

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Optimalizace podmínek hydroponického pěstování  
vybraných druhů máty**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Jana Šišková</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Ing. Sanja Čavar Zeljković, Ph.D.</b>
Rok:	2021

## **Prohlášení**

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 25. 7. 2021

.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a věnovaný čas. Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Petrovi Tarkowskému, Ph.D. za všestrannou pomoc, kterou mi poskytl při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Nurii De Diego Sanchez, Ph.D. za odborné rady. Poděkování patří zaměstnancům instituce VÚRV, v.v.i. za pomoc při realizaci experimentální části diplomové práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Šišková
Název práce	Optimalizace podmínek hydroponického pěstování vybraných druhů máty
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	2021

### Abstrakt

Rod máty (*Mentha* L.) je široce využíván v zemědělství, potravinářském průmyslu a medicíně. Důležitým parametrem pro zhodnocení kvality rostlin máty je obsah sekundárních metabolitů. Teoretická část diplomové práce se zabývá hydroponickým pěstováním máty. Práce je zaměřena na abiotický stres rostlin a vliv vybraných stresorů na metabolismus dusíku a na obsah sekundárních metabolitů. Práce byla provedena s cílem sledování vlivu abiotického stresu na složení tří vybraných genotypů máty a zhodnocení jejich kvality.

V praktické části byla pomocí tří experimentů provedena optimalizace hydroponického pěstování rostlin máty. Rostliny byly pěstovány za kontrolovaných podmínek. Kontrolním roztokem bylo Hoaglandovo médium o ½ síle (½ HM). V průběhu pěstování byly rostliny stresovány sníženým i zvýšeným příjmem dusičnanů a solným stresem a byly sledovány změny v hladinách jednotlivých metabolitů. Stěžejním experimentem bylo semihydroponické pěstování ve fenotypizačním systému Plantscreen conveyor, kdy bylo prováděno měření fluorescence chlorofylu a RGB zobrazení rostlin. Pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (UHLPC-MS/MS) byla provedena analýza volných polyaminů, aminokyselin a fenolických sloučenin v rostlinném materiálu. Majoritně zastoupenou fenolickou sloučeninou byla ve všech vzorcích kyselina rozmarýnová. Identifikace a kvantifikace terpenoidů byla provedena s využitím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Složení genotypů odpovídalo předchozím studiím. Majoritně zastoupeným terpenoidem *M. arvensis* byl karvon. Piperitenon oxid byl dominujícím terpenoidem genotypů *M. piperita* a *M. spicata*.

U jednotlivých genotypů máty byla zaznamenána odlišná odezva na působení abiotického stresu. Z hlediska morfologie rostlin bylo nejvhodnějším médiem pro pěstování *M. arvensis* i *M. piperita* kontrolní ½ HM, pro pěstování *M. spicata* to byl roztok se sníženou koncentrací dusičnanů. Jako nepříznivý pro pěstování genotypu *M. arvensis* se s ohledem na změny v hladinách metabolitů jevil stres příjmem dusičnanů. Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými genotypy byly zaznamenány zejména v toleranci solného stresu. Jako nejtolerantnější se z hlediska složení aminokyselin, polyaminů a fenolických látek vůči solnému stresu jeví genotyp

*M. piperita*, naopak nejméně tolerantním genotypem je *M. spicata*. Poznatky zjištěné v diplomové práci nasvědčují tomu, že studium podmínek pěstování jednotlivých genotypů máty je nezbytné pro zlepšování kvality rostlin.

Klíčová slova	Druhy máty, živné roztoky, hydroponie, sekundární metabolity, GC-MS, LC-MS
Počet stran	110
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jana Šišková
Title	Optimizing hydroponic growth conditions for selected <i>Mentha</i> species
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc
Supervisor	Ing.Sanja Čavar Zeljković, Ph.D.
The year of presentation	2021

### Abstract

Plants of genus *Mentha* are widely used in agriculture, the food industry, and medicine. The content of secondary metabolites is an important parameter for the quality assessment of mint plants. The theoretical part of the diploma thesis deals with the hydroponic cultivation of mint. The thesis is focused on abiotic plant stress and the influence of selected abiotic stressors on nitrogen metabolism and the content of secondary metabolites. The thesis aimed to observe the influence of abiotic stress on the composition of three selected mentha genotypes and to evaluate their quality.

In the experimental part of the thesis optimizing of hydroponic growth conditions of mint plants were performed using three consecutive experiments. Plants were cultivated under controlled conditions. The control solution was Hoagland half-strength medium ( $\frac{1}{2}$  HM). Plants were stressed during the cultivation using low and high nitrate intake and salt stress and changes in levels of metabolites were monitored. The main experiment was semi hydroponic cultivation in phenotyping system Plantscreen conveyor, where measurement of chlorophyll fluorescence and RGB imaging of plants was performed. Using ultra-high performance liquid chromatography with mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) the analysis of free polyamines, amino acids, and phenolics in plant material was carried out. Rosmarinic acid was found to be the major phenolic compound in all genotypes. Identification and quantification of terpenoids were performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The composition of all mint genotypes corresponds with previous studies. The most abundant terpenoid of *M. arvensis* was carvone. Piperitenone oxide was the most dominant terpenoid of *M. piperita* and *M. spicata* genotypes.

Different abiotic stress responses were observed among genotypes. Regarding plant morphology, the optimal solution for growing *M. arvensis* and *M. piperita* in hydroponics was a control solution ( $\frac{1}{2}$  HM), for *M. spicata* it was the solution with low nitrate concentration. Considering changes in metabolite levels, nitrate stress appeared to be unfavorable for the soilless growing of *M. arvensis*. Significant differences in salt stress tolerance between the selected genotypes were observed. According to amounts of free polyamines, amino acids, and phenolic compounds, *M. piperita* appears to be the most salt-tolerant. On the contrary, the least tolerant to salt

stress seems to be genotype *M. spicata*. Findings of the diploma thesis suggest that the study of growth conditions in different mint genotypes is necessary for improving the quality of plants.

Keywords	<i>Mentha</i> species, nutrient solutions, hydroponics, secondary metabolites, GC-MS, LC-MS
Number of pages	110
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	11
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	12
2.1	Rod máty	12
2.1.1	Vybrané druhy máty	13
2.2	Pěstování máty	14
2.2.1	Pěstování v půdě	14
2.2.2	Hydroponie	15
2.2.2.1	Hydroponické substráty	15
2.2.2.2	Typy hydroponických systémů	17
2.2.2.3	Živné roztoky	18
2.3	Abiotický stres	21
2.3.1	Vliv obsahu makroprvků na růst rostlin máty	21
2.3.1.1	Stres rostlin způsobený nedostatkem či nadbytkem dusíku	21
2.3.1.2	Stres rostlin způsobený nedostatkem či nadbytkem fosforu	22
2.3.2	Solný stres	22
2.4	Vliv abiotického stresu na metabolismus rostlin máty	25
2.4.1	Metabolismus dusíku	25
2.4.2	Vliv abiotického stresu na metabolismus dusíku v rostlinách máty	27
2.4.2.1	Vliv příjmu dusičnanů na metabolismus dusíku	27
2.4.2.2	Vliv solného stresu na metabolismus dusíku	29
2.4.3	Metody studia vlivu abiotického stresu na metabolismus dusíku	31
2.4.3.1	Technika HPLC	31
2.4.3.1.1	Stanovení aminokyselin pomocí HPLC	33
2.4.3.1.2	Stanovení polyaminů pomocí HPLC	34
2.5	Vliv abiotického stresu na obsah sekundárních metabolitů máty	35
2.5.1	Vliv příjmu dusičnanů na obsah sekundárních metabolitů	35
2.5.2	Vliv solného stresu na obsah sekundárních metabolitů	36
2.5.3	Metody analýzy sekundárních metabolitů máty	37
2.5.3.1	GC-MS analýza terpenoidů	37
2.5.3.2	HPLC analýza fenolických látek	38
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	39
3.1	Materiál	39
3.1.1	Chemikálie	39
3.1.2	Biologický materiál	40
3.1.3	Přístrojové vybavení	41
3.2	Metody	42
3.2.1	Optimalizace podmínek hydroponického pěstování máty	42
3.2.1.1	Hydroponické pěstování máty ve fytotronu	42
3.2.1.2	Semihydroponické pěstování máty ve fytotronu	44
3.2.1.3	Semihydroponické pěstování máty ve fenotypizačním zařízení Plantscreen conveyor system	46
3.2.2	Příprava rostlinného materiálu pro analýzu	48
3.2.3	Analýza dusíkatých sloučenin	48
3.2.3.1	Analýza polyaminů pomocí UHPLC-MS/MS	48
3.2.3.2	Analýza aminokyselin pomocí UHPLC-MS/MS	51



3.2.4	Analýza sekundárních metabolitů máty	56
3.2.4.1	Analýza fenolických sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS	56
3.2.4.2	Analýza terpenoidů pomocí GC-MS	61
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>64</b>
4.1	Optimalizace hydroponického pěstování máty	64
4.1.1	Hydroponické pěstování máty ve fytotronu	64
4.1.2	Semihydroponické pěstování máty ve fytotronu	65
4.1.3	Semihydroponické pěstování máty ve fenotypizačním zařízení Plantscreen conveyor system	67
4.2	Analýza polyaminů a aminokyselin	69
4.3	Analýza sekundárních metabolitů máty	78
4.3.1	Analýza fenolických sloučenin	78
4.3.2	Analýza terpenoidů	86
<b>5</b>	<b>Diskuse</b>	<b>93</b>
5.1	Optimalizace hydroponického pěstování máty	93
5.2	Vliv abiotického stresu na obsah polyaminů a aminokyselin	94
5.3	Vliv abiotického stresu na obsah sekundárních metabolitů	97
5.3.1	Vliv abiotického stresu na obsah fenolických sloučenin	97
5.3.2	Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů	99
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Literatura</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>110</b>

**Cíle práce:**

1. Vypracování literární rešerše s využitím klíčových slov: druhy máty, živné roztoky, hydroponie, sekundární metabolity, GC-MS, LC-MS.
2. Srovnání metod hydroponického pěstování rostlin.
3. Sledování vlivu abiotického stresu na vlastnosti vybraných druhů máty.
4. Aplikace metod izolace a analýzy sekundárních metabolitů rostlin.

# 1 ÚVOD

Čeleď *Lamiaceae* (Hluchavkovité) je významnou rostlinnou čeledí zahrnující rod *Mentha* (rod máty). Rostliny rodu máty obsahují velké množství bioaktivních sloučenin, z nichž těmi nejdůležitějšími jsou terpenoidy a fenolické sloučeniny. Tyto sekundární metabolity odpovídají za biologické účinky rostlin máty. Mezi nejvýznamnější účinky patří antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Čeleď *Lamiaceae* je rozšířena kosmopolitně a má široké využití.

Alternativou k běžnému pěstování rostlin v půdě je využití hydroponického pěstování. Hydroponie je pěstování rostlin v živných roztocích za kontrolovaných podmínek. Tento způsob pěstování má řadu výhod oproti pěstování v půdě. Nevýhodami tradičního pěstování v půdě jsou interakce s patogeny, nežádoucí environmentální vlivy, nedostatek makro- a mikronutrientů a možné využití pesticidů. Využití hydroponie umožňuje kontrolovaný přísun nutrientů rostlinám a zvýšení efektivity recyklace vody. Již v minulosti byl v řadě studií prokázán větší výnos a vyšší obsah sekundárních metabolitů u hydroponicky pěstovaných rostlin ve srovnání s rostlinami pěstovanými v půdě. Pěstování v živných roztocích bývá často využíváno při sledování vlivu stresu na vlastnosti plodin.

Existuje mnoho environmentálních stresových faktorů, které působí nepříznivě na růst rostlin. Jedná se zejména o teplotní stres, UV záření, sucho, nedostatek nutrientů a solný stres. V dnešní době je velkým problémem při pěstování plodin zasolení půdy. Důsledkem solného stresu u rostlin může být osmotický stres, snížení absorpce makro- a mikroprvků a v konečném důsledku redukce výnosu. Při odpovědi na abiotický stres hrají významnou roli osmolyty, mezi které jsou zařazovány například polyaminy a aminokyselina prolin. Jedná se o látky s osmoprotektivními účinky a k jejich akumulaci může docházet v rostlinách vystavených stresu.

Abiotický stres má významný vliv na syntézu sekundárních metabolitů, což může nepříznivě ovlivňovat kvalitu plodin. Proto je tato práce zaměřena na vliv abiotického stresu, konkrétně stresu nízkým i vysokým příjmem dusičnanů a solného stresu, na metabolismus dusíku a obsah sekundárních metabolitů ve vybraných genotypech hydroponicky pěstované máty, s cílem zhodnocení vlivu těchto stresorů na kvalitu vybraných genotypů.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rod máty

Rod máty (*Mentha*) je řazen do čeledi dvouděložných rostlin Lamiaceae (Hluchavkovité). Čeleď Lamiaceae zahrnuje přibližně 236 rodů a více než 7000 druhů, rozšířených celosvětově. Rostliny této čeledi jsou aromatické a mají nejčastěji čtyřhrannou lodyhu. Typická je přítomnost žlaznatých trichomů na povrchu listů, jež produkují silice. Ty se vyznačují antimikrobiálními a antioxidačními účinky. Rostliny čeledi Lamiaceae jsou využívány zejména ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, dále pak v medicíně a parfumerii (Khoury *et al.*, 2016).

Jeden z nejvýznamnějších rodů, *Mentha*, zahrnuje 18 základních druhů a 11 přirozeně se vyskytujících hybridů (Tucker a Naczi, 2007). Rod máty je specifický vysokým obsahem sekundárních metabolitů. Jedná se zejména o terpenoidy a fenolické látky, které mají významné biologické účinky. Sekundární metabolity poskytují rostlině ochranu před škůdci. Rostliny máty jsou využívány komerčně k produkci silic. Silice máty jsou majoritně složené z terpenoidů (monoterpenů, seskviterpenů a jejich derivátů) a mají lipofilní a těžký charakter. Terpenoidy (isoprenoidy) jsou nízkomolekulární látky, které jsou biosyntetizovány ze základních jednotek isopentenylidifosfátu nebo dimethylalylidifosfátu. Produktem jejich rozkladu je isopren (2-methyl-buta-1,3-dien). Majoritními složkami silic máty jsou látky menthol, limonen, eukalyptol,  $\beta$ -pinen, pulegon a karvon. Tyto látky vykazují antimikrobiální, antioxidační a protizánětlivé účinky.

Sekundárními metabolity zastoupenými v rostlinách máty jsou kromě terpenoidů také fenolické látky. Jedná se zejména o fenolické kyseliny a flavonoidy. Příkladem fenolické kyseliny obsažené v mátě je kyselina rozmarýnová, které má antimikrobiální, antioxidační a protinádorové účinky. V řadě studií bylo zjištěno, že kyselina rozmarýnová vykazuje silnější antioxidační účinky než vitamin E či trolox (Lin *et al.*, 2002). Mezi flavonoidy obsažené v mátě patří luteolin či apigenin. Tyto látky zařazujeme obecně mezi šikimáty (fenylpropanoidy). V molekule je přítomen nejméně jeden ortho-disubstituovaný fenyl, nejčastěji dochází k substituci hydroxylovou skupinou (Nagy *et al.*, 2011).

### 2.1.1 Vybrané druhy máty

Taxonomicky je rozlišováno pět základních euroasijských a afrických druhů máty. Jedná se o *M. aquatica*, *M. arvensis*, *M. longifolia*, *M. spicata* a *M. suaveolens*, jejichž křížením došlo ke vzniku mnoha genotypů máty. *Mentha arvensis* (máta rolní) je trvalá bylina dorůstající výšky až 60 cm. Listy jsou pokryté chlupy a květy mívají světle fialové zbarvení. Jedná se o velmi proměnlivý druh, který roste ve vlhkých půdách. *Mentha arvensis* má antispasmodické, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Byla zjištěna velká variabilita ve složení silic. Majoritními složkami silic *M. arvensis* jsou nejčastěji menthol, terpinen-4-ol, linalool a geraniol (Tucker *et al.*, 1991).

*Mentha spicata* (máta klasnatá) dorůstá výšky až 100 cm. Lodyhy mají fialové zbarvení, barva květů je růžová či růzovofialová. Rostliny mají podlouhlé listy a jsou pokryté hustými chlupy. *Mentha spicata* je využívána zejména ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu (výroba zubních past). Majoritně zastoupenými polyfenoly v listech tohoto druhu máty jsou kyselina rozmarýnová, její deriváty a flavonoid luteolin (Fatiha *et al.*, 2015). V silici máty klasnaté je majoritně zastoupen monoterpen karvon, který vykazuje silné antioxidační účinky a odpovídá za typickou vůni tohoto genotypu. Silice často obsahuje také látky menthon, pulegon, limonen, eukalyptol a piperitenon oxid (Padalia *et al.*, 2013). V řadě studií byly zkoumány insekticidní účinky silice *M. spicata*. Bylo zjištěno, že silice bohatá na karvon a pulegon vykazuje silné insekticidní účinky vůči druhu *Drosophila* (Franzios *et al.*, 1997).

*Mentha piperita* (máta peprná) je přirozeným hybridem *M. spicata* (máty klasnaté) a *M. aquatica* (máty vodní). Dorůstá výšky až 80 cm. Tento genotyp je většinou pouze řídko ochlupený. Listy mají tmavě zelené zbarvení, květy jsou růžové. *M. piperita* má protizánětlivé, antiemetické a analgetické účinky. Nejčastěji bývá využívána v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Majoritní složkou silice je monoterpen menthol, který tvoří 30–55 % silice máty peprné (Kumar *et al.*, 2011). Menthol odpovídá za typické aroma tohoto genotypu. Vyskytuje se ve formě 4 diastereoisomerů (menthol, neomenthol, isomenthol, neoisomenthol). V silici jsou dále zastoupeny látky menthon, menthofuran, mentyl acetát a pulegon. Menthon a pulegon působí jako přírodní insekticidy. Mezi majoritně zastoupené polyfenoly v listech *M. piperita* patří eriocitrin, kyselina kávová, kyselina rozmarýnová, hesperidin a kyselina skořicová (Bodalska *et al.*, 2019).

## 2.2 Pěstování máty

Rostliny rodu máty jsou trvalé byliny, jež mají mělké kořeny. Nejvhodnější je pěstování v polostínu. Pro svůj růst vyžadují vlhké silně humózní půdy, tedy půdy obsahující nejméně 3 % humusu. Optimální teplota vzduchu pro pěstování máty je 15–25 °C. Dle studií vykazuje *M. piperita* větší odolnost vůči chladu než *M. spicata* (Morris, 2007). Generativní způsob rozmnožování (ze semene) je poměrně obtížný, proto je tento rod nejčastěji množen vegetativně – řízkováním. Principem je získání řízků z dospělých rostlin, které mají uniformní velikost (nejčastěji 10 cm). Je možné využít vrcholové či stonkové řízky. Vrcholové řízky jsou získávány z vrchní části výhonků, kde jsou přítomny mladé listy. Je nutné odstranit listy na spodní části řízku, aby bylo zamezeno zahnívání. Řízky jsou umístěny do vody k zakořenění a po vyvinutí kořenů dochází k jejich přesazení do půdy či umístění do hydroponického systému.

### 2.2.1 Pěstování v půdě

Fyzikálními faktory, které významně ovlivňují úrodnost půdy a růst rostlin, jsou textura a pórovitost půdy, půdní propustnost a retenční kapacita půdy (schopnost zadržovat vodu). Půdní úrodnost je dána obsahem půdní organické hmoty. Jedná se o část půdy tvořenou organickými látkami, které vznikly dekompozicí rostlin a těl živočichů. Tvoří až 6 % půdy (Kahkashan *et al.*, 2016).

Existuje řada environmentálních faktorů, které ovlivňují růst máty. Jedná se zejména o obsah živin v půdě, intenzitu osvětlení, teplotu vzduchu a relativní vlhkost. Pro pěstování máty je vhodná vlhká půda s vysokým obsahem organické hmoty. Optimální pH půdy pro pěstování máty je 6,0–7,5. Pro pěstování *M. piperita* je nejvhodnější pH půdy 6,2–7,0. Půdní pH má vliv na výslednou hmotnost rostlinného materiálu (čerstvou i suchou hmotu) a také na obsah silic v mátě (Shukla *et al.*, 1997).

Makroprvky dusík, fosfor a draslík jsou nezbytné pro růst rostlin. V řadě studií byl prokázán vliv těchto makroprvků na obsah silic v rostlinách máty a na jejich složení. Pro optimální výživu rostlin je nezbytné také pravidelné zavlažování ve vhodném množství. Nadbytek vody může indukovat nadměrné vyplavování dusíku z půdy. Naopak stres suchem způsobuje nižší obsah silic v rostlinách máty a zvýšení obsahu menthofuranu v silici (Morris, 2007).

## 2.2.2 Hydroponie

Hydroponie představuje pěstování rostlin v živných roztocích bez půdy za kontrolovaných podmínek. Při využití této metody je umožněna jednoduchá regulace přívodu živin. Hydroponické systémy mohou být rozdělovány na otevřené a uzavřené. V otevřených systémech nedochází k cirkulaci živných roztoků. Naopak v uzavřených systémech probíhá recyklace přebytečného množství nutrientů a je zvýšena účinnost využití vody. Hydroponicky mohou být rostliny pěstovány bez substrátu, nebo v jeho přítomnosti (Maucieri *et al.*, 2019).

Výhodou využití hydroponie je možnost recyklace živného roztoku, zvýšená kvalita kontroly růstu, vysoce regulovaný přívod nutrientů, zvýšení výnosu a ochrana rostlin před patogeny. Ve srovnání s rostlinami pěstovanými v půdě mají rostliny pěstované hydroponicky vyšší obsah sekundárních metabolitů (Grewal *et al.*, 2011). V řadě studií bylo zjištěno, že hydroponicky pěstované rostliny mají až o 61 % vyšší obsah silic než rostliny pěstované v půdě a při využití hydroponie dochází také ke zvýšení antioxidační a enzymatické aktivity (Surendran *et al.*, 2017). Hydroponické pěstování máty je vhodnou alternativou v oblastech, kde nejsou vhodné podmínky pro pěstování v půdě. Jedná se zejména o nevhodnou strukturu a pH půdy a nízký obsah makroprvků.

### 2.2.2.1 Hydroponické substráty

Inertní substráty jsou v hydroponii využívány pro ukotvení kořenů, podporu růstu rostlin a absorpci vody. Zajišťují také přísun vzduchu ke kořenům rostlin. Existuje mnoho typů hydroponických substrátů. Výběr vhodného substrátu probíhá na základě několika specifických vlastností, mezi které patří objemová hmotnost, pórovitost substrátu, vodní kapacita (schopnost zadržovat vodu), elektrická konduktivita, kationtová výměnná kapacita a pH (Maucieri *et al.*, 2019).

Objemová hmotnost je vyjádřena jako množství substrátu vztaženého na jednotku objemu. Optimální objemová hmotnost pro pěstování plodin je přibližně 150–500 kg.m<sup>-3</sup> (Wallach, 2008). Pórovitost substrátu vyjadřuje poměr objemu pórů a celkového objemu substrátu s póry. Pro hydroponické pěstování rostlin je vhodné použít substrát s nejméně 75% pórovitostí (Blok *et al.*, 2008). Kationtová výměnná kapacita (CEC) vyjadřuje množství kationtů, které mohou být zachyceny na povrchu daného

substrátu. Organické substráty mají obecně vyšší CEC a pufrací kapacitu než substráty anorganické. Substráty s nižším pH jsou použitelné pro větší množství rostlinných druhů.

Substráty využívané v hydroponii můžeme obecně rozdělovat na vláknité a zrnité. Vlákňité substráty se vyznačují vysokou vodní kapacitou (60–80 %). Mezi vláknité substráty patří kokosové vlákno, rašelina a minerální vata. Zrnité substráty, jako například písek či perlit, mají nižší vodní kapacitu (10–40 %), ale mají vysokou porozitu (Maher *et al.*, 2008). Dle povahy můžeme rozdělit substráty na organické, anorganické a syntetické. Mezi organické substráty patří rašelina a kokosové vlákno. Rašelina je produktem dekompozice rostlin za anaerobních podmínek. Tento materiál má vysokou vodní kapacitu a CEC. Kokosové vlákno je vlastnostmi podobné rašelině, má ale vyšší pH (5,0–6,8). Využívány jsou také dřevěné piliny, jejichž nevýhodou je ovšem nízká vodní kapacita a CEC a možnost akumulace toxických látek (Dorais *et al.*, 2006).

Mezi anorganické substráty využívané v hydroponii patří písek, pemza, perlit, vermikulit, zeolit, keramzit a minerální vata. Písek je přírodní anorganický substrát s průměrem částic od 0,05 do 2 mm. Vyznačuje se nízkou pufrací kapacitou a CEC, proto je vhodné jej kombinovat s organickými substráty (Mauricieri *et al.*, 2019). Perlit je inertní materiál, který vzniká teplotním zpracováním vulkanické horniny. Obsahuje přibližně 75 %  $\text{SiO}_2$  a 13 %  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Je to velmi lehký substrát, který má nízkou objemovou hmotnost. Vyznačuje se vysokou pórovitostí. Často je přidáván do jiných substrátů za účelem provzdušnění. Vermikulit patří mezi hydratované fylosilikáty, což jsou vrstevnaté jílové minerály. Má vysokou kationtovou výměnnou kapacitu a pórovitost (90–95 %). Tento substrát je využíván samostatně, nebo bývá používán ve směsi s perlitem či rašelinou (Malik *et al.*, 2014). Méně využívanými substráty v hydroponii jsou syntetické pěstební substráty, mezi které je řazen například pěnový polystyren.

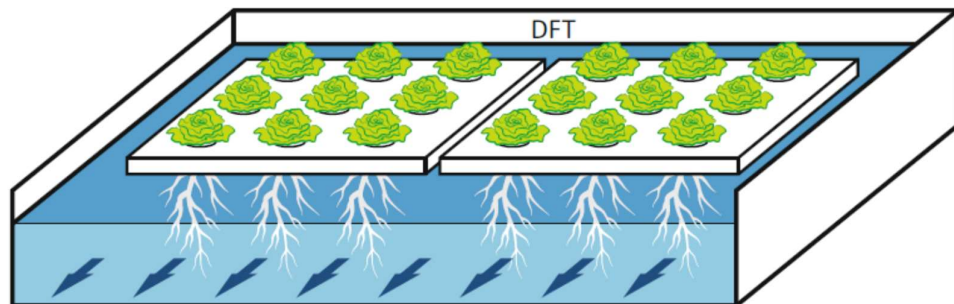
Pro hydroponické pěstování máty jsou nejčastěji využívány substráty kokosové vlákno, minerální vata, perlit či zeolit. Výhodou využití kokosového vlákna je jeho vysoká schopnost zadržovat vodu. V řadě studií bylo prokázáno, že tento substrát s velkou účinností odpuzuje hmyz (Giurgiu *et al.*, 2014). Minerální vata (rockwool) je jedním z nejpoužívanějších hydroponických substrátů. Jedná se o velmi porézní materiál s vysokou vodní kapacitou a s vláknitou strukturou. Pro pěstování máty v živných roztocích lze také využívat směsi organických a anorganických substrátů, například směs kokosového vlákna s perlitem.



### 2.2.2.2 Typy hydroponických systémů

Mezi základní typy hydroponických systémů patří NFT (Nutrient Film Technique), raftový systém DFT (Deep Flow Technique), aeroponie a semihydroponické pěstování. Dle recyklace živných roztoků můžeme hydroponické systémy rozdělit na recirkulační a RTW (Run To Waste) systémy. Mezi recirkulační typy hydroponie patří například NFT, DFT a aeroponie.

Hydroponický systém DFT, nazývaný také Deep Water Technique, představuje pěstování rostlin na plovoucích raftech či deskách umístěných v nádobách vysokých 20–30 cm obsahujících 10–20 cm živného roztoku (Van Os *et al.*, 2008). Plovoucí rafty, které mohou být vyrobeny z pěnového polystyrenu či polyethylenu, slouží k nadnášení rostlin na hladině (Obr. 1). V živném roztoku jsou umístěny pouze kořeny rostlin. Je nutná přítomnost vzduchovací pumpy za účelem dodání kyslíku kořenům. Optimální teplota roztoku v DFT systému je do 23 °C, při vyšších teplotách dochází ke snižování rozpustnosti kyslíku.



Obr. 1 Schéma hydroponického raftového systému DFT. Převzato z: Goddek *et al.*, 2019.

V NFT (Nutrient Film Technique) systému, nazývaném také technika živného filmu, dochází neustále k cirkulaci živného roztoku. Systém se skládá z krytých žlabů (nejčastěji PVC potrubí), z rezervoáru a vodního čerpadla. V NFT systému je přítomna pouze tenká vrstva živného roztoku (vysoká 1–2 cm). Hydroponický systém má lehký sklon, živný roztok tudíž omývá kořeny a díky gravitaci dochází k jeho sběru v rezervoáru. Odtud je poté znovu pumpován do hydroponického systému. Výhodou tohoto systému je recirkulace živného roztoku a nepřítomnost substrátu.

Při aeroponii visí rostliny volně ve vzduchu v pěstebních nádobách a pomocí ultrazvukového rozprašovače dochází k rozstříkování živného roztoku přímo na kořeny. Doba postřiku je od 30 do 60 sekund. Frekvence postřiku závisí na daném rostlinném druhu, na fázi vývoje rostlin a na době kultivace. Na dně nádoby je shromažďován živný roztok, který je poté skladován v rezervoáru a dochází k jeho opětovnému použití. Výhodou aeroponie je nepřítomnost substrátu a možnost recirkulace živných roztoků. Při využití aeroponického pěstování je kořenům rostlin poskytováno maximální množství kyslíku. Jedná se ovšem o finančně náročný typ hydroponie (Mauricieri *et al.*, 2019).

Při využití semihydroponického pěstování jsou rostliny umístěny v květináčích s příslušným inertním porézním substrátem. Semihydroponie patří mezi otevřené hydroponické systémy, nazývané také RTW (Run to waste). Jedná se o velmi jednoduchou hydroponickou techniku. Nedochází k recyklaci živného roztoku, do pěstebních nádob je přidán vždy nový podíl živného roztoku. Přebytečný živný roztok odtéká z květináče do podmisky. Jelikož nedochází k cirkulaci živného roztoku, není nutná přítomnost čerpadla a vzduchovací pumpy.

### **2.2.2.3 Živné roztoky**

Pro růst vyšších rostlin je nutná přítomnost 17 esenciálních prvků, které se dělí na makro– a mikrobiogenní prvky. Mezi makroprvky, které rostliny potřebují v poměrně velkém množství, patří uhlík, vodík, kyslík, dusík, fosfor, draslík, vápník, síra a hořčík. Mikroprvky jsou rostlinami přijímány pouze ve stopovém množství. Patří mezi ně železo, chlor, mangan, bor, zinek, měď, nikl a molybden. Kromě makro– a mikroprvků využívají rostliny pro svůj růst také křemík, kobalt, vanad a platinu (Trejo-Téllez *et al.*, 2007).

Při hydroponickém pěstování jsou kořeny v kontaktu s živným roztokem, který musí obsahovat množství esenciálních prvků optimální pro růst příslušných druhů rostlin. Živné roztoky jsou připravovány rozpouštěním solí makro- a mikroprvků ve vodě. Využívány jsou také anorganické kyseliny, jako například kyselina boritá či fosforečná. Dostupnost prvků je závislá na pH živného roztoku. Optimální pH živného roztoku pro pěstování rostlin je 5,5–6,5 (Sonneveld a Voogt, 2009). Při zvýšení pH nad hodnotu 7 dochází v živném roztoku k precipitaci kationtů  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$ .

Fosfor je rostlinami přijímán nejčastěji ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$  či  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Při hydroponickém pěstování je nejvyšší množství fosforu v živném roztoku, jehož pH je lehce kyselé (pH = 5–6), naopak v zásaditém prostředí dochází k výraznému poklesu jeho koncentrace (Dýsko *et al.*, 2008). Dusík mohou rostliny přijímat ve formě iontů  $\text{NH}_4^+$  či  $\text{NO}_3^-$ . V případě absorpce amonných iontů dochází k okamžité syntéze aminokyselin a jiných sloučenin obsahujících redukováný dusík. Pokud živný roztok obsahuje dusičnany, dochází před asimilací dusíku nejprve k jejich redukcí. V živných roztocích jsou nejčastěji využívány dusičnany. Příjem amonných iontů způsobuje nadměrný růst rostlin i za podmínek nedostatečného osvětlení, amonné soli mohou být tudíž využívány jako rychlý zdroj dusíku při jeho výrazném deficitu (Resh, 2013).

Pro přípravu živných roztoků jsou kromě rozpustných anorganických solí využívány také cheláty, které slouží k zajištění optimálního příjmu železa. Jako organické chelatační činidlo, které váže kovové ionty, je využívána nejčastěji EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) či EDDHA (kyselina ethylendiamindihydroxyfenyloctová). EDTA má vysokou afinitu ke kationtům železa. Rozpustnost této kyseliny ve vodě se zvyšuje tvorbou solí. Při hydroponii je EDTA přidávána do živného roztoku ve formě disodné či didraselné soli. Po přidání do roztoku obsahujícího kationty železa dojde k uvolnění draselných či sodných kationtů a vytváří se stabilní komplexy chelátů železa, čímž je zabráněno precipitaci tohoto prvku (Vadas *et al.*, 2007).

Existuje mnoho typů živných roztoků pro hydroponii. Jedná se zejména o Hoaglandův živný roztok (Hoagland a Arnon, 1938), Hewittův roztok (Hewitt, 1966) a Steinerův roztok (Steiner, 1984). Složení těchto živných roztoků je uvedeno v Tab. 1. Při hydroponickém pěstování máty je nejčastěji využíván Hoaglandův živný roztok, který je univerzálním živným roztokem pro hydroponii. Poprvé byl představen již v roce 1933.

V současnosti je používán modifikovaný Hoaglandův roztok, jelikož v historii došlo k řadě změn v koncentraci mikroprvků. Pro přípravu Hoaglandova roztoku jsou využívány následující sloučeniny:  $\text{KNO}_3$  (dusičnan draselný),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (tetrahydrát dusičnanu vápenatého),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (kyselina boritá),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  nebo  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (dihydrogenfosforečnan draselný nebo amonný), sírany ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (dihydrát molybdenanu sodného),  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (tetrahydrát chloridu manganatého) a  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  či  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  (Malhotra *et al.*, 2014).

Tab. 1 Koncentrace prvků v hydroponických živných roztocích. Upraveno dle: Trejo-Téllez *et al.*, 2007.

<b>PRVEK</b>	<b>HOAGLAND A ARNON (1938)</b>	<b>HEWITT (1966)</b>	<b>STEINER (1984)</b>
	Koncentrace [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]		
<b>N</b>	210	168	168
<b>P</b>	31	41	31
<b>K</b>	234	156	273
<b>Ca</b>	160	160	180
<b>Mg</b>	34	36	48
<b>S</b>	64	48	336
<b>Fe</b>	2,5	2,8	2–4
<b>Cu</b>	0,02	0,064	0,02
<b>Zn</b>	0,05	0,065	0,11
<b>Mn</b>	0,5	0,54	0,62
<b>B</b>	0,5	0,54	0,44
<b>Mo</b>	0,01	0,04	-

## 2.3 Abiotický stres

Biotický stres u rostlin je vyvolán působením živých organismů. Abiotický stres je vyvolán fyzikálními či chemickými vlivy, nazývanými také abiotické faktory. Mezi abiotické stresové faktory působící na rostliny patří intenzita světla, teplota vzduchu, nadbytek nebo nedostatek vody, vítr, zasolení půdy a koncentrace prvků v půdě či v živném roztoku. Abiotický stres má negativní účinky na růst a vývoj rostlin. Jeho vlivem může dojít k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), ke zvýšené denaturaci proteinů, snížené pevnosti membrán a ke změnám v metabolismu rostlin (Taiz a Zeiger, 2010).

### 2.3.1 Vliv obsahu makroprvků na růst rostlin máty

#### 2.3.1.1 Stres rostlin způsobený nedostatkem či nadbytkem dusíku

Pro růst rostlin máty a vývoj listů je nezbytný vyvážený příjem dusíku během vegetačního období. Vývoj zdravých listů je nutný pro optimální produkci silic máty, jelikož na povrchu listů jsou přítomny žlaznaté trichomy, které odpovídají za tvorbu silic. V řadě studií bylo prokázáno, že nadbytek dusíku způsobuje výrazné snížení obsahu silic v rostlinách máty (Nilson *et al.*, 2001).

Průměrný obsah dusíku v rostlinách je  $15 \text{ mg.g}^{-1}$  sušiny (Smith *et al.*, 2009). Dusík je základní součástí sloučenin, které tvoří těla rostlin, zejména proteinů a nukleových kyselin. Tento makroprvek je potřebný pro syntézu chlorofylu, a tedy pro účinnost fotosyntézy. Nedostatek dusíku se projevuje u rostlin výrazným sníženým růstem. Listy se vyznačují malou velikostí a kvůli nízkému obsahu chlorofylu mají světle zelené či žluté zbarvení (chloróza). Postupně dochází k opadávání starších listů a k tvorbě nitkovitých kořenů. Při deficienci dusíku mohou mít stonky fialové zbarvení, které je způsobeno zvýšenou tvorbou antokyanů. Tyto pigmenty jsou řazeny mezi flavonoidy a jsou syntetizovány ze sacharidů nevyužitých v metabolismu dusíku (Silva *et al.*, 2014).

Nadbytek dusíku se u rostlin projevuje zvýšeným růstem listů, které jsou ovšem chabé a mají tmavě zelené zbarvení. Kvůli nadměrnému množství listů jsou lodyhy oslabené a může docházet k poléhání rostlin. Vegetační doba je prodloužena, kvetení je zastaveno či výrazně zpomaleno. Postupně dochází ke kroucení listů. Rostliny pěstované při nadbytku dusíku jsou náchylné k napadení patogeny (Resh, 2013).

### 2.3.1.2 Stres rostlin způsobený nedostatkem či nadbytkem fosforu

Rostliny přijímají fosfor ve formě  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  či  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Fosfátové anionty mohou být navázány na organické sloučeniny procesem fosforylace. V rostlinách je fosfor zastoupen ve sloučeninách s vysokým energetickým obsahem. Je součástí nukleotidů ATP, CTP, UTP, TTP a GTP, jež polymerují za vzniku nukleových kyselin. Fosfor má významnou funkci při transportu sacharidů v rostlinách. U rostlin stimuluje vývoj kořenů, růst pupenů a tvorbu květů (Goddek *et al.*, 2019).

Při nedostatku fosforu je zpomalen růst, rostliny jsou zakrnělé a vyznačují se tmavě zeleným či fialovým zbarvením starších listů. Stejně jako při deficienci dusíku může probíhat akumulace antokyanů. Listy mají malou velikost, velmi slabou žilnatinu a dochází k jejich časnému opadu. Při využití hydroponického pěstování rostlin dochází k výraznému snížení příjmu fosforu při nízkých teplotách ( $t < 13\text{ }^\circ\text{C}$ ), či při zvýšení pH nad hodnotu 6,5 (Vance *et al.*, 2003).

Nadbytek fosforu u rostlin není příliš častý. Vysoký příjem fosforu má na růst rostlin podobný vliv jako nadbytek draslíku, dochází k urychlení stárnutí rostlin a snížení výnosu. Vysoký příjem fosforu může také způsobit druhotný nedostatek dalších prvků. Fosfor působí antagonisticky k řadě mikroprvků, při jeho nadbytku dochází například ke snížení absorpce železa, mědi či zinku (Uchida, 2000).

### 2.3.2 Solný stres

Termín salinita představuje zvýšenou akumulaci solí v půdě či v živném roztoku. Vysoké koncentrace solí (zejména iontů  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$ ) mohou vyústit ve stres rostlin. V přírodě nejčastěji způsobuje solný stres rostlin chlorid sodný. Důsledkem solného stresu je snížení výnosu a kvality plodin. Dle tolerance k solnému stresu můžeme rostliny rozdělit na halofyty a glykofyty. Halofyty mají vysokou toleranci k zasolení (Bose *et al.*, 2014). Mezi halofyty je řazeno asi 1 % suchozemských rostlin. Glykofyty jsou velmi citlivé k zasolení a již při nízkých koncentracích chloridu sodného dochází k jejich odumírání. Ze studií vyplývá, že rostliny rodu máty mají mírnou citlivost k solnému stresu (Tabatabaie *et al.*, 2007). Rostliny mohou být označovány jako vysoce citlivé na solný stres v tom případě, že dochází k 50% redukci hmotnosti sušiny proti kontrole při použití chloridu sodného o koncentraci  $50\text{ mmol.l}^{-1}$  (Maas a Hoffmann, 1977).

S výjimkou některých C4 rostlin nejsou kationty  $\text{Na}^+$  esenciální pro růst rostlin. Akumulace iontů  $\text{Na}^+$  v rostlinách je škodlivá a jejím důsledkem je ovlivnění homeostázy. Sodné kationty mohou v buňkách nahrazovat roli kationtů draselných, jejichž funkcí je zachovávání membránového potenciálu. Při nadbytku  $\text{Na}^+$  dochází k deficienci některých iontů, zejména  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  (Tester a Davenport, 2003). Může být také omezen příjem mědi a zinku. K deficienci  $\text{K}^+$  dochází při solném stresu kvůli konkurenci  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  iontů o transportéry či vazebná místa enzymů. Draslík tvoří až 10 % hmotnosti sušiny rostlin a je zapojen do významných biochemických procesů. Jedná se například o respiraci, syntézu proteinů a aktivaci enzymů (Fakhrfeshani *et al.*, 2015).

Negativní účinky solného stresu lze rozdělovat na nepřímé (osmotický stres) a přímé (cytotoxicita). Solný stres způsobuje vodní deficit v listech rostlin, dochází k inhibici růstu a ovlivnění metabolismu (Smith, 2009). Důsledkem solného stresu je destabilizace membrán, dochází k jejich depolarizaci a snižování membránového potenciálu.

Přímým negativním účinkem solného stresu je přítomnost toxického množství iontů v buňce. Jedná se zejména o ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$ . Za normálních podmínek je v cytosolu vyšších rostlin obsaženo přibližně  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{K}^+$  a méně než  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{Na}^+$ . Během solného stresu dochází ke zvýšení koncentrace sodných a chloridových iontů v cytosolu na více než  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$ , je snižován poměr  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  v buňce a ionty se stávají cytotoxickými (Smith, 2009). Probíhá denaturace proteinů a inhibice aktivity enzymů. Vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS) a dochází k oxidativnímu poškození buňky. Fotosyntéza je inhibována. Příčinou inhibice je uzavírání průduchů, snížení aktivity enzymů fixujících uhlík a destrukce fotosyntetického aparátu (Kaya *et al.*, 2010). Vlivem působení solného stresu dochází k inhibici syntézy chlorofylu a k jeho zvýšené degradaci.

Osmotický stres je nepřímým důsledkem solného stresu rostlin. Za normálních podmínek je prostředí cytosolu hypertonické vůči okolnímu prostředí. Během solného stresu je koncentrace látek uvnitř cytosolu nižší než vně – prostředí je hypotonické. Narušením koncentračního gradientu dochází ke snižování osmotického potenciálu, odčerpávání vody ven z buňky a nastává vodní deficit. Odpovědí rostlin na solný stres může být syntéza organických látek (osmolytů), jejichž funkcí je udržovat

osmotický potenciál. Osmolyty chrání buňky před negativním účinkem volných radikálů. Příkladem takové látky je aminokyselina prolin (Motřková *et al.*, 2014).

Vlivem solného stresu dochází k inhibici klíčení semen a snížení rychlosti růstu sazenic. Rostliny vystavené solnému stresu mají nižší vzrůst, jsou slabé a mají snížený počet listů. Dochází k opadávání starších listů. Kvůli deficitu vody probíhá uzavírání průduchů a je snižována účinnost fotosyntézy. Působením solného stresu dochází také ke snížení příjmu makro- a mikroprvků, například dusíku, draslíku, zinku, vápníku, či křemíku (Chrysargyris *et al.*, 2018). Kvůli nedostatečnému příjmu vody rostliny při delším trvání solného stresu odumírají.



## 2.4 Vliv abiotického stresu na metabolismus rostlin máty

### 2.4.1 Metabolismus dusíku

Dusík tvoří až 5 % hmotnosti sušiny rostlin. Je součástí nukleových kyselin, proteinů, chlorofylu, alkaloidů, fytohormonů a dalších významných sloučenin. Rostliny dusík přijímají z půdy nebo živného roztoku ve formě amonných či dusičnanových iontů (Nováček, 1990). Akumulace iontů  $\text{NH}_4^+$  v rostlinách může být toxická. Rostlinami je tedy preferován příjem dusičnanových iontů i přes vyšší energetickou náročnost asimilace  $\text{NO}_3^-$ . Metabolismus dusíku zahrnuje příjem, asimilaci a transport dusíku rostlinami. Asimilace dusíku představuje zabudování anorganického dusíku do organických látek. Dochází k tvorbě aminokyselin, peptidů, amidů a k následné syntéze proteinů a nukleových kyselin.

V případě příjmu dusičnanů rostlinami nejprve dochází k jejich dvoustupňové redukcii. Na redukcii dusičnanů se podílí enzymy nitrátreduktasa a nitritreduktasa. Dusičnanové ionty ( $\text{NO}_3^-$ ) jsou redukovány enzymem nitrátreduktasou na ionty dusitanové ( $\text{NO}_2^-$ ), následně dochází v cytosolu k redukcii nitritreduktasou na  $\text{NH}_4^+$  (Mokhele *et al.*, 2012). Poté probíhá asimilace  $\text{NH}_4^+$  do organických sloučenin za katalýzy enzymovým systémem GS/GOGAT (glutaminsynthetasa a glutamátsynthasa). Dochází ke vzniku glutaminu a glutamátu. Na asimilaci se při vyšší koncentraci  $\text{NH}_3$  podílí enzym glutamátdehydrogenasa, který katalyzuje tvorbu glutamátu zabudováním amoniaku do 2-oxoglutarátu (Zehnálek *et al.*, 2006).

Glutamát a glutamin jsou zásobními látkami dusíku v rostlině. Navázaný dusík je následně přenášen na oxokyseliny za katalýzy aminotransferasami a probíhá syntéza dalších aminokyselin procesem transaminace. Glutamin může být využit pro syntézu aminokyseliny asparaginu. Glutamát je prekurzorem pro biosyntézu prolinu, argininu a ornithinu. Aminokyseliny s amidovou skupinou, mezi které jsou řazeny glutamin a asparagin, patří mezi hlavní zásobní látky dusíku v rostlinách. Nejvýznamnějšími dusíkatými sloučeninami v rostlinách jsou proteiny, jež se skládají z aminokyselin vázaných peptidovými vazbami. Proteiny mají v rostlinách strukturní, zásobní a katalytickou funkci. Dusík je také součástí purinových a pyrimidinových bází, jež tvoří nukleové kyseliny. Dalšími sloučeninami dusíku v rostlinách jsou alkaloidy, které jsou odvozeny z aminokyselin. Alkaloidy mají významné fyziologické účinky a rostlinám mohou poskytovat ochranu před hmyzem i býložravci (Nagy *et al.*, 2011).

Polyaminy jsou alifatické polykationty, které se vyskytují ve všech prokaryotních i eukaryotních organismech. Jedná se o nízkomolekulární organické sloučeniny obsahující dvě a více aminoskupin. Jsou řazeny mezi osmolyty (kompatibilní soluty). Polyaminy jsou součástí základních buněčných procesů rostlin, hrají významnou roli při apoptóze, buněčném dělení a syntéze proteinů. Podílejí se na růstu a vývoji rostlin, ovlivňují senescenci a souvisí s mechanismem odpovědi rostlin na stres. K akumulaci polyaminů může docházet v reakci na působení biotického či abiotického stresu (Handa *et al.*, 2018). Polyaminy jsou nezbytné pro optimální vývoj rostlin, ale přesný mechanismus působení není zcela vysvětlen. I když je jejich funkcí regulace růstu rostlin, nejsou zařazovány mezi fytohormony. Fytohormony působí při velmi nízkých koncentracích ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), zatímco koncentrace polyaminů je signifikantně vyšší, často řádově v  $\text{mmol.l}^{-1}$  (Pandey *et al.*, 2000).

K hlavním polyaminům vyskytujícím se v rostlinách patří diamin putrescin, triamin spermidin a tetraamin spermin. Dalšími polyaminy v rostlinách jsou také kadaverin a 1,3-diaminopropan. Biosyntéza polyaminů v rostlinách vychází z aminokyselin ornithinu a argininu. Putrescin je syntetizován za katalýzy ornithindekarboxylasou a arginindekarboxylasou. Dekarboxylací S-adenosylmethioninu dochází k tvorbě aminopropylové skupiny, která s putrescinem představuje substráty pro tvorbu spermidinu. Po inkorporaci další aminopropylové skupiny dochází za katalýzy sperminsynthasou k tvorbě tetraaminu sperminu (Liu *et al.*, 2015).

Polyaminy se v rostlinách vyskytují volně či v konjugované formě. Konjugáty vytváří s malými molekulami (fenolické sloučeniny) či s makromolekulami (proteiny). Polyaminy tvoří kovalentní vazby s fenolickými sloučeninami za tvorby amidů. Mezi tyto fenolické sloučeniny patří například kyselina hydroxyskořicová, kyselina kávová či kyselina kumarová (Chen *et al.*, 2019). Tvorba amidů je katalyzována transglutaminasami, jejichž aktivita může být zvýšena při působení stresu (Dondini *et al.*, 1994). Polyaminy tvoří také konjugáty s makromolekulami, například s proteiny či s nukleovými kyselinami.

Vlivem stresu dochází k akumulaci polyaminů a jejich derivátů v rostlinách. Přesná funkce polyaminů při působení abiotického stresu u rostlin není zcela vysvětlena. Z řady studií ovšem vyplývá, že mají významnou roli při toleranci stresu. Mezi hlavní známé funkce polyaminů patří interakce s makromolekulami a jejich stabilizace, ovlivnění

aktivity antioxidantních enzymů a regulace metabolismu dusíku. Polyaminy mají vliv na produkci oxidu dusnatého, ovlivňují také membránové kanály a podílí se na řízené buněčné smrti. Triamin spermidin a tetraamin spermin regulují metabolismus dusíku a uhlíku u rostlin, jejich vlivem může docházet k akumulaci aminokyselin glutaminu, kyseliny glutamové a asparaginu (Handa *et al.*, 2018).

## **2.4.2 Vliv abiotického stresu na metabolismus dusíku v rostlinách máty**

Abiotický stres významně ovlivňuje metabolismus dusíkatých látek v rostlinách máty. Dusík je majoritním prvkem odpovídajícím za růst a vývoj rostlin. Působením abiotického stresu dochází k ovlivnění příjmu dusíku a ke snížení jeho asimilace v rostlinách. Důsledkem abiotického stresu je regulace aktivity enzymů podílejících se na metabolismu dusíku, ovlivnění syntézy proteinů a snížení účinnosti fotosyntézy (Goel a Singh, 2015).

V souvislosti s odpovědí na stres může docházet k akumulaci osmoprotektantů. Jedná se o organické osmolyty, které se podílí na udržování osmotického potenciálu a chrání tak rostliny před abiotickým stresem, zejména před působením solného stresu a vodního deficitu. Mezi osmoprotektanty patří aminokyseliny, kvarterní amoniové sloučeniny a sacharidy. Příkladem kvarterní amoniové sloučeniny je glycinbetain (Mořková *et al.*, 2014). Vlivem abiotického stresu dochází ke změnám v zastoupení volných aminokyselin v rostlinách. Nedostatek či nadbytek makroprvků nebo solný stres se nejčastěji projevují zvýšenou biosyntézou aminokyselin prolinu a alaninu.

### **2.4.2.1 Vliv příjmu dusičnanů na metabolismus dusíku**

Příjem dusičnanů má významný vliv na metabolismus dusíku a uhlíku v rostlinách. Dochází ke změnám v syntéze aminokyselin, proteinů, fytohormonů, organických kyselin a škrobu. Při vyšším příjmu dusičnanů probíhá zvýšená syntéza aminokyselin, proteinů, organických kyselin a snížená syntéza škrobu. Metabolismus dusíku je velmi úzce spjatý s metabolismem uhlíku a s fotosyntézou. Při asimilaci je dusík zabudováván do 2-oxoglutarátu, jenž je meziproduktem v Krebsově cyklu. Rostliny pěstované v půdě či v živných roztocích obsahujících vysoké množství dusíku tedy vykazují zvýšenou aktivitu enzymů Krebsova cyklu (Amtmann a Armengaud, 2009).

Enzymy nitrátoreduktasa, nitritoreduktasa a glutaminsynthetasa se podílejí na úvodních krocích asimilace dusičnanů v rostlinách. V řadě studií bylo prokázáno, že při mírném

zvýšení příjmu dusičnanů dochází ke zvýšení aktivity těchto enzymů, a tedy ke zvýšení asimilace dusičnanů v rostlinách (Foyer *et al.*, 2003). Nadměrný obsah dusíku v rostlinách ovšem může způsobit inhibici aktivity nitrátreduktasy (Balotf *et al.*, 2016).

Glutamát je první syntetizovanou aminokyselinou. Slouží jako prekurzor pro biosyntézu prolinu, ornithinu, argininu a polyaminů. Koncentrace prolinu, argininu a polyaminů jsou důležitými ukazateli odpovědi na abiotický stres v rostlinách (Paschalidis *et al.*, 2009). Asparagin je hlavní aminokyselinou sloužící pro skladování a transport dusíku v rostlinách. Vysoký příjem dusičnanů způsobuje akumulaci volných aminokyselin, zejména asparaginu a alaninu. Tyto aminokyseliny jsou vhodné pro skladování dusíku při vysokém příjmu  $\text{NO}_3^-$ , jelikož jejich akumulace v rostlinách nemá negativní účinky (Forde, 2014).

Akumulace velmi vysokých koncentrací dusičnanů v rostlinách je škodlivá. Z předchozích studií vyplývá, že vlivem vysokého příjmu dusičnanů dochází ke snížení syntézy proteinů (Chen *et al.*, 2004). Hmotnost sušiny těchto rostlin je výrazně snížena. Důsledkem vysoké akumulace dusičnanů v rostlinách je zvýšená produkce oxidu dusnatého, jenž může tvořit peroxynitrit reakcí se superoxidovými radikály. Peroxynitrit je pro rostliny vysoce toxický, jelikož je schopen nitrace tyrosinových residuí v proteinech, čímž dochází k inaktivaci řady proteinů a enzymů a ke snížené produkci rostlin.

Nadměrný příjem dusičnanů má vliv také na obsah fytohormonů v rostlinách. Bylo prokázáno, že při vysokém příjmu  $\text{NO}_3^-$  dochází ke zvýšení koncentrace indol-3-octové kyseliny (IAA), která odpovídá za regulaci růstu kořene. Zároveň dochází ke snížení koncentrace cytokininů, což se projevuje regulací nadzemního růstu a menší velikostí listů (Saiz-Fernández *et al.*, 2015).

Nedostatečný příjem dusičnanů způsobuje snížení aktivity enzymů podílejících se na asimilaci dusíku. Jedná se zejména o enzymy nitritreduktasu a nitrátreduktasu. Dle studie, kterou provedl Balotf *et al.* (2016) dochází vlivem deficience dusičnanů k výraznému snížení míry transkripce genů kódujících tyto enzymy u pšenice. Nízký příjem dusičnanů způsobuje redukci syntézy aminokyselin v rostlinách. Více než 70 % dusíku v rostlinách je skladováno v chloroplastech, kde je lokalizována syntéza chlorofylu. Vlivem nedostatečného příjmu dusičnanů probíhá snížení syntézy chlorofylu, je redukována účinnost fotosyntézy a dochází k ovlivnění senescence listů.

Akumulace polyaminů v rostlinách je důležitým ukazatelem odpovědi na biotický či abiotický stres. Biosyntéza polyaminů a jejich obsah v rostlinách jsou ovlivněny množstvím přijatých dusičnanů. Při sníženém příjmu  $\text{NO}_3^-$  dochází k poklesu koncentrace volných polyaminů v rostlinách. Příjem  $\text{NO}_3^-$  může ovlivňovat koncentraci polyaminů třemi mechanismy: snížením biosyntézy putrescinu či zvýšením jeho degradace, zvýšeným vznikem konjugovaného putrescinu nebo zvýšením konverze putrescinu na spermidin a spermin (Garnica *et al.*, 2009). K vyšší akumulaci volného putrescinu dochází zejména v případě vyššího příjmu amonných iontů oproti iontům dusičnanovým. Tento jev byl pozorován například v rostlinách rajčat, tabáku či hrachu (Altman a Levin, 1993). Vyšší obsah putrescinu může mít negativní vliv na vývoj rostlin. Jeho vlivem může dojít k depolarizaci membrán, deficienci draslíku a degradaci proteinů. Pro zmírnění toxických účinků  $\text{NH}_4^+$  lze do půdy či živného média přidávat ionty  $\text{NO}_3^-$ , jejichž vlivem dochází ke snížení koncentrace volného putrescinu a zvýšení míry jeho konjugace.

#### **2.4.2.2 Vliv solného stresu na metabolismus dusíku**

Působením solného stresu dochází ke změnám v metabolismu dusíku v rostlinách. Je ovlivněn příjem živin, fotosyntéza a syntéza proteinů. Důsledkem solného stresu je snížení výnosu. Solný stres může vyústit v deficienci prvků, která je způsobena kompeticí iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  s ionty  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  či  $\text{Ca}^{2+}$ . V řadě studií bylo prokázáno, že důsledkem vyšší koncentrace NaCl v rostlinách máty je redukce růstu a snížení obsahu makroprvků, zejména N, P, Ca, K, Mg (Tabatabaie a Nazari, 2007). Vlivem solného stresu dochází ke snížení obsahu proteinů v listech i kořenech rostlin. Tento jev lze vysvětlit tak, že působením NaCl dochází ke zvýšení aktivity proteas a tedy zvýšení míry proteolýzy. Výsledkem je snížení obsahu proteinů v rostlinách, které je v korelaci s nárůstem obsahu volných aminokyselin vznikajících degradací proteinů.

Důsledkem solného stresu je ovlivnění aktivity enzymů podílejících se na metabolismu dusíku. Solný stres způsobuje například snížení aktivity nitrátreduktasy a glutaminsynthetasy (Munns a Tester, 2008). Enzym nitrátreduktasa, jehož aktivita je ovlivněna řadou environmentálních faktorů, je klíčový pro růst a vývoj rostlin. U rostlin dochází vlivem vysokého příjmu  $\text{Cl}^-$  ke sníženému příjmu dusíku. Pokles obsahu dusíku v rostlinách při působení solného stresu může vyústit v inhibici aktivity

nitrátreduktasy. Jedním z důsledků solného stresu je také snížení míry fotosyntézy, které je způsobeno inhibicí aktivity enzymu Rubisco (Mittal *et al.*, 2012).

Vlivem solného stresu dochází ke zvýšení obsahu volných aminokyselin v rostlinách. Jedná se zejména o arginin, alanin, glycin, serin a prolin. Dochází také k akumulaci neproteinogenních aminokyselin (citrulinu a ornithinu) a amidů (Mansour, 2000). V rostlinách máty dochází při působení NaCl zejména ke zvýšené akumulaci prolinu. Zvýšení obsahu této aminokyseliny vlivem solného stresu je přičítáno inhibicí aktivity enzymu prolin dehydrogenasa, jenž katalyzuje první krok degradace prolinu (Misra a Gupta, 2006). Vyšší obsah prolinu může být způsoben také degradací proteinů bohatých na prolin či zvýšenou syntézou této aminokyseliny *de novo*.

Prolin hraje významnou roli při odpovědi rostlin na abiotický stres. Je zařazován mezi osmolyty (kompatibilní soluty), což jsou netoxické nízkomolekulární sloučeniny, které jsou akumulovány v cytoplazmě během solného stresu. Funkcí osmolytů je vyrovnávání osmotického tlaku při působení solného stresu. Mezi osmolyty patří kromě prolinu také asparagin, serin, glycinbetain, polyaminy, organické kyseliny a sacharidy. Prolin je významnou signální molekulou při adaptaci na abiotický stres. Má vliv na proliferaci buněk, je schopen stabilizace proteinů a membrán a umožňuje snižování osmotického stresu. Kromě osmoprotektivní funkce vykazuje prolin také antioxidační účinky. Při solném stresu dochází ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), například superoxidových radikálů či peroxidu vodíku. Prolin ochraňuje buňku před oxidačním stresem, jelikož má schopnost odstraňovat ROS. Reguluje expresi specifických genů kódujících antioxidační enzymy (Kocsy *et al.*, 2005). Prolin udržuje nízký poměr NADPH/NADP<sup>+</sup>, čímž dochází ke snižování produkce singletového kyslíku (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) ve fotosystému I (Pardha-Saradhi a Mohanty, 1997).

Při působení solného stresu dochází ke snížení integrity membrán, inhibicí aktivity řady enzymů a snížení účinnosti fotosyntézy. Obranou rostlin je produkce osmolytů, mezi které jsou zařazovány i polyaminy. Akumulace polyaminů v rostlinách, zejména spermidinu, sperminu a putrescinu, souvisí s procesy adaptace na abiotický stres. Rostliny s vysokým obsahem polyaminů vykazují silnou odolnost vůči solnému stresu. Nejčastěji je u rostlin vystavených solnému stresu výrazně zvýšena syntéza pouze jednoho z těchto tří polyaminů (Liu *et al.*, 2006). Z přechozích studií vyplývá, že tolerance vůči solnému stresu je nejvíce ovlivněna obsahem tetraaminu sperminu v rostlinách (Li a He, 2012).

Akumulace polyaminů souvisí s ochranou před oxidačním stresem. Při nárůstu obsahu polyaminů dochází ke zvyšování aktivity antioxidantních enzymů, jejímž důsledkem je snížení produkce ROS.

## **2.4.3 Metody studia vlivu abiotického stresu na metabolismus dusíku**

### **2.4.3.1 Technika HPLC**

V kapalinové chromatografii jsou využívány různé separační mechanismy. Mezi typy kapalinové chromatografie dle způsobu interakce patří například afinitní chromatografie, iontově-výměnná chromatografie či adsorpční chromatografie. HPLC (high-performance liquid chromatography), neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie, je separační technika založená na distribuci analytů mezi nemísitelnou stacionární a mobilní fází. HPLC technika poskytuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Složky vzorku jsou rozdělovány dle afinity k oběma fázím, analyty s vysokou afinitou vůči stacionární fázi jsou na koloně zadržovány a dochází k jejich pozdější eluci. Součástí HPLC systému je zásobník mobilní fáze, směšovací zařízení, odplynovač mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, nástřikové zařízení, předkolona, separační kolona a detektor. V technice HPLC je nejčastěji používán detektor fotometrický, refraktometrický, fluorescenční nebo hmotnostní spektrometr (Klouda, 2003).

Mobilní fáze v HPLC systému je kapalná. Stacionární fáze (sorbent) se vyznačuje velkým povrchem. V běžné nízkotlaké kapalinové chromatografii dochází k proudění mobilní fáze pomocí gravitace. Jelikož je při využití techniky HPLC velikost částic v analytické koloně velmi malá (2  $\mu\text{m}$ ), je nutné použití vysokých tlaků k dosažení vhodného průtoku. Proto je v HPLC systému přítomno vysokotlaké čerpadlo a mobilní fáze proudí pod výrazně zvýšeným tlakem, čímž dochází k urychlení separace a ke zvýšení její účinnosti. Eluce může být izokratická či gradientová. Při izokratické eluci se nemění složení použité mobilní fáze. Při gradientové eluci dochází ke změnám ve složení mobilní fáze a probíhá nárůst eluční síly během separace (Jandera a Churáček, 1985).

Dle polaritý fází můžeme rozlišovat chromatografické systémy s normálními fázemi (stacionární fáze je více polární než fáze mobilní) a s obrácenými fázemi (stacionární fáze je méně polární než mobilní fáze). Pro HPLC systém s normálními fázemi je možné použít chromatografickou kolonu se silikagelem, oxidem hlinitým nebo porézním

grafitem. V tomto případě mají vysokou afinitu k sorbentu analyty s polárním charakterem. Mobilní fáze je nepolární, používán je například hexan, heptan či směs nepolárních rozpouštědel. Systém s reverzními fázemi (RP-HPLC) je nejrozšířenějším způsobem separace látek v technice HPLC. V systémech s reverzními fázemi je stacionární fáze nepolární, jedná se o řetězce uhlíku (C4–C18) vázané na vysoce pórovitý silikagel. Nejčastěji je používán oktyl silikagel (SiC8) či oktadecyl silikagel (SiC18). Mobilní fází je směs polárních rozpouštědel, například směs vody a acetonitrilu. Kolonou rychleji procházejí analyty polární a dochází k zachycování nepolárních analytů na nepolární stacionární fázi (Sýkora *et al.*, 2007).

UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography), neboli ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie, je technika s vysokou separační účinností a citlivostí. Využitím UHPLC techniky dochází k urychlení separace a zachování vysoké separační účinnosti. Průměr částic sorbentu v chromatografické koloně je menší než 2  $\mu\text{m}$  a tlak dosahuje hodnoty až 150 MPa. Délka kolony pro UHPLC je nejčastěji 50–150 mm. V současné době existuje mnoho typů sorbentů pro UHPLC, využívány jsou ty s průměrem částic 1,5–2  $\mu\text{m}$  (Borovcová *et al.*, 2019).

Identifikace složek vzorku procházejících kolonou probíhá pomocí detektorů. Nejčastěji jsou využívány detektory spektrofotometrické (UV-VIS), fluorescenční, refraktometrické, elektrochemické či hmotnostní. Refraktometrický detektor nemá vysokou citlivost. Principem je zaznamenávání rozdílů mezi indexem lomu složek vzorku a indexem lomu mobilní fáze. Velmi výhodné a vysoce selektivní je spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). Součástí hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, kde dochází k ionizaci analytů. Ionty jsou separovány na základě jejich hmotnosti a elektrického náboje a následně jsou detekovány. Identifikace složek vzorku je prováděna dle jejich hmotnostních spekter a retenčních (Kovatsových) indexů.

V HPLC technice jsou často využívány derivatizační reakce. Derivatizace je využívána pro zvýšení citlivosti a umožňuje separaci a detekci látek, pro které nelze využít běžné detektory. Při derivatizaci dochází po přidání činidla k tvorbě detekovatelných derivátů. Derivatizace může být předkolonová či postkolonová. Nejčastěji jsou vytvářeny deriváty, jež absorbují v UV-VIS oblasti, fluorescenční



deriváty či deriváty pro GC-MS. Příkladem může být využití derivatizačního činidla benzoylchloridu pro analýzu polyaminů pomocí HPLC.

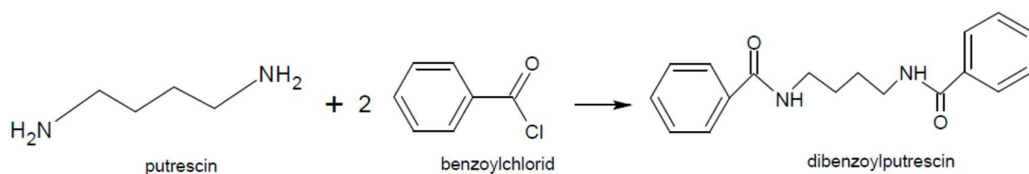
#### **2.4.3.1.1 Stanovení aminokyselin pomocí HPLC**

Separace aminokyselin běžnou kapalinovou chromatografií je poměrně obtížná. Jedná se o malé molekuly polárního charakteru, které nemohou být detekovány obvyklými typy detektorů. Pro analýzu aminokyselin pomocí HPLC jsou tedy často využívány derivatizační reakce. Analyty získávají po derivatizaci vhodné vlastnosti pro detekci, vytvářeny mohou být například produkty absorbující v UV/VIS oblasti či fluorescenční deriváty. Běžně využívanými činidly pro stanovení aminokyselin jsou ninhydrin, *o*-ftalaldehyd, dansylchlorid a fluorofenylmethoxykarbonyl (FMOC). Pokud je prováděna derivatizace aminokyselin, probíhá analýza nejčastěji s využitím iontoměničové chromatografie a postkolonové derivatizace, nebo je využita předkolonová derivatizace a RP-HPLC. Činidlem při postkolonové derivatizaci a spektrofotometrické detekci je ninhydrin (Zhang *et al.*, 2018).

Aminokyseliny mohou být analyzovány také bez nutnosti derivatizace. Výhodou je zkrácení času potřebného pro analýzu a zamezení možných vedlejších reakcí či interference činidla při analýze. Využívána je metoda HILIC (hydrofilní interakční kapalinová chromatografie), která je na pomezí techniky HPLC s normálními a reverzními fázemi. Metoda HILIC je vhodná pro separaci polárních látek. Stacionární fáze má hydrofilní charakter a je polárnější než fáze mobilní. Používán je například silikagel. Mobilní fáze je naopak podobná složením fázi využívané v RP-HPLC, jedná se o směs malého podílu vody a velkého podílu polárního organického rozpouštědla, nejčastěji acetonitrilu. Principem HILIC metody jsou hydrofilní interakce. Na povrchu stacionární fáze dochází k vytváření vodné vrstvy a analyt je distribuován mezi vodnou vrstvou na povrchu stacionární fáze a mobilní fází s nízkým podílem vody. Při stanovení aminokyselin metodou HILIC je vhodné využití detekce pomocí hmotnostního spektrometru. Vysoký podíl organických látek v mobilní fázi podporuje evaporaci při ionizaci elektrosprejem, čímž se zvyšuje citlivost detekce ESI-MS (Nguyen a Schug, 2008).

### 2.4.3.1.2 Stanovení polyaminů pomocí HPLC

Polyaminy jsou nejčastěji analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC). Pro stanovení polyaminů jsou využívány derivatizační reakce. Nejčastěji jsou vytvářeny fluorescenční produkty reakcí polyaminů s dansylchloridem či *o*-ftalaldehydem, nebo chromofory reakcí s benzoylchloridem či dabsylchloridem (Dai *et al.*, 2014). Po extrakci polyaminů do vhodného rozpouštědla (nejčastěji do kyseliny trichloroctové či chlorovodíkové) je provedena derivatizace. V případě využití benzoylchloridu se jedná o nukleofilní substituci. Reakcí polyaminu s acylchloridem dochází ke vzniku amidu (Obr. 2). Reakce probíhá v bazickém prostředí, jako činidlo je používán například hydroxid sodný. Pro detekci derivatizovaných polyaminů lze využít UV/VIS detektor či hmotnostní spektrometr.



Obr. 2 Derivatizace putrescinu s využitím benzoylchloridu.

## **2.5 Vliv abiotického stresu na obsah sekundárních metabolitů máty**

Důsledkem abiotického stresu je ovlivnění biosyntézy sekundárních metabolitů rostlin. Sekundární metabolity rostlin jsou syntetizovány z metabolitů primárních a jejich funkcí je ochrana před patogeny a přilákání opylovačů. Hlavními sekundárními metabolity máty jsou terpenoidy obsažené v silicích a fenolické látky. Silice máty vykazují antimikrobiální, antioxidační a antispasmodické účinky. Složení silic jednotlivých genotypů máty je velmi proměnlivé. Fenolické látky máty mají významné antioxidační, protizánětlivé a antimikrobiální účinky. Majoritními fenolickými látkami máty jsou flavonoidy, jež jsou zařazovány mezi fenylypropanoidy, a fenolické kyseliny. Listy máty pepřné obsahují až 7 % kyseliny kávové a jejích derivátů, například kyselinu chlorogenovou a rozmarýnovou. Mezi flavonoidy obsažené v mátě patří luteolin, apigenin, eriocitrin a hesperidin (Mimica-Dukic a Bozin, 2008).

Při působení abiotického stresu dochází ke zvýšené produkci ROS v rostlinách. Obranou rostlin může být nárůst produkce sekundárních metabolitů. Fenylypropanoidy, jež jsou syntetizovány šikimátovou cestou, mají významnou roli při odpovědi rostlin na stres. K akumulaci sekundárních metabolitů dochází zejména z důvodu zvýšení aktivity enzymu fenylyalaninamoniolyasy (PAL) a chalkonsynthasy (CHS). Jedná se o enzymy klíčové při syntéze flavonoidů, jejichž aktivita je výrazně ovlivněna řadou abiotických stresových faktorů. Enzym PAL se účastní prvního kroku syntézy fenylypropanoidů, katalyzuje deaminaci L-fenylyalaninu za tvorby kyseliny *trans*-skořicové (Dixon *et al.*, 1992).

### **2.5.1 Vliv příjmu dusičnanů na obsah sekundárních metabolitů máty**

K nárůstu produkce sekundárních metabolitů, zejména fenolických látek, dochází u rostlin pěstovaných v půdách či živných roztocích obsahujících nedostatek makronutrientů. Stres nedostatkem dusíku může vyústit ve zvýšenou produkci ROS. Fenolické látky mají antioxidační účinky, jejich funkcí je ochrana rostlinných buněk před oxidačním stresem. Vlivem abiotického stresu dochází k nárůstu aktivity enzymu PAL a zvýšení koncentrace fenolických látek v rostlinách.

K akumulaci silic dochází ve žlaznatých trichomech listů. Terpenoidy jsou syntetizovány dráhou mevalonátovou (v cytosolu) nebo methyletrytritolfosfátovou dráhou (v plastidech). Tvorba silic v rostlinách je ovlivněna nejen množstvím přijatých nutrientů,

ale závisí také na počtu listů a na jejich fotosyntetické kapacitě. V řadě studií bylo prokázáno, že příjem dusičnanů má vliv na obsah silic v rostlinách máty a na zastoupení jednotlivých terpenoidů v silicích. Je udáváno, že optimální množství dusíku pro pěstování máty peprné v půdě je 85–150 kg na hektar půdy (Mitchell a Farris, 1996). Mírné zvýšení příjmu dusičnanů koreluje s nárůstem obsahu silic v rostlinách máty. Ovšem při nadměrném příjmu dusičnanů může docházet až k 50% redukcí výnosu silic máty peprné pěstované hydroponicky (David *et al.*, 2014). Ve studii provedené Nilsonem *et al.* (2001) došlo u hydroponicky pěstované *Mentha arvensis* při vysokém příjmu dusíku k pozitivnímu ovlivnění růstu, ovšem obsah silic v rostlinách byl redukován a zaznamenáno bylo také snížení koncentrace mentholu v silici.

### **2.5.2 Vliv solného stresu na obsah sekundárních metabolitů máty**

Při působení solného stresu probíhá zvýšená ztráta vody u rostlin a osmotický stres. Důsledkem solného stresu je ovlivnění biosyntézy sekundárních metabolitů, může dojít k jejich akumulaci či poklesu obsahu v rostlinách. Solný stres způsobuje především akumulaci fenolických látek. Zvýšení obsahu fenolických látek u rostlin rodu *Mentha* během solného stresu bylo zjištěno v řadě studií (El-Danasoury *et al.*, 2010). Ke zvýšené biosyntéze fenolických látek dochází při působení mnoha typů abiotických stresových faktorů. Tyto sekundární metabolity rostlin jsou schopné vychytávání ROS produkovaných během abiotického stresu a slouží ke stabilizaci membrán.

Solný stres má signifikantní vliv na biosyntézu terpenoidů v rostlinách máty. Ze studií vyplývá, že důsledkem použití NaCl o koncentraci v rozsahu 0–150 mmol.l<sup>-1</sup> u máty je redukce růstu, snížená syntéza terpenoidů a tedy snížení obsahu silic v takto ošetřených rostlinách. Snížení obsahu silic v rostlinách *M. piperita* při působení solného stresu v porovnání s kontrolními rostlinami bylo pozorováno například ve studiích, které provedli Aziz *et al.* (2008) či Tabatabaie *et al.* (2007). Důsledkem solného stresu je snížení obsahu fotosyntetických pigmentů, probíhá jejich degradace či redukce syntézy. Redukce v obsahu silic vlivem solného stresu může být vysvětlena sníženou mírou fotosyntézy. Dalším možným důvodem je inhibice transportu cytokininů z kořenů během působení solného stresu, čímž dochází ke změně poměru množství cytokininů a kyseliny abscisové v listech (Greenway a Munns, 1980).

## 2.5.3 Metody analýzy sekundárních metabolitů máty

### 2.5.3.1 GC-MS analýza terpenoidů

Terpenoidy jsou nízkomolekulární těkavé látky obsažené v silicích máty. Tyto látky mohou být identifikovány a kvantifikovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Mobilní fází v plynové chromatografii je inertní plyn. Jako nosný plyn je nejčastěji využíváno helium, dále argon, dusík či vodík. Součástí plynového chromatografu je láhev s nosným plynem, dávkovací zařízení (injektor), chromatografická kolona a detektor. Součástí chromatografické kolony je navázaná stacionární fáze. Stacionární fází může být například 95% dimethyl–5% fenyl methyl siloxan, jenž je využíván pro separaci těkavých nepolárních látek. Složky vzorku prochází přes kolonu, kde dochází k interakci se stacionární fází. Probíhá separace na základě hmotnosti složek, látky s nižší molekulovou hmotností jsou z kolony eluovány dříve. Po separaci složek dochází k jejich detekci. Důležitou veličinou je retenční čas, což je doba od nástřiku po eluci analytu z kolony.

Hmotnostní spektrometr je vysoce citlivým detektorem pro plynovou chromatografii. Součástí hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Jako iontový zdroj pro techniku GC-MS je nejčastěji využívána elektronové ionizace (EI). Po ionizaci analytů dochází k separaci ve vakuu na základě velikosti poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Výsledkem měření jsou hmotnostní spektra, jež zobrazují závislost relativní intenzity proudu iontů na poměru  $m/z$  (Klouda, 2003). Jednotlivé složky vzorku jsou identifikovány na základě hmotnostních spekter a retenčních indexů.

Pro analýzu terpenoidů v rostlinném materiálu pomocí GC-MS je využívána extrakce do organických rozpouštědel, například do hexanu. Kvantifikace terpenoidů ve vzorcích je provedena s využitím proměření kalibrační řady standardů terpenoidů. Získané signály standardů jsou srovnány se signály terpenoidů ve vzorcích. Pro zvýšení přesnosti kvantitativní analýzy je využíván interní standard. Jedná se o vhodně zvolenou sloučeninu o předem definované koncentraci, která je přidána do vzorku. Při kvantifikaci terpenoidů ve vzorku s využitím kalibrační řady poté není využíván pouze signál dané sloučeniny, ale je prováděna normalizace, kdy je vypočítán poměr signálů jednotlivých složek a interního standardu. Interní standard slouží k vyrovnávání rozdílných ionizačních účinností a možných ztrát při přípravě vzorků pro analýzu (Volný, 2020).

### 2.5.3.2 HPLC analýza fenolických látek

Pro identifikaci a kvantifikaci fenolických sloučenin v rostlinném materiálu lze využít techniku RP-HPLC/MS. Stacionární fáze je v tomto případě méně polární než fáze mobilní, jedná se například o kolonu C18. V případě gradientové eluce je mobilní fází často roztok kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitril. Vzorky pro analýzu jsou připravovány extrakcí rostlinného materiálu do organických rozpouštědel, například do methanolu či ethanolu. Pro kvantifikaci fenolických látek ve vzorcích jsou využity standardy fenolů a interní standard. Detekce je prováděna pomocí hmotnostní spektrometrie. Nejběžnější je využití ionizace elektrosprejem (ESI). Kvantifikace je prováděna pomocí MRM (multiple reaction monitoring) módu v kombinaci s trojitým kvadrupólem (Tohma *et al.*, 2016).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

Acetonitril, čistota hypergrade pro LC-MS (Sigma-Aldrich, USA)

Benzoylchlorid (Sigma-Aldrich, USA)

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

Dihydrogenfosforečnan amonný (Lachner, Česká republika)

Dusičnan draselný (Lachner, Česká republika)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát (Lachner, Česká republika)

Ethanol 50% (VWR, USA)

Ethylendiamintetraacetát disodný dihydrát (Sigma-Aldrich, USA)

Ethylester kyseliny octové (Penta, Česká republika)

Hydroxid sodný (Lachner, Česká republika)

Chlorid manganatý tetrahydrát (Lachner, Česká republika)

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina boritá (Lachner, Česká republika)

Kyselina mravenčí (Merck, Německo)

Methanol 80 % (VWR, USA)

Molybdenan sodný dihydrát (Lachner, Česká republika)

Mravenčan amonný (Sigma-Aldrich, USA)

n-hexan, čistota p.a. (Sigma-Aldrich, USA)

Síran hořečnatý heptahyrát (Lachner, Česká republika)

Síran měďnatý pentahyrát (Lachner, Česká republika)

Síran železnatý heptahyrát (Lachner, Česká republika)

Síran zinečnatý heptahydrát (Lachner, Česká republika)

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

Standardy fenolických sloučenin nejvyšší čistoty (Sigma-Aldrich, USA): 14 fenolických kyselin (kyselina 2,3-dihydroxybenzoová; kyselina 3-hydroxybenzoová; kyselina 4-hydroxybenzoová; kyselina ferulová; kyselina gallová; kyselina chlorogenová; kyselina kávová; kyselina *p*-kumarová; kyselina rozmarýnová; kyselina salicylová; kyselina sinapová; kyselina syringová; kyselina *trans*-skořicová; kyselina vanilová); 2 deriváty fenolických kyselin (2-O- $\beta$ -D-glukosid kyseliny salicylové; methylester kyseliny *p*-kumarové) a 15 flavonoidů (apigenin; galangin; hesperidin; chrysin; kamferol; katechin; kvercetin; kvercitrin; luteolin; morin; myricetin; naringenin; naringin; pinocembrin; rutin).

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

Standardy terpenoidů nejvyšší čistoty (Sigma-Aldrich, USA):  $\beta$ -karyofylen, eukalyptol, karvon, menthofuran, menthol, menthon, pulegon.

Tridekan (Sigma-Aldrich, USA)

### 3.1.2 Biologický materiál

Byly vybrány 3 genotypy máty:

*Mentha arvensis* L. (Slovensko) – ECN 09A6400048

*Mentha piperita* L. (Československo) – ECN 09A6400046

*Mentha spicata* L. (Německo) – ECN 09A6400015

Semena rostlin byla získána v genové bance výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i (VÚRV, v.v.i.). Identifikační číslo ECN u každého genotypu máty odkazuje na databázi genové banky VÚRV (GRIN Czech, 2020). Rostlinný materiál byl vypěstován



na experimentálních plochách VÚRV, v.v.i. Pro hydroponické pěstování za kontrolovaných podmínek byly využity stonkové řízky rostlin. Optimalizace hydroponického pěstování byla provedena ve třech po sobě jdoucích experimentech. Sběr rostlin tří vybraných genotypů pro první experiment byl proveden v květnu 2020. Rostlinný materiál pro hydroponické pěstování v druhém experimentu byl získán v červnu 2020. Pro poslední experiment byl rostlinný materiál sklizen v říjnu 2020.

### **3.1.3 Přístrojové vybavení**

Analytické váhy (Radwag, Česká republika)

Centrifugační filtry (Pragolab, Česká republika)

Fytotronová komora Fytoscope (Photon system instruments, Česká republika)

Kulový mlýn (Retsch, Česká republika)

Lyofilizátor BETA 1-8 LD (Christ, Německo)

Mikrocentrifuga Prism (Labnet, USA)

Pipety (Eppendorf, Německo)

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

SPE kolonky Supelclean LC-SI o objemu 3 ml (Sigma-Aldrich, USA)

UHPLC-MS/MS technika složená z kapalinového chromatografu Nexera X2 UHPLC a z hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem MS 8050 (Shimadzu, Japonsko)

Ultrazvuková čistička (Bandelin, Německo)

Vakuový koncentrátor Centrivap (Labconco, USA)

Vortex (Biosan, Česká republika)

Vysokokapacitní fenotypizační platforma Plantscreen Conveyor system (Photon system instruments, Česká republika)

Vzduchovací motorek JKA-AP9500 (Atman, Česká republika)

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Optimalizace podmínek hydroponického pěstování máty**

#### **3.2.1.1 Hydroponické pěstování máty ve fytotronu**

První experiment probíhal v období od května do června 2020. Dne 21.5.2020 byl proveden sběr rostlinného materiálu. Od každého ze tří vybraných genotypů bylo získáno 20 uniformních řízků o velikosti 10 cm. Řízky byly umístěny na 7 dní do vody pro zakořenění. Po zakořenění byly rostliny přeneseny do hydroponického systému ve fytotronu. Podmínky pěstování ve fytotronu byly následující: teplota 24 °C, relativní vlhkost vzduchu 50 % a nastavený světelný režim byl 20 h světlo a 4 h tma. Byl zvolen DFT (Deep Flow Technique) hydroponický systém. Rostliny jednotlivých genotypů byly umístěny do nádob s živným roztokem, kde byly nadnášeny na hladině pomocí polystyrenu. Pouze kořeny rostlin byly v kontaktu s živným roztokem. Pro dodání kyslíku byly využity vzduchovací motorky. Rostliny byly pěstovány celkem v 5 hydroponických nádobách. V každé z nádob bylo umístěno 12 rostlin (čtyři rostliny od každého ze tří genotypů).

Do nádob byl přidáván vždy 1 l roztoku. Nejprve byly rostliny umístěny do vody kvůli aklimatizaci, po 7 dnech bylo následně využito živné médium. Jako živné médium bylo zvoleno ½ HM (Hoaglandovo médium o poloviční síle; v ½ HM je koncentrace dusičnanů, konkrétně dusičnanu draselného a dusičnanu vápenatého, snížena na polovinu oproti koncentraci v plném Hoaglandově médiu). Koncentrace dusičnanů v kontrolním roztoku byla 10 mmol.l<sup>-1</sup>. Pro přípravu ½ HM byly využity poznatky z původní studie (Hoagland a Arnon, 1938) a došlo k modifikaci koncentrací jednotlivých sloučenin. Byly připraveny zásobní roztoky makroprvků, mikroprvků a roztok Fe-EDTA o objemu 200 ml. Hoaglandovo médium o poloviční síle bylo připraveno napipetováním daných objemů zásobních roztoků (Tab. 2) a doplněním do 1 l destilovanou vodou. Po 8 dnech pěstování v živném roztoku následovala aplikace stresových faktorů – sníženého a zvýšeného příjmu dusičnanů a solného stresu.

Tab. 2 Příprava ½ Hoaglandova média ze zásobních roztoků pro hydroponické pěstování máty. Výsledný objem ½ HM byl 1 l. Upraveno dle: Hoagland a Arnon, 1938.

Zásobní roztoky	Sloučenina	Koncentrace v zásobních roztocích [g.l <sup>-1</sup> ]	Koncentrace v ½ HM [mg.l <sup>-1</sup> ]	Pipetovaný objem zásobního roztoku [ml] do 1 l
Roztok dusičnanů	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	295	590	2
	KNO <sub>3</sub>	126,5	253	
Roztok makroprvků	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	57,5	115	2
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	246,5	493	
Roztok mikroprvků	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	2,86	1
	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1,81	1,81	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,22	0,22	
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,08	0,08	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,11	0,11	
Fe-EDTA	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	7,45	10,06	1
	Na <sub>2</sub> -EDTA	5,52		

Pro pěstování bylo využito celkem 60 rostlin (20 rostlin každého genotypu). Rostliny jednotlivých genotypů byly rozděleny do pěti skupin, jednotlivá skupina daného genotypu byla zastoupena čtyřmi rostlinami. První skupina byla kontrolní, rostliny byly ošetřovány ½ HM (obsahujícím 10 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Druhá skupina byla pěstována v roztoku se zvýšenou koncentrací dusičnanů (20 mmol.l<sup>-1</sup>). Koncentrace dusičnanů byla shodná s koncentrací v plném Hoaglandově roztoku, tedy dvakrát vyšší, než u kontrolní skupiny. Třetí skupina představovala snížený příjem dusičnanů (1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), kdy koncentrace dusičnanů odpovídala 1/8 koncentrace v plném Hoaglandově roztoku. Solný stres byl použit u čtvrté a páté skupiny. Rostliny byly ošetřovány ½ HM obsahujícím 75 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (4. skupina) a 150 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (5. skupina). Koncentrace sloučenin v jednotlivých roztocích jsou uvedeny v Tab. 3. Výměna roztoků probíhala pravidelně každý třetí den. Experiment byl ukončen po pěti dnech působení stresu. Během pěstování probíhalo sledování růstu rostlin.

Tab. 3 Složení jednotlivých živných roztoků pro hydroponické pěstování máty (1.kontrola = ½ HM (10 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 2.↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = roztok se zvýšenou koncentrací dusičnanů (20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 3.↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = roztok se sníženou koncentrací dusičnanů (1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 4. roztok = ½ HM obsahující 75 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl; 5.roztok = ½ HM obsahující 150 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl).

Sloučenina	kontrola	↑NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	↓NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	75 mmol.l <sup>-1</sup> NaCl	150 mmol.l <sup>-1</sup> NaCl
			koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	590	1 181	147,63	590	590
KNO <sub>3</sub>	253	506	63,25	253	253
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	493	493	493	493
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86
MnCl <sub>2</sub> x 4H <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	0,22	0,22	0,22	0,22
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 2H <sub>2</sub> O	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	10,06	10,06	10,06	10,06	10,06
Na <sub>2</sub> -EDTA					
NaCl	-	-	-	4 383	8 765

### 3.2.1.2 Semihydroponické pěstování máty ve fytotronu

Druhý experiment byl proveden v období od června do července 2020. V prvním experimentu byly vybrané genotypy máty pěstovány hydroponicky ve fytotronu. Pro druhý experiment bylo zvoleno semihydroponické pěstování se substrátem (Obr. 3). Pěstování se substrátem bylo zvoleno kvůli zvýšení účinnosti pěstování, ukotvení kořenů rostlin a podpoře růstu. Rostliny máty byly pěstovány v květináčích s hydroponickým substrátem vermikulitem. Jednalo se o otevřený systém, kde nedocházelo k recyklaci živného roztoku. Do květináče byl pravidelně přidáván nový podíl živného roztoku, nadbytek odtékal do podmisky. Pěstování bylo provedeno za vysoce kontrolovaných podmínek ve fytotronu. Byly zopakovány podmínky z předešlého experimentu.



Obr. 3 Semihydroponické pěstování genotypu *Mentha spicata* se substrátem vermikulitem.

Sběr rostlinného materiálu byl proveden v červnu 2020. Od každého genotypu bylo získáno 20 uniformních řízků o velikosti 10 cm, které byly ponechány ve vodě k zakořenění. Po týdnu následoval transfer do květináčů s vermikulitem. Pro pěstování tří genotypů bylo vybráno celkem 15 květináčů. Jelikož byly rostliny stresovány s využitím 5 roztoků, bylo pro každý genotyp využito 5 květináčů. V každém z květináčů byly pěstovány 4 rostliny daného genotypu. Do jednotlivých květináčů bylo přidáno 70 ml  $\frac{1}{2}$  Hoaglandova média a květináče byly umístěny do fytotronu. Podmínky pěstování ve fytotronu byly stejné jako u prvního experimentu. Výměna roztoků probíhala pravidelně každé 3 dny. Po 2 týdnech pěstování v Hoaglandově roztoku následovala aplikace stresu. Byly využity stejné stresové faktory, jako u prvního experimentu (stres příjmem dusičnanů a solný stres), došlo ovšem ke změně koncentrací NaCl. Koncentrace NaCl byla snížena ze 75  $\text{mmol.l}^{-1}$  a 150  $\text{mmol.l}^{-1}$  (první experiment) na 50  $\text{mmol.l}^{-1}$  a 100  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Pro pěstování byly využity následující roztoky:

- 1.skupina:  $\frac{1}{2}$  HM (kontrola; 10  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ )
- 2.skupina: roztok se zvýšenou koncentrací dusičnanů (20  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ )
- 3.skupina: roztok se sníženou koncentrací dusičnanů (1,25  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ )
- 4.skupina:  $\frac{1}{2}$  HM s 50  $\text{mmol.l}^{-1}$  NaCl
- 5.skupina:  $\frac{1}{2}$  HM se 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  NaCl

Abiotický stres byl aplikován po dobu 4 týdnů a po uplynutí této doby byl experiment ukončen. Průběžně byly zaznamenávány rozdíly v růstu rostlin. Během působení stresových faktorů probíhal každý týden odběr rostlinného materiálu. Odebírána byla vždy 1 rostlina od každého genotypu z jednotlivých ošetření. Rostlinný materiál byl uchováván při -80 °C pro následnou analýzu.

### **3.2.1.3 Semihydroponické pěstování máty ve fenotypizačním zařízení Plantscreen conveyor system**

Poznatky z prvního a druhého experimentu byly využity pro pěstování máty v zařízení Plantscreen conveyor. Tento systém slouží pro fenotypizaci rostlin. Během pěstování je automaticky prováděno měření parametrů růstu rostlin. Sledován může být například vliv abiotického stresu na teplotu a hmotnost rostlin a obsah vody v rostlinách. Využíváno je také RGB zobrazení struktury. Rostliny jsou umístěny v květináčích na pásech, jenž je transportují k měřicím místům. Vysokokapacitní fenotypizační platforma byla po optimalizaci podmínek hydroponického pěstování v přechozích experimentech zvolena z toho důvodu, že se jedná o vysoce přesný fenotypizační systém a je tedy možné zaznamenávat vliv abiotického stresu na parametry rostlin již v průběhu pěstování. Fenotypizační systém Plantscreen conveyor, který byl využíván pro pěstování ve třetím experimentu, je znázorněn na Obr. 4.



Obr. 4 Semihydroponické pěstování máty ve fenotypizačním systému Plantscreen conveyor.

Třetí experiment probíhal v období od října do listopadu 2020. Sběr rostlin byl proveden v říjnu 2020. Získáno bylo 20 řízků z mateřských rostlin od každého genotypu. Řízky byly umístěny do vody k zakořenění. Po zakořenění byl proveden transfer do zařízení Plantscreen conveyor. Rostliny byly umístěny jednotlivě do květináčů se substrátem vermikulitem, pro každý genotyp bylo tedy využito 20 květináčů. Květináče byly umístěny po pěti do pěstebních nádob s živným roztokem. Parametry pěstování v Planscreen conveyoru byly nastaveny následovně: světelný režim byl 16 h světlo (den) a 8 h tma (noc). Během dne byla teplota nastavena na 24 °C, v noci byla teplota 22 °C. Relativní vlhkost vzduchu byla 60 %. V režimu dne tvořilo 20 % intenzity světla bílé světlo a 80 % infračervené záření.

Rostliny byly po transferu do conveyoru nejprve zavlažovány vodou. Po týdnu následovala aplikace ½ HM. Do každé pěstební nádoby, která obsahovala 5 květináčů, bylo přidáno 625 ml roztoku. Příprava ½ HM je uvedena v Tab. 2 v prvním experimentu. Výměna roztoků probíhala pravidelně dvakrát týdně. Po 2 týdnech následovala aplikace abiotického stresu. Byly použity stejné stresové faktory jako u předchozích experimentů s tím rozdílem, že byla zvolena pouze jedna koncentrace NaCl, a to 100 mmol.l<sup>-1</sup>. Rostliny byly tedy ošetřovány 4 roztoky:

- 1.skupina: ½ HM (kontrola; 10 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)
- 2.skupina: roztok se zvýšenou koncentrací dusičnanů (20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)
- 3.skupina: roztok se sníženou koncentrací dusičnanů (1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)
- 4.skupina: ½ HM se 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl

Příprava těchto roztoků ze zásobních roztoků pro stresování rostlin je uvedena v Tab. 4. Pro přípravu roztoku se 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl byl nachystán zásobní roztok NaCl o koncentraci 4 mol.l<sup>-1</sup>. Pro každý genotyp byly využity 4 pěstební nádoby, každá představovala jednu skupinu. Výměna roztoků probíhala pravidelně dvakrát týdně. Po 16 dnech od začátku stresování rostlin byl experiment ukončen. Byl proveden odběr rostlinného materiálu. Rostliny byly poté skladovány při -80 °C. V průběhu pěstování docházelo v conveyoru k automatickému měření parametrů růstu rostlin. Prováděna byla RGB strukturní analýza (RGB imaging) a měřena byla také kinetika fluorescence chlorofylu.

Tab. 4 Příprava jednotlivých živných roztoků pro hydroponické pěstování máty ze zásobních roztoků (1.kontrola = ½ HM (10 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 2.↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = roztok se zvýšenou koncentrací dusičnanů (20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 3.↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = roztok se sníženou koncentrací dusičnanů (1,25 mmol.l<sup>-1</sup>); 4. roztok = ½ HM obsahující 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl). Výsledný objem roztoků je 1 l. Složení zásobních roztoků a koncentrace sloučenin jsou uvedeny v Tab. 2.

Zásobní roztok	kontrola	↑NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	↓NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	100 mmol.l <sup>-1</sup> NaCl
	Pipetovaný objem [ml] do 1 l			
Roztok dusičnanů	2	4	0,5	2
Roztok makroprvků	2	2	2	2
Roztok mikroprvků	1	1	1	1
Fe-EDTA	1	1	1	1
NaCl (4 mol.l <sup>-1</sup> )	-	-	-	25

### 3.2.2 Příprava rostlinného materiálu pro analýzu

Rostlinný materiál z druhého a třetího experimentu byl uchováván při -80 °C. Následně byla provedena lyofilizace rostlin při teplotě -80 °C po dobu 72 h. Po provedení lyofilizace byl rostlinný materiál homogenizován a bylo provedeno vážení vzorků pro analýzu. Homogenizovaný materiál byl skladován při -20 °C.

### 3.2.3 Analýza dusíkatých sloučenin

Byla provedena identifikace a kvantifikace volných polyaminů a aminokyselin s využitím ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Kvantifikace dusíkatých sloučenin byla provedena ve vzorcích z třetího experimentu, kdy byly rostliny pěstovány v conveyoru. Z každého vzorku bylo naváženo 5 mg homogenizovaného rostlinného materiálu pro následnou analýzu.

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

Metoda pro kvantifikaci volných polyaminů ve vzorcích byla optimalizována dle studie Taibi *et al.* (2000). Využita byla derivatizace vzorků a následná RP-HPLC analýza s hmotnostní detekcí. Pro analýzu polyaminů byla provedena extrakce rostlinného materiálu do 50% ethanolu. Do mikrozkušavek bylo k 5 mg homogenizovaného rostlinného materiálu přidáno 1000 µl 50% ethanolu. Vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně na 10 minut a následně byly centrifugovány (po dobu 5 min., při 12 000 g). Z každého vzorku bylo odebráno 200 µl a byla provedena derivatizace



benzoylchloridem. K 200  $\mu\text{l}$  extraktu bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  NaOH o koncentraci 2  $\text{mol.l}^{-1}$  a 2  $\mu\text{l}$  roztoku benzoylchloridu v methanolu (50:50, v:v). Vzorky byly zvortexovány a následně inkubovány při teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 40 min. Poté byly vzorky extrahovány do diethyletheru. Do mikrozkušavek bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  nasyceného roztoku NaCl a 500  $\mu\text{l}$  diethyletheru. Vzorky byly umístěny na vortex a etherové vrstvy byly přeneseny do nových mikrozkušavek. Po přidání nového podílu diethyletheru (500  $\mu\text{l}$ ) byla extrakce zopakována.

Vzorky obsahující spojené etherové vrstvy byly umístěny do vakuového koncentrátoru Centrivap (50  $^{\circ}\text{C}$ ) k odpaření dosucha. Po odpaření bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  mobilní fáze pro RP-HPLC obsahující interní standard 1,6-diaminohexan o koncentraci 75  $\text{nmol.l}^{-1}$ . Vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně (5 min.) a poté byly centrifugovány (5 min., 12 000 g). Do vialek pro HPLC bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  supernatantu a byla provedena analýza.

Pro kvantifikaci volných polyaminů byly použity standardy polyaminů (1,3-diaminopropan; 1,6-diaminohexan; agmatin; histamin; homospermidin; kadaverin; norspermidin; putrescin; spermidin; spermin; thermospermin). Nejprve byly připraveny zásobní roztoky polyaminů o koncentraci 10  $\text{mmol.l}^{-1}$  v deionizované vodě. Kalibrační řada standardů pro analýzu byla připravena ředěním zásobních roztoků polyaminů s mobilní fází pro HPLC. Koncentrace polyaminů v kalibrační řadě byla v rozmezí od 1  $\text{nmol.l}^{-1}$  do 500  $\text{nmol.l}^{-1}$ . Zvoleny byly koncentrace 1  $\text{nmol.l}^{-1}$ ; 2,5  $\text{nmol.l}^{-1}$ ; 5  $\text{nmol.l}^{-1}$ ; 10  $\text{nmol.l}^{-1}$ ; 25  $\text{nmol.l}^{-1}$ ; 50  $\text{nmol.l}^{-1}$ ; 100  $\text{nmol.l}^{-1}$ ; 250  $\text{nmol.l}^{-1}$  a 500  $\text{nmol.l}^{-1}$ .

UHPLC-MS/MS analýza byla provedena s využitím Nexera X2 UHPLC ultra vysokoúčinného kapalinového chromatografu spojeného s tandemovým hmotnostním spektrometrem MS-8050. Polyaminy byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s reverzními fázemi, použita byla analytická kolona Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) s příslušnou předkolonou. Kolona byla vyhřívána na 40  $^{\circ}\text{C}$ , průtoková rychlost byla 0,4  $\text{ml.min}^{-1}$ . Objem dávkovaného vzorku byl 2  $\mu\text{l}$ . Byla využita gradientová eluce. Mobilní fáze pro RP-HPLC byla složena z vodného roztoku kyseliny mravenčí o koncentraci 15  $\text{mmol.l}^{-1}$  a pH=3 (mobilní fáze A) a methanolu (mobilní fáze B). Podmínky gradientové eluce jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5 Podmínky gradientové eluce při UHPLC-MS/MS analýze volných polyaminů. Mobilní fázi B byl methanol.

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

Využitým hmotnostním detektorem byl trojitý kvadrupól. Hmotnostní spektra analytů byla získána s využitím ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu. Parametry ESI byly následující: kapilární napětí -3 kV; napětí na rozhraní 4 kV a teplota rozhraní 300 °C. Rychlost průtoku zahřívacího a sušícího plynu byla 10 l.min<sup>-1</sup>; rychlost průtoku zmlžujícího plynu byla 3 l.min<sup>-1</sup>. Pro kvantitativní analýzu byl využit MRM (multiple reaction monitoring) mód. UHPLC-MS/MS analýza standardů polyaminů i vzorků byla provedena v triplikátech. Identifikace a následná kvantifikace analytů proběhla na základě srovnání retenčních časů a MRM přechodů a jejich relativních intenzit s odpovídajícími standardy. MRM přechody standardů polyaminů jsou uvedeny v Tab. 6. Získaná data byla vyhodnocena s využitím programu Shimadzu Labsolutions 5.97 SP1.

Tab. 6 Retenční časy a MRM přechody standardů benzoyl-derivátů polyaminů při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekursoru → m/z produktového iontu.

Standard	Retenční čas [min] (Relativní směrodatná odchylka; %)	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)	Relativní intenzita [%]
Histamin	0,649±0,005 (0,81)	215,75→95,10 (16)	100
		217,75→77,00 (38)	87
Putrescin	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	1,749±0,003 (0,15)	282,95→104,95 (25)	100
		282,95→77,00 (55)	78
		282,95→162,05 (15)	67

Tab. 6 Retenční časy a MRM přechody standardů benzoyl-derivátů polyaminů při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekurzoru → m/z produktového iontu (*pokračování*).

Standard	Retenční čas [min] (Relativní směrodatná odchylka; %)	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)	Relativní intenzita [%]
Kadaverin	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	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	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	2,617±0,004 (0,16)	472,20→274,20 (22)	100
		472,20→105,05 (43)	78
		472,20→176,05 (29)	40
Thermospermin	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	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	4,350±0,004 (0,10)	443,00→104,85 (33)	100
		443,00→375,00 (13)	15

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

Pro analýzu volných aminokyselin v extraktech tří genotypů máty byla využita metoda, jež byla optimalizovaná dle poznatků ze studií Wen *et al.* (2019) a Zhou *et al.* (2013). Analyzovány byly nederivatizované aminokyseliny pomocí metody HILIC (hydrofilní interakční chromatografie). Tato metoda je na pomezí techniky HPLC s normálními a reverzními fázemi a je vhodná pro separaci polárních látek.

K 5 mg homogenizovaného rostlinného materiálu v mikrozkumavkách bylo přidáno 1000  $\mu\text{l}$  50% ethanolu. Vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně (10 min.) a byly centrifugovány (5 min., 12 000 g). Poté bylo z každé mikrozkumavky odebráno 200  $\mu\text{l}$  supernatantu. Tento podíl supernatantu byl umístěn do vakuového koncentrátoru (při 50 °C) k odpaření dosucha. Odparek byl rozpuštěn v 50  $\mu\text{l}$  mobilní fáze. Vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně (5 min.) a byly centrifugovány (5 min., 12 000 g). Do vialek bylo napipetováno 25  $\mu\text{l}$  supernatantu a byla provedena analýza.

Pro identifikaci a kvantifikaci volných aminokyselin ve vzorcích byly využity standardy aminokyselin (alanin,  $\beta$ -alanin, arginin, asparagin, cystein, fenylalanin, glutamin, glycin, histidin, isoleucin, kyselina aminoadipová, kyselina asparagová, kyselina  $\gamma$ -aminomáselná, kyselina glutamová, leucin, lysin, methionin, ornithin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyramin, tyrosin, valin). Zásobní roztoky aminokyselin o koncentraci 10  $\text{mmol.l}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním příslušné látky v HCl o koncentraci 0,1  $\text{mol.l}^{-1}$ . Zásobní roztoky asparaginu a glutaminu byly připraveny rozpuštěním v deionizované vodě. Byly připraveny kalibrační řady standardů, jejichž rozsah byl 0,5–250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Zvolené koncentrace standardů byly 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 0,75  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 2,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 7,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Tyto roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků aminokyselin s mobilní fází. Pro UHPLC-MS/MS analýzu volných aminokyselin byly využity také interní standardy. Konkrétně se jednalo o izotopově značené standardy kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné, leucinu, glutaminu, kyseliny glutamové a prolinu.

UHPLC-MS/MS analýza byla provedena s využitím kapalinového chromatografu Nexera X2 UHPLC spojeného s tandemovým hmotnostním spektrometrem MS-8050. Pro analýzu volných aminokyselin byla zvolena HILIC metoda a použitou kolonou byla Acquity UPLC BEH AMIDE (50 x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) s příslušnou předkolonou. Parametry analýzy byly následující: kolona byla vyhřívána na 40 °C, průtoková rychlost byla 0,4  $\text{ml.min}^{-1}$  a objem dávkovaného vzorku byl 2  $\mu\text{l}$ .

Byla využita gradientová eluce. Mobilní fáze pro analýzu volných aminokyselin se skládala z mravenčanu amonného o koncentraci 20  $\text{mmol.l}^{-1}$  a pH=3 (mobilní fáze A) a z 0,2% kyseliny mravenčí v acetonitrilu (mobilní fáze B). Podmínky gradientové eluce jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7 Podmínky gradientové eluce při UHPLC-MS/MS analýze volných aminokyselin. Mobilní fázi B byla 0,2% kyselina mravenčí v acetonitrilu.

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

Hmotnostní spektra nederivatizovaných aminokyselin byla získána s využitím ESI v pozitivním módu při následujících podmínkách: kapilární napětí -3 kV; napětí na rozhraní 4 kV a teplota rozhraní 300 °C. Rychlost průtoku zahřívacího i sušícího plynu byla 10 l.min<sup>-1</sup>; rychlost průtoku zmlžujícího plynu byla 3 l.min<sup>-1</sup>. Pro UHPLC-MS/MS analýzu volných aminokyselin byl využit MRM (multiple reaction monitoring) mód a měření proběhlo v triplikátech. Analyty byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů, MRM přechodů a jejich relativních intenzit s odpovídajícími standardy. MRM přechody standardů aminokyselin jsou uvedeny v Tab. 8. Vyhodnocení bylo provedeno s využitím programu Shimadzu Labsolutions 5.97 SP1.

Tab. 8 Retenční časy a MRM přechody standardů aminokyselin při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekursoru → m/z produktového iontu.

Standard	Retenční čas [min] (Relativní směrodatná odchylka; %)	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)	Relativní intenzita [%]
Tyramin	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	2,945 ± 0,058 (1,97)	132,10→86,05 (12)	100
		132,10→44,15 (23)	20
Leucin (interní standard)	2,957 ± 0,061 (2,07)	141,95→96,10 (12)	100

Tab. 8 Retenční časy a MRM přechody standardů aminokyselin při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekursoru → m/z produktového iontu (pokračování).

Standard	Retenční čas [min] (Relativní směrodatná odchylka; %)	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)	Relativní intenzita [%]
Isoleucin	3,275 ± 0,062 (1,90)	132,10→96,15 (12) 132,10→68,95 (16)	100 20
Fenylalanin	3,030 ± 0,068 (1,92)	165,90→120,10 (15) 65,90→103,10 (27)	100 58
Tryptofan	3,335 ± 0,062 (1,86)	205,10→188,20 (11) 205,10→118,00 (25)	100 81
Kyselina γ-aminomáselná (interní standard)	3,368 ± 0,081 (2,41)	110,15→93,00 (14) 110,15→49,05 (22) 110,15→46,00 (23)	100 69 26
Kyselina γ-aminomáselná	3,372 ± 0,083 (2,45)	104,10→87,10 (14) 104,10→45,05 (23) 104,10→69,00 (16)	100 60 37
Methionin	3,838 ± 0,054 (1,40)	149,90→56,10 (17) 149,90→61,00 (23)	100 85
Valin	4,126 ± 0,066 (1,60)	118,00→72,00 (10) 118,00→55,05 (20)	100 42
Prolin (interní standard)	4,149 ± 0,064 (1,55)	122,10→75,00 (16) 122,10→46,10 (30) 122,10→30,10 (38)	100 3 3
Prolin	4,157 ± 0,069 (1,66)	116,10→70,05 (7) 116,10→43,05 (22)	100 4
β-alanin	4,623 ± 0,105 (2,27)	90,10→72,10 (12) 90,10→30,10 (13) 90,10→45,15 (33)	100 97 33
Cystein	4,590 ± 0,082 (1,78)	121,90→38,85 (14) 121,90→81,00 (7)	100 42
Tyrosin	4,703 ± 0,051 (1,09)	182,10→91,10 (28) 182,10→136,00 (15) 181,10→165,15 (13)	100 48 35

Tab. 8 Retenční časy a MRM přechody standardů aminokyselin při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekursoru → m/z produktového iontu (pokračování).

Standard	Retenční čas [min] (Relativní směrodatná odchylka; %)	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)	Relativní intenzita [%]
Alanin	5,460 ± 0,059 (1,35)	90,10→44,10 (12) 90,10→45,00 (31)	100 8
Threonin	5,706 ± 0,055 (0,97)	120,10→74,00 (14) 120,10→102,10 (15)	100 22
Kyselina aminoadipová	5,776 ± 0,021 (0,36)	161,90→98,00 (15) 161,90→55,10 (26) 161,90→121,00 (10)	100 53 9
Threonin (interní standard)	5,703 ± 0,021 (0,37)	129,90→80,00 (13) 129,90→65,10 (18)	100 24
Glycin	5,794 ± 0,027 (0,47)	76,10→30,00 (11) 76,10→48,00 (14)	100 3
Kyselina glutamová (interní standard)	5,965 ± 0,017 (0,28)	152,95→88,00 (18) 152,95→135 (14)	100 60
Kyselina glutamová	5,978 ± 0,035 (0,58)	147,90→84,10 (17) 147,90→56,00 (20)	100 17
Glutamin (interní standard)	6,065 ± 0,012 (0,20)	151,90→88,00 (18) 151,90→135,10 (4) 151,90→89,20 (19)	100 88 72
Glutamin	6,065 ± 0,041 (0,68)	146,90→84,10 (18) 146,90→130,10 (15) 146,90→56,05 (29)	100 37 25
Serin	6,060 ± 0,077 (1,26)	106,00→60,00 (15) 106,10→88,00 (11)	100 14
Asparagin	6,156 ± 0,020 (0,32)	132,90→74,00 (16) 132,90→87,15 (11) 132,90→88,10 (12)	100 53 11
Kyselina asparagová	6,287 ± 0,072 (1,14)	134,00→88,00 (10) 134,00→74,00 (12)	100 82
Arginin	6,850 ± 0,009 (1,08)	175,00→70,05 (23) 175,00→116,10 (15)	100 42

Tab. 8 Retenční časy a MRM přechody standardů aminokyselin při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekursoru → m/z produktového iontu (pokračování).

Standard	Retenční čas [min] (Relativní směrodatná odchylka; %)	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)	Relativní intenzita [%]
Histidin	6,847 ± 0,019 (0,27)	155,90→110,15 (16)	100
		155,90→83,10 (24)	45
Lysin	6,927 ± 0,012 (0,18)	146,90→84,10 (18)	100
		146,90→130,00 (15)	20
		146,90→56,15 (28)	18
Ornithin	6,967 ± 0,014 (0,20)	133,10→70,00 (22)	100
		133,10→116,00 (15)	84
		133,10→43,15 (33)	59

### 3.2.4 Analýza sekundárních metabolitů máty

Byla provedena identifikace a kvantifikace sekundárních metabolitů máty. V extraktech byly kvantifikovány fenolické sloučeniny s využitím techniky UHPLC-MS/MS. Terpenoidy byly identifikovány a kvantifikovány pomocí techniky GC-MS. Analýza fenolických sloučenin byla provedena v rostlinném materiálu ze třetího experimentu (pěstování v systému Plantscreen conveyor). Kvantifikace terpenoidů byla provedena ve vzorcích z druhého a třetího experimentu.

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

Metoda pro analýzu fenolických sloučenin pomocí UHPLC-MS/MS byla s částečnými modifikacemi provedena dle Čavar Zeljković *et al.* (2020). Pro analýzu fenolických látek byly připraveny methanolické extrakty. Do mikrozkuvek bylo naváženo 10 mg homogenizovaného rostlinného materiálu ze třetího experimentu. K tomuto množství bylo přidáno 1000 µl 80% methanolu. Vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně (10 min.) a poté byly centrifugovány (5 min., 12 000 g). Následně byly supernatanty zfiltrovány.

Do nových mikrozkuvek typu Eppendorf byly umístěny centrifugační filtry a do každé z nich bylo napipetováno 400 µl supernatantu. Podíl supernatantu o objemu 250 µl byl napipetován do nové mikrozkuvky a umístěn do vakuového koncentrátoru



k odpaření dosucha. Odparek byl rozpuštěn v 25  $\mu\text{l}$  mobilní fáze obsahující interní standard. Vzorčky byly umístěny do ultrazvukové lázně (5 min.) a byly centrifugovány (5 min., 12 000 g). Supernatant byl napipetován do vialek pro HPLC analýzu. Měření bylo provedeno v triplikátech.

Pro kvantifikaci fenolických látek ve vzorcích byly využity následující standardy: 14 fenolických kyselin (kyselina 2,3-dihydroxybenzoová; kyselina 3-hydroxybenzoová; kyselina 4-hydroxybenzoová; kyselina ferulová; kyselina gallová; kyselina chlorogenová; kyselina kávová; kyselina *p*-kumarová; kyselina rozmarýnová; kyselina salicylová; kyselina sinapová; kyselina syringová; kyselina *trans*-skořicová; kyselina vanilová); 2 deriváty fenolických kyselin (2-O- $\beta$ -D-glukosid kyseliny salicylové; methylester kyseliny *p*-kumarové) a 15 flavonoidů (apigenin; galangin; hesperidin; chrysin; kamferol; katechin; kvercetin; kvercitrin; luteolin; morin; myricetin; naringenin; naringin; pinocembrin; rutin). Zásobní roztoky standardů fenolických sloučenin o koncentraci 10  $\text{mmol.l}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním příslušného množství látky v methanolu. Postupným ředěním zásobních roztoků s mobilní fází pro HPLC byly připraveny kalibrační řady standardů s rozsahem koncentrací 0,25–100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Pro UHPLC-MS/MS analýzu fenolických sloučenin byly jako interní standard využity izotopově značené standardy, konkrétně kyselina salicylová-d4 a kyselina *p*-kumarová-d6.

UHPLC-MS/MS analýza fenolických sloučenin byla provedena s využitím ultra vysokoúčinného kapalinového chromatografu Nexera X2 spojeného s tandemovým hmotnostním spektrometrem MS-8050. Vzorčky byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s reverzními fázemi. Použita byla kolona Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) s příslušnou předkolonou. Podmínky analýzy byly následující: teplota kolony 40  $^{\circ}\text{C}$ ; dávkovaný objem vzorku 2  $\mu\text{l}$  a průtoková rychlost 0,4  $\text{ml.min}^{-1}$ . Eluce byla gradientová, použitými roztoky byly vodný roztok kyseliny mravenčí o koncentraci 15  $\text{mmol.l}^{-1}$  a pH=3 (mobilní fáze A) a acetonitril (mobilní fáze B). Podmínky gradientové eluce jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9 Podmínky gradientové eluce při UHPLC-MS/MS analýze fenolických sloučenin. Mobilní fázi B byl acetonitril.

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

Detektorem byl trojitý kvadrupól. Využita byla ionizace elektrosprejem v negativním módu (ESI<sup>-</sup>). Pracováno bylo v módu měření MRM. Podmínky analýzy byly následující: kapilární napětí 3 kV; napětí na rozhraní 4 kV a teplota rozhraní 300 °C. Rychlost průtoku sušícího a zahřívacího plynu byla 10 l.min<sup>-1</sup>, zatímco průtok zamlžujícího plynu byla 3 l.min<sup>-1</sup>. Identifikace a kvantifikace fenolických sloučenin ve vzorcích proběhla na základě porovnání retenčních časů analytů, MRM přechodů a jejich relativních intenzit s odpovídajícími standardy. MRM přechody standardů jsou uvedeny v Tab. 10. Ke zpracování dat byl využit program Shimadzu Labsolutions 5.97 SP1.

Tab. 10 Retenční časy a MRM přechody standardů fenolických sloučenin při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekursoru → m/z produktového iontu.

Standard	Retenční čas [min]	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)
Kyselina gallová	0,65	169,00→125,05 (10) 169,00→79,05 (23) 169,00→97,10 (21)
Kyselina 4-hydroxybenzoová	1,92	137,00→93,00 (15) 137,00→65,00 (31) 137,00→41,00 (53)
2-O-β-D- glukosid kyseliny salicylové	2,15	298,70→137,10 (12) 298,70→93,10 (38)

Tab. 10 Retenční časy a MRM přechody standardů fenolických sloučenin při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekursoru → m/z produktového iontu (*pokračování*).

Standard	Retenční čas [min]	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)
Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová	2,15	153,10→108,80 (10) 153,10→108,15 (25) 153,10→91,10 (26)
Katechin	2,25	288,60→245,25 (15) 288,60→123,20 (29) 288,60→109,10 (26)
Chlorogenová kyselina	2,26	352,70→190,80 (10) 352,70→85,15 (43) 352,70→93,10 (95)
Kyselina vanilová	2,43	167,20→152,25 (18) 167,20→108,15 (21)
Kyselina kávová	2,46	178,80→134,75 (15) 178,80→134,25 (25) 178,80→107,15 (23)
Kyselina 3-hydroxybenzoová	2,53	137,00→93,00 (14) 137,00→64,90 (36) 137,00→90,90 (29)
Kyselina syringová	2,66	197,10→182,25 (16) 197,10→123,20 (24) 197,10→95,10 (31)
Kyselina <i>p</i> -kumarová	3,08	163,00→149,10 (10) 163,00→93,00 (31) 163,00→147,10 (32)
Kyselina ferulová	3,54	193,10→134,25 (25) 193,10→178,25 (16)
Kyselina sinapová	3,63	222,70→208,30 (18) 222,70→193,20 (22) 222,70→164,30 (17)
Rutin	3,76	609,15→300,03 (18) 609,15→271,03 (23) 609,15→255,03 (18)

Tab. 10 Retenční časy a MRM přechody standardů fenolických sloučenin při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako  $m/z$  iontu prekursoru  $\rightarrow$   $m/z$  produktového iontu (*pokračování*).

Standard	Retenční čas [min]	MRM přechody $m/z \rightarrow m/z$ (Kolizní energie; V)
Salicylová kyselina	3,84	137,10 $\rightarrow$ 92,70 (19) 137,10 $\rightarrow$ 65,00 (29) 137,10 $\rightarrow$ 75,05 (35)
Kvercitrin	4,48	447,10 $\rightarrow$ 343,25 (28) 447,10 $\rightarrow$ 297,25 (29)
Naringin	4,61	579,20 $\rightarrow$ 459,25 (28) 579,20 $\rightarrow$ 271,30 (32) 579,20 $\rightarrow$ 151,30 (44)
Kyselina rozmarýnová	4,62	358,70 $\rightarrow$ 161,20 (15) 358,70 $\rightarrow$ 133,15 (39) 358,70 $\rightarrow$ 197,30 (18)
Myricetin	4,63	317,00 $\rightarrow$ 151,10 (20) 317,00 $\rightarrow$ 149,15 (16) 317,00 $\rightarrow$ 137,10 (24)
Hesperidin	4,75	609,00 $\rightarrow$ 301,20 (25) 609,00 $\rightarrow$ 149,15 (16) 609,00 $\rightarrow$ 164,25 (55)
Morin	4,98	301,00 $\rightarrow$ 151,10 (19) 301,00 $\rightarrow$ 125,05 (21) 301,00 $\rightarrow$ 149,15 (26)
Luteolin	5,29	284,60 $\rightarrow$ 133,20 (34) 284,60 $\rightarrow$ 151,25 (26) 284,60 $\rightarrow$ 175,25 (27)
Kvercetin	5,30	301,20 $\rightarrow$ 151,25 (21) 301,20 $\rightarrow$ 179,25 (19) 301,20 $\rightarrow$ 107,05 (28)
<i>p</i> -Methyl kumarát	5,45	176,70 $\rightarrow$ 146,80 (25) 176,70 $\rightarrow$ 118,10 (21) 176,70 $\rightarrow$ 145,25 (21)
Kyselina <i>trans</i> -skořicová	5,50	147,10 $\rightarrow$ 103,50 (15) 147,10 $\rightarrow$ 77,15 (25)

Tab. 10 Retenční časy a MRM přechody standardů fenolických sloučenin při UHPLC-MS/MS analýze. MRM přechody jsou vyjádřeny jako m/z iontu prekursoru → m/z produktového iontu (*pokračování*).

Standard	Retenční čas [min]	MRM přechody m/z→m/z (Kolizní energie; V)
Naringenin	5,81	271,10→119,25 (25) 271,10→151,25 (19) 271,10→107,05 (24)
Apigenin	5,83	268,60→117,10 (37) 268,60→151,25 (24) 268,60→149,25 (25)
Kamferol	5,97	285,60→117,05 (42) 285,60→239,20 (28) 285,60→93,05 (37)
Chrysin	7,57	252,60→63,00 (34) 252,60→143,30 (27) 252,60→209,30 (23)
Pinocembrin	7,63	254,70→213,30 (22) 254,70→151,25 (23) 254,70→171,30 (26)
Galangin	7,66	268,60→169,25 (27) 268,60→171,30 (28) 268,60→213,30 (25)
Kyselina <i>p</i> -kumarová -d <sub>6</sub> (interní standard)	3,04	169,10→124,85 (15) 169,10→97,15 (33) 169,10→213,30 (25)
Kyselina salicylová – d <sub>4</sub> (interní standard)	3,79	141,10→96,80 (16) 141,10→69,10 (31) 141,10→78,10 (35)

### 3.2.4.2 Analýza terpenoidů pomocí GC-MS

Terpenoidy ve vzorcích identifikovány a kvantifikovány pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Metoda byla optimalizována dle Čavar Zeljković *et al.* (2020). Pro analýzu terpenoidů byla provedena extrakce do hexanu. Bylo naváženo 50 mg homogenizovaného rostlinného materiálu. Toto množství bylo extrahováno do 1000 µl hexanu obsahujícího 0,001 % interního standardu tridekanu (koncentrace tridekanu 10 µg.ml<sup>-1</sup>). Vzorky byly umístěny do ultrazvukové

lázňě (15 min.) a byly centrifugovány (10 min., 12 000 g). Supernatant byl přenesen do vialek a byla provedena GC-MS analýza.

Pro kvantifikaci terpenoidů ve vzorcích byly použity standardy vybraných terpenoidů:  $\beta$ -karyofylen, eukalyptol, karvon, menthofuran, menthol, menthon a pulegon (Sigma-Aldrich, USA). Kromě těchto standardů byl využit také piperitenon oxid, který byl izolován z extraktu genotypu *Mentha spicata*. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých standardů terpenoidů o koncentraci 1000 mmol.l<sup>-1</sup> zředěním příslušného množství standardu v hexanu. Poté byl připraven mix zásobních roztoků standardů v hexanu, v němž každý ze standardů měl koncentraci 100 mmol.l<sup>-1</sup>. Byla připravena kalibrační řada standardů, jejíž rozsah byl 0,01–50 mmol.l<sup>-1</sup>. Zvolené koncentrace byly 0,01 mmol.l<sup>-1</sup>; 0,05 mmol.l<sup>-1</sup>; 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>; 0,5 mmol.l<sup>-1</sup>; 1 mmol.l<sup>-1</sup>; 2,5 mmol.l<sup>-1</sup>; 5 mmol.l<sup>-1</sup>; 10 mmol.l<sup>-1</sup>; 25 mmol.l<sup>-1</sup>; 50 mmol.l<sup>-1</sup>. Kalibrační řada byla připravena do vialek napipetováním vhodného objemu mixu standardů, interního standardu tridekanu (o výsledné koncentraci ve vialce 10  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) a hexanu.

Piperitenon oxid byl izolován a purifikován z hexanového extraktu genotypu *Mentha spicata* ze třetího experimentu po provedení GC-MS analýzy vzorků. Piperitenon oxid byl z extraktu izolován pomocí SPE (solid phase extraction; extrakce tuhou fází). Pro izolaci byly použity SPE kolonky Supelclean LC–SI (kapacita 500 mg, objem 3 ml). Byly připraveny roztoky ethylesteru kyseliny octové v hexanu, konkrétně 5%; 10% a 20% ethylester kyseliny octové v hexanu (v:v). SPE kolonky byly aktivovány pomocí hexanu (3 ml) a ethylesteru kyseliny octové (3 ml). K ekvilibraci kolonek byl využit hexan (3 ml). Vzorek byl dávkován do kolonek. Následovala frakcionace pomocí 5%; 10% a 20% ethylesteru kyseliny octové v hexanu. Frakce byly sbírány a analyzovány pomocí GC-MS za účelem zjištění čistoty piperitenon oxidu. Postup byl zopakován třikrát za účelem purifikace. Výsledná frakce 5% ethylesteru kyseliny octové v hexanu obsahující piperitenon oxid o čistotě 97 % byla analyzována pomocí GC-MS. Vzorek byl ponechán k odpaření dosucha. Odparek byl rozpuštěn v hexanu, koncentrace piperitenon oxidu v roztoku byla 1000 mmol.l<sup>-1</sup>.

Identifikace a kvantifikace terpenoidů byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A s hmotnostním spektrometrem 5975C. Využitou kolonou byl Agilent HP-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m), stacionární fází byl 5% fenyl methyl siloxan. Při analýze byl využit režim splitless (nástrík bez splitu).

Podmínky analýzy byly následující: teplota kolony 60–240 °C (nárůst 3 °C za minutu); rychlost průtoku nosného plynu 1,1 ml.min<sup>-1</sup> a teplota hmotnostního detektoru 230 °C. Dávkovaný objem vzorku byl 1 µl. Měření probíhalo v duplikátech. Identifikace a kvantifikace terpenoidů ve vzorcích byla provedena na základě srovnání retenčních indexů analytů a jejich hmotnostních spekter. Identifikace byla realizována s využitím programů MSD ChemStation E.02.02.1431.; NIST MS Search a srovnáním s literaturou (Adams, 2007). Terpenoidy byly kvantifikovány proměřením kalibračních řad standardů a srovnáním signálů terpenoidů ve vzorcích a odpovídajících standardů terpenoidů.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Optimalizace hydroponického pěstování máty

#### 4.1.1 Hydroponické pěstování máty ve fytotronu

V prvním experimentu byly rostliny tří genotypů pěstovány v hydroponickém systému ve fytotronu. V průběhu pěstování byl sledován vliv abiotického stresu (vysokého a nízkého příjmu dusičnanů a solného stresu) na růst rostlin. Sledovány byly následující parametry: výška rostlin, délka kořenů, počet listů a velikost listů.

Během působení solného stresu ( $75 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$  v  $\frac{1}{2}$  HM) došlo k signifikantní redukci růstu. Tyto rostliny měly sníženou velikost i počet listů ve srovnání s rostlinami pěstovanými v kontrolním roztoku a při zvýšeném i sníženém příjmu dusičnanů. Důsledkem aplikace  $150 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$  bylo odumírání rostlin všech genotypů. Při zvýšeném příjmu dusičnanů (dvakrát vyšším než u kontroly, tedy  $20 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ) došlo k mírné redukci výšky rostlin i počtu listů ve srovnání s rostlinami pěstovanými v kontrolním roztoku a v roztoku se sníženým příjmem dusičnanů ( $1/8 \text{ NO}_3^-$ ;  $1,25 \text{ mmol.l}^{-1}$ ).

Optimálním živným roztokem pro hydroponické pěstování *M. arvensis* bylo  $\frac{1}{2}$  HM (kontrola). K výrazné redukci růstu došlo u rostlin tohoto genotypu pěstovaných za podmínek sníženého příjmu dusičnanů (Obr. 5). Pro pěstování genotypů *M. piperita* a *M. spicata* byl optimálním živným roztokem roztok se sníženým obsahem dusičnanů. Srovnání parametrů rostlin tří genotypů pěstovaných v kontrolním  $\frac{1}{2}$  Hoaglandově médiu a v roztocích se zvýšeným a sníženým obsahem dusičnanů je uvedeno v Tab. 11.

Tab. 11 Srovnání výšky rostlin a počtu listů u genotypů máty pěstovaných hydroponicky v kontrolním médiu, při zvýšeném a sníženém příjmu dusičnanů. Každé ošetření bylo zastoupeno 4 rostlinami daného genotypu. Parametry byly zaznamenány dne 17.6.2020, po 5 dnech působení abiotického stresu.

Živný roztok	<i>M. arvensis</i>	<i>M. piperita</i>	<i>M. spicata</i>
1.kontrola ( $\frac{1}{2}$ HM)	25 cm; 22-53 listů	10-15 cm; 14-20 listů	16 cm; 20 listů
2.zvýšený příjem $\text{NO}_3^-$	15 cm; 13-16 listů	14-17 cm; 18-20 listů	14 cm; 32 listů
3.snížený příjem $\text{NO}_3^-$	odumírání	20 cm; 18-28 listů	24 cm; 50 listů





Obr. 5 Výsledné srovnání vlivu příjmu dusičnanů na růst *Mentha arvensis* po ukončení experimentu dne 17.6.2020. 1=kontrolní  $\frac{1}{2}$  HM ( $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ); 2=zvýšený příjem dusičnanů ( $20 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ); 3=snížený příjem dusičnanů ( $1,25 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ).

#### 4.1.2 Semihydroponické pěstování máty ve fytotronu

Ve druhém experimentu byly rostliny pěstovány v květináčích s hydroponickým substrátem vermikulitem ve fytotronu. Využity byly stejné podmínky jako u prvního experimentu s tím rozdílem, že došlo ke změně koncentrace NaCl u rostlin pěstovaných při solném stresu. Využito bylo  $\frac{1}{2}$  HM obsahující 50 a 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  NaCl. Nebyla využita koncentrace 150  $\text{mmol.l}^{-1}$ , jelikož v přechodném experimentu docházelo za těchto podmínek k odumírání rostlin. Každé ošetření bylo zastoupeno 4 rostlinami daného genotypu. Působení abiotického stresu probíhalo po dobu 4 týdnů. V průběhu pěstování byly zaznamenávány parametry růstu rostlin. Každý týden probíhal odběr rostlinného materiálu a následně byla provedena analýza terpenoidů ve vzorcích.

Výsledky pěstování *M. arvensis* a *M. spicata* ve vermikulitu odpovídaly výsledkům hydroponického pěstování v prvním experimentu. Nejvhodnějším roztokem pro semihydroponické pěstování *M. arvensis* ve vermikulitu bylo  $\frac{1}{2}$  HM. Optimálním roztokem pro pěstování *M. spicata* ve vermikulitu byl roztok se sníženou koncentrací dusičnanů ( $1,25 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ). Růst *M. spicata* byl negativně ovlivněn při zvýšeném příjmu dusičnanů (Obr. 6).



Obr. 6 Výsledné srovnání působení abiotického stresu po dobu 14 dní na růst *Mentha spicata*. Květináče zleva doprava: kontrolní ½ HM (10 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); zvýšený příjem dusičnanů (20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); snížený příjem dusičnanů (1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); ½ HM s 50 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl; ½ HM se 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl.

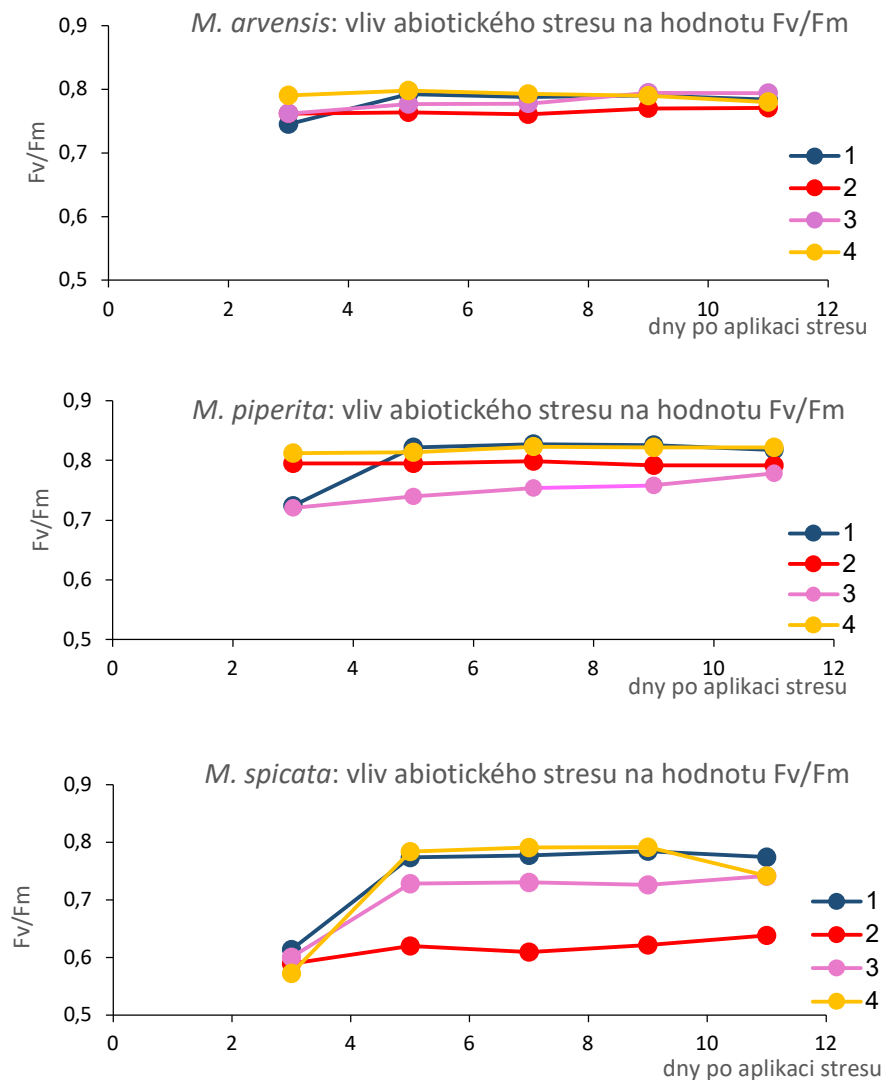
Oproti prvnímu experimentu, kde byla *M. piperita* pěstována hydroponicky a nejlepší parametry rostlin byly zaznamenány u sníženého příjmu dusíku, byl nevhodnějším roztokem pro pěstování tohoto genotypu ve vermikulitu kontrolní živný roztok (½ HM). Při použití solného stresu neprobíhalo odumírání rostlin, ale došlo k signifikantnímu snížení výšky rostlin a počtu listů u všech genotypů vystavených solnému stresu. Rozdíly ve výšce a počtu listů rostlin pěstovaných při abiotickém stresu po dobu 14 dní jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 12 Srovnání výšky rostlin a počtu listů u genotypů máty pěstovaných semihydroponicky v substrátu vermikulitu ve fytotronu. Každé ošetření bylo zastoupeno 4 rostlinami daného genotypu. Parametry byly zaznamenány dne 13.7.2020, po 14 dnech působení abiotického stresu.

Živný roztok	<i>M. arvensis</i>	<i>M. piperita</i>	<i>M. spicata</i>
1.kontrola (½ HM)	<b>26,5 cm; 72-116 listů</b>	<b>23,5 cm; 68 listů</b>	15 cm; 60 listů
2.zvýšený příjem dusičnanů	14-20 cm; 52-64 listů	22 cm; 55 listů	7 cm; 7 listů
3.snížený příjem dusičnanů	20 cm; 84 listů	19,5 cm; 42-60 listů	<b>20,5 cm; 80 listů</b>
4.solný stres (50 mmol.l <sup>-1</sup> NaCl)	11-15,5 cm; 72 listů	16 cm; 35 listů	9-12,5 cm; 30-48 listů
5.solný stres (100 mmol.l <sup>-1</sup> NaCl)	8-13 cm; 60 listů	16,5 cm; 32-48 listů	14 cm; 46 listů

### 4.1.3 Semihydroponické pěstování máty ve fenotypizačním zařízení Plantscreen conveyor system

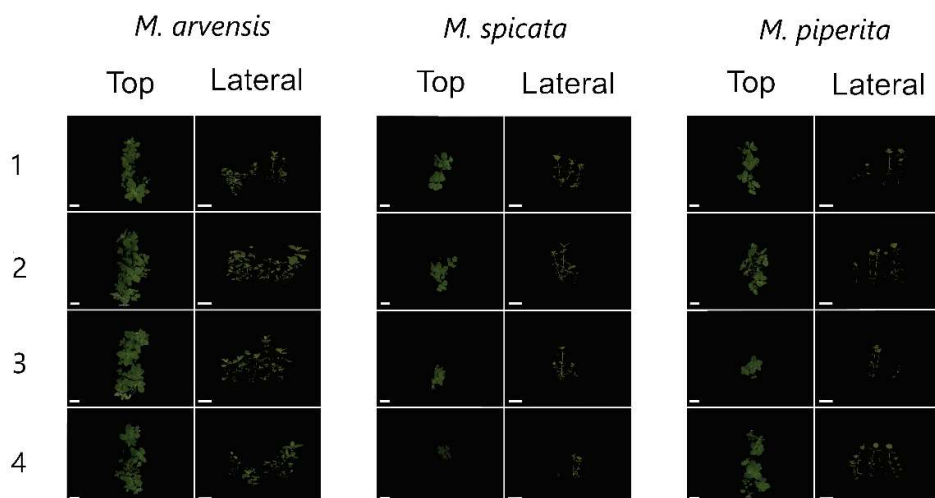
Ve třetím experimentu byly genotypy máty pěstovány v květináčích s vermikulitem ve fenotypizačním zařízení Plantscreen conveyor a v průběhu pěstování pravidelně probíhalo měření parametrů rostlin. Provedeno bylo měření chlorofylové fluorescence. Zjišťován byl základní fluorescenční poměr  $F_v/F_m$ , tedy maximální kvantový výtěžek transportu elektronů ve fotosystému II. Tento poměr byl detekován u předem zatemněných rostlin po osvětlení. Zaznamenané hodnoty  $F_v/F_m$  jsou uvedeny na Obr. 7.



Obr. 7 Výsledky měření maximálního kvantového výtěžku transportu elektronů ve fotosystému II u genotypů máty vystavených abiotickému stresu. 1=kontrolní  $\frac{1}{2}$  HM ( $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ); 2=zvýšený příjem dusičnanů ( $20 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ); 3=snížený příjem dusičnanů ( $1,25 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ); 4= $\frac{1}{2}$  HM se  $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ .

Snížení poměru Fv/Fm je ukazatelem snížené funkce fotosystému II. K nejvýraznějšímu poklesu hodnoty poměru Fv/Fm vlivem stresu došlo u genotypu *M. spicata*. Základní fluorescenční poměr Fv/Fm byl snížen zejména u rostlin pěstovaných v roztoku se zvýšeným obsahem dusičnanů. U kontrolních rostlin byl průměr zaznamenaných poměrů Fv/Fm roven  $0,74 \pm 0,07$ , zatímco u rostlin se zvýšeným příjmem dusičnanů byl tento průměr  $0,62 \pm 0,02$ . U genotypu *M. arvensis* nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi zjištěnými hodnotami Fv/Fm u jednotlivých ošetření. Poměr Fv/Fm byl u genotypu *M. piperita* mírně snížen u rostlin pěstovaných v roztoku se sníženou koncentrací dusičnanů ( $0,75 \pm 0,02$ ) oproti rostlinám kontrolním ( $0,80 \pm 0,04$ ). U žádného z genotypů nemělo působení solného stresu signifikantní vliv na hodnotu poměru Fv/Fm.

Kromě měření chlorofylové fluorescence bylo prováděno RGB zobrazení habitů. Rostliny byly v průběhu působení abiotického stresu pravidelně snímány RGB kamerou, kdy byl sledován vliv stresu na rostlinnou morfologii. Pomocí kamery byly vytvářeny snímky rostlin z boku a shora. Snímky získané RGB zobrazením byly porovnány po 8 dnech působení stresu (Obr. 8).



Obr. 8 RGB zobrazení habitů rostlin vystavených abiotickému stresu. Snímky byly získány po 8 dnech působení stresu. Jednotlivá ošetření: 1=kontrolní  $\frac{1}{2}$  HM ( $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ); 2=zvýšený příjem dusičnanů ( $20 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ); 3=snížený příjem dusičnanů ( $1,25 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ); 4= $\frac{1}{2}$  HM se  $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ .

Po ukončení experimentu byly porovnávány RGB snímky a zaznamenané parametry jednotlivých rostlin. Významné fyziologické změny rostlin se často projevují změnou zbarvení. RGB zobrazení bylo vybráno pro sledování růstu rostlin, zachycení možných změn ve zbarvení a pro monitoring stavu rostlin. RGB zobrazení poskytuje informace o množství makro- a mikroprvků v rostlinách a odezvě rostlin na abiotický stres. Získané parametry mohou být využity pro zjištění obsahu chlorofylu v rostlinách.

Bylo provedeno srovnání snímků získaných RGB zobrazením dne 18.11.2020, po 8 dnech působení abiotického stresu (Obr. 8). Zjišťovány byly plochy rostlin, tedy počet pixelů na 1 mm<sup>2</sup>. Tento parametr je vhodný pro monitoring růstu rostlin při stresových podmínkách. Z pořízených RGB snímků je patrné, že k výraznému snížení plochy došlo u rostlin genotypu *M. spicata* pěstovaných při solném stresu. Takto stresované rostliny měly snížený vzrůst a menší počet listů. Použití solného stresu mělo negativní dopad na růst a vývoj rostlin a pro pěstování tohoto genotypu tedy není vhodné. Plocha rostlin byla mírně snížena také u rostlin pěstovaných v roztoku se sníženou koncentrací dusičnanů.

U genotypu *M. arvensis* nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi jednotlivými ošetřeními. V případě genotypu *M. piperita* došlo k redukci plochy rostlin za podmínek sníženého příjmu dusičnanů v porovnání s rostlinami kontrolními i stresovanými zvýšeným příjmem dusičnanů a solným stresem. U takto ošetřených rostlin došlo také k mírnému snížení funkce fotosystému II (Obr. 7).

## 4.2 Analýza polyaminů a aminokyselin

V rostlinném materiálu ze třetího experimentu (pěstování ve fenotypizační platformě Plantscreen conveyor) byla provedena kvantifikace volných polyaminů a aminokyselin pomocí UHPLC-MS/MS. Kvantifikace dusíkatých látek byla provedena v rostlinách vystavených abiotickému stresu po dobu 16 dní. Pro kvantifikaci volných polyaminů a aminokyselin ve vzorcích byly nejprve analyzovány kalibrační řady vybraných standardů. Byly vytvořeny kalibrační křivky závislosti signálu (plochy píku v chromatogramu) na koncentraci daného standardu. Signály získané analýzou vzorků byly srovnány se signály získanými analýzou kalibračních řad standardů. Předpisy kalibračních křivek byly využity pro výpočet obsahu dané sloučeniny ve vzorcích. Obsah byl přepočítán na 1 mg rostlinného materiálu a výsledná koncentrace byla uvedena v jednotkách pmol.mg<sup>-1</sup> DW (suché hmoty).

Pro vyhodnocení vlivu abiotického stresu na obsah volných polyaminů a aminokyselin v rostlinném materiálu byla použita metoda vnitřní normalizace, kdy byly porovnávány koncentrace jednotlivých dusíkatých sloučenin ve stresovaných rostlinách a v rostlinách kontrolních. Získané poměry koncentrací byly zlogaritmovány. Výsledky byly vyobrazeny v grafech jako  $\log_2(c \text{ stres}/c \text{ kontrola})$ . Pro každý z genotypů byly vytvořeny 2 grafy. První graf představoval vliv sníženého či zvýšeného příjmu dusičnanů na koncentraci dusíkatých sloučenin, v druhém grafu byl uveden vliv solného stresu na koncentraci dusíkatých sloučenin v rostlinném materiálu. Porovnána byla také celková koncentrace volných polyaminů a aminokyselin v jednotlivých genotypech pěstovaných v rozdílných živných roztocích (Tab. 13).

Tab. 13 Vliv abiotického stresu na celkovou koncentraci volných aminokyselin a polyaminů [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] v suché hmotě jednotlivých genotypů.

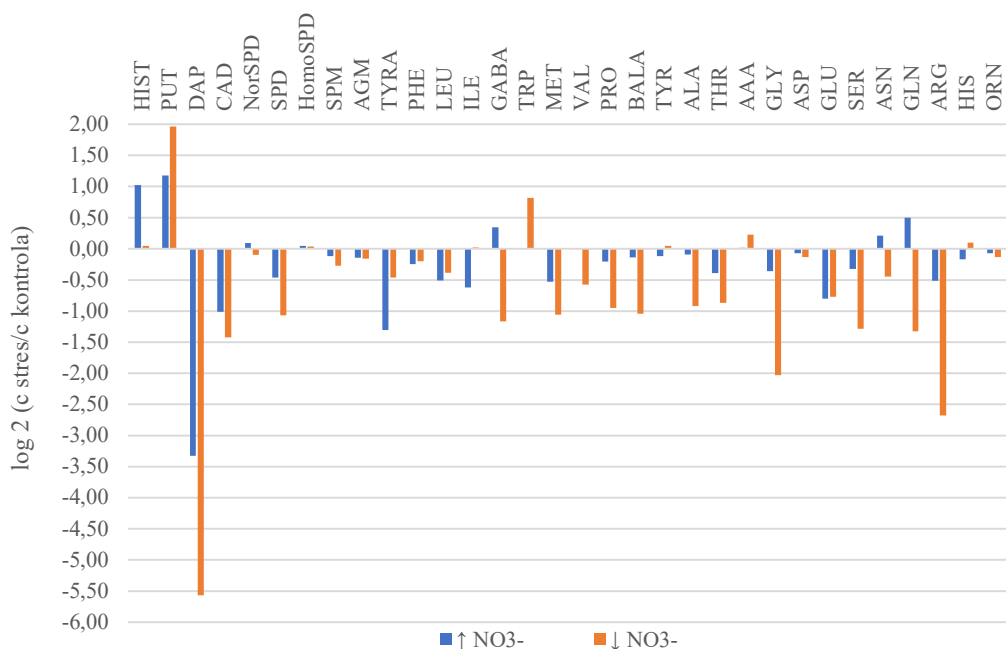
Celková koncentrace volných dusíkatých sloučenin [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW]			
	<i>M. arvensis</i>	<i>M. piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Kontrola	2 282,79	2 333,51	1 911,30
Zvýšený příjem dusičnanů	1 390,28	1 916,53	2 446,82
Snížený příjem dusičnanů	1 080,16	2 751,68	2 570,98
Solný stres	2 440,76	2 297,45	1 679,67

Největší změny v koncentraci dusíkatých sloučenin vlivem abiotického stresu byly zaznamenány u genotypu *M. arvensis*. Koncentrace dusíkatých sloučenin byla v suché hmotě genotypu *M. arvensis* signifikantně snížena vlivem pěstování při sníženém (1 080,16 pmol.mg<sup>-1</sup> DW) a zvýšeném (1 390,28 pmol.mg<sup>-1</sup> DW) příjmu dusičnanů oproti kontrole (2 282,79 pmol.mg<sup>-1</sup> DW). Naopak u rostlin pěstovaných v ½ HM se 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl došlo ke zvýšení obsahu dusíkatých látek (2 440,76 pmol.mg<sup>-1</sup> DW). Pouze u genotypu *M. arvensis* došlo ke zvýšení koncentrace dusíkatých látek vlivem solného stresu.

V rostlinách *M. piperita* byla koncentrace volných polyaminů a aminokyselin signifikantně snížena při zvýšeném příjmu dusičnanů, k mírnému snížení došlo také při působení solného stresu. Naopak při sníženém příjmu dusičnanů došlo k výraznému nárůstu obsahu dusíkatých látek (2 751,68 pmol.mg<sup>-1</sup> DW) oproti rostlinám kontrolním (2 331,51 pmol.mg<sup>-1</sup> DW). V genotypu *M. spicata* byla koncentrace dusíkatých látek vlivem solného stresu snížena (1 679,67 pmol.mg<sup>-1</sup> DW) oproti kontrolnímu ošetření (1 911,30 pmol.mg<sup>-1</sup> DW), ovšem došlo k nárůstu koncentrace při zvýšeném a sníženém příjmu dusičnanů.

Byl sledován vliv abiotického stresu působícího během hydroponického pěstování rostlin na koncentraci jednotlivých volných polyaminů a aminokyselin v suché hmotě vybraných genotypů. Vliv příjmu dusičnanů na obsah dusíkatých sloučenin v genotypu *M. arvensis* je uveden na Obr. 9. U genotypu *M. arvensis* měl obecně stres sníženým či zvýšeným příjmem dusičnanů negativní vliv na koncentraci volných dusíkatých látek. K výraznějšímu poklesu dusíkatých látek došlo při použití snížené koncentrace dusičnanů.

### Vliv příjmu dusičnanů na obsah dusíkatých sloučenin u *M. arvensis*

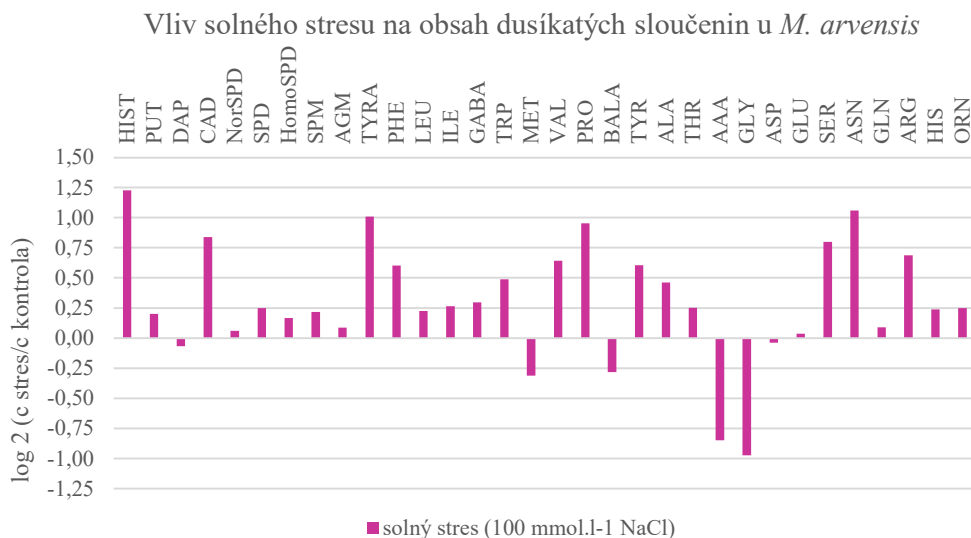


Obr. 9 Vliv příjmu dusičnanů na obsah volných polyaminů a aminokyselin v genotypu *M. arvensis*. Sledován byl vliv ↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a ↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (snížený příjem; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Dusíkaté sloučeniny: HIST=histamin; PUT=putrescin; DAP=1,3-diaminopropan; CAD=kadaverin; NorSPD=norspermidin; SPD=spermidin; HomoSPD=homospermidin; SPM=spermin; AGM=agmatin; TYRA=tyramin; PHE=fenylalanin; LEU=leucin; ILE=izoleucin; GABA=kys. γ-aminomáselná; TRP=tryptofan; MET=methionin; VAL=valin; PRO=prolin; BALA=β-alanin; TYR=tyrosin; ALA=alanin; THR=threonin; AAA=kys. aminoadipová; GLY=glycin; ASP=kys.asparagová; GLU=kys.glutamová; SER=serin; ASN=asparagin; GLN=glutamin; ARG=arginin; HIS=histidin; ORN=ornithin.

Vlivem stresu došlo zejména k významnému poklesu obsahu volných aminokyselin. Nejvíce byla snížena koncentrace argininu a glycinu. Jedinou aminokyselinou, u které došlo k výraznějšímu nárůstu koncentrace vlivem sníženého příjmu dusičnanů, byl tryptofan. Z hlediska polyaminů byla důsledkem stresu zvýšena pouze koncentrace histaminu a putrescinu. Naopak vlivem stresu došlo k výraznému poklesu koncentrací polyaminů 1,3-diaminopropanu; kadaverinu a spermidinu, a to zejména u rostlin stresovaných sníženým příjmem dusičnanů. Z výsledků vyplývá, že stres nadměrným i nízkým příjmem dusičnanů je pro pěstování genotypu *M. arvensis* nevhodný. Jeho důsledkem je zvýšení degradace aminokyselin.

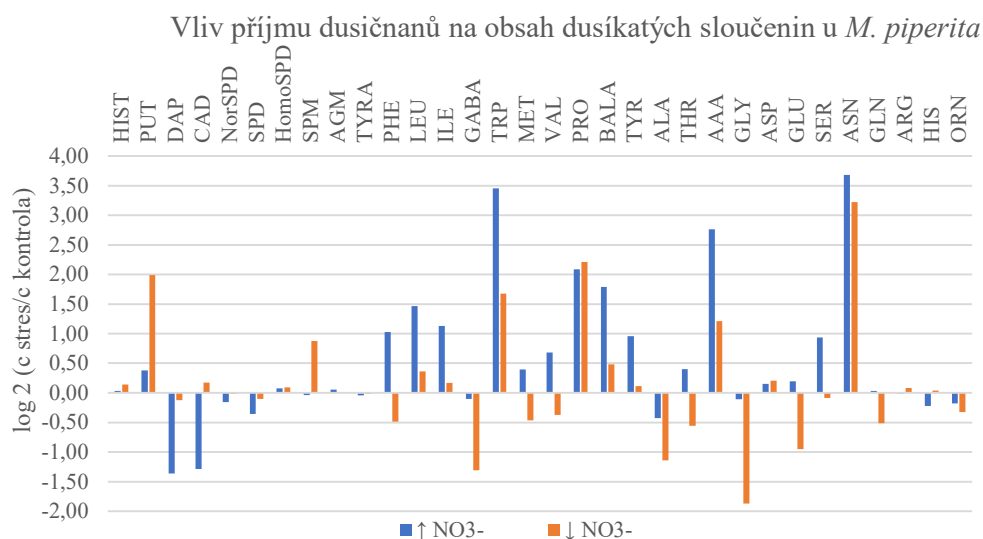


Následně byl u genotypu *M. arvensis* sledován vliv solného stresu (100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl) na koncentraci jednotlivých polyaminů a aminokyselin (Obr. 10). Obecně došlo k nárůstu koncentrace dusíkatých sloučenin vlivem solného stresu. Největší nárůst byl zaznamenán u aminokyselin asparaginu, prolinu, tyraminu a serinu. Pozitivní korelace byla zjištěna také mezi působením solného stresu a obsahem volných polyaminů, kdy signifikantní zvýšení koncentrace nastalo zejména u histaminu a kadaverinu. K výraznějšímu snížení koncentrace vlivem stresu došlo pouze u aminokyselin glycinu a kyseliny aminoadipové.



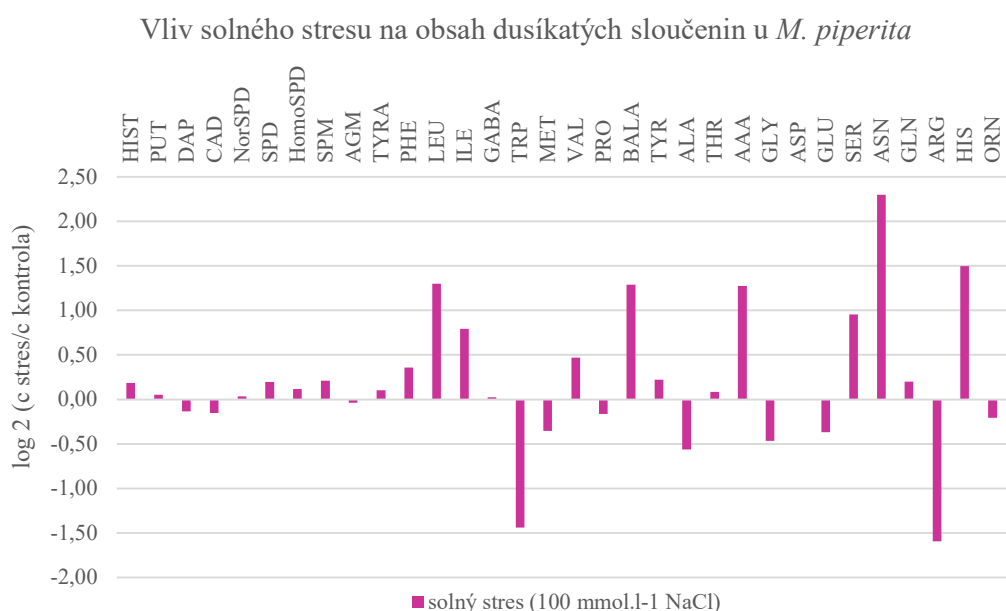
Obr. 10 Vliv solného stresu na obsah volných polyaminů a aminokyselin v genotypu *M. arvensis*. Dusíkaté sloučeniny: HIST=histamin; PUT=putrescin; DAP=1,3-diaminopropan; CAD=kadaverin; NorSPD=norspermidin; SPD=spermidin; HomoSPD=homospermidin; SPM=spermin; AGM=agmatin; TYRA=tyramin; PHE=fenylalanin; LEU=leucin; ILE=izoleucin; GABA=kys.  $\gamma$ -aminomáselná; TRP=tryptofan; MET=methionin; VAL=valin; PRO=prolin; BALA= $\beta$ -alanin; TYR=tyrosin; ALA=alanin; THR=threonin; AAA=kys. aminoadipová; GLY=glycin; ASP=kys.asparagová; GLU=kys.glutamová; SER=serin; ASN=asparagin; GLN=glutamin; ARG=arginin; HIS=histidin; ORN=ornithin.

U genotypu *M. piperita* byl zaznamenán opačný trend vlivu zvýšeného příjmu dusičnanů na obsah volných aminokyselin než u genotypu *M. arvensis*. Důsledkem zvýšeného příjmu dusičnanů byl signifikantní nárůst obsahu volných aminokyselin (Obr. 11). K největšímu nárůstu došlo u aminokyselin asparaginu, tryptofanu, prolinu, kyseliny aminoadipové. Koncentrace těchto aminokyselin byla zvýšena také při sníženém příjmu dusičnanů. I když došlo při zvýšeném příjmu dusičnanů k nárůstu obsahu volných aminokyselin, celková koncentrace dusíkatých sloučenin byla v genotypu *M. piperita* signifikantně snížena (viz. Tab. 11). Při zvýšeném příjmu dusičnanů došlo k výraznému snížení koncentrací polyaminů 1,3-diaminopropanu; kadaverinu a spermidinu. Zaznamenán byl pouze mírný nárůst obsahu putrescinu. Při sníženém příjmu dusičnanů došlo k signifikantnímu zvýšení koncentrace polyaminů putrescinu a sperminu. Snížení bylo zaznamenáno zejména u aminokyselin glycinu, alaninu, kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné, kyseliny glutamové, fenylalaninu a methioninu.



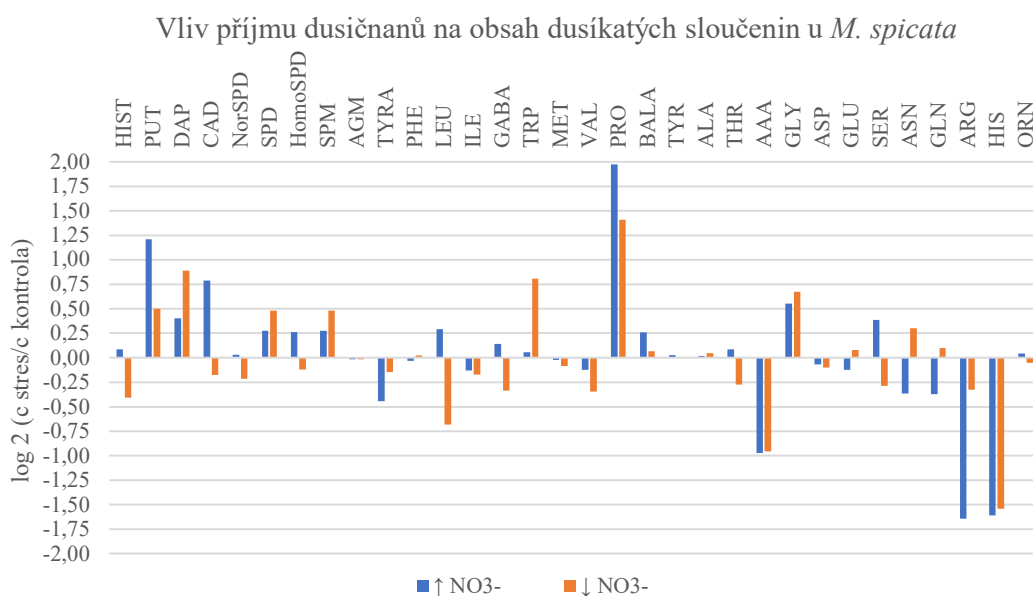
Obr. 11 Vliv příjmu dusičnanů na obsah volných polyaminů a aminokyselin v genotypu *M. piperita*. Sledován byl vliv  $\uparrow\text{NO}_3^-$  (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a  $\downarrow\text{NO}_3^-$  (snížený příjem; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Dusíkaté sloučeniny: HIST=histamin; PUT=putrescin; DAP=1,3-diaminopropan; CAD=kadaverin; NorSPD=norspermidin; SPD=spermidin; HomoSPD=homospermidin; SPM=spermin; AGM=agmatin; TYRA=tyramin; PHE=fenylalanin; GABA=kys.  $\gamma$ -aminomáselná; TRP=tryptofan; MET=methionin; VAL=valin; PRO=prolin; BALA= $\beta$ -alanin; TYR=tyrosin; ALA=alanin; THR=threonin; AAA=kys.aminoadipová; GLY=glycin; ASP=kys. asparagová; GLU=kys.glutamová; SER=serin; ASN=asparagin; GLN=glutamin; ARG=arginin; HIS=histidin; ORN=ornithin.

Důsledkem solného stresu u genotypu *M. piperita* bylo signifikantní zvýšení koncentrace volných aminokyselin asparaginu, histidinu,  $\beta$ -alaninu, leucinu, isoleucinu, serinu a kyseliny aminoadipové (Obr. 12). U genotypu *M. piperita* došlo při působení stresu ke zvýšení koncentrace prolinu pouze u rostlin stresovaných nadměrným či sníženým příjmem dusičnanů. Solný stres naopak vyústil v mírné snížení obsahu prolinu (10,12 pmol.mg<sup>-1</sup> DW) ve stresovaných rostlinách oproti rostlinám kontrolním (11,34 pmol.mg<sup>-1</sup> DW). Výrazně snížena byla vlivem solného stresu koncentrace tryptofanu a argininu. U genotypu *M. piperita* byly při solném stresu zaznamenány pouze malé změny v koncentracích jednotlivých polyaminů.



Obr. 12 Vliv solného stresu na obsah volných polyaminů a aminokyselin v genotypu *M. piperita*. Dusíkaté sloučeniny: HIST=histamin; PUT=putrescin; DAP=1,3-diaminopropan; CAD=kadaverin; NorSPD=norspermidin; SPD=spermidin; HomoSPD=homospermidin; SPM=spermin; AGM=agmatin; TYRA=tyramin; PHE=fenylalanin; LEU=leucin; ILE=izoleucin; GABA=kys.  $\gamma$ -aminomáselná; TRP=tryptofan; MET=metionin; VAL=valin; PRO=prolin; BALA= $\beta$ -alanin; TYR=tyrosin; ALA=alanin; THR=threonin; AAA=kys. aminoadipová; GLY=glycin; ASP=kys.asparagová; GLU=kys.glutamová; SER=serin; ASN=asparagin; GLN=glutamin; ARG=arginin; HIS=histidin; ORN=ornithin.

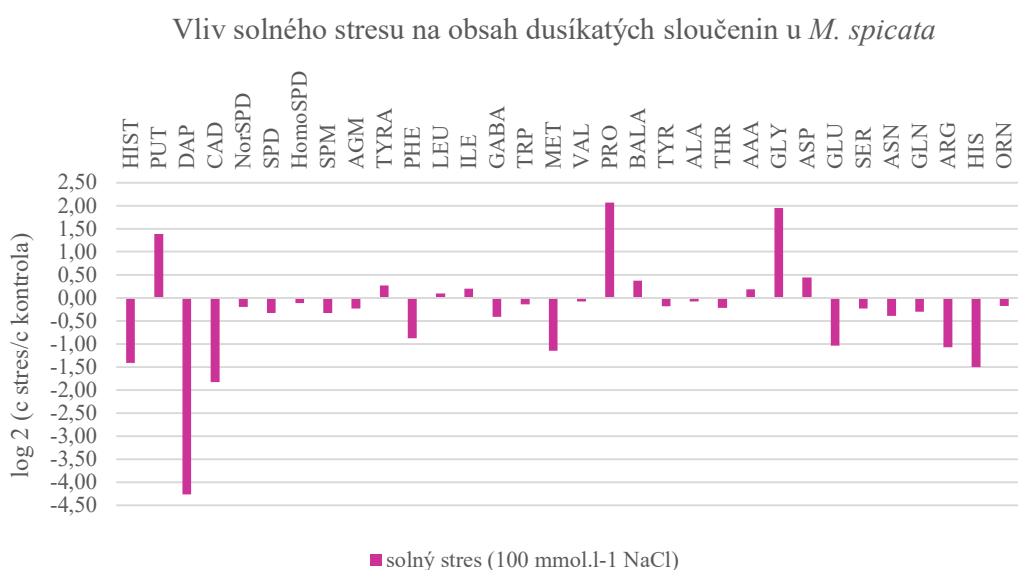
Vliv příjmu dusičnanů na koncentraci volných polyaminů a aminokyselin v rostlinách genotypu *M. spicata* je uveden na Obr. 13. Z výsledků je patrné, že zvýšený příjem dusičnanů u tohoto genotypu vyústil v nárůst obsahu volných polyaminů. Nejvíce byla zvýšena koncentrace putrescinu a kadaverinu. Abiotický stres se u genotypu *M. spicata* projevil zejména výrazným zvýšením koncentrace prolinu. Důsledkem zvýšeného příjmu dusičnanů byl také nárůst obsahu glycinu a serinu. Snížení koncentrace bylo naopak zaznamenáno u aminokyselin argininu, histidinu a kyseliny aminoadipové. Příjem nízkého množství dusičnanů se projevil u genotypu *M. spicata* nárůstem koncentrace polyaminů putrescinu; 1,3-diaminopropanu; spermidinu a sperminu. Kromě prolinu byla za podmínek nízkého příjmu dusičnanů signifikantně zvýšena také koncentrace glycinu a tryptofanu.



Obr. 13 Vliv příjmu dusičnanů na obsah volných polyaminů a aminokyselin v genotypu *M. spicata*. Dusíkaté sloučeniny: HIST=histamin; PUT=putrescin; DAP=1,3-diaminopropan; CAD=kadaverin; NorSPD=norspermidin; SPD=spermidin; HomoSPD=homospermidin; SPM=spermin; AGM=agmatin; TYRA=tyramin; PHE=fenylalanin; LEU=leucin; ILE=izoleucin; GABA=kys.  $\gamma$ -aminomáselná; TRP=tryptofan; MET=methionin; VAL=valin; PRO=prolin; BALA= $\beta$ -alanin; TYR=tyrosin; ALA=alanin; THR=threonin; AAA=kys. aminoadipová; GLY=glycin; ASP=kys.asparagová; GLU=kys.glutamová; SER=serin; ASN=asparagin; GLN=glutamin; ARG=arginin; HIS=histidin; ORN=ornithin.

Dle grafu (Obr. 14) je patrné, že solný stres měl u genotypu *M. spicata* negativní vliv na obsah dusíkatých sloučenin. Z hlediska volných polyaminů došlo pouze ke zvýšení koncentrace putrescinu, koncentrace ostatních polyaminů byla výrazně snížena. Působením solného stresu došlo k signifikantnímu zvýšení koncentrace aminokyselin prolinu a glycinu, stresových markerů. Naopak obsah histidinu, argininu, glutamátu, fenyalaninu a methioninu byl výrazně snížen.

Ze tří vybraných genotypů máty byly rostliny *M. spicata* nejméně tolerantní k působení solného stresu. Použití solného stresu ( $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ ) tedy není vhodné pro pěstování genotypu *M. spicata*.



Obr. 14 Vliv solného stresu na obsah volných polyaminů a aminokyselin v genotypu *M. spicata*. Dusíkaté sloučeniny: HIST=histamin; PUT=putrescin; DAP=1,3-diaminopropan; CAD=kadaverin; NorSPD=norspermidin; SPD=spermidin; HomoSPD=homospermidin; SPM=spermin; AGM=agmatin; TYRA=tyramin; PHE=fenylalanin; LEU=leucin; ILE=izoleucin; GABA=kys.  $\gamma$ -aminomáselná; TRP=tryptofan; MET=metionin; VAL=valin; PRO=prolin; BALA= $\beta$ -alanin; TYR=tyrosin; ALA=alanin; THR=threonin; AAA=kys. aminoadipová; GLY=glycin; ASP=kys.asparagová; GLU=kys.glutamová; SER=serin; ASN=asparagin; GLN=glutamin; ARG=arginin; HIS=histidin; ORN=ornithin.

### 4.3 Analýza sekundárních metabolitů máty

#### 4.3.1 Analýza fenolických sloučenin

Kvantifikace fenolických sloučenin byla provedena v rostlinném materiálu vypěstovaném ve třetím experimentu, kdy byly rostliny vystaveny abiotickému stresu po dobu 16 dní v systému Plantscreen conveyor. UHPLC-MS/MS analýzou kalibračních řad standardů byly získány chromatogramy jednotlivých analytů. Pro každý ze standardů byly vytvořeny kalibrační křivky závislosti plochy píku na koncentraci standardu. Předpisy kalibračních křivek standardů byly použity pro výpočet koncentrace dané fenolické sloučeniny ve vzorku. Plochy píků získané analýzou vzorků byly srovnány s plochami píků standardů a následně byl proveden přepočet na 1 mg suché hmoty (DW). Výsledná vypočítaná koncentrace byla uvedena v jednotkách  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  DW.

Pro vyhodnocení vlivu abiotického stresu na obsah fenolických sloučenin v rostlinách máty byly vypočteny podíly koncentrací jednotlivých fenolických sloučenin ve stresovaných rostlinách a v rostlinách kontrolních. Tyto podíly byly logaritmovány, použit byl logaritmus o základu 2. Vypočítané hodnoty byly následně porovnávány. Pokud byly hodnoty záporné, mělo působení stresu negativní vliv na obsah fenolických sloučenin. V případě pozitivní korelace byly hodnoty zlogaritmovaného podílu kladné. Pro vyhodnocení byly vytvořeny grafy, ve kterých byly změny koncentrací fenolů prezentovány jako  $\log_2(c \text{ stres}/c \text{ kontrola})$ .

Pro každý z genotypů byly vytvořeny 2 grafy. První graf představoval vliv příjmu dusičnanů na obsah fenolických sloučenin. Vliv solného stresu byl vynesena v druhém grafu. Kromě posouzení změn v koncentracích jednotlivých sloučenin byla také zjištěna celková koncentrace fenolických látek ve stresovaných a kontrolních rostlinách (Tab. 14).

Tab. 14 Vliv abiotického stresu na celkovou koncentraci fenolických sloučenin [ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] v suché hmotě jednotlivých genotypů.

Celková koncentrace fenolických sloučenin [ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW]			
	<i>M. arvensis</i>	<i>M. piperita</i>	<i>M. spicata</i>
Kontrola	36,496	16,104	38,959
Zvýšený příjem dusičnanů	28,146	33,643	57,836
Snížený příjem dusičnanů	29,201	46,869	48,819
Solný stres	28,688	30,782	55,407

Celková koncentrace fenolických sloučenin byla v genotypu *M. arvensis* působením abiotického stresu výrazně snížena. Jednalo se o jediný genotyp máty, u kterého byla zjištěna negativní korelace mezi působením stresu a obsahem fenolických látek. U dalších genotypů, *M. piperita* a *M. spicata*, byl důsledkem abiotického stresu nárůst obsahu fenolických sloučenin.

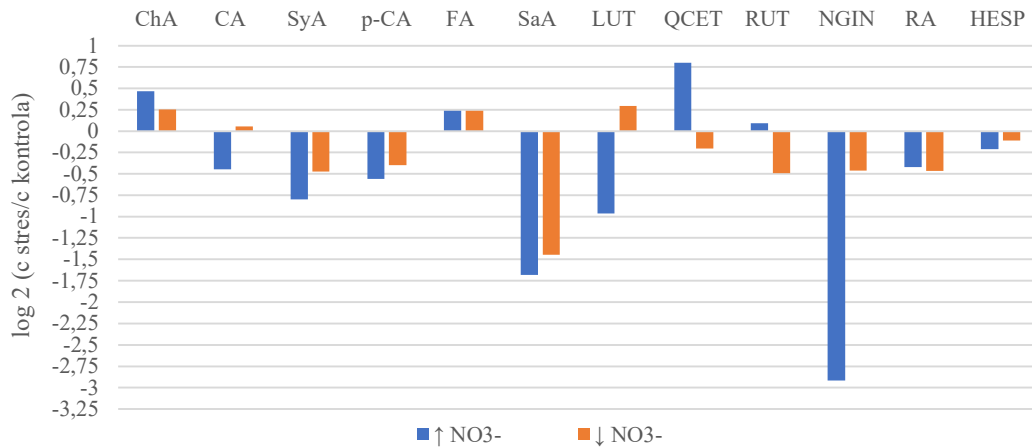
Majoritně zastoupenými fenolickými sloučeninami všech genotypů máty byly kyselina rozmarýnová, dále pak hesperidin a kyselina kávová. Zjištěné koncentrace kyseliny rozmarýnové byly porovnány se studií navazující na výsledky bakalářské práce (Ćavar Zeljković *et al.*, 2021). Koncentrace kyseliny rozmarýnové ve 13 genotypech máty pěstovaných na experimentálních plochách VÚRV, v.v.i. a sklizených v červenci–září 2018 se pohybovala v rozmezí 1 363–2 557  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW. V této diplomové práci bylo zjištěno, že u tří genotypů máty získaných na plochách VÚRV, v.v.i. v říjnu 2020 a pěstovaných hydroponicky v systému Plantscreen conveyor byla koncentrace kyseliny rozmarýnové výrazně vyšší, pohybovala se v rozmezí 2 999–9 720  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW (kontrola). V případě stresovaných rostlin byla koncentrace kyseliny rozmarýnové 6 361–14 468  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW (zvýšený příjem dusičnanů); 6 181–12 078  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW (snížený příjem dusičnanů); 6 437–14 245  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW (solný stres).

V porovnání s kontrolou došlo u genotypu *M. arvensis* pěstovaného ze podmínek stresu k výraznému poklesu obsahu fenolických sloučenin, přičemž mezi jednotlivými ošetřeními (vysoký příjem dusičnanů, nízký příjem dusičnanů, solný stres) nebyly zaznamenány velké rozdíly. Nejnižší koncentrace fenolických látek byla detekována v rostlinách pěstovaných v roztoku se zvýšeným obsahem dusičnanů.

U genotypu *M. piperita* i *M. spicata* byla v porovnání se stresovanými rostlinami koncentrace fenolických látek v kontrolních rostlinách nejnižší. V genotypu *M. piperita* byla koncentrace signifikantně zvýšena v rostlinách stresovaných sníženým příjmem dusičnanů (46,869  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  DW) oproti rostlinám kontrolním (16,104  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  DW). Nejvýraznější nárůst koncentrace fenolů byl u genotypu *M. spicata* zaznamenán u zvýšeného příjmu dusičnanů, dále pak u solného stresu.

Následně byly sledovány změny hladin jednotlivých fenolických látek v ošetřovaných rostlinách. Vliv příjmu dusičnanů na obsah fenolických sloučenin u genotypu *M. arvensis* je uveden na Obr. 15. Pouze u tohoto genotypu bylo důsledkem abiotického stresu snížení koncentrace téměř všech fenolických sloučenin.

Vliv příjmu dusičnanů na obsah fenolických sloučenin u *M. arvensis*



Obr. 15 Vliv příjmu dusičnanů na obsah fenolických sloučenin v genotypu *M. arvensis*. Sledován byl vliv  $\uparrow\text{NO}_3^-$  (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a  $\downarrow\text{NO}_3^-$  (snížený příjem dusičnanů; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Fenolické sloučeniny: ChA=kyselina chlorogenová; CA=kyselina kávová; SyA=kyselina syringová; p-CA=kyselina *p*-kumarová; FA=kyselina ferulová; SaA=kyselina salicylová; LUT=luteolin; QCET=kvercetin; RUT=rutin; NGIN=naringin; RA=kyselina rozmarýnová; HESP=hesperidin.

Vlivem zvýšeného i sníženého příjmu dusičnanů došlo k signifikantnímu poklesu koncentrace téměř všech fenolických látek v suché hmotě genotypu *M. arvensis*. K výraznějšímu poklesu obsahu fenolů došlo u rostlin pěstovaných v roztoku se zvýšenou koncentrací dusičnanů. Abiotický stres příjmem dusičnanů se projevil zejména snížením koncentrace flavonoidu naringinu a kyseliny salicylové, která je zařazována mezi fenolické kyseliny.

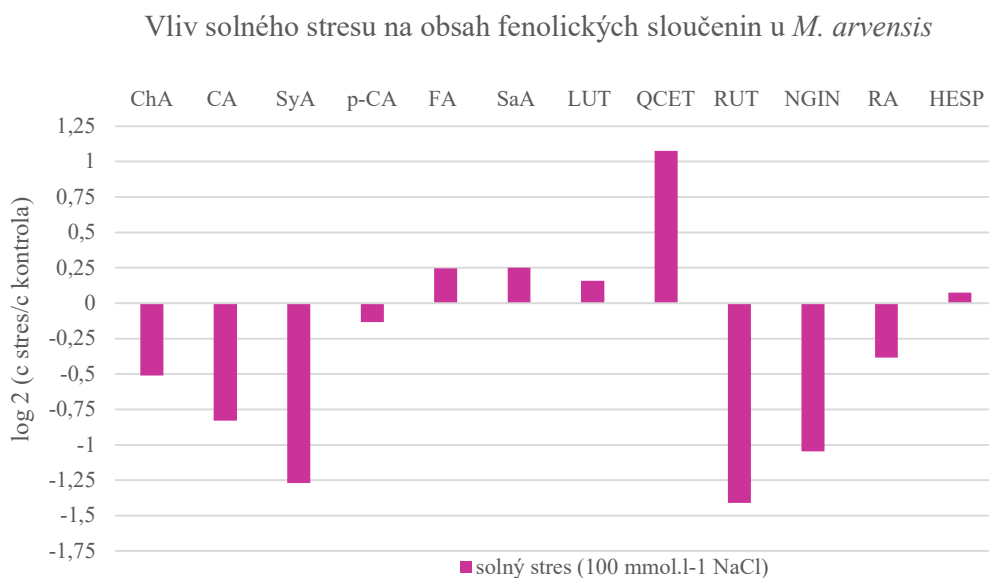
Důsledkem sníženého i zvýšeného příjmu dusičnanů byl nárůst obsahu pouze dvou fenolických kyselin, a to kyseliny chlorogenové a ferulové. Vlivem zvýšeného příjmu dusičnanů došlo také k signifikantnímu nárůstu koncentrace flavonoidu kvercetinu, naopak důsledkem sníženého příjmu dusičnanů byl nárůst koncentrace flavonoidu luteolinu.

Stres nedostatkem i nadbytkem dusičnanů měl v tomto případě negativní vliv na obsah fenolických sloučenin, pro pěstování genotypu *M. arvensis* tedy nejsou tyto podmínky vhodné.



V grafu (Obr. 16) lze pozorovat vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin u genotypu *M. arvensis*. Stejně jako v případě stresu příjmem dusičnanů nebyl solný stres příznivý a došlo k signifikantnímu poklesu koncentrace téměř všech fenolických látek. Signifikantní nárůst byl zaznamenán pouze u kvercetinu, obdobně jako v případě zvýšeného příjmu dusičnanů u tohoto genotypu. K mírnému nárůstu hladiny došlo u kyseliny ferulové, kyseliny salicylové a luteolinu. K nejvýraznějšímu snížení důsledkem zasolení došlo u rutinu, dále pak u kyseliny syringové a naringinu.

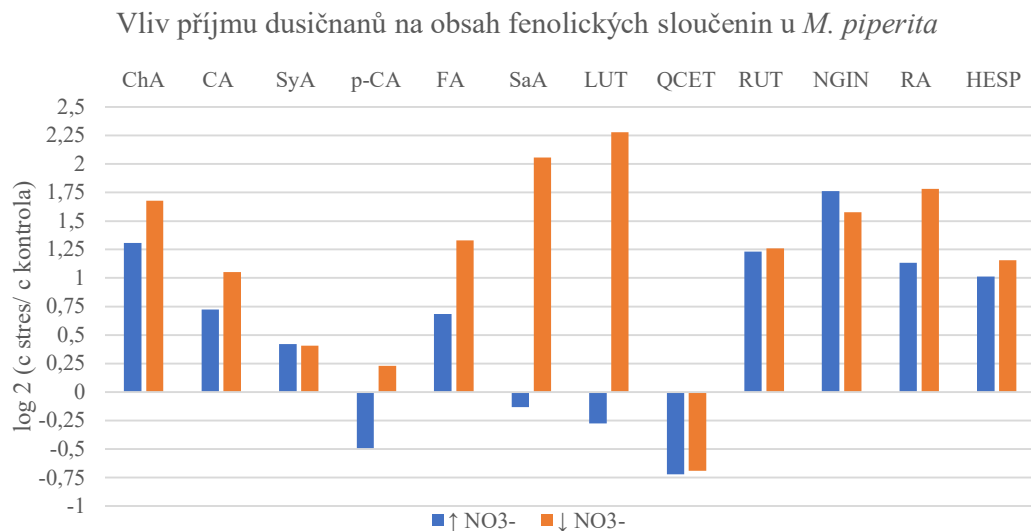
Při působení abiotického stresu nastává často zvýšení produkce fenolických sloučenin, jež se vyznačují antioxidační aktivitou. Jedná se o jeden z obranných mechanismů rostlin před negativními vlivy působícího stresu. U genotypu *M. arvensis* došlo k signifikantnímu snížení koncentrace fenolických sloučenin a antioxidační odezva na působení solného stresu nebyla dostatečná.



Obr. 16 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin v genotypu *M. arvensis*. Fenolické sloučeniny: ChA=kyselina chlorogenová; CA=kyselina kávová; SyA=kyselina syringová; p-CA=kyselina *p*-kumarová; FA=kyselina ferulová; SaA=kyselina salicylová; LUT=luteolin; QCET=kvercetin; RUT=rutin; NGIN=naringin; RA=kyselina rozmarýnová; HESP=hesperidin.

Dále byl zkoumán vliv zvýšeného a sníženého příjmu dusičnanů na obsah fenolických sloučenin u genotypu *M. piperita* (Obr. 17). Vlivem stresu došlo k signifikantnímu nárůstu téměř všech fenolických látek. Jedinou látkou, u níž došlo vlivem obou stresových faktorů k poklesu koncentrace v suché hmotě, byl kvercetin. V případě kyseliny salicylové, luteolinu a kyseliny *p*-kumarové byl zaznamenán opačný trend u zvýšeného a sníženého příjmu dusičnanů. Při sníženém příjmu dusičnanů došlo ke zvýšení obsahu, naopak zvýšený příjem dusičnanů vyústil v pokles obsahu těchto fenolických sloučenin oproti kontrole.

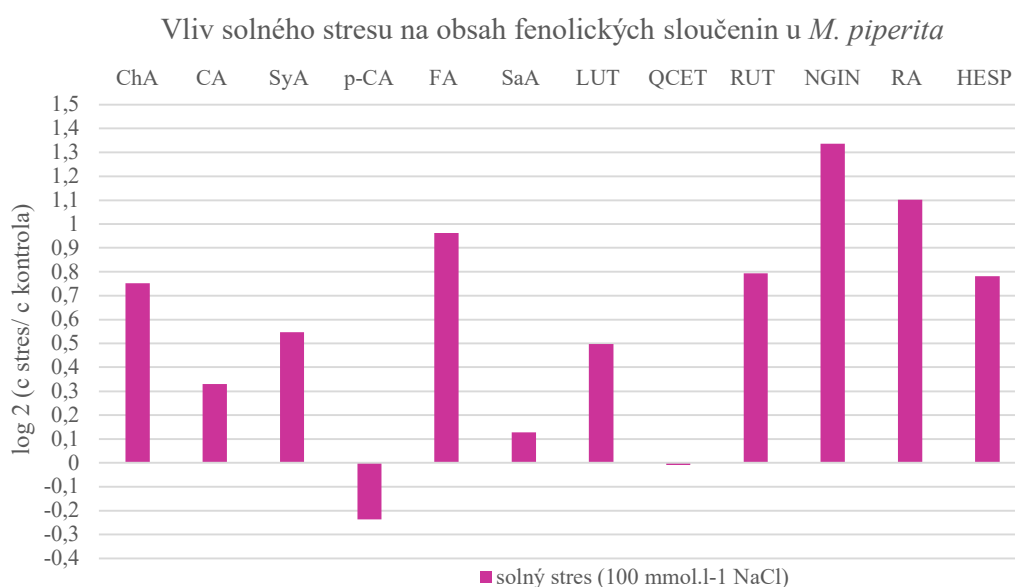
Z výsledků je patrné, že k signifikantnějšímu zvýšení obsahu fenolických sloučenin v genotypu *M. piperita* došlo při pěstování v roztoku s nízkou koncentrací dusičnanů. Antioxidační odezva rostlin stresovaných sníženým příjmem dusičnanů byla silnější a tento stresový faktor se jeví jako příznivější. Při zvýšeném příjmu dusičnanů byly detekovány méně markantní změny a v porovnání s kontrolou došlo také k mírnému snížení koncentrace kyseliny *p*-kumarové, kyseliny salicylové, luteolinu a kvercetinu.



Obr. 17 Vliv příjmu dusičnanů na obsah fenolických sloučenin v genotypu *M. piperita*. Sledován byl vliv  $\uparrow\text{NO}_3^-$  (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a  $\downarrow\text{NO}_3^-$  (snížený příjem dusičnanů; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Fenolické sloučeniny: ChA=kyselina chlorogenová; CA=kyselina kávová; SyA=kyselina syringová; p-CA=kyselina *p*-kumarová; FA=kyselina ferulová; SaA=kyselina salicylová; LUT=luteolin; QCET=kvercetin; RUT=rutin; NGIN=naringin; RA=kyselina rozmarýnová; HESP=hesperidin.

Sledován byl také vliv solného stresu (Obr. 18). Na rozdíl od genotypu *M. arvensis* byl v tomto případě solný stres pozitivním stresovým faktorem. V důsledku zasolení došlo k signifikantnímu zvýšení hladiny téměř všech fenolických látek oproti kontrole. Výjimkou byla kyselina *p*-kumarová, jejíž koncentrace byla vlivem stresu mírně snížena. Nejvýraznější nárůst byl zaznamenán u naringinu. Změny nebyly detekovány pouze u flavonoidu kvercetin.

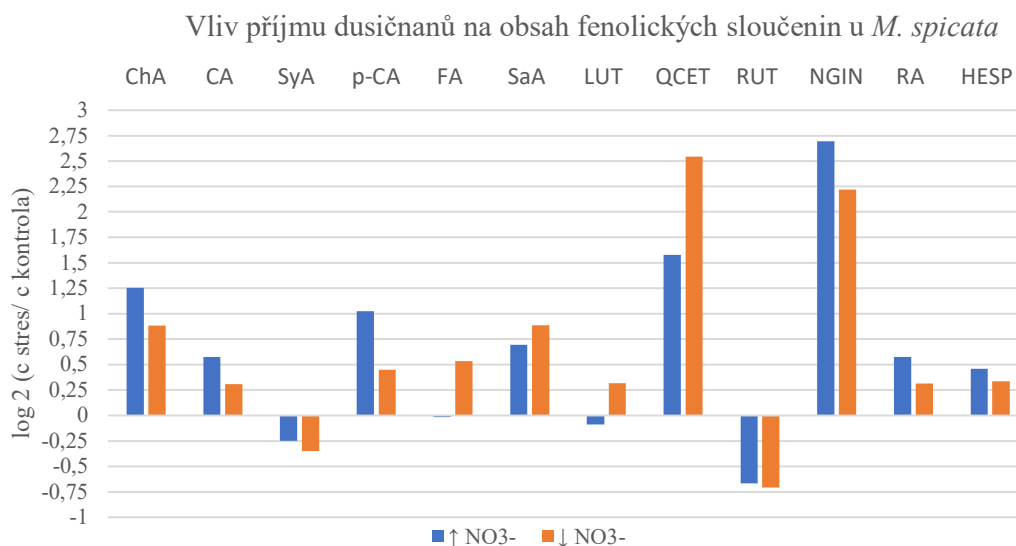
Solný stres měl opět pozitivní vliv na obsah fenolických látek v rostlinách genotypu *M. piperita*. Při použití tohoto stresového faktoru ovšem nebyla zaznamenána tak silná antioxidační odezva, jako v případě sníženého příjmu dusičnanů.



Obr. 18 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin v genotypu *M. piperita*. Fenolické sloučeniny: ChA=kyselina chlorogenová; CA=kyselina kávová; SyA=kyselina syringová; p-CA=kyselina *p*-kumarová; FA=kyselina ferulová; SaA=kyselina salicylová; LUT=luteolin; QCET=kvercetin; RUT=rutin; NGIN=naringin; RA=kyselina rozmarýnová; HESP=hesperidin.

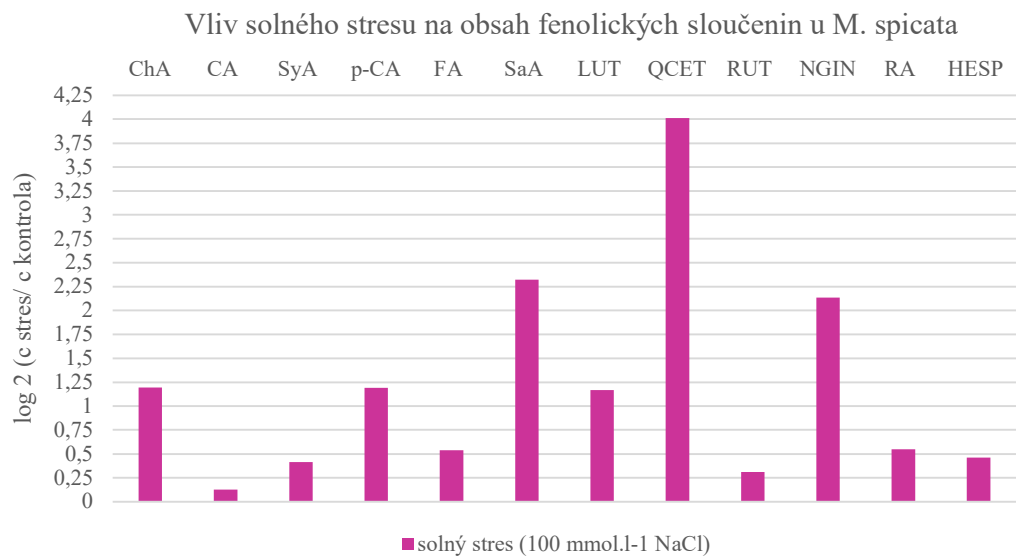
Vliv příjmu dusičnanů na obsah fenolických látek u genotypu *M. spicata* je uveden na Obr. 19. Stejně jako u genotypu *M. piperita* došlo k signifikantnímu zvýšení obsahu fenolických látek vlivem sníženého i zvýšeného příjmu dusičnanů. Ve srovnání s kontrolou byla důsledkem obou stresových faktorů nejvíce zvýšena koncentrace kvercetinu a naringinu. K mírnému snížení koncentrace došlo pouze u kyseliny syringové a rutinu.

Využití nedostatečného i nadměrného příjmu dusičnanů mělo u genotypu *M. spicata* obdobnou odezvu s tím rozdílem, že při nadměrném příjmu dusičnanů nebyly zaznamenány výrazné změny obsahu luteolinu a kyseliny ferulové oproti kontrole, naopak při sníženém příjmu dusičnanů došlo k mírnému zvýšení koncentrace těchto látek.



Obr. 19 Vliv příjmu dusičnanů na obsah fenolických sloučenin v genotypu *M. spicata*. Sledován byl vliv ↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a ↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (snížený příjem dusičnanů; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Fenolické sloučeniny: ChA=kyselina chlorogenová; CA=kyselina kávová; SyA=kyselina syringová; p-CA=kyselina *p*-kumarová; FA=kyselina ferulová; SaA=kyselina salicylová; LUT=luteolin; QCET=kvercetin; RUT=rutin; NGIN=naringin; RA=kyselina rozmarýnová; HESP=hesperidin.

Solný stres se u genotypu *M. spicata* jevil jako pozitivní stresový faktor (Obr. 20), jelikož jeho důsledkem došlo ke zvýšení koncentrace všech detekovaných fenolických sloučenin ve stresovaných rostlinách ve srovnání s kontrolou. Signifikantní nárůst koncentrace byl zaznamenán u kvercetinu, dále pak u kyseliny salicylové a naringinu. Nejmenší změny byly detekovány u kyseliny kávové.



Obr. 20 Vliv solného stresu na obsah fenolických sloučenin v genotypu *M. spicata*. Fenolické sloučeniny: ChA=kyselina chlorogenová; CA=kyselina kávová; SyA=kyselina syringová; p-CA=kyselina *p*-kumarová; FA=kyselina ferulová; SaA=kyselina salicylová; LUT=luteolin; QCET=kvercetin; RUT=rutin; NGIN=naringin; RA=kyselina rozmarýnová; HESP=hesperidin.

### 4.3.2 Analýza terpenoidů

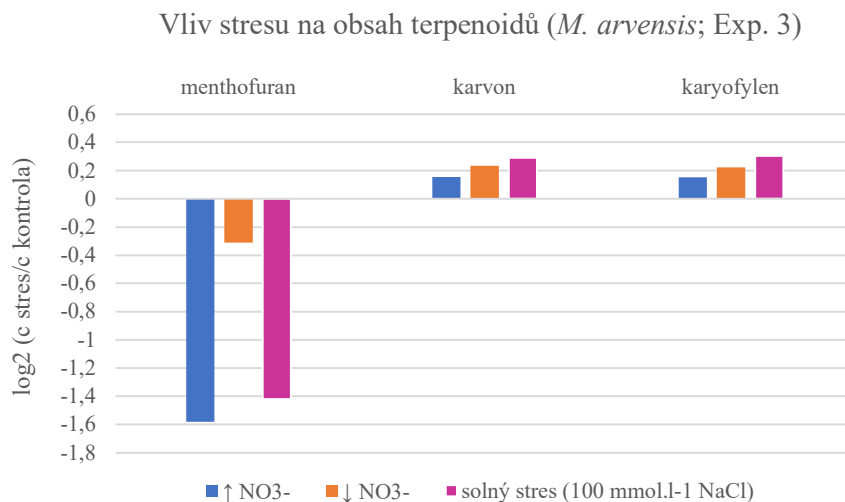
Terpenoidy byly kvantifikovány v rostlinném materiálu získaném v druhém a třetím experimentu pomocí techniky GC-MS. V případě třetího experimentu (pěstování v systému Planscreen conveyor) byly rostliny vystaveny stresu po dobu 16 dní a po ukončení experimentu proběhla kvantifikace terpenoidů. V druhém experimentu (pěstování ve fytostronu) byly rostliny stresovány po dobu 4 týdnů a jednou týdně probíhal odběr rostlinného materiálu. Pro srovnání s třetím experimentem byly využity výsledky získané ze druhého experimentu po 14 dnech působení stresu.

Kvantifikace terpenoidů byla provedena proměřením kalibračních řad standardů. Získané signály byly využity pro vynesení kalibračních křivek. Pomocí předpisů kalibračních křivek byla vypočítána koncentrace terpenoidů ve vzorcích. Sledovanými terpenoidy byly eukalyptol, menthon, menthofuran, menthol, pulegon, karvon, piperitenon oxid a karyofylen. Množství terpenoidů bylo přepočítáno na 1 mg suché hmoty (DW) a výsledná koncentrace v rostlinném materiálu byla uvedena v jednotkách  $\text{nmol.mg}^{-1}$  DW.

Pro posouzení vlivu abiotického stresu na obsah terpenoidů v rostlinném materiálu byly vypočteny podíly koncentrací terpenoidů ve stresovaných rostlinách a v kontrole, které byly následně logaritmovány. Byly vytvořeny grafy, kde koncentrace terpenoidů byly vyjádřeny jako  $\log_2(c \text{ stres}/c \text{ kontrola})$ . V případě pozitivní korelace se stresem byly logaritmované podíly kladné. Pro jednotlivé genotypy byl z každého experimentu vytvořen jeden graf vlivu stresu (sníženého i zvýšeného příjmu dusičnanů a solného stresu) na obsah terpenoidů.

Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů ve třetím experimentu (pěstování v Conveyor; říjen–listopad 2020) u genotypu *M. arvensis* je uveden na Obr. 21. V rostlinném materiálu byly identifikovány terpenoidy karvon, menthofuran a karyofylen. V rostlinách tohoto genotypu byly detekovány také terpenoidy menthol, menthon, pulegon a piperitenon oxid, které ovšem nebyly přítomny ve všech ošetřeních a nejsou tedy uvedeny ve výsledném grafu. Majoritně zastoupeným terpenoidem genotypu *M. arvensis* byl karvon (jehož koncentrace v kontrolních rostlinách byla  $886,7 \text{ nmol.mg}^{-1}$  DW). Naopak nejméně zastoupeným terpenoidem v kontrole byl karyofylen ( $27,6 \text{ nmol.mg}^{-1}$  DW).

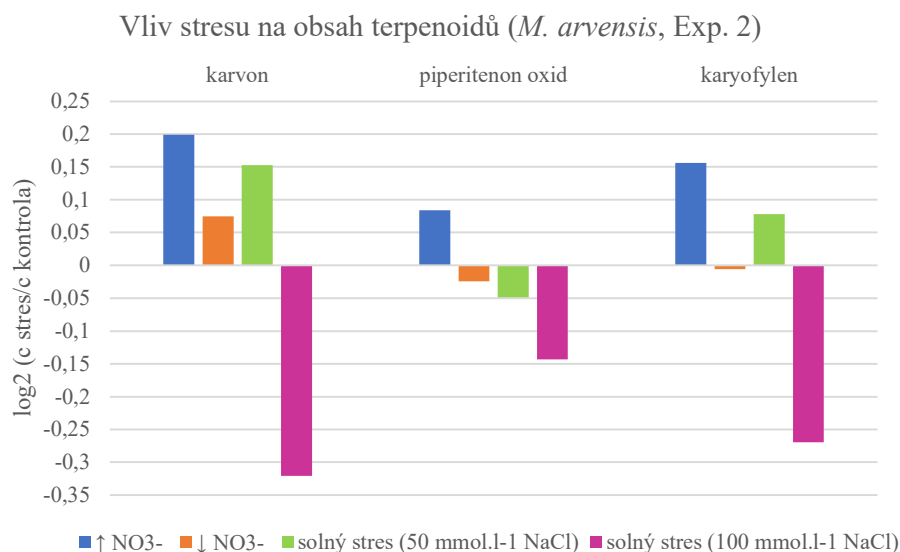
Vlivem všech zvolených stresových faktorů došlo k signifikantnímu snížení koncentrace menthofuranu ve srovnání s kontrolou. V případě karvonu a karyofylenu byl zaznamenán mírný nárůst koncentrace ve srovnání s kontrolou. Ke zvýšení obsahu obou terpenoidů došlo při použití všech stresových faktorů, nejvýrazněji byla hladina karvonu a karyofylenu zvýšena důsledkem solného stresu.



Obr. 21 Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů v genotypu *M. arvensis* (třetí experiment, pěstování v Conveoru). Sledován byl vliv ↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a ↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (snížený příjem dusičnanů; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a solného stresu.

Vliv stresu na obsah terpenoidů u genotypu *M. arvensis* ve druhém experimentu je uveden na Obr. 22. V rostlinách genotypu *M. arvensis* pěstovaných ve druhém experimentu (fytotron; červen–červenec 2020) byly identifikovány ve všech ošetřeních po 14 dnech působení stresu terpenoidy karvon, piperitenon oxid a karyofylen. V rostlinném materiálu nebyl detekován menthofuran, jenž byl obsažen v suché hmotě tohoto genotypu pěstovaného ve třetím experimentu. Na rozdíl od třetího experimentu došlo vlivem působení  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl ke snížení koncentrace všech sledovaných terpenoidů.

Působení stresu (zvýšeného a sníženého příjmu dusičnanů a použití  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl) mělo pozitivní vliv na koncentraci karvonu a karyofylenu obdobně jako ve třetím experimentu s tím rozdílem, že ve srovnání s kontrolou nebyly detekovány změny obsahu karyofylenu při sníženém příjmu dusičnanů. Byl zaznamenán pouze mírný nárůst koncentrace piperitenon oxidu vlivem stresu, a to při využití zvýšeného příjmu dusičnanů.

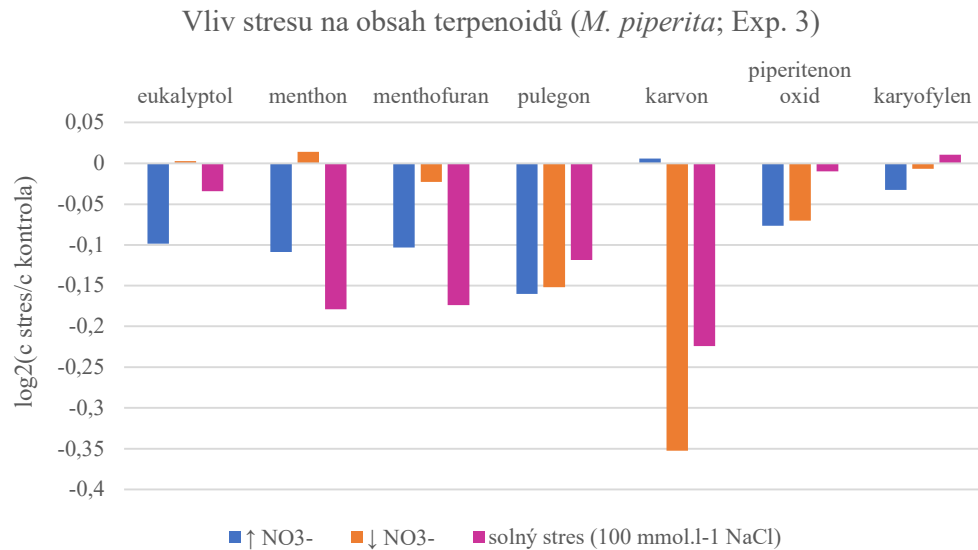


Obr. 22 Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů v genotypu *M. arvensis* (druhý experiment, pěstování ve fytotronu). Sledován byl vliv  $\uparrow\text{NO}_3^-$  (zvýšený příjem dusičnanů,  $20 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ) a  $\downarrow\text{NO}_3^-$  (snížený příjem dusičnanů;  $1,25 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ) a solného stresu ( $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  a  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl).



Odlišný trend byl zaznamenán u genotypu *M. piperita* ve třetím experimentu (Obr. 23). Ve všech ošetřovaných rostlinách byly identifikovány terpenoidy eukalyptol, menthon, menthofuran, pulegon, karvon, piperitenon oxid a karyofylen. Majoritně zastoupeným terpenoidem byl piperitenon oxid, naopak nejméně zastoupeným terpenoidem byl karyofylen.

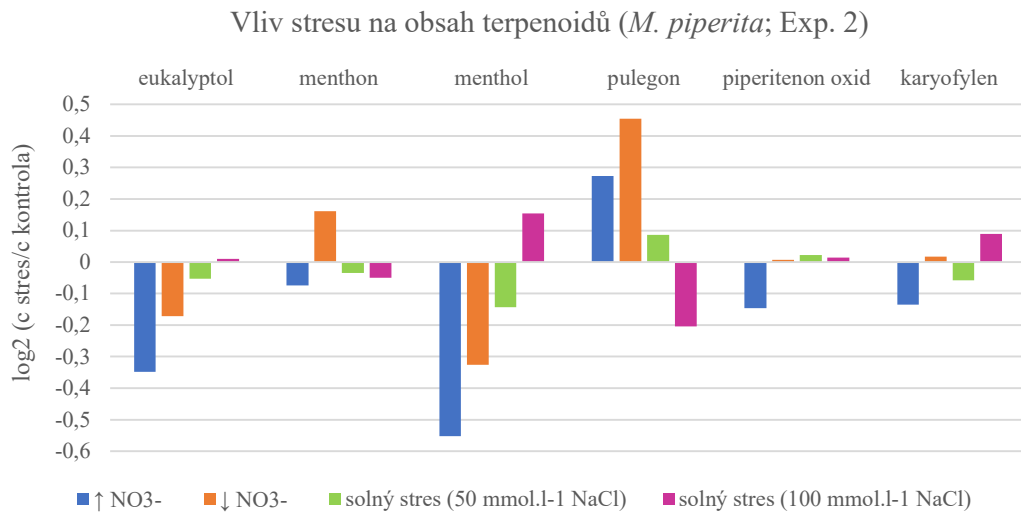
Důsledkem působících stresových faktorů bylo snížení koncentrace téměř všech terpenoidů v suché hmotě. U některých terpenoidů, například u eukalyptolu a menthonu při sníženém příjmu dusičnanů, nebyla zaznamenána signifikantní změna koncentrace oproti kontrole. K nejvýraznějšímu poklesu hladiny došlo u karvonu vlivem solného stresu a sníženého příjmu dusičnanů. Pro pěstování *M. piperita* se využití stresory z hlediska obsahu terpenoidů jeví jako výrazně negativní.



Obr. 23 Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů v genotypu *M. piperita* (třetí experiment, pěstování v Conveyoru). Sledován byl vliv ↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a ↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (snížený příjem dusičnanů; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a solného stresu.

Při pěstování ve fytotronu ve druhém experimentu (Obr. 24) byly v rostlinách genotypu *M. piperita* identifikovány terpenoidy eukalyptol, menthon, menthol, pulegon, piperitenon oxid a karyofylen. Detekovány byly také oxidované monoterpeny menthofuran a karvon, které se ovšem nevyskytovaly ve všech ošetřeních. Stejně jako ve třetím experimentu byl majoritně zastoupeným terpenoidem piperitenon oxid, dále pak menthon, menthol a pulegon.

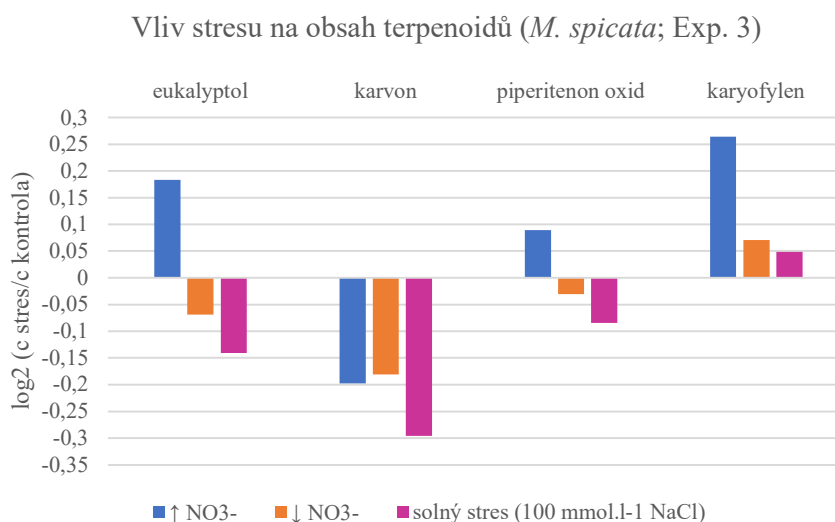
Důsledkem sníženého i zvýšeného příjmu dusičnanů a použití 50 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl bylo snížení koncentrace eukalyptolu a mentholu. Výrazné změny koncentrace nebyly zaznamenány u piperitenon oxidu a karyofylenu. K výraznějšímu nárůstu hladiny vlivem stresu došlo u menthonu za podmínek sníženého příjmu dusičnanů. Na rozdíl od třetího experimentu byl detekován signifikantní nárůst obsahu pulegonu, a to při sníženém i zvýšeném příjmu dusičnanů.



Obr. 24 Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů v genotypu *M. piperita* (druhý experiment, pěstování ve fytotronu). Sledován byl vliv ↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a ↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (snížený příjem dusičnanů; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a solného stresu (50 mmol.l<sup>-1</sup> a 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl).

Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů v rostlinách genotypu *M. spicata* pěstovaných ve třetím experimentu je uveden na Obr. 25. V rostlinném materiálu byly identifikovány oxidované monoterpeny eukalyptol, karvon a piperitenon oxid, dále pak seskviterpen karyofylen. Terpenoidem s nejvyšší koncentrací v suché hmotě byl piperitenon oxid, druhým nejvíce zastoupeným terpenoidem byl eukalyptol.

Pozitivní korelace mezi koncentrací terpenoidů v rostlinách a abiotickým stresem byla zaznamenána při použití zvýšeného příjmu dusičnanů u eukalyptolu, piperitenon oxidu a karyofylenu. Obsah seskviterpenu karyofylenu byl ve srovnání s kontrolou mírně zvýšen při použití všech stresových faktorů. Naopak důsledkem všech zvolených stresových podmínek došlo k signifikantnímu snížení koncentrace karvonu v rostlinách genotypu *M. spicata*.

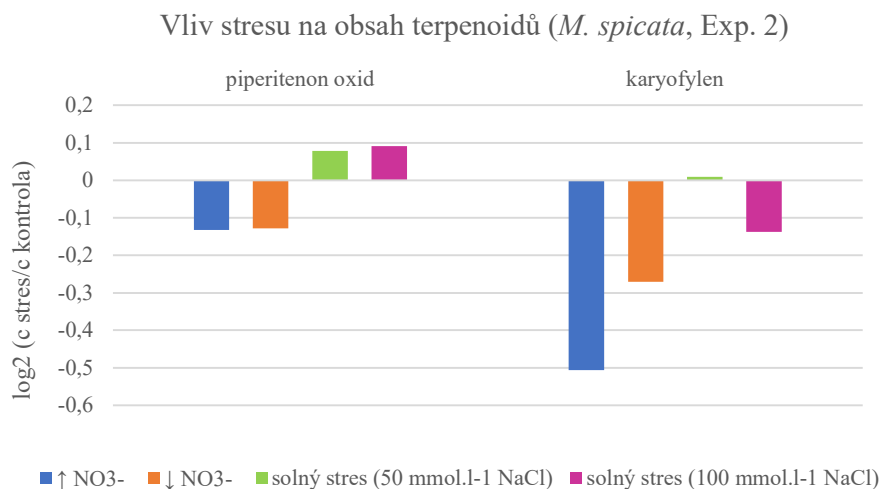


Obr. 25 Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů v genotypu *M. spicata* (třetí experiment, pěstování v Conveyoru). Sledován byl vliv ↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a ↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (snížený příjem dusičnanů; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a solného stresu.

V rostlinách genotypu *M. spicata* pěstovaných ve fytotronu ve druhém experimentu byly po 14 dnech působení abiotického stresu identifikovány stejné terpenoidy jako ve třetím experimentu s tím rozdílem, že oxidované monoterpeny eukalyptol a karvon nebyly zastoupeny ve všech ošetřeních a ve výsledném grafu tedy nejsou uvedeny. Terpenoidem, jehož koncentrace v suché hmotě byla nejvyšší, byl piperitenon oxid.

Vliv stresu na obsah terpenoidů u genotypu *M. spicata* (druhý experiment) je uveden na Obr. 26. Stres příjmem dusičnanů měl obecně u tohoto genotypu negativní vliv na obsah terpenoidů. Oproti třetímu experimentu nedošlo vlivem zvýšeného příjmu dusičnanů k nárůstu koncentrace piperitenon oxidu a karyofylenu. Hladina piperitenon oxidu byla mírně zvýšena pouze důsledkem solného stresu (50 mmol.l<sup>-1</sup> i 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl).

Odlišná odezva byla zaznamenána u karyofylenu. Při použití nižší koncentrace NaCl nebyla zaznamenána signifikantní změna hladiny karyofylenu ve srovnání s kontrolou, naopak vlivem vyšší koncentrace NaCl došlo ke snížení obsahu tohoto terpenoidu.



Obr. 26 Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů v genotypu *M. spicata* (druhý experiment, pěstování ve fytotronu). Sledován byl vliv ↑NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (zvýšený příjem dusičnanů, 20 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a ↓NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (snížený příjem dusičnanů; 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a solného stresu (50 mmol.l<sup>-1</sup> a 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl).

## 5 DISKUSE

### 5.1 Optimalizace hydroponického pěstování máty

Hydroponie představuje vhodnou alternativu k běžnému pěstování rostlin v půdě. Jelikož se jedná o pěstování v živných roztocích za vysoce kontrolovaných podmínek, je hydroponii vhodné využívat při sledování vlivu abiotického stresu na vlastnosti rostlin (Surendran *et al.*, 2017). Optimalizace hydroponického pěstování byla provedena pomocí celkem tří experimentů. Pro hydroponické pěstování máty byl nejvhodnější semihydroponický systém se substrátem vermikulitem v zařízení Planscreen conveyor (experiment 3). Výhodou tohoto zařízení je, že již v průběhu pěstování lze provádět nedestruktivní analýzu rostlin a automaticky zaznamenávat parametry růstu. Tento experiment byl stěžejní a v získaném rostlinném materiálu byla provedena kvantifikace volných polyaminů a aminokyselin, fenolických sloučenin a terpenoidů.

Z výsledků parametrů růstu rostlin získaných ve druhém a třetím experimentu je patrné, že vhodným roztokem pro pěstování *M. arvensis* a *M. piperita* z hlediska morfologie a účinnosti fotosyntézy bylo kontrolní ½ Hoaglandovo médium. Genotyp *M. spicata* byl velmi citlivý na vysoký příjem dusičnanů a negativní vliv na růst rostlin byl zaznamenán také při použití solného stresu. Optimálním roztokem pro hydroponické pěstování genotypu *M. spicata* byl tedy roztok se sníženou koncentrací dusičnanů. Růst *M. piperita* byl dle RGB snímků a fluorescenčního poměru Fv/Fm naopak sníženým příjmem dusičnanů negativně ovlivněn. Tyto výsledky korelují s poznatky z provedených studií. Při hydroponickém pěstování máty je nejčastěji využíváno ½ HM, v němž je koncentrace dusičnanů poloviční oproti kompletnímu médiu. Kompletní médium obsahuje vysoké koncentrace dusíku a draslíku a je tedy vhodné pro hydroponické pěstování větších rostlin, například rajčat (Kaur *et al.*, 2016).

Důsledkem použití vysoké koncentrace NaCl (150 mmol.l<sup>-1</sup>) v prvním experimentu bylo odumírání rostlin a tato koncentrace nebyla v dalších experimentech využívána. Rod máty je obecně klasifikován jako mírně senzitivní k zasolení (Tabatabaie *et al.*, 2007). V řadě studií byl při působení solného stresu pozorován nižší vzrůst a pokles hmotnosti rostlin máty (Aziz *et al.*, 2010). Z provedených hydroponických experimentů vyplývá, že nejméně tolerantním k zasolení byl genotyp *M. spicata*. Negativní vliv použití 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl na růst *M. spicata* byl prokázán již v předchozích studiích (Chrysargyris *et al.*, 2019).

## 5.2 Vliv abiotického stresu na obsah polyaminů a aminokyselin

U jednotlivých genotypů máty byla zjištěna rozdílná odezva na působení abiotického stresu. Sledována byla odezva koncentrace volných polyaminů a aminokyselin na zvýšený i snížený příjem dusičnanů a na solný stres. Polyaminy jsou alifatické polykationty, které se účastní řady významných procesů růstu a vývoje rostlin. Jelikož tyto látky hrají významnou roli při odpovědi na působení stresu u rostlin, byla již v minulosti provedena řada studií zaměřených na metabolismus polyaminů při stresových podmínkách (Gill a Tuteja, 2010). Funkce polyaminů v odpovědi na stres a jeho toleranci není zcela vysvětlena. Polyaminy jsou s některými aminokyselinami (například s prolinem a glycinem) zařazovány mezi osmolyty, neboli kompatibilní soluty. K akumulaci těchto látek v rostlinách dochází často důsledkem působení stresu a mezi jejich nejvýznamnější funkce patří ochrana makromolekul a zabránění osmotickému a oxidačnímu stresu (Jogawat, 2019).

Z hlediska stresu příjmem dusičnanů došlo u genotypu *M. arvensis* k signifikantnímu poklesu obsahu volných polyaminů i aminokyselin. Změny koncentrací jednotlivých sloučenin byly markantnější při použití sníženého příjmu dusičnanů. V tomto případě bylo možné pozorovat výraznou stresovou odezvu rostlin na nedostatečný příjem dusíku. Tyto poznatky korelují s výsledky z předchozích studií. Již dříve bylo prokázáno, že nadměrná akumulace dusičnanů v rostlinách, ale i naopak nedostatečný příjem dusičnanů mají negativní vliv na růst a vývoj rostlin (Saiz–Fernández *et al.*, 2015). Vlivem těchto abiotických stresorů dochází ke snížení syntézy aminokyselin a hmotnost takto ošetřovaných rostlin může být výrazně redukována (Chen *et al.*, 2004; Balotf *et al.*, 2016;).

Zcela jiný profil byl zaznamenán u genotypu *M. piperita*. Důsledkem nadměrného příjmu dusičnanů byl pokles celkového obsahu dusíkatých látek, v případě sníženého příjmu byl zaznamenán opačný trend. Ovšem vlivem obou stresových faktorů došlo k akumulaci velkého množství volných aminokyselin oproti kontrole, což značí, že rostliny genotypu *M. piperita* byly výrazně stresovány. Z hlediska zvýšeného příjmu dusičnanů došlo k signifikantnímu nárůstu u asparaginu, což bylo předpokládáno. Asparagin je klíčovou zásobní a transportní aminokyselinou dusíku v rostlinách. V porovnání s ostatními aminokyselinami má asparagin vyšší poměr N:C, díky čemuž se jedná o ideální sloučeninu pro skladování dusíku (Lea *et al.*, 2007). K akumulaci této

aminokyseliny v rostlinách dochází při působení stresu. Nárůst v obsahu asparaginu koreluje s poznatky zjištěnými v řadě studií, jelikož se jedná o aminokyselinu vhodnou ke skladování dusíku při zvýšeném příjmu dusičnanů (Balotf *et al.*, 2016). Zvýšení obsahu této aminokyseliny důsledkem stresu není pro rostliny škodlivé (Forde, 2014).

U genotypu *M. piperita* došlo také při použití obou stresových faktorů ke zvýšení obsahu řady aminokyselin (konkrétně prolinu,  $\beta$ -alaninu a serinu), které jsou zařazovány mezi stresové markery. Akumulace těchto aminokyselin v rostlinách máty vlivem abiotického stresu byla zaznamenána v již provedených studiích (Coban a Baydar, 2016; Alhaithloul *et al.*, 2019). Signifikantně zvýšena byla ve srovnání s kontrolou také hladina tryptofanu. Tato aminokyselina hraje významnou roli při adaptaci rostlin na abiotický stres a je regulátorem vývoje rostlin. Tryptofan slouží jako prekurzor biosyntézy indol-3-octové kyseliny, jež je zařazována mezi rostlinné hormony auxiny (Wang *et al.*, 2015).

Z hlediska polyaminů došlo vlivem stresu u genotypu *M. piperita* ve srovnání s kontrolou k signifikantnímu nárůstu pouze u putrescinu. V předchozích studiích byl zkoumán vzájemný vztah metabolismu polyaminů a ethylenu v rostlinách (Pandey *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2016). Zvýšená hladina putrescinu zjištěná v tomto experimentu může naznačovat, že nárůstem hladiny polyaminu se rostliny bránily nadprodukcí ethylenu. Bylo prokázáno, že společným prekurzorem pro biosyntézu polyaminů i ethylenu je S-adenosylmethionin (SAM). Další kroky přeměny SAM jsou zásadní, jelikož polyaminy a ethylen v rostlinách vykazují zcela opačnou funkci. Zatímco ethylen působí jako induktor senescence, polyaminy naopak způsobují její inhibici. Je tedy předpokládáno, že nárůst biosyntézy polyaminů snižuje míru syntézy ethylenu v rostlinách (Dewi a Purwoko, 2008).

Vlivem stresu příjmem dusičnanů nastalo u genotypu *M. spicata* zvýšení celkového obsahu volných polyaminů a aminokyselin. V kontrastu s předešlými genotypy máty došlo u stresovaných rostlin genotypu *M. spicata* zejména ke zvýšení koncentrace volných polyaminů. Důsledkem stresu zvýšeným i sníženým příjmem dusičnanů byl nárůst hladiny aminokyselin prolinu, glycinu a tryptofanu. Tyto výsledky korelují s již existujícími poznatky, jelikož v předchozích studiích byla prokázána akumulace příslušných aminokyselin v rostlinách za stresových podmínek (Pavlík *et al.*, 2012).

U genotypu *M. spicata* byl také vlivem stresu příjmem dusičnanů zaznamenán nárůst obsahu serinu a glycinu, což je v tomto případě ukazatelem nadměrného stresu a zvýšené míry fotorespirace. Při fotorespiraci dochází k zabudování kyslíku do ribulosa-1,5-bisfosfátu. Meziprodukty cyklu jsou aminokyseliny glycin a serin. Glycin může být dále využíván jako prekurzor pro syntézu glutathionu, jehož funkcí je ochrana před oxidačním stresem (Wingler *et al.*, 2000). Příмым důsledkem zvýšené fotorespirace u rostlin je snížení účinnosti fotosyntézy (Zhu *et al.*, 2008). Tento poznatek koreluje s výsledky diplomové práce. Pouze u genotypu *M. spicata* bylo zjištěno v průběhu působení stresu sníženým i zvýšeným příjmem dusičnanů signifikantní snížení základního fluorescenčního poměru Fv/Fm, tedy míry účinnosti fotosyntézy, což bylo způsobeno zvýšenou mírou fotorespirace. Pěstování rostlin tohoto genotypu v roztocích se sníženou ( $1,25 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) i zvýšenou ( $20 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) koncentrací dusičnanů je tedy zcela nevhodné.

Dále byl sledován vliv solného stresu na obsah volných polyaminů a aminokyselin u jednotlivých genotypů máty. Nárůst celkového obsahu dusíkatých látek vlivem stresu byl zaznamenán pouze u genotypu *M. arvensis*. Vlivem solného stresu došlo k nadprodukcí osmolytů, jejichž funkcí bylo zabránění zvýšeným ztrátám vody. Z hlediska polyaminů byly signifikantně zvýšeny oproti kontrole histamin a kadaverin, u volných aminokyselin se jednalo o prolin, asparagin a serin. Zvýšení obsahu těchto látek vlivem solného stresu bylo předpokládáno, jelikož se jedná o osmolyty, jenž mají významnou roli při odpovědi na stres. Akumulace těchto stresových markerů vlivem solného stresu byla prokázána již v předchozích studiích (Mansour, 2000; Marchetti *et al.*, 2019).

Zcela opačná odezva na solný stres byla detekována u genotypu *M. spicata*, kdy došlo k poklesu obsahu téměř všech volných polyaminů a aminokyselin oproti kontrole. Ke zvýšení hladiny vlivem stresu došlo pouze u polyaminu putrescinu a dále u aminokyselin prolinu a glycinu. Nárůst koncentrace prolinu a glycinu byl předpokládán, jelikož tyto aminokyseliny patří mezi osmolyty akumulující se během působení solného stresu (Meloni *et al.*, 2001). Osmolyty působí jako osmoprotektanty, jejich funkcí je vyrovnávání osmotického tlaku. Podílí se také na odstraňování ROS. Z těchto výsledků lze předpokládat, že obranné reakce před negativními vlivy stresu nebyly dostatečné a genotyp *M. spicata* se ze tří vybraných genotypů máty jeví jako nejvíce senzitivní na solný stres.



Genotyp *Mentha piperita* se z hlediska odezvy obsahu volných polyaminů a aminokyselin na působení solného stresu jeví jako nejvíce rezistentní. U stresovaných rostlin bylo zaznamenáno zvýšení koncentrace volných aminokyselin (zejména asparaginu, leucinu a histidinu), které ovšem nepatří mezi ukazatele stresu. Signifikantní změny nebyly zaznamenány v hladinách polyaminů, prolinu a ornithinu, typických markerů stresu u rostlin, z čehož může být usuzováno, že genotyp *M. piperita* má ze tří vybraných genotypů máty největší toleranci vůči zasolení. Vyšší tolerance vůči solnému stresu byla zaznamenána u genotypu *M. piperita* ve srovnání s genotypy *M. spicata* a *M. longifolia* již v dřívějších studiích (Hosseini *et al.*, 2020).

### **5.3 Vliv abiotického stresu na obsah sekundárních metabolitů**

#### **5.3.1 Vliv abiotického stresu na obsah fenolických sloučenin**

Fenolické sloučeniny, které jsou řazeny mezi sekundární metabolity, vykazují antioxidační vlastnosti. Kromě toho se podílí na řadě důležitých procesů v buňce, zejména na růstu a vývoji rostlin, fotosyntéze a buněčném dýchání (Babenko *et al.*, 2019). Mezi fenolické sloučeniny obsažené v rostlinách máty patří fenolické kyseliny a flavonoidy. V literatuře je uváděno, že majoritními fenolickými sloučeninami rodu máty jsou kyselina rozmarýnová, luteolin a apigenin (Dorman *et al.*, 2003).

Genotypem s nejvyšším obsahem fenolických sloučenin v kontrolních rostlinách byla *M. spicata*, která se tedy jeví jako nejsilnější antioxidant. Nejnižší obsah fenolů byl zaznamenán u genotypu *M. piperita*. Majoritně zastoupenou fenolickou sloučeninou byla ve všech genotypech máty kyselina rozmarýnová, což odpovídá poznatkům uvedeným v literatuře a předchozích studiích (Fialová *et al.*, 2015; Riachi a De Maria, 2015; Bahadori *et al.*, 2018). V porovnání se studií vykonanou v návaznosti na bakalářskou práci (Čavar Zeljkovic *et al.*, 2021), která byla provedena u 13 genotypů máty pěstovaných v půdě, bylo množství kyseliny rozmarýnové v hydroponicky pěstovaných rostlinách tří genotypů máty výrazně vyšší. Rozdíly v obsahu této fenolické sloučeniny mohou být vysvětleny tak, že v případě bakalářské práce byly rostliny máty pěstovány v půdě (na polích VÚRV, v.v.i.) a nebylo dosaženo kontrolovaných podmínek. Naopak v případě diplomové práce probíhalo pěstování hydroponicky za kontrolovaných podmínek (stálá teplota, intenzita záření, pěstování v roztocích s přesně definovaným složením). Signifikantně zvýšené koncentrace kyseliny rozmarýnové byly zaznamenány u stresovaných rostlin. Roli může hrát také období sklizně. V případě bakalářské práce

byly rostliny sklizeny v období červenec–září 2018. Mateřské rostliny pro diplomovou práci (experiment 3) byly získány v říjnu 2020, následně byly pěstovány hydroponicky a rostlinný materiál byl sklizen v listopadu. Dle studie provedené Fletcherem *et al.* (2010) je obsah kyseliny rozmarýnové výrazně redukován v rostlinách máty během kvetení. Období kvetení je u rodu máty běžně od července do září. Snížené množství kyseliny rozmarýnové zaznamenané u genotypů máty v bakalářské práci může mít tedy také příčinu v právě probíhajícím kvetení.

Sekundární metabolity hrají významnou roli při odpovědi rostlin na abiotický stres. Akumulace fenolických sloučenin v rostlinách je významným indikátorem tolerance stresu u daného genotypu (Sharma *et al.*, 2019). Při vysokých koncentracích ROS v buňce dochází k oxidačnímu stresu a k buněčnému poškození. Fenolické sloučeniny jsou látky s významnou antioxidační aktivitou, jež mají schopnost vychytávání ROS. Zvýšení produkce fenolických sloučenin je spojováno s obrannými mechanismy rostlin a s adaptací na stres (Cheynier *et al.*, 2013). V mnoha studiích byla zaznamenána akumulace fenolických sloučenin v rostlinách máty vlivem stresu nedostatkem či nadbytkem makroprvků (Chrysargyris *et al.*, 2019) a solného stresu (El-Danasoury *et al.*, 2010; Coban a Baydar, 2016). Důsledkem poklesu obsahu fenolických sloučenin je snížení kvality plodin.

V této diplomové práci byl zkoumán vliv sníženého i zvýšeného příjmu dusičnanů a solného stresu na obsah fenolických látek. U genotypů *M. piperita* a *M. spicata* došlo při použití všech stresorů k signifikantnímu nárůstu celkového obsahu fenolických sloučenin, což bylo dle předchozích studií předpokládáno. Pouze u genotypu *M. arvensis* byl detekován pokles koncentrace fenolických sloučenin vlivem všech použitých stresorů. Nedošlo tedy k nadprodukcí fenolů a antioxidační odezva na stres nebyla dostatečná. Z těchto výsledků vyplývá, že genotyp *M. arvensis* není rezistentní na působení stresu nízkým či nadměrným příjmem dusičnanů ani na působení solného stresu. Jelikož došlo vlivem stresu k poklesu obsahu sekundárních metabolitů a tedy ke snížení kvality genotypu, není využití těchto podmínek pro pěstování vhodné. Zjištěné poznatky u tohoto genotypu jsou v kontrastu s již provedenými studiemi, v nichž byl důsledkem nedostatečného či nadměrného příjmu dusičnanů a solného stresu v rostlinách máty nárůst obsahu fenolických sloučenin. Negativní korelace mezi obsahem fenolických látek v rostlinách máty a působením stresu byla v dřívějších studiích zjištěna pouze u teplotního stresu (Fletcher *et al.*, 2005) a stresu suchem (Rahimi *et al.*, 2018).

### 5.3.2 Vliv abiotického stresu na obsah terpenoidů

Silice složené z terpenoidů jsou skladovány ve žláznatých trichomech listů máty. Terpenoidy běžně obsaženými v silicích máty jsou menthol, menthon, piperitenon oxid, eukalyptol, pulegon, karvon a karyofylen. Silice mají antioxidační a antimikrobiální účinky a jsou využívány ve farmaceutickém i potravinářském průmyslu. Bylo zjištěno, že abiotické stresové faktory ovlivňují výnos silic a jejich kvalitu (Biswas *et al.*, 2011). Experimenty sledující vliv abiotického stresu na kvalitu silic máty jsou prováděny se snahou o zvýšení obsahu komerčně využívaných terpenoidů (mentholu a menthonu) a naopak o pokles obsahu nežádoucích terpenoidů (pulegonu a menthofuranu), které snižují kvalitu silice (Davis *et al.*, 2005).

*Mentha arvensis* je genotyp s velkou variabilitou ve složení silic (Lawrence, 2007). V provedených experimentech bylo zjištěno, že majoritně zastoupeným terpenoidem ve slovenském genotypu *M. arvensis* byl karvon. V německém genotypu *M. spicata* byl majoritním terpenoidem piperitenon oxid. Tato zjištění korelují s výsledky bakalářské práce (Šišková, 2019), kdy v případě genotypu *M. arvensis* tvořil karvon 55,6 % silice a u genotypu *M. spicata* představoval piperitenon oxid 51,1 % silice. Terpenoidem s nejvyšší koncentrací v rostlinách genotypu *M. piperita* (Československo) byl piperitenon oxid, následovaný pulegonem. Tento genotyp v bakalářské práci zkoumán nebyl, ovšem analyzován byl český genotyp *M. piperita*, v němž byl majoritně zastoupeným terpenoidem pulegon. Složení genotypů máty odpovídá předchozím studiím (Kokkini *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2011) a výsledkům bakalářské práce.

K výraznému poklesu koncentrace vlivem stresu došlo v genotypu *M. arvensis* pouze u menthofuranu. Snížení menthofuranu je pro kvalitu silice žádoucí, jelikož se jedná o látku s hepatotoxickými účinky (Khojasteh *et al.*, 2010). Mírný nárůst byl zaznamenán u karvonu a karyofylenu. Důsledkem stresu bylo v genotypu *M. piperita* snížení koncentrace téměř všech terpenoidů. Výjimkou byl pulegon, jehož obsah byl zvýšen ve druhém experimentu vlivem stresu nízkým i vysokým příjmem dusičnanů a tím došlo k redukcii kvality silice. Ve studii, kterou provedli Sahandi *et al.* (2019) bylo důsledkem deficiencie dusíku snížení množství silice v rostlinách *M. piperita*, zároveň však došlo k nárůstu obsahu pulegonu, což koreluje s výsledky diplomové práce. Zvýšení hladiny jednotlivých terpenoidů v rostlinách *M. spicata* nastalo pouze u zvýšeného příjmu dusičnanů, což koreluje s již existujícími poznatky. Dle studie David *et al.* (2014) mírný

nárůst příjmu dusičnanů u hydroponicky pěstované máty může vyústit v nárůst obsahu silice, ovšem nadměrný příjem dusičnanů způsobuje redukci obsahu silice.

Působení solného stresu u všech genotypů obecně vyústilo v mírné snížení koncentrace terpenoidů oproti kontrole. Tato skutečnost byla prokázána v předchozích studiích. Již dříve bylo zjištěno, že důsledkem solného stresu je snížení výnosu silic máty (Tabatabaie *et al.*, 2007; Aziz *et al.*, 2008; Roodbari *et al.*, 2013), což může být způsobeno poklesem obsahu fotosyntetických pigmentů vlivem stresu a tedy sníženou mírou fotosyntézy.

## 6 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na rod máty, obsažené sekundární metabolity a dusíkaté sloučeniny. Práce se věnuje abiotickému stresu rostlin, a to konkrétně nízkému i vysokému příjmu dusičnanů a solnému stresu. Provedeno bylo srovnání metod hydroponického pěstování rostlin. Práce pojednává o vlivu abiotického stresu na metabolismus dusíku a obsah sekundárních metabolitů v hydroponicky pěstovaných rostlinách máty.

Vybrány byly tři genotypy máty (*M. arvensis*; *M. piperita*; *M. spicata*). Cílem této práce bylo optimalizovat hydroponické pěstování vybraných genotypů máty a aplikovat metody izolace a analýzy sekundárních metabolitů rostlin a dusíkatých sloučenin, konkrétně polyaminů a aminokyselin. Byly sledovány změny vlastností hydroponicky pěstovaných genotypů máty podrobených stresu sníženým i zvýšeným příjmem dusičnanů a solným stresem.

Optimalizace hydroponického pěstování byla provedena v celkem třech experimentech. Z výsledků vyplývá, že z hlediska morfologie rostlin bylo nejvhodnějším médiem pro pěstování genotypů *M. arvensis* i *M. piperita* ½ Hoaglandovo médium. Růst genotypu *M. spicata* byl negativně ovlivněn zvýšeným příjmem dusíku, proto bylo pro jeho pěstování optimální médium se sníženou koncentrací dusičnanů. Měření fluorescence chlorofylu ve fenotypizačním systému Plantscreen conveyor byla u tohoto genotypu při zvýšeném příjmu dusičnanů také detekována signifikantně snížená účinnost fotosyntézy. Genotyp *M. spicata* se z hlediska morfologie jevil jako nejméně tolerantní vůči solnému stresu.

Pomocí techniky UHPLC-MS/MS byly v rostlinném materiálu kvantifikovány volné polyaminy a aminokyseliny. Z hlediska vlivu abiotického stresu na obsah dusíkatých sloučenin byly mezi jednotlivými genotypy zaznamenány signifikantní rozdíly. Stres příjmem dusičnanů vyústil v genotypu *M. arvensis* v pokles celkového obsahu dusíkatých sloučenin, v případě genotypu *M. piperita* došlo k poklesu pouze při zvýšeném příjmu dusičnanů. Důsledkem solného stresu bylo u genotypu *M. piperita* zvýšení obsahu volných aminokyselin, které ovšem nepatřily mezi stresové markery. U genotypu *M. spicata* vlivem solného stresu naopak poklesl celkový obsah volných polyaminů a aminokyselin. Z těchto výsledků vyplývá, že z vybraných genotypů je nejvíce tolerantním vůči solnému stresu *M. piperita*, nejméně tolerantním je *M. spicata*.

Analýzou fenolických sloučenin s využitím UHPLC-MS/MS bylo zjištěno, že majoritně zastoupenou látkou byla ve všech genotypech máty kyselina rozmarýnová. Nejvyšší množství bylo detekováno v genotypu *M. spicata*. Využití všech stresových faktorů vyústilo u genotypů *M. piperita* a *M. spicata* v nárůst obsahu fenolů. U genotypu *M. arvensis* byl stres nepříznivý a došlo ke snížení kvality genotypu. Antioxidační odezva nebyla dostatečná a došlo tudíž ke snížení syntézy fenolických sloučenin

Identifikace a kvantifikace terpenoidů byla provedena s využitím techniky GC-MS. Majoritně zastoupeným terpenoidem *M. arvensis* byl karvon. Piperitenon oxid byl dominujícím terpenoidem v genotypech *M. piperita* a *M. spicata*. Obecně bylo důsledkem všech využitých stresových faktorů snížení syntézy terpenoidů. Výjimkou byl nárůst hladiny pulegonu vlivem nutričního stresu u genotypu *M. piperita*, což znehodnotilo kvalitu genotypu.

V této diplomové práci byl zkoumán vliv abiotického stresu na metabolismus dusíku a obsah sekundárních metabolitů v rostlinách máty. U tří zvolených genotypů máty byla zaznamenána zcela odlišná odezva na působení abiotického stresu. Z hlediska obsahu volných polyaminů, volných aminokyselin i fenolických sloučenin byl negativní vliv nízkého i vysokého příjmu dusičnanů nejmarkantnější u genotypu *M. arvensis*, což se ovšem neprojevilo signifikantně na morfologii rostlin ani na míře fotosyntézy. V této diplomové práci byly mezi jednotlivými genotypy zjištěny zásadní rozdíly v toleranci solného stresu. Ze získaných výsledků se jako nejtolerantnější vůči solnému stresu jeví genotyp *M. piperita*, nejméně tolerantním genotypem vůči zasolení je naopak genotyp *M. spicata*.

## 7 LITERATURA

- Adams R.P. (2007): *Identification of Essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4.vydání, Allured Publishing Corporation, USA, 804 stran.
- Alhaithloul H.A., Soliman M.H., Ameta K.L., El-Esawi M.A., Elkelish A. (2019): Changes in ecophysiology, osmolytes, and secondary metabolites of the medicinal plants of *Mentha piperita* and *Catharanthus roseus* subjected to drought and heat stress. *Biomolecules* **10**, 43.
- Altman A., Levin N. (1993): Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plants. *Physiologia Plantarum* **89**, 653–658.
- Amtmann A., Armengaud P. (2009): Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 275–283.
- Aziz E.E., Al-Amier H., Craker L.E. (2008): Influence of salt stress on growth and essential oil production in peppermint, pennyroyal, and apple mint. *J. Herbs Spices Med. Plants* **14**, 3–9.
- Aziz E.E., Al-Amier H., Baek J.P., El-Hela A.A., Helaly A., Bahri H., Craker L.E. (2010): Growth and essential oil production in peppermint accessions. *Acta Horticulturae* **860**, 193–196.
- Babenko L.M., Smirnof O.E., Romanenko K.O., Trunova O.K., Kosakivska I.V. (2019): Phenolic compounds in plants: biogenesis and functions. *Ukr. Biochem. J.* **91**, 5–18.
- Bahadori M.B., Zengin G., Bahadori S., Dinparast L., Movahhedini N. (2018): Phenolic composition and functional properties of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha* (Stapf) Briq.). *International journal of food properties* **21**, 183–193.
- Balotf S., Kavooosi G., Kholdebarin B. (2016): Nitrate reductase, nitrite reductase, glutamine synthetase, and glutamate synthase expression and activity in response to different nitrogen sources in nitrogen-starved wheat seedlings. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **63**, 220–229.
- Biswas S., Koul M., Bhatnagar A.K. (2011): Effect of salt, drought and metal stress on essential oil yield and quality in plants. *Natural products communications* **6**, 1559–1564.
- Blok C., de Kreijl C., Baas R., Wever G. (2008): Analytical methods used in soilless cultivation. In: *Soilless culture, theory and practice* (Raviv M., Lieth J.H., eds), Elsevier, Amsterdam, pp 245–290.
- Bodalska A., Kowalczyk A., Włodarczyk M., Fecka I. (2019): Analysis of polyphenolic composition of a herbal medicinal product – peppermint tincture. *Molecules* **25**, 69.
- Borovcová L., Havlíček V., Lemr K. (2019): Rychlé chromatografické separace. *Chemické listy* **113**, 407–414.
- Bose J., Rodrigo-Moreno A., Shabala S. (2014): ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental botany* **65**, 1241–1257.
- Ćavar Zeljković S., Komžáková K., Šišková J., Karalija E., Smékalová K., Tarkowski P. (2020): Phytochemical variability of selected basil genotypes. *Industrial crops & Products* **157**, 112910.
- Ćavar Zeljković S., Šišková J., Komžáková K., De Diego N., Kaffková K., Tarkowski P. (2021): Phenolic compounds and biological activity of selected *Mentha* species. *Plants* **10**, 550.
- Chen B.M., Wang Z.H., Li S.X., Wang G.X., Song H.X., Wang X.N. (2004): Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Sci.* **167**, 635–643.
- Chen D., Shao Q., Yin L., Younis A., Zheng B. (2019): Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development and roles in abiotic stress responses. *Front Plant Sci.* **10**, 1945.
- Cheyrier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S. (2013): Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem* **72**, 1–20.
- Chrysargyris A., Michailidi E., Tzortzakis N. (2018): Physiological and biochemical responses of *Lavandula angustifolia* to salinity under mineral foliar application. *Front. Plant Sci.* **9**, 489.
- Chrysargyris A., Petropoulos S.A., Fernandes A., Barros L., Tzortzakis N., Ferreira I.C.F.R. (2019): Effect of phosphorus application rate on *Mentha spicata* L. grown in deep flow technique (DFT). *Food chemistry* **276**, 84–92.
- Chrysargyris A., Solomou M., Petropoulos S.A., Tzortzakis N. (2019): Physiological and biochemical attributes of *Mentha spicata* when subjected to saline conditions and cation foliar application. *Journal of Plant Physiology* **232**, 27–38.

- Coban O., Baydar N.G. (2016): Brassinosteroid effects on some physical and biochemical properties and secondary metabolite accumulation in peppermint (*Mentha piperita* L.) under salt stress. *Industrial crops and products* **86**, 251–258.
- Dai Z., Wu Z., Wang J., Wang X., Jia S., Bazer F.W., Wu G. (2014): Analysis of polyamines in biological samples by HPLC involving pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. *Amino acids* **46**, 1557–1564.
- David E.F.S., Mischan M.M., Marques M.O.M., Boaro C.S.F. (2014): Physiological indexes macro- and micronutrients in plant tissue and essential oil of *Mentha piperita* L. grown in nutrient solution with variation of N, P, K and Mg levels. *Rev. Bras. Pl. Med* **16**, 97–106.
- Davis E.M., Ringer K.L., McConkey M.E., Croteau R. (2005): Monoterpene metabolism. Cloning, expression and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant Physiology* **137**, 873–881.
- Dewi I.S., Purwoko B.S. (2008): Role of polyamines in inhibition of ethylene biosynthesis and their effects on rice anther culture development. *Indonesian journal of Agricultural science* **9**, 60–67.
- Dixon R.A., Choudhary A.D., Dalkin K. (1992): Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In: *Phenolic metabolism in plants* (Stafford H.A., Ibrahim R.K., eds.), Springer, Boston, USA, pp 91–138.
- Dondini L., Serafini-Fracassini D., del Duca S., Bregoli A.M., Tsolova M. (1994): Plant transglutaminases. In: *Polyamines: Biological and clinical aspects* (Caldarere C.M., Clo C., Morrucci M.S., eds.), Bologna, Italy, pp 183–194.
- Dorais M., Menard C., Begin G. (2006): Risk of phytotoxicity of sawdust substrates for greenhouse vegetables. In: *XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International symposium on advances in environmental control, automation and cultivation systems for sustainable, high-quality crop production under protected cultivation*, 761, pp 589–595.
- Dorman H.J.D., Kosar M., Khahlos K., Holm Y., Hitunen R. (2003): Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4563–4569.
- Dyśko J., Kaniszewski S., Kowalczyk W. (2008): The Effect of Nutrient Solution pH on Phosphorus Availability in Soilless Culture of Tomato. *Journal of Elementology* **13**, 189–198.
- El-Danasoury M., Al-Amier H., El-Din Helaly A., Aziz E.E., Craker L. (2010): Essential oil and enzyme activity in spearmint under salt stress. *J. Herbs Spices Med. Plants* **16**, 136–145.
- Fakhrfeshani M., Shahriari-Ahmadi F., Niazi A., Moshtaghi N., Zare-Mehrjerdi M. (2015): The effect of salinity stress on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> concentration, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio, electrolyte leakage and *HKT* expression profile in roots of *Aeluropus litoralis*. *Journal of Plant Molecular Breeding* **3**, 1–10.
- Fatiha B., Didier H., Naima G., Khodir M., Martin K., Leocadie K., Caroline S., Mohamed C., Pierre D. (2015): Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products* **74**, 722–730.
- Fialová S., Tekelová D., Rendeková K., Klinčok J., Kolárik M., Kurucová K., Grančai D. (2015): Phenolic compounds variation in *Mentha* L. species in the course of a four-years period. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comen.* **LXII** **9**, 2–7.
- Fletcher R.S., Slimmon T., Kott L.S. (2010): Environmental factors affecting the accumulation of rosmarinic acid in spearmint (*Mentha spicata* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.). *Open Agri J.* **4**, 10–16.
- Fletcher R.S., Slimmon T., McAuley C.Y., Kott L.S. (2005): Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L.). *Journal of the Science of food and Agriculture* **85**, 2429–2436.
- Franzios G., Mirosou M., Hatziapostolou E., Kral J., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou P. (1997): Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2690–2694.
- Forde B.G. (2014): Glutamate signalling in roots. *J. Exp. Bot.* **65**, 779–787.



- Foyer C.H., Parry M., Noctor G. (2003): Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J. Exp. Bot.* **54**, 585–593.
- Garnica M., Houdusse F., Yvin J.C., Garcia-Mina J.M. (2009): Nitrate supply induces changes in polyamine content and ethylene production in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology* **133**, 363–374.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010): Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signalling&Behavior* **5**, 26–33.
- Giurgiu R.M., Morar G.A., Dumitras A., Boanca P., Buda B.M., Moldovan C. (2014): Study regarding the suitability of cultivating medicinal plants in hydroponic systems in controlled environment. *Research Journal of Agricultural science* **46**, 84–92.
- Goddek S., Joyce A., Kotzen B., Burnell G.M. (2019): *Aquaponics food production systems: Combined aquaculture and hydroponic production technologies for the future*. 1.vydání, Springer Nature Switzerland, 619 stran.
- Goel P., Singh A.K. (2015): Abiotic stresses downregulate key genes involved in nitrogen uptake and assimilation in *Brassica juncea* L. *PLoS One* **10**, 1–17.
- Greenway H., Munns R. (1980): Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 149–190.
- Grewal H., Basant M., Sophie E., Parks S. (2011): Water and nutrient use efficiency of a low-cost hydroponic greenhouse for a cucumber crop: an Australian case study. *Agric Water Manag* **98**, 841–846
- Handa A.K., Fatima T., Mattoo A.K. (2018): Polyamines: Bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. *Front. Chem.* **6**, 10.
- Hewitt E. J. (1966): *Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition*. 2.vydání, London, England, 241 stran.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. (1938): *The water-culture method for growing plants without soil*. University of California, College of Agriculture, USA, 41 stran.
- Hosseini S.J., Tahmasebi-Sarvestani Z., Pirdashti H., Modarres-Sanavy S.A.M., Mokhtassi-Bidgoli A., Hazrati S., Nicola S. (2020): Investigation of yield, phytochemical composition, and photosynthetic pigments in different mint ecotypes under salinity stress. *Food Science & Nutrition* **9**, 2620–2643.
- Jandera P., Churáček J. (1985): *Gradient elution in column liquid chromatography theory and practice*. 1.vydání, Elsevier Science, Amsterdam, 509 stran.
- Jogawat A. (2019): Osmolytes and their role in abiotic stress tolerance in plants. In: *Molecular plant abiotic stress: Biology and Biotechnology* (Roychoudhury A., Tripathi D., eds.), John Wiley&Sons, USA, pp 91–104.
- Kakhkashan P., Najat B., Iram S., Iffat S. (2016): Influence of soil type on the growth parameters, essential oil yield and biochemical contents of *Mentha arvensis* L. *Journal of essential oil bearing plants* **1**, 76–81.
- Kaur H., Sharda R., Sharma P. (2016): Effect of Hoagland solution for growing tomato hydroponically in greenhouse. *Hortflora research spectrum* **5**, 310–315.
- Kaya C., Tuna A.L., Okant A.M. (2010): Effect of foliar applied kinetin and indole acetic acid on maize plants grown under saline conditions. *Turk J Agric For* **34**, 529–538.
- Khojasteh S.C., Oishi S., Nelson S.D. (2010): The metabolism and toxicity of menthofuran in rat liver slices and in rats. *Chem Res. Toxicol* **23**, 1824–1832.
- Khoury M., Stien D., Eparvier V., Ouaini N., Beyrouthy M.E. (2016): Report on the Medicinal Use of Eleven *Lamiaceae* Species in Lebanon and Rationalization of Their Antimicrobial Potential by Examination of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Their Essential Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **33**, 1–17.
- Klouda P. (2003): *Moderní analytické metody*. 2.vydání, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, Česká republika, 132 stran.
- Kocsy G., Laurie R., Szalai G., Szilagyi V., Simon-Sarkadi L., Galiba G., De Ronde J.A. (2005): Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stress. *Physiol Plantarum* **124**, 227–235.

- Kokkini S., Karousou R., Lanaras T. (1997): Essential oils with 1,2-epoxy-*p*-menthane derivatives from *Mentha spicata* plants growing across the island of Crete. *Bot. Acta* **110**, 184–189.
- Kumar P., Mishra S., Malik A., Satya S. (2011): Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Industrial Crops and Products* **34**, 802–817.
- Lawrence B.M. (2007): Oil composition of other *Mentha* species and hybrids. In: *Mint: The genus Mentha*. (Lawrence B.M. ed.), CRC Press, Florida, USA, 325–346.
- Lea P.J., Sodek L., Parry M.A.J., Shewry P.R., Halford N.G. (2007): Asparagine in plants. *Ann. Appl. Biol.* **150**, 1–26.
- Li Y., He J. (2012): Advance in metabolism and response to stress of polyamines in plant. *Acta Agric. Boreali Sinica* **27**, 240–245.
- Lin Y.L., Chang Y.Y., Kuo Y.H., Shiao M.S. (2002): Anti-lipid-peroxidative principles from *Tournefortia sarmentosa*. *J Nat Prod* **65**, 745–747.
- Liu J. H., Nada K., Honda C., Kitashiba H., Wen X. P., Pang X. M. (2006): Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *J. Exp. Bot.* **57**, 2589–2599.
- Liu J., Wang W., Wu H., Gong X., Moriguchi T. (2015): Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front Plant Sci.* **6**, 827.
- Maas E.V., Hoffman G.J. (1977): Crop salt tolerance - Current assessment. *J. Irrig. Drain* **103**, 115–134.
- Maher M.J., Prasad M., Raviv M. (2008): Organic soilless media components. In: *Soilless culture, theory and practice* (Raviv M., Lieth J.H., eds), Elsevier, Amsterdam, pp 459–504.
- Malhotra H., Sangha M., Pathak D., Choudhary O., Kumar P., Rathore P. (2014): A simple hydroponic variant for screening cotton genotypes for salinity tolerance. *Crop Improv* **41**, 134–139.
- Malik A., Iqbal K., Aziem S., Mahato P., Negi A.K. (2014): A review on the science of growing crops without soil (soilless culture) – a novel alternative for growing crops. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* **7**, 833–842.
- Mansour M.M.F. (2000): Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol Plant* **43**, 491–500.
- Marchetti C.F., Ugena L., Humplík J.F., Polák M., Čavar Zeljković S., Podlešáková K., Fürst T., De Diego N., Spíchal L. (2019): A novel image-based screening method to study water-deficit response and recovery of barely populations using canopy dynamics phenotyping and simple metabolite profiling. *Front. Plant Sci.* **10**, 1252.
- Maucieri C., Nicoletto C., Os E., Anseeuw D., Havermaet R., Junge R. (2019): Hydroponic technologies. In: *Aquaponics food production systems: combines aquaculture and hydroponic production technologies for the future*. (Goddek S., Joyce A., Kotzen B., Burnell G.; eds.), pp 77–112.
- Meloni D.A., Oliva M.A., Ruiz H.A., Martinez C.A. (2001): Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *J Plant Nutr.* **24**, 599–612.
- Mimica-Dukic N., Bozin B. (2008): *Mentha* L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Current Pharmaceutical design* **14**, 3141–3150.
- Misra N., Gupta A.K. (2006): Interactive effects of sodium and calcium on proline metabolism in salt tolerant green gram cultivar. *Am. J. Plant Physiol* **1**, 1–12.
- Mittal S., Kumari N., Sharma V. (2012): Differential response of salt stress on Brassica juncea: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiol Biochem* **54**, 17–26.
- Mitchell A.R., Farris N.A. (1996): Peppermint response to nitrogen fertilizer in an arid climate. *J. Plant Nutrit.* **19**, 955–967.
- Mokhele B., Zhan X., Yang G. Zhang X. (2012): Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. *Canadian Journal of Plant Science* **92**, 399–405.
- Morriss M.A. (2007): Commercial Mint Species Grown in the United States. In: *Mint: The genus Mentha*. (Lawrence B.M., ed), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 87–136.

- Mořková K., Podlipná R., Vaněk T., Kafka Z. (2014): Halofytní rostliny a jejich možné využití ve fytořemediacích. *Chemické listy* **108**, 586–591.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651–681.
- Nagy M., Grančai D., Mučaji P. (2011): *Farmakognózia: Biogenéza prírodných látok*. 1.vydání, Vydavateľstvo Osveta, Martin, Slovenská republika, 238 stran.
- Nguyen H., Schug A.K. (2008): The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *Journal of Separation Science* **31**, 1465–1480.
- Nilson B.M., Odair A.B., Marcia O.M.M., Newton P.G. (2001): Essential oil production and quality of *Mentha arvensis* L. grown in nutrient solutions. *Acta Hort.* **548**, 181–187.
- Nováček F. (1990): *Fytochemické základy botaniky*. 2.vydání, vydavatelství Fontána, Olomouc, Česká republika, 284 stran.
- Padalia R.C., Verma R.S., Chauhan A., Sundaresan V., Chanotiya C.S. (2013): Essential oil composition of sixteen elite cultivars of *Mentha* from western Himalayan region, India. *Maejo International Journal of Science and Technology* **7**, 83–93.
- Pandey S., Ranade S.A., Nagar P.K., Kumar N. (2000): Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J.Biosci.* **25**, 291–299.
- Pang X., Nada K., Liu J., Kitashiba H., Honda C., Yamashita H., Tatsuki M., Moriguchi T. (2006): Interrelationship between polyamine and ethylene in 1-methylcyclopropene treated apple fruits after harvest. *Physiologia Plantarum* **128**, 351–359.
- Pardha-Saradhi P., Mohanty P. (1997): Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **38**, 253–257.
- Paschalidis K., Moschou P.N., Aziz A., Toumi I., Roubelakis-Angelakis K.A. (2009): Polyamines in grapevine: An update. In: *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology* (Roubelakis-Angelakis K.A., ed.), Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 207–228.
- Pavlík M., Pavlíková D., Zemanová V., Hnilička F., Urbanová V., Száková J. (2012): Trace elements present in airborne particulate matter – Stressors of plant metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **79**, 101–107.
- Rahimi Y., Taleei A., Ranjbar M. (2018): Long-term water deficit modulates antioxidant capacity of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Scientia Horticulturae* **237**, 36–43.
- Resh H.M. (2013): *Hydroponic food production*. 7.vydání, CRC Press, Boca Raton, USA, 511 stran.
- Riachi L.G., De Maria A.B. (2015): Peppermint antioxidants revisited. *Food Chem* **176**, 72–81.
- Roodbari N., Roodbari S., Ganjali A., Nejad F.S., Ansarifard M. (2013): The effect of salinity stress on growth parameters and essential oil percentage of peppermint (*Mentha piperita* L.). *International journal of advanced biological and biomedical research* **1**, 1009–1015.
- Sahandi M.S., Badi H.N., Mehrafarin A., Khalighi-Sigaroodi F., Sharifi M. (2019): Changes in essential oil content and composition of peppermint (*Mentha piperita* L.) in responses to nitrogen application. *J. Med Plants* **18**, 81–97.
- Saiz-Fernández I., De Diego N., Sampedro M.C., Mena-Petite A., Ortiz-Barredo A., Lacuesta M. (2015): High nitrate supply reduces growth in maize, from cell to whole plant. *J. Plant Physiol.* **173**, 120–129.
- Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Theng B. (2019): Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* **24**, 2452.
- Shukla P., Haseeb A., Srivastava N. (1997): The relation between soil pH and the reproduction/damage potential of *pratylenchus thornei* on growth and oil yield of *Mentha spicata*. *Nematol. Mediterr.* **25**, 25–29.
- Silva D.A.S., Júnior M.L.S., Viégas I.J.M., Lobato A.K.S., Melo V.S., Botelho S.M.A., Silva G.R., Freitas J.M.N., Neto C.F.O., Cunha M.L.A., Araujo A.R.R. (2014): Growth and visual symptoms of nutrient deficiencies in young *Mentha piperita* plants. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **12**, 292–296.

- Šišková J. (2019): *Fytochemické studium vybraných genotypů máty*. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Smith A.M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A. (2009): *Plant biology*. 1.vydání, Garland Science, New York, USA, 664 stran.
- Sonneveld C., Voogt W. (2009): *Plant nutrition of greenhouse crops*. 1.vydání, Springer, Dordrecht, Nizozemsko, 403 stran.
- Steiner A. A. (1984): The Universal Nutrient Solution. In: *Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture*, Wageningen, The Netherlands, pp. 633–650.
- Surendran U., Chandran C., Joseph E.J. (2017): Hydroponic cultivation of *Mentha spicata* and comparison of biochemical and antioxidant activities with soil-grown plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **39**, 26.
- Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M. (2007): Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy* **101**, 190–199.
- Tabatabaie S.J., Nazari J., Nazemiyeh H., Zehtab S., Azarmi F. (2007): Influence of various electrical conductivity levels on the growth and essential oil content of peppermint (*Mentha piperita* L.) grown in hydroponic. *Acta Horticult.* **747**, 197–201.
- Tabatabaie S.J., Nazari J. (2007): Influence of nutrient concentration and NaCl salinity on growth, photosynthesis and essential oil content of peppermint and lemon verbena. *Turk J Agric* **31**, 245–53.
- Taibi G., Schiavo B., Gueli M.C., Calanni Rindina P., Muratore R., Nicotra C.M.A. (2000): Rapid and simultaneous high-performance liquid chromatography assay of polyamines and monoacetyl polyamines in biological specimens. *Journal of Chromatography* **745**, 431–437.
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant physiology*. 5.vydání, Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA, 782 stran.
- Tester M., Davenport R. (2003): Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann. Bot.* **91**, 503–527.
- Tohma H., Köksal E., Kilic Ö., Alan Y., Yilmaz M.A., Gülcin I., Bursal E., Alwasel S.H. (2016): RP-HPLC/MS/MS analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia* L. species. *Antioxidants* **5**, 38.
- Trejo-Téllez L. I., Gómez-Merino F.C., Alcántar G.G. (2007): Elementos Benéficos. In: *Nutrición de Cultivos* (Alcántar G.G., Trejo-Téllez L. I, eds), MundiPrensa, Mexiko, pp 50–91.
- Tucker A.O., Hendriks H., Bos R., Fairbrothers D.E. (1991): The origin of *Mentha gracilis* (*Lamiaceae*) II Essential oils. *Econ. Bot.* **45**, 200–215.
- Tucker A.O., Naczi R.F.C. (2007): *Mentha*: An overview of its classification and relationships. In: *Mint: The genus Mentha*. (Lawrence B.M., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1–40.
- Uchida R. (2000): Essential nutrients for plant growth: nutrient functions and deficiency symptoms. In: *Plant nutrient management in Hawaii's soils, approaches for tropical and subtropical agriculture* (Silva J.A., Uchida R., eds). College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, pp 31–55.
- Vadas T.M., Zhang X., Curran A.M., Ahner B.A. (2007): Fate of DTPA, EDTA and EDDS in hydroponic media and effects on plant mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition* **30**, 1229–1246.
- Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. (2003): Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* **157**, 423–447.
- Van Os E.A., Gieling T.H., Lieth J.H. (2008): Technical equipment in soilless production systems. In: *Soilless culture, theory and practice* (Raviv M., Lieth J.H., eds). Elsevier, Amsterdam, pp 157–207.
- Volný M. (2020): Kvantitativní analýza s využitím hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy* **117**, 179–186.
- Wallach J. (2008): Physical characteristics of soilless media. In: *Soilless culture, theory and practice* (Raviv M., Lieth J.H., eds). Elsevier, Amsterdam, pp 41–116.
- Wang B., Chu J., Yu T., Xu Q., Sun X., Yuan J., Xiong G., Wang G., Wang Y., Li J. (2015): Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *PNAS* **112**, 4821–4826.

- Wen Y., Yuan X., Qin F., Zhao L., Xiong Z. (2019): Development and validation of a hydrophilic interaction ultra- high- performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for rapid simultaneous determination of 19 free amino acids in rat plasma and urine. *Biomedical Chromatography* **33**, 4387.
- Wingler A., Lea P.J., Quick W.P., Leegood R.C. (2000): Photorespiration:metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **355**, 1517–1529.
- Yu Y., Jin C., Sun C., Wang J., Ye Y., Zhou W., Lu L., Lin X. (2016): Inhibition of ethylene production by putrescine alleviates aluminium-induced root inhibition in wheat plants. *Scientific reports* **6**, 18888.
- Zehnálek J., Adam V., Kozek R. (2006): Asimilace dusičnanového, amonného a amidického dusíku u zemědělských plodin. *Chemické listy* **100**, 508–514.
- Zhang M., Zhang Y., Zhang Z., Wang Y., Song R. (2018): Optimization of precolumn OPA derivatization HPLC assay for monitoring of L-asparagine depletion in serum during L-asparaginase therapy. *Journal of Chromatographic Science* **56**, 794–801.
- Zhou G., Pang G., Tang Y., Yao X., Mo X., Zhu S., Guo S., Qian D., Qian Y., Su S., Zhang L., Jin C. (2013): Hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem-mass spectrometry for highly rapid and sensitive analysis of underivatized amino acids in functional foods. *Amino acids* **44**, 1293–1305.
- Zhu X., Long S.P., Ort D.R. (2008): What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Current opinion in Biotechnology* **19**, 153–159.

Citace internetového zdroje:

GRIN Czech. <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/search.aspx> (navštíveno dne 11.3.2021)

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CEC	-	kationtová výměnná kapacita
CHS	-	chalkonsynthasa
DAH	-	1,6-diaminohexan
DFT	-	angl. deep flow technique
EDDHA	-	kyselina ethylendiamindihydroxyfenyloctová
EDTA	-	kyselina ethylendiamintetraoctová
EI	-	elektronová ionizace
ESI-MS	-	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
FMOc	-	fluorofenylmethoxykarbonyl
GC-MS	-	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HILIC	-	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	-	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	-	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IAA	-	kyselina indol-3-octová
MRM	-	angl. multiple reaction monitoring
NFT	-	angl. nutrient film technique
LC-MS	-	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
PAL	-	fenylalaninamoniumlyasa
ROS	-	reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species)
RP-HPLC	-	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
RTW	-	angl. run to waste
SAM	-	S-adenosylmethionin
SPE	-	extrakce tuhou fází (angl. solid phase extraction)
UHPLC	-	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie