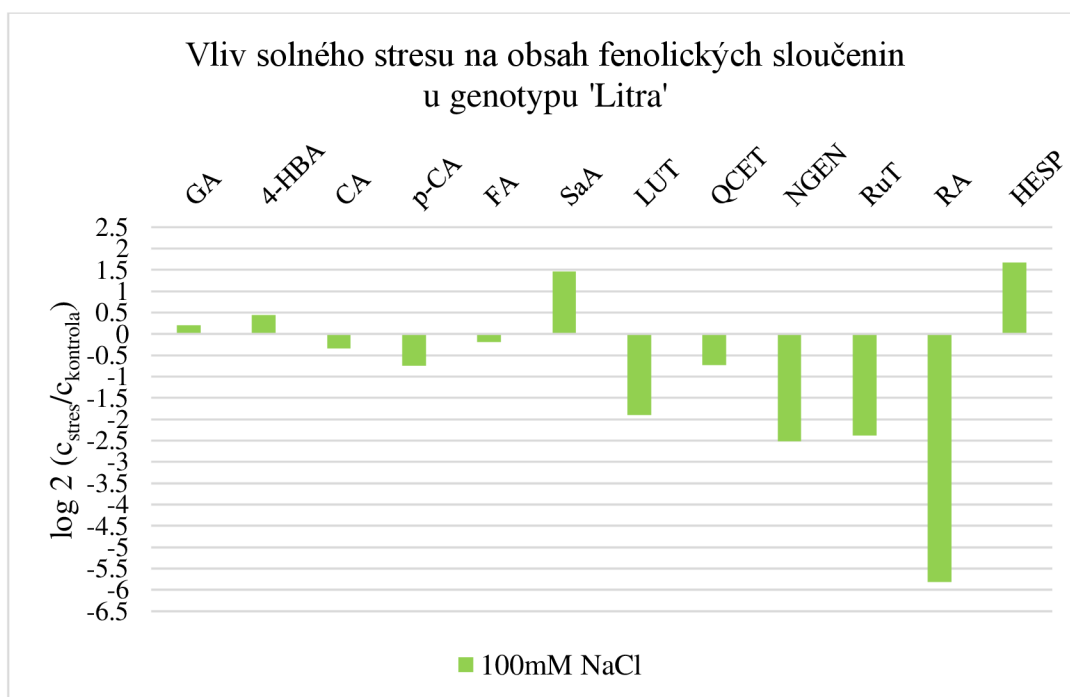
Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 27).



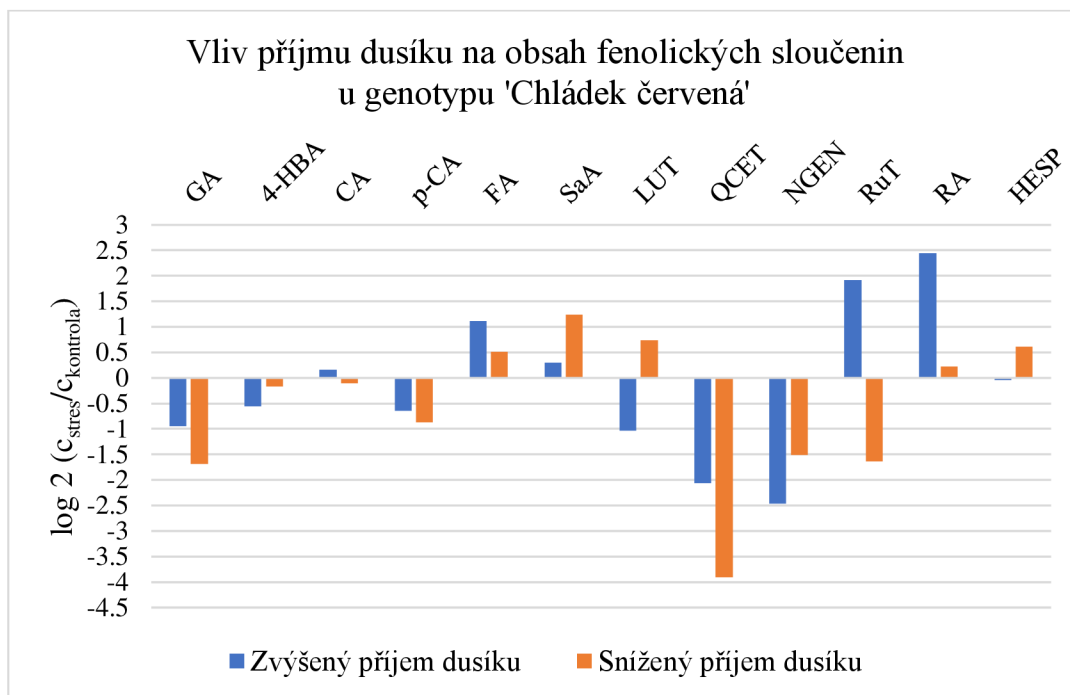
Obr. 27 Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných ve fytotronu.

Při zvýšeném příjmu dusíku došlo k výraznému nárůstu obsahu kyseliny gallové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny salicylové, naringeninů a hesperedinů. Naopak došlo k poklesu obsahu luteoninu, kvercetinů a kyseliny rozmarýnové. Na obsah ostatních analyzovaných fenolických sloučenin neměl zvýšený příjem dusíku významný vliv. Snížení příjmu dusíku vedlo ke zvýšení obsahu kyseliny gallové, 4-hydroxybenzoové kyseliny, luteoninu, kyseliny salicylové, kyseliny kávové, kyseliny *para*-kumarové, kvercetinů a hesperedinů. Ke snížení obsahu došlo u rutinů a kyseliny rozmarýnové. Snížení příjmu dusíku mělo tedy na obsah většiny fenolických sloučenin pozitivní vliv.

Vliv solného stresu u genotypu 'Litra' byl zpracován pouze pro rostlinný materiál získaný pěstováním za aplikace 100 mM NaCl, jelikož pro 50 mM bylo rostlinného materiálu nedostatek. Vliv solného stresu je uveden v grafu (Obr. 28). Při aplikaci 100 mM NaCl došlo ke zvýšení obsahu kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny salicylové a hesperedinů. Ke snížení došlo u kyseliny *para*-kumarové, luteoninu, kvercetinů, naringeninů, rutinů a nejvíce u kyseliny rozmarýnové. Solný stres měl celkově negativní vliv na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Litra'.



Obr. 28 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných ve fytotronu.

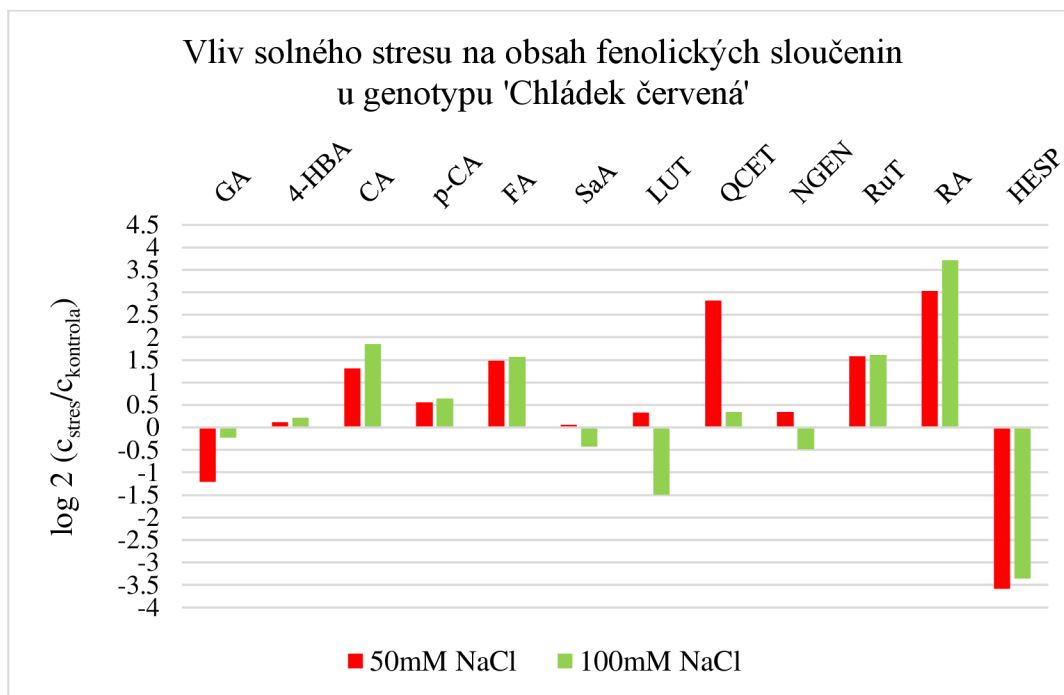


Obr. 29 Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných ve fytotronu.

Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Chládek červená' je uveden v grafu (Obr. 29). U genotypu 'Chládek červená' došlo při zvýšeném příjmu dusíku ke zvýšení obsahu kyseliny ferulové, kyseliny salicylové a nejvíce rutinu a kyseliny rozmarýnové. Ke snížení obsahu došlo u kyseliny gallové, 4-hydroxybenzoové, *para*-kumarové, kvercetinu a naringenin. Při sníženém příjmu dusíku došlo ke zvýšení obsahu ferulové kyseliny, salicylové kyseliny, luteoninu a hesperedinu. Snížil se obsah kyseliny gallové, *para*-kumarové, naringenin, rutinu a rapidně se snížil obsah kvercetinu. Zvýšení i snížení příjmu dusíku mělo na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Chládek červená' převážně negativní vliv.

Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Chládek červená' je uveden v grafu (Obr. 30). Při aplikaci 50 mM NaCl došlo u genotypu 'Chládek červená' ke zvýšení obsahu kyseliny kávové, kyseliny *para*-kumarové, kyseliny ferulové, kvercetinu, rutinu a kyseliny rozmarýnové. Zároveň se snížil obsah kyseliny gallové a hesperedinu. Při použití 100 mM NaCl došlo ke zvýšení obsahu kyseliny kávové, kyseliny *para*-kumarové, kyseliny ferulové, rutinu a kyseliny rozmarýnové. Ke snížení obsahu došlo u luteoninu a hesperedinu. Aplikace solného stresu u genotypu 'Chládek červená' měla pozitivní vliv na obsah většiny fenolických sloučenin s výjimkou hesperedinu.

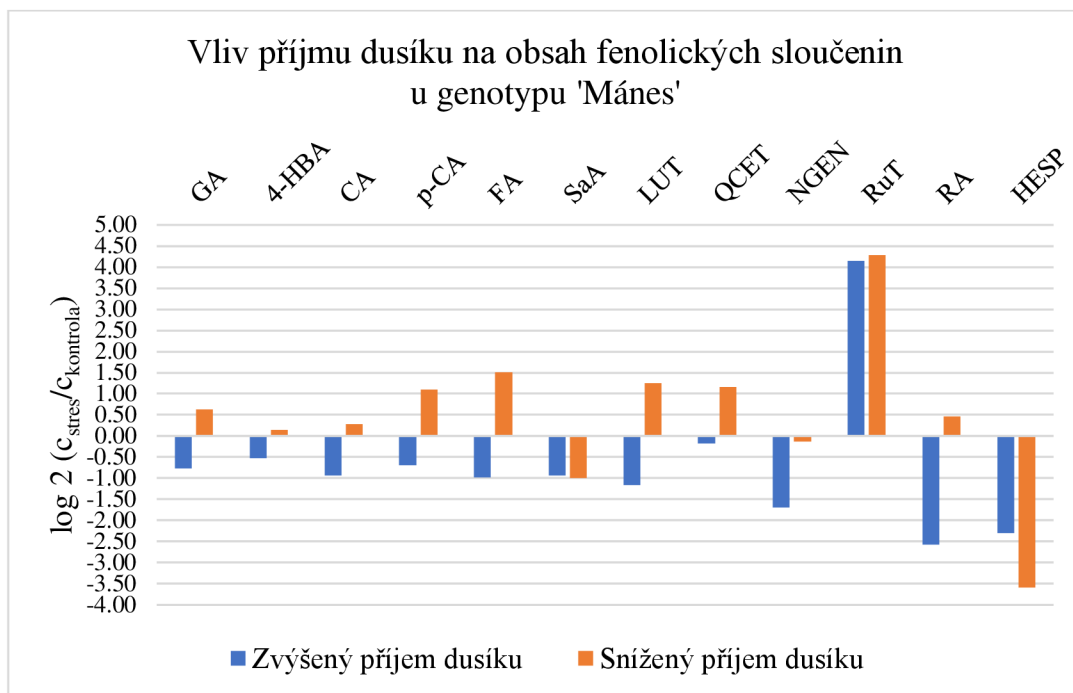




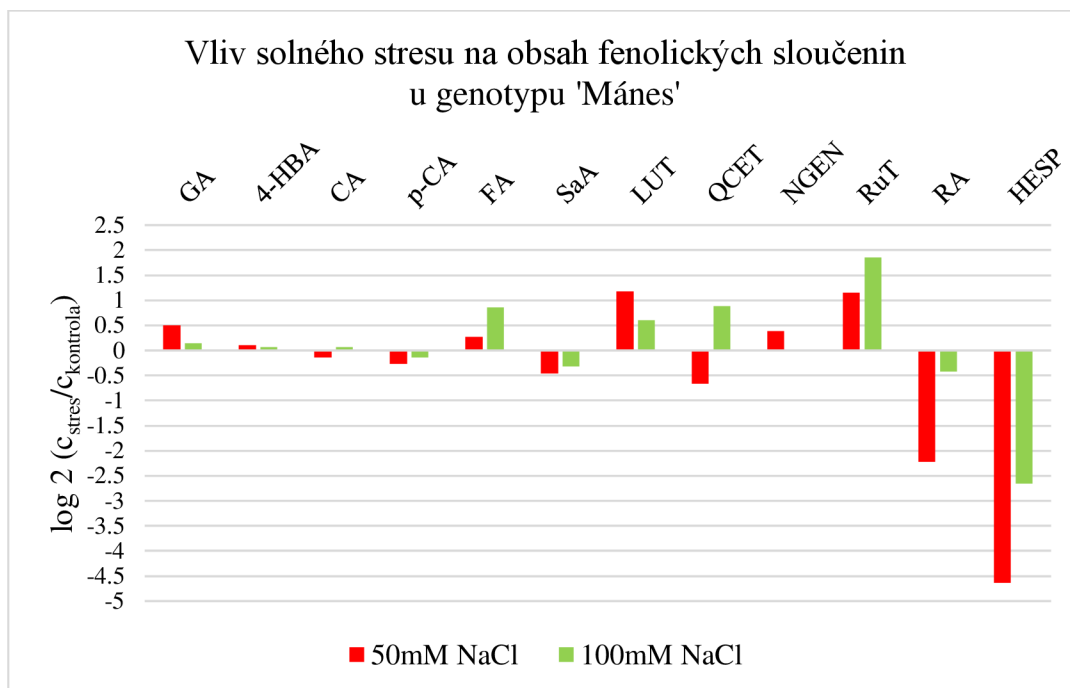
Obr. 30 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných ve fytotronu.

Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Mánes' je uveden v grafu (Obr. 31). Zvýšený příjem dusíku měl negativní vliv na obsah téměř všech nalezených fenolických sloučenin, nejvíce se snížil obsah naringeninů, kyseliny rozmarýnové a hesperedinu. Jedině obsah rutinu se výrazně zvýšil. Snížený příjem dusíku způsobil zvýšení obsahu kyseliny gallové, kyseliny *para*-kumarové, luteoninu, kvercetinů a nejvíce rutinu. K významnému snížení obsahu došlo u kyseliny salicylové a hesperedinu. Snížený příjem dusíku měl na rostliny genotypu 'Mánes' většinou pozitivní vliv.

Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Mánes' je uveden v grafu (Obr. 32). Při použití 50 mM NaCl došlo ke zvýšení obsahu kyseliny gallové, luteoninu, naringeninů a rutinu. Naopak došlo k poklesu obsahu kyseliny salicylové, kvercetinů a k velmi velkému snížení obsahu kyseliny rozmarýnové a hesperedinu. Použití 100 mM NaCl mělo za důsledek zvýšení obsahu kyseliny ferulové, luteoninu, kvercetinů a rutinu. Došlo k významnému snížení obsahu hesperedinu.



Obr. 31 Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Mánes' pěstovaných ve fytotronu.



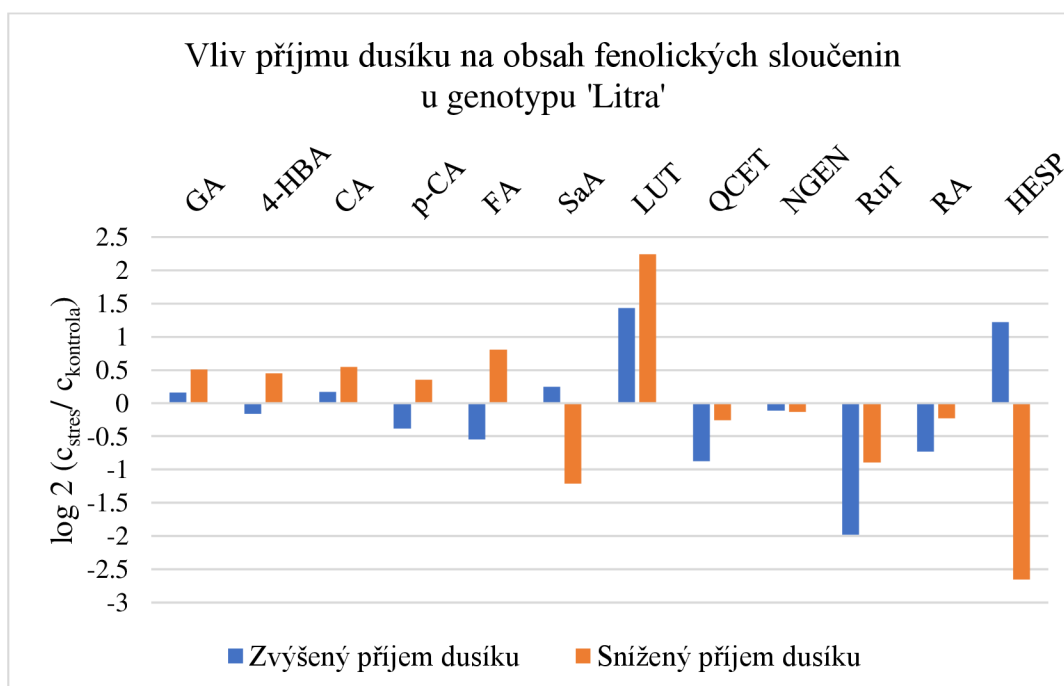
Obr. 32 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Mánes' pěstovaných ve fytotronu.

#### 4.5.2 Analýza fenolických sloučenin u rostlin bazalky pravé vypěstovaných za kontrolovaných podmínek ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system

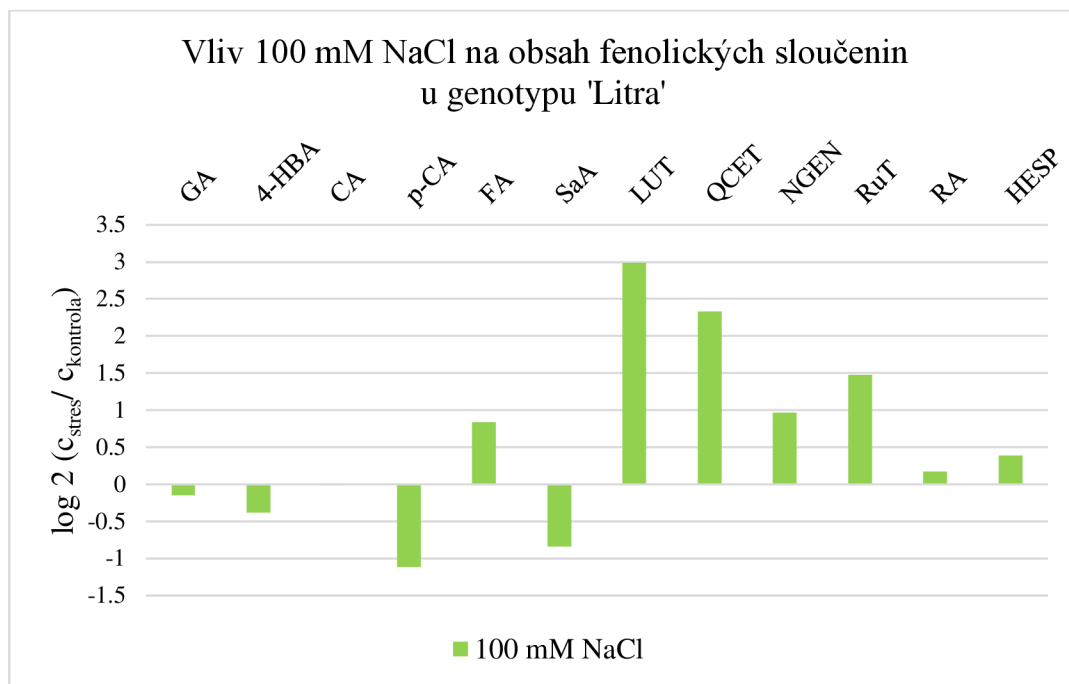
Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 33). Při zvýšeném příjmu dusíku došlo k signifikantnímu nárůstu obsahu luteoninu a hesperedinu. Obsah kyseliny ferulové, kvercetinu, rutinu a kyseliny rozmarýnové se snížil. Při sníženém příjmu dusíku došlo ke zvýšení obsahu kyseliny gallové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyselina *para*-kumarové, kyseliny kávové, kyseliny ferulové a luteoninu. Snížil se naopak obsah kyseliny salicylové, rutinu a nejvíce hesperedinu.

Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Litra' je uveden v grafu (Obr. 34). Solný stres měl pozitivní vliv na obsah kyseliny ferulové, luteoninu, naringenin, kvercetinu, rutinu a hesperedinu. Negativní vliv měl solný stres na obsah kyseliny *para*-kumarové a kyseliny salicylové. V celkovém srovnání měl však solný stres na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Litra' spíše pozitivní vliv.

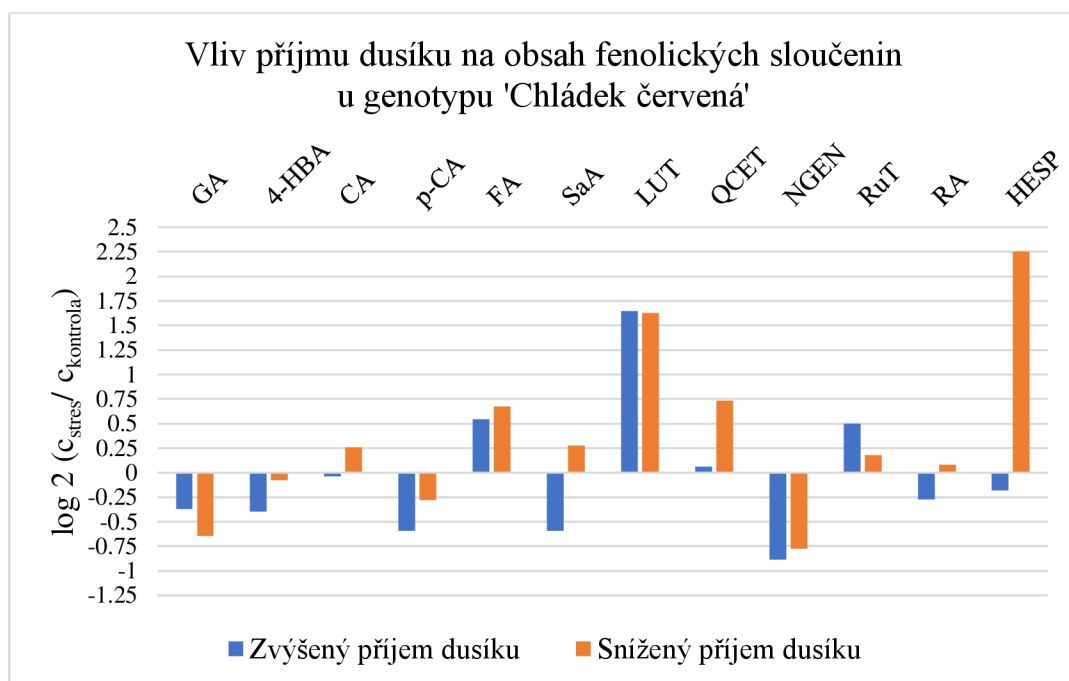
Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u genotypu 'Chládek červená' je uveden v grafu (Obr. 35). Při zvýšeném příjmu dusíku došlo ke zvýšení obsahu kyseliny ferulové, luteoninu a rutinu. Došlo ke snížení obsahu kyseliny gallové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny *para*-kumarové, kyseliny salicylové a naringenin.



Obr. 33 Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných v konveju.



Obr. 34 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných v konveju.



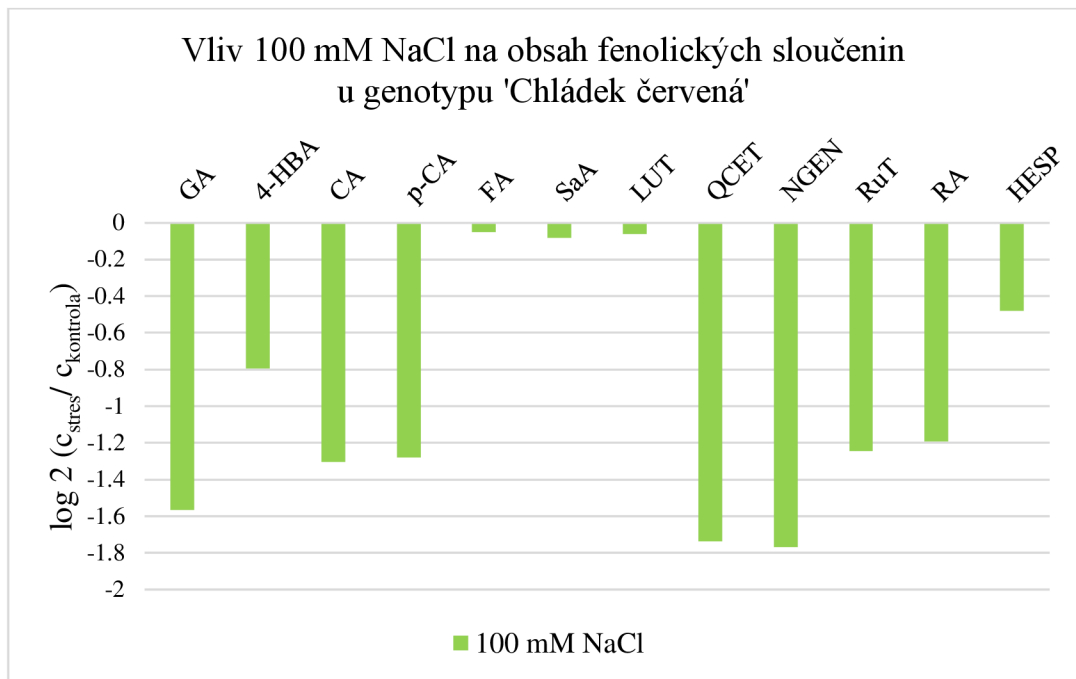
Obr. 35 Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných v konveju.

Snížený příjem dusíku měl u genotypu ‘Chládek červená‘ pozitivní vliv na obsah kyseliny ferulové, luteoninu, kvercetin a hesperedinu. Negativní vliv měl na obsah kyseliny gallové a naringenin.

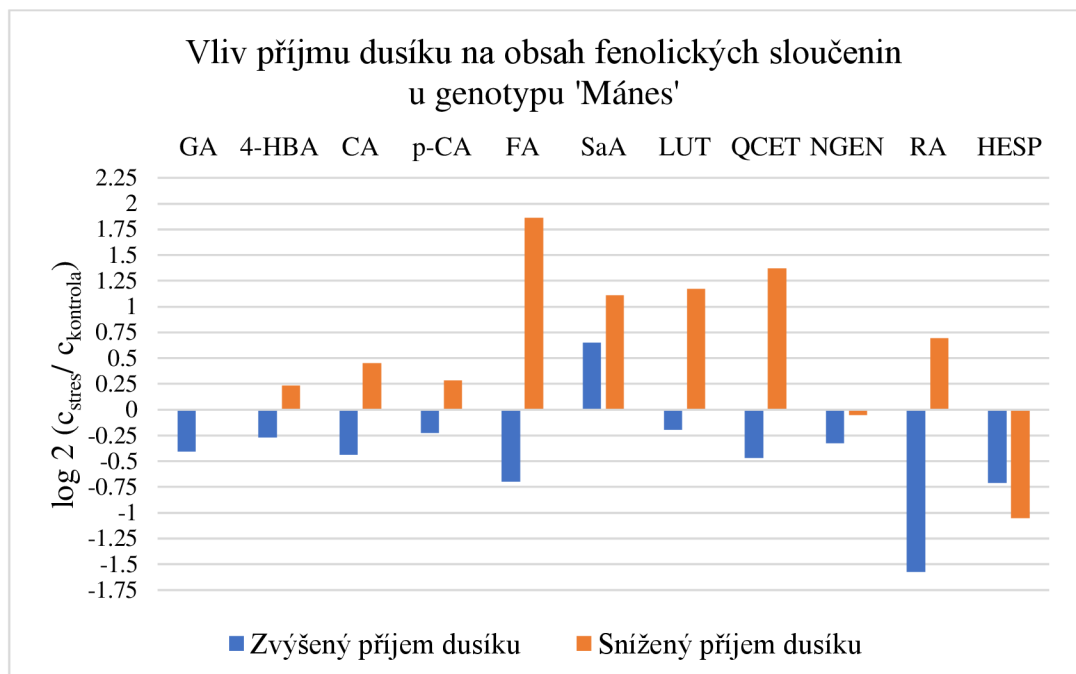
Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u genotypu ‘Chládek červená‘ je uveden v grafu (Obr. 36). U genotypu ‘Chládek červená‘ lze pozorovat, že solný stres měl velmi negativní vliv na obsah všech analyzovaných fenolických sloučenin, nejvíce na obsah kyseliny gallové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny kávové, kyseliny *para*-kumarové, kvercetin, naringenin, rutin, kyseliny rozmarýnové a hesperedinu.

Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u genotypu ‘Mánes‘ je uveden v grafu (Obr. 37). Při zvýšeném příjmu dusíku došlo ke zvýšení obsahu kyseliny salicylové. Došlo k poklesu mnoha analyzovaných fenolických sloučenin. Signifikantní snížení bylo pozorováno u obsahu kyseliny ferulové, kyseliny rozmarýnové a hesperedinu. Zvýšení příjmu dusíku mělo na obsah fenolických sloučenin u genotypu ‘Mánes‘ negativní vliv. Při snížení příjmu dusíku naopak došlo ke zvýšení obsahu mnoha fenolických sloučenin, především kyseliny ferulové, kyseliny salicylové, luteoninu, kvercetin a kyseliny rozmarýnové. K poklesu obsahu došlo pouze u hesperedinu. Snížený příjem dusíku u genotypu ‘Mánes‘ měl pozitivní vliv na obsah většiny fenolických sloučenin.

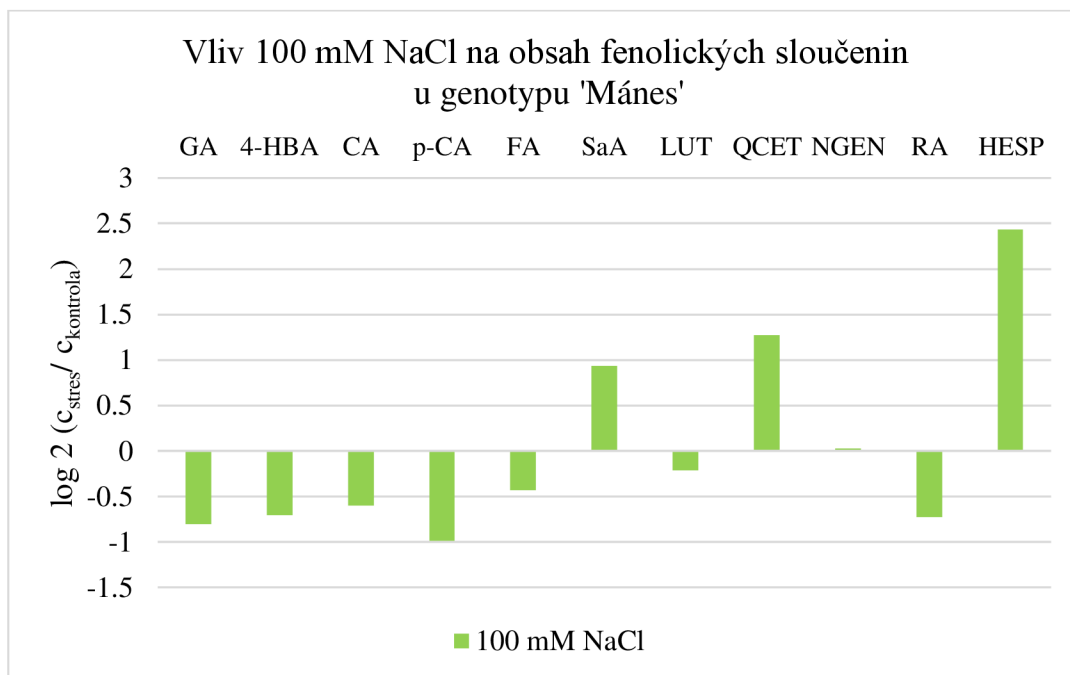
Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u genotypu ‘Mánes‘ je uveden v grafu (Obr. 38). Při solném stresu došlo ke zvýšení obsahu kyseliny salicylové, kvercetin a hesperedinu. Došlo ke snížení obsahu kyseliny gallové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny kávové, kyseliny *para*-kumarové kyseliny ferulové a kyseliny rozmarýnové. Solný stres měl u genotypu ‘Mánes‘ na obsah většiny fenolických sloučenin negativní vliv.



Obr. 36 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných v konveju.



Obr. 37 Vliv příjmu dusíku na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Mánes' pěstovaných v konveju.



Obr. 38 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u rostlin genotypu 'Mánes' pěstovaných v konveji.

## 5 DISKUZE

### 5.1 Pěstování bazalky pravé za kontrolovaných podmínek ve fytotronové komoře Fytoscope a ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Plantscreen Conveyor system

Rostlinám pěstovaným za kontrolovaných podmínek v konvejšoru se celkově dařilo lépe ve srovnání s rostlinami pěstovanými za kontrolovaných podmínek ve fytotronu.

U rostlin genotypu ‘Litra’ nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi stresovanými a kontrolními rostlinami při pěstování v konvejšoru. Naopak u rostlin pěstovaných ve fytotronu se jevílo nejlepší z hlediska fyziologické charakteristiky použití ½ Hoaglandova roztoku s vysokým obsahem dusíku, což odpovídá předchozím studiím (Sharafzadeh a Alizadeh, 2011) a ½ Hoaglandova roztoku s obsahem 50 mM NaCl. Z předchozích studií (Bekhradi *et al.*, 2015) vyplývá, že u některých, především zelených, genotypů bazalky pravé solný stres pozitivně ovlivňuje vizuální kvalitu rostlin.

U genotypu ‘Chládek červená’ se při pěstování za kontrolovaných podmínek v konvejšoru srovnatelně stejně dařilo rostlinám zavlažovaným kontrolním ½ Hoaglandovým roztokem, ½ Hoaglandovým roztokem s vysokým i nízkým obsahem dusíku, nejméně se dařilo rostlinám, na které byl aplikován solný stres (½ Hoaglandův roztok s obsahem 100 mM NaCl). Stejně výsledky plynuly i z experimentu pěstování rostlin za kontrolovaných podmínek ve fytotronu, kdy se nejvíce dařilo rostlinám zavlažovaným kontrolním ½ Hoaglandovým roztokem a nejméně rostlinám zavlažovaným ½ Hoaglandovým roztokem s obsahem 100 mM NaCl. Z tohoto pozorování plyne, že genotyp ‘Chládek červená’ je odolný vůči solnému stresu pouze při nižších koncentracích. Vliv příjmu dusíku na růst se neshoduje s předchozími studií (Biesiada a Kuś, 2010), ve které je uvedeno, že zvýšená dávka dusíku příznivě ovlivňuje růst. Intolerance fialových genotypů bazalky vůči solnému stresu se shoduje s předchozími studií (Nóbrega *et al.*, 2021), ve které je uvedeno, že solný stres způsobuje zpomalení a snížení růstu fialových genotypů bazalky pravé.

Pro genotyp ‘Mánes’ nebyly pozorovány při pěstování rostlin v konvejšoru signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Naopak při pěstování rostlin ve fytotronu se jevílo nejlepší použití kontrolního ½ Hoaglandova roztoku, kdy rostliny dosahovaly největší výšky, počtu listů i velikosti listů. Tento výsledek se neshoduje s předchozími studiemi (Golcz *et al.*, 2006; Sharafzadeh a Alizadeh, 2011),



kde je uvedeno, že hnojení dusíkem pozitivně ovlivňuje růst rostlin bazalky pravé, což se v tomto experimentu nepotvrdilo.

## 5.2 Analýza terpenoidů pomocí GC-MS

Analýza terpenoidů pomocí GC-MS byla provedena pro vzorky rostlin pěstovaných za kontrolovaných podmínek ve fytotronu i v konveju. Byly vybrány 4 nejvíce zastoupené terpenoidy, u nichž byla sledována změna obsahu ve stresovaných rostlinách oproti kontrolním rostlinám. Nejvíce zastoupené terpenoidy u genotypu 'Litra' byly pro rostliny pěstované ve fytotronu i v konveju shodné, jednalo se o linalool, eugenol, geraniol a methyleugenol. U genotypů 'Chládek červená' a 'Mánes' se nejvíce zastoupené terpenoidy v rostlinách pěstovaných ve fytotronu a v konveju mírně lišili. U obou genotypů se u rostlin pěstovaných v konveju nejvíce vyskytoval linalool, eugenol, geraniol a methyleugenol jako u genotypu 'Litra'. U rostlin pěstovaných ve fytotronu se u genotypů 'Chládek červená' a 'Mánes' však nevyskytoval geraniol.

Nejvíce zastoupeným terpenoidem u všech rostlin byl linalool, což se shoduje s literaturou (Arabaci a Bayram, 2004; Sifola a Barbieri, 2006; Daneshian *et al.*, 2009; Nurzyńska-Wierdak *et al.*, 2013).

Ve srovnání s bakalářskou prací (Komzáková, 2019), ve které byly analyzovány silice 13 genotypů bazalky pravé pomocí GC-MS, včetně genotypů 'Litra', 'Chládek červená' a 'Mánes', obsahovaly vybrané genotypy jako majoritní terpenoid linalool, což se shoduje s výsledky uvedenými v této diplomové práci. Genotyp 'Litra' obsahoval také značné množství geraniolu, eugenol se však v silicích genotypu 'Litra' nacházel ve velmi malém množství a methyleugenol se v silici nenacházel vůbec. U genotypu 'Chládek červená' se nacházelo malé množství eugenolu, geraniol a methyleugenol nebyl v silici detekován vůbec. Naopak hlavními složkami silice byly kromě linaloolu také eukalyptol, cedrelanol a terpinen-4-ol. Genotyp 'Mánes' obsahoval jako jednu z hlavních složek silice eugenol, obsahoval také značné množství methylaugenolu. Geraniol se v silici genotypu 'Mánes' nenacházel vůbec.

U genotypu 'Litra' se výsledky pěstování ve fytotronu a konveju mírně lišily. Při zvýšeném příjmu dusíku došlo u rostlin pěstovaných v konveju k razantnímu poklesu obsahu geraniolu oproti rostlinám pěstovaným v konveju, u kterých naopak došlo k velmi razantnímu nárůstu obsahu geraniolu. Při sníženém příjmu dusíku došlo u rostlin pěstovaných ve fytotronu k poklesu obsahu eugenolu, u rostlin pěstovaných v konveju se obsah eugenolu signifikantně nezměnil. Při aplikaci solného stresu

se shodují výsledky pro rostliny pěstované ve fytotronu i v konveju pro linalool, eugenol a methyleugenol. U rostlin pěstovaných v konveju došlo ke zvýšení obsahu geraniolu, u rostlin pěstovaných ve fytotronu nebyl geraniol detekován při solném stresu vůbec.

U genotypu 'Chládek červená' byly pro rostliny pěstované ve fytotronu a v konveju výsledky signifikantně odlišné. Při zvýšeném příjmu dusíku u rostlin pěstovaných ve fytotronu došlo k nárůstu obsahu linaloolu a poklesu obsahu eugenolu a methyleugenolu. U rostlin pěstovaných v konveju došlo naopak k nárůstu obsahu eugenolu a methyleugenolu, obsah linaloolu se signifikantně nezměnil. Při sníženém příjmu dusíku došlo u rostlin pěstovaných ve fytotronu k nárůstu obsahu linaloolu a methyleugenolu, obsah eugenolu se signifikantně nezměnil. U rostlin pěstovaných v konveju došlo ke snížení obsahu linaloolu a geraniolu, který nebyl u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných ve fytotronu detekován. Došlo také k nárůstu obsahu methyleugenolu. Při aplikaci solného stresu byly získány také jiné výsledky pro rostliny z fytotronu a konveju. V obou případech došlo k nárůstu obsahu linaloolu, u rostlin pěstovaných ve fytotronu došlo k nárůstu obsahu eugenolu a poklesu obsahu methyleugenolu. Naopak u rostlin pěstovaných v konveju došlo k nárůstu obsahu methyleugenolu, obsah eugenolu a geraniolu se mírně snížil.

U genotypu 'Mánes' byly pozorovány velké rozdíly mezi rostlinami pěstovanými ve fytotronu a v konveju. U rostlin pěstovaných ve fytotronu došlo při zvýšení příjmu dusíku k poklesu obsahu linaloolu a eugenolu, obsah methyleugenolu se mírně zvýšil. Při snížení příjmu dusíku nedošlo k signifikantním změnám v obsahu všech vybraných terpenoidů. U rostlin pěstovaných v konveju došlo při zvýšeném i sníženém příjmu dusíku k nárůstu obsahu linaloolu, eugenolu a methyleugenolu, obsah geraniolu se signifikantně nezměnil. Při aplikaci solného stresu došlo v obou případech k poklesu obsahu linaloolu, což odpovídá předchozí studii (Ciriello *et al.*, 2022). U rostlin pěstovaných ve fytotronu se obsah zbylých vybraných terpenoidů signifikantně nezměnil. U rostlin pěstovaných v konveju došlo také k poklesu obsahu eugenolu, a naopak k nárůstu obsahu methyleugenolu.

Předchozí studie vlivu příjmu dusíku a solného stresu na terpenoidy u genotypů použitých v této diplomové práci nebyly nalezeny, proto jsou dále výsledky srovnávány s jinými genotypy či bazalkou pravou obecně. V literatuře (Arabaci a Bayram, 2004; Daneshian *et al.*, 2009) je uvedeno, že při zvýšeném příjmu dusíku došlo k růstu obsahu terpenoidů, což částečně souhlasí s dosaženými výsledky.

Výsledky vlivu zvýšeného příjmu dusíku u genotypu 'Litra' a u rostlin genotypu 'Chládek červená' pěstovaných ve fytotronu, kdy došlo ke snížení obsahu methyleugenolu, odpovídají předchozí studii (Daneshian *et al.*, 2009). Neodpovídají výsledkům pro genotyp 'Mánes', kdy došlo k nárůstu obsahu methyleugenolu. Daneshian *et al.* (2009) také uvádí, že hnojení dusíkem nemělo signifikantní vliv na obsah eugenolu v rostlinách bazalky pravé, což neodpovídá výsledkům získaným v této diplomové práci.

V přechodí studii (Onofrei *et al.*, 2018) je uvedeno, že při aplikaci hnojiva s vysokým obsahem dusíku došlo k nárůstu obsahu linaloolu u rostlin bazalky pravé, což se shoduje s výsledky pro rostliny genotypu 'Litra' z obou experimentů pěstování, pro rostliny genotypu 'Chládek červená' pěstované ve fytotronu a pro rostliny genotypu 'Mánes' pěstované v konveju. Onofrei *et al.* (2018) dále uvádí, že došlo ke zvýšení obsahu eugenolu u rostlin hnojených hnojivou s vysokým obsahem dusíku, což se neshoduje se získanými výsledky. Geraniol a methyleugenol nebyly u rostlin ve studii (Onofrei *et al.*, 2018) detekovány.

V předchozí studii (Ciriello *et al.*, 2022) je uvedeno, že při aplikaci solného stresu došlo ke snížení obsahu linaloolu, což odpovídá pouze výsledkům pro genotyp 'Mánes', u genotypů 'Litra' a 'Chládek červená' došlo naopak k nárůstu obsahu linaloolu při aplikaci solného stresu.

V předchozích studiích (Said-Al Ahl *et al.*, 2010; Scagel *et al.*, 2019) je uvedeno, že při aplikaci solného stresu došlo u rostlin bazalky pravé ke snížení obsahu eugenolu. Tyto studie se shodují s výsledky pouze pro rostliny genotypu 'Mánes' pěstované v konveju.

Ve studii (Barbieri *et al.*, 2012) se uvádí, že vliv solného stresu na obsah terpenoidů závisí na genotypu, kdy u genotypu 'Napoletano' došlo k nárůstu obsahu terpenoidů vlivem solného stresu, u genotypu 'Genovese' došlo naopak k poklesu obsahu terpenoidů. Tato studie odpovídá výsledkům této diplomové práce, kdy se mezi sebou velmi liší výsledky získané pro jednotlivé genotypy.

### 5.3 Analýza dusíkatých sloučenin

Analýza obsahu aminokyselin a polyaminů byla provedena pro rostliny pěstované za kontrolovaných podmínek v konvejueru pomocí UHPLC-MS/MS analýzy.

V předchozí studii (Otálora *et al.*, 2018), která se zabývala vlivem hnojení čekanky listové dusíkem na obsah aminokyselin, je uvedeno, že při nedostatku přijatého dusíku došlo ke snížení obsahu všech zkoumaných aminokyselin, což se téměř shoduje s výsledky pro genotypy 'Litra' a 'Mánes'. U genotypu 'Chládek červená' došlo k signifikantnímu nárůstu některých aminokyselin, především tryptofanu, lysinu, glutamové kyseliny, asparaginu, glutaminu a ornitinu. Stejně výsledky, jako ve studii (Otálora *et al.*, 2018), byly dosaženy také ve studii (Kováčik *et al.*, 2006), která se zabývala vlivem deficiencie dusíku na obsah volných aminokyselin v listech heřmánku pravého.

Ve studii (Atanasova, 2008), která se zabývala vlivem hnojení dusíkem na obsah aminokyselin v brukvi seté, je uvedeno, že při hnojení vysokými dávkami dusíku došlo ke zvýšení obsahu asparagové kyseliny, tyrosinu, fenylalaninu, histidinu, lysinu a nejvíce argininu. Tato studie se shoduje s výsledky pro změnu obsahu histidinu a argininu u genotypu 'Litra' a 'Mánes', kdy se obsah těchto dvou aminokyselin zvýšil. U genotypu 'Chládek červená' došlo naopak ke snížení obsahu histidinu a argininu. Hladiny asparagové kyseliny, tyrosinu, fenylalaninu a lysinu se u vybraných genotypů bazalky pravé při zvýšeném příjmu dusíku příliš signifikantně nezměnily. Atanasova (2008) dále uvádí, že došlo ke snížení obsahu threoninu, glycinu, valinu a prolinu, což se shoduje s výsledky pro genotyp 'Chládek červená'. U genotypu 'Mánes' došlo ke snížení obsahu valinu a threoninu, obsah prolinu a glycinu se naopak zvýšil. U genotypu 'Litra' došlo ke snížení hladiny glycinu, zvýšil se obsah valinu a threoninu, obsah prolinu se při zvýšené aplikaci dusíku nezměnil.

V literatuře (Paschalidis *et al.*, 2019) se uvádí, že v důsledku zvýšené aplikace dusíku dochází v rostlinách ke zvýšené produkci polyaminů, které předchází zvýšená produkce argininu a ornitinu jako prekurzorů polyaminů, což se shoduje s dosaženými výsledky, kdy u všech vybraných genotypů došlo k nárůstu obsahu argininu. Obsah ornitinu se zvýšil pouze u genotypu 'Mánes', u genotypů 'Litra' a 'Chládek červená' se naopak snížil. Je však zajímavé, že k signifikantnímu nárůstu polyaminů došlo pouze u genotypu 'Litra', kdy se nejvíce zvýšil obsah 1,3-diaminopropanu a kadaverinu, naopak obsah

putrescinu se snížil. U genotypů ‘Chládek červená‘ a ‘Mánes‘ došlo ke snížení obsahu téměř všech sledovaných polyaminů.

Vlivem solného stresu došlo u všech tří vybraných genotypů ke zvýšení obsahu prolinu, což se shoduje s předchozími studiemi (Aziz *et al.*, 1999; Simon-Sarkadi *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 2013). V literatuře (Choudhary *et al.*, 2022) je uvedeno, že během solného stresu dochází k zabránění vstřebávání vody v důsledku vysoké koncentrace NaCl, což vede k iontové nerovnováze, osmotickému a oxidačnímu stresu a nutriční nerovnováze. Osmolyty, mezi které se řadí i prolin, slouží v rostlinách mimo jiné k udržování osmotické rovnováhy prostřednictvím nepřerušovaného příjmu vody. Při působení solného stresu v rostlině dochází k akumulaci prolinu, což vede ke zmírnění solného stresu.

Ve studii (Aziz *et al.*, 1999), která se zabývala vlivem solného stresu na změnu hladiny polyaminů a aminokyselin v listech rajčete, došlo kromě zvýšení obsahu prolinu ke zvýšení hladiny tyraminu, 1,3-diaminopropanu, kadaverinu a agmatinu, což se částečně shoduje s výsledky dosaženými v této diplomové práci. U genotypu ‘Litra‘ došlo při aplikaci solného stresu ke zvýšení obsahu tyraminu, 1,3-diaminopropanu a kadaverinu, obsah agmatinu se naopak snížil. Výsledky pro genotyp ‘Chládek červená‘ se neshodují se studií (Aziz *et al.*, 1999), jelikož došlo ke snížení obsahu všech zkoumaných polyaminů kromě agmatinu, u něhož se obsah vlivem solného stresu signifikantně nezměnil. U genotypu ‘Mánes‘ došlo ke zvýšení hladiny tyraminu, což se shoduje se studií, avšak obsah kadaverinu se snížil a na hladinu 1,3-diaminopropanu a agmatinu neměl solný stres u tohoto genotypu vliv.

V předchozí studii (Benavides *et al.*, 1997), kde byly zkoumány změny hladin polyaminů při působení solného stresu u sazenic slunečnice roční, došlo ke snížení hladin putrescinu, spermidinu a sperminu, což odpovídá výsledkům pro genotyp bazalky pravé ‘Chládek červená‘ a ‘Mánes‘. U genotypu ‘Litra‘ došlo ke snížení hladiny putrescinu, obsah sperminu a spermidinu se signifikantně nezměnil. Ke snížení hladin putrescinu, sperminu a spermidinu došlo také v předchozí studii (Santa-Cruz *et al.*, 1997), kde byl zkoumán vliv solného stresu na hladiny polyaminů u rajčete divokého.

V předchozí studii (Simon-Sarkadi *et al.*, 2002), která se zabývala změnou obsahu polyaminů a aminokyselin v reakci na solný stres u obilovin, se snížil obsah spermidinu a naopak zvýšil obsah putrescinu.

V literatuře (Choudhary *et al.*, 2022) je uvedeno, že hladiny polyaminů se v reakci na solný stres zvyšují, což se neshoduje s dosaženými výsledky. Akumulace polyaminů

v rostlině zvyšuje její toleranci vůči solnému stresu. Dále je uvedeno, že se při solném stresu zvyšuje aktivita arginindekarboxylasy, která se účastní syntézy polyaminů přeměnou argininu na prekurzory polyaminů (Walters, 2003; Gill a Tuteja, 2010).

Ve studii (Simon-Sarkadi *et al.*, 2002) je uvedeno, že při aplikaci solného stresu na různé druhy obilnin došlo k nárůstu obsahu kyseliny glutamové, argininu a ornitinu. Výsledky pro genotyp 'Mánes' se shodují se studií, pro ostatní vybrané genotypy se výsledky od studie liší. U genotypu 'Litra' došlo k nárůstu obsahu kyseliny glutamové, obsah argininu a ornitinu se naopak snížil. U genotypu 'Chládek červená' došlo ke zvýšení hladiny kyseliny glutamové, obsah argininu a ornitinu se snížil.

V předchozí studii (El-Bassiouny a Bekheta, 2005), kde byl zkoumán vliv solného stresu na obsah aminokyselin u dvou kultivarů pšenice, došlo ke zvýšení obsahu kyseliny glutamové, prolinu, isoleucinu, alaninu a fenylalaninu. Tato studie částečně souhlasí s výsledky pro genotyp 'Litra', u kterého došlo ke zvýšení obsahu isoleucinu, kyseliny glutamové a prolinu, obsah alaninu a fenylalaninu se signifikantně nezměnil. U genotypu 'Chládek červená' došlo taktéž ke zvýšení obsahu isoleucinu, kyseliny glutamové a prolinu, obsah alaninu a fenylalaninu se však snížil. Pro genotyp 'Mánes' se výsledky shodují částečně, kdy došlo ke zvýšení hladiny fenylalaninu, prolinu a kyseliny glutamové, obsah alaninu se však snížil a na obsah isoleucinu neměl u tohoto genotypu solný stres vliv. El-Bassiouny a Bekheta (2005) dále uvádí, že došlo ke snížení obsahu argininu, což souhlasí s dosaženými výsledky pro genotypy 'Litra' a 'Chládek červená' použité v této diplomové práci, u genotypu 'Mánes' se obsah argininu naopak zvýšil. Dále uvádí, že došlo ke snížení obsahu glycinu, histidinu a serinu, což je v rozporu s výsledky této diplomové práce, kdy se obsah histidinu a serinu výrazně zvýšil u všech vybraných genotypů. Obsah glycinu se snížil u genotypů 'Litra' a 'Chládek červená', což se shoduje s výsledky studie. U genotypu 'Mánes' se obsah glycinu zvýšil.

V předchozí studii (Martino *et al.*, 2003), která se zabývala změnou obsahu aminokyselin v reakci na solný stres u listů špenátu, je uvedeno, že došlo k nárůstu obsahu serinu a glycinu, a to především v prvních dvaceti dnech od aplikace solného stresu. Tyto výsledky se shodují s výsledky pro obsah serinu pro všechny vybrané genotypy bazalky pravé. Dále je ve studii uvedeno, že v důsledku degradace proteinů došlo k nárůstu obsahu isoleucinu, valinu a tryptofanu, což se shoduje s výsledky pro genotypy 'Litra' a 'Chládek červená', u genotypu 'Mánes' došlo k nárůstu obsahu valinu a tryptofanu, obsah isoleucinu se snížil.

K největšímu nárůstu u všech genotypů došlo u N-acetylornitinu, což je meziproduct syntézy ornitinu a argininu (Anwar *et al.*, 2018). Arginin je spolu s glutamátem prekurzorem prolinu, což je osmolyt, který snižuje negativní účinky solného stresu na rostliny (Choudhary *et al.*, 2022).

#### **5.4 Analýza fenolických sloučenin**

Analýza fenolických sloučenin byla provedena pro rostliny pěstované za kontrolovaných ve fytotronu i v konveju.

V předchozích studiích (Li *et al.*, 2008; Nguyen a Niemeyer, 2008; Jakovljević *et al.*, 2019) je uvedeno, že při snížení dostupnosti dusíku dochází k celkovému zvýšení obsahu fenolických sloučenin. Tato studie se shoduje s výsledky u všech vybraných genotypů. Pouze v případě pěstování ve fytotronu u genotypu 'Chládek červená' došlo k razantnímu snížení obsahu fenolických sloučenin, především kvercetin, kyseliny gallové, naringenin a rutinu. Ve studii je dále uvedeno, že při vysoké dostupnosti dusíku došlo naopak k signifikantnímu snížení celkového obsahu fenolických látek, což částečně odpovídá získaným výsledkům v této diplomové práci. Nejvíce u genotypu 'Mánes', kdy došlo u obou experimentů k signifikantnímu snížení obsahu téměř všech zkoumaných fenolických látek. U genotypu 'Litra' došlo ke snížení obsahu asi poloviny zkoumaných látek, v obou experimentech však došlo k výraznému nárůstu obsahu hesperedinu. U genotypu 'Chládek červená' se výsledky mezi experimenty liší, v obou však došlo k poklesu obsahu asi poloviny zkoumaných fenolických látek, což částečně souhlasí se studií.

Ve studii (Scagel *et al.*, 2019) je uvedeno, že při aplikaci solného stresu došlo oproti kontrolním vzorkům k poklesu obsahu fenolických sloučenin, což se shoduje s dosaženými výsledky pro genotyp 'Chládek červená', především pro rostliny pěstované v konveju, u kterých došlo k poklesu obsahu všech zkoumaných fenolických sloučenin. Studie se částečně shoduje i s výsledky pro rostliny genotypu 'Litra' pěstované ve fytotronu. U rostlin genotypu 'Litra' pěstovaných za kontrolovaných podmínek v konveju naopak došlo ke zvýšení obsahu mnoha fenolických sloučenin, především luteoninu, kvercetin, rutinu a naringenin. U genotypu 'Mánes' došlo až na výjimky ke snížení obsahu fenolických sloučenin u rostlin pěstovaných v konveju, u rostlin pěstovaných ve fytotronu došlo pouze k poklesu obsahu hesperedinu, kyseliny salicylové a kyseliny rozmarýnové.

V jiných předchozích studiích (Corrado *et al.*, 2021; Ciriello *et al.*, 2022) je naopak uvedeno, že solný stres vyvolal u rostlin bazalky pravé nárůst obsahu fenolických sloučenin, což se shoduje s výsledky pro rostliny genotypu ‘Litra‘ pěstované v konveju a pro rostliny genotypu ‘Chládek červená‘ pěstované ve fytotronu. Stejně výsledky byly získány také ve studii (Valifard *et al.*, 2014) zabývající se obsahem fenolických sloučenin u šalvěže, což je rostlina z čeledi *Lamiaceae*. Corrado *et al.* (2021) také uvádí, že došlo při mírném solném stresu k nárůstu obsahu kyseliny kávové a kyseliny ferulové, což odpovídá výsledkům pro rostliny genotypu ‘Litra‘ pěstované v konveju a rostliny genotypu ‘Chládek červená‘ a ‘Mánes‘ pěstované ve fytotronu. Dále Corrado *et al.* (2021) uvádí, že při zvýšené solném stresu došlo k nárůstu obsahu kyseliny rozmarýnové a *para*-kumarové, což neodpovídá výsledkům pro genotyp ‘Litra‘ a ‘Mánes‘. U genotypu ‘Chládek červená‘ jsou výsledky rozdílné v závislosti na daném experimentu.

Z výsledků vyplývá, že obsah fenolických sloučenin při různých druzích abiotického stresu se liší v závislosti na druhu stresu a také v závislosti na daném genotypu bazalky pravé.



## 6 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla vypracována literární rešerše, která se zaměřovala na popis rodu bazalka, bazalky pravé a jejích vybraných genotypů, pěstování a růst rostlin se zaměřením na hydroponii. Byly popsány hydroponické systémy, živné roztoky a substráty používané v hydroponii. Dále se teoretická část zaměřovala na metabolismus dusíku u rostlin a vybrané sekundární metabolity rostlin, mezi které patří polyaminy, fenolické sloučeniny a terpenoidy. Byl popsán vliv abiotického stresu na produkci vybraných sekundárních metabolitů rostlin, a nakonec byly popsány metody studia rostlinných metabolitů, mezi které patří GC-MS a LC-MS se zaměřením na HPLC.

Cílem experimentální části bylo fyziologické a metabolické posouzení vlivu kultivačních podmínek na růst rostlin a na obsah vybraných rostlinných metabolitů, kterými byly terpenoidy, fenolické sloučeniny, polyaminy a aminokyseliny.

Rostliny bazalky pravé byly pěstovány během dvou experimentů ve fytotronové komoře Fytoscope a ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Conveyor system. Z fyziologického hlediska vyhovoval rostlinám genotypu 'Chládek červená' a 'Mánes' kontrolní ½ Hoaglandův roztok, rostlinám genotypu 'Litra' roztok se zvýšeným obsahem dusíku. Nejméně se dařilo rostlinám, na které byl aplikován solný stres, a to u všech vybraných genotypů. Genotyp 'Chládek červená' vykazoval z fyziologického hlediska nízkou odolnost vůči solnému stresu, genotyp 'Mánes' oproti tomu vykazoval vysokou odolnost vůči solnému stresu i stresu z nedostatku či nadbytku dusíku.

Byla provedena kvantitativní analýza terpenoidů obsažených v rostlinném materiálu získaném z obou předchozích experimentů pomocí GC-MS. U všech tří genotypů byly nejvíce zastoupenými terpenoidy linalool, eugenol, geraniol a methyleugenol. Nejvyšší obsah nejvíce zastoupených terpenoidů u genotypu 'Litra' vykazovaly rostliny zavlažované kontrolním roztokem. U genotypu 'Chládek červená' obsahovaly nejvíce vybraných terpenoidů rostliny, na které byl aplikován solný stres a u genotypu 'Mánes' rostliny, které byly zavlažovány ½ Hoaglandovým roztokem se sníženým obsahem dusíku.

Byla provedena analýza aminokyselin a polyaminů pomocí UHPLC-MS/MS pro rostliny vypěstované ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Conveyor system. U genotypu 'Litra' došlo k nárůstu obsahu polyaminů a většiny aminokyselin při zavlažování ½ Hoaglandovým roztokem se zvýšeným obsahem dusíku a při aplikaci

solného stresu. U genotypu ‘Chládek červená’ došlo k nárůstu obsahu aminokyselin u rostlin, na které byl aplikován solný stres. Z hlediska obsahu polyaminů se jevílo nejvhodnější použití kontrolního roztoku. Pro genotyp ‘Mánes’ bylo z hlediska obsahu aminokyselin nejvhodnější použití ½ Hoaglandova roztoku se zvýšeným obsahem dusíku a aplikace solného stresu, kdy došlo k nárůstu obsahu většiny aminokyselin. Nejvyšší obsah polyaminů byl zaznamenán u rostlin zavlažovaných kontrolním roztokem. U všech tří genotypů došlo při aplikaci solného stresu k nárůstu obsahu prolinu, jehož akumulace vede ke zmírnění solného stresu vyrovnáváním osmotické rovnováhy.

Nakonec byla provedena analýza fenolických sloučenin rostlin pěstovaných ve fytotronové komoře Fytoscope a ve vysokokapacitní fenotypizační platformě Conveyor system pomocí UHPLC-MS/MS. U všech tří genotypů došlo k nárůstu obsahu fenolických sloučenin při zavlažování ½ Hoaglandovým roztokem se sníženým obsahem dusíku. U genotypu ‘Litra’ a ‘Mánes’ došlo k nárůstu obsahu fenolických sloučenin také při aplikaci solného stresu, na rozdíl od genotypu ‘Chládek červená’, kdy došlo ke snížení obsahu téměř všech sledovaných fenolických sloučenin.

Z fyziologického hlediska se pro genotyp ‘Litra’ jevílo nejvhodnější použití kontrolního roztoku, kdy rostliny obsahovaly také nejvyšší obsah terpenoidů. Rostliny se sníženým příjmem dusíku obsahovaly naopak vysoké hladiny fenolických látek a rostliny se zvýšeným příjmem dusíku obsahovaly vysoké hladiny polyaminů.

Genotyp ‘Chládek červená’ se jevílo z fyziologického hlediska jako málo odolný vůči solnému stresu, při aplikaci solného stresu však obsahoval vysoké hladiny terpenoidů. Rostliny se sníženým příjmem dusíku obsahovaly vysoké hladiny fenolických sloučenin.

Genotyp ‘Mánes’ se jevílo z fyziologického hlediska jako velice odolný vůči solnému stresu, z nutričního hlediska obsahoval nejvíce terpenoidů a fenolických sloučenin při sníženém příjmu dusíku.

## 7 LITERATURA

- Abbas M., Saeed F., Anjum F. M., Afzaal M., Tufail T., Bashir M. S., Ishtiaq A., Hussain S., Suleria H. A. R. (2017): Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, **20**, 1689-1699.
- Alcázar R., Marco F., Cuevas J. C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A. F., Altabella T. (2006): Involment of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters*, **28**, 1867-1876.
- Alcázar R., Bueno M., Tiburcio A. F. (2020): Polyamines: Small Amines with Large Effects on Plant Abiotic Stress Tolerance. *Cells*, **9**, 2373.
- Anwar A., She M., Wang K., Riaz B., Ye X. (2018): Biological Roles of Ornithine Aminotransferase (OAT) in Plant Stress Tolerance: Present Progress and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 3681.
- Arabaci O., Bayram E. (2004): The Effect of Nitrogen Fertilization and Different Plant Densities on Some Agronomic and technologic Characteristic of *Ocimum basilicum* L. (Basil). *Journal of Agronomy*, **3**, 255-262.
- Atanasova E. (2008): Effect of nitrogen sources on the nitrogenous forms and accumulation of amino acid in head cabbage. *Plant, Soil and Environment*, **54**, 66-71.
- Aziz A., Martin-Tanguy J., Larfer F. (1999): Salt stress-induced prolin accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Science*, **145**, 83-91.
- Barbieri G., Valoone S., Orsini F., Paradiso R., Pascale S., Negre-Zakharov F., Maggio A. (2012): Stomatal density and metabolic determinants mediate salt stress adaptation and water use efficiency in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Plant Physiology*, **169**, 1737-1746.
- Beale D. J., Pinu F. R., Kouremenos K. A., Poojary M. M., Narayana V. K., Boughton B. A., Kanojia K., Dayalan S., Jones O. A. H., Dias D. A. (2018): Review of recent development in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomimcs*, **14**, 152.
- Bekhradi F., Delshad M., Marín A., Luna M. C., Carrido Y., Kashi A., Babalar M., Gil M. I. (2015): Effect of Salt Stress on Physiological and Postharvest Quality Characteristics of Different Iranian Genotypes of Basil. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, **56**, 777-785.
- Beller H. R., Lee T. S., Katz L. (2015): Natural products as biofuels and bio-based chemicals: fatty acids and isoprenoids. *Natural Product Reports*, **32**, 11508-1526.
- Benavides M., Aizencang G., Tomaro M. L. (1997): Polyamines in *Helianthus annuus* L. during Germination under Salt Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, **16**, 205-211.
- Bergman M. E., Davis B., Philips M. A. (2019): Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurence, and Mechanism of Action. *Molecules*, **24**, 3961.
- Biesiada A., Kuś A. (2010): The effect of nitrogen fertilization and irrigation on yielding and nutritional status of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, **9**, 3-12.
- Boncan D. A. T., Tsang S. S. K., Li C., Lee I. H. T., Lam H., Chan T., Hui J. H. L. (2020): Terpenes and Terpenoids in Plants: Interactions with Environment and Insects. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 7382.
- Bouchonnet S. (2013): *Introduction to GC-MS Coupling*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 200 stran.
- Bunzel M., Schendel R. R. (2017): Determination of (Total) Phenolics and Antioxidant Capacity in Food and Ingredients. In: *Food Analysis*. (Nielsen S. S.), 5th ed., Springer, Switzerland, 455-468.
- Cavar Zeljković S., Komzákova K., Šišková J., Karalija E., Smékalová K., Tarkowski P. (2020): Phytochemical variability of selected basil genotypes. *Industrial Crops & Products*, **157**, 112910.
- Ciriello M., Formisano L., Soteriou G. A., Kyrtzis A., Pascale S., Kyriacou M. C., Roupael Y. (2022): Differential Response to NaCl Osmotic Stress in Sequentially Harvested Hydroponic Red and Green Basil and the Role of Calcium. *Frontiers in Plant Science*, **13**, 799213.

- Cheng A., Lou Y., Mao Y., Lu S., Wang L., Chen X. (2007): Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, **49**, 179-186.
- Choudhary S., Wani K. I., Naeem M., Khan M. M. A., Aftab T. (2022): Cellular Responses, Osmotic Adjustments, and Role of Osmolytes in Providing Salt Stress Resilience in Higher Plants: Polyamines and Nitric Oxide Crosstalk. *Journal of Plant Growth Regulation*, <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10584-7>.
- Corrado G., Vitaglione P., Chiaise P., Roupael Y. (2021): Unraveling the Modulation of Controlled Salinity Stress on Morphometric Traits, Mineral Profile, and Bioactive Metabolome Equilibrium in Hydroponic Basil. *Horticulturae*, **7**, 273.
- Coruzzi G. M. (2003): Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. In: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists, 1-17.
- Covey T. R., Lee E. D., Bruins A. P., Henion J. D. (1986): Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **58**, 1451-1461.
- Cui Q., Du R., Liu M., Rong L. (2020): Lignans and Their Derivates from Plants as Antivirals. *Molecules*, **25**, 183.
- Cushnie T. P. T., Lamb A. J. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**, 343-356.
- Daneshian A., Gurbuz B., Cosge B., Ipek A. (2009): Chemical Components of Essential Oils from Basil (*Ocimum basilicum* L.) Grown at Different Nitrogen Levels. *International Journal of Natural and Engineering Science*, **3**, 9-13.
- Dicko M. H., Gruppen H., Barro C., Traore A. S., Berkel W. J. H., Voragen A. G. J. (2005): Impact of phenolic compounds and related enzymes in Sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses. *Journal of Chemical Ecology*, **31**, 2671-2688.
- Douglas J. S. (1977): *Hydroponics The Bengal System*. 5th ed., Oxford University Press, New Delhi, 185 stran.
- Dubrovina A. S., Kiselev K. V. (2017): Regulation of stilbenes biosynthesis in plants. *Planta*, **246**, 597-623.
- Duke J. A., Hurst S. J. (1975): Ecological amplitudes of herbst, spices and medicinal plants. *Lloydia*, **38**, 404-410.
- El-Bassiouny H., Bekheta M. A. (2005): Effect of Salt Stress on Relative Water Content, Lipid Peroxidation, Polyamines, Amino Acids and Ethylene of Two Wheat Cultivars. *International Journal of Agriculture & Biology*, **7**, 363-368.
- Filippis B., Ammazalorso A., Amoroso R., Giampietro L. (2019): Stilbene derivates as new perspective in antifungal medicinal chemistry. *Drug Development Research*, **80**, 285-293.
- Forde B. G., Lea P. J. (2007): Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Biology*, **58**, 2339-2358.
- Foyer C. H., Noctor G., Hodges M. (2011): Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1467-1482.
- Gill S. S., Tuteja N. (2010): Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior*, **5**, 26-33.
- Giron L. M., Freire V., Alonzo A., Vaceres A. (1991): Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the cribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, **34**, 173-187.
- Golecz A., Politycka B., Seidler-Lozykowska K. (2006): The effect of nitrogen fertilization and stage of plant development on the mass and quality of sweet basil leaves [*Ocimum basilicum* L.]. *Herba Polonica*, **52**, 1-2.
- Gong Z., Xiong L., Shi H., Yang S., Herrera-Estrella L. R., Xu G., Chao D., Li J., Wang P., Qin F., Li J., Ding Y., Shi Y., Wang Y., Yang Y., Guo Y., Zhu J. (2020): Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, **63**, 635-674.
- GRIN Czech 1.10.3: <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/accessiondetail.aspx?id=36034> (29.3.2021).
- GRIN Czech 1.10.3: <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/accessiondetail.aspx?id=68924> (29.3.2021).
- Groppa M. D., Benavides M. P. (2007): Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, **34**, 35-45.

- Guohua X., Fan X., Miller A. J. (2012): Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 153-182.
- Harvey D. (2000): *Modern Analytical Chemistry*. James M. Smith, 798 stran.
- Herrmann K. M., Weaver L. M. (1999): The Shikimate Pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 473-503.
- Hussain S. S., Ali M., Ahmad M., Siddique K. H. M. (2011): Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances*, **29**, 300-311.
- Jaeger R., Cuny E. (2016): Terpenoids with Special Pharmacological Significance: A review. *Natural Product Communications*, **11**, 1373-1390.
- Jakovljević D., Topuzović M., Stanković M. (2019): Nutrient limitation as a tool for the induction of secondary metabolites with antioxidant activity in basil cultivars. *Industrial Crops & Products*, **138**, 111462.
- Jensen M. H. (1997): Hydroponics. *Horticultural Science*, **32**, 1018-1021.
- Kaul S. C., Gart S., Tamura K., Wada T., Kaul Z., Wadhwa R. (2017): Establishment of Hydroponic Cultivation of Ashwagandha for Active Ingredient Enriched Leaves. In: *Science of Ashwagandha: Preventive and Therapeutic Potentials*. (Sunil C. K. a Renu W.), Springer International Publishing AG, Switzerland, 495-508.
- Khawand T. E., Courtois A., Valls J., Richard T., Krisa S. (2018): A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, **17**, 1007-1029.
- Komzárková K. (2019): *Fytochemické studium vybraných genotypů bazalky pravé (Ocimum basilicum L.)*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Kováčik J., Repčák M., Kron I. (2006): Nitrogen deficiency induced changes of free amino acids and coumarin contents in the leaves of *Matricaria chamomilla*. *Acta Physiologiae Plantarum*, **28**, 159-164.
- Ku Y.-S., Ng M.-S., Cheng S.-S., Lo A. W.-Y., Xiao Z., Shin T.-S., Chung G., Lam H.-M. (2020): Understanding the Composition, Biosynthesis, Accumulation and Transport of Flavonoids in Crops for the Promotoin od Crops as Healthy Sources of Flavonoids for Human Consumption. *Nutrients*, **12**, 1717.
- Kumar N., Goel N. (2019): Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, **24**, e00370.
- Kusano M., Fukushima A., Redestig H., Saito K. (2010): Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1439-1453.
- Lam H.-M., Coschigano K. T., Oliveira I. C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G. M. (1996): The Molecular-genetics of Nitrogen Assimilation into Amino Acids in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 569-593.
- Li J., Zhu Z., Gerendás J. (2008): Effects of Nitrogen and Sulfur on Total Phenolics and Antioxidant Activity in Two Genotypes of Leach Mustard. *Journal of Plant Nutrition*, **31**, 1642-1655.
- Liao P., Hemmerlin A., Bach T. J., Chye M. (2016): The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnology Advances*, **34**, 697-713.
- Loreto F., Schnitzler J. (2010): Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in Plant Science*, **15**, 154-166.
- Maeda H., Dudareva N. (2012): The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 73-105.
- Martino C., Delfine S., Pizzuto R., Loreto F., Fuggi A. (2003): Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New Phytologist*, **158**, 455-463.
- McNair H. M., Miller J. M. (2009): *Basic gas chromatography*. 2nd ed., Jonh Willey & Sons, Hoboken, New Jersey, 239 stran.
- Minhas P. S., Rane J., Pasala R. K. (2017): Abiotic Stresses in Agriculture: An Overview. In: *Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture*. (Minhas P. S., Rane J., Pasala R. K.), Springer, Singapore, 3-8.
- Munos-Esparza N. C., Latorre-Moratalla M. L., Comas-Basté O., Toro-Funes N., Veciana-Nogués M. T., Vidal-Carou M. C. (2019): Polyamines in Food. *Fontiers in Nutrition*, **6**, 108.

- Nguyen P. M., Niemeyer E. D. (2008): Effect of Nitrogen Fertilization on the Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 8685-8691.
- Nóbréga J. S., Bezerra A. C., Ribeiro J. E. S., Silva E. C., Silva T. I., Costa R. N. M., Silva A. V., Lopes A. S., Dias T. J. (2021): Growth and gas Exchange of purple basil submitted to salinity and foliar nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition*, **18**, 2729-2738.
- Nováková L., Douša M., Česla P. a kolektiv: (2021): *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 2. vydání, Česká chromatografická škola, Moravany u Brna, Česká republika, 448 stran.
- Nurzyńska-Wierdak R., Borowski B., Dzina K., Zawiślak G., Kowalski R. (2013): Essential oil composition of sweet basil cultivars as affected by nitrogen and potassium fertilization. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **37**, 427-436.
- Onofrei V., Benchennout A., Jancheva M., Loupassaki S., Ouaret W., Burducea M., Lobiuc A., Teliban G.-C., Robu T. (2018): Ecological foliar fertilization effects on essential oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivated in a field system. *Scientia Horticulturae*, **239**, 104-113.
- Otálora G., Pinero M. C., López-Marín J., Varó P., Amor F. M. (2018): Effects of foliar nitrogen fertilization on the phenolic, mineral, and amino acid composition of escarole (*Cichorium endivia* L. var. latifolium). *Scientia Horticulturae*, **239**, 87-92.
- Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J. (2007): Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **55**, 315-327.
- Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. (2016): Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, **5**, e47.
- Paschalidis K., Tsaniklidis G., Wang B.-Q., Delis C., Trantas E., Loulakakis K., Makky M., Sarris P. F., Ververidis F., Liu J.-H. (2019): The Interplay among Polyamines and Nitrogen in Plant Stress Responses. *Plants*, **8**, 315.
- Patil S. T., Kadam U. S., Mane M. S., Mahale D. M., Dekale J. S (2020a): Hydroponic Nutrient Solution: A Review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, New Delhi, India, **9**, 2095-2099.
- Patil S. T., Kadam U. S., Mane M. S., Mahale D. M., Dhekale J. S. (2020b): Hydroponic Growth Media (Substrate): A Review. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*, **21**, 106-113.
- Paton A. et al. (1999): *OCIMUM: Overview of classification and relationships*. In: *Basil. The Genus Ocimum*. (Hiltunen R. a Holm Y.), Department of Pharmacy, University of Helsinki, Finland, 1-38.
- Perveen S. (2018): Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. In: *Terpenes and Terpenoids* (Perveen S., Al-Taweel A.), IntechOpen, UK, 153 stran.
- Putievsky E. (1983): Temperature and day-length influences on the growth and germination of sweet basil and oregano. *Journal of Horticultural Science*, **58**, 583-587.
- Putievsky E., Galambosi B. (1999): Production systems of sweet basil. In: *Basil. The Genus Ocimum*. (Hiltunen R. a Holm Y.), Department of Pharmacy, University of Helsinki, Finland, 39-65.
- Rashmi H. B., Negi P. S. (2020): Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health. *Food Research International*, **136**, 109298.
- Rodríguez-Delfín A., Gruda N., Eigenbrod C., Orsini F., Gianquinto G. (2017): Soil Based and Simplified Hydroponics Rooftop Gardens. In: *Rooftop Urban Agriculture*. (Orsini F., Dubbeling M., De Zeeuw H., Gianquinto G.), Springer International Publishing AG, Switzerland, 61-81.
- Runeberg P. A., Brusentsev Y., Rendon S. M. K., Eklund P. C. (2019): Oxidative Transformations of Lignans. *Molecules*, **24**, 300.
- Said-Al Ahl H. A. H., Meawad A. A., Abou-Zeid E. N., Ali M. S. (2010): Response of different basil varieties to soil salinity. *International Agrophysics*, **24**, 183-188.
- Santa-Cruz A., Acosta M., Pérez-Alfocea F., Bolarin M. C. (1997): Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiologia Plantarum*, **101**, 341-346.

- Sardare M. D., Admane S. V. (2013): A Review on Plant Without Soil – Hydroponics. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, **2**, 299-304.
- Saxena S. C., Kaur H., Verma P., Petla B. P., Andugula V. R., Majee M. (2013): Osmoprotectants: Potential for Crop Improvement Under Adverse Conditions. In: *Plant acclimation to environmental stress*. Springer, New York, 493 stran.
- Scagel C. F., Lee J., Mitchell J. N. (2019): Salinity from NaCl changes the nutrient and polyphenolic composition of basil leaves. *Industrial Crops & Products*, **127**, 119-128.
- SEMO.cz: <https://www.semo.cz/eshop/bazalka-prava-manes-prodej-osivo-semena-p5894/> (29.3.2021).
- Sharafzadeh S., Alizadeh O. (2011): Nutrient Supply and Fertilization of Basil. *Advances in Environmental Biology*, **5**, 956-960.
- Sharma N., Acharya S., Kumar K., Singh N., Chaurasia O. P. (2018): Hydroponics as an advanced technique for vegetable production: An overview. *Journal of Soil & Water Conservation*, **17**, 364-371.
- Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardway R., Landi M., Zheng B. (2019): Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*, **24**, 2452.
- Sienkiewicz M., Lysakowska M., Pastuszka M., Bienias W., Kowalczyk E. (2013): The Potential of Use Basil and Rosemary Essential Oils as Effective Antibacterial Agents. *Molecules*, **18**, 9334-9351.
- Sifola M. I., Barbieri G. (2006): Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Scientia Horticulturae*, **108**, 408-413.
- Simon J. E., Reiss-Bubenheim D., Joly R. J., Charles D. J. (1992): Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. *Journal of Essential Oil Research*, **4**, 71-75.
- Simon-Sarkadi L., Kocsy G., Sebestyén Z. (2002): Effect of salt stress on free amino acid and polyamine content in cereals. *Plant Physiology*, **46**, 73-75.
- Skrubis B., Markakis P. (1976): The effect of photoperiodism on the growth and the essential oil of *Ocimum basilicum* (sweet basil). *Economic Botany*, **30**, 389-393.
- Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W. (2010): *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 912 stran.
- Sörensen L., Henriksen K. (1992): Effects of seed rate, plastic covering, and harvest time on yield and quality of Danish grown basil (*Ocimum basilicum*). *Danish Journal of Plants and Soil Science*, **96**, 499-506.
- Spanik I., Horvathova G., Janacova A., Krupcik J. (2007): On the use of solid phase ion exchangers for isolation of amino acids from liquid samples and their enantioselective gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, **1150**, 145-154.
- Sparkman O. D., Penton Z. E., Kitson F. G. (2011): *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. 2nd ed., Academic Press, Oxford, UK, 611 stran.
- Stephane F. F. Y., Jules B. K. J. (2020): Terpenoids as Important Bioactive Constituents of Essential Oils. In: *Essential Oils, Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications* (Oliveira M. S., Costa W. A., Silva S. G), IntechOpen, UK.
- Šamec D., Karalija E., Šola I., Bok V. V., Salopek-Sondi B. (2021): The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants*, **10**, 118.
- Taibi G., Schiavo M. R., Gueli M. C., Rindina P. C., Muratore R., Nicotra C. M. (2000): Rapid and simultaneous high-performance liquid chromatography assay of polyamines and monoacetylpolyamines in biological specimens. *Journal of Chromatography B*, **745**, 431-437.
- Thoma F., Somborn-Schulz A., Schlehuber D., Keuter V., Deerberg G. (2020): Effects of Light on Secondary Metabolites in Selected Leafy Greens: A Review. *Frontiers in Plant Science*, **11**, 1-15.
- Trejo-Téllez L. I., Gómez-Merino F. C. (2012): Nutrient Solutions for Hydroponic Systems. In: *Hydroponics – A standart Methodology for Plant Biological Researches*. (Asao T.), InTech Europe, Croatia, 1-22.

- Valifard M., Mohsenzadeh S., Kholdebarin B., Rowshan V. (2014): Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. *South African Journal of Botany*, **93**, 92-97.
- Vogt T. (2010): Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, **3**, 2-20.
- Walters D. R. (2003): Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, **64**, 97-107.
- Wang M., Shen Q., Xu G., Guo S. (2014): New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. (Jeon K. W.), Elsevier, 1-37.
- Wojtunik-Kulesza K. A., Kasprzak K., Oniszczyk T., Oniszczyk A. (2019): Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent. *Chemistry & Biodiversity*, **16**, e1900434.
- Wome B. (1982): Febrifuge and antimalarial plants from Kisangani, upper Zaire. *Bulletin de la Societe Royale de botanique de Belgique*, **115**, 243-250.
- Zhou B., Xiao J. F., Tuli L., Ransom H. W. (2012): LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*, **8**, 470-481.
- Zhu J. (2016): Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell Press*, **167**, 313-324.



## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ECN	národní evidenční číslo
Fd-GOGAT	ferredoxin-glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasa
FDP	farnesyldifosfát
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (angl. „gas chromatography – mass spectrometry“)
GDH	glutamádehydogenasa
GDP	geranyldifosfátu
GS/GOGAT	glutaminsynthetasa/glutamin-2-oxoglutarát- aminotransferasa
HILIC	chromatografie založená na hydrofilních interakcích
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMGS	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoAsynthasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. „high-performance liquid chromatography“)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (angl. „liquid chromatography – mass spectrometry“)
MEP	2C-methyl-D-erytritol-4-fosfát
MRM	monitorování mnoha reakcí (angl. „multiple reaction monitoring“)
m/z	hmotnost/náboj
NADH-GOGAT	nikotinamidadenindinukleotid-glutamin-2-oxoglutarát- aminotransferasa
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. „ultra high-performance liquid chromatography“)
UHPLC-MS/MS	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií