

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA



DISERTAČNÍ PRÁCE

Vliv elicitorů na obsah účinných látek v rostlině
***Echinacea purpurea* (L.) Moench**

ŠKOLITEL:

Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

AUTOR:

Ing. Jan Vydra

2007

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé disertační práce prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc. za vedení a odbornou pomoc v průběhu doktorandského studia.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....
Ing. Jan Vydra

V Roudnici nad Labem dne 9. 12. 2007

OBSAH

Summary

Seznam použitých zkratek

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1. Historie rostliny <i>Echinacea purpurea</i>	3
2.2. Botanická charakteristika.....	5
2.3. Obsahové látky rodu <i>Echinacea</i>	5
2.4. Pěstování rostliny <i>Echinacea purpurea</i>	10
2.4.1. Výběr stanoviště.....	10
2.4.2. Množení, výsadba, výsev.....	11
2.4.3. Hnojení.....	12
2.4.4. Ochrana rostlin.....	13
2.4.5. Sklizeň.....	13
2.4.6. Posklizňová úprava.....	14
2.5. Farmaceutické využití.....	15
2.5.1. Klinické studie.....	17
2.5.2. Vedlejší účinky, možné interakce.....	21
2.6. Elicitace.....	23
2.6.1. Abiotické elicitory.....	26
2.6.2. Biotické elicitory.....	28
2.6.3. Vliv čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor... 32	
2.7. Extrakce.....	34
3. Cíle disertační práce	36
4. Materiál a metodika	37
4.1. Elicitační účinek foliární aplikace kyseliny acetylsalicylové Protivín 37	
4.1.1. Pěstování rostlin a aplikace elicitoru.....	37
4.1.2. Sklizeň rostlin a příprava extraktu.....	40
4.1.3. Analýza vzorků.....	41
4.2. Elicitační účinek foliární aplikace vybraných kyselin Dolní Pěna	44
4.2.1. Pěstování rostlin a aplikace elicitoru.....	44
4.2.2. Sklizeň rostlin a příprava extraktu.....	45

4.2.3. Analýza vzorků.....	46
4.3. Účinek čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor.....	47
4.3.1. Založení pokusu.....	47
4.3.2. Aplikace čínského biologického hnojiva.....	49
4.3.3. Sklizeň rostlin a analýza vzorků.....	50
4.4. Statistické zpracování výsledků.....	51
4.5. Použité chemikálie.....	51
5. Výsledky a diskuze.....	53
5.1. Elicitační účinek foliární aplikace kyseliny acetylsalicylové Protivín. 54	54
5.1.1. Vliv jednotlivých koncentrací elicitoru na obsah sledovaných látek v nadzemní hmotě.....	54
5.1.2. Vliv jednotlivých koncentrací elicitoru na obsah sledovaných látek v kořenu.....	61
5.2. Elicitační účinek foliární aplikace vybraných kyselin Dolní Pěna.....	69
5.2.1. Vliv jednotlivých koncentrací elicatorů na obsah sledovaných látek v kořenu.....	69
5.2.2. Vliv jednotlivých koncentrací elicatorů na obsah sledovaných látek v nadzemní hmotě.....	72
5.2.3. Vliv elicatorů na vybrané biologické parametry.....	75
5.3. Účinek čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor.....	87
5.3.1. Maloparcelkový pokus.....	87
5.3.2. Nádobový pokus.....	91
6. Závěr.....	95
7. Literatura.....	99

SUMMARY

In today's world, there are many factors influencing us, which are often negative to our state of health. People often try to fight those using a variety of methods, one of them being the strengthening of the natural resistance of the body. Pharmaceutical companies manufacture many preparations, investing considerable time and money in research into immunity supporting substances. Medicinal plants are often used as a rich source of these active substances. Current scientific research of properties and effects of medicinal plants is gaining in importance in medicine, food additives, food for special diets or in the pharmaceutical industry.

One of these plants is *Echinacea purpurea* (L.) Moench. In recent years, this medicinal plant has attracted much focus because of its positive effects on human health. Apart from stimulation of human immunity, extracts of *Echinacea purpurea* also have antirheumatic, antibacterial, antiviral and cytostatic properties; and research into anticarcinogenic properties has now taken place.

Plant organisms are constantly exposed to various stress situations referred to as stress factors. This study researches into the effects of elicitors (stress factors) on active substances in the *Echinacea purpurea* plant. The elicitors used were: acetylsalicylic acid, salicylic acid, methylsalicylic acid and titanium ascorbate, all in three different concentrations. Additionally, chinese biological phosphorus potassium fertilizer was used as an elicitor. The active substances of *Echinacea purpurea* which were tested were: caffeic acid and its derivatives, cichoric acid, caftaric acid and chlorogenic acid, which are all substances with the previously mentioned medicinal effects. Also, in some experiments, the effects of chosen biological plant parameters were monitored.

The field trials were established and over three years the effects of elicitors were observed. The effect of chinese biological phosphorus potassium fertilizer was observed during field and vessel trials. Harvested plants were separated into roots and aerial parts and their active substances determined by HPLC.

In the first trial, the effect of acetylsalicylic acid in three concentrations was observed. Different effects of elicitor on the content of active substances in separate parts of the plant was demonstrated. In aerial parts this effect is less significant. Low concentration of an elicitor raises the content of caffeic acid and cichoric acid in the aerial parts. The content of caftaric acid stays almost the same and content of chlorogenic acid is lower in comparison to the check sample (elicitation by water).

Medium and high concentrations decrease the content of active substances, often significantly. Caffeic and cichoric acids react to medium and high concentrations identically. In all cases their content decreased. The content of caftaric acid increases in the second and the third year of growing. The content of chlorogenic acid increases only in high concentrations of elicitor in the first and the second year of growing – but only minimally. In all other cases the content decreased.

When using low and especially the medium concentrations of acetylsalicylic acid, the content of active substances in roots of *Echinacea purpurea* plants always increased, in many cases significantly. In most cases, the high concentrations decreased the active substances. This probably shows the negative influence of high stress caused by high concentration of elicitors, especially on caffeic acid. Medium concentration in the roots in this trial appears optimal. This was shown by the increase of all observed substances, the highest one in chlorogenic acid. The trends of changes of active substances are almost identical during three years. Increase or decrease of active substances are significant in some years.

In the second trial, the effect of application of four chosen elicitors (acetylsalicylic acid, salicylic acid, methylsalicylic acid and titanium ascorbate) on three concentrations – low, medium and high, was observed.

In the roots, the content of cichoric acid increased in all cases (all elicitors, all concentrations), except for medium concentrations of salicylic acid (3% decline). Caftaric acid content was increased in all cases, as well as chlorogenic acid content; in low concentration of titanium ascorbate the increase was ten times higher and significant. A different situation was found with caffeic acid; its content mostly increased the elicitation by the titanium ascorbate. It is possible to say that one third of elicitors increased its content, one third decreased it and one third had no effect.

In aerial parts, the contents of cichoric and caftaric acids increased in all cases, except for high concentration of acetylsalicylic acid, where their contents decreased. On the other hand, the low concentration of salicylic acid increased their contents significantly. In just three cases the of chlorogenic acid increased; in all others decreased.

In the third trial, chinese biological phosphorus potassium fertilizer was used on a small plot and in vessels.

In the small plot trial, the content of caftaric acid was increased in both flowers and roots; the content of chlorogenic acid in flowers was the same, in the top the lower

and in the root it was four times higher. The caffeic acid content was the same in the top and the root; in the flower it was lower. The content of cichoric acid was the same in the flower, lower in the tops and higher in the roots. After fertilization, some biological parameters like dry weight of the tops, flowers and roots; number of leaves, flowers and shoots were decreased. None of the results of the small plot trial were significant.

In the vessels trial, the content of caftaric acid increased in the flowers and roots. Contents of chlorogenic and caffeic acids were increased in the flowers and the tops; and the content of cichoric acid was increased in all three parts. The increase of the weight of fresh flowers was the only significant result of using chinese biological phosphorus potassium fertilizer.

Seznam použitých zkratk

AS – acetylsalicylová kyselina

ASL – nízká koncentrace kyseliny acetylsalicylové

ASM – střední koncentrace kyseliny acetylsalicylové

ASH – vysoká koncentrace kyseliny acetylsalicylové

SL – nízká koncentrace kyseliny salicylové

SM – střední koncentrace kyseliny salicylové

SH – vysoká koncentrace kyseliny salicylové

MSL – nízká koncentrace kyseliny metylsalicylové

MSM – střední koncentrace kyseliny metylsalicylové

MSH – vysoká koncentrace kyseliny metylsalicylové

TiL – nízká koncentrace askorbátu titanu

TiM – střední koncentrace askorbátu titanu

TiH – vysoká koncentrace askorbátu titanu

1. ÚVOD

V dnešním světě na nás působí mnoho faktorů, jenž velmi často negativně ovlivňují náš zdravotní stav. Proti tomuto nežádoucímu působení se lidé snaží bojovat různými prostředky, přičemž jednou z možností je posilování obranyschopnosti organismu. Farmaceutické firmy přináší na trh velké množství přípravků, investují do výzkumů látek podporujících imunitu mnoho času i značné finanční prostředky. Jako cenný zdroj účinných látek často používají léčivé rostliny. S tím je spojena stále se zvyšující obliba užívání rostlinných produktů a homeopatických praktik. Výzkum vlastností a účinků léčivých rostlin tedy znovu nabývá na významu, ať už v oblasti medicíny, potravních doplňků, resp. potravin určených pro zvláštní výživu, nebo ve farmaceutickém průmyslu. Zajímavou ekonomickou možností je i zavádění průmyslově využívaných léčivků do zemědělských kultur a tím zvyšování objemu jejich výroby.

Do této skupiny rostlin patří i *Echinacea purpurea* (L.) Moench. – třapatka nachová, která původem pochází ze severní Ameriky. V posledních letech byla této léčivce věnována velká pozornost, vzhledem k jejím pozitivním účinkům na lidský organismus. Kromě stimulace lidské imunity mají extrakty z *Echinacea purpurea* také antirevmatické, antibakteriální, antivirové a cytostatické účinky, začínají se zkoumat dokonce účinky antikarcinogenní. Ve světě i u nás existuje již celá řada preparátů z těchto rostlin, roční obraty v obchodování s touto rostlinou dosahují mnoha desítek milionů dolarů, s čímž samozřejmě roste i povědomí o této rostlině u lidí. Zde je potřeba říci, že výrobky z Echinacey se ve většině případů neužívají jako „klasické“ léky, nýbrž jako podpůrná léčba a prevence.

Rostlinný organismus je neustále vystavován různým stresovým situacím. Všechny nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které ohrožují rostliny, nazýváme stresovými faktory. Jsou to třeba sucho, zasolení půdy, nízká hladina živin, vysoká teplota, extrémní pH, utužení půdy, napadení rostliny patogenem, znečištěné ovzduší nebo kombinace uvedených vlivů. U zemědělských plodin je to třeba stres po aplikaci pesticidů. Rostlina se těmito stresovými situacím brání svou morfologií (trichomy, trny), nebo také produkcí sekundárních metabolitů, které mohou být cennou surovinou pro farmaceutický průmysl.

V této práci je zkoumán vliv elicitorů (stresorů) na obsah účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea*. Jako elicitory byly použity kyseliny acetylsalicylová,

salicylová, methylsalicylát a askorbát titanu ve třech různých koncentracích. Byl také sledován účinek čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor. Sledovanými účinnými látkami včetně jejich produkce byla kyselina kávová a její deriváty, kyseliny cichorová, kaftarová a chlorogenová, což jsou látky, jimž literatura přisuzuje výše uvedené léčivé účinky. U některých pokusů byl sledován i vliv na vybrané biologické parametry rostlin, jelikož víme, že rostlina je schopna se bránit stresorům pouze do jejich určité intenzity.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

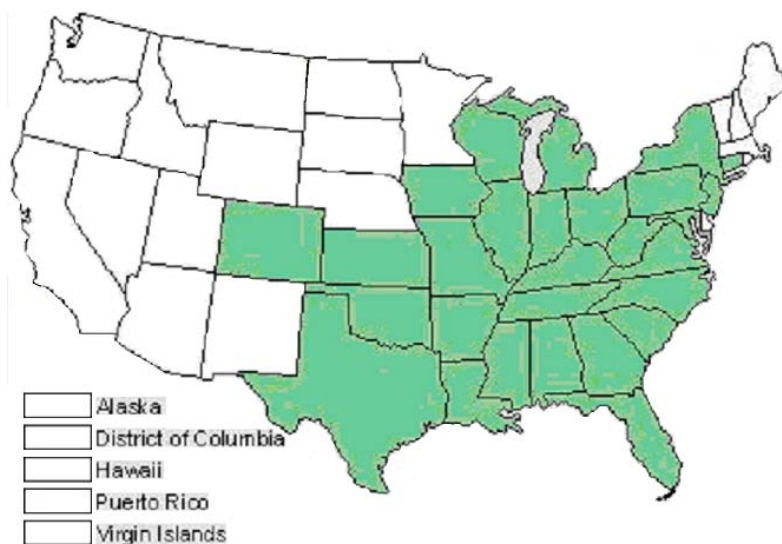
2.1. Historie rostliny *Echinacea purpurea*

Echinacea purpurea má mnoho obecných jmen, která odkazují na její užívání a vzhled. Jsou to například: purple coneflower, hadí kořen, hřebenová rostlina, černý Samson, černá hlava nebo ježek. Podle tvaru souplodí ji v 18. století pojmenoval německý botanik Conrad Moench *Echinaceou*. Toto jméno pochází z řeckého „*echinos*“, česky ježek, čímž chtěl poukázat na její ostnaté kulaté souplodí nažek, podobné ježkovi (KINDSCHER, 1989).

U nás se používají jména Rudbekie nachová a Třapatka nachová. Název „*Rudbeckia*“ získala tato rostlina na počest švédského botanika Olafa Rudbecka. V některé starší literatuře se lze setkat i se jménem *Brauneria*.

Její domov je v severoamerických prériích a lesích, směrem na východ od severovýchodního Texasu, Missouri a Michiganu (obr. č.1).

Obr. č.1: Rozšíření *Echinacea purpurea* v USA



Ještě dříve než ji objevili bílí osadníci, byla používána indiánskými kmeny, které obývaly tzv. „Indiánské Pláně“. Podle KINDSCHERA (1989) byla nejvíce používanou léčivou rostlinou na Pláních. Byla používána při různých onemocněních od bolení zubů po kašel, nachlazení, rýmu, proti hadímu uštknutí a jako anestetikum.

GILMORE (1977) uvedl, že macerovaný kořen byl používán jako protijed proti hadímu kousnutí a žihadlům, byl přikládán na zanícené rány, k odstranění pocitu horkosti. Dakotové přikládali čerstvý nastrohaný kořen na hnisavá poranění (SMITH, 1928). Lakotové ho používali při bolení zubů (MUNSON, 1981) a při nedostatku tekutin proti pocení (ROGERS, 1980). Omahové *Echinaceu* používali na bolavé oči. Kmeny Kiowa a Cheyenne léčili nachlazení a bolesti v krku žvýkáním kořene (GRINELL, 1962). Kořen byl žvýkán účastníky Slunečního tance, protože stimuloval produkci slin a tím snižoval pocit žízně. Povařená směs kořenů *Echinacea purpurea* a hub pýchavek rodu *Lycoperdon*, spolu s přídavkem tuku ze skunka byla natírána na popáleniny (HART, 1981). Kmen Crow žvýkal kořen při nachlazení a pil čaj připravený z kořene při kolice (HART, 1976). Válečníci kmene Hidatsa byli známí žvýkáním malých kousků kořene během celonočních pochodů (NICKEL, 1974).

Zatímco mezi Indiány byla *Echinacea purpurea* jako lék velmi rozšířena, bílí lékaři ji přijímali velmi pomalu. Důvodem byl nepřátelský vztah bílých osadníků k domorodcům, který nepříspěval k výměně informací o této rostlině. *Echinacea purpurea* byla první domorodá préríjní rostlina zpopularizovaná jako lék a nedělo se tomu tak rychle. Jedním z prvních lékařů, který se o *Echinacee* zmínil, byl Dr. F.V. Hayden, který v roce 1859 napsal, že kořen je velmi často používán obchodníky a Indiány jako lék na chřestýší uštknutí. H. C. F. Meyer získal informace o jejích vlastnostech pravděpodobně od Indiánů, nebo prvních osadníků (LLOYD, 1904). Meyer byl lékárníkem, tinkturu z *Echinacey* si v roce 1870 patentoval a prodával ji jako lék nazvaný „Meyerův čistič krve“ (FOSTER, 2000; HOSTETTMANN, 2003). Ten byl široce předepisován především jako přírodní prostředek proti infekcím a zánětům. Její první klinické využití bylo vyzkoušeno u pěti případů záškrtu a patnácti případů tyfu. *Echinacea* získávala mnoho příznivců, i když její význam byl mnohdy přeceňován.

V roce 1916 se třapatka stala nejprodávanějším rostlinným preparátem v USA (HOSTETTMANN, 2003). Popularita třapatky upadala s nástupem éry antibiotik. Do Evropy se její věhlas donesl až počátkem 20. století. Zde se o ni zajímali především homeopatičtí lékaři (KOHOUTOVÁ, 2003).

2.2. Botanická charakteristika

Echinacea purpurea je vytrvalá rostlina z čeledi *Asteraceae*, 80 - 120 cm vysoká, se silnou, vzpřímenou a rozvětvenou lodyhou, která je slabě drsně ochlupená nebo holá (BAUER, WAGNER, 1990). Spodní listy jsou pětinnervové, podlouhle vejčité s dlouhým řapíkem. Horní listy jsou kopinaté. Kořenový systém je tvořen hustým pletencem světle hnědých svazčitých kořenů (ŠÍCHA et al., 1989). Květy mají průměr až 20 cm, terč vystupuje v kupovitém tvaru a má tmavěhnědou až tmavěpurpurovou barvu, která místy přechází do černých odstínů. Koncové, velké květní úbory rozkvétají v červenci a srpnu, na horách se s kvetoucí rostlinou lze setkat ještě v říjnu. Okvětní lístky mají světlou, růzovofialovou barvu, odstíny květů se mohou jemně lišit podle kultivarů. Trubkovité středové květy jsou vyklenuté, s přečnívajícími, tvrdě pichlavými plevkami. Plodem jsou nažky se zakrnělým chmýrem, jsou jednosemenné a přibližně 4 mm dlouhé (DACHLER, 1989). Hmotnost jednoho tisíce semen se pohybuje od 3,6 do 4 gramů (SEIDLER-LOZYKOWSKA, DABROWSKA, 1996). Množí se výsevem nebo vegetativně kořenovými úkrojky.

Do rodu *Echinacea* patří 9 druhů, všechny původně pocházející ze Spojených států amerických a jižní Kanady (KAPTEYN et al., 2002). Z farmaceutického hlediska je nejvýznamnější *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* a *Echinacea pallida*. *Echinacea purpurea* a *Echinacea angustifolia* jsou diploidní rostliny, $n = 11$, *Echinacea pallida* je tetraploidní, $n = 22$. Další dvě jsou uvedeny ve Federálním seznamu ohrožených druhů – *Echinacea tennesseensis* (z Tennessee) a vzácná, řídce se vyskytující, v Apalačských horách rostoucí *Echinacea laevigata*. Dále jsou to *Echinacea paradoxa* a *Echinacea simulata*, obě z Arkansasu a Missouri. Další vzácné jsou *Echinacea atrorubens* z východního Texasu a Oklahomy a *Echinacea sanguinea* z Louisiany (FOSTER, 2000).

Rod *Echinacea* zahrnuje také mnoho variet a kříženců pěstovaných v zahradách jako okrasné rostliny.

2.3. Obsahové látky rostlin rodu *Echinacea*

Poprvé referovali o obsahových látkách HEYL a STALEY (1914). Podle jejich údajů se v kořenech obou druhů vyskytuje zásobní polysacharid inulin a další

polysacharidy – pentosany, redukující monosacharidy, pryskyřice a silice. Dále identifikovali v lipofilní frakci z kořenů obou druhů rostlin kyselin olejovou, linolovou, palmitovou a tři fytoosteroly. Ty byly v roce 1966 identifikovány jako β -sitosterol, β -sitosterol-3- β -D-glukosid a stigmasterol (BOHLMANN, GRENZ, 1966). Dalšími obsahovými látkami kořenů jsou triglyceridy výše uvedených mastných kyselin, levulosa, třísloviny, fenolické kyseliny, betain, minerální látky (HARNISCHFLEGER, STOLZE, 1983).

Pomocí plamenové atomové adsorpční a emisní spektrometrie byl v nadzemní části rostliny i v kořenech stanoven obsah Zn, Fe, Cu, Mn, Ca, Mg, Sr, Ni a Li (RAŽIČ et al., 2004).

Echinacea je velice bohatá na biologicky aktivní látky, které se dají rozdělit do následujících skupin:

1. polysacharidy 1 obsahující arabinosu, xylosu, galaktosu, glukosu a 4-O-methylglukuronovou kyselinu, polysacharidy 2 (arabinorhamnogalaktický) obsahující ramnosu, arabinosu, galaktosu a dále echinacin B, kyselina cichorová, betain, inulin, inuloid, fruktosa, sacharosa, xylosa, neidentifikované glykosidy, kyselina glukuronová, deriváty kyseliny kávové
2. esenciální olej obsahující onkolytickou látku 1,8 pentadekadien, echinacen, nenasycené alifatické seskviterpeny, mastné kyseliny s vyšším počtem dvojných vazeb, polyacetylenové sloučeniny, ketoalkeny
3. proteiny (v sušených kořenech *E. purpurea* 5,3 %)
4. vitamíny C, A, E
5. měď, železo, draslík, síra
6. flavonoidy, silice, pryskyřice, třísloviny

V kořenech *E. purpurea* bylo nalezeno 11 alkylamidů, přičemž převládají alkylamidy typu 2,4-dien. Hlavní alkylamidy (isobutylamid dodeka-2E, 4E, 8Z, 10E/Z-tetraenové kyseliny) jsou koncentrovány především v kořenech a květech, přičemž obsah v kořeni se pohybuje okolo (0,004 - 0,039 %), koncentrace v nati mezi 0,001 – 0,03 % (BAUER et al., 1990). Dále to jsou isobutylamidy-2,4-dieny. Chromatografické porovnání extraktů z kořenů i zelených částí *E. purpurea* ukazuje, že isobutylamidy zde jsou zastoupeny rovnoměrně.

BAUER et al. (1985) a BOHLMAN et al. (1974) izolovali a identifikovali polyinaminy diendiinového typu, N-isobutylamid kyseliny 2Z, 4E-trans-dodekadien-

8,10-diinové a směs dvou izomerů N-isobutylamidu kyseliny 2,4,8,10-dodekatetraenové. Isobutylamid dodeka-(2E,4E, 8Z, 10E)-tetraenové kyseliny je hlavní obsahovou látkou v nati. Tato sloučenina byla izolována již roku 1966 (BAUER et al., 1988).

Echinacein je látka shodná s neoherkulinem rostlin z čeledi *Ruteaceae*. Jde o N-isobutylamid kyseliny 2E,6Z,8,10E-dodekatetraenové, který má insekticidní účinky (ŠÍCHA et al., 1989).

Dalšími látkami jsou polyeny a polyiny, estery vyšších mastných kyselin, jejichž řetězením vznikají farmakologicky vysoce aktivní látky – tridecenpentaïn, tridekadien-epoxid, diindien. Jsou velice citlivé na oxidaci a jejich obsah je velice závislý na uskladnění, jehož vlivem může být jejich obsah ve vzorku silně snížen (KOHOUTOVÁ, 2003).

Z kořenů byly izolovány sloučeniny polyacetylenového typu. V čerstvých i sušených kořenech bylo nalezeno poměrně velké množství těchto sloučenin (0,2 %). Bylo identifikováno 13 sloučenin, z nichž nejvyšší podíl má 1-tridecen-3,5,7,9,11-pentaïn. WAGNER et al., 1991 izoloval 1,11-tridekadien-3,5,7,9-tetraïn, látku se silným baktericidním a fungicidním účinkem. V nati byly nalezeny pouze 4 ze 13, které se vyskytují v kořenech. Jejich koncentrace je velmi nízká. Polyacetylenové sloučeniny jsou poměrně nestálé, při dlouhodobém skladování se rozkládají (ŠÍCHA et al., 1989).

V roce 1975 byl izolován echinolon, hustý bezbarvý olej, který má insekticidní účinky na larvální stadia hmyzu. Jde o 10-hydroxy-4,10-dimethyldodekadien-2-on (ŠÍCHA et al., 1989).

Silice z kořenů *E. purpurea* obsahuje minimálně 31 látek s obsahem 18 % karyofylenu a 8,73 % farnesenu. Jako vedlejší látky se vyskytují další terpeny α -pinen (2 %), β -pinen (2 %), myrceen (1 %), limonen (0,3 %), cymol (0,1%) a stopy thujenu, humulenu a karyofylenoxidu (ŠÍCHA et al., 1989).

Obsah éterických olejů u *E. purpurea* představuje něco málo přes 0,1 % (BAUER et al., 1986).

V roce 1950 izolovali STOLL et al. z kořenů *E. angustifolia* glykosid – echinakosid. Je to bezbarvá krystalická látka rozpustná ve vodě. Cukerná část této látky je tvořena dvěma molekulami D-glukosy a jednou molekulou D-rhamnosy. Necukerná část obsahuje kyselinu kávovou. Echinakosid má slabý baktericidní účinek na *Staphylococcus aureus* a na streptokoky, dále hypotenzivní a analgetický účinek a potenciaci účinků L-DOPY při parkinsonismu. Echinakosid nevykazuje výrazný bod

tání, je opticky aktivní, rozpustný ve vodě a v methanolu. Z výsledku analýz echinakosidu a jeho derivátů, stejně jako různých produktů rozkladu, byl odvozen sumární vzorec $C_{35}H_{46}O_{30}$.

Stojí za povšimnutí, že *E. purpurea* echinakosid neobsahuje, proto se tato látka často používá při standardizaci extraktů z *E. angustifolia* a *E. pallida* (BAUER et al., 1988). U několika prodávaných produktů, které měly obsahovat pouze *E. purpurea*, se tímto prokázala přítomnost *E. angustifolia*, nebo *E. pallida* (BARNES et al., 2005).

Při mikrobiálních testech produktů echinakosidu se ukázalo, že za antibiotickou účinnost je odpovědná kyselina kávová, chlorogenová, cichorová a kaftarová. Tlumení růstu platí pro *Stafylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* nikoliv však pro *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* a *Shigella dysenteriae*. Ve srovnání s ostatními antibiotiky je však působení echinakosidu a kyseliny kávové nepatrné. V plotnovém testu ukazují 8×10^{-3} molární roztoky obou substancí stejný účinek jako 1 oxfordská jednotka penicilinu, tzn. 6,3 mg echinakosidu nebo 1,44 mg kyseliny kávové odpovídají 1 oxfordské jednotce penicilinu. Účinek je na dolní hranici pro substance, které jsou označovány za antibiotika. Lze si však domyslet, že při použití extraktů třapatky na ošetření rány je lokální koncentrace echinakosidu dostatečně velká, aby byl podpořen proces hojení. Kyselina kávová je v říši rostlin velice rozšířená, je třeba myslet na to, že při pozitivních výsledcích výzkumu antibakteriálního účinku čerstvých rostlinných extraktů mohou působit kyselina kávová nebo deriváty kyseliny kávové (STOLL et al., 1950).

Obsah derivátů kyseliny kávové v květech je mnohokrát vyšší než ve zbytku natě (BAUER et al., 1988).

Za pravděpodobně nejdůležitější imunostimulátor je považován derivát kyseliny kávové, kyselina cichorová (2,3-dikafeoyl ester kyseliny vinné) (BECKER, HSIEH, 1985). Ta je obsažena ve všech částech rostliny *E. purpurea* (BAUER et al., 1988), ale nejvíce je koncentrována v květech a kořenech (KOHOUTOVÁ, 2003). BAUER et al. (1990) označili za část rostliny s nejvyšším výskytem kyseliny cichorové kořen, následovaný květem, listy a nejnižší obsah byl zjištěn v lodyze. Tato látka byla poprvé izolována z *Cichorium intybus* – *Asteraceae*. Z druhů rodu *Echinacea* byl izolován i její metylester a mono- a dimetyléter (BECKER, HSIEH, 1985). Kyselina cichorová inhibuje některé integrázy, enzymy důležité pro množení retrovirů (DUKE, 1997).

Mezi deriváty kyseliny kávové patří také kyselina chlorogenová a kyselina kaftarová, 2-dikafeoyl ester kyseliny vinné.

E. purpurea obsahuje echinacein. Jedná se o N-isobutylamid kyseliny 2-trans-6-cis-8,10-trans-dodekanové, zvyšující přirozenou obrannou funkci organismu. Echinacein tvoří komplex s kyselinou hyaluronovou a blokuje enzym hyaluronidasu, která reguluje polymerizaci kyseliny hyaluronové a zároveň ovlivňuje výměnnou cestu tekutiny mezi buňkami a cévními stěnami. Echinacein blokuje hyaluronidasu tělu vlastní i hyaluronidasu vytvořenou bakteriemi a tím zamezuje šíření lokální infekce. Účinek je prokázán aktivním vlivem na množení fibroblastů, které by mohlo vést k znovuvytvoření inhibitoru hyaluronidasu. Bylo prokázáno, že při aplikaci echinaceinu na myši docházelo k výrazné aktivaci fagocytů. Později se ukázalo, že aplikace echinaceinu má stejný efekt jako hormony glukokortikoidy (KOHOUTOVÁ, 2003).

Echinacin B je pseudokrystalická látka s velmi nízkou toxicitou. Jde o směsný polysacharid, jehož účinnou složku tvoří kyselý mukopolysacharid. Má imunostimulační účinky a působí jako inhibitor hyaluronidas (ŠÍCHA et al., 1989).

Ze zelených částí *Echinacea purpurea* byly izolovány dva polysacharidy. Jedná se o 4-O-metylglukuronoarabinoxylan s molekulovou hmotností kolem 35 000 a arabinorhamnogalaktan s molekulovou hmotností kolem 45 000. Z buněčných struktur *E. purpurea* byly získány tři chemicky definované polysacharidy, dva neutrální fukogalaktoxyglukany s molekulární hmotností 10 000 až 25 000 a kyselý arabinogalaktan s molekulární hmotností 75 000.

V kořenech *E. purpurea* byly objeveny estery kyseliny skořicové se seskviterpenickými alkoholy typu guajanu a germakrenu, které stimulují imunitní odpověď organismu (ŠÍCHA et al., 1989). Ve šťávě z čerstvé rostliny byl nalezen tussilagin a isotussilagin. Jejich obsah v rostlinách je 0,006 %.

Další látkou, kterou *E. purpurea* obsahuje je verbascosid (SLOLEY et al., 2001) Ve všech druzích byl také dokázán rutin.

Přestože byly v průběhu let z *Echinacey* izolovány a identifikovány četné sloučeniny, nepodařilo se dosud jednoznačně určit konkrétní substanci, zodpovědnou za připisované léčebné účinky. Proto se odborníci přiklonili k názoru, že léčivý účinek je dílem celého komplexu látek (HOOPS, 1994b), (KOLÁŘ et al., 1998).

K nosným látkám, kterým jsou přičítány léčivé účinky *Echinacea* sp., patří: éterické oleje, deriváty kyseliny kávové, polysacharidy, izobutylamidy, polyeny, polyiny. Četné výzkumy z posledních let ukázaly, že se tyto sloučeniny vyskytují v různých koncentracích dle druhu a části rostlin. Podle dosavadních výzkumů i praktických zkušeností se nejúčinnější drogou jeví kořen, potom květ a nakonec list.

2.4. Pěstování rostliny *Echinacea purpurea*

Echinacea je původní rostlinou Severní Ameriky. Mezi nejdůležitější léčivé rostliny se zařadila až v minulém století a v současné době představuje významnou část rychle rostoucího obrovského průmyslu, který se zabývá přírodními produkty. Její dlouhá historie a popularita urychlila vědecký zájem o tuto rostlinu. Jednalo se hlavně o ověřování připisovaných účinků rostlinných extraktů a aktivních látek v nich obsažených. Tato popularita vedla k zájmu o její komerční pěstování, který vedl nejprve k produkci okrasných rostlin až k její dnešní dominantní produkci pro farmaceutický průmysl.

Z rodu *Echinacea* vzbudila pozornost nejdříve *Echinacea purpurea*, a to jako rostlina okrasná. Počátek pěstování *Echinacea purpurea* pro farmaceutické účely zahájila ve 30. letech minulého století firma Madaus (HAHN, MAYER, 1986) a o několik let později provozoval první polní kultury *E. purpurea* a *E. pallida* ve své firmě Dr. Willmar Schwabe NEUGEBAUER (1949). Kolem roku 1950 ji začal ve Švýcarsku pěstovat a šlechtit A. Vogel (HOSTETTMANN, 2003).

První návrh agrotechniky polních kultur *E. purpurea*, *E. pallida* a *E. angustifolia* podává v roce 1956 HEEGER. Pěstování rostlin považuje za bezproblémové, doporučuje jen hluboké, dobře zpracované půdy, které by neměly být příliš vlhké a s dostatečným osluněním. Všechny druhy rodu *Echinacea* jsou nenáročné na technologii pěstování, nemají přirozené nepřátele a jsou i velmi odolné výkyvům počasí.

2.4.1. Výběr stanoviště

Pro pěstování rostlin *Echinacea*, které zůstávají na pozemku dva až tři roky, je důležité zvolit vhodný pozemek z hlediska půdní struktury s dostatečnou půdní silou. U druhů pěstovaných pro farmaceutické účely a na výrobu potravních doplňků by měl být zvolený pozemek navíc bez nežádoucích zbytkových reziduí v půdě a z hlediska umístění z dosahu nebezpečných emisí a jiných škodlivin. Z hlediska osevního postupu by se při rozsáhlejší pěstování tyto rostliny nechaly zařadit mezi dvě obiloviny, kde by působily jako přerušovač obilného sledu.

Pro pěstování *E. purpurea* se doporučuje lehčí, nekamenitá, hluboká humózní půda, oprostěná od kořínků jiných rostlin. Měla by být rovněž vlhká, ale neměla by zadržovat vodu (BOMME, 1987).

Od roku 1981 provádí výzkum agrotechniky rostlin rodu *Echinacea* Bavorský zemský ústav pro pedologii a pěstování rostlin v exaktních polních pokusech. Pro pěstování *Echinacey* doporučuje lehčí, propustné a hluboké půdy s dostatkem humusu s vysokou vodní kapacitou, ale jen mírně vlhké, bez plevelů a s nízkou šterkovitostí (BOMME, 1987).

Z hlediska půdních podmínek vyhovují rostlinám půdy s pH mezi 6 – 8. Úspěšné bylo i pěstování při pH 5,5 – 6,0 na Novém Zélandě. Důležitá je ale půdní struktura. Doporučují se půdy lehké až středně těžké, drobné, protože hlavním výnosovým prvkem je kořen, který je nutno po vyzvednutí očistit od zeminy. To je pak v případě těžkých zamokřených půd více náročné a dochází i k značným ztrátám na výnosu a to ztrátou jemného kořenového vlášení. Proto jsou optimální půdy nesléhavé, lehčího typu s poměrně dobrou zásobou živin. Rudbéliím se daří na výsluní až v polostínu. Rostliny jsou nenáročné, ale v chudých půdách nedávají kvalitní kořen.

KOLÁŘ et al. (1998) nedoporučují zelené hnojení, neboť přebytek dusíku snižuje množství účinných látek v rostlině.

Požadavky na předplodinu jsou malé. Pouze po víceletém trvání porostu na místě by měly následovat přestávky (DACHLER, PELZMANN, 1989).

2.4.2. Množení, výsadba, výsev

Pro klíčení jsou ideální teploty mezi 20 - 25°C, později 16°C přes den a 12°C přes noc. Abychom zvýšili klíčivost, může být osivo buď jeden měsíc stratifikováno při teplotě 0°C ve vlhkém písku nebo rašelině anebo 24 hodin namočeno ve vodě (DACHLER, PELZMANN, 1989).

Drobná semínka sejeme v únoru až březnu do skleníku. Asi po 6 týdnech se pikýrují do malých nádob a koncem května nebo v červnu je vysázíme na stanoviště ve sponu alespoň 30 x 40 cm. Dále se může množit i vegetativně, a sice dělením na jaře nebo na podzim. Je možné i množení kořenovými řízků časně z jara.

Obecně rychlost vzejití semen ve skleníku je vyšší než ve volném prostranství, proto se doporučuje vysazovat sazenice ze skleníku. Ale u *E. purpurea* byly na rozdíl od ostatních třápatek dosaženy uspokojivé výsledky i s přímým výsevem do volné půdy (SMITH-JOCHUM, ALBRECHT, 1987, 1988).

Velká pozornost je v poslední době věnována především hustotě setí či výsadby při pěstování rostlin rodu *Echinacea*. V Německu je doporučováno 8 - 11 rostlin/m², v USA je obvyklá nižší hustota 5 - 7 rostlin/m². Ukázalo se, že z hlediska výnosu natě je vhodné německé doporučení stejně jako pro výnos kořenů. Podíl sušiny kořenů k celkové sušině produkce se zvyšuje s vyšší hustotou, ale problémem je nižší koncentrace produkovaných alkylamidů (PARMENTER, LITTLEJOHN, 1997).

SHALABY (1997) sledoval vliv vzdálenosti rostlin 20, 40 a 60 cm od sebe v řádcích širokých 50 cm a zjistil, že nejvyšší výnos natě, listů a kořenů je při vzdálenosti rostlin 60 cm. Při přepočtu na g sušiny/m² je ovšem nejvyšší výnos při 20 cm vzdálenosti rostlin.

COX (1998) doporučuje vzdálenost mezi rostlinami jeden a půl až dvě stopy, což je přibližně 45 až 60 centimetrů.

2.4.3. Hnojení

Podle BAUERA a WAGNERA (1990) je optimální složení hnojiva 150 - 180 kg N, 70 - 100 kg P₂O₅ a 220 - 250 kg K₂O na hektar, což odpovídá 31 - 44 kg P a 183 - 207 kg K.

DACHLER a PELZMANN (1989) uvádí hrubé odhady dávek základních prvků při hnojení na dobře zásobených půdách cca 120 kg N na ha v dělené dávce, 70 kg P₂O₅ na ha a 150 kg K₂O na ha.

PAŠEK (1997) zjistil, že nejvyšší produkci účinných látek *E. purpurea* lze dosáhnout hnojením s neharmonickým poměrem živin. Zdá se, že neharmonická výživa stimulovala u rostliny tvorbu obranných látek, zajišťujících pro ni přežití v obtížných podmínkách, které jsou zároveň farmakologicky významné pro člověka. KOLÁŘ et al. (1998) ve své práci dokazuje, že při šestinásobném přebytku dusíku v poměru k draslíku a dalším živinám produkuje rostlina o 60 % účinných látek více, než při harmonickém poměru živin bez ohledu na druh dusíkatého hnojiva, za předpokladu, že dusík není imobilizován uhlíkatými zdroji, v substrátu snadno rozložitelnými. Z tohoto důvodu je

vyloučeno zelené hnojení. Maxima produkce účinných látek bylo dosaženo teprve v posledních vegetačních fázích rostliny, proto autoři doporučují sklízet nejdříve v době květu.

2.4.4. Ochrana rostlin

KUCHARSKI (1997) se ve své studii věnoval pokusům pro určení pesticidů, vhodných pro pěstování *Echinacey*. Bylo testováno 18 herbicidů, z nichž nejlepší účinnost a toleranci prokázaly přípravky Kerb 50 W (účinná látka propyzamid), Azogard 50 WP (účinná látka prometrin) a Fusilade Super (účinná látka fluazifop-P-butyl).

Nejčastějšími původci onemocnění byli *Alternaria alternata* a spála. Byly úspěšně vyzkoušeny fungicidy Dithane M 45, Dithane DG Neotec (účinná látka mancozeb) a Penncozeb 80 WP (3 g/kg osiva), Penncozeb 75 DF (účinná látka dithiokarbamát).

Ze škůdců se významně projevil *Philenus spumarius*, *Phytomyza atricornis*, *Liriomyza strigata* a *Lygus sp.* Úspěšně byly vyzkoušeny přípravky: Ambush 25 EC, Alfazot 05 EC, Basudin 25 E (účinná látka diazinon), Bulldock 025 EC (účinná látka beta-cyfluthrin), Diazinon 250 EC (účinná látka diazinon), Cyperkill 25 EC (účinná látka cypermethrin), Karate (účinná látka lambda-cyhalotrin), Ripcord 20 EC (účinná látka cypermethrin).

2.4.5. Sklizeň

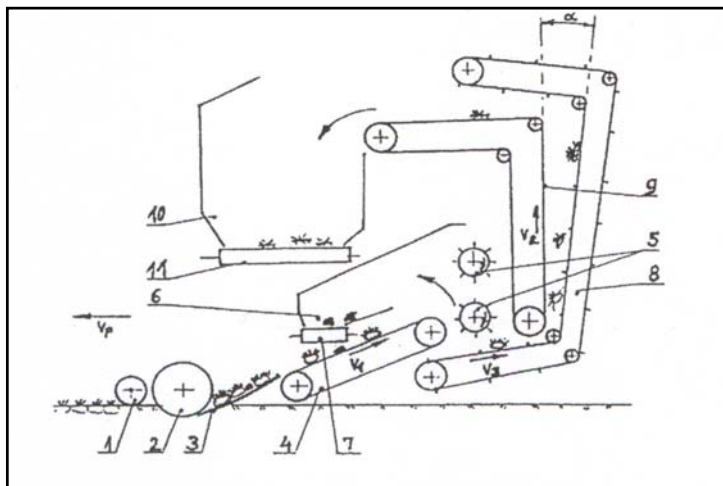
Sklizeň nadzemní části se provádí nejdříve v době květu. V této fázi obsahuje rostlina nejvíce účinných látek (KOLÁŘ et al., 1998).

Kvetoucí nať se sklízí ručně nebo mechanicky (DACHLER, 1989). Ve vegetační sezóně se zpravidla sklízí dvakrát, přičemž první sklizeň je v první červencové dekádě, druhá ne později než koncem září (KUCHARSKI, 1997).

V Srbsku byl proveden pokus, při kterém byl zkoumán obsah makroelementů a stopových prvků (zinek, železo, měď, mangan, vápník, hořčík, síra, nikl a lithium)

v kořenech a v nadzemní hmotě při jarní a podzimní sklizni, přičemž nebyl zjištěn žádný prokazatelný rozdíl (RAŽIČ et al., 2003).

Kořen se sbírá druhým až třetím rokem na podzim (v září a říjnu). Kořeny se nachází asi 10 - 20 cm pod povrchem. Sklizeň kořenové hmoty je nutné provádět za optimálního počasí a půdní vlhkosti s minimálním obsahem zeminy. Kořen *Echinacea*



purpurea by bylo možné sklízet vyorávačem brambor s následným ručním sběrem. Vhodnějším řešením by bylo použití speciálního sklízecího stroje navrženého na Slovenské zemědělské univerzitě v Nitře (PISZCZALKA et al., 1997).

Obr. č. 2: Stroj na sběr kořenů léčivých rostlin *Echinacea purpurea* a *Leuzea rhapontica*: 1-kopírovací kolo, 2-kotoučová krojidla, 3-vyorávací radlice, 4-vrhací a prosévací dopravník, 5-odhazovací bubny kamenů, 6-zásobník kamenů, 7-dopravník kamenů, 8,9-separátor zeminy, 8-prstový dopravník, 9-plnicí dopravník, 10-zásobník kořenů, 11-vyprazdňovací zásobník

2.4.6. Posklizňová úprava

Posklizňová úprava kořene spočívá v jeho důkladném propláchnutí vodou a bezpodmínečně nutné je jeho následné sušení, jinak dojde k zplsnivění.

Aby se kořeny lépe sušily, mohou se podélně rozříznout. Suší se ve stínu nebo v sušárně při teplotě do 40°C.

Není vhodné sušit *echinaceu* při vyšších teplotách, i když nebyl dokázán signifikantní rozdíl v koncentracích alkylamidů při různých teplotách sušení. Jako nejvíce labilní látka se projevila kyselina cichorová (STUART, WILLS, 2003). Jako nejvíce labilní látku při sušení a to kyselinu cichorovou určili u květů také KIM et. al.,

2000 a u kořenů LI a WARDLE, 2002. Ti však používání vyšších teplot při sušení nedoporučují.

2.5. Farmaceutické využití

Echinacea je jedna z nejprodávanějších léčivých rostlin v Evropě a Severní Americe, používá se hlavně při léčbě nachlazení a při infekcích horních cest dýchacích. V současné době existuje více než 800 různých komerčních preparátů (GOEL et al. 2004), s ročním obratem okolo 70 milionů dolarů (ERNST, 2002). Tento obrat se stále zvyšuje, neboť údaje z roku 1997 hovoří o 30 milionech dolarů, což činilo 10 % trhu s léčivkami (BREVOORT, 1998).

Je třeba zdůraznit, že ve většině případů se výrobky z rostliny *Echinacea purpurea* nepoužívají přímo jako léčivo, ale spíše jako doplňková léčba, nebo jako prevence. Dosavadní rozsah indikací přípravků z *E. purpurea* je velmi široký. Sahá od vnějšího použití při ošetřování ran přes léčbu ekzémů, bércových vředů, píštělí, popálenin, lupenky až po užití vnitřní při chřipce, katarech, chronických onemocněních horních i dolních cest dýchacích, při potížích s prostatou, polyartrididě či maligních nádorech. U rakoviny není názor jednotný a některé studie léčbu tohoto onemocnění extraktem z *Echinacey* nedoporučují. Nejvýznamnější je však její vliv na zvyšování imunity organismu. Použití léků z *Echinacey* se nabízí tam, kde je příčina nemoci v defektu imunity nebo jejím dočasném oslabení. Dokáže aktivovat lymfocyty (bílé krvinky), které jsou schopny pohltit původce infekce přímo v organismu člověka. Stejně jako pro jiné preparáty s imunostimulačním účinkem i pro echinaceové platí to, že primárně posilují nespecifický obranný systém a mohou se podávat prakticky bez omezení.

Echinacea si našla svoje místo nejen ve farmaceutickém průmyslu. Přidává se do produktů jako balzám na rty a zubní pasty, dále do produktů, které pečují o vlasy a pokožku, v pleťových maskách, krémech a pleťových vodách speciálně používaných na poškozenou pokožku. Stále více se přidává i do potravin jako jsou cereálie, cukrářské výrobky a čaje (WILLS et al., 2000).

Je podávána v mnoha podobách – sušený kořen a list, vodný extrakt, jako prášek, kapsle, tabletky, krém, gel a kromě Severní Ameriky také jako injekce (ANONYM 1).

Prokazatelně léčivý účinek byl nalezen *in vitro* a *in vivo* u čerstvé šťávy z nadzemních částí rostlin a u alkoholového extraktu z kořene *Echinacea purpurea* (BAUER, 1996).

Seznam Rote Liste uvádí přes 40 přípravků s obsahem extraktu z *E. angustifolia* (asi 2/3 přípravků) a z *E. purpurea* (asi 1/3 přípravků). Indikace obou druhů jsou shodné: vnitřně jako urologikum, prostředek proti chřipce a virózám vůbec, antiflogistikum, v gynekologii proti chronickým zánětům, stimulant imunitní odpovědi organismu a zevně na nehojící se hnisavé rány (ŠÍCHA et al., 1989).

KUHN popsal roku 1953 aktivaci histiogenických fagocytů na myších po implantaci Echinacinu (vylišované šťávy z *Herba recens Echinaceae purpureae*).

Nespecifickou odolnost organismu vyvolává sérový faktor properdin, díky vysoké specifické afinitě k polysacharidům bakterií, virů a fágů. Intravenózní aplikace šťávy z čerstvých rostlin rodu *Echinacea* králíkům zvyšuje po 24 hodinách hladinu properdinu v séru o 50-70 %.

Přípravky z třapatky působí i virostaticky – byla prokázána účinnost extraktu z *E. purpurea* proti virům herpetickým, chřipkovým, dětské obrny a kravských neštovic. Účinek extraktu se projevuje v takových koncentracích, kdy je jeho toxicita nulová. Účinek není virucidní, v buněčné kultuře je dosaženo antivirového účinku teprve tehdy, je-li kultura ošetřena extraktem z *E. purpurea* před virovou infekcí. Viry nemohou proniknout do předem ošetřených zdravých buněk.

Podle WAGNERA a PROKSCHE (1981) jsou hlavními obsahovými látkami, které vyvolávají zlepšení imunitní odpovědi organismu, polysacharidy. Polysacharidy jsou imunologicky aktivní skupinou obsahových látek. Mají inhibiční účinek proti hyaluronidase (enzym produkovaný bakteriemi, který likviduje hyaluronovou kyselinu odpovědnou za ochranu proti bakteriím), stimulují *in vivo* a *in vitro* fagocytózu granulocytů a aktivují makrofágy ke zvýšené cytotoxicitě proti tumorovým buňkám. Polysacharidy z buněčných kultur *E. purpurea* byly testovány na schopnost aktivovat lidské fagocyty *in vitro* a *in vivo*. Tyto substance zvýšily spontánní mobilitu polymorfonukleárních leukocytů a zvýšily schopnost těchto buněk zabít stafylokoky.

Echinacea dokázala schopnost inhibovat růst streptokoků a stabilizovat hyaluronovou kyselinu (BUSING, 1995), (MAGEE, 2005).

In vitro experimenty nasvědčují tomu, že polysacharidy z *Echinacea purpurea* zvyšují produkci makrofágů, interleukinu-1 a interleukinu-B2 (LUETTIG et al., 1989), což potvrdil i RININGER et al.(2000).

Byl sledován protektivní vliv echinakosidu, kyseliny chlorogenové, kyseliny cichorové, cynarinu a kyseliny kávové při degradaci kolagenu volnými radikály. Všechny uvedené sloučeniny inhibovaly degradaci kolagenu v závislosti na dávce. Výsledky ukazují, že tyto komponenty rodu *Echinacea* ochraňují kolagen před poškozením volnými radikály, mají “čistící” efekt na řadu volných radikálů a sekundárních radikálů a mohou být indikací pro místní užití extraktů z *Echinacea species* v prevenci a léčbě poškození kůže UVA/UVB zářením (FACINO et al., 1995), (BUSING, 1995).

U alkamidů z kořene rostliny *Echinacea purpurea* byly dokázány protizánětlivé účinky, stejně jako insekticidní působení (CLIFFORD et al., 2002).

HU a KITTS (2000) prokázali u alkoholových extraktů z kořene *Echinacea purpurea* antioxidační aktivitu proti volným radikálům.

BURGER et al. (1997) svými výsledky demonstrovali imunostimulační účinky nečištěné čerstvě vymačkané šťávy z rostliny *Echinacea purpurea*.

2.5.1. Klinické studie

Mnoho klinických studií zabývajících se problematikou *Echinacey* užívalo čerstvou stabilizovanou šťávu z *E. purpurea* v injekční formě, orální aplikaci nebo externě aplikované masti (HOOBS, 1994). Preparáty z nadzemní části *E. purpurea* jsou obvykle z čerstvě vylisované šťávy z listů (22 % ethanolu v objemu jako konzervační prostředek), označené jako Echinacin[®]. U něj byl prokázán pozitivní vliv při léčbě chronických respiračních onemocnění (HEINEN-KAMMERER et al., 2005).

Echinacea je často užívána v kombinovaném produktu jako Esberitox[®], který obsahuje extrakty z *Baptisia tinctoria (radix)* a *Thuja occidentalis (herba)* (WUSTENBERG et al., 1999).

U extraktů osmi druhů rodu *Echinacea* byla nalezena antivirová aktivita proti Herpes simplex (HSV) viru Typ I *in vitro* při vystavení viditelnému a UV-A záření. N-hexanové extrakty z kořene obsahující alkeny a amidy byly více účinné než ethylacetátové extrakty obsahující kyselinu kávovou (BINNS et al., 2002). Deriváty z *Echinacey* jsou součástí mikrobicidu Viracea používaného při léčbě HSV I a HSV II (THOMPSON, 1998).

Některé studie vyzkoušely užitečnost třapatky v prevenci a léčbě nachlazení. SCHONEBERGER (1992) provedl dvojitě slepou, placebo kontrolovanou studii se 108 dobrovolníky, kteří měli chronické infekce močového systému (více než tři případy za půl roku). Polovina pacientů obdržela dávku 8 ml/den čerstvě vylisované šťávy z *E. purpurea* (Echinacin[®]) po dobu 8 týdnů (skupina A), druhá polovina užívala placebo (skupina B). Ve skupině A se neobjevily žádné infekce, nebo byl časový interval mezi infekcemi zvýšen, průběh infekcí byl kratší a symptomy lehčí.

V německé studii byl použit preparát Echinacin[®] u 80 dospělých mužů a žen s prvními příznaky začínajícího nachlazení. Studie byla provedena u náhodně vybraných pacientů, byla kontrolovaná placebem, dvojitě slepá. Byla sledována délka doby nachlazení. U skupiny užívající Echinacin[®] byl medián délky onemocnění 6 dnů a u placebo skupiny byl 9 dnů (SCHULTEN et al., 2001). Podobnou studii provedli v roce 1999 i GRIMM a MULLER. Sto osm pacientů rozdělili na dvě skupiny, u poloviny z nich použili k léčbě vodný extrakt z rostliny *Echinacea purpurea*, druhá polovina sloužila jako placebo skupina. U skupiny pacientů užívajících extrakt byl medián délky onemocnění čtyři a půl dne, u placebo skupiny šest a půl dne.

V mnoha randomizovaných, dvojitě slepých a placebo kontrolovaných studiích s preparáty s čerstvou šťávou třapatky (preparát Echinagard[®]) bylo testováno 120 pacientů se začínajícími příznaky běžného nachlazení. Preparát byl efektivní u pacientů, u kterých se rozběhly symptomy nemoci naplno, uzdravení bylo rychlejší s preparáty obsahující třapatku než s preparáty placebo (4 dny versus 8 dní) (HOHEISEL, 1997).

Ve dvojitě slepé, placebo kontrolované studii se zkoušela efektivnost ethanolového extraktu vyrobeného z kořene *E. purpurea* k ulehčení symptomů a trvání infekce chřipky na 180 dobrovolnících. Byli rozděleni do 3 skupin po 60, dostávali třapatku v dávce 450 mg, 900 mg a placebo. U pacientů, kteří dostali jen 450 mg třapatky, bylo prokázáno malé zlepšení oproti placebo. U pacientů, kteří dostávali 900 mg, bylo prokázáno statisticky významné zlepšení (BRÄUNIG et al., 1992).

Ve švédské studii, placebo kontrolované, dvojitě slepé dostávalo 55 pacientů po dobu 8 dní tablety (denní dávka 3 x 2) vyrobené z vodně-alkoholového extraktu z čerstvých bylin (95 %) a kořenů (5 %) *E. purpurea*, 64 pacientů obdrželo placebo. Třinácti pacientům ze skupiny, která užívala třapatou, bylo dovoleno užívat přídatné medikace (nosní kapky, paracetamol). Preparáty třapatky byly efektivní v 68 % u těchto pacientů v redukci několika ze 12 symptomů – nosní katar, ucpaný nos, bolesti v krku, bolesti hlavy, závratě, bolesti svalů, horečka, kašel atd. (BRINKEBORN, 1998).

Stejný autor (BRINKEBORN et al., 1999) se zabýval účinkem a bezpečností různých dávek a preparátů z *E. purpurea* při léčbě nachlazení. Celkem 559 dospělých dobrovolníků trpících nachlazením bralo 3x denně 2 tablety buď Echinaforce® (95% herba, 5% radix), *Echinacea purpurea* koncentrát (stejný preparát, pouze 7x silnější), speciální *Echinacea purpurea* preparát z kořene (viz. změna oproti Echinaforce®), nebo placebo a to do té doby než se cítili zdraví, nejdéle však 7 dní. Objektem hodnocení bylo 12 typických symptomů nachlazení. Echinaforce® a jeho koncentrovaný preparát byly prokazatelně účinnější než placebo a preparát z kořene. Všechny přípravky byly dobře snášeny, frekvence nepříznivých účinků preparátů z *Echinacey* nebyla prokazatelně vyšší než u placeba. Koncentrát z *Echinacey*, stejně jako Echinaforce® představují nízkorizikovou a účinnou alternativu k standardním přípravkům užívaných při nachlazení.

Ve studii provedené v USA byla sledována imunologická aktivita třapatky. Extrakty *E. purpurea* a kořen *Panax ginseng* byly testovány pro jejich schopnost stimulovat buněčné imunitní funkce pomocí periferních krevních mononukleárních buněk (PBMC) u normálních osob a u pacientů s chronickým únavovým syndromem nebo syndromem získané imunodeficience. Z výsledků bylo prokázáno, že extrakty zvyšují funkci buněčné imunity (PBMC) u obou skupin vyšetřovaných osob (SEE et al., 1997).

KIM et al. (2002) potvrdili při studii na dobrovolnících, že extrakt z *E. purpurea* prokazatelně zvýšil obsah properdinu o 21 % oproti placebo skupině. Jeho vyšší hladina byla zjištěna ještě čtyři týdny po aplikaci.

HENNEICKE-VON ZEPELIN et al., (1999) pozorovali 236 pacientů s virovým infekčním respiračním onemocněním, polovině byly podávány bylinné léky (*Radix echinaceae*, *Radix baptisiae*, *Herba thujae*), polovině placebo. Jejich studie dokázala, že bylinné přípravky jsou účinné a bezpečné. Převaha skupiny beroucích tyto léky oproti placebo skupině byla průkazná ($p < 0.05$). Léčebný užitek se skládal z velmi prudkého zlepšení symptomů nachlazení. Jestliže pacienti byli schopni začít brát tyto přípravky v ranné fázi nemoci, výsledek byl ještě lepší ($p < 0.014$).

Další studií, kde byl extrakt z echinacey použit i s dalšími účinnými látkami, provedl COHEN et al., 2004. Jednalo se o pokus se 430 dětmi ve věku 1-5 let a *Echinacea* byla použita ve směsi spolu s propolisem a vitamínem C (skupina A). Byl prokázán významný pokles infekcí dýchacího traktu u dětí oproti placebo skupině (skupina B).

Studie provedená na 524 dětech ve věku od dvou do jedenácti let, je zřejmě nejrozsáhlejším pokusem s echinaceou, která byla dosud publikována. Sirup z nadzemních částí rostlin snižoval počet infekcí horních cest dýchacích, ale nesnížil prudkost a sílu infekce. Výsledek tohoto čtyřměsíčního pokusu ukázal, že děti ve skupině, která užívala echinaceu prodělaly prokazatelně méně druhých a třetích infekcí horních cest dýchacích než děti v placebo skupině. *Echinacea* byla označena za bezpečnou, dobře snášenlivou, s minimem vážných nepříznivých účinků. Oproti placebo skupině byl u dětí užívajících echinaceu vyšší výskyt vyrážky (7,1 % : 2,7 %), která byla vysvětlena jako alergická reakce na pyl, což může být odstraněno používáním extraktů z kořene (TAYLOR et al., 2003).

LINDENMUTH a LINDENMUTH (2000) provedli randomizovanou, dvojitě slepou, placebem kontrolovanou studii s bylinným čajovým preparátem Echinacea Plus, užívaným při prvních příznacích nachlazení a horečky. Zjistili prokazatelný rozdíl mezi experimentální skupinou (Echinacea Plus) a kontrolní skupinou (placebo), $p < 0.001$, přičemž u žádné osoby v obou skupinách nebyly zjištěny negativní účinky. Léčba časných symptomů nachlazení byla s čajem Echinacea Plus účinnější a kratší.

VOMEL (1985) průkazně dokázal na krysách, že přípravek Esberitox zvyšuje aktivitu Kupfferových buněk, které fagocytují červené krvinky v játrech.

CURRIER a MILLER (2000) se zabývali vlivem extraktu z *Echinacea purpurea* na NK buňky (natural killer cell) u stárnoucích myší. Jejich výsledky odhalily, že *E. purpurea* má schopnost zvýšit počet NK buněk, jejich produkci v kostní dřeni a jejich množství ve slezině. Tímto zvýšením se současně zvýšila i ochrana organismu proti nádorům. Fakt, že extrakt z echinacey je účinným aktivátorem NK buněk i u člověka, potvrdil i GAN et al. (2003).

GOEL et al. (2002) prokázali, že alkylamidy z *E. purpurea* zvyšují aktivitu makrofágů u krys. To samé bylo zjištěno i u myší (MISHIMA et al., 2004).

Další studie prokázala, že *Echinacea* (byla použita nadzemní hmota) zvýšila počet bílých krvinek, fagocytární aktivitu a hladinu interleukinu IL-2 u krys (CUNDELL et al., 2003).

2.5.2. Vedlejší účinky, možné interakce

McCALEB (1996) uvádí, že *Echinacea* je bezpečná při orální i injekční aplikaci osobám všeho věku, od nemluvňat po dospělé. Opravdu velmi vzácné vedlejší účinky injekční léčby (chvění, bolest hlavy, zvracení), nebyly pozorovány při orálním užívání. Na občasnou nevolnost a závratě pozorované při užívání echinacey upozorňuje i KLIGLER (2003).

MULLINS v roce 1998 popsal případ ženy, která po užití běžného komerčního extraktu z *Echinaceou* prodělala anafylaktický šok. Doporučil proto aby atopici a přecitlivělí lidé byli před rizikem užívání *Echinacey* varováni. Z provedených testů nebylo prokázáno, že tato reakce byla způsobena přímo *Echinaceou*, je možné, že se jednalo o reakci na jinou složku tohoto produktu (MYERS, WOHLMUTH, 1998).

Australští imunologové MULLINS a HEDDLE v roce 2002 uveřejnili sdělení, ve kterém popsali svoje poznatky o alergických reakcích na *Echinaceu*. V nemocnici v Deakinu bylo hospitalizováno 5 pacientů s alergickými reakcemi, které souvisely s užitím *Echinacey* (2x anafylaxe, 1x astmatická ataka, 1x opakovaná exacerbace astmatu po požití extraktu, 1x kožní vyrážka během dvou dnů po užití tablet). Kožní testy na *Echinaceu* byly pozitivní u třech.

Při širším průzkumu podezřelých nežádoucích účinků léků v Austrálii, našli celkem 51 případů, kde příčinou komplikací byla *Echinacea*. Z toho u 26 osob šlo pravděpodobně o přecitlivělost zprostředkovanou IgE protilátkami. Polovina z tohoto počtu byli atopici. Čtyři pacienti museli být hospitalizováni. Při vyšetření náhodně vybraných 100 atopiků, kteří nikdy *Echinaceu* neužívali, byly kožní testy pozitivní u 20 z nich. Když se uvaží, že v Austrálii je podle kvalifikovaného odhadu za rok užito asi 200 milionů dávek *Echinacey*, je výskyt alergických reakcí minimální.

SOON a CRAWFORD (2001) popsali případ muže, kterému se po léčbě *Echinaceou* stále vracela kožní vyrážka (*Erythema nodosum*).

Spojování *Echinacey* s alergickými reakcemi je v současné době tématem mnoha výzkumů. I když tyto reakce jsou velmi vzácné, tak by pacienti, jakými jsou astmatici a alergici, měli být opatrní při jejím užívání (BIELORY, 2004), (HUNTLEY et al., 2005).

GALLO et al. (2000) a GALLO a KOREN (2001) hledali odpověď na otázku zda-li je bezpečné užívat bylinné přípravky během těhotenství. Jejich odpověď na

užívání *Echinacey* byla taková, že sice bylo provedeno málo testů zabývajících se užíváním *Echinacey* během těhotenství, ale v žádném z nich nebyl zjištěn negativní vliv na těhotenství. Poslední „motherisk“ studie ukázala, že užívání *Echinacey* během prvního trimestru těhotenství nemělo žádný negativní vliv zvyšování rizika poškození plodu.

Vzájemné působení *Echinacey* a jiných léků je založeno na teoretických úvahách. Některé alkaloidy nalezené v *Echinacee* jsou podobné chemikáliím, které mohou poškozovat játra. Někteří lékaři proto tvrdí, že by se *Echinacea* neměla používat s jinými léky negativně působícími na játra, jako je Nizoral, Methotrexat, Cordaron nebo anabolické steroidy (GRAEDON, 1999).

Při užívání delším než osm týdnů může *Echinacea* způsobit hepatotoxicky a proto by neměla být užívána s jinými, známými hepatotoxickými látkami jako jsou anabolické steroidy, amiodaron, methotrexat a ketoconazol (MILLER, 1998).

Data ze Spojených států amerických ukazují, že 36 % pacientů s chronickou infekcí hepatitidy C používá jako doplňující bylinné preparáty, včetně *Echinacey* (PEYTON et al., 1999). Třetina z nich bez vědomí svého lékaře (PATRICK, 1999). Jelikož neexistují spolehlivé informace o účincích těchto alternativních léčiv, pacienti by měli být varováni před jejich užíváním (HERRINE, 2002).

IZZO a ERNST (2001) se zabývali interakcemi mezi rostlinnými léčivými přípravky a „klasickými“ léky. Vybrali si sedm nejprodávanějších léčivých rostlin, mezi něž zařadili i *echinaceu*, a vypracovali výtah publikací z posledních let, včetně klinických testů. Výsledkem nebyli žádné popsané interakce mezi léky a přípravky z rostliny *Echinacea purpurea*.

V další práci, ve které byly porovnávány výsledky výzkumů z posledních let, jsou u rostliny *Echinacea* uvedeny choroby, při nichž by neměla být užívána. Je to infekce HIV, nemoci kolagenu, roztroušená skleróza a tuberkulóza. Zároveň ji autor nedoporučuje užívat v těhotenství a během kojení (ERNST, 2002).

Nejsou známy žádné negativní interakce mezi *Echinaceou* a anestetiky (CROWE a LYONS, 2004).

Toxicita rostliny *Echinacea purpurea* byla vyzkoušena na laboratorních zvířatech. Po 4 týdnech řízeně podávaných dávek, které byly stejně vysoké jako dávky podávané u lidí, laboratorní testy ani pitva neprokázaly žádný důkaz jakýchkoli toxických vlivů na krysy. Test na mutagenitu uskutečněný na savcích byl negativní

stejně jako test na karcinogenitu nezpůsobil žádné maligní změny na embryonálních buňkách (MENGS et al., 1991).

Echinacea jako potravní doplněk může být bezpečně užívána spolu s antibiotiky. Podle německé Komise E, by pacienti s onemocněním autoimunity, AIDS, infekcí HIV, nebo tuberkulózou neměli užívat *Echinaceu*, ačkoliv máme málo vědeckých dat k doložení těchto kontraindikací (MAHADY et al., 2001).

Potencionálně riskantní může být užívání *Echinacey* jako alternativní léčby při nádoru mízních uzlin (WERNEKE et al., 2004).

2.6. Elicitace

V odborné literatuře a metodikách je využívání stimulátorů – stresorů, označováno jako tzv. „metoda elicitace“, která se začala používat teprve nedávno a souvisí s rozvojem kultivace rostlin *in vitro*. Jedná se o metodu, která využívá schopnosti rostlin reagovat na různá infekční a stresová agens celou řadou reakcí, na jejichž konci nastává zvýšená tvorba sekundárních metabolitů, které představují důležité suroviny pro farmaceutický průmysl, jak uvedli DiCOSMO a MISAWA (1985), ANGELOVA et al. (2006). Rostlinné buňky jsou schopny se bránit stresovým faktorům vnějšího prostředí. Při stresu dochází k uvolňování látek z buněčných stěn rostlin a následně k vytvoření nízkomolekulárních látek – fytoalexinů, představující obrannou reakci rostliny. Sekundární metabolity se tedy mohou tvořit jako součást reakce obranného mechanismu rostliny na přítomnost patogenu. Fytoalexiny představují jednu z možností iniciace genové aktivity za vzniku určitých enzymů, které katalyzují vytváření antimikrobiálně působících sekundárních metabolitů. Patří sem například flavonoidy, isoflavonoidy, terpeny, steroidy, stilbeny a další.

Elicitace je indukce obranných mechanismů rostlinného organismu, například zvýšené produkce sekundárních metabolitů, aplikací vnějšího stresujícího faktoru chemického, biologického, tepelného, světelného či mechanického charakteru (KUŽEL et al., 2005).

Optimální koncentraci stejného elicitoru u různých kultur *in vitro* v případě jeho pozitivního působení nelze zevšeobecnit a je specifická, mimo jiné, pro tu kterou kulturu a dobu elicitace. Účinnost elicitace také záleží na mnoha faktorech, které často

působí synergicky, jako jsou stáří kultury, koncentrace elicitoru a v jakých časových periodách byl elicitor podáván. Velice důležitou podmínkou je, aby elicitor nesnižoval životaschopnost kultury, proto se obecně užívají nižší koncentrace elicitorů (DiCOSMO, 1982).

Elicitory jsou rozdělovány do dvou skupin, a to na exogenní elicitory a endogenní elicitory (ANGELOVA et al., 2006). Exogenní elicitory vznikají činností patogenu a jedná se o jeho metabolity. Z chemického hlediska do této skupiny řadíme např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy. Endogenní elicitory se uvolňují z narušovaných buněčných stěn obou organismů. Mezi ně patří oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky.

Vedle mechanické obrany před stresovými faktory (trichomy, trny) si vytvořily rostliny i obranu chemickou, jejímž základem je řada sekundárních metabolitů, od chemicky jednoduchých (kyselina šťavelová či kyanidy) až po chemicky složitější látky, jako jsou např. glykosidy, alkaloidy, apod. Uvedené sekundární metabolity mohou působit buď odpudivě nebo až toxicky na býložravce. V rostlině se tyto látky nevytvářejí ve stejném množství. Uvedené alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík, glukosinoláty, se v rostlině vyskytují v malém množství, ale jsou pro živočichy vysoce toxické. Tento obranný mechanismus byl prokázán např. u jetele plazivého (*Trifolium repens*), který při napadení pletiva uvolňuje kyanovodík. Tato schopnost tvorby kyanovodíku závisí na dvou párech alel, je tedy geneticky podmíněna. Rostliny, kterým chybí buď glykosid či enzym, případně obojí, jsou požírány slimáky a hlemýždi.

Chemické obranné reakce mají jednu věc společnou. Tím společným základem pro všechny rostliny je podnět ze strany patogenního mikroorganismu. Tímto podnětem bývá ve většině případů specifický metabolit, označovaný jako elicitor, který se uvolňuje při počáteční interakci buňky a patogenu. Elicitor dále musí být identifikován vhodným receptorem hostitelské rostliny.

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně. Zprostředkovanost je závislá na přítomnosti přenašečů signálu, nazývaných "druhý posel". Přenos od aktivovaných receptorů elicitorů (plazmatická membrána) k DNA v jádře je možný více systémy, které v některých případech fungují jako při přenosu signálu z receptorů fytohormonů. K těmto systémům patří především fosfoinozitudový

system. Ve fosfoinozidovém systému vznikají hydrolýzou lipidů plazmatické membrány dvě signální sloučeniny (inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol), které za účasti iontů vápníku aktivují proteinkinázy a posléze i expresi genů. Zvýšení koncentrace iontů Ca v cytozolu, a tím i aktivace proteinkináz může být dosaženo i jinými cestami.

Velmi častým a neobyčejně rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku vyvolané elicitory. Zvýšené množství peroxidu vodíku je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru. Peroxid vodíku působí kromě již popsané přímé cesty i nepřímo. Nepřímá cesta spočívá v tom, že dojde nejprve k peroxidaci lipidů v membránách za vzniku kyseliny jasmonové a metyljasmonátu a ty pak teprve ovlivňují transkripci. Při napadení rostliny patogeny se též rychle zvyšuje tvorba etylénu, který se podílí na iniciaci genové exprese.

Vlastní obranné reakce zahrnují jak tvorbu specifických stresových proteinů, tak syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem. Tyto sekundární metabolity s ochrannou funkcí jsou u některých druhů rostlin přítomny trvale, i když v menším množství než při infekci. Patří k nim nejrozumnější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy, jako jsou fytoncidy nebo inhibitory.

Obrana rostlin tedy převážně spočívá v aktivaci specifických genů, které spustí tvorbu superoxidu a současně se urychluje tvorba etylénu, který se podílí na zvýšené iniciaci genové exprese. Dále rostliny po průniku patogenu tvoří specifické stresové proteiny. Tyto bílkoviny mají fungicidní účinky, antivirový účinek, jedná se o látky, které umožní nápravu poškozených částí buněk, atd. Dále je to tvorba fytoncidů (flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy). Specifickou skupinou jsou fytoalexiny, které se v buňce normálně nevyskytují. Jedná se o nízkomolekulární obranné látky, jejichž výskyt je podmíněn výskytem patogenu. V současné době je známo více než 300 fytoalexinů, které jsou chemicky nejednotné. U téže rostliny se mohou tvořit dva i více různých fytoalexinů. Většina těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům toxického působení fytoalexinů. Jejich toxicita nastupuje již při koncentraci 10^{-6} až 10^{-5} mol.l⁻¹ hlavně na patogenní houby, méně pak na bakterie.

Akumulace fytoalexinů může být indukovaná rovněž různými stresovými faktory jako je UV-radiace, expozice chladu nebo horka, fungicidy, antibiotika, soli těžkých kovů, vysoká koncentrace solí aj. (DEBERGH, 2003).

2.6.1. Abiotické elicitory

V širším pojetí působí jako abiotický stresor průběh počasí, nadmořská výška, emisní a imisní stav, půdní zásobenost vláhou či živinami, případně i světelné podmínky a mnoho dalších faktorů podílejících se na růstu rostlin. Většinou si však pod tímto pojmem představujeme anorganické látky. Z anorganických elicitorů se pro experimenty velmi často využívá látek chemicky čistých prvků, anebo jejich jednoduchých sloučenin obvykle aplikovaných ve vodném roztoku o velmi nízké koncentraci.

Příkladem anorganické elicítace je stimulace produkce taxolu v suspenzní kultuře *Taxus yunnanensis* dusičnanem lanthanitým, který se v zemské kůře vyskytuje velmi vzácně. Taxol je diterpenoid vyskytující se v kůře tisu a je to význačná látka při léčbě rakoviny vaječníku a prsu (WOO et al., 1994). Vzhledem k tomu, že syntetická výroba taxolu je příliš nákladná, je jeho produkce zajišťována pomocí buněčných kultur tisu. Za tímto účelem prokázali WOO et al. (1994) v prvním pokusu, že velikost sekrece taxolu buňkou úměrně stoupá se zvyšující se koncentrací lanthanu přidaného do média. Taxolu uvolněného do média bylo o 28 % více při koncentraci lanthanu 2,3 mM a o 40 % při koncentraci 5,8 mM, než v kontrolní kultuře. Zvýšená koncentrace extracelulárního taxolu, v rozmezí koncentrace dusičnanu lanthanitého 23,1 mM - 46,2 mM, zřejmě souvisí s lýzou buněčných stěn způsobenou iontem lanthanu nebo zvýšením propustnosti plasmatické membrány, kde kovové ionty mají důležitou úlohu. Tento jev byl pozorován u buněk živočichů, rostlin, řas i kvasinek a shodné výsledky zjistili také POOVIAH, LEOPOLD (1976) a VANGRONVELD, CLIJSTERS (1994).

V druhém experimentu WOO et al. (1994) přidávali dusičnan lanthanitý ve fixní koncentraci 5,8 mM do média během různých růstových fází buněčné kultury - ve střední exponenční fázi růstu (12 dní stará kultura), pozdně exponenční fáze (16 dní stará kultura) a v časné stacionární fázi (20 dní stará kultura). U 28 dní staré kultury byla vyhodnocena hustota buněk a obsah taxolu. Přidání lanthanu 12. a 16. den (střední a pozdní exponenční fáze růstu) zvýšilo intracelulární produkci taxolu

celkový objemový výtěžek taxolu. Časnější přidání lanthanité soli průkazně omezilo růst kultury, ale zvýšilo uvolnění taxolu do média, způsobeného lýzou buněčných stěn. Nejvyšší celkový výtěžek taxolu byl zjištěn u 28 dní staré kultury, 3,8x vyšší oproti kontrole, intracelulární produkce se zvýšila 4,1x oproti kontrole. Kultura ošetřená 5,8 mM dusičnanem lanthanitým během střední exponencionální fáze růstu vykazuje rapidní vzrůst hladiny lanthanu.

Biologická funkce lanthanu jako elicitoru spočívá v blokaci vápníkového kanálu v buněčné membráně. Lanthanitý ion inhibuje vtok vápenatých iontů do buňky a odpovídky rostliny na jiné elicitory (GELLI, BLUMWALD, 1997). Jestliže ion lanthanu ovlivňuje hladinu vápenatých iontů v buňce, ovlivňuje tak signální transdukční dráhu v rostlině, v níž vápenaté ionty hrají ústřední roli - takto je zřejmě inhibována odpověď rostlinou na jiné elicitory na čemž se shodli NISHI (1994), EBEL, MITHOFER (1998), NURNBERGER (1999).

Podobně i v následujícím pokusu byl sledován vliv anorganického elicitoru, tentokrát chloridu chromitého na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis L.* po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinové aplikaci. Testovaný elicitor ovlivňoval pozitivně tvorbu flavonoidů. Statisticky významný nárůst produkce flavonoidů u kalusové kultury byl zaznamenán při použití roztoku chloridu chromitého v koncentraci c1 po 24, 48, 72 a 168 hodinách, u koncentrace c2 po 24, 48 a 72 hodinách a u koncentrace c3 po 12, 24 a 48 hodinách. U suspenzní kultury statisticky významně zvyšovaly produkci flavonoidů koncentrace c1 po 12 a 72 hodinách, koncentrace c2 po 12, 24, 48 a 72 hodinách a koncentrace c3 po 12, 24, 48 a 72 hodinách. Maximální zvýšení tvorby flavonoidů o 98 % nastalo v kalusové kultuře po elicitaci roztokem chloridu chromitého v koncentraci c3 po 48 hodinách aplikace a v suspenzní kultuře po elicitaci CrCl_3 o koncentraci c2 po 12 hodinách o 100 % (TŮMOVÁ, BLAŽKOVÁ, 2002).

Zprávy o tom, že stres způsobený prostředím může zvýšit hromadění sekundární substance v rostlinách vedly k nápadu zapůsobit na tkáňové kultury *Coffea arabica* s cílem zlepšit výrobu farmaceuticky aktivních sloučenin *in vitro*. Test provedli FRISCHKNECHT, BAUMANN (1985) s nízkou a vysokoprodukční buněčnou kulturou *Coffea arabica*. Ukázalo se, že produkce alkaloidu purinu v kultuře byla stimulována vysokou intenzitou světla v závislosti na typu kultury.

Sledován byl i vliv dvou abiotických elicitorů, a to dvou nově syntetizovaných sloučenin (substituovaných anilidů pyrazin-2-karboxylových kyselin) na tvorbu

flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L.. Testované sloučeniny ovlivňovaly výrazně produkci flavonoidů v kultuře *in vitro*. Zejména po elicitaci roztokem látky č.1 (4-hydroxyanilid 6-chlor-5-terc.butylpyrazin-2-karboxylová kyselina) v koncentraci $3,32 \cdot 10^{-7}$ mol/l a době elicitace 48 hodin došlo ke zvýšení tvorby flavonoidů o 976 % oproti kontrole (TŮMOVÁ, OSTROŽLÍK, 2002).

SOYLU et al. (2002) testovali vliv světelného záření, respektive ultrafialového spektra (254 nm) u kotyledonů *Vicia faba* L., s cílem zvýšit obsah fytoalexinu wyeronu a jeho derivátů. Po patnáctiminutovém působení ultrafialového záření došlo k navýšení wyeronu o 452 $\mu\text{g/g}$ oproti kontrole.

TŮMOVÁ, RUSKOVÁ (1998) sledovaly také vliv CuSO_4 a CdCl_2 na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. po 24, 48 a 168 hodinové aplikaci. Testované elicitory výrazně ovlivnily produkci flavonoidů v této kultuře. Statisticky významný nárůst produkce flavonoidů zaznamenali při použití roztoku CdCl_2 v koncentraci 0,5 mg.l^{-1} a koncentraci 0,05 mg.l^{-1} po 48 hodinách kultivace, u koncentrace 0,005 mg.l^{-1} po 24 i 48 hodinách kultivace. U roztoku CuSO_4 v koncentraci 0,5 mg.l^{-1} po 48 i 168 hodinách. Nejvyšší nárůst hladiny flavonoidů byl zjištěn po elicitaci CdCl_2 v koncentraci 0,005 mg.l^{-1} , kde se produkce zvýšila o 67 % oproti kontrole po 48 hodinách kultivace.

2.6.2. Biotické elicitory

Při experimentální práci se jako organogenní elicitory používají kompletní homogenáty inaktivovaných kultur mikroorganismů – hub, bakterií, případně jejich frakce.

Vliv elicitorů na produkci flavonoidů byl testován v mnoha pokusech. MARINELI (1994) například prokázal vliv homogenátu z usmrčených buněk *Escherichia coli* a *Aspergillus terreus* na produkci flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis* L. – jehlice trnité. Bylo zjištěno, že uvedené elicitory zvyšovaly akumulaci flavonoidů zejména po 24 nebo 48 hodinách elicitace.

Zvýšená produkce sekundárních metabolitů po delší než 7 denní elicitaci buněčnými stěnami kvasinek byla zaznamenána u cibulek *Hippeastrum hortorum* - hvězdníku zahradního (WINK, LEHMANN, 1996).

KAŠPAROVÁ, SIATKA (1999) sledovali vliv biotického elicitoru *Pseudomonas aeruginosa* ve formě homogenátu a vodní suspenze mrtvých buněk na

produkci anthracenových derivátů tkáňovou kulturou *Rheum palmatum L.* různého stáří a původu. Kultura byla kultivována na médiu podle Murashigeho a Skooga s přídavkem $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny α -naftyloctové. Maximální obsah anthracenových derivátů, zjištěný fotometrickým stanovením podle ČSL 4, byl prokázán u osmileté kultury (1,027 %) po 6 hodinové elicitaci vodní suspenzí mrtvých buněk *Pseudomonas aeruginosa* (1,7 mg sušiny/1 ml roztoku).

Využití fungálního elicitoru řešila BALÁŽOVÁ et al. (2002) u máku setého *Papaver somniferum L.*, který je zdrojem morfinových alkaloidů, jejichž tvorba se váže na intaktní rostlinu. *In vitro* kultury máku morfiny netvoří, jejich hlavním alkaloidem je sanguinarin. Elicitace suspenzních kultur máku fungálním elicitem vedla k devítinásobnému zvýšení obsahu sanguinarinu v nich. Elicitací se zvýšila i specifická aktivita polyfenoloxidázy (PPO), která byla třikrát vyšší v elicitovaných než v neelicitovaných suspenzních kulturách. Nativní elektroforézou se v suspenzních kulturách máku identifikovali dvě izoformy PPO, přičemž elicitace neměla vliv na jejich počet. Jednostupňovou afinitní purifikací PPO na sloupci Phenyl-Sepharose CL-4B se specifická aktivita enzymu zvýšila 14x.

Další průkazné výsledky využití fungální elicitace tentokrát s *Penicillium sp.*, pro zvýšení tvorby a sekreci alkaloidů catharanthinu a ajmalicinu v *Catharanthus roseus* (respektive ve dvou poddruzích a to *Catharanthus roseus* cvs. Little Linda and Little Delicata), získali SIM et al. (1994). V kombinaci s adsorpcí *in-situ* prokázali, že došlo k zvýšení obsahu catharanthinu a ajmalicinu až o 20 a 70 % a adsorpce *in-situ* s následnou fungální elicitací měla synergický účinek na produkci a sekreci indolalkaloidů.

Druhou významnou skupinou bioelicitorů jsou sloučeniny na bázi organických sloučenin. Neustále jsou vyhledávány a vyvíjeny nové a nové organické látky, které jsou experimentálně zkoušeny jako elicitory při elicitaci testovaných kultur pěstovaných *in vitro* nebo *in vivo*.

KAŠPAROVÁ, SIATKA (2001) sledovali vliv 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinového působení čtyř koncentrací biotického elicitoru chitosanu na produkci anthracenových derivátů kalusovou a suspenzní kulturou *Rheum palmatum L.* Pozitivní ovlivnění produkce vyvolala zejména elicitace suspenzní kultury. Maximální obsah anthracenových derivátů (1,181 %), zjištěný fotometrickým stanovením podle ČSL 4, byl prokázán po 24 hodinovém působení roztoku chitosanu o koncentraci 1 mg/30 ml média. Na rozdíl od suspenzní kultury prokázali, že produkce anthracenových derivátů

v kalusové kultuře byla ovlivněna elicitací jen minimálně.

Jiný experiment se zabýval například využitím kyseliny linolové. To je po chemické stránce *cis*, *cis*-9,12-oktadekadienová kyselina, která patří do skupiny vyšších mastných kyselin. Tato kyselina byla použita jako potenciální elicitor z toho důvodu, že vyvolává akumulaci fytoalexinů (isoflavonoidů) v listech *Phaseolus vulgaris*, podobné těm, které byly dosaženy po elicitaci avirulentním kmenem *Pseudomonas syringae* pvo *phaseolica*. Maximální množství akumulovaných fytoalexinů se projevilo jako odpověď na 1,6 mM koncentraci arachidonové a linolové kyseliny. Všechny polynasyčené mastné kyseliny všechny *cis*-5,8,11,14,17 eicosapentanové a všechny *cis*-5,8, 11, 14 eicosatetraenové (arachidonové) kyseliny byly nejefektivnějšími elicitory tvorby seskviterpenických fytoalexinů, které byly zjištěny v houbových extraktech patogenu *Phytophthora infestans* (BOSTOCK et al., 1981).

Při hodnocení produkce flavonoidů v čase během elicitace kyselinou linolovou, vysledovali TŮMOVÁ, DUŠEK (2000), že u většiny pokusných koncentrací je obsah flavonoidů nejvyšší 24 hod po aplikaci elicitoru a poté klesá (u konc. 0,01; 0,10; 0,20; a 1,0 mg/ml. U koncentrací 0,02 a 2,0 mg/ml je maximální produkce po 48 hodinové elicitaci. Při porovnávání dosažených hodnot v závislosti na koncentraci elicitoru byl nejvyšší obsah flavonoidů zaznamenán v kultuře vystavené působení kyseliny linolové o koncentraci 2,0 mg/ml a 1,0 mg/ml. Významný byl nárůst obsahu flavonoidů také u koncentrací 0,01 a 0,20 mg/ml. Nevýznamný nárůst produkce flavonoidů byl zjištěn při působení koncentrace 0,02 mg/ml za 24 a 48 hodin a u koncentrace 2,0 mg/ml po 24 hodinách. Při srovnání produkce flavonoidů u elicitovaných kultur s kontrolními konstatovali, že elicitované kultury vykazovaly vyšší obsah flavonoidů zejména po 24 hodinách při koncentraci 0,01; 0,20 a 1,0 mg/ml. Po 48 hod pak byla produkce vůči kontrolním vzorkům většinou nižší s výjimkou koncentrace 1,0 a 2,0 mg/ml. Po 7 dnech působením kyseliny linolové měly všechny kontrolní kultury vyšší obsah flavonoidů než kultury elicitované. Nejvyšší nárůst tvorby flavonoidů byl zaznamenán při použití elicitoru o koncentraci 2,0 mg/ml a o době působení 48 hod a to o 118 %. Při 24 hodinovém působení elicitoru o koncentraci 1,0 mg/ml došlo ke zvýšení produkce flavonoidů o 94 %. Je zřejmé, že po dosažení maximální produkce flavonoidů dochází pak už jen ke snižování jejich obsahu. Toto snižování obsahu flavonoidů je pravděpodobně způsobeno jejich metabolizací. Na odbourávání se pravděpodobně podílí i elicitor, jak ověřili BEIDERBECK, REICHLING (1989).

CONCONI et al. (1996) prokázali, že množství kyseliny linolové a linolenové v

roślinách rajčete *Lycopersicon esculentum* vzrůstalo během 1 - 2 hodin, když byly listy mechanicky poraněny. Vzrůst koreloval s časným průběhem akumulace kyseliny jasmonové. Tento krátký časový úsek je vysvětlován tím, že vyšší mastné kyseliny jsou potenciálními toxickými látkami pro membrány, a je možné, že může docházet i k aktivaci mechanismu, který způsobuje rychlou redukci hladin těchto metabolitů.

Také v dalším experimentu TŮMOVÁ et al. (2003) testovali vliv kyseliny v tomto případě jodoctové ve 4 různých koncentracích na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L.. Elicitor byl v kontaktu s kulturou po dobu 6, 24, 48, 72 a 168 hodin.

Z dosažených výsledků vyplývá statisticky významný nárůst obsahu flavonoidů v suspenzní kultuře oproti kontrole při použití všech testovaných koncentrací elicitoru a to po 6, 24, 48 a 72 hodinové elicitaci. Maximální zvýšení produkce flavonoidů v suspenzní kultuře nastalo při použití kyseliny jodoctové koncentraci 1 mg/l, a to o 586%. U kalusové kultury došlo k maximálnímu zvýšení tvorby flavonoidů při použití kyseliny jodoctové v koncentraci 10 mg/l a to po 24 hodinách elicitace, obsah flavonoidů byl zvýšen o 529 % oproti kontrole.

GODOY-HERNÁNDEZ, LOYOLA-VARGAS (1997) ověřovali účinek acetylsalicylové kyseliny na sekundární metabolismus suspenzní kultury *Catharanthus roseus*, kdy přidavkem různých koncentrací (0.5-20 mM) acetylsalicylové kyseliny do zmíněné kultury zjistili zvýšení celkových alkaloidů o 505 %, fenolických látek o 1587%, o 612 % více furanokumarinu a 1476 % anthokyaninu. Dosaženými výsledky naznačili, že acetylsalicylová kyselina může působit jako nový elicitor na tvorbu metabolitů v buněčné kultuře *Catharanthus roseus*.

GROENWALD, VAN DER WESTHUIZEN (1998) však v dalším experimentu zjistili, že kyselina acetylsalicylová, která byla aplikována na kotyledony krátkodenních rostlin *Pharbitis nil* (před 16-h temnostní fází) inhibuje kvetení až z 90 % - je převedena na kyselinu salicylovou a v menším rozsahu na 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu v kotyledonech během 16-ti hodinové temnostní fáze. Výsledky pak potvrzují, že kyseliny salicylová a 2,5 dihydroxybenzoová jsou odpovědné za inhibici kvetení a také inhibují biosyntézu prostaglandinů.

Vysoké akumulace indolových alkaloidů v kultuře barvínku růžového bylo dosaženo aplikací homogenátů *Pythium aphanidermatum* a *Rhodotorula rubra* (EILERT, et al., 1986), sanguinarinu v kultuře máku setého homogenátem *Botrytis* sp.

(EILERT, et al., 1985), rutakridonepoxidu v kultuře routy vonné přidáním homogenátu *Rhodotorula rubra* (EILERT et al., 1984). Glykoprotein izolovaný z filtrátu kultury *Phytophthora parasitica* var. *nicotianum* vede k akumulaci kapsidolu v kultuře tabáku virginského (FARMER et al., 1987).

2.6.3 Vliv čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor

Součástí doktorského studia byla i spolupráce na grantu KONTAKT ME 704, který se jmenoval „Technologie pěstování *Echinacea purpurea* a *Schizandra chinensis* a extrakce účinných látek“. Součástí tohoto grantu bylo i použití biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor jako elicitoru a zjištění jeho vlivu na obsah účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea*.

Čínská strana popisuje toto hnojivo Jiwei, jako schopné aktivovat vázaný draslík a fosfor a dále i hořčík, železo, molybden, zinek a další prvky v půdě. Uvolněné živiny mohou být přijmuty rostlinou a zvýšit její odolnost vůči nepříznivým podmínkám a zároveň zvýšit i výnos.

Mezi lety 1990 až 2000 bylo více než třicet druhů rostlin podrobena testování na různých typech půd (viz. tab. č. 1 a 2). V průběhu testu vykazovalo 90 % plodin výrazné zvýšení výnosu. Jednalo se o plodiny jako pšenice, kukuřice, bavlna, rýže, sladké brambory, burské oříšky, fazole, meloun, grep, jablko, hruška, okurka, pepř, rajče, zelí, baklažán apod.

Z důvodu pozitivního vlivu na výnos, bylo rozhodnuto zjistit, zda-li má toto hnojivo vliv i na obsah účinných látek v *E. purpurea*.

Tabulka č.1: Účinek biologického hnojiva na zvyšování výnosu jednotlivých plodin (jednotka: Kg/mu [1 ha = 15 mu])

Oblast	Qingyuan	Xingtang	Xinle	Roncheng	Qingyuan	Xingtang	Jingxian
Plodina	kukuřice	sladké brambory	bavlna	burský oříšek	burský oříšek	burský oříšek	Soja
Varianta							
Kontrola	462,4	1137,8	38,5	207,8	270,7	172,5	54,9
Biologické hnojivo	534,7	1330,1	45,4	237,7	328,7	270,2	66,9
Zvýšení výnosu	72,3	192,4	6,9	29,9	58,0	34,7	12,0
Procento navýšení	15,6 %	16,9 %	7,9 %	14,3 %	21,4 %	20,1 %	21,8 %

Tabulka č.2: Účinek biologického hnojiva na zvyšování výnosu jednotlivých plodin (jednotka: Kg/mu [1 ha = 15 mu])

Oblast	Jingxian	Changli	Xingtang	Gaoyang	Shunping	Shunping
Plodina	gřep	hruška	jablko	okurka	špenát	zelí
Kontrola	2318,8	49,5	31,3	7020	1773	3420,5
Biologické hnojivo	2805	55,9	42	10140	2172	3984
Zvýšení výnosu	486,2	6,4	10,7	3120	399	563,5
Procento navýšení	21,0%	12,9%	34,2%	44,4%	22,5%	16,5%

(Stejně oblasti mají přinejmenším tři testovací místa)

Mikrobiologický institut Akademie věd v Hebei zkoumá dvě kultury uvolňující fosfor. Jedná se konkrétně o *Bacillus megaterium* a *Escherichia sp.*

Bacillus megaterium vytváří v průběhu reprodukce spóry, snadno se připravuje a uchovává, takže má příhodnější komerční uplatnění. Je však třeba poznamenat, že schopnost uvolňování fosforu je nižší než u *Escherichea sp.*

Bacillus megaterium - gram pozitivní bakterie, výlučně aerofilní, buňka sloupovitá až elipsoidní v nutričním roztoku. Obvyklá šířka 1,2–1,5 μ , délka 2-5 μ , v prostředí karbohydrátů narůstá. Vytváří více než jednu spóru, která odolává teplu. Spóra má tvar elipsy, roste v sedmiprocentním roztoku NaCl. Při kultivaci pozorujeme bohatý růst v živném roztoku, nešíří se, v pozdějším stádiu má kultura žlutavou barvu, při delší kultivaci barva hnědá nebo černá. Při aplikaci arabinosy, xylosy, manitolu a hydrolyzačního škrobu obvykle dochází k uvolňování kyseliny a citrátů jako zdroje uhlíku. Obsah G+C je 36 - 38 %. Vogues–Proskauerova reakce je negativní a reakce na vaječný žloutek je též negativní.

Escherchia sp. Hm0332 je bakterie s dvěma ústními otvory vytváří kulturu ve tvaru tyčinek o šířce 0,5 – 0,7 μ a délce 1,0-2,5 μ . Bakterie se vyskytuje samostatně nebo ve dvojici a může se pohybovat. Kultura vytváří v průběhu 48 hodin v živném roztoku kruhové kolonie s pravidelnými rohy o průměru 4 mm, které jsou vlhké a hladké, barvy galatitu. Rozpětí teplot leží mezi 10 – 40 stupni Celsia. Teploty 28-30°C

zlepšují růst. Kultury přežívají při pH v rozmezí 6 - 7,9. Optimální pH pro bakterie je 7 - 7,3. Vždy negativní jsou gramové reakce, oxidační reakce a Voges-Proskauerova reakce, vždy pozitivní jsou reakce na kontaktní enzym, indolové reakce a reakce na metylovou červeň. Tento aerogen vytváří kyselinu z laktosy a glukosy a používá soli kyseliny jablečné a kyseliny mléčné jako jedinečný zdroj energie a uhlíku (KUŽEL, 2005).

2.7. Extrakce

Úprava vzorku (extrakce) před samotným stanovením analytu je nejdůležitější úkon, který vede ke konečnému zjištění obsahu látky v matrici. Je příkladem separační metody založené na kontaktu dvou makroskopicky zřetelně oddělených nemísitelných fází. Extrakce často slouží nejen k separaci, ale i k zakoncentrování analytu do malého objemu extrakčního činidla a má veliký význam pro praktickou analýzu i pro preparativní účely.

K laboratorní extrakci fenolických látek se používá převážně suchý rozemletý materiál. BAUER, FOSTER (1991) extrahují 1g suché drogy 1 hodinu v Soxhletově přístroji 50 ml methanolu. Jako optimální pro třapatku nachovou doporučuje KIM et al (2000) 5 hodinovou extrakci 1 g suché drogy 50 ml methanolu v Goldfischově přístroji. Optimální pro společnou extrakci kyseliny cichorové a alkylamidů je podle STUARTA a WILLSE (2000) 60% ethanol. Podle VRCHOTOVÉ et al. (2002), ale čisté alkoholy extrahují při pokojové teplotě jen velmi nepatrnou část sledovaných fenolických látek, přičemž o něco účinnější je methanol, zejména pro kyselinu cichorovou. Jestliže použijeme pro extrakci samotnou vodu nebo směs voda - methanol, je stejně jako v případě čistých alkoholů, extrakční efekt pro kyselinu cichorovou velmi slabý. U kyseliny kaftarové, která v podmínkách kapalinové chromatografie na reverzní fázi C18 eluuje dříve než kyselina cichorová (je tedy relativně polárnější), je výtěžek extrakce pouhou vodou daleko větší než výtěžek extrakce alkoholy.

K extrakci se používá i 70% ethanol v kombinaci s ultrazvukem (BAUM et al., 2001), (LETCAMO, 1999).

Někteří autoři odstraňují z rostlinného materiálu nejprve nepolární látky, a to extrakcí s chloroformem a poté následuje extrakce s methanolem (PERRY et.al., 2001),

nebo nepolární látky z extraktů odstraňují čištěním přes SPE kolonky s náplní C₁₈ (KIM, 2000).

Nejpoužívanější způsob extrakce je podle německého lékopisu způsob, kdy se droga nejdříve extrahuje ethanolem, poté se přidá tolik vody, aby množství ethanolu činilo 60 % obj. a extrahuje se dále po stejnou dobu jako u čistého alkoholu.

VRCHOTOVÁ et al. (2002) uvádějí výtěžky pro kyselinu cichorovou 60 % v soustavě ethanol, poté stejné množství vody, a 73 % pro kyselinu kaftarovou. Doba extrakce nehraje v tomto systému podstatnou roli. K poklesu výtěžku dochází pouze u kyseliny kaftarové po dvouhodinové extrakci a to o cca 8 %. Záměnou ethanolu za methanol, což ale není systém vhodný pro farmaceutickou, resp. potravinářskou výrobu, získáme maximální množství obou kyselin. Zajímavé jsou výsledky získané při extrakci třapatky nachové vroucí vodou, při které dochází k 80% výtěžku extrakce u kyseliny cichorové, ale 125% výtěžku u kyseliny kaftarové. Obsah kyseliny kávové je nejvyšší v extraktu voda-methanol (0,22 mg.g⁻¹ suché drogy), o něco méně je kyseliny kávové v extraktu 25% methanolem (0,18 mg.g⁻¹). U vodně-alkoholových extraktů je obsah kyseliny kávové 0,10-0,12 mg.g⁻¹. U ostatních extraktů je obsah kyseliny kávové podstatně nižší. Nejvhodnějším extrakčním postupem je tedy dvoustupňová extrakce (nejdříve čistý alkohol-methanol, pak po určité době voda). Takto připravené extrakty obsahují jak látky polární, tak i látky méně polární.

Kyselina cichorová je při přípravě produktů z *E. purpurea* citlivá na enzymatickou degradaci, která může být inhibována přidavkem vhodných antioxidantů, například polyfenol oxidázou (NUSSLEIN et al., 2000).

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo prokázat vliv elicitorů na změny obsahu vybraných účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea* (L.) Moench.

Ke splnění cíle disertační práce byly stanoveny následující dílčí cíle:

Studium vlivu elicitorů na změny obsahu látek flavonoidního charakteru (kyselin kávové, kaftarové, cichorové a chlorogenové) v jednotlivých částech (nadzemní hmota a kořen) rostliny *Echinacea purpurea*.

a) Studium vlivu elicitorů připravených na bázi kyselin acetylsalicylové, salicylové a metylsalicylové a organických sloučenin titanu (askorbát titanu) aplikovaných postřikem na list.

b) Zjištění, zda-li čínské biologické hnojivo mobilizující půdní fosfor při aplikaci do půdy projevuje elicitační účinek.

Předpokládané nové vědecké výsledky disertační práce:

Ověření nové analytické metody pro stanovení vybraných účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea*.

Prokázání pozitivního vlivu elicitorů na změny obsahu vybraných účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea*.

4. MATERIÁL A METODIKA

4. 1. ELICITAČNÍ ÚČINEK FOLIÁRNÍ APLIKACE KYSELINY ACETYLSALICYLOVÉ (PROTIVÍN)

4.1.1. Pěstování rostlin a aplikace elicitoru

Studium účinku foliární aplikace elicitoru kyseliny acetylsalicylové (AS) na obsah účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea* bylo provedeno v maloparcelkovém experimentu (obr. č. 3) v letech 2002 až 2004 v lokalitě Protivín, okres Písek v nadmořské výšce 378 m. n. m. Na pokusném pozemku byly počátkem měsíce dubna roku 2002 založeny pokusné parcely s rostlinami *Echinacea purpurea* celkem o rozloze 64 m². Byly založeny vždy 4 parcely (tři pokusné a jedna kontrolní) každá o výměře 4 m² ve čtyřech opakováních. V pokuse byly použity tři koncentrace kyseliny acetylsalicylové a kontrola. Pro výsadbu byla předpěstována sadba rostlin *Echinacea purpurea* v sadbovačích. Výsev semen do sadbovačů byl proveden dne 22. února 2002. Sadbovače byly umístěny ve skleníku (foliovníku) k urychlení vzcházení semen a počátečního růstu rostlin. Výsadba balíčkované sadby byla provedena 28. dubna 2002 na pokusné parcely v přesném sponu 30 x 30 cm. Tato hustota porostu se osvědčila. Po vytvoření listové růžice došlo k významnému zastínění půdy a tím došlo k potlačení růstu plevelných rostlin.

Obr. č. 3: Maloparcelkový experiment



Před založením pokusu byly odebrány půdní vzorky ke stanovení charakteristiky pokusného pozemku. Agrochemická charakteristika půdy pokusného pozemku:

- Výměnná půdní reakce ve výluhu 1 M KCl pH_{KCl} 6,8.
- Obsah celkového uhlíku C_{ox} = 3,4 %.
- Frakcionace humusových látek. Byly stanoveny humusové látky (HL = 16,1 mg/g), fulvokyseliny (FK = 8,9 mg/g) a huminové kyseliny (HK = 7,9 mg/g). Poměr HK:FK je 0,97.
- Stanovení obsahu minerálních forem dusíku pomocí iontově selektivních elektrod. Množství dusičnanového ($N-NO_3$ = 3,2 mg/kg) a amonného dusíku ($N-NH_4$ = 1,2 mg/kg) s následným stanovením a výpočtem minerálního (N_{min} = 4,4 mg/kg) a mineralizovatelného dusíku (N_{miner} = 7,9 mg/kg).

Tab. č. 3: Obsah základních živin v půdě (Mehlich III)

Průměrný obsah živin v půdě				
N_{tot}	P mg/kg	K mg/kg	Mg mg/kg	Ca mg/kg
0,22 %	627	189	328	5197

Z výše uvedeného vyplývá, že půda pokusného pozemku je celkem dobře zásobena živinami a nebylo nutné po celou dobu pokusu provádět žádné přihnojování. Z agrotechnických opatření bylo prováděno pouze mechanické okopávání, pletí a zálivka. Vlastní postřik porostů byl proveden zádovým postřikovačem typu Gardena (obr. č. 4).

Obr. č. 4: Vlastní aplikace elicitoru



Foliární aplikace elicitoru byla provedena v souladu s metodikou pokusu ve třech různých dávkách nízké, střední a vysoké ve čtrnáctidenních intervalech a jako kontrola byl postřik vodou.

Koncentrace	nízká	střední	vysoká
Kyselina acetylsalicylová	10^{-5} mol/l	10^{-4} mol/l	10^{-3} mol/l

První aplikace proběhla 9. 6. 2002, tedy v období těsně před květem, v množství vždy 1 litr/1 m² roztoku elicitoru o požadované koncentraci, druhé ošetření bylo provedeno dne 23. 6. 2002 a třetí aplikace dne 7. 7. 2002.

Ošetřování porostu v letech 2003 a 2004 probíhalo podle stejných zásad jako v prvním roce pěstování ve stejných dávkách nízké, střední a vysoké ve čtrnáctidenních intervalech. První aplikace proběhla 2. 6. 2003, tedy v období těsně před květem, v množství vždy 1 litr/1 m² roztoku elicitoru o požadované koncentraci, druhé ošetření bylo provedeno dne 16. 6. 2003 a třetí aplikace dne 30. 6. 2003. V druhém roce pěstování byla provedena i čtvrtá aplikace dne 14. 7. 2003.

Aplikace elicitoru postřikem na list v třetím roce pěstování byla opět provedena ve třech různých dávkách nízké, střední a vysoké ve čtrnáctidenních intervalech. První aplikace proběhla 11. 6. 2004, tedy v období těsně před květem, v množství vždy 1 litr/1 m² roztoku elicitoru o požadované koncentraci, druhé ošetření bylo provedeno dne 25. 6. 2004 a třetí aplikace dne 8. 7. 2004. Čtvrtá aplikace elicitoru byla realizována dne 22. 7. 2004.

4.1.2. Sklizeň rostlin a příprava extraktu

Dne 6. srpna 2002 proběhla sklizeň vzorků celých (nadzemní části a kořenů) rostlin odděleně z každé parcelky vždy 4 rostliny z plochy 0,25 m². Rostliny byly vyjmuty, výškově změřeny, zváženy, spočítány byly odnože, počty květů a listů. Kořeny byly pečlivě omyty vodou a následně zbaveny vody. Sušení natě a kořenů proběhlo při teplotě do 40 °C v sušárně. Po zjištění hmotnosti sušiny byly odebrané vzorky kořenů a nadzemních částí rostlin podle jednotlivých partií rozšrotovány v ručním šrotovníku a připraveny pro provedení extrakce. V roce 2003 proběhla sklizeň vzorků dne 15. 8. 2003 a ve třetím roce dne 22. 8. 2004. Extrakce biologicky účinných látek z rostliny *Echinacea purpurea* byla provedena v souladu s Německým lékopisem (BAUER, WAGNER, 1990).

V experimentu byl odebrán kvartací z rozemletého vysušeného kořenového a nadzemního pokusného materiálu vzorek k rozboru o hmotnosti 2 g, který byl přelit 20 ml 96% ethanolu a ponechán extrahovat při pokojové teplotě 24 hodin. Po této době byla směs doplněná 20 ml destilované vody a opět ponechána extrahovat dalších 24

hodin. Po provedené extrakci byla směs zfiltrována a připravena k následnému rozboru metodou HPLC. Tyto vzorky byly uchovány při teplotě -28°C .

4.1.3. Analýza vzorků

Extraktů rostlinných vzorků byly analyzovány pomocí HPLC na Katedře chemie, ZF JČU v Českých Budějovicích. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vody s přidavkem kyseliny fosforečné. Mobilní fáze A: 5% acetonitril + 0,1 % kyseliny fosforečné, mobilní fáze B: 80% acetonitril + 0,1 % kyseliny fosforečné. Gradient: 0% B – 50% B, 50min. Průtok mobilní fáze byl 0,250 ml/min. Kolona Phenomenex Luna C18, 150 mm, 2 mm, 3 μm . Chromatograf Watrex, UV detektor (obr. 2 a 3). Detekce probíhala v rozmezí 190 – 600 nm, záznam a vyhodnocení bylo provedeno při $\lambda = 330 \text{ nm}$. K analýze byla použita vysokotlaká pumpa Spectra System P2000, UV detektor Spectra System UV 3000 HR Thermo Separation Products, SN 4000, auto sampler MIDAS Holland Spark (obr. č. 7). Data byla analyzována softwarem HP Chem Station (Hewlett Packard) viz. obr. č. 8. Standardy byly připraveny v 50% methanolu. Množství kyseliny cichorové bylo počítáno podle kalibrační křivky pro kyselinu kaftarovou (ŠPIČKA et al., 2003; VYDRA, 2003).

Obr. č. 5: HPLC



Obr. č. 6: HPLC



Obr. č. 7: Autosampler Midas



Obr. č. 8: Grafické znázornění chromatogramu softwarem HP Chem Station.



4.2. ELICITAČNÍ ÚČINEK FOLIÁRNÍ APLIKACE VYBRANÝCH ELICITORŮ (DOLNÍ PĚNA)

4.2.1. Pěstování rostlin a aplikace elicitoru

V letech 2002 až 2004 byl realizován na pozemku s porostem *Echinacea purpurea* poloprovozní experiment s aplikací čtyř elicitorů ve třech různých koncentracích a kontrolou ve čtyřech opakováních.

Poloprovozní experiment byl zajištěn na pěstební ploše v k. ú. Dolní Pěna, okres Jindřichův Hradec. Pozemek se nachází v nadmořské výšce 473 m. n. m. Porost *Echinacea purpurea* byl založen v roce 2002 na výměře zhruba 2 ha, s šířkou řádků 70 cm a vzdáleností rostlin v řádku 20 cm.

Na pozemku s porostem rostliny *Echinacea purpurea* bylo počátkem měsíce dubna roku 2002 vytýčeno celkem 52 parcelek každá o ploše 10 m².

Schéma pokusu:	Koncentrace		
	nízká	střední	vysoká
Kyselina acetylsalicylová	10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻⁴ mol/l	10 ⁻³ mol/l
Kyselina salicylová	10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻⁴ mol/l	10 ⁻³ mol/l
Methylsalicylát	10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻⁴ mol/l	10 ⁻³ mol/l
Askorbát titanu	10 ppm	25 ppm	50 ppm
Kontrola	postřik vodou		

Na pokusném pozemku byl odebrán směsný vzorek půdy a podroben půdnímu rozboru:

Výměnná reakce ve výluhu 1 M KCl pH_{KCl} 5,6.

Obsah celkového uhlíku C_{ox} = 2,7 % .

Frakcionace organických látek

stanoveny humusové látky (HL = 13,65 mg/g),

fulvokyseliny (FK = 8,59 mg/g)

huminové kyseliny (HK = 5,06 mg/g)

Poměr HK:FK je 0,59.

Stanovení obsahu minerálních forem dusíku pomocí iontově selektivních elektrod. Množství dusičnanového ($N-NO_3 = 3,1 \text{ mg/kg}$) a amonného dusíku ($N-NH_4 = 1,1 \text{ mg/kg}$) s následným stanovením a výpočtem minerálního ($N_{\min} = 3,7 \text{ mg/kg}$) a mineralizovatelného dusíku ($N_{\text{miner}} = 7,2 \text{ mg/kg}$).

Tab. č. 4: Obsah základních živin v půdě (Mehlich III)

Průměrný obsah živin v půdě				
N	P mg/kg	K mg/kg	Mg mg/kg	Ca mg/kg
0,14 %	219	210	75	1019

Na parcelách o výměře 10 m^2 byla uskutečněna foliární aplikace elicitorů zádovým postřikovačem 10 l postřiku s odpovídajícím elicitem v souladu se schématem pokusu. První aplikace proběhla dne 3. 6. 2002 (porost byl těsně před květem). Druhá a třetí aplikace byla realizována stejným způsobem dne 25. 6. 2002 a 15. 7. 2002 tedy v dvacetidenním intervalu.

V roce 2003 první postřik elicitory byl uskutečněn dne 1. 6. 2003 (porost byl těsně před květem). Druhý postřik dne 21. 6. 2003 a třetí postřik dne 10. 7. 2003. V tomto roce byla provedena i čtvrtá aplikace v termínu 30. 7. 2003. Mezi jednotlivými aplikacemi elicitorů byl opět dodržen dvacetidenní interval.

V roce 2004 první aplikace elicitorů byla provedena dne 4. 6. 2004 (porost byl těsně před květem). Druhá aplikace dne 24. 6. 2004 a třetí aplikace dne 14. 7. 2004. Mezi jednotlivými aplikacemi elicitorů byl opět dodržen dvacetidenní interval.

4.2.2. Sklizeň rostlin a příprava extraktu

Sklizeň vzorků z pokusných parcel byla provedena 3. srpna 2004. Pro účely charakteristiky stavu porostu byly sklizeny celé rostliny (nadměrná část a kořeny odděleně) vždy 4 rostliny z plochy $0,25 \text{ m}^2$ ve čtyřech opakováních. Rostliny byly výškově změřeny, zváženy, spočítány odnože, počty květů a listů. Kořeny byly pečlivě omyty vodou a následně zbaveny vody. Sušení natě a kořenů proběhlo při teplotě do $40 \text{ }^\circ\text{C}$ v sušárně. Po zvážení hmotnosti sušiny byly odebrané vzorky kořenů a nadzemních částí rostlin podle jednotlivých partií rozšrotovány v laboratorním mlýnku (obr. č. 9) a připraveny k extrakci.

Obr. č. 9: Laboratorní mlýnek použitý k přípravě vzorků



Z materiálu k analýze byl kvartací odebrán reprezentativní vzorek rozemletých vysušených kořenů a nadzemní části k rozboru o hmotnosti 2 g , který byl zalit 20 ml 96% ethanolu a ponechán v klidu extrahovat při pokojové teplotě 24 hodin. Po této době byla směs doplněná 20 ml destilované vody a opět ponechána v klidu extrahovat dalších 24 hodin. Po provedené extrakci byla směs zfiltrována a připravena k následnému rozboru metodou HPLC.

4.2.3. Analýza vzorků

Extrakt rostlinných vzorků byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spolupráci s Katedrou chemie v Č. Budějovicích. Použitá metoda byla stejná jako u předcházejících analýz.

4.3. ÚČINEK ČÍNSKÉHO BIOLOGICKÉHO HNOJIVA MOBILIZUJÍCÍHO PŮDNÍ FOSFOR

V letech 2003 – 2004 byl proveden nádobový pokus v Mitscherlichových nádobách v Českých Budějovicích a maloparcelkový polní experiment na školním pokusném pozemku v Českých Budějovicích s modelovými rostlinami druhu *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Studován byl vliv čínských biologických hnojiv mobilizujících půdní fosfor na obsah některých účinných látek flavonoidního charakteru. Sledován byl i vliv hnojiva na růstové parametry rostlin, např. hmotnost nadzemní hmoty, kořene, výška rostliny nebo počet odnoží, květů.

4.3.1. Založení pokusu

Rostliny rodu *Echinacea purpurea* byly pěstovány na pozemku Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích. Pro výsadbu do nádobového experimentu, ale i do maloparcelkového experimentu, byly rostliny předpěstovány v sadbovačích (obr. č. 10). Výsev do sadbovačů byl proveden dne 22. března 2003. Osivo bylo zaseto do hloubky zhruba 3 mm do zahradnického substrátu. Sadbovače byly umístěny do skleníku k rychlému vzcházení semen.

Obr. č. 10: Rostliny předpěstované v sadbovači



Tabulka č. 5: Složení použitého zahradnického substrátu pro předpěstování rostlin (složení deklarované výrobcem)

Obsah spalitelných látek ve vysušeném vzorku v % hmotnosti (min.)	55
Vlhkost v % hmotnosti	40 - 65
Obsah celkového dusíku ve vysušeném vzorku v % hmotnosti (max.)	2,2
Obsah celkového fosforu (P ₂ O ₅) ve vysušeném vzorku v % hmotnosti (max.)	0,5
Obsah celkového draslíku (K ₂ O ₅) ve vysušeném vzorku v % hmotnosti (max.)	0,6
pH ve vodném roztoku	5 - 6,5
Spalitelné látky ve vysušeném vzorku v % hmotnosti (min.)	55

Maloparcelkový experiment

Na pokusném pozemku Zemědělské fakulty JU v Č.Budějovicích. Dne 27. dubna 2003 byly vysazeny předpěstované rostliny *Echinacea purpurea* ve sponu 30 x 30 cm na plochu 24 m². Na pokusné ploše byly vytýčeny pokusné parcelky o ploše 1 m². Varianty kontrolní a hnojená pevnými čínskými biologickými hnojivy mobilizujícími fosfor půdy (v 6 opakováních). Základní hnojení při zpracování půdy na podzim P (70 kg P₂O₅.ha⁻¹ superfosfát) a K (120 kg K₂O.ha⁻¹) a děleně na jaře (před setím a 1. přihnojení) 100 kg N.ha⁻¹ (NH₄NO₃).

Nádobový experiment

Rostliny druhu *Echinacea purpurea* byly dne 28. dubna roku 2003 přesazeny do Mitscherlichových nádob, se 6 kg zeminy. Půda použitá v nádobách byla totožná s půdou maloparcelkového pokusu. Hnojení NPK - 0,2 g N (NH₄NO₃), 0,03 g P a 0,08 g K (KH₂PO₄) na 1 kg zeminy. Do každé nádoby byla zasazena pouze jedna rostlina. Tyto nádoby byly umístěny na stoly speciálně připravené k pěstování „pod otevřeným nebem“ rostliny *E. purpurea*. Po ukončení vegetace, koncem října 2003, byly rostliny přemístěny do nevytápěného skleníku k přezimování a přes zimu byly zalévány. V druhém roce byly nádoby opět umístěny na pokusné stoly k zahájení vegetace 1. dubna 2004.

Charakteristika půdy pokusného pozemku a nádobového pokusu:

Cambisol písčitohlinitá.

Výměnná půdní reakce ve výluhu 1 M KCl pH = 6.7.

Obsah celkového uhlíku $C_{ox} = 2,4 \%$.

Frakcionace humusových látek (HL = 16,1 mg/g), fulvokyseliny (FK = 8,9 mg/g) a huminové kyseliny (HK = 7,9 mg/g).

Poměr HK:FK je 0,97.

Stanovení obsahu minerálních forem dusíku pomocí iontově selektivních elektrod.

Množství dusičnanového (N-NO₃ = 4,2 mg/kg), amonného dusíku (N-NH₄ = 3,2 mg/kg)

Množství mineralizovatelného dusíku (N_{miner} = 9,9 mg/kg) a minerálního (N_{min} = 7,4 mg/kg).

Tab. č. 6: Obsah základních živin v půdě (Mehlich III)

Průměrný obsah živin v půdě				
N _{tot}	P mg/kg	K mg/kg	Mg mg/kg	Ca mg/kg
0,21 %	127	197	148	2519

4.3.2. Aplikace čínskému biologického hnojiva

Maloparcelkový experiment

Dne 1. srpna 2003 (v prvním roce vegetace) bylo aplikováno biologické hnojivo v dávce 20 g ke každé již vzrostlé rostlině, přímo do míst výskytu převážné části kořenové hmoty a zahrnuto původní zeminou. Přihnojení se provádělo v suspenzi s 200 ml destilované vody. Aplikace byla provedena prostřednictvím 15 cm hluboké rýhy vytvořené po obvodu kořenů každé rostliny. Rýha byla po aplikaci zahrnuta původní zeminou a každá rostlina zalita.

V druhém roce pěstování rostliny druhu *Echinacea purpurea* byla aplikace hnojiva provedena 1. května 2004 obdobným způsobem jako v roce prvním.

Nádobový experiment

Pokusné nádoby s rostlinami *Echinacea purpurea* byly rozděleny na dvě poloviny (25 + 25) a označeny. Dne 1. srpna 2003 (v prvním roce vegetace) byla do nádob aplikována biologická hnojiva mobilizující půdní fosfor v dávce 20 g na nádobu ke každé již vzrostlé rostlině. Přihnojení se provádělo v suspenzi s 200 ml destilované vody. Aplikace byla provedena prostřednictvím 15 cm hluboké rýhy vytvořené po obvodu kořenů v nádobě. Hnojivo bylo tedy aplikováno přímo do míst výskytu převážné části kořenové hmoty a zahrnuto původní zeminou. Po aplikaci byla rostlina zalita vodou. V kontrolních nádobách byla provedena aplikace 200 ml destilované vody prostřednictvím 15 cm hluboké rýhy vytvořené po obvodu kořenů v nádobě. Rýha byla zahrnuta původní zeminou a rostlina v nádobě zalita.

V prvním roce pěstování prakticky všechny rostliny vykvetly.

V druhém roce pěstování rostlin *Echinacea purpurea* byla aplikace hnojiva provedena dne 1. května 2004 opět v dávce 20 g ke každé rostlině stejným způsobem jako v roce prvním.

4.3.3. Sklizeň rostlin a analýza vzorků

Rostliny byly sklizeny v době, kdy devadesát procent třapatok nachových dosáhlo fáze kvetení. Sklizeň rostlin v nádobovém experimentu byla provedena v termínu od 23. – 27. srpna 2004. Sklizeň rostlin v maloparcelkovém experimentu byla uskutečněna v termínu od 13. – 16. září 2004.

Rostliny byly vyjmuty z půdy, byly výškově změřeny, spočítány odnože, počty květů a listů, dále byly zváženy květy, nať a kořen. Kořeny byly důkladně omyty a osušeny. Rostlinný materiál (nadzemní hmota a kořeny) byl usušen v sušárně při teplotě do 40°C stejným způsobem jak u nádobového, tak i u maloparcelkového pokusu. Příprava vzorků, jejich extrakce a analýza na HPLC byly prováděny stejně jako u předcházejících pokusů.

4.4. Statistické zpracování výsledků

Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit program Statistica, verze 6.0 CZ. Jednalo se hlavně o analýzu rozptylu, často také nazývanou ANOVA (Analysis of Variance). Výsledky byly zpracovány do tabulek a grafů pomocí programu Microsoft Office, hlavně jeho součástí MS Excel a MS Word.

4.5. Použité chemikálie

ethanol 96 % (Tamda, a.s.)

methanol (Fluka)

acetonitril (Merck)

trifluoroctová kyselina (Fluka)

standardy:

kyselina kaftarová (Dalton)

kyselina kávová (Sigma Aldrich)

kyselina chlorogenová (Sigma Aldrich)

elicitory:

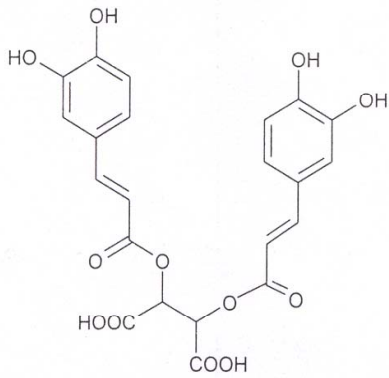
kyselina salicylová (Merck)

methylsalicylát (Merck)

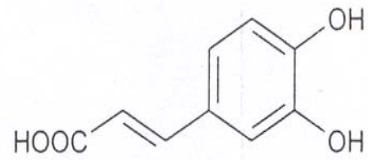
kyselina acetylsalicylová (připravena v laboratoři)

askorbát titanu (připraven v laboratoři)

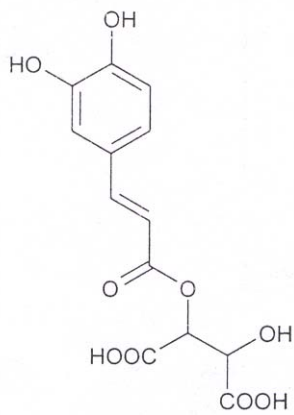
Obrázek č. 11: Vzorce sledovaných kyselin



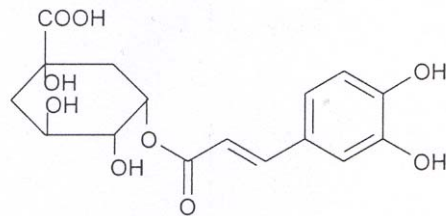
kyselina cichorová



kyselina kávová



kyselina kaftarová



kyselina chlorogenová

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Obsahy kyselin, které jsou sledovány v pokusech a které jsou použity jako kontrola, to znamená, že nebyly ošetřeny elicitorem, se podobají obsahům uváděným v literatuře. WILLS a STUART (1999) zkoumali 62 vzorků sušených kořenů a nadzemních částí pěstovaných v Austrálii pro výrobu různých léčivých preparátů z rostliny *Echinacea purpurea*. Průměrná koncentrace kyseliny cichorové v kořenech byla 13 200 mikrogramů na gram suché hmoty (hodnoty se pohybovaly mezi 1 400 – 20 500 $\mu\text{g/g}$) a nadzemní hmotě 12 900 $\mu\text{g/g}$ (rozmezí 4 900 – 21 400 $\mu\text{g/g}$). K podobným výsledkům, kořen 8 950 $\mu\text{g/g}$ a nadzemní hmota 10 900 $\mu\text{g/g}$ suché hmoty došli i QU et al. (2005). Další podobné hodnoty potvrdili také BERGERON et al. (2000), PERRY et al. (2001), BINNS et al. (2002b), BINNS et al. (2002c), LIU et al. (2006), HUDEC et al. (2007), WU et al. (2007). V našich pokusech se obsah kyseliny cichorové pohyboval na horní hranici uváděných výsledků, často ji překračoval a to jak u kořene, tak i u nadzemní hmoty. Při pokusu, kde byla použita stejná extrakční činidla (ethanol/voda) jako při našich stanoveních, se pohyboval obsah kyseliny cichorové mezi 9360 - 9600 $\mu\text{g/g}$ suché hmoty (VRCHOTOVÁ et al., 2002).

Množství kyseliny kaftarové v kořenu souhlasilo s výsledky uváděnými v literatuře (LIU et al., 2006, WU et al., 2007). VRCHOTOVÁ et al. (2002) stanovila při stejných extrakčních činidlech obsah kyseliny kaftarové na 2529-2864 $\mu\text{g/g}$ suché nadzemní hmoty, což je spíše na spodní hranici našich hodnot (4500 - 11000 $\mu\text{g/g}$). Kaftarovou a cichorovou kyselinu v kořenech a nadzemní hmotě *Echinacea purpurea* zkoumal také LUKÁŠ (2003), jeho naměřené hodnoty se podobaly hodnotám naměřených v našich pokusech.

Množství kyseliny chlorogenové se příliš neshodovalo s publikovanými hodnotami (LETCHAMO et al., 1999). Někteří autoři uvádí obsah kyseliny chlorogenové v kořenech 930 $\mu\text{g/g}$ suché hmoty (LIU et al., 2006), nebo dokonce až 5000 $\mu\text{g/g}$ (WU et al., 2007), zatímco naše výsledky se pohybovaly pouze ojediněle nejvýše na hranici 230 μg na gram suché hmoty, ale spíše mezi 8 - 20 $\mu\text{g/g}$.

I obsah kyseliny kávové v našich výsledcích se pohybuje spíše na spodní hranici hodnot uváděných VRCHOTOVOU et al. (2002).

Tyto rozdíly v obsahu sledovaných kyselin mohou být způsobeny tím, že jejich obsah v různých genetických liniích třapatky nachové může být až čtyřnásobný (BAUM et al., 2001). LETCHAMO et al. (2002) tento rozdíl zjistil až sedminásobný.

Množství sledovaných kyselin i ostatních látek samozřejmě závisí také na době sklizně, na způsobu sušení a způsobu extrakce rostlinného materiálu (VRCHOTOVÁ et al., 2002).

5.1. ELICITAČNÍ ÚČINEK FOLIÁRNÍ APLIKACE KYSELINY ACETYLSALICILOVÉ (PROTIVÍN)

5.1.1. Vliv jednotlivých koncentrací elicitoru na obsah sledovaných látek v nadzemní hmotě

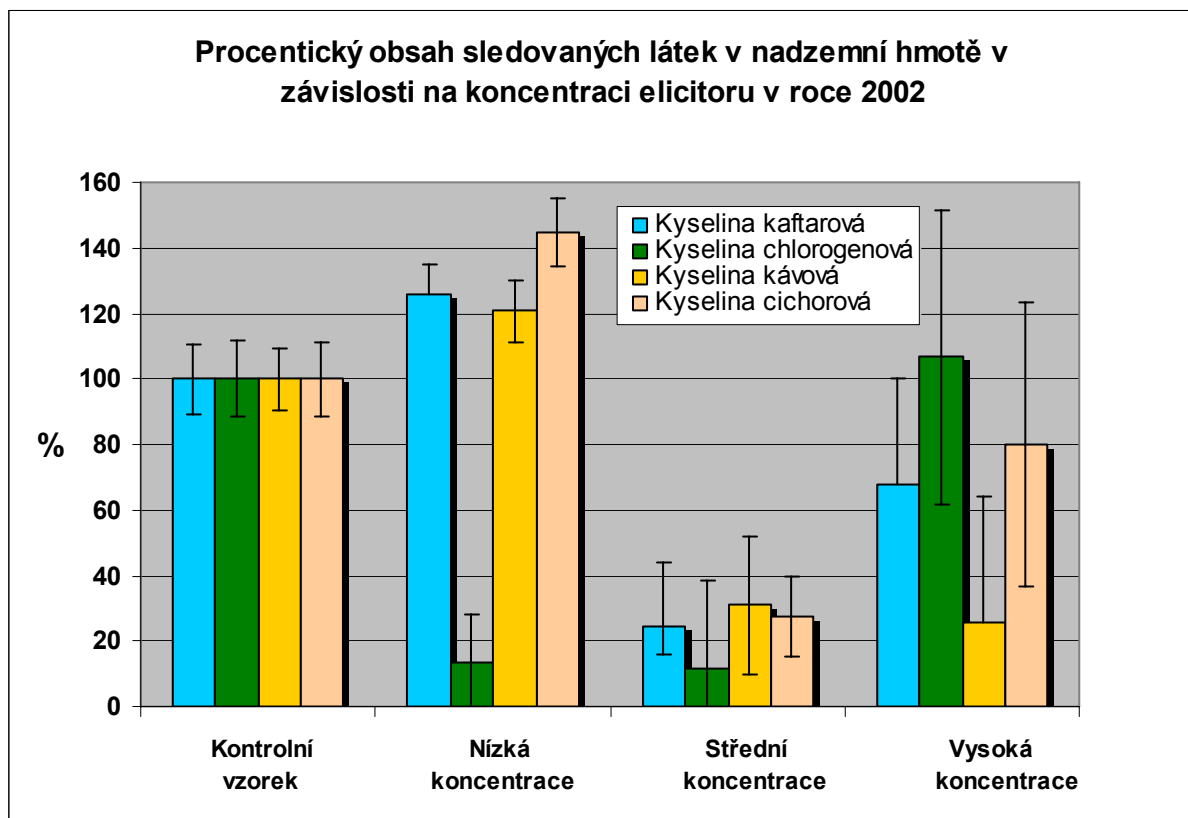
V roce 2002 došlo po aplikaci elicitoru AS v nízké koncentraci u třech látek k jejich nárůstu a u jedné k poklesu oproti kontrolnímu vzorku. Ke zvýšení došlo u kyseliny cichorové o 45 % ($p \leq 0,05$), u kyseliny kaftarové o 26 % ($p \leq 0,05$) a u kyseliny kávové o 21 % ($p \leq 0,05$). Obsah kyseliny chlorogenové se po aplikaci elicitoru snížil o 87 % ($p \leq 0,001$).

Po aplikaci elicitoru ve střední koncentraci se obsah všech sledovaných látek výrazně snížil oproti kontrolnímu vzorku. K největšímu poklesu došlo u kyseliny chlorogenové a to o 89 % ($p \leq 0,001$), pak u kyseliny kaftarové o 76 % ($p \leq 0,001$). Následuje kyselina cichorová, jejíž obsah se snížil o 73 % ($p \leq 0,001$). Nejméně se snížil obsah kyseliny kávové a to o 69 % ($p \leq 0,001$).

Po aplikaci elicitoru ve vysoké koncentraci došlo ke zvýšení obsahu pouze u jedné sledované látky a to u kyseliny chlorogenové. Její obsah se zvýšil pouze o 7 %, nebyl však statisticky průkazný. Obsah ostatních kyselin se oproti kontrolnímu vzorku snížil. K poklesu došlo u kyseliny cichorové o 20 %, u kyseliny kaftarové o 32 % a k největšímu poklesu obsahu došlo u kyseliny kávové a to o 74 % ($p \leq 0,001$).

V tomto roce se nejvíce zvýšil obsah kyseliny cichorové po aplikaci elicitoru v nízké koncentraci. Naopak největší pokles obsahu sledovaných látek nastal u kyseliny chlorogenové po aplikaci elicitoru ve střední koncentraci (viz graf č.1).

Graf č. 1



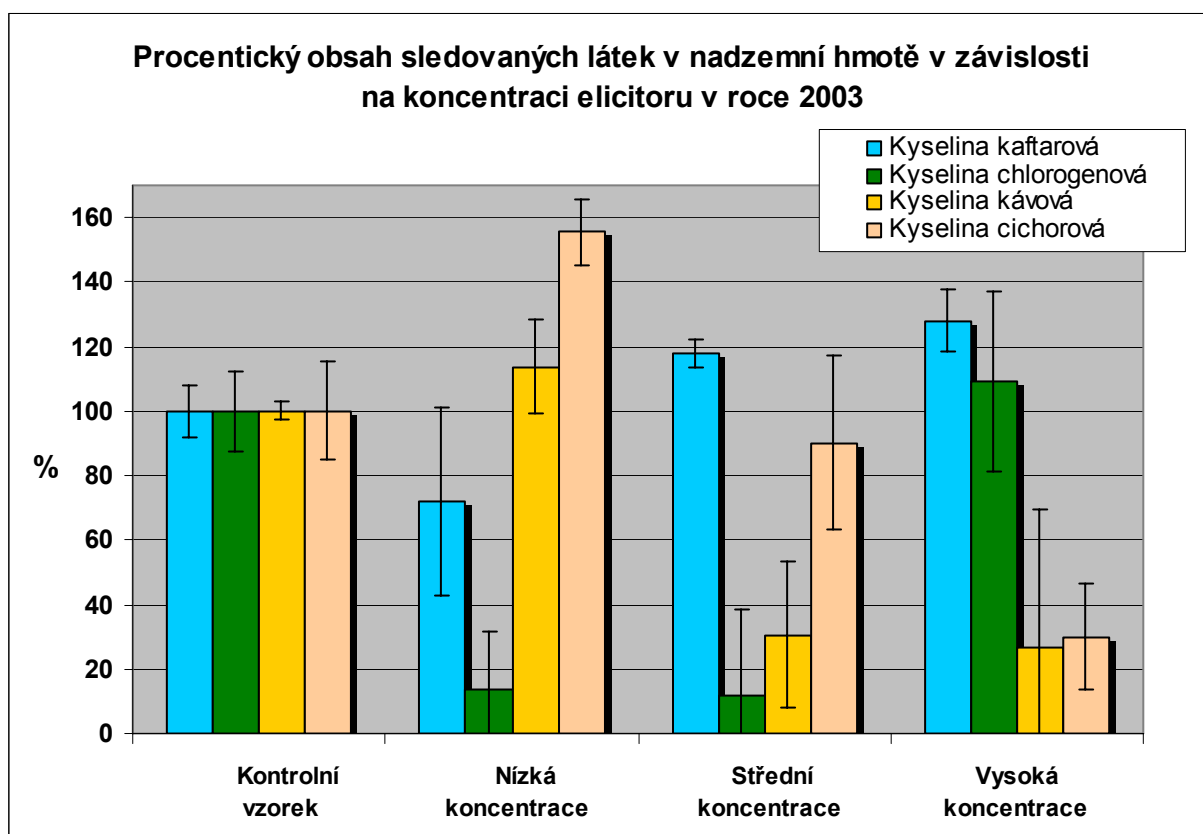
V roce 2003 došlo po aplikaci elicitoru AS v nízké koncentraci k nárůstu i k poklesu obsahu dvou sledovaných látek oproti kontrolnímu vzorku. Zvýšil se obsah kyseliny cichorové o 55 % ($p \leq 0,05$) a kyseliny kávové o 14 %. Látky, u kterých došlo ke snížení jejich obsahu, byly kyselina chlorogenová a kyselina kaftarová. U kyseliny chlorogenové se obsah snížil o 87 % ($p \leq 0,001$) a u kyseliny kaftarové o 28 %.

Po aplikaci elicitoru ve střední koncentraci nastalo zvýšení obsahu pouze u kyseliny kaftarové a to o 18 % ($p \leq 0,05$), oproti kontrolnímu vzorku. Obsah ostatních látek se snížil. Nejvíce se snížil obsah kyseliny chlorogenové o 89 % ($p \leq 0,001$), pak obsah kyseliny kávové o 69 % ($p \leq 0,001$). Nejméně se snížil obsah kyseliny cichorové a to o 10 %.

Po aplikaci elicitoru ve vysoké koncentraci nastalo zvýšení obsahu kyseliny kaftarové o 28 % ($p \leq 0,05$) a kyseliny chlorogenové o 9 %. Obsah dalších sledovaných látek se snížil. Ke snížení došlo u kyseliny cichorové o 70 % ($p \leq 0,001$) a u kyseliny kávové o 74 % ($p \leq 0,001$).

V tomto roce se nejvíce zvýšil obsah kyseliny cichorové po aplikaci nízké dávky elicitoru. Naopak k největšímu poklesu obsahu sledovaných látek došlo u kyseliny chlorogenové po aplikaci elicitoru v nízké a střední koncentraci (viz graf č. 2).

Graf č. 2



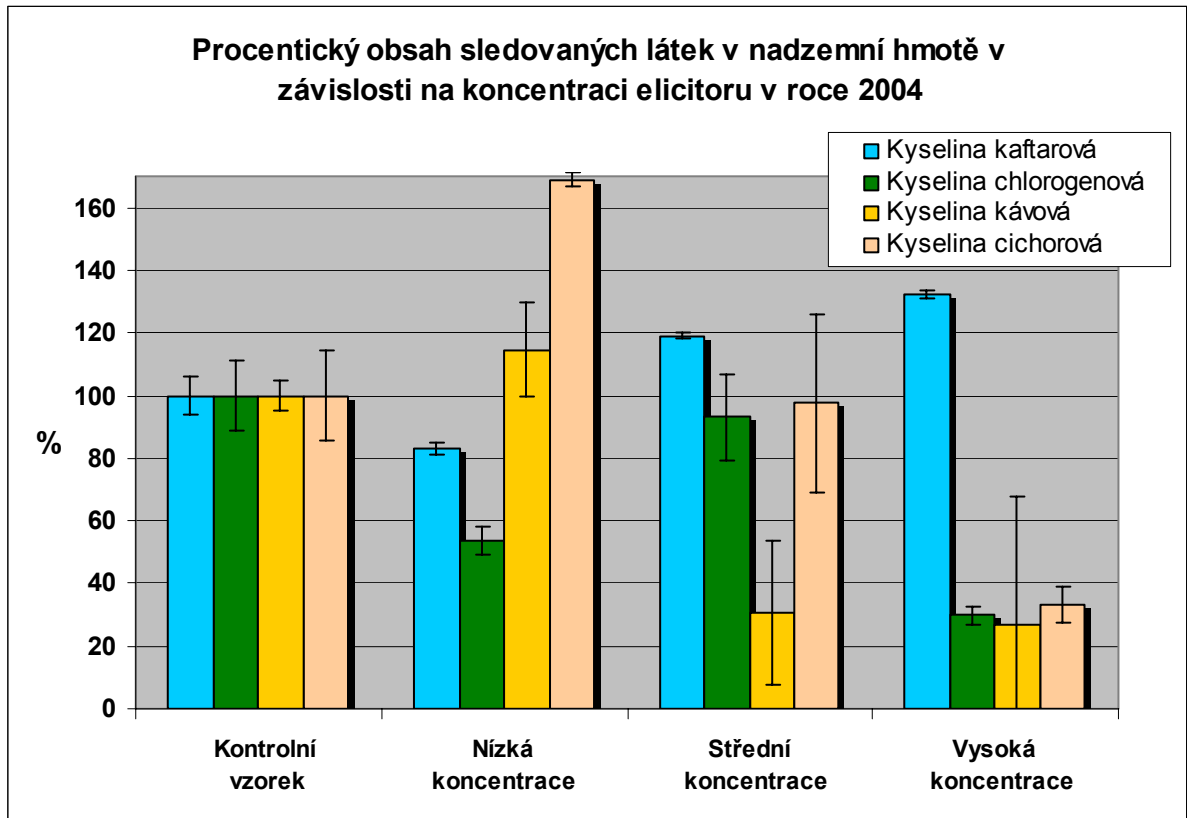
V roce 2004 došlo po aplikaci elicitoru AS v nízké koncentraci ke zvýšení obsahu kyseliny cichorové o 69 % ($p \leq 0,001$) a kyseliny kávové o 15 % oproti kontrolnímu vzorku. Obsah ostatních dvou sledovaných látek se snížil. Pokles nastal u obsahu kyseliny chlorogenové o 46 % ($p \leq 0,001$) a u kyseliny kaftarové o 17 % ($p \leq 0,05$).

Po aplikaci elicitoru ve střední koncentraci se zvýšil obsah pouze u kyseliny kaftarové a to o 19 % ($p \leq 0,05$) oproti kontrolnímu vzorku. Obsah ostatních třech sledovaných látek se snížil. K největšímu poklesu došlo u obsahu kyseliny kávové o 69 % ($p \leq 0,001$), pak u kyseliny chlorogenové o 7 %. Nejméně se snížil obsah kyseliny cichorové o 3 %.

Po aplikaci elicitoru ve vysoké koncentraci se zvýšil obsah pouze u kyseliny kaftarové o 32 % ($p \leq 0,05$) oproti kontrolnímu vzorku. Obsah ostatních třech látek se snížil. Obsah se snížil u kyseliny kávové o 73 % ($p \leq 0,001$), u kyseliny chlorogenové o 70 % ($p \leq 0,001$) a pak u kyseliny cichorové o 67 % ($p \leq 0,001$).

V tomto roce se nejvíce zvýšil obsah kyseliny cichorové po aplikaci nízké koncentrace elicitoru. Naopak k největšímu poklesu došlo u obsahu kyseliny kávové po aplikaci elicitoru ve vysoké koncentraci (viz graf č. 3).

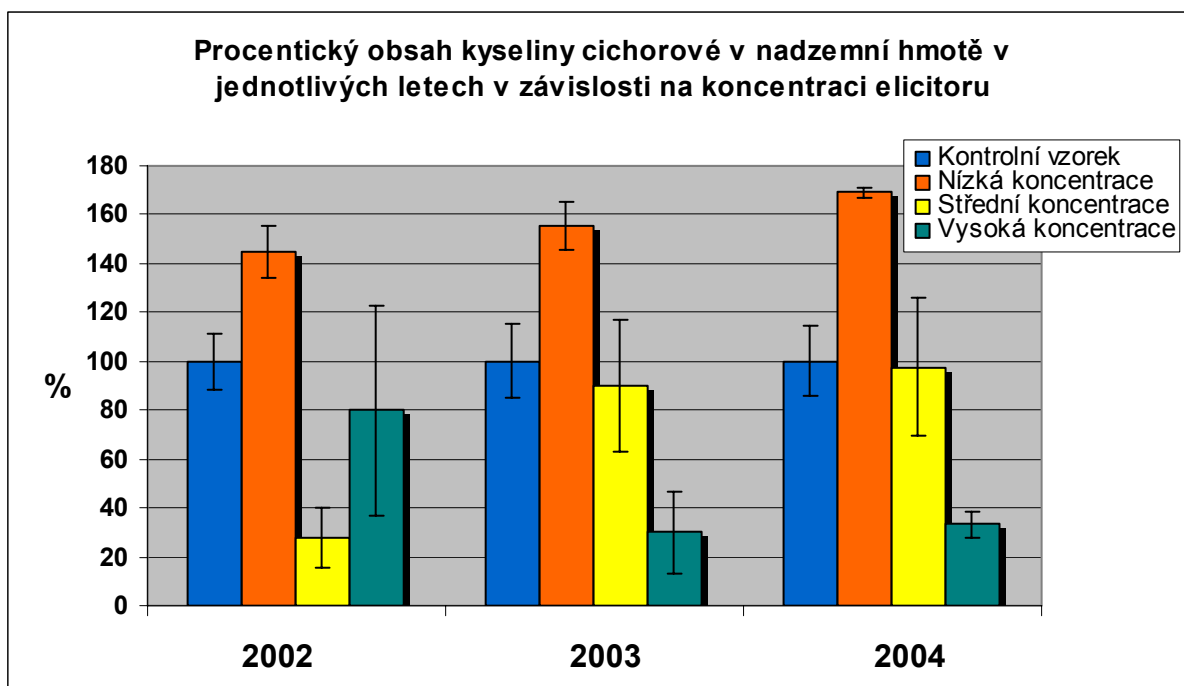
Graf č. 3



Vliv jednotlivých koncentrací elicitoru na sledované látky v nadzemní hmotě v porovnání let 2002 – 2004

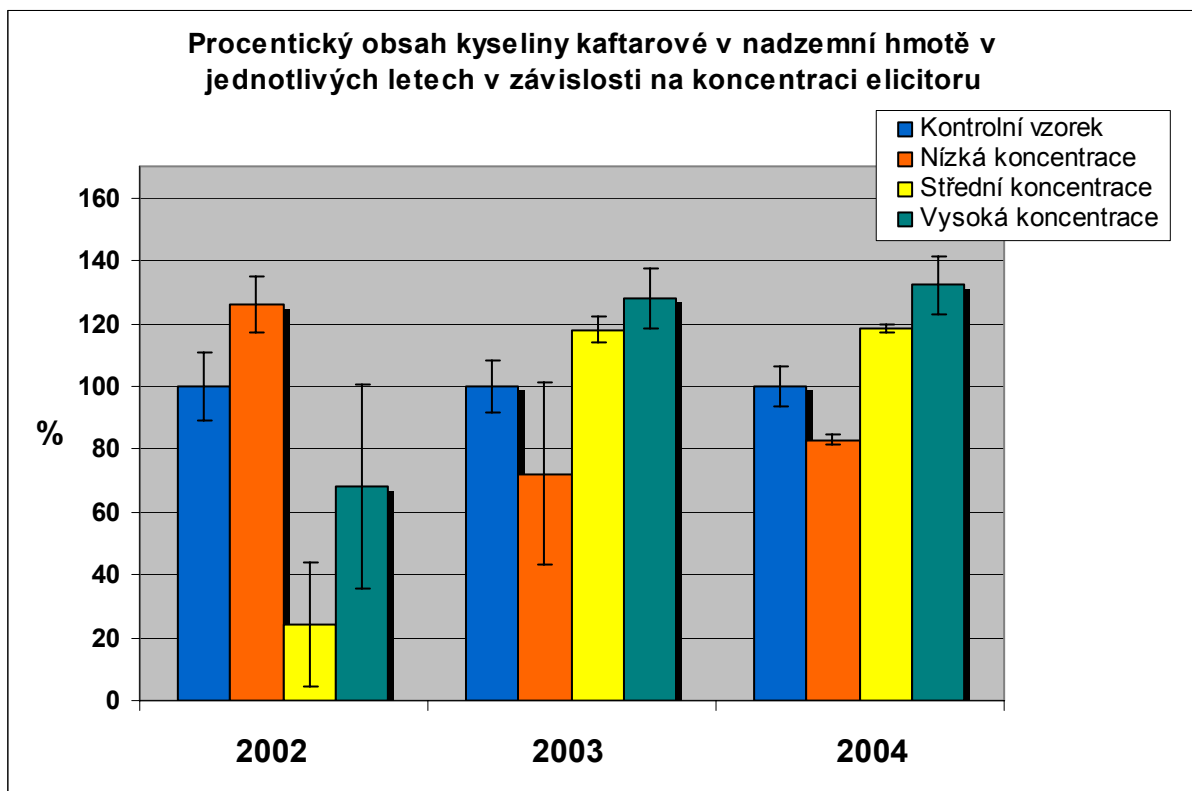
Největší vliv na zvýšení obsahu kyseliny cichorové v nadzemní hmotě během všech tří sledovaných let měla nízká koncentrace elicitoru AS. Střední a vysoká koncentrace způsobily snížení obsahu této kyseliny během všech sledovaných let (graf č. 4).

Graf č. 4



Největší vliv na zvýšení koncentrace kyseliny kaftarové v nadzemní hmotě měla vysoká koncentrace elicitoru, kromě roku 2002, kdy obsah snížila na 68 % hodnoty kontrolního vzorku. Také střední koncentrace elicitoru měla vliv na zvýšení obsahu této kyseliny, kromě roku 2002. Nízká koncentrace měla vliv na zvýšení obsahu sledované látky pouze v roce 2002 (graf č. 5).

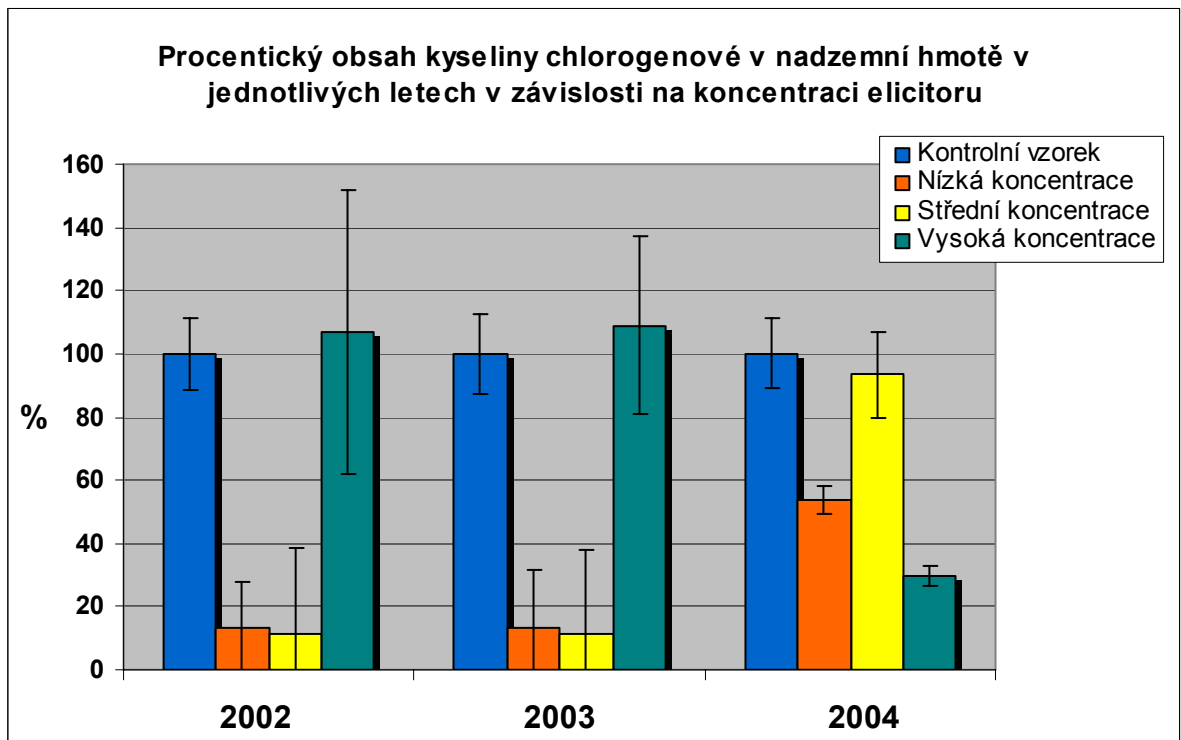
Graf č. 5



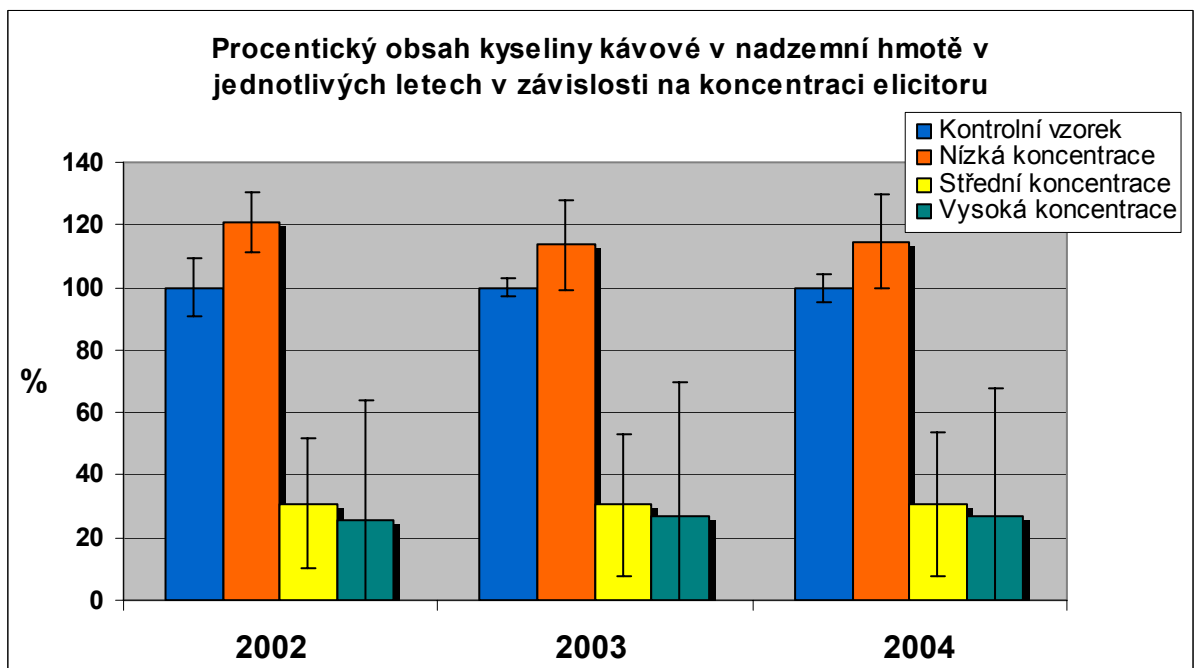
Vliv elitoru AS na kyselinu chlorogenovou v nadzemní hmotě během sledovaných let byl minimální. Pouze vysoká koncentrace elicitoru zvýšila obsah této kyseliny, zvýšení bylo jen v roce 2002 a 2003. Obsah se zvýšil jen o 7 – 9 %. Ostatní koncentrace elicitoru snížily obsah kyseliny chlorogenové. Největší snížení této látky bylo v roce 2002 a 2003 při aplikaci nízké a střední koncentrace elicitoru (graf č. 6).

Na zvýšení obsahu kyseliny kávové v nadzemní hmotě měla vliv pouze nízká koncentrace elicitoru AS. Během všech tří sledovaných let zvýšila tato koncentrace obsah této kyseliny od 14 – 21 % oproti kontrolnímu vzorku. Ostatní koncentrace elicitoru měli za následek snížení obsahu kyseliny kávové na hodnoty okolo 26 % původní hodnoty kontrolního vzorku (graf č. 7).

Graf č. 6



Graf č. 7



5.1.2. Vliv jednotlivých koncentrací elicitoru na obsah sledovaných látek v kořenu

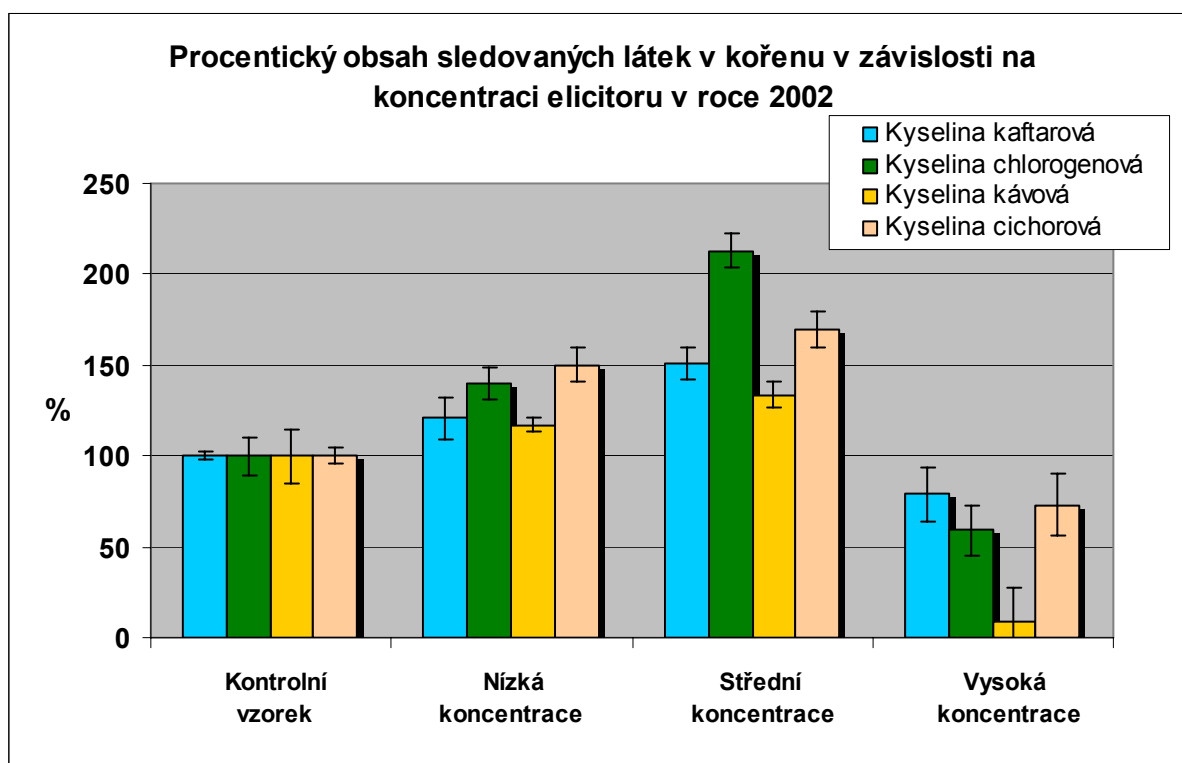
V roce 2002 došlo po aplikaci elicitoru AS v nízké koncentraci k nárůstu obsahu všech sledovaných účinných látek. Nejvíce došlo ke zvýšení obsahu oproti kontrolnímu vzorku u kyseliny cichorové o 50 % ($p \leq 0,05$), kyseliny chlorogenové o 40 % ($p \leq 0,05$), kyseliny kaftarové o 21 % a nejméně u kyseliny kávové o 17 %.

Po aplikaci elicitoru AS ve střední koncentraci došlo opět ke zvýšení obsahu všech sledovaných látek. U kyseliny chlorogenové došlo ke zvýšení o 113 % ($p \leq 0,001$), u kyseliny cichorové o 70 % ($p \leq 0,001$), u kyseliny kaftarové o 51 % ($p \leq 0,05$) a u kyseliny kávové došlo opět k nejnižšímu nárůstu obsahu a to o 34 % ($p \leq 0,05$), oproti kontrolnímu vzorku.

Po aplikaci elicitoru AS ve vysoké koncentraci došlo u všech sledovaných látek ke snížení jejich obsahu. Největšímu poklesu oproti kontrolnímu vzorku došlo u kyseliny kávové o 91 % ($p \leq 0,001$). U kyseliny chlorogenové došlo ke snížení o 41 % ($p \leq 0,001$), u kyseliny cichorové o 27 % ($p \leq 0,05$) a u kyseliny kaftarové o 21 % ($p \leq 0,05$), oproti kontrolnímu vzorku.

V tomto roce došlo k největšímu zvýšení obsahu u kyseliny chlorogenové po aplikaci elicitoru AS ve střední koncentraci. Tato střední koncentrace působila na zvýšení všech sledovaných látek a došlo také k jejich největšímu nárůstu. Naopak k největšímu poklesu všech koncentrací účinných látek došlo po aplikaci vysoké koncentrace (viz graf č. 8).

Graf č. 8



V roce 2003 se po aplikaci elicitoru AS v nízké koncentraci zvýšil obsah všech sledovaných látek. Nejvíce u kyseliny cichorové o 47 % ($p \leq 0,001$), u kyseliny chlorogenové o 29 % a kyseliny kávové o 26 % ($p \leq 0,05$). Nejnižší zvýšení bylo prokázáno u kyseliny kaftarové o 10 % oproti kontrolnímu vzorku.

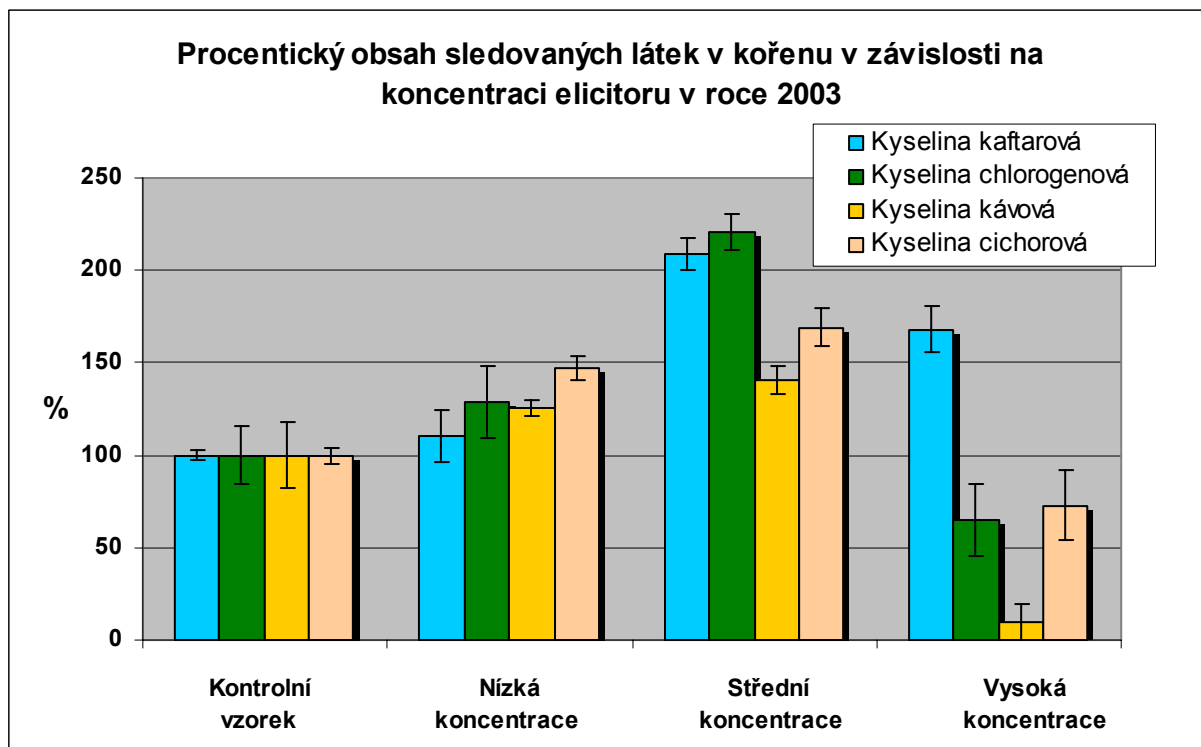
Po aplikaci střední koncentrace elicitoru AS došlo opět ke zvýšení obsahu všech sledovaných látek. Koncentrace kyseliny kaftarové se zvýšila o 109 % ($p \leq 0,001$), kyseliny chlorogenové o 121 % ($p \leq 0,001$) a kyseliny cichorové o 69 % ($p \leq 0,05$). Obsah kyseliny kávové se zvýšil nejméně, a to o 41 % ($p \leq 0,05$).

Aplikací vysoké koncentrace elicitoru AS došlo kromě kyseliny kaftarové ke snížení obsahu všech účinných látek. Ke zvýšení u kyseliny kaftarové došlo o 68 % ($p \leq 0,001$). Obsah ostatních kyselin se snížil, a to u kyseliny cichorové o 27 % ($p \leq 0,05$), kyseliny chlorogenové o 35 % ($p \leq 0,05$) a u kyseliny kávové došlo ke snížení až o 91 % ($p \leq 0,001$), oproti kontrolnímu vzorku.

V tomto roce došlo k největšímu zvýšení obsahu u kyseliny chlorogenové po aplikaci střední koncentrace elicitoru AS. Tato střední koncentrace působila na zvýšení všech sledovaných látek a došlo také k jejich nejvyššímu nárůstu. Naopak při aplikaci

vysoké koncentrace elicitoru došlo pouze u kyseliny kaftarové ke zvýšení jejího obsahu. Obsah ostatních sledovaných látek se snížil (graf č. 9).

Graf č. 9



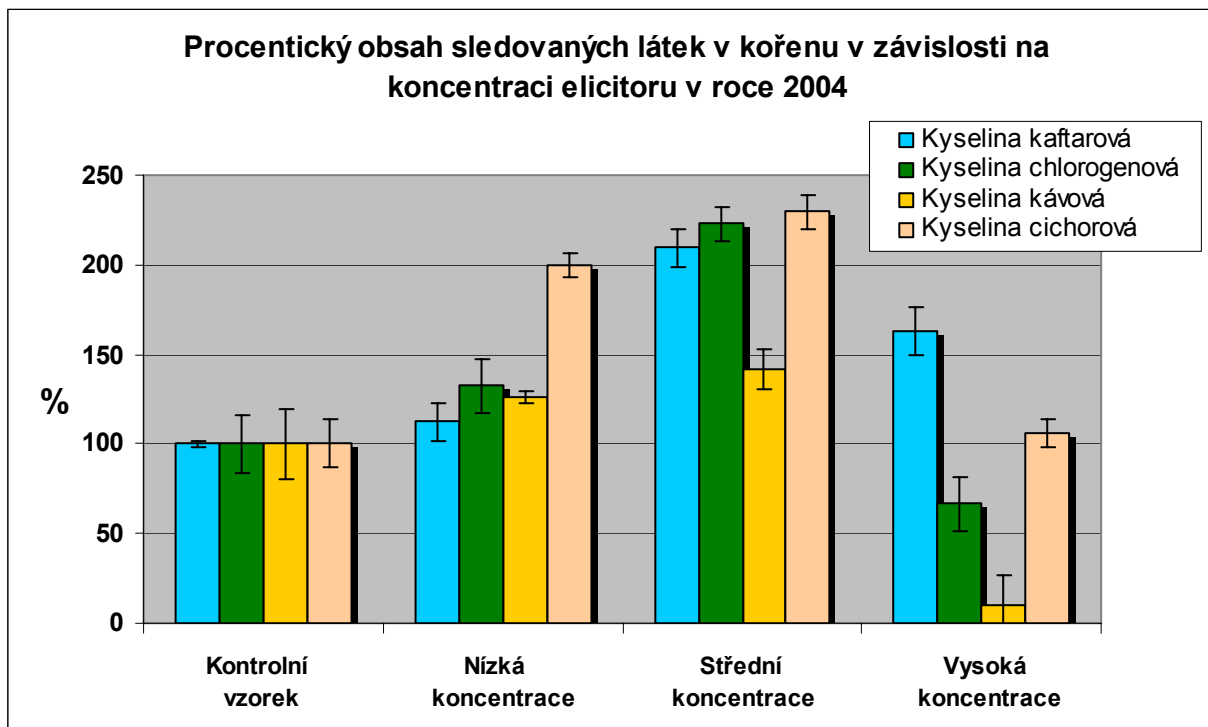
V roce 2004 po aplikaci elicitoru AS v nízké koncentraci došlo ke zvýšení obsahu všech sledovaných látek oproti kontrolnímu vzorku. Nejvíce se zvýšil obsah kyseliny cichorové o 100 % ($p \leq 0,001$), dále kyseliny chlorogenové o 33 %, kyseliny kávové o 26 % a nejmenší nárůst obsahu byl prokázán u kyseliny kaftarové o 12 %.

Po aplikaci elicitoru ve střední koncentraci došlo opět k nárůstu obsahu všech sledovaných látek oproti kontrolnímu vzorku. K nejvýraznějšímu nárůstu koncentrace došlo u kyseliny cichorové o 130 % ($p \leq 0,001$), poté u kyseliny chlorogenové o 123 % ($p \leq 0,001$). Obsah kyseliny kaftarové se zvýšil o 110 % ($p \leq 0,001$) a kyseliny kávové o 42 % ($p \leq 0,05$) oproti kontrolnímu vzorku.

Po aplikaci elicitoru ve vysoké koncentraci došlo u koncentrací dvou látek k jejich nárůstu a u dvou k poklesu. Obsah kyseliny kaftarové se zvýšil o 63 % ($p \leq 0,05$) a kyseliny cichorové o 6 %. K poklesu došlo u kyseliny chlorogenové o 33 % ($p \leq 0,05$) a u kyseliny kávové až o 90 % ($p \leq 0,001$) oproti kontrolnímu vzorku.

V tomto roce se nejvíce zvýšila koncentrace kyseliny cichorové po aplikaci elicitoru AS ve střední koncentraci. K nejvyššímu poklesu obsahu ze sledovaných látek došlo u kyseliny kávové po aplikaci elicitoru ve vysoké koncentraci (graf č. 10).

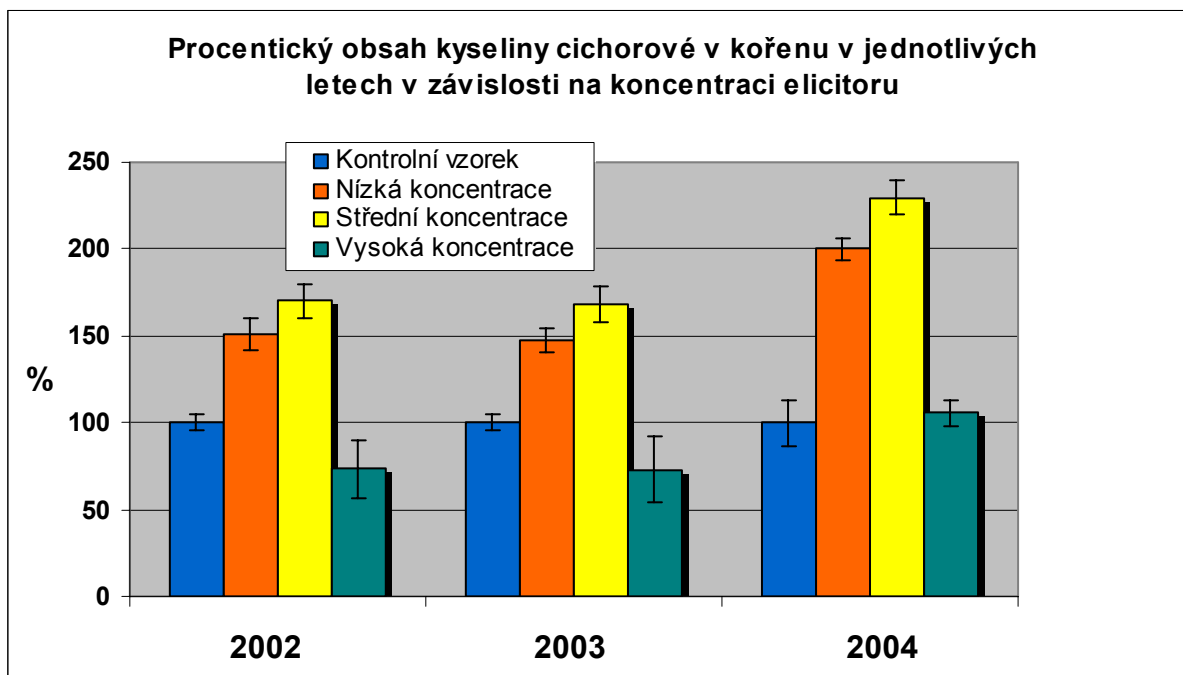
Graf č. 10



Vliv jednotlivých koncentrací elicitoru na sledované látky v kořenu v porovnání let 2002 - 2004

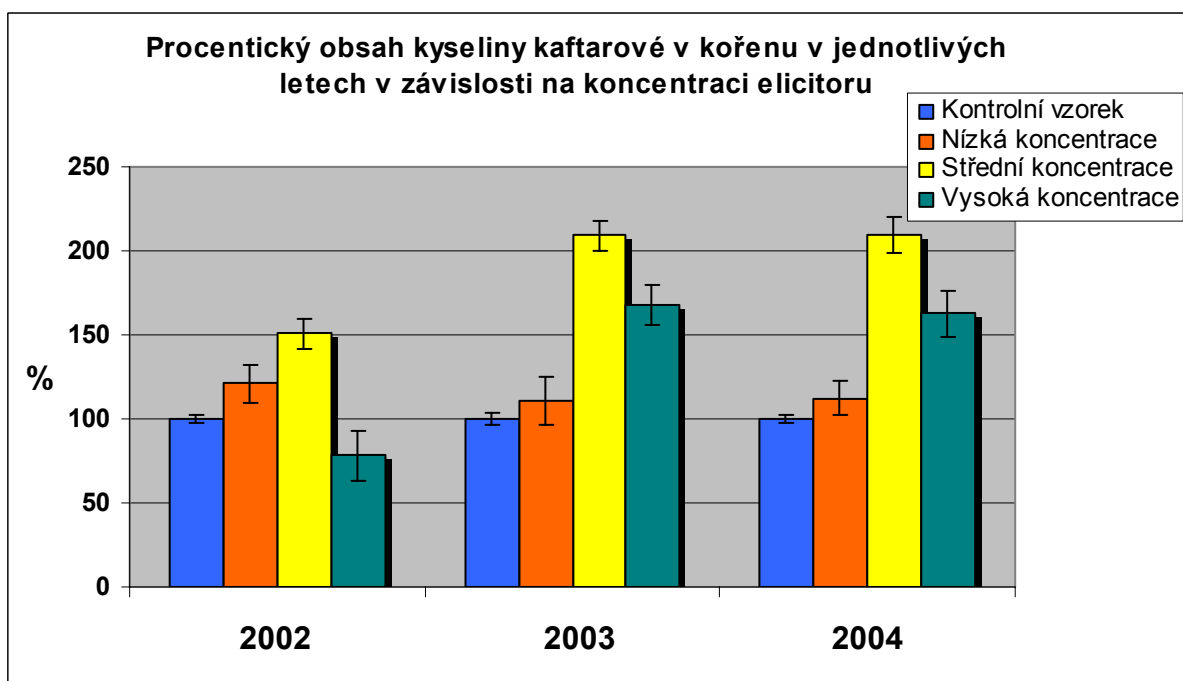
Z grafu č. 11 je zřejmé, že největší vliv na zvýšení koncentrace kyseliny cichorové v kořenu během sledovaných let měla střední koncentrace elicitoru AS. Nízká koncentrace elicitoru působila také na zvýšení obsahu kyseliny cichorové, ale ne v takové míře jako střední koncentrace. Vysoká koncentrace elicitoru působila během všech tří let na snížení obsahu této sledované látky.

Graf č. 11



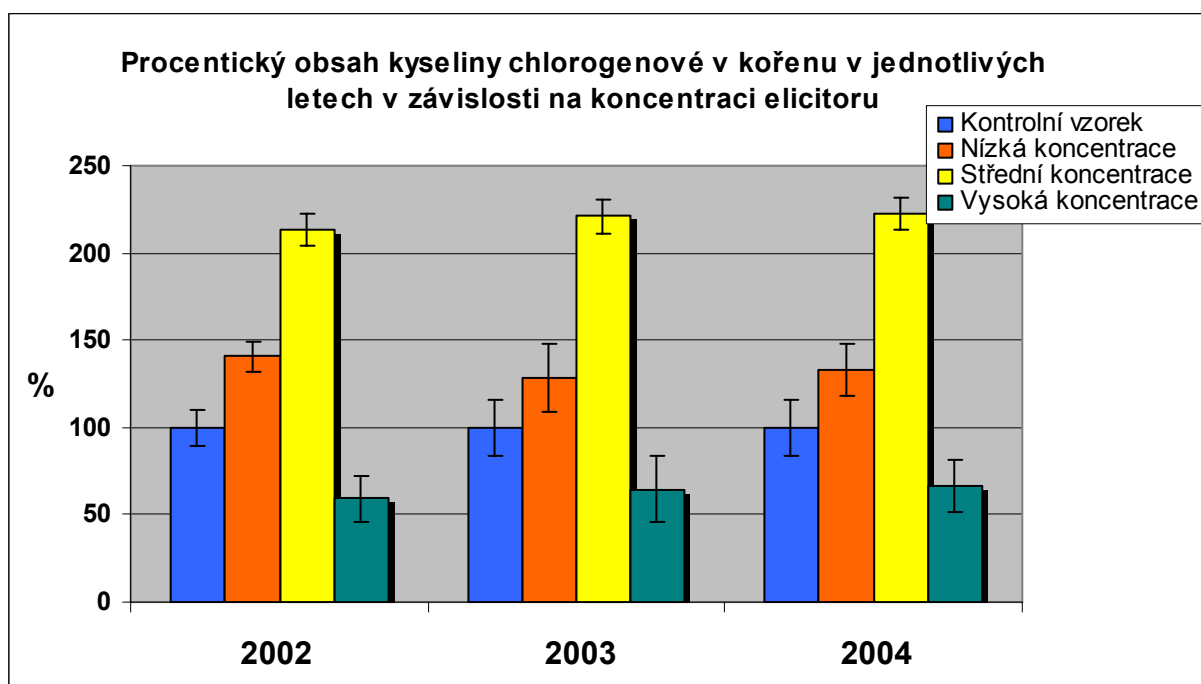
Největší vliv na zvýšení koncentrace kyseliny kaftarové v kořenu měla střední koncentrace elicitoru AS. Také vysoká koncentrace elicitoru měla vliv na zvýšení obsahu této kyseliny, kromě roku 2002. Nízká koncentrace neměla tak velký vliv na zvýšení obsahu sledované látky (graf č. 12).

Graf č. 12



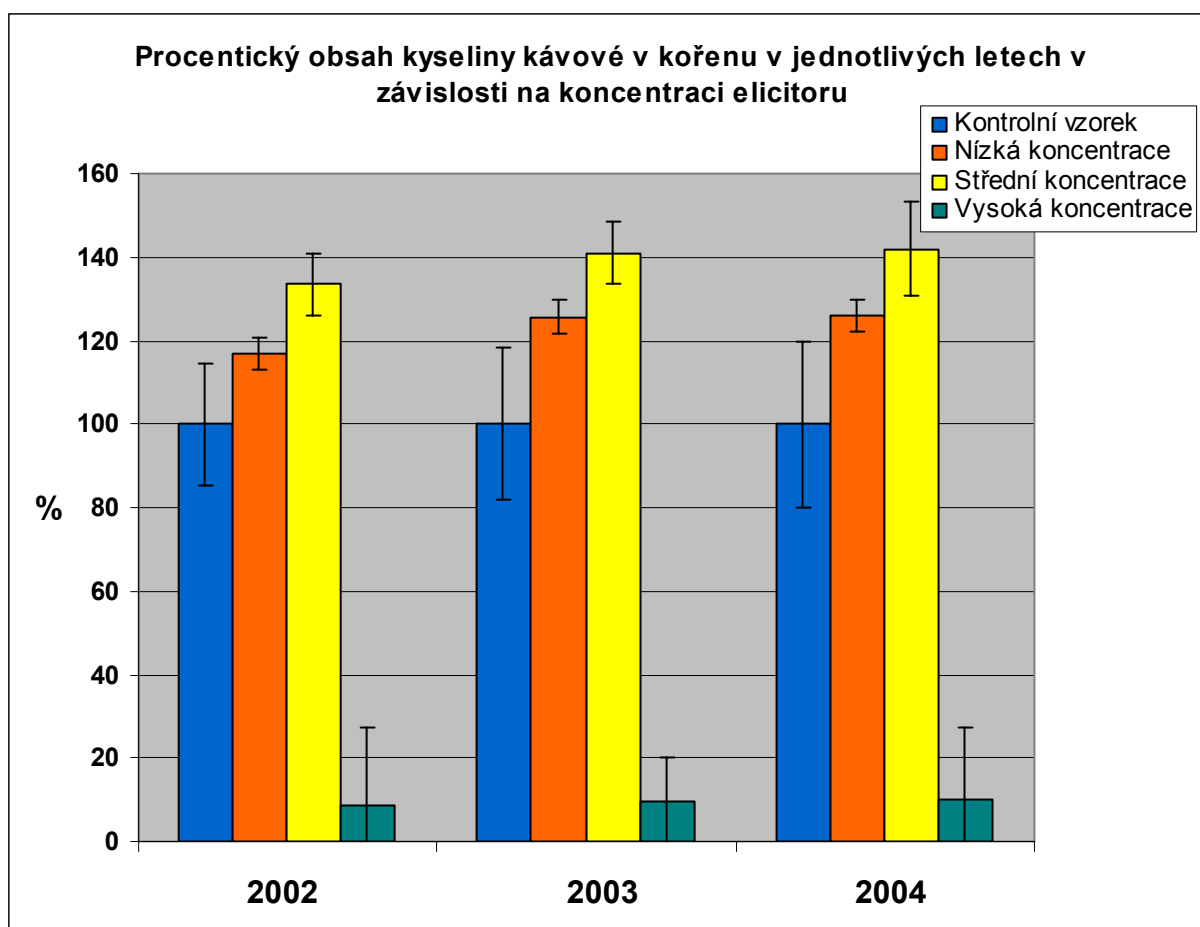
Na obsah kyseliny chlorogenové v kořenu měla největší vliv střední dávka elicitoru AS ve všech třech sledovaných letech. Koncentrace sledované látky byla více než o 100 % vyšší, oproti kontrolnímu vzorku. Nízká dávka elicitoru způsobila také zvýšení obsahu této kyseliny, ale ne tak výrazně jako dávka střední. Vysoká dávka elicitoru měla za následek snížení obsahu kyseliny chlorogenové téměř na polovinu hodnot kontrolního vzorku a to ve všech třech letech (graf č. 13).

Graf č. 13



Také u kyseliny kávové měla střední dávka elicitoru AS největší vliv na obsah této sledované látky v kořenu. Koncentrace kyseliny byla vyšší téměř o 40 % v porovnání s kontrolním vzorkem. Nízká koncentrace měla také za následek zvýšení obsahu kyseliny kávové, ale pouze okolo 20 %. Vysoká dávka elicitoru snížila obsah kyseliny kávové až na 10 % obsahu u kontrolního vzorku ve všech letech (graf č. 14).

Graf č. 14



V tomto pokusu se u neošetřených kontrol potvrdilo, že stáří rostlin nemá žádný vliv na obsah kyseliny kaftarové a cichorové (KREFT, 2005). Ve všech třech letech byl jejich obsah v nadzemní hmotě i kořenu podobný. A to nejenom u dvou jmenovaných kyselin, ale také i u kyselin chlorogenové a kávové. KREFT (2005) to potvrdil dokonce u šestiletého pokusu s rostlinou *Echinacea purpurea*.

GRAY et al. (2003) prokázali, že kontrolovaný stres v době začátku kvetení stimuluje nárůst sušiny kořene a zvyšuje obsah cichorové kyseliny v kořenu. Nemá ovšem žádný vliv na kyselinu chlorogenovou a ostatní alkaloidy. Obsah sledované kyseliny cichorové se zvýšil o 67 % při porovnání druhého a třetího roku pěstování hmotnost sušiny kořene se zvýšila o 70 %. V našich pokusech se toto zvýšení kyseliny cichorové nepotvrdilo, její množství se z druhého na třetí rok prakticky nezměnilo. Obsah kyseliny chlorogenové zůstal také nezměněn.

U kořene došlo ve všech třech letech pěstování, po aplikaci elicitoru AS v nízké a střední koncentraci, k nárůstu všech sledovaných účinných látek. Na druhé straně, střední koncentrace elicitoru u nadzemní hmoty, kromě dvou malých nárůstů, vždy jejich obsah snížila. Kořen reagoval na elicitaci více pozitivně, než nadzemní hmota. Když porovnáme ve všech třech letech a všech koncentracích počet zvýšení a snížení oproti kontrole, tak u kořene došlo ve 27 případech k nárůstu a 9 k poklesu, v nadzemní hmotě to bylo naopak, pouze 13 nárůstů a 23 snížení. Rozptyl vlivu elicitoru oproti kontrolám se pohyboval u nadzemní hmoty od 89 % snížení po 69 % navýšení, u kořene od 91 % snížení až po 130 % zvýšení. S tím, že kořeny jsou citlivější vůči stresu souhlasí i GRAY et al., (2003), podle kterých jsou kořeny nejcitlivějším orgánem rostliny, který svými morfologickými a fyziologickými vlastnostmi reaguje podstatně citlivěji na vnější prostředí, než-li nadzemní část rostlin.

Při porovnání jednotlivých kyselin zjistíme, že obsah kyseliny kaftarové byl vyšší u nadzemní hmoty než u kořene, obsah kyseliny cichorové byl naopak vyšší u kořene, což potvrdilo, že obsah kyseliny cichorové se snižuje od kořenů, přes listy až ke stonku (LETCHAMO et al. 2002). Na druhou stranu to nesouhlasí s výsledky STUARTA a WILLSE (2000), kteří našli vyšší obsah kyseliny cichorové v nadzemní hmotě oproti kořenu (1,75:1). Obsah kyseliny chlorogenové byl vyšší u nadzemní hmoty oproti výsledkům uváděným v literatuře jsou to hodnoty nízké. Obsah kyseliny kávové dosáhl vyšších hodnot v kořenu.

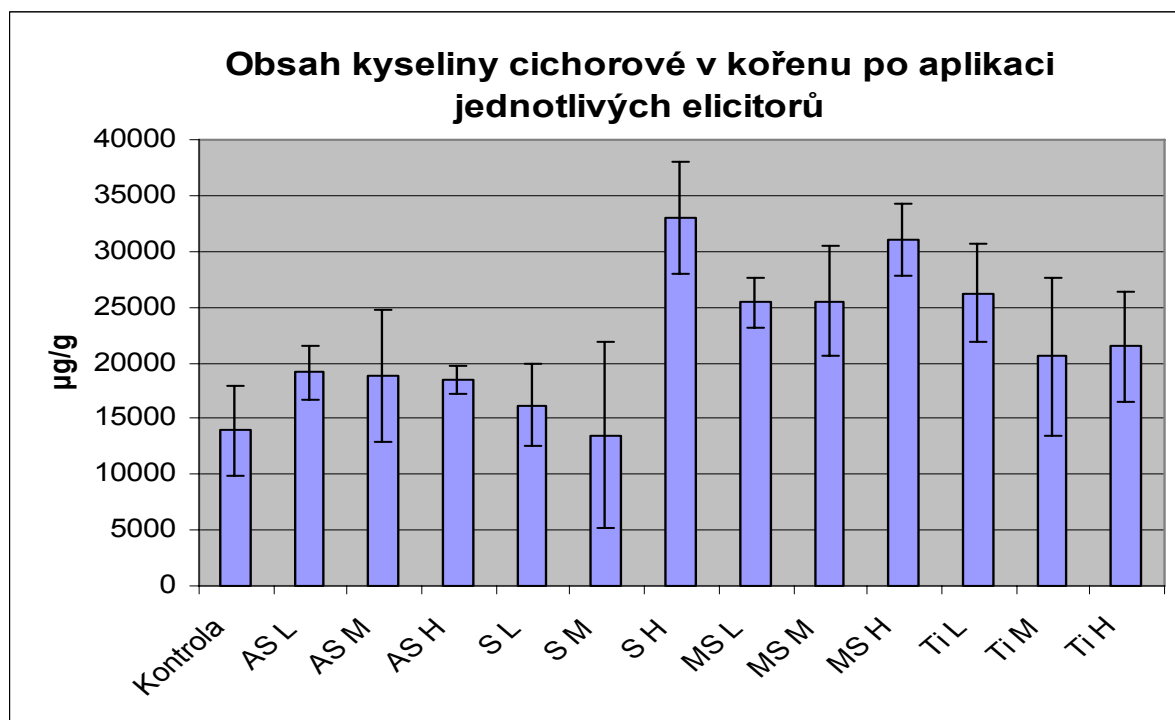
5.2. ELICITAČNÍ ÚČINEK FOLIÁRNÍ APLIKACE VYBRANÝCH KYSELIN DOLNÍ PĚNA

Jako elicitory byly použity následující látky: Kyselina acetylsalicylová (značena AS), kyselina salicylová (S), methylsalicylát (MS) a askorbát titanu (značen Ti). Nízká koncentrace elicitoru je značena písmenem L (Low), střední koncentrace písmenem M (Medium) a vysoká koncentrace písmenem H (High).

5.2.1. Vliv jednotlivých koncentrací elicitorů na obsah sledovaných látek v kořenu

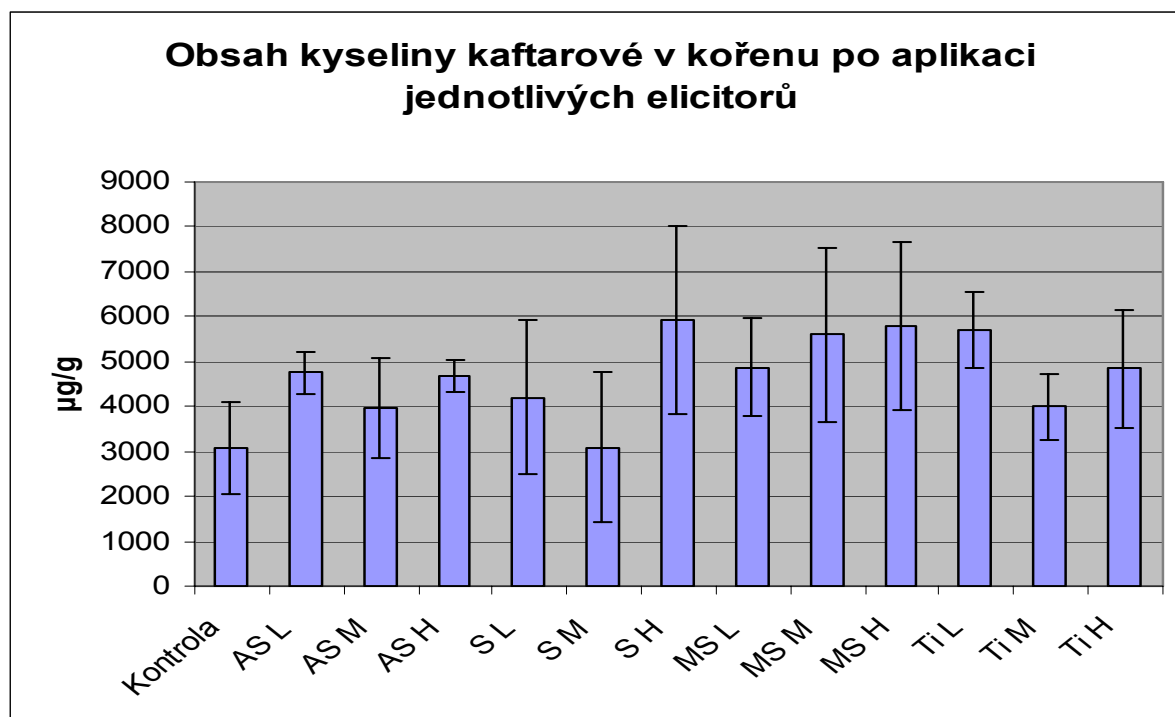
U kyseliny cichorové došlo kromě jediné výjimky k jejímu zvýšení po aplikaci všech elicitorů u všech koncentrací. K nejvyššímu nárůstu došlo u salicylové kyseliny, při vysoké koncentraci a to o 137 % a methylsalicylátu při aplikaci vysoké koncentrace o 123 %. Oba tyto výsledky jsou statisticky prokazatelné ($p \leq 0,05$). Jedinou vzpomínanou výjimkou bylo snížení o 3 % u střední koncentrace kyseliny salicylové (graf č. 15).

Graf č. 15



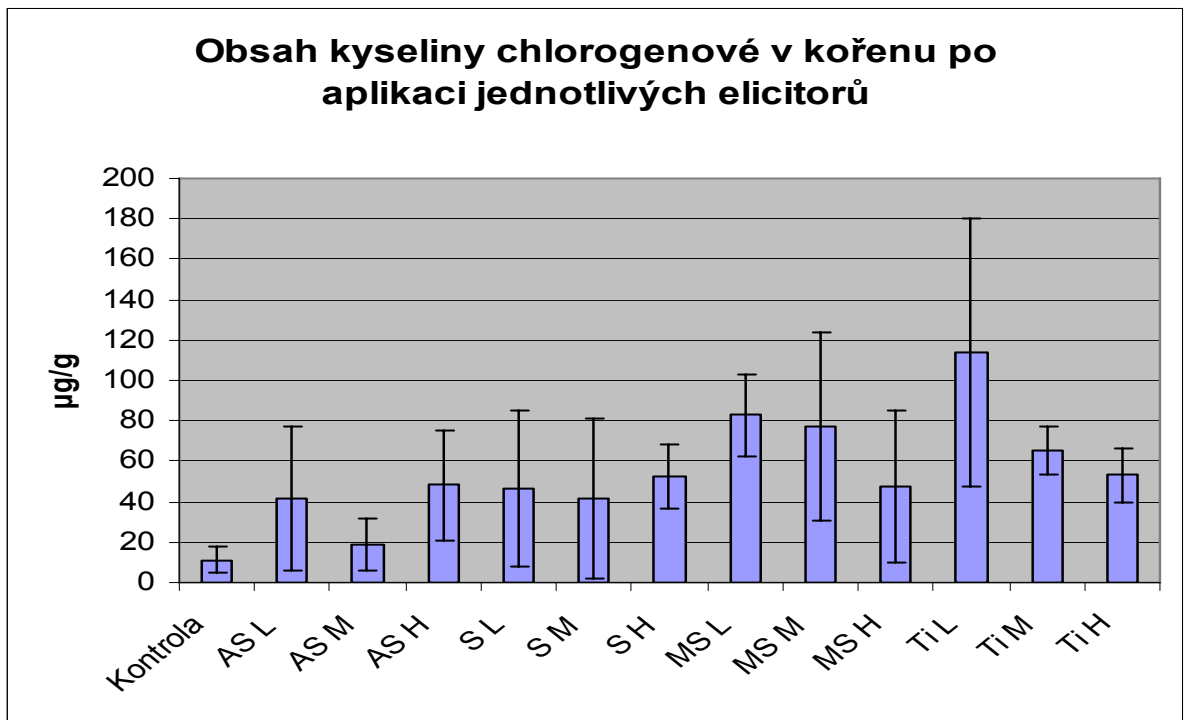
Po aplikaci elicitorů došlo u kyseliny kaftarové k jejímu nárůstu, oproti kontrole, ve všech případech. Nejnižší nárůst byl u střední koncentrace kyseliny salicylové (0,65 %), nejvyšší nárůst byl opět u vysoké koncentrace kyseliny salicylové (93 %) a vysoké koncentrace methylsalicylátu (88 %). Vysoký nárůst způsobila také nízká dávka titanu (85 %) a střední dávka methylsalicylátu (82 %). Žádný z těchto nárůstů však nebyl statisticky průkazný (graf č. 16).

Graf č.16



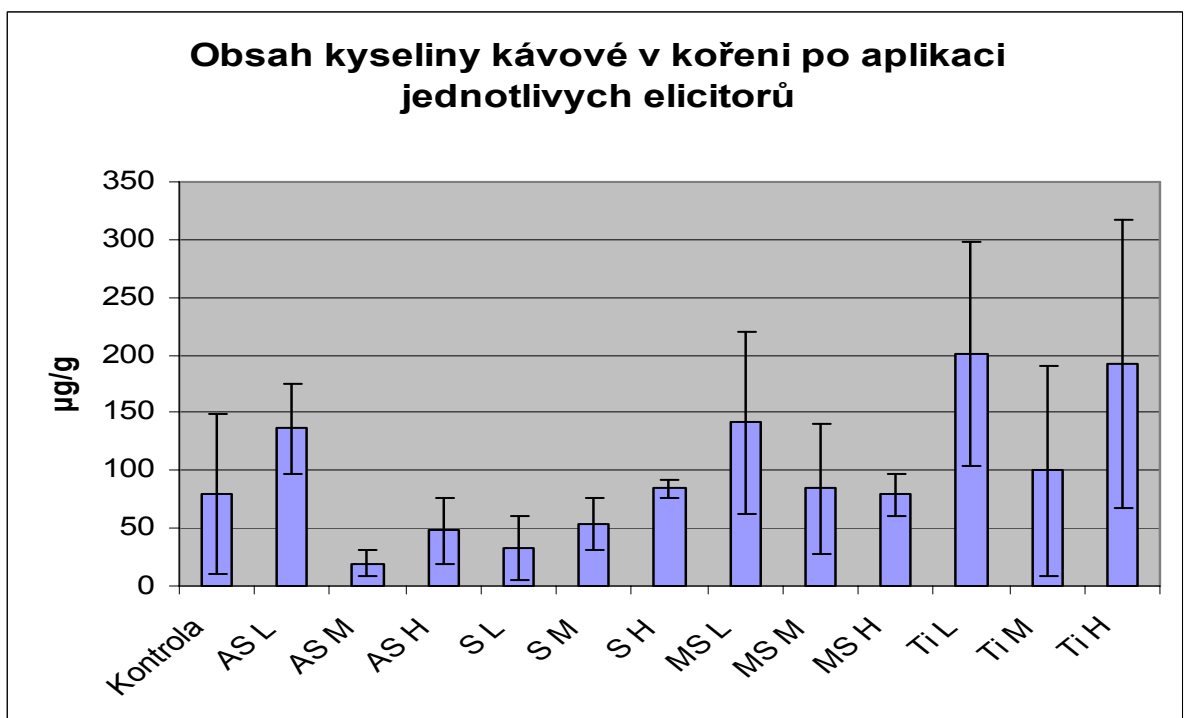
U kyseliny chlorogenové došlo také u všech elicitorů k jejímu nárůstu oproti kontrole. Nejvyšší, desetinásobný nárůst byl u nízké dávky titanu ($p \leq 0,05$), dále nízká dávka methylsalicylátu zvýšila obsah kyseliny chlorogenové o 632 % a střední dávka methylsalicylátu o 580 %. K nejnižšímu nárůstu došlo u střední dávky kyseliny acetylsalicylové a to o 68 % (graf č. 17).

Graf č.17



Ani jedno statisticky průkazné zvýšení či snížení obsahu kyseliny kávové se nepodařilo prokázat (graf č. 18). Nejvyšší nárůst oproti kontrole měla nízká (153 %) a vysoká (141 %) koncentrace titanu, naopak největší snížení bylo zaznamenáno u střední koncentrace kyseliny acetylsalicylové (o 75 %).

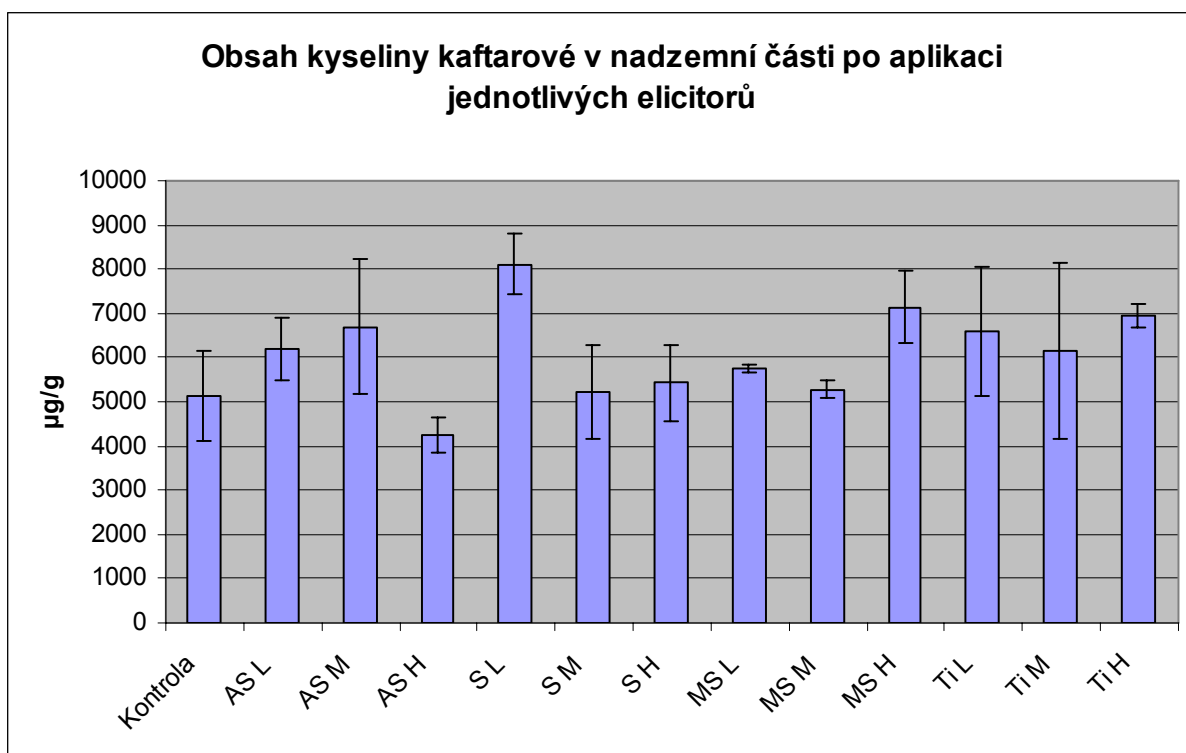
Graf. č. 18



5.2.2. Vliv jednotlivých koncentrací elicitorů na obsah sledovaných látek v nadzemní hmotě

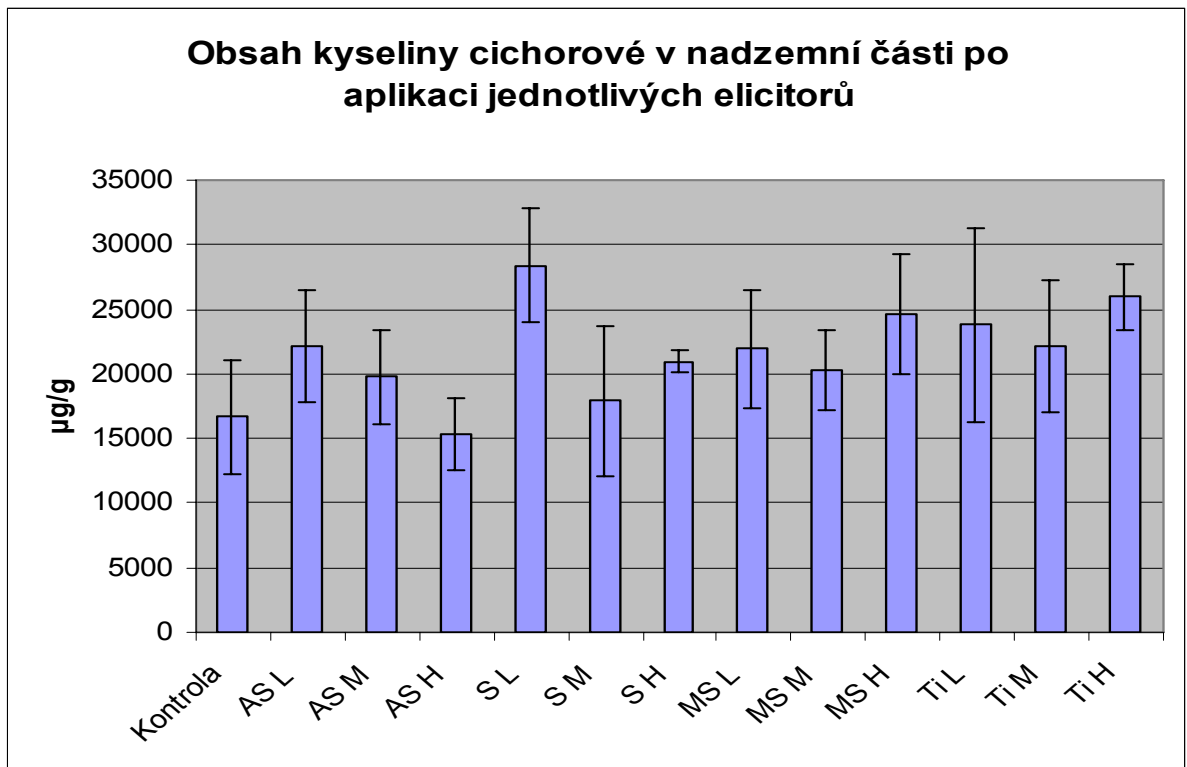
U kyseliny kaftarové v nadzemní hmotě došlo k nejvyššímu nárůstu u nízké koncentrace kyseliny salicylové a to o 58 %. Toto zvýšení bylo statisticky průkazné ($p \leq 0,05$). Ke statisticky průkaznému vlivu došlo i u kyseliny acetylsalicylové ($p \leq 0,05$) a u methylsalicylátu ($p \leq 0,05$). K nárůstu došlo i v případě všech koncentrací titanu, tady se však statistická závislost neprokázala (viz graf č. 19).

Graf č. 19



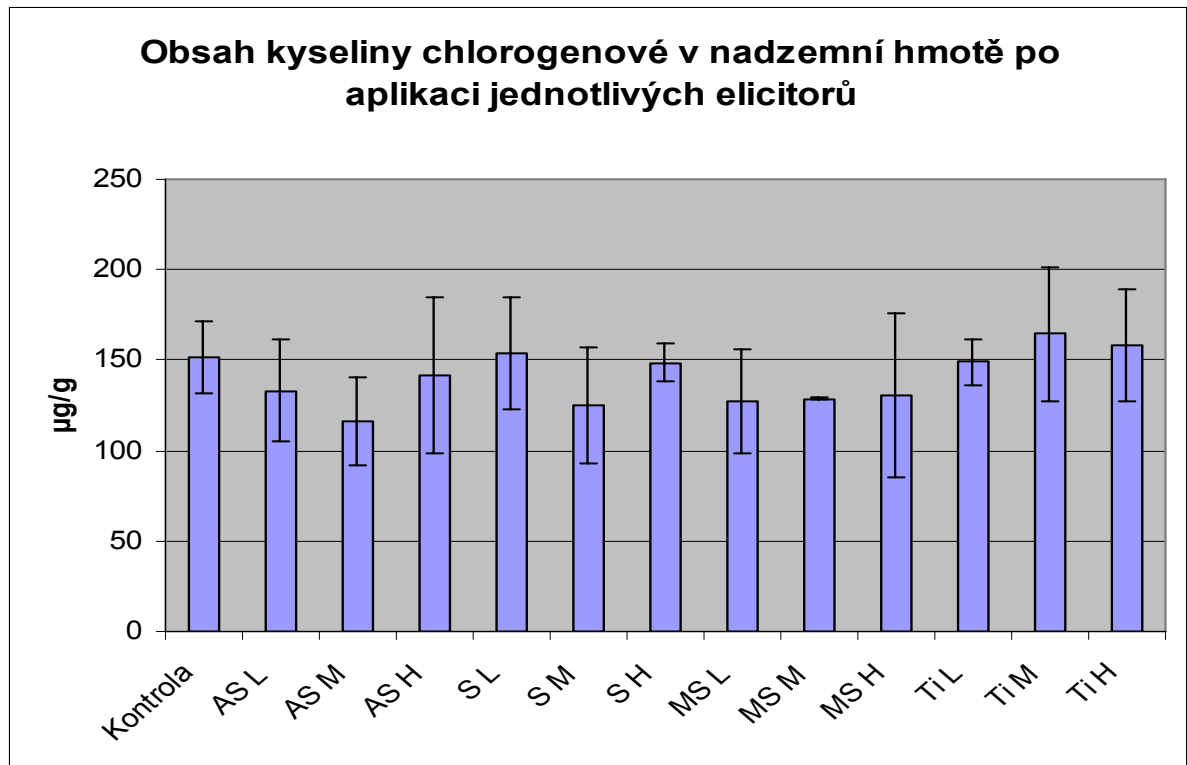
Pouze u jediného elicitoru, a to u vysoké koncentrace kyseliny acetylsalicylové, došlo po aplikaci ke snížení obsahu kyseliny cichorové. Jednalo se o snížení o 8 %. Naopak nejvyšší nárůst měla nízká koncentrace kyseliny salicylové a to o 70 %. Tento nárůst byl statisticky průkazný ($p \leq 0,05$) viz graf č. 20.

Graf č. 20



U kyseliny chlorogenové došlo pouze u 3 elicitorů k nepatrnému nárůstu oproti kontrole, naopak většina elicitorů její obsah snížila. Největší nárůst měla střední koncentrace titanu a to o 8 %, největší pokles zaznamenala střední koncentrace kyseliny acetylsalicylové (23 %). Žádná z hodnot nebyla statisticky průkazná (viz graf č. 21).

Graf č. 21

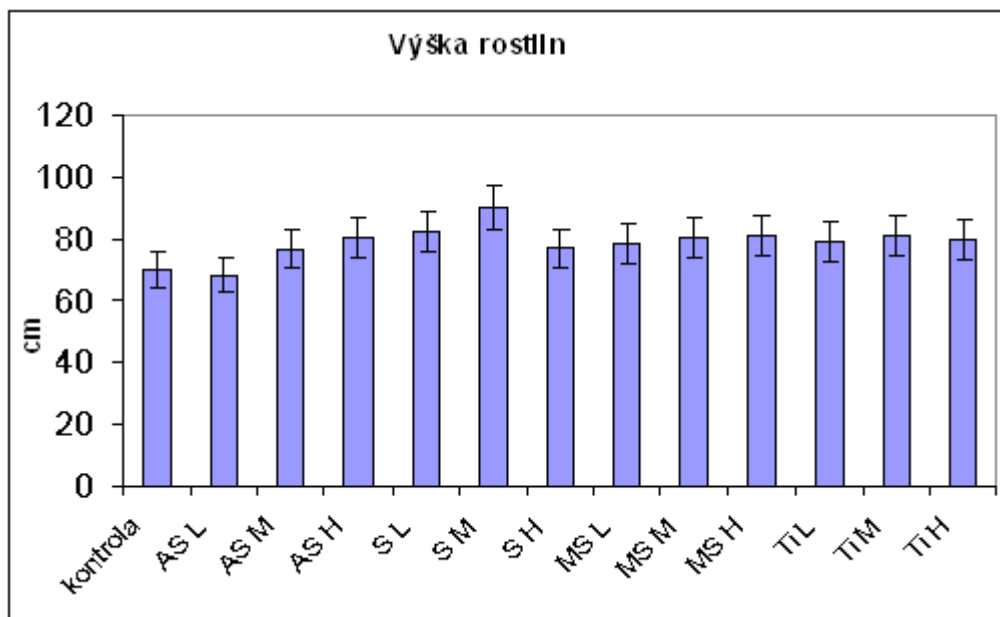


5.2.3. Vliv elicitorů na vybrané biologické parametry

Kromě vlivu elicitorů na obsah účinných látek v kořenech a nadzemní hmotě rostliny *Echinacea purpurea*, byl zkoumán také jejich vliv na některé biologické parametry.

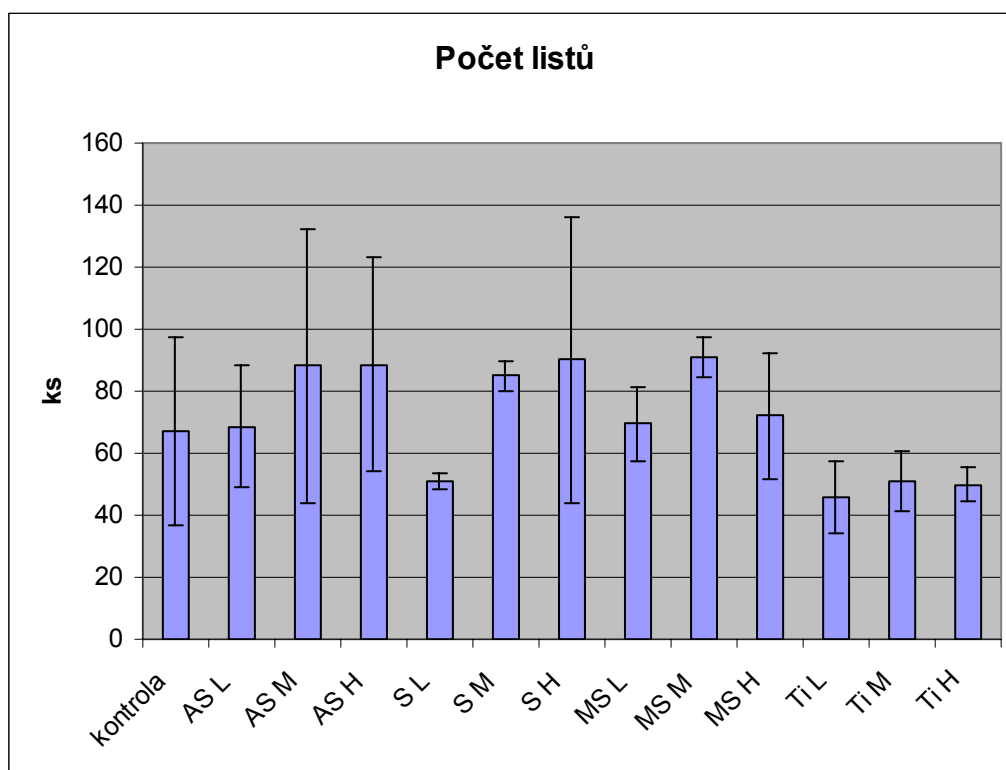
Prvním parametrem je výška rostlin. Z následujícího grafu č. 22 vyplývá, že pouze u nízké dávky kyseliny acetylsalicylové došlo k mírnému snížení rostlin (o 2,5 %). U ostatních elicitorů došlo naopak k vyššímu vzrůstu rostlin, nejvíce u střední dávky kyseliny salicylové (o 28,5 %), tento nárůst je statisticky průkazný ($p \leq 0,05$).

Graf č. 22



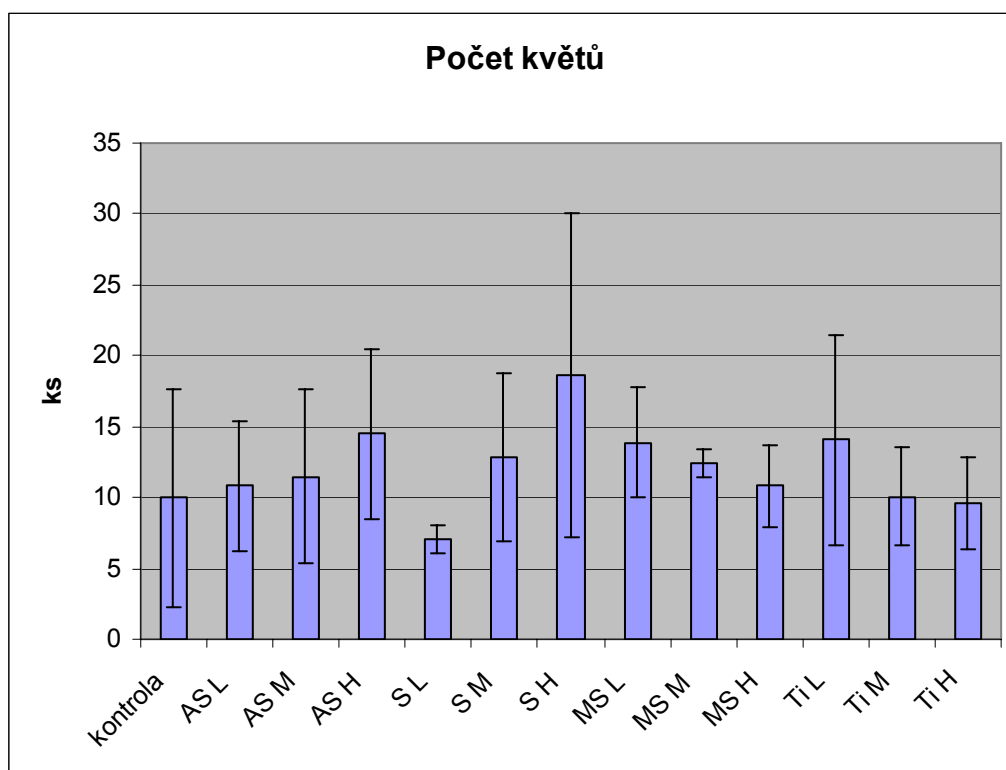
U počtu listů nebyla nalezena žádná statistická závislost. U prvních třech elicitorů došlo při všech koncentracích (kromě nízké koncentrace salicylové kyseliny) ke zvýšení počtu listů, naopak titan vždy jejich počet snížil. Nejvíce, o 35 %, vzrostl počet listů po aplikaci střední dávky methysalicylátu a o 34 % po aplikaci vysoké dávky salicylové kyseliny. Naopak nejvíce, o 32 %, klesl počet listů po aplikaci nízké dávky titanu (viz graf č. 23).

Graf č. 23



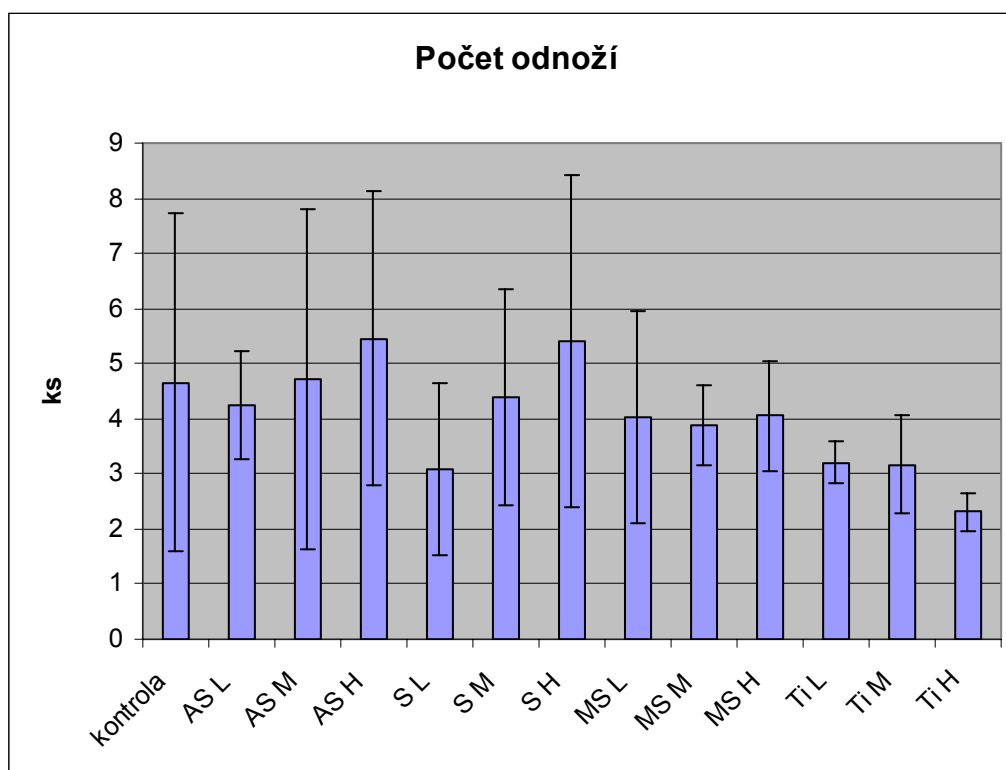
Ani u počtu květů nebyla nalezena žádná statistická závislost. Pouze nízká koncentrace kyseliny salicylové a vysoká koncentrace titanu snižovaly počet květů, a to o 29 % a 3 %, ostatní elicitory jejich počet vždy zvýšily. Nejvíce, jak ukazuje graf č. 24, vysoká koncentrace salicylové kyseliny o 88 %, vysoká koncentrace acetylsalicylové kyseliny o 46 % a nízká koncentrace titanu o 41 %.

Graf č. 24



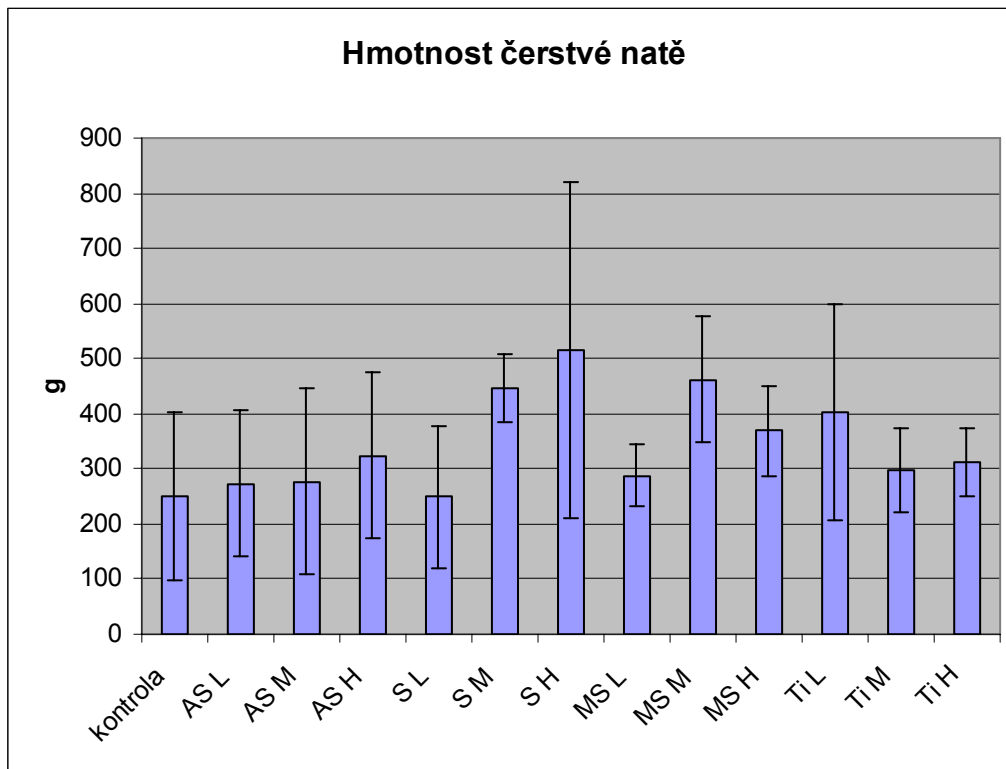
U počtu odnoží nebyla zjištěna žádná statistická závislost. Nejvyšší počty odnoží byly u vysokých koncentrací kyseliny acetylsalicylové a salicylové, které byly obě lepší než kontrola. U methylsalicylátu bylo taktéž nejvíce odnoží po aplikaci vysoké koncentrace, ale i tak to bylo méně než u kontroly. Titan byl ve všech koncentracích horší než kontrola (viz graf č. 25).

Graf č. 25

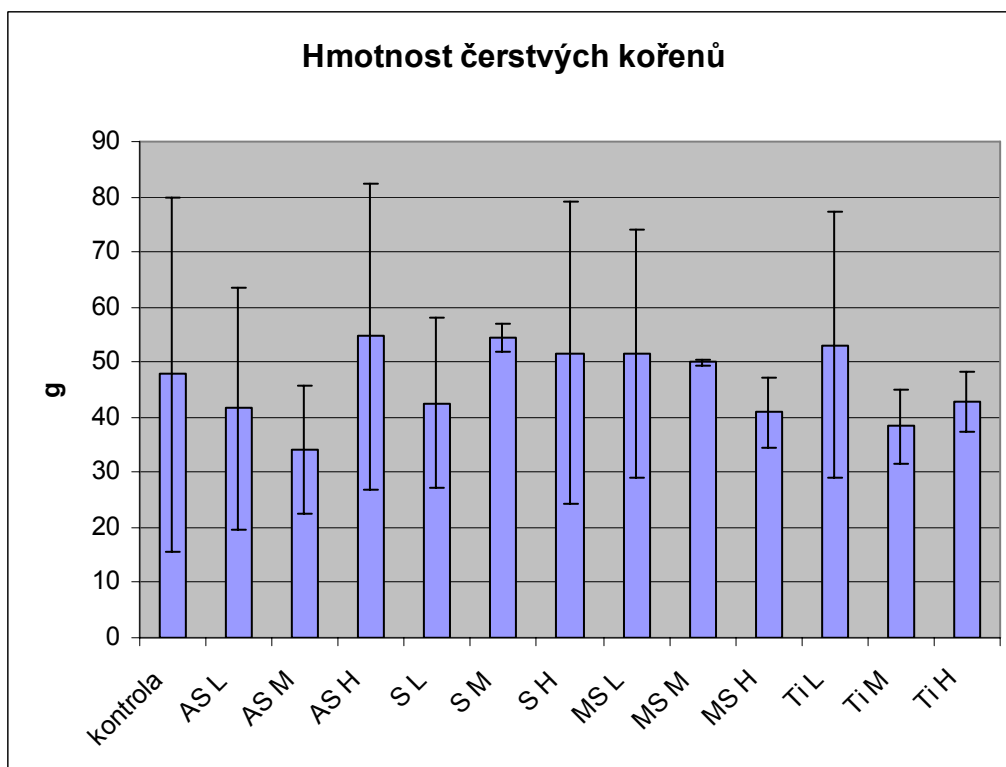


Hmotnost čerstvé natě byla u všech sledovaných elicitorů a koncentrací vyšší než u kontroly (viz graf č. 26). Nejvyšší nárůst byl u vysoké koncentrace salicylové kyseliny a to o 106 %. Dále u střední koncentrace methylsalicylátu o 85 %. Naopak nejnižší nárůst byl u nízké koncentrace kyseliny salicylové, a to o pouhé tři desetiny procenta. Opět u žádného výsledku nebyla zjištěna statistická závislost.

Graf č. 26

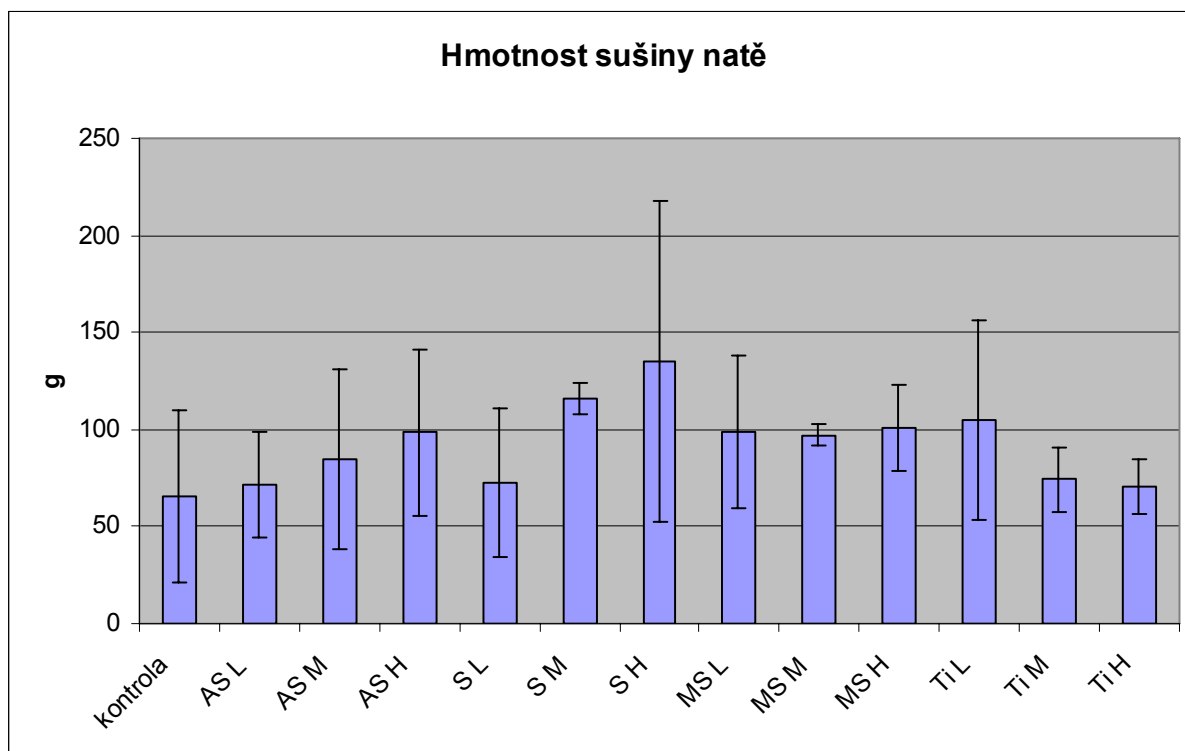


U hmotnosti čerstvých kořenů také nebyla zjištěna žádná statistická závislost. Rozdíly oproti kontrole byly malé, nejvyšší nárůst měla vysoká koncentrace kyseliny acetylsalicylové (15 %), naopak největší pokles (o 29 %) měla střední koncentrace této kyseliny (viz následující graf č. 27).



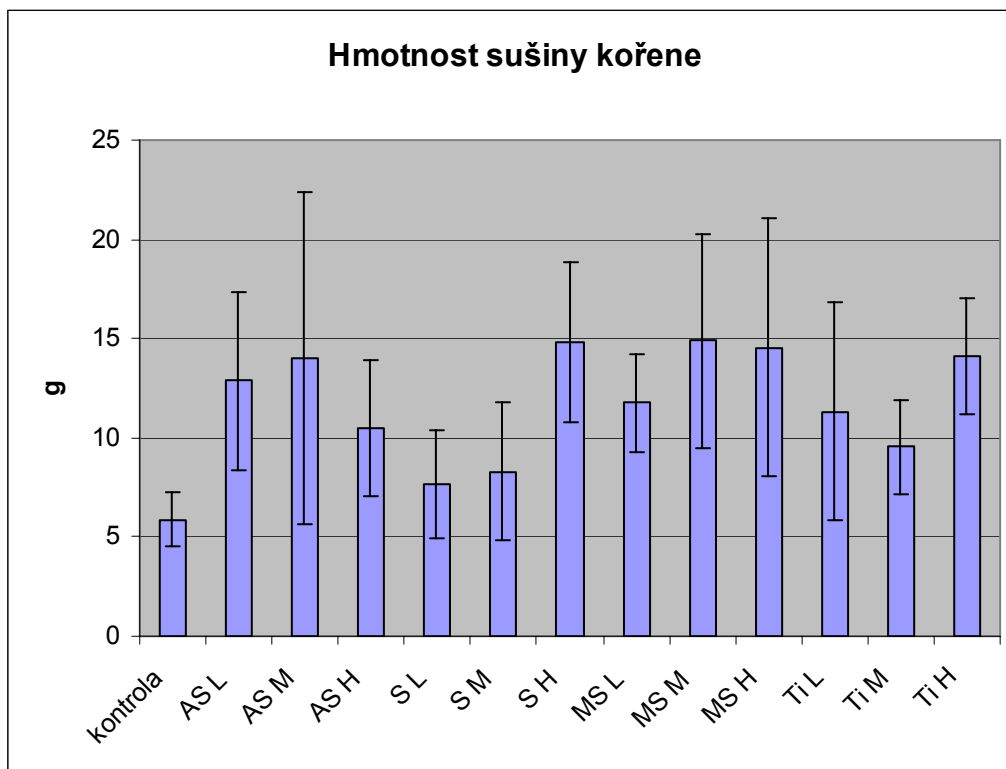
Všechny elicitory zvýšily hmotnost sušiny natě proti kontrole. Nejvíce vysoká koncentrace salicylové kyseliny o 105 %, dále střední koncentrace této kyseliny o 77 %. K nejmenšímu nárůstu došlo po aplikaci vysoké koncentrace titanu o 8 % a nízké koncentrace acetylsalicylové kyseliny o 9 % (viz. graf č. 28). Všechna zvýšení jsou ale statisticky neprůkazná.

Graf č. 28



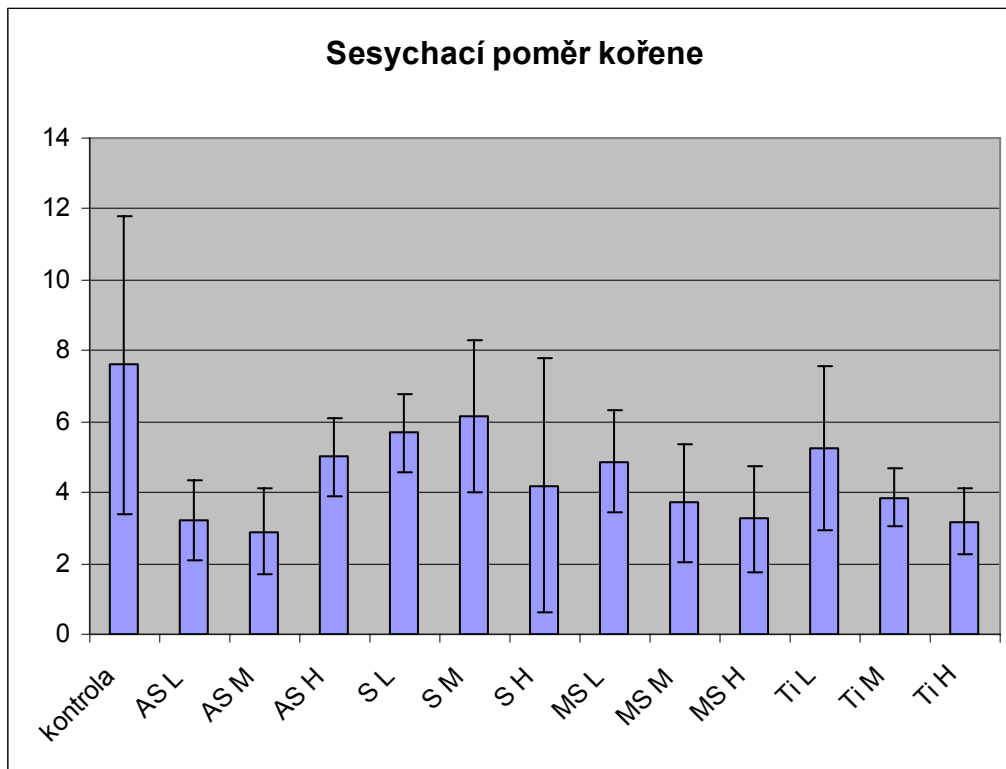
Všechny elicitory zvýšily hmotnost sušiny kořene (viz graf č. 29). Nejvíce o 154 % střední koncentrace methylsalicylátu a o 153 % vysoká koncentrace salicylové kyseliny. U kyseliny salicylové se jedná o statistickou průkaznost ($p \leq 0,05$), stejně jako u vysoké koncentrace titanu, kde došlo k nárůstu o 141 % ($p \leq 0,05$).

Graf č. 29

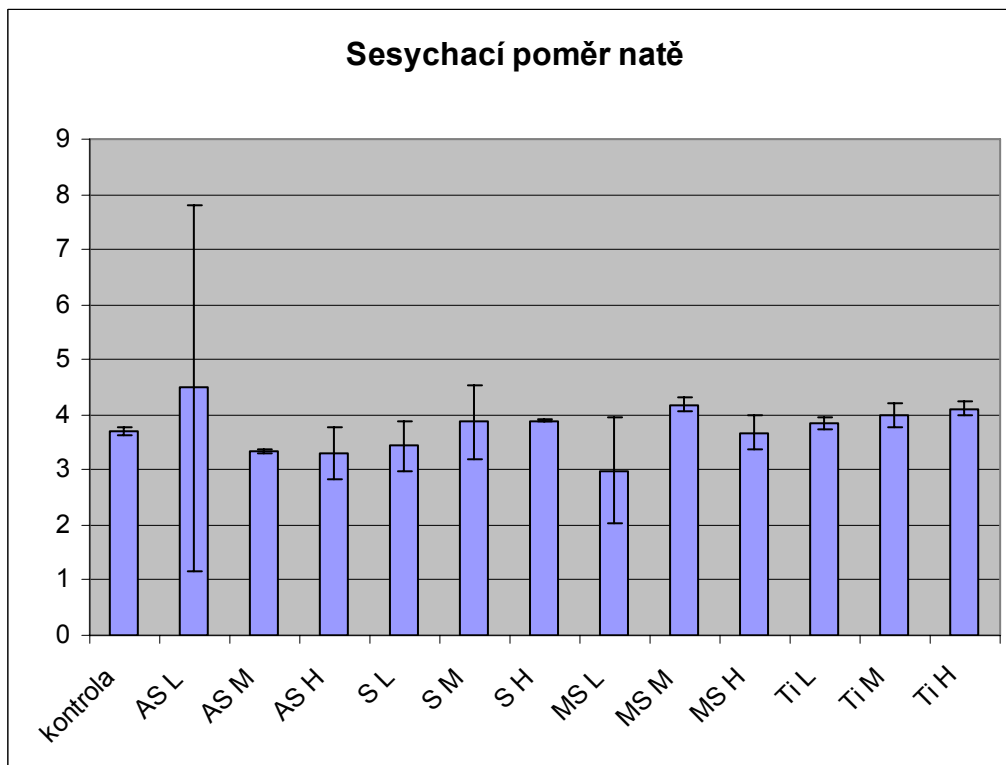


Byl sledován také sesychací poměr u kořene a natě. Sesychací poměr nám určuje z kolika dílů čerstvé hmoty vznikne jeden díl hmoty usušené. V grafu číslo 30 je vidět, že největší sesychací poměr kořene byl u kontroly (7,6 : 1), naopak nejmenší 2,9 : 1 byl u střední koncentrace kyseliny acetylsalicylové. Byl také statisticky průkazný ($p \leq 0,05$). V grafu č. 31 je vidět, že sesychací poměr natě je u všech elicitorů podobný, nicméně nejmenší je u nízké koncentrace methylsalicylátu 2,98 : 1, naopak nejvyšší je u vysoké koncentrace titanu 4,1 : 1, což je také statisticky průkazné ($p \leq 0,05$).

Graf č. 30



Graf č. 31



Jako nejzajímavější elicitor se ukázal askorbát titanu, námi syntetizovaný v laboratoři (KUŽEL et al., 2007), který jak u kořene, tak u nadzemní hmoty, kromě jedné výjimky, zvýšil obsah sledovaných kyselin.

V literatuře nebyla nalezena žádná zmínka o tom, že by někdo prováděl postřik rostliny *Echinacea purpurea* elicitory vybranými pro tuto práci (kyselina acetylsalicylová, kyselina salicylová, methyalsalicylát a askorbát titanu) na obsah vybraných účinných látek, kterými jsou kyselina kávová a její deriváty kyseliny cichorové, kaftarové a chlorogenové. Jako zajímavé se jeví porovnání vlivu kyseliny acetylsalicylové v předchozích dvou pokusech.

Tab. č. 7: Porovnání vlivu AS ve třetím roce pěstování u kořene

1. lokalita Protivín - kořen			2. lokalita Dolní Pěna - kořen		
kyselina kaftarová	µg/g suché hmoty	%*	kyselina kaftarová	µg/g suché hmoty	%*
kontrola	5285	100	kontrola	3076	100
nízká koncentrace	5931	12	nízká koncentrace	4759	55
střední koncentrace	11077	110	střední koncentrace	3974	29
vyšoká koncentrace	8609	63	vyšoká koncentrace	4677	52
kyselina cichorová			kyselina cichorová		
kontrola	21237	100	kontrola	13931	100
nízká koncentrace	42497	100	nízká koncentrace	19127	37
střední koncentrace	48740	130	střední koncentrace	18791	35
vyšoká koncentrace	22425	6	vyšoká koncentrace	18478	33
kyselina kávová			kyselina kávová		
kontrola	603	100	kontrola	79	100
nízká koncentrace	760	26	nízká koncentrace	136	72
střední koncentrace	856	42	střední koncentrace	19	-75
vyšoká koncentrace	59	-90	vyšoká koncentrace	47	-40
kyselina chlorogenová			kyselina chlorogenová		
kontrola	8,02	100	kontrola	11,33	100
nízká koncentrace	10,62	33	nízká koncentrace	41,5	266
střední koncentrace	17,85	123	střední koncentrace	19	68
vyšoká koncentrace	5,33	-33	vyšoká koncentrace	48,25	326

* procentické vyjádření zvýšení či snížení množství dané kyseliny oproti kontrole (100 %)

Ve výše uvedené tabulce jsou uvedeny hodnoty jednotlivých sledovaných kyselin v kořenu a jejich změna oproti kontrole po elicitaci kyselinou acetylsalicylovou, ve třetím roce pěstování. Je zde vidět, že kořen velice dobře reagoval na postřik, z 24 možností došlo k navýšení sledovaných látek ve 20 případech. Pokaždé k tomu došlo u nízké koncentrace AS, kde se nárůst pohyboval od 12 do 266 %. U střední koncentrace elicitoru došlo k nárůstu u všech kyselin i koncentrací, kromě jedné a to u kyseliny kávové v Dolní Pěně, kde obsah poklesl o 75 %. Zvýšení se pohybovala od 29 do 130 %. V lokalitě Protivín byla všechna zvýšení při střední koncentraci AS statisticky

průkazná. Vysoká koncentrace AS vyšla ze všech možností nejhůře i když paradoxně právě u ní byl zjištěn nejvyšší procentický nárůst oproti kontrole a to u kyseliny chlorogenové v lokalitě Dolní Pěna o 326 %. Přesto ve třech případech z osmi došlo ke snížení obsahu proti kontrolám a to u kyseliny kávové až o 90 %.

Zde je zřejmé, že po dosažení maximální produkce kyseliny kávové dochází ke snižování jejího obsahu. Toto snížení je pravděpodobně způsobeno její metabolizací a na odbourávání se pravděpodobně podílí i elicitor (BEIDERBECK, REICHLING, 1989).

Když mezi sebou porovnáme obě lokality ve kterých byly rostliny pěstované, tak zjistíme, že v lokalitě č. 1 (Protivín) byl vždy vyšší obsah kyselin kaftarové a cichorové, než u lokality č. 2 (Dolní Pěna).

Tyto dvě kyseliny jsou hlavními látkami, které jsou stanovovány při kvalitativním hodnocení finálních extraktů, při výkupu surové hmoty a při porovnávání jednotlivých preparátů z *Echinacea purpurea* (WILLS, STUART, 1999; KIM et al., 2000), jelikož vyšetření prodávaných produktů ukázalo, že mnoho výrobků dosahuje jen velmi nízkých hladin těchto kyselin (SCHIEFFER, 2000) a rostl tak tlak na standardizaci preparátů z léčivých bylin (MADDOCKS, 1985).

Oproti kyselinám kaftarové a cichorové, u kterých byl rozdíl mezi lokalitami maximálně dvojnásobný, u kávové kyseliny byl rozdíl až 45 krát větší (střední koncentrace). To je zřejmě dáno tím, že kyselina kávová je ze sledovaných kyselin nejlabilnější. U kyseliny chlorogenové nejsou rozdíly tak veliké, kontrola a střední koncentrace jsou si velmi podobné, nízká a vysoká koncentrace jsou však u lokality č. 2 mnohem účinnější.

Tab. č. 8: Porovnání vlivu AS ve třetím roce pěstování u nadzemní hmoty

1. lokalita Protivín-nadzemní hmota			2. lokalita Dolní Pěna - nadzemní hmota		
kyselina kaftarová	µg/g suché hmoty	%*	kyselina kaftarová	µg/g suché hmoty	%*
kontrola	10444	100	kontrola	5132	100
nízká koncentrace	8666	-17	nízká koncentrace	6200	21
střední koncentrace	12376	19	střední koncentrace	6696	30
vysoká koncentrace	13818	32	vysoká koncentrace	4232	-18
kyselina cichorová			kyselina cichorová		
kontrola	17165	100	kontrola	16657	100
nízká koncentrace	29011	69	nízká koncentrace	22133	33
střední koncentrace	16730	-3	střední koncentrace	19781	19
vysoká koncentrace	5713	-67	vysoká koncentrace	15297	-8
kyselina kávová			kyselina kávová		
kontrola	392	100	kontrola		
nízká koncentrace	449	15	nízká koncentrace		
střední koncentrace	120	-69	střední koncentrace		
vysoká koncentrace	106	-73	vysoká koncentrace		
kyselina chlorogenová			kyselina chlorogenová		
kontrola	49	100	kontrola	151	100
nízká koncentrace	26	-46	nízká koncentrace	133	-12
střední koncentrace	46	-7	střední koncentrace	116	-23
vysoká koncentrace	14	-70	vysoká koncentrace	141	-7

* procentické vyjádření zvýšení či snížení množství dané kyseliny oproti kontrole (100 %)

hodnoty kys. kávové budou doplněny.

U nadzemní hmoty je situace poněkud jiná než u kořene. Většina hodnot se po aplikaci elicitoru AS snížila. U kyseliny chlorogenové dokonce došlo ke snížení u všech třech koncentrací v obou lokalitách. Tyto výkyvy oproti kontrole nebyly tak velké jako u kořene, největší pokles byl o 70 % a nejvyšší nárůst o 69 %. U lokality č. 1 byl u kyseliny kaftarové jak pokles u nízké koncentrace, tak její zvýšení u střední a vysoké koncentrace statisticky průkazné. Dále bylo statisticky průkazné navýšení kyseliny cichorové při nízké koncentraci AS a její snížení při koncentraci vysoké. Statisticky průkazné snížení bylo u střední a vysoké koncentrace AS u kyseliny kávové a u nízké a vysoké koncentrace u kyseliny chlorogenové.

Když porovnáme obě lokality, tak stejně jako u kořene je v lokalitě č. 1 (Protivín) vyšší obsah kyseliny kaftarové, rozdíl u kyseliny cichorové již není tak velký jako u kořene, její obsah v nadzemní hmotě je spíše velmi podobný. Obsah kyseliny chlorogenové je stejně jako u kořene vyšší u lokality č. 2 (Dolní Pěna), tentokrát je její obsah více podobný, maximální pokles oproti kontrole je jenom 23 % oproti 326 % nárůstu u kořene.

Při porovnání nadzemní hmoty a kořene v obou lokalitách můžeme říct, že elicitor AS měl pozitivní vliv na obsah účinných látek v kořeni a naopak negativní vliv na jejich obsah v nadzemní hmotě. Zatímco rozptyl vlivu elicitoru AS v kořeni sahal od snížení o 90 % až k navýšení o 326 %, u nadzemní hmoty byl tento výkyv menší od 73 % snížení až po 69 % navýšení.

Důvodem toho, že si výsledky lokalit 1 a 2 nejsou více podobné, může být i místo pěstování (vzdálenost mezi nimi cca 60 km vzdušnou čarou), což by potvrzoval KREFT (2005), který prokázal, že místo pěstování má prokazatelný vliv na obsah těchto kyselin (25 oblastí ve Slovinsku), ale nemělo žádný vliv na morfologické parametry (průměrná hmotnost listů, stonků a květů). Zavlažování rostlin zvýšilo výnos stonku a listů více než o 50 % a květů o 25 %, nemělo však žádný vliv obsah kyseliny kaftarové a cichorové.

Stejně jako předcházející autor, tak i LETCHAMO et. al., 2002, nepopírá vliv regionu na obsah kyseliny cichorové, opírá se o srovnání lokalit z pěti kontinentů, kde mezi regiony jsou sice rozdíly ve výnosech nadzemní hmoty (4600 – 8500 kg/ha), ale procentický obsah kyseliny cichorové se pohybuje mezi 1,72 – 2,86 % v sušině.

S oběma těmito názory na vliv místa pěstování lze souhlasit, rozdíly mezi našimi lokalitami samozřejmě jsou, ale pokud budeme brát v úvahu kontroly neošetřené elicitory, nejsou nijak významné.

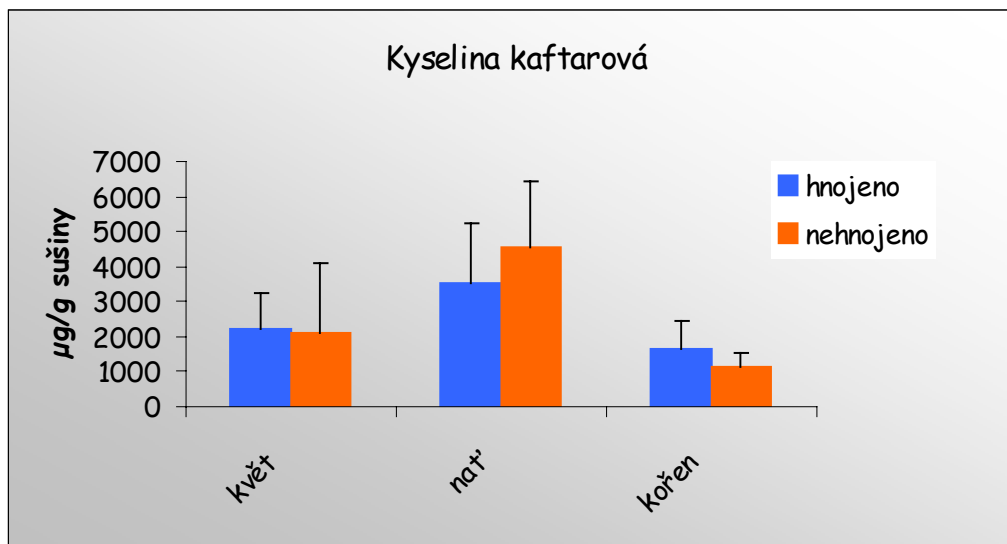
Dalším důvodem mohou být i rozdílné půdní podmínky na stanovištích, viz tabulky. V případě lokality č. 1 (Protivín) jsou zřejmě lepší, než u lokality Dolní Pěna. Někdy však mohou horší podmínky stimulovat produkci podobných látek. Je prokázáno, že stimulaci tvorby ochranných látek, které jsou v určité vazbě na tvorbu farmakologicky účinné látky, lze dosáhnout hnojením s neharmonickým poměrem živin (PAŠEK, 1997). Zdá se, že neharmonická výživa stimuluje u rostliny *Echinacea purpurea* tvorbu obranných látek zajišťujících pro ni přežití v obtížných podmínkách. Až o 60 % účinných látek více vyprodukovaly rostliny, když byly hnojeny šestinásobným přebytkem minerálního dusíku k ostatním živinám za předpokladu, že dusík není imobilizován uhlíkatými zdroji (KOLÁŘ et al., 1998). Tento jev pozoroval KOLÁŘ (1981, 1982) už dříve u jetele lučního a vlčího bobu mnoholistého, kde došlo ke zvýšení produkce fytoestrogenů genisteinu.

5.3. ÚČINEK ČÍNSKÉHO BIOLOGICKÉHO HNOJIVA MOBILIZUJÍCÍHO PŮDNÍ FOSFOR

5.3.1. Maloparcelkový pokus

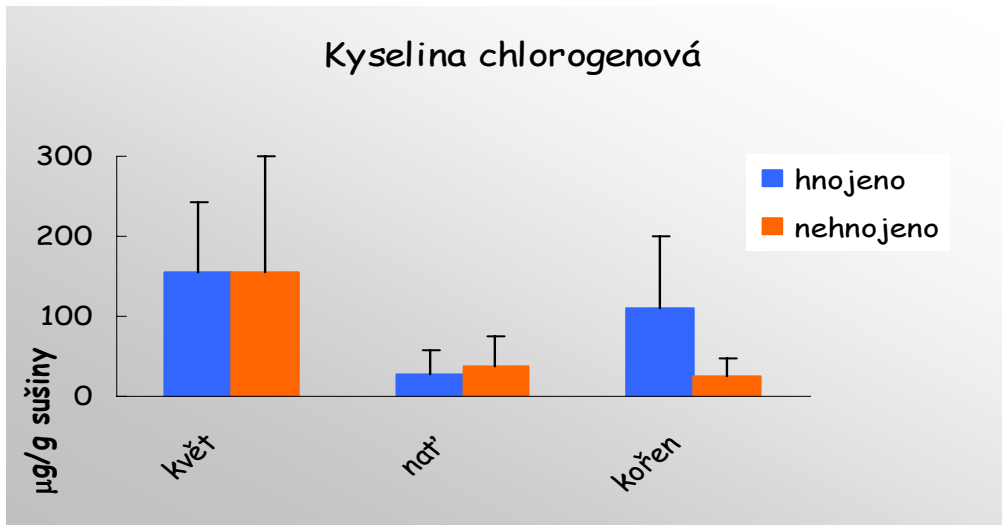
Při maloparcelkovém pokusu (graf č. 32) došlo při použití čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor u kaftarové kyseliny ke zvýšení jejího obsahu v kořeni o 45 %, v květech o 5 % a naopak v nati se její obsah snížil o 30 %. Zvýšení bylo v obou případech statisticky neprůkazné.

Graf č. 32: Obsah kyseliny kaftarové v jednotlivých částech rostliny



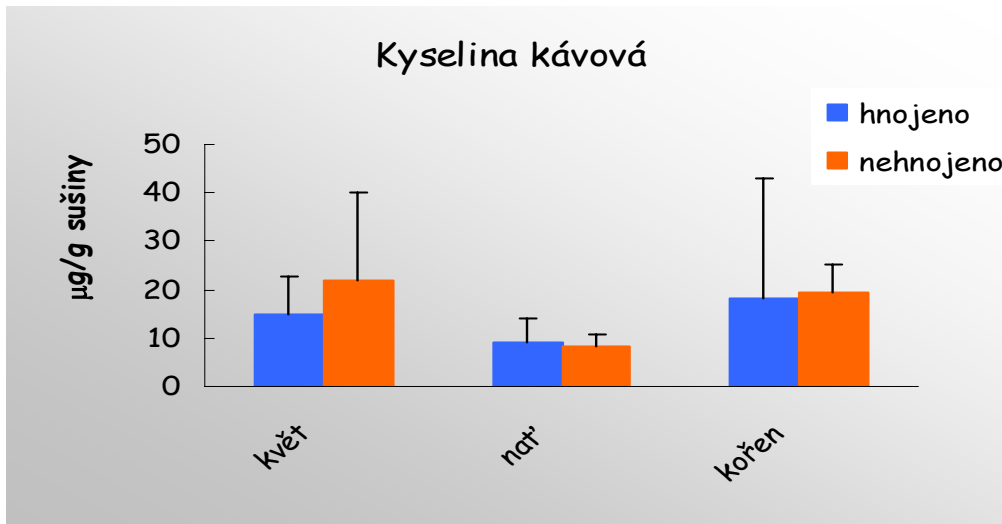
Obsah kyseliny chlorogenové v květech byl u obou variant téměř shodný (viz graf č. 33). U natě došlo k snížení obsahu o 25 %. V kořeni došlo k velmi výraznému navýšení obsahu o 318 %. Tato hodnota je ale statisticky málo průkazná ($p = 0,07$).

Graf č. 33: Obsah kyseliny chlorogenové v jednotlivých částech rostliny



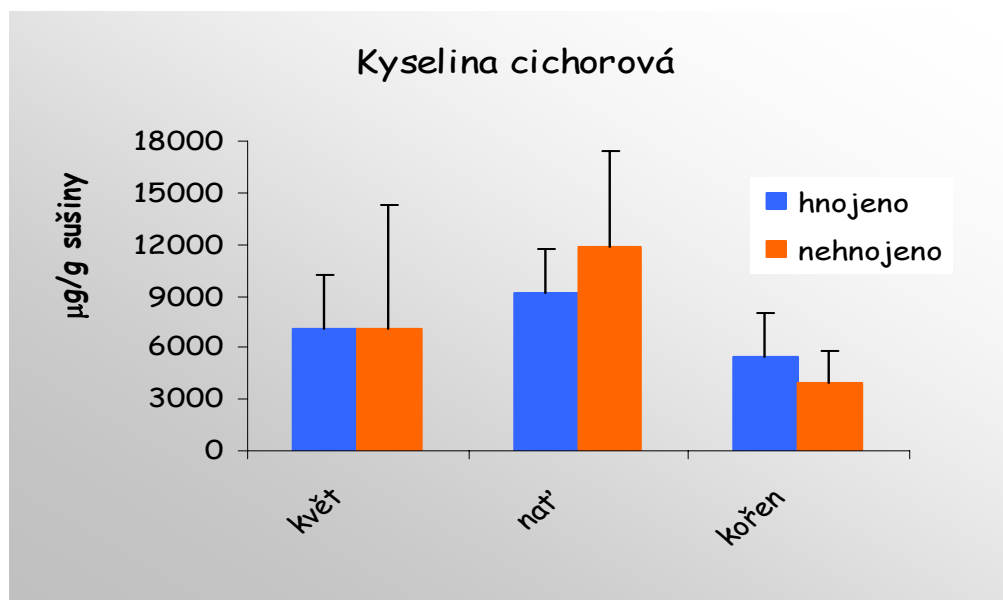
Obsah kyseliny kávové byl u dvou hnojených variant nižší než u variant nehnojených a to o 31 % v případě květu a o 7 % u kořene. Pouze u natě došlo k zvýšení obsahu o 12 % (viz graf č. 34). Toto zvýšení bylo statisticky neprůkazné.

Graf č. 34: Obsah kyseliny kávové v jednotlivých částech rostliny



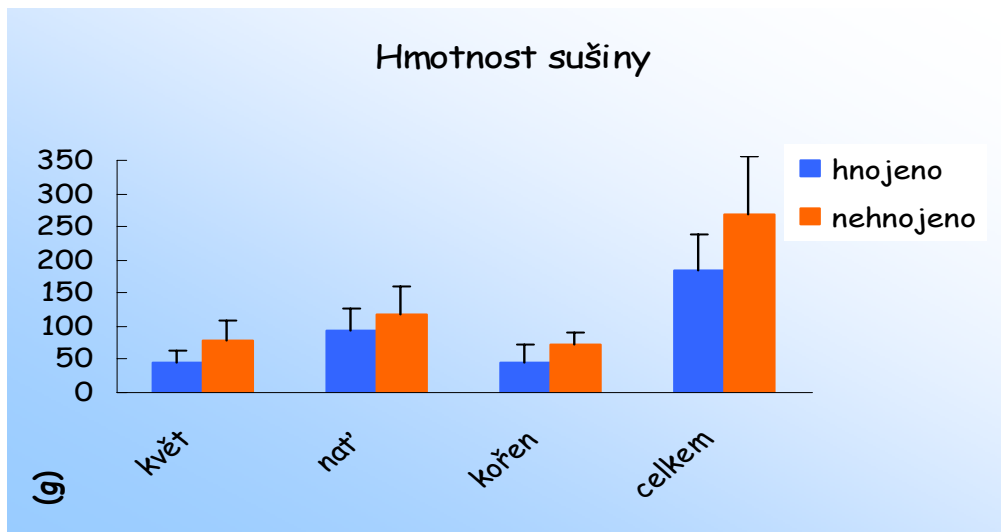
Obsah kyseliny cichorové v květu (viz graf č.35) byl u obou dvou variant prakticky stejný. U natě došlo u hnojené varianty k poklesu obsahu o 28 % a naopak u kořene vzrostl obsah kyseliny cichorové o 38 %. Nárůst je však statisticky neprůkazný.

Graf č. 35: Obsah kyseliny cichorové v jednotlivých částech rostliny



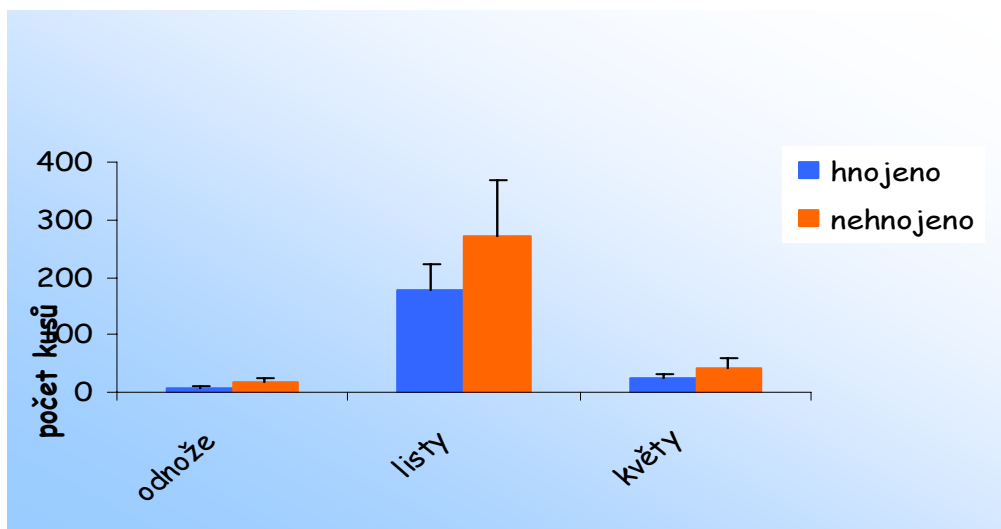
V tomto pokusu byly kromě čtyř vybraných kyselin, také sledovány některé biologické parametry. Jedním z nich byla i hmotnost sušiny. Z následujícího grafu č. 36 je patrné, že celková hmotnost sušiny, stejně jako hmotnost sušiny samotného kořene, natě i květu, byla ve všech případech u hnojené varianty nižší, než u varianty nehnojené. Pokles byl nejnižší u natě (23 %) a květu (23 %), nejvyšší u kořene (40 %).

Graf č. 36: Sušina v jednotlivých částech rostliny



Dalšími sledovanými parametry byly počty listů, květů, odnoží a výška rostlin. Kromě výšky rostlin, která byla u obou variant téměř shodná, je v grafu číslo 37 vidět, že stejně jako u hmotnosti sušiny, byly všechny sledované parametry u hnojené varianty nižší, než u nehnojené. Snížení počtu listů o 35 % a květů o 43 % se pohybovalo na hranici statistické průkaznosti, ale statisticky průkazné je pouze snížení počtu odnoží o 47 % ($p \leq 0,05$).

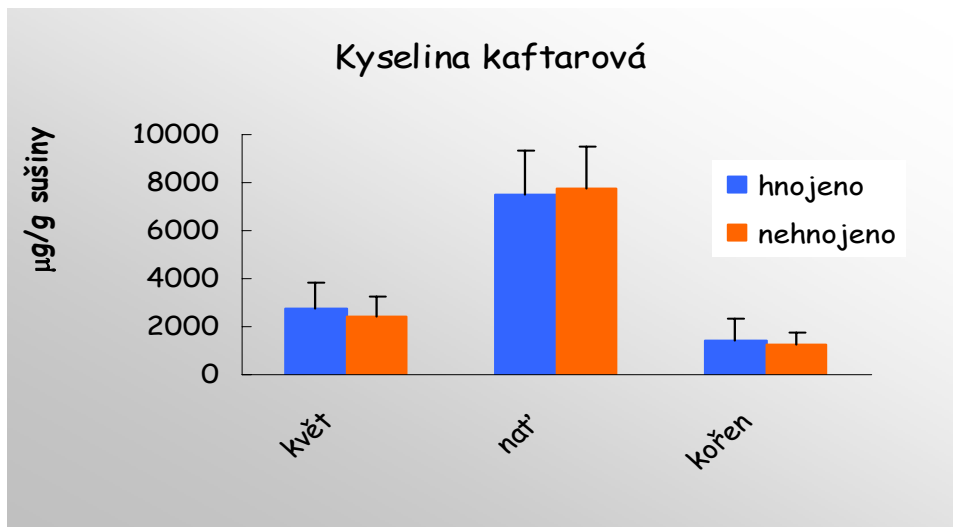
Graf č. 37: Porovnání počtu odnoží, listů a květů u hnojené a nehnojené varianty



5.3.2. Nádobový pokus

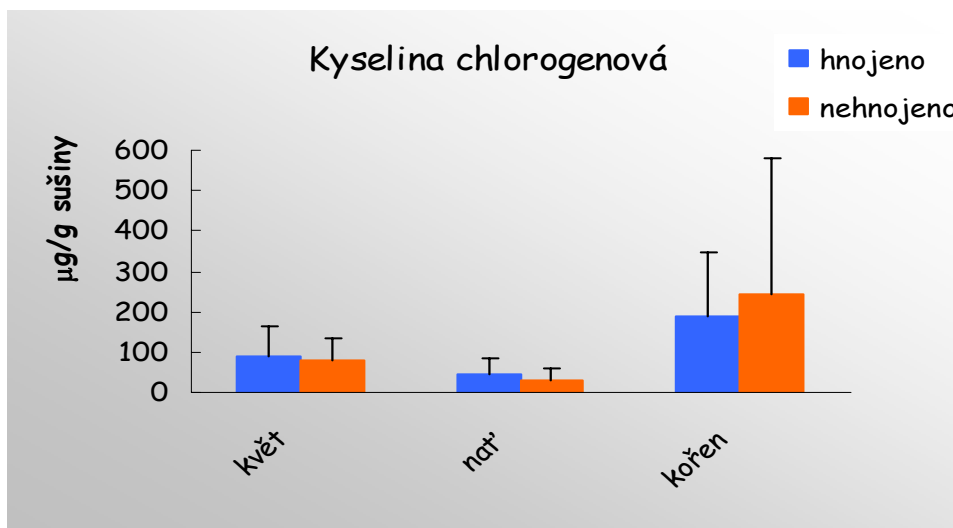
U nádobového pokusu došlo při použití čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor u kaftarové kyseliny ke zvýšení jejího obsahu (viz graf č.38) v květu o 17 % a v kořeni o 14 %. Její obsah v natě se snížil o 3 %. Žádný z těchto výsledků není statisticky průkazný.

Graf č. 38: Obsah kyseliny kaftarové v jednotlivých částech rostliny



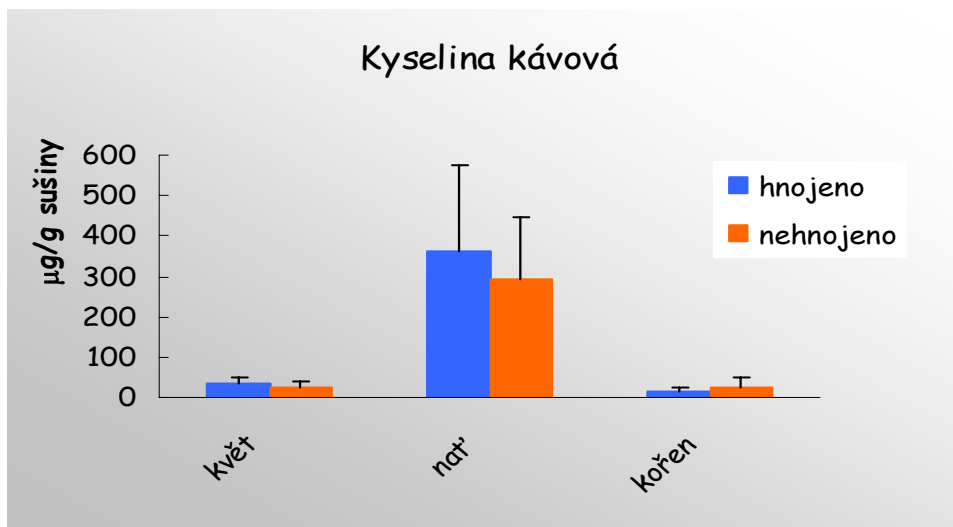
V grafu č. 39 vidíme, že v případě kyseliny chlorogenové došlo k nárůstu obsahu po hnojení u květu a natě. U květu o 11 % a u natě o 33 %. K poklesu došlo pouze u kořene a to o 23 %. Ani zde žádný výsledek není statisticky průkazný.

Graf č. 39: Obsah kyseliny chlorogenové v jednotlivých částech rostliny



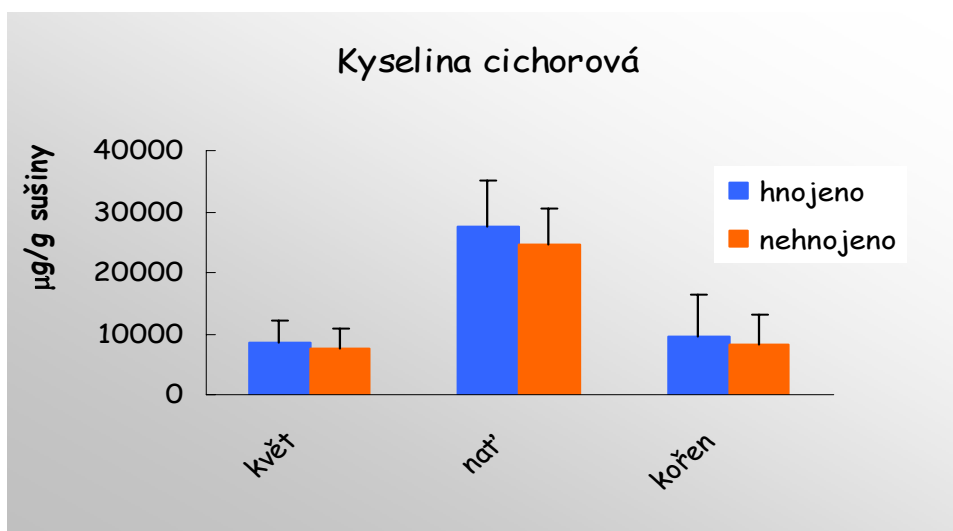
Obsah kyseliny kávové se po hnojení zvýšil v květu o 32 % a v nati o 23 %. V kořeni došlo k jeho snížení o 37 % (viz graf č. 40). Žádná z těchto hodnot nebyla statisticky průkazná.

Graf č. 40: Obsah kyseliny kávové v jednotlivých částech rostliny



U kyseliny cichorové došlo ve všech třech sledovaných ukazatelích ke zvýšení jejího obsahu (viz graf č. 41). Nejvíce u kořene o 18 %, dále pak u květu o 15 % a u natě o 11 %. Žádné z těchto zvýšení však nebylo statisticky průkazné.

Graf č. 41: Obsah kyseliny cichorové v jednotlivých částech rostliny



Stejně jako u předcházejícího maloparcelkového pokusu, byly i u nádobového pokusu sledovány některé biologické parametry. Výška rostlin byla u hnojené i nehnojené varianty opět prakticky stejná. Počet listů u hnojené varianty byl o 6 % vyšší. Vyšší byl také počet odnoží (o 3 %) a květů (o 4 %). Hmotnost čerstvých kořenů byla u hnojené varianty o 8 % vyšší oproti nehnojené, naopak hmotnost čerstvé natě byla o 2 % vyšší u nehnojené varianty. Jediný statisticky průkazný výsledek byla hmotnost čerstvých květů, která vzrostla oproti nehnojené variantě o 30 % ($p \leq 0,05$).

Aplikace čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor nepřinesla výsledky, které jsme očekávali. Z mnoha ukazatelů, které mohlo hnojení těmito hnojivy ovlivnit, tj. výška rostlin, počet odnoží, počet listů na jedné rostlině, hmotnost čerstvé biomasy celkem, sušiny celkem, hmotnost čerstvé hmoty květů a kořenů, počet pupat, počet květů, poměr květy:poupata, obsah kyseliny kaftarové v kořenech, nati, květech a ve stejných materiálech i obsah kyseliny kávové, cichorové a chlorogenové, jsme získali jen jediný statisticky průkazný výsledek: hnojení bio-hnojivy zvýšilo hmotnost čerstvé hmoty květů. Je nutno konstatovat, že při hnojení těmito hnojivy se nepodařilo dokázat vyšší obsah fenolických látek, které v souladu se zahraničními prameny a způsoby hodnocení považujeme za zdroj fyziologicky účinných látek extraktů rostlin rodu *Echinacea*. Ve výsledcích lze nalézt některé pravděpodobné trendy, např. že hnojení biohnojivy silně urychluje nástup kvetení, ale statisticky průkazné tyto a jiné trendy nejsou. Znamená to, že tyto vlastnosti zanikají v interakcích jiných významnějších faktorů a proto prakticky neznamenaají využitelný poznatek.

Téma ověření vlivu těchto biologických hnojiv mobilizujících půdní fosfor na obsah účinných látek v rostlině druhu *Echinacea purpurea* (L.) Moench. pomocí chromatografické metody HPLC, je zatím omezeně prozkoumaným úsekem a v dostupné literatuře se prakticky nevyskytuje. Stejně tak i výzkumy prováděné s tímto hnojivem Jiwei (setkat se lze i s výrazem Juwei), jsou omezené.

Se stejným fosforečným biohnojivem, které bylo vyrobeno na Institutu mikrobiologie Akademie věd v Hebei, byl proveden výzkum účinku na růst a výnos kukuřice a ředkvičky, které byly pěstovány na písčité půdě v západním Pomořansku v Polsku. Statisticky signifikantní nárůst byl prokázán pouze u kukuřice – u váhy listů a stébel. U ředkviček nebyl prokázán žádný statisticky významný nárůst. Autoři vidí problém nízké účinnosti biohnojiva v krátké vegetační době, v případě ředkviček, nebo ve vysokém obsahu přístupného fosforu v půdě. Velký vliv na účinnost biohnojiva také mohl mít vysoký počet původních bakterií v půdě, které mají schopnost aktivovat

chemické sloučeniny stejně jako biohnojiva (KUREK et al., 2002), (KUREK et al. 2003).

Je ovšem otázka, kterou znovu diskutujeme, zda fenolické látky rostlin rodu *Echinacea* jsou skutečně příčinou fyziologických vlastností extraktů těchto rostlin. Existují ojedinělé zprávy, že to mohou být látky zcela jiné, např. látky ze skupiny polysacharidů. Uvážíme-li např. fyziologický dopad nevyužitelných polysacharidů (kterým nepřesně a nesprávně říkáme „vláknina“) v lidském organismu, nezdají se tyto představy tak bizarní. Je však třeba říci, že o příčinách kladného účinku extraktů z rostliny *Echinacea* musí říci své biochemický a medicínský výzkum, nikoliv výzkum zemědělský (KUŽEL, 2005).

6. ZÁVĚR

Cílem této disertační práce bylo ověření vlivu vybraných elicitorů na obsah účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Byly založeny tři pokusy s touto rostlinou a bylo sledováno jak vybrané elicitory (kyselina acetylsalicylová, salicylová, methylsalicylát, askorbát titanu a čínské biologické hnojivo mobilizující půdní fosfor) ovlivní obsahy vybraných účinných látek. V souladu s literaturou byly jako tyto látky vybrány kyselina kávová a její deriváty - kyselina cichorová, kyselina kaftarová a kyselina chlorogenová. Byl také sledován vliv těchto elicitorů na vybrané biologické parametry.

V prvním pokusu byla tato rostlina pěstována v maloparcelkovém pokusu. Foliární aplikace elicitoru kyseliny acetylsalicylové (AS) se prováděla ve třech různých koncentracích – nízké, střední a vysoké s cílem ovlivnění obsahu sledovaných biologicky aktivních látek. Tento pokus trval 3 roky a vzorky byly odebírány každý rok. Ethanolové extrakty rostlinných vzorků byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

V práci byl prokázán odlišný vliv elicitorů na obsah sledovaných látek v jednotlivých částech rostliny. U nadzemní hmoty je efekt elicitorů méně průkazný. Nízká koncentrace elicitoru zvyšuje v nadzemní hmotě obsah kyseliny kávové a cichorové. Obsah kyseliny kaftarové se téměř nemění a obsah kyseliny chlorogenové je oproti kontrole snížen. Střední a vysoká koncentrace elicitoru obsah účinných látek spíše snižuje, často i dosti výrazně. Kyseliny kávová a cichorová reagují na střední a vysokou koncentraci elicitoru opět shodně, ve všech případech se jejich obsah oproti kontrole snížil. Obsah kyseliny kaftarové se zvyšuje ve druhém a třetím roce pěstování. Obsah kyseliny chlorogenové se zvýší jen u vysoké koncentrace elicitoru v prvním a druhém roce pěstování, tento nárůst je však minimální, v ostatních případech se její obsah vždy snížil.

Nízkou a především střední koncentrací kyseliny acetylsalicylové se obsah účinných látek v kořenu rostliny *Echinacea purpurea* vždy zvýšil, v mnoha případech i statisticky průkazně. Při vysoké koncentraci kyseliny acetylsalicylové již dochází ve většině případů ke snížení obsahu účinných látek oproti kontrole. Projevuje se zde pravděpodobně negativní vliv vysokého stresu, způsobený vysokou dávkou elicitoru, zejména u obsahu kyseliny kávové. Střední koncentrace kyseliny acetylsalicylové

se v tomto pokusu jeví, z hlediska účinných látek v kořenu, jako optimální. To se projevilo zvýšením všech sledovaných látek, největší nárůst byl zaznamenán u obsahu kyseliny chlorogenové. Trendy změn obsahu sledovaných látek jsou prakticky totožné v průběhu všech tří sledovaných let. Relativní zvýšení či snížení obsahů účinných látek je v některých letech statisticky průkazné.

Působení koncentrace elicitoru na výnos jednotlivých částí rostliny je statisticky průkazné pouze u výnosu nati a počtu listů v letech 2002 a 2004.

U druhého pokusu byl zjišťován vliv foliární aplikace čtyř vybraných elicitorů (kyselina acetylsalicylová, salicylová, methylosalicylát a askorbát titanu) také ve třech koncentracích – nízké, střední a vysoké. I v tomto případě se jednalo o tříletý pokus, elicítace byla prováděna každý rok, vzorky byly odebrány po třech letech a zanalyzovány v etanolovém extraktu pomocí HPLC.

V kořenu se obsah kyseliny cichorové zvýšil oproti kontrole po aplikaci všech elicitorů i všech koncentrací, jedinou výjimkou byla střední koncentrace kyseliny salicylové (pokles o 3 %). Obsah kyseliny kaftarové se také zvýšil ve všech případech oproti kontrole, stejně jako obsah kyseliny chlorogenové, kde byl u nízké dávky titanu nárůst dokonce desetinásobný a statisticky průkazný. Jiná situace je u kyseliny kávové, její obsah nejvíce zvyšovala elicítace titanem, zde se dá říci, že třetina látek její obsah zvýšila, třetina snížila a třetina nijak neovlivnila.

V nadzemní hmotě došlo u kyselin cichorové a kaftarové ke zvýšení jejich obsahu u všech aplikovaných elicitorů, s výjimkou vysoké koncentrace kyseliny acetylsalicylové, která jejich obsah v obou případech snížila. Naopak nízká koncentrace kyseliny salicylové pokaždé statisticky prokazatelně jejich obsah zvýšila. U kyseliny chlorogenové došlo pouze u třech elicitorů k jejímu nepatrnému zvýšení, ostatní její obsah snižovaly.

Téměř všechny koncentrace elicitorů měly vliv na výšku rostlin i na hmotnost sušiny kořenu. U kořene byly některé hodnoty statisticky průkazné.

Na závěr tohoto druhého pokusu se dá říci, že u kořene došlo po aplikaci všech koncentrací askorbátu titanu ke zvýšení obsahu účinných látek, podobně si vedl i methylosalicylát, s výjimkou kyseliny kávové, kde po aplikaci nízké a vysoké dávky byl obsah oproti kontrole téměř shodný. U nadzemní hmoty došlo k podobné situaci u kyselin kaftarové a cichorové, titan i methylosalicylát jejich obsah vždy zvýšili. Jiná situace nastala u kyseliny chlorogenové, zde methylosalicylát její obsah naopak vždy

snížil, a u titanu došlo u vysoké a střední koncentrace ke zvýšení, u nízké koncentrace byl obsah téměř shodný s kontrolou.

V třetím pokusu byl zkoumán vliv čínského biologického hnojiva mobilizujícího půdní fosfor. Za tímto účelem byl založen nádobový a maloparcelkový pokus. Tyto pokusy byly založeny v roce 2003 a v roce 2004. V době kvetení 90 % rostlin byla provedena sklizeň. Elicitace tímto hnojivem byla provedena dvakrát, v srpnu 2003 a květnu 2004, u obou pokusů ve stejný termín a stejné dávce.

U maloparcelkového pokusu došlo u kyseliny kaftarové k jejímu zvýšení u květu a kořene, u kyseliny chlorogenové byl obsah v květu u hnojené i nehnojené varianty stejný, v nati se po hnojení snížil a naopak u kořene se čtyřnásobně zvýšil. Obsah kyseliny kávové byl v nati a kořenu téměř shodný, v květu se snížil. U kyseliny cichorové došlo u hnojené varianty k poklesu u natě a k nárůstu v kořenu. V květu se obsah téměř nezměnil. U biologických parametrů došlo po hnojení k poklesu hmotnosti sušiny u natě, květu i kořenu, snížil se počet listů, květů a odnoží. Žádná ze sledovaných hodnot v tomto maloparcelkovém pokusu nebyla statisticky průkazná.

V nádobovém pokusu došlo u kaftarové kyseliny ke zvýšení jejího obsahu v květu a kořenu. Obsah chlorogenové a kávové kyseliny se zvýšil u květu a natě a obsah kyseliny cichorové se zvýšil u všech třech částí. Jediným statisticky prokazatelným vlivem čínského biologického hnojiva bylo zvýšení čerstvé hmotnosti květů.

Všechny cíle stanovené pro tuto práci byly splněny. Byl sledován vliv jednotlivých elicitorů na obsah vybraných účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea*.

Předpokládané vědecké výsledky disertační práce jsou také splněny. Byla ověřena nová jednoduchá chromatografická metoda, při níž byla v mobilní fázi nahrazena kyselina trifluoroctová, kyselinou fosforečnou (viz kapitola Metodika). Byl testován přírůstek této kyseliny v rozmezí od 0,05 – 1% obsahu, jako optimální se ukázal obsah 0,1 %. Při jejím použití dochází ke zkrácení doby analýzy z 60 minut na 35 minut, přičemž nedochází k žádné změně ve vyplavování zkoumaných látek, ani ke zhoršení separační schopnosti.

Také byl prokázán pozitivní vliv elicitorů na obsah účinných látek.

Závěrem lze konstatovat:

1. V prvním pokusu zvýšil elicitor kyselina acetylsalicylová ve střední dávce u kořene obsah všech sledovaných látek a to statisticky průkazně ve všech třech letech pěstování.
2. V nadzemní hmotě tato kyselina ve střední koncentraci ve všech případech statisticky průkazně snížila v prvním roce pěstování obsah sledovaných látek.
3. V druhém pokusu elicitor askorbát titanu kromě jedné výjimky (pokles o 1,7 %) vždy zvýšil obsah sledovaných látek oproti kontrole a to ve všech třech koncentracích.
4. Čínské biologické hnojivo nemělo žádný průkazný vliv na obsah sledovaných látek.
5. Byla ověřena nová analytická metoda stanovení vybraných účinných látek a potvrzeno zkrácení doby analýzy bez zhoršení separačních schopností.

7. LITERATURA

- ANGELOVA, Z., GEORGIEV, S., ROOS, W. Elicitation of plants. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 20(2), 2006, p. 72-83.
- ANONYM 1: *Environmental Health Perspectives*, 107(12), 1999, p. 605.
- BALAŽOVÁ, A., BILKA, F., BLANÁRIKOVÁ, V., PŠENAK, M. Zmeny obsahu sanguinarinu a aktivity polyfenoloxidázy vplyvom fungálneho elicitora v suspenzných kultúrach maku siateho *Papaver somniferum* L. *Čes. Slov. Farm.* 51(4), 2002, p. 182-185.
- BARNES, J., ANDERSON, L.A., GIBBONS S., PHILLIPSON, J.D. *Echinacea* species (*Echinacea angustigolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench : a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties, *J. of Pharmacy and Pharmacology.* 57(8), 2005, p. 929-954.
- BAUER, R. *Echinacea* drugs-effect and active ingredients. *Z. Arztl. Fortbild. (Jena).* 90(2).1996, p. 111-115.
- BAUER, R., FOSTER, S. Analysis of alkamides and caffeic acid derivatives from *Echinacea simulata* and *E. paradoxa* roots. *Planta Medica.* 57(5), 1991, p. 447-449.
- BAUER, R., JURCIC, K., PUHLMANN, J., WAGNER, H. Immunologische In-vivo-und In-vitro-Untersuchungen mit *Echinaceae*-Extrakten. (Immunological in vivo and in vitro examinations of *Echinacea* extracts.) *Arzneimittelforschung* 38, 1988, p. 276-81.
- BAUER, R., REMIGER, P., WAGNER, H. *Echinacea*. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 128(4), 1988, p. 174 – 180.
- BAUER, R., WAGNER, H. *Echinacea*. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart*, 1990, p. 182.
- BAUER, R., WAGNER, H. *Echinacea* Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart*, 1990, p. 93 – 108.
- BAUER, R. *Helv. Chima Acta.* 68, 1985, p. 23-55. In ŠÍCHA, J., HUBÍK, J., DUŠEK, J. Obsahové látky rodu *Echinacea* potencijní antivirotika a imunostimulancia. *Československá farmacie.* 38(9), 1989, p. 424 – 428.
- BAUER, R., KHAN, I., WAGNER, H. *Echinacea*-drogen. *Deutsche Apotheker Zeitung.* 126(20), 1986, p.1065 – 1070.

- BAUM B.R., MECHANDA S., LIVESEY J.F., BINNS, S.E., ARNASON, J. T. Phytochemistry. 56, 2001, p.543. In VRCHOTOVÁ, N. et al. Extrakce a analýza fenologických látek z třapatky nachové. Chemické Listy, 96, 2002, p. 636-639.
- BECKER, H. HSIEH, W. CH. Cichoree-Saure und deren derivate aus Echinacea, Arten.Z. Naturforsch. 40C, 1985, p. 585-587.
- BECKER, H. HSIEH, W. CH. Structure of echinacoside. Z. Naturforsch. 37, 1982, p.351.
- BEIDERBECK, R., REICHLING, J. Pflanzenkulturen in Forschung und Praxis. Teil V/2. Biologie 5, 1989, p. 453-464.
- BERGERON, C., LIVESEY, J. F., AWANG, D. V. C., ARNASON, J. T., RANA, J., BAUM, B.R., LECHAMO, W. A quantitative HPLC Metod for the quality assurance of *Echinacea* products on the North American market. Phytochem.Anal, 11, 2000, p. 207-215.
- BIELORY, L. Complementary and alternative interventions in asthma, allergy, and immunology. Annals of allergy asthma & immunology, 93(2), 2004, p. 45-54.
- BINNS, S., E., HUDSON, J., MERALI, S., ARNASON, J., T. Antiviral activity of characterized extracts from echinacea spp. (Heliantheae: Asteraceae) against herpes simplex virus (HSV-I). Planta Med., 68(9), 2002, p. 780-783.
- BINNS, S., E.,BAUM, B.R., ARNASON, J. T. A taxonomic revision of *Echinacea* (Asteraceae: Helianthae). Syst. Bot. 27, 2002b, p. 610-632.
- BINNS, S., E., ARNASON, J. T., BAUM, B.R. Phytochemical variation within populations of *Echinacea angustifolia* (Asteraceae). Biochemical Syst. Ecol. 30, 2002c, p. 837 -854.
- BOHLMANN, F., DALLWITZ, K. Chem. Ber. 107, 1974. In ŠÍCHA, J., HUBÍK J., DUŠEK, J. Obsahové látky rodu *Echinacea* potencionální antivirotika a imunostimulancia. Československá farmacie. 38(9), 1989, p. 424 – 428.
- BOHLMANN, F., GRENZ, M. Chem. Ber. 99, 1966, p.3197 In ŠÍCHA, J., HUBÍK, J., DUŠEK, J. Obsahové látky rodu *Echinacea* potencionální antivirotika a imunostimulancia. Československá farmacie. 38(9), 1989, p. 424 – 428.
- BOMME, U. Versuchsergebnisse der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Heil- und Gewürzpflanzen. Freising-München, 1987, p. 184.
- BOSTOCK, R. M., KUC, J. A., LAINE, R. A. Eicosapentanoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpens in potato. Science. 12, 1981, p. 67-69.
- BRÄUNIG, B., DORN, M., KNICK, E. *Echinacea purpurea* radix for strengthening the immune response in flu-like infections. Z. Phytotherapie. 13, 1992, p. 7 – 13.
- BREVOORT, P. The booming US botanical market. A new overview. Herbalgram. 44,1998, p. 33 – 46.

- BRINKEBORN, R. M. Echinaforce® in the treatment of acute colds. Schweiz Zschr. Ganzheits Med.10, 1998, p. 26 – 29.
- BRINKEBORN, R. M., SHAH, D. V., DEGENRING, F. H. Echinaforce and other Echinacea plant preparations in the treatment of the common cold. A randomized, placebo controlled, double-blind clinical trial. Phytomedicine. 1999, 6(1), p. 1-6.
- BURGER, R. A., TORRES, A. R., WARREN, R. P., CALDWELL, V. D., HUGHES, B. G. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. Int. J. Immunopharmacol. 19(7),1997 p. 371-379.
- BUSING, K. H. Hyaluronidase inhabitation of some naturally occurring substances used in therapy. Arxneimittelforschung. 1995, p. 320-322.
- CLIFFORD, L. J., NAIR, M. G., RANA, J., DEWITT, D. L. Bioactivity of alkamides isolated from *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Phytomedicine. 9(3), 2002, p. 249-253.
- COHEN, H. A., VARSANO, I., KAHAN, E., SARRELL, E. M., UZIEL, Y. Effectiveness of an herbal preparation containing echinacea, propolis and vitamin C in preventing respiratory tracts infections in children. Arch Pediatr Adolesc Med. 158, 2004, p. 217-221.
- CONCONI, A. A., MIQUEL, M., BROWSE, J. A. RYAN, C. A. Intracellular levels of free linoleic and linolenic acids increase in tomato leaves in response to wounding. Plant. Physiol. 111 (3), 1996, p. 797.
- COX, J. Purple coneflower. Rodale Press. 1998, p.52-54.
- CROWE, S., LYONS B. Herbal medicine use by children presenting for ambulatory anesthesia and surgery. Paediatric Anaesthesia. 14, 2004, p. 916.
- CUNDELL, D. R., MATRONE, M. A., RATAJCZAK, P., PIERCE, J. D. The effect of aerial parts of Echinacea on the circulating white cells levels and selected immune functions of the aging male Sprague – Dawley rat. Int. Immunopharmacology. 3(7), 2003, p. 1041-1048.
- CURRIER, N. L., MILLER, S. C. Natural killer cells from aging mice treated with extracts from *Echinacea purpurea* are quantitatively and functionally rejuvenated, Exp. Gerontol. 35(5), 2000, p. 627-639.
- DACHLER, M., PELZMANN, H. Heil- und Gewürzpflanzen. Österreichischer Agrarverlag. 1989.p. 244.
- DEBERGH, P. Secondary metabolites – elicitation. In: Tissue culture and biotechnology [online]. Belgium: University Gent, 2003. [cit.2004-10-12]. Dostupný na WWW: <<http://allserv.rug.ac.be/~pdebergh/sec/sec1at02.htm>>
- DiCOSMO, F. Fungal culture-filtrate elicits aromatic polyacetylenes in plant tissue culture. Naturwissenschaften. 69,1982, p. 550-551.

- DiCOSMO, F., MISAWA, M. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. Trends. Biotechnol. 3, 1985, p. 318 – 322.
- DUKE, A. J. The green pharmacy. Rodale Press. 1997, p. 450.
- EBEL, J., MITHOFER, A. Early events in the elicitation of plant defense. Planta. 206, 1998, p. 335-348.
- EILERT, U., CONSTABEL, F., KURZ, W. J. Plant Physiol. 126(11), 1986 In KAŠPAROVÁ, M. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* vybraných léčivých rostlin. Dizertační práce. Hradec Králové, FF HK. 1999, p. 119.
- EILERT, U., EHMKE, A., WOLTERS, B. Planta Med. 50, 1984, p. 508 In KAŠPAROVÁ, M. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* vybraných léčivých rostlin. Dizertační práce. Hradec Králové, FF HK. 1999, p. 119.
- EILERT, U., KURZ, W., CONSTABEL, F. J. Plant Physiol. 119(65), 1985 In KAŠPAROVÁ, M. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* vybraných léčivých rostlin. Dizertační práce. Hradec Králové, FF HK. 1999, p. 119.
- ERNST, E. The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: Ginkgo, St. John's wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. Ann. Intern. Med. 136, 2002, p. 42-53.
- FACINO, R. M., CARINI, M., ALDINI, G., SAIBENE, L., PIETTA, P., MAURI, P. Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of Echinacea extract in the prevention of skin photodamage. Planta Medica. 61(6), 1995, p. 510 – 514.
- FARMER, E. E., HELGELSON, J. P. Plant Physiol. 85, 1987, p. 733. In KAŠPAROVÁ, M. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* vybraných léčivých rostlin. Dizertační práce. Hradec Králové, FF HK. 1999, p. 119.
- FOSTER, S. Understanding Echinacea. 2000. Citace 15.12. 2004. Dostupný na www.stevenfoster.com
- FRISCHKNECHT, P.M., BAUMANN, T.W. Stress - induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. Phytochemistry. 24(10), 1985, p. 2255-2257.
- GALLO, M., SARKAR, M., AU, W., PIETRZAK, K., COMAS, B., SMITH, M. Pregnancy outcome following gestational exposure to echinacea: a prospective controlled study. Arch. Intern. Med. 160, 2000, p. 3141-3143.
- GALLO, M., KOREN, G. Can herbal products be used safely during pregnancy? Focus on echinacea. Can. Fam. Physician. 47, 2001, p. 1727-1728.

- GAN, X. H., ZHANG, L., HEBER, D., BONAVIDA B. Mechanism of activation of human peripheral blood NK cells at the single cell level by Echinacea water soluble extracts: recruitment of lymphocyte-target conjugates and killer cells and activation of programming for lysis. *Int. Immunopharmacology*. 3(6), 2003, p. 811-824.
- GELLI, A., BLUMWALD, E. Hyperpolarization-activated Ca-permeable channels in the plasma membrane of tomato cells. *J. Membrane Biol.* 155, 1997, p. 35-45.
- GILMORE, M. Uses of plants by the Indians of the Missouri River region, Univ. Nebraska Press, 1977. Reprint of a work first published as *Bur. Amer. Ethnol.*, 33rd Annual Rep., Washington D.C., 1919. In KINDSCHER, K.: *Ethnobotany of Purple Coneflower (*Echinacea angustifolia*, Asteraceae) and Other *Echinacea* Species*. *Economic Botany*. 43(4), 1989, p. 498-507.
- GOEL, V., CHANG, C., SLÁMA, J. V., BARTOŇ, R., BAUER, R., GAHLER, R., BASU, T. K. Alkamides in *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats. *Int. Immunopharmacology*. 2(2-3), 2002, p. 381-387.
- GOEL, V., LOVLIN, R., J. V., BARTOŇ, R., LYON, M. R., BAUER, R., LEE, T. D. G., BASU, T. K. Efficacy of a standardized echinacea preparation (Echinilin) for the treatment of the common cold: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics*. 29(1), 2004, p. 75-84.
- GODOY-HERNÁNDEZ, G., LOYOLA-VARGAS, V. M. Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 16(5), 1997, p. 287-290.
- GRAEDON, J. *The people's pharmacy guide to home and herbal remedies*. St. Martin's press. 1999, p. 291-294.
- GRAY, D. E., PALLARDY, S. G., GARRETT, H. E., ROTTINGHAUS, G. E. Acute drought stress and plant age effects on alkaloid and phenolic acid content in coneflower roots. *Planta Med.* 69, 2003. p.50-55.
- GRINELL, G. B. *The Cheyenne Indians Vol.2.*, Cooper Square Publishers, New York, 1962.
- GRIMM, W., MULLER, H. H. A randomized controlled trial of the effect of fluid extract of *Echinacea purpurea* on the incidence and severity of colds and respiratory infections. *Am. J. Med.* 106(2), 1999, p. 259-260.
- GROENEWALD, E. G., VAN DER WESTHUIZEN, A. J. The metabolism of inhibitor of flowering and prostaglandin biosynthesis, acetylsalicylic acid, in *Pharbitis nil* cotyledons. *Biol. Plant.* 41(3), 1998, p. 475 – 479.

- HAHN, G., MAYER, A. Echinacea – Igelkopf oder Sonnenhut. Madaus Illustrierte, 1986, p. 22 – 23.
- HARNISCHFLEGER, G., STOLZE, H. Bewährte pflanzendrogen in wissenschaft und medizin, Notamed Verlag. 1983.
- HART, J. A. Montana: native plants and early peoples. Montana historical society. 1976.
- HART, J. A. The ethnobotany of the northern Cheyenne Indians of Montana., J. Ethnopharmacol. 4, 1981, p. 1-55.
- HEEGER, E. F. Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenanbaus. Drogengewinnung. Dtsch. Bauernverlag, Berlin. 1956, p. 388 – 393.
- HEINEN-KAMMERER, T., HOLTMANNSPOTTER, C., SCHNABEL, S., MOTZKAT, K., KIENCKE, P., RYCHLÍK, R. Effectiveness of echinacin in therapy of recurrent respiratory disease. Gesundheitswesen. 67(4), 2005, p. 296-301.
- HENNEICKE-VON ZEPELIN, H., HENTSCHEL, C., SCHNITKER, J., KOHNEN, R., KOHLER, G., WUSTENBERG, P. Efficacy and safety of a fixed combination phytomedicine in the treatment of the common cold (acute viral respiratory tract infection): results of a randomized, double blind, placebo controlled, multicentre study. Curr. Med. Res. Opin. 15(3), 1999, p. 214-227.
- HERRINE, S. K. Approach to the patient with chronic hepatitis C virus infection. Ann. Intern. Med. 136, 2002, p. 747-757.
- HEYL, F. W., STALEY, J. F. Am. J. Pharm 86, 1914, p. 450. In ŠÍCHA, J., HUBÍK, J., DUŠEK, J. Obsahové látky rodu *Echinacea* potencionální antivirotika a imunostimulancia. Československá farmacie. 38(9), 1989, p. 424 – 428.
- HOHEISEL, O. Echinagard[®] treatment shortens the course of the common cold: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. Eur. J. Clin. Res. 9, 1997, p. 261 –269.
- HOOBS, C. Echinacea: A literatura review. HerbalGram. 30, 1994, p. 33 – 48.
- HOOBS, C. The chemistry and pharmacology of Echinacea species. HerbalGram. 30, 1994 b, p. 1-7.
- HOSTETTMANN, K. History of a plant: The example of Echinacea. Forschende Komplementarmedizin und Klassische Naturheilkunde 10(9), 2003.
- HU, C., KITTS, D.D. Studies on the antioxidants activity of Echinacea root extract. J. Agric. Food Chem. 48(5), 2000, p. 1466-1472.
- HUDEC, J., BURDOVÁ, M., KOBIDA, L., KOMORA, L., MACHO, V., KOGAN, G., TURIANICA, I., KOCHANOVÁ, R., LOZEK, O., HABAN, M., CHLEBO, P. Antioxidant Capacity Changes and Phenolic Profile of Echinacea purpurea, Nettle (*Urtica dioica* L.), and

- Dandelion (*Taraxacum officinale*) after Application of Polyamine and Phenolic Biosynthesis Regulators. *J Agric. Food Chem.* 55(14),2007, p.5689-5696.
- HUNTLEY, A.L., COON, J. T., ERNST, E. The safety of medicinal herbal products derived from Echinacea species: A systematic review. *Drug Safety.* 28(5), 2005, p. 387-400.
- IZZO, A. A., ERNST, E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Druha.* 61(15), 2001, p. 2163-2175.
- KAPTEYN, J., GOLDSBROUGH, P. B., SIMON, J. E. Genetic relationships and diversity of commercially relevant Echinacea species. *Theor. Appl. Genet.* 105, 2002, p.369-376.
- KAŠPAROVÁ M., SIATKA T. Produkce anthracenových derivátů elicitovanou tkáňovou kulturou *Rheum palmatum*. *L. Čes. Slov. Farm.* 48(6), 1999, p. 256 – 261.
- KAŠPAROVÁ M., SIATKA T. Vliv chitosanu na produkci anthracenových derivátů v tkáňové kultuře *Rheum palmatum*. *L. Čes. Slov. Farm.* 50(5), 2001, p. 249-253.
- KIM, H. O., DURANCE, T. D., SCAMAN, C. H., KITTS D.D. Retention of caffeic acid derivatives in dried *Echinacea purpurea*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2000, p. 4182-4186.
- KIM, L. S., WATERS, R. F., BURKHOLDER, P. M. Immunological activity of larch arabinogalactan and Echinacea: a preliminary, randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Alter. Med. Rev.* 7(2), 2002, p. 138-149.
- KINDSCHER, K. Ethnobotany of Purple Coneflower (*Echinacea angustifolia*, Asteraceae) and Other *Echinacea* Species. *Economic Botany*, 43(4), 1989, p. 498-507.
- KLIGLER, B. Echinacea. *Am. Fam. Physician*, 67(1), 2003, p. 77-80.
- KOHOUTOVÁ, V. *Echinamax* [online] . Finclub plus, a.s., 2003. [cit.2004-10-12]. Dostupný na WWW: <http://www.finclub.cz/web/katalogv.nsf/0/c7674fe668c74d934125683b0057038f?OpenDocument>
- KOLÁŘ, L., LEDVINA, R., KUŽEL, S., PAŠEK, J. Vliv nadbytku dusíku ve výživě *Echinacea purpurea* (L.) Moench. na tvorbu jejích účinných látek. *Rostlinná výroba.* 44(11), 1998, p. 489 - 495.
- KOLÁŘ, L. Vliv přijatých živin na tvorbu genisteinu v jeteli lučním. *Rostlinná výroba.* 28, 1981, p. 1-18.
- KOLÁŘ, L. Estrogenní genistein v jeteli lučním. *Sbor. PEF VŠZ Praha, České Budějovice.* 1982, p. 1-12.
- KREFT, S. Cichoric Acid Content and Biomass Production of *Echinacea purpurea* Plants Cultivated in Slovenia. [Pharmaceutical Biology](#). 43(8),2005, p. 662 – 665.

- KÜHN, O., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 3, 194 (1953). In BAUER, R. et. al. *Immunologische In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen mit Echinacea-Extrakten. Arzneim.-Forsch./Drug Res.*38(2), 1988, p. 276 – 281.
- KUCHARSKI, W.A. *Anbatechnologie und Pflanzenschutz von Echinacea purpurea (L.) Moench. Drogenreport.*16(10), 1997, p. 33-36.
- KUREK, E., NIEDZWIECKI, E., PROTASOWICKI, M., SŁOMKA, A., OZIMEK, E. Efekt zastosowania chinaskiego bioawozu Juwei BPF na plon kukurydzy uprawianej na glebie lekkiej w warunkach Pomorza Zachodniego. 26th congress of the Polish Society of Soil Science, Krakov. 2003, p. 32.
- KUREK, E., NIEDZWIECKI, E., PROTASOWICKI, M., SŁOMKA, A. Microbiological and chemical evaluation of chinese biofertilizers Juwei and C.B.I. mobilizing phosphorus and potassium in soil. *Zeszyty problemowe postepow nauk rolniczych. Polska akademia nauk.* 484, 2002, p. 325-334.
- KUŽEL, S., TRÍSKA, J., KOLÁŘ, L., ŠPIČKA, J., CÍGLER, P., HRUBÝ M., VYDRA, J., VRCHOTOVÁ, N. Technologie pěstování rostlin *Echinacea purpurea* a *Schizandra chinensis* a extrakce účinných látek. Průběžná zpráva o realizaci projektu Kontakt ME 704. 2003. p.52.
- KUŽEL, S., TRÍSKA, J., KOLÁŘ, L., ŠPIČKA, J., CÍGLER, P., HRUBÝ M., VYDRA, J., VRCHOTOVÁ, N. Technologie pěstování rostlin *Echinacea purpurea* a *Schizandra chinensis* a extrakce účinných látek. Závěrečná zpráva o realizaci projektu Kontakt ME 704. 2005. p.101.
- KUŽEL, S., CÍGLER, P., HRUBÝ, M., VYDRA, J., PAVLÍKOVÁ, D., TLUSTOŠ, P. The effect of simultaneous magnesium application on the biological effects of Titanium. *Plant Soil Environ.* 53 (1), 2007, p.16-23.
- LETCHAMO, W. *Perspectives on new crops and new uses* (Janick J., ed.), ASHS Press, Alexandria, VA, 1999. In: VRCHOTOVÁ, N., et al., *Extrakce a analýza fenolických látek z třapatky nachové. Chemické listy.*96(7), 2002, p. 636-639.
- LETCHAMO, W., LIVESEY, J., ARNASON, T.J., BERGERON, C., KRUTILINA, V.S. Cichoric acid and isobutylamide content in *Echinacea purpurea* as influenced by flower developmental stages. ASHS Press, Alexandria. 1999. p. 494–498.
- LETCHAMO, W., POLYDEONNY, L. W., GLADISHEVA., ARNASON, T. J., LIVESEY, J., AWANG, D.W.C. *Factors affecting Echinacea duality.* ASHS Press, Alexandria. 2002. p. 514-521.

- LI, S. C., WARDLE, D. A. Effects of root drying temperature and moisture content on the levels of active ingredients in *Echinacea* roots. *J. Herbs, Spices and Med. Plants.* 8, 2002. p. 15-22.
- LIU, C. Z., ABBASI, B. H., GAO, M., MURCH, S. J., SAXENA, P.K. Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *J Agric. Food Chem.* 54(22), 2006, p.8456-8460.
- LIMDENMUTH, G. F., LIMDENMUTH, E. B. The efficacy of echinacea compound herbal tea preparation on the severity and duration of upper respiratory and flu symptoms: a randomized, double-blind placebo controlled study. *J. Alter. Komplement. Med.* 6(4),2000, p. 327-334.
- LLOYD, J. U. History of *Echinacea angustifolia*. *Amer. J. Phar.* 76(1), 1904, p.15-19. In KINDSCHER, K. Ethnobotany of Purple Coneflower (*Echinacea angustifolia*, Asteraceae) and Other Echinacea Species. *Economic Botany.* 43(4), 1989, p. 498-507.
- LUETTIG, B., STEINMULLER, C., GIFFORD, G. E., WAGNER, H., LOHMANN-MATTHES, M. L. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1989, p. 669-675.
- LUKÁŠ, D. Vliv elicitorů na produkci kyseliny cichorové a kaftarové u rostlin *Echinacea purpurea*. *Magisterská práce na BF JCU.* 2003. p. 38.
- MADDOCKS, I. Alternative medicine. *Med. J. Aust.* 145, 1985, p.547-551.
- MAGEE, K. A. Herbal therapy: a review of potential health risks and medicinal interactions. *Orthodontics & Craniofacials Research.* 2, 2005, p. 60.
- MAHADY, G. B., QATO, D. M., GYLLENHAA, CH., CHADWICK, L., FONG, H. H. S. Echinacea: Recommendations for its use in prophylaxis and treatment of respiratory tract infection. *Nutrition in Clinical Care.* 4(4), 2001, p. 199.
- MARINELI, F. Elicitor induction of enzyme activities and 6-methoxymellein production in carrot cell-suspension culture. *Phytochemistry.* 35, 1994, p. 1457-1460.
- McCALEB, R. Echinacea safety confirmed. *Herbal Gram.* 42, 1996, p. 15.
- MENGS, U., CLARE, C. B., POILEY, J., A. Toxicity of *Echinacea purpurea*. Acute, subacute and genotoxicity studies. *Arzneimittelforschung.* 41(10), 1991, p. 1076-1081.
- MILLER, L. G. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. *Arch. Intern. Med.* 158(20), 1998, p. 2200-2211.
- MISHIMA S., SAITO K., MARUYAMA H., INOUE M., YAMASHITA T., ISHIDA T., GU Y.W. Antioxidant and immuno-enhancing effects of *Echinacea purpurea*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 27(7), 2004, p. 1004-1009.

- MULLINS R., J. Echinacea-associated anaphylaxis. *Med. J. Aust.* 168(4), 1998, p. 170-171.
- MULLINS T., HEDDLE A. Adverse reactions associated with Echinacea: the Australian experience *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 88, 2002, p. 42-51.
- MUNSON, P. J. Contributions to Osage and Lakota ethnobotany. *Plains Anthropol.* 26, 1981, p. 229-240.
- MYERS, S. P., WOHLMUTH, H. Echinacea-associated anaphylaxis. *Med. J. Aust.* 168, 1998, p. 583-4.
- NEUGEBAUER, H. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Echinacea. *Pharmazie.* 4, 1949, p. 137 – 140.
- NICKEL, R. K. Plant resource utilization at a late prehistoric site in north –central South Dakota. *Univ. Nebraska, Lincoln.* 1974, p. 189.
- NISHI, A. Effect of elicitors on the production of secondary metabolites. 1994 In : RYU, D. D. Y., FURUSAKI, S. *Adv. Plant Biotechnol. Elsevier Sci. BV*, 1998, p. 135-151.
- NURNBERG, T. Signal transduction in plant defence. *Cell. Mol. Life. Sci.* 55, 1999, p. 167-182.
- NUSSLEIN, B., KURZMANN, M., BAUER, R., KREIS, W. Enzymatic degradation of cichoric acid in *Echinacea purpurea* preparations. *J. Nat. Prod.* 63(12), 2000, p. 1615-1618.
- PARMENTER, G. A., LITTLEJOHN, R.P. Planting density effects on root yield of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* 25, 1997, p.169 – 175.
- PAŠEK, J. Návrh výroby imunogenného sirupu z fyziologicky účinné látky *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Diplomová práce. České Budějovice, ZF JU. 1997, p.69.
- PATRICK, L. Hepatitis C: epidemiology and review of complementary/alternative medicine treatments. *Altern Med Rev.* 4, 1999, p. 220-238.
- PERRY, N. G., BURGESS, E. J., GLENNIE V. A. J.. Echinacea standardization: Analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2001, p. 1702–1706.
- PEYTON, B. G., SPEARS, T. L., LINDSEY, A., LINDSEY, J., SHARMA, V. K., RAUFMAN, J. A survey of the use of herbal medicine in patients with hepatitis C, *Hematology.* 30, 1999, p. 191.
- PISZCZALKA, J., ANGELOVIČ, M., DUDÁK, J. Návrh stroja na zber koreňov liečivých rastlín *Echinacea purpurea* (L.) a *Leuzea rhapontica* (L.). In: *Acta technologica agriculturae. Zborník vedeckých prác Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.* 38, 1997, p. 201-205.

- POOVIAH, B. W., LEOPOLD, A. C. Effects of anorganic salts on tissue permeability. *Plant Physiol.* 58, 1976, p. 182-185.
- QU, L., CHEN, Y., WANG, X., SCALZO, R., DAVIS J.M. Patterns of variation in alkamides and cichoric acid in roots and aboveground plants of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *HortScience*.40(5). 2005. p. 1239-1242.
- RAŽIČ, S., ONJIA, A., POTKONJAK, B. Trace elements analysis of *Echinacea purpurea* – medicinal plant. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 33(4), 2004, p. 845-850.
- RININGER, J. A., KICKNER, S., CHIGURUPATI, P., McLEAN, E., FRANCK, Z. Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Leukocyte Biology.* 68, 2000, p. 503-510.
- ROGERS, D. J. Lakota names and traditional uses of native plants by Sicangu (Brule) people in the Rosebud area, South Dakota. Rosebud Educational Society, 1980.
- SEE, D.M., BROUMAND, N., SAHL, L., TILLES, J. G. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology*, 35(3),1997, p. 229 – 235.
- SEIDLER-LOZYKOWSKA, K., DABROWSKA, J. Prace hodowlane nad jeżowką purpurową (*Echinacea purpurea* Moench.). II. Ocena kolekcji proweniencyjnej. *Herba Polonica.* 3, 1996, p. 155-161.
- SHALABY, A.S. Growth and Yield of *Echinacea purpurea* L. as influenced by planting density and fertilization. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants.* 5(1), 1997, p. 69-76.
- SCHIEFFER, G. W. Validated HPLC method for caffeic-acid derivatives and alkylamides in Echinacea solid dosage forms using single extraction procedure. *J. Am. Nutraceutical Assoc.* 3, 2000, p. 67-81.
- SCHÖNEBERGER, D. The influence of immunostimulating effects of pressed juice from *Echinacea purpurea* on the course and severity of colds. *Forum Immunol.* 8, 1992, p. 2 – 12.
- SCHULTEN, B., BULLITA, M., BALLERING-BRUHL, B., KOSTER, U., SCHAFER, M. Efficacy of *Echinacea purpurea* in patients with a common cold. A placebo controlled, randomized, double-blind clinical trial. *Arzneimittelforschung.* 51(7), 2001, p. 563-568.
- SIM, S. J., CHANG, H. N., LIU, J. R., JUNG, K. H. Production and secretion of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* - effects of in-situ adsorption, fungal

- elicitation and permeabilization. *Journal of fermentation and bioengineering*. 78(3), 1994, p. 229-234.
- SLOLEY, B.D., URICHUK, L.J., TYWIN, C., COUTTS, R. T., PANG, P.K., SHAN, J.J. Comparison of chemical components and antioxidants capacity of different Echinacea species. *J. Pharm. Pharmacol.* 53(6), 2001, p. 849-857.
- SMITH, H. H. Ethnobotany of Meskwaki. *Bull. Publ. Mus., City of Milwaukee* 4(2), 1928, p.175-326.
- SMITH-JOCHUM, C., ALBRECHT, M.L. Transplanting or Seeding in Raised Beds Aids Field Establishment of Some Echinacea Species. *Hort Science*. 23,1988, p. 1004-1005.
- SMITH-JOCHUM, C., ALBRECHT, M.L. Germination of Three Echinacea Species. *Acta Horticulturae*. 1987, p.115-120.
- SOON, S. L., CRAWFORD, R. I. Recurrent erythema nodosum associated with echinacea herbal therapy *J. A. Acad. Dermatol.* 44, 2001, p. 298-299.
- SOYLU, S., BENNET, M. H., MANSFIELD, J. W. Induction of phytoalexin accumulation in broad bean (*Vicia faba* L.) cotyledons following treatments with biotic and abiotic elicitors. *Turk. J. Agric. For.* 26, 2002, p. 343-348.
- STOLL, A., RENZ, J., BRACK, A. Isolierung und Konstitution des Echinacosids, eines Glykosids aus den Wurzeln von *Echinacea angustifolia* D.C.. *Helvetica Chimica Acta*, roč. 33, č. 238, 1950, p. 1877 – 1893. In ŠÍCHA, J., HUBÍK, J., DUŠEK, J. Obsahové látky rodu Echinacea potencionální antivirotika a imunostimulancia. *Československá farmacie*. 38(9), 1989, p. 424 – 428.
- STUART, D. L., WILLS, R. B. H. Alkamide and cichoric acid levels in *Echinacea purpurea*. *Journal of herbs, spices and medicinal plants*. 7(1), 2000, p. 91-102.
- STUART, D. L., WILLS, R. B. H. Effect of drying temperature on alkylamide and cichoric acid concentrations of *Echinacea purpurea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(6), 2003, p.1608 – 1610.
- ŠÍCHA, J., HUBÍK, J., DUŠEK, J. Obsahové látky rodu Echinacea. Potenciální antivirotika a imunostimulancia. *Českoslov. Farm.*, 1989, 424-428.
- ŠPIČKA, J., VRCHOTOVÁ, N., TRÍSKA, J., KUŽEL, S., CÍGLER, P., HRUBÝ, M., VYDRA, J. Comparison of the HPLC analytical methods for the determination of the phenolics in plants of *Echinacea purpurea* L. *Mezinárodní konference „Chromatografické metody a zdravie človeka“*. Piešťany. 2003, p. 71 – 72.

- TAYLOR, J. A., WEBER, W., STANDISH, L., QUINN, H., GOESLING, J., MCGANN, M., CALABRESE, C. Efficacy and safety of Echinacea in treating upper respiratory tract in children: A randomized controlled trial. *J. Amer. Assn.* 290(21), 2003, p. 2824-2830.
- THOMPSON, K. D. Antiviral activity of Viracea against acyclovir susceptible and acyclovir resistant strains of herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 39(1), 1998, p. 55-61.
- TŮMOVÁ, L., DUŠEK, J. Vliv kyseliny linolové na produkci sekundárních metabolitů. *Čes. Slov. Farm.* 49(2), 2000, p. 78-81.
- TŮMOVÁ L., RUSKOVÁ, R. Vliv $CdCl_2$ a $CuSO_4$ na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. in vitro. *Čes. a Slov. Farm.* 47(6), 1998, p. 261-263.
- TŮMOVÁ L., BARTÁKOVÁ M., ZABLOUDILOVÁ J.: Kyselina jodoctová jako potencionální elicitor zvýšené tvorby flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis* L. in vitro. *Čes. Slov. Farm.* 52(4), 2003, p. 189-192.
- TŮMOVÁ L., BLAŽKOVÁ R. Vliv tvorby flavonoidu v kultuře *Ononis arvensis* L. in vitro působením $CrCl_3$. *Čes. Slov. Farm.* 51(1), 2002, p. 44-46.
- TŮMOVÁ L., OSTROŽLÍK P. *Ononis arvensis* in vitro – abiotická elicítace. *Čes. Slov. Farm.* 51(4), 2002, p. 173-176.
- VANGROENVELD J., CLIJSTERS, H. Toxic effects of metals. In: FARAGO, M., E. Plants and the chemical elements. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim. 1994, p. 149-177.
- VOMEL, T. Effect of a plant immunostimulant on phagocytosis of erythrocytes by the reticulohistiocytary system of isolated perfused rat liver. *Arzneimittelforschung.* 35(9), 1985, p. 1437-1439.
- VRCHOTOVÁ, N., KUŽEL, S., TRÍSKA, J., KOLÁŘ, L., TOTUŠEK, J. Extrakce a analýza fenologických látek z třapatky nachové. *Chemické Listy*, 96, 2002, p. 636-639.
- VYDRA, J. Extrakce účinných látek rostlin *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Závěrečná zpráva interního grantu ZF JU v Českých Budějovicích č. IG 04/03, ZF JU v Českých Budějovicích 2003, p. 10.
- WAGNER, H., PROKSCH, A. Internat. Conf. Of Biotechnology and Biology of Actual Nat. Prod., Bulg. Acad. Sci, Sofia (1981) In ŠÍCHA, J., HUBÍK, J., DUŠEK, J.: Obsahové látky rodu Echinacea potencionální antivirotika a imunostimulancia. *Československá farmacie*, 38(9), 1989. p. 424 – 428.
- WERNEKE, U., EARL, J., SEYDEL, C., HORN, O., CRICHTON, P., FANNON, D. Potential health risk of complementary alternative medicines in cancer patients. *British Journal of Cancer.* 90(2), 2004, p. 408-413.

- WILLS, R. B. H., BONE, K., MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. *Nutrition Research Reviews*. 13(1), 2000.
- WILLS, R. B. H., STUART, D. L. Alkamide and cichoric acid levels in manufactured Echinacea products. *Chem. Aust.* 1999, p.17-19.
- WINK, M., LEHMANN, P. Wounding- and elicitor- induced formation of coloured chalcones and flavans (as phytoalexins) in *Hippeastrum hortorum*. *Botanical Acta*.109, 1996, p. 412-421.
- WOO, D. D. L., MIAO, S. Y. P., PELAYO, J. C., WOOLF, A. S. Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease. *Nature*. 368, 1994. p. 750-753.
- WU, C. H., MURTHY, H., HAHN, E. J., PAEK, K.Y. Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of cichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid. *Biotechnology letters*. 29(8), 2007, p. 1179-1182.
- WUSTENBERG, P., HENNECKE-VON ZEPELIN, H., H., KOHLER, G., STAMMWITZ, U. Efficacy and mode of action of an immunomodulator herbal preparation containing echinacea, wild indigo, and white cedar. *Adv Ther*. 16(1), 1999, p. 51-70.