

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Chemická a obrazová analýza kořenového systému hrachu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Martina Horejšová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ondřej Vrobel
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala mému vedoucímu práce Mgr. Ondřejovi Vrobelovi za cenné rady, trpělivost a odborné vedení při práci v laboratoři. Mé poděkování dále patří Mgr. Tiborovi Béresovi, Ph.D. a Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D. za konzultace a cenné připomínky.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martina Horejšová
Název práce	Chemická a obrazová analýza kořenového systému hrachu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; pracoviště Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Ondřej Vrobel
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>) je významnou hospodářskou plodinou. Je zařazen do čeledi bobovitých, pro kterou je charakteristická endosymbióza mezi kořeny a půdními bakteriemi, se kterou souvisí tvorba kořenových výměšků obsahujících organické kyseliny a fenolické látky. Charakteristice těchto látek a popisu kořenového systému, rhizosféry a jejích složek je věnována teoretická část bakalářské práce. V experimentální části práce byla prováděna obrazová analýza kořenového systému hrachu, přičemž nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi plochami kořenů napříč genotypy hrachu. Byl stanoven profil organických kyselin v extraktech substrátu a pletivech kořenů metodou kapilární elektroforézy, kdy nebyly pozorovatelné významné rozdíly koncentrací organických kyselin mezi genotypy hrachu. Byla provedena analýza fenolických látek v pletivech kořenů metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Byly zaznamenány významné rozdíly koncentrací fenolických látek mezi jednotlivými genotypy hrachu.</p>
Klíčová slova	Rhizosféra, kořenové výměšky, organické kyseliny, flavonoidy.
Počet stran	54
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Martina Horejšová
Title	Chemical and image analysis of pea root system
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc
Supervisor	Mgr. Ondřej Vrobel
The year of presentation	2022
Abstract	<p>Field pea is an important agricultural crop. It is a member of fabaceae family which has characteristic endosymbiotic relationship between root system and ground bacteria. This endosymbiotic relationship is related to the production of root secrets which contain organic acids and phenolic substances. These substances are described in theoretical part of this bachelor's thesis along with the description of the root system (rhizosphere) and its parts. The experimental part consists of image analysis of pea's root system. However no significant differences were observed in between the surfaces of roots across the genotype of a pea. Using the method of capillary electrophoresis, a profile of organic acids was determined in extracts of the substrate and the root tissue. But no significant differences in concentrations of organic acids were observed across the pea's genotype. The analysis of phenolic substances in root tissue has been conducted as well using the method of liquid chromatography. In this analysis a significant differences of concentrations of phenolic substances were observed across individual pea genotypes.</p>
Keywords	Rhizosphere, root exudates, organic acids, flavonoids.
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Rhizosféra a její složky	2
2.1.1	Kořen	2
2.1.2	Půdní mikroorganismy	4
2.1.2.1	Mykorhiza	4
2.1.2.2	Půdní bakterie	5
2.2	Fixace dusíku	6
2.3	Kořenové výměšky	8
2.4	Funkce a chemické složení kořenových výměšků	8
2.4.1	Ekologická funkce kořenových výměšků	8
2.4.2	Chemické složení	10
2.4.2.1	Organické kyseliny	10
2.4.2.2	Sacharidy	11
2.4.2.3	Fenolické látky	11
2.5	Analýza složek kořenových výměšků	13
2.5.1	Analytické metody studia chemického složení kořenových výměšků	13
2.5.2	Kapilární zónová elektroforéza	14
2.5.3	Kapalinová chromatografie	16
2.5.3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	16
2.5.3.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí	19
3	Experimentální část	20
3.1	Materiál a přístroje	20
3.1.1	Chemikálie	20
3.1.1.1	Roztoky	20
3.1.2	Přístroje a pomůcky	21
3.1.3	Biologický materiál	22
3.2	Metody	22
3.2.1	Sterilizace semen hrachu setého	22
3.2.2	Pěstování a zpracování hrachu setého	22
3.2.3	Filtrace a lyofilizace získaného biologického materiálu	22
3.2.4	Stanovení obsahu fenolických látek	23
3.2.4.1	Extrakce fenolických látek	23
3.2.4.2	Analýza metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí	23
3.2.5	Stanovení iontů organických a anorganických kyselin	25
3.2.5.1	Extrakce organických kyselin	25
3.2.5.2	Identifikace iontů ve vzorcích a kalibrace	25
3.2.5.3	Podmínky analýzy metodou kapilární elektroforézy	26
3.2.6	Obrazová analýza kořenového systému	26
4	Výsledky a diskuse	28
4.1	Obrazová analýza	28
4.2	Analýza kapilární elektroforézou	30
4.2.1	Kalibrace	30
4.2.2	Analýza vzorků	34
4.2.2.1	Analýza půdního extraktu	34
4.2.2.2	Analýza kořenů	35
4.3	Analýza kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí	38
5	Závěr	42
6	Literatura	43

CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše s klíčovými slovy: rhizosféra, kořenové výměšky, organické kyseliny, flavonoidy.
2. Analýza profilu organických kyselin v kořenech a kořenových výměšcích hrachu.
3. Stanovení obsahu fenolických látek v kořenech.
4. Obrazová analýza kořenového systému hrachu.

1 ÚVOD

Hrách setý je hospodářsky velmi významnou rostlinou, rozšířenou prakticky po celém světě. Je to jednoletá luskovina, řadící se do čeledi bobovitých. Pro bobovité rostliny je charakteristická fixace dusíku, kterou mohou zajistit půdní bakterie vyskytující se v blízkosti kořene rostliny, tzv. rhizosféře. Tyto bakterie jsou ke kořenům vábeny kořenovými výměšky obsahující směs fenolických látek a organických kyselin a navazují s kořeny symbiotický vztah zvaný endosymbióza. Tomuto procesu je věnována teoretická část bakalářské práce. Je rovněž věnována bližší charakteristice kořenových výměšků, především pak fenolickým látkám a organickým kyselinám.

Jedním z cílů experimentální části je obrazová analýza kořenového systému hrachu, která je prováděna za účelem analýzy nodů, jejichž tvorba je spjatá s již zmíněnou fixací dusíku.

Tato část práce je dále věnována stanovení profilu organických kyselin. Organické kyseliny jsou identifikovány z extraktu substrátu, do kterého jsou uvolňovány kořenovými výměšky, a z pletiv kořenů. Pro účel identifikace je zvolena kapilární zónová elektroforéza.

Také je stanovován profil fenolických látek z pletiv kořenů hrachu setého. K identifikaci těchto látek je zvolena kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí, která se vyznačuje vysokou citlivostí, vhodnou pro analýzu i velmi nízkých koncentrací látek.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rhizosféra a její složky

Rhizosféra zahrnuje půdní oblast obklopující kořenový systém rostlin i samotný povrch kořene. Vyznačuje se značnou mikrobiální diversitou. Mikroorganismy, jako jsou bakterie, archea, houby, viry, prvoci a řasy, nebo organismy jako jsou háďátka či členovci, zde hrají důležitou roli při všech metabolických procesech. Kromě symbiotických mikroorganismů se mohou v rhizosféře vyskytovat i patogenní mikroorganismy, které nejsou pro rostlinu nijak prospěšné a naopak jí mohou škodit. Symbiotické mikroorganismy jsou ke kořenu rostliny atrahovány kořenovými výměškami, které kořen uvolňuje do půdy, některé patogenní mikroorganismy jsou výměškami naopak odpuzovány. Další významnou složkou rhizosféry jsou živiny, které se v půdě vyskytují ve formě anorganických vodných roztoků (Varma et al., 2019). Za nepříznivých podmínek (např. při kontaminaci a znečištění životního prostředí) mohou být součástí rhizosféry i kontaminující látky jako jsou látky toxické či těžké kovy (Dong et al., 2007). Rhizosféra je prostředí bohaté na vodné roztoky živin a zároveň je klíčovým prostředím pro vstup těchto živin do kořenů rostlin. Její podstatnou součástí jsou kořenové výměšky uvolňované kořeny rostlin (Varma et al., 2019).

2.1.1 Kořen

Kořen je zpravidla podzemní, nepravidelně se větvící, vegetativní, heterotrofní (vzácně asimilující), bezlistý, nečlánekovaný orgán sporofytu cévnatých rostlin. Pomocí kořene je rostlina ukotvená v substrátu a přijímá vodu a živiny z půdy. Mezi další funkce kořene patří zprostředkování symbiomy s jinými rostlinami nebo půdními mikroorganismy. Kořen může též sloužit i k vegetativnímu rozmnožování. Růst kořene je převážně pozitivně gravitropický (Vinter, 2008; Fajtová et al., 2018).

Na základě původu se rozlišují dva typy kořenů – primární kořeny a adventivní kořeny. V primární neboli hlavní kořen se transformuje kořínek, který vzniká při klíčení semene. Primární kořen buď brzy zaniká, anebo dál roste a nepravidelně se větví a vytváří kořenovou soustavu typu allorhizie. Tato soustava je typická pro nahosemenné a dvouděložné rostliny. Pokud dojde k zániku primárního kořene, je kořen nahrazen adventivními kořeny. Kořenová soustava je tvořena stejně tlustými a málo větvenými kořeny a nazývá se homorhizie, která je charakteristická pro jednoděložné rostliny (Fajtová et al., 2018).

Kořeny mohou, v průběhu fylogenetického vývoje a v důsledku zvýšení intenzity některé ze svých funkcí, modifikovat tvar a stavbu až metamorfovat na kořeny dužnaté, chůdovité, přičepivé či kontraktilní (Poleno et al., 1994).

V určité vzdálenosti od vzrostného vrcholu kořene (apexu) ztrácejí postupně meristematické buňky svou dělivou schopnost. Buňky se pak začínají prodlužovat a následně dozrávat v trvalá pletiva. Diferenciace jednotlivých pletiv probíhá v různých vzdálenostech od vzrostného vrcholu kořene. Podle převládajícího stádia vývoje buněk v dané části kořene je možno rozlišit čtyři typy kořenových zón – meristematická, elongační, absorpční a diferenciací. Meristematická zóna je tvořena apikálními meristémy. Dochází zde k neustálému dělení kmenových buněk. V elongační (prodlužovací) zóně probíhá intenzivní růst buněk do délky. Absorpční a diferenciací zóny jsou charakteristické vznikem kořenového vlášení, diferenciací trvalých pletiv a zakládáním postranních kořenů (Vinter, 2008).

Kořenová čepička je umístěna na špičce kořenů a chrání apikální meristém kořene. Usnadňuje průnik kořene substrátem pomocí slizu, který vylučuje. Buňky, které se nachází v centrální části kořenové čepičky, se nazývají statocyty. Tyto buňky obsahují tzv. statolity, zrna přesýpavého škrobu, jsou uspořádány do pravidelných řad a tím vytvářejí sloupek. V případě změny polohy kořene dochází k usazování statolitů ve statocytech. Sedimentace vyvolává řízený tok auxinu na spodní stranu růstové zóny kořene a kořen pak roste rychleji na svrchní straně a ohýbá se ve směru zemské tíže (gravitropismus) (Vinter, 2008; Fahn, 1990).

V primární stavbě sestává kořen z rhizodermis (primární krycí pletivo), primární kůry (základní pletivo) a ze středního válce (vodivé a zpevňovací pletivo).

Povrch kořene kryje rhizodermis. Jedná se o jednovrstvou epidermis tvořenou nekutinizovanými buňkami, které jsou propustné pro vodní roztoky minerálních látek. V absorpční zóně kořene vytváří kořenové vlášení – absorpční trichomy, rhiziny (kořenové vlásy). Rhiziny zvětšují povrch kořene a tím umožňují příjem vody s minerálními látkami i z malých půdních pórů (Vinter, 2008).

Primární kůra (cortex) tvoří dutý válec, který obklopuje střední válec kořene. Je složena z exodermis, mezodermis a endodermis.

Exodermis je jednovrstevná, tvořená protaženými buňkami a nachází se pod rhizodermis. V případě odumření rhizodermis zastupuje exodermis její krycí funkci. Buněčné stěny exodermis zpravidla korkovají, proto zde mohou být přítomny i Casparyho

proužky (tenký rámeček v buněčných stěnách, který je tvořený suberinem a ligninem), které jsou typické pro endodermis.

Mezodermis je střední a nejširší vrstva cortexu. Je důležitým centrem zásobních látek (amyloplasty) – sinkem.

Vnitřní vrstva primární kůry je tvořena endodermis, která obklopuje střední válec. Představuje ochrannou bariéru proti pronikání patogenů do středního válce. Endodermis je jednovrstevná a na radiálních stěnách se vytváří Casparyho proužky v podobně rámečků (Fajtová et al., 2018, Vinter, 2008).

Střední válec sestává z pericyklu, který je tvořen vrstvou parenchymatických buněk, a obsahuje radiální cévní svazek s pravidelně se střídajícím xylémem a floémem. U většiny rostlin z pericyklu vznikají postranní kořeny (Fajtová et al., 2018).

Sekundární stavba kořene je spjatá s druhotným tloustnutím kořene, které probíhá u většiny dvouděložných a nahosemenných rostlin. Druhotným tloustnutím kořene (činnost sekundárního meristému – kambia) vznikají druhotná pletiva.

Zároveň s druhotným tloustnutím kořene vzniká felogén (perikambium), který směrem vně tvoří vrstvu korku a směrem dovnitř vrstvu druhotného krycího pletiva (Fajtová et al., 2018).

2.1.2 Půdní mikroorganismy

Rhizosféra je vhodným prostředím pro výskyt a aktivitu mikroorganismů. Kořeny uvolňují velké množství organických látek (např. výměšky a sliz), které jsou produkty fotosyntézy a dalších rostlinných metabolických drah. Tyto organické látky slouží pro mikroorganismy jako přísun živin a mohou vábit různé druhy půdních mikroorganismů do oblasti rhizosféry a rostlina s nimi může navázat symbiotický vztah (Nannipieri et al., 2007). Rhizosféra je tedy prostředí s vysokou mikrobiální diverzitou. Největší podíl mikroorganismů, které obývají rhizosféru, jsou houby a bakterie.

Obecně mikroorganismy slouží jako prostředník mezi rostlinou, která vyžaduje minerální látky rozpuštěné ve vodě, a půdou, která tyto potřebné látky obsahuje (Malik & Grohmann, 2012).

2.1.2.1 Mykorhiza

Nejběžnějším vzájemným spojením mezi houbami a kořeny rostlin je mykorhiza. V této symbióze houba poskytuje rostlině vyšší dostupnost k vodě a živinám, a to díky rozšířené absorpční ploše, kterou zajišťují sítě hyf. Houby jsou schopny tvorby enzymů podílejících se na hydrolýze sloučenin dusíku a fosforu z půdní organické hmoty a přispívají ke

zvětrávání minerálů. Dále pak houby jsou schopny zmírnit abiotický (např. koncentrace těžkých kovů) a biotický (např. půdní patogeny) stres. Pro optimální růst a vývoj hub poskytuje rostlina houbám sacharidy. Odhaduje se, že 4-20 % sacharidů získaných fotosyntézou může být transportováno z rostliny na jejího symbiotického partnera (Malik & Grohmann, 2012).

Nejběžnějšími typy mykorhizních asociací jsou ektomykorhiza a endomykorhiza (Malik & Grohmann, 2012).

Ektomykorhizní houby tvoří asociace s mnoha dřevinami od keřů až po lesní stromy a stromy deštných pralesů. Mycelium ektomykorhizních hub tvoří různě tlustý plášť okolo tenkých kořínků. Plášť zvětšuje povrch absorpčních kořenů a často zasahuje do morfologie jemných kořínků, což má za následek bifurkaci nebo naopak shlukování kořínků. Vlákná hyf vyčnívající z pláště mohou též zasahovat do půdy, kde se shlukují za vzniku tzv. rhizomorfů, které zajišťují specializovaný transport na dlouhé vzdálenosti pro živiny a vodu. Ektomykorhizní houby také pronikají mezi buňky kořenů a vytvářejí síťovitou strukturu, tzv. Hartigovu síť. Tato struktura pak tvoří rozhraní pro výměnu fotoasimilátů a půdního roztoku mezi rostlinou a houbou (Agerer, 1991).

Endomykorhiza se vyskytuje u většiny bylin, travnatých druhů rostlin mírného pásma a stromů tropických a subtropických lesů. Při endomykorhize pronikají houby z oddělení *Glomeromycota* pomocí houbových vláken hyfů do kořenů rostlin, kde se hyfy dělí do stromovitého útvaru, tzv. arbuskulu (arbuskulární mykorhiza), anebo do ledvinkovitého útvaru, tzv. vesikulu (Van der Heijden, 2001).

2.1.2.2 Půdní bakterie

Rhizosféra je kolonizována bakteriemi, které mohou samostatně, anebo ve spolupráci s mykorhizními houbami, podporovat růst a vývoj rostliny. Bakterie v rhizosféře nepřetržitě metabolizují organické látky a zásadně tak ovlivňují zásobování rostlin živinami. Rozmanitost a struktura bakteriálních společenstev je pro každou rostlinu specifická (Malik & Grohmann, 2012).

Půdní bakterie mohou mít na rostlinu jak pozitivní, tak negativní účinek. Škodlivé rostlinné patogeny mohou napadat kořenový systém, ochuzovat rostlinu o potřebné živiny a omezovat činnost symbiotických bakterií. PGPR bakterie (z anglického Plant Growth – Promoting Rhizobacteria; v českém překladu bakterie kolonizující kořeny) naopak stimulují rostlinu k růstu, zásobují ji sloučeninami, které syntetizují nebo usnadňují jejich příjem z prostředí (např. fixace dusíku), hrají velkou roli při komunikaci mezi rostlinou

a mikroorganismy v rhizosféře (Hrynkiewicz & Baum, 2012; Zhang et al., 2014). Nejvýznamnějšími rody půdních bakterií jsou rody *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azotobacter* a *Azospirillum* (Zhang et al., 2014).

PGPR bakterie mají praktické využití v zemědělství. Využívají se např. jako biokontrola rostlinných onemocnění nebo jsou součástí biohnojiv. Další využití našly bakterie při fytořemediaci. Jedná se o technologické postupy, které využívají rostliny a jejich symbiotické mikroorganismy pro schopnost absorpce, schopnost metabolizovat organické kontaminující sloučeniny a sekvestrovat těžké kovy v rámci eliminace škodlivých a znečišťujících látek z životního prostředí (van Dam & Bouwmeester, 2016).

2.2 Fixace dusíku

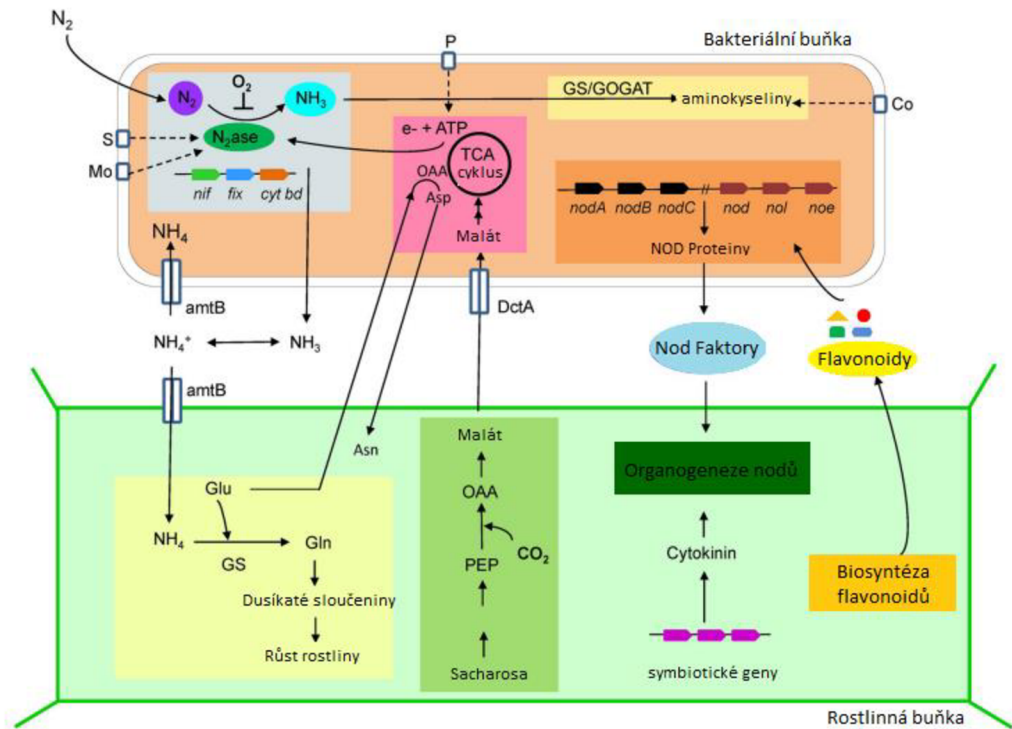
Biologická fixace dusíku je přeměna atmosférického N_2 na NH_3 . Tento proces se vyskytuje u většiny užitkových rostlin, především u luskovin v zemědělských systémech. Symbiotickou fixaci dusíku mohou zajistit bakterie a archebakterie, eukaryota pak nikoliv. Z bakterií se na fixaci dusíku podílejí PGPR bakterie jako *Azospirillum*, které podporují růst rostliny a fixaci dusíku u pšenice, kukuřice a rýže, *Rhizobium* fixující dusík pro luskoviny, *Anabaena azollae* v symbióze s *Azolla* kapradinami při fixaci dusíku v zemědělství při pěstování rýže (Mus et al., 2016).

Nejvíce vyvinutou formou asociace mezi rostlinou a PGPR je endosymbióza. Tento typ symbiózy je typický především pro luskoviny a bakteriální rod *Rhizobium* (Obr. 1). Luskoviny vylučují svým kořenovým systémem směs fenolických látek, převážně flavonoidy a isoflavonoidy, které *Rhizobium* přijímá jako signál, váže se na regulátor transkripce NodD a aktivuje bakteriální nodulační geny. Tyto geny jsou zodpovědné za produkci lipochitoologosacharidů nazývané jako Nod faktory. Nod faktory z různých *Rhizobií* sdílejí stejnou chitinovou N-acetylglukosaminovou oligosacharidovou kostru s acylovým řetězcem mastné kyseliny na neredukujícím konci. Vnímání signálu Nod faktoru luskovinou je zprostředkováno LysM doménovými receptorovými kinásami. Nod faktory spouštějí dělení rostlinných buněk a tvorbu meristému, *Rhizobium* vstoupí do kořene pomocí endocytózy, kde se v rostlinné organelle symbiozomu diferencuje na bakterioidy fixující dusík za vzniku nody (Long, 1996; Mus et al., 2016).

Některé rostliny tvoří krátké proteiny podobné defensinu, kterými mohou řídit chování bakteriálního symbionta. Např. luskoviny produkují stovky malých peptidů bohatých na cystein, které jsou specifické pro nody. Tyto peptidy narušují buněčný cyklus, což vede

k endoreduplikaci rostlinného i bakteriálního genomu, narušení stability membrány, změně genové exprese a podpoře diferenciace druhů *Rhizobia* (Maróti et al., 2015).

Podstatou symbiomy mezi rostlinami a bakteriemi vázající dusík je výměna živin mezi oběma partnery. Za fixaci dusíku zprostředkovanou bakteriemi poskytuje rostlina bakterii zdroj uhlíku a další klíčové živiny. Oba organismy přizpůsobují své metabolické dráhy tak, aby vždy vyhověly potřebám druhého symbiotického organismu (Mus et al., 2016).



Obr. 1: Schematická reprezentace symbiomy mezi bakterií fixující dusík a nodulující rostlinnou buňkou při fixaci dusíku. Převzato a upraveno z Mus et al., 2016.

2.3 Kořenové výměšky

Kořenové výměšky, neboli exudáty, jsou látky vyměšované kořenovým systémem rostliny do půdního prostředí. Jedná se o směs primárních a sekundárních metabolitů, které jsou pro každý druh rostliny specifické. Ve svém složení obsahují organické látky s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou sacharidy (např. glukosa, sacharosa), aminokyseliny (např. glycin, glutamát) a organické kyseliny (např. citrát, malát, oxalát), mastné kyseliny, steroly, růstové faktory a vitamíny (van Dam & Bouwmeester, 2016; Nannipieri et al., 2007).

Kořenové výměšky jsou také definovány jako difúzní sloučeniny, které se pasivně ztrácejí kořenem. Rychlost ztráty jednotlivých komponent kořenových výměšek závisí na třech kritických faktorech, a to na koncentračním gradientu, propustnosti plazmatické membrány a umístění rozpuštěných látek v kořenové tkáni (Jones et al., 2009). Množství a typ kořenových výměšek jsou ovlivněny genotypem rostliny, fází růstu rostliny a podmínkami prostředí, např. druh půdy, vlhkost půdy, dostupnost živin, toxicita. Výměšky jsou též značně ovlivněny mikroorganismy žijícími v rhizosféře (Nannipieri et al., 2007).

Kořenové výměšky plní řadu funkcí. Mezi ty hlavní patří chemická komunikace mezi kořeny a rhizosférou rostliny, komunikace mezi kořenovými systémy více rostlin, dále slouží k vábení symbiotických mikroorganismů (příkladem mohou být rody *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azotobacter* a *Azospirillum*), nebo naopak k odpuzování patogenních mikroorganismů a ochrana před toxickými látkami a těžkými kovy. Složky kořenových výměšek také slouží jako zdroj uhlíku pro půdní mikroorganismy a také se účastní metabolismu pro rostlinu důležitých prvků jako je dusík či fosfor (van Dam & Bouwmeester, 2016; Beleggia et al. 2021).

2.4 Funkce a chemické složení kořenových výměšek

2.4.1 Ekologická funkce kořenových výměšek

Vylučování kořenových výměšek má pro rostlinu jak pozitivní, tak negativní účinek. V rámci pozitivních účinků se jedná o odpuzování patogenů a vábení parazitů, kteří mohou odpudit a zahubit patogeny v rhizosféře rostliny. V případě negativních účinků se jedná o antibiotické účinky kořenových výměšek na symbiotické mikroorganismy, inhibice mikrobiálních signálů a aleopatie. Aleopatie je negativní působení výměšek jedné rostliny na rostlinu druhou, což může vést například ke zpomalení růstu poškozené rostliny (van Dam & Bouwmeester, 2016) (Obr. 2).



Obr. 2: Chemická komunikace rostliny s jinými organismy v rhizosféře. (A) Rostliny vylučují fenolické látky k inhibici klíčení nebo růstu jiných rostlin (aleopatie); (B) larvy hmyzu atrahované těkavými látkami produkované kořenem; (C) kolonizace rhizosférickými bakteriemi a tvorba kořenových nodů vyvolaná výměškou; (D) výměšky indukují líhnutí háďátek a atrahují juvenilní háďátka směrem ke kořeni; (E) kořenová čepička je místem nejaktivnější exsudace; (F) strigolaktony v kořenových výměšcích indukují větvení hyf u arbuskulárních mykorhizních hub; (G) klíčení parazitických rostlin je vyvoláno strigolaktony ve výměšcích jejich hostitele. Převzato z van Dam & Bouwmeester, 2016.

Výměšky hrají ochrannou roli při kontaminaci rhizosféry toxickými látkami a těžkými kovy. Při znečištění půdy těžkými kovy, jako jsou kadmium, olovo, rtuť, chrom či arsen, mohou některé rostliny aktivně či pasivně měnit sekreci protonu vodíku H^+ . Tyto kořenem vyvolané změny pH rhizosféry mohou ovlivnit dostupnost a příjem minerálních látek kořenem. Poklesem pH se zvyšuje rozpustnost a aktivita těžkých kovů, což usnadňuje vstup kationtu kovu do rostliny jejím kořenovým systémem. Aby byl vstup kationtů kovů a toxických látek do kořene rostlin při kontaminaci půdy minimální, kořenové výměšky atrahují mikroorganismy, které jsou schopny tyto látky metabolizovat a eliminovat jejich přítomnost v rhizosféře (Dong et al., 2007).

Kořenové výměšky jsou důležitým zdrojem esenciálních prvků pro symbiotické mikroorganismy. 5 % až 21 % uhlíku z celkového obsahu uhlíku v kořenových výměšcích je fixováno fotosyntézou, dalších 15 % až 25 % uhlíku je výměškou fixováno z rhizosféry. Uhlík se uplatňuje při syntéze uhlíkového skeletu všech významných

sloučenin jako jsou aminokyseliny, proteiny, sacharidy, lipidy atd. Nejdůležitějším prvkem pro růst rostliny je dusík, který je rostlinou přijímán ve formě dusičnanu NO_3^- . Dusičnany jsou metabolizovány nitrátreduktasou (EC 1.7.1.1.) a dusitany NO_2^- , ty jsou dále přeměňovány nitritreduktasou (EC 1.7.1.4) na amonné kationty NH_4^+ . V této finální podobě je dusík začleňován do aminokyselin, proteinů, nukleových kyselin a chlorofylu. Dusík se rovněž uplatňuje v případě zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, kdy koriguje správný růst a vývoj kořenů (Li et al., 2018). Zásadní roli v metabolismu rostlin hraje fosfor. Fosfor je rostlinou přijímán ve formě (ortho)fosforečnanu a do organických sloučenin se zabudovává pomocí fosforylace. Je nepostradatelnou strukturní složkou nukleových kyselin, koenzymů, nukleotidů, fosfoproteinů atd. (Jin et al., 2015).

2.4.2 Chemické složení

Kořenové výměšky jsou složeny z vysokomolekulárních, ve vodě nerozpustných látek, a z nízkomolekulárních, ve vodě rozpustných látek. Vysokomolekulární látky zahrnují buněčné stěny, odumřelé buněčné komponenty, kořenové zbytky a sliz. Vyměšovanými nízkomolekulárními látkami jsou aminokyseliny, organické kyseliny, sacharidy, fenolické látky, hormony a vitaminy. Dominantní složky kořenových výměšek tvoří především sacharidy (např. glukosa, fruktosa, sacharosa), organické kyseliny (např. kyselina citronová, jantarová, vinná) a aminokyseliny (např. serin, glycin, lysin,) (Vranová et al., 2010).

2.4.2.1 Organické kyseliny

Nízkomolekulární organické kyseliny hrají klíčovou roli v mnoha půdních procesech. V půdě vznikají při degradaci organického materiálu, např. rozkladem odumřelých kořenů houbami či bakteriemi. Organické kyseliny jsou rovněž součástí výměšek, které jsou uvolňovány houbami a kořenovým systémem rostlin. Koncentrace organických kyselin v půdním roztoku se typicky pohybuje v rozmezí od $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Ve srovnání s koncentracemi rozpuštěných anorganických látek v půdním roztoku, jako je NO_3^- , Cl^- , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} , jsou koncentrace organických kyselin významně nižší. Nejběžněji se vyskytujícími organickými alifatickými kyselinami ve výměšcích jsou kyselina mravenčí, octová, jablečná, mléčná, citronová, jantarová a fumarová (Jones et al., 2003; Van Hees et al., 1999).

Kyseliny se účastní různých procesů probíhajících v rhizosféře, jako je atrahování mikroorganismů, minerální zvětrávání, odstranění kovů z půdy, solubilizace a mobilizace živin rostlinami a mikroorganismy (např. při solubilizaci živin jako je fosfor se uplatňují

oxalát a citrát) a chrání kořen před negativními účinky enviromentálního stresu. Obecně platí, že pokles pH půdy zlepšuje dostupnost živin do kořenů rostlin. Snížení pH půdy je zapříčiněno buď uvolňováním protonu vodíku H^+ organickou kyselinou, nebo pomocí H^+ -ATPas (EC 7.1.2.1) (Liang et al. 2020; Jones et al., 2003).

Organické kyseliny v širokém rozsahu půdních podmínek jsou typicky záporně nabitě anionty schopné silně reagovat s kovovými ionty jak v půdním roztoku, tak v pevné fázi. Jsou proto důležitými složkami půdy pro rozpouštění kovů z nerozpustných minerálních fází v půdě. Mohou zvýšit desorpci těžkých kovů a kovů vzácných zemin z půdy a následně zvýšit koncentraci těchto kovů v půdním roztoku (Han et al. 2006). Například kyselina šťavelová, jantarová a citronová podporují desorpci manganu, kyselina maleinová zinku, nebo kyselina jablečná desorpci železa a manganu (Liang et al. 2020). Zvýšení rozpustnosti kovů v půdách kyselinami a následnou absorpcí kovu rostlinou se připisuje především chelatačním vlastnostem organických kyselin (Han et al. 2006).

2.4.2.2 Sacharidy

Sacharidy, stejně jako organické kyseliny a aminokyseliny, se zařazují do nízkomolekulárních primárních metabolitů, které tvoří důležitou součást kořenových výměšků (Gargallo-Garriga et al., 2018). Sacharidy zde plní funkci významného zdroje energie pro metabolické procesy a půdní organismy, poskytují uhlíkový materiál pro jiné organické látky a mikroorganismy, udržují stabilní osmotický tlak (především sacharosa, maltosa a glukosa), mají zásobní funkci a jsou stavebním kamenem všech buněk a pletiv (Nováček, 2008; Fan et al., 2011). V případě mírného sucha rostliny vyměšují polysacharidy s větším množstvím slizu pro usnadnění pohybu kořenů suchou půdou. Sacharidy jsou typickými semipolárními metabolity, které se běžně vyskytují v rostoucích rostlinných tkáních, jako jsou kořeny rostlin (Gargallo-Garriga et al., 2018).

2.4.2.3 Fenolické látky

Hrách setý se během posledních desetiletí stal středem zájmu pro výzkum profilu fenolických látek. V literatuře bylo popsáno celkem 115 strukturně odlišných fenolických sloučenin, přičemž většinu tvoří glykosylované flavonoly, patřící do skupiny flavonoidů, spolu s jejich biosynteticky příbuznými protějšky, například flavony, flavanoly, flavanony, antokyany, pterolarpanoidy a isoflavonoidy (Fahim et al., 2019).

Fenolické látky jsou organické sloučeniny obsahující jeden nebo více aromatických kruhů. Každý aromatický kruh nese jeden nebo více hydroxylových substituentů (včetně jejich funkčních derivátů jako jsou estery, methylestery, glykosidy atd.) či skupin, které

mají vliv na polaritu fenolických látek a na jejich rozpustnost ve vodě (Bílková et al., 2018). Přítomnost molekuly fenolu propůjčuje fenolickým látkám alkoholovou povahu, jsou kategorizovány jako terciální alkoholy. Všechny fenolické látky jsou v podstatě polycyklické molekuly, které mění své základní vlastnosti vlivem substituce (Husain & Gupta, 2015).

Rostlinné fenolické sloučeniny jsou biosyntetizované šikimátovou cestou nebo polyacetátovou či směsnou (šikimát-polyacetát) drahou. Tvoří tak deriváty šikimátu, pentofosfátu a deriváty fenypropanoidních drah, proto jsou fenolické sloučeniny označovány jako sekundární metabolity (Bílková et al., 2018). Ve vodě rozpustné fenolické látky jsou koncentrovány v buněčných vakuolách, zatímco nerozpustné fenolické látky se nacházejí v buněčných stěnách, kde mají schopnost tvořit komplex s proteiny. Fenolové kyseliny jsou univerzální v distribuci, např. mohou být spojeny s ligninem (Husain & Gupta, 2015).

Tyto sloučeniny selektivně stimulují růst rhizosferické půdní mikroflóry generováním redoxních reakcí v půdě a tím i mění složení mikrobiálních společenstev. Přispívají k humifikaci organických látek, k jejich mineralizaci až na jednoduché anorganické látky (jako je především fosfor a dusík), stejně jako organické kyseliny chelatují kovy a zlepšují poréznost půdy, což vede ke zvýšení mobility a biologické dostupnosti esenciálních prvků jako je hořčík, draslík, vápník, zinek, měď, mangan apod. (Ray et al., 2018). Fenolické látky jsou důležité pro růst rostlin, uplatňují se při jejich rozmnožování a také mají vliv na ochranu proti patogenům. Rovněž jejich antioxidační a antimikrobiální aktivita má na rostlinu prospěšné účinky. Vzhledem k širokému zastoupení v rostlinách jsou i součástí lidské stravy (Husain & Gupta, 2015; Bílková et al., 2018). Jejich příjem je spojován se snížením četnosti výskytu rakoviny, Alzheimerovy choroby či kardiovaskulárních onemocnění a také s antialergenými, protizánětlivými nebo antitrombotickými účinky (Rahman., 2014).

Fenolické látky se podle chemické struktury dělí na fenolové kyseliny, flavonoidy, lignany, taniny a stilbeny. Mezi fenolové kyseliny se řadí deriváty kyseliny benzoové (kyselina salicylová, *p*-hydroxybenzoová, vanillová, syringová, protokatchová, gallová, gentisová a veratrová), deriváty kyseliny skořicové (kyselina *o*-kumarová, *m*-kumarová, *p*-kumarová, ferulová, sinapová, kávová), kyselina chlorogenová a kyselina rozmarýnová. Nejhojněji zastoupenými látkami sekundárních metabolitů jsou flavonoidy. Typickými zástupci flavonoidů jsou anthokyany, flavonoly, flavanovy, flavony a isoflavony. Taniny se mohou ve výměšcích a kořenech vyskytovat jak

v hydrolyzované, tak v kondenzované formě. Nejhojněji se vyskytujícím zástupcem stilbenu ve výměšcích je resveratrol (Pandey & Rizvi, 2009).

Flavonoidy jsou fenyylpropanoidy, které se vyznačují antioxidačními a antimikrobiálními účinky. V kořeni a kořenových výměšcích zastávají i funkci enzymových regulátorů a signálních molekul pro mikroorganismy (Wasson et al., 2009). Např. apigenin a lutein jsou signálními molekulami pro PGPR bakterie fixující dusík v kořenech luskovin (Buchanan et al., 2000).

Flavonoidy regulují polární transport a odbourávání auxinu, proto mohou být využívány jako vývojové regulátory, které řídí organogenezi prostřednictvím účinků na transport a lokalizaci auxinu. Flavonoidy se specificky hromadí v diferenciační zóně kořene a v oblasti kořenového vlášení, např. v postranních kořenech či nodech. Snížené koncentrace flavonoidů mohou negativně ovlivnit gravitropismus, mohou způsobit zauzlení kořene, omezit vývoj postranních kořenů a způsobit vývojové vady rostliny (Wasson et al., 2009).

Flavonoidy produkované v prýtu se účastní interakce mezi rostlinou a živočichy. Propůjčují květům a ovoci barevnost, které k rostlině atrahují hmyz. Konkrétně se jedná o anthokyany, jako pelargonidiny (oranžová, růžová a červená barva), kyanidiny (fialová a karmínová barva) a delfidininy (modrá a světle fialová barva). Flavonoidy též poskytují rostlině ochranu před UV zářením. Tato ochranná role je připisována především flavonolu kaempferolu (Buchanan et al., 2000).

2.5 Analýza složek kořenových výměšků

2.5.1 Analytické metody studia chemického složení kořenových výměšků

Mezi nejběžněji analyzované složky kořenových výměšků se řadí organické kyseliny. Pro separaci kyselin se převážně využívá kapalinová chromatografie (Barbas et al., 1999). Ionově-výměnná chromatografie (IEC, Ion-exchange chromatography) je typem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Využívá se k separaci široké škály organických kyselin a umožňuje vysoce selektivní analýzu vzorků o velmi malých koncentracích. Využívá vysoce stabilní stacionární fázi, která velmi dobře snáší kyselá a bazická rozpouštědla (Baziramakenga et al., 1994). Další možné techniky pro separaci kyselin jsou kapilární elektroforéza a plynová chromatografie. Kapilární elektroforéza (CE, capillary electrophoresis) je metoda, která poskytuje kvalitní separaci organických kyselin v relativně krátkém čase, bez časově náročných příprav a složitého ředění vzorků

(Barbas et al., 1999). Princip kapilární elektroforézy je popsán v kapitole 2.3.2. Plynová chromatografie (GC, gas chromatography) vyžaduje před provedením extrakci vzorku, který je následně dávkován do proudu plynu, který unáší vzorek kolonou. Rovněž je před analýzou potřeba provést derivatizaci vzorku, což může případně zkomplikovat jeho přípravu. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií GC-MS poskytuje jednu z nejlepších možných separací kyselin a jasné rozlišení píků v chromatogramu. IEC poskytuje v porovnání s GC-MS lepší kvalitativní reprodukovatelnost (Barbas et al., 1999; Klouda, 2016).

Dalšími analyzovanými sloučeninami výměšků jsou fenolické látky. Pro jejich analýzu se nejčastěji využívá HPLC, která se v tomto případě provádí v režimu reverzní fáze na kolonách ze silikagelu, jehož povrch je chemicky modifikován, viz kapitola 2.3.3.1. Výkonnost metody HPLC je zvýšena systémem UHPLC (z anglického Ultra-high performance liquid chromatography), kdy je zkrácen čas analýzy a rozlišení a citlivost analýzy jsou vyšší. To je dáno použitím částic o průměru menším než 2 μm . Struktura fenolických látek umožňuje detekci v UV oblasti. První detekční maximum je v rozsahu 240-285 nm, druhé v rozsahu 300-550 nm. Další vhodnou metodou ke stanovení fenolických látek je LC-MS (z anglického Liquid chromatography–mass spectrometry) a plynová chromatografie, která se vyznačuje vysokou citlivostí detekce pro téměř všechny těkavé i netěkavé fenolické látky. Pro separaci a současné určení struktury fenolických látek je vhodná metoda kapalinové chromatografie spojené s nukleární magnetickou rezonancí (LC-NMR, Liquid Chromatography Nuclear Magnetic Resonance) (Liu et al., 2008).

Hojně zastoupenými a analyzovanými komponenty kořenových výměšků jsou sacharidy. Nejúčinnější metodou pro analýzu sacharidů je HPLC (Magwaza & Opara, 2015).

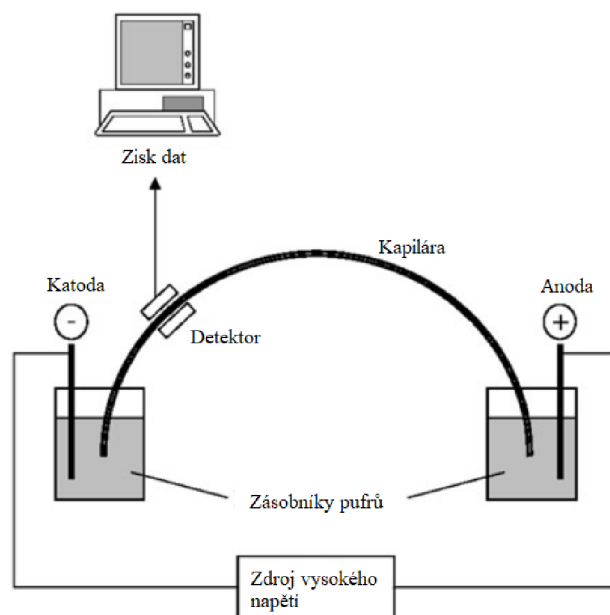
2.5.2 Kapilární zónová elektroforéza

Elektroforéza se řadí mezi elektromigrační metody. Její princip je založen na migraci nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, které se tvoří mezi elektrodami vkládáním konstantního stejnosměrného napětí. Základní charakteristikou je elektroforetická pohyblivost – rychlost pohybu nabité částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Pokud jsou na počátku separace částice v jednom místě, v průběhu separace se dostávají dopředu částice nabité, které mají větší pohyblivost,

a opožďují se částice s menší pohyblivostí, čímž dochází k jejich oddělení (Klouda, 2016).

Kapilární elektroforéza (Obr. 3) probíhá v tenké (vnitřní průměr 50 nebo 75 μm) křemenné kapiláře naplněné základním elektrolytem. Konce kapiláry jsou ponořeny do nádob s elektrolytem. Nádoby jsou vyrobeny z inertního materiálu, nejčastěji polypropylenové mikrozkuřavky, elektrody jsou též sestaveny z inertního materiálu platiny. Mezi elektrodami je aplikováno napětí v rozsahu 10 – 30 kV. V průběhu analýzy je sledována absorpce UV v kapiláře pomocí fotometrického zařízení. Výsledným záznamem analýzy je elektroferogram, který popisuje závislost odezvy detektoru na čase. Poloha píku v elektroferogramu pak určuje kvalitu, plocha píků kvantitu (Klouda, 2016).

Kapilární zónová elektroforéza (CZE, capillary zone electrophoresis) se užívá k separaci anorganických iontů (Cl^- , NO_3^- , SO_4^- , PO_4^{3-} atd.), nabitých a nenabitých molekul, jako např. ionty organických kyselin či peptidy a proteiny, které se vyskytují ve formě zwitteriontů. CZE se provádí za použití homogenních pufrů a homogenního elektrického pole. Průběh separace závisí, kromě již zmíněné pohyblivosti částic, na tom, že separované částice nesmí interagovat s kapilární stěnou. Pro potlačení těchto interakcí se mohou využívat anorganické soli, organická rozpouštědla a aminy. Využívají se též kapiláry potažené vrstvou křemene. Pro zvýšení stability se provádí derivatizace tohoto povlaku alkyly (Pingoud et al., 2002). Stěny křemenných kapilár silanolové skupiny, které v přítomnosti vyššího pH disociují. Tím se vytváří záporný náboj na stěně, ke které jsou přitahovány kovové ionty základního elektrolytu a dojde ke vzniku elektrické dvojvrstvy. Při zavedení napětí tyto kationty, které jsou blíže středu, migrují ke katodě, pohyb kationtů H^+ s asociovanými molekulami vody vyvolá tzv. elektroosmotický tok roztoku k detektoru, který se nachází za katodou. Síla toku je tak vysoká, že unáší ke katodě i anionty. Rychlost elektroneutrálních částic je rovna rychlosti elektroosmotického toku (Klouda, 2016).



Obr. 3: Schéma uspořádání přístroje pro kapilární elektroforézu. Převzato a upraveno z <https://www.princetechnologies.com>.

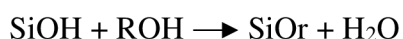
2.5.3 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je jednou z nejdůležitějších separačních technik v biochemii, která byla objevena italsko-ruským vědcem Michailem Cvěttem. Chromatografická separace směsi látek probíhá za rozpuštění dané směsi v kapalině, tzv. mobilní fázi, a následné perkolace přes kolonu obsahující porézní pevnou matici, tzv. stacionární fázi. Rozpuštěné látky protékají kolonou, kde interagují se stacionární fází a zpomalují se. Velikost zpomalení závisí na vlastnostech každé rozpuštěné látky (Voet et al., 2016).

2.5.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

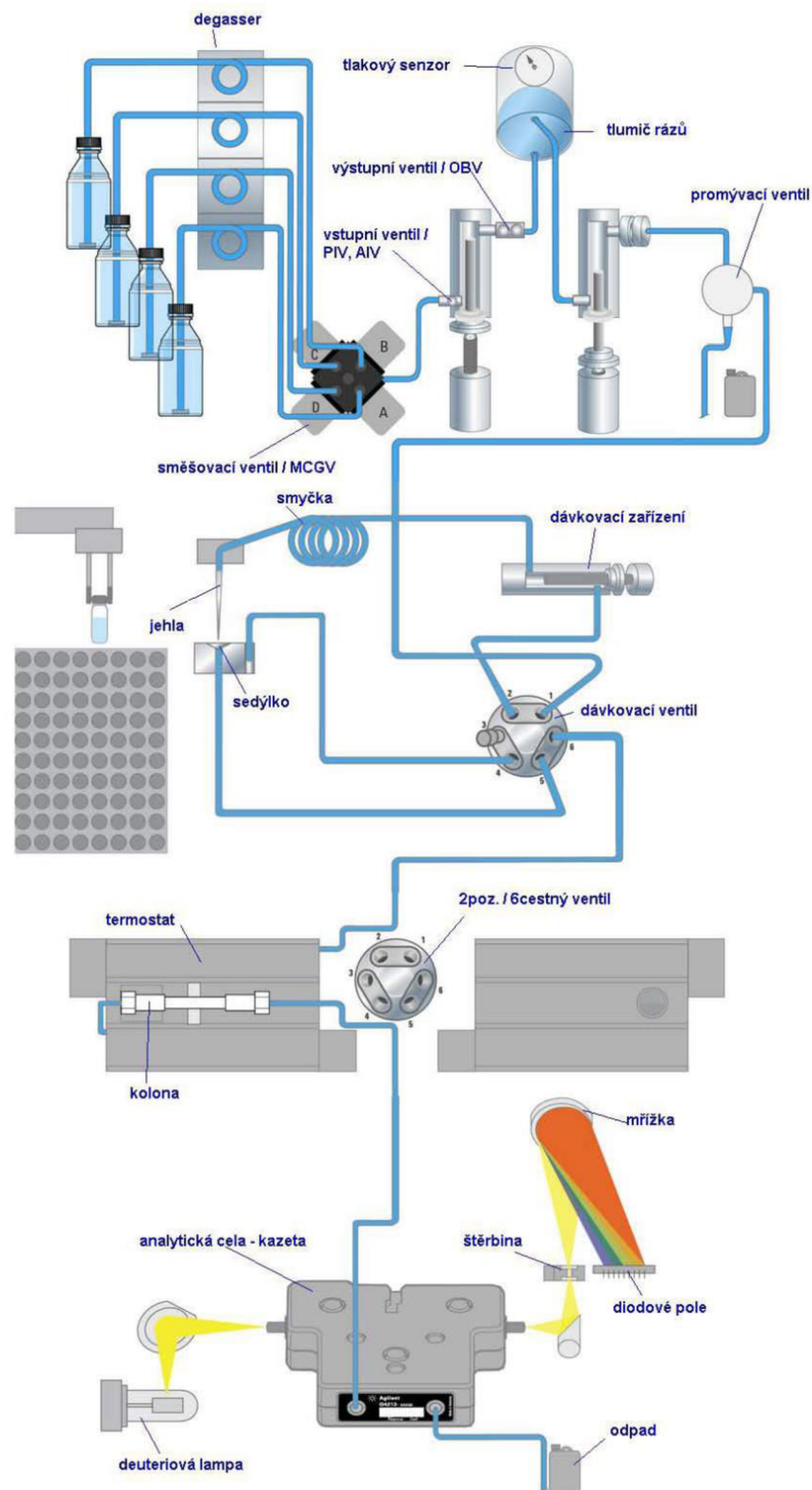
Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC je typem kapalinové chromatografie s klasickým kolonovým provedením (Voet et al., 2016). Zařízení obsahuje čerpadlo, směšovací zařízení, dávkovací zařízení, termostat, kolony a detektor. Kapalina je do kolony čerpána pístovými či membránovými čerpadly, které dosahují průtoku v rozsahu μl až desítek ml za minutu. Materiál čerpadla nesmí do mobilní fáze uvolňovat žádné látky, proto jsou čerpadla zhotovena z odolných materiálů jako např. nerezová ocel, keramika, plast. Směšovací zařízení může ponechat stálé složení mobilní fáze (izokratická eluce), nebo ho během separace měnit (gradientová eluce). Směšovací zařízení lze naprogramovat tak, aby za využití zásobníků různých kapalin připravil směs kapalin o stálém složení, anebo řídil změny ve složení výsledné mobilní fáze v procesu

separace. Vzorek se zachytí v hlavě kolony, eluent postupuje kolonou dále. Výměnou za silnější eluent dojde k eluci analytů (Klouda, 2016). Užívaný náplňový materiál v kolonách musí být vysoce odolný vůči tlaku. Užívají se tuhé, převážně kulovité, částice s porézním povrchem. Tyto částice jsou složeny z SiO₂, případně z Al₂O₃ (tzv. normální fáze). Pro zvýšení účinnosti a změnu separačního mechanismu mohou být derivatizovány alkylovými nebo arylovými skupinami (vznik tzv. reverzní fáze). Tento proces je popsán následujícími rovnicemi:



R = -C₄H₉ (butyl-), -C₈H₁₇ (oktyl-), -C₁₈H₃₇ (oktadecyl-), -C₆H₅ (fenyl-), -(CH₂)₃CN (kyano-), -(CH₂)₃NH₂ (amino-), -(CH₂)₃OCH(OH)·CH₂OH (diol-)

V systému normálních fází je mobilní fáze méně polární než stacionární. Polární molekuly jsou vázány pevněji na stacionární fázi než nepolární, a proto jsou nepolární molekuly eluovány před polárními. Typickými elučními médii jsou hexan, dichlormethan, ethyl-acetát, případně jejich kombinace. V případě reverzních fází funguje separační mechanismus obráceně. Mobilní fáze je polárnější než fáze stacionární. Nepolární látky se vážou pevněji než ty polární, a proto jsou polární sloučeniny eluovány snadněji než nepolární. Užívanými elučními činidly jsou v tomto případě acetonitril, methanol, voda, případně jejich kombinace (Pingoud et al., 2002). Detektory v HPLC musí být selektivní pro analyty a zároveň málo citlivé pro mobilní fázi. Nejběžněji užívanými detektory jsou fotometrický, proměřuje absorbanci eluátu vycházejícího z kolony, refraktometrický, měří změny indexu lomu, a fluorescenční detektor, který je založen na absorpci UV látkami a vysílání záření o vyšší vlnové délce, které je zachyceno fotonásobičem (Klouda, 2016). Schématické uspořádání HPLC je uvedeno na Obr. 4.



Obr. 4: Schéma toku mobilní fáze kapalinovým chromatografem s UV detekcí. Převzato z: <https://hpst.cz/hplc-vysokoucinna-kapalinova-chromatografie-zaklady-principy>.

2.5.3.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

LC-MS je analytická metoda kombinující schopnost kapalinové chromatografie (či HPLC) separovat jednotlivé látky ze směsi a schopnost hmotnostní spektrometrie tyto separované látky analyzovat. V tandemové hmotnostní spektrometrii jsou kombinovány dvě nebo více fází v rámci jednoho experimentu, kdy každá fáze poskytuje analýze další informace, např. strukturní informace, data o selektivitě či izolaci. Zatímco kapalinová chromatografie rozlišuje látky podle jejich retenčního času, hmotnostní spektrometrie izoluje hmotu (Gross, 2004).

Principem hmotnostní spektrometrie (MS) je analýza nabitých částic. Na základě poměru náboje k poměru hmotnosti (m/z). MS tak poskytuje jak kvalitativní, tak kvantitativní data. Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum graficky znázorňující závislost četnosti iontů (intenzity signálu) na hodnotě m/z (Cibiček et al., 2014).

Zařízení provádějící analýzu se nazývá hmotnostní spektrometr. Skládá se ze tří částí – iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor s vyhodnocovacím zařízením. Iontový zdroj tvoří ionty v plynné fázi, a to ionizací účinkem elektrického pole, dopadem vysokoenergetických elektronů, iontů nebo fotonů, případně zvýšenou teplotou. Nejběžnější ionizační technikou ve spojení s LC je ionizace elektrosprejem (ESI, ElectroSpray Ionization), který převádí kapalný vzorek do plynné fáze za tvorby molekulárních iontů (protonizované či deprotonizované ionty). Ionizace probíhá za atmosférického tlaku, ale zbývající prostory hmotnostního spektrometru jsou evakuovány a ionty se pohybují ve vakuu. Ve hmotnostním analyzátoru dochází k samotné separaci iontů na základě jejich poměru m/z . Následně ionty dopadají na detektor a jsou převedeny na signál. Po zpracování signálu vyhodnocovacím zařízením je získáno hmotnostní spektrum (Cibiček et al., 2014; Friedecký & Lemr, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Aceton (Merck, Česko)

Dihydrogen fosforečnan sodný dihydrát p.a. (Lach:ner, Česko)

Dusičnan sodný (Lach:ner, Česko)

Dusitan sodný (Dorapis, Česko)

96% Ethanol (Penta Chemicals, Česko)

Hydroxid sodný p.a. (Penta Chemicals, Česko)

Chlorid sodný p.a. (Lach:ner, Česko)

Chlornan sodný (SAVO dezinfekční prostředek, Česko)

Kyselina citronová (Merck, Česko)

Kyselina jantarová (Merck, Česko)

Kyselina L-jablečná (Merck, Česko)

Kyselina octová p.a. (Lach:ner, Česko)

Kyselina pyrohroznová (Merck, Česko)

Kyselina šřavelová dihydrát (Lachema, Česko)

Methanol LC-MS čistota (Merck, Česko)

Milli-Q voda

Síran sodný (Penta Chemicals, Česko)

Vinan draselný p.a. (Lachema, Česko)

3.1.1.1 Roztoky

250 ml 70% ethanolu

250 ml 1% NaClO

100 ml 80% aceton

Standard NO₃⁻ o koncentraci 10 mg·ml⁻¹

Standard SO₄²⁻ o koncentraci 10 mg·ml⁻¹

Standard NO₂⁻ o koncentraci 10 mg·ml⁻¹

Standard Cl⁻ o koncentraci 10 mg·ml⁻¹

Standard PO₄³⁻ o koncentraci 10 mg·ml⁻¹

Standard C₄H₅O₆⁻ o koncentraci 10 mg·ml⁻¹

Standard (COO⁻)₂ o koncentraci 10 mg·ml⁻¹

Standard C₆H₆O₇²⁻ o koncentraci 10 mg·ml⁻¹

Standard $C_4O_5H_4^{2-}$ o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

Standard $C_4H_4O_4^{2-}$ o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

Standard $C_3O_3H_3^-$ o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

Kit CE Elixir OA (MicroSolv Technology Corporation, USA)

Kyselina mravenčí o koncentraci $15 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (pH 3)

Acetonitril LC-MS čistota (Merck, Česko)

3.1.2 Přístroje a pomůcky

Analogová ultrazvuková lázeň AU-32 (ARGOLAB spol. s.r.o., Česko)

Analytická váha XA 110/2X (RADWAG, Polsko)

Automatické pipety o objemech $20\text{-}200 \mu\text{l}$, $100\text{-}1000 \mu\text{l}$ (Eppendorf, Německo)

Automatické pipety o objemech $0,5\text{-}10 \mu\text{l}$, $1\text{-}5 \mu\text{l}$, $2\text{-}20 \mu\text{l}$ (Labnet International, USA)

Centrifugační zkumavky o objemu 50 ml (VWR, USA)

Digitální suchá lázeň s rozvodem plynu (MRC-Group, Česko)

Filtrační aparatura (filtrační kruh, filtrační papír, stojan, svorky)

Fytotron FS-WI-WIU (Photon Systems Instruments, spol. s.r.o., Česko)

Kolona pro kapalinovou chromatografii Acquity BEH C18 (Waters, USA)

Injekční stříkačka BRAUN Injekt (B. Braun, Česko) s filtrem (CHROMSERVIS, Česko)

Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (LCMS-8050, Shimadzu, Japonsko; Nexera X2 LC-30AD, Shimadzu, Japonsko)

Laboratorní sklo (baňky, Erlenmeyerova baňka, kádinky, nálevky, odměrné válce, Petriho misky, tyčinky, zkumavky; Simax, Česko)

Laboratorní váha (Kern, Německo)

Laminární box (Faster S.r.l., Itálie)

Lyofilizátor (Martin Christ, Německo)

Oscilační kulový mlýn MM 400 (Retsch, Německo)

Pipetovací špičky (Eppendorf, Německo)

Plastové mikrozukmavky objemu $1,5 \text{ ml}$ a 2 ml (Eppendorf, Německo)

Polypropylenové vialky (Macherey-Nagel, Německo)

Rotační vakuová odparka (Heliopolph Instruments, Německo)

Sestava kapilární elektroforézy Agilent CE G1600AX (Agilent Technologies, USA)

Software MorphoAnalyzer (Photon Systems Instruments s.r.o., Česko)

Stolní centrifuga BIOSAN Microspin 12 (Biosan, Lotyšsko)

Systém pro přípravu MilliQ vody (Millipore, USA)

Třepačka BIOSAN VORTEX V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

3.1.3 Biologický materiál

Pro potřeby bakalářské práce byly pěstovány 3 genotypy hrachu setého (*Pisum sativum*). Genotypy byly dříve získané z Australské genové banky AGG. Použit byl nově propagovaný materiál, pro zajištění dostatečného množství semen:

1. Wan Dou 7209 (původem z Číny)
2. Pis 511 (původem z Etiopie)
3. Beseliya (původem z Turecka)

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace semen hrachu setého

Semena hrachu setého byla sterilizována roztokem 70% ethanolu po dobu 3 minut. Následně proběhla 10minutová sterilizace 1% roztokem chlornanu sodného. Po ukončení sterilizace byla semena pětkrát dekantována autoklávovanou vodou. Sterilizovaná semena byla následně naklíčena na Petriho miskách s filtračním papírem. Sterilizace semen i jejich následné klíčení probíhalo ve sterilním prostředí laminárního boxu.

3.2.2 Pěstování a zpracování hrachu setého

Byla zvolena 4 semena od každého genotypu. Byla zvolena semena s největší podobností pro zajištění uniformity. Naklíčená semena byla ve skleníku zasazena do květináčů s výsevním substrátem a perlitem v poměru 1:4 (180 g této směsi v jednom květináči), přemístěna do fytotronu a pěstována za následujících podmínek: den/noc – 12h/12h a 22 °C/18 °C, 70% vlhkost. Každé tři dny byly květináče zalévány vodou do referenční hodnoty. Referenční hodnota odpovídala váze substrátu při maximální retenční vodní kapacitě.

Po dvou týdnech byly sazenice vyjmuty z květináčů. Z každé sazenice byl oddělen prýt od kořene. Kořeny byly následně očištěny, naskenovány kancelářským scannerem oproti černému pozadí a umístěny do 50 ml centrifugačních zkumavek. Substrát každého vzorku byl promyt destilovanou vodou, pro extrakci kořenových výměšků. Takto získané vzorky byly převedeny do 50 ml centrifugačních zkumavek a uchovány při -20 °C před dalším použitím.

3.2.3 Filtrace a lyofilizace získaného biologického materiálu

Vzorky s extrahovanými kořenovými výměškami byly přefiltrovány pro odstranění jemných částic substrátu a perlitu z roztoku. Filtrace byla provedena na jednoduché stolní aparatuře. Přefiltrované vzorky byly umístěny do 50 ml centrifugačních zkumavek.

Zkumavky s filtráty i zkumavky s kořeny byly lyofilizovány. Lyofilizace probíhala 72h a to ve dvou fázích: 1. fáze: 36h, -80 °C, 0,31 mbar; 2. fáze: 36h, -80 °C, 0,01 mbar. Lyofilizované kořeny byly následně homogenizovány pomocí oscilačního kulového mlýnu po dobu 2 minut při frekvenci 27 Hz.

3.2.4 Stanovení obsahu fenolických látek

3.2.4.1 Extrakce fenolických látek

Fenolické látky byly stanoveny ve vzorcích kořenů. Do každé mikrozkušavky se vzorkem o hmotnosti 20 ± 2 mg bylo přidáno 500 μ l 80% roztoku acetonu a směs byla zvortexována, sonikována na ultrazvukové lázni a zcentrifugována po dobu 5 min při 12 000 g. Supernatant byl odebrán. Pelet byl reextrahován dalšími 500 μ l extrakčního činidla. Celkově byly vzorky kořenů extrahovány třikrát. Spojené supernatanty byly odpařeny do sucha za pomoci centrifugační vakuové odparky.

3.2.4.2 Analýza metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí

Odpařené vzorky byly rozpuštěny ve 25 μ l mobilní fáze a převedeny do vialky se zúženým dnem a umístěny do autosampleru kapalinového chromatografu. Analýza vzorků probíhala současně se standardy a to za užití chromatografické kolony Acquity BEH C18 o délce 50 mm s vnitřním průměrem 2,1 mm pro velikost částic 1,7 μ m, která byla opatřena vhodnou předkolonou. Vzorek byl do kolony dávkován o objemu 2 μ l. Průtok kolonou byl nastaven na 0,4 ml·min⁻¹. Analýzy probíhaly při 40 °C. Pro gradientovou eluci, pro kterou byly zvoleny kyselina mravenčí o koncentraci 15 mmol·l⁻¹ (pH 3) a acetonitril, byly zvoleny následující podmínky: 0 min 5% B, 0,7 min 5% B, 2 min 15% B, 4,5 min 30% B, 6 min 30% B, 7,5 min 70% B, 7,6 min 100 B, 8,2 min 5% B, 12 min 5% B.

Ionizace elektrosprejem probíhala při kapilárním napětí 3 kV. Napětí interface 4 kV s teplotou 300 °C, teplota heatblocku 400 °C a DL 250°C. Průtok zahřívacího a sušícího plynu byl 10 l·min⁻¹, průtok zmlžovacího plynu byl nastaven na 3 ml·min⁻¹. Interní standardizace byla provedena pomocí látek značenými stabilními izotopy, identifikace fenolických látek byla provedena porovnáním retenčních časů a MRM přechodů se standardy. Jednotlivé MRM přechody standardů zaznamenává Tab. 1.

Tab. 1: Retenční časy, MRM přechody standardů a kolizní energie (m/z prekurzorového iontu > m/z produkovaného iontu).

Standard	Retenční čas Rt (min)	MRM přechody	Kolizní energie (eV)
Kyselina 4- hydroxybenzoová (4HBA)	1,92	137,00>93,00	15
		137,00> 65,00	31
		137,00> 41,00	53
2-O-β-D- glukosid kyseliny salicylové (SaAG)	2,15	298,70>137,10	12
		298,70> 93,10	38
Kyselina kávová (CA)	2,46	178,80>134,75	15
		178,80>134,25	25
		178,80>107,15	23
Kyselina syringová (SyA)	2,66	197,10>182,25	16
		197,10>123,20	24
		197,10>95,10	31
Kyselina <i>p</i> -kumarová (pCA)	3,08	163,00>149,10	10
		163,00>93,00	31
		163,00>147,10	32
Kyselina ferulová (FA)	3,54	193,10>134,25	25
		193,10>178,25	16
Kyselina sialová (SiA)	3,63	222,70>208,30	18
		222,70>193,20	22
		222,70>164,30	17
Salicylová kyselina (SaA)	3,84	137,10>92,70	19
		137,10>65,00	29
		137,10>75,05	35
Hesperetin (HESP)	4,75	609,00>301,20	25
		609,00>149,15	16
		609,00>164,25	55
Morin (MOR)	4,98	301,00>151,10	19
		301,00> 125,05	21
		301,00>149,15	26
Luteolin (LUT)	5,29	284,60>133,20	34
		284,60>151,25	26
		284,60>175,25	27
Naringenin (NGEN)	5,81	271,10>49,25	25
		271,10>151,25	19
		271,10>107,05	24

Tab. 1: Retenční časy, MRM přechody standardů a kolizní energie (m/z prekurzorového iontu > m/z produkovaného iontu) (pokračování).

Standard	Retenční čas Rt (min)	MRM přechody	Kolizní energie (eV)
Pinocembrin (PIN)	7,63	254,70>213,30	22
		254,70>151,25	23
		254,70>171,30	26
Kyselina <i>p</i> -kumarová - d ₆ (pCA-d ₆ , interní standard)	3,04	169,10>124,85	15
		169,10>97,15	33
		169,10>213,30	25
Salicylová kyselina – d ₄ (SaA-d ₄ , interní standard)	3,79	141,10>96,80	16
		141,10>69,10	31
		141,10>78,10	35

3.2.5 Stanovení iontů organických a anorganických kyselin

3.2.5.1 Extrakce organických kyselin

Organické kyseliny byly stanoveny ve vzorcích kořenů a kořenových výměšků. Homogenát kořenů hmotnosti o 10 mg ± 2 mg byl navážen do mikrozkušavek a extrahován v 1 ml MilliQ vody. Mikrozkušavky se vzorky byly sonikovány na ultrazvukové lázni po dobu 15 min a centrifugovány při 12 000 g po dobu 10 min. Po centrifugaci bylo odebráno 450 µl supernatantu. Supernatant byl přefiltrován stříkačkovým filtrem do polypropylenové vialky. Odparek kořenových výměšků byl rozpuštěn v MilliQ vodě a zfiltrován za vzniku roztoku o koncentraci 10 mg·ml⁻¹.

3.2.5.2 Identifikace iontů ve vzorcích a kalibrace

Před přípravou kalibračních roztoků byly nejprve identifikovány analyty přítomné v reálných vzorcích. Ze vzorků kořenů a kořenových výměšků byl náhodně vybrán vždy jeden vzorek, který byl opakovaně podroben analýze současně s roztokem standardů iontů organických a anorganických kyselin (výpis standardů v kapitole 3.1.1.1.) o koncentraci 0,1 mg·ml⁻¹ (50 µl roztoku standardů o koncentraci 1 mg·ml⁻¹ bylo naředěno 450 µl MilliQ vodou do vialky na objem 500 µl). Systém kapilární elektroforézy umožňuje snadné současné dávkování více vzorků najednou, tímto způsobem byly vzorky obohaceny o definované množství standardu a byla provedena identifikace na základě shody migračních časů a nárůstu plochy píků. Z aniontů organických kyselin byla potvrzena přítomnost citrátu, malátu a vinanu, z anorganických iontů Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ a SO₄²⁻.

Na základě získaných údajů o přítomnosti iontů byla sestrojena kalibrace pro ionty organických kyselin a kalibrace pro ionty anorganických kyselin.

3.2.5.3 Podmínky analýzy metodou kapilární elektroforézy

Pro kalibraci a následné analýzy vzorků byla zvolena křemenná kapilára. Celková délka kapiláry s vnitřním průměrem 75 μm byla 80,5 cm, efektivní délka kapiláry byla 72 cm. Před zahájením analýz byla vždy kapilára propláchnuta roztokem hydroxidu sodného o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (10 min) a následně MilliQ vodou (10 min).

Základní elektrolyt i roztok iniciátoru byly součástí kitu CE Elixir OA pH 5,4. Základní elektrolyt byl po každé proběhnuté analýze vylit do odpadu a byl doplněn za nový. Roztok iniciátoru byl v případě potřeby v průběhu analýz pouze doplňován. Injekce základního elektrolytu a iniciátoru byla provedena hydrodynamicky aplikací tlaku 50 mbar při délce nástřiku 10 s. Tyto parametry nástřiku byly identické pro nástřik vzorků.

Pro detekci všech iontů byla zvolena detekční vlnová délka 250 nm a referenční vlnová délka 214 nm. Analýza probíhala při -30 kV (rampa $-1 \text{ kV} \cdot \text{s}^{-1}$).

3.2.6 Obrazová analýza kořenového systému

Snímky scanovaných kořenů byly podrobeny obrazové analýze. K tomu byl použit software MorphoAnalyzer vyvinutý firmou Photon Systems Instruments s.r.o. (Česko) dodávaný pro uživatele instrumentů stejné firmy, které jsou orientovány na fenotypovací systémy. Software byl optimalizován pro rozlišení pozadí od rostlinných pletiv. Nastavení parametrů je uvedeno v Tab. 2. Parametry „color formula“ a „threshold“ slouží softwaru pro rozlišení každého pixelu na základě jeho třech hodnot (R,G,B) a přiřazení buď k rostlině nebo k vyřazení a zahrnutí jako pozadí. Počet pixelů identifikovaných jako rostlina je pak sečten. Tento snímek je dále podroben barevné segmentaci, tedy zařazení každého pixelu do nejbližší z 6 skupin zvolených barev opět na základě RGB hodnot.

Vzhledem k tomu, že snímky byly vždy pořízeny totožným kancelářským scannerem se stejným nastavením (rozlišení 300 dpi), tak nebyla nutná kalibrace. Všechny snímky jsou vzájemně srovnatelné, jelikož stanovený počet pixelů odpovídá vždy stejným vzdálenostem.

Tab. 2: Nastavení softwaru MorphoAnalyzer pro obrazovou analýzu snímků kořenového systému.

Parametr	Hodnota nastavení
Color Formula	$5 \times G - 0 \times R - 4 \times B$
Threshold	0,4215686
Median Filter Size	3
MinSize	150
MinHoleSize	50
CropObjectsOnBorders	False
UseReflectionReduction	False
SkipBadExposedPoints	False

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

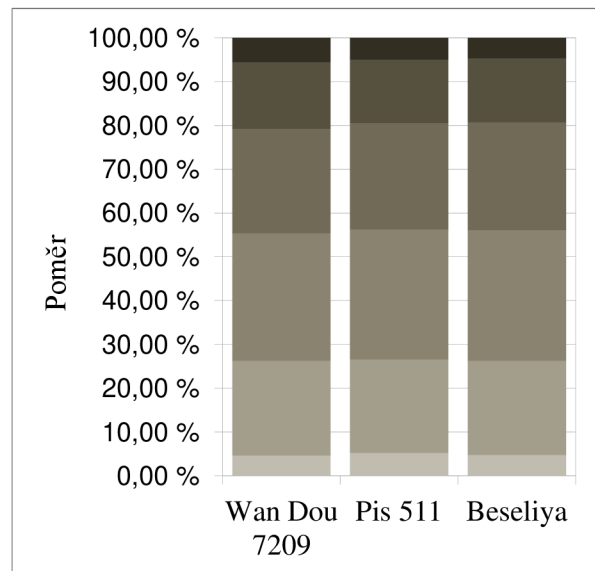
4.1 Obrazová analýza

Prvním sledovaným parametrem jsou hmotnosti kořenů. Byly porovnány hmotnosti kořenů tří genotypů hrachu setého. Kořeny byly zváženy ihned po vyjmutí sazenic z květináčů, odejmutí prýtu od kořene a následném očištění kořenů od substrátu a perlitu. Průměrné hmotnosti kořenů jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Plochy kořenů, průměrné hmotnosti kořenů a průměrné hmotnosti suché hmoty pro jednotlivé genotypy hrachu setého (průměr \pm SD, n = 4).

Genotyp	Plocha kořene [px]	Průměrná hmotnost kořene [g]	Suchá hmota [g]
Wan Dou 7209	1019478	4,94 \pm 0,52	0,32 \pm 0,02
Pis 511	1285528	6,75 \pm 1,24	0,40 \pm 0,06
Beseliya	1191098	6,38 \pm 0,24	0,39 \pm 0,01

Byla vyhodnocena silná pozitivní korelace mezi plochou kořenů a hmotností suché hmoty ($R = 0,897$). Plocha kořene silně korelovala i s hodnotou průměrné hmotnosti kořene ($R = 0,934$). Obr. 5 zaznamenává poměr barev, které charakterizují plochy kořenů jednotlivých genotypů.



Obr. 5: Poměr barev charakterizující plochy kořenů jednotlivých genotypů.

Jednotlivé procentuální hodnoty v grafu udávají poměr barev charakterizující zařazení pixelu do nejbližší z 6 skupin zvolených barev. Pro každou barvu byla vypočtena průměrná procentuální hodnota jejího zastoupení v rámci genotypu a to z jednotlivých procentuálních hodnot každé barvy v jednotlivých vzorcích.

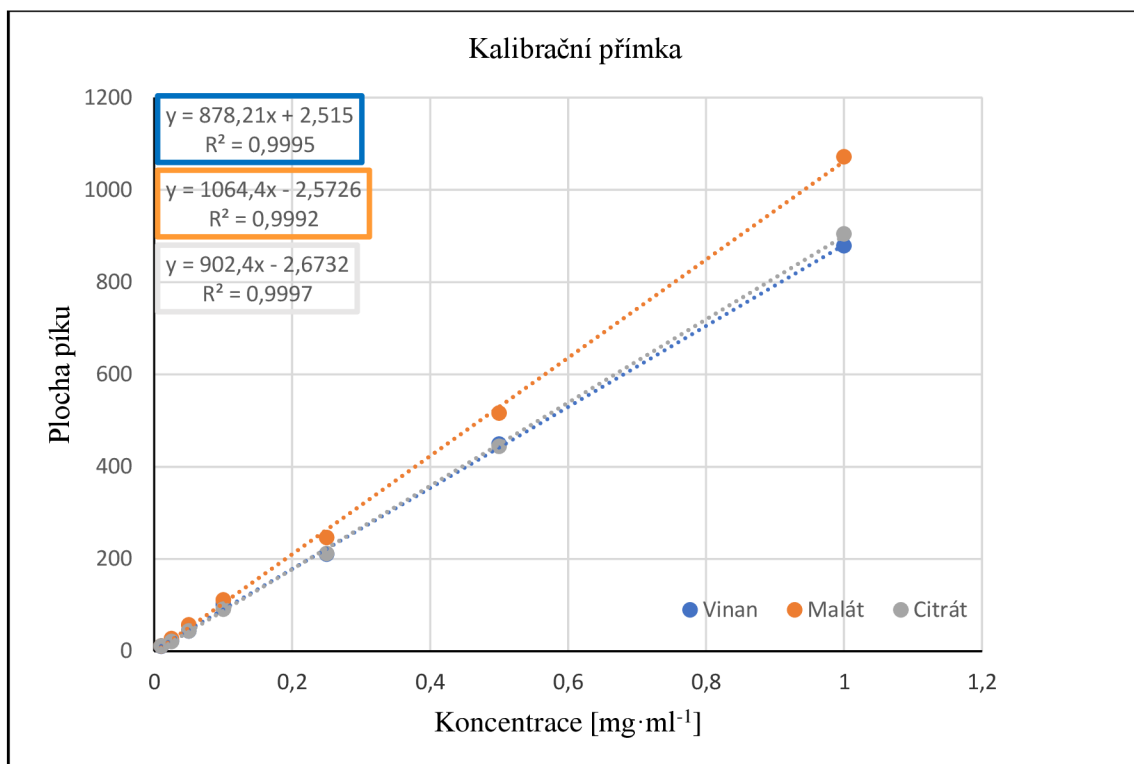
Hlavním cílem byla obrazová analýza nodulace kořenů. Tvorba nodů se nezdařila z důvodu napadení sazenic parazitickými houbami, díky čemuž muselo být pěstování hrachu předčasně ukončeno. Obrazová analýza pak posloužila pro porovnávání ploch kořenů hrachu. Z hodnot vyplývá, že napříč jednotlivými genotypy nejsou zaznamenány výrazné odlišnosti v ploše kořenů. Očekávaným výsledkem je korelace plochy kořenů s jejich hmotností.

4.2 Analýza kapilární elektroforézou

Nejhojněji se vyskytujícími a zároveň i nejčastěji analyzovanými organickými kyselinami půdního extraktu jsou kyseliny L-jablečná, malonová, octová, citronová, fumarová, jantarová, mléčná, vinná, šťavelová aj. (Hillel, 2004). Pro analýzu organických kyselin byly k dispozici ionty citrát, malát, oxalát, pyruvát, sukcinát a vinan, pro analýzu anorganických iontů dusičnanový, dusitanový, síranový, chloridový a fosforečnanový anion.

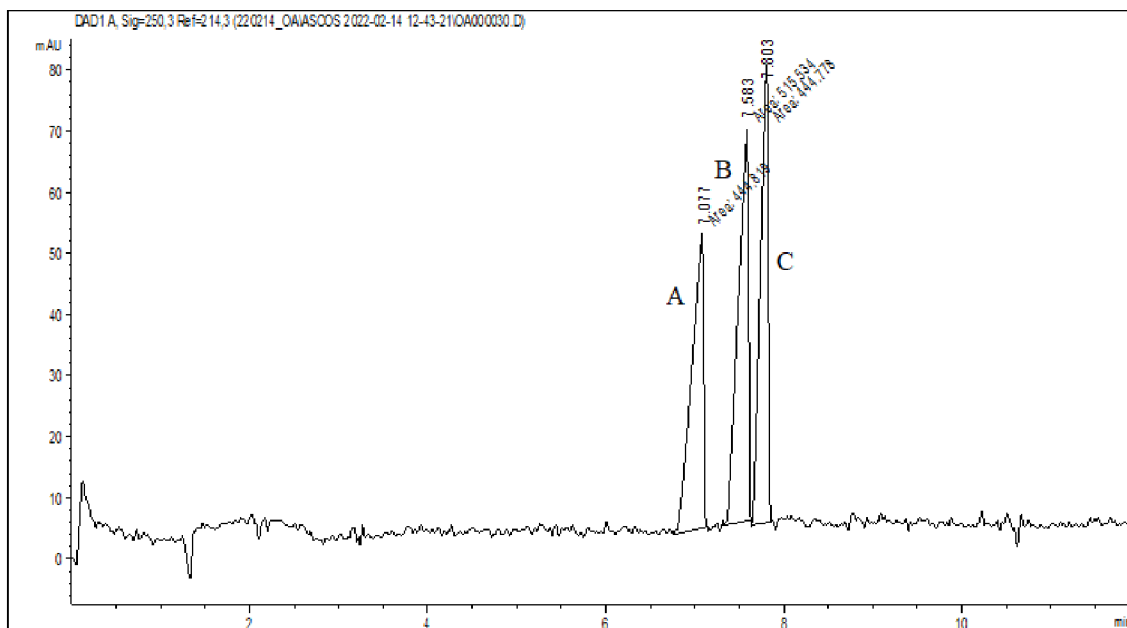
4.2.1 Kalibrace

Před zahájením analýzy samotných vzorků byla provedena kalibrace. Kalibrační přímka pro organické kyseliny byla vytvořena ze sedmi bodů o koncentracích: 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,01 mg·ml⁻¹. Ve vzorcích byla potvrzena přítomnost tří iontů kyselin, a to citrátu, malátu a vinanu, a následně byly sestrojeny kalibrační přímky pro každý ion (Obr. 6).



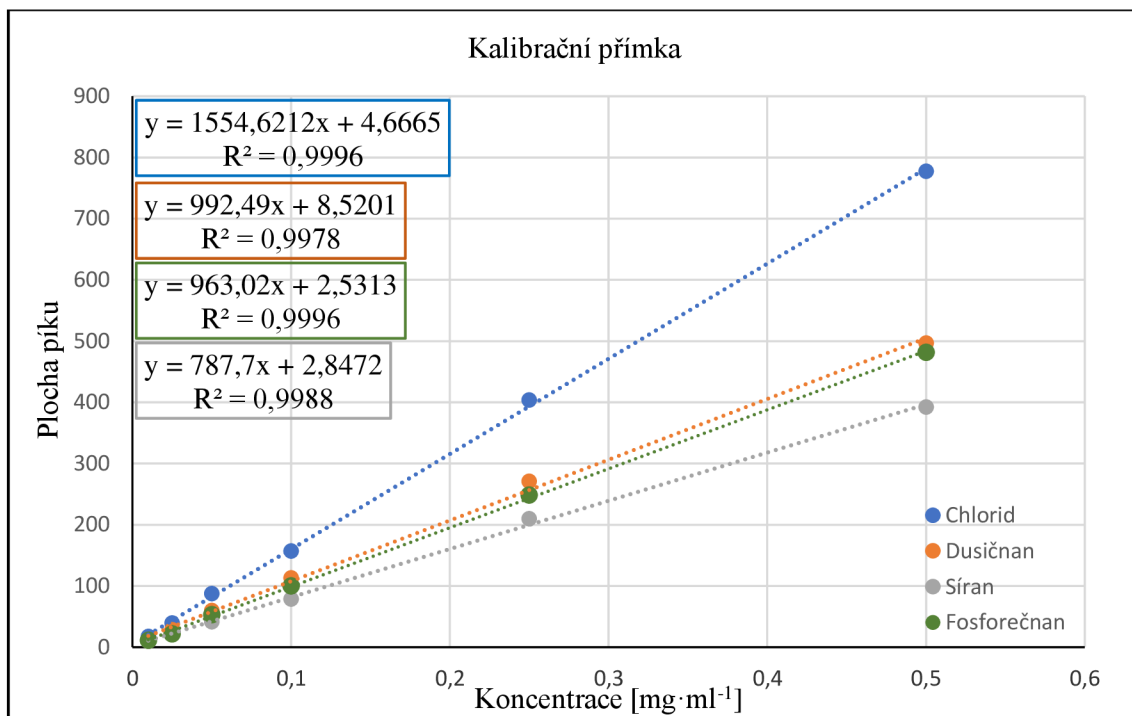
Obr. 6: Kalibrační přímka vinanu, malátu a citrátu.

Na Obr. 7 je vyobrazen záznam z průběhu analýzy roztoku standardů o koncentraci $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ určeného pro kalibraci organických kyselin.



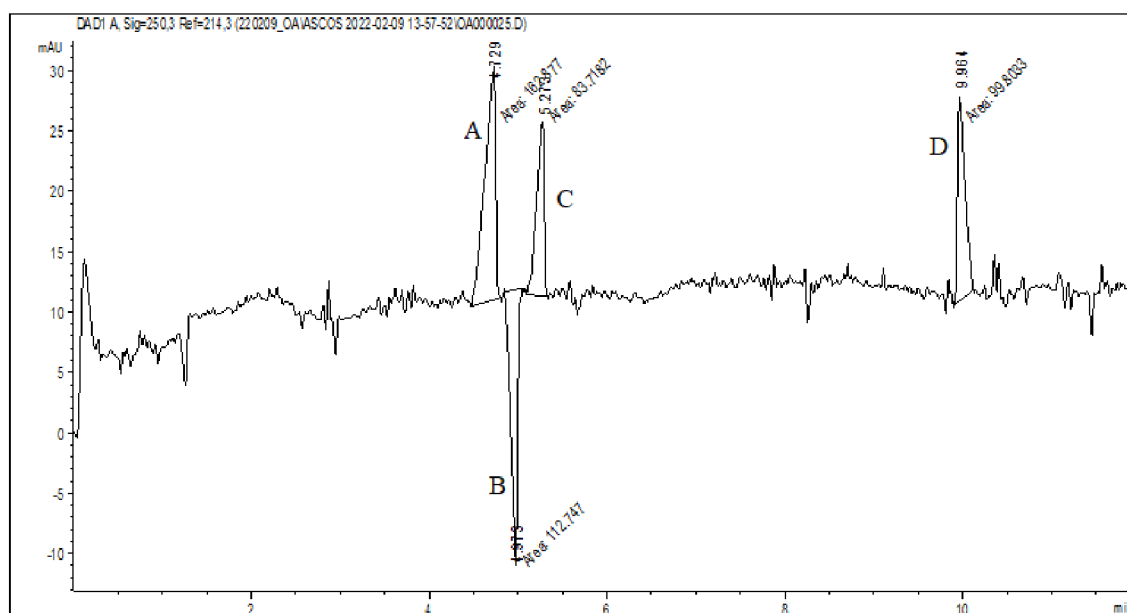
Obr. 7: Elektroferogram separace roztoku standardů aniontů organických kyselin o koncentraci $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$: A = vinan, B = malát, C = citrát.

Kalibrační přímka pro ionty anorganických kyselin (Obr. 8) byla sestrojena z šesti bodů o následujících koncentracích: 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,01 mg·ml⁻¹. Ve vzorcích byla potvrzena přítomnost dusičnanového, síranového, chloridového a fosforečnanového aniontu. Potvrzení přítomnosti dusitanového iontu v kořenech či kořenových výměšcích je velmi málo pravděpodobné.



Obr. 8: Kalibrační přímka chloridu, dusičnanu, síranu a fosforečnanu.

Průběh analýzy roztoku standardů anorganických kyselin shrnuje následující elektroferogram (Obr. 9).



Obr. 9: Elektroferogram separace roztoku standardu aniontů anorganických kyselin o koncentraci $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$: A = chloridový anion, B = dusičnanový anion, C = síranový anion, D = fosforečnanový anion.

4.2.2 Analýza vzorků

Organické kyseliny a ionty anorganických kyselin byly analyzovány ze vzorků kořenů i z kořenových výměšků.

4.2.2.1 Analýza půdního extraktu

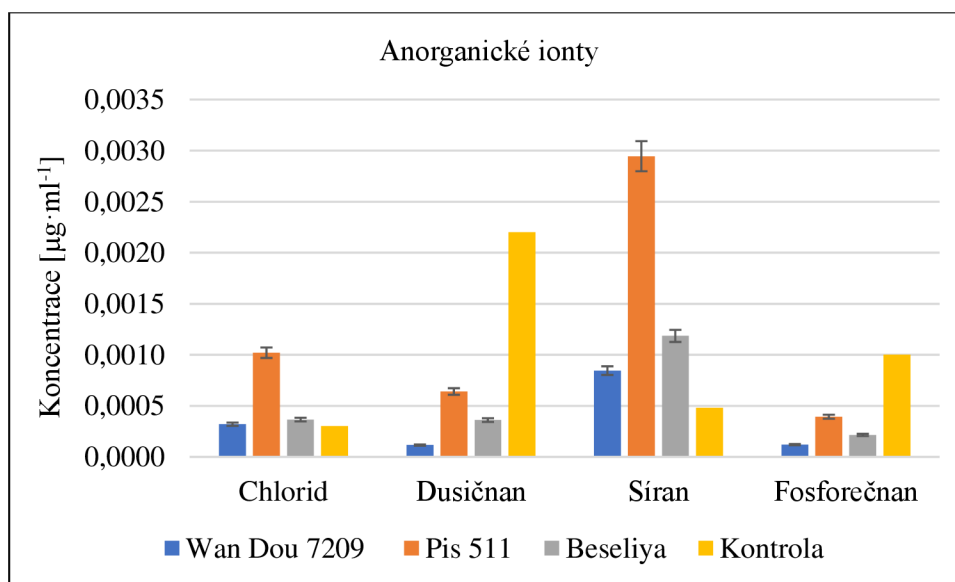
Při analýze vzorků půdního extraktu byly identifikovány ionty anorganických kyselin. Koncentrace daného anorganické iontu byla získána na základě integrace plochy píku zaznamenaného v elektroferogramu daného iontu. Získaná hodnota byla dosazena do příslušné rovnice kalibrační přímky iontu za hodnotu y a byla spočtena koncentrace. Zde je uveden příklad výpočtu koncentrace chloridového aniontu ve vzorku č. 1 genotypu Wan Dou 7209 (plocha píku = 32,5):

$$y = 1554,6216x + 4,6665$$

$$x = \frac{32,5 - 4,6665}{1554,6216}$$

$$x = 0,018 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Obr. 10 vyobrazuje naměřené hodnoty koncentrací anorganických iontů ve vzorcích extraktu substrátu.



Obr. 10: Koncentrace anorganických iontů ve vzorcích extraktu substrátu (chybové úsečky \pm SD, $n = 4$).

Ze získaných hodnot koncentrací dusičnanového aniontu lze usuzovat, že snížení koncentrací tohoto aniontu v půdním substrátu oproti kontrole je zapříčiněno příjmem dusičnanového aniontu rostlinou a jeho následné metabolizování na organický dusík. Po vyčerpání zásob dusičnanu dochází k tvorbě nodů kořenovým systémem, které zajišťují rostlině nový přísun dusíku (Mus et al., 2016). Získané výsledky koncentrací byly podrobeny analýze statistickým nástrojem ANOVA, kdy byly pozorovány statistické rozdíly koncentrací síranových iontů genotypu Pis 511 v porovnání s genotypy Wan Dou 7209 a Beseliya. V případě genotypů Wan Dou 7209 a Beseliya nebyly zaznamenány významné statistické rozdíly koncentrací u žádného iontů.

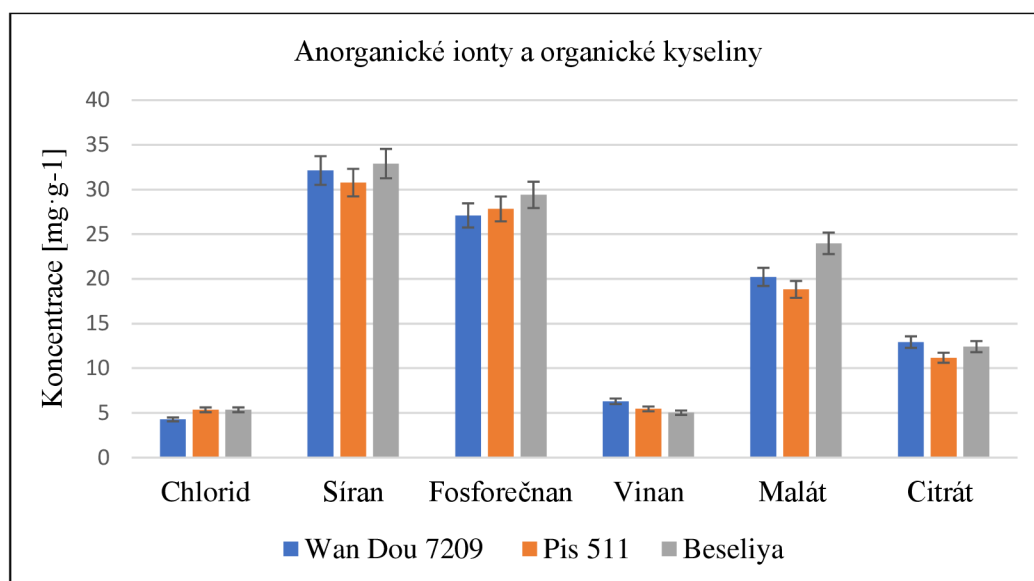
Ve vzorcích extraktů substrátu nebyla detekována přítomnost žádné zkoumané organické kyseliny. Důvodem, proč kyseliny nebyly detekovány, může být nedostatečná citlivost metody kapilární zónové elektroforézy, která však nabízí jednoduché zpracování vzorku pro následnou analýzu, umožňuje analyzovat ionty anorganických kyselin a práce s tímto zařízením je časově málo náročná v porovnání s jinými metodami. Dalším důvodem může být dle práce Tuason & Arocena (2009) volba hydrodynamického nástřiku vzorku do kapiláry před elektrokinetickým. Volba elektrokinetického nástřiku je vhodná pro měření nízkých koncentrací organických kyselin ve vzorcích. Identifikace organických kyselin by bylo možné pravděpodobně docílit změnou postupu zpracování vzorků, provedením purifikace vzorků nebo zvolením citlivější metody. Takovou metodou může být například metoda LC-MS. Ačkoliv LC-MS by byla metodou daleko citlivější pro analýzu organických kyselin, vzorky by musely být před analýzou přečištěny pro odstranění iontů anorganických kyselin z důvodu ochrany kolony a iontového zdroje. Cílem práce bylo měření koncentrací organických kyselin za nativních podmínek, tedy bez přečišťování vzorků, které by vyžadovalo vývoj nového postupu přečištění, které by mohlo případně negativně ovlivnit výsledné koncentrace organických kyselin.

4.2.2.2 Analýza kořenů

Analýzou kořenů byla identifikována přítomnost anorganických i organických iontů. V porovnání se vzorky extraktu substrátu, ani v pletivech kořene nebyl přítomen dusičnanový anion. Dále byla potvrzena přítomnost organických kyselin malátu, citrátu a vianu.

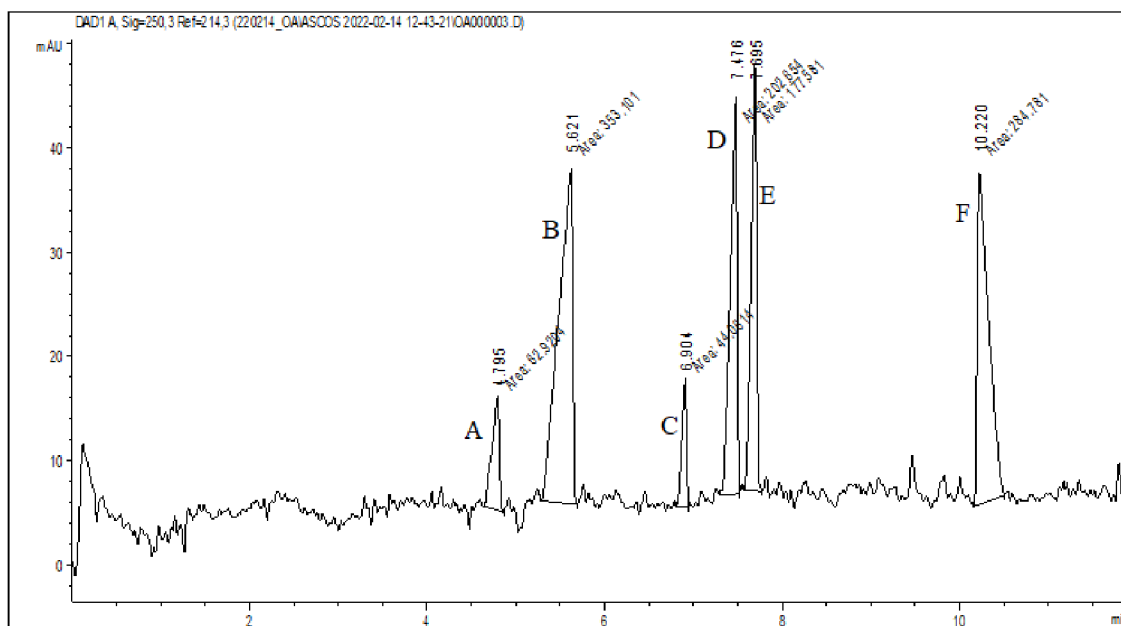
Hodnoty koncentrací anorganických iontů a koncentrací organických kyselin (Obr. 11) byly vypočteny stejným způsobem, jako tomu bylo u koncentrací anorganických iontů

v extraktech substrátu. Koncentrace každého iontu byla přepočtena na 1 g lyofilizovaného vzorku kořene.



Obr. 11: Koncentrace anorganických iontů a organických kyselin ve vzorcích kořenů (chybové úsečky \pm SD, n = 4).

Na Obr. 12 je uveden reprezentativní elektroferogram analýzy kořenového vzorku č. 3 genotypu Wan Dou 7209.



Obr. 12: Elektroferogram analýzy vzorku kořenu č. 3: A= chlorid, B = síran, C = vinan, D = malát, E = citrát, F = fosforečnan.

Ze získaných koncentrací anorganických iontů analýzou kořenů je patrné, že nejhojněji se vyskytujícím anorganickým iontem v kořenech hrachu je síranový a fosforečnanový anion. Získané výsledky koncentrací anorganických iontů byly podrobeny analýze ANOVA, kdy nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly koncentrací iontů napříč jednotlivými genotypy.

V případě naměřených koncentrací organických kyselin v pletivech kořene, rovněž dle nástroje ANOVA, nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly koncentrací mezi jednotlivými genotypy. Nebyly zde očekávány velké rozdíly z důvodu pěstování všech genotypů hrachu setého za stejných podmínek. Významnější výkyvy koncentrací jednotlivých kyselin můžeme pozorovat dle poznatků Carvalhais et al. (2011) například při nutriční deficienci. Byl zaznamenán nárůst koncentrace malátu při nedostatku železa a fosforu v substrátu, naopak snížení jeho koncentrace je detekováno při deficienci draslíku a dusíku v substrátu. Koncentrace citrátu se při nutriční deficienci železa, draslíku, dusíku a fosforu snížila oproti koncentraci kontroly. Dle Wu et al. (2018) naopak vzrůstá koncentrace citrátu a malátu v přítomnosti hlinitých kationtů, se kterými zmíněné organické kyseliny tvoří komplexy, jež snižují toxicitu tohoto kationtu v půdě. Malát a citrát jsou kyseliny, které především slouží k vábení symbiotických mikroorganismů ke kořeni rostliny (Wu et al, 2018).

Možnou příčinou, proč v pletivech kořenů hrachu setého nebyly zaznamenány kyseliny oxalát, pyruvát a sukcinát, je, že koncentrace jmenovaných kyselin byla nižší, než je detekční limit metody.

4.3 Analýza kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí

V analyzovaných pletivech kořenů byly identifikovány následující látky: flavanony hesperidin (HESP), naringenin (NGEN) a pinocembrin (PIN), flavanol morin (MOR), flavon luteoninu (LUT) a fenolové kyseliny jako je 2,3-dihydroxybenzoová kyselina (2,3DHBA), 4-hydroxybenzoová kyselina (4HBA), kávová kyselina (CA), syringová kyselina (SyA), *p*-kumarová kyselina (pCA), salicylová kyselina (SaA), felurová kyselina (FA), sialová kyselina (SiA) a derivát fenolových kyselin 2-O- β -glukosid kyseliny salicylové (SaAG).

V Tab. 4 jsou uvedeny průměrné koncentrace fenolických látek pro jednotlivé genotypy hrachu setého. V genotypu Wan Dou 7209 byla naměřena 10x nižší koncentrace morinu oproti genotypům Pis 511 a Beseliya. Významný výsledek byl detekován u hesperidinu. Tento flavanol byl detekován pouze v pletivech hrachu genotypu Beseliya.

Obdobně tomu bylo u pinocembrinu, který byl detekován pouze u genotypu Pis 511 a to v 1000x nižších koncentracích oproti ostatním fenolickým látkám.

Tab. 4: Výsledné koncentrace fenolických látek v pletivech hrachu setého (půměr ± SD, n = 3).

Genotyp	Koncentrace fenolických látek [nmol · g ⁻¹]						
	2,3 DHBA	4 HBA	SiA	SaA	CA	SyA	pCA
Wan Dou 7209	1,59 ± 0,27	9,99 ± 8,94	0,13 ± 0,08	0,515 ± 0,26	0,22 ± 0,17	0,15 ± 0,02	1,70 ± 0,46
Pis 511	1,64 ± 0,13	14,00 ± 7,53	0,18 ± 0,08	0,339 ± 0,08	0,19 ± 0,08	0,73 ± 0,40	1,42 ± 0,37
Beseliya	2,06 ± 0,18	36,42 ± 5,11	0,22 ± 0,08	0,49 ± 0,13	0,54 ± 0,05	1,15 ± 0,20	1,56 ± 0,43

Tab. 4: Výsledné koncentrace fenolických látek v pletivech hrachu setého (půměr ± SD, n = 3) (pokračování).

Genotyp	Koncentrace fenolických látek						
	FA [nmol · g ⁻¹]	SaAG [nmol · g ⁻¹]	MOR [nmol · g ⁻¹]	HESP [pmol · g ⁻¹]	LUT [pmol · g ⁻¹]	NGEN [nmol · g ⁻¹]	PIN [pmol · g ⁻¹]
Wan Dou 7209	4,13 ± 1,53	3,28 ± 0,33	0,18 ± 0,02	-	89 ± 0,01	0,14 ± 0,02	-
Pis 511	3,67 ± 1,11	1,29 ± 0,29	1,00 ± 0,08	-	61 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,21 ± 0,09
Beseliya	3,09 ± 0,85	10,13 ± 3,20	0,55 ± 0,04	6 ± 0,00	83 ± 0,02	0,08 ± 0,03	-

V porovnání s prací Sreeramulu & Raghunath (2010), která se zabývá stanovením flavonoidů v zelenině a luštěninách, je patrné, že naměřená koncentrace flavonoidů v tomto experimentu je přibližně 250x nižší, než naměřené koncentrace flavonoidů ve zkoumaných luštěninách ve zmíněné práci. Velké rozdíly v koncentracích mohou být ovlivněny typem luštěniny. V práci Sreeramulu & Raghunath (2010) je měřena koncentrace ve fazolu šarlatovém, v tomto experimentu v hrachu setém. Rovněž je potřeba brát v potaz orgánovou specifitu a vývojovou fázi rostliny. Práce Devi et al. (2019) je zaměřena na stanovení koncentrace fenolických látek v luscích 22 rozdílných genotypů hrachu setého. V porovnání s výsledky této práce jsou naměřené koncentrace flavonoidů v tomto experimentu v průměru 3x-60x nižší. Důvodem může být rozdílná délka pěstování hrachu. Ve zmíněné práci je uváděna půlroční doba pěstování. V tomto experimentu byl hrách pěstován po dobu dvou týdnů. Porovnání experimentu s výsledky práce naznačuje i významné rozdíly mezi koncentracemi flavonoidů napříč jednotlivými genotypy.

Obecně nízké koncentrace fenolických látek naměřené v tomto experimentu mohou být připsány dvoutýdenní době pěstování hrachu setého. Zkoumané kořeny hrachu měly tedy velmi mladá a nevyvinutá pletiva, ve kterých ještě nedošlo k plné syntéze fenolických látek (van Dam & Bouwmeester, 2016).

5 ZÁVĚR

Cílem této práce byla analýza profilu organických kyselin a fenolických látek a obrazová analýza kořenového systému hrachu setého třech genotypů. Teoretická část je věnována obecné charakteristice rhizosféry, jejích složek, včetně popisu kořenového systému rostlin. Dále je věnována charakteristice kořenových výměšků, jejichž nedílnou součástí jsou organické kyseliny a fenolické látky. Charakteristika a funkce těchto sloučenin je též v této části popsána.

Jedním z cílů experimentální části byla obrazová analýza kořenového systému hrachu. Cílem obrazové analýzy, prováděné za užití softwaru MorphoAnalyzer, byla analýza nodů na kořenech hrachu setého. Nodulace však nebyla zdařená, proto obrazová analýza posloužila jen pro porovnání ploch kořenů hrachu. Byly zaznamenány silné korelace mezi plochami kořenů a jejich průměrnými hmotnostmi.

Analýza profilu fenolických látek v pletivech kořenů hrachu byla prováděna metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Byly detekovány fenolické látky v nízkých koncentracích, nicméně i přes to byly patrné značné rozdíly mezi jednotlivými genotypy hrachu. U genotypu Wan Dou 7209 byla naměřena 10x nižší koncentrace morinu než tomu bylo u genotypů Pis 511 a Beseliya. Pro genotyp Pis 511 byla identifikována přítomnost flavanonu pinocembrinu, kdežto pro genotyp Beseliya přítomnost hesperidinu.

Analýza profilu organických kyselin metodou kapilární zónové elektroforézy byla prováděna jak v pletivech kořenů, tak i ve vzorcích extraktu substrátu. V kořenových pletivech byly detekovány organické kyseliny vinan, malát a citrát. Detekovány byly rovněž anorganické ionty chlorid, síran a fosforečnan. Rozdílné výsledky byly zaznamenány při analýze extraktu substrátu, kdy nebyla detekována ani jedna ze jmenovaných kyselin. Důvodem může být nízká citlivost použité metody. V porovnání s analýzou kořenových pletiv, v extraktu substrátu byl detekován navíc dusičnanový anion.

Byly naplněny cíle bakalářské práce.

6 LITERATURA

- Agerer, R. (1991). Ectomycorrhizae of *Sarcodon imbricatus* on Norway spruce and their chlamydospores. *Mycorrhiza*, 1(1), 21–30. <https://doi.org/10.1007/BF00205898>
- Barbas, C., García, J. A. L., & Mañero, F. J. G. (1999). Separation and identification of organic acids in root exudates of *Lupinus luteus* by capillary zone electrophoresis. *Phytochemical Analysis*, 10(2), 55–59. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1565\(199903/04\)10:2<55::aid-pca437>3.3.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1565(199903/04)10:2<55::aid-pca437>3.3.co;2-9)
- Baziramakenga, R., Leroux, G. D., & Simard, R. R. (1994). Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3), 349–356. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00178-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00178-4)
- Beleggia R., Canfora L., de Vita P., & Iannucci A., Nigro F. (2021). Relationships between root morphology, root exudate compounds and rhizosphere microbial community in durum wheat. *Applied Soil Ecology*, 158, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103781>
- Bílková, A. (2018). *Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypch jabloní s ohledem na různé podmínky skladování* (1. vydání). Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.
- Bouwmeester H.J., & van Dam N.M. (2016). Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. *Trends in Plant Science*, 21 (3), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>
- Buchanan, B. B., Grissem, W., Jones., R., L. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants* (Second edition). John Wiley & Sons Inc.
- Carvalhois, L. C., Dennis, P. G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M. R., Borriss, R., & Von Wirén, N. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(1), 3–11. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000085>
- Cibiček, N., Vacek, J. a kol. (2014). *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně* (1. vydání). Univerzita Palackého v Olomouci.
- Devi, J., Sanwal, S. K., Koley, T. K., Mishra, G. P., Karmakar, P., Singh, P. M., & Singh, B. (2019). Variations in the total phenolics and antioxidant activities among garden pea (*Pisum sativum* L.) genotypes differing for maturity duration, seed and flower traits and their association with the yield. *Scientia Horticulturae*, 244, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.048>
- Dong, J., Mao, W. H., Zhang, G. P., Wu, F. B., & Cai, Y. (2007): Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity - A review. *Plant, Soil and Environment*, 53(5), 193–200. <https://doi.org/10.17221/2205-pse>
- Fahim, J. R., Attia, E. Z., & Kamel, M. S. (2019). The phenolic profile of pea (*Pisum sativum*): a phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 18, 173–198. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9586-9>
- Fahn A. (1990). *Plant Anatomy* (First edition). Pergamon Press.
- Fajtová K., Tšponová J., & Mamrák P. (2018). *Výukové a studijní materiály pro mikroskopické cvičení z předmětu Botanika*. Veterinární univerzita Bmo.
- Fan, M., Liu, Z., Zhou, L., Lin, T., Liu, Y., & Luo, L. (2011). Effects of Plant Growth Regulators and Saccharide on In Vitro Plant and Tuberos Root Regeneration of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(1), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s00344-010-9163-y>
- Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*, 20(3), 152–157. <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
- Gargallo-Garriga, A., Preece, C., Sardans, J., Oravec, M., Urban, O., & Peñuelas, J. (2018). Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30150-0>
- Gross, J. H. (2004). *Mass Spectrometry* (First edition). Springer International Publishing.

- Han, F., Shan, X., Zhang, S., Wen, B., & Owens, G. (2006). Enhanced cadmium accumulation in maize roots - The impact of organic acids. *Plant and Soil*, 289(1–2), 355–368. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9145-9>
- Hillel, D. (2004). *Encyclopedia of soils in the environment* (First edition). Elsevier Academic Press.
- HPST. <https://hpst.cz/hplc-vysokoucinná-kapalinová-chromatografie-zaklady-principy> (7. 3. 2022)
- Husain N., & Gupta S. (2015). A critical study on chemistry and distribution of phenolic compounds in plants, and their role in human health. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 3(1), 57-60. <https://www.iosrjournals.org/iosr-jestft/papers/SSSSMHB/Volume-3/paper%2045.pdf>.
- Jin, J., Tang, C., & Sale, P. (2015). The impact of elevated carbon dioxide on the phosphorus nutrition of plants: A review. *Annals of Botany*, 116, 987-999. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv088>
- Jones, D. L., Dennis, P. G., Owen, A. G., & Van Hees, P. A. W. (2003). Organic acid behavior in soils - Misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*, 248(1–2), 31–41. <https://doi.org/10.1023/A:1022304332313>
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil*, 321, 5-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Klouda, P. (2016): *Moderní analytické metody* (3. vydání). Nakladatelství Pavko, Ostrava.
- Li, X., Dong, J., Chu, W., Chen, Y., & Duan, Z. (2018). The relationship between root exudation properties and root morphological traits of cucumber grown under different nitrogen supplies and atmospheric CO₂ concentrations. *Plant and Soil*, 425(1–2), 415–432. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3555-8>
- Liang, S., Wang, Y. H., Zhang, H., Yun, X. Y. & Wu, Y. (2020). Response of Root-Exuded Organic Acids in Irrigated Rice to Different Water Management Practices. *Eurasian Soil Science*, 53(11), 1572–1578. <https://doi.org/10.1134/S1064229320110101>
- Liu, E. H., Qi, L. W., Cao, J., Li, P., Li, C. Y., & Peng, Y. B. (2008). Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules*, 13, 2521–2544. <https://doi.org/10.3390/molecules13102521>
- Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell*, 8, 1885–1898. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1885>
- Magwaza, L. S., & Opara, U. L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products-A review. *Scientia Horticulturae*, 184, 179-192. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>
- Malik, A., & Grohmann, E. (2012). Environmental protection strategies for sustainable development. Springer International Publishing.
- Maróti, G., Downie, J. A., & Kondorosi, É. (2015). Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 57-63 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.031>
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Costas, A. G., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M., Oldroyd, G., Poole, P., et al. (2016). Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (13), 3698-3710. <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16>
- Nannipieri, P., Pinton, R., & Varanini, Z. (2007). *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface* (Second edition). CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Nováček, F. (2008). *Fytochemické základy botaniky* (2. vydání). Olomouc: Fontána.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5(2), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J., & Jeltsch, A. (2002). *Biochemical Methods: A concise Guide for Students and Researchers* (First edition). John Wiley & Sons, Inc.
- Poleno, Z. a kol. (1994). *Lesnický naučný slovník I* (1. vydání). Ministerstvo zemědělství České republiky.

- Princetechnologies. <https://www.princetechnologies.com> (22. 3. 2022)
- Rahman, A. (2014). *Studies in Natural Products Chemistry*. Faculty of Agriculture, Dalhousie University.
- Ray, S., Mishra, S., Bisen, K., Singh, S., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2018). Modulation in phenolic root exudate profile of *Abelmoschus esculentus* expressing activation of defense pathway. *Microbiological Research*, 207, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.011>
- Sreeramulu, D., & Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India. *Food Research International*, 43(4), 1017–1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.009>
- Tuason, M. M. S., & Arocena, J. M. (2009). Root organic acid exudates and properties of rhizosphere soils of white spruce (*Picea glauca*) and subalpine fir (*Abies lasiocarpa*). *Canadian Journal of Soil Science*, 89(3), 287–300. <https://doi.org/10.4141/CJSS08021>
- Van der Heijden, E. W. (2001). Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. *Mycorrhiza*, 10(4), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s005720000077>
- Van Hees, P. A. W., Dahlén, J., Lundström, U. S., Borén, H., & Allard, B. (1999). Determination of low molecular weight organic acids in soil solution by HPLC. *Talanta*, 48(1), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00236-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00236-7)
- Varma, A., Tripathi, S., & Prasad, R. (2019). *Plant biotic interactions: State of the art* (First edition). Springer International Publishing.
- Vinter V. (2009). *Rostliny pod mikroskopem: základy anatomie cévnatých rostlin* (2. vydání). Univerzita Palackého v Olomouci.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, Ch. W. (2016): *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level* (Fifth edition). John Wiley & Sons, Inc.
- Vranová, V., Kaňová, H., Rejšek, K., & Formánek, P. (2010). Dominant amino acids, organic acids and sugars in water-soluble root exudates of C₄ plants: a minu-review. *Mendel University of Agriculture and Forestry Brno*, 58(5), 441-446. <https://doi.org/10.11118/actaun201058050441>
- Wasson, A. P., Ramsay, K., Jones, M. G. K., & Mathesius, U. (2009). Differing requirements for flavonoids during the formation of lateral roots, nodules and root knot nematode galls in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 183(1), 167–179. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02850.x>
- Wu, L., Kobayashi, Y., Wasaki, J., & Koyama, H. (2018). Organic acid excretion from roots: a plant mechanism for enhancing phosphorus acquisition, enhancing aluminum tolerance, and recruiting beneficial rhizobacteria. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64(6), 697-704. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1537093>
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374(1–2), 689–700. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1915-6>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2,3DHBA	2,3-dihydroxybenzoová kyselina
4HBA	4-hydroxybenzoová kyselina
CA	kávová kyselina
CE	capillary electrophoresis
CZE	capillary zone electrophoresis
ESI	ElectroSpray Ionization
FA	felurová kyselina
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
HESP	hesperidin
IEC	Ion-exchange chromatography
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-NMR	Liquid Chromatography Nuclear Magnetic Resonance
LUT	luteonin
MOR	morin
NGEN	naringenin
pCA	<i>p</i> -kumarová kyselina
PGPR	Plant Growth – Promoting Rhizobacteria
PIN	pinocembrin
SaA	salicylová kyselina
SaAG	2-O- β -glukosid kyseliny salicylové
SiA	sialová kyselina
SyA	syringová kyselina
UHPLC	Ultra-high performance liquid chromatography