

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**Studijní program:** N4101 Zemědělské inženýrství

**Studijní obor:** Agroekologie navazující

**Katedra:** Katedra agroekosystémů

**Vedoucí katedry:** doc. Ing. Petr Konvalina, Ph.D.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vliv technologie pěstování kotvičníku zemního (*Tribulus terrestris* L.) na kvalitu  
produktu

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

**Autor diplomové práce:** Bc. Jaroslav Neumann

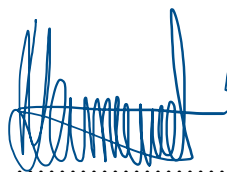
**České Budějovice, 2020**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Vliv technologie pěstování kotvičnicku zemního (*Tribulus Terrestris* L.) na kvalitu produktu jsem vypracoval 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 odevzdanému textu této kvalifikační 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 výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích.....



.....Neumann Jaroslav Bc.

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

## Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

### ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Jaroslav NEUMANN  
Osobní číslo: Z18013  
Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Agroekologie – Ekologické zemědělství  
Téma práce: Vliv technologie pěstování Kotvičniku zemního (*Tribulus terrestris* L.) na kvalitu produktu.  
Zadávací katedra: Katedra agroekosystémů

#### Zásady pro vypracování

**Cíl práce:** Studium vlivu technologie pěstování kotvičniku zemního na obsah vybraných biologicky aktivních látek. Vypracujte literární rešerši na zadané téma. Proveďte maloparcelkový pokus s pěstováním kotvičniku zemitého. Statisticky vyhodnoťte vliv použité technologie pěstování na obsah vybraných biologicky aktivních látek v produktu. Získané výsledky diskutujte a porovnejte s publikovanou literaturou.

Diplomová práce bude obsahovat následující kapitoly:

1. Úvod – úvod do problematiky (rozsah 1 strana, bez citací)
2. Literární přehled – a) botanická charakteristika kotvičniku zemního, agrotechnika, hnojení, ochrana před škůdci a proti chorobám b) chemické složení a účinné látky c) metody stanovení účinných látek d) farmakologické účinky některých účinných f) vliv technologie pěstování na obsah vybraných účinných látek v kotvičniku zemitém. (rozsah cca 50% textové části DP)
3. Cíl práce a definice pracovních hypotéz – např. technologie pěstování kotvičniku zemního ovlivní obsah biologicky aktivních látek v produktu (rozsah 1 strana)
4. Metodický postup – uvést jasnou a stručnou metodiku práce. Podle doporučeného schématu proveďte maloparcelkový pokus s pěstováním kotvičniku zemitého na pokusném pozemku ZF v Č. B. Ve vypěstovaném materiálu stanovte metodou HPLC obsah vybraných biologicky aktivních látek. Proveďte statistické zpracování dat.
5. Výsledky a diskuse – statisticky vyhodnocené výsledky diskutujte a porovnejte s publikovanou k tématu literaturou (rozsah cca 50% textové části DP)
6. Závěr – shrnutí výsledků (rozsah 1-2 strany, bez citací)
7. Seznam citované literatury (minimálně 1/3 literárních pramenů ze zahraničních zdrojů – vědecké časopisy s IF, patenty, knihy)

Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran bez příloh  
Rozsah grafických prací: dle potřeby (tabulky, grafy, fotografická příloha)  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

Stavriani A.N., E.A. Stekolshchikova, P.N. Turova, I.A. Rodin, O.A. Shpigun, (2017): Quantitative Analysis of a Multicomponent System for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Determination of Diosgenin, Dioscin and Protodioscin in Plant Extracts of Tribulus terrestris. Moscow University Chemistry Bulletin, 2017, Vol. 72, No. 3, pp. 135-143. Original Russian Text ? published in Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya 2: Khimiya, 2017, No. 3, pp. 144-153; Salim Uddin, Zaidul Islam Sarker, Sahena Ferdosh, Jahurul Haque Akanda, Sabina Easmin, Siti Hadijah Shamsudina, Kamaruzzaman Bin Yunuse (2014): Phytosterols and their extraction from Various Plant matrices using supercritical carbon dioxide: a review. J Sci Food Agric 2015; 95: 1385-1394; Kužel S. a kol. (2009): Elicitation of Pharmacologically Active Substances in an Intact Medical Plant under Field-like Conditions. J. Agric Food Chemistry. 57, (17): 7907-7911; Kužel P., Hrubý M., (2006): „Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin“. CZ-296300, ÚPV Praha, 24. 2. 2006; DINCHEV D., EVSTATIEVA L., PLATIKANOV S., GALAMBOSI B.(2010): Investigation of perspective origins of Tribulus terrestris L. for cultivation. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 63(10), 1429 – 1434. ISSN13101331; ANGELOVA Z., GEORGIEV S., ROOS W. (2006):Elicitation of Plants, Biotechnology & Biotechnological Equipment. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2006.10817345>; SHARMA M., SHARMA A., KUMAR A., KUMAR BASU S. (2011): Enhancement of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells Through Stress Stimulus. American Journal of Plant Physiology, 6:50-80 71. Dostupné z: <http://scialert.net/abstract/?doi=ajpp.2011.50.71>; Hudská M. (2015): Technologie pěstování Kotvičniku zemního (Tribulus terrestris L.) a jeho využití. Bc práce ZF JU v CB; Bartoš P. (2016): Návrh technologie pěstování kotvičniku zemního (Tribulus terrestris L.) a jeho využití. Dp ZF JU v CB; Sikora D. (2007): Biologicky aktivní látky v rostlinách kotvičniku zemního. Bc. TF Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,59 s.; Neumann J. (2017): Technologie pěstování kotvičniku zemního (Tribulus terrestris L.) a jeho využití. Bc ZF JU v CB.; M. D, Nanavati D.D., Mehta N.K. A review on the ayurvedic herb tribulus terrestris. L 1997, roč. 17, č. 2, s. 144-150.; NAVRÁTILOVÁ, Z., PATOČKA J. Tribulus terrestris – diskutované fytofarmakum. 2013, roč. 15, č. 4, s. 470-477.  
Další informace pro zpracování BP/DP: [http://www.zf.jcu.cz/studium/informace-pro-studujici/dokumenty-studijniho-oddeleni/informace-pro-studujici/Jak\\_vypracovat\\_DP.pdf](http://www.zf.jcu.cz/studium/informace-pro-studujici/dokumenty-studijniho-oddeleni/informace-pro-studujici/Jak_vypracovat_DP.pdf)  
Opatření děkana ZF ke zpracování BP/DP: [http://www.zf.jcu.cz/studium/dokumenty%20pro%20studenty/sdeleni-dekana-opatreni-a-rozhodnuti-dekana/copy\\_of\\_opatr.dek.414kvalif\\_pozadavky\\_zav.prace.pdf](http://www.zf.jcu.cz/studium/dokumenty%20pro%20studenty/sdeleni-dekana-opatreni-a-rozhodnuti-dekana/copy_of_opatr.dek.414kvalif_pozadavky_zav.prace.pdf)

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

Datum zadání diplomové práce: 18. února 2019  
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2020

V Českých Budějovicích dne 11. března 2019

V.Š.

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚLÉSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1988, 370 05 České Budějovice

L.S.

doc. Ing. Petr Konvalina, Ph.D.  
vedoucí katedry



### **Poděkování**

Tímto bych chtěl vyjádřit poděkování zejména vedoucímu diplomové práce panu prof. Ing. Stanislavu Kuželovi CSc., za jeho připomínky, usměrnění a veškerou pomoc.

Dále mé poděkování patří děkanu zemědělské fakulty panu prof. Ing. Miloslavu Šochovi, CSc., dr. h. c., paní doc. Ing. Evě Dadákové Ph.D., panu Ing. Jaroslavu Hánovi, řediteli Meclovské zemědělské a.s., a svému kolegovi Bc. Petru Vytiskovi za všechnu pomoc, kontakty a finanční podporu, které tato práce vyžadovala.

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Botanická charakteristika .....	2
2.1.1. List .....	3
2.1.2. Stonek .....	4
2.1.3. Kořen .....	4
2.1.4. Morfologie .....	4
2.1.5. Složení saponinů v rostlině z různých geografických regionů.....	5
2.2. Agrotechnika .....	13
2.2.1. Setí.....	13
2.2.2. Klíčení.....	13
2.2.3. Zalévání a první lístky .....	14
2.2.4. Přesazování .....	14
2.2.5. Předpěstování ve skleníku .....	14
2.2.6. Venkovní pěstování, půda a její příprava .....	15
2.2.7. Hnojení .....	15
2.2.8. Ochrana před škůdci a proti chorobám .....	15
2.2.9. Sklizeň.....	15
2.3. Chemické složení a účinné látky.....	16
2.3.1. Sacharidy.....	17
2.3.2. Alkaloidy .....	17
2.3.4. Saponiny .....	17
2.4. Metody stanovení účinných látek (KŘÍŽEK, ŠÍMA 2015).....	19
2.4.1. Chromatografie .....	19
2.4.2. Čerpadla pro HPLC .....	20
2.4.3. Dávkování vzorků.....	20

2.4.4.	Kolony pro HPLC .....	20
2.4.5.	Náplně pro eluenty – chromatografie na reverzní fázi .....	21
2.4.6.	Detektory .....	21
2.5.	UHPLC-MS/MS analýza steroidních saponinů (VŠCHT).....	22
2.5.1.	Použité chemikálie .....	22
2.5.2.	Příprava vzorků.....	22
2.5.3.	UHPLC-MS/MS stanovení obsahu steroidních saponinů .....	22
2.6.	Farmakologické účinky některých sledovaných látek.....	24
2.6.1.	Diosgenin .....	24
2.6.2.	Diosgenin ve sportu .....	24
2.6.3.	Farmakologie .....	25
2.6.4.	Protirakovinné použití .....	26
2.6.5.	Protiinfekční účinky .....	27
2.6.6.	Účinky protidiabetické, dyslipidemické a účinky proti obezitě .....	27
2.7.	Protodioscin.....	28
2.7.1.	Protodioscin ve sportu.....	29
2.7.2.	Farmakologie .....	30
2.7.3.	Sexuální poruchy .....	31
2.7.4.	Protirakovinné využití .....	32
2.7.5.	Srdeční onemocnění .....	33
2.7.6.	Nervový systém .....	33
2.7.7.	Fyzická síla a vytrvalost.....	33
2.7.8.	Antioxidační účinky .....	34
2.7.9.	Dermatologie .....	34
2.7.10.	Insekticidní účinky.....	34
2.7.11.	Toxikologie a vedlejší účinky .....	34

<b>2.8. Vliv technologie pěstování na obsah vybraných účinných látek v kotvičnicku zemním .....</b>	<b>35</b>
<b>2.7.1. Abiotický stres a kyselina acetylsalicylová (ASA) .....</b>	<b>35</b>
<b>2.7.2. Kyselina acetylsalicylová (ASA) a tolerance k abiotickému stresu .....</b>	<b>38</b>
<b>2.7.3. Kovy/metaloidy jako stresový faktor .....</b>	<b>38</b>
<b>2.7.4. Salinita jako stresový faktor .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.5. Ozón jako stresový faktor .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.6. UV-B záření jako stresový faktor .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.7. Teplota jako stresový faktor .....</b>	<b>40</b>
<b>2.7.8. Sucho jako stresový faktor .....</b>	<b>40</b>
<b>2.7.9. Interakce kyseliny acetylsalicylové (ASA) s minerálními látkami.....</b>	<b>41</b>
<b>2.7.10. Interakce ASA s hormony .....</b>	<b>41</b>
<b>2.8. NanoFyt Si<sup>®</sup> .....</b>	<b>42</b>
<b>2.8.1. Cíl použití a způsob účinku .....</b>	<b>43</b>
<b>2.8.2. Složení.....</b>	<b>43</b>
<b>2.8.3. Křemík.....</b>	<b>43</b>
<b>3. Cíle práce a definice pracovních hypotéz .....</b>	<b>44</b>
<b>4. Metodický postup.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Stručná metodika práce .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. Pěstování ve skleníku.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3. AZP .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.1. České Budějovice (pro rok 2013) .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.1.1. Vyhodnocení podle metodického pokynu č.9/SZV .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.2. Meclov (pro rok 2019).....</b>	<b>53</b>
<b>4.3.2.1. Vyhodnocení podle metodického pokynu č.9/SZV .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4. Počasí v Meclově .....</b>	<b>54</b>
<b>4.4.1. Počasí pro Meclov za 50 let.....</b>	<b>55</b>

4.4.1.1. Územní teploty.....	55
4.5. Pěstování v Meclově.....	59
4.6. Schéma postřiku pozemku ZF JU v Č.B.....	71
4.6.1. Počasí České Budějovice .....	71
4.6.1.1. Počasí pro České Budějovice za 50 let .....	72
4.6.1.2. Územní teploty.....	72
4.6.1.3. Územní srážky .....	74
4.6.2. Pěstování na pozemku ZF JU v Č.B. ....	76
4.7. Výsledky.....	82
4.7.1. HPLC analýza ZF JU v Č.B. ....	82
4.7.2. Meclov.....	84
4.7.3. Maloparcelkový pokus ZF JU v Č.B. ....	86
4.7.4. Porovnání Meclova a maloparcelkového pokusu na pozemku ZF JU v Č.B. ....	88
2.7.4. Vliv vegetační fáze rostliny na obsah biologicky aktivních látek .....	90
2.7.5. Vliv sklizně na obsah sledovaných látek v Meclově a na pozemku ZF JU v Č.B. ....	91
4.8. Návrh pěstování pro malou farmu pro největší výnos nadzemní hmoty.....	92
4.9. Statistické zpracování dat .....	94
4.9.1. Diosgenin v nati kotvičnicku .....	94
4.9.1.1. Statisticky neprůkazný obsah diosgeninu v nati mezi ošetřeními.....	94
4.9.1.2. Statisticky průkazný obsah diosgeninu v nati mezi ošetřeními.....	94
4.9.2. Diosgenin v plodu kotvičnicku .....	95
4.9.2.1. Statisticky neprůkazný obsah diosgeninu v plodu mezi ošetřeními.....	95

4.9.2.2. Statisticky průkazný obsah diosgeninu v plodu mezi ošetřeními.....	95
4.9.3. Diosgenin - celek .....	96
4.9.3.1. Statisticky neprůkazný obsah diosgeninu v nati a plodu mezi ošetřeními.....	96
4.9.3.2. Statisticky průkazný obsah diosgeninu v nati a plodu mezi ošetřeními.....	96
4.9.4. Diosgenin – interakce rostlina x ošetření .....	96
4.9.5. Protodioscin v nati kotvičnicku.....	97
4.9.5.1. Statisticky neprůkazný obsah protodioscinu v nati mezi ošetřeními.....	97
4.9.5.2. Statisticky průkazný obsah protodioscinu v nati mezi ošetřeními.....	97
4.9.6. Protodioscin v plodu kotvičnicku .....	98
4.9.6.1. Statisticky neprůkazný obsah protodioscinu v plodu mezi ošetřeními.....	98
4.9.6.2. Statisticky průkazný obsah protodioscinu v plodu mezi ošetřeními.....	98
4.9.7. Protodioscin - celek .....	99
4.9.7.1. Statisticky neprůkazný obsah protodioscinu v nati a plodu mezi ošetřeními.....	99
4.9.7.2. Statisticky průkazný obsah protodioscinu v nati a plodu mezi ošetřeními.....	99
4.9.8. Protodioscin - interakce rostlina x ošetření .....	99
5. Diskuze.....	100
5.1. Porovnání působení elicitorů s literaturou.....	100
5.1.1. Porovnání naměřených hodnot - protodioscin .....	103
5.2. Porovnání s diplomovou prací Ing. Petra Bartoše (2016).....	104
5.2.1. Porovnání průměrných teplot 2014 x 2019.....	104

<b>5.2.2. Porovnání srážek 2014 x 2019 .....</b>	<b>105</b>
<b>5.3. Porovnání výsledků s diplomovou prací Ing. Petra Bartoše.....</b>	<b>107</b>
<b>6. Závěr .....</b>	<b>112</b>
<b>7. Použitá literatura .....</b>	<b>113</b>



## **Abstrakt**

Cílem diplomové práce je zjistit, jak pěstování kotvičnicku zemního na poli bez použití elicitorů a s použitím elicitorů, ovlivní obsah látek, konkrétně protodioscinu a diosgeninu a ty stanovit pomocí metody UHPLC-MS/MS. Dále látky protodioscin a diosgenin popsat a uvést jejich možné využití ve farmacii. Nakonec vše statisticky zhodnotit a stanovit nejlepší metodu pěstování. V praktické části je popsáno pěstování kotvičnicku zemního.

Klíčova slova: Kotvičnick zemní, protodioscin, diosgenin, elicitory, farmacie, saponiny, fytosteroly, kyselina acetylsalicylová, ASA

## **Abstract**

The main goal of this masters dissertation is to observe, how cultivation on the field with elicitors and without them can affect the quantity of substances, like protodioscin and diosgenin and than determine them by UHPLC-MS/MS method. Also, describe protodioscin and diosgenin and introduce their possible usage in pharmacy. At the end, evaluate results and decide, which way of cultivation is the best one. In the practical part it is showed how to grow *Tribulus terrestris*.

Key words: *Tribulus terrestris*, protodioscin, diosgenin, elicitors, pharmacy, saponins, phytosterols, acetylsalicylic acid, ASA

## 1. Úvod

Kotvičnick zemi (*Tribulus Terrestris* L.) je rostlina spojovaná především s fitness průmyslem, a to díky její údajné schopnosti zvyšovat svalovou sílu, hmotu a hladinu hormonů v krvi. Pokud pomineme fitness průmysl, s kotvičnickem se velmi často setkáme ve formě čajů, tinktur a extraktů. Tyto výrobky se používají jako doplněk k léčbě nemocí, nejčastěji například astmatu či neplodnosti, ale také ke zvýšení libida.

Léčivé účinky kotvičnicku zajišťuje mnoho látek, ale jedněmi z nejdůležitějších jsou saponiny. Ve fitness průmyslu je nejvíce známý protodioscin a diosgenin. Ve farmacii mají své místo také protodioscin, diosgenin a jejich deriváty a další látky.

Bohužel obsahy látek, jako jsou protodioscin a diosgenin, se udávají jen na minimum výrobků ve fitness průmyslu, u čajů, tinktur a extraktů se setkáme se stanovením těchto látek jen velmi zřídka či vůbec. Jenže právě protodioscin je nejvíce spojovaný s kvalitou zakoupeného produktu. Většina výrobců uvádí celkový obsah saponinů, který je nic neříkající. Velký problém je fakt, že konkrétně saponiny, přesněji jejich obsahy, se mění podle lokality, kde se rostlina vyskytuje.

Cílem diplomové práce je zjistit, zda rozdílné systémy pěstování, jako je pěstování na poli s použitím elicitorů a bez jejich použití, ovlivní obsahy těchto biologicky aktivních látek.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Botanická charakteristika

Čeleď kacíbovité zahrnuje asi 286 druhů rostlin, které jsou nativní v teplejších oblastech a tropických regionech jižní Evropy, Asie, Afriky a Austrálie (Qureshi et al. 2014). Tyto rostliny dokáží přežívat dokonce i v pouštních podmínkách či ve velmi chudých půdách.

Kotvičnick zemní (*Tribulus terrestris*) je jednoletá C4 rostlina z rodu *Zygophyllaceae* (kacíbovité), která je i dnes poměrně málo prozkoumaná a v některých zemích je považována za plevel (Chen et al. 2015., Selim et al. 2015., Dong et al. 2015., Al Jasem et al. 2014). Kotvičnick je ve světě známý pod mnoha jmény jako je *Puncture vine*, *Bindii*, *Bullhead*, *Burra gokharu*, *Caltrop*, *Cat`s head*, *Devil`s eyelashes*, *Devil`s thorn*, *Devil`s weed*, *Goat head*, *Tackweed*, ale i třeba jako *Al-Gutub*, *Qutiba*, *Hasak*, *Ders El Agouz*.

Obrázek č. 1 rostlina kotvičnicku

112

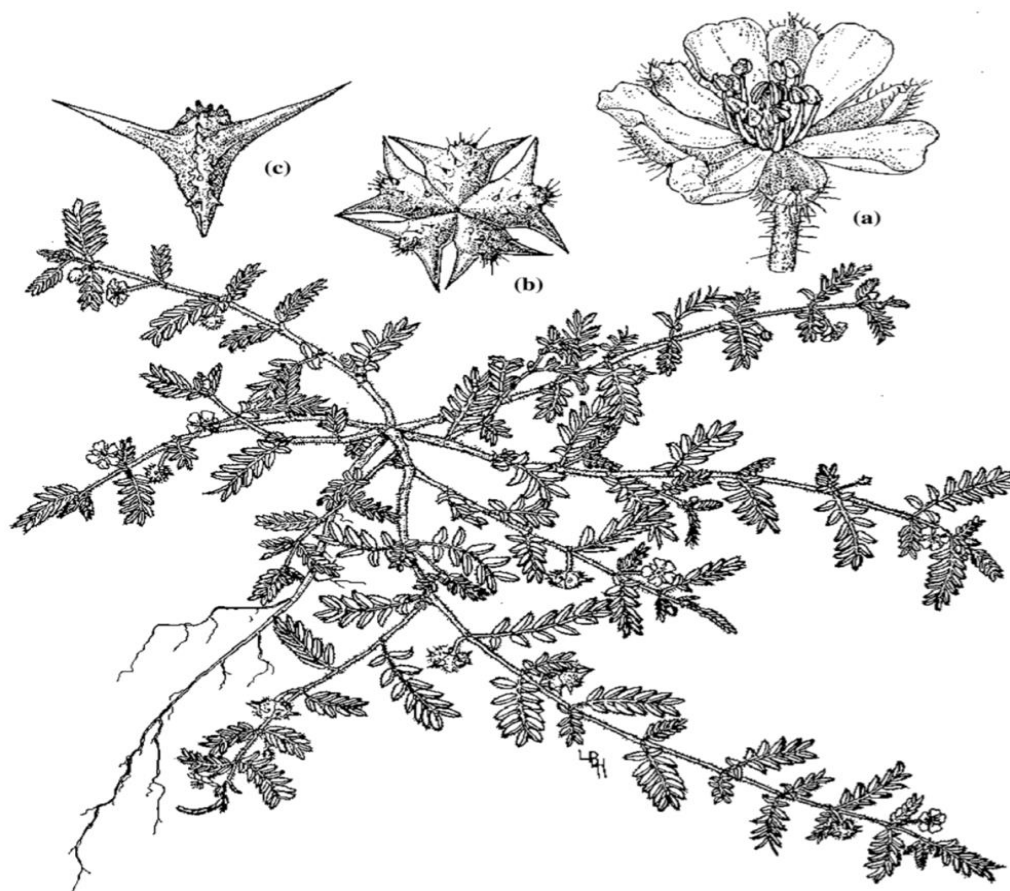


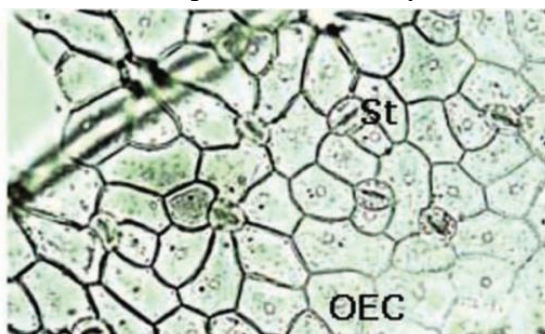
Figure 1. Puncture vine (*Tribulus terrestris*); (a) flower; (b) fruit or seedpod, a cluster of five bony burrs or nutlets; (c) single burr or nutlet containing 2–5 seeds..

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

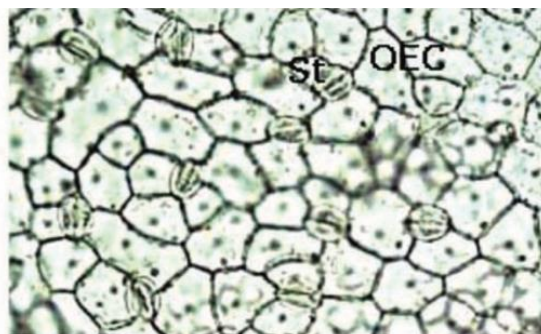
### 2.1.1. List

Listy kotvičníku se skládají z malých lístků, které rostou ve třech až sedmi párech proti sobě a jsou asi 1-5 cm dlouhé. Listy jsou eliptické až obdélníkovité. Pokud je velké sucho, lístky se složí proti sobě aby tak snížily evaporaci vody. Jsou pokryty jednovrstevným epitelem s mnohoúhelníkovitými nebo trojúhelníkovitými epidermálními buňkami a anomocytními průduchy (Obrázek 1A. a 1B).

Obrázek č. 2 epidermis zvětšený 400x



A. Lower epidermis of *Tribulus terrestris* at magnification X400



B. Upper epidermis of *Tribulus terrestris* at magnification X400

Zdroj: Vassilev (2014)

V lístcích se ovlivňuje frekvence průduchů na horním a dolním epidermu. Trichomy vznikají z povrchu jak na horním tak na spodním epidermu, na spodním je jich ale větší počet a jsou zároveň i delší. Lístky kotvičníku jsou pokryté vrstvou rektangulárních epitelových buněk. Na vnějších stěnách epidermálních buněk se vytváří kutikuly, které redukuje ztráty vody a mají důležitou roli při kontrolování teploty na povrchu rostliny. Lístky mají palisádovitý parenchym s poměrně malým intracelulárním prostorem na každé straně. Palisádový parenchym obsahuje velké množství chloroplastu (Vassilev 2014)

### **2.1.2. Stonek**

Je větvený, obvykle 1m dlouhý, rostoucí radiálně. Stonek je pokrytý jednou vrstvou epitelu s malými buňkami, které zakrývá tlustá dřevitá kůra. Kůra má 6-9 vrstev parenchymu s většinou isodiametrickým tvarem a malým intracelulárním prostorem. Cévní svazek zahrnuje phloem, který má 7-9 vrstev a není dobře vyvinutý a xylem, který má 8-11 vrstev parenchymu a je vyvinutý velmi dobře. Struktura stonku je kompaktní, sklerifikovaná, s malým intercelulárním prostorem.

### **2.1.3. Kořen**

Kořen roste do hloubky s výrazným větvením, který je vždy vertikální s hojným zastoupením vláknitých kořínků (Pathak 1970). Kořen kryje tlustá vrstva peridermu, který tvoří 2-3 vrstvy rektangulárních buněk. Pod peridermem se nachází velké množství sklerenchymu a poměrně malé množství parenchymu. Parenchym je heterogenní cévní svazek, zahrnuje phloem, kambium a xylem. Sklerifikovaná struktura a velmi špatná aerace, kterou kořeny disponují, vysvětlují špatný růst rostliny ve vlhkých půdách a naopak jeho dobrý růst na půdách suchých (Pathak 1970).

Dobře vyvinutý kořenový systém a xeromorfní a sklerofylní charakteristika listu zajišťují mnohem menší nároky na vodu než mají jiné rostliny. Kotvičnick potřebuje k produkci 1kg sušiny 96litrů vody, což je 3x méně než potřebují rostliny rodu *Sorghum* (čirok), které jsou také C4 rostliny (Holm et al. 1991).

### **2.1.4. Morfologie**

Morfologie kotvičnicku je velmi variabilní. Rozdíly mezi populacemi se odvíjí od morfologie plodu a počtu chromozomů. Scott a Morrison v roce 1996 vytvořili 4 skupiny semen ze 30 Australských vzorků a 34 vzorků ze zemí Indie, Israel, USA, Irán a ze středomoří. Adaikan et al. (2001) studoval morfologii plodů získaných z Indie a zjistil rozdíl v morfologickém typu semen.

Přítomnost furostanolových a spirostanolových saponinů je pro kotvičnick charakteristická (Mahato et al. 1982). Existují různé variace diosgeninu, ruscogeninu, chlorgeninu a sasapogeninu.

### 2.1.5. Složení saponinů v rostlině z různých geografických regionů

Složení saponinů v kotvičniku z různých geografických oblastí se popisuje asi takto

1. Saponiny s cis A/B spojením (tabulka 15 a 16) se nachází pouze v Čínském kotvičniku.
2. Saponiny gitogenin/neogitogenin (tabulka 2 a 11) vůbec nejsou v Indickém a Bulharském kotvičniku.
3. Saponiny tigogenin, gitogenin a hecogenin (tabulka 1-3 a 10-12) jsou dominantně zastoupeny v Čínském kotvičniku.
4. Vysoké zastoupení furostanolových saponinů (tabulka 13) je charakteristické pro Bulharský kotvičnik.

#### Obrázek č. 3

*Spirostanol saponins*

*Derivatives of 25S-5β-spirostan-3β-ol (sarsasapogenin, 77)*

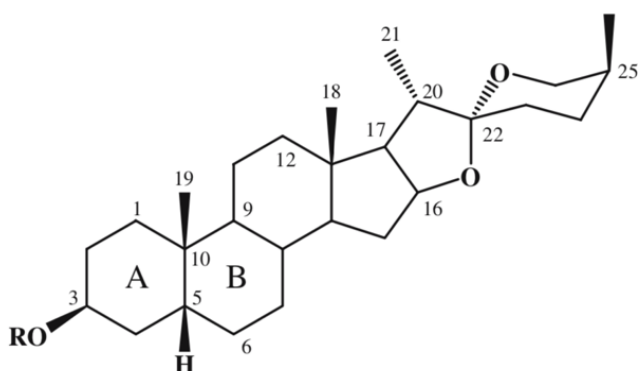


Table 15. Spiro saponins of sarsasapogenin type.

Compound	R	Origin
Sarsasapogenin (77)	H	
Isoterrestrosin B (78) <sup>a,b</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc   <sup>2</sup> α-L-Rha	Ch

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

## Obrázek č. 4

*Pseudofurostanol precursors of sarsasapogenin (77) spirosonins*

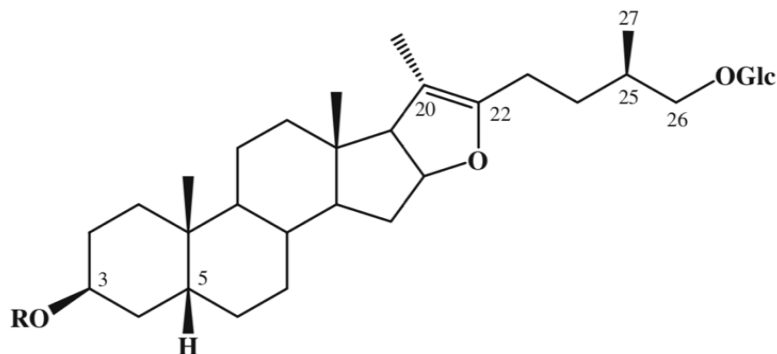


Table 16. Pseudofurostanol saponins of sarsasapogenin type.

Compound	R	Origin
Tribulosaponin A (79) <sup>a,b</sup>	-β-D-Glc <sup>4</sup> -α-L-Rha   2 α-L-Rha	Ch
Tribulosaponin B (80) <sup>a,b</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc   2 α-L-Rha	Ch

<sup>a</sup>Bedir et al. (2002), <sup>b</sup>Bedir and Khan (2000).

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

## Obrázek č. 5

*Derivatives of 25R-5α-spirostan-2α,3β-diol (gitogenin, 11) and 25S-5α-spirostan-2α,3β-diol (neogitogenin, 12)*

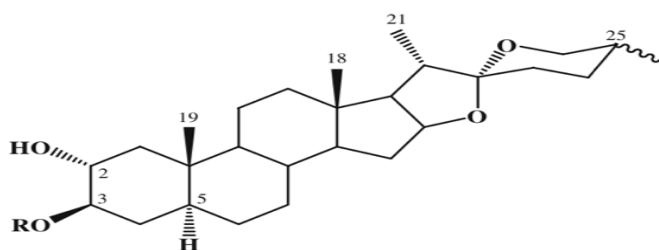


Table 2. Spirosaponins of gitogenin/neogitogenin type.

Compound	R	C-25	Origin
Gitogenin (11) <sup>a,b,c,d</sup>	H	R	Ch,SA,R,In
Neogitogenin (12) <sup>d</sup>	H	S	In
Gitogenin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-β-D-galactopyranoside (13) <sup>e</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc	R	Ch
25R,S-5α-spirostan-2α,3β-diol-3-O-β-glucopyranosyl-(1 → 4)-β-D-galactopyranoside (14) <sup>e</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc	R,S	Ch
Terrestrosin E (15) <sup>e,f</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc <sup>2</sup> -β-D-Gal	R,S	Ch
F-Gitonin (16) <sup>f</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc <sup>2</sup> -β-D-Glc   β-D-Xyl	R	Ch
Desglucolanatigonin (17) <sup>f</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc <sup>2</sup> -β-D-Gal   3 β-D-Xyl	R	Ch

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)



## Obrázek č. 6

Precursors of gitogenin (11) and neogitogenin (12) spirosaponins

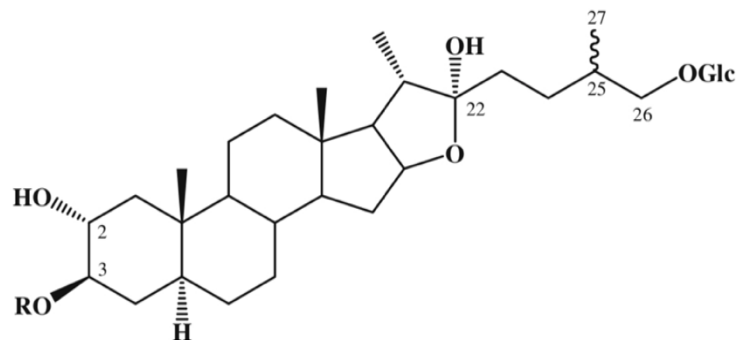


Table 11. Furostanol derivatives of gitogenin/neogitogenin type.

Compound	R	C-25	Origin
Terrestrosin F (57) <sup>a</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc	R	Ch
26-O-β-[D-glucopyranosyl- (25R,S)-5α-furostan-2α, 3β,22α,26-tetrol-3-O- β-D-glucopyranosyl- (1 → 4)-β-D-galactopy- ranoside (58) <sup>a</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc	R,S	Ch
Terrestrosin G (59) <sup>a</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc <sup>2</sup> -β-D-Gal	R,S	Ch

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

## Obrázek č. 7

### *Spirostanol saponins*

*Derivatives of 25R-5 $\alpha$ -spirostan-3 $\beta$ -ol (tigogenin, 1) and 25S-5 $\alpha$ -spirostan-3 $\beta$ -ol (neotigogenin, 2)*

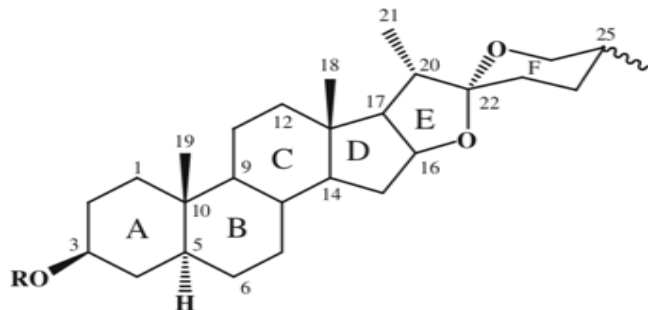


Table 1. Spirosaponins of tigogenin/neotigogenin type.

Compound	R	C-25	Origin
Tigogenin (1) <sup>a,b</sup>	H	R	Ch, Au
Neotigogenin (2) <sup>c,d</sup>	H	S	In
Tigogenin-3- <i>O</i> - $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -galactopyranoside (3) <sup>e</sup>	$-\beta$ -Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -Glc	R	Ch
Terrestrosid F (4) <sup>f</sup>	Glc:Rha/2:1	R	Bg
Terrestrosin A (5) <sup>g</sup>	$-\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -D-Gal	R,S	Ch
Terrestrosin B (6) <sup>g</sup>	$-\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc   <sup>2</sup> $\alpha$ -L-Rha	R,S	Ch
Desgalactotigogenin (7) <sup>g,c</sup>	$-\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -D-Glc   <sup>2</sup> $\beta$ -D-Xyl	R	Ch
Gitonin (8) <sup>g</sup>	$-\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -D-Gal   <sup>3</sup> $\beta$ -D-Xyl	R	Ch
Tigogenin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopyranoside (9) <sup>c,g,h</sup>	$-\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -D-Xyl   <sup>2</sup>   <sup>2</sup> $\alpha$ -L-Rha $\beta$ -D-Xyl	R	Ch
Tribulosin (10) <sup>c,i</sup>	$-\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -D-Xyl   <sup>2</sup>   <sup>2</sup> $\alpha$ -L-Rha $\beta$ -D-Xyl	S	In

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

## Obrázek č. 8

Derivatives of 25R-5 $\alpha$ -spirostan-3 $\beta$ -ol,12-one (hecogenin, **18**) and 25S-5 $\alpha$ -spirostan-3 $\beta$ -ol,12-one (neohecogenin, **19**)

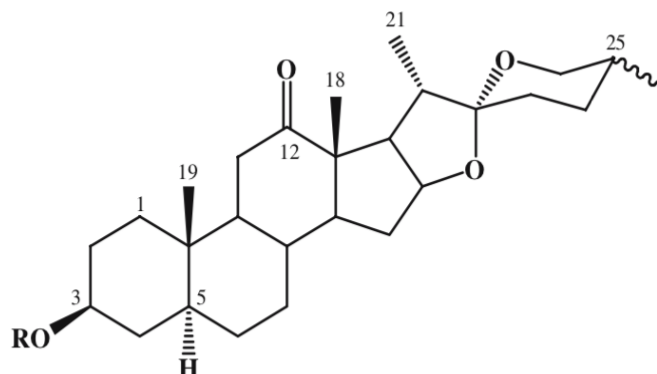


Table 3. Spirosaponins of hecogenin/neohecogenin type.

Compound	R	C-25	Origin
Hecogenin ( <b>18</b> ) <sup>a,b,c,d,e</sup>	H	R	Ch,In,Bg
Neohecogenin ( <b>19</b> )	H	S	
Agovoside A ( <b>20</b> ) <sup>f</sup>	- $\beta$ -Gal	R	Ch
Neohecogenin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside ( <b>21</b> ) <sup>g</sup>	- $\beta$ -D-Glc	S	In
Hecogenin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranoside ( <b>22</b> ) <sup>b, h,i</sup>	- $\beta$ -Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -Glc	R	Ch,In
Terreside B ( <b>23</b> ) <sup>j</sup>	- $\beta$ -Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -Glc	S	Ch
Hecogenin-3-O- $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -galactopyranoside ( <b>24</b> ) <sup>h</sup>	- $\beta$ -Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc	R	Ch
Terreside A ( <b>25</b> ) <sup>l</sup>	- $\beta$ -Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc	S	Ch
Hecogenin-3-O- $\beta$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -galactopyranoside ( <b>26</b> ) <sup>h</sup>	- $\beta$ -Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -Xyl	R	Ch
Terrestrosin C ( <b>27</b> ) <sup>k,l</sup>	- $\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -D-Gal - $\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -D-Xyl	R,S	Ch
Hecogenin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranoside ( <b>28</b> ) <sup>f,h,m,n</sup>	$\beta$ -D-Glc	R	Ch,In
Terrestrosin D ( <b>29</b> ) <sup>f,k</sup>	- $\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -D-Gal $\beta$ -D-Xyl	R	Ch
Hecogenin-3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopyranoside ( <b>30</b> ) <sup>f,m</sup>	- $\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -D-Xyl $\alpha$ -L-Rha $\beta$ -D-Xyl	R	Ch
25R, S-5 $\alpha$ -Spirostan-12-one-3-O- $\beta$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -galactopyranoside ( <b>31</b> ) <sup>o</sup>	- $\beta$ -Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -Xyl $\alpha$ -Rha $\beta$ -Xyl	R,S	Ch

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

Obrázek č. 9  
Furostanol saponins

Precursors of tigogenin (1) and neotigogenin (2) spirosaponins

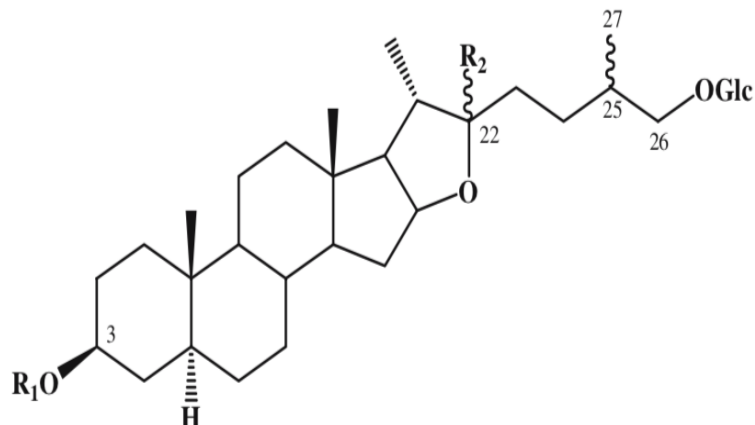


Table 10. Derivatives of tigogenin/neotigogenin type.

Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	C-25	Origin
25R-5 $\alpha$ -Furostan-22-methoxy-3 $\beta$ ,26-diol-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopyranoside (51) <sup>a,b,c</sup>	- $\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -D-Xyl   <sup>2</sup>   <sup>2</sup> $\alpha$ -L-Rha $\beta$ -D-Xyl	$\alpha$ OCH <sub>3</sub>	R	Ch,In
Terrestroside A (52) <sup>d</sup>	- $\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -D-Xyl   <sup>2</sup>   <sup>2</sup> $\alpha$ -L-Rha $\beta$ -D-Xyl	OCH <sub>3</sub>	N.D.	Ch
Terrestrosin H (53) <sup>e</sup>	- $\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -D-Gal	$\alpha$ OH	R,S	Ch
Neoprotodioscin (5,6-dihydroprotodioscin, 54) <sup>f</sup>	- $\beta$ -D-Glc <sup>4</sup> - $\alpha$ -L-Rha   <sup>2</sup> $\alpha$ -L-Rha	$\alpha$ OH	R	Bg
Neoprototribestin (5,6-dihydroprototribestin, 55) <sup>f</sup>	- $\beta$ -D-Glc <sup>2</sup> - $\alpha$ -L-Rha   <sup>4</sup> SO <sub>3</sub> Na	$\alpha$ OH	R	Bg
Terrestrinin B (56) <sup>b</sup>	- $\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -D-Xyl   <sup>2</sup>   <sup>2</sup> $\alpha$ -L-Rha $\beta$ -D-Xyl	$\alpha$ OH	S	Ch

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

Obrázek č. 10

Precursors of hecogenin (18) and neohecogenin (19) spirosaponins

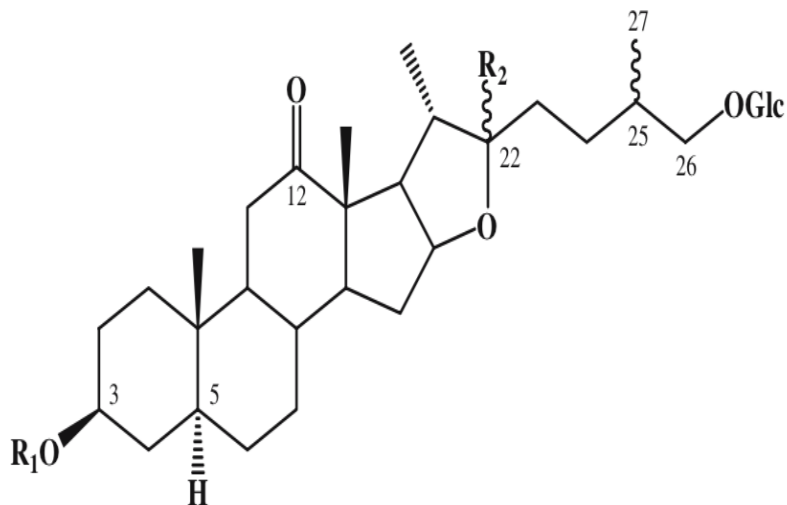


Table 12. Furostanol saponins of hecogenin/neohecogenin type.

Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	C-25	Origin
26- <i>O</i> -β-Glucopyranosyl-(25 <i>S</i> )-5α-furostan-12-one-3β,22α,26-triol-3- <i>O</i> -β-glucopyranosyl-(1 → 2)-β-galactopyranoside ( <b>60</b> ) <sup>a</sup>	-β-Gal <sup>2</sup> -β-Glc	αOH	S	Ch
26- <i>O</i> -β-Glucopyranosyl-(25 <i>R</i> )-5α-furostan-12-one-3β,22α,26-triol-3- <i>O</i> -β-glucopyranosyl-(1 → 2)-β-galactopyranoside ( <b>61</b> ) <sup>b</sup>	-β-D-Gal <sup>2</sup> -β-D-Glc	αOH	R	Ch
26- <i>O</i> -β-Glucopyranosyl-(25 <i>S</i> )-5α-furostan-12-one-3β,22α,26-triol-3- <i>O</i> -β-glucopyranosyl-(1 → 4)-[α-rhamnopyranosyl-(1 → 2)]-β-galactopyranoside ( <b>62</b> ) <sup>a</sup>	-β-Gal <sup>4</sup> -β-Glc   <sup>2</sup> α-Rha	αOH	S	Ch
26- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-5α-furostan-12-one-3β,22,26-triol-3- <i>O</i> -[β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)]-β-D-galactopyranosyl-(1 → 2)]-β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranoside ( <b>63</b> ) <sup>c</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc <sup>3</sup> -β-D-Xyl   <sup>2</sup> β-D-Gal	OH	N.D.	Ch
Terrestrosin I ( <b>64</b> ) <sup>d</sup>	-β-D-Gal <sup>4</sup> -β-D-Glc <sup>2</sup> -β-D-Gal	αOH	R,S	Ch

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

Obrázek č. 11

Precursors of diosgenin (32) and yamogenin (33) spirosaponins

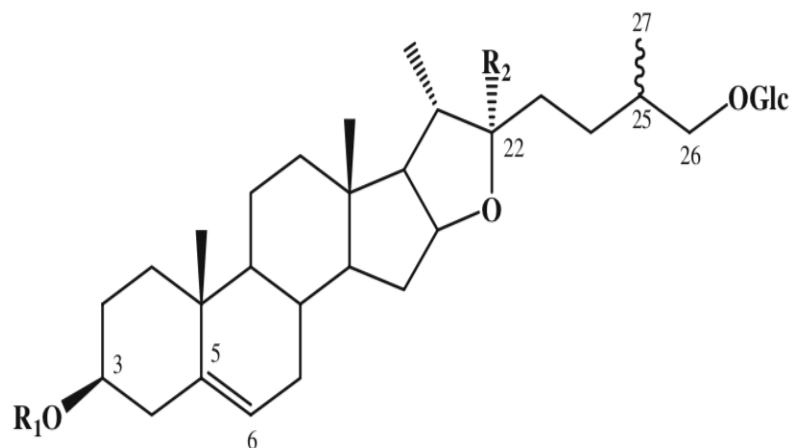


Table 13. Furostanol derivatives of diosgenin/yamogenin type.

Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	C-25	Origin
Protodioscin (65) <sup>a-i</sup>	$\beta$ -D-Glc <sup>4</sup> - $\alpha$ -L-Rha   2 $\alpha$ -L-Rha	OH	R	Bg,Ch,In,M
Methylprotodioscin (66) <sup>c</sup>	$\beta$ -D-Glc <sup>4</sup> - $\alpha$ -L-Rha   2 $\alpha$ -L-Rha	OCH <sub>3</sub>	R	Bg
Terrestrosin J (67) <sup>j</sup>	$\beta$ -D-Gal <sup>4</sup> - $\beta$ -D-Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -D-Gal	OH	R,S	Ch
Prototribestin (68) <sup>d,e</sup>	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\alpha$ -Rha   4 SO <sub>3</sub> Na	OH	R	Bg
Methylprototribestin (69) <sup>c</sup>	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\alpha$ -Rha   4 SO <sub>3</sub> Na	OCH <sub>3</sub>	R	Bg
Protogracillin (70) <sup>a,,c,g,i,k</sup>	$\beta$ -D-Glc <sup>3</sup> - $\beta$ -D-Glc   2 $\alpha$ -L-Rha	OH	R	Bg,M

Zdroj: Kostova a Dinchev (2005)

## **2.2. Agrotechnika**

Kultivace kotvičníku v našich podmínkách (České republiky) není nikterak složitá, je však poměrně pracná. Půdy na kterých by se kotvičník pěstovat neměl, jsou půdy těžké a vlhké. Jelikož jsou semena kotvičníku v souplodí, které se skládá z 5 plůdků, doporučuje se sázet po jednom anebo po dvou plůdkách. Tím se omezí šance, že vyklíčí více rostlin v jednom sadbovači či na poli. Klíčivost semen je relativně veliký problém, protože klíčí poměrně neochotně.

Doporučuje se rostliny předpěstovat ve skleníku nebo v pařeništi a poté je vysadit na pole. Semena je ideální vysévat od poloviny března do konce dubna (Hemzal 2014). Je možný i pozdní výsev, který je třeba uskutečnit do poloviny června.

### **2.2.1. Setí**

Nejčastější a nejefektivnější způsob pěstování je sázet plody ve skleníku do obyčejného zahradnického substrátu, do hloubky 0,5 cm. Při výsevu je dobré použít previkur proti plísním a po jeho postřiku plod zakrýt. Hemzal (2014) doporučuje substrát namíchat s pískem v poměru 1:3, to ale není nezbytné. Substrát není potřeba jakkoli přihnojovat jak před výsevem, tak i po výsevu.

### **2.2.2. Klíčení**

Nejproblematictější u kotvičníku je jeho klíčivost (Petkov 2011). Kotvičník je jednoletá rostlina, která se množí generativně - semeny. Semena jsou uložena v plodech, které jsou dřevnaté, velmi tvrdé a po obvodu ostnaté. Plod či souplodí se skládá z 5 plůdků, kde v každém plůdku je jedno semeno hnědé barvy, veliké asi 1 mm. Klíčí spíše neochotně a velmi nerovnoměrně. Ke zlepšení klíčivosti je ideální namočit plody do vody a nechat namočené několik hodin. Tím se docílí výrazného změkčení kůry plodu a následné lepší klíčivosti. Pokud je ve skleníku teplota nad 20 stupňů, rostliny by měly začít vzcházet po 10 dnech. První květy by se měly objevit do 4 týdnů, semena za další 2 týdny (Pacanoski et al. 2014).



### **2.2.3. Zalévání a první lístky**

K zalévání je vhodné použít kapkovou závlahu anebo vodní mlhu. Zalévání z konve není tak šetrné jako předchozí varianty a substrát bude víc mokrá než vlhký. Je třeba mít na paměti, že rostlina nepotřebuje tolik vody a má velmi sofistikované mechanismy, kterými s ní hospodáří. Platí, že méně vody je lepší. Kotvičnick rostle poměrně rychle a nejdříve do výšky. Až po několika týdnech začne poléhat.

### **2.2.4. Přesazování**

Přesadit rostliny je vhodné buď hned po vzejití anebo až po několika týdnech. Pokud se rostliny vysazovaly do prostornějších nádob, mohou v nich zůstat až do konce vegetace. Hemzal (2014) nezaznamenal žádný rozdíl u rostlin, které byly přesazeny jednou, víckrát nebo vůbec.

### **2.2.5. Předpěstování ve skleníku**

Pěstování ve skleníku se pěstitel nejspíš nevyhne, ať už chce pěstovat rostliny na poli nebo na zahrádce. Předpěstované rostliny ze skleníku se bez větších problémů uchytí v půdě a i klíčivost bude ve skleníku mnohem lepší než venku.

Plody kotvičnicku by se měly zasadit od druhé poloviny března do konce dubna. Substrát by se měl navlhčovat denně anebo podle potřeby. Lepší je, když je substrát vlhký, než aby byl po celou dobu mokrá. I malé rostliny potřebují spíše sucho než mokro. Dlouhodobě mokrá substrát může rostlinu poškodit.

Největší počet rostlin vyklíčí v prvním měsíci od výsevu, do té doby se nedoporučuje ve skleníku výrazně větrat. Vlhkost vzduchu by neměla dlouhodobě překročit 70 % kvůli vzniku plísní.

Jak je zmíněno výše, k zavlažování je lepší použít kapkovou závlahu anebo vodní mlhu. Oboje je velmi dobře použitelné. Kapková závlaha zajistí lepší zavlažení substrátu a je možné rostliny zavlažit i během dne, aniž se by popálily.

Vodní mlha substrát spíše navlhčí, ale i s vodní mlhou je možné zavlažit i během dne bez toho, aniž by se rostliny spálily a teplota ve skleníku se sníží až o 15 stupňů. Na druhou stranu, díky vodní mlze rostliny budou poléhat pod tíhou vody, která na ně dopadne a pokud bude závlaha probíhat příliš dlouho, substrát bude místy úplně promočený. Ovšem toto se výrazně odvíjí od typu skleníku a jeho možností jak a kam takový systém závlahy nainstalovat.

Po jednom měsíci, pokud to teploty v noci dovolí, se doporučuje skleník otevřít a zajistit proudění vzduchu. Rostliny jednak zesílí, budou méně náchylné k vnějším vlivům a odpočinou si.

#### **2.2.6. Venkovní pěstování, půda a její příprava**

Podle Hemzala (2014) se obsah účinných látek mění s místem, kde je kotvičník pěstovaný. Rystonová (2014) doporučuje kotvičník pěstovat výhradně venku k dosažení vyšší úrody a většího obsahu látek.

Ideální je provedení hluboké orby na podzim, aby půda přes zimu co nejvíce promrzla. Tím se zredukuje potenciale plevele a škůdci. Na jaře je ideální pole zorat znovu, podmínout, zvláčet a těsně před výsevem zvláčet ještě jednou. Použití pesticidních látek se nedoporučuje. Hnojiva jsou též nepotřebná jak při venkovním pěstování, tak i při pěstování ve skleníku.

Při přesazování rostlin ze skleníku na pole, by se měla použít černá tkanina po celé ploše na které se bude sázet a to proto, že konkurenční schopnost kotvičníku v ranných fázích růstu je poměrně malá. To je způsobeno tím, že rostliny které ze skleníku sázíme, mají velmi rozdílnou velikost a pár dní potrvá, než se rostlina uchytlí.

#### **2.2.7. Hnojení**

Kotvičník není potřeba hnojit. Je to rostlina nenáročná na živiny (Hemzal 2014).

#### **2.2.8. Ochrana před škůdci a proti chorobám**

Při pěstování kotvičníku na poli výskyt škůdců nebyl pozorován. Při pěstování na zahrádce jsou nejčastějšími škůdci slimáci. Při pěstování ve skleníku je největším problémem přesycení substrátu vodou, což rostliny nemají rády. Z toho pak vznikají plísňe, kterým je třeba předcházet, a pokud možno zamezit jejich výskytu. Pokud se ale i tak plíseň objeví, je třeba rostlinu či rostliny ihned vyřadit. Z takových rostlin se nesmí dělat droga (Hemzal 2014). Je možné použít ve skleníku biologické ochrany, ale ta je velmi drahá.

#### **2.2.9. Sklizeň**

Kotvičník je možné sklídit několikrát za vegetaci, to ale ovšem závisí na lokalitě, kde je pěstovaný. Obvykle první sklizeň probíhá na přelomu června a července a druhá v první

polovině či na konci srpna. Není to ovšem dogma, sklizeň se odvíjí od doby výsevu a od velikosti rostlin.

### 2.3. Chemické složení a účinné látky

Kotvičnick obsahuje furostanolové a spirostanolové saponiny (Yuan et al. 2008). Spirostanolové saponiny mají sacharid na C-3, kdežto furostanolové saponiny mají sacharid jak na C-3 tak ještě molekulu D-glukózy na C-26. Saponiny jsou zodpovědné za biologickou aktivitu extraktů kotvičnicku zemního. Plody obsahují pryskyřice, alkaloidy a oleje, kdy je nejvíce zastoupená kyselina linolová a linoleová. Nať a listy obsahují asi 12 % bílkovin, 2,5 % tuku, 40 % sacharidů, asi 28 % vlákniny a 16 % minerálních látek. V kořenu najdeme největší množství saponinu diosgeninu (Hemzal 2014).

Kotvičnick je velmi dlouho používán v Čínské tradiční a Indické medicíně (Kasote et al. 2017). Ve svém těle obsahuje kotvičnick spoustu aktivních látek, jako jsou saponiny, flavonoidy, alkaloidy, které jsou pro naše zdraví velmi prospěšné. Kotvičnick se používá buď ve formě usušené nati anebo jako hlavní složka pro výrobu řady léčiv a doplňků stravy (Jiang et al. 2016., Shao et al. 2007).

Plody jsou velmi ceněné v tradiční Čínské medicíně. V nejstarší lékařské knize v Číně, Shern-Nong Pharmacopoeia, je kotvičnicková droga velmi používaná k obnově jater, při mastitidě, proti bolestem hlavy, závratím a otokům (Yuan et al. 2008). Velmi populární je také v Indické Ayurvédě pro jeho schopnost pomáhat rozpouštět ledvinové kameny a pro afrodisiakální vlastnosti. Výrobky z kotvičnicku jsou nejčastěji používány ve sportu a při léčbě impotence. Saponiny, které rostlina obsahuje se používají v lécích k léčbě impotence jako je Tribestan (Bulharsko) a Libillov (USA) a v lécích k potlačení kardiovaskulárních onemocnění v Číně (lék Xin-naoshu-tong).

Nový lék Xinnao Shutong, který byl vyrobený ze saponinů kotvičnicku zemního se ukázal být efektivní v léčbě několika kardiovaskulárních onemocnění, včetně ischemické srdeční choroby, infarktu myokardu a cerebrální arterioskleróze (Ya Juan et al. 2010).

Zlepšení sexuálních funkcí bylo pozorováno u pacientů, kteří byli v rekonvalescenci po infarktu myokardu (Nikolaeva et al. 1986). Pacienti s oligospermii vykazovali také zlepšení (Nigam et al. 1984). Impotence a ztráta libida se zlepšila zejména u pacientů nemocných diabetem, ale také u impotentních, ale jinak zdravých

pacientů Misra et al. (1984). Počet spermií a jejich pohyblivost se zlepšila asi o 60-70 % u pacientů s oligospermii.

Extrakt z kotvičnicku, který obsahoval protodioscin se používá k léčbě kardiovaskulárních chorob a gastrointestiálních onemocnění. Podávání protodioscinu lidem i zvířatům jasně prokázalo zvýšení libida a spermatogeneze (Tomova et al. 1981). Protodioscin se ukazuje jako stimulant DHEA (Adimoelja 1997), dihydrotestosteronu a má proerektivní efekt (Adaikan et al. 2001)

### **2.3.1. Sacharidy**

Sacharidy (cukry) se nachází v celém těle rostliny. Jsou to zásobní látky a stavební prvky. V rostlině jsou především ve formě monosacharidů.

### **2.3.2. Alkaloidy**

Tyto látky najdeme v různých částech rostliny. Pomáhají rostlině chránit se před patogeny a stresovými faktory. Alkaloidy velmi často působí negativně na lidský organismus a to zejména jejich toxicitou. Rozdělujeme je do 3 základních skupin, pravé alkaloidy, pseudoalkaloidy a protoalkaloidy. Jedno z použití kotvičnicku je proti depresím a to proto, že obsahuje alkaloidy harman, harmalin a harmin.

### **2.3.3. Flavonoidy**

Flavonoidy jsou rostlinné pigmenty, které určují, jakou barvu bude mít plod. Flavonoidy se považují za antioxidanty. V kotvičnicku najdeme zejména kampherol, isorhamnetin a rutin (Hemzal 2014).

### **2.3.4. Saponiny**

Vyskytují se v rostlinách. Spojují je podobné vlastnosti jako jsou nahořklá chuť, reakce se žlučovými kyselinami a detergenční účinky. Se saponiny se můžeme setkat například v antioxidantních prostředcích a v poslední době při léčbě rakoviny. Obecně saponiny snižují cholesterol v krevní plazmě, mají vliv na lepší trávení bílkovin a zlepšují příjem minerálů a vitamínů (Neumann 2018). Saponiny ovšem nemají jen pozitivní účinky. Při požití enormních množství, které několikrát násobně převyšují doporučenou denní dávku, může nastat poškození jater, či selhání funkce plic a nakonec zástava dýchání. Konzumaci saponinů by se měly vyhýbat také těhotné ženy, a to kvůli riziku potratu (Hemzal 2014).

Saponiny se rozdělují na dva typy. Spirostanolové a furostanolové. Jedním z nejvýznamnějších spirostanolových saponinů je diosgenin, který najdeme v největším zastoupení v kořenech kotvičnicku, spolu s gitogeninem a neogitogeninem. Naopak furostanolový saponin protodioscin, který je považovaný za jeden z nejvýznamnějších saponinů, které se v kotvičnicku nachází, najdeme v nadzemních částech rostliny.

Další saponiny, které se v kotvičnicku nachází jsou: dioscin (pupen,nať), campesterin (pupen, nať), diosgenin (pupen, nať, kořen), furostenedion ( kořen, plod), gitogenin (květ), gitonin (nať), gracilin (nať), hacogenin (pupen, nať), chlorogenin (celá rostlina), neogitogenin (květ), neohecogenin (pupen, nať), neoprotodioscin (list, květ, nať), protodioscin (pupen, nať), protogracilin (nať), prototribestin (list, květ, nať), ruskogenin (celá rostlina) (Hemzal 2014).

## 2.4. Metody stanovení účinných látek (KŘÍŽEK, ŠÍMA 2015)

### 2.4.1. Chromatografie

Chromatografie patří mezi nejvýznamnější metody, které se používají k separaci, identifikaci a stanovení organických nebo anorganických sloučenin.

Jejím principem je rozdělení vzorku mezi mobilní (plyn nebo kapalina) a stacionární fázi (částice tuhé fáze v různých velikostech, kapalina nebo film kapaliny).

Přes sorbent (jakákoli forma stacionární fáze) prostupuje fáze mobilní. Když se stacionární fáze potká s mobilní fází v koloně, dojde ke vzájemné interakci, která rozhodne o následném dělení (separaci) produktu.

Interakce mohou být: adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná nebo gelová. Použitá metoda stanovení pro tuto práci byla HPLC, tedy kapalinová chromatografie. Pod HPLC spadají všechny chromatografické metody, ve kterých je mobilní fáze kapalná.

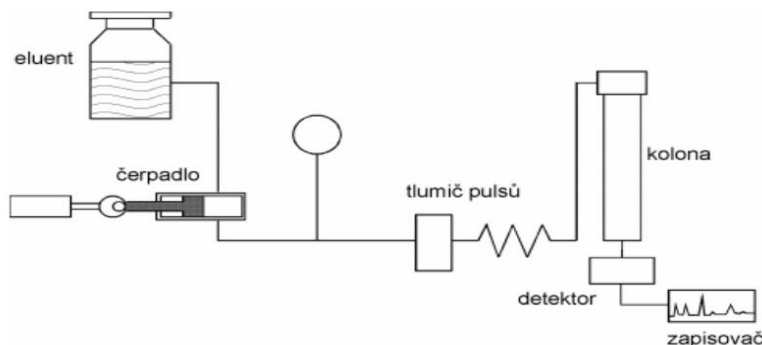
HPLC, oproti například plynové chromatografii, je rozdílná v tom, že mobilní fáze je minimálně kompresibilní a teplota má poměrně malý vliv na separaci látek.

Při isokratické eluci (= vyluhování/vymývání látek), kdy se složení mobilní fáze, konkrétně její eluční síla, během analýzy nemění, je mobilní fáze vedena do vysokotlakého čerpadla ze zásobníku přes odplyňovač.

Při gradientové eluci, kdy eluční síla vzrůstá během analýzy, se složky mobilní fáze ze zásobníku do směšovače převádějí. Poté se ve směšovači smíchají ve zvoleném poměru a až poté postoupí do čerpadla. Z něj mobilní fáze prostoupí do kolony, za kterou je připojen detektor, který je spojený se zařízením, jež monitoruje průběh analýzy.

Identifikace získaných dat se provádí porovnáním retenčního času neznámé látky a standardu, který byl separovaný za stejných podmínek.

Obrázek č. 12 schéma izokratické kapalinové chromatografie



Křížek, Šíma (2015)

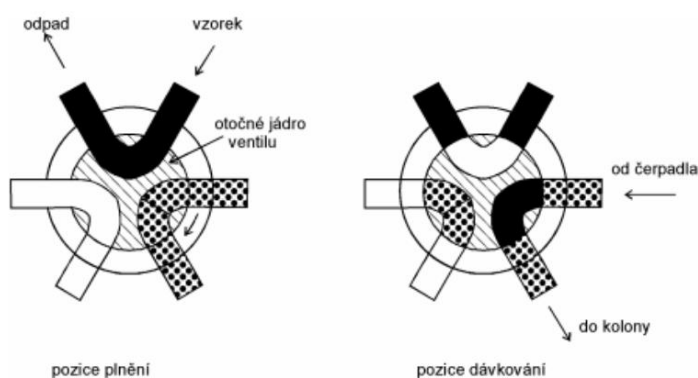
### 2.4.2. Čerpadla pro HPLC

V HPLC se pracuje s tlaky od 1 do 60 Mpa, kdy průtok mobilní fáze je 0,1 až 10 ml/min. Díky vysokému tlaku a malému průtoku se používají kontinuálně pracující čerpadla - pístové či membránové. Při každém pohybu pístu nebo membrány dojde k vytlačení malého objemu mobilní fáze do systému. Pulzace je tlumena přidáním dalšího čerpadla, které pracuje proti tomu prvnímu, tzv. systém "dual head pumps".

### 2.4.3. Dávkování vzorků

Nejčastěji používaný způsob nástřiku vzorku je použití tzv. šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Smyčka o známém konstantním objemu se nejprve naplní vzorkem a poté se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a vnese vzorek do kolony.

Obrázek č. 13 schéma dávkovacího ventilu



Křížek, Šíma (2015)

### 2.4.4. Kolony pro HPLC

Pro HPLC se používají kolony rovné, dlouhé asi 10 až 100 cm, nejčastěji 10 až 20 cm a s vnitřním průměrem 0,2 až 2 cm. V případě, že se dělí složitější směsi, se kolony řadí za sebe. Pokud se dělí složky, které obsahují velké množství balastních látek, které by mohly způsobit předčasné znehodnocení kolony, přidá se před kolonu ochranná předkolonka.



#### **2.4.5. Náplně pro eluenty – chromatografie na reverzní fázi**

Jako mobilní fáze se nejčastěji používají binární či ternární směsy vody, methanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu či dioxanu. Úpravou pH mobilní fáze se může výrazně měnit retenční parametr mnohých látek. Zvýšením pH se zvýší retenční časy bazických složek a sníží retenční časy složek kyselých. Opačného efektu se docílí snížením pH mobilní fáze. Dnes se tato metoda používá z 80 %.

#### **2.4.6. Detektory**

Velmi rozšířeným detektorem je fotometrický či fluorometrický detektor. Eluát protéká měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou (obvykle  $V=5-10 \mu\text{l}$ ,  $l=10 \text{ mm}$ ). Moderní přístroje jsou navíc vybaveny detektory s proměnlivou a programově měnitelnou vlnovou délkou – diode array detection, schopným změřit ve zvoleném okamžiku celé UV/VIS spektrum složky. Informace takto získaná je velmi důležitým kvalitativním údajem, který vypovídá o sledované složce.

## **2.5. UHPLC-MS/MS analýza steroidních saponinů (VŠCHT)**

Pro analýzu byla použita metodika vyvinutá v Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha.

### **2.5.1. Použité chemikálie**

Methanol (LC-MS grade), fluorid amonný, diosgenin a protodioscin byly od společnosti Sigmy-Aldrich (USA). Ethanol absolutní byl od firmy Merck (Německo).

### **2.5.2. Příprava vzorků**

Sušené vzorky byly rozemlety na jemno pomocí elektrického mlýnku (IKA A 11; IKA Werke GMBH&Co.KG, Německo). Jeden gram rostlinného materiálu se extrahoval 10 ml 70 % ethanolu, který obsahoval deuterovaný testosteron o koncentraci 1 µg/ml jako vnitřní standard. Vzorky se tři hodiny třepaly při laboratorní teplotě. Poté byly extrakty zcentrifugovány (10 min, 3000 rpm, Centrifuga Hettich Universal 320R, Hettich, Německo) a ředěny 10x a následně 300x 20 % methanolem a použity pro UHPLC-MS/MS analýzy. Vzorky byly připraveny ve třech opakováních.

### **2.5.3. UHPLC-MS/MS stanovení obsahu steroidních saponinů**

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

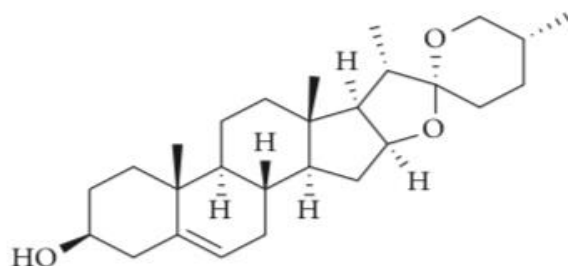
Pro hmotnostní detekci byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Parametry iontového zdroje byly následující: teplota sušícího plynu (dusík) – 130°C; průtok sušícího plynu – 13 l/min; teplota zmlžovacího plynu (dusík) – 350°C; průtok zmlžovacího plynu – 11 l/min; tlak v nebulizéru – 35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

Kalibrační křivky pro kvantitativní analýzu vybraných steroidních saponinů (dioscin, diosgenin, protodioscin, pseudoprotodioscin, ruscogenin a tribulosin) byly sestaveny z devíti bodů (koncentrace 200, 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05 ng/ml). Pro potlačení vlivů matrice během analýz byl pro kalibraci použit extrakt volně rostoucího konopí, který sledované saponiny neobsahuje. Extrakt byl připraven stejným způsobem jako extrakty vzorků kotvičníku.

## 2.6. Farmakologické účinky některých sledovaných látek

### 2.6.1. Diosgenin

Obrázek č. 14 chemická struktura diosgeninu



Diosgenin

Zdroj: Diosgenin: recent highlights on pharmacology and analytical method (Mafalda et al. 2016).

Běžně se tato látka extrahuje z hlíz různých druhů popínavých či jednoděložných rostlin. Některé druhy jedovatých popínavých rostlin obsahují až 13 % diosgeninu z celkového obsahu sapogeninů. Tyto rostliny používají zejména domorodci k výrobě jedů, které slouží k chytání ryb, i přes to, že diosgenin jako takový má chemickou strukturu podobnou steroidním hormonům.

Chemik jménem R. E. Marker kolem roku 1960 získal diosgenin fermentací s pomocí bakterií, které produkovaly enzymy, jež diosgenin dokázaly změnit na lidský steroidní hormon, jako jsou estrogen, testosteron a kortizon.

### 2.6.2. Diosgenin ve sportu

Diosgenin nebude v tomto odvětví fungovat minimálně ze dvou důvodů. Zaprvé, naše tělo neobsahuje nezbytné enzymy, které dokáží z diosgeninu vytvořit například testosteron. Zadruhé, naše tělo vytváří všechny steroidní hormony z cholesterolu pod velmi striktní kontrolou specifických hormonálních signálů z hypotalamu a hypofýzy. To, že diosgenin může mít anebo má nějaký vliv na zvířata, neznamená, že bude podobně fungovat i na lidi. Diosgenin ve sportu nemá žádné místo, co se nabírání svalové hmoty a zvyšování svalové síly týče. (Colgan 1992).

Většina produktů, které tvrdí, že mají anabolický či ergogenní účinek obsahují vedle rostlinných sterolů jako je beta-sitosterol, stigmasterol a campesterol také části rostlin (Colgan 1992), které poskytují další látky a mají v lidském těle zapříčinit syntézu steroidních hormonů našemu tělu vlastní.

Jednou takovou rostlinou, z které se vyrábí všemožné podpůrné tablety jsou rostliny z rodu *Smilax*. To, že zrovna tyto rostliny by mohly obsahovat látky, které budou mít anabolické účinky, vychází z jejich tradičního použití jako afrodiziaka. Je několik důkazů, že správně připravená tinktura může poskytnout slabý stimulační efekt genitálií (Morton 1981., Leung 1980).

Tvrdit, že rostliny mohou mít anabolické anebo ergogenické účinky na lidské tělo, je velice odvážné (Colgan 1992).

Ano, existují výjimky. Steroly a steroidy z rostlin či hmyzu, které mohou mít pozitivní účinky na sexuální aktivitu u savců. Několik estrogenů, které se nachází v mořských hvězdících anebo látka zvaná ekdysone, kterou najdeme především u hmyzu, mohou mít slabý účinek na steroidní receptory savců (Williams 1967). Přesto neexistuje důkaz, že by měly anabolické účinky.

Rostlinný sterol genistein z jedné rostliny původem z Austrálie, vyvolává u dobytka říjí. Podobný fytoestrogen equol, diadzen a coumesterol se nachází například v sojových bobech a způsobují sexuální disfunkce u ovcí (Shutt 1976).

Coumesterol působí nejsilněji, protože jeho chemická struktura je nejvíce podobná hormonu estradiolu. Coumesterol způsobuje růst dělohy u krys (Whitten 1992).

Jednou z velmi mála sloučenin u které byl prokázán velmi slabý anabolický účinek u zvířat, je ekdysteron extrahovaný z rostliny *Leuzea carthamoides* (Maralí kořen) (Chermnykh 1988).

### **2.6.3. Farmakologie**

Na druhou stranu, používání přírodních produktů, včetně saponinů se rozšiřuje nejen v terapeutickém odvětví, ale také v oblasti výzkumu (Jiang et al. 2016., Salvador et al. 2013). Několik let zpět byly objeveny steroidní saponiny a sapogeniny, které sdílí jejich potenciální protikarcinogenní účinky a relativně bezpečné spektrum používání (Tong et al. 2012., Chen et al. 2015). Mezi těmito sloučeninami je velmi významný steroidní saponin diosgenin, který je získáván hned z několika rostlin – *Dioscorea Trigonella*, *Costus* (Chen et al. 2015., Selim 2015., Raju 2009), ale také z rostliny *Tribulus Terrestris* či jiných jednoděložných rostlin (Shao et al. 2007).

Tyto zmíněné rostliny se používají v tradiční medicíně proti různým onemocněním. Diosgenin je dnes velmi významným saponinem, na který svoji pozornost zaměřuje stále více vědců. V podstatě většina terapeuticky použitelných a fungujících

sloučenin, včetně sexuálních hormonů a kortikosteroidů, je vyráběna polosynteticky z přírodních prekurzorů a převážně z diosgeninu (Dong et al. 2015., Al Jasem et al. 2014). Nicméně i přes velké množství synteticky vyrobených hormonů, diosgenin samotný má veliký význam ve farmacii, díky jeho biologické aktivitě (Chen et al. 2015., Raju 2009., Huang et al. 2012).

Diosgenin je v literatuře velmi často zmiňován pro své využití ve farmacii s velmi častými odkazy na tradiční medicínu. Mnoho studií v posledních 20 letech se zaměřovalo na důležitost a benefity diosgeninu proti nemocem jako je diabetes, obezita, dyslipidemie anebo hypercholesterolemie, dále také proti zánětlivým onemocněním či dokonce proti rakovině (Chen et al. 2015., Raju 2009., Raju, 2012).

Výsledky z těchto studií ukazují na potenciální využití diosgeninu jako látky, která dokáže léčit více různorodých onemocnění. Dalo by se říci, že diosgenin je jedním z nejvýznamnějších saponinů z celé rostliny kotvičníku.

Diosgenin je saponin známý díky své bioaktivitě a mnoho studií potvrzuje jeho teoretické využití v medicíně. Tento saponin má protizánětlivé a antioxidační vlastnosti (Manivannan et al. 2013) a může být užitečný při krevních či mozkových onemocněních, alergiích, diabetu a obezitě (Roghani-Dekhorti et al. 2015), menopauzálních symptomech anebo stárnutí kůže. Také má pravděpodobně obranné schopnosti proti kardiovaskulárním chorobám jako je trombóza a ateroskleróza (Choi et al. 2011., Esfandiarei et al. 2011., Liu et al. 2012., Yang et al. 2013., Kalailingam et al. 2014., Gong et al. 2011) a proti rakovině (Chen et al. 2015., Huang et al. 2012., Gong et al. 2011., Chen et al. 2011., Kim et al. 2012).

#### **2.6.4. Protirakovinné použití**

Vývoj léků proti rakovině z rostlinných sloučenin je velmi nadějný a v posledních letech víc a víc rozšířený mezi chemiky. Dnes už je mnoho aktivních molekul, které byly v posledních letech objeveny (Salvador et al. 2013., Hamid et al. 2014). Několik preklinických studií se zaměřovalo na použití diosgeninu jako chemopreventivní terapeutické agens proti různým druhům rakoviny (Chen et al. 2015., Raju 2009). Zjistilo se, že protirakovinný účinek diosgeninu velmi závisí na typu rakoviny. Například naprosto průkazné pozitivní účinky diosgeninu byly pozorovány u rakoviny prostaty (PC-3 a DU-145 buňky) (Chen et al. 2011), u karcinomu tlustého střeva (HCT-116 a HT-29 buňky) (Lepage et al. 2011), erytroleukemie (HEL buňky), rakoviny kůže (A431, Hep2 a

RPMI 2650 buňky) (Das et al. 2012), hepatocelulárního karcinomu (HepG2 a HCC buňky) (Selim 2015., Kim et al. 2012), rakoviny žaludku (BGC-823 buňky) (Mao et al. 2012), rakoviny plic (A549 buňky) (Mohammed et al. 2013), rakoviny prsu (MCF-7 buňky) (Selim 2015., Patel et al. 2012., Ghosh et al. 2015) a myeloidní leukemia (CML) (K562 buňky) (Jiang 2016). Diosgenin se zdá být klíčovým v různých fázích vytváření nádorů, kdy způsobuje apoptózu a zabraňuje maligním transformacím (Tong et al. 2012., Chen et al. 2015., Raju 2012). Přesněji, protirakovinné účinky diosgeninu se zprostředkovávají přes aktivaci p53 (tumor supresorový gen), zastavením buněčného cyklu a ještě dalšími mechanismy, které vysoce přesahují rámec, odbornost a zaměření této práce.

#### **2.6.5. Protiinfekční účinky**

Při použití proti lidským kvasinkám (*Candida albicans*) byl pozorovaný slabý protiinfekční účinek (Satour et al. 2004., Yang et al. 2006). Dále diosgenin vykazuje slabý účinek proti houbám *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*.

Na druhou stranu, tento saponin vykazuje vysokou citlivost k několika druhům gram-pozitivních (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*) bakterií (Khan et al. 2015).

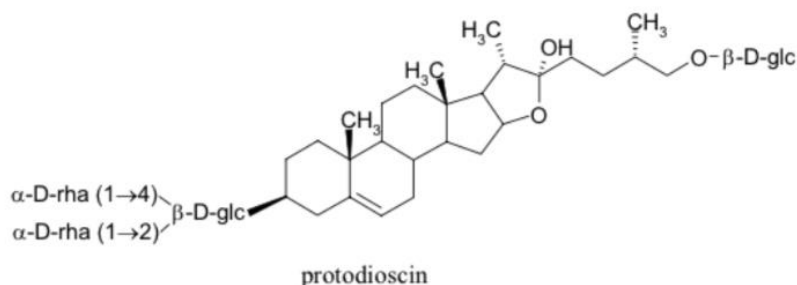
Díky své antioxidační aktivitě je diosgenin teoreticky možné využít při léčbě HIV pacientů s demencí (Turchan et al. 2003). Nakonec, ve studiích provedených *in vitro*, diosgenin vykázal účinky proti hepatitidě C díky snižování hladiny cholesterolu v krevní plasmě, který hepatitida C potřebuje k dalšímu rozšiřování (Wang et al. 2011).

#### **2.6.6. Účinky protidiabetické, dyslipidemické a účinky proti obezitě**

Ze studií provedených *in vitro* a *in vivo* plyne, že tento rostlinný saponin s sebou nese několik výhod proti metabolickým poruchám jako je diabetes, obezita (Roghani-Dehkordi et al. 2015., Liu et al. 2012., Sangeetha et al. 2013) a dyslipidemie, zahrnující hypercholesterolemii (Raju 2009., Kalailingam et al. 2014., Son et al. 2007). Působení diosgeninu proti diabetu funguje tak, že diosgenin podporuje diferenciaci adipocytů spolu s dalšími ději, které probíhají v adipózních tkáních. Proto může být diosgenin užitečný i při léčení obezity tím, že ovlivní metabolismus cukrů tak, že sníží hladinu glukózy v krvi u pacientů s metabolickým onemocněním (Uemura et al. 2010). Toto zatím bylo pozorováno jen na myších (Uemura et al. 2011).

## 2.7. Protodioscin

Obrázek č. 15 chemická struktura protodioscinu



Zdroj: Valentová et al. (2004)

Protodioscin je fytochemikálie získaná z rostliny kotvičnicku, u které byl v klinických studiích testován a následně prokázán vliv na zvýšení libida a zlepšení erekce tím, že se protodioscin změní v těle na DHEA (De-Hydro-Epi-Androsterone). Protodioscin se na DHEA mění pouze za specifických podmínek. DHEA může například posilovat imunitu (Adimoelja 1997). DHEA je nejspíš potřebný k udržování integrity buněčných membrán a tím zajišťuje jejich správnou funkci.

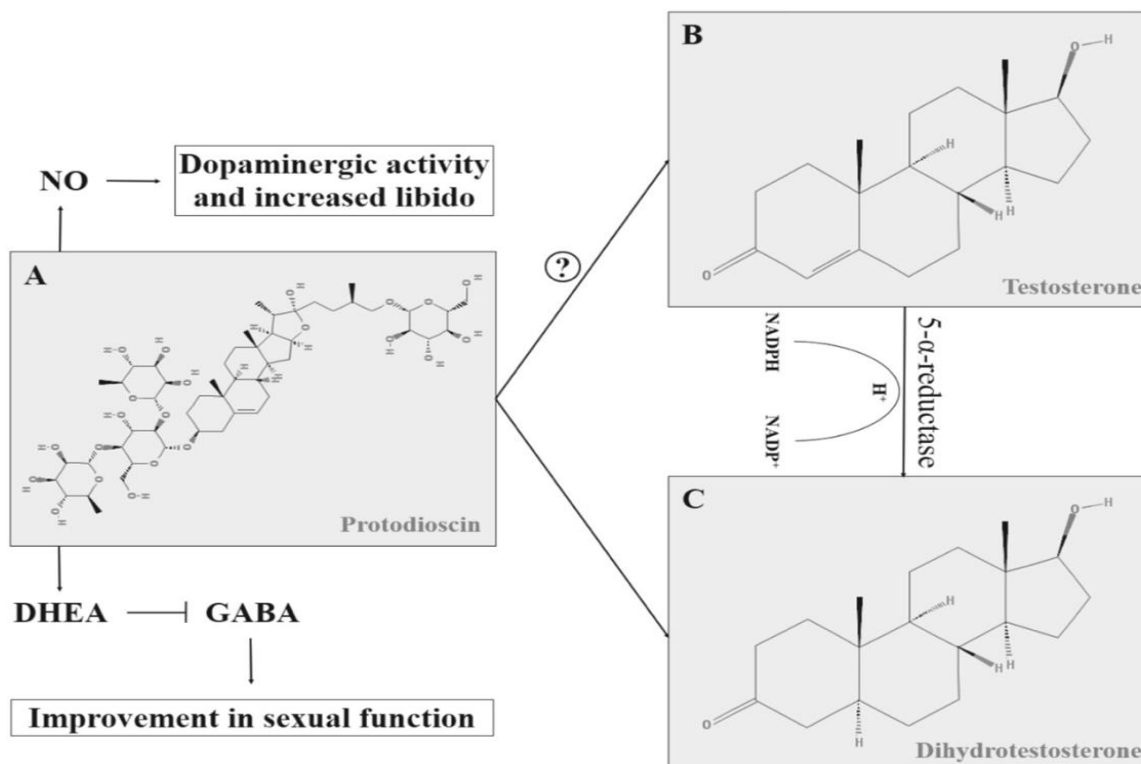
Protodioscin byl zatím zjištěn jen v Bulharském a Moldavském kotvičnicku. Různé druhy extraktů kotvičnicku z Bulharska, Indie a Číny byly podrobené rozborům HPLC-ELSD. Výsledky ukázaly vysokou rozdílnost jak obsahu saponinů, tak i jejich stavby, která byla vždy rozdílná region od regionu. Bulharský kotvičník obsahoval od 0,245-1,337 % protodioscinu, kdežto Čínský kotvičník buď neobsahoval žádný protodioscin a nebo nižší množství od 0,063-0,089 %.

Také v Indii je protodioscin v minoritním zastoupení (0,024 %). Chemické analýzy výrobků z kotvičnicku vykazovaly také vysoké rozdíly. Bulharský kotvičník obsahoval 6,49 % protodioscinu, kdežto další dva vzorky nespécifikovaného původu obsahovaly 0,85 a 0,17 % protodioscinu.

Valentová et al. (2004) píše, že protodioscin může tvořit asi 50 % všech účinných látek. Protodioscin je saponin furostanolového typu. Mluví se o něm jako o přírodním, rostlinném steroidu, který má způsobovat v lidském těle zvýšení hladiny testosteronu a nárůstu svalové hmoty. Ovšem výsledky několika studií, které se tuto teorii snažily prokázat, buď na lidech anebo na zvířatech, toto nepotvrdily. Naopak u starších mužů byl pozorován nejen pozitivní vliv na spermatogenezi, potenci a libido, ale dokonce i zlepšení svalové regenerace a posílení imunity (Neumann 2018).



Obrázek č. 16 možné působení protodioscinu v těle



Zdroj: Gauthaman (2003)

A) Protodioscin, saponin z rostliny kotvičník zemní (*Tribulus terrestris*) může stimulovat oxid dusnatý (NO). Protodioscin může také být konvertovaný na DHEA, který dokáže promotovat zlepšení sexuálních funkcí. B) Vztah mezi protodioscinem a testosteronem, stimulace a přímá konverze je stále nepopsaná, ale v *in vivo* pokusech se ukazuje, že protodioscin může ovlivňovat testosteron a C) dihydrotestosteron (Gauthaman 2003).

### 2.7.1. Protodioscin ve sportu

Milasius et al. (2009) zkoumal účinnost komerčních dietních doplňků výživy, které obsahovaly kotvičník zemní, na trénovaných sportovcích. Dvacet dní sportovci užívali extrakt z kotvičníku zemního. Extrakt neukázal žádný efekt na erytrocyty, hemoglobin a trombocyty. Během výzkumu, se u atletů snížily granulocyty a leukocyty se zvýšily, což poukazovalo na ne příliš pozitivní změny v krvi sportovců. Koncentrace kreatin kinázy v krvi se zvýšila a kreatinin měl tendence klesat po celou dobu, kdy sportovci extrakt užívali. Koncentrace cholesterolu a bilirubínu v krvi se lehce snížily.

Většina provedených studií nepodpořila tvrzení, že kotvičník má nějaké ergogenní účinky. Zkoumaly se účinky 3,21 mg/kg váhy při denním podávání u

trénovaných sportovců a byly porovnávány s druhou skupinou, která brala placebo. Tělesná hmotnost, složení těla, maximální síla a nálada se zhodnotily před a po studii, která trvala 8 týdnů. Nebyla zjištěna žádná změna ve složení těla, procentu tuku, v množství vody ani ve změně nálad. Toto vše se potvrdilo výzkumem Rogersona et al. (2007), který také nepřišel na žádné účinky na testosteron/epitestosteron. Navíc skupina, která užívala extrakt kotvičníku, nevykázala žádné změny v množství svalové hmoty či síly oproti kontrolní skupině (Rogerson et al. 2007).

### **2.7.2. Farmakologie**

Protodioscin může zvýšit množství dehydroepiandrosteronu (DHEA) v krvi. DHEA je hormon, který ovlivňuje imunitní systém a obecně se o něm mluví jako o hormonu, který ovlivňuje celkově dobré bytí. Od roku 1993 se má za to, že DHEA zlepšuje integritu a funkci buněk (Gaby 1993). Užívání extraktu z kotvičníku (Libilov<sup>TM</sup>) při jedné tabletě 3x denně po dobu 10 dní prokazatelně zvýšilo množství DHEA jak u pacientů s diabetem i bez něj, ale s diagnostikovanou poruchou erekce (Adimoelja 1997).

Protodioscin zvyšuje sekreci luteinizačního hormonu (LH). Ukázalo se, že protodioscin zvyšuje počet Sertolého buněk beze změny v počtu Leydigových buněk a zvyšuje počet spermatocytů.

Klinické studie prokázaly, že protodioscin zvyšuje hladinu DHEA u plodných mužů. Uvažuje se o tom, že protodioscin by mohl být prekurzorem DHEA u pacientů s nízkými hodnotami DHEA v séru. DHEA hraje roli ve zlepšení integrity buněk a jejich funkci.

Protodioscin nejspíš funguje v těle tak, že zvýší konverzi testosteronu na DHEA, který nejen že zvyšuje sexuální touhy, ale také má pozitivní vliv na tvorbu červených krvinek. Proerektivní účinky protodioscinu popsal Adaikan et al. (2001).

### 2.7.3. Sexuální poruchy

Neplodnost se definuje jako neschopnost počít dítě po době delší než 12 měsíců (Arsyad 1996., Poppe et al. 2007). Tento problém postihuje asi 15 % párů, které se snaží poprvé o dítě a v téměř 50 % případech je neplodný muž (Nishimune et al. 2006). I přes to, že v léčbě neplodnosti u žen dnešní medicína velmi pokročila, v případě mužů je tomu naopak a stále se přesně neví, co neplodnost způsobuje a jak ji efektivně léčit (Jarow et al. 2005).

Používání rostlin, které se používají v Tradiční Čínské Medicíně anebo Ayurvédě, se v posledních letech velmi rozšířilo mezi lidmi jako okamžitá léčba poruchy erekce či neplodnosti (Adimoelja 2000). Kotvičnick zemi, by měl být efektivní při léčbě těchto dvou nemocí zvýšením LH (Arsyad 1996) tím, že protodioscin se v těle přemění na dehydroepiandrosteron (DHEA) (Adimoelja 2000). Zatím ještě nebyl popsán přesný mechanismus působení protodioscinu. Viktorov et al. (1994) zjistil, že podávání kotvičnicku znatelně zvýšilo počet spermatocytů u dospělých krys. Protodioscin nejspíš ovlivňuje intenzitu DNA syntézy (Viktorov et al. 1994).

Studie na krysách, králících a primátech přinesly zajímavé výsledky. Jedna studie ukázala, že podávání extraktu z kotvičnicku má značný vliv na zvýšení dihydrotestosteronu a dehydroepiandrosteronu (Gauthaman et al. 2008) a má také afrodisiakální účinky (Gauthaman et al. 2002). Další studie porovnávala dobrovolníky v letech mezi 21-50, kteří trpěli oligozoospermií. Kapsle s kotvičnickem byly podávány 60 dní, kdy kontrolní skupina užívala placebo. Výsledky ukázaly jednoznačné zlepšení stavu dobrovolníků trpících oligozoospermií.

Ženy se užívání kotvičnicku bát nemusí, je poměrně účinný při nepravidelných menstruačních cyklech. Celkem 24 z 36 žen se obnovil pravidelný menstruační cyklus. Ženy, které užívaly kotvičnick, neměly žádné vedlejší účinky, oproti 38 % žen, které braly klasické léky.

Také se ukázalo, že kotvičnick zmírňuje menopausální symptomy (pocení, deprese, nespavost a úzkost) v 98 % případů. Nejdůležitějším poznatkem z léčby kotvičnickem je to, že nebyly zjištěny žádné změny v koncentraci hormonů jako prolaktin, estradiol nebo progesteron (Zarkova 1983).

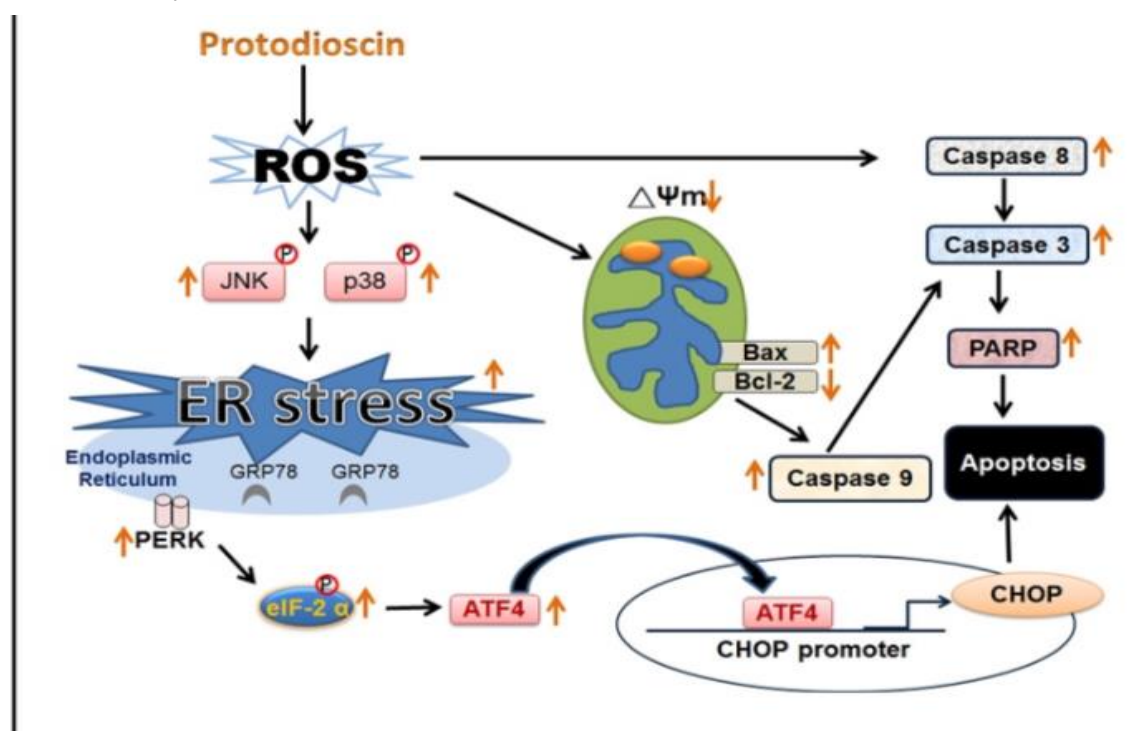
#### 2.7.4. Protirakovinné využití

Mezi různými saponiny analyzovanými z rozličných částí kotvičnicku získaných z rozdílných regionů (Bulharsko, Čína a Indie), jen některé vykazují vysokou účinnost (Kostova a Dinchev 2005). Mezi spirostanolovými saponiny je nejúčinnější hecogenin, který je účinný proti SKMEL, KB, BT 549 a SKOV-3 buňkám (Bedir et al. 2002., Bedir et al. 2000). Dioscin a prosapogenin A ukazují protirakovinné účinky v buňkách K562 (Hu et al. 1996), pouze in vitro. Protodioscin se ukazuje být cytotoxický proti buňkám leukemie a tumorům, zejména proti jedné linii leukémie a to sice MOLT-4, NSCLC (A549/ATCC), dvěma liniím rakoviny tlustého střeva (HCT-116 a SW-620) a jedné linii melanomu (LOX IMVI).

Navíc se zjistilo, že extrakt z rostliny *Tribulus macropterus*, který pochází ze stejného rodu jako kotvičnick zemní, je cytotoxický proti rakovině jater.

Velmi dlouho se používá extrakt z kotvičnicku k léčbě rakoviny, zejména v orientálních medicínách, nicméně mechanismy působení nejsou zcela známy.

Obrázek č. 17



**Fig. 9.** A schematic representation showing PD induced the ROS-mediated endoplasmic reticulum dependent on apoptosis of human cervical cells via activation of the JNK/p38 activation pathways.

Zdroj: Chen et al. (2018)

### **2.7.5. Srdeční onemocnění**

Kardiovaskulární choroby jsou jednou z nejčastějších (20 %) příčin úmrtí jak ve vyspělých zemích, tak i v rozvojových.

Mezi různými druhy těchto onemocnění je nejčastější infarkt myokardu. Ten vzniká tím, že krev se nedostane do části srdce a tím vznikne nekróza srdeční tkáně (Upananlawar et al. 2011).

Infarkt myokardu, nejspíš vyvolává metabolismus catecholaminu v určitých redoxních reakcích (Dhalla et al. 2000). Tyto reakce produkují volné radikály (Rupp et al. 1994).

Lidé začali užívat Tribulusin s tím, že chtějí zlepšit sportovní výkonnost a jako prevenci proti zmíněným srdečním onemocněním. Některé studie ukazují na to, že kotvičnick potlačuje příznaky angíny. Nejdůležitějším obranným či preventivním účinkem extraktu z kotvičnicku je jeho schopnost snižovat množství tuku, peroxidaci tuku a zvýšení antioxidantních enzymů (Sailaja et al. 2013).

### **2.7.6. Nervový systém**

Extrakt kotvičnicku zvyšuje stimulační aktivitu centrálního nervového systému (CNS). Extrakt v chloroformu s usušenou celou rostlinou, podávaný intraperitoneálně (injekčně do břicha) myším má analgetický účinek. Ukázalo se, že extrakt kotvičnicku má antihypersenzitivní účinky (Yang et al. 1991., Chui et al. 1992).

Antihypersenzitivní mechanismy kotvičnicku se studovaly na 2K1C hypersenzitivních krysách měřením cirkulace ACE aktivity v aortě, srdci, ledvinách a plicích. Systolický krevní tlak a ACE se výrazně snížil při podání extraktu kotvičnicku.

### **2.7.7. Fyzická síla a vytrvalost**

Tonikum je tradičně přípravek, který podporuje fyzickou, mentální a emocionální vitalitu. Reputace kotvičnicku byla potvrzena v laboratořích, při testech na krysách (Taskov 1988). V lidském těle se kotvičnick zdá být stimulatorem. Také podporuje proteinovou syntézu, hlavně v játrech, ledvinách a srdečních tkáních u zvířat (Sheitanov et al. 1988), přičemž podporuje metabolismus (Toshkov et al. 1985). Jedno z nejspokojivějších vysvětlení je to, že kotvičnick reguluje sekreci katabolických hormonů jako je například kortisol (Tomova et al. 1978).

### **2.7.8. Antioxidační účinky**

Velké množství rostlin je používáno k léčbě metabolických onemocnění jako je diabetes, obezita či rakovina. Spekuluje se, že vytváření volných radikálů v těle je výsledkem v buněčných změnách a vzniku rakoviny a jiných nemocí. To by mohlo být neutralizováno antioxidanty z různých léčivých rostlin. Ukázalo se, že získané antioxidanty z rostlin mohou neutralizovat volné radikály a modulovat oxidativní stres (Joseph et al. 1999). Volné radikály jsou jednou z příčin vzniku rakoviny, aterosklerózy, diabetu a stárnutí (Halliwell et al. 1999). Kotvičnick má antioxidační účinky a jeho extrakt redukuje vznik hydroxyperoxidu (Bhattacharjee 2004).

### **2.7.9. Dermatologie**

Z kotvičnicku se dokonce vyrábí krémy, které mají antibakteriální a protizánětlivé účinky. Dokonce se doporučuje používat kotvičnick s kovy (Alexis 2001., Alexis 2005). Mezi Asijskými patenty je možné najít několik přípravků a krémů z kotvičnicku.

### **2.7.10. Insekticidní účinky**

Extrakty z kotvičnicku dokáží kontrolovat či potlačit růst *Spodopteralitura* (Al-Bayati et al. 2008), *Meloidogyne incognita* (Khurma et al. 1997), *Bulinustruncates* (Singh et al. 1991) nebo *Macrophominaphaseolina* (Jit et al. 1986).

### **2.7.11. Toxikologie a vedlejší účinky**

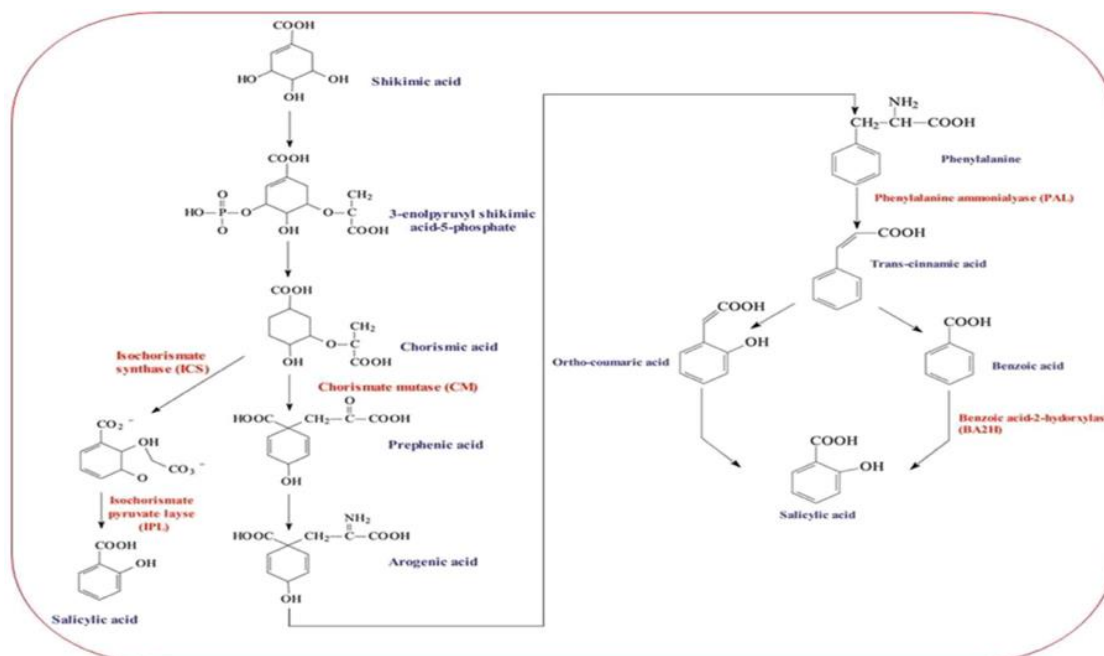
V případě lidí je užívání kotvičnicku většinou bezpečné, vzhledem ke krátké době užívání a za předpokladu, že dotyčný je zdravý, není v jiném stavu a nekojí (Hemzal 2014).

Kotvičnick by neměl užívat nikdo, kdo užívá léky na srdce nebo na vysoký krevní tlak, protože kotvičnick přímo reaguje s léky jako jsou beta blokátory (Hemzal 2014).

## 2.8. Vliv technologie pěstování na obsah vybraných účinných látek v kotvičniku zemním

### 2.7.1. Abiotický stres a kyselina acetylsalicylová (ASA)

Obrázek č. 18



A model of salicylic acid (SA) biosynthesis pathway starting from Shikimic acid and accomplished by three different pathways.

Zdroj: Khan et al. (2015)

Abiotický stres rostlin je v poslední době bráný jako velká hrozba pro zemědělskou produkci po celém světě, který samotný člověk - byť nevědomky - podporuje. Například průmysl má poměrně velký vliv na degradaci zemědělských systémů a jejich produktivitu tím, že vytvářejí stresové podmínky ukládáním kovů do půdy, zvyšující se salinitou půd, UV-B radiací, extrémními teplotami, vyčerpáním živin z půdy a vysokým suchem (Khan and Khan 2013).

Takový typ stresu dokáže ovlivnit skoro všechny fyziologické, biochemické a molekulární procesy v rostlině od počátku jejího růstu, tedy klíčení až po konec její vegetace. Takové stresové podmínky mohou způsobit zemědělci ztráty až 70 % (Kaur et al. 2008., Mantri et al. 2012).

Rostlinné regulátory růstu hrají velice důležitou roli ve vývoji rostliny (Khan et al. 2012a, b, c., Asgher et al. 2015). Kyselina acetylsalicylová (ASA) je sloučenina, která ovlivňuje růst a vývoj rostlin a jejich chování vůči biotickým a abiotickým vlivům (Raskin 1992.,

Khan et al. 2012a, b, c, 2013b., Miura and Tada 2014., Kužel S., Cígler P., Hrubý M. (2006, 2015).

Kyselina acetylsalicylová (ASA) ovlivňuje fyziologické procesy jako je fotosyntéza, metabolismus dusíku, produkci glycinebetainu, antioxidace a hospodaření s vodou, tudíž poskytuje jakousi ochranu rostlině proti biotickým stresovým faktorům (Khan et al. 2010., 2012a, b, c, 2013b, 2014., Nazar et al. 2011., Miura and Tada 2014., Hrubý M. et al. 2002, Kužel, S. et al. 2003, 2007, 2008, 2009., Tlustoš et al. 2005., Cígler P. et al. 2010).

Kromě toho, kyselina acetylsalicylová (ASA) dokáže zvýšit toleranci proti hlavním abiotickým stresovým faktorům jako je kov (Zhang et al. 2015), salinita (Khan et al. 2014., Nazar et al. 2015), sucho a vysoké teploty (Khan et al. 2013b).

Kyselina acetylsalicylová (ASA) z exogenních zdrojů se používá buď při moření osiva anebo ve formě postřiku ke zvýšení tolerance k hlavním stresující faktorům (Horváth et al. 2007., Khan et al. 2012a, b, c, 2013b, 2014., Palma et al. 2013).

ASA ovlivňuje rostlinné funkce ve specifických dávkách, kdy se indukují anebo inhibují rostlinné mechanismy. Toho se dosáhne buď nízkými či vysokými dávkami. Například v rostlině *Matricaria chamomilla*, 50 a 250  $\mu\text{M}$  ASA inhibuje růst (Kováčik et al. 2009). Samozřejmě je důležité zohlednit délku postřiku, druh rostliny, její věk a orgány, na které se ASA aplikuje, protože to vše může ovlivnit působení ASA (Shi et al. 2009., Miura and Tada 2014).

Z dlouholetého výzkumu Kužela et al. (2003, 2006, 2007, 2009, 2015, a prací Hrubého et al. (2002), Tlustoše et al. (2005) a Cíglera et al. (2010) vyplývá, že není jednoduché užití stresorů (elicitorů) v případě, pokud je záměrem vyvolat v rostlinách příslušnou pozitivní odezvu na směr k rostlině vyvolaný optimální stres. Je důležité zohlednit látku, její koncentraci, dobu postřiku, násobnost postřiku, druh rostliny, její věk a orgány, na které se elicitor aplikuje, včetně způsobu aplikace, protože to vše může ovlivnit působení elicitoru a konečný výsledek, který se projeví zvýšeným výnosem a jeho vyšší kvalitou.

U léčivých rostlin je to zvýšený obsah sekundárních metabolitů, kterými se rostlina brání proti přicházejícímu skutečnému nebo pouze uměle vyvolanému stresu, kdy rostlina dostane pouze informaci o tom, že přichází stres, který u ní vyvolá obrannou reakci a ve skutečnosti stres vůbec nepříjde. Tyto sekundární metabolity jsou současně biologicky účinnými látkami s léčivými účinky.



Autoři v rámci výzkumu použili řadu elicitorů jako jsou kyseliny acetylsalicylová, kyselina salicylová, metylsalicylát, askorbát titanu a další. Výsledky výzkumu ochránily v rámci patentové ochrany formou českého patentu, z roku 2006, CZ -296300, (Kužel S., Cígler P., Hrubý M.). Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin. 2006. Český patent CZ-296300, ÚPV Praha), a evropského patentu, z roku 2015, EP 1750507, (Kužel S., Cígler P., Hrubý M.), *The preparation for the induction of increased formation of bioactive compounds in plants and its use*. Evropský patentový úřad 2015. EP 1750507, kde je patentově kryto použití více než 1500 různých elicitorů. Kolektiv autorů prodal licenci patentů firmě AGRA GROUP a.s., která ji ve svém produktovém portfoliu u řady produktů využívá. Jedním z produktů je i v práci použitý NanoFyt Si®.

V poslední době se ukazuje, že ASA může regulovat mnoho rostlinných mechanismů na genové úrovni a tím zlepšit jejich toleranci k abiotickým stresovým faktorům. O ASA se ví, že dokáže ovlivňovat HSPs = heat shock proteins, antioxidanty a sekundární metabolity (sinapyl alkohol dehydrogenázu SAD), cinnamil alkohol dehydrogenázu (CAD) a cytochrom P450 (Jumali et al. 2011).

## 2.7.2. Kyselina acetylsalicylová (ASA) a tolerance k abiotickému stresu

Obrázek č. 19

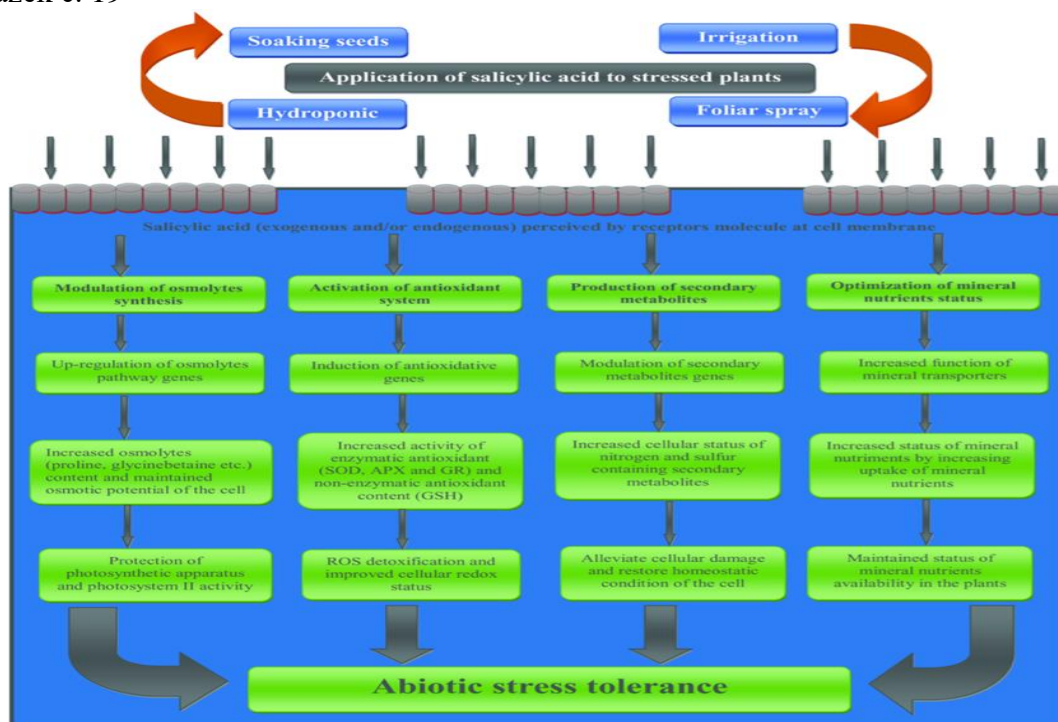


FIGURE 2 | Simplified schemes representing potential mechanisms underlying SA-mediated plant abiotic stress tolerance.

Zdroj: Khan et al. (2015)

## 2.7.3. Kovy/metaloidy jako stresový faktor

Stres působením kovů/metaloidů způsobuje veliké problémy udržitelnému zemědělství a životnímu prostředí. Zemědělská půda je plná polutantů kovů z několika zdrojů, jako jsou průmysl, spalování fosilních paliv, nakládání s odpady nebo chemie používaná v zemědělství. Exogenně aplikovaná ASA zlepšuje růst a fotosyntézu a snižuje negativní stresové účinky kovů a metaloidů jako je kadmium (10,15 a 25  $\mu\text{M}$ ) v *Zea Mays* (Krantev et al. 2008) a Cu (0,05, 0,10, 0,15 a 0,20 mM) v *Phaseolus vulgaris* (Zengin 2014).

Exogenně aplikovaná ASA reguluje antioxidantní systémy rostliny a výrazně snižuje peroxidaci lipidů v membránách v *Phaseolus vulgaris* (Zengin 2014), která je vystavená Cu.

ASA hraje důležitou roli ve fotosyntéze, konkrétně ve fotosystému II a v aktivitě enzymů jako je rubisco a carbonic anhydrasa při vystavení stresu z kovů (Al-Wahaibi et al. 2012., Noriega et al. 2012., Zhang et al. 2015).

ASA také zvyšuje odolnost proti poškození membrán snížením  $\text{H}_2\text{O}_2$  u rostlin vystavených kadmium (Cd), zejména v *Oryza sativa* (Chao et al. 2010).

#### **2.7.4. Salinita jako stresový faktor**

Odhaduje se, že asi 45 miliónů hektarů zemědělské půdy celosvětově je postiženo salinitou a tato plocha se den za dnem zvětšuje (Pitman and Lauchli 2002., Munns and Tester 2008). Důsledky salinity jsou deficit živin v půdě, zhoršení vodního potenciálu rostliny a narušení fyziologických a biochemických procesů (Munns and Tester 2008., Nazar et al. 2011., Khan et al. 2014).

Zvýšení tolerance vůči stresu způsobeným salinitou bylo dokázáno u mnoha rostlin, včetně *Vicia faba* (Azooz 2009), *Brassica juncea* (Nazar et al. 2011, 2015) či *Medicago sativa* (Palma et al. 2013). Deficit ASA v rostlině se považuje za hlavní důvod nízké odolnosti proti poškození rostliny, na kterou salinita působí.

Exogenně aplikovaná SA (0,5 mM) zvyšuje toleranci vůči soli v pšenici seté, tím že zvyšuje úroveň transkriptu antioxidantních genů GPX1, GPX2, DHAR, GR, GST1, GST2, MDHAR a GS. (Li et al. 2013).

#### **2.7.5. Ozón jako stresový faktor**

Ozón patří mezi nejvýznamnější stresové faktory, které jsou zodpovědné za poškozování kulturních rostlin a lesů. Ozón do rostliny vstupuje mezofilními buňkami přes průduchy, kdy pak okamžitě reaguje s vodou a dalšími mechanismy. Poté vzniká fytotoxicita hlavně díky zvýšení produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> což následně spustí defenzivní mechanismy v rostlině (Long and Naidu 2002., Pál et al. 2014). SA funguje jako signální molekula a promotuje molekulární a fyziologické změny u rostlin vystavených stresu způsobené ozónem (Tamaoki 2008). Navíc, SA je nezbytná k iniciaci antioxidantních mechanismů. ASA ovlivňuje růst rostlin (Yoshida et al. 2009).

#### **2.7.6. UV-B záření jako stresový faktor**

UV-B záření (280-320nm) je dnes diskutované ve spojitosti s růstem rostlin a jejím vývojem (Caldwell et al. 2007., Gill et al. 2015). UV-B záření může výrazně ovlivnit fotosystém II, transport elektronů, intenzitu fotosyntézy, nukleové kyseliny a biomasu (Sullivan and Teramura 1989., Mohammed and Tarpley 2009a, b). Vystavení UV-B záření snižuje syntézu klíčových fotosyntetických proteinů jako je chlorofyl a/b a D1 polypeptid fotosystému II (Jordan 1996., Jordan et al. 1998). Výrazné akumulace SA je nejčastěji pozorována u rostlin vystavených UV záření (Fodor et al. 1997., Horváth et al. 2002).

Exogenně aplikovaná SA ovlivňuje antioxidační účinky, detoxikaci radikálů, chrání membrány a metabolické enzymy (Mohammed and Tarpley 2009a). SA ovlivňuje aktivaci antioxidantních enzymů a je považována za velmi významnou při regulaci stresu způsobeným UV zářením v listech *Capsicum annuum* (Mahdavian et al. 2007). Dále se zjistilo, že SA zvyšuje účinnost fotosyntézy, koncentraci fenolů v listech a výnos při působení stresu UV-B v *Oryza sativa* (Mohammed and Tarpley 2013). SA snižuje výskyt chromozomových aberací způsobených UV-B zářením v meristematických buňkách v kořenech (Ranceliene and Vyšniauskiene 2012).

### **2.7.7. Teplota jako stresový faktor**

Nízké ale i vysoké teploty se dnes stávají potenciálním abiotickým stresovým faktorem u kulturních plodin. Stres způsobený teplotou ovlivňuje mnoho fyziologických a biochemických procesů a aktivuje mechanismy na molekulární úrovni, které ovlivní chování rostliny vůči takovému stresu (Larkindale and Knight 2002, Khan et al. 2013b., Kazemi-Shahadashi et al. 2014., Sibozza et al. 2014). Aplikace ASA na rostlinu, způsobí u rozdílných druhů rostlin vždy jinou reakci při nízkých teplotách (Janda et al. 1999, Ding et al. 2002., Horváth et al. 2002., Kang et al. 2012., Kazemi-Shahadashi et al. 2014., Sibozza et al. 2014) a při vysokých teplotách (He et al. 2002., Larkindale and Knight 2002., Clarke et al. 2004., Shi et al. 2006., Wang and Li 2006., Wang et al. 2010., Khan et al. 2013b).

### **2.7.8. Sucho jako stresový faktor**

Sucho se považuje za jeden z nejvýznamnějších abiotických stresorů, který velmi trápí zemědělce. Stres způsobený suchem může velice výrazně snížit efekt fotosyntézy, syntézu fotosyntetických pigmentů a nakonec předčasně ukončit růst rostliny (Hasanuzzaman et al. 2013).

Použití ASA na *Triticum aestivum*, vystavenému stresu ze sucha, ovlivnilo 76 identifikovaných bílkovin (Kang et al. 2012). Tyto proteiny byly součástí procesů jako je fotosyntéza, metabolismus cukrů, metabolismus proteinů a metabolismus toxinů.

### **2.7.9. Interakce kyseliny acetylsalicylové (ASA) s minerálními látkami**

Minerální látky jsou absolutně nezbytné pro správný růst rostliny, její vývoj a přežití v různých klimatických podmínkách. ASA výrazně ovlivňuje příjem minerálních látek rostlinou a tím zlepšuje růst a vývoj rostlin, které jsou vystavené abiotickému stresu (Alpaslan and Gunes 2001., Gunes et al. 2007., Chen et al. 2011., Khokon et al. 2011., Tufail et al. 2013., Nazar et al. 2015).

ASA také může být zapojená do regulace příjmu některých minerálních látek jako je Mn, Ca, Cu, Fe, P a Zn a tím může ovlivnit negativní působení stresu vyvolaným olovem 0,5 mM ASA zvýší efektivitu fotosyntézy, pokud je rostlina vystavena stresu vyvolaným salinitou tím, že sníží  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  ionty v buňkách a zvýší příjem živin.

### **2.7.10. Interakce ASA s hormony**

Růst a vývoj rostliny ovlivňuje mnoho faktorů. ASA dokáže regulovat různé druhy rostlinných mechanismů vystavených stresovému faktoru. Interakce ASA například s auxiny (Iglesias et al. 2011., Khan et al. 2012a), s cytokininy (Peleg et al. 2011., Khan et al. 2012a), gibberelíny (Khan et al. 2012a), etylenem (Khan et al. 2012a, 2013b, 2014) nebo oxidem dusnatým (Khan et al. 2012a) probíhá jak za stresových podmínek tak i za podmínek optimálních.

ASA reaguje s fytohormony na základě synergismu anebo antagonismu, tedy podle toho, jestli jsou podmínky prostředí ideální či stresové.

## 2.8. NanoFyt Si®

Registrační údaje - uváděno do oběhu jako pomocná půdní látka, číslo registrace ÚKZÚZ 3835. Preparát byl vyvinut na základě českého CZ-296300 a evropského EP 1750507 patentu autorského kolektivu Kužel S., Cígler P., Hrubý M. (2006). Je v produktové nabídce společnosti AGRA GROUP a.s. Střelské Hoštice.

Obrázek č. 20



Foto: autor

### **2.8.1. Cíl použití a způsob účinku**

NanoFyt Si<sup>®</sup> je přípravek obsahující stabilizované nanočástice SiO<sub>2</sub>, určené pro mimokořenovou výživu postřikem na list. Tento přípravek je určen k rychlému dodání křemíku u obilovin. Křemík zvyšuje pevnost stěn rostlinných buněk, což se projevuje zvýšením tuhosti kutikuly listů a zvýšenou tolerancí ke škůdcům a nemocem. Snižuje se tím i výpar vody v suchém období. Přípravek obsahuje jako formulační látky také přírodní estery, přičemž aplikace komplexu nanočástic obsahujících křemík spolu s těmito přírodními estery působí příznivě na kondici pěstovaných kultur a výrazně přispívá k omezení biotických a abiotických stresů během vegetace.

### **2.8.2. Složení**

NanoFyt Si<sup>®</sup> obsahuje 20 % SiO<sub>2</sub> ve formě stabilizovaných hydratovaných nanočástic a specifické přírodní estery (AGRA 2017).

### **2.8.3. Křemík**

Křemík je prvek, u kterého byly prokázány pozitivní účinky po jeho aplikaci. Křemík a jeho sloučeniny zaujímají významnou roli při biotickém a abiotickém stresu. AGRA GROUP a.s. (2017) tvrdí, že příjem a dostupnost křemíku rostlinou má zásadní vliv na výnos a kvalitu rostlin.

Přípravek NanoFyt Si<sup>®</sup> obsahuje křemík ve formě stabilizovaných nanočástic hydratovaného oxidu křemičitého s průměrem 15 nm. Díky těmto nanočásticím je přípravek určený pro foliární aplikace.

V listech se chová jako specifický zdroj křemíku, který se dokáže zapojit do metabolismu rostliny. Přípravek má vysokou účinnost zejména díky nanočásticím.

### 3. Cíle práce a definice pracovních hypotéz

Cílem diplomové práce bylo maloparcelkovým pokusem ověřit, zda použití elicitorů ovlivní kvalitu produktu, tedy obsah látek, konkrétně protodioscinu a diosgeninu v rostlině kotvičníku zemního (*Tribulus terrestris* L.). Použité elicitory byly kyselina acetylsalicylová (ASA) ve třech koncentracích  $10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup>,  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>,  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> a komerční přípravek NanoFyt Si<sup>®</sup> od společnosti AGRA GROUP a.s., které byly na rostliny aplikovány foliárně. Pro kontrolu sloužil postřik vodou, který byl prováděn stejně a ve stejnou dobu jako postřik elicitory.

Podle literatury by kyselina acetalsalicylová alespoň v jedné koncentraci měla mít pozitivní účinek na obsah protodioscinu a diosgeninu v nati nebo plodu rostliny oproti kontrolnímu postřiku.

Cíl diplomové práce byl naplněn maloparcelkovým pokusem. Výsledky poskytnuté Laboratoří forenzní analýzy biologicky aktivních látek VŠCHT Praha ukazují, že kyselina acetylsalicylová (ASA) v porovnání s kontrolním postřikem vody, průkazně statisticky zvýšila obsah diosgeninu, , v plodech kotvičníku ve střední koncentraci  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>.



## 4. Metodický postup

### 4.1. Stručná metodika práce

- A. Předpěstování rostlin kotvičnicku zemního ve skleníku
- B. Umístění rostlin na pokusné stanoviště
- C. Provedení elicítace
- D. Odebrání vzorků
- E. Vyhodnocení vzorků UHPLC-MS/MS metodou
- F. Porovnání výsledků s literaturou (potvrzení nebo vyvrácení hypotéz).

### 4.2. Pěstování ve skleníku

Dne 10. 4. 2019 byl proveden výsev semen poskytnutých ZF JU v ČB. Původ semen nebyl známý, protože byla pořízena na nákupním portálu ebay.com a jejich původ není doložitelný. Celkem 7584 bylo vyseto po dvou asi 0,5 cm hlubokých důlků a to do klasického zahradnického substrátu smíchaného s pískem v poměru 1:6 ve skleníku o ploše 12 m<sup>2</sup>. Semena byla před výsevem namočena v previcuru v dávce 2 ml/5 l vody po dobu 5 minut a po výsevu zalita 30 l vody. Poté se skleník zavlažoval denně v 8 hodin ráno a v 8 hodin večer vždy na 15 minut, kdy celkový průtok vody za den byl 31 litrů.

Obrázek č. 21 semena kotvičnicku



Foto: autor

Obrázek č. 22 sázení semen po dvou



Foto: autor

Dne 16. 4. 2019 překvapivě vyklíčilo již 62 semen. Podle dostupné (Hemzal 2014) literatury rostliny vzchází po 14 dnech, ze předpokladu, že v prostředí ve kterém se semena nacházejí je alespoň 20°C. Den poté vzešlo dalších 79 semen.

Obrázek č. 23 rostlina kotvičníku 1 den stará



Foto: autor

Obrázek č. 24 12 denní rostlina kotvičníku



Foto: autor

Ke dni 22. 4. 2019 vzešlo celkem 1432 rostlin kotvičníku, což byla asi 18,88 % klíčivost. Velmi se začínal projevovat nepravidelný růst, kdy 12 denní rostlina byla vzrůstově menší než rostlinka mladší. Obecně je v povědomí lidí, že rostliny pěstované ve skleníku se setkávají s různými škůdci a výskytem plevelných rostlin. Od doby, kdy byly rostliny vysazeny byl výskyt plevelu téměř nulový a škůdci se nevyskytovali vůbec. Plíseň, jak popisuje Hemzal (2014) se nevyskytla ani na 1 % pěstovaných rostlin.

Dne 23. 4. 2019 byl proveden preventivní postřik rostlin previcurem v dávce 1 ml/5 l vody. Rostliny rostou rychle, jsou zdravé a silné.

Dne 8. 5. 2019 bylo přidáno pomocné svícení od 10:00 do 18:00. Závlaha byla prováděna 8 min ráno a 8 min večer. U některých rostlin se objevilo žloutnutí listů (asi 1,5 %). Byl pozorován výskyt škůdců, požeračů, kteří způsobili škodu asi na 0,6 % rostlin, proto byla provedena aplikace mospilanu 1 g/5 l vody. Plíseň bez výskytu.

Dne 14.5. 2019 proběhlo přesazení všech rostlin do nového substrátu a dále příprava na výsev na pole. Závlaha byla upravena na 15 min ráno a 15 min večer. Došlo k odstranění pomocného svícení. Příprava na výsev nových rostlin.

Obrázek č. 25



Foto: autor



Dne 22. 5. 2019 byl proveden výsev plodů ve skleníku, které byly namočený ve vodě 30 hod. Kůra plodu byla výrazně měkčí, téměř se rozpadala. Plůdky byly sety vždy po jednom v celkovém počtu 1600 do nového substrátu. Závlaha upravena 3x denně na 3 min - což se později ukázalo jako nedostatečné. Následně byl provedený postřik previcurem 0,5 ml preparátu na 1,5 l vody.

Obrázek č. 26



Foto: autor

Dne 12. 6. 2019 rostliny ve skleníku stále klíčí, pouze ale v řádu několika desítek. Možná to bude otevřeným skleníkem, poměrně razantním snížením teploty či menší efektivností závlahy, která v uzavřeném skleníku nezavlažuje rovnoměrně všechny sadbovače. Nicméně, rostliny se začínají podobat těm v Meclově a to velikostí lístků a barvou stonků. Na některých místech se začínají ukazovat pavučinky, což značí výskyt škůdců, požeračů. Plísně se nevyskytují.

Obrázek č. 27



Foto: autor



Dne 4. 7. 2019 proběhla kontrola rostlin ve skleníku. Rostlinám se ve skleníku kvůli vysokému teplu nedaří. Vodní mlha je poměrně dobrý systém závlahy, ale jen v případě, že ve skleníku neproudí vzduch. Jelikož je momentálně skleník otevřený, vodní mlha je poměrně málo účinná a ve skleníku je v současnosti jen 75 rostlin. Zbytek díky nedokonalému zavlažování zvadl. Do otevřeného skleníku bude lepší jiný systém závlahy. Rostliny byly přesazeny do nového substrátu a začínají semenit.

Obrázek č. 28



Foto: autor

Dne 23. 7. 2019 proběhla další kontrola rostlin. Rostliny ve skleníku rostou velmi pomalu, avšak neschnou. Zdá se, že nastavení závlahy je momentálně optimální. Rostliny jsou zdravé a poměrně silné, ale velikosti rostlin na poli se po dobu jejich vegetace ani nepřiblíží.

Jelikož skleník sloužil jen k vypěstování sazenic na pole, pozorování ve skleníku bylo tímto ukončeno. Rostliny byly ve srovnání s pozemkem ZF JU v Č.B. velmi slabé.

Ukázalo se, že skleník je výborný k předpěstování, ale ne k samotnému pěstování, alespoň za těchto podmínek.

Obrázek č. 29



Foto: Vytiska Petr Bc.

### 4.3. AZP

#### 4.3.1. České Budějovice (pro rok 2013)

Obrázek č. 30

Ukazatel	Ve 100% <sup>(12)</sup> sušině	V pův. <sup>(11)</sup> hmotě <sup>(12)</sup>	V lab. sušině	Jednotka	Limitní <sup>(5)</sup> hodnota (typ)	Nejistota měření	Použitá metoda <sup>(14)</sup>
draslík (K)	111	94,6	110	mg/kg		±20 %	(A) SOP 42
fosfor (P)	130	111	129	mg/kg		±20 %	(A) SOP 43-2
hořčík (Mg)	86,6	74,0	86,0	mg/kg		±15 %	(A) SOP 42
vápník (Ca)	907	775	901	mg/kg		±20 %	(A) SOP 42
pH (CaCl <sub>2</sub> ) <sup>(7, 8)</sup>			6,25	-			(A) SOP 44

Ukazatel	V pův. hmotě	Jednotka	Limitní <sup>(6)</sup> hodnota (typ)	Nejistota měření	Použitá metoda	(14)
sušina	85,4	%		±15 %	(A) SOP 39-2	

Seznam použitých metod:

- (A) SOP 42 JPP AP I kap. 3
- (A) SOP 39-2 ČSN ISO 11465
- (A) SOP 44 JPP AP I kap. 2.3, ČSN ISO 10523, ČSN ISO 10390
- (A) SOP 43-2 JPP AP I kap. 3

Zdroj: Bernas (2018)

#### 4.3.1.1. Vyhodnocení podle metodického pokynu č.9/SZV

Hodnota draslíku v původní hmotě je 94,6 mg.kg<sup>-1</sup>. Dle tabulky č.10 metodického pokynu č.9/SZV je obsah draslíku v půdě nízký.

Hodnota fosforu v původní hmotě je 111 mg.kg<sup>-1</sup>. Dle tabulky č.10 metodického pokynu č.9/SZV je obsah fosforu dobrý.

Hodnota hořčíku v původní hmotě je 74,0 mg.kg<sup>-1</sup>. Dle tabulky č.10 metodického pokynu č.9/SZV je obsah hořčíku nízký.

Hodnota vápníku v původní hmotě je 775 mg.kg<sup>-1</sup>. Dle tabulky č.10 metodického pokynu č.9/SZV je obsah vápníku nízký.



### 4.3.2. Meclov (pro rok 2019)

Obrázek č. 31

Ukazatel	Ve 100% <sup>12)</sup> sušině	V pův. <sup>11)</sup> hmotě <sup>12)</sup>	V lab. sušině	Jednotka	Limitní <sup>5)</sup> hodnota (typ)	Nejistota měření	Použitá metoda	<sup>14)</sup>
fosfor (P)	150	125	148	mg/kg		±20 %	(A) SOP 43-2	
hořčík (Mg)	217	181	214	mg/kg		±15 %	(A) SOP 42	
draslík (K)	219	182	216	mg/kg		±20 %	(A) SOP 42	
vápník (Ca)	1540	1280	1520	mg/kg		±20 %	(A) SOP 42	
pH (CaCl <sub>2</sub> ) <sup>7) 8)</sup>			5,65	-		±0,1 pH	(A) SOP 44	

Ukazatel	V pův. hmotě	Jednotka	Limitní <sup>6)</sup> hodnota (typ)	Nejistota měření	Použitá metoda	<sup>14)</sup>
sušina	83,2	%		±5 %	(A) SOP 39-2	

#### Seznam použitých metod:

- (A) SOP 42 JPP AP I kap. 3
- (A) SOP 44 JPP AP I kap. 2.3, ČSN ISO 10523, ČSN ISO 10390
- (A) SOP 39-2 ČSN ISO 11465
- (A) SOP 43-2 JPP AP I kap. 3

Zdroj: AGRO-LA spol. s.r.o.

#### 4.3.2.1. Vyhodnocení podle metodického pokynu č.9/SZV

Hodnota draslíku v původní hmotě je 182 mg.kg<sup>-1</sup>. Dle tabulky č.10 metodického pokynu č.9/SZV je obsah draslíku v půdě dobrý.

Hodnota fosforu v původní hmotě je 125 mg.kg<sup>-1</sup>. Dle tabulky č.10 metodického pokynu č.9/SZV je obsah fosforu vysoký.

Hodnota hořčíku v původní hmotě je 181 mg.kg<sup>-1</sup>. Dle tabulky č.10 metodického pokynu č.9/SZV je obsah hořčíku dobrý.

Hodnota vápníku v původní hmotě je 1280 mg.kg<sup>-1</sup>. Dle tabulky č.10 metodického pokynu č.9/SZV je obsah vápníku vyhovující.

V AZP je značný rozdíl. Půda v Meclově je bohatší na živiny než půda na pozemku ZF JU v Č.B., kde je menší obsah všech přístupných živin a vyšší pH.

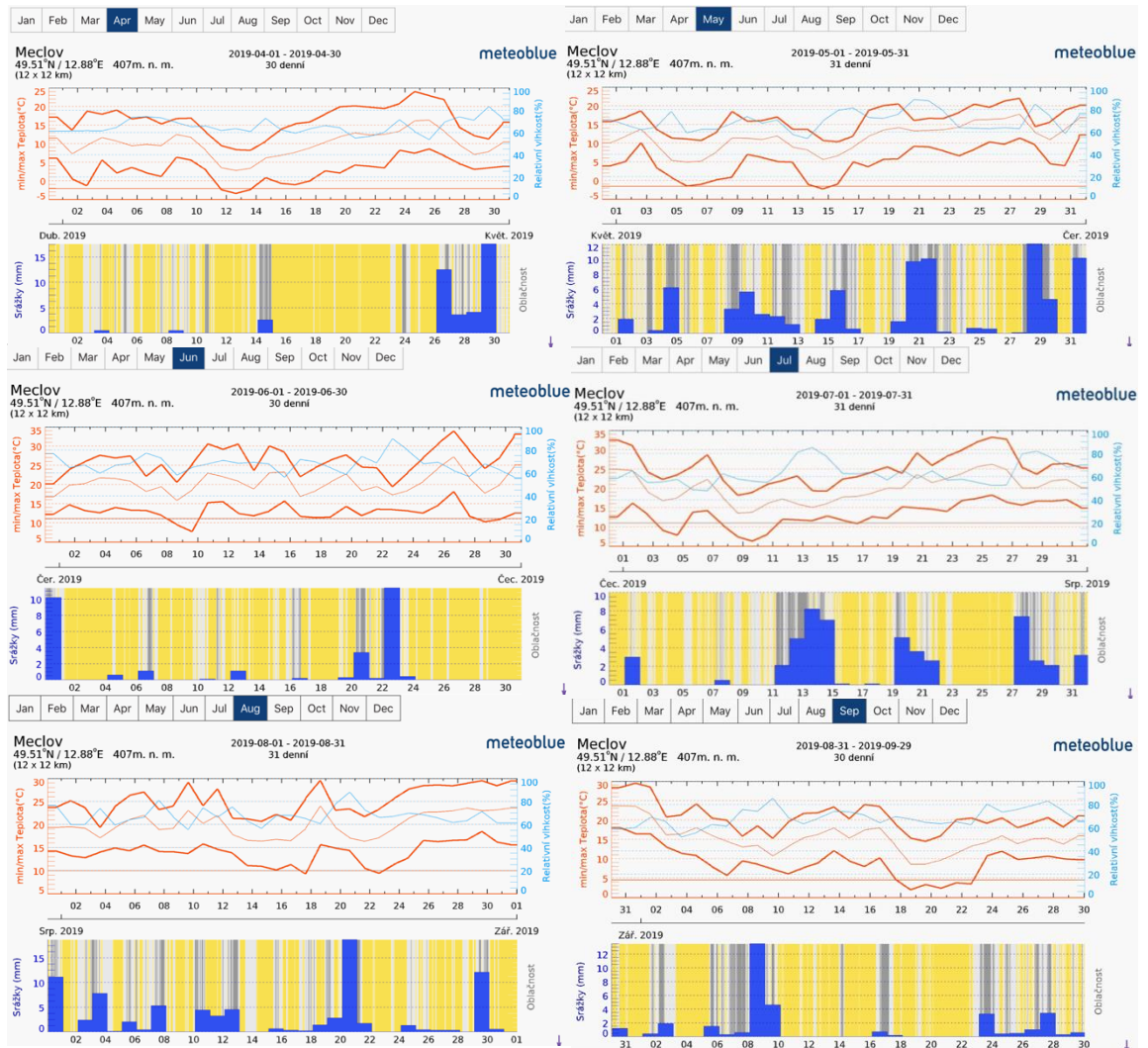
Pozemek ZF JU v Č.B. byl na podzim zoraný. Na jaře byl zoraný znovu a poté byl zvláčen. Hnojený pozemek nebyl.

V Meclovské zemědělské proběhlo několik jednání o přípravě půdy, jejím hnojení, agrotechnickém zpracování a sklizni. Původně bylo naplánované půdu vyhnojit, ovšem po výsledcích z AGRO-LA spol. s.r.o. bylo od veškerého hnojení upuštěno.

Půda v Meclově nebyla tedy pro kotvičnick nijak hnojena či ošetřena. Její lepší poměr živin je způsobený tím, že na pozemek o velikosti asi 10 arů, kde kotvičnick byl pěstovaný, byla navezena půda z polí, na kterých Meclovská zemědělská a.s. hospodaří.

## 4.4. Počasí v Meclově

Obrázek č. 32

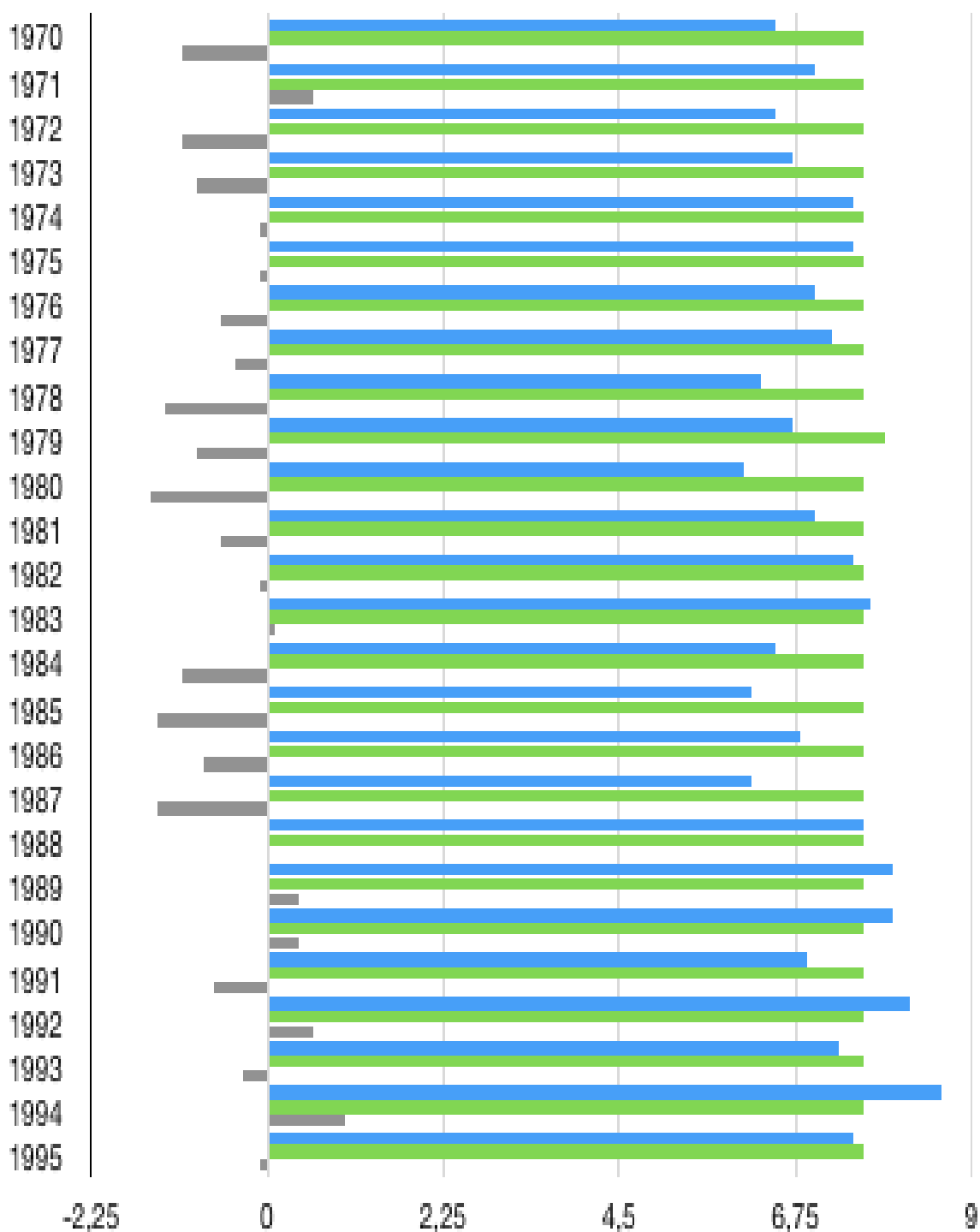


Zdroj: meteoblue.com

#### 4.4.1. Počasí pro Meclov za 50 let

##### 4.4.1.1. Územní teploty

Graf č. 1

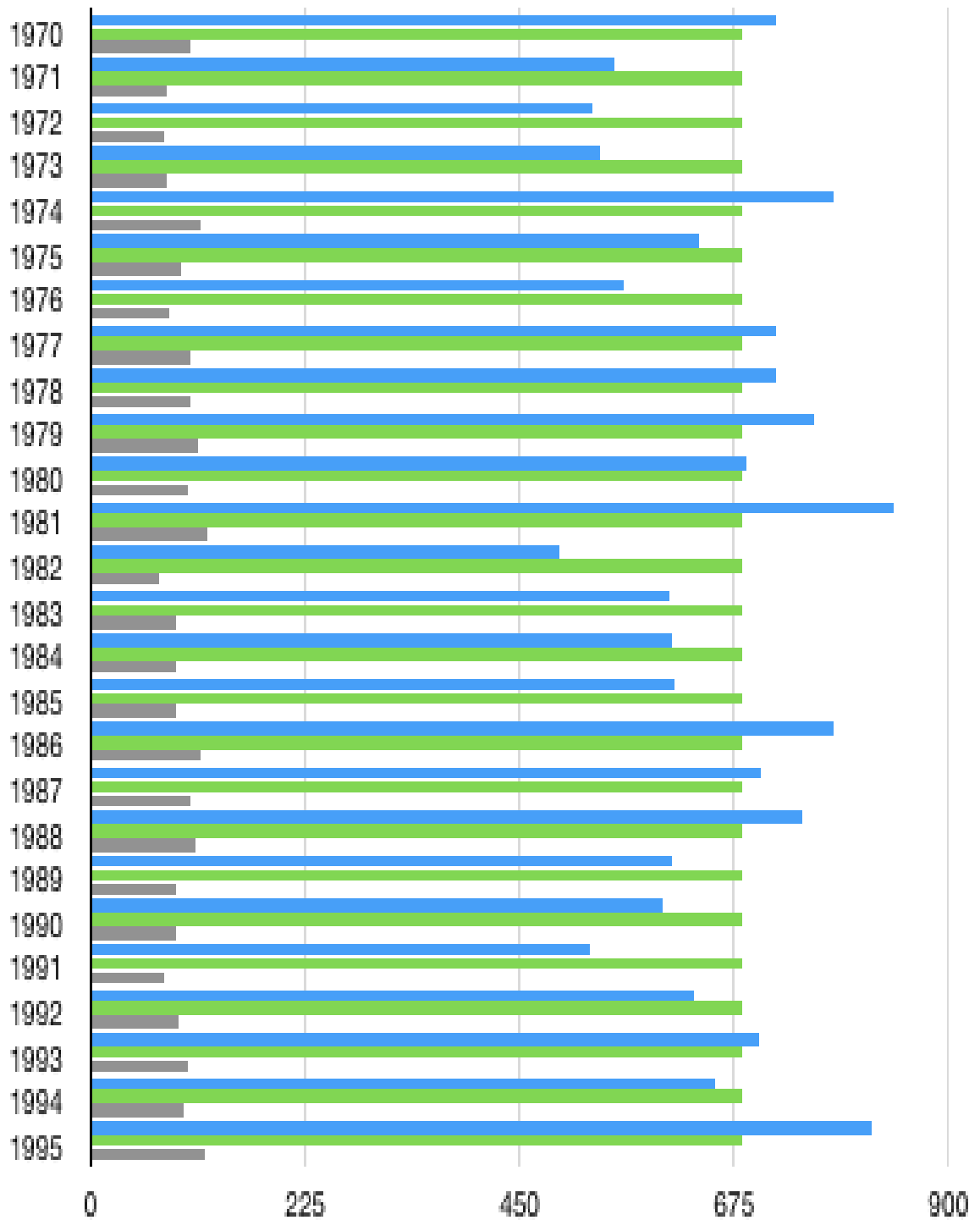


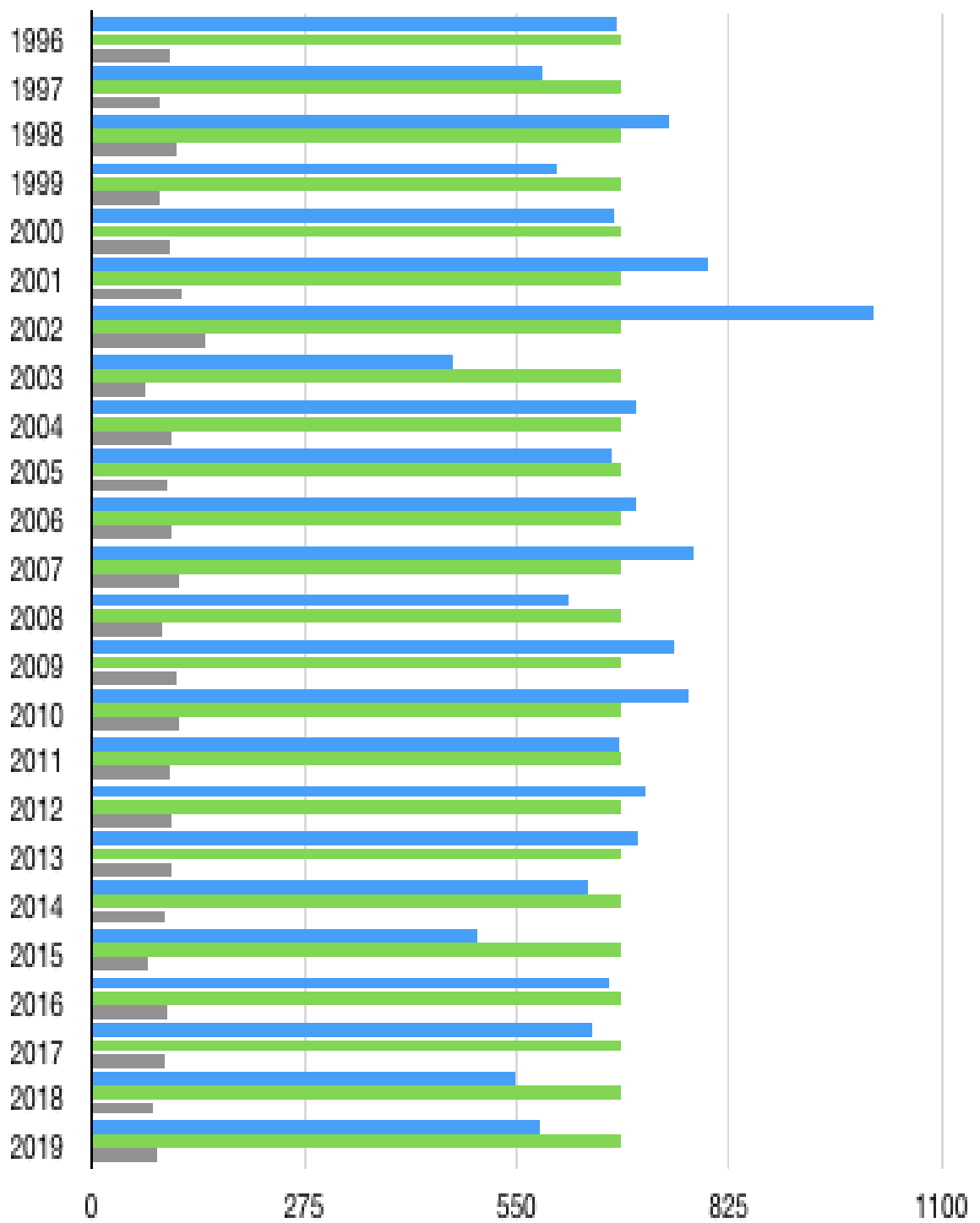


■ = teplota vzduchu [°C], ■ = dlouhodobý normál teploty vzduchu 1981-2010 [°C],  
 ■ = odchylka od normálu [°C]

#### 4.4.1.2. Územní srážky

Graf č. 2





■ = úhrn srážek [mm], ■ = dlouhodobý srážkový normál 1981-2010 [mm], ■ = úhrn srážek v % normálu 1981–2010.

#### 4.5. Pěstování v Meclově

Před vysetím rostlin v Meclově byla navezena půda z polí Meclovské zemědělské a.s. na celkovou plochu 10 arů. Z této plochy se vyčlenilo 80 m<sup>2</sup> pro pěstování kotvičníku. Celá plocha byla několikrát zvláčena, zejména kvůli odstranění kamenů a plevelů. Po předchozí domluvě bylo rozhodnuto, že použití jakéhokoli pesticidu bude na celé ploše zakázané po celou dobu pěstování.

Dne 20. 5. 2019 proběhl výsev 1300 rostlin na parcelu o velikosti 72 m<sup>2</sup> Meclově. Parcela byla pokryta netkanou textilií, do které byly vyřezány díry. Do těch byly vloženy rostliny. Rostlin mělo být původně pouze 1000 kusů a celková plocha, na které se rostliny měly pěstovat byla 1 ar.

Rostlin bylo celkem 1300 kusů a cca 300 z nich bylo srostlých k sobě, po dvou až čtyřech rostlinách, díky tomu, že sázená byla celá souplodí.

Rostliny byly zasazeny střední zemědělskou školou, s kterou Meclovská zemědělská a.s. spolupracuje.

Obrázek č. 33



Foto: autor



Dne 11. 6. 2019, tedy 2 týdny po výsevu na poli v Meclově se rostlinám daří výborně. Rostliny nemají tendenci růst do výšky, ale místo toho poléhají a velmi pěkně se větví. Asi 0,2 % rostlin se neujalo a to sice ty nejmenší. Většina rostlin má skutečné hezké, hnědé, tvrdé, už spíše dřevité stonky. Lístky u největších rostlin mají téměř 1 cm a jsou sytě zelené. Venkovní podmínky rostlinám očividně svědčí. Plevel, i přes to, že je na zemi netkaná textilie, se vyskytuje na 3 % celkové plochy, ale nijak nevadí ani nestíní rostlinám. Zdá se, že řádky 60 x 15cm kotvičníku velmi svědčí. Rostliny se překrývají a místy tvoří “koberec”. Největší rostliny mají kolem 50 cm. Zdá se, že úmrtnost rostlin na následky vnějších vlivů je menší než 0,1 %. Škůdci zatím nejsou žádní, rostliny jsou zdravé a prosperují. Asi 30 % rostlin kvete, a zhruba 5 % semení.

Obrázek č. 34



Foto: autor



Dne 4. 7. 2019 se kotvičníku v Meclově daří více než dobře. Rostliny jsou poměrně veliké, silné, dřevnaté, velmi dobře vyvinuté a stonky místy mají i 1 cm průměr. Vytvořily dokonalý koberec, rozdíl oproti poslední návštěvě Méclova je neskutečný. Plevel teď již nemá vůbec žádnou šanci k růstu. Kotvičník je v plném květu, plně semení. Plody jsou veliké, zatím zelené.

Obrázek č. 35



Foto: autor

Obrázek č. 36



Foto: autor



Obrázek č. 37



Foto: autor

Obrázek č. 38



Foto: autor



Obrázek č. 39



Foto: autor

Obrázek č. 40



Foto: autor



Dne 18. 7. 2019 proběhla sklizeň rostlin kotvičniku v Meclově. Sklizeň trvala přibližně 2 hodiny. Rostliny se ostříhaly ručně na velikost asi 20 cm. Sklidilo se celkem 300 kg hmoty  $\pm$  10 kg.

Obrázek č. 41



Foto: autor

Foto č. 42



Foto: autor



Dne 3. 8. 2019 po 17 dnech od sklizně v Meclově rostliny vypadají opravdu velmi dobře. Obrostly, v průměru mají kolem 80 cm, škůdci nejsou žádní a plevel se také nevyskytuje. Rostliny jsou zdravé, začínají kvést.

Obrázek č. 43



Foto: autor

Obrázek č. 44

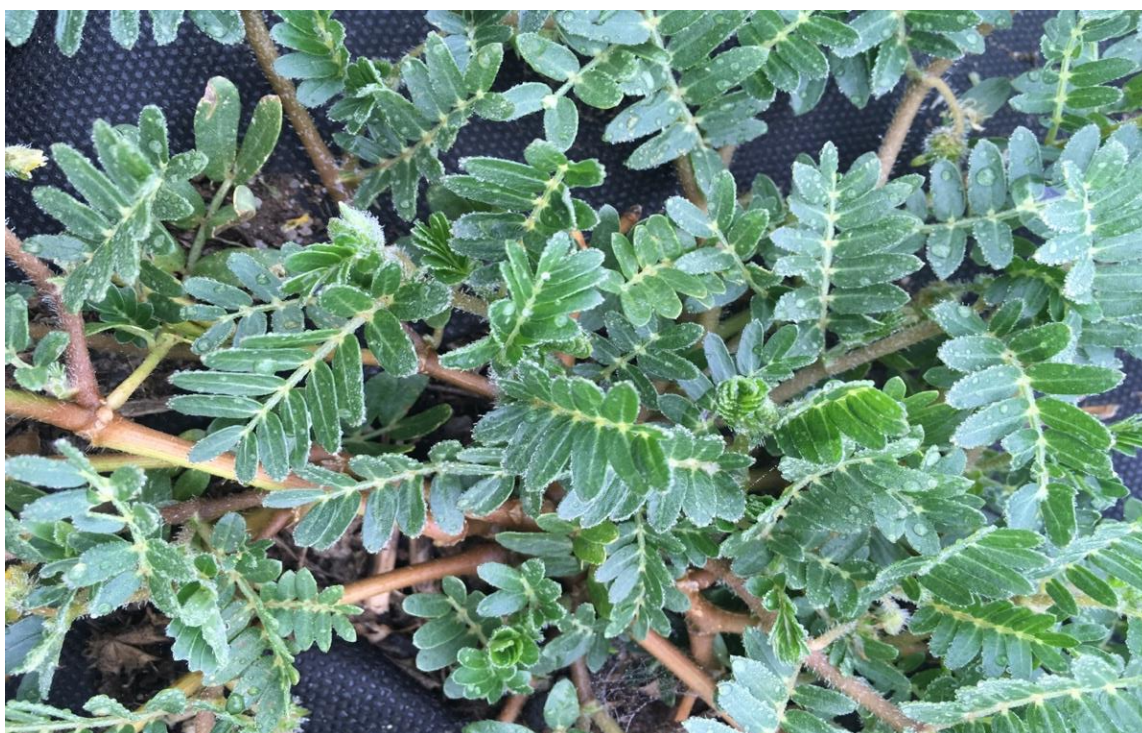


Foto: autor



Dne 17. 8. 2019 rostliny kotvičnicku v Meclově nemají tak silné a dřevnaté lodyhy, jako před první sklizní. Lodyhy jsou spíš zelené, posledních asi 5-10 cm je zdřevnatělých. Rostliny rostou poměrně dobře. Plevel se skoro nevyskytuje, rostliny utváří koberec. Netrpí nedostatkem vody, jsou zdravé. Semena jsou ještě nedozrálá, veliká, zelená. Největší rostliny mají kolem 2 m.

Obrázek č. 45



Foto: autor

Dne 12. 9. 2019 provedena poslední kontrola před sklizní v Meclově, která bude 25. 9. 2019. Rostliny jsou zdravé, posledních pár studených a vlhkých dní jim nijak neuškodilo. Plevel ani nemoci se stále nevyskytují.

Plody pomalu dozrávají, jsou už z části hnědé. Největší plody mají cca 1,2 cm v průměru. Rostliny mají pořád slabší lodyhy než před sklizní. Posledních asi 15 cm lodyh je zdřevnatělých, jinak jsou zelené a asi 2-3 mm silné. Ty největší rostliny mají 7 párů lístků a mají více než 2 m.

Obrázek č. 46



Foto: autor



Obrázek č. 47



Foto: autor

Obrázek č. 48



Foto: autor

Obrázek č. 49



Foto: autor



Dne 25. 9. 2019 proběhla druhá a zároveň poslední sklizeň kotvičnicku v Meclově. Rostliny začaly vadnout díky špatnému počasí, ovšem jen asi 10% a to sice jen ty, které byly na “koberci” nejvýše.

Obrázek č. 50



Foto: autor

Obrázek č. 51



Foto: Vytiska Petr Bc.



Obrázek č. 52



Foto: autor

Přesnou hmotnost sklizené natě nebylo možné určit, protože porost byl mokrý a “nacucaný” vodou. Lze ale předpokládat, že se sklídilo stejné množství natě jako při první sklizni, tedy 300 kg.

Obrázek č. 53



Foto: autor



Kromě toho, že některé rostliny začaly vadnout se nevyskytly žádné plísně, nemoci či jakýkoliv druh škůdců. Kotvičnick už odkvetl, semena začala dozrávat, byla už tmavě zelená, v průměru zhruba 1 cm a s ostny velkými do 0,5 cm.

Semena se sklídila z tkaniny i s veškerými nečistotami, zejména s hlínou a zbytky rostlin. Hmotnost takto sklizených semen byla 32 kg.

Obrázek č. 54



Foto: autor

Rostliny měly v průměru 2 m, největší kolem 2,5 m.

Obrázek č. 55



Foto: Vytiska Petr Bc.



## 4.6. Schéma postřiku pozemku ZF JU v Č.B.

Tabulka č. 1 schéma postřiku

ASA (10 <sup>-5</sup> )	ASA (10 <sup>-4</sup> )	ASA (10 <sup>-4</sup> )	ASA (10 <sup>-3</sup> )	ASA(10 <sup>-3</sup> )
ASA (10 <sup>-5</sup> )	NanoFyt Si <sup>®</sup>	NanoFyt Si <sup>®</sup>	Voda	Voda

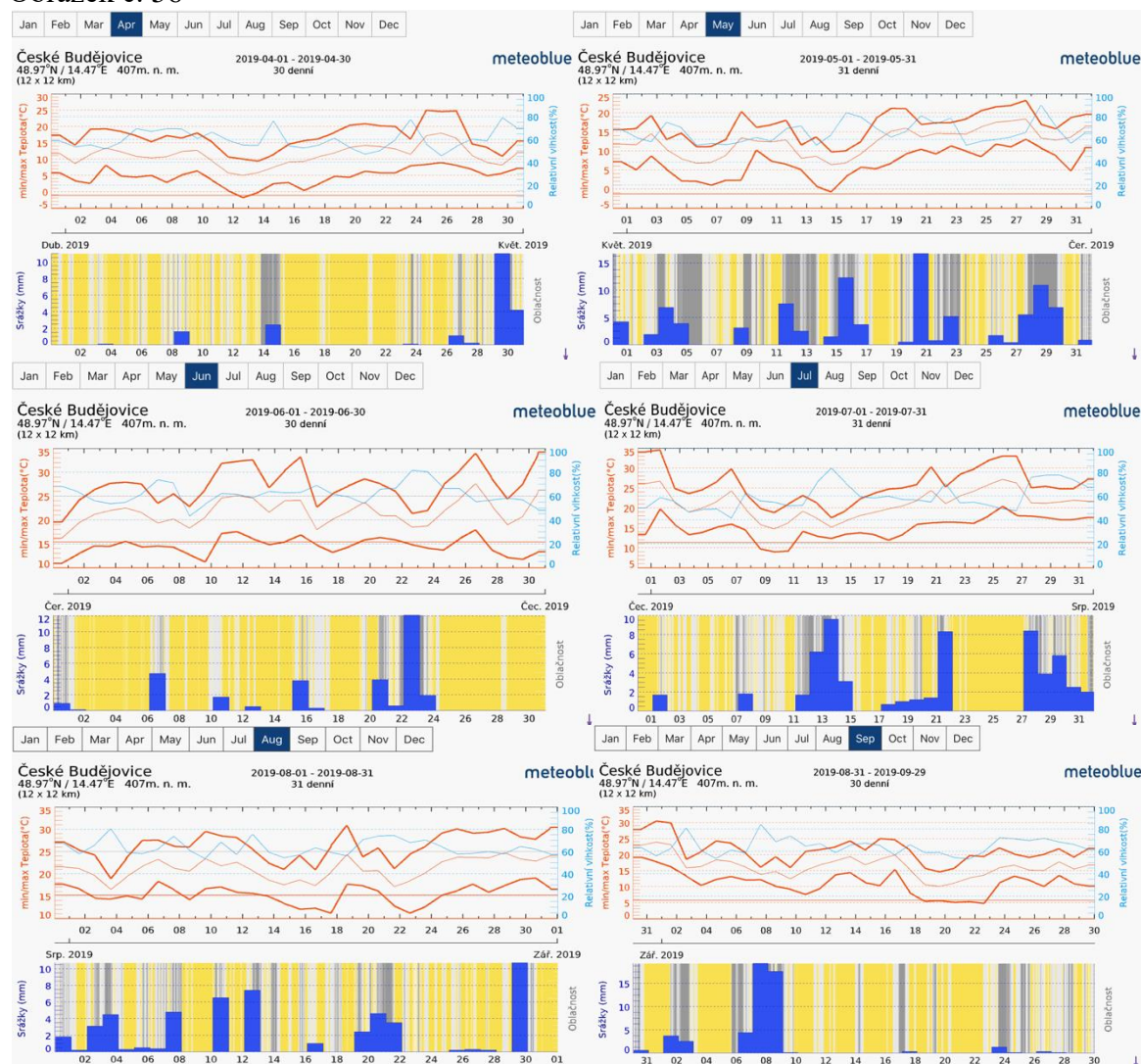
Celkem bylo 10 parcelek, kdy na každé bylo 10 rostlin. Na všech parcelkách bylo tedy 100 rostlin.

Postřik byl vždy proveden na dvou parcelkách, a to v termínech 4. 7., 27. 7. a 20. 8. 2019.

Rostliny byly vysazeny do sponu 60 x 10 cm, kdy mezi každou parcelkou byl ochranný pás široký 50 cm.

### 4.6.1. Počasí České Budějovice

Obrázek č. 56



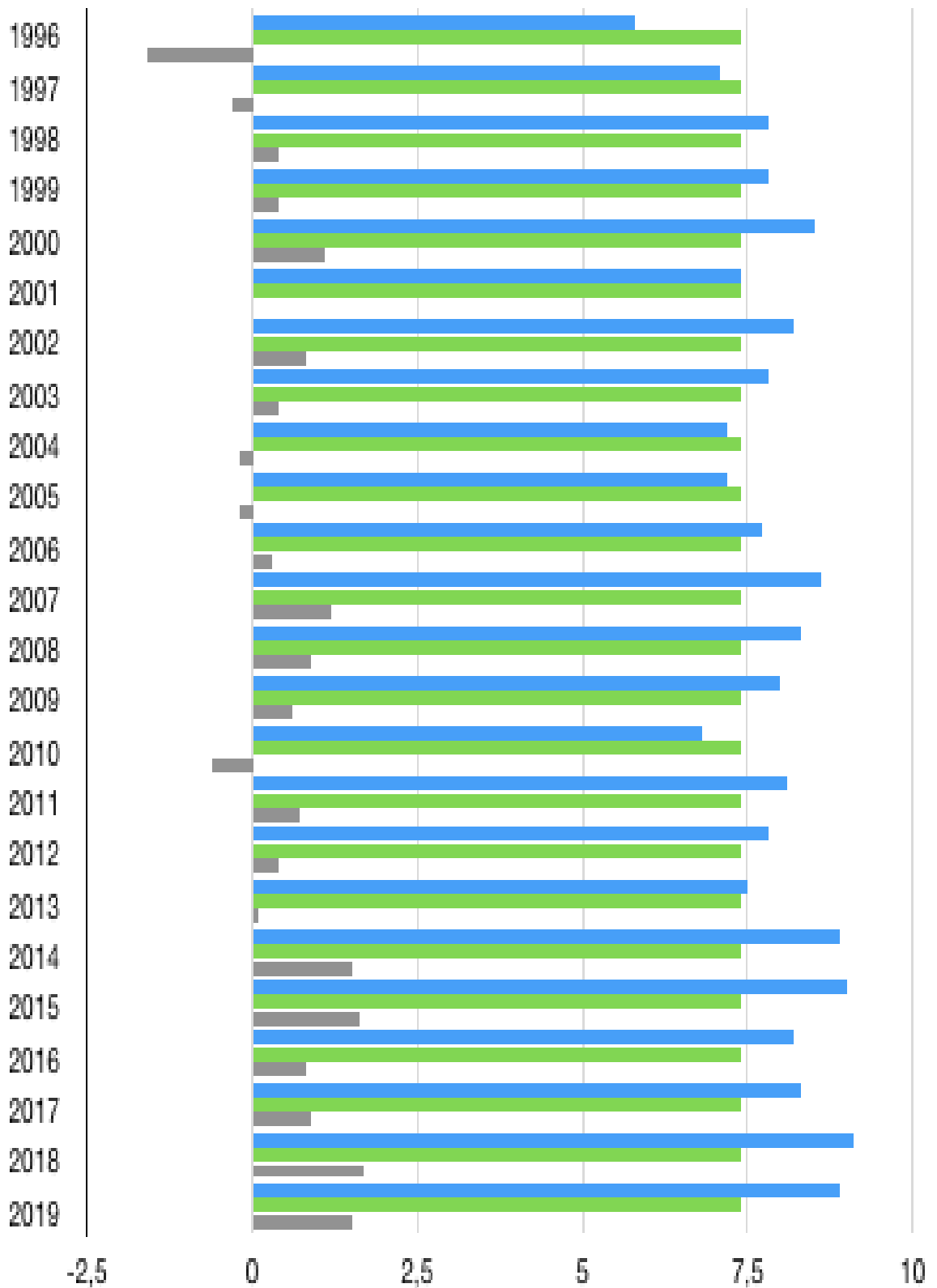
Zdroj: meteoblue.com

#### 4.6.1.1. Počasí pro České Budějovice za 50 let

#### 4.6.1.2. Územní teploty

Graf č. 3

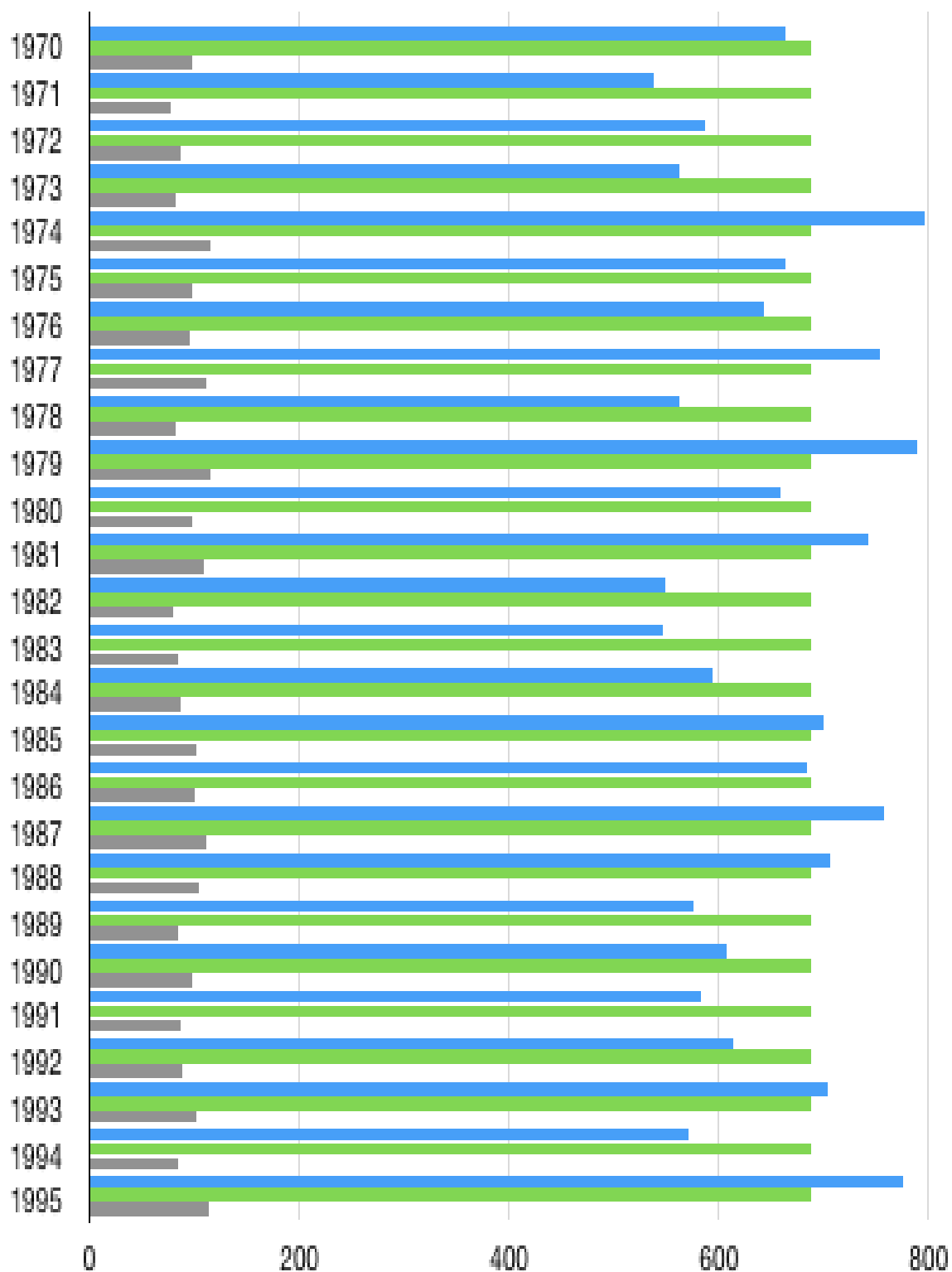


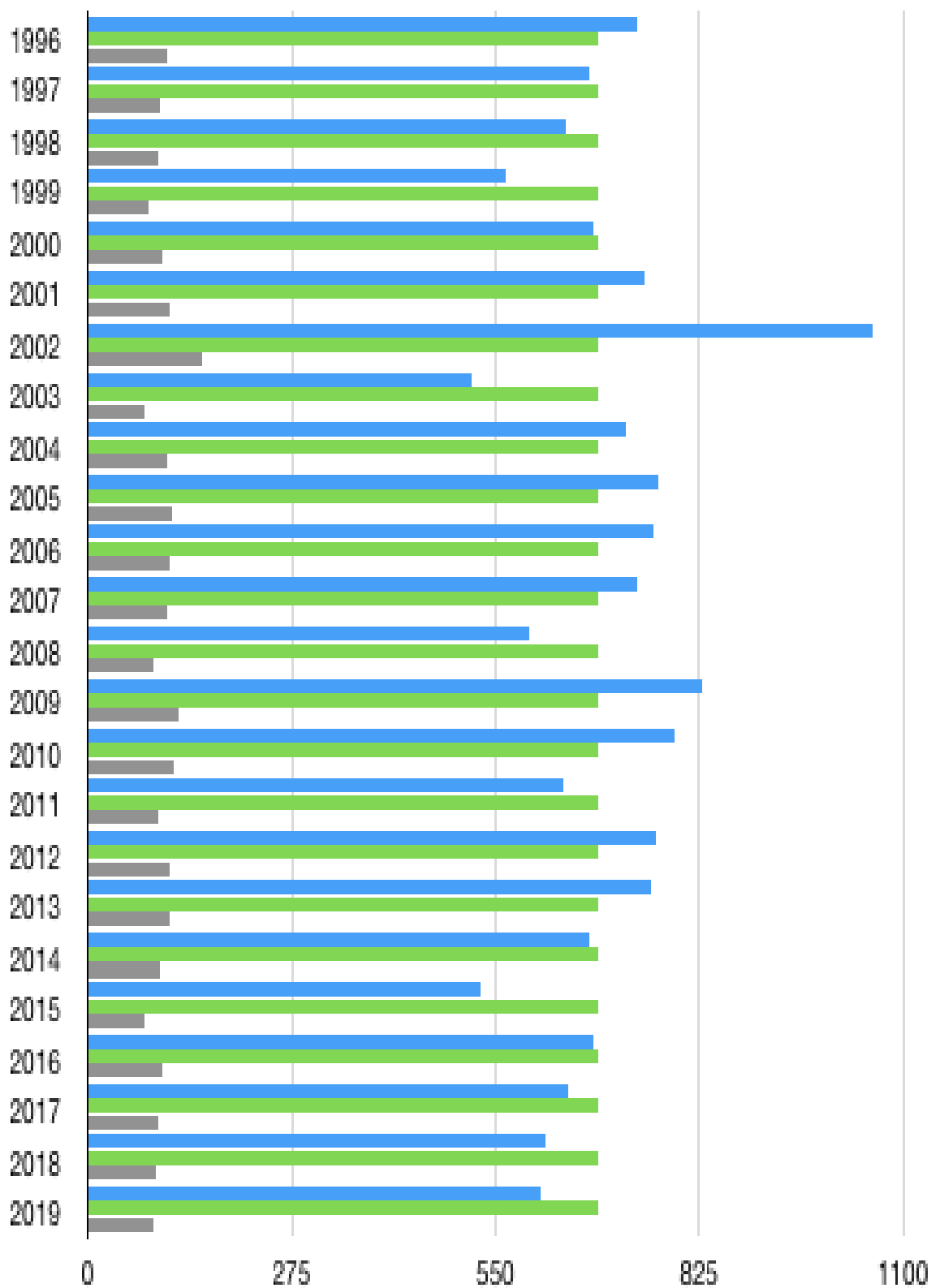


■ = teplota vzduchu [°C], ■ = dlouhodobý normál teploty vzduchu 1981-2010 [°C],  
 ■ = odchylka od normálu [°C]

#### 4.6.1.3. Územní srážky

Graf č. 4





■ = úhrn srážek [mm], ■ = dlouhodobý srážkový normál 1981-2010 [mm], ■ = úhrn srážek v % normálu 1981–2010.

#### 4.6.2. Pěstování na pozemku ZF JU v Č.B.

Dne 12. 6. 2019 bylo vysazeno na pozemek ZF JU v Č.B. 100 rostlin kotvičnicku zemního. Vysazené rostliny vypadaly velmi dobře. Rostliny byly vysazeny poměrně malé, s měkkými stonky.

Obrázek č. 57



Foto: autor

Dne 4. 7. 2019 proběhla kontrola a postřik rostlin. Rostliny se navzdory velkým suchům ujaly dobře. Mají tmavě zelené lístky a pevnější, dřevnatější stonky zbarvené do hněda. V rostlinách je plevel, ale kotvičnick ohrožuje naprosto minimálně. Rostliny vypadají zdravě, kvetou, semení, plody jsou ještě poměrně malé a zelené a i přes velké sucho se jim daří dobře.

Postřik proběhl časně z rána. Na 20 rostlin se použilo 0,75 l kyseliny acetylsalicylové (ASA) v nízké, střední a vysoké koncentraci. NanoFyt Si<sup>®</sup> (1 ml komerčního preparátu na 10 l vody) taktéž v množství 0,75 l a voda taktéž.



Obrázek č. 58



Foto: autor

Dne 15. 7. 2019 byl provedený odběr vzorků z pozemku ZF JU v Č.B. k analýzám, které se budou dělat na katedře aplikované chemie ZF JU v Č.B. Rostlinám se daří dobře, zaplevelení je už poměrně vysoké, ovšem rostliny nijak neohrožuje ani neomezuje. Řádky už nejsou vůbec vidět, ovšem jednotlivé parcelky jsou stále rozpoznatelné.



Obrázek č. 59



Foto: autor

Obrázek č. 60



Foto: autor

Dne 27. 7. 2019 byl časně z rána provedený druhý postřik rostlin, kyselinou acetylsalicylovou (ASA), NanoFytem Si<sup>®</sup> a vodou.

Spotřeba kyseliny acetylsalicylové (ASA), NanoFytu Si<sup>®</sup> a vody byla 0,5l od každé koncentrace.

Kotvičnick roste velmi uspokojivě, ovšem pole je poměrně málo udržované a vyskytuje se značné zplevelení, které ale stále rostliny nijak neohrožuje. Jednotlivé parcelky už skoro nejsou rozpoznatelné, tím jak se kotvičnick rozrostl a nijak se nesklízel.



Dne 20. 8. 2019 proběhla kontrola rostlin na pozemku ZF JU v Č.B. Parcelky jsou poměrně špatně rozpoznatelné, tím jak jsou už rostliny velké. Zaplevelení je již poměrně silné, je potřeba pro příští výsev použít černou tkaninu, tak jako v Meclově. Jinak jsou ale rostliny zdravé, bez viditelného poškození škůdci a mají dostatek vody.

Rostliny byly potřetí ošetřeny kyselinou acetylsalicylovou (ASA) a NanoFytem Si®.

Použilo se 0,5l ASA na každou koncentraci a 0,5l NanoFytu Si®.

Obrázek č. 61



Foto: Vytiska Petr Bc.

Dne 2. 9. 2019 jsou rostliny na pozemku ZF JU v plném květu. Jsou slabší, než před první sklizní. Lodyhy jsou pořád zelené, nejsou dřevnaté. Plazí se po sobě do výšky asi 50 cm. Rostliny se zdají být větší než byly při první sklizni, jsou zdravé, lodyhy jsou poměrně tenké, užší než před první sklizní. Semena mají 1 cm v průměru, nejsou ještě zralá. Rostliny jsou úplně zdravé, bez známek poškození či napadení škůdci.

Obrázek č. 62



Foto: autor



Dne 1. 10. 2019 proběhla sklizeň kotvičnicku na pozemku ZF JU. Rostliny byly jako v Meclově nenapadené škůdci, plísněmi či houbami. Díky méně deštivému počasí zvadlo 1 % rostlin. Porost byl ale jinak zdravý, před koncem vegetace. Rostliny odkvetly, semena byla zelená, ne plně zralá, veliká od 3 milimetrů do 1 centimetru. Největší rostliny dorůstaly jednoho a půl metru, lodyhy byly od 2 do 5 mm silné, zelené barvy, nezdřevnatělé.

Obrázek č. 63



Foto: autor

## 4.7. Výsledky

### 4.7.1. HPLC analýza ZF JU v Č.B.

Stanovení sledovaných látek proběhlo na katedře aplikované chemie ZF JU v Č.B podle metodiky “A simple method for determination of protodioscin in *Tribulus terrestris* L. and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography using diode array detection” (Shishovska et al. 2015).

Odebralo se 10 vzorků o hmotnosti 50 g z rostlin poprvé ošetřených kyselinou acetalsalicylovou a NanoFytem Si<sup>®</sup> z pozemku ZF JU v Č.B.(nať), rostlin ze skleníku ZF JU v Č.B. (kořen a nať) a z Meclova (nať), které byly usušeny a v laboratoři zhomogenizovány.

Následně se navážilo 0,24 g od každého vzorku ve čtyřech opakováních. Poté se nadrcené rostliny smíchaly s 10 ml acetonitrilu a byly vloženy na 20 min do přístroje s ultrazvukem. V dalším kroku se vzorky vložily na 20 min do odstředivky. Po vyndání se doplnila hladina acetonitrilu po rysku a následně proběhla filtrace. Vzorky byly označené 1-8 TT, opakování byly ve většině případů 4.

1-1	0,2456g	3-1	0,2408g	5-1	0,2412g	7-1	0,2483g
1-2	0,2526g	3-2	0,2462g	5-2	0,2441g	7-2	0,2481g
1-3	0,2437g	3-3	0,2480g	5-3	0,2422g	7-3	0,2447g
1-4	0,2437g	3-4	0,2432g	5-4	0,2462g	7-4	0,2413g
2-1	0,2437g	4-1	0,2243g	6-1	0,2428g	8-1	0,2453g
2-2	0,2413g	4-2	0,2438g	6-2	0,2485g	8-2	0,2408g
2-3	-----	4-3	0,2415g	6-3	0,2421g	8-3	0,2429g
2-4	-----	4-4	0,2466g	6-4	0,2472g	8-4	0,2471g

Kdy: 1-1 až 1-4 = vzorek nadzemní hmoty rostliny ze skleníku  
2-1 až 2-4 = vzorek kořenů rostliny ze skleníku  
3-1 až 3-4 = vzorek rostliny z pozemku ZF JU ošetřené vodou  
4-1 až 4-4 = vzorek rostliny z pozemku ZF JU ošetřené NanoFytem Si<sup>®</sup>  
5-1 až 5-4 = vzorek rostliny z pozemku ZF JU ošetřený ASA 10<sup>-5</sup> mol.l<sup>-1</sup>  
6-1 až 6-4 = vzorek rostliny z pozemku ZF JU ošetřený ASA 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>  
7-1 až 7-4 = vzorek rostliny z pozemku ZF JU ošetřený ASA 10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup>  
8-1 až 8-4 = vzorek rostliny z Meclova

Stanovení biologicky účinných látek se katedře aplikované chemie nepodařilo, díky špatně zvolené metodice stanovení.

Vzorky ke stanovení na VŠCHT byly odebrány jen z rostlin sklizených, tedy po třetím postřiku a to z důvodu nedostatečného množství vzorků. Když vyšlo najevo, že výsledky z postřiku 1 nebudou, bylo pozdě na odebrání vzorků z postřiku 2, protože bylo těsně po postřiku 3.

Obrázek č. 64

	diosgenin		protodioscin	
	µg/g	RSD (µg/g)	µg/g	RSD (µg/g)
Kotvičnick Meclov (nať)	3,24	0,19	0,52	0,03
Kotvičnick H2O (nať)	6,16	0,48	1,71	0,13
Kotvičnick Nanofit Si (nať)	1,08	0,06	0,89	0,09
Kotvičnick ASA vysoká (nať)	1,73	0,15	0,87	0,09
Kotvičnick ASA střední (nať)	1,36	0,08	0,51	0,05
Kotvičnick ASA nízká (nať)	2,21	0,18	0,56	0,04
Kotvičnick Meclov (plod)	23,70	0,91	1,22	0,07
Kotvičnick H2O (plod)	2,39	0,21	1,58	0,08
Kotvičnick Nanofit Si (plod)	4,09	0,33	0,99	0,09
Kotvičnick ASA vysoká (plod)	4,25	0,34	0,88	0,07
Kotvičnick ASA střední (plod)	4,94	0,37	1,11	0,08
Kotvičnick ASA nízká (plod)	2,66	0,06	1,36	0,14
<b>LOQ</b>	<b>µg/g</b>			
diosgenin	0,5			
protodioscin	0,5			

Zdroj: Bafa VŠCHT, Praha 2020

RSD = relative standard deviation (relativní směrodatná odchylka).

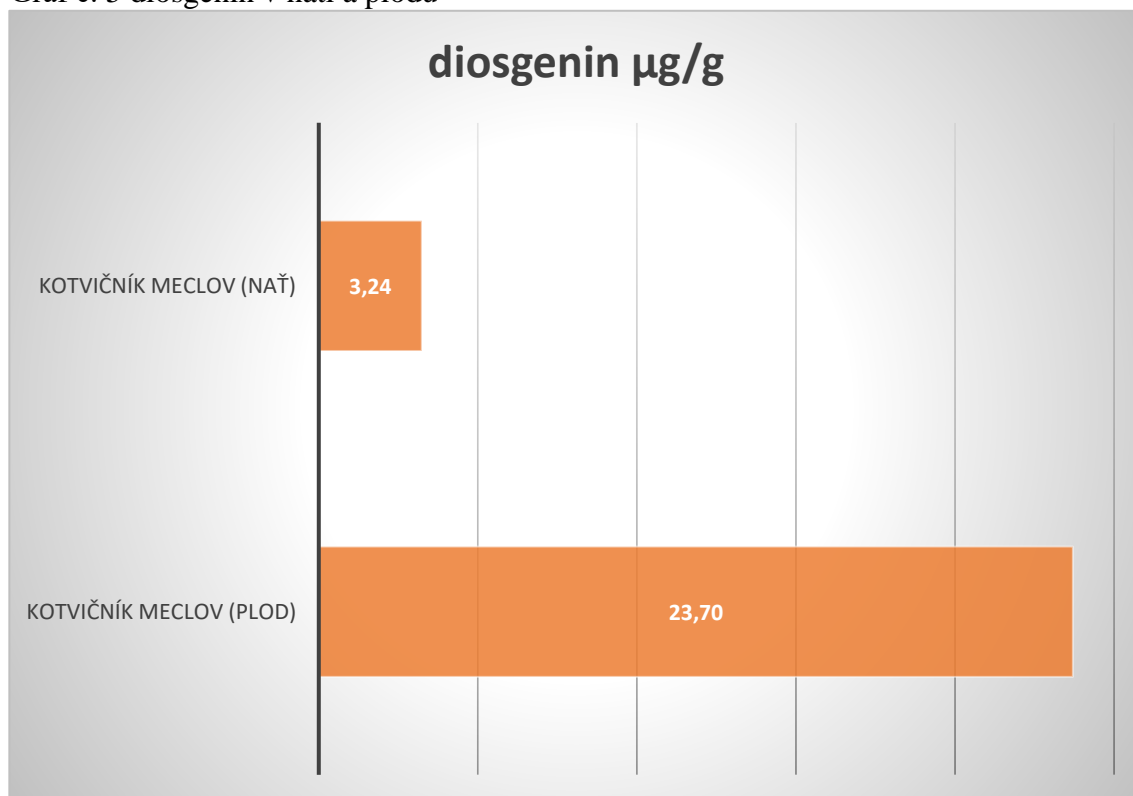
Směrodatná odchylka vypovídá o tom, nakolik se od sebe navzájem typicky liší jednotlivé případy v souboru zkoumaných hodnot. Je-li malá, jsou si prvky souboru většinou navzájem podobné, naopak velká směrodatná odchylka signalizuje velké vzájemné odlišnosti.

LOQ = limit of quantification (mez stanovitelnosti)

Určuje jaké množství analytu lze s definovanou přesností ještě stanovit.

#### 4.7.2. Meclov

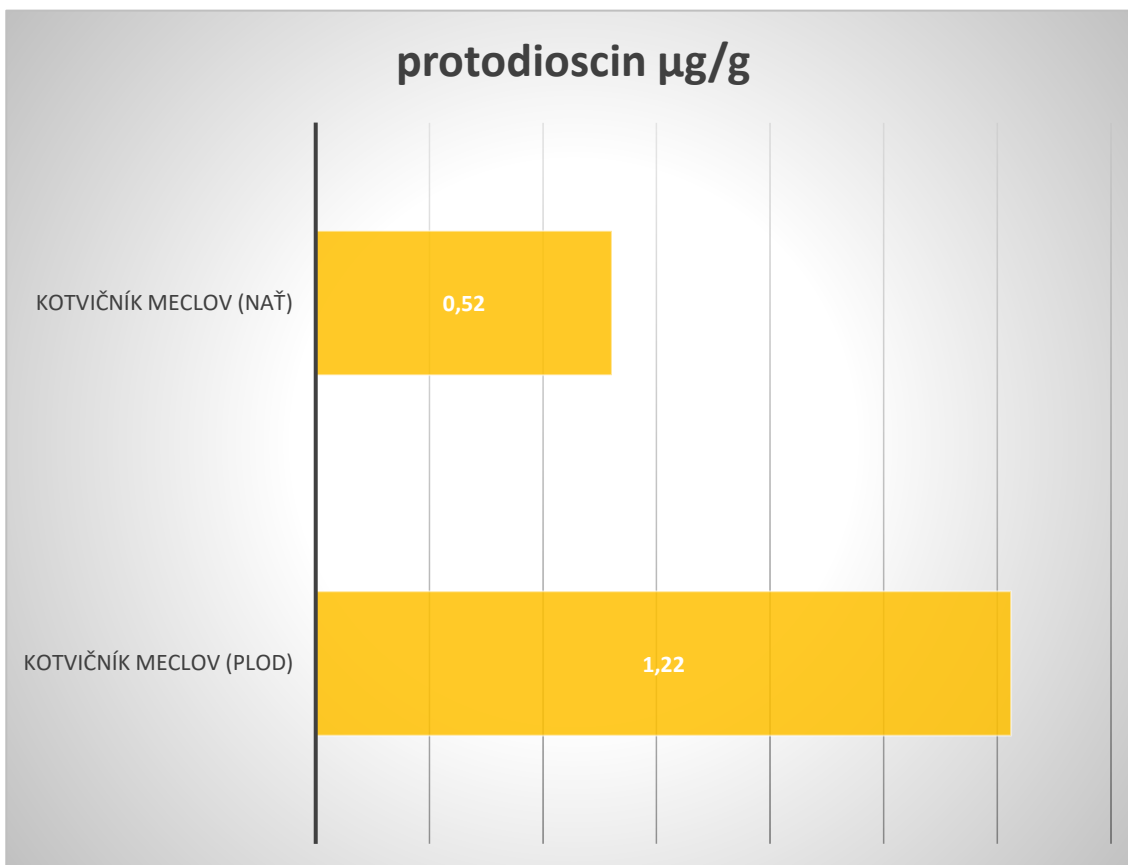
Graf č. 5 diosgenin v nati a plodu



Největší obsah diosgeninu z celého pokusu byl naměřený v plodech kotvičnicku pěstovaném v Meclově. Druhý největší obsah diosgeninu z celého pokus byl naměřený v nati. Rostliny byly vysazeny jako sazenice na pole, na kterém byla položena černá netkaná textilie aby se co nejvíce zamezilo růstů plevelů. Spon, ve kterém byly rostliny pěstované, měl rozměry 15 x 60 cm.



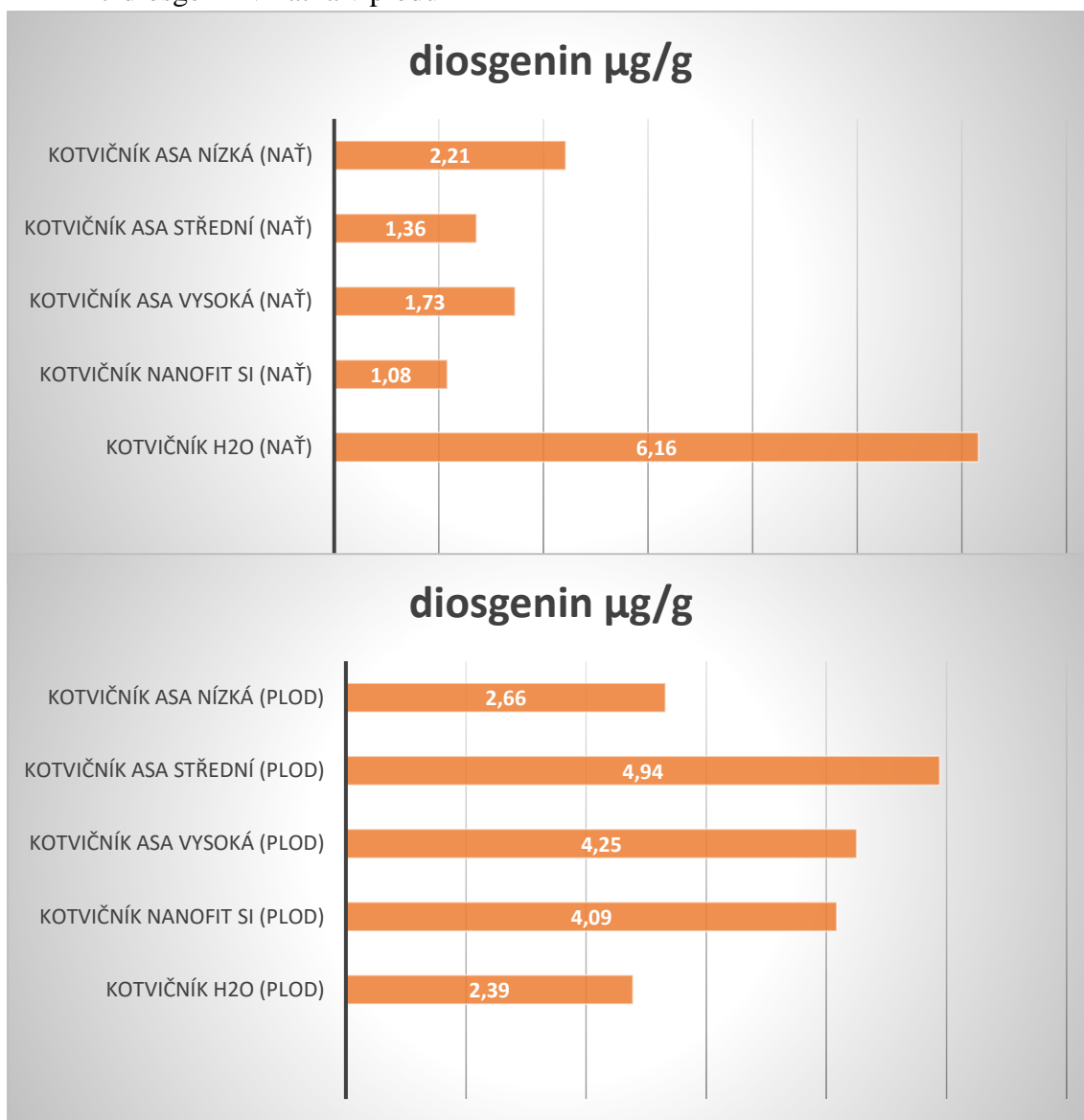
Graf č. 6 protodioscin v nati a plodu



Obsah protodioscinu, jak v nati tak i plodech kotvičníku pěstovaném v Meclově, byl v porovnání se všemi výsledky průměrný.

### 4.7.3. Maloparcelkový pokus ZF JU v Č.B.

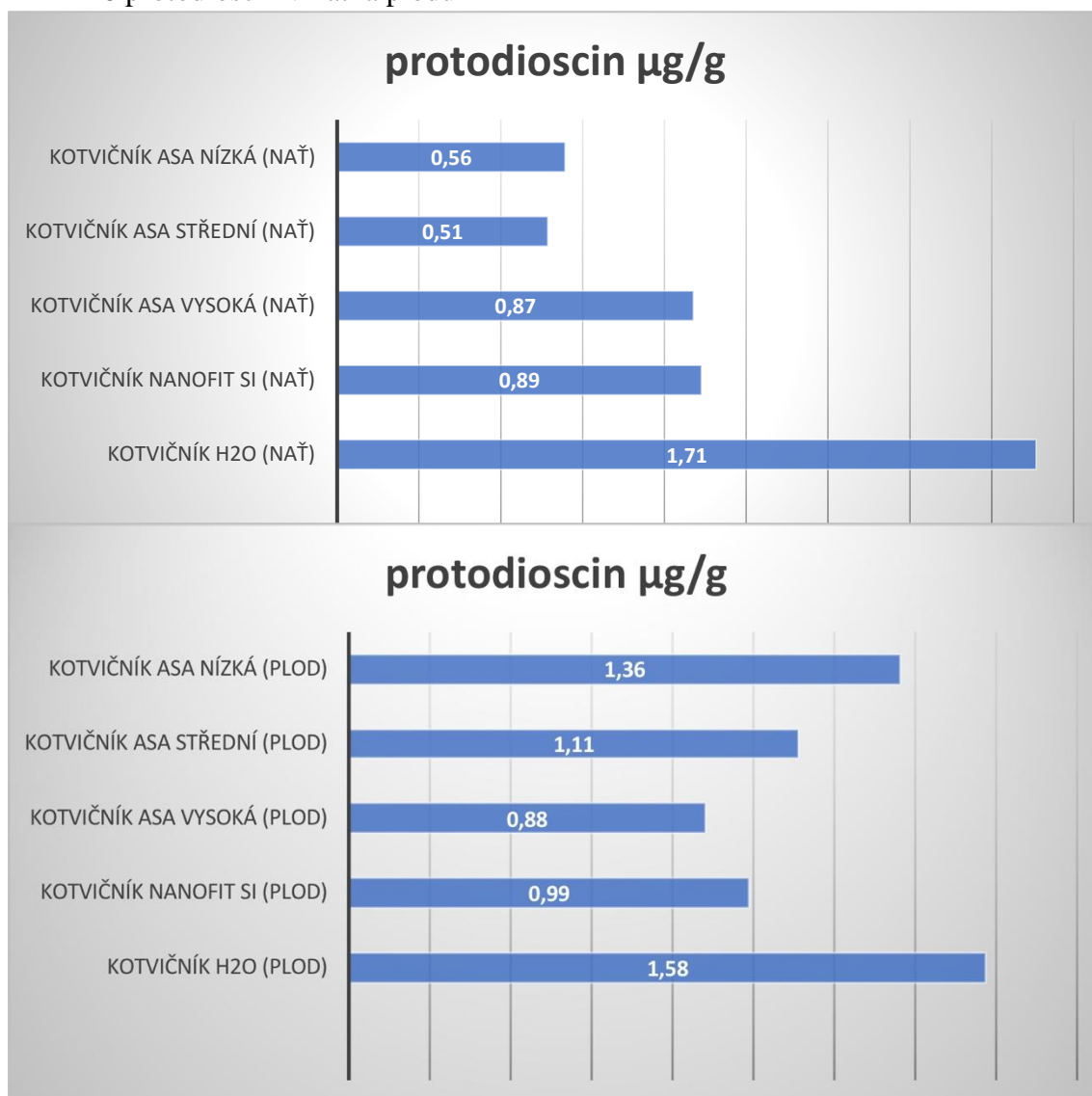
Graf č. 7 diosgenin v nati a v plodu



Z grafu číslo 7 vyplývá, že největší vliv na obsah diosgeninu v nati kotvičnicku měl kontrolní postřik vodou. Kyselina acetylsalicylová (ASA) ve všech koncentracích a NanoFyt Si<sup>®</sup> obsah diosgeninu v nati, oproti kontrolnímu postřiku vody, snížily.

Největší obsah diosgeninu v plodech kotvičnicku byl naopak pozorovaný u postřiku kyseliny acetalsalicylové (ASA) ve střední koncentraci  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>.

Graf č. 8 protodioscin v nati a plodu



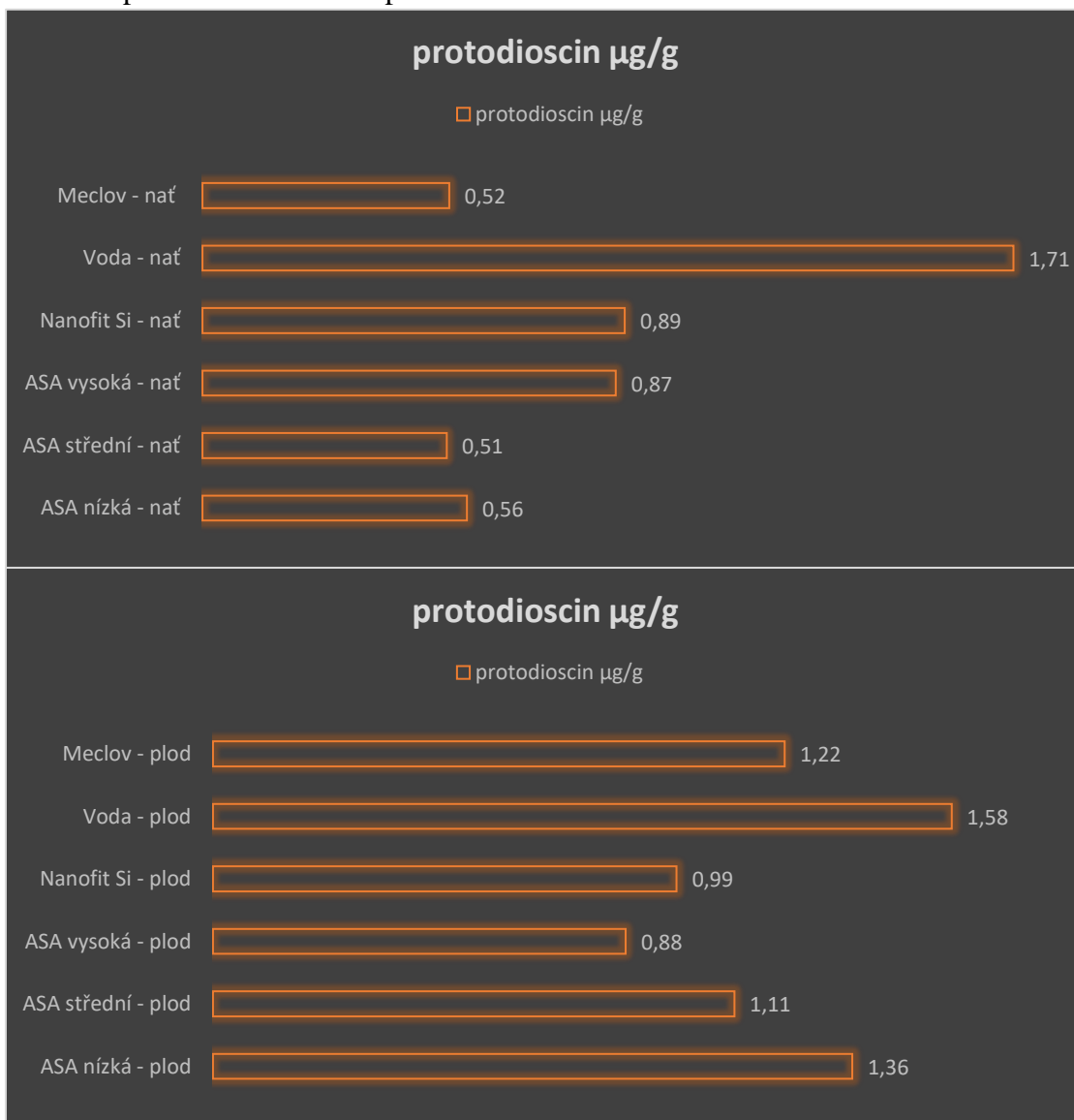
Z grafu číslo 8 je patrné, že největší vliv na obsah protodioscinu v nati a plodech kotvičnicku měl kontrolní postřik vody. Kyselina acetylsalicylová (ASA) ve všech koncentracích a Nanofyt Si<sup>®</sup> obsah protodioscinu v nati a plodu, oproti kontrolnímu postřiku vody, snížily.

#### 4.7.4. Porovnání Meclova a maloparcelkového pokusu na pozemku ZF JU v Č.B.

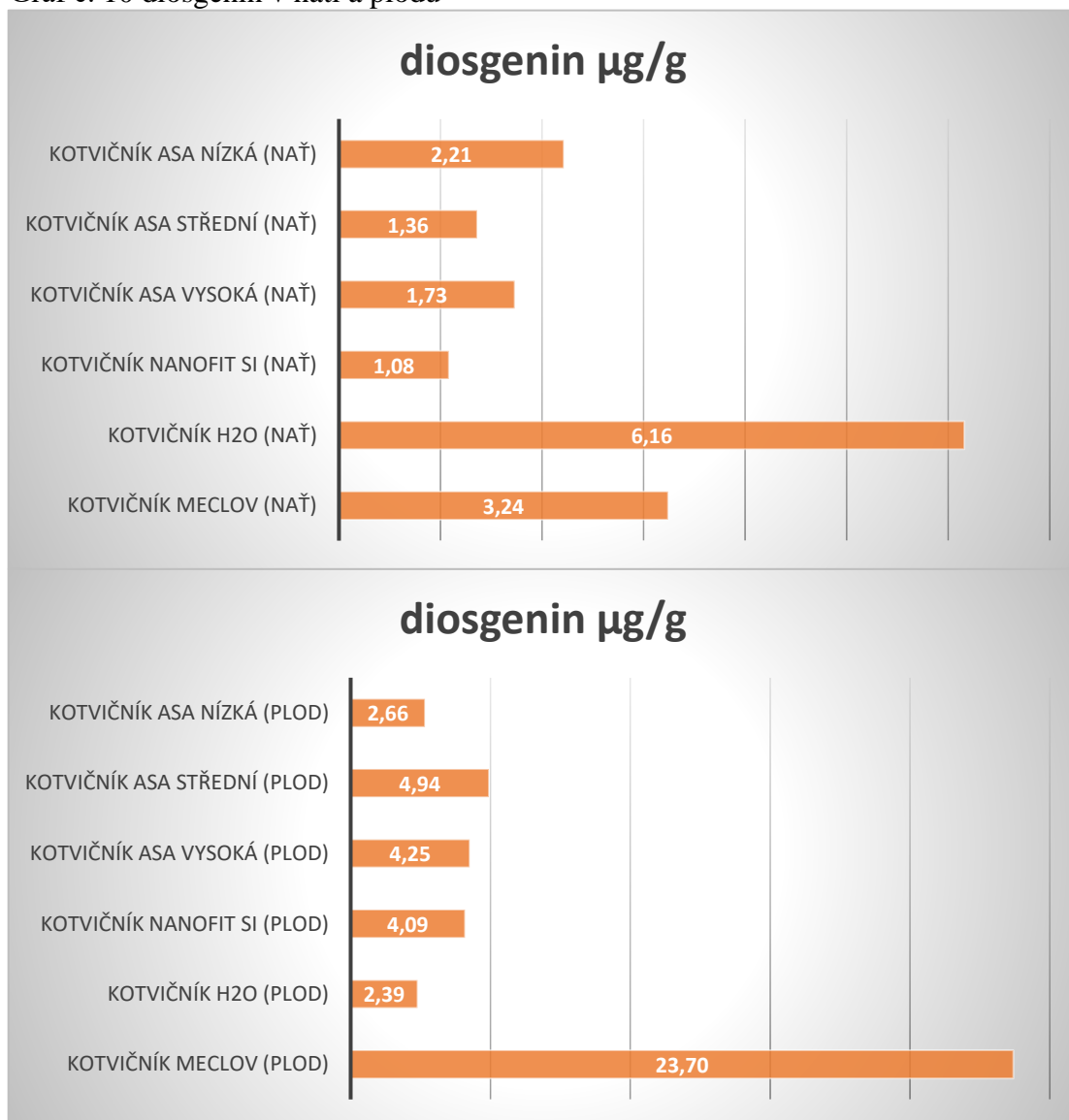
Zde jsou uvedeny grafy, které znázorňují protodioscin a diosgenin v nati a plodu z Meclova a pokusného pozemku ZF JU v Č.B.

Porovnat rostliny mezi těmito dvěma lokalitami nelze, protože podmínky pěstování byly odlišné, půda ve které rostliny byly pěstované byla odlišná a počasí se také lišilo.

Graf č. 9 protodioscin v nati a plodu



Graf č. 10 diosgenin v nati a plodu



## 2.7.4. Vliv vegetační fáze rostliny na obsah biologicky aktivních látek

Rozdílné obsahy látek 1-7 v nadzemní hmotě rostliny jsou závislé na růstové fázi rostliny.

Pro porovnání byly použity vzorky rostlin z Bulharska (Plovdivu) a Íránu (Mashhad) byly použity pro porovnání. Výsledky z těchto od sebe vzdálených zemí jsou si podobné.

Obsah saponinů 1-5 vzrostl kvetením rostliny a trval po celou dobu květu. Po odkvetení se obsahy sloučenin 1-5 snížily a dosáhly svého minima před začátkem semenění. V průběhu tvorby semen se obsahy znovu zvýšily. Na konci vegetace se zejména obsah protodioscinu v kotvičnicku v Íránu výrazně snížil.

Největší akumulace sledovaných látek byla v době květu, co se Bulharského kotvičnicku týče.

U kotvičnicku z Íránu byla největší koncentrace zaznamenána v době před kvetením.

Obrázek č. 65 obsah saponinů 1-6 a rutinu (7) v nati kotvičnicku

Content of saponins 1-6 and rutin (7) in the aerial parts of *T. terrestris* depending on the stage of plant development ( $\mu\text{g/g}$  of dry wt)

Sample	Stage	1	2	3	4	5	6	7
Bulgaria, Plovdiv – <i>glabr. fr.</i>								
29.05.05	Pre-flowering	3506.2	3547.4	214.4	162.2	211.5	57.9	443.2
28.06.05	Flowering	3749.5	3580.4	144.0	185.5	548.1	15.0	404.2
25.07.05	Flowering-seeding	2240.7	2615.3	89.5	126.7	382.1	2.2	113.5
23.08.05	Flowering-seeding	1956.7	1977.7	4.7	37.7	51.8	11.8	111.5
27.09.05	Seeding	2069.0	2713.7	61.1	70.6	86.4	14.7	118.0
Iran, Mashhad – <i>hirsut. fr.</i>								
02.07.05	Pre-flowering	5090.3	3645.7	1.5	30.4	45.6	–	106.9
01.08.05	Flowering-seeding	1060.1	874.5	1.4	10.4	13.9	–	92.3
20.09.05	Seeding	2270.3	2614.5	7.9	43.7	63.6	2.0	23.3
20.11.05	Seeding	268.3	1663.3	–	30.3	167.1	–	–

Zdroj: Dinchev et al. (2007)

Obrázek č. 66

Compound	Genin	Name	R
1	I	protodioscin	$-\beta\text{-D-Glc}^4\text{-}\alpha\text{-L-Rha}$
2	I	prototribestin	$-\beta\text{-Glc}^2\text{-}\alpha\text{-Rha}$ OSO <sub>3</sub> Na
3	II	pseudoprotodioscin	$-\beta\text{-D-Glc}^4\text{-}\alpha\text{-L-Rha}$
4	III	dioscin	$-\beta\text{-D-Glc}^4\text{-}\alpha\text{-L-Rha}$
5	III	tribestin	$-\beta\text{-Glc}^2\text{-}\alpha\text{-Rha}$ OSO <sub>3</sub> Na
6	IV	tribulosin	$-\beta\text{-D-Gal}^4\text{-}\beta\text{-D-Glc}^3\text{-}\beta\text{-D-Xyl}$ $\alpha\text{-L-Rha}$
7	V	rutin	$-\beta\text{-D-Glc}^6\text{-}\alpha\text{-L-Rha}$

Zdroj: Dinchev et al. (2007)

### **2.7.5. Vliv sklizně na obsah sledovaných látek v Meclově a na pozemku ZF JU v Č.B.**

Z obrázku č. 65 obsah saponinů 1-6 a rutinu (7) v nati kotvičnicku je zřejmé, že obsah saponinů v kotvičnicku velmi závisí na době sklizně.

Lze tedy předpokládat, že sklizeň v Meclově, která byla provedena 25. 9. 2019, kdy rostlina už vytvořila plody a byla na konci vegetace, měla výrazný vliv na obsah sledovaných látek, protodioscinu a diosgeninu. Jelikož rostliny byly vzrůstově větší a byly vysety dříve než rostliny na pozemku ZF JU v Č.B., lze říci, že díky této skutečnosti měly rostliny větší obsah diosgeninu v plodu.

Rostliny kotvičnicku z pokusného pozemku ZF JU v Č.B. byly sklizeny 1. 10. 2019, je pravděpodobné, že nízký obsah látek byl způsobený pozdním termínem sklizně, kdy rostliny byly na konci vegetace.

Ing. Petr Bartoš ve své diplomové práci rostliny sklízel 8. 9. 2014, což bylo o 17 dní dříve než byla sklizeň v Meclově a 24 dní před sklizní na pozemku ZF JU v Č.B., lze předpokládat, že díky včasné sklizni, kdy rostlina nebyla na konci vegetace, ale teprve před jejím koncem, mělo vliv na obsah sledovaných látek v rostlině.

Dalším důvodem může být i rozdílný původ semen, o kterém se ale Ing. Bartoš ve své práci nezmiňuje. Rostliny z různých oblastí mají velmi významné rozdíly ve složení biologicky aktivních látek.

#### 4.8. Návrh pěstování pro malou farmu pro největší výnos nadzemní hmoty

Z této práce plyne, že nejlepším způsobem pěstování je pěstovat rostliny na poli s netkanou textilií. Pěstování kotvičnicku je spíše záležitostí ruční práce, protože díky tvaru plodů je velmi těžké kotvičnick zasít strojově. Plody v půdě navíc klíčí velmi neochotně. Sklidit strojově kotvičnick je také poměrně složité. Navíc, kotvičnick má velmi malou konkurenční schopnost v rané fázi růstu, proto je ideální použít netkanou textilií, aby se zamezilo výskytu plevelů, jako tomu bylo při pěstování na pozemku ZF JU v Č.B.

První krok by tedy měl být vysadit rostliny ve skleníku. Až rostliny vzejdou, v závislosti na počasí, je přesadit na pole. Je potřeba aby se rostliny vysadily na pole až po přejití posledních ranních mrazíků, jinak nepřežijí.

Pole na které rostliny budeme vysazovat je dobré na podzim zorat, aby se provzdušnila půda a přes zimu vymrzli škůdci a plevele. Hnojit není potřeba. Těsně před výsevem je potřeba půdu zvláčet a natáhnout černou netkanou textilií.

Rostliny následně sít ve sponu 15x60 cm. Pokud to je možné, zasazené rostliny ihned zalít vodou, aby měly dostatek vláhy, než zapustí kořeny do půdy.

Termíny sklizně pro kotvičnick nejsou. Porost můžeme sklidit 2 – 3x za vegetaci jako tomu bylo v Meclově.

Kotvičnick nemá smysl pěstovat na veliké ploše. Není to tímto způsobem ani možné, jak z finančního hlediska tak i z hlediska lidských sil. Ideální plocha, kterou zvládne obhospodařit pár lidí je asi 5 arů. Což by mohlo být teoreticky 5 000 rostlin, pokud budeme vycházet z pěstování v Meclově. Pokud bude klíčivost jako v této práci, budeme muset vysít zhruba 27 800 kusů semen. Na to bude potřeba skleníků o velikosti přibližně 60 m<sup>2</sup>, pokud budeme vycházet z velikosti skleníku a počtu vysazených semen v této práci.

Na rozdíl od Meclova se vysadí 1 000 rostlin na 1 ar. To ve výsledku bude 5 000 rostlin.

Pokud spočítáme výnos v Meclově, kdy se z 1 300 rostlin sklidilo 300 kg nati, zjistíme, že z 1 000 rostlin získáme asi 230 kg v jedné sklizni. Pokud budeme postupovat jako v Meclově, za dvě sklizně sklidíme 460 kg hmoty z jednoho aru. Z pěti arů tedy sklidíme 2 300 kg čerstvé hmoty. Pokud bude poměr sesychání 1:5, výsledné množství bude 460 kg. Jedno kilo suché natě lze prodat až za 6 000 Kč (viz Jikl.cz). Potenciální hrubý výtěžek tedy z 5ti arů je 2 760 000 Kč. Samozřejmě za předpokladu, že takové množství bude reálné na tak malém trhu v České Republice prodat.



Pokud budeme chtít znát reálnou čistou částku, musíme dopočítat náklady na zpracování půdy, semena, substrát, sadbovací misky, netkanou textílii a zaměstnance.

Náklady na zpracování půdy, podle ceníku společnosti AGRODOS spol. s r.o. bude potřeba vynaložit:

podmítka	- 560 Kč/ha
hluboká orba	- 1400 Kč/ha
předseťová příprava	- 600 Kč/ha
<b>celkem tedy</b>	<b>- 2560 Kč/ha -&gt; 5 a = 128 Kč</b>

Na plochu 5 a bude potřeba 5000 rostlin. Při klíčivosti 18,88 % bude potřeba pořídit cca 26 500 ks semen. Zahradnictví Jíkl prodává 20 ks semen za 30 Kč. To odpovídá 1325 balíčků při ceně 30 Kč za kus. Tedy celkem **39 750 Kč** za semena. Jako substrát zvolíme ten nejlevnější – Agro substrát zahradnický 75 l s cenou 149 Kč. Pořídíme pouze výsevnou misku TK3040 F s rozměry 39 x 29 x 5,5 cm, objemem cca 6 l a cenou 25 Kč za kus. Do každé této misky vysadíme 100 semen. Budeme tedy těchto misek potřebovat 265 s cenou **6 625 Kč**. Celkem do těchto misek budeme potřebovat 1590 l substrátu, což je 21,2 pytle s cenou **3 159 Kč**. Na takové množství výsevních misek bude potřeba skleník o velikosti alespoň 40 m<sup>2</sup>. V případě, že takový skleník je potřeba koupit, cena bude **44 167 Kč** (skleník Volha 12 x 3,3m, 8 mm polykarbonát). Pokud bude sázet jeden zaměstnanec, stráví nad zasetím semen alespoň 3 pracovní dny. Jelikož je toto práce důležitá a musí být provedená precizně, počítejme s odměnou 200kč na hodinu. To je celkem 22,5 h s výslednou částkou **4 500 Kč**. Netkaná textílie Meclov stála 15 Kč za jeden čtvereční metr, tedy 5 a = 500 m<sup>2</sup>. Cena netkané textílie bude tedy **7 500 Kč**.

V prvním roce pěstování budou náklady na vypěstování: 128 + 39 750 + 6 625 + 3 159 + 44 167 + 4 500 + 7 500 = **105 829 Kč**

S alespoň 2 sklizněmi je potřeba připočítat práci zaměstnanců. 4 zaměstnanci za jeden den sklídí a usuší rostliny. To je 7,5 h x 4 -> tedy 30 h při odměně 200 Kč na hodinu to je 6 000 Kč za první a 6 000 Kč za druhou sklizeň.

V prvním roce pěstování i se sklizní činí celkové náklady 105 829 + 6 000 + 6 000 = **117 829 Kč**.

Výdělek z 5 a po odečtení nákladů bude tedy 2 760 000 – 117 829 = **2 642 171 Kč**.

V druhém roce pěstování i se sklizní budou náklady menší o semena, skleník, výsevní misky a netkanou textílii. Tedy teoretický čistý výdělek bude **2 740 213 Kč**.

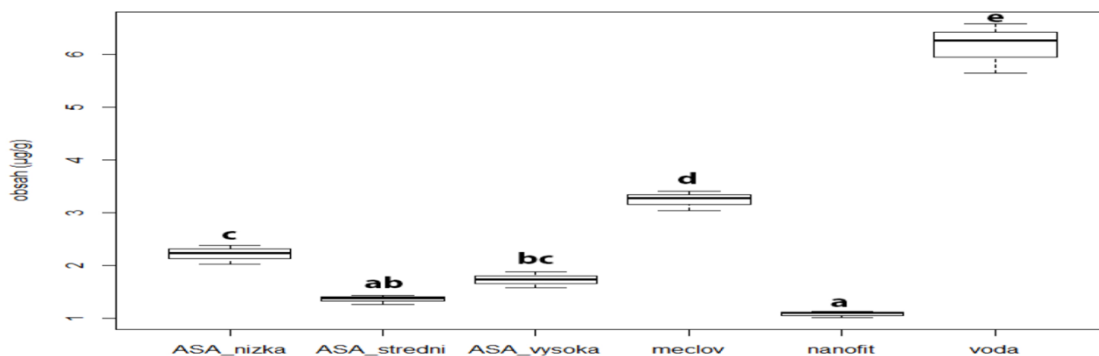
Je potřeba vzít v úvahu, že kotvičnick se prodává od 1000 Kč za 1 kg do 6000 Kč za 1 kg usušené nati. V realitě je možné prodat kotvičnick po odečtení nákladů mezi 440 213 a 2 740 171 Kč.

## 4.9. Statistické zpracování dat

### 4.9.1. Diosgenin v nati kotvičnicku

Písmena v závorce označují pořadí (první písmeno abecedy = nejnižší hodnota). Pokud jsou dvě (nebo více písmen) u jedné hodnoty, pak to znamená, že mezi variantami, které sdílejí jedno (nebo více) písmen, není průkazný rozdíl.

Graf č. 11 obsah diosgeninu v nati kotvičnicku



Zdroj: R core team (2019)

Obsah diosgeninu v nati kotvičnicku je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA), [ $F_{(5,12)} = 195.40$ ,  $P = 4.6 \times 10^{-11}$ ]. Porovnání jednotlivých variant bylo post-hoc provedeno testem TukeyC.

#### 4.9.1.1. Statisticky neprůkazný obsah diosgeninu v nati mezi ošetřeními

Obsah diosgeninu v nati kotvičnicku není průkazně rozdílný mezi ošetřeními NanoFyt Si<sup>®</sup> (a) a ASA střední (ab). Dále mezi ASA vysoká (bc) a ASA nízká (c).

#### 4.9.1.2. Statisticky průkazný obsah diosgeninu v nati mezi ošetřeními

ASA nízká (c): ASA střední (ab), Meclov (d), NanoFyt Si<sup>®</sup> (a), voda (e)

ASA střední (ab): ASA nízká (c), Meclov (d), voda (e)

ASA vysoká (bc): Meclov (d), NanoFyt Si<sup>®</sup> (a), voda (e)

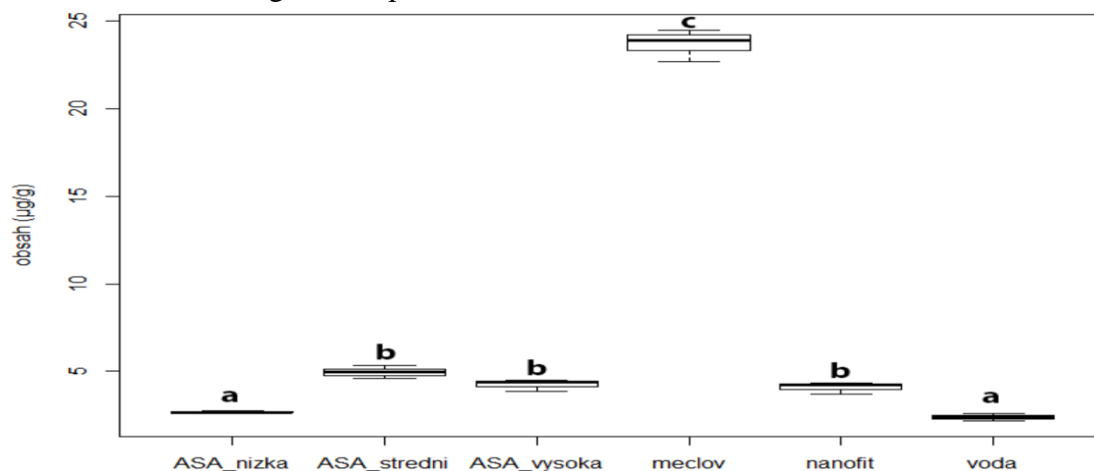
Meclov (d): ASA nízká (c), ASA střední (ab), ASA vysoká (bc), NanoFyt Si<sup>®</sup> (a), voda (e)

NanoFyt Si<sup>®</sup> (a): ASA nízká (c), ASA vysoká (bc), Meclov (d), voda (e)

Voda (e): ASA nízká (c), ASA střední (ab), ASA vysoká (bc), Meclov (d), NanoFyt Si<sup>®</sup> (a)

#### 4.9.2. Diosgenin v plodu kotvičnicku

Graf č. 12 obsah diosgeninu v plodu kotvičnicku



Zdroj: R core team (2019)

Obsah diosgeninu v plodu kotvičnicku je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí Welchova F-testu (jelikož je zde velké riziko porušení předpokladu homogeneity rozptylů), [ $F_{(5,4.93)} = 235.24, P = 7.3 \times 10^{-6}$ ]. Porovnání jednotlivých variant bylo post-hoc provedeno testem TukeyC (výsledky viz výpis z R a graf).

##### 4.9.2.1. Statisticky neprůkazný obsah diosgeninu v plodu mezi ošetřeními

Obsah diosgeninu v plodu kotvičnicku není průkazně rozdílný mezi ošetřeními ASA nízká (a) a voda (a). Dále mezi ASA střední (b) a ASA vysoká (b) a NanoFyt Si<sup>®</sup> (b).

##### 4.9.2.2. Statisticky průkazný obsah diosgeninu v plodu mezi ošetřeními

ASA nízká (a): ASA střední (b), ASA vysoká (b), Meclov (c), NanoFyt Si<sup>®</sup> (b)

ASA střední (b): ASA nízká (a), Meclov (c), voda (a)

ASA vysoká (b): ASA nízká (a), Meclov (c), voda (a)

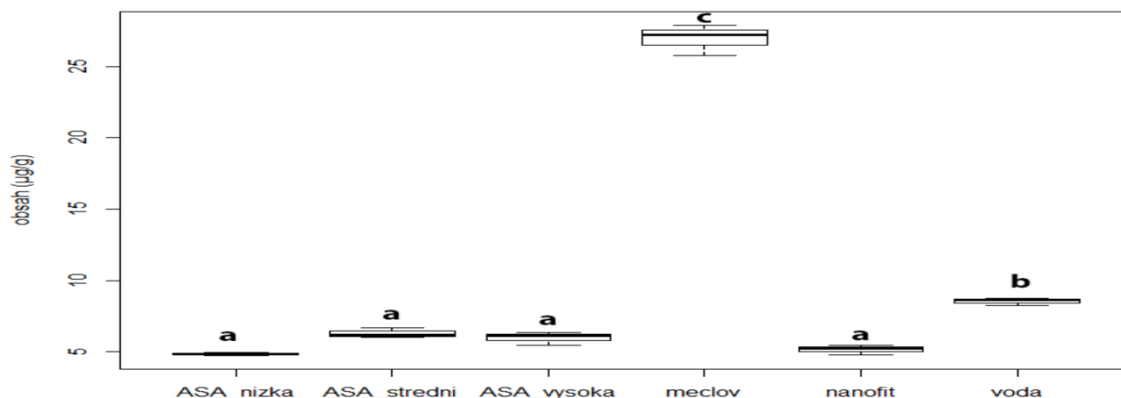
Meclov (c): ASA nízká (a), ASA střední (b), ASA vysoká (b), NanoFyt Si<sup>®</sup> (b), voda (a)

NanoFyt Si<sup>®</sup> (b): ASA nízká (a), Meclov (c), voda (a)

Voda (a): ASA střední (b), ASA vysoká (b), Meclov (c), NanoFyt Si<sup>®</sup> (b)

### 4.9.3. Diosgenin - celek

Graf č. 13 obsah diosgeninu ve směsi nati a plodů kotvičnicku



Zdroj: R core team (2019)

Obsah diosgeninu směsi nati a plodů kotvičnicku je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA), [ $F_{(5,12)} = 751.3$ ,  $P = 1.52 \times 10^{-14}$ ] Porovnání jednotlivých variant bylo post-hoc provedeno testem TukeyC.

#### 4.9.3.1. Statisticky neprůkazný obsah diosgeninu v nati a plodu mezi ošetřeními

Obsah diosgeninu v nati a plodu, v kotvičnicku jako celku, není průkazně rozdílný mezi ošetřeními ASA nízká (a) a ASA střední (a) a ASA vysoká (a) a NanoFyt Si<sup>®</sup>.

#### 4.9.3.2. Statisticky průkazný obsah diosgeninu v nati a plodu mezi ošetřeními

ASA nízká (a): Meclov (c), voda (b)

Meclov (c): ASA nízká (a), ASA střední (a), ASA vysoká (a), NanoFyt Si<sup>®</sup> (a), voda (b)

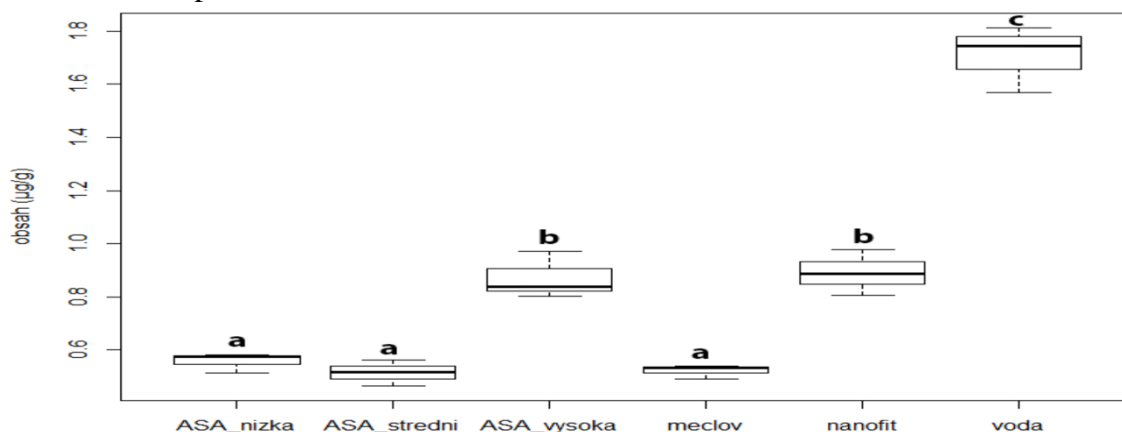
Voda (b): ASA nízká (a), ASA střední (a), ASA vysoká (a), Meclov (c), NanoFyt Si<sup>®</sup> (a)

#### 4.9.4. Diosgenin – interakce rostlina x ošetření

Obsah diosgeninu je u kotvičnicku průkazně ovlivněn interakcí mezi rostlinou a ošetřením. Ošetření má tedy u kotvičnicku jiný efekt na obsah diosgeninu v nati a v plodech. Testováno pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (two-way ANOVA), [ $F_{(5,24)} = 593.1$ ,  $P < 2 \times 10^{-16}$ ].

#### 4.9.5. Protodioscin v nati kotvičnicku

Graf č. 15 obsah protodioscinu v nati kotvičnicku



Zdroj: R core team (2019)

Obsah protodioscinu v nati kotvičnicku je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA), [ $F_{(5,12)} = 105.7$ ,  $P = 1.71 \times 10^{-9}$ ]. Porovnání jednotlivých variant bylo post-hoc provedeno testem TukeyC.

##### 4.9.5.1. Statisticky neprůkazný obsah protodioscinu v nati mezi ošetřeními

Obsah protodioscinu v nati není průkazně rozdílný mezi ošetřeními ASA nízká (a) a ASA střední (a) a Meclov (a). Dále mezi ASA vysoká (b) a NanoFyt Si<sup>®</sup> (b).

##### 4.9.5.2. Statisticky průkazný obsah protodioscinu v nati mezi ošetřeními

ASA nízká (a): ASA vysoká (b), NanoFyt Si<sup>®</sup> (b), voda (c)

ASA střední (a): ASA vysoká (b), NanoFyt Si<sup>®</sup> (b), voda (c)

ASA vysoká (b): ASA nízká (a), ASA střední (a), Meclov (a), voda (c)

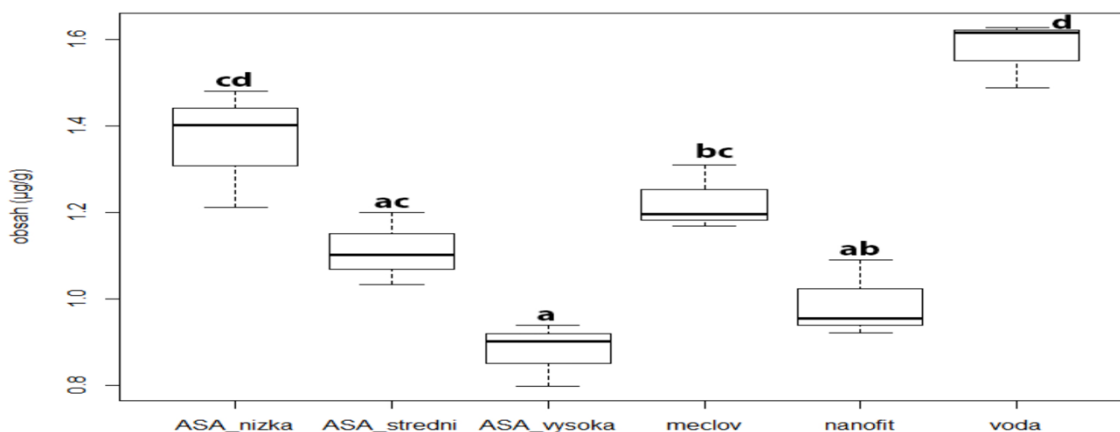
Meclov (a): NanoFyt Si<sup>®</sup> (b), voda (c)

NanoFyt Si<sup>®</sup> (b): ASA nízká (a), ASA střední (a), Meclov (a), voda (c)

Voda (c): ASA nízká (a), ASA střední (a), ASA vysoká (a), Meclov (a), NanoFyt Si<sup>®</sup>, voda (c)

#### 4.9.6. Protodioscin v plodu kotvičnicku

Graf č. 16 obsah protodioscinu v plodu kotvičnicku



Zdroj: R core team (2019)

Obsah protodioscinu v plodu kotvičnicku je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA), [F (5,12) = 22.87 P =  $9.47 \times 10^{-6}$ ]. Porovnání jednotlivých variant bylo post-hoc provedeno testem TukeyC.

##### 4.9.6.1. Statisticky neprůkazný obsah protodioscinu v plodu mezi ošetřeními

Obsah protodioscinu v plodu není průkazně rozdílný mezi ošetřeními ASA nízká (cd) a ASA střední (ac) a Meclov (bc) a voda (d). Dále mezi ASA vysoká (a) a ASA střední (ac) a NanoFyt Si<sup>®</sup> (ab).

##### 4.9.6.2. Statisticky průkazný obsah protodioscinu v plodu mezi ošetřeními

ASA nízká (cd): ASA vysoká (a), NanoFyt Si<sup>®</sup> (ab)

ASA střední (ac): voda (d)

ASA vysoká (a): ASA nízká (cd), Meclov (bc), voda (d)

Meclov (bc): ASA vysoká (a), voda (d)

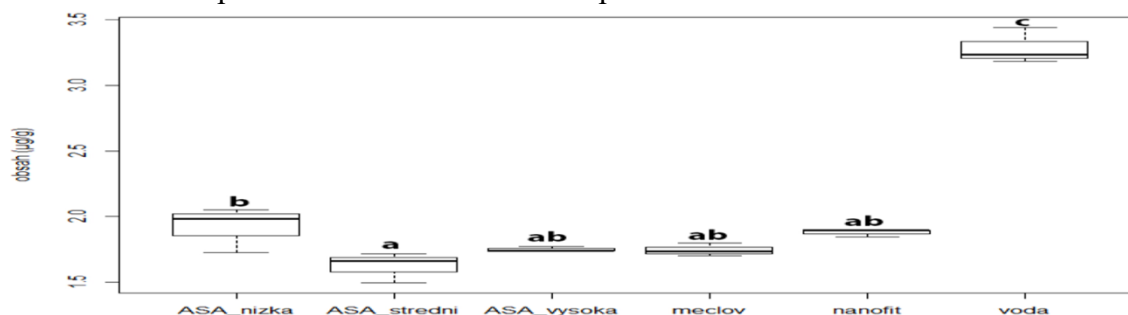
NanoFyt Si<sup>®</sup> (ab): ASA nízká (cd), voda (d)

Voda (d): ASA střední (ac), ASA vysoká (a), Meclov (bc), NanoFyt Si<sup>®</sup> (ab)



#### 4.9.7. Protodioscin - celek

Graf č. 17 obsah protodioscinu ve směsi nati a plodů kotvičnicku



Zdroj: R core team (2019)

Obsah protodioscinu ve směsi nati a plodů kotvičnicku je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí Welchova F-testu (jelikož zde je zde velké riziko porušení předpokladu homogenity rozptylů),  $[F_{(5,5.16)} = 54.46, P = 1.87 \times 10^{-4}]$ . Porovnání jednotlivých variant bylo post-hoc provedeno testem TukeyC.

##### 4.9.7.1. Statisticky neprůkazný obsah protodioscinu v nati a plodu mezi ošetřeními

Obsah protodioscinu v nati a plodu, v kotvičnicku jako celku, není průkazně rozdílný mezi ošetřeními ASA nízká (b) a ASA vysoká (ab) a Meclov (ab) a NanoFyt Si<sup>®</sup> (ab).

##### 4.9.7.2. Statisticky průkazný obsah protodioscinu v nati a plodu mezi ošetřeními

ASA nízká (b): ASA střední (a), voda (c)

ASA střední (a): ASA nízká (b), voda (c)

ASA vysoká (ab): voda (c)

Meclov (ab): voda (c)

NanoFyt Si<sup>®</sup>: voda (c)

Voda (c): ASA nízká (b), ASA střední (a), ASA vysoká (ab), Meclov (ab), NanoFyt Si<sup>®</sup> (ab)

#### 4.9.8. Protodioscin - interakce rostlina x ošetření

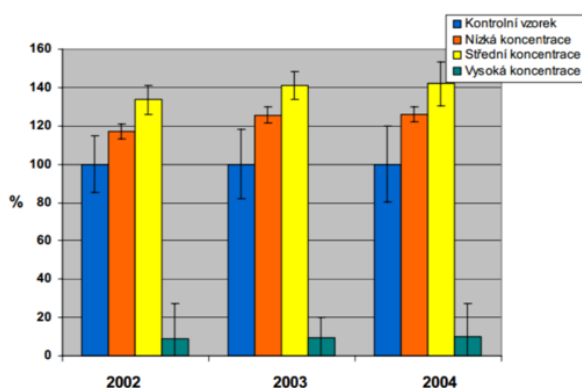
Obsah protodioscinu je u kotvičnicku průkazně ovlivněn interakcí mezi rostlinou a ošetřením. Ošetření má tedy u kotvičnicku jiný efekt na obsah protodioscinu v nati a v plodech. Testováno pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (two-way ANOVA),  $[F_{(5,24)} = 33.60, P = 4.40 \times 10^{-10}]$ .

## 5. Diskuze

### 5.1. Porovnání působení elicitorů s literaturou

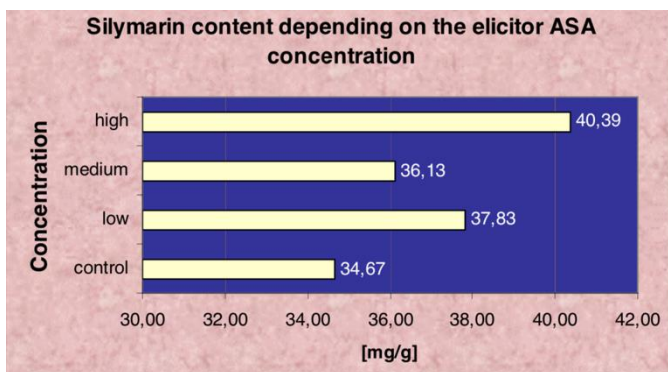
Kyselina acetylsalicylová (ASA) byla použita na nepřeberném množství rostlin, kdy byl jasně prokázán její pozitivní účinek na zvýšení obsahu sledovaných látek.

Jednou z nich byla i třapatka nachová, u které byly po vystavení kyselině acetylsalicylové (ASA) sledovány vyšší obsahy flavonoidů, zejména kyseliny cichorové, kaftarové a kávové. Vliv elicítace se projevil zejména v kořenech rostliny, při použití nízké  $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a střední  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (Šrámek 2007).

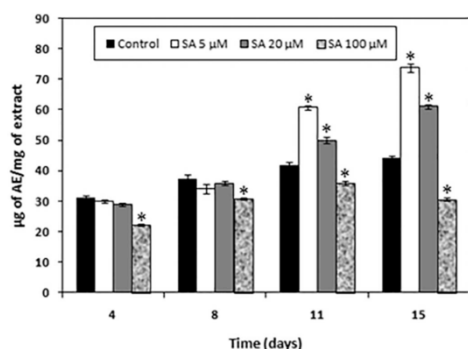


Graf č. 18 procentuální zastoupení kyseliny kávové v kořenech třapatky nachové (Šrámek 2007).

Další z rostlin, na které byly pozorovány pozitivní účinky kyseliny acetylsalicylové (ASA) byl ostropestřec mariánský. Elicítace proběhla ve třech koncentracích. Při aplikaci vysoké  $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  koncentrace kyseliny acetylsalicylové (ASA) se obsah silymarinu zvýšil o 16 %, při aplikaci nízké  $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  koncentrace kyseliny acetylsalicylové (ASA) se zvýšil obsah silymarinu o 9 %, při aplikaci střední  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  koncentrace kyseliny acetylsalicylové (ASA) byl nárůst o 4 % (Gramanová 2009).

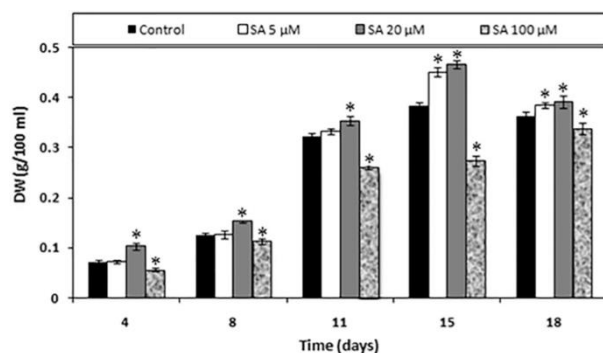


Graf č. 19 obsah silymarinu v závislosti na koncentraci ASA ze semen ostropestřce mariánského (Gramanová 2009).



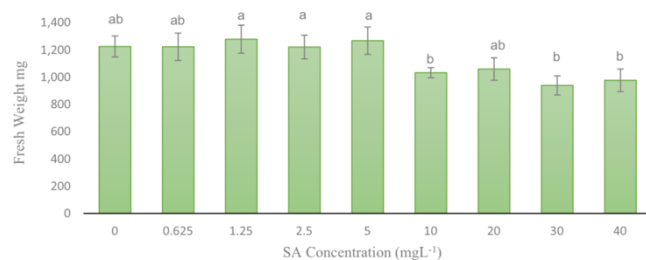
Graf č. 20 je znázornění, jak různé koncentrace kyseliny salicylové (SA), v podání v různý čas ovlivnily obsah produkci alkaloidů ve sladkovodní sinice (*Arthrospira platensis*) (Hadizadeh et al. 2019).

Graf číslo 20 popisuje aplikaci různých koncentrací salicylové kyseliny (SA) na produkci alkaloidů, s pozitivním účinkem na sinici.



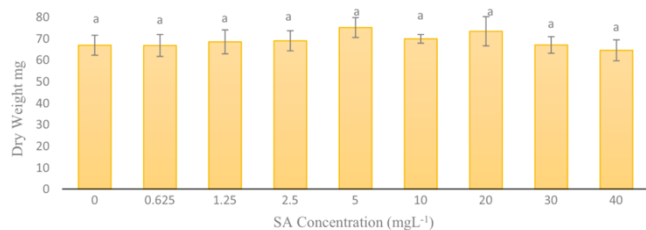
Graf č. 21 efekt různých koncentrací salicylové kyseliny na usušenou biomasu sladkovodní sinice (*Arthrospira platensis*) (Hadizadeh et al. 2019).

Elicitory mají své využití i na zvýšení biomasy, ne jen na zvýšení obsahu biologicky aktivních látek. To popisuje graf číslo 21. Různé koncentrace kyseliny salicylové (SA) ovlivňují příznivě množství biomasy sinice (*Arthrospira platensis*).



Graf č. 22 vliv salicylové kyseliny (SA) na čerstvou hmotu smutněje (*Phyllanthus pulcher*) (Danaee et al. 2015).

Graf číslo 22 znázorňuje účinek salicylové kyseliny (SA) na zvýšení čerstvé hmoty u smutněje, kdy se projevuje lehké zvýšení biomasy s použitím koncentrace do 5 mg.l<sup>-1</sup>.



Graf č. 23 vliv salicylové kyseliny (SA) na suchou hmotu smutněje (*Phyllanthus pulcher*) (Danaee et al. 2015).

Dvacátý třetí graf znázorňuje působení různých koncentrací salicylové kyseliny (SA) na suchou hmotu smutněje, kdy největší nárůst byl pozorovaný u koncentrace 5 a 20 mg.l<sup>-1</sup>.

SA (mg)	TFC <sup>a</sup>	TPC <sup>b</sup>	AX
0	2.335 ± 0.007 <sup>h</sup>	1.360 ± 0.001 <sup>f</sup>	89.164 ± 0.149 <sup>d</sup>
0.625	2.444 ± 0.055 <sup>g</sup>	1.406 ± 0.001 <sup>e</sup>	89.137 ± 0.145 <sup>d</sup>
1.25	2.678 ± 0.006 <sup>f</sup>	1.481 ± 0.002 <sup>d</sup>	89.900 ± 0.096 <sup>d</sup>
2.5	3.131 ± 0.008 <sup>d</sup>	1.613 ± 0.005 <sup>c</sup>	90.084 ± 0.132 <sup>cd</sup>
5	3.232 ± 0.007 <sup>c</sup>	1.635 ± 0.004 <sup>c</sup>	91.110 ± 0.164 <sup>c</sup>
10	3.747 ± 0.008 <sup>b</sup>	1.950 ± 0.005 <sup>b</sup>	98.001 ± 0.430 <sup>a</sup>
<b>20</b>	<b>4.824 ± 0.010<sup>a</sup></b>	<b>2.554 ± 0.003<sup>a</sup></b>	<b>98.159 ± 0.158<sup>a</sup></b>
30	2.766 ± 0.019 <sup>e</sup>	0.935 ± 0.017 <sup>g</sup>	92.609 ± 0.237 <sup>b</sup>
40	1.249 ± 0.008 <sup>i</sup>	0.674 ± 0.018 <sup>h</sup>	79.748 ± 0.101 <sup>e</sup>

Graf č. 24 vliv různých koncentrací salicylové kyseliny (SA) na koncentrace flavonoidů (TFC), fenolů (TPC) a antioxidantů (AX) ve smutněji (*Phyllanthus pulcher*) (Danaee et al. 2015).

Dvacátý čtvrtý graf porovnává vliv kyseliny salicylové (SA) na obsah flavonoidů, fenolů a antioxidantů smutněje. Největších hodnot bylo dosaženo aplikací 20 mg.l<sup>-1</sup> tohoto elicitoru.

### 5.1.1. Porovnání naměřených hodnot - protodioscin

Obrázek č. 67 obsah protodioscinu v kotvičnicku zemním podle státu (µg/g)

Sample/plant parts	1	2	3	4	5	6	7	Compound	Genin	Name
<b>Bulgaria</b>								<b>1</b>	<b>I</b>	<b>protodioscin</b>
<i>Haskovo</i> hirsut. fr. a.p.	6519.8	2266.0	384.1	100.6	24.1	77.3	1455.2			
Fruits	567.9	280.6	442.0	26.1	9.2	26.5	762.9			
Leaves	10003.5	7317.5	357.6	895.7	627.3	7.9	2037.3	<b>2</b>	<b>I</b>	<b>prototribestin</b>
Stems	193.3	408.8	157.5	8.7	27.7	1.7	92.4			
<i>Pomorie</i> hirsut. fr. a.p.	1917.2	1346.4	0.7	921.9	2266.4	1.8	41.9			
<i>Petrich</i> hirsut. fr. a.p.	4305.6	1899.1	41.4	587.1	623.8	1.1	2196.9	<b>3</b>	<b>II</b>	<b>pseudoprotodioscin</b>
<i>Svistov</i> hirsut. fr. a.p.	3619.2	3319.1	8.9	201.3	692.6	4.9	450.0			
<i>Ropotamo</i> hirsut. fr. Fruits	549.9	217.2	78.7	61.2	34.6	–	167.2	<b>4</b>	<b>III</b>	<b>dioscin</b>
<i>Smokinya</i> glabr. fr. Fruits	597.5	226.3	44.2	56.1	21.9	–	121.2	<b>5</b>	<b>III</b>	<b>tribestin</b>
<b>Turkey</b>										
<i>Marmaris</i> hirsut. fr. a.p.	3426.9	3948.4	40.9	129.2	286.1	0.3	170.3			
Fruits	254.9	727.0	–	18.6	10.9	–	287.9	<b>6</b>	<b>IV</b>	<b>tribulosin</b>
<i>Marmaris</i> glabr. fr. a.p.	3439.1	2710.4	92.9	66.1	84.0	10.2	84.0			
Fruits	170.3	59.5	83.1	21.9	5.5	–	124.4			
<i>Ankara</i> a.p.	10270.3	4989.1	748.7	93.4	68.9	17.4	349.1	<b>7</b>	<b>V</b>	<b>rutin</b>
Fruits	652.6	187.3	12.2	21.7	9.5	1.4	240.8			
<i>Ayvalak</i> hirsut. fr. a.p.	3126.8	3698.2	30.7	111.9	131.7	2.2	524.6			
<i>Yatagan</i> glabr. fr. a.p.	4649.2	3781.9	38.6	130.5	136.5	–	118.7			
<b>Greece</b>										
<i>Rhodes</i> hirsut. fr. a.p.	7968.7	3463.2	801.3	311.7	244.3	13.0	1213.6			
<i>Kalambaka</i> glabr. fr. a.p.	2265.7	1526.7	302.5	260.3	0.4	24.0	1007.7			
<b>Macedonia</b>										
<i>Novo Selo</i> glabr. fr. a.p.	4230.9	1961.9	14.3	135.7	73.8	–	408.6			
<i>Bogdanzi</i> glabr. fr. a.p.	9996.1	7429.0	1049.3	158.6	106.7	6.8	1620.5			
<b>Serbia</b>										
<i>Nish</i> a.p.	2033.4	1698.3	198.9	879.5	2151.8	22.4	801.0			
<b>Georgia</b>										
<i>Tbillisi</i> hirsut. fr. a.p.	5661.9	2419.1	534.3	80.1	67.2	5.6	1287.4			
<b>Vietnam</b>										
a.p.	32.7	–	1.3	0.4	–	220.5	4.8			
Fruits	13.0	–	3.9	–	–	4196.9	24.1			
<b>India</b>										
<i>Rajasthan</i> hirsut. fr. Fruits	2.4	–	1.1	–	–	11.2	464.5			
Leaves	14.0	–	10.0	–	–	6442.1	76.8			
Stems	4.0	–	–	–	–	1850.8	110.7			
<i>Bangalore</i> hirsut. fr. Fruits	6.5	–	–	–	–	10.9	76.2			

<sup>a</sup> Not detected.

Zdroj: Dinchev et al. (2007)

Naměřené hodnoty v této diplomové práci se nejvíce blíží hodnotám protodioscinu v Indickém kotvičnicku.

Naměřené hodnoty z diplomové práce Ing. Petra Bartoše se podobají rostlinám původem z Bulharska, z oblasti Smokinya.



## 5.2. Porovnání s diplomovou prací Ing. Petra Bartoše (2016)

### 5.2.1. Porovnání průměrných teplot 2014 x 2019

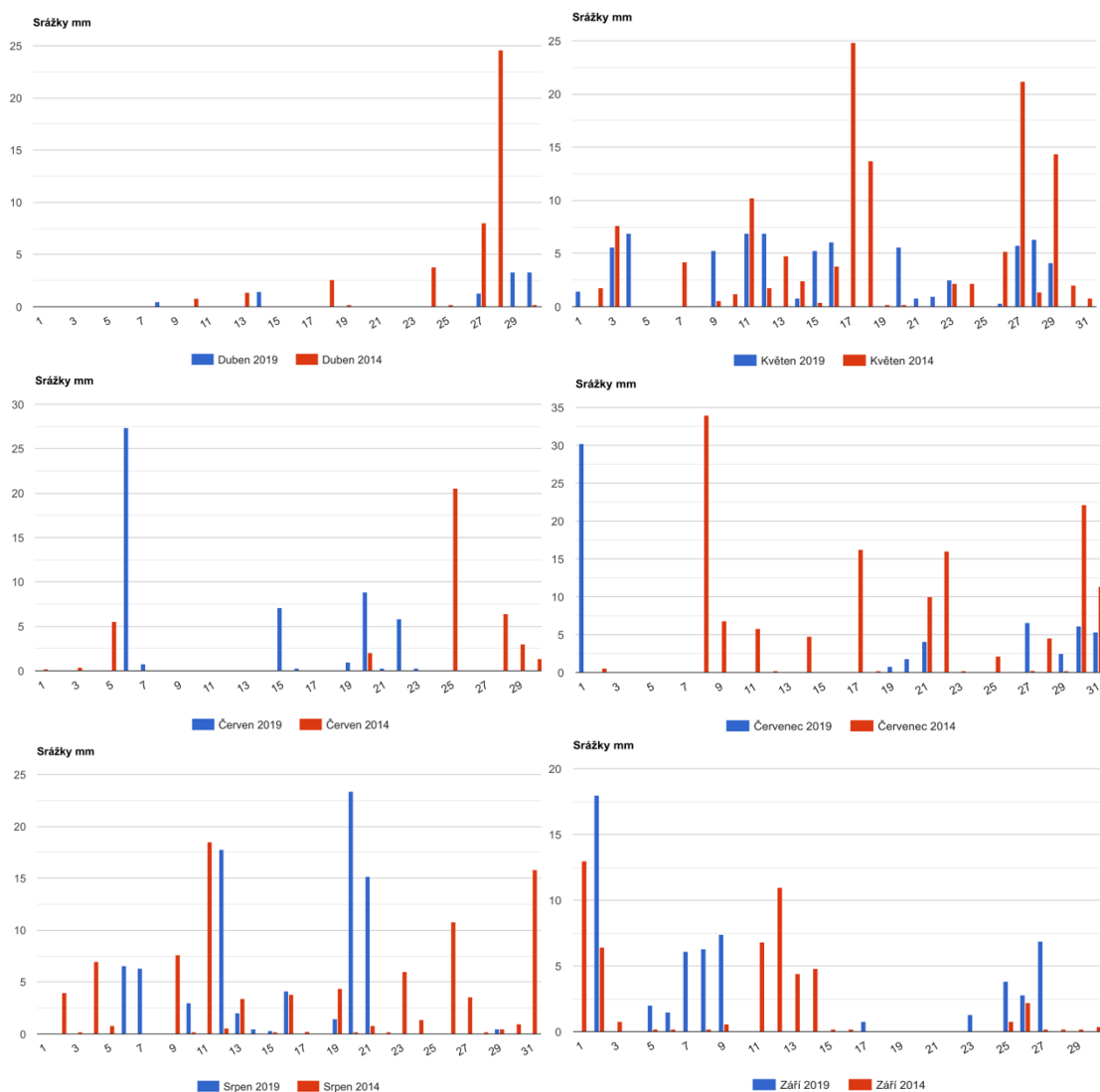
Obrázek č. 68



Zdroj: c-budejovice.cz

## 5.2.2. Porovnání srážek 2014 x 2019

Obrázek č. 69



Zdroj: c-budejovice.cz

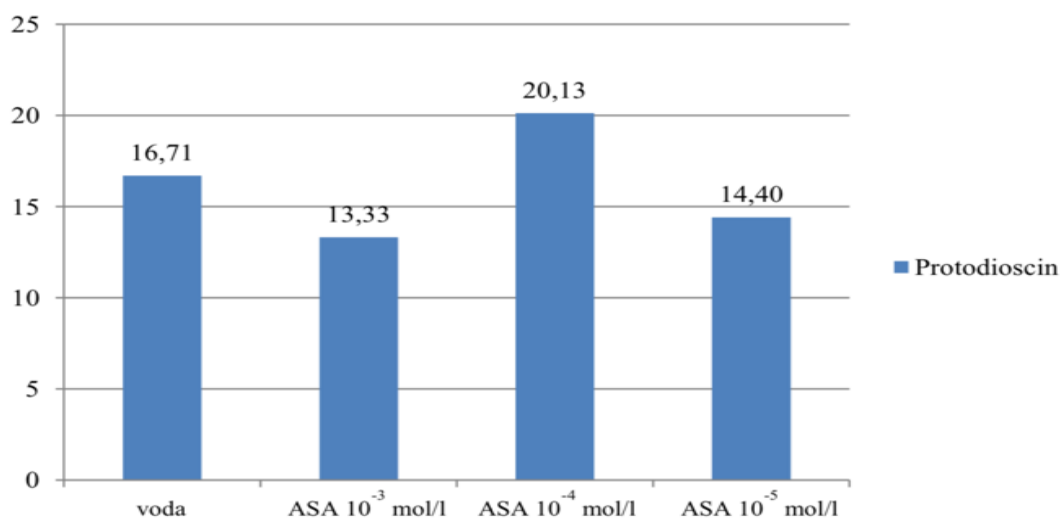
Ing. Bartoš se v diplomové práci kromě doby sklizně o počasí nezmiňuje a nepopisuje rostliny které vypěstoval. Neuvádí ani jejich původ, stejně jako v této práci, kdy původ semen není známý, protože byla pořízena na ebay.com a jejich původ není doložitelný. Z těchto důvodů není možné porovnat rostliny pěstované na pozemku ZF JU v ČB v roce 2019 s rostlinami pěstovanými v roce 2014.

Bez těchto znalostí není možné s jistotou říci, zda počasí, tedy teplota a srážky, měly vliv na obsah látek v kotvičniku pěstovaném na pozemku ZF JU v Č.B. v roce 2019 a v diplomové práci Ing. Petra Bartoše.

Rozdílné obsahy sledovaných látek, mohou být podle dostupných informací, způsobeny nejspíše rozdílným původem. Rostliny pěstované pro účely této diplomové práce se svými obsahy podobají rostlinám původem z Indie (podle obrázku č. 67) a rostliny z diplomové práce Ing. Petra Bartoše se podobají rostlinám původem z Bulharska, oblasti Smokinya tedy co se obsahu protodioscinu týká.

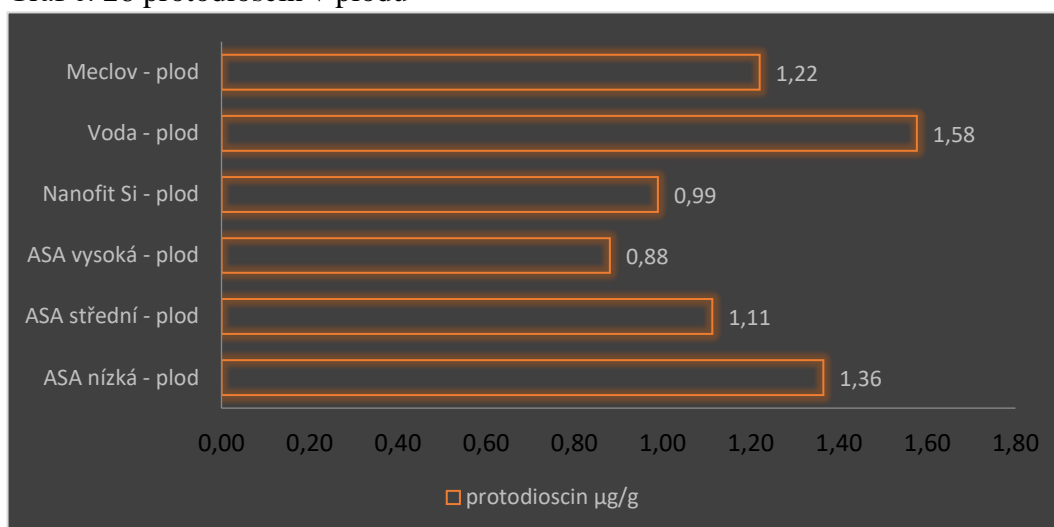
### 5.3. Porovnání výsledků s diplomovou prací Ing. Petra Bartoše

Graf č. 25 protodioscin v plodu



Bartoš (2016)

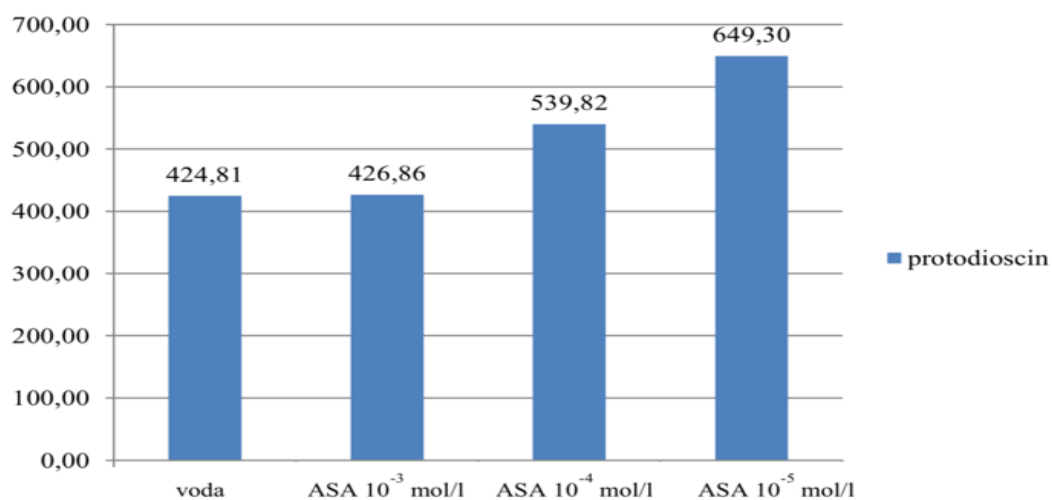
Graf č. 26 protodioscin v plodu



Z grafu číslo 25 vyplývá, že největší vliv na obsah protodioscinu v plodu kotvičnicku měla kyselina acetylsalicylová (ASA) ve střední koncentraci 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> a poté kontrolní postřik vodou.

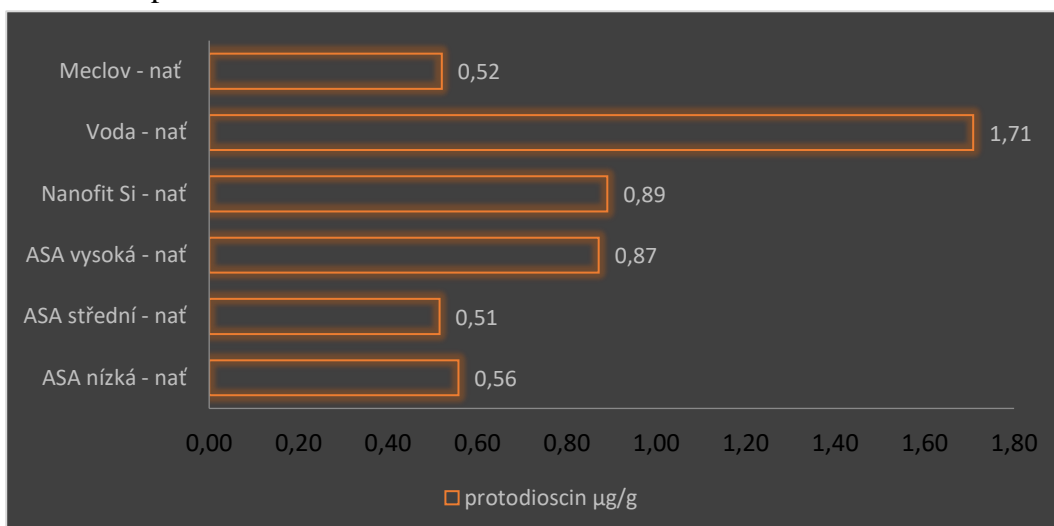
V této práci, podle grafu číslo 26 byl nejvíce účinný postřik vodou, zbylá ošetření rostliny snížily obsah protodioscinu.

Graf č. 27 protodioscin v nati



Bartoš (2016)

Graf č. 28 protodioscin v nati

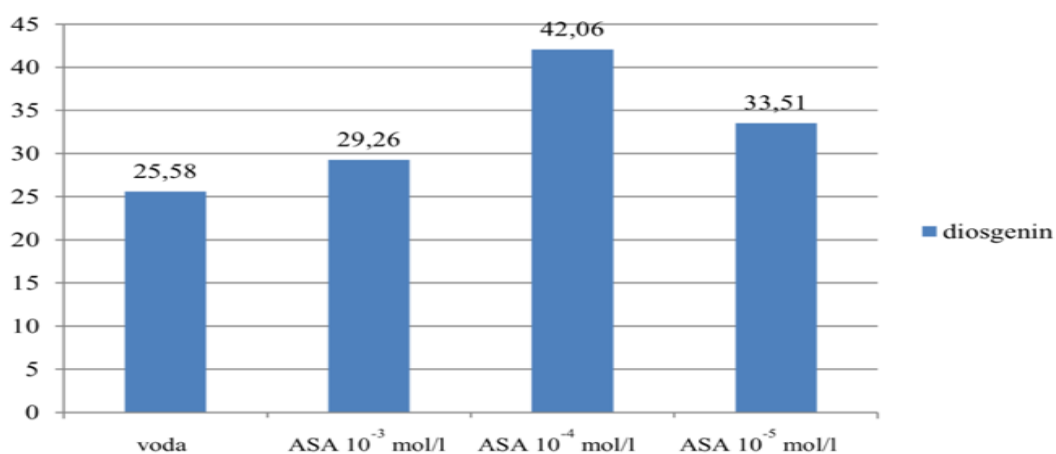


V grafu číslo 27 můžeme vidět, že v práci Ing. Bartoše měla největší vliv na obsah protodioscinu v nati kyselina acetylsalicylová (ASA) v nízké koncentraci 10<sup>-5</sup> mol.l<sup>-1</sup> a nejmenší účinek měl kontrolní postřik vodou.

Výsledky pro tuto diplomovou práci, podle grafu číslo 28 ukazují, že největší vliv na obsah protodioscinu v nati měl kontrolní postřik vody, zbylá ošetření rostliny snížily obsah protodioscinu.

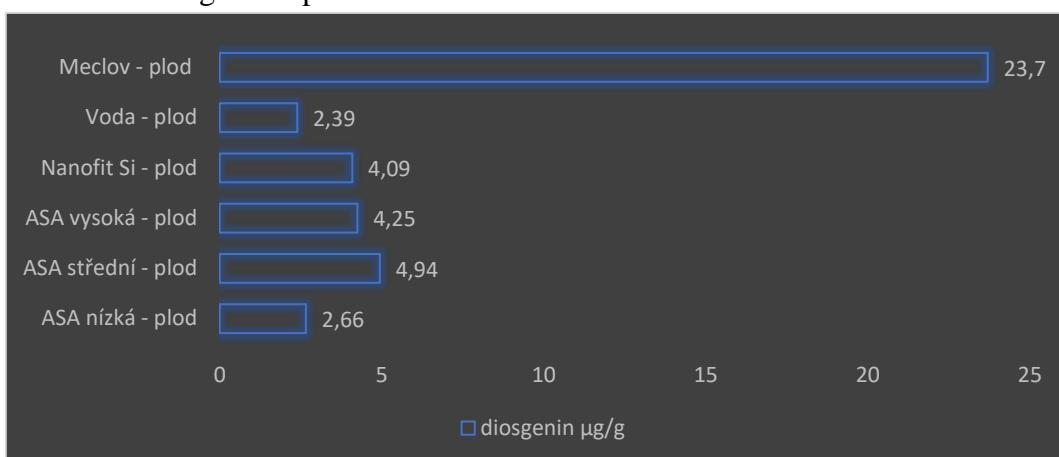


Graf č. 29 diosgenin v plodu



Bartoš (2016)

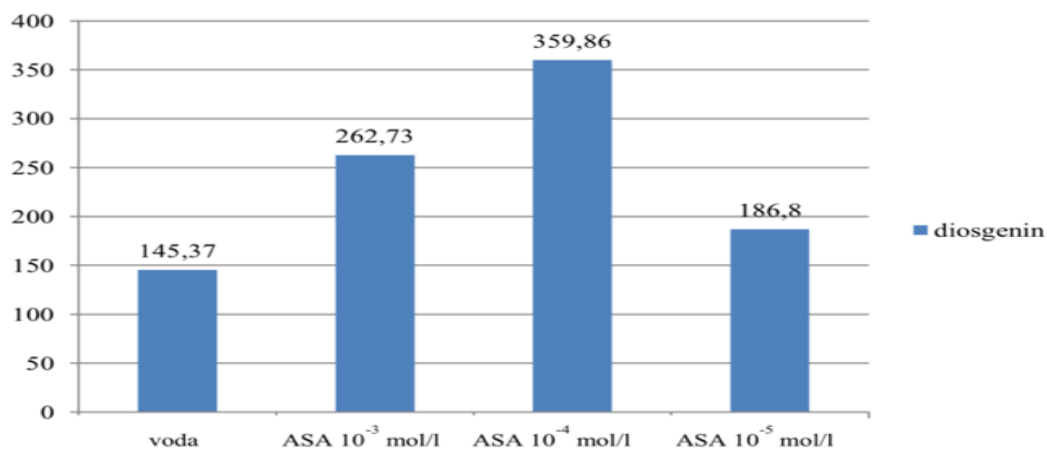
Graf č. 30 diosgenin v plodu



V grafu číslo 29 můžeme vidět, že největší vliv v práci Ing. Bartoše na obsah diosgeninu v plodu měl postřik kyseliny acetalsalicylové (ASA) ve střední 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> a poté v nízké 10<sup>-5</sup> mol.l<sup>-1</sup> koncentraci.

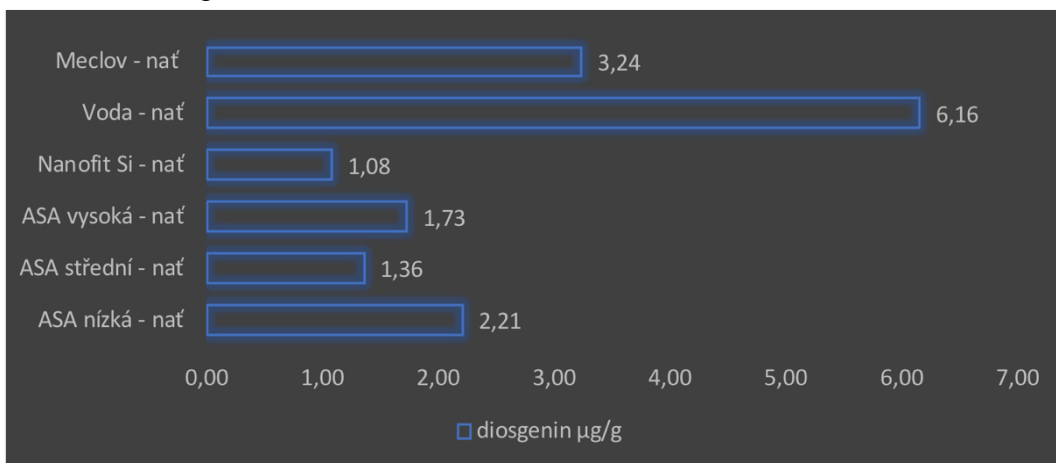
Graf číslo 30 naopak znázorňuje, že nejvíce diosgeninu v této práci v plodu kotvičníku bylo v rostlinách, které nebyly vůbec ošetřené elicitorem, tedy v rostlinách z Meclova. Pokud bychom ale přihlédli pouze k elicitorům, zjistíme, že nejvyšších obsahů bylo dosaženo, stejně jako v grafu číslo 24, kyselinou acetylsalicylovou (ASA) ve střední 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> koncentraci.

Graf č. 31 diosgenin v nati



Bartoš (2016)

Graf č. 32 diosgenin v nati



Podle grafu číslo 31 největší vliv na diosgenin v nati měla kyselina acetylsalicylová (ASA) ve střední 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> koncentraci a poté ve vysoké 10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> koncentraci.

Graf číslo 32 znázorňuje největší obsah diosgeninu v nati ošetřené pouze kontrolním roztokem, vodou. Zbylá ošetření rostliny snížily obsah diosgeninu.

#### **5.4. Naplnění platnosti pokusných hypotéz**

Z výsledků poskytnutých Laboratoří forenzní analýzy biologicky aktivních látek VŠCHT Praha je statisticky průkazné, že kyselina acetylsalicylová (ASA), v porovnání s kontrolním postříkem vody, zvýšila obsah diosgeninu v plodech kotvičníku ve střední koncentraci  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ .

## 6. Závěr

Cílem práce bylo studium vlivu technologie pěstování kotvičnicku zemního (*Tribulus Terrestris* L.) na kvalitu produktu, tedy na obsah vybraných sledovaných látek, kterými byly protodioscin a diosgenin.

Dále vypracovat literární rešerši na zadané téma a provést maloparcelkový pokus s pěstováním kotvičnicku zemního.

Statisticky vyhodnotit vliv použité technologie na obsah vybraných biologicky aktivních látek v produktu a získané výsledky diskutovat a porovnat s publikovanou literaturou.

Součástí práce bylo popsat pěstování této rostliny, což zahrnuje pěstování ve skleníku a následné vysazení na pole. Na poli byla použita kyselina acetylsalicylová (ASA) ve třech koncentracích, nízké  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>, střední  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> a vysoké  $10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> a komerční preparát NanoFyt Si<sup>®</sup> v koncentraci 1ml na 10 l vody, který působí na rostliny také jako elicitor.

Pomocí metody UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography) a metodiky poskytnuté Laboratoří forenzní analýzy biologicky aktivních látek, pod vedením pana Ing. Martina Kuchaře Ph. D. VŠCHT Praha byly stanoveny látky protodioscin a diosgenin.

Podle výsledků z analýz vyšlo najevo, že obsah protodioscinu v tomto pokusu podobal obsahu této látky v rostlinách rostoucích v Indii.

Pokud porovnáme obsah protodioscinu a diosgeninu v této práci s prací Ing. Bartoše z roku 2016 je zjevné, že oproti jeho výsledkům jsou výsledky z této práce podprůměrné.

Statistické zpracování dat prokazuje, že působení kyseliny acetylsalicylové (ASA) v jednotlivých koncentracích a NanoFytu Si<sup>®</sup>, v porovnání mezi sebou, prokazatelně ovlivňuje obsah protodioscinu a diosgeninu v analyzovaných částech rostliny.

Tato diplomová práce došla k závěru, že působení kyseliny acetylsalicylové (ASA) bylo v maloparcelkové pokuse provedeném na pokusném pozemku ZF JU v Č.B. statisticky průkazné. ASA měla vliv na zvýšení obsahu diosgeninu v plodech kotvičnicku, při použití střední koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>.

Střední koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> ASA a její statisticky průkazné působení na obsah vybraných biologicky aktivních látek naplňuje a potvrzuje cíle a hypotézy zformulované v kapitole 3. – cíl práce a definice pracovních hypotéz.

## 7. Použitá literatura

1. **Adaikan, P. G., Gauthaman, K., Prasad, R. N., & Ng, S. C. (2001).** Proerectile pharmacological effects of *Tribulus terrestris* extract on the rabbit corpus cavernosum. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 29(1), 22-26.
2. **Adimoelja, A. (1997).** Treatment of sexual dysfunction in diabetes mellitus subjects using orally administered protodioscin and injection of vasoactive compounds. In *Seminar of Erectile Dysfunction of Diabetes in Bandung, Indonesia*.
3. **Adimoelja, A. (2000).** Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. *International journal of andrology*, 23(S2), 82-84.
4. **AGRA (2017).** NanoFyt Si<sup>®</sup>. [online] [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: [https://www.agrofert.cz/downloads/etikety\\_agrochemikalie/Nanofyt%20Si.pdf](https://www.agrofert.cz/downloads/etikety_agrochemikalie/Nanofyt%20Si.pdf)
5. **Al Jasem, Y., Khan, M., Taha, A., & Thiemann, T. (2014).** Preparation of steroidal hormones with an emphasis on transformations of phytosterols and cholesterol-a review. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 3(2), 796-830.
6. **Al-Bayati, F. A., Al-Mola, H. F. (2008).** Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(2), 154-159.
7. **Alexis, B. (2001).** Natural, anti-bacterial, anti-inflammation, anti-virus, anti-herpes cream. Patent Application WO2001/011971.
8. **Alexis, B. (2005).** U.S. Patent Application No. 10/973,639.
9. **Alpaslan, M., & Gunes, A. (2001).** Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant and Soil*, 236(1), 123-128.
10. **Al-Whaibi, M. H., Siddiqui, M. H., & Basalah, M. O. (2012).** Salicylic acid and calcium-induced protection of wheat against salinity. *Protoplasma*, 249(3), 769-778.
11. **Arcasoy, H. B., Erenmemisoglu, A., Tekol, Y., Kurucu, S., & Kartal, M. (1998).** Effect of *Tribulus terrestris* L. saponin mixture on some smooth muscle preparations: a preliminary study. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 137(11), 473-475.

12. **Arsyad, K. M. (1996).** Effect of protodioscin on the quantity and quality of sperms from males with moderate idiopathic oligozoospermia. *Medika*, 22(8), 614-618.
13. **Asgher, M., Khan, M. I. R., Anjum, N. A., and Khan, N. A. (2015).** Minimizing toxicity of cadmium in plants—role of plant growth regulators. *Protoplasma* 252, 399–413. doi: 10.1007/s00709-014-0710-4
14. **Azooz, M. M. (2009).** Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *Int J Agric Biol*, 11(4), 343-350.
15. **Bartoš Pavel, (2016).** Návrh technologie pěstování kotvičnicku zemního (*Tribulus terrestris* L.) a jeho využití. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
16. **Bedir, E., & Khan, I. A. (2000).** New steroidal glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. *Journal of natural products*, 63(12), 1699-1701.
17. **Bedir, E., Khan, I. A., & Walker, L. A. (2002).** Biologically active steroidal glycosides from *Tribulus terrestris*. *Die Pharmazie*, 57(7), 491-493.
18. **Bernas J., (2018).** Environmentální, energetické a ekonomické aspekty pěstování vybraných energetických rostlin, České Budějovice 2018, Disertační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
19. **Bhattacharjee SK (2004).** Handbook of Medicinal plants. Pointer Publishers, Jaipur 353.
20. **Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballaré, C. L., Flint, S. D., & Kulandaivelu, G. (2007).** Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(3), 252-266.
21. **Cigler, P., Olejnickova, J., Hruby, M., Csefalvay, L., Peterka, J., & Kuzel, S. (2010).** Interactions between iron and titanium metabolism in spinach: a chlorophyll fluorescence study in hydropony. *Journal of plant physiology*, 167(18), 1592-1597.
22. **Clarke, S. M., Mur, L. A., Wood, J. E., & Scott, I. M. (2004).** Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 38(3), 432-447.



23. **Colgan, M. (1992).** Optimum sports nutrition: your competitive edge. New York, NY, USA: Advanced Research Press.
24. **c-budejovice.cz**
25. **Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Kadir, M. A., Sinniah, U. R., Mohamad, R., & Taha, R. M. (2015).** Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. *Brazilian Journal of Botany*, 38(2), 265-272.
26. **Das, S., K. K. Dey, G. Dey et al., (2012).** “Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 10, Article ID e46641.
27. **Dhalla, N. S., Temsah, R. M., & Netticadan, T. (2000).** Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of hypertension*, 18(6), 655-673.
28. **Ding, C. K., Wang, C., Gross, K. C., & Smith, D. L. (2002).** Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, 214(6), 895-901.
29. **Dong, J., Lei, C., Lu, D., & Wang, Y. (2015).** Direct biotransformation of dioscin into diosgenin in rhizome of *Dioscorea zingiberensis* by *Penicillium dioscin*. *Indian journal of microbiology*, 55(2), 200-206.
30. **Dinchev, D., Janda, B., Evstatieva, L., Oleszek, W., Aslani, M. R., & Kostova, I. (2007).** Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry*, 69(1), 176-186.
31. **Esfandiarei, M., Lam, J. T., Yazdi, S. A., Kariminia, A., Dorado, J. N., Kuzeljevic, B., ... & van Breemen, C. (2011).** Diosgenin modulates vascular smooth muscle cell function by regulating cell viability, migration, and calcium homeostasis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(3), 925-939.
32. **Fodor, J., Gullner, G., Adam, A. L., Barna, B., Komives, T., & Király, Z. (1997).** Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance). *Plant Physiology*, 114(4), 1443-1451.
33. **Gaby, A. R. (1993).** DHEA: The hormone that" does it all. *Holistic Medicine*, 19-24.

34. **Gauthaman, K., & Ganesan, A. P. (2008).** The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction—an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine*, 15(1-2), 44-54.
35. **Gauthaman, K., Adaikan, P. G., & Prasad, R. N. V. (2002).** Aphrodisiac properties of *Tribulus Terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. *Life sciences*, 71(12), 1385-1396.
36. **Gauthaman, K., Ganesan, A. P., & Prasad, R. N. V. (2003).** Sexual effects of puncturevine (*Tribulus terrestris*) extract (protodioscin): an evaluation using a rat model. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 9(2), 257-265.
37. **Ghosh, S., More, P., Derle, A., Kitture, R., Kale, T., Gorain, M., ... & Dhavale, D. D. (2015).** Diosgenin functionalized iron oxide nanoparticles as novel nanomaterial against breast cancer. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 15(12), 9464-9472.
38. **Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Jha, M., & Tuteja, N. (2015).** DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations. *The Scientific World Journal*.
39. **Gong, G., Qin, Y., & Huang, W. (2011).** Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* CH Wright in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, 18(6), 458-463.
40. **Gramanová Hana, (2009).** Technologie pěstování ostropestřce mariánského *Silybum marianum* ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
41. **Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E. G., & Cicek, N. (2007).** Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 728-736.
42. **Hadizadeh, M., Ofoghi, H., Kianirad, M., & Amidi, Z. (2019).** Elicitation of pharmaceutical alkaloids biosynthesis by salicylic acid in marine microalgae *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 42, 101597.
43. **Halliwell, B. (1999).** Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutrition reviews*, 57(4), 104-113.

44. **Hamid, A. A., Hasanain, M., Singh, A., Bhukya, B., Vasudev, P. G., Sarkar, J., ... & Negi, A. S. (2014).** Synthesis of novel anticancer agents through opening of spiroacetal ring of diosgenin. *Steroids*, 87, 108-118.
45. **Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S. S., & Fujita, M. (2013).** Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. *Climate change and plant abiotic stress tolerance*, 209-250
46. **He, Y. L., & Liu, Q. (2002).** Thermotolerance related to antioxidation induced by salicylic acid and heat acclimation in tall fescue seedlings.
47. **Hemzal B., (2014).** *Kotvičnick zemi.* Brno: Neptun, 79 s.
48. **Holm L.G., Plucknett D.L., Pancho J.V., Herberger J.p. (1991)** the World's Worst Weeds, University Press of hawaii, honolulu, p. 609.
49. **Horváth, E., Janda, T., Szalai, G., and Páldi, E. (2002).** In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci.* 163, 112–1135. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00324-2
50. **Horváth, E., Pál, M., Szalai, G., Páldi, E., and Janda, T. (2007).** Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. *Biol. Plant.* 51, 480–487. doi: 10.1007/s10535-007-0101-1
51. **Hrubý, M., Cígler, P., & Kuzel, S. (2002).** Contribution to understanding the mechanism of titanium action in plant. *Journal of plant nutrition*, 25(3), 577-598.
52. **Chao, Y. Y., Chen, C. Y., Huang, W. D., & Kao, C. H. (2010).** Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves. *Plant and soil*, 329(1-2), 327-337
53. **Chen P. S., Y.-W. Shih, H.-C. Huang, and H.-W. Cheng, (2011).** “Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer pc-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 5, Article ID e20164.
54. **Chen Y., Y.-M. Tang, S.-L. Yu et al., (2015)** “Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin,” *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 13, no. 8, pp. 578–587.

55. **Chen, J., Zhang, Y., Wang, C., Lü, W., Jin, J. B., & Hua, X. (2011).** Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. *Amino acids*, 40(5), 1473-1484.
56. **Chen, M. F., Gong, F., Zhang, Y. Y., Li, C., Zhou, C., Hong, P., ... & Qian, Z. J. (2018).** Preventive effect of YGDEY from Tilapia fish skin gelatin hydrolysates against alcohol-induced damage in HepG2 cells through ROS-mediated signaling pathways. *Nutrients*, 11(2), 392.
57. **Chermnykh N.S., et al., (1988).** Effects of methandrostenolone and ecdisterone on physical endurance of animals and protein metabolism in skeletal muscle. *Farmakologiya Toksikologiya*, 51:57-60.
58. **Choi, K. W., Park, H. J., Jung, D. H., Kim, T. W., Park, Y. M., Kim, B. O., ... & Pyo, S. (2011).** Inhibition of TNF- $\alpha$ -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Vascular pharmacology*, 53(5-6), 273-280.
59. **Chui, H. C., Victoroff, J. I., Margolin, D., Jagust, W., Shankle, R., & Katzman, R. (1992).** Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers. *Neurology*, 42(3), 473-473.
60. **Iglesias, M. J., Terrile, M. C., & Casalongué, C. A. (2011).** Auxin and salicylic acid signalings counteract the regulation of adaptive responses to stress. *Plant signaling & behavior*, 6(3), 452-454.
61. **Janda, T., Szalai, G., Tari, I., & Paldi, E. (1999).** Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, 208(2), 175-180.
62. **Jarow, J. P., Wright, W. W., Brown, T. R., Yan, X., & Zirkin, B. R. (2005).** Bioactivity of androgens within the testes and serum of normal men. *Journal of andrology*, 26(3), 343-348.
63. **Jiang, S., Fan, J., Wang, Q., Ju, D., Feng, M., Li, J., ... & Ye, L. (2016).** Diosgenin induces ROS-dependent autophagy and cytotoxicity via mTOR signaling pathway in chronic myeloid leukemia cells. *Phytomedicine*, 23(3), 243-252.

64. **Jit, S., Shekhawat, S., Grover, S., & Nag, T. N. (1986).** Screening of some plants of Zygophyllaceae for their antimicrobial activity. *Acta Botanica Indica*, 14(1), 45-47.
65. **Jordan, B. R. (1996).** The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Adv. Bot. Res.*, 22, 97-162.
66. **Jordan, B. R., James, P. E., & Mackerness, S. A. H. (1998).** Factors affecting UV-B-induced changes in *Arabidopsis thaliana* L. gene expression: the role of development, protective pigments and the chloroplast signal. *Plant and cell physiology*, 39(7), 769-778.
67. **Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N. A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J. J., & Bickford, P. C. (1999).** Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *Journal of Neuroscience*, 19(18), 8114-8121.
68. **Jumali, S. S., Said, I. M., Ismail, I., & Zainal, Z. (2011).** Genes induced by high concentration of salicylic acid in '*Mitragyna speciosa*'. *Australian Journal of Crop Science*, 5(3), 296.
69. **Kalailingam P., B. Kannaian, E. Tamilmani, and R. Kaliaperumal, (2014).** "Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)- induced diabetic rats," *Phytomedicine*, vol. 21, no. 10, pp. 1154– 1161.
70. **Kang, G., Li, G., Xu, W., Peng, X., Han, Q., Zhu, Y., & Guo, T. (2012).** Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 6066-6079.
71. **Kasote, D. M., Jagtap, S. D., Thapa, D., Khyade, M. S. and Russel W. R. (2017).** Herbal remedies for urinary stones used in India and China: A Review. *J. Ethnop.*, 203: 55–68.
72. **Kaur, G., Kumar, S., Nayyar, H., & Upadhyaya, H. D. (2008).** Cold stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on quantitative and qualitative components of seeds. *Journal of agronomy and crop science*, 194(6), 457-464.
73. **Kazemi-Shahandashti, S. S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A., & Ramezanpour, S. S. (2014).** Effect of short-term cold stress on oxidative

- damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of plant physiology*, 171(13), 1106-1116.
74. **Khan, H., Saeed, M., Rauf, A., Khan, M. A., & Muhammad, N. (2015).** Antimicrobial and inhibition on heat-induced protein denaturation of constituents isolated from *Polygonatum verticillatum* rhizomes. *Natural product research*, 29(22), 2160-2163.
  75. **Khan, M. I. R., & Khan, N. A. (2013).** Salicylic acid and jasmonates: approaches in abiotic stress tolerance. *J Plant Biochem Physiol*, 1(4).
  76. **Khan, M. I. R., & Khan, N. A. (2014).** Ethylene reverses photosynthetic inhibition by nickel and zinc in mustard through changes in PS II activity, photosynthetic nitrogen use efficiency, and antioxidant metabolism. *Protoplasma*, 251(5), 1007-1019.
  77. **Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., & Khan, N. A. (2015).** Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 462.
  78. **Khan, M. I. R., Iqbal, N., Masood, A., & Khan, N. A. (2012c).** Variation in salt tolerance of wheat cultivars: role of glycinebetaine and ethylene. *Pedosphere*, 22(6), 746-754.
  79. **Khan, M. I. R., Iqbal, N., Masood, A., Per, T. S., & Khan, N. A. (2013b).** Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant signaling & behavior*, 8(11), e26374.
  80. **Khan, M. I. R., Syeed, S., Nazar, R., & Anjum, N. A. (2012b).** An insight into the role of salicylic acid and jasmonic acid in salt stress tolerance. In *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants* (pp. 277-300). Springer, Berlin, Heidelberg.
  81. **Khan, N. A., Nazar, R., Iqbal, N., & Anjum, N. A. (Eds.). (2012a).** *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. Springer Science & Business Media.
  82. **Khan, N., Syeed, S., Masood, A., Nazar, R., & Iqbal, N. (2010).** Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *International Journal of Plant Biology*, 1(1), e1-e1.



83. **Khokon, M. A. R., Okuma, E. I. J. I., Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., ... & Murata, Y. (2011).** Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment*, 34(3), 434-443.
84. **Khurma, U. R., & Singh, A. (1997).** Nematicidal potential of steel extracts: in vitro effects on juvenile mortality and egg hatch of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Nematologia Mediterranea*, 25, 49-54.
85. **Kim, D. S., Jeon, B. K., Lee, Y. E., Woo, W. H., & Mun, Y. J. (2012).** Diosgenin induces apoptosis in HepG2 cells through generation of reactive oxygen species and mitochondrial pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
86. **Kostova, I., & Dinchev, D. (2005).** Saponins in *Tribulus terrestris*—chemistry and bioactivity. *Phytochemistry reviews*, 4(2-3), 111-137.
87. **Kováčik, J., Grúz, J., Bačkor, M., Strnad, M., & Repčák, M. (2009).** Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant cell reports*, 28(1), 135.
88. **Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G., & Popova, L. (2008).** Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of plant physiology*, 165(9), 920-931.
89. **Křížek M., Šíma, J. (2015)** Analytická chemie. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015, s. 214. ISBN 978-80-7394-486-5.
90. **Kužel S., Cígler P., Hrubý M. (2006).** Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin. 2006. Český patent CZ-296300, ÚPV Praha.
91. **Kužel S., Cígler P., Hrubý M. (2015).** The preparation for the induction of increased formative of bioactive compounds in plants and its use. Evropský patentový úřad 2015. EP 170507
92. **Kužel, S., Cígler, P., Hrubý, M., Vydra, J., Pavlíková, D., & Tlustoš, P. (2007).** The effect of simultaneous magnesium application on the biological effects of titanium. *Plant Soil Environ*, 53(1), 16-23.
93. **Kužel, S., Hrubý, M., Cígler, P., Tlustoš, P., & Van Nguyen, P. (2003).** Mechanism of physiological effects of titanium leaf sprays on plants grown on soil. *Biological trace element research*, 91(2), 179-189.

94. **Kužel S., Vydra J., Tříška J., Vrchotová N., Hrubý M., Cígler P. (2008).** 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, s.116, Malotechnologie
95. **Kužel, S., Vydra, J., Triska, J., Vrchotova, N., Hruby, M., & Cigler, P. (2009).** Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(17), 7907-7911.
96. **Larkindale, J., & Knight, M. R. (2002).** Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant physiology*, 128(2), 682-695.
97. **Leavitt, W. W., & Meisner, D. M. (1968).** Sexual development altered by non-steroidal oestrogens. *Nature*, 218(5137), 181-182.
98. **Lepage, C., Léger, D. Y., Bertrand, J., Martin, F., Beneytout, J. L., & Liagre, B. (2011).** Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer letters*, 301(2), 193-202.
99. **Leung, A. Y. (1980).** Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. Wiley.
100. **Li, A. (2010).** Chinese herb medicine for treating pruritus skin diseases. Patent Application TW201014611.
101. **Liu, K., Zhao, W., Gao, X., Huang, F., Kou, J., & Liu, B. (2012).** Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKK $\beta$  and IRS-1 pathways. *Atherosclerosis*, 223(2), 350-358.
102. **Long, S. P., & Naidu, S. L. (2002).** Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone. *Air pollution and Plant life*, 2, 69-88.
103. **Mafalda J., Ana P.J.M., Eugenia G., Samuel S. (2016).** Diosgenin: Recent highlights on pharmacology and analytical methodology. *Journal of analytical methods in chemistry*, volume 2016.
104. **Mahato, S. B., Sahu, N. P., Ganguly, A. N., Miyahara, K., & Kawasaki, T. (1982).** Steroidal glycosides of *Tribulus terrestris* Linn. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2405-2410.

105. **Mahdavian, K., Kalantari, K. M., & Ghorbanli, M. (2007).** The effect of different concentrations of salicylic acid on protective enzyme activities of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10, 3162-3165.
106. **Manivannan, J., Arunagiri, P., Sivasubramanian, J., & Balamurugan, E. (2013).** Diosgenin prevents hepatic oxidative stress, lipid peroxidation and molecular alterations in chronic renal failure rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(3), 289.
107. **Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., & Pang, E. (2012).** Abiotic stress responses in plants: present and future. In *Abiotic stress responses in plants* (pp. 1-19). Springer, New York, NY.
108. **Mao, Z. J., Tang, Q. J., Zhang, C. A., Qin, Z. F., Pang, B., Wei, P. K., ... & Chou, Y. N. (2012).** Anti-proliferation and anti-invasion effects of diosgenin on gastric cancer BGC-823 cells with HIF-1 $\alpha$  shRNAs. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 6521-6533.
109. **Mashchenko, N. E., Gyulemetova, R., Kintya, P. K., & Shashkov, A. S. (1990).** A sulfated glycoside from the preparation "Tribestan". *Chemistry of Natural Compounds*, 26(5), 552-555.
110. **Meteoblue.com**
111. **Milasius, K., Dadeliene, R., & Skernevicius, J. (2009).** The influence of the *Tribulus terrestris* extract on the parameters of the functional preparedness and athletes' organism homeostasis. *Fiziol Zh*, 55(5), 89-96.
112. **Misra DN, Shukla GD. Indian Med Gaz. (1984).** 118(10):322–324
113. **Miura, K., and Tada, Y. (2014).** Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 5:4. doi: 10.3389/fpls.2014.00004.
114. **Mohammad, R. Y., Somayyeh, G., Gholamreza, H., Majid, M., & Yousef, R. (2013).** Diosgenin inhibits hTERT gene expression in the A549 lung cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6945-6948.
115. **Mohammed, A. R., & Tarpley, L. (2009a).** Impact of high nighttime temperature on respiration, membrane stability, antioxidant capacity, and yield of rice plants. *Crop Science*, 49(1), 313-322.
116. **Mohammed, A. R., & Tarpley, L. (2013).** Effects of enhanced ultraviolet-B (UV-B) radiation and antioxidative-type plant growth regulators on

- Rice (*Oryza sativa* L.) leaf photosynthetic rate, photochemistry and physiology. *Journal of Agricultural Science*, 5(5), 115.
117. **Mohammed, A. R., and Tarpley, L. (2009b)**. Effects of elevated ultraviolet-B radiation on productive tillers, spikelet sterility and grain characteristics of southern US rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Agro. Crop Sci.* 195, 292–300.
  118. **Morton J.F., (1981)**. *Atlas of Medical Plants of Middle America.*” Springfield IL: CC Thomas.
  119. **Munns, R., and Tester, M. (2008)**. Mechanism of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
  120. **Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S., & Khan, N. A. (2011)**. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of plant physiology*, 168(8), 807-815.
  121. **Nazar, R., Umar, S., & Khan, N. A. (2015)**. Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate-glutathione metabolism and S assimilation in mustard under salt stress. *Plant signaling & behavior*, 10(3), e1003751.
  122. **Neumann J., (2018)**. Technologie pěstování kotvičnicku zemního (*Tribulus Terrestris* L.), České Budějovice, Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
  123. **Nigam P, Mukhija RD, Gupta AK, et al. Hansenol Int. (1984)**. 9(1–2):10–20. Sathyanathan TJ. *Indian Med Gaz.* 1985;119(6):196–197.
  124. **Nishimune, Y., & Tanaka, H. (2006)**. Infertility caused by polymorphisms or mutations in spermatogenesis-specific genes. *Journal of andrology*, 27(3), 326-334.
  125. **Noriega, G., Caggiano, E., Lecube, M. L., Santa Cruz, D., Batlle, A., Tomaro, M., & Balestrasse, K. B. (2012)**. The role of salicylic acid in the prevention of oxidative stress elicited by cadmium in soybean plants. *Biometals*, 25(6), 1155-1165.
  126. **Pacanoski, Z., Týr, Š., & Vereš, T. (2014)**. Puncturevine (*Tribulus terrestris* L.): noxious weed or powerful medical herb. *Journal of Central European Agriculture*, 15(1), 0-0.

127. **Pál, M., Kovács, V., Szalai, G., Soós, V., Ma, X., Liu, H., et al. (2014).** Salicylic acid and abiotic stress responses in rice. *J. Agro. Crop Sci.* 200, 1–11.
128. **Palma, F., López-Gómez, M., Tejera, N. A., & Lluch, C. (2013).** Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant science*, 208, 75-82.
129. **Patel, K., Gadewar, M., Tahilyani, V., & Patel, D. K. (2012).** A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Natural products and bioprospecting*, 2(2), 46-52.
130. **Pathak P.S., (1970).** *Agra University Journal of Research Science*, 19:149-166. Nikolaeva LF, Dedov II Kurbanov VA. *Kardiologia*. 1986;26(7):82–85.
131. **Petkov, G. (2011).** Enhancement of *Tribulus terrestris* L. yield by supplement of green house seedlings. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(2), 2366-2368.
132. **Pitman, M. G., & Läuchli, A. (2002).** Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In *Salinity: environment-plants-molecules* (pp. 3-20). Springer, Dordrecht.
133. **Poppe, K., Velkeniers, B., & Glinoyer, D. (2007).** Thyroid disease and female reproduction. *Clinical endocrinology*, 66(3), 309-321.
134. **Qureshi, A., Naughton, D. P., & Petroczi, A. (2014).** A systematic review on the herbal extract *Tribulus terrestris* and the roots of its putative aphrodisiac and performance enhancing effect. *Journal of dietary supplements*, 11(1), 64-79.
135. **Raja, D., Jenifer A. M., Steffi, P. F., Thamilmaraiselvi, B., Srinivasan, P. and Tamilvanan, R. (2018).** Micropropagation of *Plumbago zeylanica* - an important medicinal plant. *J. Pharmacy and Pharmace Sci.*, 7(4): 1823–1829.
136. **Raju, J., & Mehta, R. (2009).** Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutrition and cancer*, 61(1), 27-35.
137. **Raju, J., & Rao, C. V. (2012).** Diosgenin, a steroid saponin constituent of yams and fenugreek: emerging evidence for applications in medicine. *Bioactive compounds in phytomedicine*, 125, 143.

138. **Ranceliene, V., & Vysniauskiene, R. (2012).** Modification of UV-B radiation effect on *Crepis capillaris* by antioxidant and environmental conditions. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6), 614.
139. **Raskin, I. (1992).** *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 43, 439-463.
140. **R Core Team (2019).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
141. **Rogerson, S., Riches, C. J., Jennings, C., Weatherby, R. P., Meir, R. A., & Marshall-Gradisnik, S. M. (2007).** The effect of five weeks of *Tribulus terrestris* supplementation on muscle strength and body composition during preseason training in elite rugby league players. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 21(2), 348-353.
142. **Roghani-Dehkordi, F., Roghani, M., & Baluchnejadmojarad, T. (2015).** Diosgenin mitigates streptozotocin diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta: the involved mechanisms. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 66(6), 584-592.
143. **Rupp, H., Dhalla, K. S., & Dhalla, N. S. (1994).** Mechanisms of cardiac cell damage due to catecholamines: significance of drugs regulating central sympathetic outflow. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 24, S16-24.
144. **Rystonová I., Byliny na potenci. Praha: Vodnář, (2014).** 231 s.
145. **Sailaja, K. V., Shivaranjani, V. L., Poornima, H., Rahamathulla, S. M., & Devi, K. L. (2013).** Protective effect of *Tribulus terrestris* L. fruit aqueous extract on lipid profile and oxidative stress in isoproterenol induced myocardial necrosis in male albino Wistar rats. *EXCLI journal*, 12, 373.
146. **Salvador, J. A., Carvalho, J. F., Neves, M. A., Silvestre, S. M., Leitao, A. J., Silva, M. M. C., & e Melo, M. L. S. (2013).** Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Natural product reports*, 30(2), 324-374.
147. **Sangeetha, M. K., Mal, N. S., Atmaja, K., Sali, V. K., & Vasanthi, H. R. (2013).** PPAR's and Diosgenin a chemico biological insight in NIDDM. *Chemico-biological interactions*, 206(2), 403-410.
148. **Selim, S., & Al Jaouni, S. (2015).** Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen.) Sm. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1-7.



149. **Shao, B., Guo, H., Cui, Y., Ye, M., Han, J., & Guo, D. (2007).** Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry*, 68(5), 623-630.
150. **Sheitanov M, Khristov T, Taskov M, et al. (1988).** Vitaton: comparative studies on its effect on incorporation intensity of labeled amino acids in cellular proteins. *Med-BiolInf* 1: 20-23.
151. **Shi, G. R., Cai, Q. S., Liu, Q. Q., & Wu, L. (2009).** Salicylic acid-mediated alleviation of cadmium toxicity in hemp plants in relation to cadmium uptake, photosynthesis, and antioxidant enzymes. *Acta physiologiae plantarum*, 31(5), 969-977.
152. **Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., Ying, Q., & Qian, Q. (2006).** Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant growth regulation*, 48(2), 127-135.
153. **Shutt, D. A. (1976).** The effects of plant oestrogens on animal reproduction. *Endeavour*, 35, 110-113.
154. **Siboza, X. I., Bertling, I., & Odindo, A. O. (2014).** Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). *Journal of Plant Physiology*, 171(18), 1722-1731.
155. **Singh RP, Tomar SS, Devakumar C, Goswami BK, Saxena DB (1991).** Nematicidal efficacy of some essential oils against *Meloidogyne incognita*. *Indian Perfumer* 35:35-37.
156. **Son, I. S., Kim, J. H., Sohn, H. Y., Son, K. H., Kim, J. S., & Kwon, C. S. (2007).** Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(12), 3063-3071.
157. **Sullivan, J. H., & Teramura, A. H. (1989).** The effects of ultraviolet-B radiation on loblolly pine. I. Growth, photosynthesis and pigment production in greenhouse-grown seedlings. *Physiologia Plantarum*, 77(2), 202-207.
158. **Šrámek J. (2007).** Léčivé rostliny, jejich hnojení a ošetření elicitory s cílem maximální produkce některých účinných látek. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
159. **Tamaoki, M. (2008).** The role of phytohormone signaling in ozone-induced cell death in plants. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 166-174.

160. **Taskov M (1988).** Vitaton. Med-BiolInf 1: 3.
161. **Thustoš, P., Cígler, P., Hrubý, M., Kužel, S., Száková, J., & Balík, J. (2005).** The role of titanium in biomass production and its influence on essential elements contents in field growing crops. *Plant Soil Environ*, 51(1), 19-25.
162. **Tomova M, Gyulemetova R (1978).** Steroid saponine. VI. Furostanol bisglykosidaus *Tribulus terrestris* L. *Planta medica* 34: 188-191.
163. **Tomova, M., Gjulemetova, R., Zarkova, S., Peeva, S., Pangarova, T., & Simova, M. (1981).** Steroidal saponins from *Tribulus terrestris* L. with a stimulating action on the sexual functions. In First International Conference on Chemical, Biotechnological and Biologically Active Natural Products, Proceedings Varna, September (Vol. 3, pp. 299-303).
164. **Tong, Q. Y., He, Y., Zhao, Q. B., Qing, Y., Huang, W., & Wu, X. H. (2012).** Cytotoxicity and apoptosis-inducing effect of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* Wright against cancer cells. *Steroids*, 77(12), 1219-1227.
165. **Toshkov, A., Dimov, V., & Zarkova, S. (1985).** Tribestan: immunostimulating properties. *Med. Biol. Inf*, 28-31.
166. **Tufail, A., Arfan, M., Gurmani, A. R., Khan, A., & Bano, A. (2013).** Salicylic acid induced salinity tolerance in maize (*Zea mays*). *Pak. J. Bot*, 45(S1), 75-82.
167. **Turchan, J., Pocernich, C. B., Gairola, C., Chauhan, A., Schifitto, G., Butterfield, D. A., ... & Berger, J. R. (2003).** Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants. *Neurology*, 60(2), 307-314.
168. **Uemura, T., Goto, T., Kang, M. S., Mizoguchi, N., Hirai, S., Lee, J. Y., ... & Tsuge, N. (2011).** Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits LXR $\alpha$  activity in HepG2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic mice. *The Journal of nutrition*, 141(1), 17-23.
169. **Uemura, T., Hirai, S., Mizoguchi, N., Goto, T., Lee, J. Y., Taketani, K., ... & Narukami, T. (2010).** Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues. *Molecular nutrition & food research*, 54(11), 1596-1608.
170. **Upaganlawar, A., Gandhi, H., & Balaraman, R. (2011).** Isoproterenol induced myocardial infarction: protective role of natural products. *J Pharmacol Toxicol*, 6(1), 1-17.

171. **Valentová K., Entnerová P., Urbaníková J., Šimánek V. (2004).** Chemie mužské sexuality. Chemické listy. roč. 98, č. 12, s. 1125
172. **Vassilev Andon (2014).** A study on *Tribulus terrestris* L. Anatomy and ecological adaptation. Article in Biotechnology & Biotechnological Equipment
173. **Viktorov, I., Bozadjieva, E., & Protich, M. (1994).** Pharmacological, pharmacokinetic, toxicological and clinical studies on protodioscin. IIMS Therapeutic Focus, 2, 311-13.
174. **Wang, L. J., & Li, S. H. (2006).** Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca<sup>2+</sup> homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. Plant Science, 170(4), 685-694.
175. **Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G. J., Cheng, J. S., et al. (2010).** Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. BMC Plant Biol. 10:34. doi: 10.1186/1471-2229-10-34
176. **Wang, Y. J., Pan, K. L., Hsieh, T. C., Chang, T. Y., Lin, W. H., & Hsu, J. T. A. (2011).** Diosgenin, a plant-derived sapogenin, exhibits antiviral activity in vitro against hepatitis C virus. Journal of natural products, 74(4), 580-584.
177. **Whitten, P. L., Russell, E., & Naftolin, F. (1992).** Effects of a normal, human-concentration, phytoestrogen diet on rat uterine growth. Steroids, 57(3), 98-106.
178. **Williams R.J., Landsfold EM, eds. (1967).** „Encyclopedia of Biochemistry. New York: Reinhold Publishing.
179. **Ya Juan Xu b, c, Tun Hai Xu, Jun Ying Yang, Sheng Xu Xie, Yue Liu, Yun Shan Si, Dong Ming Xu (2010).** Two new furostanol saponins from *Tribulus terrestris* L. Chinese Chemical Letters, 21: 580–583.
180. **Yang, C. R., Zhang, Y., Jacob, M. R., Khan, S. I., Zhang, Y. J., & Li, X. C. (2006).** Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. Antimicrobial agents and chemotherapy, 50(5), 1710-1714.
181. **Yang, H. P., Yue, L., Jiang, W. W., Liu, Q., Kou, J. P., & Yu, B. Y. (2013).** Diosgenin inhibits tumor necrosis factor-induced tissue factor activity and expression in THP-1 cells via down-regulation of the NF-κB, Akt, and MAPK signaling pathways. Chin J Nat Med, 11(6), 608-615.

182. **Yoshida, S., Tamaoki, M., Ioki, M., Ogawa, D., Sato, Y., Aono, M., ... & Nakajima, N. (2009).** Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 136(3), 284-298.
183. **Yuan Wei-Hua, Wang Nai-Li, Yi Yang-Hua, Yao Xin-Sheng (2008).** Two Furostanol Saponins from the Fruits of *Tribulus terrestris*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 6:172-175.
184. **Zarkova S (1983).** *Tribestan: Experimental and Clinical Investigations.* Chemical Pharmaceutical Research Institute.
185. **Zengin, F. (2014).** Exogenous treatment with salicylic acid alleviating copper toxicity in bean seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84(3), 749-755.
186. **Zhang, Y., Xu, S., Yang, S., & Chen, Y. (2015).** Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.). *Protoplasma*, 252(3), 911-924