

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Agroekologie

Katedra: Agroekosystémů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan Moudrý, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Návrh technologie pěstování kotvičnicku zemního
(*Tribulus terrestris L.*) a jeho využití

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

Autor diplomové práce:

Bc. Pavel Bartoš

České Budějovice, 2016

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavel BARTOŠ**
Osobní číslo: **Z13428**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Agroekologie**
Název tématu: **Návrh technologie pěstování Kotvičniku zemitého (*Tribulus terrestris* L.) a jeho využití**
Zadávací katedra: **Katedra aplikovaných rostlinných biotechnologií**

Zásady pro vypracování:

Kotvičnik zemitý je jednoletá poléhavá bylina z čeledi kacíbovitých, Zygophyllaceae. Složení *Tribulus terrestris* (TT) je zcela mimořádné. V kořenech je hlavně saponin diosgenin. Nař a listy mají v sušině asi 12,1 % bílkovin, 2,6 % tuku, 40,8 % sacharidů, 27,8 % vlákniny a 16,7 % minerálních látek. Dále je zde asi 2,8 % steroidních saponinů, alkaloidy, třísloviny, flavonoidy, pryskyřice a také 153-160 mg% vitamínu C. V květech nacházíme steriny, stigmasterin, campestrin, beta-sitosterin, steroidy diosgenin, tigogenin, yamogenin, neotigogenin, flavonoidy campherol, rutin, a quercetin a alkaloidy. V plodech a semenech jsou alkaloidy, pryskyřice, 3,5-5 % oleje složeného z 57 % kyseliny linolové a linolenové, 27 % olejové, dále behenové, stearové, palmitové a dalších. Zjištěny byly i taniny, sacharidy, steroly, dále derivát diosgeninu desoxidiosgenin, gracillin, dioscin a terrestrosiny A - E. Cílem práce je návrh technologie pěstování kotvičniku zemitého a jeho využití.

Vypracujte rešerši: a) botanická charakteristika, agrotechnika, hnojení, ochrana před škůdci a proti chorobám; b) chemické složení a účinné látky; c) metody stanovení některých účinných látek v TT; e) farmakologické účinky některých účinných látek; f) současné využití rostliny TT a jejích účinných látek; f) vliv technologie pěstování na obsah účinných látek kotvičniku zemitého. Na základě získaných teoretických a praktických zkušeností s pěstováním TT navrhněte technologii pěstování kotvičniku zemitého a jeho využití.

Ke zpracování diplomové práce využijte skripta Technika zpracování bakalářských a diplomových prací (Kareš J., Vaněček D., Burešová M., 2007) a Práce s VTI (Mílotka J., Nýdl V., 1996). Bakalářskou práci vypracujte dle Opatření děkana č. 13 ze dne 18. 12. 2009.

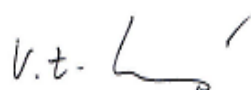
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 50-60 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

Valíček P., Kokoška L., Holubová K. (2001): Léčivé rostliny třetího tisíciletí. Start, 175 s., ISBN: 80-86231-14-3; Janča J., Zentrich J.A. (2008): Herbář léčivých rostlin, 2. Díl. Eminent, 287 s., ISBN: 978-80-7281-368-1; Zentrich J.A. (2001): Speciální metody fototerapie. Eminent, ISBN: 80-7281-056-1; Zentrich J.A. (2004): Rady bylináře Zentricha. Fontána, 291 s., ISBN: 80-7336-186-8; Jablonský I., Bajer J. (2007): Rostliny pro posílení organismu a zdraví. Grada Publishing, ISBN 978-80-247-1745-6; Sikora D. (2007): Biologicky aktivní látky v rostlinách kotvičniku zemního. Bc. práce. TF Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 59 s.; Alberts A., Mullen P. (2002): Psychoaktivní rostliny, houby a živočichové. České vyd. 1. Praha: Svojtka & Co., 2002, ISBN 80-7237-518-0; Kužel S. a kol. (2009): Elicitation of Pharmacologically Active Substances in an Intact Medical Plant under Field-like Conditions. J. Agric. Food Chemistry, 57, (17): 7907-7911; Kužel P., Hrubý M. (2006): "Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin". CZ-296300, ÚPV Praha, 24. 2. 2006; Hamilton E. (17. 2. 2013): Tribulus terrestris: Does it work? [NOOK Book], eBook, 11 KB; Další materiály od vedoucího práce.


Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.
Katedra aplikovaných rostlinných biotechnologií

Datum zadání diplomové práce: 10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2015


prof. Ing. Miloš Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Jan, st. Moudrý, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 26. března 2014

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 (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JČU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 11/1998 Sb. Zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis:

Poděkování:

Tímto si dovoluji poděkovat vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc. za cenné rady, odborné připomínky a všestrannou pomoc při vypracování diplomové práce i celém studiu. Děkuji ing. Martinu Kuchařovi Ph. D. a PharmDr. Petře Mikšátkové z Laboratoře forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha za provedení analýz. Dále děkuji za podporu rodině a přátelům.

Abstrakt

Kotvičník zemní (*Tribulus terrestris* L.) je jednoletá rostlina z čeledi *Zygophyllaceae* (kacibovitě). Pro své léčivé účinky se již dlouho používá v tradiční čínské a indické medicíně k léčbě různých onemocnění. Bylo prokázáno, že účinné látky, mezi které lze zařadit steroidní saponiny, glykosidy, flavonoidy, fytosteroly a alkaloidy vykazují účinky na reprodukci, účinky afrodisiakální, antibakteriální, antikarcinogenní, antioxidantní, diuretické, antidiabetické, kardiovaskulární a mnohé další. Cílem této diplomové práce bylo ověřit vliv elicitorů na obsah vybraných účinných látek v kotvičniku zemním. Elicitem v této práci byla kyselina acetylsalicylová o třech různých koncentracích aplikovaná postřikem. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru byl u plodů a natě stanoven obsah diosgeninu, protodioscinu, ruscogeninu. U všech třech sledovaných látek byl pozorován pozitivní vliv elicitoru na jejich obsah, nicméně je potřeba vždy přihlédnout na koncentraci elicitoru.

Klíčová slova: Kotvičník zemní, *Tribulus terrestris*, steroidní saponiny, elicitory, elicítace, kyselina acetylsalicylová

Abstract

Puncturevine (*Tribulus terrestris* L.) is an annual plant of the *Zygophyllaceae* family. Its medicinal properties have long been used in traditional Chinese and Indian medicine to treat various diseases. It has been shown that active substances, among which we count steroid saponins, glycosides, flavonoids, phytosterols and alkaloids have effects on reproduction, effects aphrodisiac, antibacterial, anti-carcinogenic, antioxidant, diuretic, antidiabetic, cardiovascular, and many other effects. The aim of this work was to verify the effect of elicitors on the content of selected active ingredients in Puncturevine. The elicitor in this work was acetylsalicylic acid of three different concentrations applied by spraying. Using high performance liquid chromatography and mass spectrometry were in fruits and stems determined the content of diosgenin, protodioscin, ruscogenin. For all three compounds was observed positive effect of the elicitor on their content, however, it is always necessary to take into account the concentration of elicitor.

Keywords: Puncturevine, *Tribulus terrestris*, steroid saponins, elicitors, elicitation, acetylsalicylic acid

Obsah

1. ÚVOD	9
2. KOTVIČNÍK ZEMNÍ	11
2.1 POPIS ROSTLINY	11
2.2 PŮVOD A VÝSKYT.....	12
2.3 SLOŽENÍ A ÚČINNÉ LÁTKY.....	13
2.3.1 Saponiny.....	13
2.3.2 Alkaloidy.....	16
2.3.3 Glykosidy	17
2.3.4 Flavonoidy	18
2.3.5 Fytosteroly	19
2.4 FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY	19
2.4.1 Afrodiziakální vlastnosti	20
2.4.2 Účinky na erekci	21
2.4.3 Účinky na reprodukci.....	21
2.4.4 Antibakteriální vlastnosti	23
2.4.5 Antibiotické vlastnosti	24
2.4.6 Kardiovaskulární účinky	25
2.4.7 Urologické vlastnosti	26
2.4.8 Antikarcinogenní vlastnosti	26
2.4.9 Redukce cholesterolu	26
2.4.10 Antidiabetické vlastnosti.....	28
2.4.11 Účinky v přípravcích pro sportovce.....	28
2.4.12 Ochranné účinky	29
2.4.13 Ostatní účinky	30
2.4.14 Vedlejší účinky a kontraindikace.....	31
2.5 PĚSTOVÁNÍ.....	32
2.5.1 Klíčení.....	32
2.5.2 Setí	33
2.5.3 Choroby a škůdci	34
2.5.4 Sklizeň.....	35
2.6 ZÁKLADNÍ FORMY ZPRACOVÁNÍ.....	35

3.	METODY STANOVENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK.....	36
3.1	EXTRAKCE	36
3.2	CHROMATOGRAFIE.....	37
4.	VLIV ELICITORŮ NA OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK.....	38
4.1	BIOTICKÉ A ABIOTICKÉ FAKTORY PŮSOBÍCÍ NA ROSTLINY.....	38
4.2	SEKUNDÁRNÍ METABOLITY ROSTLIN	40
4.3	ELICITACE.....	42
4.3.1	Biotické elicitory	45
4.3.2	Abiotické chemické elicitory	46
4.3.3	Abiotické fyzikální elicitory	46
4.3.4	Fytohormony	47
4.3.5	Příklady využití elicitorů.....	48
4.3.6	Elicitace pomocí kyseliny acetylsalicylové	52
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	59
5.1	MALOPARCELKOVÉ PĚSTOVÁNÍ	59
5.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	62
5.3	ANALÝZA VZORKŮ	62
6.	VÝSLEDKY	63
6.1	VLIV ELICITORU NA OBSAH LÁTEK V PLODU KOTVIČNÍKU.....	63
6.2	VLIV ELICITORU NA OBSAH LÁTEK V NATI KOTVIČNÍKU.....	65
7.	DISKUZE.....	68
8.	ZÁVĚR.....	71
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72
10.	PŘÍLOHY	81
10.1	TABULKY	81
10.2	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	86

1. ÚVOD

Historie využívání léčivých rostlin sahá tisíce let nazpět. Nejstarší zprávy pochází z Číny, Egypta, Indie a Mezopotámie. Ve starém Egyptě byla jistě velká spotřeba na bázi léčivých rostlin určených k balzamování a mumifikování mrtvých ať už lidí či dokonce zvířat. V Indii nalezneme kolébku Ayurvědy, která se zakládá na komplexním léčení a podpoře životních cyklů člověka výhradně na léčivých rostlinách. Ve středověku se poznatky o léčivých rostlinách zaznamenávaly do herbářů. Jedním z všeobecně známých je Herbář neboli bylinář Pietra Andrea Mattioliho vydaný roku 1562.

Flóra střední Evropy zahrnuje desítky rostlin řazených mezi léčivé rostliny. Používá se pro ně řada dalších názvů: léčivé byliny, bylinky, léčivky, zelinky apod. Odborně se tato druhově velmi pestrá a nesourodá skupina rostlin, které se sbírají ve volné přírodě nebo se záměrně pěstují, nazývá: léčivé, aromatické a kořeninové rostliny (LAKR). (MITÁČEK et al. 2010)

V celosvětovém měřítku jsou LAKR využívány ve 20 % k farmacii jako léčivo nebo surovina, 50 % spotřeby zahrnuje potravinářský průmysl na nápoje, lihovarnictví a potraviny. Kosmetický průmysl a farmacie spotřebovává ve světě 25 % LAKR pro dekorativní a léčebnou kosmetiku a zbývajících 5 % připadá na ostatní odvětví (funkce esteticko-ekologická, zdravotně-hygienická, vodohospodářská aj.)

Farmaceutický průmysl v České republice zpracovává cca 240 druhů LAKR. S ohledem na geografické podmínky je možné v ČR pěstovat cca 190 druhů LAKR a výměra pěstovaných ploch se u nás v posledních letech pohybuje v rozmezí 6 až 11 tisíc ha. (NEUGEBAUEROVÁ 2006)

Světová zdravotnická organizace (WHO) definuje léčivé rostliny takto: Léčivé rostliny jsou rostliny, obsahující v některé části látky, které mají terapeutické účinky nebo slouží jako surovina pro farmaceutickou výrobu. Léčivé rostliny se nejčastěji upravují na nálevy, extrakty nebo tinktury a extrahované čisté chemické látky.

Pod pojmem droga WHO rozumí části léčivých rostlin nejčastěji sušené a mechanicky zpracované za účelem zmenšení objemu pro lepší skladovatelnost a dopravu. V obchodní praxi se používají následující názvy drog: Bulbus/cibule, Cortex/kůra, Flos/květy a květenství, Folium/listy, Fructus/plody nebo jejich části,

Herba/nať, Radix/kořen, Rhizoma/oddenek, Semen/semena, Tuber/hlíza (MITÁČEK et al. 2010).

K léčbě v humánní a veterinární medicíně se používají přímo i nepřímo. V čerstvém stavu, přímo, spíše výjimečně například ve formě vylisované šťávy. Častěji se upravuje například sušením pro stabilizování obsahových látek a stává se z ní droga. Nepřímo jsou léčivé rostliny surovinou pro výrobu léčiv, hromadně vyráběných léčivých přípravků, pro izolaci alkaloidů, silic nebo olejů a jsou prekurzory pro syntézu nových léčivých látek.

Množství a složení chemicky a terapeuticky rozdílných látek, které droga obsahuje, záleží na vnitřních a vnějších faktorech. Mezi vnitřní faktory náleží genetická výbava, fáze ontogenetického vývoje apod. Za vnější faktory označujeme především půdní a klimatické podmínky přirozeného výskytu nebo pěstování rostliny, termín sklizně, způsob sušení, doba skladování atd. Některé z těchto faktorů lze ovlivnit také pěstebními postupy. (NEUGEBAUEROVÁ 2006)

Bohužel je možné konstatovat, že většímu rozšíření využití léčivých rostlin brání také silná farmaceutická lobby. Nikoliv z obavy o lidské zdraví, ale kvůli oprávněné obavě o ztrátu části zisků z prodeje léčiv. Jen trvale léčený člověk totiž přináší ekonomický profit. (HEMZAL 2014, MITÁČEK et al. 2006)

Jednou z mnoha léčivých rostlin užívaných v tradiční i současné medicíně je kotvičnick zeminí (*Tribulus terrestris*). Díky řadě velmi aktuálních léčivých účinků se dostává do popředí zájmu vědeckého zkoumání a je jednou z nejdiskutovanějších bylin současnosti. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013)

2. KOTVIČNÍK ZEMNÍ

2.1 Popis rostliny

Kotvičnick zemi latinským názvem *Tribulus terrestris* L. čeleď *Zygophyllaceae* (Kacibovité), anglicky Puncturevine, Land Caltrops, goathead, cat's-head, devil's thorn. V českém jazyce se vyskytuje několik lidových názvů: bylinná viagra, zelená viagra, trojhrotník, zemní hvězdička, zázračný kotvičnick. (JAHODÁŘ 2006; RYSTONOVÁ 2007; PUNCTUREVINE 2010)

Latinské jméno *Tribulus* pravděpodobně vychází řečtiny, odvozeno od slov tři a belos-jehla, hrot. Slovem *tribolos* se označoval plod kotvice plovoucí (*Trapa natans*) neboli vodní kaštan, se svými charakteristickými růžkatými výrůstky a trojbokým tvarem. Toto slovo se však ujalo i pro kotvičnick a obecně se tak nazývala i pichlavá rostlina či bodlák. Zřejmě na základě jisté podobnosti s plody kotvice vznikl i český název pro kotvičnick. Ve středověku pak slovo *tribolos* či *tribulus* označovalo i zbraň známou česky jako nášlapný ježek a v angličtině řečenou *caltrop*, z čeho se odvinul i jeden ze současných anglických názvů. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013)

Obr. 1 Kotvičnick zemi (Foto: Bc. Pavel Bartoš)



Kotvičník zemní je jednoletou poléhavou bylinou od základu větvenou. Listy jsou vstřícné, přitiskle chlupaté, lichozpeřené, velmi krátce řapíkaté, podlouhlé nebo obkopinaté. Listy tvoří 4-9 jařem. Květy jsou žluté, oboupohlavní, jednotlivé, v úžlabí listenů, stopkaté a pětičetné. Plody se skládají z pěti trojbokých více semenných plůdků s ostře špičatými okraji. (JAHODÁŘ 2006; JABLONSKÝ, BAJER 2007). Plod je 0,8–1,5 cm veliký a obsahuje 2-5 semen. V plné zralosti se rozpadá na jednotlivé plůdky. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013). Nejprve je zelený, následně šedohnědý, zralý pak hnědý a velmi tvrdý. (HEMZAL 2014)

Jedna rostlina je schopna vyprodukovat 200-500 plodů. Při hlubším uložení v půdě mohou semena setrvat ve stavu dormance po dobu 3-6 let. Rostlina dorůstá délky až 2 m, lodyha se bohatě větví do délky 20-60 cm. (PUNCTUREVINE 2014) Kvete průběžně od června do srpna a plody zrají od července do září. (HEMZAL 2014)

2.2 Původ a výskyt

Za původní oblast výskytu kotvičníku zemního je pravděpodobně možné označit Čínu, Japonsko, Indii, Indonésii, Středozeší a Blízky východ. V současnosti lze nalézt na řadě míst po celém světě. Kromě původních oblastí se hojně vyskytuje v Severní a Jižní Americe, kam byl nejspíše zavlečen s dobyt看em exportovaným ze Středozeší, v jižní a východní Africe, v Austrálii. V Evropě pak roste nejčastěji v Bulharsku, Řecku, Rumunsku, Maďarsku, nalezneme jej také například v severní Francii nebo na jižním Slovensku. V České republice se objevuje spíše vzácně na rekultivovaných výsypkách a nádražích. (PACANOSKI et al. 2014; JABLONSKÝ, BAJER 2007)

Terapeutické využití kotvičníku je staré přibližně 5000 let. Používán byl v tradiční čínské medicíně pod jmény Ci Ji Li, Bai Li Ji nebo Ji Li. V ájurvédské medicíně pod jménem Gokshura a také ve starém Řecku. (HEMZAL 2014; PACANOSKI et al. 2014)

Kotvičník je dobře přizpůsobený pro růst v mírném, středozešním, sub tropickém, tropickém a teplém mírném klimatu. Vyžaduje poměrně vysoké teploty pro růst a je převládající v oblastech s teplými léty a je nesnášenlivý vůči teplotám pod bodem mrazu. Lze ho nalézt v širokém rozsahu podmínek. Daří se mu na suchých, písčítých půdách, prosperuje v blízkosti písčítých dun, na naváté volné půdě podél ulic, silnic, železnic, na rumíštích i na okrajích polí. Roste však také v těžších půdách, a to zejména v případě, že jsou bohaté na živiny a vlhké. Současně na zhutněných

půdách jako jsou okraje cest nebo hřišť. Kotvičnick je místy považován za agresivní druh, který má potenciál zranit zvířata, snížit kvalitu sena a hodnotu vlny. Snižuje biodiverzitu svou schopností rychle napadnout a vytěsnit původní druhy. Vzhledem ke své schopnosti získat vláhu z velké hloubky v půdě, konkuruje dobře v mnoha plodinách. Tato rostlina je částečně problematická, neboť má plevelný potenciál. Byla prohlášena za plevel v nejméně 37 zemích světa a alespoň 21 plodinách jako bavlna, kukuřice, ve vinicích a sadech. Kromě svého invazivního a plevelného potenciálu je kotvičnick zemní považován za velmi užitečnou bylinu. Jedná se o bylinný lék, který se používá pro různé účely v lidovém léčitelství. (PACANOSKI et al. 2014)

2.3 Složení a účinné látky

Pro léčebné účely se z kotvičnicku zemního využívá celá rostlina. Účinné látky jsou obsaženy ve stoncích, listech, květech, plodech i kořenech. Druh a množství obsahových látek je závislé na konkrétní části rostliny. Stejně tak je závislé na oblasti pěstování, podmínkách růstu, způsobu sklizně, zpracování a skladování. (HEMZAL 2014; HAN et al. 2008)

Rostlina obsahuje řadu biologicky aktivních látek. Nejdůležitější z nich jsou steroidní saponiny furostanolového, v menším množství i spirostanolového typu, dále flavonoidy, alkaloidy, glykosidy, fytosteroly, deriváty kyseliny skořicové (terrestriamid), lignany, mastné kyseliny (kyselina palmitová, stearová, olejová, linoleová), aminokyseliny a sacharidy. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013)

Listy a nať obsahují cca 12,1 % bílkovin, 2,6 % tuku, 40,8 % sacharidů, 27,8 % vlákniny a 16,7 % minerálních látek v sušině. Rostlina obsahuje také třísloviny, pryskyřice a taniny. (VALÍČEK et al. 2012)

Ze suchých plodů byly pomocí spektrální analýzy izolovány také estery mastných kyselin, kyselina ferulová, vanilin, β -sitosterol, hydroxybenzoové kyseliny. (WU 1999)

2.3.1 Saponiny

Saponiny obsahují jako sacharidickou složku různé monosacharidy nebo glukuronovou kyselinu. Nesacharidická složka je označována jako sapogenin nebo sapogenol a je dvojího typu. Steroidní s 27 atomy uhlíku nebo častěji triterpenoidní s 30 atomy uhlíku utvářející skelet s pěti cykly. (KALÁČ 2001)

Saponiny jsou různorodou skupinou heteroglykosidů, které se vyskytují převážně v rostlinách. Vykazují některé společné vlastnosti, např. hořká chuť, detergenční účinky, hemolytické účinky, reagují se žlučovými kyselinami, cholesterolem. Koncentráty saponinů se používají jako pěnotvorné látky, emulgátory, antioxidanty. Objevují se běžně i v kosmetických výrobcích. Za příznivé účinky saponinů lze označit účinky fungicidní, antioxidační, antikarcinogenní. Dále mají také pozitivní vliv na snížení hladiny cholesterolu v krevní plasmě, stravitelnost bílkovin, resorpci minerálních látek a vitamínů v zažívacím systému, preventivně působí na kardiovaskulární onemocnění. Vybrané saponiny jsou toxické. Toxický účinek spočívá v hemolýze erytrocytů a jiných buněk. Zásadní příčinou je interakce saponinů s cholesterolem v buněčných stěnách. Poškození jater a selhání dýchání může nastat při požití vysokých dávek toxických saponinů. Množství saponinů je pak závislé na druhu rostliny a klimatických podmínkách.

Saponiny obsahující v molekule jako aglykony steroidy nazýváme steroidní saponiny. Skládají se z aglykonů založených na strukturách C₂₇ spirostonalu nebo furostonalu vzniklých modifikací postranního řetězce cholesterolu. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Současně jsou saponiny považovány za bioaktivní sloučeniny, které rostlina produkuje proti patogenům a býložravcům. (AUGUSTIN et al. 2011)

Skupina steroidních saponinů je méně rozšířena než saponiny triterpenoidní. Vyskytuje se zejména u jednoděložných rostlin, z dvouděložných například u rodu náprstník a lilek. Nejvýznamnějším steroidním saponinem je diosgenin, který se získává především z kořenů smldince. Představuje důležitou látku pro syntézu podobných steroidních alkaloidů. Další saponiny tohoto typu digitonin a gitogenin obsahuje náprstník a agáve, tigogenin obsahují agáve, juka a lilek. (NOVÁČEK 2009)

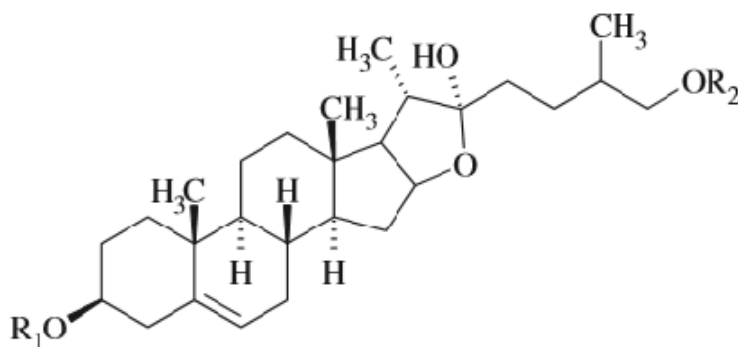
Typicky se dále nacházejí v jednoděložných rostlinách z čeledi česnekovitých, chřestovitých a lipnicovitých, z dvouděložných v rostlinách z čeledi bobovitých. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

V kotvičniku jsou ze saponinů zastoupeny diosgenin, gitogenin, neogitogenin, tigogenin, chlorogenin, ruscogenin, protodioscin, hecogenin, neohecogenin, tribulosin, tribestin, prototribestin, terrestriamid, sarsapogenin a furostanol glykosid C. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013)

Účinnými látkami z extraktů kotvičnicku jsou dále steroidní saponiny: Terrestrinins A a B, Terrestrosins A, B, C, D, E, Tribulosaponin B, lignanamidy Tribulusamides A a B, Tribulosaponin B, flavonoidy rutin. V bulharských rostlinných extraktech se vyskytují komponenty dioscin, metylprotodioscin. (IVANOVA 2014)

Dominantní složkou kotvičnicku je považován protodioscin. Rozdílný je obsah saponinů podle země původu. Saponiny typu gitogenin nejsou přítomny v kotvičnicku indického a bulharského původu, zatímco saponiny typu tigogeninu, gitogenin a hecogenin převládají v kotvičnicku z Číny. Síranový spirostanol a furostanolové saponiny byly izolovány pouze z kotvičnicku bulharského původu. (DINCHEV et al. 2008)

Obr. 2 Protodioscin (GAUTHAMAN, GANESAN 2008)



Rozdílné obsahy saponinů furostanolového typu jmenovitě protodioscinu, prototribestinu a pseudoprotodioscinu byly rovněž zaznamenány v rostlinách z různých oblastí Maďarska, Bulharska, Španělska a Turecka (DINCHEV et al. 2010)

Jednotlivé části rostliny se také liší obsahem saponinů. Nejvíce saponinů obsahují semena, následují listy a kořen, nejméně pak stonky. (MATHUR, SUNDARAMOORTHY 2013)

Nové saponiny 5,6 dihydroprotodioscin, neoprotodioscin a jejich sulfáty byly detekovány v roce 2003. (DE COMBARIEU et al. 2003)

2.3.2 Alkaloidy

Alkaloidy jsou dusíkaté bazické látky, které vznikají metabolickou přeměnou aminokyselin, případně jiných prekurzorů především v rostlinách. (HRDINA et al. 2004)

Nejčastěji se vyskytují ve směsi látek příbuzné struktury, jako volné látky, N-oxidy, soli karboxylových kyselin, jejich amidy nebo estery, případně jako glykosidy.

Nacházejí se v různých částech cévnatých rostlin, ale také u určitých druhů mechů, hub, bakterií i některých bezobratlých živočichů a obratlovců. Hrají důležitou roli v ochraně rostlin před elicitory, patogeny a v evoluci rostlinných druhů. Některé jsou považovány za produkty detoxikace, rezervní formy dusíku, regulátory růstu, přírodní toxické aminokyseliny, biogenní aminy nebo přírodní barviva. Řada z nich vzniká také při termickém zpracování potravin ze základních živin. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Velmi často se jedná o komplikované chemické sloučeniny s charakteristickým účinkem na lidský organismus. Téměř všechny spojuje působení na centrální nervový systém a zpravidla jsou až toxické. (MITÁČEK et al. 2010)

Alkaloidy lze rozdělit do 3 základních skupin: pravé alkaloidy, pseudoalkaloidy a protoalkaloidy. Pravé alkaloidy bývají heterocyklické dusíkaté báze odvozené od aminokyselin. Jejich spektrum fyziologických účinků je velmi široké a jsou často velmi toxické pro člověka nebo živočichy (např. nikotin). Pseudoalkaloidy jsou rovněž heterocyklické dusíkaté báze, ale jejich prekurzory jsou terpenoidy nebo puriny. Toxicita je nižší než u pravých alkaloidů, příkladem může být kofein. Bazické aminy odvozené od aminokyselin, kde dusík není součástí aromatického systému, nazýváme protoalkaloidy. Je jím například kapsaicin vyskytující se v pálivých paprikách.

Běžně se uplatňuje také klasifikace jednotlivých skupin alkaloidů podle heterocyklických sloučenin, ze kterých jsou odvozeny jejich základní skelety. Dále se mohou alkaloidy dělit dle původu. Například mezi tabákové alkaloidy se řadí nikotin. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Kotvičnický zemin je zdrojem tří β -karbolinových derivátů: harman, harmalin, harmin. Vyjmenované alkaloidy jsou silnými inhibitory MAO (monoaminoxidázy). Využívají se jako antidepresiva, nicméně může nastat i stav intoxikace v dávkách nad

1 mg/kg tělesné váhy s příznaky typu nauzea, zvracení, bledost kůže, třes, agresivita, v dalším průběhu i polospánek s halucinacemi. (HRDINA et al. 2004)

Dalšími zastoupenými alkaloidy β -karbolinového typu jsou norharman, harmol, tribulusterin, perlolyrin. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013)

2.3.3 Glykosidy

Glykosidy jsou deriváty cyklických forem monosacharidů, případně oligosacharidů. V nich je vodík poloacetalového hydroxyly nahrazen substituentem různého charakteru. V rostlinách jsou hojně rozšířeny. Některé mají hořkou chuť a slouží tak jako součást ochrany proti konzumentům. Jiné se vyznačují výraznou vůní, a proto se používají do koření nebo ochucovadel. Řada z glykosidů má léčivé účinky. (KALÁČ 2001)

Vybrané glykosidy mají bakteriocidní a mykocidní účinky nebo charakter barviv. Mohou být i velmi jedovaté. Ve fyziologických dávkách však na lidský organismus působí příznivě.

Hydrolýzou glykosidů vzniká glycid a aglykon. Ten je tvořen různými alifatickými i aromatickými látkami. Podle nich se glykosidy dělí do několika skupin. Nejdůležitější jsou: alkoholické, fenolické, kumarinové, steroidní, kyanové, antrachinové, flavonové a fenanthrenové. Vyjmenované glykosidy náleží do skupiny O-glykosidů, kdy alkoholová složka reaguje s cukrem prostřednictvím OH-skupiny. Fyziologicky důležitou skupinou jsou N-glykosidy, ke kterým patří nukleosidy, kdy s pomocí NH-skupiny reaguje alkoholová složka s cukrem. (NOVÁČEK 2009)

Přírozenou složkou v potravinách jsou také S-glykosidy neboli thioglykosidy. Mezi významné zástupce rostlin s obsahem thioglykosidů náleží čeleď brukvovitých, která zahrnuje hospodářsky významné plodiny řazené mezi olejniny, zeleniny nebo pochutiny. Thioglykosidy jsou mimo jiné zodpovědné za typickou štiplavou chuť semen řepky, aroma hořčice a křenu, ředkve a podobných druhů. V krmivech pro hospodářská zvířata jsou řazené mezi antinutriční faktory. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Kyanogenní glykosidy obsahují kyanohydrinovou sloučeninu. Hydrolýzou a enzymatickým štěpením vzniká kyanovodík, který je prudce jedovatý. (NOVÁČEK 2009) Mezi zástupce kyanogenních glykosidů řadíme například linamarin obsažený

v manioku jedlém nebo v semenech lnu setého. V našich podmínkách pak je nejvýznamnější amygdalin společně s prunasinem a sambunigrinem, neboť jsou přítomny v rostlinách čeledi růžovitých. Známymi zdroji jsou hořké mandle nebo pecky meruněk, broskví, švestek a třešní. Obsaženy jsou ve všech částech bezu černého. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Ke glykosidům řadíme také tzv. C-glykosidy. Zástupcem těchto glykosidů jsou některá přírodní barviva. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

V kotvičniku byly objeveny a izolovány nové furostanolové glykosidy v roce 2003. (CONRAD 2004). V roce 2010 vychází zpráva o objevu dalších 5 furostanolových glykosidů. (XU 2010). Další dva nově pojmenované terrestrinones A1/A2 byly pozitivně hodnoceny na indukovanou produkci oxidu dusnatého. (HONG 2013)

2.3.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou velmi rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů obsahující v molekule dva benzenové kruhy spojené tří uhlíkovým řetězcem. Jejich současně známý počet se odhaduje na 5000 a stále jsou nacházeny nové sloučeniny. Jsou uváděny jako samostatná skupina rostlinných barviv. Základní struktury flavonoidů se dělí dle stupně oxidace C_3 a jeho substituce na: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny. Přičemž v tomto uvedeném pořadí roste oxidační stupeň sloučenin a současně intenzita jejich barvy. Dále z flavonoidů rozeznáváme chalkony, dihydrochalkony a aurony.

Nejvýznamnější flavonoidní barviva jsou žluté flavony a flavonoly a zejména anthokyaniny poskytující žluté, oranžové, fialové a modré pigmenty. Chalkony i dihydrochalkony jsou barviva žlutá, aurony barviva zlatožlutá.

Některé flavonoidy jsou významné i pro svoji chuť (trpké a hořké látky nebo jejich prekurzory), případně mají významné biologické účinky. Jedním z nejbohatších zdrojů flavonoidů je např. zelený čaj. Rozhodující pro antioxidační aktivitu flavonoidů je počet hydroxylových skupin v molekule a jejich poloha. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Uvádí se také, že flavonoidy mají protizánětlivý účinek a zlepšují celkový fyziologický stav zvířat. (CHRISTEV et al. 2011)

Z flavonoidů a glykosidů jsou v kotvičniku zastoupeny kaempferol, kaempferol-3-glukosid, kaempferol-3-rutinosid, kaempferol-3-gentiobiosid, kaempferol-3-p-kumaroylglukosid, tribulosid, isorhamnetin-3-glukosid, isorhamnetin-3-gentiobiosid, isorhamnetin-3-gentiobiosid-7-glukosid, isorhamnetin-3-rutinosid, isorhamnetin-3,7-diglukosid, isorhamnetin-3-p-kumaroylglukosid, kvercetin-3-glukosid, kvercetin-3-gentiobiosid-7-glukosid, kvercetin-3-gentiotriosid, isorhamnetin-3-rutinosid a isorhamnetin-3,7-diglukosid. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013)

2.3.5 Fytosteroly

Steroly se dělí dle výskytu v přírodě na následující kategorie: živočišné steroly (zoosteroly), rostlinné steroly (fytoosteroly) a steroly hub (mykosteroly). Základním C₂₇ sterolem je považován cholesterol.

Steroly jsou v organismech nezbytnou složkou lipoproteinů a tukových membrán. U živočichů jsou zvláště důležité v nervových tkáních nebo při transportu lipidů. Tělo člověka si většinu potřebného cholesterolu dokáže syntetizovat. Při nadměrném příjmu cholesterolu mohou však nastat zdravotní komplikace. Prokázalo se, že fytoosteroly mají jistý vliv na biosyntézu cholesterolu a pro snížení množství cholesterolu v krevní plasmě se doporučuje přijmout s potravou asi 250 mg fytoosterolů. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Z fytoosterolů jsou nejběžnější sitosterol, stigmasterol a kampesterol. Poměr obsažených fytoosterolů je charakteristický pro každou rostlinu a lze tak například využít při identifikaci původu potravinářských olejů. (KALAČ 2001)

V kotvičniku zemním jsou z fytoosterolů zastoupeny β-sitosterol, stigmasterol a kampesterol. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013)

Fytoosterol β-sitosterol-D-glukosid společně s tribulosinem, což je spirostanolový typ steroidních saponinů byl izolován z vodného výluhu. V roce 2002 je uváděna první zpráva o jejich protihlístové aktivitě. (DEEPAK et al. 2002)

2.4 Farmakologické účinky

Na naší planetě roste odhadem více než 700 000 druhů rostlin, z toho lidé hospodářsky dovedou využít asi 17 000 druhů rostlin, asi 5000 se pak pěstuje uměle. Léčivých rostlin je na celém světě více než 100 000. V České republice roste přibližně

4000 rostlin, které mají potenciál využití ve fytoterapii. Používá se jich jen asi 400, z toho nejběžnějších je okolo 100. (RYSTONOVÁ 2007)

Fytoterapie je definována jako použití rostlin nebo rostlinných výtažků, které nejsou obvykle součástí léčebných prostředků. Odkazuje se na tradiční lidové léčitelství a bylinkářství. Bylinné přípravky jsou pravidelně uváděny na trh jako standardizované produkty jedné nebo více rostlin, části rostlin v surovém nebo zpracovaném stavu. Někdy jsou zahrnuty také plísňové, včelí produkty a minerální látky. Tyto přípravky se obvykle připravují pomocí macerace, perkolace nebo destilace a následně jsou podávány ve velmi koncentrované formě, aby byl zajištěn jejich terapeutický účinek. Fytoterapie nebo bylinné léky vždy hrály důležitou roli v tradiční medicíně a v současné době její význam opět roste. Rostliny stále významně přispívají k primární zdravotní péči. Podle Světové zdravotnické organizace brání chudoba přístupu k moderní medicíně a asi 65-80 % ze světové populace žijící v rozvojových zemích v Africe, Asii a Latinské Americe je v podstatě závislá na používání tradiční medicíny založené na rostlinách. Mnoho pacientů také preferuje bylinné přípravky, protože mají dobrou snášenlivost. Nicméně i bylinné léky nejsou vždy bezpečné a bez vedlejších účinků, neboť mohou obsahovat složky, které jsou velmi toxické. (HORÁK 2014)

2.4.1 Afrodiziakální vlastnosti

Kotvičnický zemní je již dlouho používán v tradiční čínské a indické medicíně jako prostředek pro zlepšení sexuální funkce u člověka. Sexuální chování a intrakavernózní tlak (ICP) byly studovány u normálních i kastrovaných krys za účelem prozkoumání účinku protodioscinu jako afrodiziaka. 40 dospělých kastrovaných i nekastrovaných krys bylo rozděleno do pěti skupin po 8, kterým byla podávána destilovaná voda (nekastrovaným a kastrovaným), testosteron (nekastrovaným a kastrovaným) v dávce 10 mg/kg tělesné hmotnosti a extrakt z kotvičnicku kastrovaným jedincům v množství 5 mg/kg tělesné hmotnosti jednou za dva týdny po dobu 8 týdnů. U kastrovaných jedinců bylo pozorováno snížení tělesné hmotnosti, hmotnosti prostaty a ICP. Došlo také k celkovému snížení ve všech sledovaných parametrech sexuálního chování. Naproti tomu u kastrovaných krys, kterým byl podáván testosteron nebo extrakt z kotvičnicku došlo ke zvýšení hmotnosti prostaty, zvýšení ICP a sexuálních parametrů chování. (GAUTHAMAN et al. 2002)

Afrodiziakální účinky byly prověřeny v řadě experimentů u zvířat, proto se jeden výzkum zaměřil na posouzení účinnosti u žen v porovnání s placebo efektem. K výzkumu byly vybrány ženy, které spontánně uváděly ztrátu libida. Na začátku i na konci vyplnily dotazník FSFI (Female Sexual Function Index) čítající 19 otázek z oblasti intimního života. Sledování probíhalo po dobu 4 týdnů, kdy jedné části žen byl podáván extrakt z kotvičnicku v dávce 7,5 mg na kg živé váhy a druhé preparát bez účinku. Závěrečné vyhodnocení FSFI prokázalo významné zlepšení v oblasti touhy, vzrušení a podobných sexuálních ukazatelích. (AKHTARI et al. 2014)

2.4.2 Účinky na erekci

Erektální dysfunkce (ED) je jednou z nejčastějších mužských sexuálních poruch a její výskyt se zvyšuje s věkem. Jedna studie uváděla, že přibližně 40 % mužů starších 40 let a až cca 67 % ve věku nad 70 let trpí ED. (KAM et al. 2012)

Hormonální vliv kotvičnicku a jeho role v řízení mužské erektilní dysfunkce byli vyhodnoceny u primátů, králíků a potkanů. Extrakt z kotvičnicku byl podáván v dávce 7,5; 15 a 30 mg/kg u primátů. Králíkům bylo podáno 2,5; 5 a 10 mg/kg extraktu po dobu 8 týdnů. Vzorky krve byly analyzovány na testosteron (T), dihydrotestosteron (DHT) a hladinu dehydroepiandrosteron-sulfátu (DHEAS) pomocí radioimunoanalýzy. U primátů bylo statisticky významné navýšení T (52%), DHT (31%) a DHEAS (29%) při dávce extraktu 7,5 mg/kg. U králíků, jak T a DHT byly zvýšeny ve srovnání s kontrolou, nicméně pouze zvýšení DHT (o 30% a 32% při 5 a 10 mg/kg), bylo statisticky průkazné. Z těchto výsledků vyplývá, že kotvičnick zvyšuje obsah některých pohlavních hormonů v krvi, pravděpodobně v důsledku přítomnosti protodioscinu v extraktu a může být užitečný pro mírné až středně těžké případy erektilní dysfunkce. (GAUTHAMAN, GANESAN 2008)

Objektivně je však nutné uvést i studii, která srovnávala účinek extraktu na ED v porovnání s placebo efektem u vybrané skupiny 30 mužů starších 40 let stěžující si na problémy s erekcí. Ke zlepšení stavu sice skutečně došlo, ale toto zlepšení bylo připisováno právě tzv. placebo efektu. (SANTOS et al. 2014)

2.4.3 Účinky na reprodukci

Mezi účinky na reprodukci lze zařadit ochranný účinek extraktu z kotvičnicku na indukované změny spermatogeneze (tvorba mužských pohlavních buněk-spermií),

počtu spermií a oxidační stres vlivem Metronidazolu (MTZ). Pokus byl proveden na 30 dospělých myších rozdělených do 6 skupin po dobu 28 dnů.

Skupina 1 a 2 sloužila jako kontrolní neošetřená a ošetřená vehikulem, skupině 3 byl podáván MTZ (500 mg/kg tělesné hmotnosti/den), skupině 4: extrakt z kotvičnicku (200 mg/kg tělesné hmotnosti/den), skupině 5: MTZ (500 mg/kg tělesné hmotnosti/den) + kotvičnick (100 mg/kg tělesné hmotnosti/den), skupině 6: MTZ (500 mg/kg tělesné hmotnosti/den) + kotvičnick (200 mg/kg tělesné hmotnosti/den). 24 hodin po posledním ošetření byla všechna zvířata usmrcena pro studium histologických změn ve varlatech a počtu spermií v nadvarlatech.

Metronidazol způsobil výrazné změny v hmotnosti varlat, spermatogeneze, aktivity antioxidantních enzymů, laktátdehydrogenázy, alkalické fosfatázy a počtu spermií. Tyto změny byly částečně obnoveny po současném podání 500 mg/kg tělesné hmotnosti/den MTZ a 100 mg/kg tělesné hmotnosti/den kotvičnicku. Pokud však byl myším podán společně s MTZ kotvičnick 200 mg/kg tělesné hmotnosti/den, změny se vrátili zpět úplně. Je tedy možné konstatovat, že extrakt z kotvičnicku zmírňuje MTZ-indukované změny ve varlatech. (KUMARI, SINGH 2015)

Zajímavým příkladem využití kotvičnicku je jeho stimulační účinek na vejcorodou činnost včel. Všechny hlavní procesy ve včelstvu jsou úzce spojeny s nektarodárnou vegetací v dané oblasti. Vejcorodá činnost včelích královen je přímo závislá na toku nektaru a pylu ve včelstvu. Když se přísun zvedne, vede to ke zvýšení vejcorodé činnosti královen a tím se zvyšuje výkon kolonie. Stimulace krmení cukrovým sirupem v nepřítomnosti přísunu pylu má malý vliv na kladení vajíček královen. Proto byl v Bulharsku v průběhu roku 2009 proveden pokus s cílem ověřit účinky komerčně prodáváného přípravku Startovit určeného ke stimulaci a urychlení rozvoje včelstev v porovnání s extraktem z kotvičnicku přidaného do cukrového sirupu. Včelstva byla rozdělena do tří skupin, přičemž první (kontrolní) skupině byl podáván cukerný sirup, druhé skupině cukerný sirup s přídavkem extraktu z kotvičnicku v množství 10 mg na 1 kg včel a třetí skupině cukerný roztok s přídavkem přípravku Startovit v množství 1g na 2 l. Výsledkem pokusu bylo zjištění, že oproti kontrolní skupině dochází u obou přídavků ke zvýšení vejcorodé aktivity včelích královen. Konkrétně v průměru o zvýšení 38,61 % u přídavku kotvičnicku a 23,45 % u přídavku Startovitu. (HRISTAKOV 2012)

2.4.4 Antibakteriální vlastnosti

Odborná literatura nabízí několik příkladů použití extraktů kotvičníku obsahující saponiny pro přípravu antibakteriálních prostředků. Jsou popsány metody pro přípravu dermatologických krémů používající právě tyto extrakty s antibakteriální, protizánětlivou, protivirovou aktivitou pro místní použití na kůži a tkáň. Některé z těchto dokumentů odkazují na využití zahrnující lokální podávání proti svědění, čímž se zvyšuje propustnost a zlepšuje citlivost kůže.

Nicméně problémy vznikají při výběru materiálu, který má být použit. Extrakty různého původu se mohou výrazně lišit zejména s ohledem na obsah účinných látek. Jedna z odborných prací použila extrakt z kotvičníku ze tří komerčně dostupných výrobků na italském trhu s deklarovaným minimálním obsahem saponinů 40 % a porovnávala jejich biologický účinek jako biocid.

Měření obsahu saponinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) potvrdilo rozdílný obsah saponinů. Dále byla testována účinnost extraktu jako přísada přípravku pro intimní hygienu k zesílení účinků proti kvasinkám. S ohledem na různý obsah saponinů bylo dosaženo různých výsledků v porovnání s přípravkem na bázi Triclosanu, což je silné protibakteriální a protihoubové činidlo, přidávané například do mýdel (0,15 - 0,30 %), deodorantů, past na zuby, holicích krémů, ústních vod a čisticích prostředků.

V současné době však existují rostoucí obavy o jeho šíření ve vodním prostředí. Bezpečnost Triclosanu pro člověka je také v posledních letech zpochybňována a používání tohoto přípravku bude pravděpodobně v blízké budoucnosti sníženo. Na základě těchto informací je vhodné uvažovat o výrobě nových a bezpečnějších nejlépe přírodních produktech. Tato problematika je podstatná například pro osoby trpící cukrovkou, kdy vzhledem k jejich špatné glykemické kontrole kvasinky snadněji kolonizují vagínu a konečník. Zde se proto nabízí možnost využití extraktů z kotvičníku, jejichž pozitivní účinek na potenciálně patogenní kožní flóru byl prokázán. (DI SANSEBASTIANO et al. 2013)

Antimikrobiální aktivita organických a vodných výtažků z plodů, listů a kořenů kotvičníku zemního, používaného v iráckém lidovém léčitelství, byla zkoumána u 11 druhů patogenních a nepatogenních mikroorganismů: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Próteus*

vulgaris, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*. Všechny výtažky z různých částí rostliny vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti většině testovaných mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že byla tato aktivita prokázána u nejrozšířenějších gramnegativních bakterií způsobující infekce močových cest, je možné kotvičnick využít k jejich léčbě. (AL-BAYATI, AL-MOLA 2008)

2.4.5 Antibiotické vlastnosti

Antibiotika jsou používány po celém světě v subterapeutických dávkách v drůbežářském průmyslu, aby podporovala růst a zabránila patogenům drůbeže. Antibiotické růstové stimulatory zvyšují rychlost růstu v důsledku zlepšení zdraví střev, což vede k lepšímu využití živin a poměru konverze potravy. Avšak kontinuální subterapeutické použití antibiotik v krmivu má za následek vývoj bakterií odolných vůči antibiotikům, zbytkům léků v těle ptáků, a nerovnováhy normální mikroflóry. V důsledku toho se probiotikům a prebiotikům rostlinného původu dostává zvýšené pozornosti jako možné náhrady antibiotických stimulatorů růstu. Vzhledem k uvedeným skutečnostem byla provedena studie s cílem vyhodnotit dopad kotvičnicku zemního na růstové výkonnosti, parametry těla a imunitní odpovědi u brojlerových kuřat. Jednodenní kuřata brojlerů Ross 308 byla náhodně rozdělena do čtyř skupin po 12. Jedna skupina byla kontrolní, následně druhé bylo podáváno 4,5 mg flavofosfolipol/kg (antibiotikum), třetí a čtvrtá dostávala 1 g a 5 g kotvičnicku na 1 kg krmné dávky. Pokus neměl žádný výrazný vliv na spotřebu krmiva. Doplnění 1 g kotvičnicku do krmiva výrazně zvýšilo tělesnou hmotnost ve stáří 14 dnů. Účinek experimentální stravy na imunitní reakce je uveden v následující tabulce a potvrzuje zlepšení imunitní reakce kuřat. (YAZDI et al. 2014)

Tabulka 1 Účinky kotvičnicku zemního a antibiotik proti Viru Newcastleké nemoci, chřipkovému viru a protilátek SRBC. (YAZDI et al. 2014)

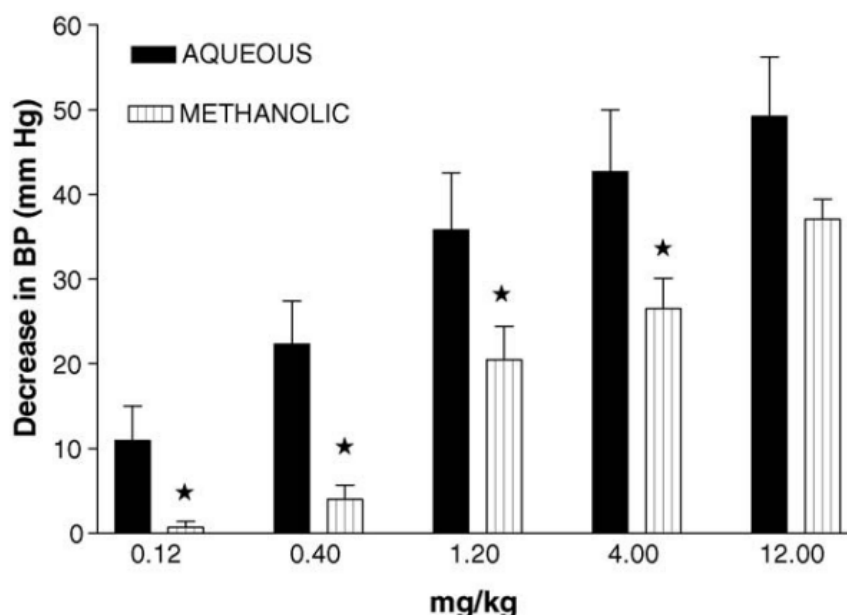
Dietary treatments	New castle (log ₂)	Influenza (log ₂)	SRBC (log ₂)
Control	5.57 ^a	3.37 ^a	6.71 ^a
Antibiotic	6.37 ^{abc}	4.25 ^{ab}	7.25 ^{ab}
TT (1 g/kg)	6.00 ^{ab}	6.62 ^d	8.28 ^{bc}
TT (5 g/kg)	7.42 ^c	6.00 ^{cd}	7.14 ^{ab}
SEM	0.41	0.17	0.57

2.4.6 Kardiovaskulární účinky

V tradiční čínské medicíně se plody kotvičnicku používají k léčbě vysokého krevního tlaku a ischemické choroby srdeční. Proto byl prošetřen antihypertenzivní mechanismus a aktivita ACE v aortě, srdci, ledvinách a plicích u krys. ACE (Angiotenzin konvertující enzym) se podílí na řízení krevního tlaku. Po dobu 4 týdnů zvířata dostávala jednu denní dávku 10 mg extraktu zředěného v 0,5 ml destilované vody na kg své váhy. Ukázalo se, že ACE aktivita byla podáváním kotvičnicku výrazně snížena ve všech sledovaných tkání u zvířat s vyvolanou hypertenzí. Tato zjištění potvrdila, že kotvičnick snižuje krevní tlak, například prostřednictvím inhibice aktivity ACE. (SHARIFI et al. 2003)

Významné snižování krevního tlaku a rozšiřování cév potvrdila další vědecká práce zkoumající methanolicke i vodné extrakty z kotvičnicku u spontánně hypertenzních krys. Přičemž s rostoucí dávkou se efekt zvyšoval a současně se vodné extrakty projeví jako účinnější jak uvádí následující graf. (PHILLIPS et al. 2006)

Obr. 3 Účinky methanolickeho a vodného extraktu z kotvičnicku na krevní tlak u spontánně hypertenzních krys. (PHILLIPS et al. 2006)



Výzkum také prokázal, že saponiny extrahované z kotvičnicku chrání buněčné a molekulární mechanismy v buňkách hladké svaloviny cév před aterosklerózou. (LI et al. 2013)

2.4.7 Urologické vlastnosti

Zdravotním problémem velkého počtu lidí jsou ledvinové kameny. Tyto kameny jsou složeny mimo jiné ze šťavelanu vápenatého. V tradiční indické medicíně se pro léčbu ledvinových kamenů používá také kotvičník zemní. Proto byl ověřen inhibiční účinek vodného výluhu z kotvičníku na růst krystalů šťavelanu vápenatého *in vitro*. Tento účinek byl jednoznačně prokázán a je díky tomu možné, uvažovat o provedení dalších pokusů *in vivo*. (JOSHI et al. 2005)

2.4.8 Antikarcinogenní vlastnosti

Slibné výsledky získané v bylinné terapii proti rakovině podnítily další výzkum léčivého využití rostlin. Rostlinné saponiny jsou již běžně používány v lékařské praxi pro jejich potenciální zdravotní výhody. Nové důkazy ukázaly, že saponiny obsažené v kotvičníku mají cytostatickou aktivitu proti rakovinným buňkám. Nicméně potenciální protirakovinné účinky u člověka jsou stále ještě do značné míry neprostudované.

Oblast ultrafialového záření UVB je již dlouho uznávána jako nejvýraznější rizikový faktor pro vývoj rakoviny kůže. Bylo dostatečně prokázáno, že lidské keratinocyty podstupují programovanou buněčnou smrt po vystavení UVB. V této souvislosti je cílem současného výzkumu zjištění účinků saponinů z kotvičníku v boji proti kožním nádorům. Studie ukázaly, že saponiny z kotvičníku výrazně zvýšily odolnost keratinocytů proti UVB záření a tím snížily možnost vzniku nádoru kůže. (SISTO et al. 2012)

Hepatocelulární karcinom je jedním z nejčastějších nádorů po celém světě. Vysoký výskyt rakoviny jater je způsoben například přetrvávající infekcí hepatitidy B, konzumací alkoholu nebo kontaktem s karcinogenními látkami jako nitrosaminy, aflatoxiny. Studie ukazuje experimentální důkaz, že extrakt z kotvičníku má klinické léčebné účinky proti rakovině, kdy silně inhibuje růst rakovinných buněk lidských jater. Naznačuje velký potenciál pro vyvinutí nového léku pro pacienty s rakovinou jater. (KIM et al. 2011)

2.4.9 Redukce cholesterolu

Základní aktivní sloučeninou kotvičníku jsou steroidní saponiny, které zahrnují různé typy terrestrosinu, mající hypolipidemický účinek.

Byla provedena studie, která měla za cíl, prozkoumat účinky dlouhodobého užívání extraktu z kotvičnicku při podávání stravy bohaté na cholesterol v cévách králičí mozkové kůry. Králíci byli rozděleni do tří skupin a sledováni po dobu 12 týdnů. Experimentální skupina 1 byla krmena pouze stravou bohatou na cholesterol, skupina 2 navíc extraktem z kotvičnicku v množství 5 mg / kg / den, třetí skupina byla kontrolní. V obou skupinách vedlo podávání stravy bohaté na cholesterol k určitým poškozením cév. Ve skupině krmené extraktem kotvičnicku, však byla pozorována zvýšená ochrana struktury cév v králičím mozku. (BERKMAN et al. 2009)

Další studie zkoumala u novozélandských králíků 7-8 měsíců starých, vážících 3,5-4 kg obsah cholesterolu a triglyceridů v krvi a dále buněčné poškození stěny břišní aorty při krmení potravou bohatou na cholesterol. Osmnáct králíků bylo rozděleno do skupin po šesti, přičemž první skupině (EG-I) byla podávána strava bohatá na cholesterol, druhé skupině (EG-II) navíc s přidavkem extraktu z kotvičnicku a třetí skupina byla kontrolní (CG). Strava bohatá na cholesterol sestávala ze standardní stravy s přidavkem 1 % cholesterolu a strava obohacená o extrakt z kotvičnicku obsahovala navíc 5 mg extraktu na 1 kg váhy a den. Vzorky krve byly odebrány na počátku testu, poté po 4 a 12 týdnech pro stanovení celkového cholesterolu (TC), cholesterolu typu HDL, cholesterolu typu LDL a triglyceridů (TG). Výsledky rozborů krve s pozitivním dopadem na hladinu cholesterolu a triglyceridů ukazuje následující tabulka. Současně byl prokázán regenerační účinek na stěny břišní aorty poškozené vlivem cholesterolu, byť v omezeném rozsahu. (TUNCER et al. 2008)

Tabulka 2 Lipidové profily skupin EG-I, EG-II a CG v různých obdobích experimentu (mg/dl). (TUNCER et al. 2008)

	Day 0	After 4 weeks	After 12 weeks
EG-I			
TC	32.3 ± 13.3	869.1 ± 167.2	849.1 ± 165.1
LDL-C	11.4 ± 6.4	414.5 ± 237.3	433.7 ± 268.6
HDL-C	31.3 ± 14.3	287.7 ± 14.3	294.8 ± 17.2
TG	61.6 ± 38.6	159.4 ± 43.4	179.3 ± 72.3
EG-II			
TC	31.1 ± 12.1	787.9 ± 285.1	278.3 ± 119.2
LDL-C	10.2 ± 3.6	418.7 ± 253.0	144.4 ± 82.9
HDL-C	29.4 ± 9.3	316.1 ± 56.6	113.9 ± 50.6
TG	42.7 ± 29.1	117 ± 28.9	52.9 ± 34.9
CG			
TC	30.3 ± 12.3	32.2 ± 14.1	33.1 ± 13.1
LDL-C	12.2 ± 3.9	10.2 ± 2.1	14.1 ± 10.0
HDL-C	28.5 ± 11.4	32.4 ± 15.2	30.5 ± 15.3
TG	56.6 ± 29.4	53.4 ± 17.2	57.5 ± 23.4

TC; total cholesterol, LDL-C; low density lipoprotein-cholesterol, HDL-C; high density lipoprotein-cholesterol, TG; triglyceride.

2.4.10 Antidiabetické vlastnosti

Diabetes mellitus (cukrovka) je jedním z nejčastějších endokrinních onemocnění na světě, které postihuje více než 6 % světové populace. Odhaduje se, že aktuální počet cca 143 milionů lidí po celém světě s touto nemocí, se pravděpodobně do roku 2030 zdvojnásobí. Cílem jednoho z výzkumů bylo zkoumat ochranný účinek kotvičnicku při onemocnění cukrovkou. Je známo, že cukrovka zvyšuje reaktivní formy kyslíku (ROS) na úroveň, která následně přispívá k patogenezi diabetu. Krysy byly rozděleny do skupin a léčeny buď fyziologickým roztokem, glibenklamid nebo kotvičnickem v dávce 2 g na kg živé váhy po dobu 30 dní. Části byl vyvolán diabetes a druhá část zůstala kontrolní. Na konci experimentu byla provedena analýza séra a jaterní testy.

Testovaný kotvičnickový extrakt významně snížil hladiny alaninaminotransferázy a kreatininu v séru u diabetických skupin a snížil hladinu malondialdehydu v játrech u diabetických i nediabetických skupin. Na druhé straně hladiny redukováného glutathionu se v játrech významně zvýšily. Histopatologické vyšetření odhalilo výrazné oživení jater. Tyto výsledky naznačují ochranný efekt kotvičnicku u krys s vyvolaným diabetem. (AMIN et al. 2006)

V dalším experimentu na potkanech s vyvolaným diabetem byl srovnáván účinek kotvičnickového extraktu s glibenclamidem jako standardem. Kotvičnick významně snižoval hladinu glukózy a glykovaného hemoglobinu v krvi, snižoval současně hladinu celkového cholesterolu, triglyceridů a LDL-cholesterolu. (NAVRÁTILOVÁ, PATOČKA 2013)

2.4.11 Účinky v přípravcích pro sportovce

Kotvičnick zemní je oblíbeným doplňkem sportovců, kteří jej znají zejména pod různým slovním označením obsahující slovo Tribulus. Užíván je zejména extrakt z kotvičnicku. Kotvičnick zemní zvyšuje aktivitu syntézy bílkovin a svalové hmoty a umožňuje snadnější regeneraci po fyzickém zatížení.

Cílem jednoho z výzkumů bylo zjistit, jaký vliv má doplněk stravy s obsahem kotvičnicku na tělesný vývoj závodníků, fyzické schopnosti a aerobní kapacitu, stejně jako na některé krevní biochemické indexy. Do výzkumu bylo přizváno 32 sportujících mužů ve věku 20-22 let. První skupina se skládala z 20 jedinců, kteří užívali jednu tobolku doplňku stravy Tribulus (Optimum Nutrition Company, USA) ráno a dvě tobolky večer po dobu 20 dní. Jedna tobolka obsahovala 625 mg prášku,

takže sportovci spotřebovali 1875 mg za den. To odpovídá přibližně 25 mg prášku na jeden kg tělesné hmotnosti. Kontrolní skupina se skládala z 12 jedinců, kteří nekonzumovali žádný potravinový doplněk.

Studie ukázala, že užívání přípravku Tribulus po dobu 20 dnů (1875 mg za den) nemá příliš vliv na fyzický vývoj jednotlivců, ačkoli se zvýšila jejich síla. Svalová kapacita testovaných osob při výkonu 30 sekundových prací vzrostla v důsledku konzumace Tribulusu. Pozitivně lze hodnotit sníženou koncentraci laktátu v krvi sportovců i při pracovní aktivitě se stoupající zátěží, aerobní kapacitu v mezích kritické intenzity a aerobního prahu, stejně jako funkční kapacitu oběhového a dýchacího systému. Byl zde také patrný zvýšený obsah krevního testosteronu při užívání doplňků stravy obsahující kotvičnick zemi. (MILAŠIUS et al. 2010)

2.4.12 Ochranné účinky

Mezi jedny z farmakologických účinků kotvičnicku lze zařadit jeho ochranné účinky při poškození ledvin. Samci krys byli podrobeni testu, ve kterém po dobu 13 dnů přijímali extrakt z kotvičnicku v dávce 11 mg/kg. Ve 14. dnu byla vyvolána indukovaná ischemie po dobu 30 minut a následně reperfuze po dobu 24 hod. Po uplynutí 6 hodin od konce reperfuze byly odebrány vzorky moči, krve a tkáně ledvin. Rozbory prokázaly, že orální podávání extraktu z kotvičnicku po dobu dvou týdnů může snížit funkční poruchu ledvin, oxidační stres a reperfuzní poškození u krys. Přesné stanovení mechanismu účinků extraktu kotvičnicku v ledvinách však vyžaduje další výzkum. (NAJAFI et al. 2014)

Ochranná funkce kotvičnicku na ledviny byla zkoumána při indukovaném poškození ledvin vyvolaném použitím cisplatinu. Proti rakovinové léčivo cis-diamminedichloroplatinum neboli cisplatina (CIS) je široce používáno pro léčbu mnoha nádorů. Z důvodu, že účinnosti dosahuje jen ve vysokých dávkách, jsou běžné vedlejší účinky, které omezují klinické použití léku. I když, nízké dávky léku také indukují patologické příznaky u laboratorních zvířat. Nefrotoxicita je nejvýznamnější vedlejší účinek CIS, který se vyskytuje u více než 30% léčených pacientů. Vzhledem ke známým pozitivním účinkům kotvičnicku při ochraně ledvin, odstraňování písku z moči a kamenů v močovém měchýři byl extrakt z kotvičnicku použit jakožto ochranný prvek na nefrotoxicitu vyvolanou CIS u myši. V této souvislosti bylo třicet myši rozděleno do pěti skupin po 6. První skupina (kontrolní) obdržela fyziologický roztok

(0,9% NaCl), experimentální skupina 1: CIS 5,5 mg/kg, skupina 2: CIS + 100 mg/kg extraktu, skupina 3: CIS + 300 mg/kg extraktu, skupina 4: CIS + 500 mg/kg extraktu. Ledviny byly odstraněny po 4 dnech a bylo provedeno histologické hodnocení.

Data ukázala, že neexistují žádné významné rozdíly v tělesné hmotnosti myši před a po experimentech u skupin 3 a 4, zatímco tělesná hmotnost byla snížena na konci experimentů u skupiny 1 a 2. Hmotnost ledvin ve srovnání s kontrolní skupinou byla u skupiny 1 výrazně snížena. Histologické změny na tkáni ledvin působením CIS byly rovněž potvrzeny. Výsledky naznačují, že podávání extraktu z kotvičnicku má kladný dopad na ochranu proti nefrotoxicitě u myši, nicméně je potřeba provést další výzkumy pro objasnění účinků této ochrany. (RAOOFI et al. 2015)

2.4.13 Ostatní účinky

Kotvičnick zemní je překvapivě možné využít také v oblasti rybí říše. Prozkoumán byl účinek extraktu z kotvičnicku na maskulinizaci (přeměna ženských znaků na mužské) na rybičky z rodu cichlidů Kančík příčnopruhý (*Cichlasoma nigrofasciatum*) s cílem zavedení nové ekologicky šetrné metody. Různé koncentrace (0,0; 0,10; 0,20 a 0,30 g/l) byly testovány na jejich účinek na změnu pohlaví ponořením nově vylíhnutého potomstva jednou týdně po dobu 2 měsíců do extraktu s vodou. Dávka 0,30 g/l byla nejúčinnější, pokud jde o maskulinizaci, což mělo za následek maximální mužský poměr 87,23 %. Poměry 79 a 85 % při dávce 0,10 a 0,20 g/l extraktu, v daném pořadí, byly také značně odlišné od očekávaného poměru 1:1. Negativní účinek na míru přežití nebyl zaznamenán. Kromě toho všechny skupiny ošetřených ryb vykazovaly úspěšné zrychlení růstu ve srovnání s kontrolní skupinou, ale pouze dávka 0,30 g/l výrazně zlepšila rychlost růstu. (CEK et al. 2007)

Komerčně dostupný bulharský extrakt kotvičnicku byl vybrán pro test s japonskými křepelkami. Pokusné skupiny (44 dní staré křepelky krmené ad libitum) dostaly do pitné vody testovaný výrobek po denních dávkách: 4 mg/kg tělesné hmotnosti (po dobu 10 týdnů); 10 mg/kg tělesné hmotnosti (5 týdnů); 10 mg/kg tělesné hmotnosti (10 týdnů). Přídavek extraktu zlepšil hodnoty hmotnosti celých vajec, žloutky i bílku, dále hmotnosti a tloušťky skořápky. Současně nezhoršil senzorické hodnocení vajec křepelk. (NICKOLOVA, PENKOV 2010)

U japonských křepelek byla také zaznamenána zvýšená produkce vajec při podávání extraktu z kotvičnicku do pitné vody v denních dávkách 10 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 10 týdnů. (NIKOLOVA et al. 2015)

Pozitivně byl extrakt kotvičnicku hodnocen při léčbě syndromu polycystických vaječníků (PCO) u krys. 15 dospělým krysám byl navozen PCO a byly náhodně rozděleny do tří skupin. Podávání extraktu rozpuštěného v destilované vodě v dávkách 5 resp. 10 mg po dobu 62 dnů mělo za následek výrazné snížení počtu cyst na vaječnicích a současně zvýšení počtu žlutých tělísek ve srovnání s kontrolní skupinou. Pozitivně může tedy působit na vyvolání ovulace a obnovení činnosti vaječníků. Tento efekt je však nezbytné ověřit ještě u jiných druhů. (DEHGHAN et al. 2012)

Ve světě moderních technologií byl vodný výluh kotvičnickového extraktu odzkoušen k syntéze nanočástic stříbra. Tento typ biosyntézy je perspektivní, i s ohledem na šetrnost k životnímu prostředí. (ASHOKKUMAR et al. 2014)

Jedna z vědeckých studií uvádí také antioxidační vlastnosti kotvičnicku. (HAMMODA et al. 2013)

V literatuře je popsáno i zlepšení peristaltiky střev, vylučování žluči a stimulace sekrece žaludečních šťáv. (VALÍČEK 2002)

2.4.14 Vedlejší účinky a kontraindikace

Celá řada vědeckých prací zkoumá a vesměs potvrzuje pozitivní účinky kotvičnicku. Nicméně lze nalézt i zprávy se zápornými vlastnostmi. Příkladem mohou být otravy u ovcí a koz.

Jedenáct ovcí, 1-2 roky staré, obou pohlaví bylo náhodně rozděleno do dvou skupin, 6 ovcí bylo určeno jako experimentální skupina a 5 sloužilo ke kontrole. Ovce v experimentální skupině byly krmeny 80 % kotvičnicku a 20 % sena z vojtěšky a pšeničné slámy, zatímco kontrolní ovce dostaly směs 40 % vojtěškového sena a 60% pšeničné slámy. Při tomto testu byly pozorovány od prvního dne zarudnutí a tvorba krusty na tlamě, nosu, uších a očních víčkách, deprese, hubnutí, žloutenka, zánět spojivek a žluté zbarvení moči.

Laboratorní nálezy na týdenních vzorcích uvádí značné rozdíly v počtu bílých krvinek, celkové plazmatické bílkoviny a fibrinogenu, bilirubinu v krvi. Při pitvě pokusných zvířat byly zjištěny různé stupně žloutenky, oteklá játra a odbarvení

žlučového barviva. Histopatologické vyšetření odhalilo různá množství krystaloidního materiálu ve žlučových cestách a ledvinových kanálcích, hepatocelulární degeneraci, biliární fibrózu, nekrózu ledvinových kanálek a ložiskové nekrózy srdečního svalu. (ASLANI et al. 2003)

Sedm jedno až dvou ročních koz bylo krmeno sušeným kotvičником po dobu 8 týdnů. Dvě testované kozy vykazovaly na konci pokusu klinické příznaky toxicity, včetně úbytku hmotnosti, deprese, žloutenky, zvýšené tělesné teploty i změny v krevním rozboru. Při pitvě byly nalezeny viditelné patologické změny na játrech, žlučových cestách, ledvinách a ledvinových kanálcích. (ASLANI et al. 2004)

2.5 Pěstování

Kotvičnik zemní je bylina původem zřejmě z oblasti Středoziemního moře a severní Afriky a rostoucí v širokém pásu mírného až tropického klimatu celého světa. (SEMERDJIEVA, EVSTATIEVA 2010)

Nejlépe prosperuje v půdách suchých, sypkých a písčitých, případně i těžších při dobrém zásobení živinami. (VERDÚ, MAS 2006)

Rostlině vyhovuje slunné stanoviště, půdy lehké a propustné. (JABLONSKÝ, BAJER 2007)

Jeho jednoduchý kořen umožňuje růst i v oblastech s nízkou vlhkostí a vyklíčit nebo přežít v podmínkách sucha. (ŠALAMON et al. 2006)

Kotvičnik zemní lze pěstovat i v klimatických podmínkách České republiky a to ve volné půdě na záhonech, v květináčích nebo ve skleníku. Při pěstování je potřeba se vyvarovat příliš těžkých a vlhkých půd, kde rostliny podehnívají. (VALÍČEK et al. 2012)

2.5.1 Klíčení

Kotvičnik je rostlina jednoletá, která se pěstuje ze semen. Semena jsou uložena v plodech, jejichž slupka je dřevitá a mimořádně tvrdá. Plod se skládá z pěti hvězdicovitě rozložených bradavičnatých plůdků, ve kterých je ukryto jedno asi 1 mm velké, kulaté, hnědé semeno. (KLUŠÁK 2013)

Velikost jednotlivých plůdků není stejná. Největší obvykle klíčí jako první. Sekundární a terciární semena mohou vyklíčit, ale většinou zůstávají v dormanci po

dobu i delší než 3 roky. Klíčení nastává až v okamžiku, kdy průměrná teplota vrchní vrstvy půdy je více než 15 °C po dobu dvou týdnů. (AFFELDT 2007)

V České nebo Slovenské republice jsou uváděny podmínky pro klíčení od různých autorů: teplota kolem 20 °C a doba cca 10 nebo 14 dnů. (HEMZAL 2014; KLUŠÁK 2013; ŠALAMON 2006) V oblasti Sahelu však může být doba klíčení kotvičnicku po bouřích velmi rychlá a dosahovat pouze 2-3 dny. (VERDŮ, MAS 2006)

Vzcházení není pravidelné. Některá semena mohou vyklíčit i po více měsících nebo někdy i na podzim či dokonce v dalším roce. Rostlina se tímto pravděpodobně chrání před nepřízní počasí a vymizením. (HEMZAL 2014; KLUŠÁK 2013)

Úspěšnost umělého výsevu se pohybuje okolo 60 %, neboť semena mají velmi nevyrovnané klíčení. (JANOUTOVÁ 2014)

Semena klíčí od jara do podzimu a rychle produkují hluboký kořenový systém během několika týdnů. Květy se mohou objevit během 3-4 týdnů po vzejití a semena následně do 2 týdnů poté. (PACANOSKI et al. 2014)

Rostlina kvete během všech fází růstu a poslední květy se mohou objevit ještě v září. (ŠALAMON 2006)

Vzhledem k velké produkci a dlouhodobé životaschopnosti semen se tento druh může za vhodných podmínek rychle rozšířit. (VERDŮ, MAS 2006)

2.5.2 Setí

Vysít je možné celý plod, který se v zemi rozdělí nebo vysít již rozdělené jednotlivé plůdky. Semena ochotně klíčí a není potřeba je namáčet. (KLUŠÁK 2013)

Obr. 4 Kotvičnick zemní – plod (Foto: Bc. Pavel Bartoš)



Pro urychlení klíčení se někdy uvádí namáčení do převařené vychladlé vody na cca 10 hodin, čímž se naruší tvrdý obal semen. Použití chemických přípravků pro urychlení klíčení není nutné. (HEMZAL 2014)

Setí do vegetačních nádob za účelem počátečního nebo trvalého pěstování ve skleníku se provádí od poloviny března do konce dubna. (HEMZAL 2014) Uváděno je i období do konce května, případně i pozdější výsevy až do konce července. Naproti tomu lednové nebo únorové výsevy nejsou pro krátkou délku světelného dne vhodné. (KLUŠÁK 2013)

Na pěstování kotvičnicku ve vegetačních nádobách se využívá běžný zahradnický substrát. Doporučuje se nový nepoužitý nebo také propláchnutý vodou vařící a následně studenou. Do studené vody je možné také přimíchat přípravek proti plísním pro odstranění zárodků plísní v substrátu. (HEMZAL 2014)

Z důvodu, že kotvičnicku vyhovuje hlinitopísčité půda, je užitečné smíchat substrát s pískem v poměru 3:1. (HEMZAL 2014) Přimíchávání písku do substrátu však není nutné. (KLUŠÁK 2013)

Do vegetačních nádob se kotvičnick seje přímo ve vzdálenosti cca 15 cm nebo se do nich přesazuje ze sadbovačů. Semena jsou v substrátu seta cca 0,5 cm hluboko. Semeno se do substrátu lehce zamáčkne nebo se tenkou vrstvou substrátu překryje. (HEMZAL 2014; KLUŠÁK 2013)

Od druhé poloviny dubna je možno vysévat kotvičnick přímo do volné půdy. Spon výsadby může být například 30 x 30 cm. (VALÍČEK et al. 2012)

Pokusně byl kotvičnick také zaset způsobem 4 semena do řádku po 25 cm s následným vyjednocením a ponecháním dvou sazenic na 1 m². (ŠALAMON et al. 2016)

2.5.3 Choroby a škůdci

Mladé rostliny jsou poměrně náchylné na padání klíčících rostlin. Dochází k zeslabování stonku těsně nad substrátem a následnému zborcení rostliny, až uhnití. Tento problém lze řešit používáním fungicidu s účinkem proti půdním a listovým chorobám. Další možností je tzv. pikýrování. Přepichování a přesazování čerstvě vzešlých rostlin každé dva dny problém s padáním řeší téměř spolehlivě. Preventivním opatřením je zajištění optimální vlhkosti půdy. (KLUŠÁK 2013)

Mezi škůdce kotvičníku se řadí svilušky a mšice. Výskyt těchto škůdců je pravděpodobnější při pěstování kotvičníku ve skleníku než při venkovním pěstování. (KLUŠÁK 2013)

Přirozeným nepřítelem kotvičníku je brouk nosatec, jmenovitě *Microthrips* *piriformis* a *Microthrips lareynii*. Tito brouci původem z Indie, Francie a Itálie se využívají jako biologická ochrana proti plevelnému šíření kotvičníku. Úspěšné použití nosatců bylo zaznamenáno v Nevadě, Kalifornii, Arizoně, Texasu, Novém Mexiku a Havaji. (PACANOSKI et al. 2014) Larvy nosatců se živí semeny uvnitř plodů a vnitřní částí stonků. (AFFELDT 2007)

2.5.4 Sklizeň

Nať kotvičníku lze postupně sklízet již v průběhu vegetace. Sběr semen probíhá před koncem vegetace, kdy semena vypadávají. (VALÍČEK et al. 2012) Při výsadbě do skleníku v průběhu března bývá první sklizeň začátkem července. Sklizeň z červnové výsadby pak na začátku září. Třetí sklizeň je závislá na počasí. (KLUŠÁK 2013) Kotvičník se při sklizni ořezává vždy po čtyřech až šesti týdnech. Poslední sklizeň může probíhat včetně kořenů, které také obsahují účinné látky. (JANOUTOVÁ 2014)

Rostlinné části se po vyčištění suší po dobu 10 až 15 dnů v tmavé místnosti při teplotě 21-23 °C a relativní vlhkosti 40 až 60 %. (ŠALAMON et al. 2016)

Sesychací poměr tj. poměr čerstvě sklizené natě a suché natě lze vypočítat z údajů vzešlých při pěstování kotvičníku v Bulharsku. Například čerstvá nať/suchá nať: 150 kg/43 kg, 600 kg/170 kg, 1000 kg/286 kg. Z toho vyplývá sesychací poměr cca 1:3,5. (SEMERDJIEVA, EVSTATIEVA 2015)

2.6 Základní formy zpracování

Sušenou drogu je nutné skladovat a chránit před světlem, oxidací a vlhkostí. Skladování ve vlhkém prostředí může vyvolat vznik plísní. Drogu je vhodné skladovat v co největších kusech pouze nasekanou nebo drcenou, aby nedocházelo ke znehodnocení oxidací.

Z rostliny lze využít všechny části, ať už současně nebo samostatně list, květ, nať, plod i kořen. Součástí usušené natě bývá list, květ, stonky a plody. (HEMZAL 2014)

Nejčastěji se užívá nat' a z ní připravený čaj. Připraví se z jedné lžice suché a rozemleté natě, zalije se vroucí vodou a následně se vaří 30 minut. Po procezení se pije čtvrt až půl sklenky 3-4 krát denně půlhodiny před jídlem. (VALÍČEK et al. 2012)

Další možností přípravy čaje je odvar. Droga se zaleje vroucí vodou, poté se 5-10 minut vaří a následně se nechá 20 minut luhovat. (HEMZAL 2014)

Z kotvičnicku se vyrábí také tinktura. Čistý ethanol 40-95 % se jako činidlo mísí s drogou obvykle v poměru 1:4. Do tmavé, uzavíratelné nádoby se vloží a přiměřeně stlačí kotvičnick zhruba do dvou třetin objemu. Zalije se ethanolem, tak aby veškerá droga byla ponořená. Uzavřená nádoba se umístí do temného místa s teplotou kolem 25 °C a nechá se luhovat 30 dnů. Každý den se nádoba protřepe. Po 30 dnech se ethanol slije, droga se znovu zalije ethanolem a postup se opakuje. Nakonec se ethanol z obou částí slije dohromady. (HEMZAL 2014)

Farmaceutický průmysl zpracovává kotvičnick formou extraktu. Léky nebo potravinové doplňky se využívají například k léčení a profylaxi aterosklerózy, snížení sekrece žaludečních šťáv, k aktivaci spermatogeneze, zlepšení erekce, stimulaci pohlavních funkcí. (VALÍČEK et al. 2012)

3. METODY STANOVENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK

3.1 Extrakce

Extrakce je příkladem separační metody založené na kontaktu dvou makroskopicky zřetelně oddělených nemísitelných fází, přičemž tyto fáze mohou být různého skupenství. Extrakce bývá obvykle prováděna tak, aby při ní došlo nejen k separaci, ale i ke zkontcentrování analytu z relativně velkého objemu do malého objemu kontaktní fáze – extrakčního činidla.

Jedním z druhů extrakcí může být extrakce kapalinou (L-L extrakce). Při této extrakci se analyt převádí z vodného roztoku vzorku do organického rozpouštědla (chloroform, benzen atd.). Extrakci lze provádět manuálním protřepáváním obou kapalin v dělicích nálevkách nebo v různých extraktorech. K následné analýze se používá organická fáze. Tato metoda je vhodná pro stanovení těžkých kovů a netěkavých organických látek. Látky iontové povahy dávají přednost vodné, polární fázi. Látky neiontové povahy pak fázi organické, nepolární, a proto je nutno ionty kovů před extrakcí z vodné do organické fáze převést reakcí s vhodným chelaktačním

činidlem do formy chelátu bez náboje. Uplatňuje se zde Liebigovo pravidlo „podobné se rozpouští v podobném“. (OPEKAR et al. 2007)

3.2 Chromatografie

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších separačních metod, která umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého množství organických i anorganických látek. Principem chromatografie je dělení vzorku mezi dvěma fázemi tzv. mobilní a stacionární. Fáze mobilní může být plyn nebo kapalina. Fáze stacionární může mít velmi rozdílnou formu – částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, kapalina umístěná na povrchu inertního nosiče nebo film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry. Pro jakoukoliv formu stacionární fáze se užívá označení sorbent. Přes sorbent, kterým je naplněna kolona postupuje určitou rychlostí mobilní fáze. Při styku stacionární a mobilní fáze s dělenými látkami vzorku dochází k vzájemným interakcím rozhodujících o průběhu separačního procesu. Podle typu interakcí je dělíme např. na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnné či gelové chromatografie. Celkový průběh separace je v řadě případů podmíněn dvěma i více mechanismy, proto se nejběžněji v praxi používá členění na plynovou a kapalinovou chromatografii.

Kapalinová chromatografie zahrnuje všechny chromatografické metody, kdy mobilní fáze je kapalná. Oproti plynové chromatografii spočívá rozdíl v minimální kompresibilitě mobilní fáze, malém vlivu teploty na separaci a velmi významné úloze mobilní fáze. Kapalinová chromatografie může být uspořádána v otevřeném systému (tenkovrstvá a papírová chromatografie) a v uzavřeném systému (vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC).

Mobilní fáze je při isokratické eluci vedena ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla přes odplyňovač, při gradientové eluci se komponenty mobilní fáze přivádějí ze zásobníku do směšovače. Ve směšovači se programově mísí ve zvoleném poměru a až následně postupují do čerpadla. Z čerpadla je mobilní fáze vedena přes tlumič pulzů do kolony. Bezprostředně za kolonu je připojen detektor. Ten je spojen se zařízením pro registraci průběhu analýzy (PC s vyhodnocacím softwarem). Za detektor někdy bývá zařazen i tzv. sběrač frakcí mobilní fáze, který umožňuje zachytit separovanou složku vzorku pro následnou detailní identifikaci.

Kapalinová chromatografie často přináší šetrnější stanovení nejrůznějších, zejména organických látek oproti plynové chromatografii, která s látkami pracuje

obvykle za zvýšené teploty. HPLC je výhodnější používat spíše pro hůře těkavé látky, které se obtížně stanovují plynovou chromatografií.

Kvalitativní vyhodnocení chromatogramů je založeno na znalosti retenčních dat chromatografovaných látek. Identifikace obnáší porovnání retenčního času neznámé látky a standardu separovaného za stejných podmínek. Jeden z nejlepších způsobů identifikace eluovaných látek je napojení kapalinového chromatografu na hmotnostní spektrometr.

Plocha pod eluční křivkou je pak kvantitativním údajem detektorů. Nejběžněji se plocha měří násobením výšky píku a šířkou píku v polovině výšky píku. Moderní přístroje jsou již vybaveny softwarem s integrátorem plochy píků.

Metoda HPLC je v současnosti široce využívána v průmyslu, zdravotnictví, farmacii a v dalších oborech. (KŘÍŽEK, ŠÍMA 2015)

4. VLIV ELICITORŮ NA OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK

4.1 Biotické a abiotické faktory působící na rostliny

V průběhu vývoje jsou rostliny vystaveny různým vlivům okolního prostředí, které mění jejich základní metabolismus. Chce-li rostlina úspěšně dokončit svůj životní cyklus, musí se vyrovnat s ekologickými omezeními, zahrnujícími patogenní napadení, extrémní výkyvy teplot, vodní deficit a vysokou intenzitu světla. Pokud tyto parametry překročí kritickou mez, uvádí se, že rostliny jsou pod tlakem nebo také ve stresu. Tento posun podmínek prostředí pak vede ke snížené rychlosti růstu a nižší produktivitě a v extrémních případech může mít dokonce fatální účinky. Faktory ovlivňující životní prostředí rostlin se rozdělují do dvou hlavních skupin na biotické a abiotické. (BARTWAL et al. 2013)

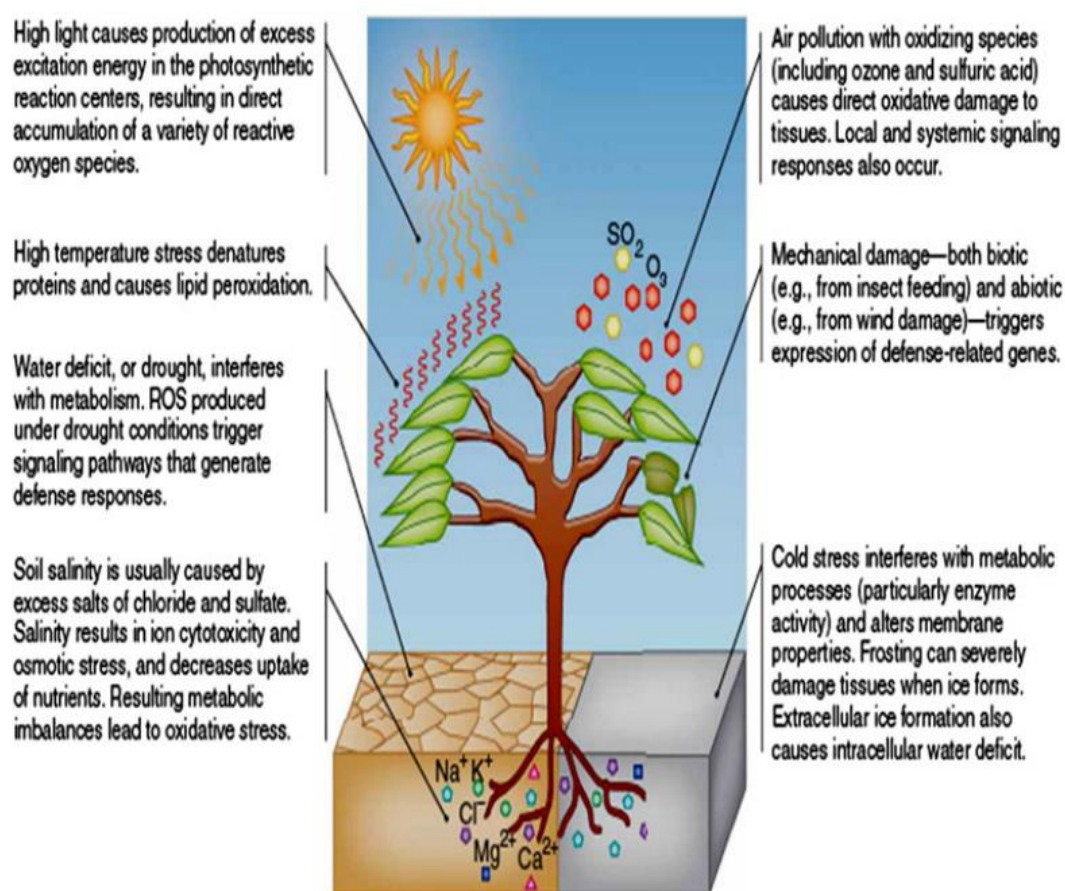
Rostliny jsou fyzicky napadány mnoha biologickými činiteli. Napadení rostlin houbami, viry, bakteriemi a hlísticemi, způsobuje u rostlin stres známý jako biotický stres. (VERMA, SHUKLA 2015)

Biotické faktory zahrnují kromě různých patogenních mikroorganismů také plevely, hmyz, býložravce a další predátory. (BARTWAL et al. 2013; ZHAO et al. 2005)

V průběhu vývoje rostlin dochází k jejich interakci s okolním prostředím a přicházejí do styku s různými abiotickými složkami jako je voda, světlo, teplota, půda a chemické látky (minerály/hnojiva). (VERMA, SHUKLA 2015)

Mezi zdroje abiotického stresu patří látky znečišťující ovzduší, extrémní teploty (včetně bodu mrazu), sucho, vysoká intenzita světla, salinita a mechanické poškození. (BARTWAL et al. 2013)

Obr. 5 Faktory ovlivňující stres rostlin (BARTWAL et al. 2013)



Prakticky každý biotický a abiotický stres má za následek nadprodukcii reaktivních forem kyslíku angl. Reactive Oxygen Species (ROS). (SHABALA 2012)

Tyto reaktivní formy kyslíku mají tendenci oxidovat různé buněčné biomolekuly, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny, lipidy apod. Rostliny vyvinuly složitý antioxidační obranný systém, aby se zabránilo hromadění ROS a zajistily si vlastní přežití. Antioxidační obranný systém se skládá z různých enzymatických a neenzymatických molekul, produkovaných proti nepříznivým účinkům vlivů okolního

prostředí. Značný počet těchto molekul patří do kategorie sloučenin zvaných sekundární metabolity (SM). (BARTWAL et al. 2013)

4.2 Sekundární metabolity rostlin

Rostlinných sekundárních metabolitů bylo již identifikováno více než 100 000. Zpočátku se předpokládalo, že mohou být pouhými vedlejšími produkty primárního metabolismu. Později však bylo zjištěno, že slouží pro celou řadu ekologických funkcí a obraně rostlin. (KESSLER 2015)

Sekundární metabolity se tvoří již během klíčení a raného vývoje rostliny, tedy rozhodující etapě života rostlin. Velká část SM je biosyntetizována de novo, zatímco zbytek je odvozen z části nebo zcela z mateřské rostliny. (DE-LA-CRUZ CHACON et al. 2013)

Za hlavní funkce SM je považována odolnost proti antagonistickým organismům, jako jsou býložravci. Mohou fungovat jako jedy, látky snižující stravitelnost, odpuzovat nebo být naopak atraktanty pro přirozené nepřátele býložravců. (KESSLER 2015)

Z důvodu absence imunitního systému vykazují rostliny odolnost proti patogenům prostřednictvím sekundárních metabolitů. Některé SM (fytoalexiny) mají antimikrobiální účinky, které fungují jako obranný systém rostlin po napadení mikroorganismy. (VERMA, SHUKLA 2015)

Uvádí se, že SM nejsou přímo zapojeny do růstu, vývoje nebo reprodukce. Nepodílí se na dýchání, syntéze proteinů, asimilaci živin nebo fotosyntéze a nemají tedy velký význam pro primární život rostlin. (BARTWAL et al. 2013)

Bylo také jasně prokázáno, že SM hrají hlavní roli v adaptaci rostlin na jejich okolní prostředí. Působí také jako alelopatické látky a tím omezují klíčivost nebo jsou toxické pro jiné rostliny. (BOURGAUD et al. 2001)

Sekundární metabolity také přispívají ke specifickému zápachu, chuti a barvy rostlin. SM mají významné praktické využití pro léčivé, kosmetické nebo potravinářské účely. Obecně jsou v rostlinách přítomny v nízkých koncentracích (méně než 1 % sušiny) a jejich obsah závisí ve velké míře na fyziologické a vývojové fázi rostlin. Mezi známé SM využívané pro své léčivé vlastnosti lze uvést morfin,

kodein a chinin nebo steroidy jako je diosgenin, digoxin a digitoxin. (RAMAKRISHNA, GOKARE 2011)

Obsah sekundárních metabolitů v ovoci a zelenině má důležitou roli pro podporu zdraví a tedy přispívá k jejich ekonomickému významu v potravinách. Optimalizace složení ovoce a zeleniny by byla velmi efektivní metoda pro zlepšení zdraví pomocí výživy a prevence nemocí. Zlepšení zdravotního stavu stravou by představovalo snížené náklady na zdravotnictví. (BAENAS et al. 2014)

Sekundární metabolity lze rozdělit na tři hlavní skupiny (BARTWAL et al. 2013):

- Terpeny (terpenoidy nebo isoprenoidy)
 - Monoterpeny
 - Seskviterpeny
 - Diterpeny
 - Triterpeny
 - Tetraterpeny
 - Polyterpenoidy
- Fenoly
 - Flavonoidy
 - Třísloviny
 - Ligniny atd.
- Dusík obsahující sekundární metabolity
 - Alkaloidy
 - Kyanogenní glykosidy
 - Glukosinoláty atd.

Terpeny patří mezi významné vonné látky (tvoří složky aroma prakticky všech druhů ovoce, zelenina a koření), silice (citrusy, máta, kmín), pryskyřice (jehličnany). (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Fenolické látky rostlin mohou být syntetizovány během normálního vývoje rostlinných tkání nebo jsou syntetizovány rostlinami v reakci na fyzické poranění, infekci nebo jinou formu stresu. Bylo zdokumentováno několik věrohodných

funkčních rolí pro některé z těchto sloučenin. Mezi ně patří: zbarvení květů, které přitahují opylující zvířata; ochrana proti škodlivému UV záření; odstrašování dobytka před pastvou pro jejich svíravou a toxickou povahu; zajištění mechanismu pro přilákání hmyzu; odolnost proti patogenům; ochrana proti růstu ostatních rostlin v bezprostřední blízkosti. (BECKMAN 2000)

Z fenolických látek obsažených hojně v rostlinách a využívaných v potravinářství pro specifickou chuť nebo barvu lze uvést například kapsaicin, který je odpovědný za štiplavé vlastnosti červené papriky. Alkylfenoly jsou zodpovědné za charakteristickou chuť a vůni hřebíčku, třísloviny přidávají zřetelnou hořkost nebo trpkost některých potravin, anthokyany odpovídají za červené, modré a fialové zbarvení rostlin. Glukosinoláty jsou charakteristické svou hořkou chutí a intenzivním aroma brukvovité zeleniny. (BAENAS et al. 2014)

Díky svým účinkům proti oxidačnímu stresu a reaktivním formám kyslíku (ROS), které mohou být vyvolány například stresory (chlad, sucho atd.) nebo navozeny externě látkami znečišťující ovzduší (ozón a SO₂), zvýšením UVB (pokles stratosférické ozonové vrstvy), radioaktivní depozice (Černobyl) a mohou tedy být pro rostliny potenciálně toxickými, lze fenoly a terpenoidy označit za přírodní antioxidanty. (GRASSMANN et al. 2002)

4.3 Elicitace

Obranné reakce rostlin mohou být spuštěny při použití celé řady sloučenin nebo faktorů zvaných elicitory. Původně byl termín elicitor použit pro molekuly, které jsou schopné indukovat produkci fytoalexinů, ale v současnosti se běžně používá pro všechny podněty, stimulující jakýkoliv typ obrany rostlin. První biotické elicitory byly popsány na začátku roku 1970. (ANGELOVA et al. 2006)

Elicitory jsou tedy látky, které vyvolávají fyziologické změny (stres) v rostlině. Rostliny reagují na tyto stresory aktivací řady mechanismů podobně, jako jsou obranné odpovědi na patogenní infekci nebo podněty z oblasti životního prostředí zásahem do svého metabolismu a zlepšením syntézy fytochemikálií.

Elicitor jako nástroj ke zvýšení obsahu fytochemických látek v rostlinách je možné použít samostatně nebo v kombinaci s dalšími elicitory a také ve vybraných růstových fázích rostliny. Často jsou elicitory komplexní biologické přípravky, ve kterých není známa molekulární struktura účinných látek. Příkladem takového

elicitoru jsou kvasinkové extrakty a mikrobiální přípravky z buněčných stěn. Extraktu z kvasnic obsahuje několik složek, které mohou vyvolat odezvy k obraně rostlin, včetně chitinu, N-acetylglukosamin oligomerů, beta-glukanu, glykopeptidů a ergosterolu.

Koncentrace elicitoru a interval mezi aplikací a sklizní vyvolává různé reakce charakteristické pro daný rostlinný druh, což nutně zohlednit a najít odpovídající účinnou dávku a čas aplikace.

Elicitace může být provedena namáčením semen nebo sazenic do vody s elicitem, postřikem na listy případně zapojením elicitorů v hydroponické systému pěstování.

Komerčně se elicitory používají také po sklizni pro zvýšení obsahu fytochemických látek a kvality mnoha druhů ovoce a zeleniny. Před uvedením na trh se například využívá působení nízkých nebo vysokých teplot, ultrafialového záření nebo kombinace s plynem. V této souvislosti lze uvést i negativní stránku takového použití elicitorů, kdy například u pomerančů vyvolá skladování v chladu při teplotě 4 °C po dobu 75 dnů nahromadění antokyanů v dužině osminásobně oproti kontrolním vzorkům. Hromadění fenolických sloučenin bylo také nalezeno v průběhu skladování jablek v chladu. Kombinace viditelného světla a UVB záření (380 nm) aplikovaná 12 hodin denně po dobu 10 dnů vedla k celkovému zvýšení fenolických sloučenin o 127 % ve srovnání s ozařováním samotným viditelným světlem v jablečné kůře. (BAENAS et al. 2014)

Vzhledem k vysokým výrobním nákladům a nespolehlivosti získat přírodní produkty využitelné zejména pro farmaceutický průmysl, byla vyvinuta k produkci sekundárních metabolitů technologie rostlinné buněčné kultury. První patent na výrobu produktů z rostlinné buněčné kultury byl získán v roce 1956. Při této technologii probíhá růst rostlinných buněk, tkání nebo orgánů v živném kultivačním médiu o známém složení. Jednou z možností jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů je elicítace kořenové kultury v kultivačním médiu pomocí přirozeně se vyskytující půdní bakterie *Agrobacterium rhizogenes*. Kořeny se po infekci této bakterie vyznačují vysokou mírou růstu, genetickou stabilitou a mohou produkovat zvýšené množství sekundárních metabolitů. (CHANDRA, CHANDRA 2011)

Fyziologické podmínky také hrají důležitou roli při elicitaci. Lepších výsledků lze dosáhnout v intenzivní fázi růstu rostliny, kdy je koncentrace biologicky aktivních látek vyšší v přítomnosti regulátorů růstu. (BAENAS et al. 2014)

U rostlin jsou elicitory schopné vyvolat obranou reakci proti produkci ROS (reaktivní formy kyslíku) nebo zvýšit obsah fytoalexinů, sekundárních metabolitů s antimikrobiálními vlastnostmi. Indukovaná biosyntéza fytoalexinů získává zvláštní důležitost, neboť řada těchto sloučenin se využívá jako léčiva nebo jinak biologicky aktivní látky. Jedním z příkladů může být taxol. Tento diterpenoid byl objeven v kůře tisu a využívá se pro léčbu karcinomu prsa a vaječníku. Poptávka po taxolu je vysoká a syntetická výroba je velmi nákladná. Proto se biosyntéza v tisech stala předmětem intenzivního výzkumu. Elicitace díky tomu nachází i komerční využití, v podobě snížení výrobních nákladů. (ANGELOVA et al. 2006)

Aplikováním elicitorů na rostliny lze také zvýšit kvalitu čerstvých surovin, obohacených potravin nebo výchozích složek potravinářských a krmných výrobků. (BAENAS et al. 2014)

V současnosti je elicitace považována za jednu z nejúspěšnějších metod vedoucí ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů. (BOURGAUD et al. 2001)

Elicitory se rozdělují na biotické a abiotické. Nicméně za elicitory lze považovat také rostlinné hormony. (BAENAS et al. 2014)

4.3.1 Biotické elicitory

Mezi biotické elicitory se řadí:

- Lipopolysacharidy
- Polysacharidy
 - pektin a celulózy, chitosan, chitin a glukany, alginát, arabská guma, guarová guma, karobová guma, extrakt z kvasnic
- Oligosacharidy
 - glukuronidy, guluronát, manan, manuronát
- Proteiny
 - celuláza, cryptogein, glykoproteiny, oligandrin, pektolyáza, rybí bílkovinné hydrolyzáty, laktoferin
- Komplexní přípravky
 - plísňové spory, buněčná stěna mycelia, mikrobiální buněčné stěny
- Patogenní toxiny
 - koronatin
- Extrakt z oregana (BAENAS et al. 2014)

Tabulka 3 Přehled sacharidových elictorů působící na metabolity v rostlinných buněčných kulturách (ANGELOVA et al. 2006)

Elicitor	Culture	Metabolites/products
β -Linked glucopyranosyl	<i>Glycine max</i>	Phytoalexins
α -1,4-Oligogalacturonide	<i>Glycine max</i>	Phytoalexins
Chitosan	<i>N. tabacum</i> , <i>E. californica</i>	Phytoalexins
Hepta- β -glucoside	<i>Glycine max</i>	Phytoalexins
Pectic oligomers	<i>Citrus limon</i>	Phytoalexins
β -1,6-1,3-Glucans	<i>Glycine max</i>	Isoflavonoids
β -Glucan	<i>Glycine max</i>	H ₂ O ₂
β -D-Glucans	<i>N. tabacum</i>	Disease resistance
Chitin	<i>Papaver somniferum</i>	Sanguinarine
Chitosan	<i>Polygonum tinctorium</i>	Indirubin
Chitosan	<i>Lupinus albus</i>	Isoflavonoids
Chito-oligosaccharides	<i>Juniperus chinensis</i>	Podophyllotoxin
Oligogalacturonides	<i>N. tabacum</i>	H ₂ O ₂
Chitosan	<i>Lupinus albus</i>	Genistein
Chitin and chitosan oligosaccharides	<i>Taxus canadensis</i>	Taxol
Chitin, alginate, pectin, guar gum		
rhamosan, xanthan	<i>Morinda citrifolia</i>	Anthraquinones
Laminarin	<i>N. tabacum</i>	H ₂ O ₂
Mannan	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypercins
N-Acetylchitohexaose	<i>Taxus canadensis</i>	Taxol
Chitosan	<i>Rheum palmatum</i>	Anthracene
N-Acetylchito-oligosaccharide	<i>Avena sativa</i>	Anthranilate

4.3.2 Abiotické chemické elicitory

Za abiotické chemické elicitory se považuje:

- Kyselina octová
- Ethylen
- Ethanol
- Silikon
- Benzothiadiazol
- Bioregulátor prohexadione
- Anorganické soli
 - Chlorid rtuťnatý, síran měďnatý, chlorid vápenatý, síran vanadylu
- Kovové ionty
 - Co^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Ag^+ , Ag^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} (BAENAS et al. 2014)
 - ionty lanthanu, europia, vápníku
- Polyaminy
- Oxid dusnatý (RAMAKRISHNA, GOKARE 2011)
- Přípravky na bázi titanu (KUŽEL et al. 2003)

4.3.3 Abiotické fyzikální elicitory

Abiotickými fyzikálními elicitory jsou:

- Sucho
- Extrémní teplotní šok
- Vysoký tlak
- UV záření
- Salinita
- Mechanické poškození
- CO_2
- Ozon (BAENAS et al. 2014)
- pH (BOURGAUD et al. 2001)
- Vysoká nebo nízká teplota
- Zaplavení (RAMAKRISHNA, GOKARE 2011)

Tabulka 4 Sekundární metabolity a rostliny ovlivňované suchem (RAMAKRISHNA, GOKARE 2011)

Secondary metabolite	Plant species
Glycosides	<i>Scrophularia ningpoensis</i>
Morphine alkaloids	<i>Papaver somniferum</i>
Trigonelline	<i>Glycine max</i>
Glucosinolates	<i>Brassica napus</i>
Chinolizidin alkaloids	<i>Lupinus angustifolius</i>
Epicatechins	<i>Camellia sinensis</i>
Betulinic acid	<i>Hypericum brasiliense</i>
Rutine	<i>Hypericum brasiliense</i>
Flavonoids	<i>Prisms sativum</i>
Anthocyanins	<i>Pisum sativum</i>
Chlorogenic acid	<i>Helianthus annuum</i>
Rosmarinic acid	<i>Salvia miltiorrhiza</i>

4.3.4 Fytohormony

Rostlinné hormony jsou přírodní produkty s nízkou molekulovou hmotností, které působí v mikromolární (nebo dokonce nižší) koncentraci a regulují v podstatě všechny fyziologické a vývojové procesy během životního cyklu rostliny. Tyto strukturálně různorodé sloučeniny zahrnují:

- kyselinu abscisovou,
- auxiny,
- brassinosteroidy,
- cytokininy,
- gibereliny,
- ethylen,
- kyselinu jasmonovou případně methyl-jasmonát, (PIOTROWSKA, BAJGUZ 2011)
- kyselinu salicylovou (Kužel et al. 2009),
- methylsalicylát (Kužel et al. 2009; BAENAS et al. 2014),
- kyselinu acetylsalicylovou (Kužel et al. 2009)

Auxiny kontrolují dělení buněk, klíčení, fototropismus a další děje. Gibereliny stimulují dělení buněk, určují stálost tvaru rostliny, regulují geotropismus. Cytokininy

regulují diferenciaci buněk. Ethylen stimuluje dozrávání plodů. Kyselina abscisová reguluje stárnutí, opadávání listů, otevírání průduchů apod. Kyselina jasmonová se uplatňuje v inhibici růstu rostlin, jejich stárnutí a opadávání listů. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Brassinosteroidy jsou například důležitými regulátory růstu rostlin, ovlivňují dělení buněk, reprodukční vývoj, klíčení semen, stárnutí a zrání. (PIOTROWSKA, BAJGUZ 2011)

4.3.5 Příklady využití elicitorů

Tabulka 5 Elicitory zvyšující produkci fenolických sloučenin (BAENAS et al. 2014)

Plant Food	Elicitor Treatment	Application	Target Compounds Class and Increase
“Fuji” apples	Ethephon (2-chloroethyl phosphonic acid) (100 mg/L)	Sprayed for 4 weeks before commercial harvest	Anthocyanins (8-fold), and flavonols (2-fold) during fruit maturation
Grape berry fruits	Ethanol (5 g/100 mL)	Sprayed for 8–9 weeks after anthesis	Anthocyanins (3-fold)
Butter Lettuce	JA 1 μ M	Sprayed after 21 days of germination	Total phenolics (280%) Flavonoids (133%) Phenolic acids (360%)
Lettuce cv. “Lollo Rosso”	UV-full range (UV-A and UV-B)	Radiation during cultivation	Flavonoids (130%) and phenolic acids (200%)
Purple-flesh potatoes	Wounding (vegetable slicer)	After harvest	Total phenolics (60%)
Strawberry fruits	CO ₂ (ambient + 600 μ mol)	28 months	Anthocyanin and flavonols (30%–50%)
Sweet basil	MeJA 0.5 mM	Sprayed when the plants had five or six leaves	Rosmarinic acid (50%) and caffeic acid (38%)
Greek oregano	Chitosan oligosaccharides (50 and 200 mg/L)	Sprayed for 2 weeks prior to the anticipated flowering time	Phenolic acids and flavonoids (30%)
Pea sprouts	Folin acid (50 μ M) and vitamin C (500 μ M) solutions	Soaking seeds for 12–48 h	Total phenolic compounds (20%)
Olive trees organs	Nutrient solution “Brotomax” (0.3 g/100 mL) (urea nitrogen, copper, manganese and zinc)	Sprayed for 120 days after anthesis	Tyrosol, catechin, and oleuropein (20%)
Radish sprouts	NaCl (100 mM)	In 0.5% agar media for 3, 5 and 7 days after sowing seeds	Total phenolics (30% and 50% in 5 and 7-days-old sprouts, respectively)
Radish, chinese kale and pak choi 3-day-old sprouts	Glucose (5 g/100 mL)	Hydroponic system for 3 days after sowing seeds	Total phenolics (20%)
Broccoli 7-day-old sprouts	Sucrose, fructose and glucose (146 mM)	In 0.5% agar media for 5 days after sowing seeds	Total anthocyanins (10%)
Broccoli 7-day-old sprouts	Sucrose and mannitol (176 mM)	Hydroponic system for 5 days after sowing seeds	Total anthocyanins (40%) and phenolics (50%)

Tabulka 6 Přehled elicitorů zvyšujících produkci glukosinolatů (BAENAS et al. 2014)

Plant Food	Elicitor Treatment	Application	Target Compounds Class and Fold Increase
Brassica 7-day-old sprouts cotyledons and leaves	JA spray (5 nmol)	Topically	3-indolylmethyl GLS (6-fold) in <i>B. napus</i> ; 4-hydroxy-3-indolylmethyl GLS (9-fold) in <i>B. rapa</i> ; both indole GLS (2-fold) in <i>B. juncea</i>
Turnip root exudates	MeJa (130 µM)	Added in the hydroponic system for 10 days	Indole GLS (4-fold)
Broccoli sprouts	Sucrose (146 mM)	In 0.5% agar media for 5 days after sowing seeds	Total GLS (2-fold)
Broccoli 7-day-old sprouts	1. Methionine (5 mM) 2. Tryptophan (10 mM) 3. SA (100 µM) 4. MeJA (25 µM)	Daily exogenous spraying during 3, 5 and 7 days	1. Aliphatic GLS (30%) 2. Indole GLS (80%) 3. Indole GLS (30%) 4. Indole GLS (50%)
Radish, chinese kale and pak choi 3-day-old sprouts	Glucose (5 g/100 mL)	Hydroponic system for 3 days after sowing seeds	Gluconapin (150% and 60% in Chinese kale and pak choi, respectively) Glucobrassicinapin (110-fold in pak choi)
Sauerkraut (<i>B. oleracea</i> L. var. capitata)	0.5% NaCl and 0.3 mg of sodium selenite/kg	Added to fresh cabbage before fermentation	Indole GLS hydrolysis products (indole-3- carbinol and indole-3- acetonitrile in 70% and 10%, respectively)
Radish sprouts	NaCl (100 mM)	In 0.5% agar media for 3, 5 and 7 days after sowing seeds	Total GLS (50% and 120% in 5 and 7-days-old sprouts, respectively)
<i>Brassica</i> 8-day-old sprouts	MeJA (25 µM) JA (150 µM) Sucrose (146 mM)	Sprayed for 5 days before harvest	Total GLS Broccoli: >50% Turnip: >20% Rutabaga: >100%
<i>Raphanus</i> 8-day-old sprouts	MeJA (25 µM) SA (100 µM) Glucose (277 mM)	Sprayed for 5 days before harvest	Total GLS: > 20%
Broccoli 7-day-old sprouts	Sucrose and mannitol (176 mM)	Hydroponic system for 5 days after sowing seeds	Total GLS: > 50%
Broccoli florets	Ethanol evaporated (500 µL/L)	6 h after harvested	Total GLS: > 50%
Broccoli florets	MeJA spray (250 µM)	Aerial portions twice per week from flowering to head formation	Indolyl GLS: > 30%

Tabulka 7 Přehled elicitorů působících na sekundární metabolity (Sharma et al. 2011)

Plant	Product (s)	Elicitor (s)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Indole glucosinolates, Camalexin	<i>Erwinia carotovora</i> .
<i>Cupressus lusitanica</i>	Beta-thujaplicin	Fungal elicitor
<i>Medicago truncatula</i>	Beta-amyrin	Yeast elicitor
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Diterpenoid tanshinones	Yeast elicitor
<i>Silybum marianum</i>	Silymarin	Yeast extract
<i>Coleus forskolin</i>	Methyl jasmonate (MeJA)	Forskolin
<i>Panax ginseng</i>	Saponins	Low-energy ultrasound
<i>Taxus chinensis</i>	Trifluoroethyl salicylate (TFESA)	Taxuyunnanine C (Tc)
<i>Datura stramonium</i>	Alkaloids (tropane)	<i>Phytophthora megasperma</i>
<i>Azadirachta indica</i>	Azadirachtin	Jasmonic acid, salicylic acid
<i>Nicotiana tabacum</i>	Capsidiol, debneyol, scopoletin, nicotine	Cryptogein
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Nicotine	Cellulase, MeJA
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Diterpenoid tanshinones	Yeast elicitor
<i>Glycine max</i>	Glyceollins, apigenin, genistein, luteolin	Glucan, MeJA
<i>Dacus carota</i>	Methoxymellein, 4-hydroxybenzoic acid	Fungal elicitor
<i>Ocimum basilicum</i>	Rosmarinic acid	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Rhodiola sachalinensi</i>	Salidroside	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Ganoderma lucidum</i>
<i>Panax ginseng</i>	Saponin	Oligogalacturonic acid Low energy ultra sound
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Scopoletin	Fungal elicitor, MeJA
<i>Ammi majus</i>	Scopoletin	<i>Enterobacter sakazaki</i>
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Soyasaponin, 5-deoxyflavonoid	MeJA
<i>Vitis vinifera</i>	Stilbene, resveratrol, anthocyanins	MeJA, ethylene
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Tanshinone	Hyperosmotic stress, yeast elicitor
<i>Taxus chinensis</i>	Taxol	Fungal elicitation
<i>Brugmansia suaveolens</i>	Tropane alkaloids	<i>Spodoptera frugiperda</i> Methyl jasmonate
<i>Catharanthus roseus</i>	5'-phosphodiesterase (Pdase)	<i>Alteromonas acleodii</i> , alginate oligomers
<i>Rubia tinctorum</i>	Anthraquinone derivatives	Fungal polysaccharides, SA, JA
<i>Pinellia ternata</i>	Alkaloids	<i>Pseudomonas</i> sp. and <i>Enterobacter</i> sp.
<i>Vanilla planifolia</i>	Vanillin	Acetone dried red (beetperoxidase)
<i>Abrus precatorius</i>	Glycyrrhizin	<i>Aspergillus niger</i> and <i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Calendula officinalis</i>	Oleanolic acid	<i>Trichoderma viride</i> , pectin, chitosan
<i>Pueraria candollei</i> var. <i>candollei</i> and <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>	Isoflavonoid	Laminarin, Chitosan, oligosaccharide, MeJA
<i>Carthamus tinctorius</i>	α -tocopherol and pigment	<i>Trametes versicolor</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Penicillium notatum</i> , <i>Rhizopus</i> <i>stolonifer</i> and <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> and abiotic (NaCl, MgSO ₄ , FeSO ₄ , ZnSO ₄ , and FeCl ₃)

Tabulka 8 Přehled elicitorů působících na sekundární metabolity, pokračování tab. 8 (SHARMA et al. 2011)

Plant	Product (s)	Elicitor (s)
<i>Taxus chinensis</i>	Taxol	Nitric oxide
<i>Ginkgo biloba</i>	Bilobalide and ginkgolides	Biotic
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides	Fungal
<i>Vaccinium corymbosum</i>	Non-volatile phenolic compounds	UV-B radiation
<i>Drosera burmanii</i>	pPlumbagin	Methyl jasmonate, yeast Extract and chitosan
<i>Arabidopsis</i>	Indole glucosinolates, camalexin	Thaliana Fungal elicitor, MeJA, SA; JA-independent
<i>Coleus blumei</i>	Rosmarinic acid	Yeast elicitor
<i>Eschscholtzia californica</i>	Benzophenanthridines, sanguinarine	MeJA, Fungal elicitor <i>Puccinia cornoata</i> phytotoxin Victorin
<i>Avena sativa</i>	Avenanthramides	
<i>Catharanthus roseus</i>	Ajmalicine, catharanthine, vindoline	Yeast elicitor, MeJA
<i>Eschscholtzia californica</i>	Benzophenanthridines, sanguinarine	MeJA, Fungal elicitor
<i>Glycine max</i>	Glyceollins, apigenin, daidzein, genistein, luteolin	h-glucan, MeJA, 12-oxo-PDA; Glutathione
<i>Cupressus lusitanica</i>	β -thujaplicin	Oligosaccharide, MeJA
<i>Daucus carota</i>	Fungal elicitor from <i>Pythium aphanidermatum</i>	6-methoxymellein; 4-hydroxybenzoic acid
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Soyasaponin 5-deoxyflavonoid	MeJA
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shikonin, rosmarinic acid	Polysaccharides, fungal elicitor, MeJA
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Solavetivone, rishitin, lubimin, scopolamine	SA
<i>Oryza sativa</i>	Momilactones, sakuranetin, phytocassans	N-acetylchitoheptaose, MeJA, sphingolipid cerebrosides
<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin, pseudohypericin, hyperforin	Mannan, Colletotrichum gloeosporioides infection

Tabulka 9 Přehled různých abiotických elicitorů a jejich vliv na produkci různých sekundárních metabolitů v rostlinách (Ramakrishna, Gokare 2011)

Plant species	Abiotic factor	Secondary metabolite
<i>Ocimum basilicum</i>	Methyl Jasmonate	Rosmarinic acid, Caffeic acid
<i>Beta vulgaris</i>	Calcium, magnesium, manganese, zinc, copper, iron and cobalt	Betalain
<i>Dioscorea bulbifera</i>	CuSO ₄	Diosgenin
<i>Beta vulgaris</i>	Metal ions	Betalaines
<i>Beta vulgaris</i>	Polyamines and MeJ	Betalaine
<i>Taxus chinensis</i>	Lanthanum	Taxol
<i>Beta vulgaris</i> and <i>Tagetes patula</i>	Micro algal extracts	Betalaine
<i>Vitis vinifera</i> suspension cultures	Jasmonic acid and light irradiation	Anthocyanin
<i>Beta vulgaris</i>	Spermidine, Putrescine and Cu ²⁺	Betalaine
<i>Beta vulgaris</i>	polyamines	Betalaine
<i>Brugsmansia candida</i>	Salicylic acid	Scopolamine Hyposcyamine
<i>Lepidium sativum</i>	Zn ²⁺	Lepidine
<i>Cichorium intybus</i>	Polyamines	Coumarins
Capsicum	Nitrate and phosphate	Capsaicinoids
Capsicum	Cinnamic acid, coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid	Capsaicin production
<i>Vanilla planifolia</i>	Blue light	Vanillin
<i>Amaranthus caudatus</i>	Cu ²⁺	Betacyanins
<i>Vitis vinifera</i>	Sucrose Osmotic stress	Anthocyanin

4.3.6 Elicitace pomocí kyseliny acetylsalicylové

Kyselina acetylsalicylová (ASA) je bílý krystalický prášek běžně známý pod názvem Aspirin nebo Acylpyrin. Chemický systematický název je kyselina 2-acetyloxybenzoová. (MYERS 2007)

Už v dobách okolo roku 400 před naším letopočtem se vědělo, že horečku lze snížit žvýkáním vrbové kůry. Počátkem 19. století bylo zjištěno, že účinnou látkou je aromatická sloučenina salicin. Salicin se hydrolyzou může převést na salicylalkohol a ten následně oxidací na salicylovou kyselinu (SA). SA je pro snížení horečky ještě účinnější než salicin a zároveň tlumí bolest a působí protizánětlivě. Každodenní užívání však působí příliš agresivně na žaludeční stěny. Přeměnou fenolické skupiny –OH na ester s kyselinou octovou byla připravena kyselina acetylsalicylová, která je rovněž účinná jako kyselina salicylová a na nepůsobí tak agresivně na žaludeční stěny. (MCMURRY 2007)

Z dalších rostlin obsahující SA nebo její deriváty lze kromě vrby jmenovat také libavku nebo rostliny z čeledi myrtovité. (MCMURRY 2007) Dále byla SA izolována

například z tužebníku jilmového nebo břízy tuhé. (Bourgaud et al. 2001) Vyskytuje se také v plodech maliníku obecného a jahodníku obecného. Má bakteriocidní účinky a používá se jako antiseptikum. Salicylové deriváty mají účinky antipyretické, antirevmatické a analgetické. (NOVÁČEK 2009)

Některé kyseliny včetně SA jsou i složkami kouře používaného pro uzení potravin. V ovoci se vyskytuje jen v malém množství (0,3-3 mg/kg). Účastní se termogeneze, metabolismu minerálních látek, indukuje kvetení rostlin, ovlivňuje resistenci vůči patogenům, biosyntézu ethylenu a jiné děje. Přítomna je také ve formě glykosidu a esterů. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ 2009)

Průmyslově se kyselina acetylsalicylová vyrábí acetylací *o*-hydroxybenzoové (salicylové) kyseliny acet-anhydridem. (PACÁK 2007)

Aspirin je řazen mezi nejrozšířenější léky na světě. V USA je spotřeba kyseliny acetylsalicylové více než 10 000 tun ročně a celosvětová roční spotřeba je odhadována na 45 000 tun. (MCMURRY 2007)

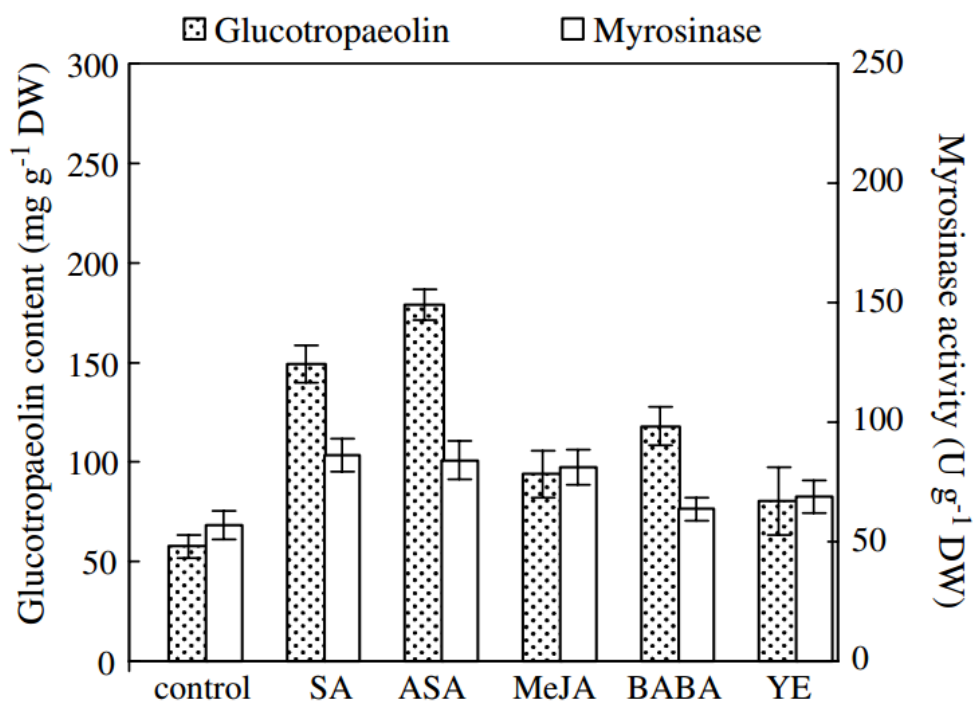
SA je dobře známá jako induktor rostlin při systematické rezistenci a v interakci rostlina-patogen. SA se rychle hromadí v místě infekce v průběhu útoku patogenu a u rostlin vyvolává hypersenzitivní reakce, následně se šíří i do dalších částí rostliny. Současně SA indukuje genovou expresi související s biosyntézou a výrobou některých tříd sekundárních metabolitů v rostlinách. (ZHAO et al. 2005)

ASA podstupuje v rostlinách spontánní hydrolýze na SA a obě tyto sloučeniny mají podobný účinek. (KHAN et al. 2015)

U barvínkovce růžového (*Catharanthus roseus*) kultivovaného in vitro vedlo přidání různých koncentrací (0,5-20 mM) ASA k pozoruhodným účinkům na produkci sekundárních metabolitů. Došlo k nárůstu o 505 % u celkových alkaloidů, 1587 % u celkových fenolických látek, 612 % u celkových furanokumarinů a 1476 % u celkových anthokyanů. (GODOY-HERNADEZ, LOYOLA-VARGAS 1997)

Účinky elicítace pomocí ASA na produkci glucotropaeolinu a aktivity myrosinasy byly studovány v kořenové kultuře lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*). ASA indukovala trojnásobné zvýšení produkce glucotropaeolinu oproti kontrolnímu vzorku, lepší aktivitu myrosinasy, ale menší prodloužení kořenů (asi o 50 %). (WIELANEK, URBANEK 2006)

Obr. 6 Obsah glucotropaeolinu a aktivita myrosinasy v kořenové kultuře 6. den po ošetření elicitory u lichořeřišnice větší. (SA-kyselina salycilová, ASA-kyselina acetylsalicylová, MeJA-methyl jasmonát, BABA-D,L- β -aminobutyrová kyselina, YE-kvasnicový extrakt (WIELANEK, URBANEK 2006)

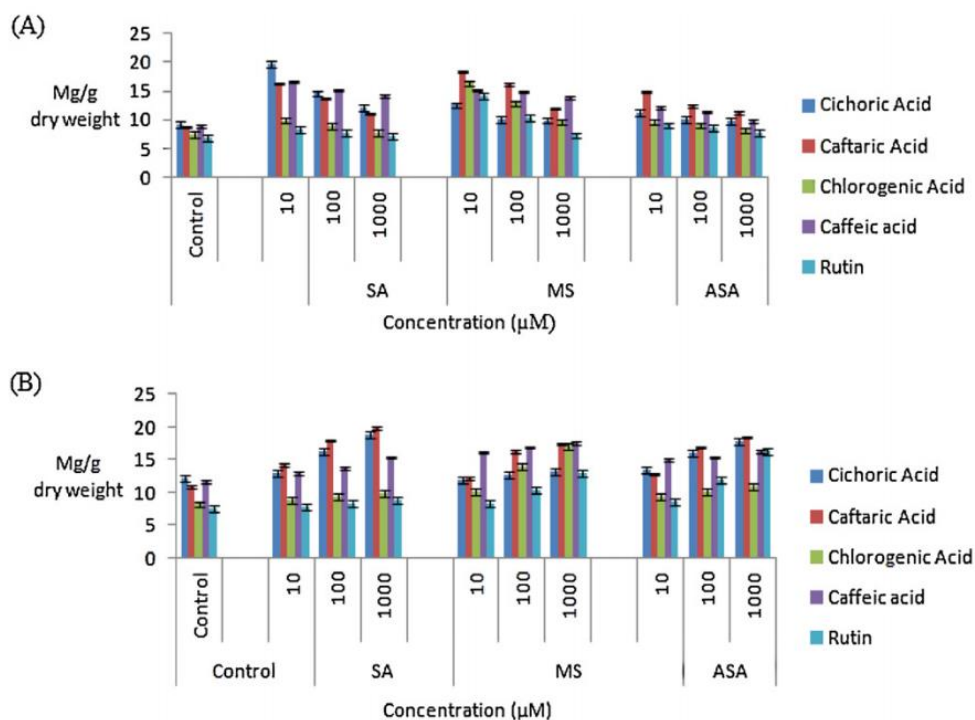


Isoflavonoidy často chybějí nebo jsou přítomné pouze ve velmi nízkých koncentracích u zdravých potravin např. u luštěnin. Ošetření kořenové kultury fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) po dobu 4 hodin 1,45 mM kyselinou acetylsalicylovou a dalšími elicitory mělo za cíl ověřit jejich vliv na obsah isoflavonoidů, kumestanů a pterokarpanů. ASA vykazovala pozoruhodně indukující účinek na obsah sledovaných látek, zejména u pterokarpanů byl její vliv v porovnání s dalšími elicitory nejlepší. (DURANGO et al. 2014)

Zmijovice hadová (*Rauvolfia serpentina*) je důležitá z důvodu přítomnosti indolových alkaloidů, které jsou lokalizovány v kořenech. Nejvýznamnějším z těchto alkaloidů je reserpin, užitečný při léčbě nervových poruch, hypertenze a jiných kardiovaskulárních onemocněních. Cílem jedné studie bylo vyhodnotit účinky tří přírodních elicitorů (SA, methylsalicylát (MS), ASA) v různých koncentracích na obsah fenolických kyselin u zmijovice hadové. Všechny elicitory byly použity k postřiku na list ve třech různých koncentracích (10, 100 a 1000 μ M), postřik vodou byl kontrolní. Postřik byl aplikován s intervalem dvacet dnů, 50., 70. a 90. den po

výsadbě. Rostliny byly sklizeny 100. den po výsadbě. Analýzou byl prokázán pozitivní efekt elicitace SA a jejích derivátů na sekundární metabolity. Obsah fenolických kyselin a flavonoidu rutinu byl u všech vzorků zvýšen. Na množství sledovaných látek má kromě elicitoru vliv i jeho koncentrace a také určitá část rostliny. (NAIR et al. 2013)

Obr. 7 Vliv elicitoru na obsah fenolových kyselin a rutinu u zmijovice hadové (A) ve výhonech a (B) v kořenech. (NAIR et al. 2013)

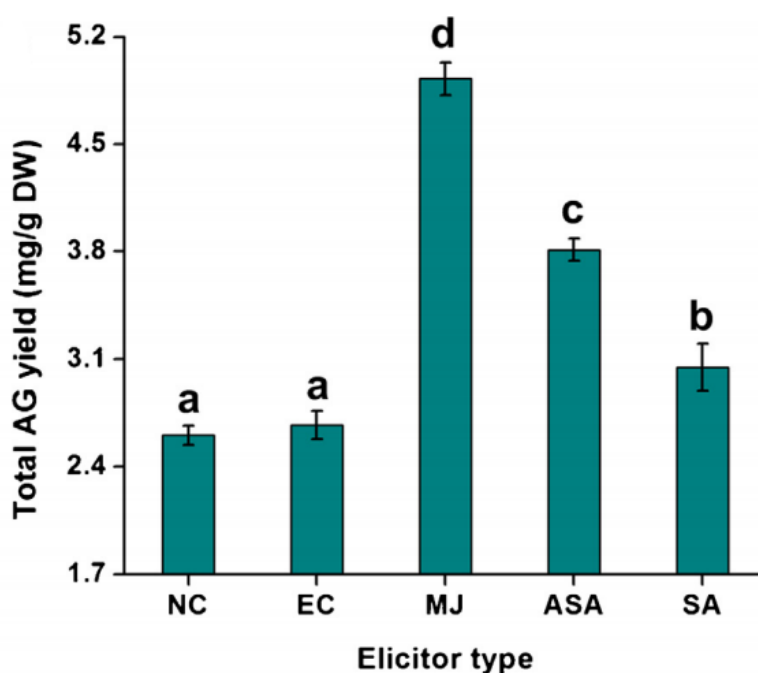


Obecně platí, že isoflavonoidy mohou působit jako fytoalexiny nebo fytoanticipiny k ochraně rostlin před nepříznivými vlivy. Nicméně množství isoflavonoidů v kořenech rostlin rostoucích volně v přírodě nebo záměrně pěstovaných často kolísá z důvodu jejich citlivosti na podmínky prostředí. Proto byly zkoumány elicitory methyl-jasmonát (MJ), SA a ASA pro jejich možný vliv na zvýšení produkce isoflavonoidů v kořenové kultuře kozince blanitého (*Astragalus membranaceus*). Kozinec je důležitým zdrojem isoflavonoidů jako jsou například calycosin-7-*O*- β -D-glukosid, ononin, astraisoflavan-7-*O*- β -D-glukosid, calycosin a formononetin. Elicitace byla provedena roztoky elicatorů o koncentraci 150 μM a s dobou expozice 36 hod. Všechny elicitory zvýšily výtěžky isoflavonoidů v rozmezí 303,28-1933,91

$\mu\text{g/g}$ sušiny oproti neošetřenému kontrolnímu vzorku s obsahem isoflavonoidů $231,64 \pm 6,51 \mu\text{g/g}$ sušiny. (GAI et al. 2015)

Další pokus u kozince blanitého měl za cíl prověřit vliv elicitorů MJ, SA a ASA na zvýšení obsahu astragalosidů. Elicitory vykazovaly zřetelné účinky na výnos astragalosidů, který byl pravděpodobně spojený s aktivací různých signálních drah syntetizující různé úrovně sekundárních metabolitů během jejich zprostředkované obranné reakce. Jak je patrné z následujícího obrázku výnos astragalosidů se pohyboval v rozmezí 3,0-4,9 mg/g sušiny ve srovnání s 2,6 mg/g sušiny v kontrolním vzorku a 2,7 mg/g sušiny v kontrolním vzorku ošetřeném ethanolem. (JIAO et al. 2016)

Obr. 8 Účinky MJ, SA a ASA na celkovém výtěžku astragalosidů u kozince blanitého. (NC-kontrolní vzorek, EC-kontrolní vzorek ošetřený ethanolem, elicitory MJ, SA, ASA) (JIAO et al. 2016)



Z pokusů prováděných v České republice lze uvést práce zaměřené na zhodnocení vlivu elicitoru ASA na obsah vybraných účinných látek v semeni ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). ASA byla použita ve třech různých koncentracích, a to $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ označena jako nízká, $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ jako střední a $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ jako vysoká koncentrace. Na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích byl

prokázán vliv elicitoru ASA na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského. Při aplikaci ASA ve vysoké koncentraci vzrostl procentický obsah silymarinu o 16,48 %, u nízké koncentrace ASA o 9,12 % a u střední koncentrace o 4,21 %. Na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic však nebyl ani v jednom případě účinek ASA na zvýšení obsahu silymarinové složky prokázán, dokonce došlo ke snížení obsahu účinných látek při aplikaci ASA ve střední a vysoké koncentraci. (GRAMANOVÁ 2009)

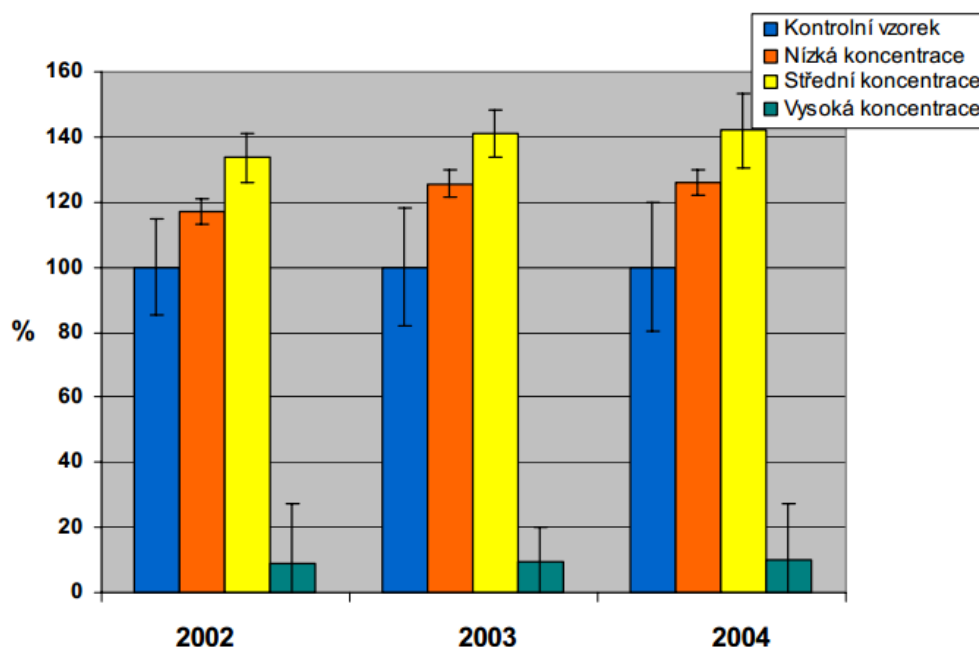
Jiná práce zaměřená na studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském uvádí, že aplikace elicitoru ASA o vysoké koncentraci je nevhodná. Podstatně se použitím tohoto elicitoru redukuje obsah účinných látek v semenech a takto vysoká koncentrace elicitoru ASA je zřejmě pro rostlinu již toxická. (DVOŘÁKOVÁ 2009)

Další pokus s elicitací ASA u ostropestřce mariánského rovněž ukázal, že rozdíl ve zjištěných koncentracích sledovaných látek mezi vzorky skupiny rostlin s aplikací elicitoru ASA a kontrolní skupiny s aplikací vody nebyl statisticky průkazný u žádné účinné látky. Rovněž byl sledován statisticky neprůkazný trend snižování obsahu všech účinných látek sylimarinového komplexu s rostoucí koncentrací elicitoru. Používání tohoto elicitoru o daných koncentracích se tedy jeví jako neúčinné, i když statisticky neprůkazný vliv nemusí být zapříčiněn pouze jeho neefektivností, ale může být způsoben mnoha vnějšími abiotickými či biotickými vlivy, které na porost rostlin v maloparcelkovém pokusu působí, a tím ovlivňují i výsledný obsah účinných látek. (PETR 2014)

Třapatka nachová (*Echinacea purpurea*) byla zvolena jako modelová rostlina s cílem ji pěstovat při dosažení maximální produkce vybraných účinných látek. Za tímto účelem byla prováděna foliární aplikace elicitoru ASA ve čtrnáctidenních intervalech ve třech různých koncentracích – nízké, střední a vysoké. Ethanolové extrakty získaných vzorků byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a sledován byl obsah látek flavonoidního charakteru kyseliny kávové, kaftarové, cichorové a chlorogenové. Analýzou byl prokázán odlišný vliv elicitorů na obsah sledovaných látek v jednotlivých částech rostliny. U nati je efekt elicitorů méně průkazný a je výrazněji ovlivněn ročníkem. V kořenech, které jsou hlavní částí rostliny pro farmaceutické a jiné využití se použití elicitoru ASA projevilo výrazněji. Nízká a především střední koncentrace ASA je pro obsah účinných látek v kořenech rostliny

zásadní, při vysoké koncentraci ASA se již obsah účinných látek oproti tomu snižuje. Pravděpodobně se projevuje negativní vliv stresu, znatelný zejména u obsahu kyseliny kávové. Použití střední koncentrace elicitoru ASA se projevilo zvýšením všech sledovaných látek, největší nárůst byl zaznamenán u obsahu kyseliny chlorogenové. Trend změn obsahu sledovaných látek byl prakticky totožný v průběhu třech sledovaných let a bylo potvrzeno, že účinkem elicítace se mění vzájemný poměr účinných látek. Především se zvyšuje obsah kyseliny kaftarové, cichorové a chlorogenové oproti metabolickému meziproduktu kyseliny kávové. (ŠRÁMEK 2007)

Obr. 9 Procentický obsah kyseliny kávové v křenech třapatky nachové v jednotlivých letech v závislosti na koncentraci elicitoru. (ŠRÁMEK 2007)



Přírodní rostlinné stresory a jejich deriváty (kyselina acetylsalicylová, kyselina salicylová a methyl salicylát), jakož i nově zavedený biokompatibilní elicitor na bázi askorbátu titanu byli také použity ve formě listové aplikace u léčivé rostliny třapatky nachové pěstované v půdě pro zvýšení obsahu biologicky aktivních fenolických látek. Bylo dosaženo významného nárůstu fenolických látek (až 10 krát ve srovnání s kontrolou), a stimulace výtěžku biomasy. Tato metodika představuje výhodnou alternativu k pěstování rostlin v buněčné suspenzi nebo hydroponických kulturách a nabízí široké uplatnění v zemědělské praxi. (Kužel et al. 2009)

V souvislosti s třapatkou nachovou lze zmínit i český patent na přípravek pro indukcii zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin v rostlinách. Ekologicky nezávadné a netoxické přípravky obsahující rostlinné stresové hormony, jejich deriváty a sloučeniny titanu vyvolávají po aplikaci formou foliárního postřiku v celých intaktních rostlinách zvýšení obsahu farmakologicky významných produktů sekundárního metabolismu. Vysoká účinnost těchto přípravků na zvýšení obsahu některých fenolických látek v extraktu byla prokázána právě u třapatky nachové. (CÍGLER et al. 2006)

Předpokládá se, že při interakci iontů titanu a rostlin titan konkurenčně nahrazuje některé podstatné prvky z jejich přirozených vazebných míst a způsobuje zdánlivé nedostatky podstatných prvků (zejména Fe a Mg). To má za následek komplikované obranné reakce, které mohou zvýšit zdravotní stav rostliny a převážit nad toxickými účinky titanu. Zda bude účinek titanu pozitivní nebo negativní závisí na dávce a na síle obranné reakce rostliny. (KUŽEL et al. 2007)

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této diplomové práce bylo prostřednictvím maloparcelkového pěstování ověřit vliv elicitorů na obsah vybraných účinných látek v kotvičnicku zemním (*Tribulus terrestris L.*). Elicitem v této práci byla kyselina acetylsalicylová (dále jen ASA) o třech různých koncentracích (10^{-3} mol.l⁻¹, 10^{-4} mol.l⁻¹, 10^{-5} mol.l⁻¹) aplikovaná postřikem. Kontrolní porost kotvičnicku byl postřikován pouze vodou.

Z vypěstovaných rostlin byla provedena UHPLC-MS/MS analýza steroidních saponinů. Pro analýzu byla použita metodika vyvinutá v Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha vedená ing. Martinem Kuchařem Ph. D. Analýzy provedla PharmDr. Petra Mikšátková rovněž ve stejné laboratoři.

5.1 Maloparcelkové pěstování

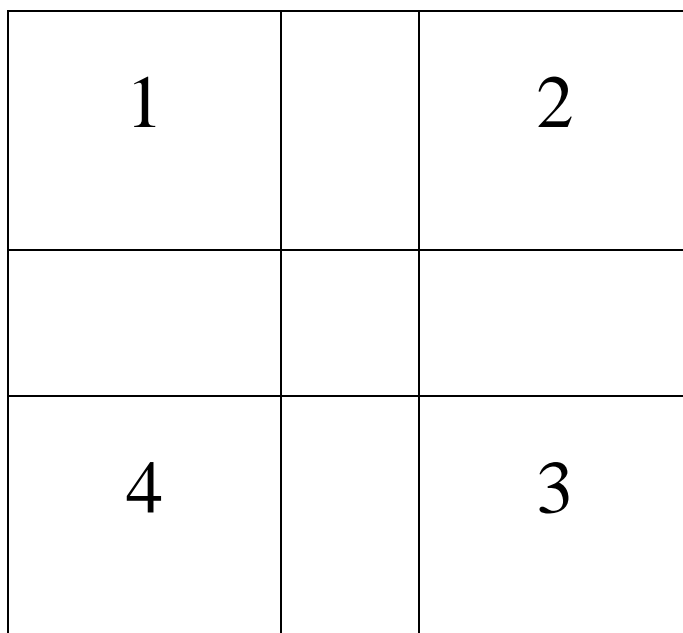
Za účelem provedení experimentu byl v roce 2014 na zahradě v obci Hradce založen maloparcelkový pozemek. Obec Hradce se nachází zhruba 13 km jihozápadně od Českých Budějovic. Malá vesnice s rozptýlenou zástavbou se rozprostírá na úpatí CHKO Blanský les v nadmořské výšce okolo 494 m n. m.

Podle geomorfologického členění ČR se lokalita nalézá v podcelku Kaplická brázda, celku Novohradské podhůří, oblasti Šumavská hornatina, subprovincii

Šumavská soustava a provincii Česká vysočina. Povrch území je zde mírně svažité. Z regionálně geologického hlediska je podloží lokality budováno krystalickými horninami Šumavské větve moldanubika. Zde se nachází žula (granit), v okolí i granulit a peridotit. Kvartérní pokryv je tvořen svahovými písčitymi hlínami a písčity hlinitými. Na základě makroskopické klasifikace byly popsány zeminy v jednotlivých horizontech. Horizont 0-20 cm: tmavě hnědá humózní hlína písčitá, horizont 20-60 cm: hnědá hlína silně písčitá s příměsí drobných úlomků žuly případně hnědý písek hrubozrnný silně hlinitý.

Pro účely pěstování byly vytvořeny dva záhony o velikosti 2,5 x 2,5 metru. Každý záhon byl rozdělen na 4 parcelky o velikosti 1 x 1 metr s ochrannou uličkou mezi parcelkami se šířkou 0,5 metru. Schéma rozložení pokusných ploch na jednom záhonu znázorňuje níže uvedený obrázek.

Obr. 10 Schéma maloparcelkového pěstování



plocha č. 1: porost postřikovaný vodou

plocha č. 2: porost postřikovaný ASA o koncentraci $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$

plocha č. 3: porost postřikovaný ASA o koncentraci $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$

plocha č. 4: porost postřikovaný ASA o koncentraci $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$

Hnojení pozemku bylo provedeno vyzrálým kompostem na jaře roku 2014 zapraveným rytím. Dávka kompostu byla přibližně 0,5 kg na 1m², ekvivalentní dávce 5 t.ha⁻¹.

Výsev semen kotvičníku byl proveden dne 5. 6. 2014 do upravené půdy s jemným povrchem. Na každou plochu záhonu bylo vyseto 25 semen ve sponu 30 x 15 cm a hloubkou setí 0,5-1 cm. Z celkového počtu 200 vysetých semen vzešlo 112 rostlin v intervalu mezi 7-12 dnem. Vzešlé rostliny byly rovnoměrně rozsázeny v počtu 14 kusů na každou parcelu.

Pro účely postřiku bylo potřeba připravit tři různé koncentrace kyseliny acetylsalicylové. Zásobní roztok s koncentrací 0,1 mol.l⁻¹ byl připraven z 1,80 g ASA rozpuštěné v 50 ml 96% ethanolu s doplněním vodou do objemu 100 ml. Roztok ASA o koncentraci 10⁻³ mol.l⁻¹ vznikl doplněním 10 ml zásobního roztoku o koncentraci 0,1 mol.l⁻¹ do 1 l vody. Roztok ASA o koncentraci 10⁻⁴ mol.l⁻¹ byl vytvořen doplněním 100 ml roztoku o koncentraci 10⁻³ mol.l⁻¹ do 1 l vody. Roztok ASA o koncentraci 10⁻⁵ mol.l⁻¹ byl získán z 10 ml roztoku o koncentraci 10⁻³ mol.l⁻¹ doplněním do 1 l vody. Kontrolní postřik byl prováděn pouze vodou.

Postřik rostlin pomocí zádového pístového postřikovače s regulovatelnou postřikovací tryskou byl naplánován vždy po 20 dnech. Nicméně bylo vždy potřeba přihlídnout k aktuálnímu stavu počasí nebo jeho předpovědi a termín postřiku přizpůsobit. Postřik byl prováděn za suchého počasí bez deště a bez vyhlídky deště v následujících hodinách. Rostliny byly postřikovány v dopoledních nebo podvečerních hodinách. První postřik tak byl proveden 5. 7. 2014, druhý 26.7 2014 a poslední třetí 24. 8. 2014.

Sklizeň byla provedena jednorázově dne 8. 9. 2014. Z důvodu poměrně deštivých dnů na konci měsíce srpna a začátku září 2014 byla část porostu zasažena plísní. Faktor počasí společně s hustotou porostu tak znehodnotil část sklizně a rostliny se známkou plísně proto byly zlikvidovány. Sklizena byla nať a vyzrálé plody.

5.2 Příprava vzorků

Z usušených plodů a natě byly připraveny vzorky, které byly rozemlety na jemno pomocí elektrického mlýnku (IKA A 11; IKA Werke GMBH&Co.KG, Německo). Jeden gram rostlinného materiálu se extrahoval 10 ml 70 % ethanolu, který obsahoval deuterovaný testosteron o koncentraci 1 µg/ml jako vnitřní standard. Vzorky se 60 minut třepaly při laboratorní teplotě. Následně byly umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně a dalších 60 minut se opět třepaly při laboratorní teplotě. Poté byly extrakty zcentrifugovány (10 minut, 3000rpm, Centrifuga Hettich Universal 320R, Hettich, Německo), následně stokrát naředěny 20 % methanolem a použity pro UHPLC-MS/MS analýzu. Vzorky byly připraveny ve třech opakováních.

5.3 Analýza vzorků

Z připravených vzorků bylo provedeno UHPLC-MS/MS stanovení obsahu steroidních saponinů. S ohledem na dostupnost standardů byl stanoven obsah diosgeninu, protodioscinu, ruscogeninu.

Pro UHPLC-MS/MS analýzy byla použita sestava UHPLC Infinity 1290 (Agilent Technology, USA) spojená s hmotnostním detektorem Q-TOF 6550 (Agilent Technologies, USA). Chromatografická separace probíhala na analytické koloně Zorbax SB-C18 RRHD, 2,1 mm x 100 mm; 1,8 µm (Agilent Technologies, USA) s mobilními fázemi 1 mM fluoridem amonným (mobilní fáze A) a methanolem (mobilní fáze B). Použita byla gradientová eluce s následujícím průběhem: 0 min – 80:20 (A:B); 11 min – 0:100; 15 min – 0:100; 15,2 min – 20:80; 17,5 min – 20:80. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min, teplota kolony 40°C a nástřik vzorku 2 µl.

Pro hmotnostní detekci byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Parametry iontového zdroje byly následující: teplota sušícího plynu (dusík) – 130°C; průtok sušícího plynu – 13 l/min; teplota zmlžovacího plynu (dusík) – 350°C; průtok zmlžovacího plynu – 11 l/min; tlak v nebulizéru – 35 psi; napětí na kapiláře – 4000V. V tzv. all ion MS módu byly sledovány m/z v rozsahu 50 – 1500 a sbírána byla MS (kolizní energie 0 V) a MS/MS spektra (10, 20 a 40 V). Pro akvizici dat a vyhodnocení výsledků byl použit software Agilent MassHunter verze B.05.01 (Agilent Technologies, USA).

Kalibrační křivky pro kvantitativní analýzu vybraných steroidních saponinů (diosgenin, protodioscin, ruscogenin) byly sestaveny z devíti bodů (koncentrace 200,

100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05 µg/ml). Pro potlačení vlivů matrice během analýz byl pro kalibraci použit extrakt volně rostoucího konopí, který sledované saponiny neobsahuje. Extrakt byl připraven stejným způsobem jako extrakty vzorků kotvičnicku.

6. VÝSLEDKY

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (UHPLC-MS/MS) byl u plodů a natě kotvičnicku zemního stanoven obsah diosgeninu, protodioscinu, ruscogeninu.

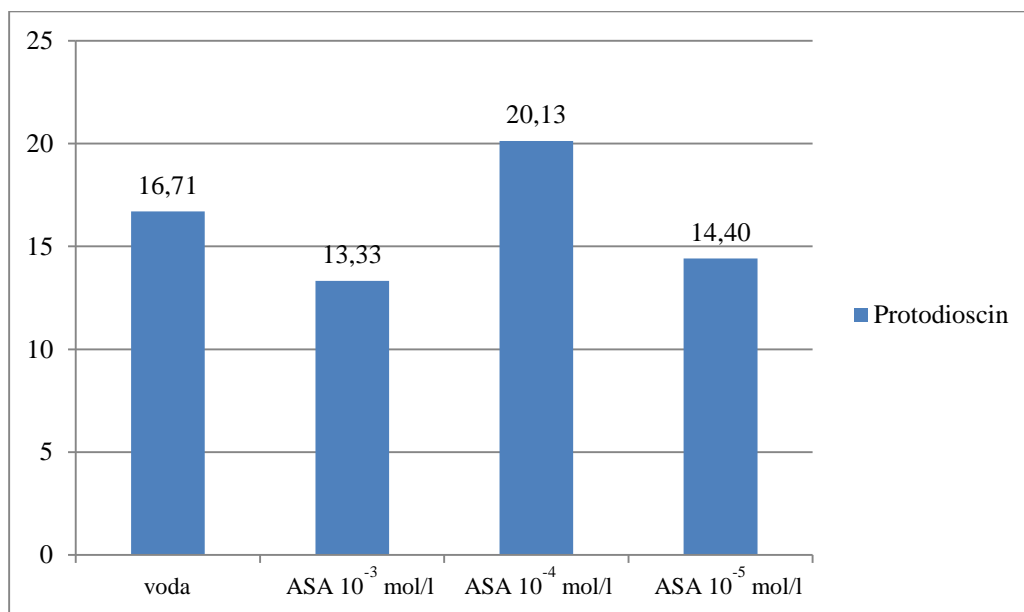
Obsah jednotlivých analyzovaných látek je uveden v příloze v tabulkách č. 10 – 15. Dosažené výsledky jsou vyjádřeny v množství dané látky v µg na 1 gram vzorku a také procenticky. Grafy č. 1-3 vyjadřují vliv jednotlivých koncentrací elicitoru na obsah sledovaných látek v plodu kotvičnicku. Grafy č. 4-6 zachycují vliv jednotlivých koncentrací elicitoru na obsah sledovaných látek v nati kotvičnicku.

Pro každou koncentraci elicitoru nebo kontrolní postřik vodou byly k dispozici dvě pokusné plochy. Ze vzorků z každé plochy byly provedeny 2 měření. V grafickém znázornění je potom vyobrazen aritmetický průměr ze 4 naměřených hodnot.

6.1 Vliv elicitoru na obsah látek v plodu kotvičnicku

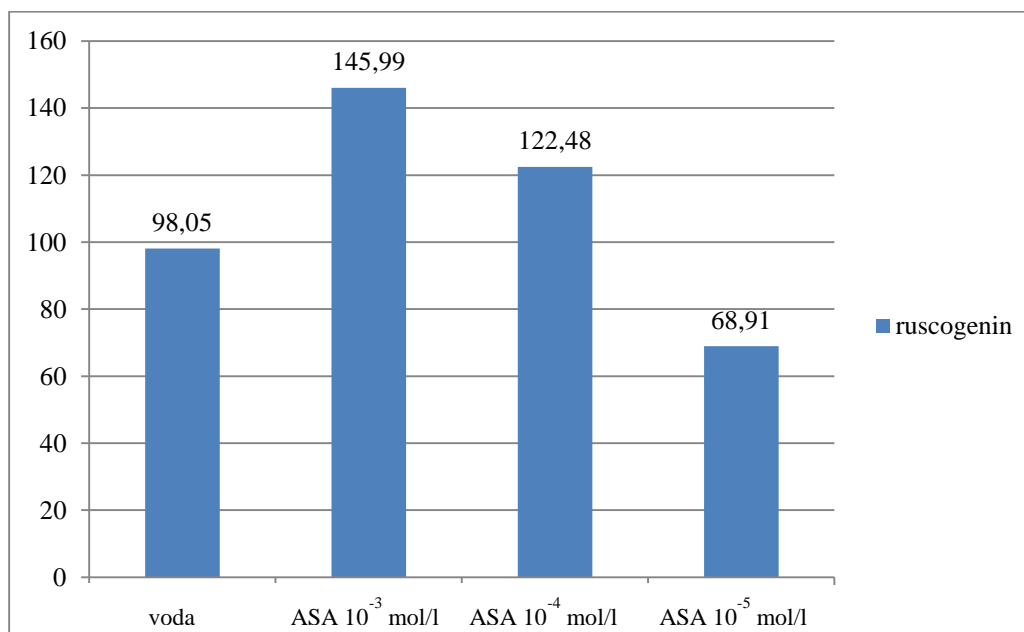
Graf č. 1 znázorňuje vliv různých koncentrací kyseliny acetylsalicylové na obsah protodioscinu v plodech kotvičnicku v µg na 1 gram sušených plodů. Po aplikaci elicitoru o koncentraci 10^{-3} mol/l a 10^{-5} mol/l došlo ke snížení obsahu protodioscinu o 20,2 % a 13,8 %. Naopak elicitor o koncentraci 10^{-4} mol/l obsah protodioscinu zvyšoval o 20,5 %.

Graf 1 Vliv elicitoru ASA na obsah protodioscinu v plodech kotvičníku ($\mu\text{g/g}$)



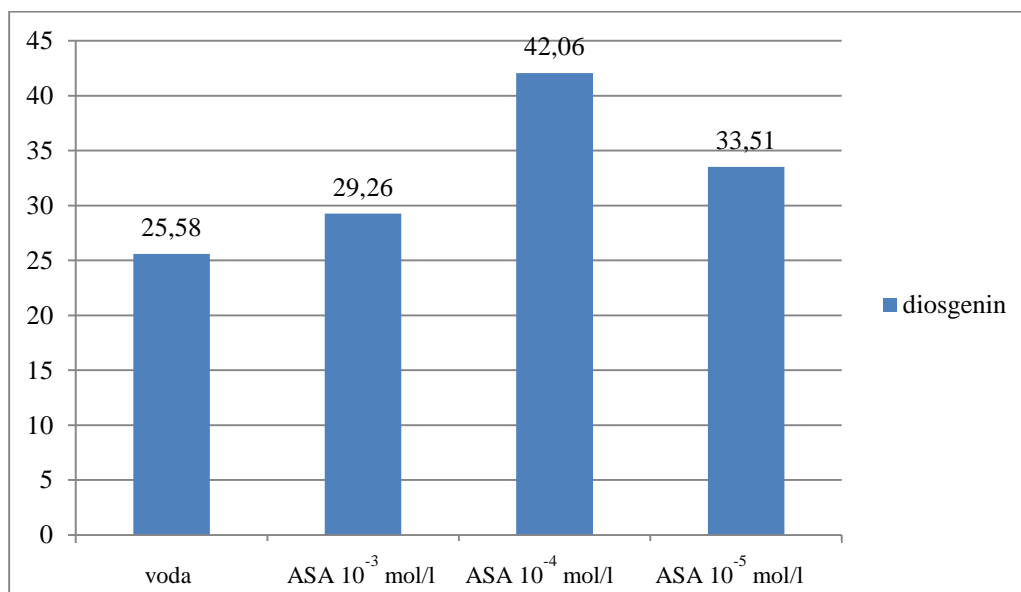
Graf č. 2 uvádí vliv různých koncentrací kyseliny acetylsalicylové na obsah ruscogeninu v plodech kotvičníku v μg na 1 gram sušených plodů. Při aplikaci elicitoru o koncentraci 10⁻⁵ mol/l došlo k snížení obsahu ruscogeninu, konkrétně o 29,7 %. Elicitor o koncentraci 10⁻⁴ mol/l zvyšoval obsah ruscogeninu o 24,9 % a elicitor o koncentraci 10⁻³ mol/l o 48,9 %.

Graf 2 Vliv elicitoru ASA na obsah ruscogeninu v plodech kotvičníku ($\mu\text{g/g}$)



V grafu č. 3 jsou vyobrazeny výsledky vlivu různých koncentrací elicitoru kyseliny acetylsalicylové na obsah diosgeninu v plodech kotvičnicku v μg na 1 gram sušených plodů. Elicitor o všech koncentracích způsobil zvýšení obsahu diosgeninu. Koncentrace 10^{-3} mol/l o 14,4 %, koncentrace 10^{-4} mol/l o 64,4 % a koncentrace 10^{-5} mol/l o 31,0 %.

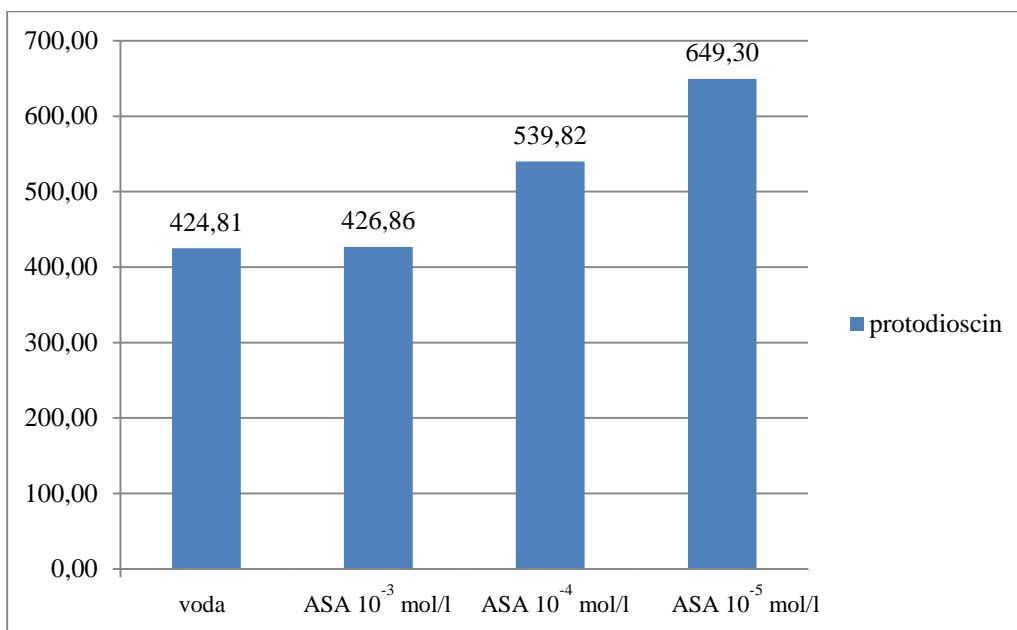
Graf 3 Vliv elicitoru ASA na obsah diosgeninu v plodech kotvičnicku ($\mu\text{g/g}$)



6.2 Vliv elicitoru na obsah látek v nati kotvičnicku

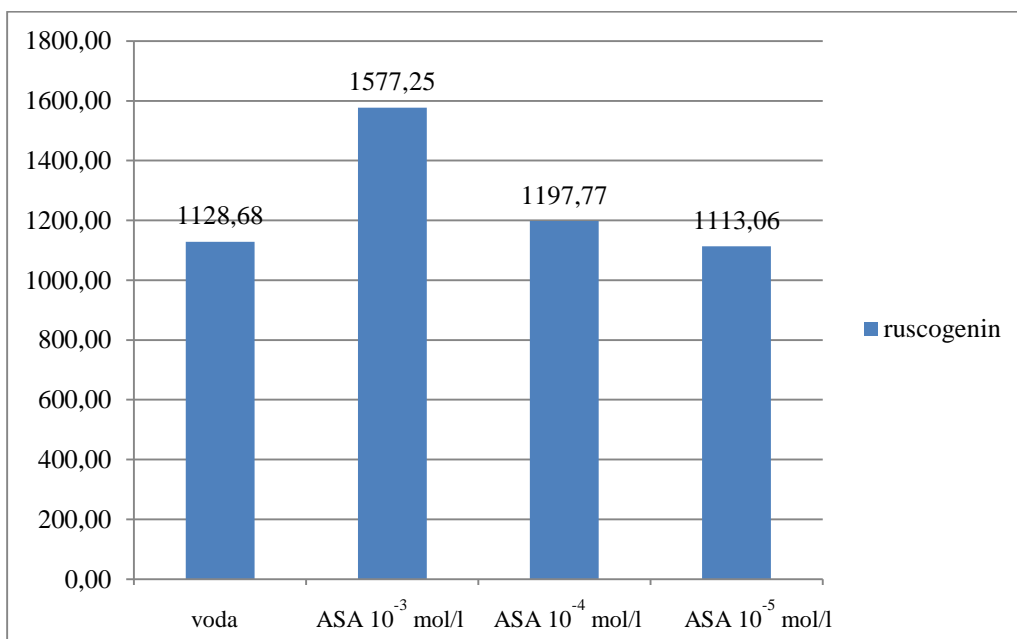
Graf č. 4 vyobrazuje vliv různých koncentrací kyseliny acetylsalicylové na obsah protodioscinu v nati kotvičnicku v μg na 1 gram sušené natě. Po aplikaci elicitoru o koncentraci 10^{-3} mol/l došlo pouze k bezvýznamnému zvýšení obsahu protodioscinu o 0,5 %, ale s aplikací koncentrace 10^{-4} mol/l zrostl obsah protodioscinu o 27,1 % a koncentrace elicitoru 10^{-5} mol/l způsobila zvýšení dokonce o 52,8 %.

Graf 4 Vliv elicitoru ASA na obsah protodioscinu v nati kotvičniku ($\mu\text{g/g}$)



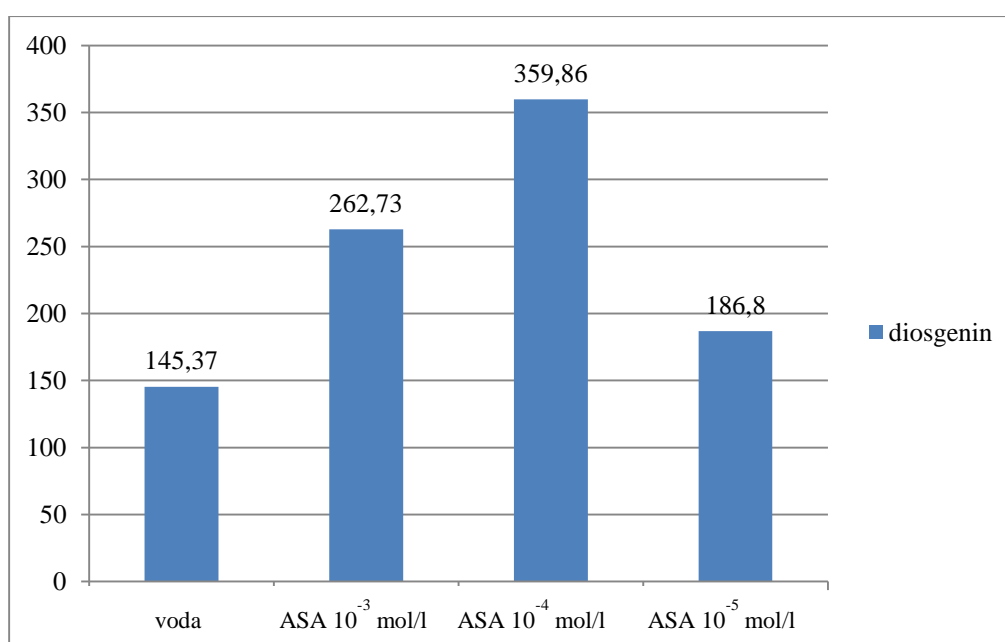
V graf č. 5 jsou znázorněny výsledky vlivu různých koncentrací kyseliny acetylsalicylové na obsah ruscogeninu v nati kotvičniku v μg na 1 gram sušené natě. Po aplikaci elicitoru o koncentraci 10^{-3} mol/l došlo k výraznějšímu zvýšení obsahu ruscogeninu o 39,7 %, ale s aplikací koncentrace 10^{-4} mol/l zrostl obsah ruscogeninu již jen o 6,1 % a koncentrace elicitoru 10^{-5} mol/l způsobila dokonce snížení o 1,4 %.

Graf 5 Vliv elicitoru ASA na obsah ruscogeninu v nati kotvičniku ($\mu\text{g/g}$)



Graf č. 6 jsou uvedeny výsledky vlivu různých koncentrací kyseliny acetylsalicylové na obsah diosgeninu v nati kotvičnicku v μg na 1 gram sušené natě. Po aplikaci všech koncentrací elicitoru došlo ke zvýšení obsahu diosgeninu v nati kotvičnicku a tato zvýšení jsou ve dvou případech nejvyšší z celého experimentu. Aplikace elicitoru o koncentraci 10^{-3} mol/l zvýšila výrazně obsah diosgeninu o 80,7 % a aplikace elicitoru o koncentraci 10^{-4} mol/l o úctyhodných 147,5 %. Koncentrace elicitoru 10^{-5} mol/l pak přinesla také zvýšení obsahu diosgeninu v nati kotvičnicku o 28,5 %.

Graf 6 Vliv elicitoru ASA na obsah diosgeninu v nati kotvičnicku ($\mu\text{g/g}$)



7. DISKUZE

Obecně platí, že růst rostliny ovlivňuje celá řada biotických a abiotických faktorů. Druh látek obsažených v rostlinách je v nich sice geneticky zakódován, ale jejich produkce do značné míry závisí na interakci mezi rostlinou a životním prostředím. Nejinak tomu je i u kotvičnicku zemního, o kterém pojednává tato diplomová práce.

Z odborné literatury lze vyčíst, že obsah látek v kotvičnicku zemním ovlivňují klimatické podmínky respektive lokalita jeho výskytu. Pokud například srovnáme obsah látek podle státu, ve kterém kotvičnick rostl, nalezneme různé hodnoty pro Bulharsko, Turecko, Řecko, Makedonii, Srbsko, Gruzii, Vietnam nebo Indii. (DINCHEV et al. 2008) Stejná situace je při srovnání států Finsko, Bulharsko, Španělsko a Turecko. (DINCHEV et al. 2010) Rozdíly v obsahu látek lze však najít i v rámci jednoho státu, což se potvrdilo na Slovensku v lokalitách Nesvady, Nové Zámky, Nitra, Streda nad Bogrodom (ŠALAMON et al. 2006) nebo také v Bulharsku v mikroregionech Pazardzhik-Plovdiv, Haskovo, Karlovo, Stara Zagora. (IVANOVA et al. 2011)

Kromě obsahu látek se dle původu státu mění i struktura druhů látek, kdy kotvičnick rostoucí ve Vietnamu nebo Indii obsahoval mnohonásobně více tribulosinu v porovnání s kotvičnickem rostoucím v Evropě. (DINCHEV et al. 2008)

V různých fázích růstu rostliny se množství látek rovněž mění. Potvrdilo se to u kotvičnicku rostoucího v Bulharsku a Íránu při sklizni rostlin před kvetením, během kvetením a po kvetení. Například obsah protodioscinu byl nejvyšší ve fázi před kvetením nebo během kvetení. (DINCHEV et al. 2008) Pokusy prováděné na Slovensku ukázaly, že obsah protodioscinu ve stoncích se zvětšuje s jeho délkou a nejvyšší obsah byl pozorován u stonků délky 1,2-1,4 m. (ŠALOMON et al. 2016)

Jednotlivé části rostliny se od sebe také liší množstvím obsažených látek. Slovenský výzkum uvádí, že obsah furostanolových saponinů je vyšší ve stoncích a listech než v kořenech a semenech, přičemž nejnižší obsah byl v semenech. (ŠALOMON et al. 2006) Obsah protodioscinu se u jednotlivých částí kotvičnicku zvyšuje v pořadí kořen, plod a stonky. (ŠALOMON et al. 2016) Analýzy prováděné v Bulharsku ukazují, že obsah saponinů v listech je výrazně vyšší oproti plodům. (DINCHEV et al. 2008) Tento trend je možné vyčíst i z výsledků této práce, kdy množství látek obsažených v nati je výrazně vyšší než u plodů. Nicméně tuto

skutečnost pravděpodobně nelze paušalizovat, neboť MATHUR, SUNDARAMOORTHY (2013) uvádějí vyšší obsah steroidních saponinů u plodů oproti listům, stonku a kořenům.

Ke zvýšení obsahu látek v rostlinách se efektivně využívá metoda zvaná elicítace, při které se používají látky se signálním účinkem, tzv. elicitory, působící jako stresové faktory a spouštějící obrannou odpověď rostlin. Při stresovém stavu rostlina produkuje zvýšené množství sekundárních metabolitů. Elicitorů existuje celá řada, jak je v této diplomové práci také uvedeno a jedním z nich je kyselina acetylsalicylová (ASA).

Tento přírodní rostlinný stresor byl použit ve formě listové aplikace u léčivé rostliny třapatky nachové pěstované v půdě pro zvýšení obsahu biologicky aktivních fenolických látek. Bylo dosaženo významného nárůstu fenolických látek (až 10 krát ve srovnání s kontrolou), a stimulace výtěžku biomasy. (Kužel et al. 2009)

Vlivu elicitoru ASA na obsah vybraných účinných látek byl prověřen u ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Při aplikaci ASA ve vysoké koncentraci vzrostl procentický obsah silymarinu o 16,48 %, u nízké koncentrace ASA o 9,12 % a u střední koncentrace o 4,21 %. (GRAMANOVÁ 2009)

U barvínkovce růžového (*Catharanthus roseus*) kultivovaného in vitro vedlo přidání různých koncentrací ASA k nárůstu o 505 % u celkových alkaloidů, 1587 % u celkových fenolických látek, 612 % u celkových furanokumarinů a 1476 % u celkových anthokyanů. (GODOY-HERNADEZ, LOYOLA-VARGAS 1997)

Účinky elicítace pomocí ASA na produkci glucotropaeolinu a aktivity myrosinasy byly studovány v kořenové kultuře lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*). ASA indukovala trojnásobné zvýšení produkce glucotropaeolinu oproti kontrolnímu vzorku, lepší aktivitu myrosinasy, ale menší prodloužení kořenů (asi o 50 %). (WIELANEK, URBANEK 2006)

Ošetření kořenové kultury fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) kyselinou acetylsalicylovou mělo pozitivní vliv na obsah pterokarpanů. (DURANGO et al. 2014)

Zmijovice hadová (*Rauvolfia serpentina*) je důležitá z důvodu přítomnosti indolových alkaloidů, které jsou lokalizovány v kořenech. Analýzou byl prokázán pozitivní efekt elicítace SA a jejích derivátů na sekundární metabolity. Obsah fenolických kyselin a flavonoidu rutinu byl zvýšen. Na množství sledovaných látek

měla kromě elicitoru vliv i jeho koncentrace a také určitá část rostliny. (NAIR et al. 2013)

V této diplomové práci byla kyselina acetylsalicylová použita ve třech různých koncentracích (10^{-3} mol.l⁻¹, 10^{-4} mol.l⁻¹, 10^{-5} mol.l⁻¹) jako elicitor s cílem ověřit její vliv na obsah vybraných saponinů u kotvičnicku zemního. Pomocí UHPLC-MS/MS analýzy byl stanoven obsah protodioscinu, ruscogeninu a diosgeninu v plodech a nati. Z výsledků je patrné, že elicitor ASA má vliv na všechny tři sledované látky v plodech i v nati. Jednotlivé koncentrace působí specificky na obsah určité látky a různě působí i na konkrétní část rostliny. Na obsah protodioscinu v plodech nejlépe působila koncentrace 10^{-4} mol.l⁻¹, která přinesla zvýšení jeho obsahu o 20,5 % oproti kontrolnímu postřiku vodou. U nati byl pozorován nejvyšší nárůst obsahu protodioscinu s použitím koncentrace 10^{-5} mol.l⁻¹ o 52,8 % ve srovnání s kontrolou. U ruscogeninu se obsah v plodech i v nati vlivem ASA zvýšil výrazněji oproti ostatním koncentracím při aplikaci koncentrace 10^{-3} mol.l⁻¹, konkrétně o 48,9 % u plodu a o 39,7 % u nati vůči kontrole. Obsah diosgeninu zrostl nejvíce v plodech i v nati postřikem ASA o koncentraci 10^{-4} mol.l⁻¹. Vliv ASA o této koncentraci na obsah diosgeninu se projevil ze všech měření nejvýznamněji a znamenal při porovnání s postřikem vodou zvýšení o 64,4 % u plodu a 147,5 % u nati. Na výsledcích lze však také pozorovat i snížení obsahu vybraných látek a to u protodioscinu za použití ASA o koncentraci 10^{-3} mol.l⁻¹ a 10^{-5} mol.l⁻¹. U ruscogeninu pak koncentrace ASA 10^{-5} mol.l⁻¹ znamenala pokles hodnot oproti kontrolnímu vzorku o 29,7 % u plodu a o 1,4 % u nati.

8. ZÁVĚR

Kotvičnick zemi (*Tribulus terrestris* L.) se díky zdokumentovaným pozitivním účinkům na lidské zdraví mezi kterými lze uvést účinky na reprodukci, účinky afrodisiakální, antibakteriální, antikarcinogenní, antioxidační, diuretické, antidiabetické, kardiovaskulární a mnohé další, jeví jako perspektivní léčivá bylina. Účinnými látkami jsou zejména steroidní saponiny, glykosidy, flavonoidy, fytosteroly a alkaloidy.

Cílem této diplomové práce bylo prověřit vliv elicitorů na obsah vybraných účinných látek v této rostlině. Za tímto účelem byl v roce 2014 na zahradě v obci Hradce založen maloparcelkový pozemek pro pěstování kotvičnicku. Elicitem v této práci byla kyselina acetylsalicylová o třech různých koncentracích (10^{-3} mol.l⁻¹, 10^{-4} mol.l⁻¹, 10^{-5} mol.l⁻¹) aplikovaná postřikem. Kontrolní porost kotvičnicku byl postřikován pouze vodou.

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru (UHPLC-MS/MS) a na základě metodiky vyvinuté v Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha byla provedena analýza steroidních saponinů, jmenovitě diosgeninu, protodioscinu, ruscogeninu. Stanoven byl obsah těchto látek v plodech a nati.

Aplikace elicitoru kyseliny acetylsalicylové postřikem během pěstování kotvičnicku prokázala vliv elicitace na obsah sledovaných účinných látek u nati i plodu. U každé ze stanovených látek se různě projevila daná koncentrace elicitoru a specifické bylo i její působení na určitou část rostliny. Ve všech případech lze nalézt minimálně jednu koncentraci kyseliny acetylsalicylové, která způsobila významné zvýšení obsahu diosgeninu, protodioscinu a ruscogeninu. Ve 4 z 12 případů došlo však také ke snížení obsahu vybraných látek, proto je vždy nutné při případném používání kyseliny acetylsalicylové jako elicitoru u kotvičnicku zohlednit její koncentraci. S přihlédnutím k tomuto doporučení lze tento elicitor pro kotvičnick zemi označit za velmi přínosný a pomocí něho dosáhnout podstatného zvýšení obsahu některých steroidních saponinů.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AFFELDT R., Puncturevine Biology and Control. Oregon State University Extension Jefferson County. [online]. 2007 [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: http://ipm.wsu.edu/seedcrops/PPT%20Presentations%20as%20PDFs/Affeldt_Puncturevine_CBVSA.pdf
2. AKHTARI E., KESHAVARZ M., HOSSEINI H., SOHRABVAND F., BIOOS S., KAMALINEJAD M., GHOBADI A. *Tribulus terrestris* for treatment of sexual dysfunction in women: randomized double-blind placebo - controlled study. *Daru: Journal Of Faculty Of Pharmacy, Tehran University Of Medical Sciences* 2014, 22, 40. DOI: 10.1186/2008-2231-22-40. ISSN 20082231.
3. AL-BAYATI F. A., AL-MOLA H. F. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. *Journal Of Zhejiang University. Science. B* 2008, 9(2), 154-9. DOI: 10.1631/jzus.B0720251. ISSN 16731581.
4. AMIN A., LOTFY M., SHAFIULLAH M., ADEGHATE E. The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 2006, 1084, 391-401. ISSN 00778923.
5. ANGELOVA Z., GEORGIEV S., ROOS W. Elicitation of Plants, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. [online]. 2006 [cit. 2016-02-23]. 20:2, 72-83, DOI: 10.1080/13102818.2006.10817345. ISSN: 1314-3530. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2006.10817345>
6. ASHOKKUMAR S., RAVI S., KATHIRAVAN V., VELMURUGAN S. Synthesis, characterization and catalytic activity of silver nanoparticles using *Tribulus terrestris* leaf extract. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular And Biomolecular Spectroscopy* 2014, 121, 88-93. DOI: 10.1016/j.saa.2013.10.073. ISSN 18733557.
7. ASLANI M. R., MOVASSAGHI A. R., MOHRI M., PEDRAM M., ABAVISANI A. Experimental *Tribulus terrestris* Poisoning in Sheep: Clinical, Laboratory and Pathological Findings. *Veterinary research communications* 2003, 27, no. 1(1). ISSN 01657380.
8. ASLANI M. R., MOVASSAGHI A. R., MOHRI M., EBRAHIM-POUR V., MOHEBI A. N. Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in goats. *Small Ruminant Research* 2004, 51(3), 261-267. DOI: 10.1016/S0921-4488(03)00195-0. ISSN 09214488.
9. AUGUSTIN J. M., KUZINA V., ANDERSEN S. B., BAK S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 2011, 72(6), 435-57. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.015. ISSN 18733700.

10. BARTWAL A., MALL R., LOHANI P., GURU S. K., ARORA S.. Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *Journal of plant growth regulation* [online]. 2013, 32, no. 1(1), 216-232 [cit. 2016-03-16]. ISSN 07217595. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-012-9272-x>
11. BAENAS N., GARCÍA-VIGUERA C., MORENO D. A. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules* 2014, 19(9), 13541-13563. DOI: 10.3390/molecules190913541. ISSN 14203049.
12. BECKMAN C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2000, 57, 101-110. doi:10.1006/pmpp.2000.0287. ISSN 0885-5765.
13. BERKMAN Z., TANRIOVER G., ACAR G., SATI L., ALTUG T., DEMIR R. Changes in the brain cortex of rabbits on a cholesterol-rich diet following supplementation with a herbal extract of *Tribulus terrestris*. *Histology and histopathology* 2009, 24(6), 683-692. ISSN 02133911.
14. CEK S., TURAN F., ATIK E. Masculinization of Convict Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) by immersion in *Tribulus terrestris* extract. *Aquaculture international* 2007, 15(2), 109-119. ISSN 09676120.
15. CÍGLER P., HRUBÝ M., KUŽEL S. Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin v rostlinách a jejich použití. Česká republika. Patentový spis CZ 296300 B6. 3. 1. 2006
16. CONRAD, J., D. DINCHEV, I. KLAIBER, S. MIKA, I. KOSTOVA a W. KRAUS. A novel furostanol saponin from *Tribulus terrestris* of Bulgarian origin. *Fitoterapia* 2004, 75(2), 117-122. DOI: 10.1016/j.fitote.2003.09.001. ISSN 0367326X.
17. DE COMBARIEU E., FUZZATI N., LOVATI M., MERCALLI E. Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Fitoterapia* 2003, 74(6), 583-591. DOI: 10.1016/S0367-326X(03)00152-7. ISSN 0367326X.
18. DEEPAK M., DIPANKAR G., PRASHANTH D., ASHA M. K., AMIT A., VENKATARAMAN B. V. Tribulosin and beta-sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. *Phytomedicine: International Journal Of Phytotherapy And Phytopharmacology* 2002, 9(8), 753-6. ISSN 09447113.
19. DEHGHAN A., ESFANDIARI A., BIGDELI S. M. Alternative treatment of ovarian cysts with *Tribulus terrestris* extract: a rat model. *Reproduction In Domestic Animals = Zuchthygiene* 2012, 47(1), e12-5. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01877.x. ISSN 14390531.
20. DE-LA-CRUZ CHACÓN I., RILEY-SALDAÑA CH. A., GONZÁLEZ-ESQUINCA A. R. Secondary metabolites during early development in plants.

- Phytochemistry reviews* [online]. 2013, 12, no. 1(1), 47-64 [cit. 2016-03-16]. ISSN 15687767. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-012-9250-8>
21. DI SANSEBASTIANO G. -P., DE BENEDICTIS M., LOFRUMENTO D., MONTEFUSCO A., ZUCCARELLO V., DALESSANDRO G., PIRO G., CARATI D., DURANTE M. Quality and efficacy of *Tribulus terrestris* as an ingredient for dermatological formulations. *Open Dermatology Journal* 2013, 7(1), 1 - 7. DOI: 10.2174/1874372201307010001. ISSN 18743722.
 22. DINCHEV D., JANDA B., OLESZEK W., ASLANI M. R., KOSTOVA I. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry* 2008, 69(1), 176-186. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.07.003. ISSN 00319422.
 23. DINCHEV D., EVSTATIEVA L., PLATIKANOV S., GALAMBOSI B. Investigation of perspective origins of *Tribulus terrestris* L. for cultivation. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* 2010, 63(10), 1429 - 1434. ISSN 13101331.
 24. DURANGO D., PULGARIN N., GIL J., ESCOBAR G., ECHEVERRI F., QUIÑONES W. Differential accumulation of defense-related isoflavonoids in hypocotyls/roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars treated with salicylic acid and structurally related compounds. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*. 2014, 13(4), 381 - 405. ISSN 07177917.
 25. DVOŘÁKOVÁ Jana. Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině Ostropestřec mariánský *Silybum marianum* (L.) Gaertn. České Budějovice, 2006. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
 26. GAI Q.-Y., JIAO J., LUO M., WANG W., GU Ch.-B., FU Y.-J. Tremendous enhancements of isoflavonoid biosynthesis, associated gene expression and antioxidant capacity in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Process Biochemistry*. 2016. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.01.012. ISSN 13595113.
 27. GAUTHAMAN K., GANESAN A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction – an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine* 2008, 15(1), 44-54. DOI: 10.1016/j.phymed.2007.11.011. ISSN 09447113.
 28. GAUTHAMAN K., ADAIKAN P. G., PRASAD R. N. V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Sciences* 2002, 71(12), 1385-1396. DOI: 10.1016/S0024-3205(02)01858-1. ISSN 00243205.
 29. GODOY-HERNADEZ G., LOYOLA-VARGAS V. M. Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor

- suspension cultures. *Plant Cell Reports* (Germany). 1997, 16(5), 287. ISSN 0721085X.
30. GRAMANOVÁ Hana. Technologie pěstování ostropestřce mariánského *Silybum marianum* ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování. České Budějovice, 2009. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
 31. GRASSMANN J., HIPPELI S., ELSTNER E. F. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002, 40(6-8), 471-478. ISSN 09819428.
 32. HAMMODA H. M., GHAZY N. M., HARRAZ F. M., RADWAN M. M., ELSOHLY M. A., ABDALLAH I. Chemical constituents from *Tribulus terrestris* and screening of their antioxidant activity. *Phytochemistry* 2013, 92, 153-9. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.04.005. ISSN 18733700.
 33. HAN M., YANG L. M., HAN D. Y., YANG L. Study on fitting growth density and best harvest time of *Tribulus terrestris*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2008, 33(7), 750 - 753. ISSN 10015302.
 34. HEMZAL, Boleslav. Kotvičník zemní. Brno: Neptun, 2014. ISBN 978-80-86850-08-5.
 35. HONG S. S., CHOI Y.-H., JEONG W., KWON J. G., KIM J. K., SEO C., AHN E.-K., LEE H. H., KO H.-J., OH J. S., SEO D.-W. Two new furostanol glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. *Tetrahedron Letters* 2013, 54(30), 3967 - 3970. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.05.081. ISSN 00404039.
 36. HORÁK M. A reader in ethnobotany and phytotherapy: monographic series. 1st ed. Brno: Mendel University in Brno, 2014. ISBN 978-80-7509-157-4.
 37. HRDINA R., JAHODÁŘ L., MARTINEC Z., MĚRKA V. Přírodní toxiny a jedy. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-7262-256-0.
 38. HRISTAKOV I. Research on the stimulating effect of *Tribulus terrestris* on the oviparous activity of the queen bees. *Agricultural Science* 2012, 4(3), 228-233.
 39. CHANDRA S., CHANDRA R. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry reviews* 2011, 10(3), 371-395. ISSN 15687767.
 40. CHRISTEV CH., NICKOLOVA M., PENKOV D., IVANOVA R., ABADJIEVA D., GRIGOROVA S. Investigation of the effect of *Tribulus terrestris* extract on the main biochemical and haematological indices of the blood in guinea fowls (*Numida meleagris*). *Journal of Central European Agriculture* 2011, 2(1). DOI: 10.5513/JCEA01/12.1.875. ISSN 13329049.
 41. IVANOVA S., OBRESHKOVA D., IVANOV K., ZLATKOV B., ATANASOV P. Investigation of some food additives containing compounds

- wiht androgenic activity and their analytical study. *Pharmacia* 2014, 61(3), 17 - 27. ISSN 04280296.
42. IVANOVA A., LAZAROVA I., MECHKAROVA P., SEMERDJIEVA I., EVSTATIEVA L. Intraspecific Variability of Biologically Active Compounds of Different Populations of *Tribulus Terrestris* in Thracian Floristic Region, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2011, 25:2, 2357-2361, DOI: 10.5504/BBEQ.2011.0041
 43. JABLONSKÝ I., BAJER J. Rostliny pro posílení organismu a zdraví. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. ISBN 978-80-247-1745-6.
 44. JAHODÁŘ L. Farmakobotanika: semenné rostliny. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1225-9.
 45. JANOUTOVÁ Š. Stále nové možnosti a plány. *Farmář* 2014, č. 10, s. 14-15. ISSN 1210-9789.
 46. JIAO J., GAI Q. -Y., WANG W., LUO M., ZU Y. -G., FU Y. -J. Enhanced astragaloside production and transcriptional responses of biosynthetic genes in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures by elicitation with methyl jasmonate. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 105, 339-346. DOI: 10.1016/j.bej.2015.10.010. ISSN 1369703X.
 47. JOSHI V. S., PAREKH B. B., JOSHI M. J., VAIDYA A. D. Inhibition of the growth of urinary calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals with aqueous extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata*. *Urological Research* 2005, 33(2), 80-6. ISSN 03005623.
 48. KALÁČ P. Organická chemie přírodních látek a kontaminantů. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2001. ISBN 80-7040-520-1.
 49. KAM SC., DO J. M., CHOI J. H., JEON B. T., ROH G. S., HYUN J. S. In vivo and in vitro animal investigation of the effect of a mixture of herbal extracts from *Tribulus terrestris* and *Cornus officinalis* on penile erection. *The Journal Of Sexual Medicine* 2012, 9(10), 2544-51. DOI: 10.1111/j.1743-6109.2012.02889.x. ISSN 17436109.
 50. KESSLER A. The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. *Current Opinion in Insect Science* 2015, 8, 47-53. DOI: 10.1016/j.cois.2015.02.002. ISSN 22145745.
 51. KHAN M. I. R., FATMA M., PER T. S., KHAN N. A., ANJUM N. A. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science* 2015, 6, 1-17. DOI: 10.3389/fpls.2015.00462. ISSN 1664462X.
 52. KIM H. J., KIM J. C., MIN J. S., KIM M. J., KIM J. A., KOR M. H., YOO H. S., AHN J. K. Aqueous extract of *Tribulus terrestris* Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF- κ B signaling in liver cancer cells.

- Journal Of Ethnopharmacology* 2011, 136(1), 197-203. DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.060. ISSN 18727573.
53. KLUŠÁK J. Kotvičník. Zahradnictví Jíkl. [online]. 2013 [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: <http://www.jikl.cz/359-kotvicnik>
54. KRÍŽEK M., ŠÍMA J. Analytická chemie. 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5.
55. KUMARI M., SINGH P. *Tribulus terrestris* ameliorates metronidazole-induced spermatogenic inhibition and testicular oxidative stress in the laboratory mouse. *Indian Journal of Pharmacology* 2015, 47(3), 304-310. DOI: 10.4103/0253-7613.157129. ISSN 02537613.
56. KUŽEL S., HRUBÝ M., CÍGLER P., TLUSTOŠ P., VAN P. N. Mechanism of physiological effects of titanium leaf sprays on plants grown on soil. *Biological Trace Element Research*. 2003, 91(2), 179 - 189. DOI: 10.1385/BTER:91:2:179. ISSN 01634984.
57. KUŽEL S., VYDRA J., TRÍSKA J., VRCHOTOVÁ N., HRUBÝ M., CÍGLER P. Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 2009, 57(17), 7907-11. DOI: 10.1021/jf9011246. ISSN 15205118.
58. KUŽEL S., CÍGLER P., HRUBÝ M., VYDRA J., PAVLÍKOVÁ D., TLUSTOŠ P.. The effect of simultaneous magnesium application on the biological effects of titanium. *Plant soil and environment* 2007, 53(1), 16-23. ISSN 12141178.
59. LI M., LIU J., ZHAI F., ZHANG X., GUAN L., GUAN Y. Cellular and molecular mechanisms in vascular smooth muscle cells by which total saponin extracted from *Tribulus terrestris* protects against atherosclerosis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2013, 32(5), 1299 - 1308. DOI: 10.1159/000354528. ISSN 10158987.
60. MILAŠIUS K., PEČIUKONIENĖ M., RŪTA D., SKERNEVIČIUS J. Efficacy of the *Tribulus* food supplement used by athletes. *Acta Medica Lituanica* 2010, 17(1/2), 65-70. DOI: 10.2478/v10140-010-0008-6. ISSN 13920138.
61. MATHUR M., SUNDARAMOORTHY S. Ethnopharmacological studies of *Tribulus terrestris* (Linn). in relation to its aphrodisiac properties. *African Journal of Traditional, Complementary* 2013, 10(1), 83-94. DOI: 10.4314/ajtcam.v10i1.12. ISSN 01896016.
62. MCMURRY J. Organická chemie. Vyd. 1. Přeložil J. JONAS. Brno: VUTIUM, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8.
63. MITÁČEK T. Pěstování léčivých a kořeninových rostlin v ekologickém zemědělství. Olomouc: Bioinstitut, 2010. ISBN 978-80-87371-05-3.

64. MYERS R. L. The 100 Most Important Chemical Compounds. Greenwood Press, 2007. 352 s. ISBN 978-0-313-33758-1.
65. NAIR V. D., PANNEERSELVAM R., GOPI R., HONG-BO S. Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. *Industrial Crops*. 2013, 45, 406-415. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.01.008. ISSN 09266690.
66. NAJAFI H., FIROUZIFAR M. R., SHAFIAT O., ASHTIYANI S.CH., HOSSEINI N. Protective effects of *Tribulus terrestris* L extract against acute kidney injury induced by reperfusion injury in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases* [online]. 2014, 8(4), 292–298 [cit. 2016-03-08]. Dostupné z: <http://www.ijkd.org/index.php/ijkd/article/download/1138/688>.
67. NAVRÁTILOVÁ Z., PATOČKA J. *Tribulus terrestris* - diskutované fytofarmakum. *Kontakt*. 2013, roč. 15, č. 4, s. 470-477. ISSN 1804-7122
68. NEUGEBAUEROVÁ J. Pěstování léčivých a kořeninových rostlin. Vyd. 1. V Brně: Mendelova lesnická a zemědělská univerzita, 2006. ISBN 80-7157-997-1.
69. NIKOLOVA M., PENCHEV G., GRIGOROVA S., PENKOV D., HRISTEV H., KOEVA I. Effect of different concentrations of *Tribulus terrestris* dry extract on histological structure of gonads and kidneys in japanese quail. *Macedonian Journal of Animal Science* [online]. 2015, 5(1), 11-17 [cit. 2016-03-09]. ISSN ISSN 1857 – 7709. Dostupné z: http://www.mjas.ukim.edu.mk/files/MJAS-05-1_2015_192-Nikolova-Martina.pdf
70. NICKOLOVA M., PENKOV D. Influence of *Tribulus terrestris* extract supplementation on laying productivity and eggs quality in Japanese quails. *Journal of Central European Agriculture* 2010, 11(4), 373 - 380. ISSN 13329049.
71. NOVÁČEK F. Fytochemické základy botaniky. Vyd. 2., dopl. Olomouc: Fontána, 2009. ISBN 978-80-7336-457-1.
72. OPEKAR F., JELÍNEK I., RYCHLOVSKÝ P., PLZÁK Z. Základní analytická chemie pro studenty: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 978-80-246-0553-1.
73. PACÁK J. Jak porozumět organické chemii. Vyd. 2. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1354-3.
74. PACANOSKI Z. Puncturevine (*Tribulus terrestris* L.): noxious weed or powerful medical herb. *Journal of Central European Agriculture* 2014, 15(1), 11-23. DOI: 10.5513/JCEA01/15.1.1404. ISSN 13329049.
75. PETR J. Vliv ošetření elicitory na obsah některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině. České Budějovice, 2014. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

76. PHILLIPS O. A., MATHEW K. T., ORIOWO M. A. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *Journal Of Ethnopharmacology* 2006, 104(3), 351-5. ISSN 03788741.
77. PIOTROWSKA A., BAJGUZ A. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* 2011, 72(17), 2097-2112. ISSN 00319422.
78. PUNCTUREVINE. The Washington State Noxious Weed Control Board [online]. Washington, 2010 [cit. 2016-03-08]. Dostupné z: <http://www.nwcb.wa.gov/detail.asp?weed=137>
79. PUNCTUREVINE. The Alberta Invasive Species Council [online]. Edmonton, Alberta Canada, 2014 [cit. 2016-03-08]. Dostupné z: <https://www.abinvasives.ca/factsheets/140609-fs-puncturevine.pdf?iframe=true&width=800&height=600>
80. RAMAKRISHNA A., GOKARE A. R. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 6:11, 1720-1731, [cit. 2016-02-08]. DOI: 10.4161/psb.6.11.17613. ISSN: 1559-2324. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
81. RAOOFI A., KHAZAEI M., GHANBARI A. Protective effect of hydroalcoholic extract of *Tribulus terrestris* on cisplatin induced renal tissue damage in male mice. *International Journal of Preventive Medicine*. 2015, 6(1), 28-34. DOI: 10.4103/2008-7802.151817. ISSN 20087802.
82. RYSTONOVÁ I. Průvodce lidovými názvy rostlin i jiných léčivých přírodnin a jejich produktů. Vyd. 1. Praha: Academia, 2007. ISBN 978-80-200-1332-3.
83. SANTOS J., REIS L. O., DESTRO-SAADE R., LUIZA-REIS A., FREGONESI A. Original article: *Tribulus terrestris* versus placebo in the treatment of erectile dysfunction. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)* 2014, 38(4), 244-248. DOI: 10.1016/j.acuroe.2014.03.009. ISSN 21735786.
84. SEMERDJIEVA I., EVSTATIEVA L. Distribution and resources evaluation of *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) population in thracian floristic region. *Biotechnology* 2010, 24(2), 56-65. ISSN 13102818.
85. SHABALA S. (ed.). Plant stress physiology. Wallingford: CABI, 2012. ISBN 978-1-84593-995-3.
86. SHARIFI A. M., DARABI R., AKBARLOO N. Study of antihypertensive mechanism of *Tribulus terrestris* in 2K1C hypertensive rats: role of tissue ACE activity. *Life Sciences* 2003, 73(23), 2963-71. ISSN 00243205.
87. SHARMA M., SHARMA A., KUMAR A., KUMAR BASU S. Enhancement of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells Through Stress Stimulus. *American Journal of Plant Physiology*, [online]. 2011, 6:50-

71. DOI:10.3923/ajpp.2011.50.71, [cit. 2016-03-08]. Dostupné z: <http://scialert.net/abstract/?doi=ajpp.2011.50.71>
88. SISTO M., LISI S., D'AMORE M., LUCRO R. D., CARATI D., CASTELLANA D., PESA V. L., ZUCCARELLO V., LOFRUMENTO D. D. Saponins from *Tribulus terrestris* L. protect human keratinocytes from UVB-induced damage. *Journal of Photochemistry* 2012, 117, 193-201. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.10.002. ISSN 10111344.
89. ŠALAMON, I., M. HABÁN, T. BARANEC, M. HABÁNOVÁ a M. KNOLL. The occurrence of puncture vine (*Tribulus terrestris*) and its metabolic characteristics in Slovakia. *Biologia* 2006, 61(1), 25 - 30. ISSN 00063088.
90. ŠALAMON I., GRUŠOVÁ D., DE FEO V. Comparison of two methods for field grow of puncture vine (*Tribulus terrestris* L.) in Slovakia, *Acta Agriculturae Scandinavica* 2016, Section B — Soil & Plant Science, 66:3, 267-271, DOI: 10.1080/09064710.2015.1093652.
91. ŠRÁMEK J. Léčivé rostliny, jejich hnojení a ošetření elicitory s cílem maximální produkce některých účinných látek. České Budějovice, 2007. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
92. TUNCER M. A., YAYMACI B., SATI L., CAYLI S., ACAR G., ALTUG T., DEMIR R. Influence of *Tribulus terrestris* extract on lipid profile and endothelial structure in developing atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet. *Acta Histochemica* 2009, 111(6), 488-500. DOI: 10.1016/j.acthis.2008.06.004. ISSN 16180372.
93. VALÍČEK P. Užitkové rostliny tropů a subtropů. 2. upravené a dopl. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0939-6.
94. VALÍČEK P., KOKOŠKA L., HOLUBOVÁ K. Léčivé rostliny třetího tisíciletí. 2., upr. vyd. Benešov: Start, 2012. ISBN 978-80-86231-57-0.
95. VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. Chemie potravin. Rozšířené a přepracované 3. vydání. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
96. VERDÚ A. M. C., MAS M. T. Cohort-dependent seedling recruitment, survival and reproductive capacity of *Tribulus terrestris*. *Weed research* 2006, 46, no. 5(5). ISSN 00431737.
97. VERMA N., SHUKLA S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2015, 2(4), 105 - 113. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.09.002. ISSN 22147861.
98. WIELANEK M., URBANEK H. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant cell, tissue and organ culture* [online]. 2006, 86, no. 2(2), 177-186 [cit. 2016-03-20]. ISSN 01676857. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-006-9106-2>

99. WU T. S., SHIL S., KUO S. C. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris*. *Phytochemistry*. 1999, 50(8). ISSN 00319422.
100. XU Y., LIU T., XU T., XIE S., SI Y., LIU Y., ZHOU H., XU D. A new furostanol glycoside from *Tribulus terrestris*. *Molecules* 2010, 15(2), 613-8. DOI: 10.3390/molecules15020613. ISSN 14203049.
101. YAZDI F. F., GHALAMKARI G., TOGHYANI M., MODARESI M., LANDY N. Efficiency of *Tribulus terrestris* L. as an antibiotic growth promoter substitute on performance and immune responses in broiler chicks. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2014, 4(S2), S1014 - S1018. DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60774-X. ISSN 22221808.
102. ZHAO J., DAVIS L. C., VERPOORTE R. Research review paper: Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2005, 23(4), 283-333. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003. ISSN 07349750.

10. PŘÍLOHY

10.1 Tabulky

Tabulka 10 Vliv elicitoru ASA na obsah protodioscinu v plodech kotvičniku ($\mu\text{g/g}$)

vzorek č.	druh postřiku	obsah protodioscinu ($\mu\text{g/g}$)	aritmetický průměr obsahu protodioscinu ($\mu\text{g/g}$)	směrodatná odchylka	procentuální množství obsahu protodioscinu (%)
1A	voda	8,97	16,71	9,0	100,0
1B	voda	9,02			
1C	voda	25,57			
1D	voda	23,27			
2A	ASA 10^{-3} mol/l	13,89	13,33	0,8	79,8
2B	ASA 10^{-3} mol/l	12,33			
2C	ASA 10^{-3} mol/l	14,09			
2D	ASA 10^{-3} mol/l	13,01			
3A	ASA 10^{-4} mol/l	18,76	20,13	1,8	120,5
3B	ASA 10^{-4} mol/l	19,23			
3C	ASA 10^{-4} mol/l	22,79			
3D	ASA 10^{-4} mol/l	19,73			
4A	ASA 10^{-5} mol/l	11,87	14,40	3,3	86,2
4B	ASA 10^{-5} mol/l	11,26			
4C	ASA 10^{-5} mol/l	17,16			
4D	ASA 10^{-5} mol/l	17,32			

Tabulka 11 Vliv elicitoru ASA na obsah ruscogeninu v plodech kotvičnicku ($\mu\text{g/g}$)

vzorek č.	druh postřiku	obsah ruscogeninu ($\mu\text{g/g}$)	aritmetický průměr obsahu ruscogeninu ($\mu\text{g/g}$)	směrodatná odchylka	procentuální množství obsahu ruscogeninu (%)
1A	voda	81,07	98,05	17,1	100,0
1B	voda	85,70			
1C	voda	110,70			
1D	voda	114,74			
2A	ASA 10^{-3} mol/l	156,97	145,99	7,4	148,9
2B	ASA 10^{-3} mol/l	143,83			
2C	ASA 10^{-3} mol/l	142,34			
2D	ASA 10^{-3} mol/l	140,82			
3A	ASA 10^{-4} mol/l	110,05	122,48	9,1	124,9
3B	ASA 10^{-4} mol/l	121,56			
3C	ASA 10^{-4} mol/l	130,29			
3D	ASA 10^{-4} mol/l	128,00			
4A	ASA 10^{-5} mol/l	64,86	68,91	5,6	70,3
4B	ASA 10^{-5} mol/l	63,35			
4C	ASA 10^{-5} mol/l	73,62			
4D	ASA 10^{-5} mol/l	73,82			

Tabulka 12

Vliv elicitoru ASA na obsah diosgeninu v plodech kotvičnicku ($\mu\text{g/g}$)

vzorek č.	druh postřiku	obsah diosgeninu ($\mu\text{g/g}$)	aritmetický průměr obsahu diosgeninu ($\mu\text{g/g}$)	směrodatná odchylka	procentuální množství obsahu diosgeninu (%)
1A	voda	23,91	25,58	2,0	100,0
1B	voda	23,77			
1C	voda	26,99			
1D	voda	27,68			
2A	ASA 10^{-3} mol/l	33,74	29,26	4,5	114,4
2B	ASA 10^{-3} mol/l	32,39			
2C	ASA 10^{-3} mol/l	24,90			
2D	ASA 10^{-3} mol/l	26,00			
3A	ASA 10^{-4} mol/l	50,30	42,06	9,3	164,4
3B	ASA 10^{-4} mol/l	49,96			
3C	ASA 10^{-4} mol/l	33,93			
3D	ASA 10^{-4} mol/l	34,07			
4A	ASA 10^{-5} mol/l	32,19	33,51	1,5	131,0
4B	ASA 10^{-5} mol/l	32,34			
4C	ASA 10^{-5} mol/l	35,21			
4D	ASA 10^{-5} mol/l	34,31			

Tabulka 13 Vliv elicitoru ASA na obsah protodioscinu v nati kotvičniku ($\mu\text{g/g}$)

vzorek č.	druh postřiku	obsah protodioscinu ($\mu\text{g/g}$)	aritmetický průměr obsahu protodioscinu ($\mu\text{g/g}$)	směrodatná odchylka	procentuální množství obsahu protodioscinu (%)
1A	voda	399,15	424,81	26,5	100,0
1B	voda	404,82			
1C	voda	448,22			
1D	voda	447,04			
2A	ASA 10^{-3} mol/l	486,50	426,86	75,2	100,5
2B	ASA 10^{-3} mol/l	497,17			
2C	ASA 10^{-3} mol/l	358,52			
2D	ASA 10^{-3} mol/l	365,26			
3A	ASA 10^{-4} mol/l	618,00	539,82	86,2	127,1
3B	ASA 10^{-4} mol/l	610,39			
3C	ASA 10^{-4} mol/l	456,72			
3D	ASA 10^{-4} mol/l	474,16			
4A	ASA 10^{-5} mol/l	728,87	649,30	95,8	152,8
4B	ASA 10^{-5} mol/l	735,25			
4C	ASA 10^{-5} mol/l	559,89			
4D	ASA 10^{-5} mol/l	573,18			

Tabulka 14 Vliv elicitoru ASA na obsah ruscogeninu v nati kotvičniku ($\mu\text{g/g}$)

vzorek č.	druh postřiku	obsah ruscogeninu ($\mu\text{g/g}$)	aritmetický průměr obsahu ruscogeninu ($\mu\text{g/g}$)	směrodatná odchylka	procentuální množství obsahu ruscogeninu (%)
1A	voda	1049,42	1128,68	65,4	100,0
1B	voda	1208,51			
1C	voda	1137,98			
1D	voda	1118,81			
2A	ASA 10^{-3} mol/l	1600,49	1577,25	24,7	139,7
2B	ASA 10^{-3} mol/l	1594,08			
2C	ASA 10^{-3} mol/l	1547,21			
2D	ASA 10^{-3} mol/l	1567,21			
3A	ASA 10^{-4} mol/l	1278,29	1197,77	101,9	106,1
3B	ASA 10^{-4} mol/l	1292,15			
3C	ASA 10^{-4} mol/l	1094,83			
3D	ASA 10^{-4} mol/l	1125,82			
4A	ASA 10^{-5} mol/l	1156,64	1113,06	48,2	98,6
4B	ASA 10^{-5} mol/l	1105,63			
4C	ASA 10^{-5} mol/l	1048,24			
4D	ASA 10^{-5} mol/l	1141,73			

Tabulka 15 Vliv elicitoru ASA na obsah diosgeninu v nati kotvičniku ($\mu\text{g/g}$)

vzorek č.	druh postřiku	obsah diosgeninu ($\mu\text{g/g}$)	aritmetický průměr obsahu diosgeninu ($\mu\text{g/g}$)	směrodatná odchylka	procentuální množství obsahu diosgeninu (%)
1A	voda	144,26	145,37	10,8	100,0
1B	voda	160,93			
1C	voda	137,09			
1D	voda	139,22			
2A	ASA 10^{-3} mol/l	283,34	262,73	20,3	180,7
2B	ASA 10^{-3} mol/l	276,63			
2C	ASA 10^{-3} mol/l	241,74			
2D	ASA 10^{-3} mol/l	249,19			
3A	ASA 10^{-4} mol/l	340,89	359,86	28,4	247,5
3B	ASA 10^{-4} mol/l	330,52			
3C	ASA 10^{-4} mol/l	380,14			
3D	ASA 10^{-4} mol/l	387,91			
4A	ASA 10^{-5} mol/l	167,70	186,80	23,8	128,5
4B	ASA 10^{-5} mol/l	164,83			
4C	ASA 10^{-5} mol/l	205,93			
4D	ASA 10^{-5} mol/l	208,74			

10.2 Seznam použitých zkratk

ACE - Angiotenzin konvertující enzym

ASA - kyselina acetylsalicylová

BABA - D,L- β -aminobutyrová kyselina

CG – kontrolní skupina

CIS – cisplatina

DHEAS - dehydroepiandrosteron-sulfát

DHT – dihydrotestosteron

ED - erektilní dysfunkce

EG – experimentální skupina

FSFI - Female Sexual Function Index

HDL - Vysokodenzitní lipoprotein

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICP - intrakavernózní tlak

LAKR - léčivé, aromatické a kořeninové rostliny

LDL - Nízkodenzitní lipoprotein

MAO – monoaminoxidáza

MJ - methyl-jasmonát

MS – methylsalicylát

MTZ – Metronidazol

PCO - syndrom polycystických vaječníků

ROS – reaktivní forma kyslíku

SA - kyselina salicylová

SM - sekundární metabolity

SRBC - imunizované beraní krvinky

T – testosteron

TC - celkový cholesterol

TG – triglyceridy

UHPLC-MS/MS - vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem

WHO - Světová zdravotnická organizace

YE – kvasnicový extrakt