

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
KATEDRA AGROEKOSYSTÉMŮ

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: 4101T013 Zemědělské inženýrství – Prvovýroba

**Vliv elicitorů, hnojení a technologie pěstování Ostropestřce mariánského
(*Silybum marianum* L.) na produkt a jeho využití**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce

Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

Autor:

Bc. Jana Gubišová

2017

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana GUBIŠOVÁ**
Osobní číslo: **Z15457**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské inženýrství - Prvovýroba**
Název tématu: **Vliv elicitorů, hnojení a technologie pěstování Ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L) na produkt a jeho využití.**
Zadávací katedra: **Katedra agroekosystémů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Rostlina *Silybum marianum* (SM) obsahuje značné množství účinných látek ze skupiny flavonolignanů, tzv. silymarinový komplex, který vykazuje hepatoprotektivní vliv na jaterní buňky. Směs silybinu, silydioninu a silikristinu se nazývá silymarin a pod tímto označením je známa jako hlavní obsahová část velké řady komerčně vyráběných přípravků. Silymarin chrání játra zejména antioxidačním účinkem před škodlivými vlivy, jako jsou chemické přídavky potravin, léky, alkohol, toxické látky z hub, virové infekce, aplikace steroidních hormonů a dalších látek, které mohou negativně zatížit organismus. Jsou prokázány pozitivní účinky SM při léčbě některých druhů rakoviny. Cílem práce je studium technologie pěstování ve vztahu k obsahu biologicky aktivních látek v rostlinách a jejich 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 SM d) farmakologické účinky účinných látek e) využití rostliny SM f) vliv technologie pěstování a elicitorů na obsah účinných látek ostropestřce mariánského. Statisticky vyhodnoťte a diskutujte výsledky maloparcelkového pokusu s SM. Poznatky získané z Vašeho pokusu a z literární rešerše uplatněte v návrhu technologie pěstování *Silybum marianum* pro soukromou farmu a návrhu na využití produktu. Diplomovou práci vypracujte dle Opatření děkana č. 4 ze dne 14. 3. 2014 při využití poznatků získaných ve Vaší bakalářské práci. Ke zpracování využijte skripta Technika zpracování bakalářských a diplomových prací (Kareš J. a kol., 2007) a Práce s VTI (Milota J., Nýdl V., 1996). Použijte publikaci prof. Kalače: Jak vypracovat diplomovou práci v zemědělských oborech, 2009.

Rozsah grafických prací: tabulky, grafy, obrázky dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 40-60 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

Afshar, RK et al. (2015): Accumulation of silymarin in milk thistle seeds under drought stress. *Planta*, 242, 3, 539-543; Afshar, RK et al (2015): Interactive effect of deficit irrigation and soil organic amendments on seed yield and flavonolignan production of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.). *Industrial Crops and Products*, 58, 166-172; Tůmová L. a kol.: *Silybum marianum* in vitro-flavonolignan production. *Plant Soil Environ.*, 52, 2006 (10): 454-458; Jegorov A. (1996): Flavonolignany - novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem. *Chem. listy* 90, 859-862; Slanina J. (2000): Biologická a farmakologická aktivita lignanů. *Chem. listy* 94, 111-116; Kurkin V. et al. (2001): Flavonolignans of *Silybum marianum* Fruit. *Chemistry of natural compounds* 37 (4), 318-321; Kvasnička F. a kol. (2003): Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*, 990, 239-245; Andrzejewska J. et al. (2010): Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. *Industrial crops and Products*. Journal homepage: www.Elsevier.com; 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; Nam-Cheol Kim et al. (2003): Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*) *Org. Biomol. Chem*, 1, 1684-1689; Quaglia M. G. et al. (1999): Determination of Silymarin in the Extrakt from the dried *Silybum marianum* by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19, 435-442; Kužel S., Cígler P., Hrubý M., (2006): "Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin". CZ-296300;. Další materiály od vedoucího práce.

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

Katedra agroekosystémů

Datum zadání diplomové práce: 15. března 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017

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

děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1888, 370 05 České Budějovice

doc. Ing. Petr Konvalina, Ph.D.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 16. listopadu 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma **Vliv elicitorů, hnojení a technologie pěstování Ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L) na produkt a jeho využití** vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách a to se zachováním mého autorského práva k odevzdání textu této klasifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby klasifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáváním textu mé klasifikační práce s databází klasifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských klasifikačních databází a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne.....

Podpis.....

Poděkování:

Tímto děkuji vedoucímu diplomové práce panu Prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc., za metodické vedení, zaslání vzorků k analýze a pomoc při zpracování této práce. Dále děkuji rodině a příteli za podporu.

ABSTRAKT

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) je jedna z nejdéle známých léčivých rostlin. Semena Ostropestřce obsahují biologicky aktivní látky – taxifolin, silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A a isosilybin B celkově nazývané jako silymarinový komplex.

Cílem této práce byl vliv elicitorů, hnojení a technologie pěstování na produkt a jeho využití.

V první části diplomové práce jsem se zabývala historií, botanickou charakteristikou, agrotechnikou, chemickým složením a metodami stanovení účinných látek, farmakologickými účinky účinných látek.

V praktické části jsem pomocí dvou maloparcelkových pokusů zjišťovala vliv elicitorů na obsah účinných látek. Ve vlastním pokusu byly použity 2 elicitory NanoFYT Si[®] v koncentraci 1 ml/l a N-FENOL MIX[®] v koncentraci 0,5 ml/l. Ve druhém pokusu od vedoucího práce byl kromě NanoFYT Si[®] v koncentraci 1 ml/l a N-FENOL MIX[®] v koncentraci 0,5 ml/l použit elicitor ASA ve třech různých koncentracích, nízké [10^{-5} mol/l], střední [10^{-4} mol/l] a vysoké [10^{-3} mol/l].

V závěru jsem provedla statistické vyhodnocení jednotlivých pokusů, porovnání s ostatními publikovanými pokusy a návrh technologie pěstování a využití Ostropestřce mariánského.

Klíčová slova: Ostropestřec mariánský, *Silybum marianum*, elicitory, elicítace, silymarinový komplex, hepatoprotektivní účinky

ABSTRACT

Milk Thistle (*Silybum marianum*) has been one of the best known medicinal herb for a very long time. Seeds contain biologically active substances – taxifolin, silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A and isosilybin B, commonly known as silymarin complex.

The aim of this thesis was the influence of elicitors, fertilization and growing technology on this product and its utilization.

In the first part I focused on history, botanical attributes, agrotechnology, chemical composition and substance – efficiency method of determination and also on pharmacological impacts of effective substances.

In the practical part I conducted two small – parcel experiments to reveal the impact of elicitors on effective substances. I used two elicitors NanoFYTSi[®] in 1 ml/l concentration and N-FENOLMIX[®] in 0.5 ml/l concentration. In the second experiment from my supervisor elicitor NanoFYT Si[®] in 1ml/l concentration and N-FENOL MIX[®] in 0.5 ml/l and elicitor ASA were used in three different concentration: low [10^{-5} mol/l], medium [10^{-4} mol/l] and high [10^{-3} mol/l].

In the conclusion I did statistical analysis of the above mentioned experiments and compared them with other published experiments. Then I proposed the growing technology and utilization of Milk Thistle.

Key words: Milk thistle, *Silybum marianum*, elicitors, elicitation, silymarin complex, hepatoprotective effects

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	CÍL PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	Léčivé rostliny	12
3.1.1	Léčivé a aromatické rostliny	12
3.2	Ostropestřec mariánský	14
3.2.1	Historie	14
3.2.2	Ostropestřec v České republice	14
3.2.3	Původ a výskyt	15
3.2.4	Botanická charakteristika	15
3.2.5	Agrotechnika	17
3.3	Chemické složení a účinné látky	23
3.3.1	Účinné látky	24
4	Metody stanovení účinných látek	27
4.1.1	Chromatografie	27
4.1.2	Elektroforéza	36
4.1.3	Porovnání metod pro stanovení účinných látek v Ostropestřci mariánském	37
4.2	Farmakologické účinky účinných látek	39
4.2.1	Hepatoprotektivní účinky	39
4.2.1	Ostatní účinky	40
4.2.2	Vedlejší účinky	41
4.3	Využití silymarinu	41
4.3.1	Přípravky, léčiva	41
4.3.2	Přípravky – doplňky stravy	43
4.3.3	Využití u hospodářských zvířat	44
4.4	Stres	46
4.4.1	Definice stresu	46
4.4.2	Definice stresu u rostlin	47

4.4.3	Stresory	47
4.4.4	Sekundární metabolity	48
4.5	Elicitace	50
4.5.1	Elicitory	50
4.5.2	Elicitory firmy AGRA GROUP a.s.	51
4.5.3	NanoFYT Si [®]	53
4.5.4	ELITiC [®]	54
4.5.5	Ostatní elicitory	55
5	METODIKA	58
5.1	Pokus č. 1	58
5.2	Pokus č. 2.	60
5.3	Příprava vzorku k analýze stanovení účinných látek	61
5.4	Stanovení účinných látek v semeni Ostropestřce mariánského	61
6	VÝSLEDKY	63
6.1	Výsledky pokusu č. 1. Stojanovice	63
6.2	Výsledky pokusu č. 2. lokalita JU v Českých Budějovicích	72
7	Vliv agrotechniky	81
8	VLIV ELICITORŮ NA OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK	82
9	NÁVRH TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ OSTROPESTRČE MARÁNSKÉHO PRO SOUKROMOU FARMU	84
10	VYUŽITÍ OSTROPESTRČE MARIÁNSKÉHO	85
11	DISKUZE	86
12	ZÁVĚR	89
13	POUŽITÁ LITERATURA	90
14	PŘÍLOHY	104

1 ÚVOD

V 21. století žijí mnozí lidé nezdravým životním stylem. Stres, shon a špatné stravovací návyky přispívají ke zhoršování zdravotního stavu, který se projevuje například špatnou funkcí tělních orgánů – jater, ledvin. Moderní lidé si začali uvědomovat, že jednou z možností, jak zlepšit svůj zdravotní stav, je návrat k využívání léčivých rostlin a produktů z nich vyrobených.

Léčivými rostlinami se nazývají rostliny obsahující účinné látky, které se používají k léčení chorob, zmírnění bolesti nebo jako prevence již tisíce let. Na celém světě bylo popsáno na 15 000 druhů rostlin s léčivými účinky, z toho zhruba 1 000 v Evropě. K lékařským účelům se v dnešní době se využívá jen zhruba 300 léčivek. V Evropě je to asi 130 druhů a v České republice zhruba 70 druhů.

Jednou z velmi významných léčivých rostlin, která se v dnešní době dostává do popředí zájmu lidí, je Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) jehož plody obsahují účinné látky ze skupiny flavonolignanů nazývaných silymarinový komplex. Tento komplex účinných látek má široké spektrum využití. Hepatoprotektivní účinky silymarinového komplexu mají vliv nejen na ochranu jaterních buněk. Antioxidační účinky zase brání poškození jaterních buněk vlivem toxických látek z hub, alkoholu nebo léků např. při léčbě rakoviny.

Při zpracování semen je důležitý obsah a složení silymarinového komplexu. Pro tyto účely je potřebné dodržovat přesný postup při pěstování. Pro zvýšení obsahu účinných látek v semeni je vhodné použití elicitorů, které chrání rostlinu před stresem a tím přispívají k jejímu dobrému vývoji a růstu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je studium vlivu elicitorů, hnojení a technologie pěstování *Ostropestřce mariánského* na produkt a jeho využití. Dále je cílem botanická charakteristika, agrotechnika, ochrana před škůdci a proti chorobám, chemické složení a účinné látky, metody stanovení některých účinných látek, farmakologické účinky účinných látek a využití rostliny. Dalším úkolem této práce je statistické vyhodnocení výsledků z maloparcelkových pokusů.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Léčivé rostliny

Léčivé rostliny jsou takové rostliny, které se používají na léčení chorob lidí, zvířat, nebo se používají jako surovina na výrobu léků a léčiv (MACKŮ, KREJČA, 1988). Některé druhy však také poskytují třísloviny pro koželužství, přírodní barviva, přadná vlákna pro textilní průmysl. Dále pak se léčivky využívají jako kaučukodárné, olejodárné, jako rostliny skýtající píci pro domácí zvířata, nebo jsou využívány jako zelenina, ovoce nebo okrasné rostliny (JIRÁSEK et al., 1986).

Z těchto rostlin lze využít květy, listy, stonek nebo kořen. Nejčastější způsob využití je v čerstvém nebo sušeném stavu. V sušeném stavu se droga používá celá, nebo upravená, například drcená (MACKŮ, KREJČA, 1988).

3.1.1 Léčivé a aromatické rostliny

LAKR neboli léčivé, aromatické a kořenové rostliny jsou skupinou rostlin vyznačující se velkou rozmanitostí a zároveň širokým spektrem využití například v lékařství nebo v potravinářství (BRANŽOVSKÝ, 2007). Jeden druh rostliny se může zařadit zároveň mezi léčivé, ale i aromatické rostliny (ANTOŠOVÁ, 2009), mohou se pěstovat jako zelenina, jiné druhy jako okrasné rostliny (BRANŽOVSKÝ, 2007).

Na celém světě je popsáno na 15 000 druhů s léčivými účinky, v Evropě je to zhruba 1 000 druhů, z nichž 800 se používalo v tradičním lidovém léčitelství. Dnes nachází uplatnění zhruba jen 300 druhů a pěstováno je však jen několik desítek druhů. V Evropě je to asi 130 druhů (PŘIBÍK, 2005), v České republice se sbírá asi 70 druhů léčivých rostlin (ANTOŠOVÁ, 2009).

3.1.1.1 Situace v České republice

V roce 2011 byly léčivé, kořenové a aromatické rostliny pěstovány na 8 588 ha s produkcí 7 016 t a výnosem 0,82 t/ha (TOŠOVSKÁ, BUCHTOVÁ, 2012). Každým rokem dochází k poklesu ploch LAKR. V roce 2015 poklesly plochy na 5 177 ha s produkcí 4 400 t a průměrným výnosem 0,84 t/ha. Tento pokles je zapříčiněn nestabilní situací odbytu, která je závislá především na ekonomické i odborné náročnosti pěstování LAKR, dále pak i na stagnaci výkupních cen (TOŠOVSKÁ, BUCHTOVÁ, 2012).

Tab. č. 1. Plochy pěstování LAKR v České republice (PŘIBYLOVÁ, 2014, ANONYM 7, 2015 – přidán rok 2015)

Rok	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Plocha ha	5 858	5 184	4 015	5 674	7 864	8 588	7 225	5 659	5 566	5 177
Produkce	4 727	3 925	3 847	3 900	5 605	7 016	6 098	3 775	5 066	4 400
Výnos (t)	0,81	0,76	0,96	0,69	0,71	0,82	0,86	0,67	0,91	0,84

Konkrétně Ostropestřec mariánský zaznamenal v posledních letech výrazné zvýšení poptávky ze strany tuzemských i zahraničních zpracovatelů především z farmaceutického průmyslu. Vzrůst poptávky zpracovatelů ovlivňuje růst jeho pěstování. Dle šetření sdružení PELERO CZ o. s. byl Ostropestřec v roce 2013 i 2014 pěstován na více než 4 500 ha (PŘIBYLOVÁ, 2014).

Tab. č. 2. Přehled pěstování Ostropestřce mariánského v České republice (PŘIBYLOVÁ, 2014)

Rok	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Plocha	800	1 500	2 000	3 500	-	5 000	5 000	4 500	4 700
Výnos	0,65	0,80	0,75	0,68	-	-	0,5	0,6	0,65

3.2 Ostropestřec mariánský

3.2.1 Historie

Ostropestřec mariánský lze zařadit mezi nejdéle známé léčivé rostliny. Semena Ostropestřce byla použita před více jak 2 000 lety k léčbě jater a žlučníku a dalším nemocem.

Tuto bylinu pravděpodobně jako první popsal Theoprastus ve 4. století p. n. l. pod názvem „Pternix“. Později se o něm zmínil Dioskurides v jeho „Materia Medica“ v 1. století n. l., posléze i v Pliniusových spiscích v 1. století n. l. (KŘEN, WALTEROVÁ, 2005).

V dobách středověku byly mnohé medicínské poznatky zapomenuty. Později však byly znovu objeveny. Ostropestřec mariánský byl popsán ve všech významných herbářích léčivých rostlin, například v herbáři abatyše Hildegardy z Bingenu (1098 – 1179), Hieronyma Bocka (1593), Matioliho (1626), Jacobuse Theodoruse (1664), Valentiniho (1719), Von Hallera (1755) a mnoha dalších až do současnosti (JEGEROV, 1996).

Zprvu se používala celá rostlina a byla považována za všelék. Bylina měla pomáhat od bolesti v boku, způsobené pravděpodobně nemocí jater a žlučníku. Až v roce 1851 se německý lékař Rademacher vyjádřil, že Ostropestřec spolehlivě účinkuje proti jaterním onemocněním a k tomuto účelu doporučil užívat tinkturu ze semen – Tinctura Cardui mariae (STARÝ, 2000).

3.2.2 Ostropestřec v České republice

V první polovině 70. let se Ostropestřec začal pěstovat v České republice. První pěstování bylo odzkoušeno v podniku na Pardubicku. Od té doby se pěstování rozvíjelo. V dnešní době je o tuto léčivku poměrně velký zájem (KUBÍNEK, 1987).

3.2.3 Původ a výskyt

Ostropestřec mariánský pochází z oblasti Středozemního moře (MOUDRÝ, 2011). Areál výskytu byl rozšířen na východ do Malé Asie, oblasti Kavkazu, Íránu a Sýrie. Zavlečen byl také do teplejších stepních oblastí střední Asie (STARÝ, 2000). Ostropestřec se objevil v severní Africe, na Madeiře a Kanárských ostrovech. Ojedinelý výskyt byl zaznamenán v Severní a Jižní Americe a v jižní Austrálii. Do těchto oblastí byl zavlečen lidmi (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981).

3.2.4 Botanická charakteristika

Ostropestřec mariánský, původně dvouletá bylina ze středomoří (JAHODÁŘ, 2006), se v našich klimatických podmínkách vyskytuje jako jednoletá rostlina z čeledi Hvězdnicovité (*Asteraceae*), (SPIZTOVÁ, 1997). Vzhledem a mohutností připomíná „bodlák“. Název získala též kvůli jejím ostnům, které se vyskytují na celé rostlině (KUBÍNEK, 1987).

Ostropestřec mariánský má mohutný, převážně kulový kořen s rozvětvenými postranními kořeny. Rostlina vytváří do dvou měsíců po výsevu (MOUDRÝ, 2016) přizemní růžici velkých, bíle mramorovaných podél nervatury, leskle zelených listů laločnatého tvaru, ukončených ostnem (STARÝ, 2000) dlouhým 4 – 5 cm (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981). Listy jsou uspořádány tak, aby dobře sváděly dešťovou vodu ke kořenům. Ze středu růžice vyrůstá lodyha, která je do poloviny hustě olistěná, zaobleně hranatá, vyplněná bílou dřevinou (BĚLOHLÁVKOVÁ, 2004). Pokud dojde u rostliny k poranění, začnou listy a lodyha produkovat mléčně bílou šťávu (CASTLEMAN, 2004).

Na konci hlavních i vedlejších os vyrůstají úbory (STARÝ, 2000). Na vejčité bázi mají úbory šídlovitě zašpicatělé zákrovní listeny, ukončené silným načervenalým trnem. Květy mají dlouhou bílou korunní trubku v horní $\frac{1}{3}$ baňkovitě rozšířenou. Barva květů je od červené po světle i tmavě fialovou (GUBIŠOVÁ, 2015). KUBÍNEK (1987) uvádí velikost květu o průměru 50 až 80 mm. Ostropestřec květe v závislosti na termínu výsevu od června do srpna. Jako cizosprašná bylina bývá nejčastěji opilována čmelákem nebo včelou, proto se uplatňuje jako medonosná rostlina.

Plodem je nažka, dozrávající nestejně v závislosti na termínu výsevu od července do září. Nažky jsou tmavohnědé žíhané s průměrnou velikostí 6,5 *3 mm (SPITZOVÁ, 1997). Tvar nažek je vejčitý, mírně zploštělý s lesklým povrchem. Semeno je složeno z embrya (zárodku), klíčku, listu, základu radikuly a z dvou děložních listů bohatých na olej, dále z oplodí (perikarp) a osemení (testa), (GROMOVÁ, 1993). Na semeno přisedá snadno opadavý cca 1,5 cm dlouhý chmýr (SPITZOVÁ, 1997). HTS (hmotnost tisíce semen) se pohybuje v rozmezí 28 – 30 g (ANDREZEJEVSKA, 2010).

3.2.4.1 Vývojové fáze Ostropestřce

Klíčení – trvá 2 až 3 týdny (HRDLIČKOVÁ, 2013) a končí vynořením listové dělohy na povrch půdy (MARTINELLI, 2014).

Vzcházení – období 10 až 22 dní, ve kterém záleží na klimatických podmínkách a teplotě (HRDLIČKOVÁ, 2013).

Dva pravé listy – trvá 5 až 10 dní. V tomto období je porost náchylný na zaplevelení (HRDLIČKOVÁ, 2013).

Přízemní růžice – období 30 dnů. Toto období je velmi důležité pro tvorbu a složení silymarinu (GROMOVÁ, 1993).

Dlouhivý růst – jedná se o prodlužování a větvení rostliny. Nárůst biomasy znamená velký odběr živin a vody (GUBIŠOVÁ, 2015).

Tvorba květu – začíná 62 až 67 dní po vzcházení (HRDLIČKOVÁ, 2013).

Kvetení – doba kvetení je 74 až 90 dnů po setí. Je ukončen nárůst biomasy (GROMOVÁ, 1993).

Zrání semene – začíná asi 30 dní po kvetení. Při plné zralosti se objeví bílý chmýr (HRDLIČKOVÁ, 2013).

3.2.5 Agrotechnika

3.2.5.1 Klimatické a půdní podmínky

Ostropestřec mariánský lze pěstovat z hlediska podnebí v širokých klimatických podmínkách našeho státu. Přestože se jedná o rostlinu spíše teplomilnou, není nutné ji pěstovat jen ve KVO (kukuřičná výrobní oblast), kde v sušších rocích trpí nedostatkem vláhy a větší náchylností na tracheomykózu (KUBÍNEK, 1987). Při vhodné expozici pozemku a příznivých podmínkách (MOUDRÝ, 2016), tj. na slunečném, ale před větrem krytém místě (BODLÁK, 2004), lze Ostropestřec pěstovat do nadmořské výšky 600 m n. m. (MOUDRÝ, 2016), tj. v klimatickém regionu MT4 (mírně teplý, vlhký, s průměrnou roční teplotou 6 – 7 °C, s ročním úhrnem srážek 650 – 750 mm, sumou teplot nad 10 °C 2200 – 2400 °C), (KUBÍNEK, 1987).

Ostropestřec mariánský je relativně přizpůsobivý k půdním podmínkám, například ve srovnání s obilovinami je citlivější na málo úrodné půdy (MOUDRÝ, 2016). Na černozemích, hnědozemích, nivních a lužních půdách jsou obecně dosahovány nejvyšší výnosy. Pro pěstování jsou zcela nevhodné půdy mělké, výrazně písčité, štěrkovité a silně kyselé a citlivě reaguje na zamokřenou a utuženou půdu. Naopak pokud je půda provzdušněná a propustná, dokáže využít vyšší množství spodní vody pro svůj růst. Při pěstování má velký význam přítomnost organické hmoty, nejlépe trvalého půdního humusu se všemi jeho pozitivními vlastnostmi, neutrální půdní reakci s dobrou zásobou vápníku (KUBÍNEK, 1987).

3.2.5.2 Příprava půdy

Na přípravu půdy má Ostropestřec podobné nároky jako obiloviny. Pro použití přesných secích strojů je žádoucí dokonale připravený povrch pozemku (ZIMOLKA, 2000). Na podzim se provede středně hluboká orba bez organického hnojení, popřípadě se provádí doplnění živin na požadovanou hodnotu (NEUGEBAUEROVÁ, 2006). Příprava setového lůžka je závislá na půdních podmínkách, v sušších podmínkách volíme hloubku 40 – 50 mm, v běžných podmínkách je to 15 mm (GROMOVÁ, 1993). KUBÍNEK (1987) uvádí, že pečlivé urovnání povrchu je zvlášť důležité pro dodržení stejnoměrné hloubky výsevu, což je předpoklad vyrovnaného vzcházení semen.

3.2.5.3 Předplodina a místo v osevním sledu

Na předplodinu není Ostropestřec náročný, doporučují se předplodiny obecně zlepšující, jako jsou jeteloviny, směsky, ale nejsou rozhodující podmínkou úspěchu (SPITZOVÁ, 1997). Vhodnými předplodinami jsou dále okopaniny nebo luskoviny (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004). Ostropestřec je možné zařadit i po obilninách (SPITZOVÁ, 1997).

V osevním postupu se Ostropestřec zařazuje jako zlepšující plodina (ZIMOLKA, 2000). Z hlediska obav zaplevelení pozemku se ostropestřec pěstuje i více let po sobě. Při tomto postupu může dojít k vyššímu výskytu houbových chorob (KUBÍNEK, 1987).

3.2.5.4 Setí

Porost zakládáme v závislosti na regionu od března do dubna (SPITZOVÁ, 1997), optimálně v období 25. 3. – 10. 4. při teplotě půdy minimálně 5 °C a přiměřené vlhkosti. Agrotechnická lhůta setí Ostropestřce se podle klimatických regionů pochybuje mezi 15. – 25. dubnem (KUBÍNEK, 1987).

Sejeme přesným secím strojem do hloubky 2 – 3 cm, šířky řádků 45 cm s normou výsevu 6 kg/ha (ZIMOLKA, 2000). NEUGEBAUEROVÁ (2006) uvádí, že výsevek může být 8 – 10 – (15) kg/ha.

Na 1m² by mělo být 6 – 12 rostlin, tj. 60 000 – 120 000 rostlin na hektar (NEUGEBAUEROVÁ, 2006).

K setí se používá kvalitní osivo, které je složeno ze světlých až tmavých semen plného tvaru s hmotností tisíce semen (HTS) 25 – 30 g (KUBÍNEK, 1987) a klíčivostí 75 % až 95 % (GROMOVÁ, 1993). Cílem přesného setí je optimální organizace porostu s odpovídajícím habitem rostlin. Na 1 m² by mělo být 5 – 7 rostlin (GUBIŠOVÁ, 2015).

3.2.5.4.1 Úprava semen před setím

V případě časného jarního výsevu při teplotě 5 °C je možné semeno namočit na 6 hodin do 40 °C teplé vody a následně opatrně osušit. Tímto postupem se zkrátí vegetační doba až o tři týdny (BRABENEC, BORIK, 1990).

3.2.5.5 Hnojení

Vzhledem k nárůstu nadzemní hmoty vyžaduje Ostropestřec odpovídající množství živin. Optimální pro něj jsou půdy ve staré půdní síle. (ZIMOLKA, 2000). Na podzim je důležité pozemek přihnojit 500 – 600 kg NPK na ha. Jestliže po vzejití jsou listové růžice slabé, přihnojíme ledkem amonným nebo vápenatým v dávce 100 – 150 kg na ha (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004).

Doporučená dávka dusíku se pohybuje v rozmezí 60 – 90 kg na hektar a to s ohledem například na klimatické podmínky a zařazení v osevním postupu. Při hnojení můžeme využít dělenou aplikaci, to znamená: polovina až dvě třetiny se zapravují do půdy v rámci předseťové přípravy, zbytek ve fázi 6 – 8 pravých listů před zapojením porostu (ZIMOLKA, 2000).

V závislosti na předplodině a půdní zásobě živin se na jaře doporučují dávky od 60 do 90 kg P_2O_5 na hektar, dávka K_2O se pohybuje v rozmezí 80 – 120 kg na hektar (MOUDRÝ, 2011).

V praxi se doporučuje aplikovat 45 až 60 kg N, 17,5 kg P a 33,2 kg K na hektar, což znamená, že na 1 hektar musíme aplikovat 200 kg NPK, v případě vysoké zásoby K v půdě 100 kg/ha Amofosu na podzim. Na jaře je vhodné aplikovat 100 až 150 kg dusičnanu amonného před setím nebo ihned po zasetí (GUBIŠOVÁ, 2015).

Při fázi dozrávání dochází k největšímu odčerpávání živin. Tehdy rostlina odčerpá cca 93 kg/ha dusíku, 9,6 kg/ha P a až 200 kg/ha K. Semeno odčerpá cca 43 kg/ha N, 11,4 kg/ha P a cca 12,2 kg/ha K (GROMOVÁ, 1993).

Při hnojení a volbě hnojiv musíme přihlížet na optimální pH půdy, které se pohybuje u ostropestřce v rozmezí 5,8 až 7,2 (ZIMOLKA, 2000) v závislosti na druhu půdy (KUBÍNEK, 1987).

Pro zabezpečení potřeby vápníku je důležité většinu půd vápnit. V závislosti na hodnotě pH můžeme využít vápnění udržovací, nebo meliorační (KUBÍNEK, 1987).

3.2.5.6 Ošetřování během vegetace

Základem ničení plevelů je mechanická kultivace meziřádků. Používá se většinou plečkování, které se provádí do fáze 6 pravých listů. Při silném zaplevelení je vhodné plečkovat již v počátečních fázích vývoje porostu (KUBÍNEK, 1987).

3.2.5.7 Plevel, škůdci, choroby

3.2.5.7.1 Plevel

Ostropestřec mariánský má velmi dobré odplevelovací schopnosti díky svému bujnému růstu a velké listové pokryvnosti. V období vzcházení až dlouhivého růstu je ohrožen Ostropestřec rychlejším startem růstu plevelů (ZVOLÁNKOVÁ, 2012).

Základním ošetřením proti plevelům je mechanická kultivace. Na silně zaplevelených pozemcích se můžou tři dny před setím zapravit do půdy herbicidy (HABÁN, 2008).

Při nedodržení termínu sklizně může být v dalších letech sám sobě škodlivý. Při přezrání úborů dochází k odlétání ochmýřených nažek do větší vzdálenosti. V půdě se pak nažky udržují několik let (BĚLOHLÁVKOVÁ, 2004).

3.2.5.7.2 Choroby

Silybum marianum vytváří velké množství nadzemní biomasy, na kterém vzniká ideální mikroklima pro šíření chorob, které napadají postupně celou rostlinu. Dochází k ukončení vegetační doby a to má špatný vliv na výnos a kvalitu sklizeného produktu (ONDŘEJ, ODSTRČILOVÁ, 1999).

Choroby napadají Ostropestřec ve všech vývojových fázích. Poměrně častá je mikrobiální kontaminace semen, které jsou napadány houbami rodu *Mucor* (*Mucor*, *Rhizopus*), bakteriemi (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*) nebo běžnými saprofytickými houbami (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*), (ONDŘEJ, ODSTRČILOVÁ, 1999).

Klíčící a vzházející rostliny jsou nejvíce napadány houbami *Pythium ultimo* a *Rhizoctonia solani*, dále pak zástupci rodu *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*) a také houbami (*Cylindrocarpon destructans*, *Cellototrichum gloeosporioides*) a vláknitou houbou *Hyphomycetes* a *Mycedinaceae* (ONDŘEJ, ODSTRČILOVÁ, 1999).

Nejvýznamnější chorobou je tracheomykóza, neboli cévní vadnutí, způsobené houbami rodu *Fusarium* a *Pythium*. Příznaky tracheomykózy se začínají projevovat ve fázi listové růžice, následně dochází k postupnému vadnutí, žloutnutí až hnědnutí a následně k nekrotizaci celé rostliny (HABÁN, 2008).

V podhorských oblastech bývá často zdravotním problémem plíseň šedá (SPITZOVÁ, 1997), (*Botritis cinerea*), (HABÁN, 2008). V teplejších oblastech škodí houby rodu *Fusarium*. Ojediněle se na rostlině vyskytne padlí čekankové a skvrnitost způsobená druhy rodu *Septoria* a *Alternaria* (SPITZOVÁ, 1997).

Plíseň šedá je parazit napadající pletiva oslabených rostlin a pomocí konidií se šíří do celé rostliny, kde se vyživuje tkání rostliny. Z vyklíčených konidií vznikne mycelium, které přezimuje pomocí tzv. sklerocií nacházejících se ve zbytcích rostlin na zemi, semenech a plodech (BÖHRINGER, JÖRG, 1996). Napadené listy, stonky, květy a plody jsou pokryty hustým šedým povlakem (BRADLEY, 2008).

Příznakem napadení houbou *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*) je vadnutí, při kterém listy blednou, žloutnou a opadají (BÖHMER, WOHANKA, 2003). Příznaky u napadení *Fusariem* se začínají projevovat od fáze listové růžice (ZIMOLKA, 2000), kdy se u kořenových krčků začíná objevovat bělorůžový povlak mycelia (BÖHMER, WOHANKA, 2003).

3.2.5.7.3 Škůdci

Nejčastěji se na Ostropestřci vyskytuje mšice maková (*Aphis fabae Scop.*), mšice bodláková (*Brachycaudus cardui*), štítonoši (*Cassida sp.*), dlouháč plevelový (*Tanymecus palliatus Farb.*) (HABÁN, 2008), kteří rostlinu zpravidla vážně nepoškozují (ZIMOLKA, 2000). Proti těmto škůdcům je možné použít povolené přípravky. Při skladování nažek může dojít k poškození *Ploidou interpunctillou L.* Ochrana proti nim spočívá v rozmístění Instop pásů nebo v asanaci skladu (HABÁN, 2008).

3.2.5.8 Sklizeň

Nejnáročnějším agrotechnickým článkem v pěstování Ostropestřce je sklizeň. Limituje jak výnos, tak kvalitu (SPITZOVÁ, 1997).

Úbory dozrávají na rostlině od shora dolů a v úboru od středu ven (MOUDRÝ, 2011). Musíme sledovat barvu úborů a nažek. Při dozrávání mění úbor barvu ze zelené na hnědou, a nažky se přeměňují ze světlé na tmavohnědou (GROMOVÁ, 1993). Porost sklízíme v plné zralosti, tj. když jsou úbory zralé na hlavní ose stonku. Ostropestřec většinou dozrává v průběhu srpna až září (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004). Termín sklizně se posouvá v závislosti na nadmořské výšce na září až říjen (ZIMOLKA, 2000).

Při pěstování na malé ploše se pro sklizeň používají zahradnické nůžky (KOUDELA, 2009). Při velkoplošném pěstování se používá sklízecí mlátička, na které se demontují pera přiháněče, aby nedocházelo k nabalování rostlin. Klasická vytrásadla se nahradí vytrásadly s většími otvory a zvětší se mezera mezi mláticím košem a bubnem (KUBÍNEK, 1987). Lištu sklízecí mlátičky musíme zvednout zhruba do horní $\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$ rostliny. Otáčky přiháněče musí být optimálně nastavené. Jsou-li otáčky vyšší, může dojít při úderu přiháněče na květní lodyhu k vystřelení semen z úboru, následkem toho dochází k vyšším ztrátám (ZIMOLKA, 2000).

3.3 Chemické složení a účinné látky

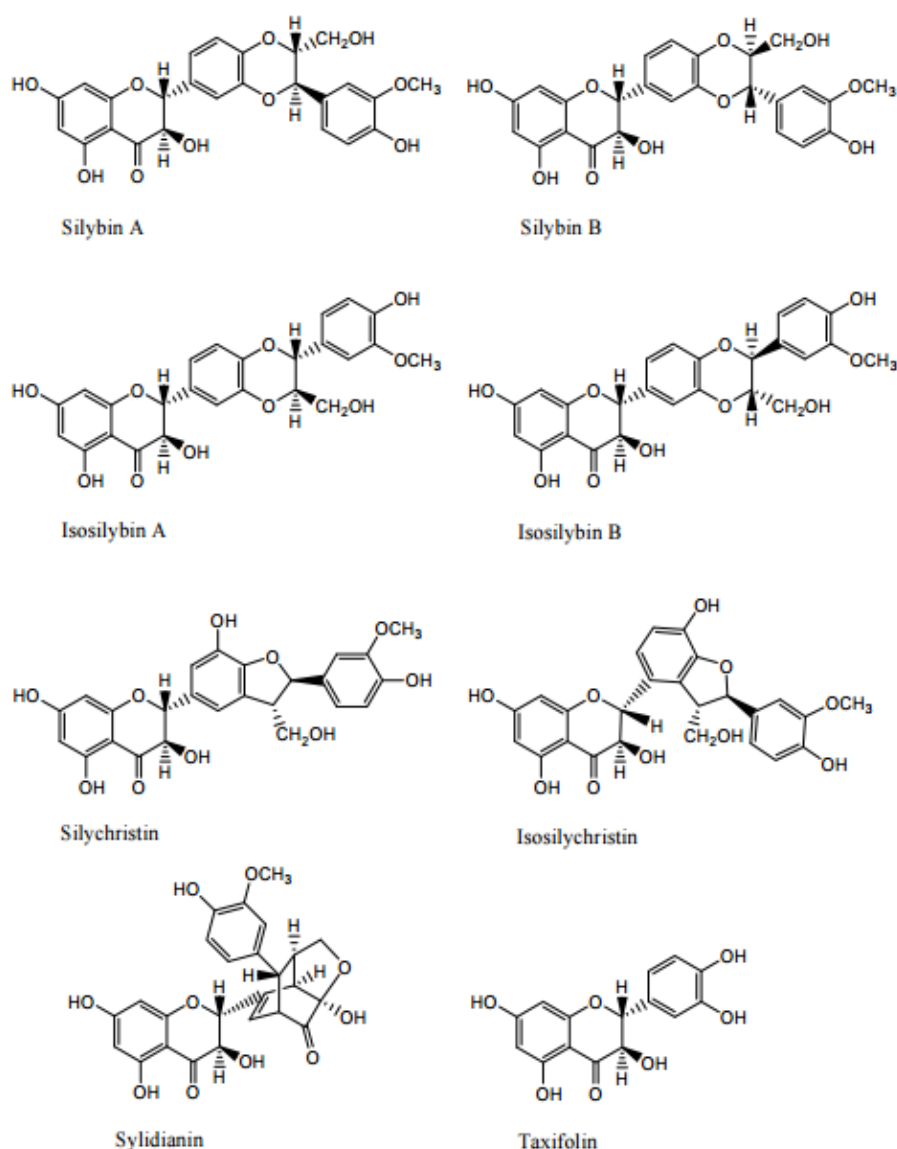
Silybum marianum je díky svému složení jednou z neúčinnějších léčivých rostlin. Tato rostlina obsahuje skupinu flavonolignanů komplexně nazývaných silymarin, neboli silymarinový komplex (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

Silymarin je směs z extraktu ze semen Ostropestřce mariánského, tvořeného nejméně 7 flavonolignany a flavonoidu taxofolinu (JANČOVÁ et al., 2008).

Silymarinová polyfenolová frakce obsahuje flavonolignany: silybin A, silybin B, isolilybin A, isosilybin B, dehydrosilybin, silydianin, silychristin, isosilychristin (VOSTÁLOVÁ, 2008). Dále jsou zastoupeny flavonoidy (kvercetin, kamferol), aminy (tyramin, histamin), mastný olej (kyselina listová, olejová, palmitová), tokoferol (0,6 %), steroly (kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol) a bílkoviny (OPLETAL, VOKÁL, 1999).

Nažky Ostropestřce obsahují 25 – 35 % oleje s vysokým podílem kyseliny linolové (55 – 72 %), olejové (15 – 26 %), 8 – 12 % nasycených mastných kyselin, 26 – 28 % bílkovin (SCHUSTER, 1992).

Obr. č. 1. Chemická struktura hlavních složek silymarinového komplexu (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).



3.3.1 Účinné látky

3.3.1.1 Lignany

Lignany tvoří poměrně rozsáhlou skupinu sekundárních metabolitů cévnatých rostlin se zajímavými fyziologickými účinky. Jsou tvořeny ze dvou fenylypropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální (β)uhlíky obou postranních řetězců (SLATINA, 2000).

Struktura lignanů je podmíněna jejich vznikem z redukované formy základních, biogeneticky klíčových meziproductů šikimátové dráhy, tj. z alkoholů pocházejících z kyseliny skořicové, *p*-kumarové a dalších biogenetických ekvivalentů (HARTMATHA, 2005).

Název lignany byl odvozen od ligninu, kdy tyto sloučeniny byly původně považovány za meziproducty při biosyntéze ligninu $(C_6 - C_3)_n$, polymeru složeného z fenylypropanových jednotek jako lignany $(C_6 - C_3)_2$. Vzhledem ke struktuře ligninu a lignanu je dnes zřejmé, že jen pouze některé z nich mohou sloužit k tomuto účelu (SLATINA, 2000).

3.3.1.2 Flavonolignany

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolových látek, lišících se od sebe chemickou strukturou a vlastnostmi, které je možno nalézt ve všech rostlinách. Z tohoto důvodu jsou flavonoidy každodenní součástí lidské stravy. V rámci hlavních tříd bylo identifikováno více než 4 000 různých flavonoidů. Tyto třídy zahrnují flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, isoflavony, antokyany, dihydroflavonoly a chalkony. Flavonoidy jsou ze zažívacího traktu lidí a zvířat absorbovány a následně vylučovány ve formě nezměněné, nebo jako metabolity flavonoidů v moči a výkalech. Flavonoidy jsou zařazovány mezi silné antioxidanty, lapače volných radikálů či chelátory a inhibují peroxidaci lipidů (COOK, SAMMAN, 1996).

Hetzogovi a Hagedornovi se v roce 1952 podařilo zjistit, že v semenech Ostropestřce jsou aktivní složkou látky flavonoidní povahy. V roce 1960 byla objasněna Janiakem a Hänselem struktura dvou flavanonů – silybinu a silydianinu. Silychristin a iso-silybin jsou dalšími složkami směsi flavonoidů, souhrnně označované jako silymarin. Všechny tyto látky jsou tvořeny flavanonem taxifolinem (dihydrokvercetin), k němuž je oxidativní činností připojena molekula koniferylalkoholu. Vzhledem k tomu, že je koniferylalkohol obvyklou složkou lignanů, dostal tento nový typ flavonoidů souhrnné označení flavonolignany (JEGEROV, 1996).

Celou řadu velmi specifických enzymatických reakcí zahrnuje biosyntéza flavonoidů z fenylalaninu. Nízká stereospecifita následné oxidativní adice koniferylalkoholu je v souladu s předpokládaným radikálovým mechanismem této reakce, která probíhá jak *in vitro*, tak *in vivo*. Možnost oxidativní adice olefinu (koniferylalkoholu) na fenol (taxifolin) je neobyčejnou ukázkou stereochemických možností struktury flavanolignanů. Tvorbou 1,4-benzodioxanů, v níž reagují obě sousední fenolické skupiny (3', 4'), vznikají čtyři stereometry nalezené v přírodní směsi: dva silybiny, v nichž je α -uhlík koniferylalkoholu vázán na 3'-O a dva isosilybiny u nichž je vázán α -uhlík koniferylalkoholu na 4'-O náležející C kruhu taxofolinu (JEGEROV, 1996).

Existují dvě varianty, bílá a fialová. Z bílé kvetoucí varianty se podařilo izolovat 3-deoxy-flavonolignany silandrin, silymonin, silyhermin a neosilyherminy A a B. Ve fialové variantě se nevyskytují (JEGEROV, 1996).

3.3.1.3 Silybin

Silybin je sekundární metabolit izolovaný ze semen Ostropestřce mariánského. Objeven byl jako první ze skupiny přírodních látek flavanolignanů roce 1959. V průběhu dalších let mu byla věnována pozornost mnoha organických chemiků. Zásadní průlom v chemii u silybinu nastal při určení absolutních konfigurací silybinu A a silybinu B a v dalším vývoji metod pro jeho oddělení (BIEDERMANN, 2014).

Flavanolignan silybin je směsí dvou diastereomanů, silybinu A (3-(R),5,7-trihydroxy-2-(R)-[3-(R)-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(R)-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-on) a silybinu B (3-(R),5,7-trihydroxy-2-(R)-[3-(S)-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(S)-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-on) v přibližném poměru 1:1 (JANČOVÁ, 2010).

3.3.1.4 Kultivar silyb

Poměrně mladým kultivarem, který se ještě zcela nedostal do podvědomí odborné veřejnosti, je kultivar silyb (SPITZOVÁ, 1991).

Kultivar je definován vysokým podílem silybinu a absencí silydianinu (SPITZOVÁ, 1997) při současném zvýšení obsahu silybinu zhruba na 2 %. To znamená, že kultivar je použitelný pro izolaci čistého silybinu s možným využití v humánní i veterinární praxi (SPITZOVÁ, 1991).

4 Metody stanovení účinných látek

4.1.1 Chromatografie

Chromatografie je jednou z nejdůležitějších analytických a separačních metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu anorganických a organických látek (DRBAL, KŘÍŽEK, 1999), obsažených v nejrůznějších přírodních i technických směsích v širokém koncentračním rozmezí, tj. poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o vzorku (COUFAL, 1996).

V roce 1906 ruský botanik, fyziolog a biochemik M. S. Cvet provedl experiment, při kterém rozdělil chlorofyl na jednotlivé složky. Chlorofyl pak nechal protékat v kolonce přes sloupec křemeliny (CaCO_3). Extrakt se při průchodu kolonkou rozdělil na jednotlivá barviva. V chlorofylu a na kolonce se vytvořily jednotlivé barevné zóny viditelné okem. Tuto metodu pak Cvet pojmenoval „chromatografie“ („barvopis“, řec. chroma = barva), (CHROMATOGRRAFIE, 2017).

Do chromatografických metod lze zařadit například: vysokoúčinnou kolonovou kapalinovou chromatografii (HPLC), plynovou chromatografii (GC) nebo chromatografii na tenké vrstvě (TLC). Chromatografie využívá dělení jednotlivých složek, které se rozdělují mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fázi. Nepohyblivá fáze neboli sorbent může mít různé formy, například: částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, nebo to může být kapalina umístěná na povrchu inertního nosiče, či film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry.

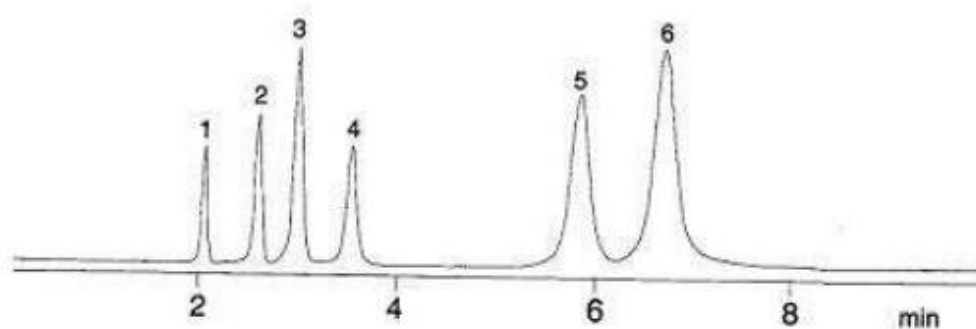
(DRBAL, KŘÍŽEK, 1999). Stacionární fáze tvoří tzv. chromatografické lože různého tvaru. Tímto ložem protéká fáze mobilní (GRAMANOVÁ, 2009). Pohyblivou fází tvoří kapalina nebo plyn. Pokud je mobilní fází kapalina, nazýváme chromatografii jako kapalinovou. V případě, že je mobilní fází plyn, jedná se o chromatografii plynovou (CHROMATOGRRAFIE, 2017).

O průběhu separačního procesu rozhodují vzájemné interakce, ke kterým dochází při styku mobilní a stacionární fáze s dělenými látkami vzorku. Podle typů interakcí lze dělit jednotlivé chromatografické metody, například: adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou a gelovou. Názvy těchto metod jsou odvozeny z mechanismu, na jehož základě dochází k separaci. V řadě případů je celkový průběh podmíněn dvěma i více mechanismy, proto se v praxi používá nejčastěji členění chromatografie na plynovou a kapalinovou (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2015).

Principem chromatografické separace je nástřik vzorku, např.: dvojice látek, do chromatografické kolony, kde se nejprve vytvoří zóna obsahující směs obou složek. Tato směs je unášena mobilní fází a k jejich rozdělení dochází na koloně naplněné sorbentem (DRBAL, KŘÍŽEK, 1999).

Po výstupu první látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu a zaznamenává tzv. eluční pík. Oddělené látky po opuštění kolony jsou na záznamu zapisovače znázorněny jako dva oddělené eluční píky (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2015), které mají různou plochu, výšku a mají od sebe různou vzdálenost (CHROMATOGRRAFIE, 2017). V ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky (DRBAL, KŘÍŽEK, 1999). Poloha píku je na ose x uváděná pomocí retenčního času (CHROMATOGRRAFIE, 2017), který představuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu maximální koncentrace detektorem (OPEKAR et al., 2005), určuje, o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza). Plocha píku (či jeho výška) určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza), viz obrázek č. 2. Identifikace píku se provádí podle tzv. standardní směsi, za stejných experimentálních podmínek, pomocí předem připravené směsi o známém kvalitativním složení (CHROMATOGRRAFIE, 2009.)

Obr. č. 2. Ukázka chromatogramu – každý pík odpovídá jedné složce analyzované směsi (CHROMATOGRRAFIE, 2017).



4.1.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) lze zařadit mezi jednu z nejčastěji používaných metod. Předností kapalinové chromatografie je vysoká účinnost, dobrá opakovatelnost a robustnost (ANONYM 4, 2017).

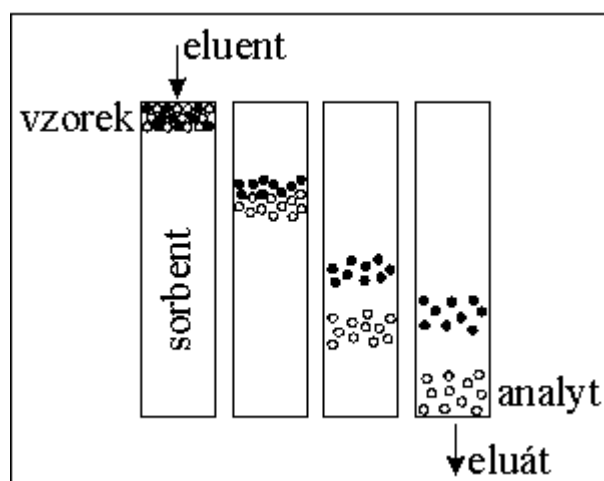
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie probíhá v uzavřeném systému (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2005). Vysoké účinnosti lze dosáhnout použitím stacionárních fází obsahujících malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu (ŠTULÍK et al., 2005). Separační kolony používané v HPLC musí odolat vysokému tlaku mobilní fáze. Jsou vyrobené z ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice (OPEKAR et al., 2005). Používají se rovné kolony o délce 10 až 100cm, nejčastěji 10 až 20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm. Při použití složitějších směsí se kolony řadí za sebou (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2005).

Stacionární fázi (sorbent) tvoří mikročástice silikagelu o velikosti částic 3 – 10 μm . Mobilní fázi (eluent) HPLC může tvořit např., voda, methanol, acetonitril v různých vzájemných poměrech (CHROMATOGRRAFIE, 2017). Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokotlakým pístovým či membránovým čerpadlem, která běžně pracují s tlaky od 1 do 60 MPa, při průtocích mobilní fáze v rozsahu od 0,1 do 10 ml/l. Při každém pohybu pístu nebo membrány vpřed dochází k vytlačení malého množství objemu mobilní fáze do systému. Dávkování vzorku se děje pomocí mikrostříkačky, tzv. „stop flow“ ventilu, kterým se umožňuje krátkodobé rozpojení

čerpadla a kolony. Po nástřiku dochází opět k propojení těchto částí systému (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2005). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde probíhá separace jednotlivých složek. Výstup z kolony je veden do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zapsán v podobě chromatogramu (CHROMATOGRRAFIE, 2017). Detektory mohou být s proměnnou a programově měrnou délkou, tzv. diode array detektory, které jsou ve zvoleném okamžiku schopné proměřit celé spektrum látky. Použity mohou být také detektory fotometrické, či fluorimetrické (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2015). Méně běžně používaným je refraktometrický detektor registrující změny indexu lomu eluátu (GRAMANOVÁ, 2009).

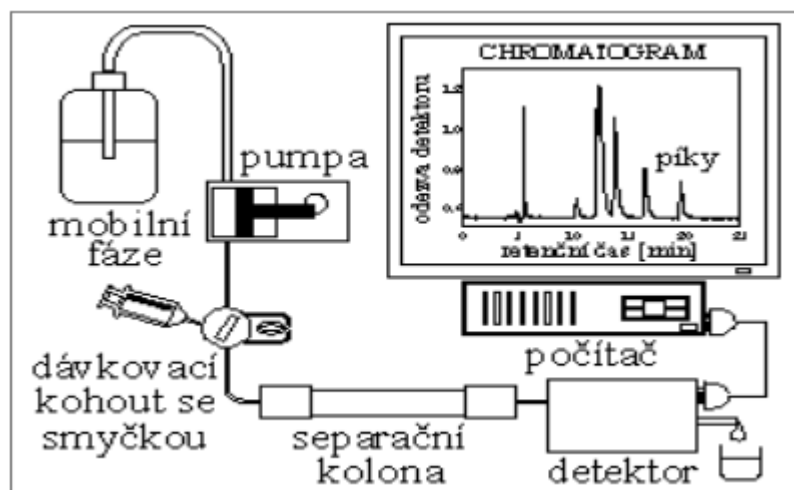
Eluát protéká měrnou jednotkou malého objemu s velkou optickou délkou. Při vhodně zvolené vlnové délce je registrována absorbance eluátu (DRBAL, KŘÍŽEK, 1999).

Obr. č. 3. Rozdělení jednotlivých složek (COUFAL, 1996)



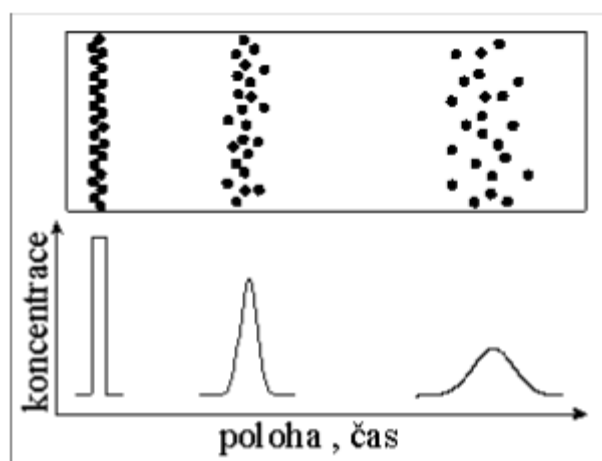
Rozdílné analyty (dělené fáze) mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi a jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpoždovány (COUFAL, 1996).

Obr. č. 4. Princip kapalinového chromatografu (COUFAL, 1996)



Během postupu kolonou se zóny dělených látek (analytů) rozšiřují. V chromatografu odpovídá zóně analytu pík neboli eluční křivka, která charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně (COUFAL, 1996).

Obr. č. 5. Kinetika separace (COUFAL, 1996)



4.1.1.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je metoda určená k dělení a stanovení plynů, kapalin nebo pevných látek s bodem varu do cca 400 °C. U plynové chromatografie je mobilní fází plyn, nazývaný nosný plyn. Stacionární fáze u náplňových kolon může

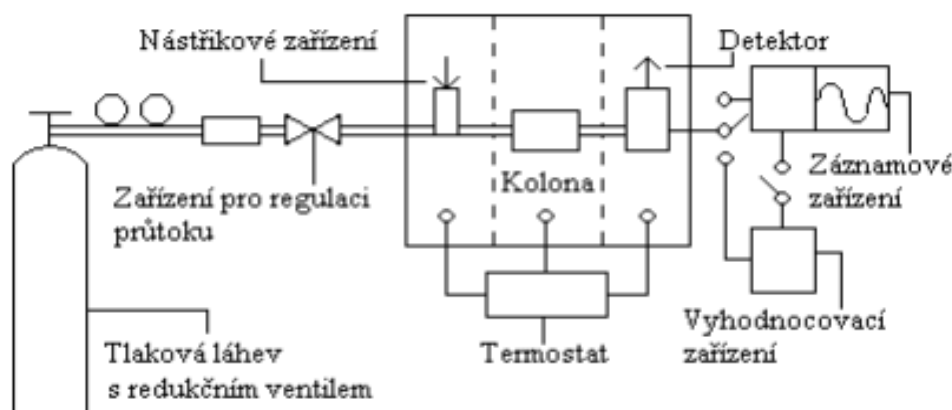
být pevná látka (aktivní uhlí, silikagel, polymerní sorbenty, oxid hlinitý), nebo vysokovroucí kapalina nanesená v tenké vrstvě na pevném, inertním nosiči (ZACHAŘ, SÝKORA, 2015).

Nosný plyn slouží v GC jako transportní médium pro plynnou směs, která je analyzována. Ve stacionární fázi se nosný plyn neinteraguje ani se složkami analyzované směsi na rozdíl od kapalinové chromatografie, kde dochází k významné interakci mezi mobilní fází a analyzovanou směsí. Plyny He, Ar, N₂, H₂, CO₂ lze použít jako nosné plyny (CHROMATOGRRAFIE, 2017).

Princípem plynové chromatografie je stále procházející nosný plyn kolonou se stacionární fází. Vzorek se vnese do vyhřívaného bloku – nástříkové komory neboli injektoru, kde dochází k odpaření, a ve formě par je vzorek unášen postupně do kolony. Složky ze vzorku se ve stacionární fázi sorbují a následně desorbují čerstvým nosným plynem. Nosný plyn unáší složky ze vzorku postupně ke konci kolony. Dělicí proces se neustále opakuje (ZACHAŘ, SÝKORA, 2017).

Každá složka ze vzorku postupuje svou vlastní rychlostí závisící na distribuční konstantě složky $K_D = c_s/c_m$, kde c_s a c_m jsou rovnovážné koncentrace složky v mobilní a stacionární fázi. Podle pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant látky postupně vycházejí z kolony a vstupují do detektoru, který indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Signál detektoru je vhodně upraven a plynule se registruje. Výsledkem je grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase nazývaný chromatogram (ZACHAŘ, SÝKORA, 2017).

Obrázek č. 6. Schéma plynové chromatografie (SCHNNEDORFEROVÁ, 2009)



4.1.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě – TLC (Thin Layer Chromatography) může mít dva typy – rozdělovací a adsorpční (SOBOTNÍKOVÁ, 2017). U rozdělovacího typu je mobilní fáze kapalina (cyklohexan, isopropanol, aceton, voda, toluen), stacionární fázi tvoří také kapalina zachycená na tenké vrstvě. Stacionární fázi u adsorpčního typu tvoří tuhý absorbent (silikagel, oxid uhličitý, iontoměniče) v podobě tenké vrstvy. Mobilní fází je kapalina (ANONYM 7, 2017).

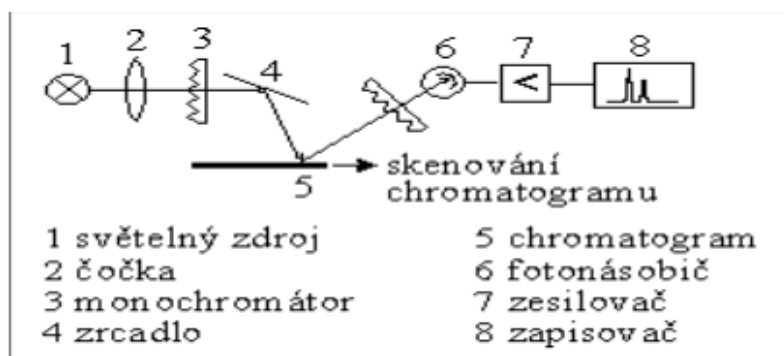
TLC je často používanou jednoduchou chromatografickou metodou, kterou je možné charakterizovat jako chromatografii v otevřené koloně. Na tenké vrstvě je podstatně méně stacionární fáze, proto může být analýza velmi rychlá v porovnání s kolonou (SOBOTNÍKOVÁ, 2007).

Při tenkovrstevné chromatografii je kapka dělené směsi nanášena na startovní místo na desce s tenkou vrstvou sorbentu (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2015). Nanáší se 0,1% až 5% roztoky v množství 200 nl až 20 μ l do skvrn o průměru 2 až 6 mm (COUFAL, 1996).

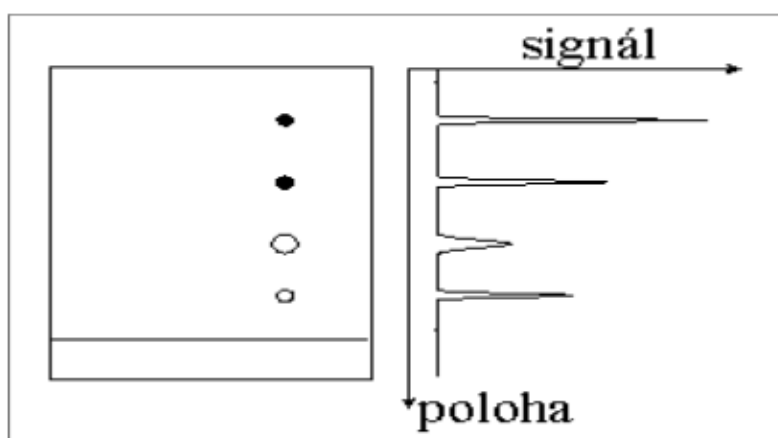
Po odpaření rozpouštědla se deska s tenkou vrstvou umístí jedním koncem do mobilní fáze chromatografické kolony (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2015), tak aby startovní místo kapek analytu zůstalo nad hladinou mobilní fáze (ANONYM 7, 2017) a nechá se saturovat parami rozpouštědel. Rozpouštědlo vzlíná vrstvou sorbentu a unáší s sebou dělené složky. (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2015). Analýza je ukončena, když čelo mobilní fáze dorazí do blízkosti protilehlého konce tenké vrstvy (ANONYM 7, 2017). Deska je následně vyjmuta, nechá se odpařit a provede se detekce. Detekce se provádí vybarvením skvrn jednotlivých složek po postřiku chromatogramu vhodným činidlem, nebo prohlížením chromatogramu v ultrafialovém světle či jinou technikou (DRBAL, KŘÍŽEK, 1999).

Kvalitativní vyhodnocení se provádí přímo nebo nepřímo. Přímá metoda stanovení je prováděná pomocí fotodozimetru (densitometru), který převede skvrny analytů na chromatogram s píky (COUFAL, 1996). Při nepřímé metodě je skvrna vyškrabána z tenké vrstvy a následně extrahována vhodným rozpouštědlem. Koncentrace látky se pak určí např. spektrofotometricky (ŠTULÍK, 2005).

Obr. 7. Princip chromatogramu (COUFAL, 1996)



Obr. 8. Vyhodnocení chromatogramu (COUFAL, 1996)



Kvalitativní vyhodnocování chromatogramů lze provést změřením hodnot retardačním faktorem R_F jednotlivých složek a porovnáním se standardními vzorky chromatografovanými za stejných podmínek. Vyhodnocení je možno provést několika způsoby, z nichž nejjednodušší je vizuální porovnání velikosti skvrn stanovené složky ve vzorku a ve standardu (GRAMANOVÁ, 2009).

Obr. č. 9. Vzorec pro měření hodnot retardačním faktorem (COUFAL, 1996)

$$R_{F,i} = \frac{u_i}{u_m} = \frac{d_i}{d_m} = \frac{1}{1+k_i}$$

u_i = rychlost skvrny i-tého analytu

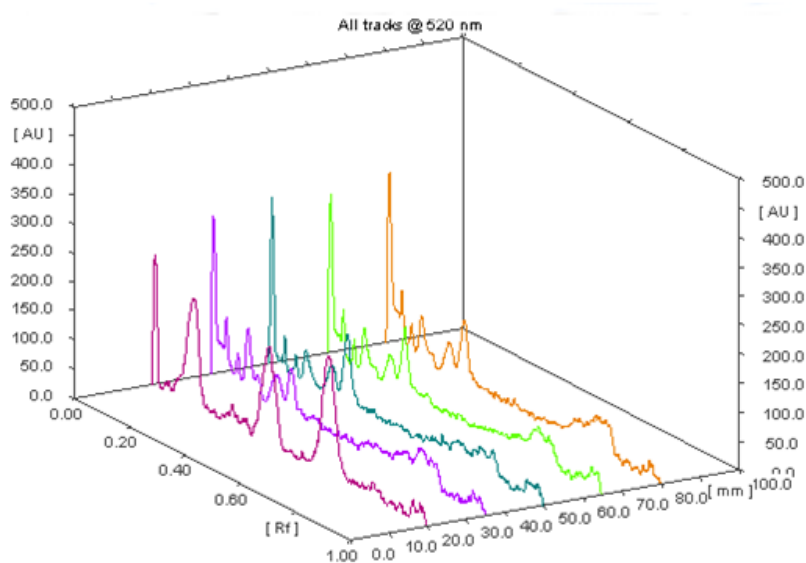
u_m = rychlost (čela) mobilní fáze

d_i = vzdálenost středu skvrny i-tého analytu od startu

d_m = vzdálenost čela mobilní fáze od startu (COUFAL, 1996)

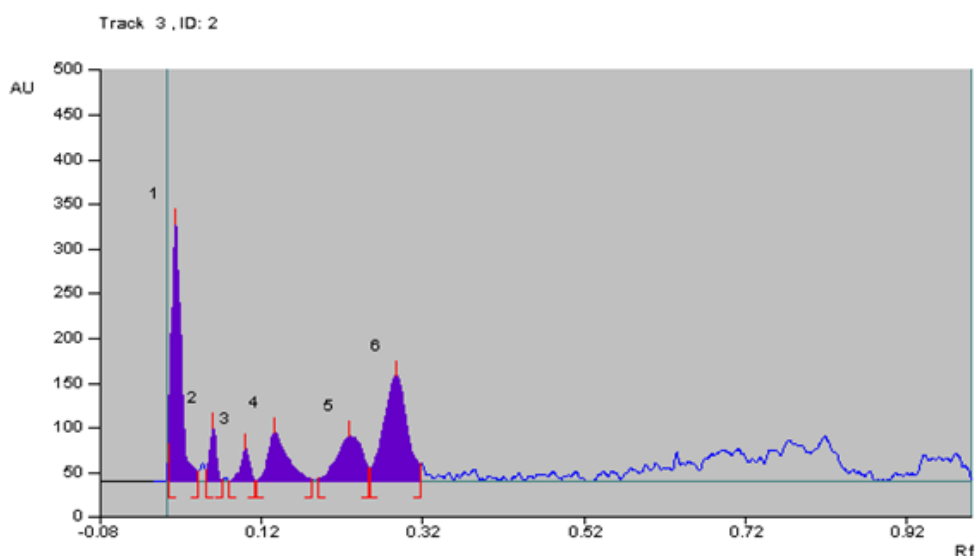
K vyhodnocení TLC desek byl použit přístroj Scanner 3 od firmy CAMAG. Jedná se o denzitometr, tj. spektrofotometr měřící odražené světlo v absorbančním i fluorescenčním módu. Výsledky byly následně zpracovány pomocí programu winCATS, verze 1.3.0. obrázek 10. (KUŽEL et al., 2008).

Obr. č. 10. Vyhodnocení TLC – desek na přístroji Scanner od firmy CAMAG (KUŽEL et al., 2008).



Pomocí denzitometru byly získány velikosti ploch jednotlivých skvrn a jejich R_f hodnoty (Obr. č. 11.). Následně byly porovnány plochy skvrn se shodnými R_f , tj. stejnými skupinami látek (KUŽEL et al., 2008).

Obr. č. 11. Vyhodnocení TLC desek pomocí densitometru (KUŽEL et al., 2008)



4.1.2 Elektroforéza

Elektroforéza se řadí do elektromigračních metod, které jsou založeny na rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnoměrném elektrickém poli. Pohyblivost nabitých částic závisí na velikosti náboje, tvaru a velikosti molekul, podmínkách prostředí a síly elektrického pole. Velikost náboje ovlivňuje stupeň ionizace, iontová síla a pH prostředí (CHURÁČEK, 1990). Elektromigrační metody se praktikují výhradně v kapalně fázi, převážně ve vodných roztocích (KŘÍŽEK, ŠÍMA, 2015).

4.1.2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE – Capillary zone electrophoresis) je moderní a perspektivní metoda někdy označována jako „open – tube“, nebo kapilární elektroforéza ve vodném roztoku (MAREČEK, 2007), která probíhá jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře (GRAMANOVÁ, 2009).

Kapiláry se vyrábí z taveného syntetického křemene a jsou poměrně křehké (KAŠIČKA, 1997). Před mechanickým poškozením je chráněn polyamidový povlak. V místě detekce je odstraněn malý podíl povlaku (GRAMANOVÁ, 2009). Kapiláry jsou většinou 30 – 80 cm dlouhé a vnitřní průměr křemenné kapiláry je obvykle menší než 100 μm (typicky 50 až 75 μm), (KAŠIČKA, 1997). Pro různé účely např.:

snížení adsorpce vzorku, nebo změně iontového náboje na kapilární stěně, je vnitřní povrch chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek (GRAMANOVÁ, 2009).

Kapilára je naplněna základním elektrolytem vedoucím elektrický proud. Na anodovém konci je do kapiláry zaveden vzorek o velikosti 1 – 10 nl (MAREČEK, 2007). Oba konce tenké křemenné kapiláry jsou ponořeny do elektrodových nádobek naplněných elektrolytem, kterým je též naplněna kapilára (KAŠIČKA, 1997). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 – 30 kV), kdy dochází v kapiláře k elektroosmotickému toku, kterým jsou jak kationty, tak anionty transportovány směrem k detektoru. Při tomto transportu dochází k separaci. O kvalitě dělení rozhoduje délka kapiláry, rychlost elektroosmotického toku a pohyblivost dělených iontů, která je závislá na pH roztoku a teplotě, při níž separace probíhá (GRAMANOVÁ, 2009). Hlavní výhodou elektroforézy je možnost zvyšovat svorkové napětí až k hodnotám 30 kV (MAREČEK, 2007). Stěnou kapiláry je odvedeno do okolního termostátového prostoru generované teplo. Rychlost částice je přímo úměrná intenzitě elektrického pole, proto jsou rychlosti migrujících iontů vyšší oproti klasické elektroforéze (GRAMANOVÁ, 2009).

Zónová elektroforéza se v současnosti provádí převážně v plošných uspořádáních na tenkých vrstvách gelů či na fólii acetátové celulózy (polyakrylamidový gel, agarózy). Tloušťky gelových vrstev jsou 0,2 – 1 mm, používají se pufrы o koncentracích 0,005 – 0,05 mol/l (VÁVROVÁ, 2008).

4.1.3 Porovnání metod pro stanovení účinných látek v Ostropestřci mariánském

V některých pokusech při porovnání vysokoúčinné kapalinové chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě byla nalezena vyšší koncentrace silybinu i přes to, že příprava roztoků k analýze byla provedena stejně. Mezi stanovením obsahu silybinu v droze Ostropestřce metodou HPLC a stanovením spektrofotometrickou metodou, po rozdělení na jednotlivé komponenty pomocí TLC, byl statisticky prokázán vysoce průkazný rozdíl. Důvodem rozdílu se stala reakce mezi diazotovanou kyselinou sulfanilovou, silybinem a isosilybinem, které na tenké vrstvě nebyly rozděleny. U HPLC byla odečtena koncentrace pouze u silybinu, resp.

iso-silybinu, protože u těchto komponent dochází na koloně k rozdělení a k samostatné detekci (INDRÁK, CHYTILOVÁ, 1992).

Podobných výsledků bylo dosaženo při porovnání kapilární zónové elektroforézy (CZE) s HPLC (QUAGLIA et al., 1999, KVASNIČKA et al., 2003, VELIKANAC et al., 2004). Obsah silymarinových komponentů v droze dokonce koreloval s jejich antioxidačními účinky. Významná byla čistota extraktů *Ostrostřice mariánské*, kdy se při vyšší čistotě snižoval antioxidační účinek, což bylo pravděpodobně způsobeno tím, že nečistoty samotné měly vyšší antioxidační účinek než identifikované flavonolignanů (KVASNIČKA et al., 2003).

Za podobně popsanych podmínek experimenty prokázaly, že metoda CZE je selektivnější oproti metodě HPLC, která je více senzitivní (VELIKINAC et al., 2004) s tím, že metoda CZE neseperoala diastereomery iso-silybinu, ale metoda HPLC jejich separaci umožnila (QUAGLIA et al., 1999) a v konečném výsledku udává nepatrně vyšší celkové obsahy flavonolignanů. Oproti metodě HPLC je metoda CZE dvakrát rychlejší a poskytuje lepší separaci silychristinu a silydianinu. Díky přesnosti vyhovuje veškerým farmakologickým kritériím (KVASNIČKA et al., 2003).

Při použití metod CZE a HPLC lze říci, že se dosahuje srovnatelných výsledků. Při porovnání HPLC a TLC metod bylo prokázáno, že vliv na výsledek má vzhledem k obsahu účinných látek nejen stupeň umletí semen (rozdíl až 20 %), ale i doba ponechání mleté drogy před další extrakcí (rozdíl až 12 %) a způsob utěsnění baňky - vlivem netěsnosti může dojít k částečnému odpaření extrakčního činidla (aceton, bod varu 56,3 °C), a tím vlastně k zakoncentrování silybinu (rozdíl až 13%), kvalita použitého extrakčního činidla a standardních látek (INDRÁK, CHYTILOVÁ, 1992) a způsob extrakce (SUBRAMANIAM et al., 2008).

4.2 Farmakologické účinky účinných látek

Ostropestřec mariánský je považován za jednu z nejrozsáhleji prostudovaných a zdokumentovaných léčivek (ANONYM 1, 2017). Využívá se především jako lék k ochraně a onemocnění jater více jak 2 000 let. V minulosti byl doporučován starořeckým lékařem Dioskoridem proti hadímu uštknutí, nebo jej doporučil římský léčitel Plinius na podporu odtoku žluči. V 17. století britský bylinář Nicholas Culpeper používal Ostropestřec jako lék při žloutence projevující se žloutnutím kůže a bělma očí. V roce 1968 se podařilo německým vědcům izolovat ze semen Ostropestřce tři látky: silybinin, silydianin a silychristin, které mají ochranný vliv na játra. Tyto látky se souhrnně nazývají silymarin (CASTLEMAN, 2004).

4.2.1 Hepatoprotektivní účinky

Silymarin má na játra několik léčebných účinků. Za prvé zabraňuje vniknutí jedovatým látkám do jaterní tkáně tím, že se váže na receptory na membránách jaterních buněk, např.: při akutní otravě muchomůrkou zelenou. Za druhé podporuje obnovu poškozených jaterních buněk a posiluje imunitní systém (CASTLEMAN, 2004). V neposlední řadě je silymarin využíván jako silný antioxidant, který chrání jaterní buňky před účinky jaterních jedů, např.: thalných solí, etanolu, paracetamolu. Při těchto otravách slouží silymarin jako lapač volných radikálů, jeho inhibiční účinek má vliv na různé oxygenasy a peroxidasy a naopak má pozitivní efekt na stabilizaci koncentrace neredukovaného glyathionu (JEGEROV, 1996).

Játra mohou poškozovat ve vysokých dávkách i běžné léky, jako například paracetamol. Při laboratorním pokusu ochránil silymarin játra zvířat, kterým byl podáván paracetamol ve vysokých dávkách. Další studia dokázala, že stejná dávka silymarinu může předejít vzniku poškození jater při podávání antibiotik, antidepresiv a léku proti psychózám (CASTLEMAN, 2004). Silymarin pro svůj ochranný efekt dokáže ochránit játra před poškozením způsobeným užíváním hormonální antikoncepce (VÍTEK, 2015).

Silymarin podporuje regeneraci nových jaterních buněk, které postupně nahrazují staré a poškozené buňky. Tímto se zvyšuje aktivita enzymů, stimuluje se jadernou polymerázou A a tím se zvyšuje syntéza ribozomálních proteinů

(TŮMOVÁ et al., 2010). Silymarin lze zařadit do tzv. hepatoprotektiv, což jsou látky napomáhající regeneraci jaterní tkáně při poškození alkoholem (ANONYM 5, 2017).

4.2.1 Ostatní účinky

Ostropestřec mariánský lze použít při léčbě endometriózy, příčině ženské neplodnosti, protože pomáhá játrům zpracovávat hormon estrogen, jehož vysoká hladina zhoršuje bolesti a jiné příznaky tohoto onemocnění. Využití nachází při prevenci a léčení žlučových kamenů, zlepšuje odtok žluče, trávicí šťávy nabité cholesterolem z jater do střev, kde pomáhá trávit tuky. Méně známé účinky jsou např.: mírné zvyšování krevního tlaku, u některých lidí pomáhá při bolestech hlavy, nebo je možné Ostropestřec použít jako „přírodní kinedril“ při cestovní nevolnosti (GUBIŠOVÁ, 2015). Nálev z drcených nažek Ostropestřce se používá k léčbě bércových vředů a křečových žil ve formě obkladů, nebo jako přídavek do koupele (BODLÁK, 2004).

Ostropestřec mariánský má v klinických studiích prokazatelné protinádorové účinky. Zpomaluje nádorový růst u nemocných rakovinou prostaty, děložního čípku, prsu, tlustého střeva, plic, kůže a mozku (VÍTEK, 2014). U nemocných snižuje lékové poškození jater při chemoterapii a urychluje zotavování. Uspíšením procesů vedoucích k odstranění toxických látek, které se mohou v těle hromadit během léčby (ANONYM 2, 2017).

V roce 2009 čeští vědci z týmu profesora Vladimíra Křena z Mikrobiologického ústavu Akademie věd ve spolupráci s odborníky olomoucké Univerzity Palackého provedly výzkum substance silybinu. Princip pokusu spočívá v tom, že silybin nádor doslova vyhladověl, tj. zabránil vývoji cév, které tumor vyživovaly. Tato metoda by mohla doplňovat klasickou chemoterapii, která sice nádor zabíjí, ale oslabuje zároveň imunitní systém člověka. Silybin nádor oslabí a chemoterapie jej zničí (GUBIŠOVÁ, 2015).

Zvýšeným pohybem na slunci narůstá počet a snižuje se věk lidí nemocných rakovinou kůže. Ultrafialová složka slunečního záření způsobuje v kůži oxidační stres, poškození makromolekul, indukuje zánětlivé procesy, předčasné stárnutí či rakovinu kůže. Vhodným prostředkem jsou přípravky obsahující rostlinné

antioxidanty. U silymarinu byla popsána jeho schopnost chránit kůži proti následkům UVB záření (VOSTÁLOVÁ, 2008).

4.2.2 Vedlejší účinky

Vedlejší účinky silymarinu/silybinu jsou jen zcela výjimečné. V provedených studiích se u 2 % až 10 % lidí objevily nežádoucí účinky v podobě kožního a gastrointestinálního podráždění a bolesti hlavy (KŘEN, WALTEROVÁ, 2005).

4.3 Využití silymarinu

4.3.1 Přípravky, léčiva

V lékařství se používají zralé plody Ostropestřce, z nichž se vyrábí především vysoce koncentrované suché extrakty, které jsou dále nabízeny v podobě kapslí, tablet, dražé, tinktur, čajů (GRÜNWALD, JÄNICKE, 2008)

Tab. č. 3. Seznam některých schválených a používaných léčiv z rostliny Ostropestřec mariánský (GUBIŠOVÁ, 2015)

Název	Výrobce	Indikace	Forma	Druh léku
Apotheke Ostropestřec mariánský čaj	Mediate s. r. o., Dolní Libchavy	Podporuje látkovou výměnu, ovlivňuje tvorbu a vylučování žluče, napomáhá při doléčování chorob	Čaj	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
HERBEX Ostropestřec mariánský	Herbex Cechia, s r. o., Nedašov	Onemocnění jater	Čaj	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
LEROS, Ostropestřec mariánský plod sypaný	Leros, s. r. o., Praha	Onemocnění jater	Čaj	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
Megafyt Ostropestřec mariánský bylinný čaj	Megafyt – R, Vrané nad Vltavou	Onemocnění jater	Čaj	Fytofarmakum, hepatoprotektivum

Ostropestřec mariánský – granulovaný plod	Ostropestřec	Onemocnění jater	Čaj	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
Harmony Line – ostropestřec blistr tobolek	Favea s. r. o., Kopřivnice	Ochrana jater před toxickými látkami, snížené riziko vzniku žlučových kamenů, antioxidační účinky	Tobolky	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
LEGALON	Madaus GmbH, Köln, SRN.	Podpůrná léčba při toxickém poškození jater, chronickém zánětlivém onemocnění jater, nebo při jaterní cirhóze	Tobolky	Hepatoprotektivum
Natrodale Ostropestřec	Vital Health Foods (ems) Bkp	Příznivě působí při jaterních chorobách, hlavně při cirhóze a zánětu jater, snižuje poškození jater alkoholem, pomáhá jako prevence při žlučových kamenech	Tobolky	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
LAGOSA	Mauermann, Arzneimittel KG, Pöcking, SRN, Dragonopharm Apotheker Püschl GmbH, Tittmoning, SRN	Toxická poškození jater, podpůrná léčba chronických jaterních onemocnění, zánětlivá onemocnění jater, cirhóza	Tablety	Fytofarmakum, hepatikum, hepatoprotektivum
Medin Terra – Ostropestřec tablety	Medinterra, s. r. o., Brno	Při jaterních chorobách, cirhóze, zánětu jater, snižuje poškození jater alkoholem, prevence při žlučových kamenech	Tablety	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
Silymarin maka	Favea s. r. o., Kopřivnice	Snižuje riziko aterosklerotických změn cévního systému a chrání játra před toxickými vlivy chemických škodlivin	Tablety	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
SILYMARIN emulgel	Favea s. r. o., Kopřivnice	Prevence poškození kůže, ekzémů, lupénky a akné	Emulgel	Fytofarmakum, hepatoprotektivum

Bylinková žvýkačka – směs Ostropestřec Herb plus	Herb Plus s. r. o.	Působí příznivě při jaterních chorobách	Žvýkačka	Fytofarmakum, hepatoprotektivum
IBEROGAST	Steigerwald Arzneimittel GmbH, Darmstadt, SRN	Poruchy funkce a mobility střev, křeče žaludku a střev	Kapky	Fytofarmakum, digestivum, hepatoprotektivum
LEGALON SIL inj. plv. sol.	Madaus GmbH, köln, SRN	Otrava muchomůrkou zelenou, příp. závažné intoxikace hepatotoxickými látkami	Prášek pro přípravu injekčního roztoku	Hepatoprotektivum
Silymarin s vit. C + E na regeneraci jater	Favea s. r. o., Kopřivnice	Doplňěk stravy při potížích způsobených poruchami jaterních funkcí a zvýšené hladiny cholesterolu v krvi	Pastilky	Fytofarmakum, hepatoprotektivum

4.3.2 Přípravky – doplňky stravy

Mezi doplňky stravy lze zařadit olej ze semen Ostropestřce mariánského v dávce 1 až 2 lžičky denně, podle stavu člověka (ANONYM 2, 2017).

Tab. č. 4. Seznam některých přípravků a doplňků stravy (GUBIŠOVÁ, 2015)

Název	Výrobce	Indikace	Forma
Bio Ostropestřec mariánský	Irel spol. s. r. o.	Detoxikace organismu	Granulovaný plod
Ostropestřec 100%	Virde	Doplňěk stravy	Olej
Silymar Plus	Virde	Doplňěk stravy	Tablety
Ostropestřec	Grešík	Doplňěk stravy působící příznivě na játra a žaludek	Tinktura
Ostropestřec mariánský	Naděje Podhorná	Doplňěk stravy podporující látkovou výměnu a funkci trávicího ústrojí	Výtažek z pupenů

Ostropestřec mariánský extrakt	Topvet Dr. Jiří Pantuček, Česká u Brna	Působí příznivě při jaterních chorobách	Extrakt
Ostropestřec extra	Solio	Podporuje tvorbu nových jaterních buněk	Olej
Panenský ostropestřecový olej	Equicentrum	Doplněk stravy	Olej
Olej z ostropestřce lisovaný za studena	ASO zdravý život	Doplněk stravy	Olej
Ostropestřec, silymarin 100mg	MedPharma	Doplněk stravy pro posílení činnosti jater	Tablety
Ostropestřecová směs JK	Dědek Kořenář	Působí na činnost jater	Směs

4.3.3 Využití u hospodářských zvířat

Silymarinový komplex se nejvíce vyskytuje v osemeni (perikarpu) plodu Ostropestřce. Získává se po odlisování oleje a následné homogenizaci slupky semene ve formě krmného expeleru. Z tohoto důvodu je možné využít Ostropestřec ve veterinární medicíně (GUBIŠOVÁ, 2015).

Výhodou přímého zkrmování expeleru z Ostropestřce je vysoká využitelnost silymarinu a dalších flavonolignanů, nacházejících se zde v amorfni formě. Při zpracování ve farmaceutickém průmyslu dochází ke krystalizaci silymarinu a tím ke snížení jeho dostupnosti z expeleru (KOPECKÁ, 2012). V expeleru je jeho obsah vysoký (až 18 %) bezlepkových bílkovin, 8 – 9 % kvalitního oleje s omega-6 kyseliny linolové a 20 % vlákniny, což podporuje správnou funkci zažívacího traktu (GUBIŠOVÁ, 2015).

Po podávání krmného expeleru do krmné dávky došlo prokazatelně ke zvýšení odolnosti vůči některým chorobám, zlepšení funkce jater, zlepšení stavu pokožky, srsti, kopyt a celkového zdravotního stavu zvířat (KOPECKÁ, 2012).

4.3.3.1 Využití u dojnic

U dojnic je zkrmování Ostropestřce vhodné v době stání na sucho, kdy se dojnice připravují na porod a na laktaci. V tomto období je potřebné docílit kromě regenerace mléčné žlázy a bachoru i regenerace jater. Zkrmováním po porodu se projeví zlepšení činnosti jaterních buněk, což chovatel ocení zejména v období, kdy dochází k negativní energetické bilanci (KOUKOLOVÁ, 2017).

Ostropestřec mariánský u dojnic posiluje celkový imunitní systém, což se může zobrazit ve zvýšení užitkovosti, zlepšení reprodukce a na stabilizaci zdravotního stavu dojnic po porodu. Proto je vhodné přidávat Ostropestřec mariánský do krmné dávky jako doplňkové krmivo v rámci prevence (KOUKOLOVÁ, 2017).

4.3.3.2 Využití u koní

Ostropestřec je vhodný nejen pro aktivní detoxikaci, ale i prevenci. Snižuje negativní vliv očkování, odčervení a posiluje imunitu, podporuje a chrání játra. Ostropestřec je cenným zdrojem mastných kyselin a pozitivně působí na růst kopyt a srsti. Je dobrým pomocníkem při schvácení kopyt, dušnosti, při dietě redukčního charakteru a různých onemocněních. Produkty z Ostropestřce je vhodné podávat nejen koním ve sportu či chovu, ale také koním v „důchodu“. Pozitivně působí zejména u koní, kteří podávají fyzické výkony. U nich je třeba chránit metabolické cesty v organismu podáváním látek, které pomohou rychle obnovit tělesnou rovnováhu (GUBIŠOVÁ, 2015).

Do krmení se mohou přidávat přímo semena v dávce 20 až 30 g, která se před podáním musí rozemlít v mlýnku, nebo připravit čaj a nalít ho do krmení (ANONYM 3, 2017),

Tab. č. 5. Seznam přípravků pro koně (GUBIŠOVÁ, 2015)

Název	Výrobce	Indikace	Forma
Silyfeed A Ostropestřec	Amino centrum krmiv	Játra, srst, kopyta, při alergiích a dušnosti	Granule
Ostropestřecový olej	RajProKone.cz	Detoxikace, posílení imunity, celkové nastartování organismu	Olej

Extrudovaný ostropestřec	RajProKone.cz	Vhodné pro hubené a hůře krmitelné koně	Extrudovaná semena
Premin ® Plus	Premin.cz	Ochrana jaterních buněk	Směs
Mariendistel Granulát	EPONA	Pro celkovou detoxikaci organismu	Granulát
SILYFEED CLA	PROFARM	Ochrana organismu	Granulát

4.4 Stres

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny působení proměnlivého vnějšího prostředí (MORICOVÁ et al., 2014). Musí se vyrovnat s požadavky prostředí, které zahrnují útok patogenů, extrémní teplotní výkyvy, nadměrnou či nedostatečnou vláhu a sluneční záření (BARTWAL et al., 2013). To může zpomalovat jejich životní funkce a poškozovat jednotlivé orgány. V krajních případech mohou vést k uhynutí (PROCHÁZKA et al., 1998). Na tyto podněty reagují rostliny tzv. stresem, který aktivuje řadu mechanismů, podobně jako obranné reakce na patogenní infekce nebo na podněty v oblasti životního prostředí, jako je např.: zásah do metabolismu rostlin či zlepšení syntézy fytochemikálií (BAENAS et al., 2014).

4.4.1 Definice stresu

KOVALČÍKOVÁ, KOVALČÍK (1973) definují obecně stres jako stav, ve kterém se nachází živý systém při mobilizování obranných či nápravných zařízení, kterými odpovídá na nespécifické podněty z prostředí. Klinický stres může vyvolat extrémní teplo, chlad nebo sluneční záření, nutriční stres nedostatek potravy nebo vody, sociální stres nízké postavení v sociálním žebříčku společenské jednotky, vnitřní stres reaguje na patogeny či toxiny.

4.4.2 Definice stresu u rostlin

Stres u rostlin je stav, kdy jsou rostliny vystaveny mimořádně nepříznivým podmínkám (LARCHER, 1988) a reagují na působení zátěžových tj. stresových faktorů – stresorů aktivací obranných mechanismů (PAVLOVÁ, 2005).

Ve fyziologii rostlin definice stresu původně vycházela z terminologie užívané ve fyziologických a technických oborech. V druhé polovině 20. století Jacob Levitt definoval pojem stres jako nepříznivý zátěžový faktor vyvolávající v objektu, v němž působí, změnu vlastností nebo funkcí zvanou strain – stresová reakce (PAVLOVÁ, 2005).

4.4.3 Stresory

Stresory – stresové faktory působí na celou rostlinu tj. na kořeny, nadzemní i podzemní část, na vyvíjející se semena. Rostlina může dosáhnout na základě kompenzačních procesů nového stavu. Při nezvládnutí vlivu stresorů dochází k uhynutí (BLÁHA et al., 2003). Obecně se stresory rozdělují na biotické a abiotické stresové faktory (PAVLOVÁ, 2005).

4.4.3.1 Biotické stresové faktory

Biotické stresové faktory jsou způsobeny biologickými činiteli (VERMA, SHUKLA, 2015). Biotické faktory zahrnují celou řadu patogenních mikroorganismů (BARTWAL et al., 2013), např.: houby, viry, bakterie, hlístice (VERMA, SHUKLA, 2015), hmyzí a živočišné škůdce nebo samotné rostliny (BLÁHA et al., 2003).

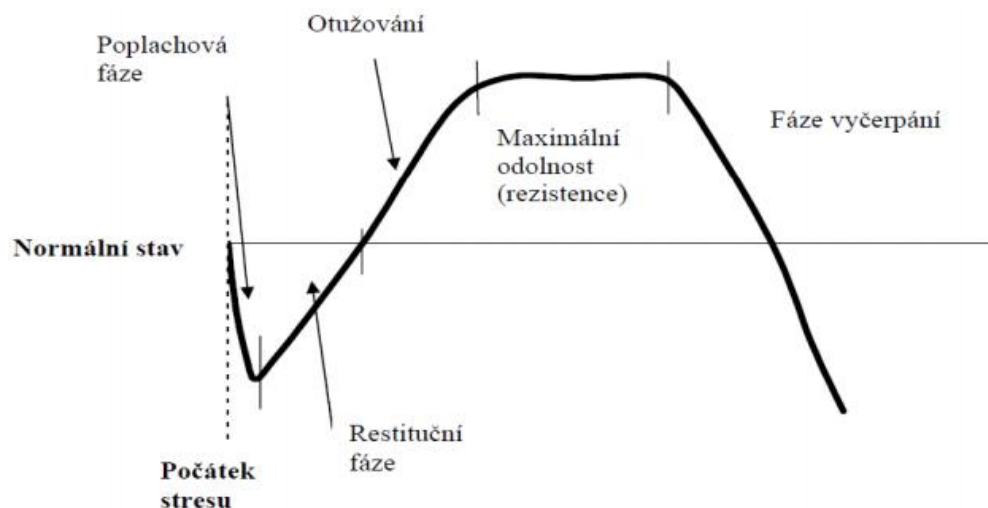
4.4.3.2 Abiotické stresové faktory

Abiotické stresové faktory mají fyzikální nebo chemickou povahu. Do této skupiny faktorů patří příliš vysoká nebo nízká ozáření, extrémní výkyvy teplot, nedostatek nebo nadbytek vody, nedostatek kyslíku a jiných minerálních prvků, nadbytek iontů v půdním roztoku (zasolení půd), nízké či vysoké pH, přítomnost toxických látek (organické látky, těžké kovy) a vítr (PAVLOVÁ, 2005).

4.4.3.3 Stresová reakce

1. Poplachová fáze – bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází narušení buněčných struktur a funkcí.
2. Restituční fáze – mobilizace kompenzačních mechanismů (do této fáze přechází stresová reakce v případě, že intenzita stresu nepřekračuje letální úroveň).
3. Fáze resistance – zvyšování odolnosti rostliny vůči působícím faktorům.
4. Fáze vyčerpání – nastává při dlouhodobém a intenzivním působením stresového faktoru (SOUDEK, 2017).

Obr. 12. Stresové reakce (SOUDEK, 2017).



4.4.4 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity (SM) jsou organické látky, které nemají zřejmý přímý vztah k metabolickým procesům zajišťujícím základní životní funkce, růst a vývoj rostlin (PAVLOVÁ, 2005). Hojně se sekundární metabolity vyskytují v houbách a rostlinách. Skládají se ze sloučenin s nízkou molekulovou hmotností (PUSTZTAHELYI et al., 2015). Nepodílejí se na dýchání, asimilaci živin nebo fotosyntéze a syntéze proteinů (BARTWAL et al., 2013). Tvorba sekundárních

metabolitů začíná při klíčení a v raném vývoji rostlin (DE-LA-CRUZ CHACON et al., 2013).

Sekundární metabolity se z chemického hlediska rozdělují do třech skupin (PAVLOVÁ, 2005). Terpeny – vyrobené z kyseliny mevalonové – složené téměř výhradně z atomů uhlíku a vodíku. Fenolické látky – složené z jednotlivých cukrů – obsahují benzenové kruhy vodíku a kyslíku. Dusík obsahující sekundární metabolity – jsou velmi rozdílné, může obsahovat síru (SCHULTZ, 2017).

1. Terpeny (terpenoidy nebo isoprenoidy):

- 2 isoprenové jednotky (C₁₀ terpeny) – monoterpeny
- 3 isoprenové jednotky (C₁₅ terpeny) – seskviterpeny
- 4 isoprenové jednotky (C₂₀ terpeny) – diterpeny
- 6 isoprenové jednotky (C₃₀ terpeny) – triterpeny
- 8 isoprenové jednotky (C₄₀ terpeny) – tetraterpeny
- 8 isoprenové jednotky (C_{>40} terpeny) – polyterpeny

2. Fenolické látky:

- Flavonoidy
- Třísloviny
- Ligniny

3. Dusík obsahující sekundární metabolity:

- Alkaloidy
- Kyanogenní glykosidy
- Glykosinoláty (BARTWAL et al., 2013)

4.4.4.1 Funkce sekundárních metabolitů

Jednou z hlavních funkcí je odolnost proti antagonistickým organismům – býložravci. Mohou fungovat jako jedy, látky snižující stravitelnost, odpuzovat nebo být naopak atraktivní pro přirozené nepřátele býložravců (BARTOŠ, 2016). SM dodávají rostlinám pevnost a ochraňují jí před dopadajícím zářením. Sekundární metabolity se podílejí na příjmu a přenosu signálu mezi rostlinou a prostředím i uvnitř rostliny (PAVLOVÁ, 2005).

4.5 Elicitace

Elicitace je metoda, která dokáže vyvolat stres, který aktivuje obranné reakce rostlin (KUŽEL et al., 2004b), nebo rostlinného explantátu, vedoucích ke změně transkripce genů kódující enzymy ovlivňujících biosyntézu sekundárních metabolitů (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

Elicitace je intenzivně zkoumaná metoda založená na faktu, že akumulace mnoha sekundárních látek v explantovaných kulturách a rostlinách je součástí jejich obranné reakce vůči působení stresových vlivů – elicitorů (SIATKA et al., 2011). Tato metoda je jednoduchá a ekonomicky výhodná bez velkých nároků na prostředí (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

Elicitace se často používá v *in vitro* (ve skle) kulturách rostlin. Důvodem tohoto použití je produkce účinných látek buněk rostlin, které jsou vzácné, chráněné, špatně se pěstují, nebo jejich vypěstování trvá příliš dlouho. Hlavní překážkou využití *in vitro* kultur v biotechnologii jsou především vysoké investiční a provozní náklady (KUŽEL et al., 2004a).

Elicitace se provádí přidáním elicitoru do růstového média. To vede ke zvýšení biosyntézy sekundárních metabolitů, které normálně slouží k obraně samotné rostliny (KUŽEL et al., 2004b).

Základním předpokladem pro úspěšnou elicítaci je nalezení vhodného elicitoru a jeho doby, kdy působí na rostlinnou kulturu *in vitro*, a jeho optimální koncentrace (KUŽEL et al., 2004a). Elicitor stojí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktor (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

4.5.1 Elicitory

Elicitory jsou biologicky aktivní látky schopné v rostlině vyvolat obrannou reakci (MAREŠOVÁ, 2007) v interakci rostlina – patogen (MORICOVÁ, 2014). Jako elicitory mohou sloužit některé metabolity vylučované patogeny – exogenní elicitory a sloučeniny, které se uvolňují narušováním buněčné stěny obou organismů – endogenní elicitory. Do exogenních elicitorů se řadí některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy, do endogenních elicitorů například: oligomery chitinu

nebo glykoproteidy, uvolněné hydrolýzou buněčné stěny patogenu či oligogalaktouronany uvolněné z buněčné stěny napadené buňky (MAREŠOVÁ, 2007).

Elicitory se mohou dělit na nespecifické a specifické. Mezi nespecifické elicitory se řadí látky, které se vyskytují v celé řadě patogenů (polysacharidy buněčných stěn, nebo některé nízkomolekulární látky jako mastné kyseliny, steroly). Specifické elicitory jsou tvořeny konkrétním patogenem – ve většině případů jde o produkty *Avr* genu, které bývají rozpoznány jen určitou skupinou hostitelů. U specifických elicitorů bývá reakce zpravidla mnohem komplexnější než je tomu u nespecifických (MORICOVÁ, 2014). Elicitory je možné rozdělit na biotické (fytormony a mikroorganismy) a abiotické (fyzikální – UV záření, chemické – ionty kovů, anorganické soli (BAENAS et al., 2014).

4.5.2 Elicitory firmy AGRA GROUP a.s.

4.5.2.1 N-FENOL MIX[®]

N-FENOL MIX[®] zvyšuje příjem a využití živin zahradními či polními plodinami zejména v jarním období, kdy jsou již porosty dostatečně aktivní a mají podmínky pro silné zvýšení metabolického výkonu. To se pozitivně odráží ve výnosových a kvalitativních parametrech (AGRA GROUP a. s., 2017), dobrým zakořeňováním a intenzivním růstem rostliny (AGRA 1, 2017). Stimulací dochází k podpoře tvorby výnosotvorných prvků a omezení jejich redukce. (AGRA GROUP a. s., 2017).

4.5.2.1.1 Cíl aplikace

Cílem aplikace je ovlivnění autoregulačních systémů rostliny, které se významně podílejí na řízení tvorby hospodářského výnosu. N-FENOL MIX[®] má zvláště vysoký účinek za stresových podmínek – například: aplikace herbicidů, po období sucha nebo zamokření. Po aplikaci rostlina vytváří větší hmotu biomasy.

Nitrofenoláty zasahují přímo do metabolismu rostliny na různých úrovních a pozitivně působí na kapacitu tvorby a ukládání látek významných pro rostlinu. Na účinku nitrofenolátů se podílí elicitace, kde nitrofenoláty jsou nositeli informace, která probudí v rostlině obranné metabolické aktivity, aniž by následoval nástup stresu a odčerpání zdrojů energie (AGRA GROUP a. s., 2017)

4.5.2.1.2 Aplikace

N-FENOL MIX[®] lze míchat s listovými hnojivy, regulátory růstu, přípravky na ochranu rostlin a hnojivem DAM (AGRA GROUP a. s., 2017).

Před aplikací musí mít rostliny dostatečnou aktivní listovou plochu. V případě kombinace s hnojivem DAM musí postřiková kapalina ulpívat na listech a nestékat na půdu, aby co největší množství účinných látek proniklo skrz listovou plochu do rostliny (AGRA GROUP a. s., 2017).

Při aplikaci před kvetením významně ovlivňuje klíčení pylových zrn, má také pozitivní vliv na násadu plodů a semen. Aplikace po působení mrazu, krupobití nebo po předchozí aplikaci méně selektivních pesticidů přispívá k nastartování příjmu živin z půdy a rychlejšímu překonání stresu a zahájení růstu (AGRA 1, 2017)

Tab. č. 6. Chemické složení (AGRA GROUP a. s., 2017).

Účinné látky	v %	g/l
4-nitrofenolát sodný	0,9	9
2-nitrofenolát sodný	0,6	6
5-nitroguajakolát sodný	0,3	3

Obsah rizikových prvků splňuje zákonem stanovené limity – kadmium 1, olovo 10, rtuť 1, arzen 10, chrom 50 mg/kg (AGRA 1, 2017).

4.5.3 NanoFYT Si[®]

NanoFYT Si[®] je přípravek s obsahem stabilizované nanočástice SiO₂, který je využíván pro mimokořenovou výživu postříkem na list. Tento přípravek je určen k rychlému dodávání křemíku do rostlin. Díky křemíku se u rostlinných buněk zvyšuje pevnost stěn, což se projevuje zvýšením tuhosti kutikuly listů a zvýšenou tolerancí ke škůdcům a nemocem (AGRA 2, 2017), snižuje výpar vody v suchém období, snižuje toxické působení některých kovů, především hliníku, manganu a napadání rostlin houbovými chorobami a plísněmi, zvyšuje toleranci rostlin k zasolení půdy, podporuje asimilaci dusíku a zvyšuje výnos a kvalitu produkce (AGRA GROUP a. s. 2, 2017).

NanoFYT Si[®] obsahuje také přírodní estery jako formulační látky, které působí v kombinaci s nanočásticemi příznivě na kondici pěstovaných kultur a výrazně přispívá k omezení biotických a abiotických stresů během vegetace (AGRA 2,2017).

4.5.3.1 Chemické složení

NanoFYT Si[®] se obsahuje 20 % SiO₂ ve formě stabilizovaných hydratovaných nanočástic a formulační látky – specifické přírodní estery (AGRA 2, 2017).

4.5.3.2 Křemík

Křemík je prvkem s prokázanými benefičními účinky. Sloučeniny křemíku mají významnou roli při biotickém a abiotickém stresu. Jeho příjem a dostupnost má zásadní vliv na výnos a kvalitu rostlin (AGRA GROUP a. s. 2,2017).

Přípravek NanoFYT Si[®] obsahuje křemík ve formě stabilizovaných nanočástic hydratovaného oxidu křemičitého o průměru 15 nm. Tyto nanočástice byly vyvinuty speciálně pro foliární aplikace. Působí v listech jako specifický zdroj křemíku, který se může aktivně zapojit do metabolismu rostliny. Nanorozměry částic jsou zodpovědné za zvláštní vlastnosti přípravku a souvisí s jeho vysokou účinností. NanoFYT Si[®] obsahuje jako formulační látky přírodní estery, které v komplexu s nanočásticemi křemíku působí pozitivně k omezení biotických a abiotických stresů během vegetace (AGRA GROUP a. s. 2,2017).

4.5.4 ELITiC®

ELITiC® je pomocný rostlinný přípravek do chmele a léčivých rostlin, který obsahuje optimální poměr biokompatibilního vodorozpustného komplexu titanu a hydrolyzátu bílkovin. Působením dochází v rostlinách ke specifickému ovlivnění zvýšené tvorby sekundárních metabolitů. Hydrolyzát aminokyselin navíc podporuje tvorbu auxinů a cytokininů, které mají vliv na vitalitu a růst rostlin (AGRA 3, 2017).

Přípravek dále obsahuje emulgovaný řepkový olej, který zlepšuje pronikání účinných látek před kutikulu i v období přisušků kdy je ochranná vrstva listu špatně propustná. ELITiC® obsahuje také draslík, který v citrátové formě stabilizuje pH (AGRA 3, 2017)

ELITiC® významně iniciuje tvorbu sekundárních metabolitů, stimuluje dělení buněk a tvorbu chloroplastů, podporuje fotosyntézu a významně přispívá k vysoké a stabilní kvalitě produkce. U chmelu významně ovlivňuje množství alfa hořkých kyselin v požadovaném množství. V případě léčivých rostlin zvyšuje obsah sekundárních metabolitů např.: kyselin kávové, cichorové, kaftarové, chlorogenové, rutinu atd. Částečně zvyšuje i přirozenou cestou odolnost rostlin proti chorobám (AGRA 3, 2017).

Tab. č. 7. Chemické a fyzikální vlastnosti (AGRA 3, 2017).

Vlastnost	Hodnota
Celkový dusík jako N	min. 0,14 %
Suma volných aminokyselin	min. 0,1 %
Oxid draselný (K ₂ O)	4,0 %
Hodnota pH	5,0 - 7,0

4.5.4.1 Aplikace u chmelu

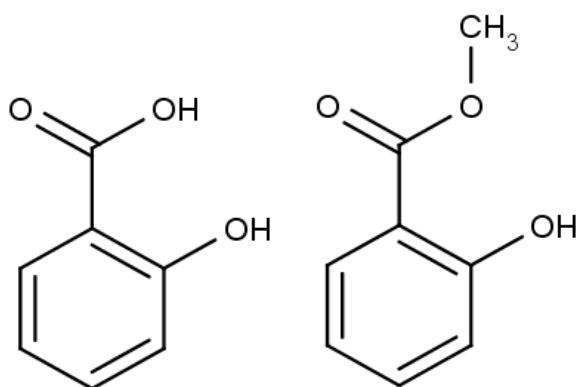
Aplikace se u chmelu provádí v dávce 0,5 l/ha na 1 500 až 2 000 l vody. První aplikace se provádí na začátku kvetení chmele a druhá aplikace cca 14 dní po první aplikaci (AGRA 3, 2017)

4.5.5 Ostatní elicitory

4.5.5.1 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA) je 2-hydroxy-benzoová kyselina. Je to fenolická sloučenina, jejíž název je odvozen od latinského názvu pro vrbu (*Salix*), (JANDA, VALENTOVÁ, 2014).

Obr. č. 13. Kyselina salicylová (vlevo) a její methylester (vpravo), (KOTYK, 2009).



První zmínky o kyselině salicylové objevují kolem roku 2200 př. n. l. ve sbírce receptů neznámého sumerského lékaře. Ve středověku Hippokrates používal odvar z kůry vrby jako lék proti horečce (NORSETI, 2017). V roce 1899 byl v německé společnosti Bayer chemikem Hoffmanem synteticky připraven derivát kyseliny salicylové – kyselina acetylsalicylová, která je účinnou složkou jednoho z nejrozšířenějších léků – aspirinu (JANDA, VALENTOVÁ, 2014).

SA je rostlinný hormon regulující řadu fyziologických procesů jako je klíčení semen, buněčný růst, dýchání, zavírání průduchů, výnos plodů. SA je poslem pro lokální i systémovou rezistenci (KOTYK, 2009). Dále je jednou z klíčových molekul, které regulují reakci rostlin na infekci patogenními mikroorganismy. Odpovídá na biotické a abiotické stresové faktory (JANDA, VALENTOVÁ, 2014).

Bylo prokázáno, že kyselina salicylová je silný a potencionální nástroj na snížení či zmírnění nepříznivých účinků abiotických stresových faktorů u rostlin (IQBAL, 2015).

4.5.5.2 Kyselina acetylsalicylová

Kyselina acetylsalicylová (ASA) neboli 2-acetoxybenzoová kyselina patří do fenolytických kyselin. Jako derivát kyseliny salicylové se vyskytuje v léku Aspirin (NORSETI, 2017).

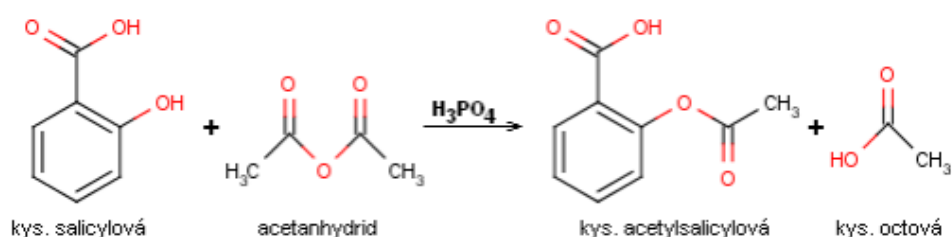
ASA se skládá z 60 % uhlíku, 35,5 % kyslíku a 4,5 % vodíku. Při pokojové teplotě se jeví jako bílý krystalický prášek s bodem tání 136 °C a bodem varu 140 °C o hustotě 1,40 g/cm³ (GUBIŠOVÁ, 2015).

4.5.5.2.1 Využití kyseliny acetylsalicylové

Pod názvem aspirin se ASA používá při léčbě bolestí končetin, hlavy, při akutních bolestech svalů, šlach, kostí a kloubů. Při chronických bolestech např.: při artróze a revmatu snižuje horečku a používá se před kardiovaskulárními chorobami. U akutních a chronických zánětů snižuje zánětlivou reakci. ASA zabraňuje shlukování krevních destiček, trombocytů, které se s červenými i bílými krvinkami nacházejí v plazmě. To znamená, že kyselina acetylsalicylová ovlivňuje srážení krve tím, že zabraňuje agregaci trombocytů (NORSETI, 2017).

Kyselina acetylsalicylová vzniká při esterifikaci fenolové skupiny. K tomu dochází zahříváním kyseliny salicylové s acetanhydridem za přítomnosti kyseliny fosforečné (NOVÁKOVÁ, 2011).

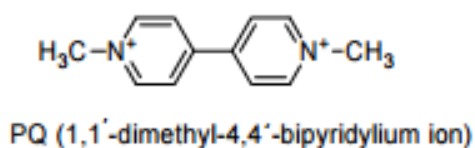
Obr. č. 14. Vznik kyseliny acetylsalicylové z kyseliny salicylové (NOVÁKOVÁ, 2011).



4.5.5.3 Paraquat

Paraquat neboli methylviologen slouží jako kontaktní herbicid či vysušovadlo. Je to bezbarvá až žlutá krystalická látka patřící do bipyridilových herbicidů. (ANONYM 6, 2017). Jako elicitor byl paraquat použit při elicitaci v kalusové kultuře *Silybum marianum* ve třech koncentracích roztoku methylviologen-dichloridu dihydrátu v ethanolu – $c_1 = 10,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ [$2,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$], $c_2 = 1,0 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ [$2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$], $c_3 = 0,1 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ [$2,19 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$]. Pro zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru methylviologen na obsah flavonolignanů byl použit t-test rozdílů dvou poměrů. Pro hladinu významnosti $P=0,05$, stupně volnosti $v=4$ je kritická hodnota testovaného kritéria 2,78. Nárůst obsahu flavonolignanů o 1250 % byl zaznamenán po 6 hodinové elicitaci methylviologinem o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$. V ostatních případech po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách se obsah flavonolignanů jen nepatrně zvýšil nebo naopak výrazně klesl. Lze předpokládat, že methylviologen působí jako stresový faktor vyvolávající zvýšenou tvorbu obranných látek – flavonoidů (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

Obr. č. 15. Chemická struktura methylviologenu (paraquat), (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009)



5 METODIKA

Na základě zadání diplomové práce byl zjišťován vliv elicitorů na obsah některých látek v semenech Ostropestřce mariánského. Pro tento účel byly provedeny dva pokusy v roce 2015 v Českých Budějovicích a v roce 2016 ve Stojanovicích.

5.1 Pokus č. 1

V roce 2016 byl proveden v lokalitě Stojanovice v okrese Klatovy pokus s cílem zhodnocení vlivu preparátů NanoFYT Si[®] a N-FENOL MIX[®] na obsah vybraných účinných látek v semeni Ostropestřce.

Pro tuto práci byl Ostropestřec mariánský pěstován v CHKO Šumava ve vesnici Stojanovice nacházející se v 2 km jihozápadně od Velhartic v nadmořské výšce 700 m n. m., s ročním úhrnem srážek 820 mm, sumou roční teploty 7,1 °C, se středně zvlněným až mírně svažitém terénem.

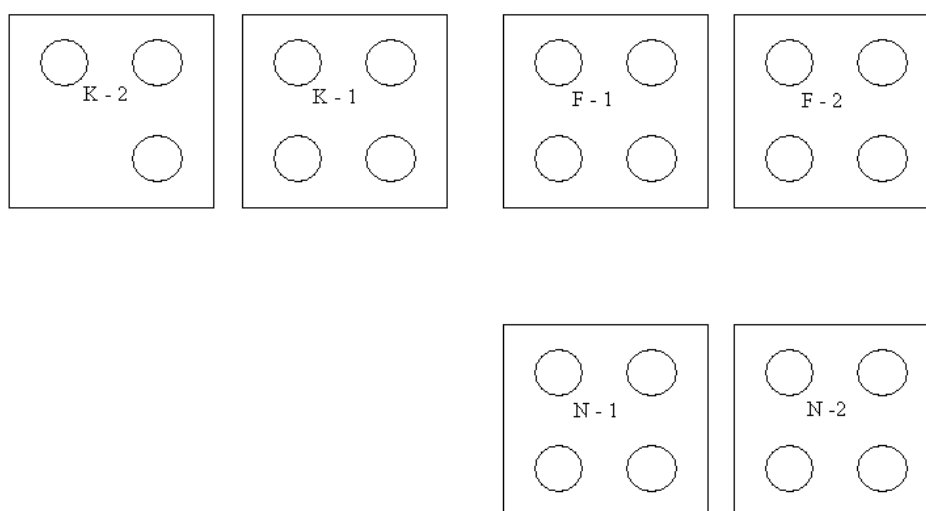
V tomto pokusu byly použity sazenice Ostropestřce (předpěstované ve skleníku ZF JU v Českých Budějovicích), které byly vysazeny ve dvou termínech, čili ve dvou různých růstových fázích – u prvního pokusu 3 – 4 pravé listy, u druhého pokusu 6 – 7 pravých listů. Pro tento pokus bylo vytyčeno 6 pokusných parcel, každá o velikosti 1 m². Dvě parcelky sloužily jako kontrolní. U druhé kontroly byly v růstové fázi 6 – 7 listů vysazeny pouze tři rostliny. Na ostatních parcelkách byly vysazeny vždy 4 rostliny. Další dvě parcelky byly ošetřeny elicitem NanoFYT Si[®] o koncentraci 1ml na 1 litr vody. Zbylé dvě parcelky byly ošetřeny elicitem N-FENOL MIX[®] o koncentraci 0,5 ml na 1 litr vody. Během vegetace bylo provedeno pouze odplevelení parcelek.

Předplodinou Ostropestřce byly rané brambory, po jejichž sklizni následovalo hnojení hnojem v dávce 30 – 40 t/ha a následné zaorání. Na jaře se provedlo urovnání povrchu smyky. Vytyčená část pole na pokus byla ručně upravena. Během vegetace bylo prováděno ruční odplevelování.

Použité sazenice byly předpěstované ve skleníku. Výsev semen byl proveden 20. března 2016. Sazenice byly na pole vysazeny v termínech 16. 5. 2016 a 22. 5. 2016. Postřiky byly prováděny ve dvacetidenním intervalu.

První postřik byl proveden 15. 6. 2016. Druhý postřik byl proveden 5. 7. 2016. Třetí postřik měl být proveden 25. 7. 2016, ale z důvodu nepříznivého počasí (déšť) musel být postřik odložen na 3. 8. 2016. Sklizeň probíhala ručně od 10. 8. 2016 do poloviny září. Ostropestřec dozrává nestejně. Pokud by se sklízelo najednou, ze zralých úborů by vylétaly semena a došlo by ke ztrátám a následnému zaplevelení pozemku příští rok.

Obr. 16. Schéma parcel vlastního pokusu v lokalitě Stojanovice



K-1 – Kontrola H₂O fáze 3 – 4 pravých listů

K-2 – Kontrola H₂O fáze 6 – 7 pravých listů

F-1 – N-FENOL MIX[®] fáze 3 – 4 pravých listů

F-2 – N-FENOL MIX[®] fáze 6 – 7 pravých listů

N-1 – NanoFYT Si[®] fáze 3 – 4 pravých listů

N-2 – NanoFYT Si[®] fáze 6 – 7 pravých listů

5.2 Pokus č. 2.

V roce 2015 byl v Českých Budějovicích proveden pokus s cílem zhodnocení vlivu elicitorů na obsah vybraných účinných látek v semeni Ostropestřce. Jako elicitor byla použita kyselina acetylsalicylová (ASA) ve třech různých koncentracích, nízké [10^{-5} mol/l], střední [10^{-4} mol/l] a vysoké [10^{-3} mol/l].

Na pozemku Jihočeské univerzity bylo vytyčeno 24 pokusných parcel, každá o velikosti 1 m². Na 4 kontrolních parcelách bylo provedeno ošetření pouze vodou. 4 parcely byly ošetřeny kyselinou acetylsalicylovou v koncentraci [10^{-5} mol/l], 4 parcely kyselinou acetylsalicylovou v koncentraci [10^{-4} mol/l], 4 parcely byly ošetřeny kyselinou acetylsalicylovou v koncentraci [10^{-3} mol/l]. NanoFYTEM[®] Si byly ošetřeny 4 parcely v koncentraci 1ml na 1 litr vody a N- FENOL MIXEM[®] také 4 parcely v koncentraci 0,5ml na 1 litr vody.

Obr. 17. Schéma ošetření na parcelách na pokusném pozemku JU v Českých Budějovicích

K	N	K	NAN	S	V
V	NAN	S	FEN	N	FEN
S	FEN	V	K	V	NAN
N	K	S	NAN	FEN	N

K – kontrola H₂O

N- nízká koncentrace ASA

S – střední koncentrace ASA

V – vysoká koncentrace ASA

NAN- NanoFYT Si[®]

FEN – N-FENOL MIX[®]

Semena Ostropestřce byla zaseta 4. května 2015. V průběhu vegetace byly aplikovány tři postřiky. První 27. června 2015, druhý 16. července 2015 a třetí 13. srpna 2015. Sklizen semen proběhla postupně v druhé dekádě září 2015.

5.3 Příprava vzorku k analýze stanovení účinných látek

Do odměrné baňky o objemu 25 ml byl navážen 1 g jemně pomleté droby semene Ostropestřce.

K navážce se přilil 1 ml redestilované vody a to se nechalo 1 hodinu stát. Do této směsi bylo přidáno 23 ml acetonu (p. a) a metanolu (p. a), (26:20, v/v). Takto připravená směs byla pomocí ultrazvuku míchána 1 hodinu, poté následovala 12 hodinová macerace. Po 12 hodinách byla acetonmetanová frakce filtrována přes nylonový filtr a extrakt byl 6x zředěn (100 μ l vzorku + 500 μ l metanolu).

5.4 Stanovení účinných látek v semeni Ostropestřce mariánského

Stanovení obsahu látek silymarinového komplexu vzorků semen z pokusu č. 1. a pokusu č. 2. zajistil vedoucí práce Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

K analyzování extraktů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPCL). Na koloně Nucleosil C 18 o rozměrech 4,6 x 250 mm (zrnění 5 μ m) probíhala separace. Tato kolona byla spojena s předkolonou naplněnou sorbentem stejných vlastností jako v koloně.

Směs metanolu, acetonitrilu a vody s přídávkem kyseliny fosforečné byla užitá jako mobilní fáze. Mobilní fáze A: 22% CH₃OH (metanol) + 15% CH₃CN (acetonitril) + 63% H₂O + 0,5% H₃PO₄; mobilní fáze B: 40% CH₃OH + 20% CH₃CN + 40% H₂O + 0,5% H₃PO₄.

Gradient byl následující: 0 min. – 100 % A; 30 min. – 100 % B; 35 min. – 100 % A. Celkový čas analýzy byl 40 minut. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou, byla 0,9 ml/min. Objem dávkovací smyčky byl μ l.

Pomocí diodového pole (DAD) byla provedena detekce. Získaná data byla zpracována při vlnové délce 288 nm a vyhodnocena pomocí softwaru Intercative Graphics Version 6.5.

Pomocí externí kalibrace s použitím standardních roztoků bylo provedeno kvantitativní hodnocení.

Pro kalibraci kvantitativního stanovení silymarinu byly připraveny zásobní roztoky taxifolinu (TX), silychristinu (SCH), silydianinu (SD), silybinu A, silybinu B (SB A, B) a silybininu A, silybininu B (ISB A, B) v metanolu. Z těchto zásobních roztoků byl připraven směsný standard, jehož naředěním byly dále připraveny směšné standardní roztoky o koncentracích: 2,219 – 142 ug/ml TX; 625 – 104 ug/ml SCH; 3.313 – 212 ug/ml SD; 3,563 – 228 ug/ml SB A, B; 0,836 – 53,50 ug/ml ISB A, 0,352 – 22,5 ug/ml ISB B.

6 VÝSLEDKY

6.1 Výsledky pokusu č. 1. Stojanovice

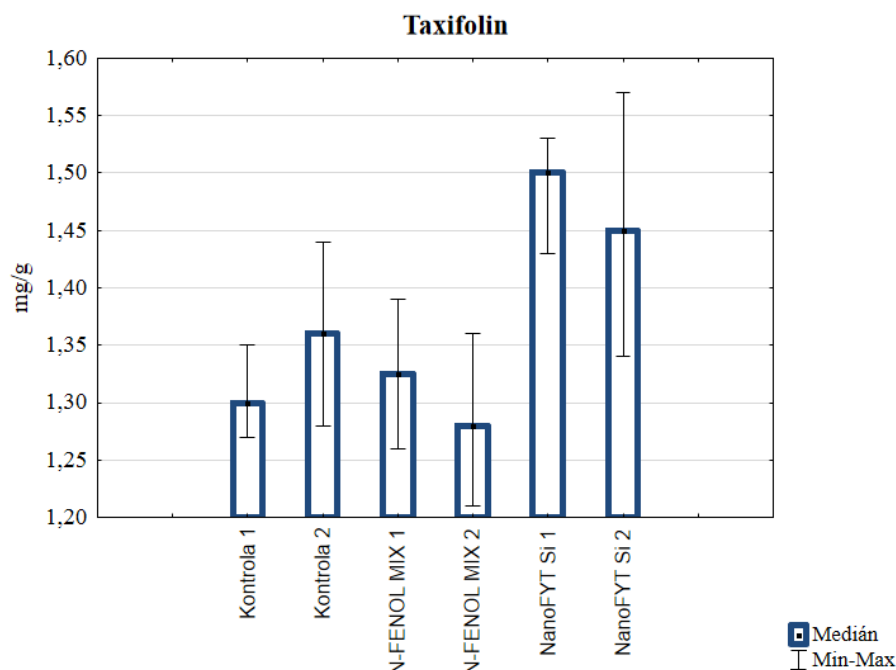
Pomocí metody HPLC byly u semen Ostropestřce mariánského získaných z pokusu 1. a 2. stanoveny hodnoty silymarinového komplexu a jeho jednotlivých složek – taxifolin, silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A a isosilybin B. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny a statisticky zpracovány v programu Microsoft Office, STATISTICA 12 a v programu R 3.2.3.

V příloze jsou uvedeny tabulky ke každému grafu množství účinné látky.

Tab. č. 8. Obsah účinných látek v pokusu č. 1.

Vzorky	Taxifolin [mg/g]	Silychristin [mg/g]	Silydianin [mg/g]	Silybin A [mg/g]	Silybin B [mg/g]	Isosilybin A [mg/g]	Isosilybin B [mg/g]	Suma 100% [mg/g]	Průměr	Sušina %
Kontrola 1	1,35	11,52	1,6	838	13,1	2,81	0,65	39,82	39,48	95,14
	1,31	10,77	1,57	8,99	13,76	2,79	0,61	39,8		
	1,27	10,86	1,49	9,03	13,22	2,94	0,7	38,79		
	1,29	10,96	1,52	8,73	13,41	2,94	0,64	39,5		
	1,31	11,03	1,55	8,89	13,37	2,69	0,65			
Kontrola 2	1,36	11,32	1,69	8,83	13,3	2,8	0,66	39,96	40,76	95,14
	1,44	11,96	1,39	9,13	14,43	2,42	0,7	41,47		
	1,28	10,99	1,55	9,93	13,46	2,97	0,66	40,85		
	1,36	11,42	1,54	9,3	13,73	2,73	0,67			
N-FENOL MIX 1	1,39	12,65	1,69	9,69	14,91	3,3	0,64	44,28	43,25	94,4
	1,31	11,94	1,6	9,15	14,08	3,11	0,61	41,8		
	1,34	13,01	1,7	9,79	14,98	3,26	0,71	44,79		
	1,26	12,24	1,6	9,21	14,09	3,06	0,67	42,12		
	1,33	12,46	1,65	9,46	14,82	3,1	0,85			
N-FENOL MIX 2	1,29	12,43	1,76	9,8	15,3	3,15	0,91	44,65	43,42	93,79
	1,21	11,66	1,65	9,19	14,35	2,95	0,85	41,87		
	1,36	12,49	1,82	9,92	15,3	3,25	0,84	44,98		
	1,27	11,71	1,71	9,3	14,34	3,05	0,78	42,17		
	1,28	12,07	1,74	9,55	14,82	3,1	0,85			
NanoFYT Si 1	1,43	12,47	1,79	9,95	15,29	3,26	0,84	45,02	44,84	92,45
	1,48	12,79	1,12	10,02	15,46	3,24	0,83	44,94		
	1,53	12,35	1,9	9,67	14,98	3,33	0,8	44,56		
	1,52	12,53	1,65	10,2	15,13	3,01	0,77	44,82		
	1,49	12,54	1,62	9,96	15,22	3,21	0,81			
NanoFYT Si 2	1,43	12,68	1,8	10,06	15,54	3,31	0,86	45,68	44,94	93,74
	1,34	11,88	1,69	9,43	14,57	3,11	0,81	42,82		
	1,57	13,03	2,11	10,22	15,83	3,42	0,88	47,06		
	1,47	12,23	1,98	9,59	14,86	3,21	0,83	44,18		
	1,45	12,45	1,9	9,83	15,2	3,26	0,85			

Graf č. 1. Obsah účinné látky Taxifolin

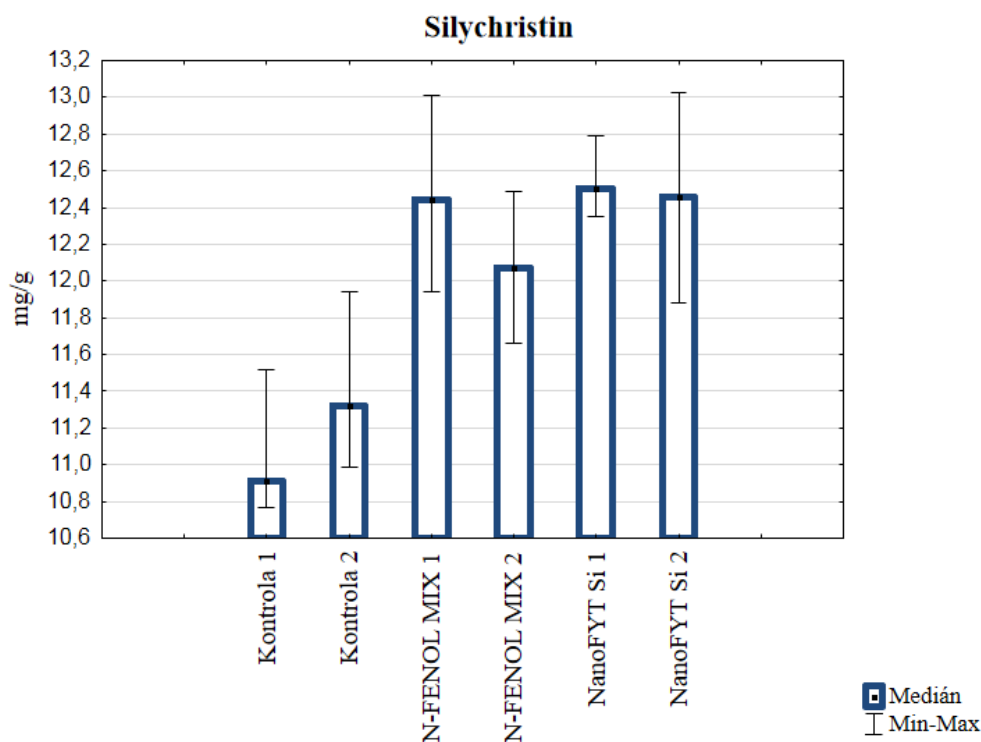


V Grafu č. 1. je znázorněn obsah účinné látky Taxifolin. U elicitoru NanoFYT Si[®] 1 a kontroly 1 byl prokázán statisticky průkazný rozdíl u fáze 3 – 4 pravých listů ($p= 0,0007177$). Rozdíl při použití elicitoru N-FENOL MIX[®] 1 v porovnání s NanoFYT Si[®] 1 byl u fáze 1 ($p= 0,0015999$) a mezi NanoFYT Si[®] 2 a N-FENOL MIX[®] 2 u fáze 2 ($p= 0,0290570$).

Tab. č. 9. Statistická průkaznost u Taxifolinu.

	p- value	Statistická průkaznost
Kontrola 1 – N-FENOL MIX 1	0,8119487	Ne
NanoFYT Si 1 – N-FENOL MIX 1	0,0015999	Ano
NanoFYT Si 1 – Kontrola 1	0,0007177	Ano
Kontrola 2 – N-FENOL MIX 2	0,4573796	Ne
Kontrola 2 – NanoFYT Si 2	0,1959226	Ne
NanoFYT Si 2 – N-FENOL MIX 2	0,0290570	Ano

Graf č. 2. Obsah účinné látky Silychristin.

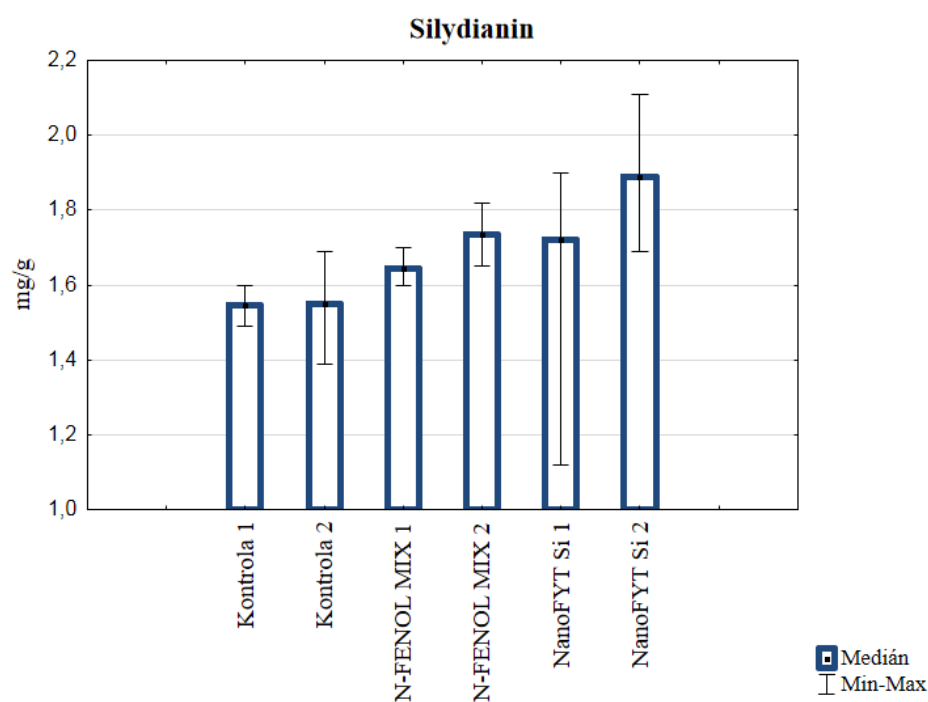


V grafu č. 2. byl u účinné látky Silychristin statisticky průkazný rozdíl u kontroly 1 a N-FENOL MIX[®] 1 ($p=0,0006885$), u kontroly 1 a NanoFYT Si 1 ($p=0,0004751$) u fáze 3 – 4 pravých listů. U fáze 6 – 7 pravých listů byl statisticky průkazný rozdíl pouze mezi kontrolou 2 a NanoFYT Si[®] 2 ($p=0,0438287$).

Tab. č. 10. Statistická průkaznost u Silychristinu.

	p - value	Statistická průkaznost
Kontrola 1 – N-FENOL MIX 1	0,0006885	Ano
NanoFYT Si 1 – N-FENOL MIX 1	0,9509028	Ne
NanoFYT Si 1 – Kontrola 1	0,0004751	Ano
Kontrola 2 – N-FENOL MIX 2	0,2529575	Ne
Kontrola 2 – NanoFYT Si 2	0,0438287	Ano
NanoFYT Si 2 – N-FENOL MIX 2	0,5018169	Ne

Graf č. 3. Obsah účinné látky Silydianin.

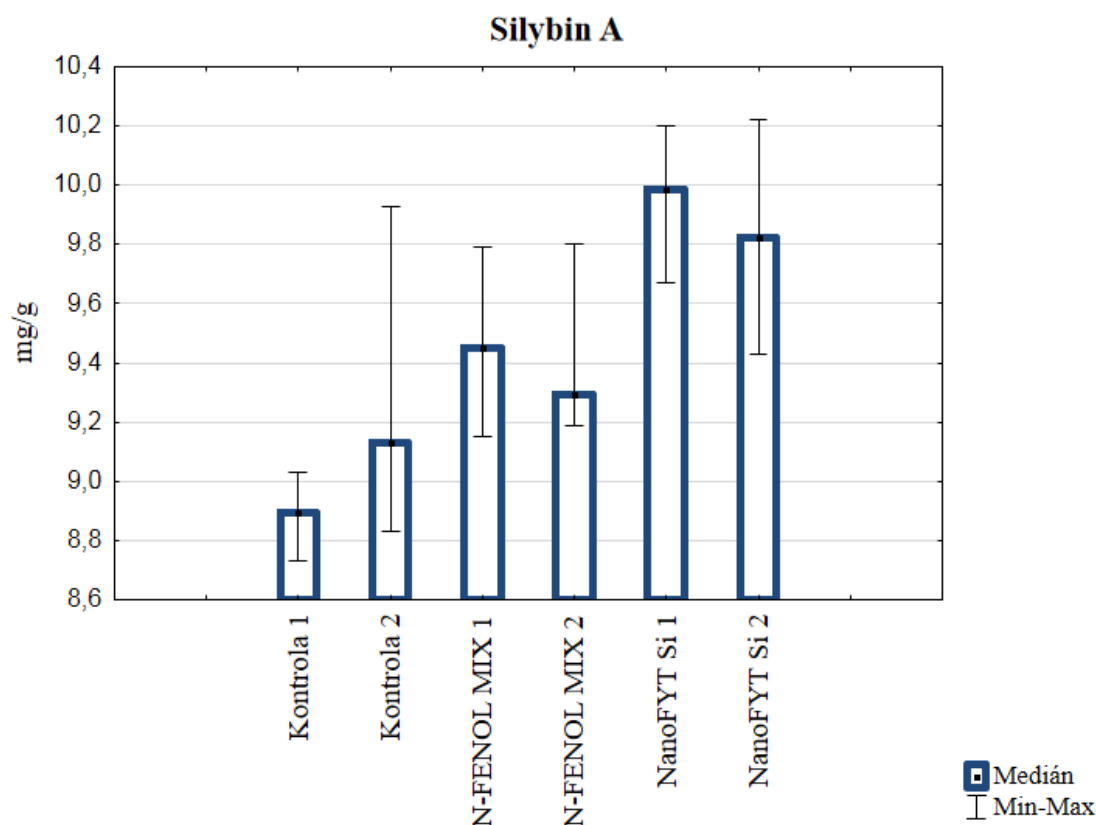


Graf č. 3. znázorňuje statistické vyhodnocení účinné látky Silydianin. Statistická průkaznost byl pouze mezi kontrolou 2 a NanoFYT Si[®] 2 (p= 0,0132304) ve fázi 6 – 7 pravých listů.

Tab. č. 11. Statistická průkaznost u Silydianinu.

	p – value	Statistická průkaznost
Kontrola 1 – N-FENOL MIX 1	0,7635079	Ne
NanoFYT Si 1 – N-FENOL MIX 1	0,9724844	Ne
NanoFYT Si 1 – Kontrola 1	0,8799046	Ne
Kontrola 2 – N-FENOL MIX 2	0,1721244	Ne
Kontrola 2 – NanoFYT Si 2	0,0132304	Ano
NanoFYT Si 2 – N-FENOL MIX 2	0,2681413	Ne

Graf č. 4. Obsah účinné látky Silybin A.

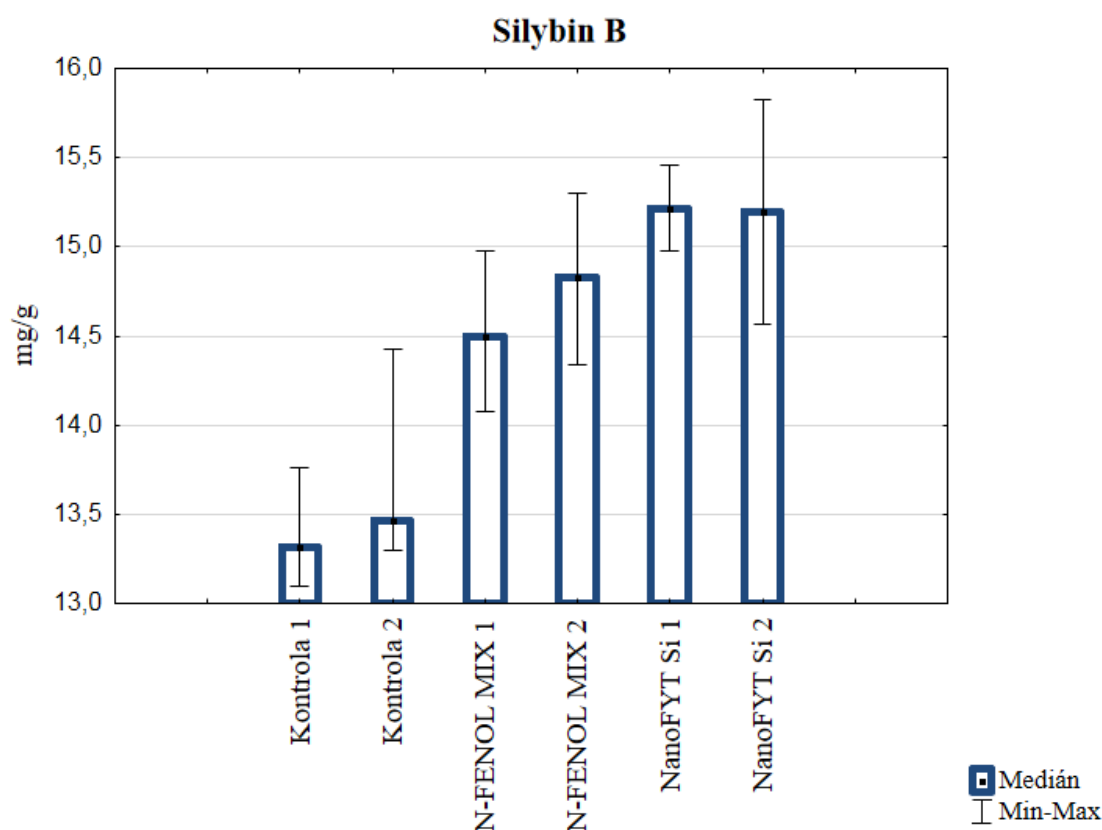


V grafu č. 4. byla prokázána statistická průkaznost u účinné látky Silybin A pouze u rostlin ve fázi 3 – 4 pravých listů mezi kontrolou 1 a N-FENOL MIX[®] 1 ($p=0,0213543$), kontrolou 1 a NanoFYT Si[®] 1 ($p=0,0003906$). Mezi elicitory je statistická průkaznost N-FENOL MIX[®] 1 a NanoFYT Si[®] 1 ($p=0,0411804$).

Tab. č. 12. Statistická průkaznost u Silybinu A.

	p – value	Statistická průkaznost
Kontrola 1 – N-FENOL MIX 1	0,0213543	Ano
NanoFYT Si 1 – N-FENOL MIX 1	0,0411804	Ano
NanoFYT Si 1 – Kontrola 1	0,0003906	Ano
Kontrola 2 – N-FENOL MIX 2	0,4797278	Ne
Kontrola 2 – NanoFYT Si 2	0,1398020	Ne
NanoFYT Si 2 – N-FENOL MIX 2	0,6429342	Ne

Graf č. 5. Obsah účinné látky Silybin B.

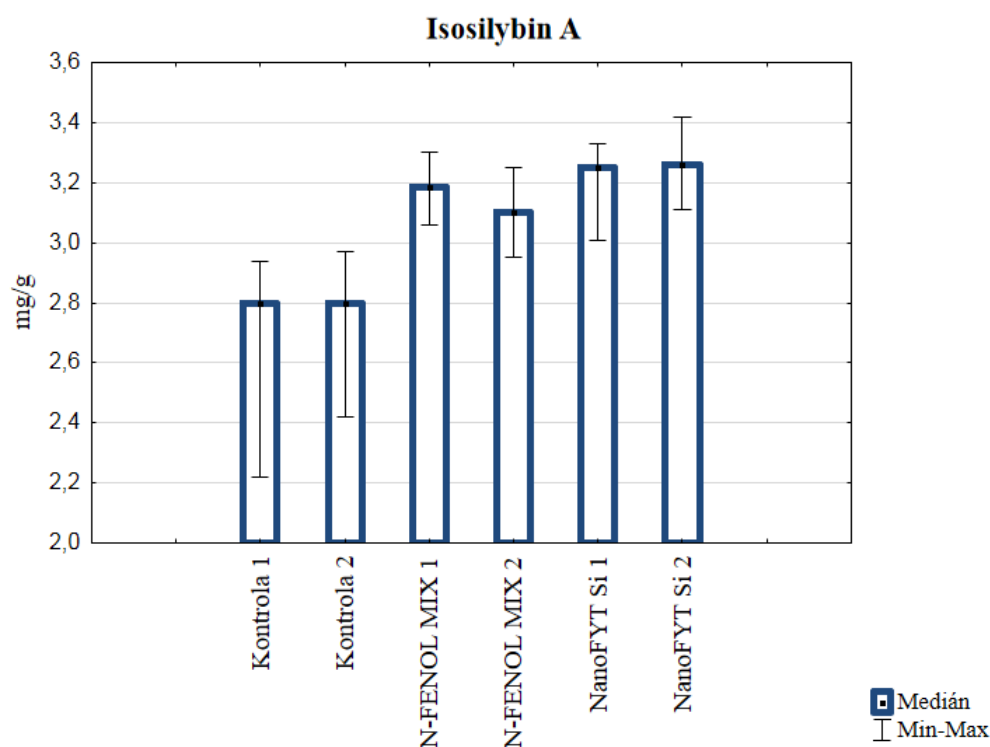


V grafu č. 5. byla u účinné látky Silybin B statistická průkaznost mezi kontrolou 1 a N-FENOL MIX[®] 1 ($p= 0,0033991$), kontrolou 1 a NanoFYT Si[®] 1 ($p= 0,0001100$), elicitory NanoFYT Si[®] 1 a N-FENOL MIX[®] 1 vykazovaly statistickou průkaznost ($p= 0,0488326$) u fáze 3 – 4 pravých listů. U fáze 6 – 7 pravých listů byla průkaznost mezi kontrolou 2 a N-FENOL MIX[®] 2 ($p= 0,0405048$) a NanoFYT Si[®] 2 ($p= 0,0091117$).

Tab. č. 13. Statistická průkaznost v Silybinu B.

	p – value	Statistická průkaznost
Kontrola 1 – N-FENOL MIX 1	0,0033991	Ano
NanoFYT Si 1 – N-FENOL MIX 1	0,0488326	Ano
NanoFYT Si 1 – Kontrola 1	0,0001100	Ano
Kontrola 2 – N-FENOL MIX 2	0,0405048	Ano
Kontrola 2 – NanoFYT Si 2	0,0091117	Ano
NanoFYT Si 2 – N-FENOL MIX 2	0,6105889	Ne

Graf č. 6. Obsah účinné látky Isosilybin A.

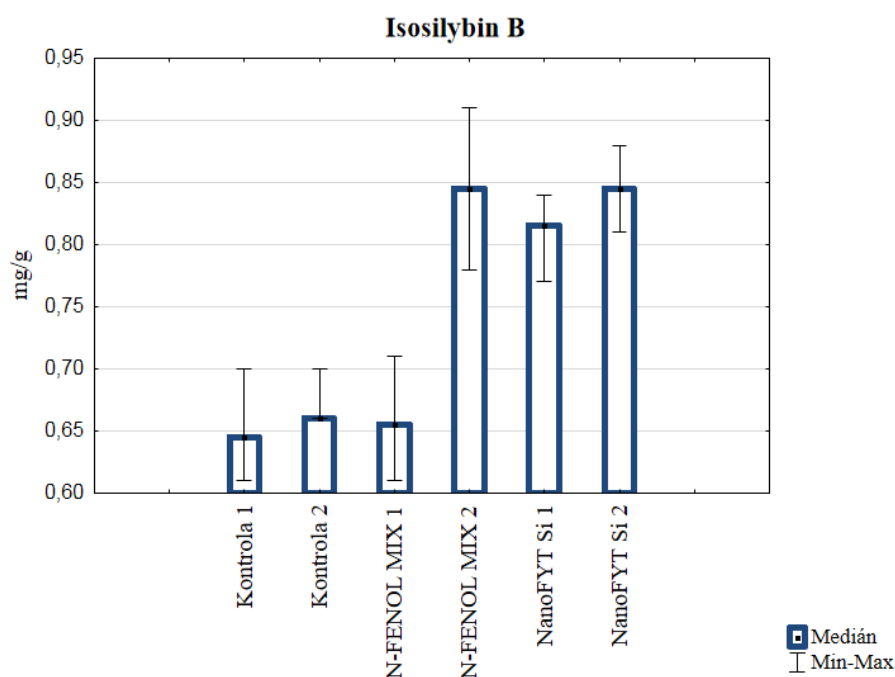


Tento graf č. 6. znázorňuje statistickou průkaznost účinné látky Isosilybin A u rostlin ve fázi 3 – 4 pravých listů mezi kontrolou 1 a N-FENOL MIX[®] 1 ($p=0,0327350$) a NanoFYT Si[®] 1 ($p=0,0260076$). U fáze 6 – 7 pravých listů byla průkaznost mezi kontrolou 2 a N-FENOL MIX[®] 2 ($p=0,0408939$), kontrolou 2 a NanoFYT Si[®] 2 ($p=0,0066022$).

Tab. č. 14. Statistická průkaznost u Isosilybinu A.

	p - value	Statistická průkaznost
Kontrola 1 – N-FENOL MIX 1	0,0327350	Ano
NanoFYT Si 1 – N-FENOL MIX 1	0,9879974	Ne
NanoFYT Si 1 – Kontrola 1	0,0260076	Ano
Kontrola 2 – N-FENOL MIX 2	0,0408939	Ano
Kontrola 2 – NanoFYT Si 2	0,0066022	Ano
NanoFYT Si 2 – N-FENOL MIX 2	0,4835136	Ne

Graf č. 7. Obsah účinné látky Isosilybin B.

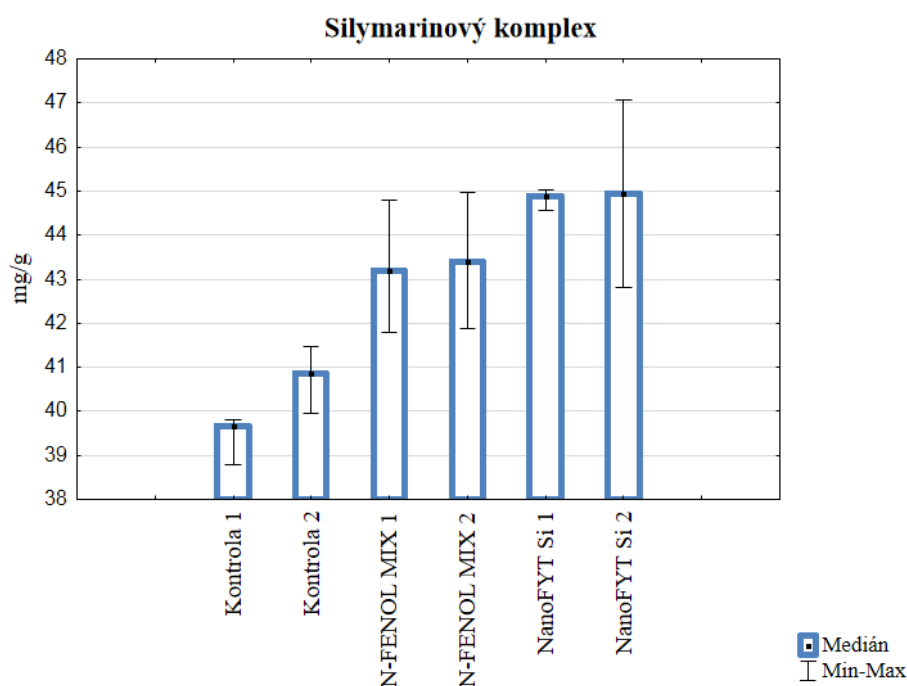


U účinné látky Isosilybin B byla v grafu č. 7. statistická průkaznost u mezi kontrolou 1 a NanoFYT Si[®] 1 ($p= 0,0007693$) a mezi N-FENOL MIX[®] 1 a NanoFYT Si[®] 1 ($p= 0,0011091$) u fázi 3 – 4 pravých listů. Ve fázi 6 – 7 pravých listů byla průkaznost mezi kontrolou 2 a N-FENOL MIX[®] 2 ($p= 0,0001674$) a NanoFYT Si[®] 2 ($p= 0,0001623$).

Tab. č. 15. Statistická průkaznost u Isosilybinu B.

	p – value	Statistická průkaznost
Kontrola 1 – N-FENOL MIX 1	0,9557632	Ne
NanoFYT Si 1 – N-FENOL MIX 1	0,0011091	Ano
NanoFYT Si 1 – Kontrola 1	0,0007693	Ano
Kontrola 2 – N-FENOL MIX 2	0,0001674	Ano
Kontrola 2 – NanoFYT Si 2	0,0001623	Ano
NanoFYT Si 2 – N-FENOL MIX 2	0,9995552	Ne

Graf č. 8. Obsah silymarinového komplexu



V grafu č. 8 byla u silymarinového komplexu statistická průkaznost u kontroly 1 a N-FENOL MIX[®] 1 ($p= 0,0006859$) a NanoFYT Si[®] 1 ($p= 0,0000469$) u fáze 3 – 4 pravých listů. U fáze 6 – 7 pravých listů byla statistická průkaznost pouze mezi kontrolou 2 a NanoFYT Si[®] 2 ($p= 0,0067429$).

Tab. č. 16. Statistická průkaznost u Silymarinového komplexu.

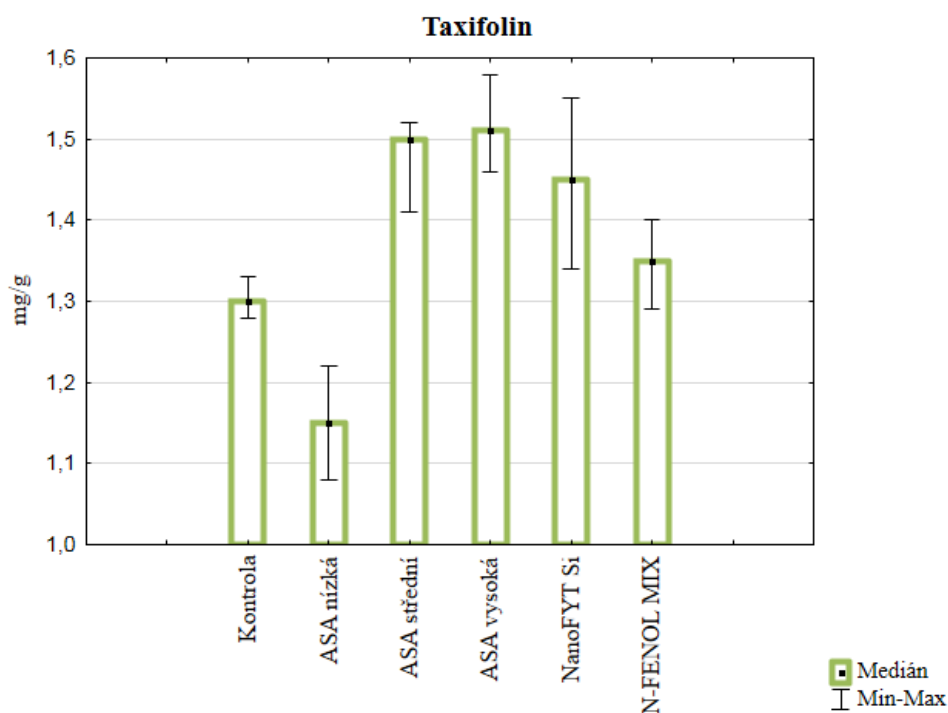
	p – value	Statistická průkaznost
Kontrola 1 – N-FENOL MIX 1	0,0006859	Ano
NanoFYT Si 1 – N-FENOL MIX 1	0,0865410	Ne
NanoFYT Si 1 – Kontrola 1	0,0000469	Ano
Kontrola 2 – N-FENOL MIX 2	0,0637297	Ne
Kontrola 2 – NanoFYT Si 2	0,0067429	Ano
NanoFYT Si 2 – N-FENOL MIX 2	0,3497800	Ne

6.2 Výsledky pokusu č. 2. lokalita JU v Českých Budějovicích

Tab. č. 17. Obsah účinných látek v pokusu č. 2.

Vzorky	Taxifolin [mg/g]	Silychristin [mg/g]	Silydianin [mg/g]	Silybin A [mg/g]	Silybin B [mg/g]	Isosilybin A [mg/g]	Isosilybin B [mg/g]	Suma 100%	Průměr	Sušina %
Kontrola	1,33	9,18	1,27	7,81	11,96	2,60	0,54	34,67	33,81	92,84
	1,31	9,27	1,28	7,94	11,54	2,56	0,50	34,41		
	1,29	8,92	1,19	7,56	11,90	2,49	0,49	33,84		
	1,28	8,85	1,26	7,28	11,14	2,42	0,50	32,31		
	1,30	9,06	1,25	7,65	11,63	2,52	0,51			
ASA nízká	1,17	9,63	1,57	8,06	12,36	2,79	0,55	36,13	36,02	92,64
	1,13	9,73	1,59	8,27	12,40	2,56	0,57	36,25		
	1,22	9,61	1,66	8,44	12,00	2,65	0,58	36,16		
	1,08	9,32	1,46	7,99	12,59	2,60	0,51	35,55		
	1,15	9,57	1,57	8,19	12,34	2,65	0,55			
ASA střední	1,52	9,91	1,38	8,60	13,23	2,82	0,56	38,03	37,53	92,57
	1,49	9,67	1,40	8,96	12,91	2,84	0,62	37,90		
	1,51	9,89	1,31	8,86	12,89	2,74	0,54	37,74		
	1,41	9,78	1,43	7,96	12,66	2,69	0,52	36,45		
	1,48	9,82	1,38	8,60	12,92	2,77	0,56			
ASA vysoká	1,52	10,70	1,73	8,94	13,78	3,01	0,73	40,41	40,40	93,47
	1,50	10,68	1,62	8,99	13,87	3,16	0,70	40,52		
	1,58	11,24	1,70	9,32	13,46	3,04	0,69	41,03		
	1,46	10,22	1,82	8,58	13,91	2,99	0,66	43,62		
	1,51	10,71	1,72	8,96	13,76	3,05	0,69			
NanoFYT Si	1,43	12,78	1,80	10,06	15,54	3,31	0,86	45,78	45,48	93,72
	1,55	12,81	1,86	10,51	15,49	3,22	0,95	46,39		
	1,47	12,69	1,72	10,20	15,90	3,36	0,79	46,13		
	1,34	11,98	1,89	9,43	14,97	3,21	0,81	43,62		
	1,45	12,57	1,82	10,05	15,47	3,27	0,85			
N-FENOL MIX	1,35	11,52	1,60	9,18	14,30	3,10	0,67		41,48	95,10
	1,40	11,79	1,62	8,94	13,88	3,24	0,66	41,52		
	1,35	11,66	1,77	9,20	14,67	2,97	0,62	42,23		
	1,29	10,96	1,52	9,23	13,49	3,34	0,64	40,47		
	1,35	11,48	1,63	9,14	14,08	3,16	0,65			

Graf č. 9. Obsah účinné látky Taxifolin.

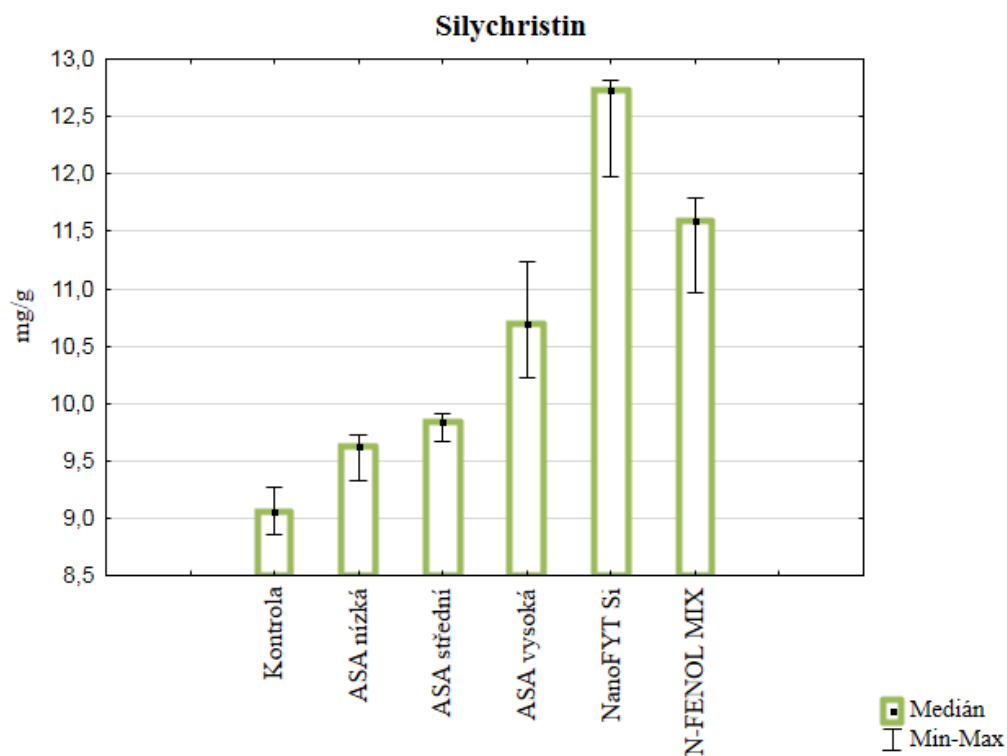


Graf č. 9. znázorňuje statistické vyhodnocení obsahu účinné látky Taxifolin. Pro lepší přehlednost byla vytvořena tab. č. 18.

Tab. č. 18. Statistická průkaznost u Taxifolinu.

	p-value	Statistická průkaznost
Kontrola – ASA nízká	0,0122140	Ano
Kontrola – ASA střední	0,0027963	Ano
Kontrola – ASA vysoká	0,0004952	Ano
Kontrola – N-FENOL MIX	0,8578939	Ne
ASA střední – ASA nízká	0,0000015	Ano
ASA vysoká – ASA nízká	0,0000004	Ano
ASA vysoká – ASA střední	0,9591160	Ne
NanoFYT Si – ASA nízká	0,0000073	Ano
NanoFYT Si – ASA střední	0,9447214	Ne
NanoFYT Si – ASA vysoká	0,5419328	Ne
NanoFYT Si – N-FENOL MIX	0,1654587	Ne
NanoFYT SI – Kontrola	0,0181639	Ano
N-FENOL MIX – ASA nízká	0,0010955	Ano
N-FENOL MIX – ASA střední	0,0305925	Ano

Graf č. 10. Obsah účinné látky Silychristin.

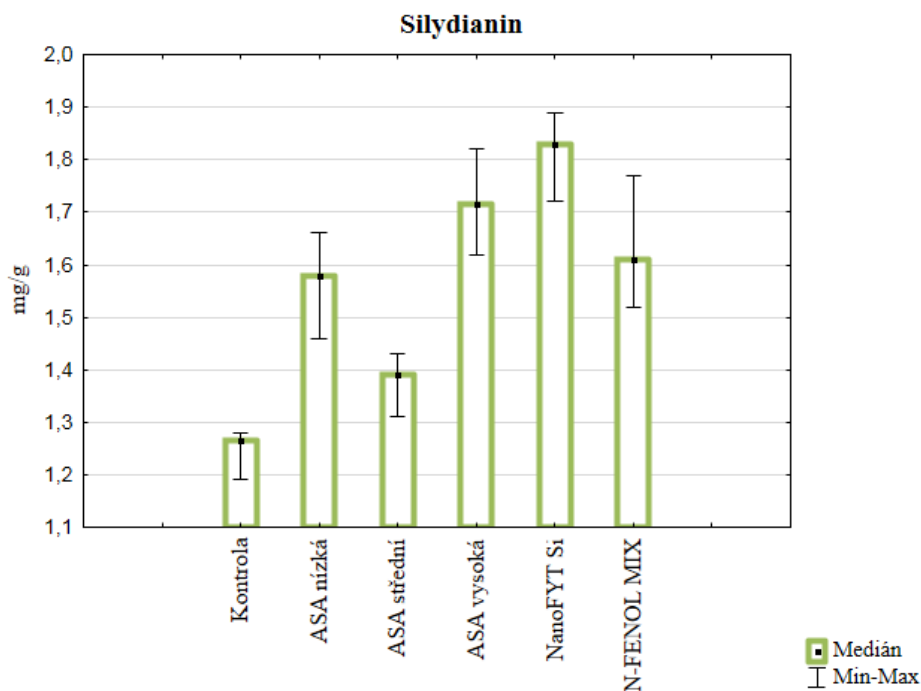


V grafu č. 10. je znázorněn obsah účinné látky Silychristin. Statistická průkaznost pro lepší přehled je uvedena v tab. č. 19.

Tab. č. 19. Statistická průkaznost u Silychristinu

	p-value	Statistická průkaznost
Kontrola – ASA nízká	0,1992557	Ne
Kontrola – ASA střední	0,0059642	Ano
Kontrola – ASA vysoká	0,0000050	Ano
Kontrola – N-FENOL MIX	0,0000000	Ano
ASA střední – ASA nízká	0,8647773	Ne
ASA vysoká – ASA nízká	0,0005568	Ano
ASA vysoká – ASA střední	0,0059642	Ano
NanoFYT Si – ASA nízká	0,0000000	Ano
NanoFYT Si – ASA střední	0,0000000	Ano
NanoFYT Si – ASA vysoká	0,0000010	Ano
NanoFYT Si – N-FENOL MIX	0,0009538	Ano
NanoFYT SI – Kontrola	0,0000000	Ano
N-FENOL MIX – ASA nízká	0,0000006	Ano
N-FENOL MIX – ASA střední	0,0000044	Ano
N-FENOL MIX – ASA vysoká	0,0203899	Ano

Graf č. 11. Obsah účinné látky Silydianin

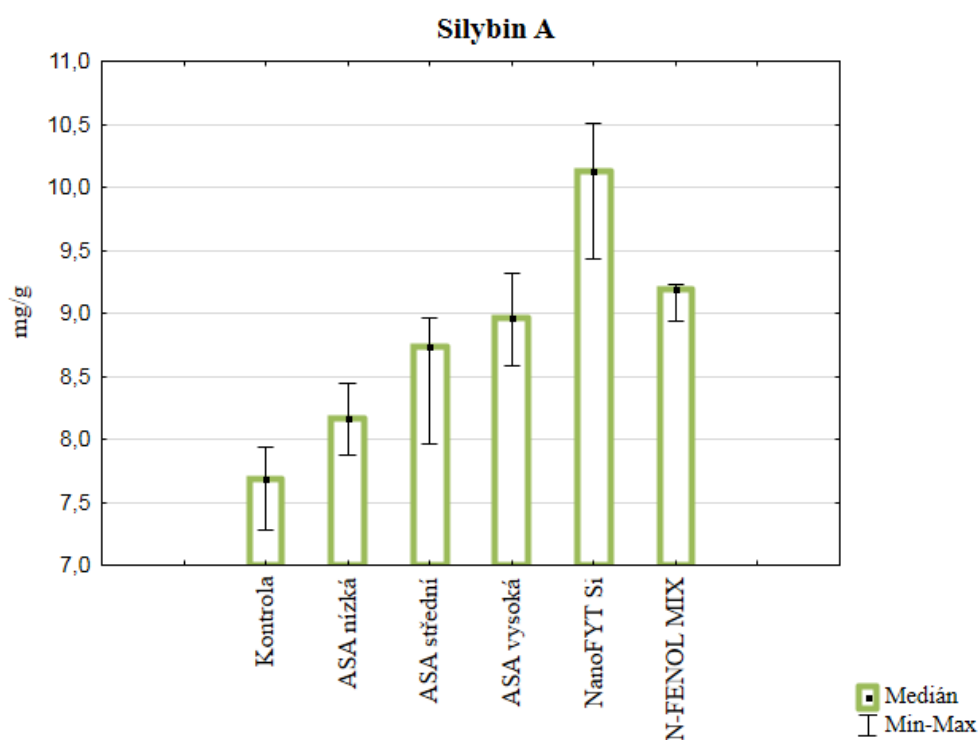


Graf č. 12. Obsah účinné látky Silydianin. V tab. č. 20. je pro lepší přehled statistická průkaznost.

Tab. č. 20. Statistická průkaznost u Silidianinu.

	p- value	Statistická průkaznost
Kontrola – ASA nízká	0,0001504	Ano
Kontrola – ASA střední	0,1992806	Ne
Kontrola – ASA vysoká	0,0000009	Ano
Kontrola – N-FENOL MIX	0,0000185	Ano
ASA střední – ASA nízká	0,0238405	Ano
ASA vysoká – ASA nízká	0,1126849	Ne
ASA vysoká – ASA střední	0,0000784	Ano
NanoFYT Si – ASA nízká	0,0024954	Ano
NanoFYT Si – ASA střední	0,0000024	Ano
NanoFYT Si – ASA vysoká	0,4523274	Ne
NanoFYT Si – N-FENOL MIX	0,0238405	Ano
NanoFYT SI – Kontrola	0,0000000	Ano
N-FENOL MIX – ASA nízká	0,8858181	Ne
N-FENOL MIX – ASA střední	0,0024954	Ano
N-FENOL MIX – ASA vysoká	0,5612400	Ne

Graf č. 12. Obsah účinné látky Silybin A.

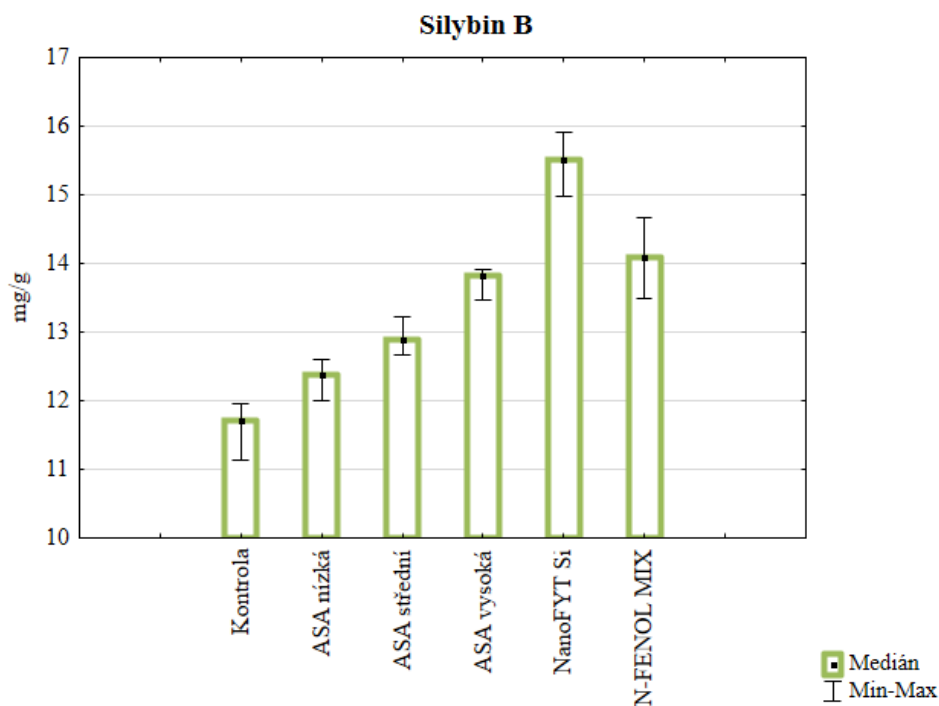


Graf č. 12. znázorňuje obsah účinné látky Silybin A. Pro lepší přehled byla statistická průkaznost uvedena v tab. č. 21.

Tab. č. 21. Statistická průkaznost u Silybinu A.

	p-value	Statistická průkaznost
Kontrola – ASA nízká	0,2289444	Ne
Kontrola – ASA střední	0,0076698	Ano
Kontrola – ASA vysoká	0,0002876	Ano
Kontrola – N-FENOL MIX	0,0000605	Ano
ASA střední – ASA nízká	0,5207305	Ne
ASA vysoká – ASA nízká	0,0383550	Ano
ASA vysoká – ASA střední	0,6305155	Ne
NanoFYT Si – ASA nízká	0,0000031	Ano
NanoFYT Si – ASA střední	0,0000815	Ano
NanoFYT Si – ASA vysoká	0,0020385	Ano
NanoFYT Si – N-FENOL MIX	0,0105442	Ano
NanoFYT SI – Kontrola	0,0000001	Ano
N-FENOL MIX – ASA nízká	0,0076698	Ano
N-FENOL MIX – ASA střední	0,2289444	Ne
N-FENOL MIX – ASA vysoká	0,9680922	Ne

Graf č. 13. Obsah účinné látky Silybin B.

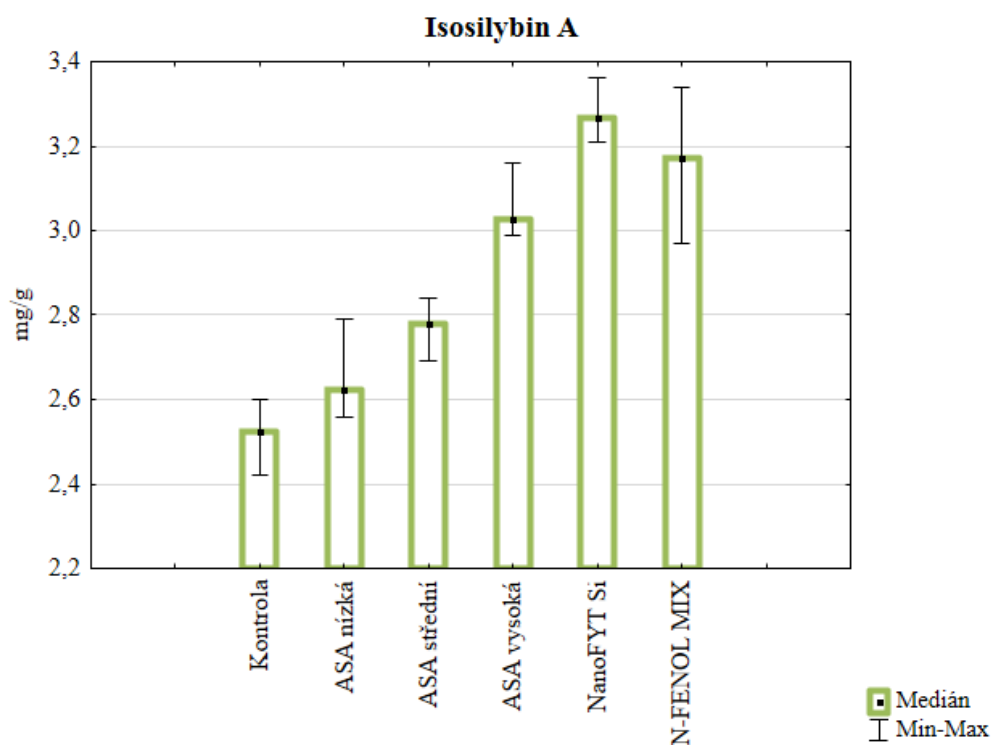


Graf č. 13. zaznamenává obsah účinné látky Silybin B. Statistické vyhodnocení průkaznosti je zaznamenáno v tab. č. 22.

Tab. č. 22. Statistická průkaznost u Isosilybinu B

	p-value	Statistická průkaznost
Kontrola – ASA nízká	0,0871078	Ne
Kontrola – ASA střední	0,0005969	Ano
Kontrola – ASA vysoká	0,0000009	Ano
Kontrola – N-FENOL MIX	0,0000001	Ano
ASA střední – ASA nízká	0,2053667	Ne
ASA vysoká – ASA nízká	0,0001987	Ano
ASA vysoká – ASA střední	0,0304224	Ano
NanoFYT Si – ASA nízká	0,0000000	Ano
NanoFYT Si – ASA střední	0,0000001	Ano
NanoFYT Si – ASA vysoká	0,0000174	Ano
NanoFYT Si – N-FENOL MIX	0,0002501	Ano
NanoFYT SI – Kontrola	0,0000000	Ano
N-FENOL MIX – ASA nízká	0,0000140	Ano
N-FENOL MIX – ASA střední	0,0017566	Ano
N-FENOL MIX – ASA vysoká	0,7501357	Ne

Graf č. 14. Obsah účinné látky Isosilybin A.

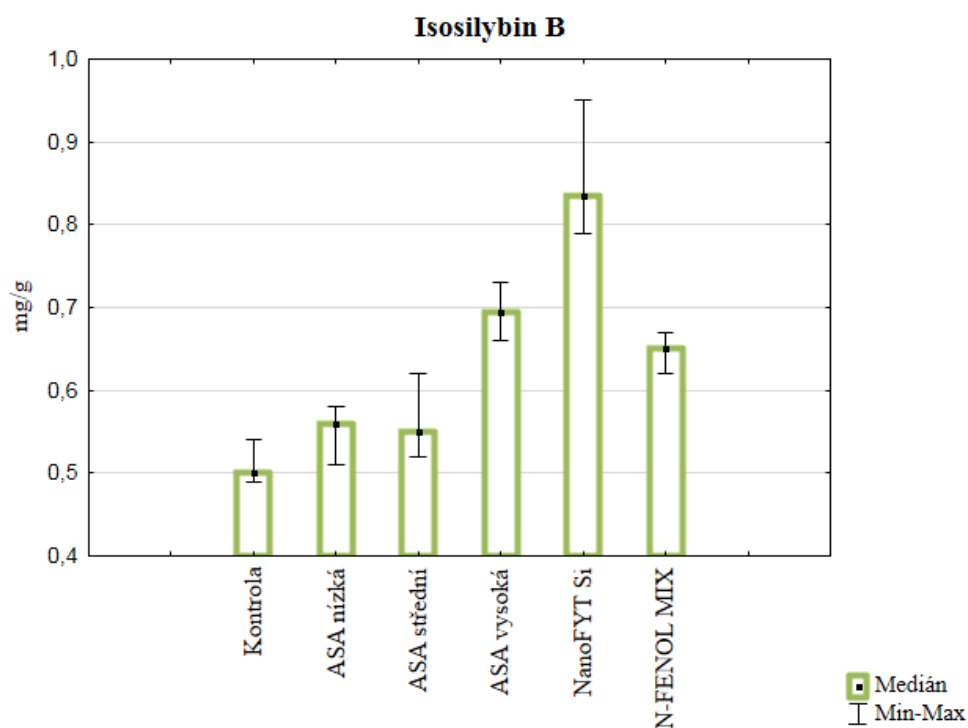


Graf. č. 14. znázorňuje obsah účinné látky Isosilybin A. V tab. č. 23 je pro lepší přehled zaznamenána statistická průkaznost.

Tab. č. 23. Statistická průkaznost u Isosilybinu A

	p-value	Statistická průkaznost
Kontrola – ASA nízká	0,3336067	Ne
Kontrola – ASA střední	0,0063751	Ano
Kontrola – ASA vysoká	0,0000017	Ano
Kontrola – N-FENOL MIX	0,0000002	Ano
ASA střední – ASA nízká	0,3388389	Ne
ASA vysoká – ASA nízká	0,0000818	Ano
ASA vysoká – ASA střední	0,0061336	Ano
NanoFYT Si – ASA nízká	0,0000004	Ano
NanoFYT Si – ASA střední	0,0000138	Ano
NanoFYT Si – ASA vysoká	0,0698198	Ne
NanoFYT Si – N-FENOL MIX	0,6417007	Ne
NanoFYT SI – Kontrola	0,0000000	Ano
N-FENOL MIX – ASA nízká	0,0000052	Ano
N-FENOL MIX – ASA střední	0,0002855	Ano
N-FENOL MIX – ASA vysoká	0,6910953	Ne

Graf č. 15. Obsah účinné látky Isosilybin B

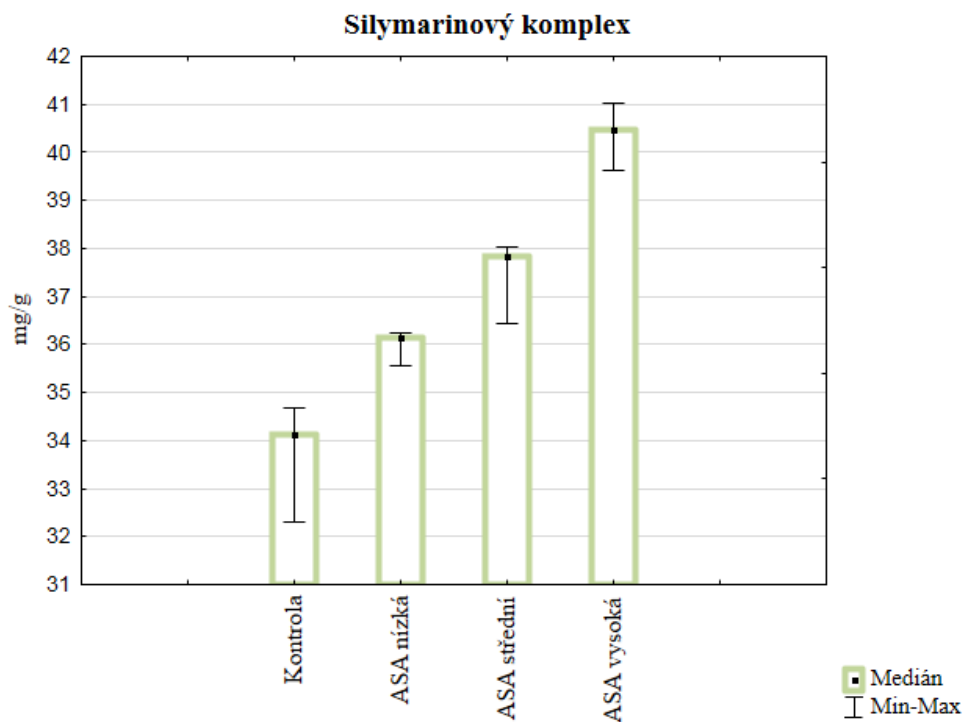


Tento graf č. 15. obsahuje údaje o množství účinné látky Isosilybin B. Statistická průkaznost je pro lepší přehled znázorněná v tab. č. 24.

Tab. č. 24. Statistická průkaznost u Isosilybinu B

	p-value	Statistická průkaznost
Kontrola – ASA nízká	0,3567287	Ne
Kontrola – ASA střední	0,2259076	Ne
Kontrola – ASA vysoká	0,0000064	Ano
Kontrola – N-FENOL MIX	0,0001709	Ano
ASA střední – ASA nízká	0,9995920	Ne
ASA vysoká – ASA nízká	0,0003390	Ano
ASA vysoká – ASA střední	0,0006349	Ano
NanoFYT Si – ASA nízká	0,0000001	Ano
NanoFYT Si – ASA střední	0,0000001	Ano
NanoFYT Si – ASA vysoká	0,0013700	Ano
NanoFYT Si – N-FENOL MIX	0,0000423	Ano
NanoFYT SI – Kontrola	0,0000000	Ano
N-FENOL MIX – ASA nízká	0,0123417	Ano
N-FENOL MIX – ASA střední	0,0231790	Ano
N-FENOL MIX – ASA vysoká	0,5429331	Ne

Graf č. 16. Silymarinový komplex u pokusu s elicitorem ASA v nízké, střední a vysoké koncentraci.

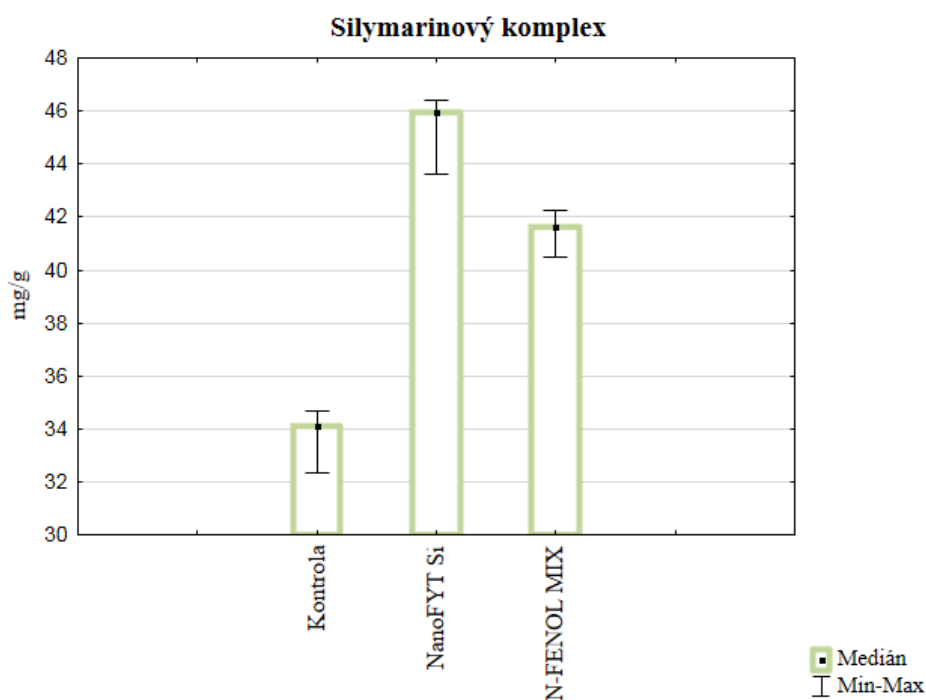


Graf č. 16. znázorňuje statistickou průkaznost u silymarinového komplexu při použití elicitoru ASA nízké, střední a vysoké koncentraci. Pro lepší přehlednost byla vytvořena tab. č. 25.

Tab. č. 25. Statistická průkaznost u Silymarinového komplexu s elicitorem ASA v nízké, střední a vysoké koncentraci.

	p-value	Statistická průkaznost
Kontrola – ASA nízká	0,0161958	Ano
Kontrola – ASA střední	0,0000824	Ano
Kontrola – ASA vysoká	0,0000000	Ano
ASA střední – ASA nízká	0,1642665	Ne
ASA vysoká – ASA nízká	0,0000100	Ano
ASA vysoká – ASA střední	0,0000824	Ano

Graf č. 17. Silymarinový komplex při použití elicitorů NanoFYTSi[®] a N-FENOL MIX[®].



Graf č. 17. obsahuje záznam pokusu s elicitory NanoFYT Si[®] a N-FENOL MIX[®]. Statistická průkaznost je zaznamenána v tab. č. 26.

Tab. č. 26. Statistická průkaznost u Silymarinového komplexu s elictory NanoFYT Si[®] a N-FENOL MIX[®].

	p-value	Statistická průkaznost
Kontrola – N-FENOL MIX	0,0000000	Ano
NanoFYT Si – N-FENOL MIX	0,0000336	Ano
NanoFYT SI – Kontrola	0,0000000	Ano

7 Vliv agrotechniky

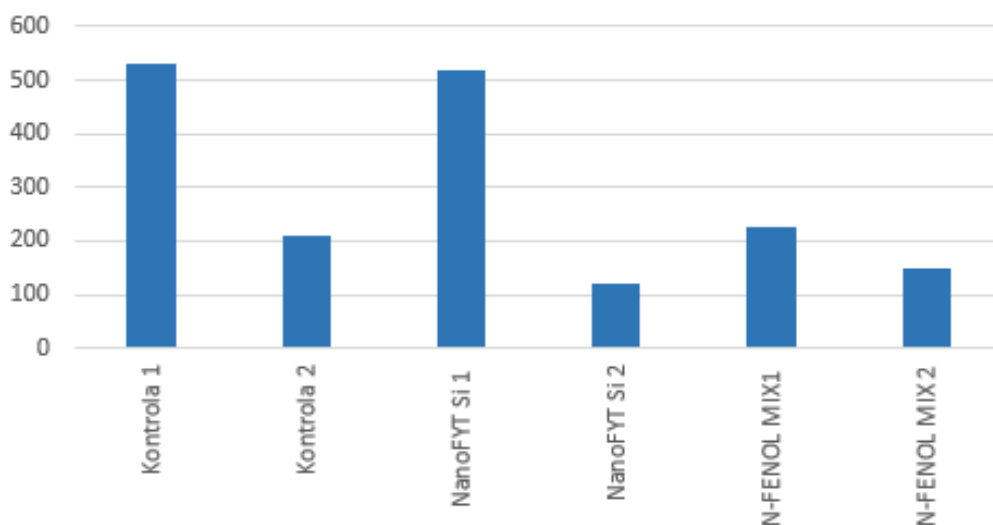
Při pěstování Ostropestřce mariánského v pokusu č. 1. a č. 2. se ukázalo, že nadmořská výška lokalit, ve kterých byl pokus prováděn, nemá až tak veliký vliv na obsah účinných látek (graf č. 19.), jak se předpokládalo.

V pokusu č. 1. byl v lokalitě Stojanovice při porovnání dvou různých růstových fází, ve kterých byly sazenice vysazeny na pozemek, se projevil rozdíl v hmotnosti semen při následném zpracování. Sazenice vysazené ve fázi 3 – 4 pravých listů se lépe adaptovaly, a proto vykazovaly vyšší hmotnost. Naopak u sazenic vysazených ve fázi 6 – 7 pravých listů byla hmotnost semen nižší z důvodu horší adaptace vysazených rostlin na půdní a klimatické podmínky.

Tabulka č. 27. Hmotnosti semen z pokusu č. 1

	Kontrola 1	Kontrola 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2
Hmotnost [g]	530,59	211,84	520,3	122,04	224,51	147,84

Graf č. 18. Porovnání hmotností [g]



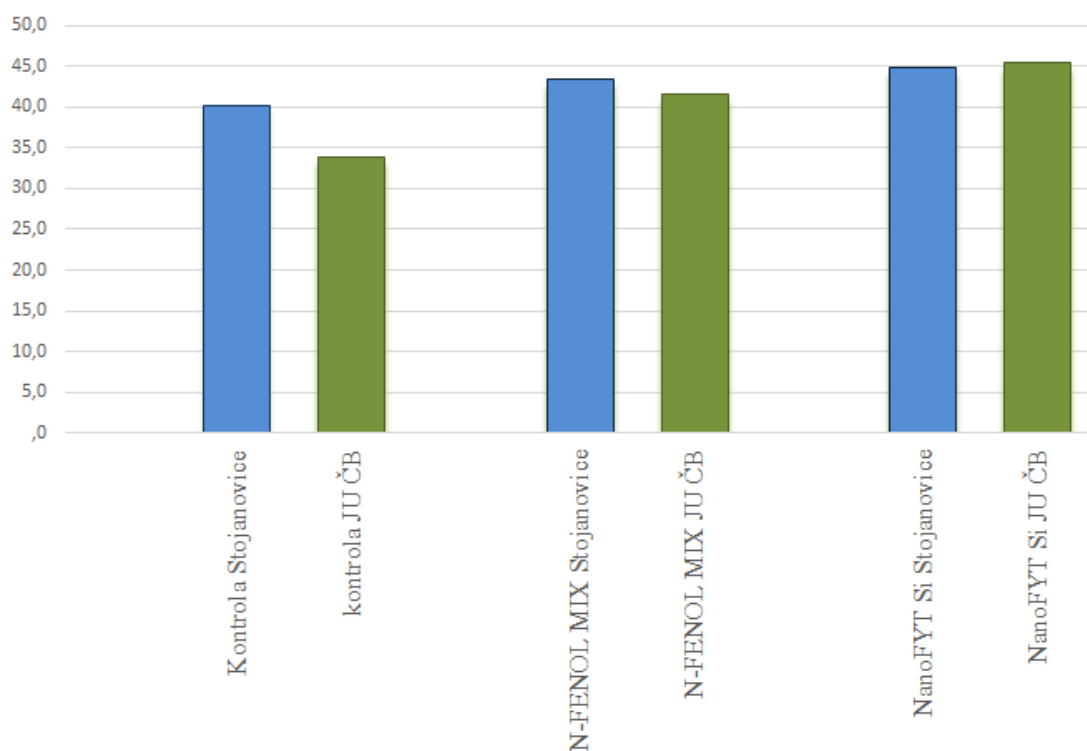
8 VLIV ELICITORŮ NA OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK

U pokusu č. 1. v lokalitě Stojanovice je v grafu č. 8. vidět většinou nárůst obsahu silymarinového komplexu u obou růstových fází. Mezi jednotlivými růstovými fázemi je minimální rozdíl. U kontroly je zaznamenán největší rozdíl 1,21 mg/g, N-FENOL MIX[®] se liší o 0,17 mg/g, u NanoFYT Si[®] je rozdíl 0,10 mg/g. Naopak mezi kontrolou a jednotlivými elicitory je rozdíl znatelný. U N-FENOL MIX[®] 1 je nárůst 3,77 mg/g a u N-FENOL MIX[®] 2 je nárůst 2,73 mg/g. U elicitoru NanoFYT Si[®] 1 a kontrolou 1 je nárůst o 5,36 mg/g, u kontroly 2 a NanoFYT Si[®] 2 je rozdíl 4,25 mg/g.

V pokusu č. 2. je zaznamenán v grafech č. 16. a 17. při použití elicitorů nárůst oproti kontrole u ASA nízká o 2,21 mg/g, u ASA střední 3,72 mg/g a u ASA vysoká 5,59 mg/g. U elicitoru NanoFYT Si[®] je nárůst o 11,67 mg/g, i N-FENOL MIX[®] je nárůst o 7,67 mg/g.

Vlivem použití elicitorů prokazatelně došlo v těchto dvou pokusech k nárůstu obsahu účinných látek. Největší nárůst byl při použití elicitoru NanoFYT Si[®].

Graf č. 19. Porovnání hodnot silymarinového komplexu [mg/g] u pokusu č. 1 a č. 2. tab. č. 44. viz. příloha.



Při porovnání pokusu č. 1. a č. 2. jsem došla k výsledku, že u kontroly na pozemku JU byl obsah účinných látek menší o 6,28 mg/g oproti pozemku v lokalitě Stojanovice. Po použití elicitoru N-FENOL MIX[®] se rozdíl lišil jen o 1,84 mg/g ve prospěch pozemku v lokalitě Stojanovice. U elicitoru NanoFYT Si[®] byl naopak obsah silymarinového komplexu na pozemku JU v Českých Budějovicích větší o 0,59 mg/g oproti pozemku v lokalitě Stojanovice.

9 NÁVRH TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ OSTROPESTŘCE MARÁNSKÉHO PRO SOUKROMOU FARMU

Na základě získaných poznatků v kapitole 3.2 navrhuji tento technologický postup.

Ostropestřec mariánský je na půdní podmínky relativně nenáročný, ale je výhodnější sít do hlubších hlinitých nebo písčitohlinitých půd s dobrou zásobou živin. Citlivě reaguje na zamokřené a utužené půdy, ale naopak pokud je půda dostatečně provzdušněná dokáže využít vyšší množství spodní vody pro svůj růst. Nejvíce se Ostropestřeci daří v kukuřičné výrobní oblasti, ale je možné jej pěstovat v podhorských oblastech do nadmořské výšky až 700 m n. m.

Důležité pro stejnorný růst je předseťová příprava půdy, která se provádí již na podzim střední orbou bez přímého organického hnojení. Na jaře se provede příprava seťového lůžka, tak aby byla dodržována stejnorná hloubka.

Na předplodinu není Ostropestřec náročný, lze ho pěstovat po okopaninách, obilninách nebo luskovinách. V osevním postupu se zařazuje jako zlepšující plodina.

Ostropestřec se seje v období 25.3 – 10. 4. při teplotě půdy minimálně 5 °C do hloubky 2 – 3 cm, šířce řádků 45 cm přesným secím strojem při výsevu 8 – 10 kg/ha.

Vzhledem k velkému nárůstu biomasy vyžaduje odpovídající množství živin. Doporučuje se aplikovat 500 až 600 kg NPK na hektar. Hnojení dusíkem je důležité, proto se dávky dusíku pohybují v rozmezí 60 až 90 kg na hektar. Tuto dávku je nutné rozdělit, tak aby $\frac{1}{2}$ až $\frac{2}{3}$ byly zapraveny v rámci předseťové přípravy a zbytek ve fázi 6 – 8 pravých listů. Během vegetace se provádí ošetřování porostu plečkováním do fáze 6 pravých listů.

Sklizeň Ostropestřce mariánského je nenáročnější část technologie pěstování, z důvodu nestejnorného dozrávání a následného vypadání semen z úboru. Sklizeň se provádí od srpna do září, kdy jsou nažky již tmavohnědé a úbory zhnědnou. Sklízí se pomocí sklízecí mlátičky upravené, tak aby lišta byla zvednuta do $\frac{1}{3}$ až $\frac{1}{2}$ rostliny.

10 VYUŽITÍ OSTROPESTRČE MARIÁNSKÉHO

Na základě zjištění při zpracování této práce v kapitole „využití silymarinu“ jsem zjistila, že v dnešní době je na trhu velké množství léčiv, přípravků a doplňků stravy s obsahem účinných látek z léčivky Ostropestřec mariánský. Navrhovala bych přidávat drcená semena do celozrnného pečiva a müsli, nebo výtažky z této rostliny do různých nápojů, například do limonád. Tímto by lidé dodávali do těla nenásilnou formou účinné látky na ochranu jater.

Dále bych navrhovala využití u hospodářských zvířat přidáním krmného expeleru do krmné dávky.

U dojnic v době stání na sucho, kdy se dojnice připravuje na porod a na laktaci by docházelo kromě zlepšení regenerace mléčné žlázy a bachoru i k regeneraci jater. Dále by byl u dojnic posílen imunitní systém, což se projeví na zvýšení užitkovosti, zlepšení reprodukce.

U koní by Ostropestřec podporoval růst kopyt a srsti, snižoval negativní vliv očkování, odčervení a chránil by játra koní. Tímto by celkově přispíval k dobrému zdravotnímu stavu nejen koní ve sportu či chovu, ale i koní v „důchodu“.

11 DISKUZE

V této práci byly porovnány výsledky pokusů z roku 2015 a 2016. V pokusu z roku 2016 byl statisticky prokázán nárůst účinných látek v Ostropestřci při použití elicitorů NanoFYT Si[®] a N-FENOL MIX[®]. V tomto pokusu byly použity sazenice, u kterých byl nárůst obsahu účinných látek u fáze 3 – 4 pravých listů o 5,36 mg/l a u fáze 6 – 7 pravých listů o 4,25 mg/g při použití elicitoru NanoFYT Si[®]. V pokusu z roku 2015 byly použity elicitory ASA ve třech koncentracích, NanoFYT Si[®] a N-FENOL MIX[®]. Nejvyšší statisticky průkazný rozdíl byl při použití elicitoru NanoFYT Si[®] a to o 11,67 mg/g.

Při vzájemném porovnání pokusu č. 1. a č. 2. byl u kontrolního vzorku na pozemku JU obsah účinných látek menší o 6,28 mg/g oproti pozemku v lokalitě Stojanovice. Po použití elicitoru N-FENOL MIX[®] se rozdíl zmenšil na 1,84 mg/g ve prospěch pozemku v lokalitě Stojanovice. U NanoFYT Si[®] byl naopak obsah účinných látek silymarinového komplexu na pozemku JU větší o 0,59 mg/g oproti pozemku v lokalitě Stojanovice. Tyto výsledky mohly být ovlivněny rozdílným počasím v roce 2015 a 2016, protože každý pokus byl prováděn v jiném roce.

V pokusu na pozemku JU v Českých Budějovicích byla vyhodnocena ASA s vysokou koncentrací [10^{-3} mol/l] jako nejlepší. Nárůst látek silymarinového komplexu oproti kontrole byl 5,59 mg/g.

GRAMANOVÁ (2009) uvádí ve své práci pokusy z roku 2007 na pozemcích JU v Českých Budějovicích a na pozemcích u Svárova za účelem stanovení vlivu elicitoru ASA na obsah účinných látek v semeni Ostropestřce mariánského. Při aplikaci ASA na pozemcích JU v Českých Budějovicích byl průkazný vliv elicitorů na obsah biologicky účinných látek v semeni Ostropestřce také u vysoké koncentrace [10^{-3} mol/l] a to o 5,72 mg/g. U nízké a střední koncentrace byl výsledek statisticky neprůkazný. Na pozemcích u Svárova nebyl statisticky prokázán účinek elicitoru ASA na zvýšení obsahu silymarinových složek. Naopak při aplikaci střední a vysoké koncentrace došlo ke snížení obsahu účinných látek. V porovnání s mým pokusem z roku 2015 na pozemku JU v Českých Budějovicích je rozdíl o 0,13 mg/g ve prospěch pokusu z roku 2007. To ukazuje, že použití elicitoru ASA je pro nárůst obsahu účinných látek vhodné.

DVOŘÁKOVÁ (2006) se ve své práci také zabývala vlivem elicitorů na obsah účinných látek v semeni Ostropestřce mariánského. V roce 2004 provedla pokus s Ostropestřcem na Benešovsku. Po aplikaci nízké a vysoké koncentrace došlo k nepatrnému snížení obsahu účinných látek o 1,28 mg/g u nízké a o 7,03 mg/g u vysoké oproti aplikaci střední koncentrace, kdy došlo k mírnému zvýšení o 3,65 mg/g. V roce 2005 při opakovaném pokusu byl u nízké koncentrace zjištěn opět nepatrný pokles. U střední koncentrace došlo k výraznějším zvýšení obsahu látek silymarinového komplexu oproti pokusu z roku 2004 o 6,93 mg/g. Naopak při použití vysoké koncentrace došlo opět k prokazatelnému snížení obsahu účinných látek o 13,22 mg/g.

Vlivem elicitoru ASA na obsah účinných látek se zabýval i PETR (2014). V jeho pokusu s Ostropestřcem při použití třech koncentrací ASA nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl ve změně obsahu účinných látek v semeni Ostropestřce mariánského mezi jednotlivými koncentracemi.

Kyselina acetylsalicylová byla použita k elicitaci také u jiných léčivých rostlin. Například u rostliny *Echinacea purpurea*, Heřmánku pravého, Chmele, Máku, Jitroceli, Kotvičnicku zemního.

BARTOŠ (2016) se ve své práci zabýval vlivem elicitoru ASA na obsah účinných látek u Kotvičnicku zemního. V pokusu v roce 2014 byly aplikovány postřikem tři koncentrace ASA. Během pokusu byl prokázán vliv elicitorů na obsah účinných látek u plodů i natě. Statisticky bylo prokázáno, že u každé koncentrace došlo alespoň jednou ke zvýšení obsahu vybraných látek u Kotvičnicku. V některých případech ale došlo ke snížení vybraných účinných látek. Při použití kyseliny acetylsalicylové u Kotvičnicku je důležité zohlednit její koncentraci. Z jeho pokusu vyplývá, že kyselina acetylsalicylová je v mnoha případech velmi přínosná a při jejím použití dochází ke zvýšení obsahu vybraných účinných látek.

ŠRÁMEK (2007) prováděl pokus vliv elicitorů na maximální produkci vybraných účinných látek – kyseliny kávové, kaftarové, cichorové, chlorogenové, rutinu u moderní léčivé rostliny – *Echinacea purpurea*. Byla použita ASA ve středních koncentracích, při sledování obsahu účinných látek u jednotlivých částí rostliny. U nati byl efekt vlivu elicitoru méně průkazný a výrazně byl ovlivněn ročníkem. Nízká koncentrace zvyšovala obsah kyseliny kávové a cichorové. U střední a vysoké

koncentrace se obsah účinných látek spíše snižoval. V kořeni byl při použití nízké a střední koncentrace obsah účinných látek statisticky průkazně zvýšen. Při vysoké koncentraci došlo ke snížení obsahu vybraných účinných látek. U tohoto pokusu se střední koncentrace kyseliny acetylsalicylové jevila jako optimální.

12 ZÁVĚR

Cílem této práce byla studie vlivu elicitorů, hnojení a technologie pěstování Ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L) na produkt a jeho využití. Za tímto účelem byly založeny dva paloparcelkové pokusy. První pokus byl založen v roce 2015 na pozemku Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích s použitím třech různých elicitorů a to NanoFYT Si[®] v koncentraci 1 ml/l, N-FENOL MIX[®] v koncentraci 0,5 ml/l a kyselina acetylsalicylová ve třech koncentracích – nízké [10^{-5} mol/l], střední [10^{-4} mol/l] a vysoké [10^{-3} mol/l]. Druhý pokus byl založen v roce 2016 na pozemku v místě mého bydliště – Stojanovice. V tomto pokusu byly použity dva elicitory NanoFYT Si[®] v koncentraci 1 ml/l, N-FENOL MIX[®] v koncentraci 0,5 ml/l a sazenice získané ze skleníku JU v Českých Budějovicích byly vysazeny ve dvou růstových fázích a to 3 – 4 pravých listů a 6 – 7 pravých listů. Odebrané vzorky semen byly školitelem prof. Ing. Stanislavem Kuželem, CSc. odeslány do Prahy na analýzu.

Při vyhodnocení pokusů č. 1 a č. 2 byl prokazatelný nárůst po aplikaci elicitorů ASA, NanoFYT Si[®] a N-FENOL MIX[®]. Na základě těchto výsledků lze doporučit při pěstování Ostropestřce mariánského používat elicitory na zvýšení obsahu účinných látek.

13 POUŽITÁ LITERATURA

AGRA 1., *N-FENOL MIX*[®]. [online] 2017 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <https://www.agrofert.cz/downloads/etikety-agrochemikalie/N-FENOL%20MIX.pdf>

AGRA 2., *NanoFYT Si*[®]. [online] 2017 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <https://www.agrofert.cz/downloads/etikety-agrochemikalie/Nanofyt%20Si.pdf>

AGRA 3., *ELITiC*[®]. [online] 2017 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: http://www.agra.cz/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=18%3

AGRA GROUP a. s., *N-FENOL MIX*[®] – *Pomocný rostlinný přípravek pro vyšší výkon polních a zahradních plodin v aktivní vegetaci.* [online] 2017 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.agra.cz/stimulatory/n-fenol-mix.html>

AGRA GROUP a. s. 2., *NanoFYT Si*[®] [online] 2017 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.agra.cz/stimulatory/nanofyt-si.html>

ANDRZEZEJEWSKÁ, J., SADOWSKA, K., MIELCAREK, S., *Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate.* *Industrial Crops and Products.* 2010, vol 33, issue 2, s. 462-468. DOI:10.1016/j.incrop.2010.10.027. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669010002724>

ANONYM 1., *Ostropestřec mariánský.* [online] 2017 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.beltina.cz/bylinka/ostropestrec-mariansky/>

ANONYM 2., *Ostropestřec mariánský.* [online] 2017 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.dia-potraviny.cz/ostropestrec.html>

ANONYM 3., *Bodlák, který nepíchá, aneb nastartujte své koně.* [online] 2017 [cit. 2017-02-16]. Dostupné z: <http://www.distanc.cz/bodlak-ktery-nepicha-aneb-nastartujte-sve-kon/>

ANONYM 4., *HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie).* [online] 2017 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>

ANONYM 5., *Cirhóza jater.* [online] 2017 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://nemoci.vitalion.cz/cirhoza-jater/>

ANONYM 6., *Paraquat.* [online] 2017 [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15939>

ANONYM 7., *Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a papírová chromatografie (PC).* [online] 2017 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: http://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52967

ANONYM 8., *Zpráva o stavu zemědělství ČR za rok 2015 „Zelená zpráva“.* [online] 2015 [cit. 2016-11-10]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/481729/ZZ15_V4.pdf

ANTOŠOVÁ, V., *Léčivé, aromatické a kořenové rostliny – perspektiva komodit.* Brno 2009. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.

BAENAS, N., GARCÍA-VIGUERA C., MORENO, D. A., *Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods.* *Molecules.* 2014, 19 (9), s. 13541-13563. DOI: 10.3390./molecules190913541. ISSN 14203049.

BARTOŠ, P., *Návrh technologie pěstování kotvičniku zemního (Tribulus terrestris L.) a jeho využití*. České Budějovice, 2016. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

BARTWAL, A., MALL R., LOHANI, P., GURU, S. K., AROROA, S., *Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses*. Journal of plant growth regulation. 2013, vol. 32, issue 1, pp. 216-232. ISSN 07217595. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00344-012-9272-x>

BĚLOHLÁVKOVÁ, R., *Květena České republiky*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2004, s. 407 – 408. ISBN 80-200-1161-7.

BIEDERMANN, D., VAVŘÍKOVÁ, E., CVAK, L., KŘEN, V., *Chemistry of silybin. Natural Product Reports*. 2014, vol. 31, issue 9, s. 1138-1157. DOI: 10.1039/C3NP70122K. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3NP70122K>

BLÁHA, L., BOCKOVÁ, R., HNILIČKA, F., HNILIČKOVÁ, H., HOLUBEC, V., MÖLLEROVÁ, J., ŠTOLCOVÁ, J., ZIEGLEROVÁ, J., *Rostlina a stres*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2003, s. 156. ISBN 80-86555-32-1.

BODLÁK, J., SEVERA, F., VANČURA, B., *Příroda léčí: Bylinář s recepty*. Vyd. 3. Praha: Granit, 2004, s 239. ISBN 80-7296-036-9.

BÖHMER, B., WOHANKA, W., *Atlas chorob a škůdců okrasných rostlin, ovoce a zeleniny*. Vyd v češtině 1. Praha: Brázda, 2003, s. 240. ISBN 80-209-0317-8.

BÖHRINGER, M., JÖRG, G., *Ochrana rostlin*. Ostrava: Blesk, 1996, s. 155, ISBN 80-8606-000-4.

BRABENEC, M., BÔRIK, J., *Pestovanie liečivých a kořeninových rastlín na malých plochách.* Praha:Svépomoc, 1990, s. 324. ISBN 80-85168-09-x.

BRADLEY, S., *Nemoci rostlin a jejich léčba: informace odborníka na dosah ruky: škůdci, choroby, jiné poruchy zdraví.* České vyd. 1. Praha: Svojtka, 2008, s. 144. ISBN 978-80-7352-702-0.

BRANŽOVSKÝ, I., *Léčivé, aromatické a kořenové rostliny – příležitost pro zemědělce.* Ministerstvo zemědělství. Úroda, 2007, roč. 55, s. 43-45. ISSN 0139-6013.

CASTLEMAN, M., *Velká kniha léčivých rostlin: klasický průvodce nejlepšími přírodními léčivy představující ty nejlepší – časem i vedou prověřené – léčivé rostliny.* 1.vyd. Praha: Columbus, 2004, s. 635. ISBN 80-7249-177-6.

COUFAL, P., *Separation methods* [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 1996 [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/sepmet.html>

COOK, C. N., SAMMAN, S., *Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources.* The Journal of Nutritional Biochemistry. 1996, vol. 7, issue 2, pp. 66-76. DOI:

DE-LA-CRUZ CHACÓN I., RILEY-SALDAÑA CH. A., GONZÁLEZ-ESQUINCA A. R., *Secondary metabolites during early development in plants.* Phytochemistry Reviews. 2013, vol. 12, issue 1, pp. 47-64. ISSN 1568-7767. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11101-012-9250-8>

DRBAL, K., KŘÍŽEK, M., *Analytická chemie.* 1.vyd. V Českých Budějovicích: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 1999, 185 s. ISBN 80-7040-352-7.

DVOŘÁKOVÁ, J., *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.

GRAMANOVÁ, H., *Technologie pěstování Ostropestřce mariánského Silybum marianum ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování.* České Budějovice, 2009. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

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

GRÜNWARD, J., JÄNICKE, CH., *Zelená lékárna.* Praha: Svojtka, 2008. s. 416. ISBN 978-80-7352-600-9.

GUBIŠOVÁ, J., *Technologie pěstování Ostropestřce mariánského (Silybum marianum L. Gaertn.) a jeho hnojení s cílem maximální kvality produktu a jeho využití.* České Budějovice, 2015. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

HABÁN, M., OTEPKA, P., ŠALAMON, I., *Polnohospodářské aspekty pestovania liečivých rastlín/Agricultural aspects of medicinal plants cultivation.* SPU Nitra, Nitra, 2008, s. 65, ISBN 978-80-552-0121-4.

HARTMATHA, J., *Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenyylpropanoidů.* Chemické listy. 2005, č. 99, s. 622-632. ISSN 1213-7103.

HRDLIČKOVÁ, H., *Vliv ošetření osiva Ostropestřce mariánského na výnos nažek*. České Budějovice, 2013. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

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

CHROMATOGRFIE., [online] 2017 [cit. 2017-03-07]. Dostupný z: [http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/chromatografie\(4f9a8942587af\).pdf](http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/chromatografie(4f9a8942587af).pdf)

CHURÁČEK, J., *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemicko-technologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, s. 384. ISBN 80-03-00569-8.

INDRÁK, P., CHYTILOVÁ, D., *K problematice stanovení silybinu v droze Ostropestřce mariánského (Silybum marianum /L./ Gaertn.)*. Zahradnictví. 1992, roč. 19, č. 4, s. 309-313.

JAHODÁŘ, L., *Farmakobitanika: semenné rostliny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2006, s. 278. ISBN 80-246-1225-9.

JANČOVÁ, P., *Metabolické přeměny silybinu*. Olomouc, 2010. Disertační práce. Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

JANČOVÁ, P., ANZENBACHEROVÁ, E., DVOŘÁK, Z., KOSINA, P., ŠIMÁNEK, V., *Metabolické přeměny silybinu*. Chemické listy. 2008, č. 102, s. 633-634. ISSN 1213-7103.

JANDA, M., VALENTOVÁ, O., *Kyselina salicylová*. Bioprospect. 2014, roč. 24, č. 1, s. 9-12. ISSN 1210-1737.

JEGEROV, A., *Flavonolignany – novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem*. Chemické listy. 1996, č. 90, s. 859 – 862. ISSN 1213 – 7103.

JIRÁSEK, V., STARÝ, F., SEVERA, F. *Atlas léčivých rostlin*. Atlas léčivých rostlin, doc.RNDr. Václav Jirásek, CSc., RNDr. PhMr.František Starý, CSc., ilustroval: František Severa, první vydání-Státní Pedagogické Nakladatelství v Praze, 1986, č. 6-82-33/1, 14-578-86.

KAŠIČKA, V., *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*. Chemické listy. 1997, č. 91, s. 320 – 329. ISSN 1213-7103.

KOPECKÁ, Z., *Hodnocení produkce Ostropestřce mariánského [Silybum marianum (L.) Gaertn.]*. Brno, 2012. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně.

KOTYK, A., *Imunita rostlin*. [online] 2009 [cit. 2017-04-04] Dostupné z: <http://www.akademon.cz/clanekDetail.asp?name=Imunita%20rostlin&source=0409>

KOUDELA, M., *Ostropestřec mariánský*. Zahrádkář. 2009, č. 9., s. 23.

KOUKOLOVÁ, M., LÁCHOVÁ, J., HOMOLKA, P., *Výživa dojníc při přechodu do laktace*. Zemědělec. 2017, č. 14, s. 14-16. ISSN 1211-3816.

KOVALČÍKOVÁ, M., KOVALČÍK, K., *Adaptácia a stres v chove hospodárskych zvierat*. Bratislava: Príroda. 1974, s. 206.

KŘEN, V., WALTEROVÁ, D., *Silybin and silymarin – new effects and applications.* Biomedical Papers [online] 2005, vol. 149m issue 1, s. 29 – 41 [cit. 2016-12-15] DOI:10.5507//bp.2005.002. Dostupné z: http://biomed.papers.upol.cz/artkey/bio-2005010002_SILYBIN_AND_SILYMARIN_8211_NEW_EFFECTS_AND_APPLICATIONS.php

KŘÍŽEK, M., ŠÍMA, J., *Analytická chemie.* České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015, s. 214. ISBN 978-80-7394-486-5.

KUBÍNEK, J., *Ostropestřec mariánský – metodika pěstování.* Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR. 1987, 21 s.

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, vol. 57, issue 17, pp. 179-189.

KUŽEL, S., CÍGLER, P., HRUBÝ, M., *Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin v rostlinách a jeho použití.* CZ-296300 český patent, 2004a

KUŽEL, S., VYDRA, J., TRÍSKA, J., VRCHOTOVÁ, N., HRUBÝ, M., CÍGLER, P.,

Technologie pěstování a zpracování Echinacea purpurea na extrakt s požadovanými prvky jakosti a podklady pro jeho certifikaci: vědecká monografie. 1.vyd V Českých Budějovicích: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2008, s. 116, Malotechnologie. ISBN 978-80-7394-103-1.

KUŽEL, S., CÍGLER, P., HRUBÝ, M., *The preparation for the induction of increased formation of bioactive compounds in plants and its use.* Evropský patent:*EP 05744660.1, *PCT/CZ2005/000045 (PV 2004-687), 2004b

KVASNIČKA, F., BÍBA, B., SEVČÍK, R., VOLDŘICH, M., KRÁTKÁ, J., *Analysis of the active components of silymarin.* Journal of Chromatography A. 2003, vol. 990, no. 1-2, s. 239-245.

LARCHER, W., Fyziologická ekologie rostlin. Praha: Academia. 1988, s. 368.

MACKŮ, J., KREJČA, J., *Atlas léčivých rostlin.* 4., slov. vyd. Bratislava: Veda, 1988. ISBN 071-010-88.

MAREČEK, V., *Využití elektromigračních metod v potravinářství.* Brno, 2007. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně.

MARTINELLI, T., ANDRZEJEWSKA, J., SALIS, M., SULAS, L., *Phenological growth of Silybum marianum according to the extended BBCH scale.* Annals and Applied Biology. 2014, vol. 166, issue 1, s. 53-66. DOI: 10.1111./aab.12163.

MIKEŠOVÁ, I., LUTOVSKÁ, M., *Léčivé rostliny: o sběru a pěstování.* 1.vyd. Praha: Dokořán, 2004, s. 234. ISBN 80-86569-68-3.

MORICOVÁ, P., LUHOVÁ, L., LOCHMAN, J., KAŠPAROVSKÝ, T., *Elicitiny: Klíčové molekuly interakcí rostlin a patogenů.* Chemické listy, 2014, č. 108, s. 1133-1139. ISSN 1213-7103.

MOUDRÝ, J., *Ostropěstřec mariánský (Silybum marianum)* [online] 2016 [cit. 2016-11-15]. Dostupný z:

http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Ostropestrec_mariansky.htm

MOUDRÝ, J., *Alternativní plodiny*. 1.vyd. Praha: profi Press, 2011, s. 142. ISBN 978-80-86726-40-3.

NEUGEBAUEROVÁ, J., *Pěstování léčivých a kořeninových rostlin*. Vyd. 1. v Brně: Mendelova lesnická a zemědělská univerzita, 2006, s. 122. ISBN 80-7175-997-1.

NOVÁKOVÁ, V., *Kyselina salicylová*. Čelákovice, 2011. Absolvenská práce. Vyšší odborná škola, střední odborná škola a základní MILLS, s.r.o. Čelákovice.

NOSRETI, D., *Kyselina acetylsalicylová, ACC*. [online] 2017 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: http://darius.cz/archeus/LS_kys_acet.html

ONDŘEJ, M., ODSTRČILOVÁ, L., *Choroby ostropstce. Agro-ochrana, výživa, odrůda*. 1999, ročník 4, č. 7, s. 15-17.

OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z., *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním oborem*. Praha: Karolinum, 2005. s. 202. ISBN 978-80-246-0553-1.

OPLETAL, L., VOLÁK, J., *Rostliny pro zdraví*. Vyd. 1. Praha:Aventium, 1999, s. 176. ISBN 80-7151-412-2.

PAVLOVÁ, L., *Fyziologie rostlin*. Praha: Karolinum, 2005, s. 253. ISBN 80-246-0985-1.

PETR, J., *Vliv ošetření elicitory na obsah některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině.* České Budějovice, 2014. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J., *Fyziologie rostlin.* Praha: Academia. 1998, s. 484. ISBN 80-200-0586-2. 1999, vol. 19 (3-4), s. 435-442. DOI: 10.1016/S0731-7085(98)00231-1.

PŘIBÍK, O., *Léčivé rostliny jsou v kursu.* [online]. ÚRODA, 2005 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://uroda.cz/lecive-rostliny-jsou-v-kursu/>

PŘIBYLOVÁ, Z., MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. *Léčivé, aromatické a kořenové rostliny: Situační a výhledová zpráva* [online]. Praha, 2014 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/403652/SVZ_LAKR_12_2014.pdf

PUSZTAHELYI, T., HOLB, I. J., PÓCSI, I., *Secondary metabolites in fungus-plant interactions.* *Frontiers in Plant Science.* 2015, vol. 6, article 573.

QUAGLIA, M. G., BOSSÙ, E., DONATI, E., BRANDT, A., *Determination of silymarin in the extract from dried Silybum marianum fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis.*

SCHNNEEDORFEROVÁ, I., *Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech tělních tekutin pomocí plynové chromatografie.* České Budějovice, 2009, 74 s. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

SCHULTZ, J., *Secondary Metabolites in Plants* [online]. 2017 [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: <http://www.biologyreference.com/Re-Se/Secondary-Metabolites-in-Plants.html>

SCHUSTER, R. M., *The Hepaticae and Anthocerotae of North America east of the hundredth meridian*. 1992, s. 854. ISBN 0-914-86820-9.

SIATKA, T., SKLENÁŘOVÁ, H., KAŠPAROVÁ, M., SOLICH, P., *Vliv chloridu rtuťnatého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L.* Chemické listy. 2011, č. 105, s. 367-370. ISSN 1213-7103.

SLATINA, J., *Biologická a farmakologická aktivita lignanů*. Chemické listy. 2000, č. 94, s. 111-116. ISSN 1213-7103.

SOBOTNÍKOVÁ, J., *Separační metody*. [online] 2017 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~suchan/PC_TLC.pdf

SOUDEK, P., *Fotoremedoace II*. [online] 2017 [2017-03-12]. Dostupné z: <http://www.petrsoudek.eu/pdf/Fytoremediace03-oxidativni%20stres.pdf>

SPITZOVÁ, I., *Ostropěstřec mariánský – staronová léčivá rostlina*. Úroda. 1997, č. 8, s. 28-29.

SPITZOVÁ, I., *Kultivar *Silyb*, nová rostlina farmaceutického průmyslu*. Živa. 1991, č. 3, s. 116 – 117.

STARÝ, F., *Léčivé bodláky: Ze světa léčivých rostlin 5*. Třeva: časopis pro biologickou práci. 2000, č. 5, s. 208-210.

SUBRAMAINAM, S., VAUGHN, K., CARRIER, D. J., CLAUSEN E. C., *Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: An alternative to petroleum ether defatting*. Bioresource Technology. 2008, vol. 99, issue 7, s. 2501 – 2506.

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.

ŠTULÍK, K., *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004, s. 264. ISBN 80-246-0852-9.

TOŠOVSKÁ, M., BUCHTOVÁ, I., MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. *Léčivé, aromatické a kořenové rostliny: Situační a výhledová zpráva* [online]. Praha, 2012 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z:

http://eagri.cz/public/web/file/188525/SVZ_2012_konecna_verze.pdf

TŮMOVÁ, L., TŮMA, J., *Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat*. Chemické listy. 2009, č.103, s. 503-510. ISSN 1213-7103.

TŮMOVÁ, L., TŮMA, J., MEGUŠÁR, K., DOLEŽAL, M. *Substituted pyrazincarboxamides as abiotic elicitors of flavonolignan production in *silybum marianum* (L.) Gaertn cultures in vitro*. Molecules. 2010, 15 (1), 331 -340.

VÁVROVÁ, J., *Zónová elektroforéza* [online]. 2017 [2017-03-10]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJAZH.htm

VELIKINAC, I., ČUDINA, O., JANKOVIĆ, I., AGBABA, D., VLADIMIROV, S., *Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations*. II Farmaco. 2004, vol. 59, issue 5, pp. 419-424.

VERMA, N., SHUKLA, S., *Impact of variol factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites.* Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 2015, vol. 2, issue 4, pp. 105-113. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.09.002. ISSN 22147861.

VÍTEK, L., *Účinky silymarinu (Ostropestřec) II.* [online] 2014 [2017-02-13]. Dostupné z: <http://www.sportvital.cz/zdravi/ucinky-silymarinu-ostropestrec-ii>

VÍTEK, L., *Účinky silymarinu (Ostropestřec) I.* [online] 2015 [2017-02-13]. Dostupné z: <https://www.sportvital.cz/zdravi/ucinky-silymarinu-ostropestrec-i>

VOSTÁLOVÁ, J., *Nové biologické aktivity silymarinu a jeho obsahových složek.* Chemické listy. 2008, č. 102, s. 623-633. ISSN 1213-7103.

ZACHAŘ, P., SÝKORA, D., *Plynová chromatografie* [online]. 2017 [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>

ZIMOLKA, J., *Speciální produkce rostlinná – rostlinná výroba: (Polní a zahradní plodiny, základy pícninářství).* Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2000, s. 245. ISBN 80-7175-451-1.

ZVOLÁNKOVÁ, J., *Sledování výskytu chorob na Ostropestřci mariánském [Silybum marianum (L.) Gaertn.].* Brno, 2012. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně.

14 PŘÍLOHY

obr. č. 18. Sazenice ve fázi 3 – 4 pravých listů.



Foto: Bc. Jana Gubišová

Obr. č. 19. Sazenice ve fázi 6 – 7 pravých listů.



Foto: Bc. Jana Gubišová

Obr. 20. Detail květu.



Foto: Bc. Jana Gubišová

Obr. č. 21. Nestejnoměrné dozrávání.



Foto: Bc. Jana Gubišová

Obr. č. 22. Nažky s chmýrem.



Obr.č. 23. Ostropestřec mariánský v období sklizně.



Foto: Bc. Jana Gubišová

Tab. č. 28 Taxifolin, graf č. 1.

mg/g	Kontrola 1	Kontrola 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2
	1,35	1,36	1,39	1,29	1,43	1,43
	1,31	1,44	1,31	1,21	1,48	1,34
	1,27	1,28	1,34	1,36	1,53	1,57
	1,29		1,26	1,27	1,52	1,47
Min. hodnota	1,27	1,28	1,26	1,21	1,43	1,34
Max. hodnota	1,35	1,44	1,39	1,36	1,53	1,57
Medián	1,3	1,36	1,33	1,28	1,52	1,47

Tab.č 29. Silychristin, graf č. 2.

mg/g	Kontrola 1	Kontrola 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2
	11,52	11,32	12,65	11,43	12,47	12,68
	10,77	11,96	11,94	11,66	12,79	11,88
	10,86	10,99	13,01	11,49	12,35	13,03
	10,96		12,24	11,71	12,53	12,23
Min. hodnota	10,77	11,32	11,94	11,66	12,35	11,88
Max. hodnota	11,52	11,96	12,65	12,49	12,79	12,68
Medián	10,91	11,32	12,45	11,58	12,5	12,46

Tab. č. 30. Silydianin, graf č. 3.

mg/g	Kontrola 1	Kontrola 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2
	1,6	1,69	1,69	1,76	1,79	1,8
	1,57	1,39	1,6	1,65	1,12	1,69
	1,49	1,55	1,7	1,82	1,9	2,11
	1,52		1,6	1,71	1,65	1,98
Min. hodnota	1,49	1,39	1,6	1,65	1,12	1,69
Max. hodnota	1,6	1,69	1,7	1,76	1,79	2,11
Medián	1,55	1,55	1,65	1,71	1,72	1,89

Tab. č. 31. Silybin A, graf č. 4

mg/g	Kontrola 1	Kontrola 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2
	8,8	8,83	9,69	9,8	9,95	10,06
	8,99	9,13	9,15	9,19	10,02	9,43
	9,03	9,93	9,79	9,92	9,67	10,22
	8,73		9,21	9,3	10,2	9,59
Min. hodnota	8,73	8,83	9,15	9,19	9,67	9,43
Max. hodnota	9,03	9,93	9,79	9,92	10,2	10,22
Medián	8,9	9,13	9,45	9,55	9,98	9,83

Tab. č. 32. Silybin B, graf č. 5.

mg/g	Kontrola 1	Kontrola 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2
	13,1	13,3	14,91	15,3	15,29	15,54
	13,76	14,43	14,08	14,35	15,46	14,57
	13,22	13,46	14,98	15,3	14,98	15,83
	13,41		14,09	14,34	15,13	14,86
Min. hodnota	13,1	13,3	14,08	14,34	14,98	14,57
Max. hodnota	13,76	14,43	14,98	15,3	15,29	15,83
Medián	13,32	13,46	14,5	14,83	15,21	15,2

Tab. č. 33. Isosilybin A, graf č. 6.

mg/g	Kontrola 1	Kontrola 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2
	2,81	2,8	3,3	3,15	3,26	3,31
	2,79	2,42	3,11	2,95	3,24	3,11
	2,22	2,97	3,26	3,25	3,33	3,42
	2,94		3,06	3,05	3,01	3,21
Min. hodnota	2,22	2,42	3,11	2,95	3,01	3,11
Max. hodnota	2,94	2,97	3,3	3,25	3,33	3,42
Medián	2,8	2,8	3,19	3,1	3,25	3,26

Tab. č. 34. Isosilybin B, graf č. 7.

mg/g	Kontrola 1	Kontrola 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2
	0,65	0,66	0,64	0,91	0,84	0,86
	0,61	0,7	0,61	0,85	0,83	0,81
	0,7	0,66	0,71	0,84	0,8	0,88
	0,64		0,67	0,78	0,77	0,83
Min. hodnota	0,61	0,66	0,61	0,78	0,77	0,81
Max. hodnota	0,7	0,7	0,71	0,91	0,84	0,88
Medián	0,65	0,66	0,66	0,85	0,82	0,85

Tab. č. 35. Silymarinový komplex, graf č. 8.

mg/g	Kontrola 1	Kontrola 2	N-FENOL MIX 1	N-FENOL MIX 2	NanoFYT Si 1	NanoFYT Si 2
	39,82	39,96	44,28	44,65	45,02	45,68
	39,8	41,47	41,8	41,87	44,94	42,82
	38,79	40,85	44,79	44,98	44,56	47,06
	39,5		42,12	42,17	44,82	44,18
Min. hodnota	38,79	39,96	41,8	41,87	44,56	42,82
Max. hodnota	39,82	41,47	44,79	44,98	45,02	47,06
Medián	39,65	40,85	43,2	43,41	44,88	44,93

Tab. č. 36. Taxifolin, graf č. 9.

mg/g	Kontrola	ASA – nízká	ASA – střední	ASA – vysoká	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
	1,33	1,17	1,52	1,52	1,43	1,35
	1,31	1,13	1,49	1,50	1,55	1,40
	1,29	1,22	1,51	1,58	1,47	1,35
	1,28	1,08	1,41	1,46	1,34	1,29
Min. hodnota	1,28	1,08	1,41	1,46	1,34	1,29
Max. hodnota	1,33	1,22	1,52	1,58	1,55	1,40
Medián	1,3	1,17	1,5	1,51	1,45	1,35

Tab. č. 37. Silychristin, graf č. 10.

mg/g	Kontrola	ASA – nízká	ASA – střední	ASA – vysoká	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
	9,18	9,63	9,91	10,70	12,78	11,52
	9,27	9,73	9,67	10,68	12,81	11,79
	8,92	9,61	9,89	11,24	12,69	11,66
	8,85	9,32	9,78	10,22	11,98	10,96
Min. hodnota	8,85	9,32	9,67	10,22	11,98	10,96
Max. hodnota	9,27	9,73	9,91	10,70	12,81	11,79
Medián	9,05	9,63	9,84	10,69	12,74	11,59

Tab. č. 38. Silydianin, graf č. 11.

mg/g	Kontrola	ASA – nízká	ASA – střední	ASA – vysoká	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
	1,27	1,57	1,38	1,73	1,80	1,60
	1,28	1,59	1,40	1,62	1,86	1,62
	1,19	1,66	1,31	1,70	1,72	1,77
	1,26	1,46	1,43	1,82	1,89	1,52
Min. hodnota	1,19	1,46	1,31	1,62	1,72	1,52
Max. hodnota	1,28	1,66	1,43	1,82	1,89	1,77
Medián	1,27	1,59	1,39	1,72	1,83	1,61

Tab. č. 39. Silybin A, graf č. 12.

mg/g	Kontrola	ASA – nízká	ASA – střední	ASA – vysoká	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
	7,81	8,06	8,60	8,94	10,06	9,18
	7,94	8,27	8,96	8,99	10,51	8,84
	7,56	8,44	8,86	9,32	10,20	9,20
	7,28	7,99	7,96	8,58	9,43	9,23
Min. hodnota	7,28	8,06	7,96	8,58	9,43	8,84
Max. hodnota	7,94	8,44	8,96	9,32	10,51	9,23
Medián	7,69	8,27	8,73	8,97	10,13	9,19

Tab. č. 40. Silybin B, graf č. 13.

mg/g	Kontrola	ASA – nízká	ASA – střední	ASA – vysoká	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
	11,96	12,36	13,23	13,78	15,54	14,30
	11,54	12,40	12,91	13,87	15,49	13,88
	11,90	12,00	12,89	13,46	15,90	14,67
	11,14	12,59	12,66	13,91	14,97	13,49
Min. hodnota	11,14	12,00	12,66	13,46	14,97	13,49
Max. hodnota	11,96	12,59	13,23	13,91	15,90	14,67
Medián	11,72	12,36	12,9	13,83	15,52	14,09

Tab. č. 41. Isosilybin A, graf č. 14.

mg/g	Kontrola	ASA – nízká	ASA – střední	ASA – vysoká	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
	2,60	2,79	2,82	3,01	3,31	3,10
	2,56	2,56	2,84	3,16	3,22	3,24
	2,49	2,65	2,74	3,04	3,36	2,97
	2,42	2,60	2,96	2,99	3,21	3,34
Min. hodnota	2,42	2,56	2,74	2,99	3,21	2,97
Max. hodnota	2,60	2,79	2,96	3,16	3,36	3,34
Medián	2,53	2,65	2,83	3,03	3,27	3,17

Tab. č. 42. Isosilybin B, graf č. 15.

mg/g	Kontrola	ASA – nízká	ASA – střední	ASA – vysoká	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
	0,54	0,55	0,56	0,73	0,86	0,67
	0,50	0,57	0,62	0,70	0,95	0,66
	0,49	0,58	0,54	0,69	0,79	0,62
	0,50	0,51	0,52	0,66	0,81	0,64
Min. hodnota	0,49	0,51	0,52	0,66	0,79	0,62
Max. hodnota	0,54	0,58	0,62	0,73	0,95	0,67
Medián	0,5	0,57	0,55	0,7	0,84	0,65

Tab. č. 43. Silymarinový komplex, graf č. 16.

mg/g	Kontrola	ASA – nízká	ASA – střední	ASA – vysoká	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
	34,67	36,13	38,03	40,41	45,78	41,72
	34,41	36,25	37,90	40,52	46,39	41,52
	33,84	36,16	37,74	41,03	46,13	42,23
	32,31	35,55	36,45	39,64	43,62	40,47
Min. hodnota	32,31	35,55	36,45	39,64	43,62	40,47
Max. hodnota	34,67	36,25	38,03	41,03	46,39	42,23
Medián	34,13	36,16	37,82	40,47	45,96	41,62

Tab. č. 44. porovnání výsledků účinných látek u silymarinového komplexu u pokusu č. 1 a č. 2. [mg/g], graf č. 19.

Lokalita	Kontrola	NanoFYT Si	N-FENOL MIX
Stojanovice	40,12	44,89	43,33
JU České Budějovice	33,81	45,48	41,48