

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
KATEDRA APLIKOVANÝCH ROSTLINNÝCH BIOTECHNOLOGIÍ

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Agroekologie

**Vliv ošetření elicitory na obsah některých biologicky aktivních látek
ve vybrané rostlině**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

Autor:
Bc. Jindřich Petr

České Budějovice, duben 2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: Jindřich Petr

Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **4106T019 Agroekologie**

Název tématu: Vliv ošetření elicitory na obsah některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině.

Zásady pro vypracování:

(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

Rostlina *Silybum marianum* (SM) obsahuje značné množství účinných látek ze skupiny flavonolignanů, tzv. silymarinový komplex, který vykazuje hepatoprotektivní vliv na jaterní buňky. Směs silybinu, silydioninu a silikristinu se nazývá silymarin a pod tímto označením je známa jako hlavní obsahová část velké řady komerčně vyráběných přípravků. Silymarin chrání játra zejména antioxidantním účinkem před škodlivými vlivy, jako jsou např. chemické přísady potravin, léky, alkohol, toxické látky z hub, virové infekce, při aplikaci steroidních hormonů a dalších látek, které mohou negativně zatížit organismus. Jsou prokázány pozitivní účinky při léčbě některých druhů rakoviny. Cílem práce je studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině. Vypracujte literární řešerši a) vliv elicitorů na obsah některých účinných látek v Ostropestřeci mariánském *Silybum marianum* (L.) nebo v jiných vybraných rostlinách b) botanická charakteristika, způsob pěstování, agrotechnika, hnojení, ochrana před škůdci a proti chorobám Ostropestřece mariánského *Silybum marianum* (L.) c) chemické složení a účinné látky v Ostropestřeci mariánském *Silybum marianum* (L.) a metody jejich stanovení. Prostřednictvím maloparcelkového pokusu odzkoušejte vliv vybraného elicitoru na obsah některých účinných látek v Ostropestřeci mariánském *Silybum marianum* (L.). Vypracujte bakalářskou práci dle Opatření děkana č. 13 ze dne 18. 12. 2009

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah průvodní zprávy: 40 – 60 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

Kužel S. a kol: Elicitation of Pharmacologically Active Substances in an Intact Medical Plant Under Field-like Conditions. *J. Agric Food Chemistry*. 57, (17): 7907-7911; Kužel S. a kol (2008): Technologie pěstování a zpracování *Echinacea purpurea* na extrakt s požadovanými prvky jakosti a podklady pro jeho realizaci. *JU v Čes. Budějovicích, ZF*, 116 s.; Tlustoš P. a kol. (2005): The Role of Titanium in Biomass Production and its Influence on Essentials Element Contents in Field Growing Crops. *Plant Soil Environ.*, 51, (1), 19-25.; Kužel S. a kol. (2003): The Mechanism of Physiological Effects of Titanium Leaf Sprays on Plants Grown on Soil. *Biological Trace Element Research*. Vol. 91, Issue 2, 179-190; Vrchotová N. a kol.: Extrakce a analýza fenolických látek z třapatky nachové (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.). *Chemické listy*, 96, 2002, 7, 636-639; Hrubý M. a kol.: Titanium in Plant Nutrition. The Contribution to Understanding the Mechanism of Titanium Action in Plants. *Journal of Plant Nutrition*. 2002,25,3; Dvořáková J.: Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině *Ostropestřec Mariánský Silybum marianum* (L.) Gaertn., Dipl. pr., JU v Č. B. *ZF*, 2006, 87; Tůmová L. a kol.: *Silybum marianum* in vitro-flavonolignan production. *Plant Soil Environ.*, 52, 2006 (10): 454458; Jegorov A. (1996): Flavonolignany novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem. *Chem. listy* 90, 859-862; Slanina J. (2000): Biologická a farmakologická aktivita lignanů. *Chem. listy* 94, 111-116; Kurkin V. et al. (2001): Flavonolignans of *Silybum marianum* Fruit. *Chemistry of natural compounds* 37 (4), 318-321; Kvasnička F. a kol. (2003): Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography*, 990, 239-245; Andrzejewska J. et al. (2010): Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. *Industrial crops and Products*. *Journal homepage: www.Elsevier.com*, doi: 10.1016/j.indcrop.2010.10.027; Kužel S., Cígler P., Hrubý M., (2006): Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin. CZ-296300, ÚPV Praha, 24. 2. 2006; Nam-Cheol Kim et al. (2003): Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*) *Org. Biomol. Chem*, 1, 1684-1689; Quaglia M.G. et al. (1999): Determination of Silymarin in the capillary electrophoresis. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19, 435-442; Hammouda F. M. et al. (1993): Evaluation of the silymarin content in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Cultivated under different agricultural conditions. *Phytoterapy research* 7 (1) 90-91.

Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Stanislav Kužel, Csc.

Datum zadání diplomové práce: 15 března 2013

Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2014

Prof. Ing. Jan Moudrý, CSc.
Vedoucí katedry

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
Děkan

V Českých Budějovicích dne 15. března 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma **Vliv ošetření elicitory na obsah některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.)** jsem vypracoval samostatně, pod vedením Prof. Ing. Stanislava Kužela, CSc., pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách. Tato diplomová práce je součástí řešení projektu FRVŠ č. j. 420/2013.

České Budejovice, duben 2014

Poděkování:

Děkuji vedoucímu diplomové práce panu Prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc. za metodické vedení a všestrannou pomoc při zpracování zadaného úkolu této práce. Děkuji také panu Ing. Janu Bastlovi za pomoc při extrakci semen a paní Ing. Ivetě Marešové za pomoc při stanovování a vyhodnocování obsahu účinných látek v semenech rostlin.

ABSTRAKT

Cílem předložené práce bylo studium účinku elicitoru – kyseliny acetylsalicylové na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.).

Hlavními účinnými látkami ostropestřce mariánského jsou silybin, silydianin, isosilybin, silychristin, označované čast jako silymarinový komplex, a taxifolin. Tyto látky mají antihepatotoxické účinky a další ochranné účinky na mnohé buňky a orgány.

Před výzkumnou částí byla provedena literární rešerše o stresu a elicitaci, původu, botanické charakteristice, růstu a pěstování ostropestřce mariánského.

Poté byl založen maloparcelkový experiment na zahradě v Hluboké nad Vltavou v roce 2013. Rostliny ostropestřce mariánského byly rozděleny do čtyř skupin, přičemž tři skupiny byly v průběhu vegetace třikrát ošetřeny roztoky elicitoru kyseliny acetylsalicylové o třech různých koncentracích - 10^{-3} mol.l⁻¹ (vysoká), 10^{-4} mol.l⁻¹ (střední) a 10^{-5} mol.l⁻¹ (nízká). Každá jedna skupina byla ošetřena pouze roztokem o jedné zvolené koncentraci, poslední skupina byla ponechána jako kontrolní a postřik byl prováděn pouze vodou.

Příprava extraktů proběhla za použití směsi acetonu, metanolu a vody. Extrakty byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Vliv elicitoru kyseliny acetylsalicylové (ASA) na obsah sledovaných biologicky aktivních látek v rostlinách ostropestřce mariánského ošetřených roztoky kyseliny acetylsalicylové o zvolené koncentraci nebyl v porovnání s kontrolní skupinou rostlin (bez aplikace elicitoru) statisticky průkazný u žádné ze zvolených koncentrací (vysoká, střední, nízká). Neúčinnost elicitoru mohla být zapříčiněna také neoptimálním stavem porostu v důsledku působení rozličných abiotických a biotických stresorů.

Klíčová slova: *Silybum marianum*, silymarin, stresor, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, flavanolignany, kyselina acetylsalicylová

ABSTRACT

The aim of this thesis was to study the effect of the acetylsalicylic acid on the stimulation of plant immunity and thus the influence on the content of the active constituents in *Silybum marianum* L. plants.

The main active constituents of *Silybum marianum* L. seeds are silybine, silydianine, isosilybine, silycristine, usually expressed as silymarin content, and taxifoline. These constituents have antihepatotoxic effect and many different protective effects on numerous organs and cells.

Knowledge about stress and elicitation, origin, botanical characterization, growth, development and cultivation of *Silybum marianum* L. were summarized before the research.

The small-plot experiment was set up in Hluboká nad Vltavou in 2013. Plants of *Silybum marianum* were divided into four groups and then three groups were treated three times during the vegetation with the acetylsalicylic acid of three different concentrations - 10^{-3} mol.l⁻¹ (high), 10^{-4} mol.l⁻¹ (medium) a 10^{-5} mol.l⁻¹ (low). Every single one group was treated with only one concentration of the acetylsalicylic acid. The last group was treated only with water and served as a control group.

The preparation of the extracts was being held with using mixture of acetone, methanol and water. The extracts were determined by High Performance Liquid Chromatography.

The effects of each chosen concentration of acetylsalicylic acid (high, medium, low) on the active constituents in seeds were not statistically proven compared to seeds without application of the elicitor (control group). The ineffectiveness of the elicitor should have been also caused by nonoptimal condition of plants due to various abiotic and biotic stressors.

Key words: *Silybum marianum*, silymarin, stressor, High Performance Liquid Chromatography, flavanolignans, acetylsalicylic acid

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	12
2.1 Léčivé rostliny	12
2.1.1 Léčivé rostliny ve světě	11
2.1.2 Pěstování léčivých rostlin v ČR	12
2.1.3 Průběh stresové reakce	13
2.2 Metabolismus rostlin	15
2.2.1 Primární a sekundární metabolismus.....	15
2.2.2 Evoluční a genetické aspekty sekundárního metabolismu ...	18
2.3 Stres.....	20
2.3.1 Stres jako pojem	20
2.3.2 Stresory	21
2.3.3 Průběh stresové reakce	22
2.3.4 Stres a primární metabolismus	22
2.4 Stimulace, elicitace a rostlinná imunita	25
2.4.1 Elicitace	25
2.4.2 Vztah rostlina - patogen.....	26
2.4.3 Abiotické elicitory	28
2.4.4 Biotické elicitory	29
2.4.5 Neharmonické hnojení.....	30
2.4.6 Kyselina acetylsalicylová	30
2.5 Ostropestřec mariánský - popis rostliny	34
2.5.1 Původ.....	34
2.5.2 Botanická charakteristika	35
2.5.3 Pěstování.....	37
2.5.3.1 Půdní a klimatické podmínky.....	37
2.5.3.2 Setí.....	38
2.5.3.3 Hnojení a výživa.....	39
2.5.3.4 Ochrana proti plevelům	42
2.5.3.5 Ochrana proti chorobám	42
2.5.3.6 Sklizeň	43
2.6 Účinné látky.....	45
2.6.1 Lignany	45
2.6.2 Flavanolignany	46
2.6.3 Silyb.....	47
2.7 Farmakologické účinky	48
2.8. Metody stanovení obsahu účinných látek v rostlině.....	50
2.8.1 Chromatografie	50
2.8.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC	52
2.8.1.2 Chromatografie na tenké vrstvě TLC	53
2.8.2 Eletromigrační metody	55
2.8.2.1 Kapilární elektroforéza.....	55
2.8.2.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	55
3. METODIKA - VLASTNÍ POKUS	57
3.1 Maloparcelkový experiment	58
3.2 Příprava extraktu.....	60
3.3 Analýza vzorku	61

4. VÝSLEDKY	62
4.1 Výsledný obsah účinných látek	62
4.2 Vliv elicitorů na obsah účinných látek	67
5. DISKUSE.	70
6. ZÁVĚR	74
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	76
8. PŘÍLOHY	92

1. ÚVOD

Motto: *φύσις κρύπτεσθαι φιλεῖ*
Přirozenost se ráda skrývá.

Hérakleitos z Efesu, zlomek B 123

Léčivý potenciál rostlin si lidstvo uvědomuje již od počátku své historie. V současné době se zájem západní společnosti soustředí především k využití léčivých rostlin jako surovin pro moderní farmacii a potravinářský průmysl k výrobě léčiv a doplňků stravy. Vzhledem k bezprostřednímu působení těchto látek na zdraví lidí či zvířat je rozhodujícím momentem pěstitelské praxe snaha o co nejvyšší kvalitu surovin, která následně rozhoduje i o ekonomickém výsledku pěstitelů.

Především v méně příznivých oblastech se jeví alternativní hospodaření v podobě pěstování léčivých rostlin jako velmi vhodné a vyhovující aktuálním zájmům společné zemědělské politiky Evropské unie, neboť odpovídá návratu k pěstování tradičních a krajových rostlin, nezřídka i v režimu ekologického zemědělství, s produkcí vysoce kvalitních surovin pro zpracovatelský průmysl. Plní také významné mimoprodukční funkce a napomáhá k trvale udržitelnému rozvoji venkova.

Jednou z farmaceuticky nejvýznamnějších velkoplošně pěstovaných léčivých rostlin je ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.). Látky silymarinového komplexu obsažené v semenech ostropestřce mají významné hepatoprotektivní účinky a současné výzkumy dokazují i pozitivní vliv při léčení některých typů nádorových onemocnění.

Kvalitu semen lze ovlivnit aplikací rozličných látek se stimulačním účinkem na rostlinné obranné mechanismy, tzv. elicitorů. Moderní analytické metody poskytují dokonalejší poznání metabolismu a vlivů specifických látek na tvorbu žádoucích metabolitů. Metoda elicitace se tedy jeví jako velmi perspektivní oblast vědeckého zájmu s významnými možnostmi praktické aplikace.

Cíl práce

Cílem práce je studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.).

Cílem práce je vypracovat literární rešerši:

- a) vliv elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.) nebo v jiných vybraných rostlinách
- b) botanická charakteristika, způsob pěstování, agrotechnika, hnojení, ochrana před škůdci a proti chorobám ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L.)
- c) chemické složení a účinné látky v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.) a metody jejich stanovení

Po dohodě s vedoucím diplomové práce byla část literární rešerše vypracována rozšířením poznatků shrnutých v bakalářské práci (Petr, 2012).

Cílem práce je prostřednictvím maloparcelkového pokusu odzkoušet vliv vybraných elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.)

Cílem práce je vypracovat diplomovou práci dle Opatření děkana č. 13 ze dne 18.12.2009.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Léčivé rostliny

2.1.1 Léčivé rostliny ve světě

Pěstování léčivých rostlin je odvětvím rostlinné výroby s dlouhou historií a velmi perspektivní budoucností. Celosvětově lze ocenit jeho význam především v produkci rostlin, které obsahují biologicky aktivní látky s příznivými účinky na lidský organismus. Tyto jsou pak v moderní farmacii aplikovány nepřímo ve formě léčiv a léků nebo přímo ve fytotherapeutických postupech alternativních a tradičních medicínských systémů. V současné době se z léčivých rostlin vyrábí asi 65 % léků a léčiv (Šula, 2006), přičemž v rozvojových zemích je odkázáno na přímé užívání léčivých rostlin jakožto základní zdravotnickou péči více než 80 % obyvatelstva (Evans, 2001).

Rostlinná říše (*Regnum vegetabile*) zahrnuje asi 700 tisíc druhů (Nováček, 2009), z nichž je známých přibližně 250 tisíc druhů rostlin vyšších, které jsou potenciálními zdroji nových léčivých látek (Prance, 1997). Dle výzkumů WHO je z vyšších rostlin k léčení užíváno asi 14 – 28 %, tedy 35 až 70 tisíc vyšších rostlin (Akerle et al. 1991, s. 26). Schippmann et al. (2002) konkretizují toto číslo na 52 885 druhů. Balunas a Kinghorn (2005) uvádějí již dokonce 85 tisíc zdokumentovaných vyšších rostlin s pozitivními účinky na lidské zdraví.

Mnohé léčivé rostliny se využívají jako aromatické a kořeninové a vice versa, čímž vznikla rozmanitá, uměle vytvořená, skupina léčivých, aromatických a kořeninových rostlin (LAKR). Tohoto termínu využívá česká legislativa při regulaci jejich pěstování právními normami. LAKR mohou být pěstovány zelenina či jako okrasné rostliny. Jejich přímé využití může být k léčení, jako koření či při tvorbě čajovin. Nepřímo jich využívá potravinářský, farmaceutický a kosmetický průmysl. Celosvětové výzkumy objevují nové možnosti využití některých léčivých rostlin k fytotherapii či jako energetických bylin.

V EU se jako léčivých, aromatických a kořeninových rostlin používá asi 2 000 druhů, z toho ve Francii cca 900 druhů, v Německu 1 500 druhů, v Maďarsku 270 druhů a v České republice 300 druhů. Nejvíce pěstovanými druhy LAKR v EU

jsou kmín kořený, koriandr setý, fenykl obecný, ostropestřec mariánský, anýz vonný, pelyněk pravý, heřmánek pravý a třezalka tečkovaná (Prošková, 2007).

Vypovídající a relevantní přehled o plochách pěstování LAKR ve světě není v současné době dostupný. Statistiky se této komoditě věnují jen okrajově. LAKR jsou ve většině případů zařazeny spolu s dalšími skupinami rostlin do kategorie „ostatní plodiny“. Skutečnosti se pravděpodobně nejvíce blíží šetření Výzkumného střediska pro zemědělství a potravinářství ve finské Karile, dle něhož celkové plochy LAKR v Evropě dosahují 170 – 200 tis. ha, v Číně 460 tis. ha a v Indii 300 tis. ha (Prošková, 2007)

2.1.2 Pěstování léčivých rostlin v ČR

Pěstování léčivých rostlin je z pohledu české rostlinné výroby okrajovým odvětvím, nicméně s velmi podstatným významem. Dle údajů Českého statistického úřadu lze v tuzemské produkci LAKR sledovat v období posledních 15 let kolísání výměry pěstebních ploch, které dosáhlo vrcholů přes 11 tis. ha v letech 1997 a 2004 a propadů pod 4 tis. ha v letech 1999 a 2008. Od roku 2009 do současnosti pozorujeme opětovný kontinuální růst.

V roce 2011 byly LAKR pěstovány na 8 588 ha, z toho léčivé rostliny na 4 063 ha, což tvoří podíl na celkové struktuře ploch osevů pouze 0,2 %.

Nejrozšířenější velkoplošně pěstovanou léčivkou u nás je ostropestřec mariánský, jehož nažky obsahují látky silymarinového komplexu s velmi ceněným hepatoprotektivním účinkem. Po něm následuje námel (vřeckaté stádium paličkovice nachové – *Claviceps purpurea* Fr. Tul.), kterým jsou uměle infikovány dnes již sterilní odrůdy žita a který vytváří v klasu místo obilek sklerocia s farmakologicky využitelnými alkaloidy. Další důležitou surovinou farmaceutického průmyslu je makovina, tj. prázdná makovice a 10 cm stonku pod makovicí, bez minerálních příměsí a prachu, získávající se z rostlin máku setého (*Papaver somniferum* L.). Pro svůj obsah alkaloidů morfinu, kodeinu a papaverinu je řazena mezi léčivé rostliny. Makovina se sklízí přibližně z poloviny celkové plochy pěstovaného máku v České republice, tj. asi 15 - 17 tisíc ha, průměrný výnos dosahuje 0,3 - 0,4 t čisté makoviny na hektar (dle informací sdružení Český mák).

Léčivé rostliny se získávají vedle pěstování i sběrem, který má v České republice velmi dlouhou tradici. Mezi nejčastější sbírané léčivé rostliny patří v České

republike tradičně šípek, list břízy bělokoré, nať třezalky tečkované a kopřivy dvoudomé, květ lípy srdčité a černého bezu, nať řepíku lékařského a přesličky rolní, list maliníku a ostružiníku a mnoho dalších – celkem okolo 70 druhů nakupovaných léčivých rostlin (Situční a výhledová zpráva MZe, 2010).

V souladu s nejmodernějšími trendy vývoje zemědělského hospodaření v západním světě se začínají otevírat možnosti pěstování LAKR v ekologickém zemědělství. Vzhledem k povaze léčivých rostlin je nasnadě zájem na co nejvyšší kvalitě výsledného produktu. V popředí zájmu je především správná pěstitelská praxe včetně posklizňové úpravy a skladování. Dle statistického šetření ekologického zemědělství ÚZEI (2011) byly v roce 2010 LAKR pěstovány na 42 ekofarmách, celkem na 240,5 ha půd v ekologickém režimu s průměrným výnosem 1,13 t.ha⁻¹. Průměrná cena prodeje zpracovatelům činila v roce 2009 sumu 74 364 Kč.t⁻¹.

Naprostá většina celkové produkce LAKR je určena pro export a pouhá 2 % spotřebuje domácí trh. Mezi nejvíce pěstované LAKR patří především kmín, fenykl, koriandr, česnek, heřmánek, meduňka, máta, malina list, saturejka, anýz, levandule, v rámci zeleniny pak také čerstvá nať (zelené koření) kopru, máty, koriandru apod. Největšími producenty LAKR jsou v České republice společnosti Sonnentor s.r.o., Leros, s.r.o. či Botanicus, spol. s r.o.

Česká republika má dlouhodobě zápornou bilanci zahraničního obchodu v oblasti koření, přičemž schodek dosahuje více než 4 tisíc tun. Naproti tomu v obchodě s léčivkami si buduje stále silnější pozici jako exportér. V roce 2010 bylo dovezeno 2 488 t pro farmaceutické a kosmetické zpracování, vyvezeno bylo 5 999 t s největším procentuálním zastoupením makoviny (88 %). Kladná obchodní bilance vyjádřená hmotností však nesouhlasí po finanční stránce, kde je především kvůli vývozu velkého objemu levných rostlin obchodní bilance negativní (Situční a výhledová zpráva MZe, 2010).

S pěstováním ostropestřce mariánského v ČR se začalo před 70. lety na Pardubicku. U nás je v přírodě ojedinělý a vzácný. Důvodem je zřejmě zimní období, kdy rostliny i semena vymrznou (Moudrý et al. 2011). Pěstování ostropestřce je v posledních letech na vzestupu a zájem ze strany tuzemských i zahraničních zpracovatelů stále roste. V roce 2009 byl ostropestřec dle šetření sdružení PELERO pěstován na 3 500 ha, další nárůst rozsahu pěstování PELERO předpokládá i v roce 2010 a následujících letech (Situční a výhledová zpráva MZe, 2010). V roce 2011-2012 byl ostropestřec dle šetření Sdružení PELERO pěstován cca na 5 000 ha.

2.2 Metabolismus rostlin

2.2.1 Primární a sekundární metabolismus

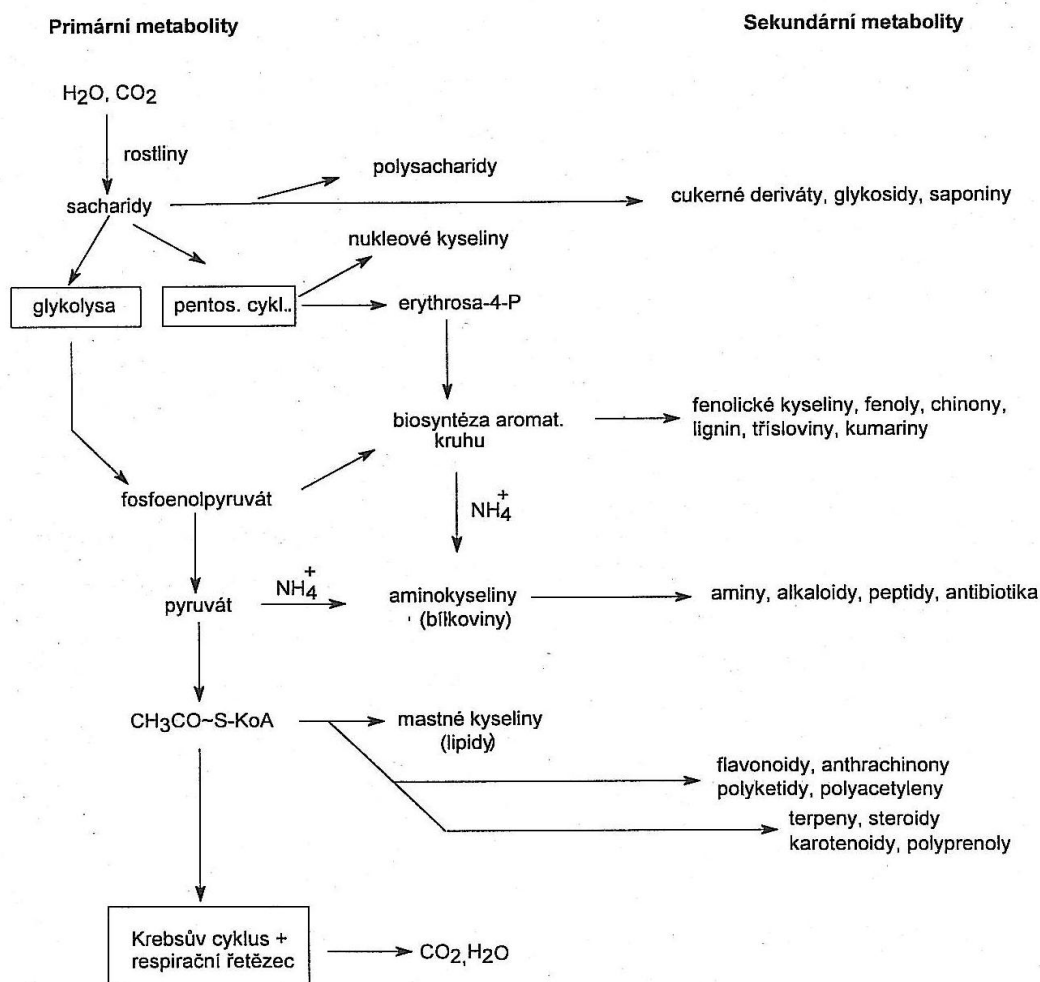
Metabolismus je geneticky zakódovaný soubor všech enzymaticky řízených, prostorově a časově uspořádaných reakcí, v nichž dochází k přeměně přijatých látek a energií uvnitř systému, tj. k tvorbě metabolitů, a jejich následné výměně s vnějším prostředím, jejich ukládání či dalším přeměnám v prostředí vnitřním. Metabolismus patří mezi základní projevy živých organismů. Lze z něj odvodit další projevy jako růst, rozmnožování, hojení, atd. (Ottův slovník naučný nové doby, 2001, s. 199). Metabolismus slouží k udržování jejich biologické homeostáze a termodynamického stacionárního nerovnovážného stavu. Živé systémy mohou vlastně existovat jen na účet energie z okolí (Laštůvka, 1988). Metabolické procesy poháněné dodávanou energií mohou směřovat buď od jednodušších chemických sloučenin ke složitějším, jedná se o syntetické pochody - anabolismy, nebo opačně, pak hovoříme o rozkladných pochodech – katabolismech (Nováček, 2009).

Na metabolické procesy lze pohlížet i z hlediska jejich obecnosti či důležitosti pro konkrétní organismus, poté rozlišujeme primární a sekundární metabolismus. Primární, též základní, metabolismus je pro život organismu nezastupitelný, neboť v jeho cestách vznikají základní organické sloučeniny, jako jsou cukry, tuky, bílkoviny, proteinogenní aminokyseliny či karboxylové kyseliny citrátového cyklu. Na těchto látkách závisí život, růst a přenos genetické informace organismů. Biochemické pochody primárního metabolismu probíhají u všech organismů stejným či velmi podobným způsobem a jsou nezávislé na biodiverzitě (Vodrážka, 1996). Z produktů primárního metabolismu mohou organismy za účasti specializovaných enzymů syntetizovat další, druhově specifické, chemické látky, tzv. sekundární metabolity. U živočichů se vyskytují spíše sporadicky, zato odhadem z 80 % jsou to produkty rostlin a hub, které v metabolismu pozoruhodně „experimentují“ (Macholán, 2003).

Biogeneze sekundárních metabolitů se odvíjí pouze z několika málo primárních metabolitů, z cukrů, aminokyselin, mevalonové kyseliny, šikimové kyseliny, acetylkoenzymu A a malonylkoenzymu A (Jahodář, 2006). Z etymologického hlediska je třeba zdůraznit, že většina názvů jednotlivých látek

pochází od pojmenování biologických taxonů, z nichž byly izolovány, nebo jsou odvozeny z klasických jazyků podle nějaké významné vlastnosti (Macholán, 2003).

obr. č. 1 - Biosyntetické vztahy mezi metabolity (Macholán, 2003)



K biochemickým reakcím sekundárního metabolismu dochází v cytoplazmě pouze za určitých podmínek, jeho intenzita se mění v závislosti na ontogenezi rostliny či vnějších podmínkách, některé složky sekundárního metabolismu se mohou vyskytovat v aktivní formě, jiné se aktivují až při poranění či infekci (fytoalexiny) (Jahodář, 2006). Stávající definice nepřikládají sekundárním metabolitům významnou funkci v metabolismu producenta. Tento pohled se však jeví již jako zastaralý, neboť sekundární metabolity velmi často mají vysokou energetickou hladinu (Nováček, 2009) a plní mnoho důležitých a mnohdy zásadních funkcí pro život organismu (např. rostlinné hormony) (Vodrážka, 1996).

Existuje několik teorií, proč se rostlinám vyplatí vynakládat energii a stavební látky do syntézy sekundárních metabolitů místo toho, aby je využily k růstu a rozmnožování. V praxi pak předpokládáme, že produkce sekundárních přírodních látek je vyvolána kombinací níže popsaných příčin.

Rostlinné druhy nemají vyvinutý vylučovací systém, tudíž nejsou schopny nepotřebné produkty primárního metabolismu, exkrety, efektivně eliminovat a jsou nuceny syntetizovat z nich metabolity sekundární, a ty dále ukládat ve vakuolách, buněčných stěnách či sekrečních buňkách a prostorech (Jahodář, 2006). Sekundární metabolity tak vznikají jako výsledek detoxikace látek. Většina rostlin neumí odbourávat tryptofan a aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrosin, proto z nich produkují a hromadí sekundární metabolity (alkaloidy, deriváty skořicové kyseliny) (Vodrážka, 1996).

Z velmi vysokého počtu sekundárních metabolitů je pak určitá, relativně malá, část pro organismus nezbytná. Jedná se o signální molekuly umožňující koordinaci metabolismu různých specializovaných buněk (mnohé hormony a neurotransmitery), koordinující aktivitu organismů téhož druhu (feromony) a vztahy mezi různými skupinami organismů v ekosystémech (Vodrážka, 1996)

V posledních letech stále oblíbenější teorie evolučního molekulového modelování chápe jejich vznik jako účelový biogenetický proces adaptace rostlin na jejich životní prostředí. Poukazuje na úzkou korelaci chemických struktur sekundárních metabolitů (fytoncidů, feromonů ad.) a jim odpovídajících struktur endogenních substrátů u parazitů či kompetitorů. Díky těmto svým vlastnostem plní funkce ochranných látek, atraktantů pro opylovače či přenašeče semen, uplatňují se při reprodukci a růstu rostliny, slouží jako látky impregnující, hormonální či detoxikační (Jahodář, 2006). Mimoto některé sekundární metabolity působí jako kofaktory enzymů, stavební materiál buněčných stěn či jako skladovací formy dusíku a uhlíku. Další sekundární přírodní látky chrání před světlem, působí při fotosyntéze, transportu iontů či zvyšují stabilitu membrán (Vodrážka, 1996).

Z hlediska biogeneze se sekundární metabolity dělí na polyketidy, steroidy, terpeny a látky vznikající z kyseliny šikimové, mezi nejdůležitějšími skupinami sekundárních metabolitů lze jmenovat například silice, pryskyřice, třísloviny, alkaloidy, glykosidy, hořčiny či saponiny. Obsah těchto látek učinil v průběhu lidské historie tisíce rostlin středem lidského zájmu (Jahodář, 2006).

Podle biologických funkcí můžeme dělit sekundární metabolity na tyto hlavní skupiny (Vodrážka, 1996):

1. Efektory působící v buňce, která je syntetisovala, tj. intracelulární přenašeče informací.
2. Efektory účinkující na jiné buňky téhož organismu, tj. intracelulární přenašeče informací (rostlinné a živočišné hormony, neuroendokrinní transmittery).
3. Efektory působící na jiné organismy (rostlinná barviva, vůně květin, antibiotika, insekticidy, fytoalexiny, toxiny, odpuzující látky, sexuální vábící látky).
4. Faktory umožňující využívání specifických ekologických situací (chelatační činidla, antibiotika a inhibitory antibiotické aktivity).
5. Skladovací formy odpadních produktů primárního metabolismu.

2.2.2 Evoluční a genetické aspekty sekundárního metabolismu

Rostlinný genom obsahuje v průměru 20 000 - 60 000 genů, z nichž 15 - 25 % kóduje enzymy sekundárního metabolismu (Bevan et al. 1998, Somerville a Somerville, 1999). Je zřejmé, že počet enzymů, které se podílejí na produkci sekundárních metabolitů, dosahuje napříč rostlinnou říší řádu stovek tisíc (Pichersky a Gang, 2000), některé z nich katalyzují z více substrátů rozličné sekundární metabolity (Allina et al. 1998, Maury et al. 1999), jiné se vzácněji podílejí na tvorbě rozličných metabolitů z téhož substrátu (Phillips et al. 1999).

Schopnost syntézy sekundárních metabolitů odpovídala v průběhu evoluce rozličným potřebám toho kterého rostlinného rodu. Vyvinuly se éterické oleje a specifické zbarvení, které zvyšovaly pravděpodobnost opylení (Dudareva a Pichersky, 2000, Mol et al. 1998), vznikly biochemické cesty pro tvorbu fytoncidů, které potlačují růst okolních rostlin nebo pro tvorbu látek repelentních, odpuzujících (Bennet a Wallsgrove 1994), mnoho z nich zodpovídá za specifické funkce regulace na buněčné úrovni, jako např. odolnost vůči osmotickému stresu (Nuccio et al. 1999).

Výčet funkcí jednotlivých sekundárních metabolitů není doposud zcela vyčerpán. Různé rostliny vyvinuly odlišné chemické struktury k dosažení stejných cílů. Proto se například liší chemické složení látek atrahujících opylovače produkovaných různými rostlinnými druhy, přestože se jedná o stejnou skupinu opylovačů (Knudsen a Tollsten, 1993). Tato obrovská diverzita je z genetického hlediska dána jednak možností vzniku genů sekundárního metabolismu náhodnými mutacemi při duplikaci genů metabolismu primárního, ale také možností vzniku nových genů pouze uvnitř metabolismu sekundárního (Pichersky a Gang, 2000).

2.3 Stres

2.3.1 Stres jako pojem

Pojem stres používáme v běžné řeči především jako synonymum pro duševní zátěž, avšak stresem se dnes zabývají přední odborníci mnoha rozličných vědních oborů. Do češtiny bylo toto slovo přejato z anglického „stress“, jež nese sémantické významy jako například tíseň, nesnáze či tlak (Fronek, 1998). Etymologicky lze sledovat původ slova až k latinskému slovesu „stringo, stringere, strinxi, strictum“ s významem utahovati, stahovati, zadržovati (Křivohlavý, 1994).

Výraz stres se ve významu těžkost či nepřízeň osudu objevuje v literatuře již ve 14. století, avšak bez přesnější specifikace. V 17. století pak pojem stres (stress) užíval fyzik R. Hooke v souvislosti se studiem konstrukčních vlastností mostů, které musely odolávat různým zátěžím (loads) přírodních sil. Výrazem stres definoval pole, ve kterém byl materiál vystaven zátěži. Celý vztah je pak vyjádřen v Hookově zákonu elasticity (Lazarus, 1993).

Jako první použil termín stres v biologickém kontextu maďarský endokrinolog Hans Selye, který se od třicátých let dvacátého století systematicky stresem zabýval. Navázal na práce Clauda Bernarda o stabilitě vnitřního prostředí, „milieu intérieur“ (Skinner, 1991), a Waltera Cannona o homeostázi jakožto schopnosti organismů udržovat své vnitřní prostředí pomocí složitých mechanismů v dynamicky konstantním stavu (Cannon, 1929).

Hans Selye ve svých pozdějších pracích popsal i pozitivní efekty stresu a navrhl rozlišovat mezi pojmy „eustress“ a „distress“. Pozitivní stres, „eustress“, vede ve svém důsledku k posílení organismu a je vnímán jako vítězně překonaná zátěž, zatímco negativní stres je vnímán jako znepokojující zátěž, jejíž překonání stálo mnoho sil. Reakce organismu je v obou případech stejná, záleží pouze na vnímání a hodnocení subjektu (Selye, 1976). Subjektivita je na úrovni vegetativního rostlinného světa záležitostí nevědomou, kterou můžeme vztahovat ke schopnosti „autopoiesis“, tj. ke schopnosti sebevytváření a sebeudržování (Varela et al. 1974). Ačkoli nové teorie poznání (Capra, 2004, Bateson, 2006) spatřují kognitivní proces jako proces ontologický, nepředpokládáme, že by rostlina mohla zažívat stresovou situaci jako hodnotově relevantní. Člověk jako pozorovatel však

může vnímat působení stresu pozitivně, vede-li k intenzivnějšímu projevení přirozenosti rostliny v podobě zvýšení obsahu účinných látek.

2.3.2 Stresory

Vše živé má překvapivě složitou vnitřní strukturu, fyzicky realizovanou sítí vnitřních vztahů, skrze kterou komunikuje s okolím. Tím, jak rostlina realizuje za pomoci energie získané metabolismem své možnosti, vystavává do určitého tvaru a vytváří komunikační rozhraní vůči okolí. Rostlina je udržována průtokem látek a energie, které získává z okolního prostředí, je tedy otevřeným systémem (Kratochvíl, 1994).

Rostlina je bezprostředně začleněna do svého životního okruhu. Její hranice jsou jaksí otevřeny světu. Plessner označil formu pozicionality rostliny jako otevřenou. Rostlina je sama sebou právě skrze své okolí, což je v protikladu ke zvířecí říši, neboť zvíře má své hranice přísně vymezené a uzavřené, jeho pozicionalita je uzavřená (Fischer, 2000). Životní prostředí, které se zpřítomňuje v podobě žitého světa, tzv. „Umwelt“ (Uexküll, 1934), v němž rostlina realizuje svůj životní cyklus, sestává v nejobecnější rovině z přímého a nepřímého působení organismů v komplexu přírodních podmínek. Ekologické faktory tedy dělíme na biotické (vnitrodruhové a mezidruhové vztahy, příp. antropogenní faktor - působení člověka) a abiotické (fyzikální a chemické). Každý organismus je schopen se přizpůsobit určitému rozmezí působení každého jednotlivého faktoru, hovoříme o jeho ekologické valenci, která může být pro určitý faktor relativně široká - druhy euryvalentní, nebo relativně úzká - druhy stenovalentní. Nejvyšší zdatnosti, tj. schopnosti rozmnožit se, dosahuje organismus v pásmu ekologického optima působení faktoru a při dostatečné přítomnosti zdrojů. Pro niku populací platí výše uvedené per analogiam (Begon et al. 1990).

Jestliže určitý faktor působí mimo optimální hodnoty fylogeneticky zakódované v rostlině, tedy zatěžuje rostlinu nad běžnou úroveň (Pulkrábek et al. 2005) a narušuje její homeostázu, vyvolává napětí a stres, bývá klasifikován jako stresor, tj. původce stresu (Kovalčík a Kovalčíková, 1974).

Stresory působí na celou rostlinu, tj. na kořeny, nadzemní část i na vyvíjející se semena. Rostliny jsou přizpůsobeny k vykonávání všech důležitých životních funkcí za poměrně značného kolísání faktorů vnějšího prostředí.

Při působení stresorů může rostlina dosáhnout nového rovnovážného stavu na základě činnosti kompenzačních procesů. Při nezvládnutí vlivu stresorů dojde až k uhynutí rostliny (Bláha et al. 2003).

2.3.3 Průběh stresové reakce

Působení stresorů vede k mobilizaci obranných či nápravných zařízení (Kovalčík a Kovalčíková, 1974), tedy ke stresové reakci, která probíhá ve čtyřech fázích, a to ve fázi poplachové - fázi restituční - fázi rezistence - fázi vyčerpání.

Poplachová fáze je zahájena bezprostředně po účinku stresoru či spíše kombinace stresorů, kdy jsou jejich působením narušeny buněčné struktury a životní funkce rostliny. V restituční fázi, nedojde-li ovšem k překročení letální meze rostliny a jejímu úhynu, začnou pracovat kompenzační mechanismy. Tyto mechanismy směřují ke zvýšené odolnosti rostliny ve fázi rezistence vůči působícím stresorům. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresorů nemusí být zvýšená odolnost rostliny vždy trvalého charakteru a může dojít opět k jejímu poklesu ve fázi vyčerpání (Bláha et al. 2003).

Výsledkem stresové reakce je určitá úroveň adaptační schopnosti. Přechodně se může zvýšit i úroveň odolnosti vůči biotickým stresorům - tento jev se nazývá aklimatizace. Řada rostlinných druhů se dokáže vyhnout působení stresorů, většinou se však rostlina pokouší o nastolení tolerance vůči stresu (Bláha et al. 2003)

2.3.4 Stres a primární metabolismus

V posledních letech je velmi důkladně studován mechanismus obranných reakcí rostlin ve stresových situacích obzvláště v souvislosti s produkcí druhově specifických sekundárních metabolitů. Zajímavé výsledky však přináší i méně exponovaná oblast studia vlivu stresových faktorů na primární metabolismus rostlin. Vzhledem k vzájemné provázanosti a korelaci primárního a sekundárního metabolismu u rostlin, jeví se tato oblast jako neméně důležitá (Ryšlavá a Doubnerová, 2010).

Spuštěné obranné mechanismy vyžadují obecně změnu v distribuci živin a energie rostlinného organismu. Některé dřívější studie poukázovaly na doprovodný pokles zdatnosti (zpomalení růstu, snížení výnosu), který měl být zapříčiněn jednak

autotoxicitou produktů těchto mechanismů (Baldwin a Callahan, 1993) či jejich vysokou energetickou náročností (Heil et al. 2000, Smedegaard-Petersen a Stolen 1981, Zangerl et al. 1997).

Nové výzkumy poukázaly na nesnadnou měřitelnost poklesu zdatnosti (Purrington, 2000, Walters a Boyle, 2005) a prokázaly její příčinnou souvislost spíše s úrodností půdy (Ros et al. 2008) a působením faktorů prostředí (Agrawal, 2000). Vysoké energetické nároky však byly prokázány nepochybně (Heil a Bostock, 2002, Smedegaard-Petersen a Tolstrup, 1985).

Základním projevem změn primárního metabolismu při stresové situaci je zpomalení fotosyntézy a uzavírání průduchů, především v místě napadení či poranění a jeho blízkém okolí, které umožňuje využít energii na obrannou reakci (Somssich a Hahlbrock, 1998) a zároveň chrání fotosyntetický aparát před oxidativním poškozením (Niyogi, 2000). Nicméně poškozené buňky mají zvýšené energetické nároky, proto dochází ke zvýšení koncentrace sacharózy v apoplastu. Následně je enzymaticky štěpena na glukózu a fruktózu, které jsou transportovány do buněk, aby uspokojily energetické nároky (Truernit et al. 1996). Rostlinná respirace je tedy pozitivně stimulována (Smedegaard-Petersen a Stolen 1981).

V reakci na působení abiotických a biotických stresorů dochází také ke změnám aktivity enzymů, které regulují metabolické pochody. Při narušení vodní rovnováhy rostlin chladem, suchem či zasolením půdy bylo sledováno zvýšení aktivity enzymu fosfoenolpyruvátcarboxylasy (PEPC) (Gonzalez et al. 2003, Sanchez et al. 2006). Enzym PEPC umožňuje rostlině využívat nižší koncentrace CO₂ (Ryšlavá a Doubnerová, 2010). Za podmínek zvýšené koncentrace solí může dokonce docházet k přechodu metabolismu C₃ na CAM (Crassulacean Acid Metabolism) spojenému se syntézou a zvýšením aktivity PEPC, což bylo pozorováno například u kosmatce křišťálového (*Mesembryanthemum crystallinum*) (Höfner et al. 1987).

PEPC spojuje metabolismus sacharidů s metabolismem aminokyselin a proteinů, tato skutečnost může být pro rostlinu za stresu, kdy je nárok na syntézu proteinů vyšší, důležitá. (Ryšlavá a Doubnerová, 2010).

Zvýšení aktivity enzymu NADP-dependentní malátdehydrogenasa, který v rostlinách za stresových podmínek katalyzuje produkci redukčních ekvivalentů NADPH nutných pro biosyntézu fytoalexinů a dalších obranných látek (Piterková et al. 2005), bylo sledováno u rostlin tabáku při působení biotického

stresu (Ryšlavá et al. 2003) v C3 i CAM rostlinách v souvislosti se solným stresem (Valderrama et al. 2006)

NADP katalyzuje také vznik pyruvátu z L-malátu, který může být navíc využit pro biosyntézu lipidů na opravy poškozených membrán. NADPH také slouží jako koenzym antioxidantních enzymů (Piterková et al. 2005).

Zvýšení aktivity enzymu pyruvát, fosfát dikinasy (PPDK) bylo také prokázáno v souvislosti se stresem (Ryšlavá a Doubnerová, 2010). Další studium enzymatických změn metabolismu C3 rostlin by mohlo blíže objasnit i jejich možnosti získávání CO₂ ve stresových podmínkách.

2.4 Stimulace, elicitace a rostlinná imunita

2.4.1 Elicitace

Působení biotických a abiotických stresorů ovlivňuje u rostlin tvorbu sekundárních metabolitů, které mohou obsahovat účinné látky s využitím ve farmaceutickém průmyslu. Pakliže stresor pozitivně ovlivňuje tvorbu žádoucích látek, lze chápat jeho efekt pozitivně jako stimulaci, nabuzení obranných mechanismů rostliny. Elicitory indukují v rámci rostlinných obranných mechanismů tvorbu nízkomolekulárních sekundárních metabolitů fytoalexinů, jako jsou například terpeny, flavonoidy, kumariny, isoflavonoidy, steroidy, stilbeny a další. Využití stimulačního efektu specifických látek se nazývá elicitace (Dicosmo a Misawa, 1985).

Radman et al. (2003) rozdělují elicitory na fyzikální a chemické, ty pak na abiotické a biotické, a ty na elicitory komplexního složení a definovaného složení.

tab. č. 1 - Rostlinné elicitory (Radman et al. 2003)

TABLE 1

Elicitors of plants

Elicitors					Reported effects on	
Physical Elicitors	Injury				P	
	Abiotic	Metal ions (lanthanum, europium, calcium, silver, cadmium), oxalate			Pc	
		Complex Composition	Yeast cell wall, Mycelia cell wall, Fungal spores		Pc, F	
Chemical Elicitors	Biotic	Defined Composition	Carbohydrates	Polysaccharides	Alginate LBG Pectin Chitosan Guar Gum	Pc, F, B F Pc, F Pc Pc
				Oligosaccharides	Mannuronate Guluronate Mannan Galacturonides	F F F Pc
				Peptides	Glutathione	Pc
				Proteics	Proteins	Cellulase, Elic- itins, Oligandrin
			Lipids		Lipopolysaccharides	Pc
			Glycoproteins		Not characterized	Pc
			Volatiles		C ₆ -C ₁₀	Pc

Abbreviations: P, plants; Pc, plant cell culture; B, bacterial cell culture; F, fungal cell culture.

Kužel et al. (2005) pak elicitaci definují jako indukci obranných mechanismů rostlinného organismu, například zvýšení tvorby sekundárních metabolitů, vyvolanou aplikací vnějšího stresového faktoru chemického, biologického, světelného, tepelného či mechanického charakteru.

Bláha et al. (2003) označují elicitor naproti tomu v užším smyslu jako látku, která se vytváří po proniknutí patogenu do organismu rostliny a spouští obrannou reakci rostliny. Elicitory dělí na exogenní, které jsou metabolity patogenu, např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy, a endogenní, které se uvolňují z narušovaných buněčných stěn organismů, např. oligoglukany, oligomery chitinu, oligogalakturonany.

2.4.2 Vztah rostlina - patogen

Rostlina je vzhledem k omezené možnosti pohybu vhodným terčem mnoha parazitů. Proto se u rostlin vyvinuly v průběhu evoluce velmi účinné koordinované systémy pasivních a aktivních způsobů obrany, které omezují počet mikroorganismů schopných způsobit chorobu.

Pasivní dráha obranného mechanismu rostliny spočívá ve vrozené rostlinné imunitě, která je založena na detekci unikátních molekulárních struktur mikrobů (tzv. MAMP - microbe-associated molecular patterns) (Ausubel, 2005, Gohre a Robatzek, 2008, He et al. 2007). Jedná se například o bakteriální flagellin (Gómez-Gómez a Boller, 2000) či chitin plísni (Kaku et al. 2006, Miya et al, 2007), jejichž rozpoznání rostlinou může spustit obranné reakce posilující rostlinnou imunitu.

Úspěšné patogeny však vyvinuly v průběhu evoluce účinné bílkoviny, které vyžadují aktivní obrannou reakci rostliny, neboť vrozené obranné mechanismy na jejich potlačení nestačí (Bolton, 2009, O'Connell a Panstruga, 2006, van Esse et al. 2008).

Zda je rostlina náchylná nebo rezistentní k infekci záleží na mnoha nepatrných interakcích mezi molekulami tvořenými rostlinou a molekulami tvořenými patogenem. V procesu poznání jsou klíčové geny rezistence (R) rostliny. Ty kódují receptory, jež jsou schopny vzájemně reagovat se specifickými, to jest odpovídajícími proteiny, pocházejícími z patogenu. Téměř každá interakce hostitel –

patogen je jedinečná ve způsobu aktivace, lokalizace, trvání a rozsahu obranných reakcí (Věchet, 2011).

Obranná reakce rostliny je vyvolána signálními molekulami, elicitory, které se váží na specifické receptory na povrchu buněčných membrán a vytváří signál ke spuštění obranných mechanismů. Mezi nejdůležitější signální sloučeniny, které aktivují rozličné obranné mechanismy, patří přechodný reaktivní kyslík, kyselina salicylová, oxid dusičný, etylén a kyselina jasmonová (Věchet, 2011).

V místě penetrace rostliny patogenem jsou extracelulárně syntetizovány silné oxidanty, tak jako H_2O_2 , O^{2-} , OH , které vedou k oxidativnímu propuknutí (vzplanutí), následovanému odumřením infikovaných buněk podle mechanismu podobného apoptóze u obratlovců (Lam et al. 1999). Tento mechanismus je podmíněn změnou prostupnosti membrán, která vede k přívalu vápníku a draslíku a výtoku chloridu.

Podle Thomma et al. (2001) je tato obranná strategie zvláště účinná proti biotrofním patogenům (bakterie, houby a viry).

Lokální proces následně vytváří signální molekuly, které se šíří celou rostlinou, a dochází k aktivaci patogenezí vztažených genů (PR-geny). Rostlina začíná akumulovat ochranné látky, stěny buněk zesilují a je v nich produkována kyselina salicylová. Celistvost těchto událostí je nazývána jako systémově získaná rezistence (SAR) (Mitter et al. 1998).

Další systémová reakce k infekci patogenem je indukovaná systémová reakce (ISR), které se neúčastní kyselina salicylová a která se odlišuje od systémově získané reakce aktivací některých odchylných skupin genů patogenezí (Pieterse et al. 1996).

Obranná reakce rostliny se projevuje na fyzikální a na chemické úrovni. Fyzikální reakce na snahu patogenem proniknout do hostitelské buňky spočívá v nahromadění cytoplazmy okolo místa útoku, zvýší se tvorba kalózy a tvoří se papily, buněčné stěny se zpevňují ligninem. Pokud buňka opraví a posílí buněčnou stěnu dostatečně rychle, účinně tak redukuje průnik patogenem (Černý, 1989, s. 99).

Chemický obranný mechanismus rostliny zahrnuje konstitutivní fytoalexiny s mikrobiální aktivitou, které se v rostlině nacházejí konstantně, nezávisle na vnějším nebezpečí. Některé fytoalexiny se aktivují až na základě signalizace patogenem. Dalšími skupinami látek účinnými při napadení rostlin patogenem jsou laktony, kyanogenní glykosidy, saponiny, terpeny, stilbeny, taniny či defensiny (Věchet, 2011).

2.4.3 Abiotické elicitory

Abiotické elicitory jsou středem méně intenzivního zájmu než biotické (Radman et al. 2003) V praxi se nejčastěji využívá chemicky čistých sloučenin anebo jednoduchých sloučenin kovů a vzácných kovů obvykle aplikovaných ve vodném roztoku o velmi nízké koncentraci (Dvořáková, 2006).

Mnoho kovových prvků se v rostlinném organismu běžně nachází. Z makroelementů jsou to hořčík a vápník, z mikroelementů pak železo, molybden, mangan, kobalt, zinek, měď, lithium, olovo ad. Tyto prvky, které se v rostlinném organismu vyskytují v podobě iontů, organických a anorganických solí, chelátů či oxidů, působí mnohdy jako katalyzátory enzymatických reakcí, uplatňují se například při transportních pochodech či při neutralizaci organických kyselin, jsou nepostradatelné pro fotosyntézu, biosyntézu chlorofylu a respiraci, ovlivňují také metabolismus rostlinných hormonů (Nováček, 2009).

Obsah těchto prvků v rostlině se v průběhu času přirozeně mění. Perspektivní výsledky by v budoucnu mohly nabídnout výzkumy zaměřené na studium kombinovaného působení několika abiotických elicitorů zároveň, korelace mezi obsahem určitého mikroprvku v rostlinném organismu a účinností rozličných koncentrací na jeho bázi založených elicitorů, vztahu mezi biorytmy rostlin a délkou periody aplikace elicitoru.

Wu et al. (2001) například prokázali zvýšení obsahu taxolu v suspenzní kultuře při použití lanthanu na 280 % bez znatelných změn v produkci biomasy.

Mnohé další vzácné kovy mají stimulační účinky na rostlinný organismus, respektive v nižších koncentracích podporují růst kultury, ve vyšších jej potlačují. Tento efekt byl sledován při působení iontů europia v kalusové kultuře reveně dlanité (*Rheum palmatum*) (Lu et al. 1997) či po přidání iontů ytterbia do kalusové kultury koptisu čínského (*Coptis chinensis*) (Lu et al. 1998).

Kašparová et al. (2007) sledovali vliv abiotického elicitoru síranu měďnatého na produkci suspenzní kultury jetele lučního (*Trifolium pratense L.* varieta DO-8 a varieta DO-9). Byl zaznamenán významný nárůst produkce flavonoidů, který dosáhl u obou variet maxima (230%) při 168 hodinové aplikaci koncentrace 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Produkci isoflavonoidů u variety DO-8 stimulovala zejména 48 hodinová aplikace koncentrace 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, kdy došlo k nárůstu produkce genistinu o 860 % a genisteinu o 50 %, u variety DO-9 měla největší elicitální účinek 168 hodinová

aplikace koncentrace 10 μmol , při níž nastalo zvýšení produkce genisteinu o 124 % a diadzeinu o 300 %. Flavonoidy a isoflavonoidy plní v rostlině obranné funkce, přičemž skupina isoflavonoidů patří mezi významné fytoestrogeny, které mohou příznivě působit na zdraví člověka při kardiovaskulárních poruchách, osteoporóze či menopauzálních problémech (Tham et al. 1998).

Siatka a Kašparová (2007) dále prokázali vliv vanadičnanu sodného na produkci kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské (*Angelica archangelica L.*), který v koncentracích 0,2 a 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ na světle vedl k růstu produkce kumarinů o 46 % a 25 %.

Produkci flavonoidů ovlivňují dle Duška (1999) elicitory v podobě chloridu rtuťnatého, chloridu kademnatého, síranu měďnatého, síranu manganatého a dusičnanu olovnatého.

2.4.4 Biotické elicitory

Živé organismy ve svém životním prostředí běžně vstupují do různých vztahů s dalšími organismy svého druhu i mezidruhově. Mezi biotické stresory je možné řadit patogenní mikroorganismy, jako jsou např. viry, bakterie a jiné mikroorganismy, houby, dále hmyzí a živočišné škůdce, ale také rostliny. Biotické elicitory komplexního složení pak bývají nejčastěji homogenáty virů, bakterií a hub (Hnilička et al. 2003).

Marinelli et al. (1994) například prokázali zvýšení akumulace flavonoidů v suspenzní kultuře jehlice rolní (*Ononis arvensis*) elicitací homogenátem z usmrcených buněk z *Escherichie coli* a kropidláka zemního (*Aspergillus terreus*).

Biotické elicitory na bázi organických sloučenin představují druhou, velmi širokou skupinu látek se stimulačními účinky, přičemž počet nově objasněných molekulárních struktur rozličných biotických elicitorů v poslední době stále stoupá. Řadíme sem různé proteiny, glykoproteiny, oligosacharidy či rostlinné hormony (Anderson, 1989, Hahn et al. 1989).

Elicitaci samotnou organickou látkou využili ve svém experimentu Tůmová a Dušek (2000), kteří tak prokázali významnou elicitaci kyseliny linolové vedoucí ke zvýšené tvorbě fytoalexinů (isoflavonoidů) v listech rostliny fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*). Působení kyseliny linolové je přičítáno blízkosti její struktury ke struktuře kyseliny gama-linolenové, jež je prekurzorem kyseliny

jasmínové, jejíž methylester je fytohormonem v obranném metabolismu rostlin (Longland et al. 1987).

Zacharius, Kalan (1990) pozorovali akumulaci glyceolinu v suspenzní kultuře sóji luštinaté (*Glycine max*) vyvolanou elicitací homogenátem *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.

Fischer, Quijano (1985) prokázali účinnost elicitace na produkci thiarubrinu A, který má antivirové, antibakteriální a fungicidní účinky, v kultuře vlasových kořenů rostliny ambrózie peřenolisté (*Ambrosia artemisifolia*).

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 záleží na mnoha faktorech, které často působí synergicky, jako jsou stáří kultury, fyziologický stav rostliny, 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 (Pexídr, 2004).

Doposud stále není uspokojivě vysvětlen mechanismus účinku biotických a abiotických elicitorů, jakož ani struktura biosyntetických drah sekundárního metabolismu rostlin (Siatka a Kašparová, 2007).

2.4.5 Neharmonické hnojení

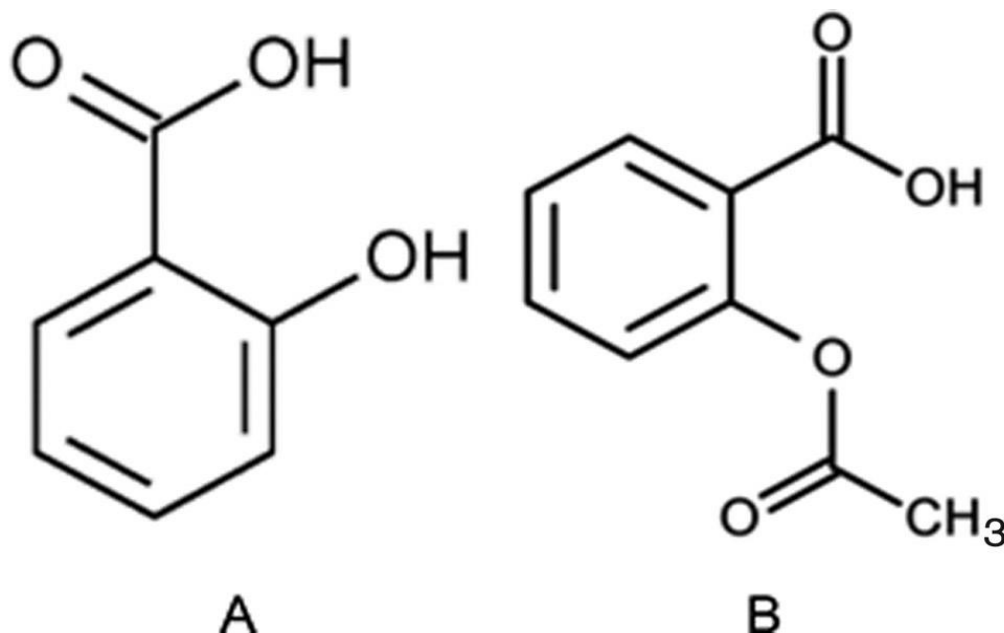
Nabuzení sekundárního metabolismu způsobil i stres vyvolaný neharmonickým poměrem živin při hnojení (Pašek, 1997). Kolář (1982) dosáhl tímto způsobem zvýšení tvorby genisteinu u vlničky bobu mnoholisté a jetele lučního. Podobný efekt byl pozorován u rostliny třepatky nachové hnojené neharmonickým poměrem živin v podobě šestinásobného přebytku minerálního dusíku k draslíku a dalším živinám. V tomto případě došlo až k 60 % nárůstu obsahu účinných látek oproti rostlinám hnojeným harmonickým poměrem živin (Kolář et al. 1998).

2.4.6 Kyselina acetylsalicylová

Kyselina acetylsalicylová (*Acidum acetylsalicylicum* – ASA) je fenolickou sloučeninou, chemicky 2 - acetoxybenzoovou kyselinou, derivátem kyseliny salicylové (*Acidum Salicylicum* - SA), chemicky 2 - hydroxybenzoové kyseliny

(Janda a Valentová, 2014). Skládá se z 60 % uhlíku, 35,5 % kyslíku a 4,5 % vodíku, její bod tání je 136 °C a bod varu 140 °C. Při pokojové teplotě se jedná o bílý krystalický prášek, jehož hustota činí 1,40 g.cm⁻³ (Myers, 2007).

obr. č. 2 - A – kys. salicylová, B – kys. acetylsalicylová (Janda a Valentová, 2014)



Kyselina salicylová je rostlinným hormonem, který mimo svou funkci v mnohých fyziologických procesech (klíčení, buněčný růst, dýchání, výnos plodů a další) zastává klíčovou funkci v reakci na infekci patogenními organismy (převážně biotrofními patogeny). Zde přenáší signál o napadení do dalších částí rostliny, v nichž se spouští nespecifické obranné reakce spojené s tvorbou obranných (pathogenesis related) proteinů. Tato forma rezistence – tzv. systémově získaná rezistence (SAR), nesměřuje k programované buněčné smrti, nýbrž k přežití a záchraně rostlinných buněk. Přímou v místě infekce však nastává hypersenzitivní reakce a programovaná buněčná smrt. Kyselina salicylová taktéž komunikuje s ostatními fytohormony, její vztah s kyselinou jasmonovou, která bývá nejčastěji spojována s obrannou reakcí proti nekrotrofním patogenům, je ambivalentní, vztah s auxinem byl popsán jako antagonistický (Janda a Valentová, 2014).

Podle historických záznamů už Hippokratés předepisoval svým pacientům kůru a listy z vrby (*Salix*) ke zmírnění bolesti a horečky. Účinek byl připisován příbuzné látce – salicinu, na který je vrba bohatá. Analgetické a antipyretické účinky rostlinných salicylátů patrně znali již Číňané, Keltové, Germáni či civilizace Středního východu (Myers, 2007).

První syntéza ASA byla uskutečněna v roce 1879, a přestože od jejího prvního léčebného použití uplynulo více jak 100 let, je i nadále předmětem zájmu medicínální praxe a výzkumu. Stabilní formu ASA syntetizoval německý chemik Felix Hoffmann u Bayerů v Leverkusenu. Později byla účinná látka nazvána aspirinem spojením „a“ jako zkratky acetyl, dále částice „spir“ ze slova spirea, tj. jména rostliny, která byla zdrojem salicinu a nový název léku dostal koncovku „inn“, po léta pro medikamenty oblíbenou. Acetylsalicylová kyselina se nepoužívá pouze pro zmírnění bolesti či horečky, ale také jako prevence tvorby krevních sraženin – prevence ucpání tepen, tj. tedy i proti vzniku infarktu myokardu (snížení agregability destiček) nebo mozkové mrtvice (Pexidr, 2004). ASA je základem významné skupiny celosvětově rozšířených léků, z nichž je více než 100 let nejznámější *Aspirin*. V současné době jeho roční výroba (včetně generických analogů) představuje okolo 45 tisíc tun ročně (Myers, 2007).

ASA byla v této práci využita ve formě vodného roztoku o třech rozličných koncentracích k foliární aplikaci za účelem ověření účinku na stimulatory rostlinné imunity u rostlin ostropestřce mariánského. Dané téma experimentu za využití elicitoru kyseliny acetylsalicylové je zatím vědecky velmi omezeně prozkoumanou oblastí.

Godoy-Hernandéz a Loyola-Vargas (1997) ověřovali účinek acetylsalicylové kyseliny na sekundární metabolismus suspenzní kultury barvínku růžového (*Catharanthus roseus*). Při aplikaci různých koncentrací (0,5 – 20 mM) acetylsalicylové kyseliny do zmíněné kultury pozorovali zvýšení celkových alkaloidů o 505 %, fenolických látek o 1 587 %, furanokumarinu o 612 % a anthokyaninu o 1 476 %.

Groenewald a Van der Westhuizen (1998) ve svém experimentu použili kyselinu acetylsalicylovou na kotyledony krátkodenních rostlin svlačce břečťanovitého (*Pharbitis nil*) (před 16 - h temnostní fází). Sledovali inhibici kvetení a inhibici syntézy prostaglandinů v následující temnostní fázi způsobené přeměnou kyseliny acetylsalicylové na kyselinu salicylovou (až z 90 %) a v menší míře na kyselinu 2,5 - dihydroxybenzoovou.

Vydra (2007) sledoval vliv kyseliny acetylsalicylové na obsah účinných látek v rostlině třapatky nachové (*Echinacea purpurea*). Pozitivní vliv nízké koncentrace (10^{-5} mol.l⁻¹) byl vyhodnocen na obsah kyseliny cichorové a kyseliny kávové v nadzemní hmotě po dobu tří let, vliv na kyselinu chlorogenovou ve všech

koncentracích byl v nadzemní hmotě minimální, výsledky u kyseliny kaftarové byly smíšené v závislosti na roku a zvolené koncentraci. Vliv nízké a střední koncentrace byl pozorován po dobu tří let pozitivní u všech sledovaných látek. Výsledky při aplikaci vysoké koncentrace (10^{-3} mol.l⁻¹) byly smíšené. Statisticky průkazný byl však vliv pouze ve střední dávce, a to na obsah všech sledovaných kyselin u kořene po dobu tří let pěstování.

Vliv ASA byl také zkoumán u hospodářsky významných plodin. Bergmann et al. (1994) ověřovali aplikaci ASA ve vodném roztoku (0,2 – 2 mg.rostlina⁻¹ nebo 1 - 2 kg.ha⁻¹) na rostliny ječmene, brambor a cukrovky, přičemž došlo k významnému zvýšení výnosu a efektivity využití vody (v ječmenu až o 20 %, v cukrovce o 10 %). Účinek aplikace ASA byl porovnatelný s šesti ošetřeními fytohormonem kyselinou abscisovou (ABA). V nestresových podmínkách se ASA chovala jako antitranspirant a zvyšovala osmotický tlak (n). Po následujícím suchém období však byla v ošetřených rostlinách zvýšená hodnota (n) o polovinu menší než v rostlinách neošetřených.

Pexídr (2004) provedl pokus, který potvrdil vliv kyseliny acetylsalicylové na tvorbu některých sekundárních metabolitů i vliv na množství sklizené hmoty sledovaných rostlin třapatky nachové (*Echinacea purpurea*) a třapatky úzkolisté (*Echinacea angustifolia*), a to tak, že u třapatky nachové v kořenové hmotě ve většině případů po aplikaci střední dávky elicitoru ASA došlo u maloparcelkového a poloprovozního experimentu k významnému navýšení sledovaných látek.

Oproti Bergmannovi et al. (1994), kteří dosáhli aplikací ASA ve vodném roztoku zvýšení výnosu ječmene, brambor a cukrovky, došlo u Pexídra (2004) u rostlin rodu *Echinacea* po aplikaci elicitoru ASA ve všech koncentracích ke snížení výnosu kořenové i nadzemní hmoty oproti kontrole s jedinou výjimkou mírného zvýšení výnosu u rostliny třapatky úzkolisté při použití vysoké dávky. U všech koncentrací došlo také ke snížení počtu květů, listů či odnoží.

Dvořáková (2006) sledovala v maloparcelkovém experimentu nepatrné snížení obsahu účinných látek v ostropestřci oproti kontrole při nízké koncentraci ASA o 0,5 %, zvýšení o 22,5 % při aplikaci střední koncentrace ASA a pokles o téměř 43 % při použití vysoké koncentrace ASA. Statistická průkaznost na 5 % hladině významnosti nebyla však v žádném z případů potvrzena.

2.5 Ostropestřec mariánský - popis rostliny

2.5.1 Původ

Ostropestřec mariánský je jednou z nejdéle známých léčivých rostlin na evropském kontinentě s původem v oblasti Středomoří, odkud se později rozšířil po celém světě. Areál jeho rozšíření zahrnuje oblast Kavkazu, Íránu, Sýrie (Starý, 2000), severní Afriku, Kanárské ostrovy, Pyrenejský poloostrov, Madeiru, byl zavlečen i do Ameriky a Austrálie (Husáková a Lhotská 1981). Dnes je ostropestřec pěstován na plantážích v mnoha evropských zemích, severní Africe, Severní a Jižní Americe, středí a západní Asii a jižní Austrálii (Chiavari et al. 1991, Morazzoni a Bombardelli, 1995, Carrier et al. 2002).

Ostropestřec byl vždy považován za jednu z nejúčinnějších léčivých rostlin a zmínky o něm najdeme téměř ve všech významných herbářích od dob středověku, jako například v herbáři abatyše Hildegardy z Bingenu, Hieronyma Bocka, Mattioliho a dalších (Jegorov, 1996). Již od dob antiky byl používán jako jaterní tonikum. Patrně první zmínka pochází od Theophrasta z Erastu, který jej ve 4. stl. př. n. l. ve svém spisu o zkoumání rostlin nazývá Pternix. Gaius Plinius Secundus pak v 1. stl. n. l. pak uvádí, že ve směsi s medem vede k odtoku žluči (Jones, 1966).

Na základě Hippokratovy teorie o čtyřech základních tělesných šťávách byla játra považována za zdroj žluče (žluté žluče a černé žluče). Nadbytek či naopak nedostatek jedné ze šťáv měl přímý účinek i na psychický stav člověka, vrozený poměr šťáv pak vypovídal o temperamentu jedince. John Gerard píše ve své Obecné historii rostlin z roku 1597, že ostropestřec mariánský je nejlepším lékem na všechny nemoci způsobené černou žlučí („melancholy“) (Grieve, 1931).

Anglický lékař a alchymista Nicolas Culpepper pak v 17. století pak uvádí, že ostropestřec čistí játra a slezinu a pomáhá proti žloutence (DerMarderosian, 2003).

Ostropestřec byl v Evropě také pěstován v zahradách jako zelenina, mladé listy se používaly do salátů jako náhrada za špenát, mladé stonky se upravovaly na způsob chřestu, kořeny se nechávaly přes noc namočené ve vodě, aby ztratily hořkost, a jedly se v úpravách jako černý kořen, květní lůžka připomínající artyčoky byla připravována jako artyčoky (Hedrick, 1919, Grieve, 1931)

Rodové jméno *Silybum* patrně vzniklo z řeckého „silybon“ – střapec, podle tvaru a velikosti úboru. Druhové jméno vychází z legendy o bílém mramorování na listech, které mělo být mlékem Panny Marie (Starý, 2000).

Rystonová (2007, s. 380) uvádí mimo jiné tyto lidové názvy ostropestřce mariánského: bejlí Panny Marie, bodlák, bodlák mariánský, bodlák opilců, jaterní semínko, jmělí Panny Marie, koření podjedové, Kristova koruna, pestřec, podstřel či volčec.

V současné době dochází k stále častějšímu využívání biomasy jakožto obnovitelného zdroje energie. Mimo rychlerostoucí dřeviny lze také efektivně pěstovat energetické rostliny bylinného charakteru. Jedná se o robustní rostliny schopné velmi intenzivního růstu a tvorby velkého množství nadzemní hmoty, která je následně využívána k energetickým účelům. Ostropestřec mariánský se jeví jako velmi perspektivní energetická bylina (Petříková, 2005).

2.5.2 Botanická charakteristika

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.), synonymně *Carduus marianus*, z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*), je bylinou podobnou pcháčům a bodlákům (Husáková a Lhotská, 1981). Podobnost s bodlákem vyjadřují i cizojazyčné názvy, anglicky „milk thistle“, francouzsky „chardon Marie“, německy „Mariendistel“ (Starý, 2000). Na našem území se jedná o jednoletou bylinu, výjimečně dvouletou (Spitzová, 1997). V příznivých klimatických podmínkách je ozimého charakteru, v našich podmínkách téměř vždy vymrzající (Kubínek, 1987). V teplých zahraničních oblastech je velmi významnou plevelnou rostlinou (Husáková a Lhotská, 1981), jeho nízká odolnost proti mrazu jej však u nás činí pouze vzácnou plevelnou rostlinou (Kubínek 1987). Ostropestřec přechodně zplaňuje na rumišťích, pustých místech, keřnatých a kamenitých stráních (Husáková a Lhotská, 1981). Vedle zplanění na místech pěstování může být i zavlékán. V České republice se přirozeně vyskytuje především v termofytiku a mezofytiku, vzácně v oreofytiku (Slavík, 2004).

Ostropestřec rychle a spolehlivě klíčí (Starý, 2000). Vzcházet může v optimálních podmínkách i po 5 dnech, průměrně však 2 - 3 týdny po výsevu. Přízemní růžice velkých, laločnatých listů s dožluta zbarvenými trny (Starý, 2000) se vytvoří do dvou měsíců po výsevu (Kubínek, 1987). Listy přízemní růžice jsou

podobné tvarem i barvou lodyžním, dosahují délky až 40 cm a liší se od nich rozšířenou hluboce žlábkovitou střední žilkou (Slavík, 2004).

Tato fáze má významný vliv na tvorbu a složení silymarinového komplexu (Gromová, 1993). Rostlina přechází do generativní fáze začátkem dlouhivého růstu (Starý, 2000) a rychlé tvorby rozvětvené, květonosné lodyhy, která dosahuje konečné výšky 1 – 2 metry, maximálně 2,5 metru (Kubínek, 1987). Lodyha podobná benediktu je silná, s bílou dřevinou, zaobleně hranatá, dole hustě olistěná, v horní polovině bohatě větvená a řídkěji olistěná (Slavík, 2004).

Listy svým tvarem dobře svádějí vodu ke kořenům (Starý, 2000), jsou zelené, střídavé, tuhé, lesklé, objímavé (Husáková a Lhotská, 1981), podlouhle eliptické a na okrajích ostnitě zubaté (Opletal a Volák, 1999), na žilnatině bíle mramorované (Janča a Zentrich, 1995). Zpravidla je silně vyvinut křivý kořen (Spitzová, 1997).

Povětšinou jednotlivé mohutné vzpřímené úbory, velké 5 až 8 cm (Spitzová 1997) mají dlouhou stopku, zákrov na bázi vmáčknutý a okrouhle obvejčité vnější zákrovní listeny (Slavík, 2004). Úbory jsou červenofialově kvetoucí (Starý, 2000), zřídka s bílými či bledě fialovými květy (Opletal a Volák, 1999), s lysým, kulovitým zákrovem a ostnitě zubatými listeny, které vybíhají v mohutné, žlábkovité, nazpět ohnuté ostny (Husáková a Lhotská, 1981). Květy jsou dlouhé 3,5 – 4 cm s velmi dlouhou bílou korunní trubkou, která v horní třetině přechází v červenou až světle fialovou (Slavík, 2004). Ostropestřec kvete v závislosti na termínu výsevu v červenci až září (Moudrý, 2012), je cizosprašný, hlavními opylovači jsou včela a čmelák. Ostropestřec patří mezi významné medonosné rostliny (Spitzová, 1997). V každém úboru je přibližně 190 semen, což v průměru z jedné rostliny při 94 % klíčivosti a hmotnosti jednoho semene 22 mg dává 6 350 semen (Sindel, 1991).

Plodem ostropestřce je tmavohnědá, žíhaná nažka dlouhá 6 – 7 mm a široká 3 mm (Spitzová, 1997). Pokud je v období tvorby plodů deštivé a chladné počasí, jejich obaly se mnohdy vůbec nezbarví (Czabajska et al. 1989). Semena mají lesklý bílý chmýr, který je u báze srostlý a dlouhý asi 10 – 15 mm (Husáková a Lhotská, 1981). Semena se využívají i s obaly, jelikož se účinné látky nacházejí bezprostředně pod osemněním (Jaroš, 1992), přičemž relativně největší množství účinných látek je v semenech z vrcholových úborů (Gromová, 1993). Droga má nahořklou chuť a je bez pachu (Opletal a Volák, 1999).

obr. č. 3 - Detail květu ostropestřce mariánského



Foto: Jindřich Petr

2.5.3 Pěstování

2.5.3.1 Půdní a klimatické podmínky

Ostropestřec mariánský lze pěstovat v širokém pásmu půdních a klimatických podmínek díky jeho relativně vysoké přizpůsobivosti. Podmínky řepařského výrobního typu se nejvíce podobají klimatickým podmínkám areálu jeho původního rozšíření (Spitzová, 1997). Jeho optimální půdní prostředí je bohaté na půdní humus, ve staré půdní síle, s neutrální půdní reakcí a dostatkem vláhy. Nevhodné jsou mělké, písčité, šterkovité a kyselé půdy, stejně jako výsušné jižní svahy, na kterých nemá rostlina dostatek vody zvláště v kritickém období přechodu do generativní fáze spojeného s prudkým nárůstem biomasy v podobě květonosných lodyh (Moudrý, 2012). Mimo jiné je ostropestřec při nedostatečném vláhovém režimu náchylnější k napadení půdními houbami z rodu srpovnička (*Fusarium*). Nepřemokřené a neutužené těžké půdy lze k jeho pěstování také využít, ovšem na úkor nižšího výnosu oproti půdám kvalitnějším (Dvořáková, 2006), tedy hlubším hlinitým půdám s velmi dobrou zásobou živin (Ryant, 2005).

2.5.3.2 Setí

Světlá až tmavá semena ostropestřce jsou svým tvarem a velikostí blízká osivu obilnin. Hmotnost tisíce semen činí 25 – 30 g. S rostoucí délkou skladování klesá jejich klíčivost, proto se nedoporučuje požívat osivo skladované déle než 2 roky (Kubínek, 1987).

Vhodnými předplodinami jsou zlepšující plodiny jako leguminózy či organicky hnojené plodiny (Moudrý, 2012), ovšem lze jej zařadit i po obilnině.

Příprava půdy před setím spočívá v hluboké podzimní orbě, podmínce po sklizni předplodiny, na silně proschlé půdy lze doporučit i válení (Dvořáková, 2006).

Výsev je realizován přesnými secími stroji do širokých řádků. Norma výsevu se pohybuje mezi 5 až 8 kg.ha⁻¹. Výsev se provádí podle počasí a regionu v březnu až dubnu (Spitzová, 1997), při teplotě půdy minimálně 5° C. Včasný výsev zajišťuje dostatek vláhy při vzcházení a ochranu před tracheomykózou (Kubínek, 1987). Naproti tomu výsev na konci dubna vede k nižší tvorbě nadzemní biomasy, což usnadňuje mechanizovaný sběr. Zrání úborů se v tomto případě přesouvá do suššího a teplejšího období, a tím se zvyšuje obsah silymarinu v semenech (Gromová, 1993). Hnojení půdy ve spojení s pozdějším výsevem má také pozitivní efekt na výnos semen, obsah silymarinu a podíl nenasycených masných kyselin (Andrzejewska a Skinder, 2007)

Hloubka výsevu by měla být 2 – 3 cm. Hlubší výsev do 5 cm za současného zvýšení normy výsevu až na 12 kg.ha⁻¹ je opodstatněný v suchých podmínkách a měl by být doprovázen válením půdy (Moudrý, 2012).

Vhodný spon pěstování je mezi 30 x 30 cm až 40 x 40 cm, počet jedinců na 1 m² by se měl pohybovat mezi 6 - 12 (Kubínek, 1987). Pro malopěstitele se doporučuje spon širší (Gromová, 1993).

Schulte (1999) uvádí, že množství postranních (laterálních) stonků ostropestřce závisí na hustotě výsevu a klimatických podmínkách. Studie dokládá, že ostropestřec vysetý v nízké hustotě 10 rostlin na metr čtvereční vytváří 10 - 16 laterálních stonků. Dvojnásobný výsev sníží počet postranních stonků o více než polovinu. Ve Španělsku bylo dosaženo nejvyšších výnosů při hustotě výsevu 40 - 50 rostlin na metr čtvereční, v Německu při 20 - 30 rostlinách na metr čtvereční.

Byly prováděny experimenty s velmi nízkou hustotou, 5 - 7 rostlin na metr čtvereční, kde jedna rostlina pokrývá plochu 1 500 – 2 000 cm² a výnosy se pohybují

od 0,7 do 1,4 t.ha⁻¹ (Foldesi a Barsi, 1983, Carruba a la Torre, 2003, Omidbaigi et al. 2003, Geneva et al. 2008).

Při hustotě 30 rostlin na metr čtvereční je plocha rostliny 190 - 370 cm², tj. pětkrát až osmkrát menší, přičemž výnosy byly srovnatelné či vyšší (Rumińska, 1991, s. 424).

obr. č. 4 - Vyzrálá semena ostropestřce mariánského



Foto: Jana Dvořáková

2.5.3.3 Hnojení a výživa

Aplikace minerálních hnojiv a růstových regulátorů obvykle vede k rozvoji vegetativních částí rostliny díky nastartování primárního metabolismu (Chernyadev, 1994). Pozitivně ovlivňují růst, počet postranních lodyh a počet úborů na jednu rostlinu. Tyto změny jsou spojené s pozměněnou dobou kvetení, kvalitnějším dozráváním semen a zvýšeným výnosem. Vliv na produkci flavonoidů a látek silymarinového komplexu byl sledován také kladný (Geneva et al. 2008).

Přesto může vést v některých případech aplikace hnojiva na list k mobilizaci živin do kořenů (Wojcik, 2004).

Přestože mají hnojení a půdní podmínky významný vliv na růst a výnos porostů ostropestřce, bylo prokázáno, že množství srážek během kritického období působí na výnos ostropestřce mnohem více (Kubínek, 1987).

Pozorování v severním Egyptě prokázala pozitivní vliv hnojení dusíkem a fosforem na výnos nažek, obsah oleje a silymarinu v rostlině (Omer et al. 1998). Nejvhodnějším způsobem hnojení se ukázala dělená aplikace síranu amonného ve dvou termínech (Omer, 1996). Vysoké dávky dusíkatých a draselných hnojiv vedou k vyššímu výnosu nažek, nicméně obsah oleje a silymarinu v nažkách není vysokými dávkami ovlivněn (Omer et al. 1993, Omer et al. 1995).

V našich podmínkách se doporučuje dělené hnojení dávkou 60 – 90 kg N na hektar, polovina až dvě třetiny se aplikují při jarní předset'ové přípravě půdy, zbytek ve fázi 6 - 8 pravých listů, v suchých a teplých oblastech vše před výsevem. Společně s podzimní hlubokou orbou je vhodně zapravit i organická hnojiva (Kubínek, 1987). Paušálně lze aplikovat předset'ově 300 - 400 kg NPK na hektar (Ryant, 2005).

Rámcová metodika Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. pro pěstování ostropestřce mariánského (2003) doporučuje aplikaci 45 - 60 kg N, 17,5 kg P a 33,2 kg K na hektar, což v praxi znamená aplikaci 200 kg NPK (19-19-19) na hektar. V případě vysoké nebo velmi vysoké zásoby draslíku v půdě pak navrhuje aplikovat 100 kg Amofosu na ha na podzim. Na jaře je potom vhodné hnojit 100 až 150 kg dusičnanu amonného před setím nebo ihned po zasetí. Jako nejvhodnější regiony pro pěstování ostropestřce mariánského jsou zde popisovány zemědělská výrobní oblast řepařská nebo obilnářská s hlubší hlinitou půdou a s velmi dobrou zásobou živin.

Plnou a soustavnou pozornost při hnojení je však třeba také věnovat dodávání kvalitní organické hmoty, která je schopná eliminovat, nebo alespoň omezovat nepříznivé vlastnosti půd (Kolář, 1987).

Primární zdroje organické hmoty kryjí potřeby org. látek na orné půdě asi z 50 – 70%, zbytek (asi 1,5 – 3,0 t OL. ha⁻¹) je potřeba dodat v podobě organických hnojiv (Tesař a Vaněk, 1992).

Organická hmota se v půdě nachází v různém stádiu skladných a rozkladných přeměn. Primární, nerozložená organická hmota slouží především jako výchozí

humusotvorný materiál a jako zdroj energie pro půdní edafon. Fyzikálními a chemickými procesy (dekompozice, mineralizace, polymerace, kondenzace a dalšími) za součinnosti půdních organismů se z ní tvoří půdní humus. Organické půdní koloidy pak vstupují do vazeb s minerálními částicemi a obnovuje se tak tzv. stará půdní síla. Organominerální sloučeniny plní v půdě řadu funkcí a vyznačují se velmi vysokou sorpční schopností pro živiny i pro vodu (Šarapatka et al. 2010).

Půdní organická hmota po přeměně na půdní humus má příznivý vliv především na:

- vytváření půdních agregátů,
- sorpční a iontovýměnné procesy v půdě,
- vláhový režim v půdě,
- využitelnost rostlinných živin,
- detoxifikaci škodlivých sloučenin,
- částečnou detoxifikaci těžkých kovů,
- biologickou, biochemickou a biofyzikální dynamiku půdy (Kolář, 1987).

Specifickým organickým (statkovým) hnojivem, které bylo využito v provedeném maloparcelkovém pokusu, je kompost, neboť v něm již proběhly humifikační procesy. Činností půdních organismů dochází v aerobním prostředí k odbourání původních organických substancí a jejich přeměně na stabilní humusové látky. Proces tvorby kompostu probíhá v několika navazujících fázích, kdy dochází ke zvyšování teploty a činnosti mezofilních a termofilních organismů, která následně přechází v ochlazování za činnosti hub, bakterií a aktinomycet. Posledním stadiem je zrání se syntézou humusových látek (Kudelková et al. 1999).

Celkové ztráty hmotnosti činí přibližně polovinu původní hmotnosti kompostovaného materiálu. Délka procesu závisí na zvolené technologii kompostování (Kalina, 2004)

Aplikací kompostu dochází i na půdách ve velmi suchých oblastech (Zeytin a Barana, 2003) ke snížení objemové hmotnosti půdy (přirozené nakypření),

zvýšení stability půdních agregátů, zvýšení pórovitosti a snížení odtoku půdní vody (Kovaříček et al. 2012).

Z hlediska udržení příp. zvyšování obsahu kvalitního humusu v orné půdě se jeví jako dostatečné dávky 6 – 8 t suché hmoty kompostu na 1 ha a rok. U půd dostatečně zásobených humusem dávka 3 – 5 t suché hmoty kompostu na 1 ha a rok (Erhart a Hartl, 2010).

2.5.3.4 Ochrana proti plevelům

Ostropestřec je konkurenčně velmi silnou rostlinou, nejnebezpečnějšími druhy plevelů jsou pro něj merlíky, lebedy, oves hluchý, hořčice, ohnice, výdrol řepky a obilí, vytrvalé plevele jako pýr a pcháč, a další méně časté plevele, které jej přerůstají ve fázi listové růžice. Pro redukci plevelů se doporučuje mechanická kultivace meziřádků. Vhodné je plečkování rotačními plečkami na cukrovku. Po zapojení porostu je negativní vliv plevelů omezen na minimum (Kubínek, 1987).

Herbicidní přípravky využívané k ochraně ostropestřce zahrnují Gesagard 80, 1,2 - 2 kg.ha⁻¹ a Amfalon 80, 1,5 - 2 kg.ha⁻¹, oba účinkují proti dvouděložným plevelům a aplikují se preemergentně, tedy do 3 dnů po zasetí. Proti jednoděložným plevelům se užívají vhodné graminicidy (Rámcová metodika, 2003).

2.5.3.5 Ochrana proti chorobám

Za nejzávažnější chorobu ostropestřce je považována tracheomykóza – cévní vadnutí (Kubínek, 1987). Původcem této choroby jsou houby rodu srpovnička (*Fusarium*), které za vhodných podmínek, tj. v kyselém, suchém prostředí, za teplot s optimem mezi 26 - 28° C a při celkovém oslabení rostlin, napadají ostropestřec a způsobují více či méně závažná poškození, která mohou vyústit až v úhyn rostliny. Nejefektivnější ochranou je včasný výsev biologicky hodnotného osiva, které je vhodné mořit (Kubínek, 1987). Chemická ochrana proti tracheomykóze se jeví pro praxi příliš nákladná. K moření se doporučuje například přípravek Fundazol (Moudrý, 2012).

Závažné problémy obzvláště v podhorských oblastech způsobuje plíseň šedá (*Botrytis cinerea*) (Spitzová, 1997). Tento saproparazit způsobuje na rostlinách ve

fázi kvetení a zrání hnědnutí, černání, zasychání až upadávání celých úborů. Vhodnou ochranou je taktéž včasný výsev mořeného osiva (Kubínek, 1987).

Mezi choroby ostropestřce s marginálním významem se řadí padlí čekankové a skvrnitosti způsobené druhy rodů čerň (*Alternaria*) a braničnatka (*Septoria*) (Kubínek, 1987).

Nejvýznamnějšími živočišnými škůdci jsou mšice, housenky polyfágních škůdců a babočky bodlákové (Spitzová, 1997). Semena mohou po seti vyzobávat bažanti, dozrávající plody jsou lákavé pro ptáky, především pro zvonky a vrabce (Kubínek, 1987).

2.5.3.6 Sklizeň

Sklizeň ostropestřce je pravděpodobně nejproblematictější agrotechnickým zásahem, neboť rozhodující měrou limituje kvalitu a výnos drogy. Úbory ostropestřce dozrávají postupně, odshora dolů, přičemž semena v úborech dozrávají od středu k obvodu (Spitzová a Placr, 1994).

Ve fázi zralosti vyvstává další komplikace v podobě značného množství vegetační vody v rostlině. Sklizeň pouze zralých semen s optimální koncentrací žádoucích látek je tudíž technicky nemožná. Porost by se měl sklízet při 30 % zastoupení přezrálých rozevřených úborů, zbylé úbory by měly v té době zasychat. Sklízet by se mělo pomocí techniky pro sklizeň obilovin, tj. vhodně upravenou sklízecí mlátičkou (Kubínek, 1987). Vlhkost nažek by se při ruční sklizni měla pohybovat mezi 13 až 18 % (Gromová, 1993).

Nejvhodnější dobou pro sklizeň se jeví vlhké počasí, kdy se úbory uzavírají (Moudrý, 2012). Desikace není doporučována vzhledem k riziku obsahu reziduí v droze (Spitzová a Placr, 1994, Kubínek, 1987). Po výmlatu se semena vyčistí, zbaví se chmýru a dosouší se (Opletal a Volák, 1999).

Andrzejewska et al. (2010) dosáhli ve svém pokusu průměrného výnosu plodů 1,23 t.ha⁻¹, tj. 26,5 kg silymarinu na hektar. Při rozdílných vlhkostních a teplotních podmínkách dosahovaly výnosy plodů od 0,55 do 1,68 t.ha⁻¹ a výnosy silymarinu od 13,3 do 35,4 kg.ha⁻¹. Pozdější výsev v půlce dubna neměl na výši výnosu vliv, ovšem zvýšil se obsah silymarinu o 0,4 % a výnos silymarinu o 5,3 kg.ha⁻¹. Zvýšení výsevu z 12 na 24 kg.ha⁻¹ vedlo k mírnému zvýšení výnosu (40 kg.ha⁻¹), obsah silymarinu nebyl při vyšším výsevu ovlivněn. Průměrný podíl

silymarinové složky v semenech byl 2,18 %. Poměr silydianinu k silychristinu byl 1 : 2,2 a poměr k silydianinu k sumě silybinu a isosilybinu dosáhl hodnot 1 : 3,3.

Na bohatých, hlubokých a živinami dobře zásobených půdách mohou výnosy semen dosáhnout až 2 t.ha⁻¹. Avšak na bohatých půdách obzvláště po silných letních deštích dochází k masivnímu růstu vegetativních částí rostliny, které ztěžují sklizeň (Schulte, 1999, Habán et al. 2009).

obr. č. 5 - Ostropestřec mariánský - fáze zralosti před rozevřením úboru



Foto: Jindřich Petr

2.6 Účinné látky

2.6.1 Lignany

Lignany tvoří skupinu, dnes již více než 500 známých, přírodních sloučenin (Beran, 2007), které vznikají jako produkty sekundárního metabolismu cévnatých rostlin. Skládají se ze dvou fenylypropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální (β) uhlíky obou postranních řetězců (Slanina, 2000).

Lignany byly nalezeny ve všech částech rostlin, obzvláště markantní je jejich přítomnost ve dřevě a kůře stromů, kde některé z nich slouží k syntéze ligninu. U některých druhů nahosemenných a dvouděložných rostlin byl nejvyšší obsah zaznamenán v pryskyřicích či semenech (Slanina, 2000).

Přítomnost lignanů byla prokázána i v krvi a moči savců, kde vznikají přeměnou rostlinných lignanů přijímaných v potravě.

Tyto sloučeniny mají výrazný antimikrobiální, antibiotický, antivirový, antioxidační a antinutriční potenciál. Nepolární charakter pak umožňuje lignanům prostoupit buněčnou stěnou, a ovlivnit tak celou řadu biologických dějů. Jejich využití ve farmaceutickém průmyslu sahá od prevence kardiovaskulárních onemocnění až po vývoj léčiv působících proti viru HIV (Slanina, 2000). Lignany mají význam i v chemických interakcích mezi rostlinami a houbami, rostlinami a hmyzem a rostlinami navzájem (Harmatha, 2005).

Existuje široká škála látek příbuzných s lignany, které se nazývají neolignany. Sestávají také ze dvou fenylypropanových jednotek, které jsou ale spojeny jinou vazbou než přes centrální (β) uhlíky alifatických řetězců (Slanina, 2000). I tyto látky nabízejí významné možnosti farmaceutického uplatnění. Konoshima et al. (1991) prokázali například inhibiční účinky neolignanů izolovaných z rostliny šácholanu (*Magnolia officinalis*) na virus Epstein-Barrové a poukázali na možnost jejich využití při protinádorové léčbě.

Další skupiny sloučenin, které mají jednu část molekuly tvořenou fenylypropanovou jednotkou a druhou část jinou přírodní látkou, zahrnují například kumarinolignany, flavanolignany a lignin-iridoidy (Slanina, 2000).

2.6.2 Flavanolignany

Flavonoidy jsou látky polyfenolické povahy s přirozeným výskytem ve všech částech rostlin. (Jegorov, 1996). Fenoly jsou aromatickými analogy alkoholů, přičemž alkoholy mají hydroxylovou skupinu vázanou na sp^3 -hybridizovaný atom uhlíku a fenoly mají hydroxylovou skupinu vázanou na sp^2 -hybridizovaný atom uhlíku aromatického kruhu. Fenoly jsou asi milionkrát kyselejší než alkoholy (McMurry, 2007). Fenolické látky představují rozsáhlou a různorodou skupinu sekundárních metabolitů. Patří do ní látky od jednoduchých derivátů benzenu, kyseliny benzoové a skořicové, přes flavonoidy, antokyany a kumariny až po látky složité, jako jsou třísloviny a lignin (Procházka, 1998).

V roce 1952 bylo objeveno, že aktivními látkami semene ostropestřce jsou právě flavonoidy, přičemž struktura silybinu a silydianinu byla popsána v roce 1960. Směs všech flavonoidů je nazývána silymarin, který mimo shora uvedené obsahuje i silychristin a iso-silybin. Tyto látky jsou tvořeny flavanonem taxifolinem, k němuž je oxidativní adicí připojena molekula koniferylalkoholu, jenž je běžnou součástí ligninu. Proto byl tento typ flavonoidů souhrnně pojmenován flavanolignany (Jegorov, 1996). Látky silymarinového komplexu jsou pak v procentuálně nejvyšším zastoupení, asi 70 – 80 % (Křen a Walterová, 2005), obsaženy v oplodí a osemeni plodů (Indrák a Chytilová, 1992).

Podíl flavanolignanů, tj. silymarinu, v sušině se pohybuje nejčastěji od 1 do 3 %, ale může dosáhnout až 4 % (Kozłowski a Hołyńska, 1985, Chiavari et al. 1991).

Semena ostropestřce mimoto obsahují bílkoviny (25 - 30 %), flavonoidy (taxifolin, kvercetin, kemferol), aminy (tyramin, histamin), steroly (kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol), tokoferol (0,6 %) a olej (20 - 30 %) tvořený především kyselinou linolovou, olejovou a palmitovou (Opletal a Volák, 1999).

Indrák a Chytilová (1992) ještě doplňují obsah sacharidů, malého množství sílice a konkretizují složení olejového podílu na 60 % kyseliny linolové, 15 - 26 % kyseliny olejové, 2 % kyseliny linoleové a 8 - 12 % nasycených mastných kyselin.

Slavík (2004) uvádí obsah jednotlivých složek oleje na 55 - 72 % kyseliny linolové, 15 – 20 % kyseliny olejové a 8 – 14 % nasycených mastných kyselin, obsah tokoferolu se pohybuje mezi 500 – 800 $mg \cdot kg^{-1}$.

Z terapeutického hlediska nejúčinnější složku silymarinového komplexu představuje silybin, tvořený silybinem A a silybinem B, přibližně v poměru 1 : 1 (Starý, 2000). Nejméně aktivní složku patrně tvoří iso-silybin (Jegorov, 1996). Sersen et al. (2006) zjistili, že proti fenylglykolovým ketylovým radikálům a radikálům DPPH je ze složek silymarinu nejúčinnější silychristin.

Přesnější metody analýzy a separace ukázaly, že silymarin sestává z velkého množství flavanolignanů zahrnujících mimo silybin (SBA, SBB), isosilybin (ISBA, ISBB), silydianin (SD) a silychristin (SC) i další flavanolignany jako dehydrosilybin, desoxysilychristin, desoxysilydianin, silandrin, silybinome, silyhermin a neosilyhermin. Díky svým antioxidačním a stabilizačním vlastnostem chrání tyto složky rozličné orgány a buňky proti poraněním (Kvasnička et al. 2003).

Nyiredy et al. (2008) přišli s celou škálou nových derivátů získaných z variety ostropestřce s bílými květy, kterou nazvali Silymiran. Za proklamovaného použití chromatografických metod popsali látky získané z bílokvěté variety jako cissilybin, isocissilybin, isosilandrin A a B, cissilandrin, ad. Jejich výsledky však popřeli Křen et al. (2010).

Flavanolignany pak byly izolovány i z mnohých dalších rostlin jako např. z tisu západoamerického (*Taxus brevifolia*) (Arslanian et al. 1995), ostropse (*Onopordum corymbosum*) (Cardona et al. 1990) či ovsa setého (*Avena sativa*) (Wenzig et al. 2005).

2.6.3 Silyb

Hlavním záměrem pěstování ostropestřce je produkce kvalitní drogy s vysokým obsahem látek silymarinového komplexu. Tento cíl je však komplikován nejen vlivem vnějších podmínek a obtížnější agrotechnickou praxí zejména v období sklizně, ale u nešlechtěných rostlin i nízkou koncentrací účinných látek, např. silybinu 0,2 - 0,6 %. Z toho důvodu byla vyšlechtěna silybinová chemovarieta s obsahem silybinu asi 2,5 % a silychristinu 1,5 % za absence silydianinu, jež byla zapsána do Listiny povolených odrůd v roce 1988 pod názvem Silyb (Indrák a Chytilová, 1992). Při využití nejnovějších farmakologických poznatků může cílené šlechtění pomoci dosáhnout standardní produkce kvalitativně co možná nejhodnotnějších surovin pro farmaceutický průmysl.

2.7 Farmakologické účinky

Ostropestřec mariánský je využíván v evropské medicíně po staletí jako nejúčinnější lék na choroby jater. Systematické studie aktivních složek začaly v 60. letech 20. století. Wagner et al. (1967) poprvé izolovali silymarin ze semen ostropestřce, přičemž později odhalili, že se nejedná o jednu látku, ale celý komplex flavanolignanů. Byly učiněny pokusy získat silymarin biotechnologickými metodami, výsledky zatím nedokazují, že by v blízké budoucnosti mohlo dojít k nahrazení polní plodiny ostropestřce jako základního zdroje farmaceutického materiálu (Cacho et al. 1999, Alikaridis et al. 2000, Sanchez-Sampedro et al. 2008).

Produkce silymarinu a na jeho bázi založených léků celosvětově stále roste, mezi největší producenty se řadí Čína, Španělsko, Česká republika, Indie a Brazílie.

Oceňován je především příznivý účinek na obnovu a stabilizaci buněčných stěn jater a pozitivní vliv na metabolismus hepatocytů. Indikace nejrozšířenějších léků zahrnují především toxickometabolické alterace jater (steatózu, poléková poškození, otravy) a akutní hepatitidy (Kummer et al. 2000).

Látky silymarinového komplexu účinkují pozitivně při bakteriálních, virových, mykotických onemocněních a akutních otravách jaterními jedy tím, že pohlcují volné radikály, inhibují činnost oxidáz a peroxidáz, váží se na buněčné membrány a pronikají i do buněčných jader, kde stimulují syntézu bílkovin, čímž dochází k opravě poškozených buněk a tvorbě nových jaterních enzymů. Tyto účinky jsou příčinou výjimečného vlivu flavanolignanů na jaterní parenchym a jeho regeneraci (Jegorov, 1996).

Studie prokázaly příznivé účinky silymarinu v prevenci a léčbě rakoviny prsou, prostaty a kůže (Pepping, 1999), jakož i rakoviny tlustého střeva (Hogan et al. 2007) či plic (Agarwal et al. 2006).

Lidové léčitelství využívá semena, kořen i listy ostropestřce ve formě odvarů či tinktur. Odvar z kořene pomáhá při bílém výtoku a při slabé menstruaci, odvar z listů pak při žloutence, zánětu pohrudnice a plic a žlučnickových kamenech (Janča a Zentrich, 1995). Semena se mohou využívat celá, mletá či drcená. Jedna čajová lžička drogy se nechá přibližně dvacet minut louhovat a poté se dvě minuty vaří (Jaroš, 1992). V lidovém léčitelství je ostropestřec také doporučován

kombinovat s řepíkem, pampeliškou, čekankou, zemědýmem, třezalkou, oddenkem pýru, vlasštovičником, meduňkou a benediktem (Janča a Zentrich, 1995).

Využití ostropestřce mariánského jakožto adaptogenní a imunogenní rostliny zvyšující všeobecnou odolnost organismu má, mimo výše uvedené účinky, i značný doposud neprobádaný potenciál pro budoucnost (Hubená, 2012).

2.8 Metody stanovení obsahu účinných látek v rostlině

2.8.1 Chromatografie

Chromatografické metody, jako jsou například vysokoúčinná kolonová kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GLC) či chromatografie na tenké vrstvě (TLC), slouží k dělení a identifikaci mnoha organických a anorganických látek obsažených v přírodních i technických směsích v širokém koncentračním pásmu. Jedná se tedy o jedny z nejdůležitějších analytických a separačních metod (Drbal a Křížek, 1999), jejichž výstupem jsou kvalitativní a kvantitativní údaje o vzorku (Coufal, 2004a). Mimo počet a kvalitu látek ve vzorku, umožňuje řada metod prokázat i množství přítomných látek či tyto látky izolovat (Chmel et al. 1987).

Princip chromatografické metody byl objeven na počátku 20. století ruským přírodovědcem a botanikem M. S. Cvětem při výzkumu rostlinných barviv, když při filtrování petroletherového extraktu z listů sloupcem uhličitanu vápenatého ve skelněné trubici pozoroval tvorbu barevných pruhů. Ty se při dalším promývání rozpouštědlem pohybovaly směrem dolů. Tak se mu postupnou elucí rozpouštědlem podařilo rozdělit barviva rostlinného extraktu v jednotlivé složky. Tuto metodu nazval chromatografií z řeckého chroma – barva a grafó – píši. Označení bylo odvozeno z izolace barevných látek, nicméně později se vžilo i pro laboratorní a provozní metody analyzující i látky bezbarvé. Od roku 1931 dochází k rozvoji této metody, o jejíž důležitosti svědčí i fakt, že za objev papírové chromatografie získali R. L. M. Synge a A. J. P. Martin roku 1952 Nobelovu cenu za chemii (Šimek, 1972).

Šimek (1972) navrhuje dělit chromatografii podle pracovního postupu takto:

- I. Adsorpční chromatografie
 1. eluční - klasická / promývací
 2. frontální analýza
 3. vytěšňovací
 4. adsorpční perkolace
 5. chromatografie plynů - plyn - tuhá látka / plyn – kapalina

- II. Rozdělovací chromatografie
 - 1. sloupcová
 - 2. papírová - jednorozměrná / dvojrozměrná / kruhová / preparativní

- III. Výměna iontů
 - 1. výměna kationtů
 - 2. výměna aniontů

- IV. Dělení směsí látek ve stejnosměrném elektrickém poli
 - 1. elektroforéza
 - 2. elektrochromatografie

Fremerová (2004, s. 49) udává výčet možných dělení chromatografických metod:

- 1) podle mobilní fáze - plynová (GC), kapalinová (LC)
- 2) podle způsobu provedení - kolonová (sloupcová), plošná (planární)
- 3) podle principu separace - rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelová, afinitivní
- 4) podle pracovního způsobu - eluční (analytická chemie), frontální, vytěsňovací
- 5) podle účelu - analytická, preparativní (preparační)

Jednotlivé složky se rozdělují mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fázi. Stacionární fáze, označovaná jako sorbent, vytváří tzv. chromatografické lože, kterým protéká mobilní fáze, označována také jako eluent. Jako mobilní fáze slouží kapalina či plyn, jako stacionární fáze pak tuhé části o velikosti v řádech mikrometrů, kapalina na povrchu inertního nosiče či film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry (Drbal a Křížek, 1999).

Při nástřiku vzorku do chromatografické kolony se nejprve vytvoří směs jednotlivých složek, které se pak pohybují mobilní fází směrem k sorbentu, tzv. vyvíjení, s rozdílnou rychlostí, čímž dochází k jejich separaci. Interakce vedoucí k jejich oddělení mohou být např. adsorpční, rozdělovací či iontově výměnné. Tento proces je většinou podmíněn více mechanismy, v praxi se používá členění na plynovou a kapalinovou chromatografii (Drbal a Křížek, 1999).

Jednotlivé látky v podobě eluátu, tj. roztoku v mobilní fázi, se pohybují kolonou, až dosáhnou jejího konce a jsou zaznamenány detektorem, načež opustí kolonu. Jsou unášeny odlišnou rychlostí v závislosti na distribuční konstantě mezi oběma fázemi, na míře zadržení ve stacionární a mobilní fázi (Chmel et al. 1987). Jejich cestu popisuje tzv. eluční pík (Drbal a Křížek, 1999), jehož vrchol určuje konkrétní látku (kvalitativní analýza) a plocha určuje její koncentraci ve směsi (kvantitativní analýza). Údaje jsou vyhodnocovány porovnáním s tzv. standardní směsí (Chromatografie, 2009).

Výsledkem průtoku mobilní fáze soustavou je chromatogram, který má svůj start na začátku chromatografického děje. Místo, kde se v daném okamžiku nacházejí složky s nulovou aktivitou vůči stacionární fázi, které bylo původně na startu, se nazývá čelo mobilní fáze. Místa výskytu ostatních jednotlivých složek se nazývají pásy, zóny a někdy též skvrny (Hubáček, 1988).

2.8.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC (high performance liquid chromatography)

HPLC je jednou z nejdokonalejších forem sloupcové (kolonové) kapalinové chromatografie využívaných k dělení směsí velmi příbuzných látek. Její vznik souvisel s rozvojem přístrojové techniky, především v oblasti detekce chromatografovaných látek. Velké pozitivum této metody spočívá ve vysoké účinnosti a rozlišovací schopnosti, které jsou však vykoupeny vysokou cenou HPLC chromatografů (Sklenák, 2003).

HPLC probíhá v uzavřeném systému, klíčovou roli má mobilní fáze, která je kapalná a může být do kolony vedena přes odplyňovač a vysokotlaké čerpadlo (při isokratické eluci), nebo přes směšovač a čerpadlo (při gradientové eluci). Čerpadla se používají pulzující membránová či pístová (Drbal a Křížek, 1999).

Tlaky v koloně se běžně pohybují od 1 do 60 MPa, průtoky od 0,1 do 10 ml.min⁻¹, délky rovné kolony od 10 do 100 cm, nejčastěji 10 - 20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm, velikost zrn sorbentu tvořených vysoce homogenními částicemi (Sklenák, 2003) se pohybuje mezi 3 – 50 μm. Vzorky se dávkuje mikrostříkačkou pomocí tzv. stop flow ventilu. (Drbal a Křížek, 1999). Jako kolony se využívají skleněné, kovové (Sklenák, 2003) či křemenné trubice (Štern, 2003).

V separační koloně složené ze sorbentu a eluentu dochází k oddělení jednotlivých složek. Jejich rychlost průtoku může být tak rozdílná, že vytvářejí oddělené zóny, které odpouštějí postupně kolonu ve formě eluátu. Jejich vývoj popisují na vnějším chromatogramu eluční křivky, tzv. eluční píky (Kopřiva, 2002), jejichž plocha je úměrná množství složky (Garaj et al. 1987).

Na výstupu z kolony protéká eluát detektorem, který je nejčastěji v podobě průtokového fotometrického detektoru, fluorimetrického detektoru či tepelně vodivostního detektoru (Drbal a Křížek, 1999). Garaj et al. (1987) rozlišují detektory HPLC - koncentrační, kam spadají diferenciální refraktometry, - fotometrické UV detektory, - selektivní, mezi něž patří elektrochemické detektory, infračervený detektor a fluorescenční detektor. Velmi účinným řešením detekce je i hmotnostní spektrometr, který je však technicky a finančně velmi náročný (Štern, 2003).

Detektor bývá spojen se zapisovacím a vyhodnocovacím zařízením. V současné době mohou automatizované systémy HPLC za pomoci digitalizovaných zařízení pro registraci a vyhodnocení průběhu analýzy uskutečnit až několik set analýz za den (Drbal a Křížek, 1999).

2.8.1.2 Chromatografie na tenké vrstvě TLC (Thin Layer Chromatography)

Chromatografie na tenké vrstvě využívá poznatky gelové chromatografie a kapalinové chromatografie. Gelová chromatografie vznikla jako metoda čištění, dělení a analýzy směsí, při níž dochází k rozdělení většinou na základě rozdílů molekulové váhy, přičemž je možno tuto váhu pomocí gelové chromatografie i naopak stanovit (Determann, 1972).

Na makroskopické úrovni je možné provést rozdělení podle velikosti například pomocí molekulových sít v podobě krystalických hlinitokřemičitanů, tzv. zeolitů, které svým prostorovým uspořádáním umožňují separaci částic procházejících dutinami prostorové sítě (Toro-Goyco a Matos, 1966).

Gely sestávají ze dvou částí – z dispergované látky (gelotvorné substance) a z dispersního prostředí (rozpuštědla), které se navzájem pronikají a jsou spojitě. Kostra gelu je tvořena makromolekulami spojenými ve vazebných bodech a podle prostorové hustoty gelové sítě nastává různě intenzivní difuze. U homogenních gelů lze zvýšit účinnost a rychlost dělení, pokud je granulací znásoben povrch. Při prosakování roztoku analyzované látky a následujícím promýváním čistým

rozpouštědlem způsobují částice gelu dělení různých molekul podle velikosti. Velké molekuly jsou unášeny rychleji než malé, neboť malé molekuly zpomaluje difuze do nepohyblivé gelové fáze. Složky směsi tak opouští trubici naplněnou gelovými částicemi s rozpouštědlem v pořadí podle klesající molekulové váhy (Determann, 1972).

Chromatografie na tenké vrstvě je rychlou a jednoduchou metodou kapalinové chromatografie, jejíž podstatou je menší množství stacionární fáze, které umožňuje rychlejší analýzu (Coufal, 2004b). K tomuto účelu se využívají stacionární fáze se zrnitostí 5 - 40 μm , jako např. silikagel, celulóza, iontoměničče či polyamid, nanášené na inertní podložky ze skla či hliníku. Mobilní fáze v podobě toluenu, cyklohexanu, acetonu, etanolu, metanolu, vody, amoniaku kyseliny octové či jejich směsí (Coufal, 2004b) vzlíná vrstvou sorbentu a rozdílnou rychlostí unáší jednotlivé dělené složky chromatografickou komorou (Drbal a Křížek, 1999).

Detekce se provádí vysušením chromatogramu a následným nanesením vhodného činidla, prohlížením v ultrafialovém světle či jinou technikou (Drbal a Křížek, 1999). Tyto metody detekce zobrazí na chromatogramu rozdílné skvrny, jejichž porovnáním se standardními vzorky za stejných podmínek se kvalitativně vyhodnocuje chromatogram (Coufal, 2004b). Stanovení analytů lze provést přímo na chromatogramu pomocí fotodozimetru (densitometru) (Coufal, 2004b).

Metoda HPLC v porovnání s TLC vykazuje průkazné rozdíly ve výsledcích analýzy, které mohou být až dvacetiprocentní. Je to zapříčiněno především skutečností, že při TLC nedochází na vrstvě silikagelu k separaci silybinu od isosilybinu, zatímco u HPLC k ní dochází. Podstatnými faktory ovlivňujícími výsledek analýzy jsou také stupeň umletí vzorku, doba ponechání mleté drogy před další extrakcí, způsob utěsnění baňky, způsob extrakce a kvalita použitého extrakčního činidla a standardních látek. Vzhledem k průměrné koncentraci silybinu v droze, která činí 2 %, může mít nepřesné měření vlivem nevhodně zvolené metody či nedodržení podmínek přípravy vzorku k analýze i významné ekonomické následky (Indrák a Chytilová, 1992).

2.8.2 Elektromigrační metody

Elektromigrační (elektroforetické) metody využívají schopnosti pohybu nabitých částic v elektrickém poli, jejichž rychlost je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly. Elektromigrační metody se liší způsobem práce i principem, na němž je separace založena, lze je provádět buď ve vodných roztocích pufrů (volná elektroforéza) nebo na nosičích (Králová a Rauch, 1993).

2.8.2.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je velmi rychlou elektromigrační metodou s vysokou rozlišovací schopností (Coufal, 2004c). Aplikuje se nejčastěji ve vodných roztocích a využívá rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli (Drbal a Křížek, 1999).

Kapilára je ne naplněna základním elektrolytem a její konce jsou ponořeny do zásobníků elektrolytu společně s elektrodami z inertního materiálu. Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 - 30 kV) a fotometrický detektor zachycuje pohyb nabitých částic, který je vyhodnocován v podobě elektroforegramu podobného chromatogramu. Poloha píku vyjadřuje kvalitu, plocha a výška kvantitu (Klouda, 2003).

2.8.2.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis) čili kapilární elektroforéza ve volném roztoku (Free Solution Capillary Electrophoresis) využívá elektroosmotického toku iontů v kapiláře směrem k detektoru (Drbal a Křížek, 1999). Oba konce kapiláry jsou ponořeny v tlumivém roztoku, kapilára z taveného křemene je potažena ochranným polyamidovým povlakem, který v délce několika milimetrů chybí na katodovém konci, aby byla umožněna fotometrická detekce. Kapilára je dlouhá od 25 do 100 cm (Klouda, 2003) a má běžně průměr 25 - 75 μm (Drbal a Křížek, 1999).

Na anodovém konci je do kapiláry nasáván vzorek v množství přibližně tisíckrát menším než u chromatografických metod (1 - 10 nl). Okolní prostor by měl

být striktně termostatický. Svorkové napětí dosahuje hodnot 10-30 kV, což zapříčiňuje velmi vysokou rychlost přenášených iontů (Drbal a Křížek, 1999).

Separace iontů uvnitř kapiláry je dána jejich rozdílnou elektroforetickou rychlostí (Coufal, 2004c), kvalita separace je pak určována délkou kapiláry, pohyblivostí dělených iontů a rychlostí elektroosmotického toku, která je závislá na teplotě a pH roztoku (Drbal a Křížek, 1999).

Přesnost a účinnost metody kapilární zónové elektroforézy byly porovnávány s metodou HPLC (Quaglia et al. 1999, Kvasnička et al. 2003, Velikinac et al. 2004). Bylo prokázáno, že obě metody poskytují obdobné výsledky, přičemž HPLC stanovuje mírně vyšší obsah flavanolignanů oproti CZE, neboť udává vyšší úroveň silydianinu a silychristinu. Obsah silybinu je u obou metod podobný. Analýza kapilární zónovou elektroforézou je dvakrát rychlejší než metodou HPLC. Metoda CZE umožňuje na rozdíl od HPLC separaci diastereomerů isosilybinu, je tedy citlivější.

3. METODIKA - VLASTNÍ POKUS

Cílem práce bylo studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský.

Za tímto účelem byl proveden maloparcelkový pokus v roce 2013 na zahradě v Hluboké nad Vltavou. V příhodných fázích růstu za vhodného počasí byly aplikovány roztoky elicitoru kyseliny acetylsalicylové o třech různých koncentracích na rostliny jednotlivých skupin. Zásobní roztok o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ byl vytvořen navážením 1,80 g kyseliny acetylsalicylové a následným rozpuštěním v 50 ml ethanolu a doplněním 100 ml vody. Vysoká koncentrace $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ (V) byla dosažena zředěním 50 ml zásobního roztoku 5 l vody, střední koncentrace $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ (S) byla vytvořena zředěním 5 ml zásobního roztoku 5 l vody a nízká koncentrace $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (N) byla dosažena zředěním 50 ml připraveného roztoku o vysoké koncentraci v 5 l vody. Část rostlin byla ponechána jako kontrolní (K) a postřik byl prováděn pouze vodou.

Vypěstovaná semena byla analyzována na obsah látek silymarinového komplexu a taxifolin na katedře aplikovaných rostlinných biotechnologií ZF JU metodou HPLC, a byly tak získány údaje o obsahu některých účinných látek v závislosti na koncentraci elicitoru.

3.1 Maloparcelkový experiment

Cílem této práce bylo prostřednictvím maloparcelkového pokusu odzkoušet vliv vybraných elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.)

Maloparcelkový experiment byl proveden v roce 2013 na zahradě v Hluboké nad Vltavou, Hosínská 1212, v okrese České Budějovice. V roce 2012 byla provedena navážka půdy do hloubky 30 cm. Půdním typem je hnědozem (referenční třída luvisoly). Zrnitostně odpovídá půdnímu druhu střední půdy - písčitohlinité podle u nás nejčastěji používané Novákovy klasifikace půdních druhů.

Pro účely pokusu byl vytvořen záhonek o velikosti 8 x 1,5 metru s jihozápadní expozicí, který byl rozparcelován na 8 parcelek o velikosti 1,5 x 1 metr s ochrannými zónami 0,5 m mezi parcelkami a 1 m okolo pokusu a vyseta semena ostropestřce mariánského dle níže uvedeného schématu.

obr. č. 6 - Schéma maloparcelkového pokusu



Agrochemické zkoušení půd provedené laboratoří AGRO-LA, spol. s r.o. mezi 9. 8. 2013 a 13. 8. 2013 stanovilo pH(CaCl₂) půdy na 5,23 – kyselá půdní reakce. Dále analýza určila následné průměrné obsahy živin v půdě v přepočtu na 100% sušinu:

tab. č. 2 - Průměrné obsahy živin v půdě (dle protokolu o zkoušce č. 2492/2013)

Fosfor (P)	115 mg.kg ⁻¹
Draslík (K)	376 mg.kg ⁻¹
Hořčík (Mg)	178 mg.kg ⁻¹
Vápník (Ca)	1540 mg.kg ⁻¹

Stanovení dusičnanového a amonného dusíku v půdě bylo provedeno taktéž v laboratoři AGRO-LA, spol. s r.o. Obsah dusičnanového dusíku v půdních vzorcích dosahoval v původní hmotě hodnoty $9,23 \text{ mg.kg}^{-1}$, obsah amonného pak činil $5,80 \text{ mg.kg}^{-1}$ původní hmoty půdy.

Dle kritérií protokolu o zkoušce byly výsledné obsahy živiny vyhodnoceny u fosforu jako dobrý, u draslíku jako vysoký, u hořčíku jako dobrý a u vápníku jako vyhovující. Zásoba minerálního dusíku v půdě odpovídá nižší střední zásobě.

Hnojení pokusných parcellek dobře vyzrálým kompostem bylo provedeno na podzim roku 2012 společně s hlubokou orbou. Dávka kompostu byla stanovena na $0,6 \text{ kg na } 1\text{m}^2$, což odpovídá dávce 6 t.ha^{-1} .

Výsev semen ostropestřce mariánského byl proveden 25. 4. 2013 do již urovnané a připravené půdy. Na každou parcelku bylo vyseto po pěti semenech do sponu $50 \times 50 \text{ cm}$, s hloubkou setí 3 cm . Přebytné rostliny byly po vyklíčení odstraněny, aby bylo dosaženo požadované hustoty šesti rostlin na jednu parcelku. Vzhledem ke skutečnosti, že několik rostlin na příslušných parcelkách vykazovalo známky omezeného růstu, byly odstraněny, čímž byl dosažen celkový počet 40 sledovaných rostlin, 10 s aplikací elicitoru o vysoké koncentraci, 10 s aplikací elicitoru o střední koncentraci, 10 s aplikací elicitoru o nízké koncentraci a 10 kontrolních bez aplikace elicitoru, pouze s aplikací vody.

Aplikace elicitoru kyseliny acetylsalicylové byla na příslušných parcelkách provedena na list po dobu vegetace celkem třikrát, buď v dopoledních či podvečerních hodinách za suchého a teplého počasí. První postřik byl uskutečněn 1.7.2013, druhý 21.7.2013 a třetí 11.8.2013.

Sklizeň byla prováděna průběžně od 1. 9. 2013 do 10. 9. 2013. Při sklizni bylo pozorováno nerovnoměrné dozrání jednotlivých rostlin, některé rostliny, na něž byly aplikovány roztoky elicitoru, byly v té době již značně seschlé, zejména odspodu. Pro účely pokusu byly vybrány pouze úbory v nejvyšším stupni zralosti.

3.2 Příprava extraktu

Extrakce (úprava vzorku) před stanovením analytu je považována za nejdůležitější úkon, který vede k finálnímu zjištění obsahu látky v matrici (Rouhová et al. 2004). Dochází při ní k separaci založené na kontaktu dvou makroskopicky zřetelně oddělených nemísitelných fází a často i k následnému zakoncentrování analytu do malého objemu extrakčního činidla (Šíma, 2004).

Semena pro přípravu extraktů byla vybrána ze sklizených semen maloparcelkového experimentu v co možná nejvyšším stupni dozrání. Semena byla rozdělena na čtyři skupiny podle použitého elicitoru, resp. vody. Každá skupina zahrnovala deset vzorků semen jednotlivých rostlin.

Vrchotová et al. (2002) shrnují, že volba postupu extrakce je problematická a měla by se volit i dle povahy analyzovaných látek. Různé způsoby extrakce spočívají například v odlišném použití extrakčního činidla, době extrakce atd.

Zajímavé je zjištění, že vyšší čistota extraktu ostropestřce vykazuje nižší antioxidační sílu, vyjádřenou jako tzv. TAS - total antioxidant status. To poukazuje na možnost, že extrakt obsahuje určité nečistoty, které mají větší antioxidační potenciál než identifikované flavanolignany (Kvasnička et al. 2003).

Za účelem extrakce byl do odměrné baňky o objemu 25 ml navážen 1 g jemně pomleté drogy ostropestřce mariánského. K navážce byl přidán 1 ml vody (redestilované) a směs se ponechala 1 hodinu stát. Pak bylo přidáno 23 ml směsi acetonu (p.a.) a metanolu (p.a.) (26:20, v/v). Takto připravená směs byla míchána 1 hodinu pomocí ultrazvuku, poté následovala 12 hodinová macerace. Aceton - metanolová frakce byla filtrována přes nylonový filtr a extrakt byl 6 x zředěn (100 μ l vzorku + 500 μ l metanolu).

3.3 Analýza vzorku

Extrakty byly analyzovány pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) ve spolupráci s Ing. Ivetou Marešovou na Katedře zootechnických a veterinárních disciplín Jihočeské univerzity. Separace probíhala na koloně Nucleosil C 18 o rozměrech 4,6 x 250 mm (zrnění 5 μm). Kolona byla spojena s předkolonou naplněnou sorbentem stejných vlastností jako v koloně.

Jako mobilní fáze byla užita směs metanolu, acetonitrilu a vody s přidavkem kyseliny fosforečné. Mobilní fáze A: 22 % CH_3OH (metanol) + 15 % CH_3CN (acetonitril) + 63 % H_2O + 0,5 % H_3PO_4 ; mobilní fáze B: 40 % CH_3OH + 20 % CH_3CN + 40 % H_2O + 0,5 % H_3PO_4 . Gradient byl následující: 0 min. – 100 % A; 25 min. 83 % B; 25 min. – 100 % A. Celkový čas analýzy byl 32 minut. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla 0,9 ml/min. Objem dávkovací smyčky byl 20 μl .

Detekce byla provedena pomocí diodového pole (DAD). Data byla zpracována při vlnové délce 288 nm a vyhodnocena pomocí softwaru Chromeleon 7. Kvantitativní hodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím standardních roztoků.

Pro kalibraci kvantitativního stanovení silymarinu byly připraveny zásobní roztoky taxifolinu (TX), silychristinu (SCH), silydianinu (SD), silybinu A a B (SB A+B) a isosilybinu A a B (ISB A+B) v metanolu. Z těchto zásobních roztoků byl připraven směsný standard, jehož naředěním byly dále připraveny směsné standardní roztoky o koncentracích: 30,6 – 488,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ TX; 11,1 – 178,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SCH; 33,3 – 533,3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SD; 76,4 – 1222,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SB A a B; 5,56 – 88,89 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ISB A a B. Podmínky analýzy byly totožné jako při stanovení silymarinových extraktů.

4. VÝSLEDKY

Cílem maloparcelkového experimentu bylo studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek v rostlině ostropestřci mariánském. Jejich stanovení bylo provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byly sledovány především tyto činné látky: taxifolin, silychristin, silydianin, silybin A+B, isosilybin A+B. Po provedení analýzy byly naměřené výsledky vyhodnoceny a statisticky zpracovány. Změřené koncentrace byly za tímto účelem přepočítány na $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 100% sušiny. Výsledné koncentrace jednotlivých účinných látek byly otestovány na normalitu (Shapiro – Wilkův test). Protože nebyla zamítnuta normalita získaných dat, byla k analýze dat použita metoda analýzy rozptylu (ANOVA). Kromě toho byly získané koncentrace účinných látek proloženy logaritmickou regresní funkcí.

4.1 Výsledný obsah účinných látek

Extrakty ze semen odebraných z jednotlivých rostlin jednotlivých skupin (K, N, S, V) byly připraveny podle zvolené metodiky a analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s následným vyhodnocením získaných dat o koncentraci některých biologicky účinných látek.

tab. č. 3 - Obsah účinných látek v mg.g⁻¹ v rostlinách s aplikací roztoku ASA o nízké koncentraci

kód vzorku	taxifolin (mg.g ⁻¹)	silychristin (mg.g ⁻¹)	silydianin (mg.g ⁻¹)	silybin A+B (mg.g ⁻¹)	isosilybin A+B (mg.g ⁻¹)	účinné látky (mg.g ⁻¹)	sušina (%)
1 N	1,925	7,466	3,535	47,616	2,399	62,940	93,45
	2,060	7,989	3,783	50,953	2,567	67,352	
2 N	1,680	7,611	3,554	49,570	2,152	64,566	93,40
	1,798	8,149	3,805	53,073	2,304	69,129	
3 N	1,664	7,638	3,468	48,449	2,828	64,047	93,54
	1,779	8,165	3,708	51,795	3,023	68,470	
4 N	1,902	7,894	3,885	51,680	2,550	67,911	93,53
	2,034	8,440	4,154	55,255	2,726	72,609	
5 N	2,079	7,962	3,800	49,804	2,708	66,352	93,72
	2,218	8,496	4,054	53,141	2,890	70,799	
6 N	2,020	7,602	3,002	51,870	2,855	67,349	93,67
	2,157	8,115	3,205	55,375	3,048	71,900	
7 N	2,416	7,420	3,628	48,400	2,422	64,286	93,15
	2,594	7,965	3,895	51,959	2,600	69,013	
8 N	1,483	6,866	3,740	45,892	2,377	60,358	92,95
	1,596	7,387	4,024	49,373	2,557	64,936	
9 N	2,078	7,206	3,461	47,051	2,360	62,156	93,12
	2,232	7,739	3,717	50,527	2,534	66,748	
10 N	2,369	7,033	3,725	45,106	2,311	60,544	93,33
	2,538	7,536	3,992	48,330	2,477	64,871	

účinné látky – silymarin suma + taxifolin

...obsah ve vzorku (i s H₂O)

...přepočít na 100% sušinu

tab. č. 4 - Obsah účinných látek v mg.g⁻¹ v rostlinách s aplikací roztoku ASA o střední koncentraci

kód vzorku	taxifolin (mg.g ⁻¹)	silychristin (mg.g ⁻¹)	silydianin (mg.g ⁻¹)	silybin A+B (mg.g ⁻¹)	isosilybin A+B (mg.g ⁻¹)	účinné látky (mg.g ⁻¹)	sušina (%)
1 S	2,295	7,717	3,772	49,969	2,538	66,292	94,35
	2,433	8,179	3,998	52,962	2,690	70,262	
2 S	2,493	7,823	3,818	52,473	2,516	69,123	93,33
	2,672	8,382	4,091	56,223	2,696	74,063	
3 S	2,742	7,624	3,959	49,740	2,525	66,590	93,34
	2,937	8,168	4,241	53,289	2,705	71,341	
4 S	1,668	6,390	2,962	41,194	2,055	54,270	93,12
	1,791	6,863	3,180	44,238	2,207	58,279	
5 S	2,272	7,785	3,749	49,308	2,454	65,567	93,36
	2,434	8,338	4,015	52,815	2,628	70,231	
6 S	1,467	6,707	2,417	45,158	2,155	57,904	93,86
	1,563	7,146	2,575	48,112	2,296	61,692	
7 S	1,118	6,517	3,091	45,599	1,931	58,256	93,50
	1,196	6,970	3,306	48,769	2,065	62,306	
8 S	2,194	7,180	3,452	46,562	2,472	61,861	93,57
	2,345	7,674	3,689	49,762	2,642	66,112	
9 S	2,530	7,302	3,738	48,432	2,373	64,375	93,50
	2,706	7,810	3,998	51,799	2,538	68,851	
10 S	1,323	7,421	2,743	51,942	2,677	66,106	93,59
	1,414	7,929	2,931	55,499	2,860	70,633	

účinné látky – silymarin suma + taxifolin

...obsah ve vzorku (i s H₂O)

...přepočít na 100% sušinu

tab. č. 5 - Obsah účinných látek v mg.g⁻¹ v rostlinách s aplikací roztoku ASA o vysoké koncentraci

kód vzorku	taxifolin (mg.g ⁻¹)	silychristin (mg.g ⁻¹)	silydianin (mg.g ⁻¹)	silybin A+B (mg.g ⁻¹)	isosilybin A+B (mg.g ⁻¹)	účinné látky (mg.g ⁻¹)	sušina (%)
1 V	1,825	7,310	3,390	46,150	2,447	61,122	92,99
	1,962	7,861	3,646	49,629	2,632	65,730	
2 V	2,251	7,496	3,621	46,818	2,560	62,745	92,80
	2,426	8,077	3,902	50,450	2,758	67,613	
3 V	2,388	7,639	3,538	48,663	2,361	64,590	92,45
	2,583	8,263	3,827	52,637	2,554	69,865	
4 V	2,191	7,052	3,133	43,740	2,610	58,726	92,90
	2,359	7,591	3,373	47,083	2,810	63,214	
5 V	2,053	7,269	3,645	47,241	2,430	62,638	93,12
	2,205	7,806	3,914	50,731	2,610	67,266	
6 V	1,979	7,549	3,581	48,106	2,466	63,681	93,05
	2,127	8,113	3,849	51,699	2,650	68,438	
7 V	0,923	6,571	2,668	44,622	2,467	57,251	93,41
	0,988	7,034	2,856	47,771	2,642	61,290	
8 V	1,946	7,286	3,089	46,925	1,822	61,069	93,33
	2,086	7,807	3,310	50,278	1,952	65,433	
9 V	2,164	6,854	2,667	43,998	1,778	57,460	93,48
	2,315	7,332	2,853	47,066	1,902	61,468	
10 V	2,157	7,211	2,926	48,343	2,250	62,888	93,50
	2,307	7,713	3,129	51,704	2,407	67,260	

účinné látky – silymarin suma + taxifolin

...obsah ve vzorku (i s H₂O)

...přepočít na 100% sušinu

tab. č. 6 - Obsah účinných látek v mg.g⁻¹ v rostlinách kontrolní skupiny s aplikací vody

kód vzorku	taxifolin (mg.g ⁻¹)	silychristin (mg.g ⁻¹)	silydianin (mg.g ⁻¹)	silybin A+B (mg.g ⁻¹)	isosilybin A+B (mg.g ⁻¹)	účinné látky (mg.g ⁻¹)	sušina (%)
1 K	2,330	7,677	4,135	51,720	2,508	68,370	92,94
	2,507	8,260	4,449	55,649	2,698	73,564	
2 K	1,720	7,450	3,983	47,445	2,492	63,090	92,87
	1,852	8,022	4,289	51,087	2,684	67,933	
3 K	1,408	6,447	3,050	43,119	2,103	56,128	92,89
	1,516	6,941	3,284	46,419	2,264	60,424	
4 K	1,162	6,290	1,940	43,854	2,229	55,474	93,29
	1,245	6,742	2,079	47,008	2,389	59,464	
5 K	2,009	7,262	3,115	47,836	2,399	62,621	93,06
	2,159	7,804	3,347	51,404	2,577	67,291	
6 K	1,920	6,038	2,912	39,971	2,023	52,864	93,11
	2,062	6,484	3,128	42,929	2,173	56,776	
7 K	1,705	7,131	3,791	47,158	2,865	62,649	93,60
	1,821	7,618	4,050	50,383	3,061	66,933	
8 K	2,594	7,622	4,086	49,904	2,556	66,762	93,93
	2,761	8,115	4,350	53,129	2,721	71,076	
9 K	2,255	7,678	3,742	50,513	2,594	66,782	93,22
	2,420	8,236	4,014	54,187	2,783	71,639	
10 K	2,385	7,501	4,011	49,763	2,790	66,450	93,21
	2,559	8,048	4,303	53,388	2,993	71,291	

účinné látky – silymarin suma + taxifolin

...obsah ve vzorku (i s H₂O)

...přepočet na 100% sušinu

4.2 Vliv elicitorů na obsah účinných látek

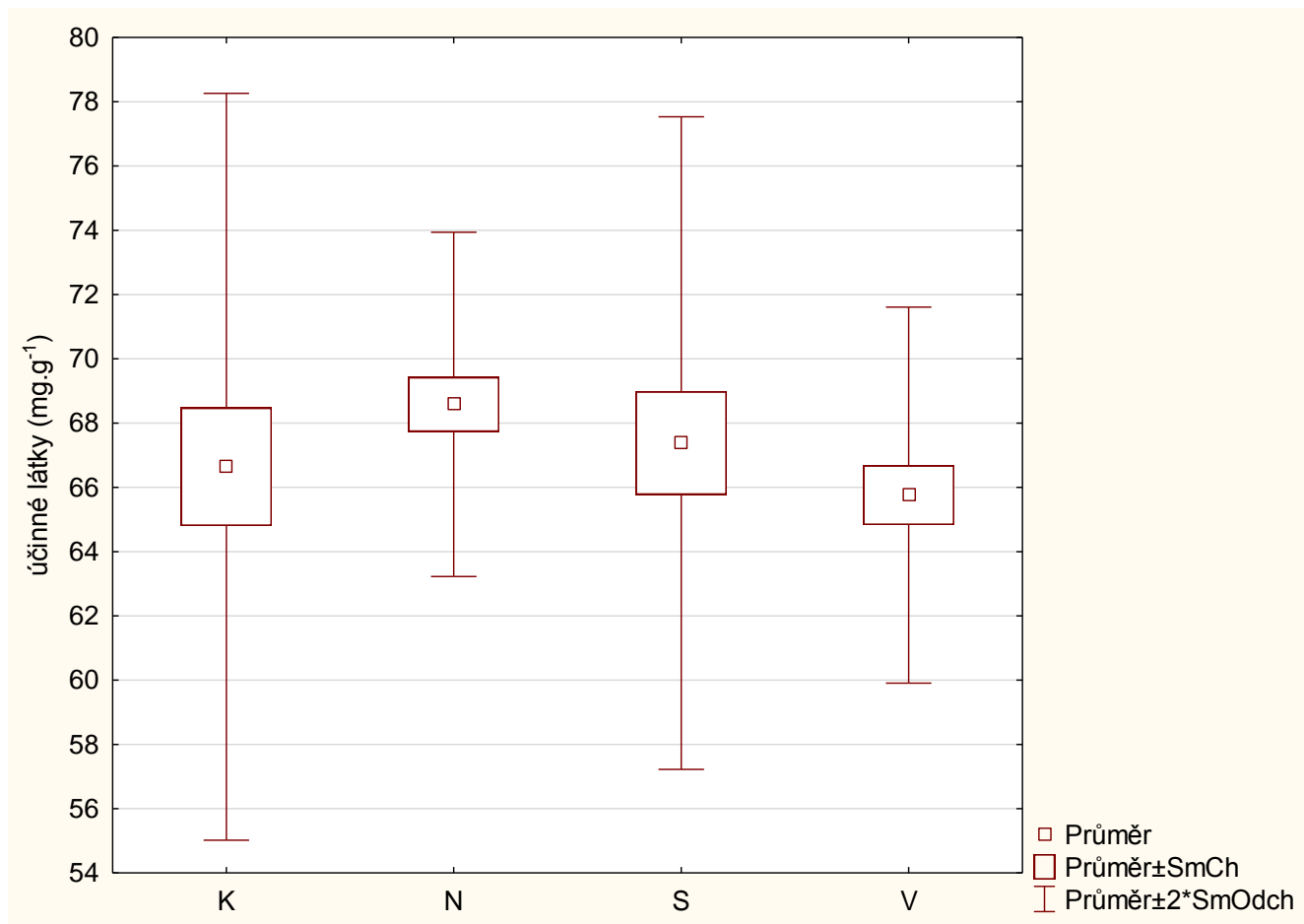
Rozdíl koncentrace celkové sumy účinných látek (látky silymarinového komplexu a taxifolin) u vzorků skupiny rostlin s aplikací ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci a kontrolní skupiny nebyl statisticky průkazný (ANOVA; $F(3;36) = 0,76$; $p = 0,52$; obr. č. 6).

Podobně rozdíl ve zjištěných koncentracích jednotlivých sledovaných látek mezi vzorky skupiny rostlin s aplikací elicitoru ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci a kontrolní skupiny s aplikací vody nebyl statisticky průkazný u žádné účinné látky (ANOVA; všechna $p > 0,43$). Krabicové grafy vyjadřující závislost obsahu jednotlivých účinných látek na aplikaci elicitoru o zvolených koncentracích jsou součástí přílohy 1.

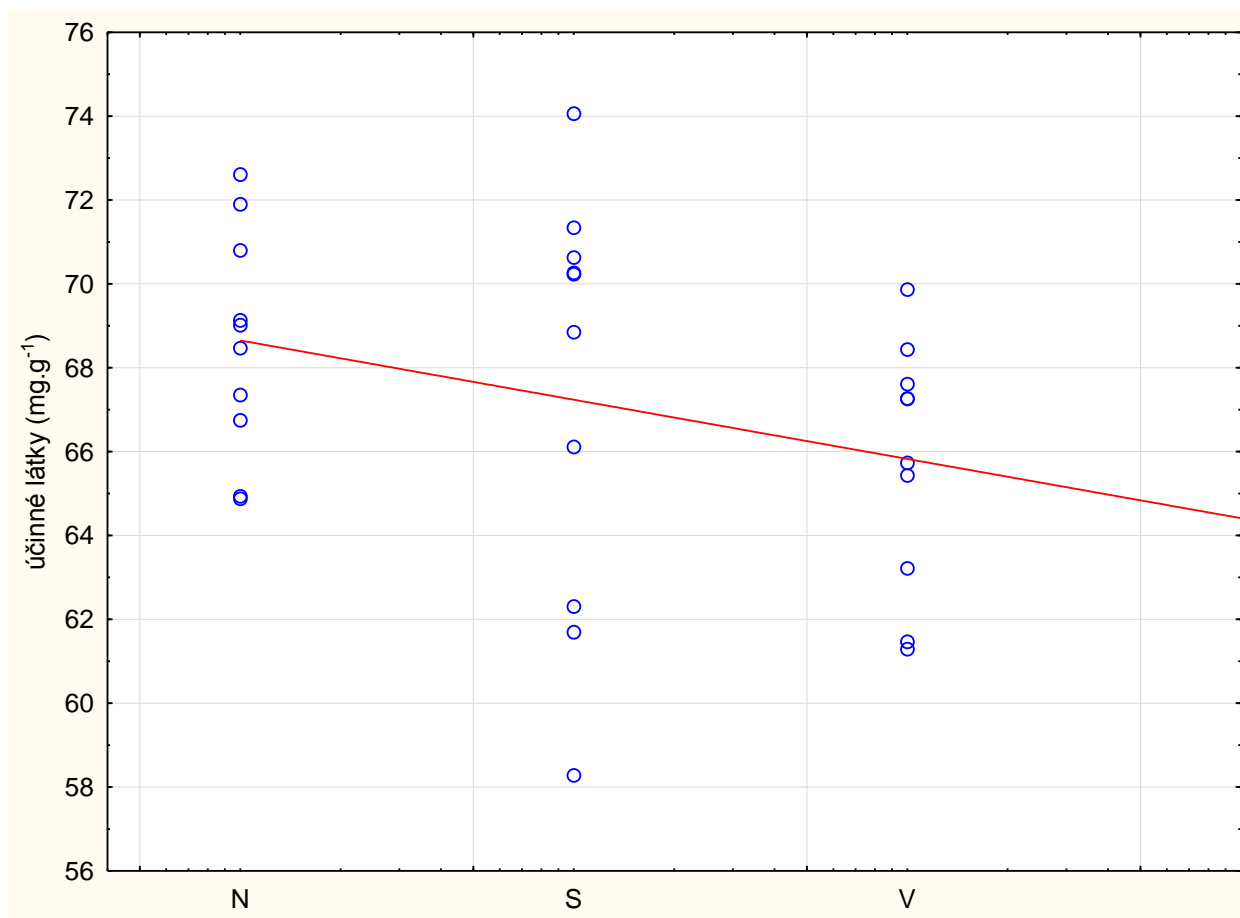
V závislosti na rozdílné koncentraci elicitoru ASA byl u skupin rostlin s jeho aplikací sledován statisticky neprůkazný trend snižování obsahu celkové sumy účinných látek (látky silymarinového komplexu a taxifolin) s rostoucí koncentrací elicitoru ($y = 61,59 - 1,41 \cdot \log(x)$; $p = 0,1$; obr. č. 7).

Mezi jednotlivými koncentracemi elicitoru byl sledován statisticky neprůkazný trend snižování obsahu všech účinných látek silymarinového komplexu s rostoucí koncentrací elicitoru (všechna $p > 0,07$). U taxifolinu byl sledován statisticky neprůkazný trend zvyšování jeho obsahu v semenech se zvyšující se koncentrací elicitoru ($p = 0,99$). Bodové grafy vyjadřující závislost obsahu jednotlivých účinných látek na rozdílné koncentraci aplikovaného elicitoru jsou součástí přílohy 2.

obr. č. 6 - Závislost celkového obsahu účinných látek (silymarin suma + taxifolin) v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ na aplikaci elicitoru o rozdílné koncentraci



obr. č. 7 - Závislost celkového obsahu účinných látek (silymarin suma + taxifolin) v mg.g^{-1} na koncentraci elicitoru. Protože koncentrace elicitoru rostla exponenciálně, je měřítko osy X (koncentrace elicitoru) zlogaritmováno dekadickým logaritmem. Proložená přímka tedy odpovídá logaritmické funkci.



5. DISKUSE

V předložené práci byl sledován efekt aplikace elicitoru kyseliny acetylsalicylové (ASA) na tvorbu sekundárních metabolitů rostlinami ostropestřce mariánského v porovnání s kontrolní skupinou při maloparcelkovém pokusu v Hluboké nad Vltavou v roce 2013. Předložená práce a provedený experiment navazují na poznatky shrnuté v bakalářské práci (Petr, 2012), v níž byl sledován statisticky neprůkazný vliv preparátů na bázi titanu - ELITiC a Elitic Jack na obsah účinných látek v semenech ostropestřce mariánského.

ASA byla v této použita ve formě vodného roztoku o třech rozličných koncentracích (nízké - 10^{-5} mol.l⁻¹, střední - 10^{-4} mol.l⁻¹, vysoké - 10^{-3} mol.l⁻¹) foliární aplikací (třikrát za dobu vegetace) za účelem ověření účinku na stimulatory rostlinné imunity u rostlin ostropestřce mariánského.

Pozitivní vliv elicitorů na výnos a kvalitu rozličných kulturních plodin prokázali například Kužel et al. (2006) a Kašparová et al. (2007). Využití ASA jakožto elicitoru je prozatím vědecky nepříliš prozkoumanou oblastí.

Godoy-Hernandéz a Loyola-Vargas (1997) prokázali pozitivní účinek acetylsalicylové kyseliny na sekundární metabolismus suspenzní kultury barvínku růžového. Groenewald a Van der Westhuizen (1998) sledovali ve svém experimentu inhibici kvetení a inhibici syntézy prostaglandinů u rostlin svlačce břechťanovitého.

Bergmann et al. (1994) ověřili aplikaci ASA u některých hospodářsky významných rostlin (ječmen, brambor, cukrovka), přičemž u nich došlo k významnému zvýšení výnosu a efektivity využití vody. Účinek aplikace ASA byl porovnatelný s šesti ošetřeními fytohormonem kyselinou abscisovou (ABA).

Pexídr (2004) provedl pokus, který potvrdil vliv ASA na tvorbu některých sekundárních metabolitů i vliv na množství sklizené hmoty sledovaných rostlin třapatky nachové a třapatky úzkolisté. U třapatky nachové v kořenové hmotě ve většině případů po aplikaci střední dávky elicitoru ASA došlo u maloparcelkového a poloprovozního experimentu k významnému navýšení sledovaných látek.

Tento výsledek částečně potvrdil i Vydra (2007), který vyhodnotil po dobu tří let jako statisticky významný vliv ASA na obsah účinných látek – kyseliny chlorogenové, kyseliny kaftarové a kyseliny cichorové v kořeni třapatky nachové, a to při použití střední koncentrace (10^{-4} mol.l⁻¹). Vliv nízké a střední koncentrace byl pozorován po dobu tří let pozitivní u všech sledovaných látek v nadzemní hmotě,

výsledky vysoké koncentrace byly smíšené, celkově však všechny statisticky neprůkazné.

Oproti Bergmannovi et al. (1994), kteří dosáhli aplikací ASA ve vodném roztoku zvýšení výnosu ječmene, brambor a cukrovky, došlo u Pexídra (2004) u rostlin rodu *Echinacea* po aplikaci elicitoru ASA ve všech koncentracích ke snížení výnosu kořenové i nadzemní hmoty oproti kontrole s jedinou výjimkou mírného zvýšení výnosu u rostliny třapatky úzkolisté při použití vysoké dávky. U všech koncentrací došlo také ke snížení počtu květů, listů či odnoží.

Vlivem působení elicitoru ASA na rostlinu ostropestřce mariánského se zabývaly Dvořáková (2006) a Gramanová (2009). Dvořáková (2006) sledovala v poloprovozním experimentu statisticky průkazný pozitivní vliv střední koncentrace kyseliny acetylsalicylové (10^{-4} mol.l⁻¹) na obsah účinných látek v semenech rostlin ostropestřce mariánského. Tento vliv však byl sledován pouze jeden rok. V opakovaném maloparcelkovém pokusu nebyly změny v koncentracích účinných látek statisticky průkazné pro žádnou ze zvolených koncentrací.

Taktéž Gramanová (2009) pozorovala pro porost ostropestřce mariánského statisticky průkazný vliv elicitoru ASA, a to o vysoké koncentraci (10^{-3} mol.l⁻¹) ve smyslu navýšení obsahu účinných látek. Na paralelně prováděném pokusu na pozemcích v jiné lokalitě ale nebyl vliv žádné ze zvolených koncentrací téhož elicitoru statisticky průkazný.

Maloparcelkový experiment pro účely této práce byl proveden v roce 2013 a získané extrakty ze semen byly následně analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Zjištěné rozdíly v koncentracích účinných látek mezi vzorky skupin s aplikací elicitoru a kontrolní skupiny s aplikací vody nebyly statisticky průkazné. Bylo možné sledovat nevýznamný pozitivní trend působení nízké a střední koncentrace na obsah účinných látek ostropestřce mariánského, neboť aplikace roztoku ASA o nízké koncentraci zvýšila průměrně obsah sledovaných účinných látek v semenech o 2,92 % a aplikace roztoku ASA o střední koncentraci zvýšila obsah sledovaných účinných látek v semenech o 1,10 % oproti kontrole. Vysoká koncentrace ASA snížila obsah účinných látek oproti kontrole o 3,40 %. Uvedené trendy však nejsou statisticky průkazné a mají pouze orientační charakter.

Dvořáková (2006) naproti tomu sledovala v maloparcelkovém experimentu nepatrné snížení obsahu účinných látek oproti kontrole při nízké koncentraci ASA

o 0,5 %, zvýšení o 22,5% při aplikaci střední koncentrace ASA a pokles o téměř 43 % při použití vysoké koncentrace ASA. Statistická průkaznost na 5% hladině významnosti nebyla však v žádném z případů potvrzena.

Mezi jednotlivými koncentracemi elicitoru ASA odzkoušenými v předložené práci byl sledován statisticky neprůkazný trend snižování obsahu všech účinných látek silymarinového komplexu s rostoucí koncentrací elicitoru. U taxifolinu, který je však řazen do skupiny flavanonů, byl sledován statisticky neprůkazný trend mírného zvyšování obsahu v semenech se zvyšující se koncentrací elicitoru. Uvedený trend pro látky silymarinového komplexu lze považovat za přibližný vzhledem ke statistické neprůkaznosti, nicméně lze předpokládat, že při zvýšení počtu vzorků by se tento trend projevil jako významný.

Průměrný celkový obsah účinných látek (silymarinu + taxifolinu) přepočtený na 100% sušinu činil na kontrolních parcelkách bez aplikace elicitorů $66,639 \text{ mg.g}^{-1}$. Rostliny, na něž byl aplikován roztok ASA o nízké koncentraci, vykázaly relativně nejvyšší průměrný celkový obsah účinných látek $68,583 \text{ mg.g}^{-1}$. U rostlin s použitím roztoku ASA o střední koncentraci byl naměřený obsah účinných látek v průměru $67,377 \text{ mg.g}^{-1}$ a u skupiny s vysokou koncentrací ASA byl obsah účinných látek relativně nejnižší a činil průměrně $64,375 \text{ mg.g}^{-1}$.

Průměrná koncentrace účinných látek v semenech tedy činila v maloparcelkovém pokusu předložené práce $66,7 \text{ mg.g}^{-1}$. Tato koncentrace výrazně převyšuje průměrný výsledek zjištěný v předchozím pokusu za použití elicitorů na bázi titanu, který činil $40,3 \text{ mg.g}^{-1}$ (Petr, 2012), a to o 66 %. Výrazně vyšší je i v porovnání s výsledky Dvořákové (2006), které v letech 2004 a 2005 činily v maloparcelkových pokusech průměrně 47 mg.g^{-1} a 31 mg.g^{-1} , a Gramanové (2009), která v maloparcelkových pokusech roku 2007 stanovila průměrné obsahy sumy účinných látek v semenech ostropestřce mariánského na 37 mg.g^{-1} a 47 mg.g^{-1} .

Ostropestřec bývá obvykle řazen v osevním postupu v třetí či čtvrté trati po organicky hnojené plodině (Kubínek, 1987). V experimentální části předložené práce byl zařazen v první trati a hnojen dobře vyzrálým kompostem v dávce 6 t.ha^{-1} . Vliv organického hnojení na obsah účinných látek tak mohl být významný, stejně jako relativně pozdější termín setí, jehož pozitivní vliv na výnos silymarinu potvrdili již Andrzejewska et al. (2010), společně s vlivem ročníku, nicméně výnos semen ostropestřce mariánského a obsah účinných látek závisí na mnoha proměnných komplexně působících faktorech.

Vliv ASA na obsah účinných látek v semenech ostropestřce mariánského byl vyhodnocen jako neprokazatelný. Na rostliny však taktéž působí abiotické stresory v podobě průběhu počasí, nadmořské výšky, emisního a imisního stavu, půdní zásobenosti vláhou a živinami, světelných podmínek (Pexídr, 2004) a biotických stresorů, které nespecificky působí po celou dobu růstu porostu a které mohou v kombinaci s aplikací elicitoru negativně ovlivnit jeho zdravotní stav, přestože by při optimálních podmínkách aplikace elicitoru mohla působit na porost stimulačně. Příčinou neprokazatelnosti vlivu kyseliny acetylsalicylové patrně nebyla její koncentrace v roztoku, neboť obsah účinných látek v semenech nevykazoval statisticky významné změny v závislosti na zvolené koncentraci kyseliny. Byl však sledován statisticky neprůkazný trend snižování obsahu všech účinných látek silymarinového komplexu s rostoucí koncentrací elicitoru.

6. ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.) a odzkoušení jejich vlivu prostřednictvím maloparcelkového pokusu, jakož i vypracování literární rešerše se zaměřením na působení elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.) nebo v jiných vybraných rostlinách, botanickou charakteristiku, způsob pěstování, agrotechniku, hnojení a ochranu před škůdci a proti chorobám ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L.), a chemické a účinné látky v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.) a metody jejich stanovení.

Za tímto účelem byla vypracována literární rešerše na stanovená témata. Dále byl v roce 2013 na 8 parcelkách založen porost ostropestřce mariánského, na nějž byly v průběhu vegetace třikrát aplikovány vodné roztoky ASA o třech zvolených koncentracích, přičemž 2 parcelky sloužily jako kontrolní za ošetření pouze vodou. Odebrané vzorky semen byly analyzovány na Katedře zootechnických a veterinárních disciplín Jihočeské univerzity metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Následně byla získaná data zpracována, vyhodnocena a kvantitativně shrnuta v tabulkách č. 3, č. 4, č. 5 a č. 6.

Protože nebyla zamítnuta normalita získaných dat, byla k analýze dat použita metoda analýzy rozptylu (ANOVA). Změna koncentrace celkové sumy účinných látek u vzorků jednotlivých skupin rostlin nebyla statisticky průkazná. Rozdíl ve zjištěných koncentracích sledovaných látek mezi vzorky skupiny rostlin s aplikací elicitoru ASA o nízké koncentraci, skupiny s aplikací elicitoru ASA o střední koncentraci, skupiny s aplikací elicitoru ASA o vysoké koncentraci a kontrolní skupiny s aplikací vody nebyl statisticky průkazný u žádné účinné látky. Mezi jednotlivými koncentracemi elicitoru byl sledován statisticky neprůkazný trend snižování obsahu všech účinných látek silymarinového komplexu s rostoucí koncentrací elicitoru, který by se při větším počtu vzorků mohl stát významným.

Používání vybraného elicitoru o zvolených koncentracích se tedy jeví jako neúčinné. Statisticky neprůkazný vliv působení elicitoru ASA nemusí být zapříčiněn pouze jeho neefektivností, ale může být způsoben mnohými vnějšími abiotickými

či biotickými vlivy, které na porost rostlin v maloparcelkovém pokusu nespecificky působí, a tím ovlivňují i výsledný obsah účinných látek.

Výsledky předložené práce potvrdily předchozí zkoumání působení elicitorů (ELITIC a Elitic Jack) na obsah účinných látek semen rostliny ostropestřce mariánského, které bylo vyhodnoceno taktéž jako neefektivní (Petr, 2012). Vzhledem ke skutečnosti, že předkládaný pokus zkoumá elicitor s odlišným chemickým složením (ASA), nemohl být takto opakován a s ohledem na výsledky paralelně prováděných pokusů prokazující pozitivní efekt rozličných elicitorů na výnos a kvalitu některých rostlin a účinných látek, nelze považovat závěr o jeho neúčinnosti za definitivní.

Výsledky pokusu by bylo vhodné dále ověřovat v provozní praxi na větších plochách. Elicitace rostlin kyselinou acetylsalicylovou o optimální koncentraci společně s vhodnými agrotechnickými zásahy by mohly zabezpečit pěstitelům vyšší efektivitu výroby, lepší odbyt a zpeněžení vysoce kvalitních produktů.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Agarwal, A. A. Benefits and costs of induced plant defense for *Lepidium virginicum* (*Brassicaceae*). *Ecology*, 2000. vol. 81, no. 7, s. 1804-1813.

Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, R. P. a Aggarwal B. B. Anticancer potential of silymarin: From bench to bed side. *Anticancer research*, 2006. vol. 26, no. 6B, s. 4457-4498.

Akerele O., Heywood, V. H. a Synge H. *Conservation of Medicinal Plants*. Cambridge University Press, 1991. s. 26. ISBN 0-521-39206-3.

Alikaridis, F., Papadakis, D., Pantelia, K. a Kephelas, T. Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root cultures. *Fitoterapia*, 2000. vol. 71, s. 379-384.

Allina, S. M., Pri-Hadash, A., Theilmann, D. A., Ellis, B. E. a Douglas, C. J. 4-Coumarate: coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning and analysis of recombinant enzymes. *Plant Physiology*, 1998. vol. 116, no. 2, s. 743-754.

Anderson, A. J. The biology of glycoproteins as elicitors. In *Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives*. New York: McGraw Hill Inc, 1989. vol. 3, s. 87-130.

Andrzejewska, J. a Skinder, Z. Yield and quality of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) raw material grown in monoculture and crop rotation. Part 2. Milk thistle reaction to potassium fertilization. *Herba Polonica*, 2007. vol. 53, no. 1, s. 5-10. ISSN 0018-0599.

Andrzejewska J., Sadowska K. a Mielcarek S. Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. *Industrial Crops and Products*, 2010. vol. 33, no. 2, s. 462-468.

Arslanian, R. L., Bailey, D. T., Kent, M. C., Richheimer, S. L., Thornburg, K. R., Timmons, D. W. a Zheng, Q. Y. Brevitaxin a New Diterpenolignan from the Bark of *Taxus brevifolia*. *Journal of Natural Products*, 1995. vol. 58, no. 4, s. 583-585.

Ausubel, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, 2005. vol. 6, s. 973-979.

Baldwin, I. T. a Callahan, P. Autotoxicity and chemical defense: Nicotine accumulation and carbon gain in solanaceous plants. *Oecologia*, 1993. vol. 94, no. 4, s. 534-541.

Balunas, M. J. a Kinghorn, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 2005. vol. 78, s. 431-441.

Bateson, G. Mysl a příroda: nezbytná jednota. Praha: Malvern, 2006. 197 s. ISBN 80-86702-19-7.

Begon, M., Harper J. L. a Townsend C. R. Ecology: individuals, populations, and communities. 2nd ed. Boston: Blackwell Scietific, 1990. 945 s.

Bennet, R. N. a Wallsgrove, R. M. Secondary metabolism in plant defense – mechanisms. New Phytologist, 1994. vol. 127, s. 617–633.

Beran, M. Vaše dotazy - Naše odpovědi [online]. Výzkumný ústav potravinářský Praha, 2007 [cit. 2012-02-11]. Dostupný z: <http://www.vupp.cz/czvupp/aktualit/index.htm>.

Bergmann, H., Leinhos, V. a Machelett, B. Increase of stress resistance in crop plants by using phenolic compounds. Acta Hort. 381 (International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance, International Society for Horticultural Science), 1994. vol. 1, s. 390-397.

Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E. a Love, K. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. Nature, 1998. vol. 391, s. 485–488.

Bláha, L., Bocková, R., Hnilička, F., Hniličková, H., Holubec, V., Millerová, J., Štolcová, J. a Zieglerová, J. Rostlina a stres. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2003. 156 s.

Bolton, M. D., Primary Metabolism and Plant Defense - Fuel for the Fire. MPMI, 2009. vol. 22, no. 5, s. 487–497.

Cacho, M., Moran, M., Corchete, P. a Fernandez-Tarrago, J. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Plant Science, 1999. vol. 144, s. 77-84.

Cannon, W. B. Organization for physiological homeostasis. Physiological Reviews, 1929. vol. 9, no. 3, s. 399 - 431.

Capra, F. Tkáň života: nová syntéza mysli a hmoty. Praha: Academia, 2004. 290 s. ISBN 80-200-1169-2.

Cardona, M., Garcia, B., Pedro, J. a Sinisterra, J. Flavonoids, flavonolignans and a phenylpropanoid from *Onopordon corymbosum*. Phytochemistry, 1990. vol. 29, no. 2, s. 629.

Carrier, D. J., Crowe, T., Sokhansanj, S., Wahab, J. a Barl, B. Milk thistle, *Silybum marianum* L. Gaertn. flower head development and associated marker compound profile. J. Herbs Spices Med. Plants, 2002. vol. 10, s. 65-74.

Carruba, A. a la Torre, R. Cultivation trials of milk thistle, *Silybum marianum* L. Gaertn. into the semiarid Mediterranean environment. Agricultura mediterranea, 2003. vol. 133, s. 14-19. ISSN 0394-0438.

Coufal, P. Separation methods [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2004a [cit. 2014-01-08]. Dostupný z: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/sepmet.html>

Coufal, P. Thin layer chromatography, TLC; Paper chromatography, PC [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2004b [cit. 2014-01-08]. Dostupný z: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>

Coufal, P. Capillary Electroseparations, CES [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2004c [cit. 2012-01-08]. Dostupný z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html>

Czabajska, W., Kazimierczak, K., Maciolkowska-Ludowicz, E. Studies on the biology of *Silybum marianum Gaertn.*: Development, blooming, fructifying. *Herba-Polonica* (Poland), 1989. vol. 35, no. 2-3, s. 109-115.

Černý, A. Parazitické dřevokazné houby. Státní zemědělské nakladatelství v Praze, 1989. 99 s. ISBN 80-209-0090-X.

DerMarderosian, A. Milk Thistle. Review of Natural Products. Fact and Comparisons. St. Louis, MO: Fact and Comparisons Publishers, 2003.

Determann, H. Gelová chromatografie. Praha: Academia, 1972. 218 s.

Dicosmo, F. a Misawa, M. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends. Biotechnol.*, 1985. no. 3, s. 318-322.

Drbal, K. a Křížek, M. Analytická chemie. Skripta, Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 1999. 185 s. ISBN 80-7040-352-7.

Dudareva, N. a Pichersky, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scent. *Plant Physiology*, 2000. vol. 122, s. 627–633.

Dušek, J. Studium faktorů ovlivňující biosynthesu terapeuticky významných metabolitů v kulturách in vitro. Závěrečná zpráva grantu 193/1997/B-BIO/FaF, 1999.

Dvořáková J. Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině *Ostropestřec mariánský Silybum marianum (L.) Gaertn.* Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2006. 87 s.

Erhart, E. a Hartl, W. Compost using in organic farming. *Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming. Sustainable Agriculture Reviews*, 2010. vol. 4, s. 311-345.

Evans, W. C. *Trease and Evans's Pharmacognosy*. 15th ed. London: WB Saunders. 2001.

Fischer, J. Excentrische Positionalität, Plessners Grundkategorie der Philosophischen Anthropologie. *Deutsche Zeitschrift für Philosophie*, 2000. jg. 48, h. 2, s. 275-276.

Fischer, N. H. a Quijano, L. Allelopathic agents from common weeds *Amaranthus palmeri*, *Ambrosia artemisifolia* and related weeds. In: Thompson, A. C. The Chemistry of Allelopathy. American Chemical Society, Washington, DC, 1985. s. 134-147.

Foldesi, D. a Barsi, E. Seeding date and spacing experiments with *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Herba Hungarica*, 1983. vol. 22, s. 55-64.

Fremerová, M. Identifikace látek z extraktu rostliny *Echinacea purpurea*. Diplomová práce, Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2004. s. 49.

Fronek, J. Anglicko-český, česko-anglický slovník. Praha: LEDA, 1998. 1277 s. ISBN 80-85927-48-9.

Garaj, J., Bustin, D. a Hladký, Z. Analytická chemia. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1987. 740 s.

Geneva, M., Stancheva, I., Sichanova, M., Boychinova, M., Georgiev, G. a Doležal, M. Improvement of milk thistle (*Silybum marianum* L.) seed yield and quality with foliar fertilization and growth effector MD 148/II. *Gen. Appl. Plant Physiology*, 2008. vol. 34, no. 3-4, s. 309-318.

Godoy-Hernández, G. a Loyola-Vargas, V. M. Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 1997. vol. 16, no. 5, s. 287-290.

Gohre, V. a Robatzek, S. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 2008. vol. 46, s. 189-215.

Gonzalez, M. C., Sanchez, R. a Cejudo, F. J. Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta*, 2003. vol. 216, no. 6, s. 985-992.

Gómez-Gómez, L. a Boller, T. FLS2 an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 2000. vol. 5, s. 1003-1011.

Gramanová, H. Technologie pěstování ostropestřece mariánského *Silybum marianum* ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2009. 70 s.

Grieve, M. A Modern Herbal. 2 vols. New York: Harcourt, Brace & Company. 1931.

Groenewald, E. G. a Van der Westhuizen, A. J. The metabolism of inhibitor of flowering and prostaglandin biosynthesis, acetylsalicylic acid, in *Pharbitis nil* cotyledons. *Biol. Plant.*, 1998. vol. 41, no. 3, s. 475-479.

Gromová, Z. Pestovanie špeciálnych plodín. Skripta Vysoká škola poľnohospodárska v Nitre, Agronomická fakulta, Katedra rastlinnej výroby. Nitra: Vydavateľské a edičné stredisko VŠP, 1993. 165 s. ISBN 80-7137-115-7.

Habán, M., Otepka, P., Kobida, L. a Habánová, M. Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion. Horticultural Science, 2009. vol. 36, no. 2, s. 25-30.

Hahn, M. G., Bucheli, P., Cervone, F., Doares, S. H., O'Neill, R. A., Darvill, A. a Albersheim, P. The roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives. T. Kosuge and E. W. Nester, eds (New York, NY: McGraw Hill Publishing Co.), 1989. vol. 3, s. 131-181.

Harmatha, J. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů. Chemické listy, roč. 99, s. 622 – 632. ISSN 1213-7103

He, P., Shan, L. a Sheen, J. Elicitation and suppression of microbe - associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. Cellular Microbiology, 2007. vol. 9, s. 1385-1396.

Hedrick, U. P. Sturtevant's Notes on Edible Plants. Part II. State of New York, Dept. of Agriculture, Twenty-seventh Annual Report, 1919. vol. 2.

Heil, M. a Bostock, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Annals of Botany, 2002. vol. 89, s. 503-512.

Heil, M., Hilpert, A., Kaiser, W. a Linsenmair, K. E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: Does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? Journal of Ecology, 2000. vol. 88, s. 645-654.

Hérakleitos z Efesu, zlomek B 123. In: Kratochvíl, Z. Dělský potápěč k Hérakleitově řeči. Praha: Hermann a synové, 2006. 527 s. ISBN 80-87054-00-8.

Hnilička, F., Hniličková, H., Bláha, L., Möllerová, J. a Zieglerová, J. Ekologické a fyziologické odezvy rostlin na biotické stresory. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin. In: Sborník příspěvků, 2003. s. 156 - 170.

Hogan, F. S., Krishnegowda, N. K., Mikhailova, M. a Kahlenberg M. S. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. Journal of Surgical Research, 2007. vol. 143, no. 1, s. 58-65.

Höfner, R., Vazquez-Moreno, L., Winter, K., Bohnert, H. J. a Schmitt, J. M. Induction of Crassulacean Acid Metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* by High Salinity: Mass Increase and de Novo Synthesis of PEP-Carboxylase. Plant Physiology, 1987. vol. 83, no. 4, s. 915–919.

Hubáček, J. Chemie pro vysoké školy zemědělské, 1. vyd. Praha: SZN, 1988. 767 s.

Hubená, L. Význam adaptogenních a imunogenních rostlin v boji proti civilizačním chorobám, jejich agrotechnika, hnojení, sklizeň a zpracování. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2012. 48 s.

Husáková, J. a Lhotská, M. Ostropestřec mariánský - okrasná a léčivá rostlina. Živa: časopis pro biologickou práci, 1981. roč. 28, č. 4, s. 133. ISSN 0044-4812.

Chernyadev, I. I. Effect of 6 - benzylaminopurine and thidiazuron on photosynthesis in crop plants. Photosynthetica, 1994. vol. 30, s. 287-292.

Chiavari, G., Galletti G. C., Marotti, M. a Piccaglia, R. Silymarin content of different *Silybum marianum* L. Gaertn. cultivars. Herba Hungar. Vol. 1-2, 1991. s. 23 - 27.

Chmel, K., Cvak, Z, Dědek, M. a Gajdůšková, V. Chromatografie na tenké vrstvě, její využití pro průkaz cizorodých látek v potravinářství a v zemědělství. 1. vyd. Praha: VÚPP, 1987. 172 s.

Chromatografie [online]. 2009 [cit. 2014-01-08]. Dostupný z:
http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc

Indrák, P. a Chytilová, D. K problematice stanovení silybinu v droze ostropestřece mariánského (*Silybum marianum* L. Gaertn.). Zahradnictví, 1992. roč. 19, č. 4, s. 309-313.

Jahodář, L. Farmakobotanika semenné rostliny. Praha: Karolinum, 2006. 258 s. ISBN 80-246-1225-9.

Janča, J. a Zentrich, J. A. Herbář léčivých rostlin. 1. vyd. Praha: Eminent, 1995. s. 216 - 219. ISBN 80-85876-14-0.

Janda, M. a Valentová, O. Kyselina salicylová. Bioprospect, 2014. roč. 24, č. 1, s. 9 – 12.

Jaroš, Z. Léčivé látky z rostlin. Dona, 1992. 79 s. ISBN 80-85463-04-0.

Jegorov, A. Flavolignany - novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem. Chemické listy, 1996. roč. 90, s. 859-862.

Jones, W. H. S. Pliny Natural History with an English Translation in Ten Volumes. Cambridge: Harvard University Press, 1966. vol. 7.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. a Shibuya, N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2006. vol. 103, s. 11086-91.

Kalina, M. Kompostování a péče o půdu. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 116 s. ISBN 80-247-0907-4.

Kašparová, M., Siatka, T. a Dušek, J. Abiotic elicitation of *Trifolium pratense* L. Suspension culture. Čes. slov. Farm., 2007. roč. 56, č. 5, s. 225–229.

Klouda, P. Moderní analytické metody [online]. 2003 [cit. 2014-01-08]. Dostupný z: <http://klouda.webpark.cz/mam.htm>

Knudsen, J. T. a Tollsten, L. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Bot. J. Linn. Soc.*, 1993. vol. 113, s. 263–284.

Kolář, L. Vliv přijatých živin na tvorbu genisteinu v jeteli lučním. Rostlinná výroba, 1982. roč. 28, č. 8, s. 1-12.

Kolář, L. Organické hnojení a humus. Praha: VŠZ, 1987. 106 s.

Kolář, L., Ledvina, R., Kužel, S. a Pašek, J. Vliv nadbytku dusíku ve výživě *Echinacea purpurea* (L.) Moench na tvorbu jejích účinných látek. Rostlinná výroba, 1998. roč. 44, č. 11, s. 489-495.

Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Haruna, M., Ito, K. a Tanabe, M. Studies on Inhibitors of Skin Tumor Promotion, IX. Neolignans from *Magnolia officinalis*, *Journal of Natural Products*, 1991. vol. 54, no. 3, s. 816-822.

Kopřiva, Z. Leuzea saflorová (*Leuzea carthamoides*) jako alternativní rostlina. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2002. 67 s.

Kovalčík, K. a Kovalčíková, M. Adaptácia a stres v chove hospodárskych zvierat. *Príroda*, 1974. 195 s.

Kovaříček, P., Hůla, J., Vlášková, M., Kroulík, M. a Mašek, J. Zapravení organické hmoty do půdy s cílem omezit povrchový odtok vody při přívalových deštích [online]. Výzkumný ústav zemědělské techniky, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně, 2012 [cit. 2014-01-08]. Dostupné z <http://svt.pi.gin.cz/vuzt/novinky/metodika2012kovaricek.pdf>

Kozłowski, J. a Hołyńska, M. Effect of fertilization in a field experiment on the crop of *Silybum marianum* Gaertn. fruits as well as on the content and yield of silymarin. *Heba Polonica*, 1985. no. 1-2, s. 51-59.

Kratochvíl, Z. Filosofie živé přírody. Praha: Hermann a synové, 1994. 222 s.

Králová, B. a Rauch, P. Bioanalytické metody. Praha: VŠCHT, 1993. 280 s. ISBN 80-7080-177-8.

Křen, V. a Walterová, D. Silybin and Silymarin - New Effects and Applications. *Biomed. Papers*, 2005. vol. 149, no. 1, s. 29-41.

Křen, V., Gažák, R., Biedermann, D. a Marhol, P. Silybin (Silibinin) Structure and Chirality. *Chromatographia*, 2010. vol. 71, no. 1-2, s. 167-168.

Křivohlavý, J. Jak zvládat stres. Praha: Grada Publishing, 1994. 190 s. ISBN 80-7169-121-6.

Kubínek, J. Ostropestřec mariánský - metodika pěstování. Ministerstvo zemědělství a výživy ČR, 1987. 21 s.

Kudělková, K., Jodlovská, J. a Šarapatka, B. Odpady. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci – Vydavatelství, 1999. 186 s. ISBN 80-244-0046-4.

Kummer, V., Mašková, J., Zralý, Z. a Čanderle, J. Vedlejší účinky zkrmování výlisků semen ostropestřce mariánského u krav. Veterinářství, 2000. roč. 50, č. 2, s. 55 - 58.

Kužel, S., Tříška, J., Kolář, L., Špička, J., Cígler, P., Hrubý, M., Vydra, J. a Vrchotová, N. Technologie pěstování rostlin *Echinacea purpurea* a *Schizandra chinensis* a extrakce účinných látek. Závěrečná zpráva o realizaci projektu Kontakt ME 704, 2005. s. 101.

Kužel, S., Cígler, P., Hrubý, M., Pilař M. a Kopecký, J. Stimulace obsahu α -hořkých kyselin ve chmelu otáčivém. In: Sborník příspěvků Semináře technologie pěstování chmele, 2006.

Kvasnička, F., Bíba, B., Ševčík, R., Voldřich, M., Krátka, J. Analysis of the active components of silymarin. Journal of Chromatography A, 2003. vol. 990, s. 239-245.

Lam, E., Pontier, D. a del Pozo, O. Die and let live: programmed cell death in plants. Curr. Opin. Plant Biol., 1999. vol. 2, s. 502-507.

Laštůvka, Z. Energetický metabolismus vyšších rostlin. Brno : Univerzita J.E. Purkyně, 1988. s. 7.

Lazarus, R. S. From psychological stress to the emotions: A history of changing outlooks. Annual Review of Psychology, 1993. vol. 44, s. 1 – 21.

Longland, A. C., Slusarenko, A. J. a Friend, J. Arachidonic and linoleic acid elicit isoflavonoid phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* (French bean). Journal of Phytopathology, 1987. vol. 120, s. 289-297.

Lu, K., Chang, Z., Chen, B., Guo, D., Zheng, J. a Wang, K. Hormone-like effect of rare earth elements on the plant. Journal of Beijing Medical University, 1997. vol. 4, s. 289-291.

Lu, P., Lu, K., Zheng, J. a Guo, D. Effect of rare earth elements on callus growth in *Coptis chinensis*. Journal of Beijing Medical University, 1998. vol. 5, s. 389-391.

Macholán, K. Sekundární metabolity. Masarykova univerzita v Brně, 2003. s. 7-8. ISBN 80-210-3068-2.

Marinelli, F., Ronchi, V. N. a Salvador, P. Elicitor induction of enzyme activates and 6 - methoxymellein production in carrot cell-suspension culture. Phytochemistry, 1994. vol. 35, s. 1457-1640.

Maury, S., Geoffroy, P. a Legrand, M. Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloylcoenzyme A 3/5-O-methyltransferase and caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiology*, 1999. vol. 121, s. 215–223.

McMurry, J. *Organická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2007. 1176 s. ISBN 978-80-7080-637-1.

Mitter, N., Kazan, K., Way, H. M., Broekaert, W. F. a Manners, J. M.: Systemic induction of an *Arabidopsis* plant defensin gene promoter by tobacco mosaic virus and jasmonic acid in transgenic tobacco. *Plant Science*, 1998. vol. 136, s. 169–180.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H. a Shibuya, N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007. vol. 104, s. 19613-19618.

Mol, J., Grotewold, E. a Koes, R. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science*, 1998. vol. 3, 1998. s. 212–217.

Morazzoni, P. a Bombardelli, E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia*, 1995. vol. 66, s. 3-42.

Moudrý, J., Bárta, J., Bártová, V., Bubeník, V., Bubeník, J., Diviš, J., Dostálová, R., Hýbl, M., Konvalina, P., Ondřej, M., Peterka, J., Pexová Kalinová, J., Ponižil, A., Seindenglanz, M., Stražil, Z., Šmirouz, P., Štolcová, M. a Vaculík, A. *Alternativní plodiny*. Profi Press, 2011. 150 s. ISBN 978-80-86726-40-3.

Moudrý, J. *Ostropestřec mariánský* (*Silybum marianum*) [online]. Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2012. [cit. 2014-01-08]. Dostupný z: www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Ostropestrec_mariansky.htm

Myers, R. L. *The 100 Most Important Chemical Compounds*. Greenwood Press, 2007. 352 s. ISBN 978-0-313-33758-1.

Nováček, F. *Fytochemické základy botaniky*. Fontána, 2009. 284 s. ISBN 978-80-7336-457-1.

Nuccio, M. L., Rhodest, D., McNeil, S. D. a Hanson, A. D. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1999. vol. 2, s. 128–134.

Niyogi, K. K. Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2000. vol. 3, s. 455-460.

Nyiredy, S., Szűcs, Z., Antus, S. a Samu, Z. New Components from *Silybum marianum* L. Fruits: A Theory Comes True. In *Memoriam of Professor Szabolcs Nyiredy (1950–2006)*. *Chromatographia*, 2008. vol. 68, s. 5-11.

O'Connell, R. J. a Panstruga, R. Tete a tete inside a plant cell: Establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytologist*, 2006. vol. 171, s. 699-718.

Omer, E. A., Refaat, A. M., Ahmed, S. S., Kamel, A. a Hammouda, F. M. Effect of spacing and fertilization on the yield and active constituents of milk thistle, *Silybum marianum*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 1993. vol. 1, no. 4, s. 17-23.

Omer, E. A., Ibrahim, M. E., Razin, A. M. a Ahmed, S. S. Effect of spacing, nitrogen and potassium fertilization of *Silybum marianum* L. cultivated in newly reclaimed lands. *Egyptian Journal of Horticulture*, 1995. vol. 22, no. 1, s. 97-108.

Omer, E. A. Effect of different nitrogen sources on Romanian *Silybum marianum* cultivated in sandy and clay soils. *Egyptian Journal of Horticulture*, 1996. vol. 23, no. 1, s. 63-76.

Omer, E. A., Ahmed, S. S., Fayed, T. B. a Ezzel-Din, A. A. Seed yield of *Silybum marianum* L. as affected by row spacing and fertilization in new reclaimed lands of Egypt. *Egyptian Journal of Horticulture*, 1998. vol. 25, no. 3, s. 281-293.

Omidbaigi, R., Karimzadeh, G. a Koshki, M. H. A study on the influence of sowing date and plant density on the productivity of *Silybum marianum* and the characteristics correlation. *Iranian J. Sci. Technol.*, 2003. vol. 1, s. 203-212.

Opletal, L. a Volák, J. *Rostliny pro zdraví*. Praha: Aventinum, 1999. 176 s. ISBN 80-7151-074-2.

Ottův slovník naučný nové doby: dodatky k velikému Ottovu slovníku naučnému. 4. díl. Praha: Argo, 2001. 1. sv., s. 199. ISBN 80-7203-341-7.

Pašek, J. Návrh výroby imunogenního sirupu z fyziologicky účinné látky *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Diplomová práce, Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 1997. 69 s.

Pepping, J. Milk thistle: *Silybum marianum*. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 1999. vol. 56, no. 12, s. 1195-7.

Petr J. Vliv ošetření elicitory na obsah některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2012. 52 s.

Petříková, V. Energetická biomasa z polních kultur [online]. *Biom*, 2005 [cit. 2014-01-08]. Dostupný z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/energeticka-biomasa-z-polnich-kultur>. ISSN: 1801-2655.

Pexídr, R. Vliv kyseliny acetylsalicylové na obsah účinných látek ve vybraných léčivkách. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2004. 80 s.

Phillips, M. A., Savage, T. J. a Croteau R. Monoterpene synthases of loblolly pine (*Pinus taeda*) produce pinene isomers and enantiomers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999. vol. 372, s. 197–204.

Pieterse, C. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., van Pelt, J. A. a van Loon, L. C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 1996. vol. 8, s. 1225-1237.

Pichersky, E. a Gang, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 2000. vol. 5, no. 10, s. 439-445.

Piterková, J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M. a Peč P. Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické Listy*, 2005. roč. 99, s. 455 - 466. ISSN 1213-7103.

Prance, G. T. Floristic Inventory of the tropics: Where do we stand? *Annals of Missouri Botanical Garden*, 1997. vol. 64, s. 659-684.

Procházka, S. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1998. 484 s. ISBN 80-200-0586-2.

Prošková, J. Výzkumný ústav zemědělské ekonomiky - Analýza současného stavu pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin (LAKR) v ekologickém zemědělství ČR, příležitosti a konkurenceschopnost v tomto odvětví, studie VÚZE jako výstup úkolu Distribuční toky vybraných komodit a perspektivy komodity mléko v ČR s využitím databáze IFCN. In: *Ročenka VÚZE*, 2007. 17 s. ISBN 978-80-86671-49-9.

Pulkrábek, J., Jozefyová, L., Urban, J. a Šroller, J. Stresové faktory při pěstování cukrovky. *AGRO*, 2005. vol. 6, s. 67.

Purrington, C. B. Costs of resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2000. vol. 3, s. 305-308.

Quaglia, M. G., Bossu, E., Donati, G., Mazzanti, G. a Brandt, A. Determination of silymarine in the extract from dried silybum marianum fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999. vol. 19, s. 435-442.

Radman, R., Saez, T., Bucke, C. a Keshavarz, T. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2003. vol. 37, s. 91–102.

Rámcová metodika pěstební technologie ostropestřce mariánského [online]. Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., 2003 [cit. 2014-01-08]. Dostupné z http://www.agrokrom.cz/texty/METODIKY/RAM_METOD/RAM_METOD_OSTR_OPESTREC_MARIANSKY.pdf

Ros, B., Mohler, V., Wenzel, G. a Thümmeler, F. *Phytophthora infestans*-triggered response of growth-and defense-related genes in potato cultivars with different levels of resistance under the influence of nitrogen availability. *Physiol. Plant.*, 2008. vol. 133, s. 386-396.

Rouhová, M., Mikulčíková, P. a Ventura, K. Extrakce a stanovení kortikosteronu z biologického materiálu. In: Sborník prací 7. ročníku soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie o cenu firmy Merck. Praha: Česká společnost chemická, 2004. s. 67-71. ISBN 80-86238-38-5.

Rumińska, A. *Herbs Grower's Guide*. Poznań: PWRiL, 1991. s. 424.

Ryant, P. Alternativní olejniny [online]. Agrochemická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně, 2005 [cit. 2014-01-08]. Dostupný z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/hnojeni_plodin/html/olejniny/alterolejniny.htm

Rystonová, I. Průvodce lidovými názvy rostlin i jiných léčivých přírodnin a jejich produktů. Praha: Academia, 2007. s. 380. ISBN 978-80-200-1332-3.

Ryšlavá, H. a Doubnerová, V. Enzymy Hatch-Slackova cyklu v C3 rostlinách. *Chemické Listy*, 2010. roč. 104, s. 1175 - 1180.

Ryšlavá, H., Müller, K., Semoradová, Š., Synková, H. a Čerovská, N. Photosynthesis and Activity of Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. Leaves Infected by Potato virus A and Potato virus Y. *Photosynthetica*, 2003. vol. 41, s. 357-363.

Sanchez, R., Flores, A. a Cejudo, F. J. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*, 2006. vol. 223, no. 5, s. 901-909.

Sanchez-Sampedro, A. A., Fernandez-Tarrago, J., Corchete, P. Some common signal transduction events are not necessary for the elicitor-induced accumulation of silymarin in cell cultures of *Silybum marianum*. *Journal of Plant Physiology*, 2008. vol. 165, s. 1466-1473.

Selye, H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *CMA Journal*, 1976. vol. 115, s. 53-56.

Sersen, F., Vencel, T. a Annus, J. Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. *Fitoterapia*, 2006. vol. 77, s. 525-529.

Schippmann, U., Leaman, D. J. a Cunningham, A. B. Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues. In: Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry and fisheries. Satellite event on the occasion of the Ninth regular session of the commission on genetic resources for food and agriculture. Rome: FAO, 2002. 21 s.

Schulte, E. Die Ertragsbildung bei Nutzung sekundärer Inhaltsstoffe. Ansätze zur Optimierung des Wirkstoffertrages bei *Silybum marianum* (L.), der Mariendistel. Doctoral Dissertation. Institut für Pflanzenbau der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 1999.

Siatka, T. a Kašparová, M. Vliv sloučenin vanadu na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Čes. slov. Farm., 2007. roč. 56, č. 5, s. 230–234.

Sindel, B. M. A review of the ecology and control of thistles in Australia. Weed Research, 1991. vol. 31, s. 189-201.

Situační a výhledová zpráva MZe. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR, 2010. ISBN 978-80-7084-908-8.

Skinner, M. K. Cell-Cell Interactions in the Testis, Endocrine Reviews, 1991. vol. 12, no. 1, s. 45-77.

Sklenák, L. Experimentální metody biofyziky. Učební texty KFY PřF OU. Ostrava: Ostravská univerzita, 2003. 61 s. ISBN 80-7042-899-6.

Slanina, J. Biologická a farmakologická aktivita lignanů. Praha: Česká společnost chemická. Chemické listy, 2000. roč. 94, č. 2, s. 111-116. ISSN 0009-2770.

Slavík, B. Květena České republiky. 7. Praha: Academia, 2004. 766 s. ISBN 80-200-1161-7.

Smedegaard-Petersen, V. a Stolen, O. Effect of energy requiring defense reactions on yield and grain quality in powdery mildew *Erysiphe graminis* sp. *hordei* resistant *Hordeum vulgare* cultivar Sultan. Phytopathology, 1981. vol. 71, s. 396-399.

Smedegaard-Petersen, V. a Tolstrup, K. The limiting effect of disease resistance on yield. Annu. Rev. Phytopathol., 1985. vol. 23, s. 475-490.

Somerville, C. a Somerville, S. Plant functional genomics. Science, 1999. vol. 285, s. 380–383.

Somssich, I. E. a Hahlbrock, K. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. Trends in Plant Science, 1998. vol. 3, s. 86-90.

Spitzová, I. a Placr, M. Vliv desikantů na biologickou hodnotu semen a kvalitu drog ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L. Gaertn.). Zahradnictví, 1994. roč. 24, č. 2, s. 93-101.

Spitzová, I. Ostropestřec mariánský - staronová léčivá rostlina. Úroda: časopis pro rostlinnou produkci, 1997. roč. 45, č. 8, s. 28-29. ISSN 0139/6013.

Starý, F. Léčivé bodláky: Ze světa léčivých rostlin 5. Živa: časopis pro biologickou práci, 2000. roč. 48, č. 5, s. 208-210.

Statistická šetření ekologického zemědělství provedená v roce 2010. Brno: ÚZEI, 2011.

Šarapatka B. et al. Agroekologie: východiska pro udržitelné hospodaření v krajině. Olomouc: Bioinstitut, o.p.s., 2010. 440 s. ISBN 978-80-87371-10-7.

Šimek, J. Chromatografické metody. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1972. 100 s.

Šíma, J. Separační metody v analytické chemii [online]. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2004 [cit. 2014-01-08]. Dostupný z: http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm

Štern, P. Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii [online]. Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha, 2003 [cit. 2014-01-08]. Dostupný z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>

Šula, J. Fytoterapie jako součást moderní medicíny. In: Regenerace. Praha: Agentura Impuls Art, 2006. roč. 14, č. 4. ISSN 1210-6631.

Tesař, S. a Vaněk, V. Výživa rostlin a hnojení. Praha: AF VŠZ, 1992. 151 s.

Tham, D. M., Gardner, Ch. D. a Haskell, W. L. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998. vol. 83, no. 7, s. 2223-2235.

Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F. a Cammue, B. P. The complexity for disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*, 2001. vol. 13, s. 63-68.

Toro-Goyco, E. a Matos, M. Pinguinain: a Simple Method for its Crystallization. *Nature*, 1966. vol. 210, no. 5035, s. 527-529.

Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J. a Sauer, N. The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis STP4* gene: Enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell*, 1996. vol. 8, s. 2169-2182.

Tůmová, L. a Dušek, J. Vliv kyseliny linolové na produkci sekundárních metabolitů. *Československá farmacie*, 2000. roč. 49, č. 2, s. 78-81.

Uexküll, J. von. Streifzüge durch die Umwelten von Tieren und Menschen. Berlin: Springer-Verlag, 1934. 101 s.

Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Gomez-Rodriguez M. V., Chaki M., Pedrajas J. R., Fernandez-Ocana A., Del Rio L. A. a Barroso J. B. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell & Environment*, 2006. vol. 29, no. 7, s. 1449–1459.

van Esse, H. P., van't Klooster, J. W., Bolton, M. D., Yadeta, K. A., van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., de Wit, P. J. G. M. a Thomma, B. P. H. J. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell*, 2008. vol. 20, s. 1948-1963.

Varela, F. G, Maturana, H. R. a Uribe, R. Autopoiesis: The organization of living systems, its characterization and a model. *Biosystems*, 1974. vol. 5, no. 4, s. 87-196.

Velikinac, I., Čudina, O., Janković, I., Agbaba D. a Vladimirov, S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. *IL FARMACO*, 2004. vol. 59, no. 5, s. 419-424.

Věchet, L. Význam interakcí hostitel - patogen. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, sborník recenzovaných příspěvků. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2011. s. 72 -77. ISBN: 978-80-213-2160-1

Vodrážka, Z. *Biochemie*. Praha: Academia, 1996. 196 s. ISBN 80-200-0600-1.

Vrchotová N., Kužel S., Tříška J., Kolář L. a Totušek J. Extrakce a analýza fenolických látek z třapatky nachové (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). *Chem. Listy*, 2002. roč. 96, č. 7, s. 636-639.

Vydra J. Vliv elicitorů na obsah účinných látek v rostlině *Echinacea purpurea*. Disertační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007. 112 s.

Wagner, H., Hörhammer, L. a Munster, R. The chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). *Arzneimittel-Forschung*, 1967. vol. 18, no. 6, s. 688-696.

Walters, D. R. a Boyle, C. Induced resistance and allocation costs: What is the impact of pathogen challenge? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2005. vol. 66, s. 40-44.

Wenzig, E., Kunert, O., Ferreira, D., Schmid, M., Schühly, W., Bauer, R., Hiermann, A. Flavonolignans from *Avena sativa*. *Journal of Natural Products*, 2005. vol. 68, no. 2, s. 289–92.

Wojcik, P. Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 2004. vol. 12, s. 201-218.

Wu J., Wang C. a Mei X. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology*, 2001. vol. 85, s. 67-73.

Zacharius, M. R a Kalan, B. E. Isoflavonoids, changes in soybean cell-suspensions when challenged with intact bacterial or fungal elicitors. *Journal of Plant Physiology*, 1990. vol. 135, s. 732-736.

Zangerl, A. R., Arntz, A. M. a Berenbaum, M. R. Physiological price of an induced chemical defense: Photosynthesis, respiration, biosynthesis, and growth. *Oecologia*, 1997. vol. 109, s. 433-441.

Zeytin, S. a Baran, A. Influences of Composted Hazelnut Husk on some Physical Properties of Soils. *Bioresource Technology*, 2003. vol. 88, no. 3, s. 241 – 244.

8. PŘÍLOHY

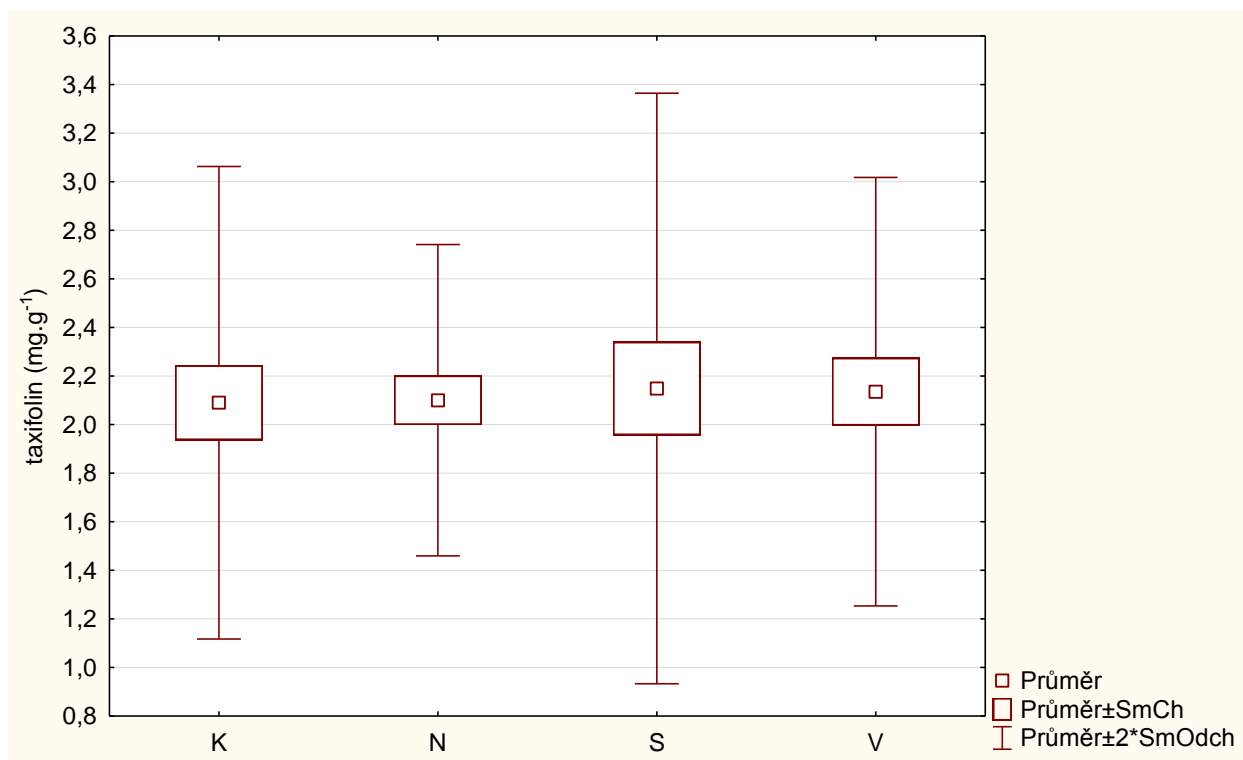
- Příloha 1 - Grafy vyjadřující závislost obsahu jednotlivých účinných látek na aplikaci elicitorů
- Příloha 2 - Grafy vyjadřující závislost obsahu jednotlivých účinných látek na rozdílné koncentraci aplikovaného elicitoru

Příloha 1:

Vliv aplikace elicitoru na koncentraci taxifolinu

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu taxifolinu (ANOVA; $F(3;36) = 0,0347$; $p = 0,99$).

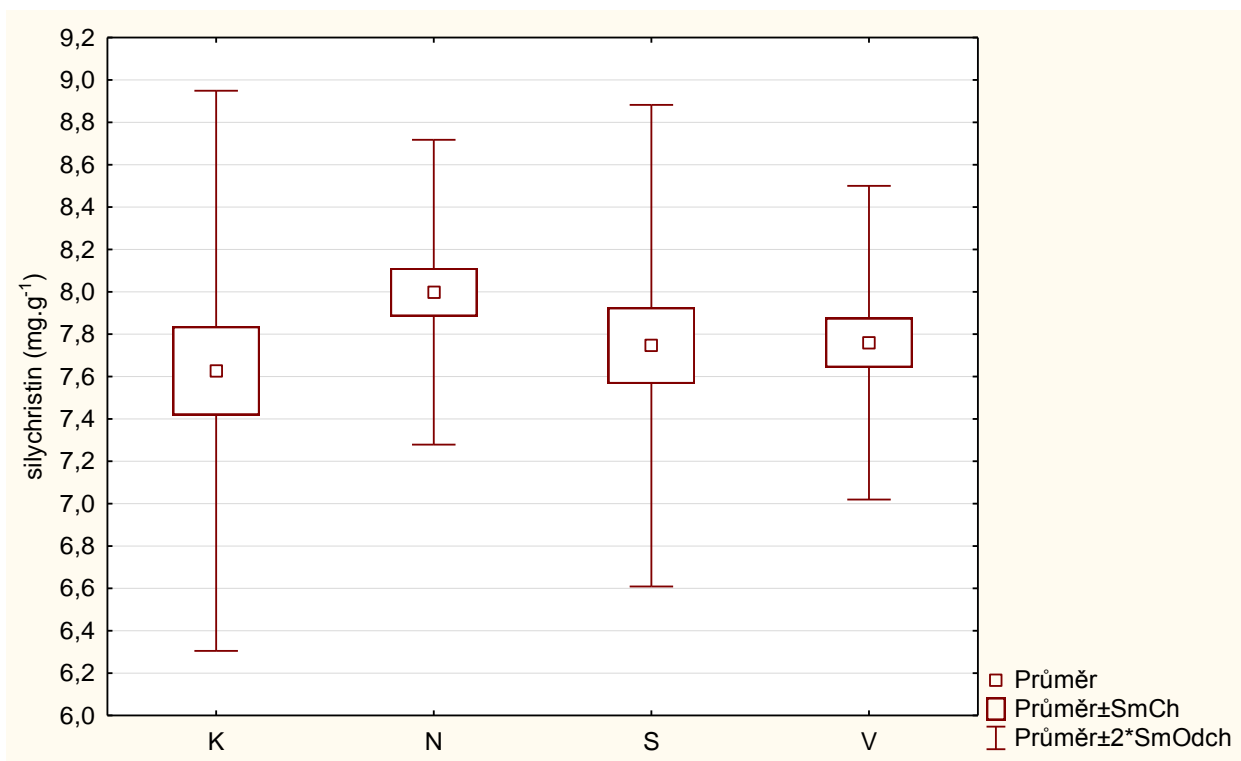
obr. č. 7 - Vliv aplikace elicitoru na koncentraci taxifolinu



Vliv aplikace elicitoru na koncentraci silychristinu

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci a kontrolní skupinou taktéž nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu silychristinu (ANOVA; $F(3;36) = 0,9425$; $p = 0,43$).

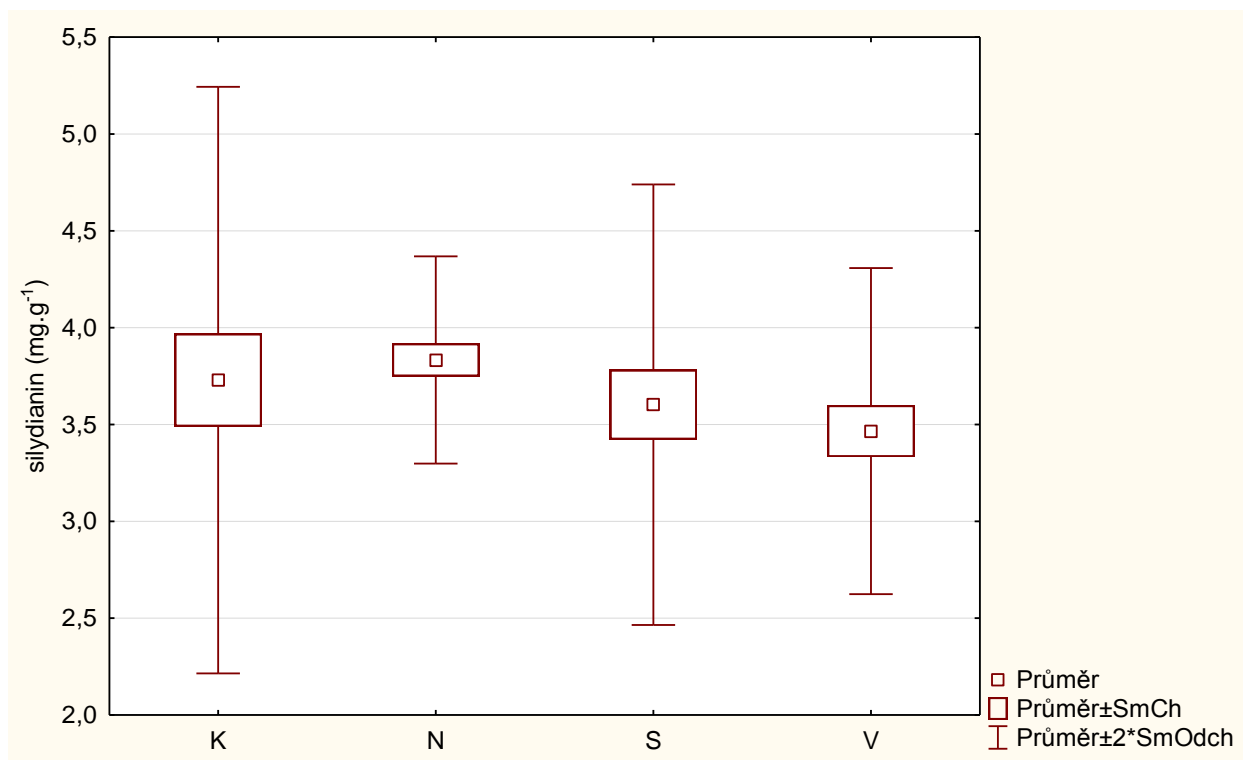
obr. č. 8 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silychristinu



Vliv aplikace elicitoru na koncentraci silydianinu

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu silydianinu (ANOVA; $F(3;36) = 0,8832$; $p = 0,46$).

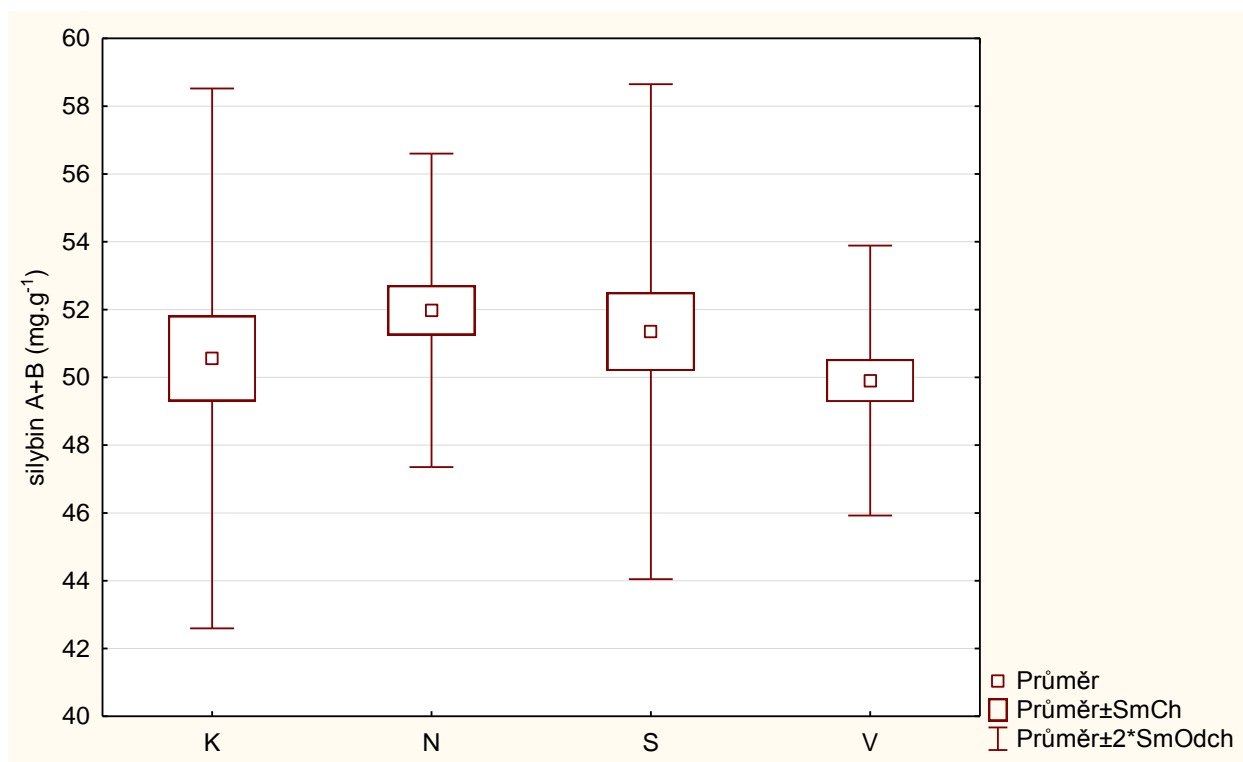
obr. č. 9 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silydianinu



Vliv aplikace elicitoru na koncentraci silybinu A+B

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu silybinu A+B (ANOVA; $F(3;36) = 0,8523$; $p = 0,47$).

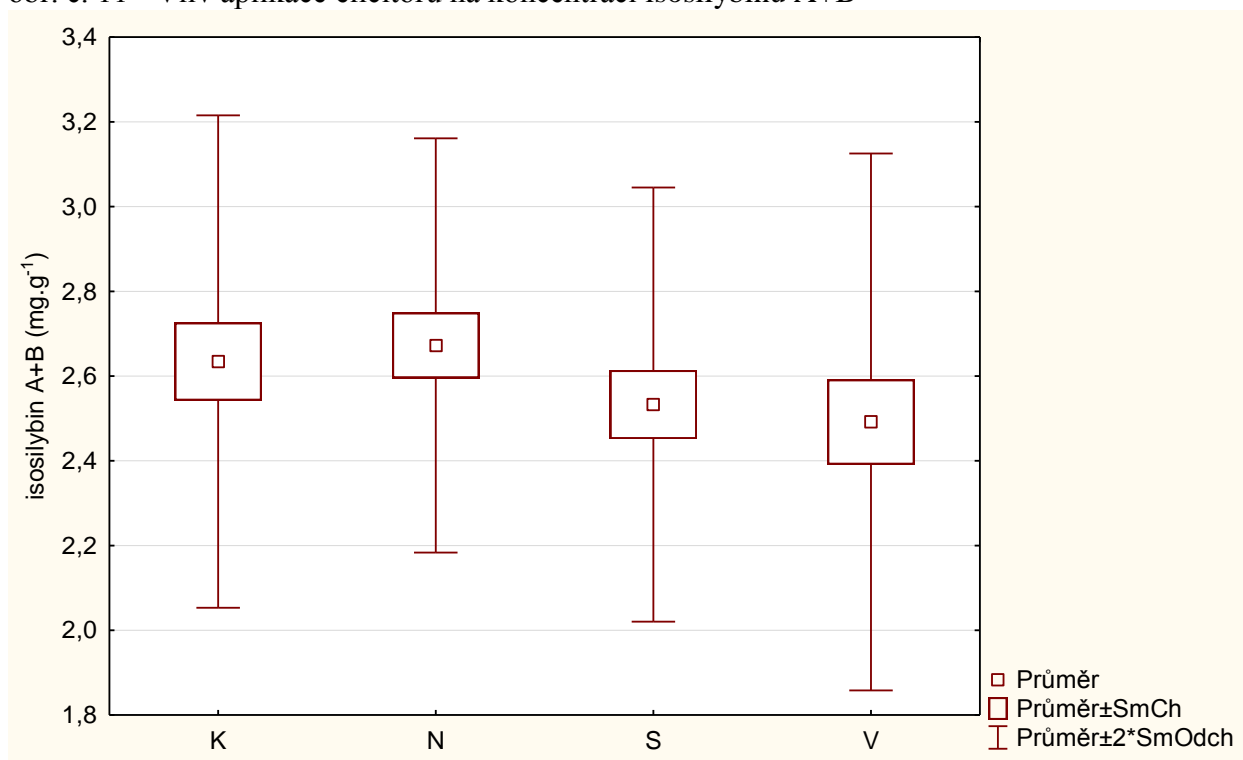
obr. č. 10 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silybinu A+B



Vliv aplikace elicitoru na koncentraci isosilybinu A+B

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu isosilybinu A+B (ANOVA; $F(3;36) = 0,9247$; $p = 0,44$).

obr. č. 11 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci isosilybinu A+B

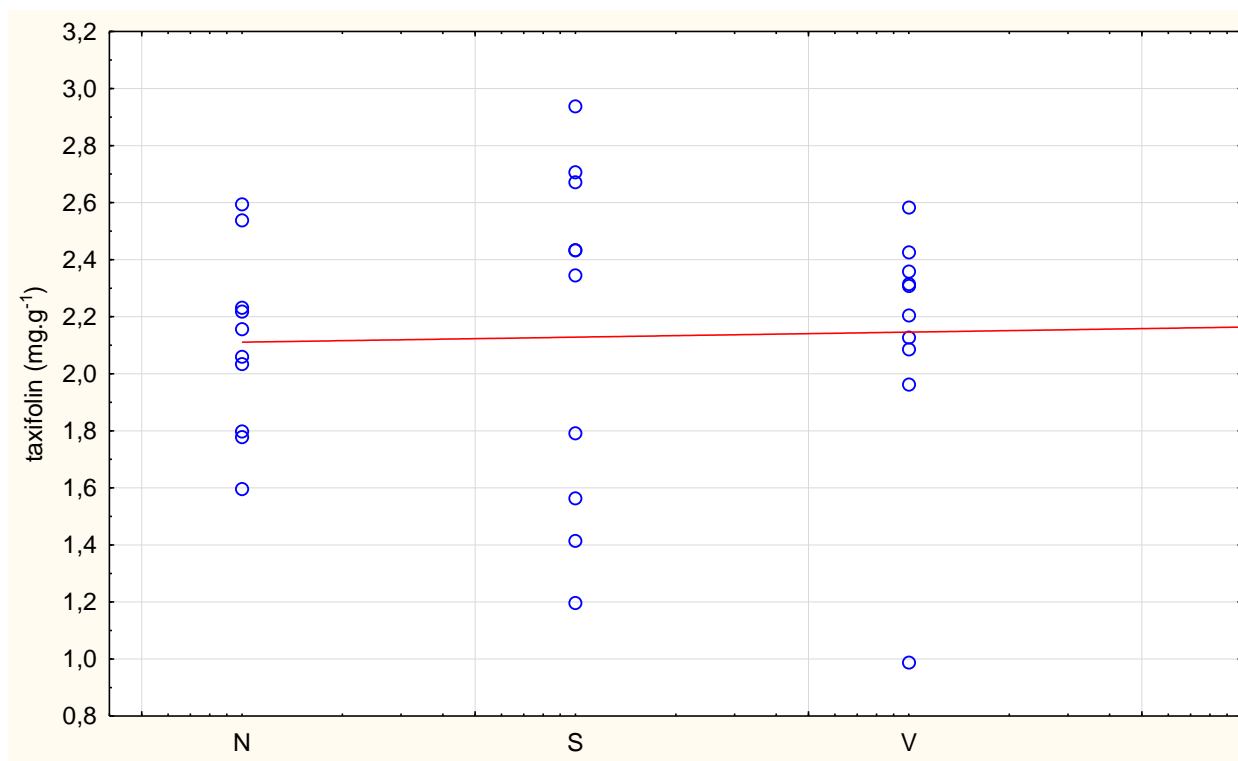


Příloha 2:

Vliv rozdílné koncentrace elicitoru na koncentraci taxifolinu

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci nebyl zjištěn signifikantní trend v obsahu taxifolinu ($y = 2,20 + 0,02 \cdot \log(x)$; $p = 0,99$).

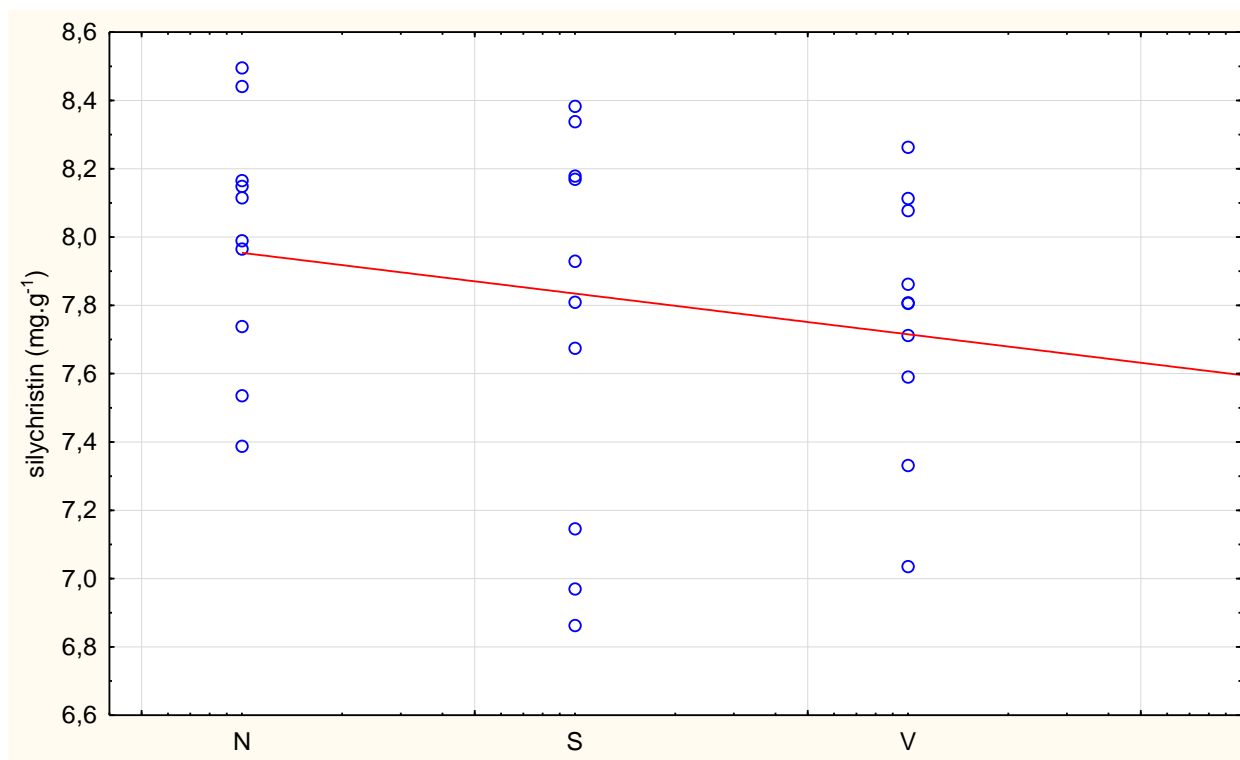
obr. č. 7 - Vliv koncentrace elicitoru na koncentraci taxifolinu



Vliv rozdílné koncentrace elicitoru na koncentraci silychristinu

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci taktéž nebyl zjištěn signifikantní trend v obsahu silychristinu ($y = 7,36 - 0,12 \cdot \log(x)$; $p = 0,25$).

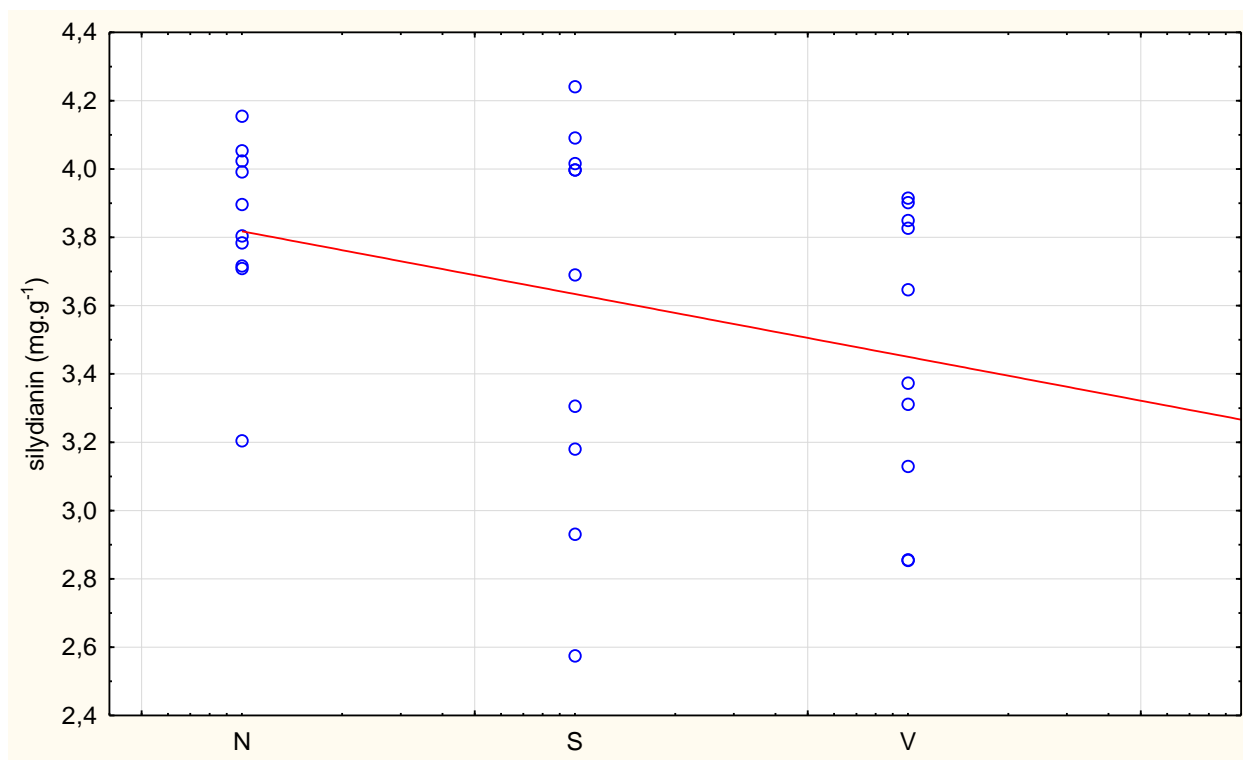
obr. č. 11 – Vliv koncentrace elicitoru na koncentraci silychristinu



Vliv rozdílné koncentrace elicitoru na koncentraci silydianinu

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci taktéž nebyl zjištěn signifikantní trend v obsahu silydianinu ($y = 2,90 - 0,18 \cdot \log(x)$; $p = 0,07$).

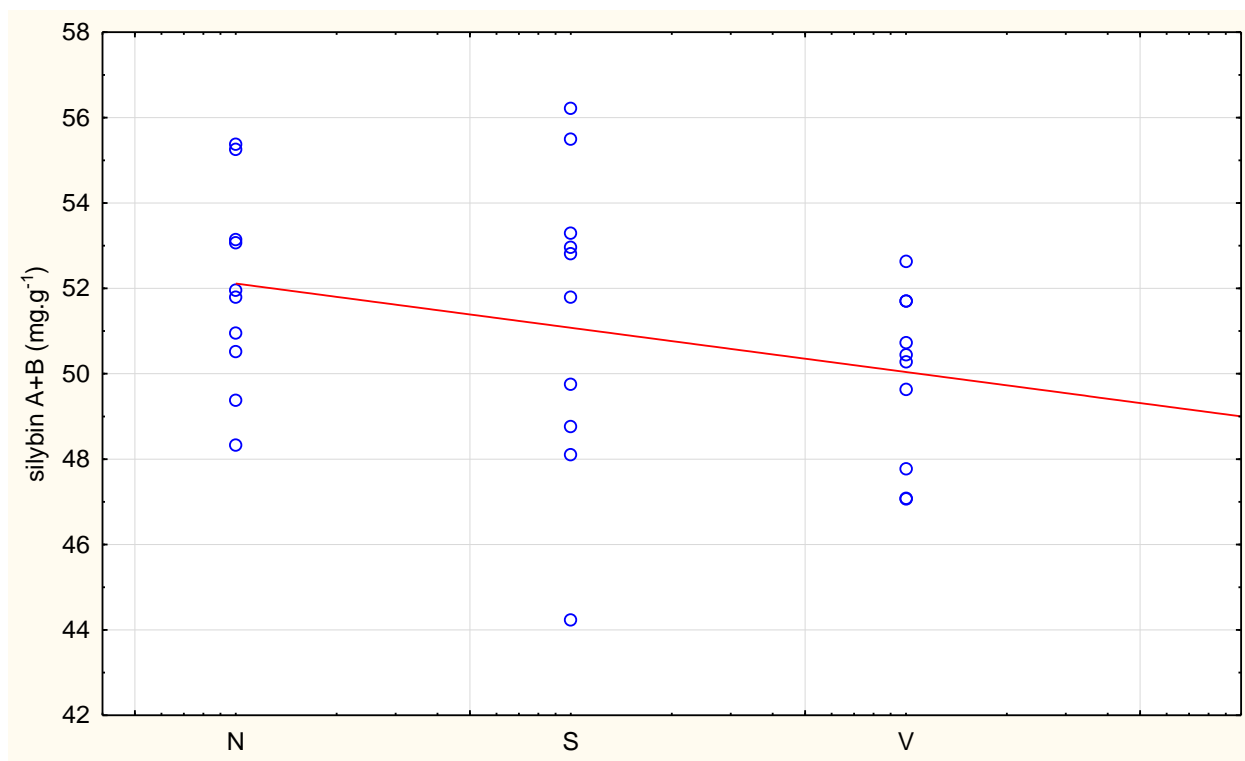
obr. č. 11 - Vliv koncentrace elicitoru na koncentraci silydianinu



Vliv rozdílné koncentrace elicitoru na koncentraci silybinu A+B

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci taktéž nebyl zjištěn signifikantní trend v obsahu silybinu A+B ($y = 46,93 - 1,04 \cdot \log(x)$; $p = 0,1$).

obr. č. 11 - Vliv koncentrace elicitoru na koncentraci silybinu A+B



Vliv rozdílné koncentrace elicitoru na koncentraci isosilybinu A+B

Mezi rostlinami s postřikem ASA o nízké, střední a vysoké koncentraci taktéž nebyl zjištěn signifikantní trend v obsahu isosilybinu A+B ($y = 2,20 - 0,01 * \log(x)$; $p = 0,15$).

obr. č. 11 - Vliv koncentrace elicitoru na koncentraci isosilybinu A+B

