

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Agroekologie – Ekologické zemědělství

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv technologie pěstování Leuzezy saflorové (*Leuzea carthamoides* DC.) na kvalitu produktu

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

Autor diplomové práce:
Bc. Petr Vytiska

České Budějovice, 2020

Prohlášení

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 klasifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a 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.

Poděkování

Tímto bych chtěl vyjádřit poděkování vedoucímu diplomové práce panu prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc., děkanu zemědělské fakulty panu prof. Ing. Miloslavu Šochovi, CSc., dr. h. c., proděkanu doc. Ing. Petru Konvalinovi, Ph.D., paní doc. Ing. Evě Dadákové Ph.D. a proděkanu Ing. Karlu Suchému, Ph.D. Dále mé poděkování patří panu Ing. Jaroslavu Hánovi, řediteli Meclovské zemědělské a.s., a svému spolužáku Bc. Jaroslavu Neumannovi za všechnu pomoc, kontakty a finanční podporu, bez které by tato práce jen těžko vznikla.

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Literární přehled.....	2
2.1.1.	Vědecká klasifikace	2
2.1.2.	Botanická charakteristika	2
2.1.3.	Agrotechnika.....	7
2.1.3.1.	Nároky na půdu a příprava plochy	9
2.1.3.2.	Výsadba, výsev	10
2.1.3.3.	Hnojení	11
2.1.3.4.	Sklizeň a zpracování sklizeného materiálu	11
2.1.4.	Ochrana před škůdci a proti chorobám	16
2.2.	Chemické složení a účinné látky.....	18
2.2.1.	Fytoekdysteroidy	19
2.2.1.1.	Vitamín D ₁	22
2.2.1.2.	Steroidní sloučeniny v L. saflorové	24
2.2.2.	Fenolové kyseliny a flavonoidy	27
2.2.3.	Esenciální olej.....	32
2.3.	Metody stanovení účinných látek.....	33
2.3.1.	Extrakce pomocí organických rozpouštědel	33
2.3.2.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	34
2.3.3.	Přístroje pro kapalinovou chromatografii.....	34
2.3.4.	Čerpadla pro HPLC	35
2.3.5.	Dávkování vzorku	35
2.3.6.	Kolony pro HPLC.....	36
2.3.7.	Náplně a eluenty	36
2.3.8.	Detektory.....	37
2.3.9.	Kvalitativní chromatografická analýza	37
2.3.10.	Kvantitativní analýza.....	37
2.3.11.	Separace ekdysteroidů.....	37
2.4.	Farmakologické účinky některých účinných látek.....	38
2.4.1.	Efekt na proteosyntézu a pracovní kapacitu	38
2.4.2.	Vliv na kardiovaskulární systém a krev.....	40
2.4.3.	Efekt na nervový systém včetně mozku u savců.....	41
2.4.4.	Neurologie	42
2.4.4.1.	Úzkost	42
2.4.5.	Interakce s metabolismem glukózy.....	42
2.4.5.1.	Glukóza v krvi	42

2.4.6. Kosterní svalstvo a fyzická zdatnost	43
2.4.6.1. Hypertrofie	43
2.4.6.2. Účinky na výkon.....	43
2.4.7. Imunologie a zánětlivé onemocnění.....	43
2.4.7.1. Interleukiny	43
2.4.7.2. Neutrofily	44
2.4.8. Efekt na reprodukci a sexuální funkce.....	44
2.4.9. Efekt na libido	44
2.4.10. Inerakce s hormony	44
2.4.10.1. Kortikosteroidy.....	44
2.4.10.2. Hormony štítné žlázy	44
2.4.10.3. Estrogeny.....	45
2.4.10.4. Androgeny.....	45
2.4.11. Antioxidační imunomodulační a protinádorová aktivita	45
2.4.11.1. Interakce s rakovinovým mechanismem	46
2.4.12. Bezpečnost a toxikologie	46
2.5. Současné využití rostliny a jejich účinných látek v ČR a ve světě.....	46
2.5.1. Využití ve farmacii.....	46
2.5.2. Ecdysten.....	47
2.5.3. Admax	48
2.5.4. Využití ve výživě zvířat	49
2.5.5. Využití v ochraně rostlin.....	49
2.6. Vliv technologie pěstování na obsah účinných látek	50
3. Cíl práce a definice pracovních hypotéz.....	56
4. Metodický postup	57
4.1. Předpěstování ve skleníku	57
4.2. Pěstování ZF JCU	61
4.3. Elicitace.....	63
4.4. Pěstování v Meclově.....	68
4.5. Počasí.....	72
4.6. Rozbory půd	76
4.6.1. AZP pokusného pozemku ZF JCU.....	76
4.6.2. Vyhodnocení dle metodického pokynu č.9/SZV	77
4.6.3. AZP Meclov	77
4.6.4. Vyhodnocení dle metodického pokynu č.9/SZV	78
4.7. UHPLC-MS/MS analýza 20-hydroxyecdysonu a polypodinu B	79
4.7.1. Použité chemikálie	79

4.7.2. Příprava vzorku	79
4.8. UHPLC-MS/MS stanovení obsahu 20-hydroxyecdysonu a polypodinu B 79	
5. Výsledky a diskuse	80
5.1.1. Analýza na katedře aplikované chemie ZF JCU	80
5.2. Výsledky UHPLC-MS/MS obsahu 20-hydroxyecdysonu a Polypodinu B 83	
5.3. Statistické zpracování dat.....	84
5.3.1. 20-hydroxyecdysone nať.....	84
5.3.2. 20-hydroxyekdyson kořen.....	85
5.3.3. 20-hydroxyekdyson interakce rostlina*ošetření	86
5.3.4. Polypodin B nať.....	86
5.3.5. Polypodin B kořen	86
5.3.6. Polypodin B interakce rostlina*ošetření.....	87
5.3.7. Kalkulace nákladů aplikace elicitorů ve srovnání s jejich působením... 87	
5.3.7.1. Příprava roztoku.....	87
5.3.7.2. Aplikace.....	88
5.3.7.3. ASA nízká - nať.....	89
5.3.7.4. ASA nízká - kořen	90
5.4. Diskuse.....	91
5.4.1. 20-hydroxyekdyson v naťi	91
5.4.2. 20-hydroxyekdyson v kořenu	91
5.4.3. Diskuse 20- hydroxyekdyson	92
5.4.4. Polypodin B nať.....	92
5.4.5. Polypodin B kořen	92
5.4.6. Diskuse Polypodin B.....	92
5.5. Porovnání elicitorů s literaturou	93
5.6. Porovnání 20-hydroxyekdysonu s literaturou	95
5.7. Porovnání Polypodinu B s literaturou.....	96
5.8. Výsledky stanovené hypotézy	96
6. Závěr	98
7. Seznam citované literatury	99

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo prostřednictvím maloparcelového pěstování ověřit vliv elicitorů na obsah vybraných účinných látek v leuzee saflorové (*Leuzea carthamoides* DC.). Použitými elicitory byly kyselina acetylsalicylová a Nanofyt Si[®] od společnosti AGRA GROUP a.s. Stanovované účinné látky byly 20-hydroxyecdysone a Polypodin B. Vyhodnocení bylo provedeno UHPLC-MS/MS metodou. V závěru byla provedena statistika získaných výsledků.

Klíčová slova: Leuzea, saflorová, 20-hydroxyecdysone, Polypodin B, elicitory, fytoecdysteroidy, kyselina acetylsalicylová, ASA, Nanofyt Si[®], pěstování, farmacie

Abstract

The aim of this diploma thesis was to verify the effect of elicitors on the content of selected active substances in *Leuzea carthamoides* DC. The elicitors used were acetylsalicylic acid and Nanophyte Si[®] from AGRA GROUP a.s. Determined active substances were 20-hydroxyecdysone and Polypodine B. Evaluation was performed by UHPLC-MS / MS method. In conclusion, statistics of obtained results were performed.

Key words: *Leuzea, carthamoides*, 20-hydroxyecdysone, Polypodine B, elicitory, phytoecdysteroids, acetylsalicylic acid, ASA, Nanofyt Si[®], cultivation, pharmacy

1. Úvod

Leuzea saflorová (*Leuzea carthamoides* DC.) je léčivá bylina, známá též pod názvem „maralí kořen“, který získala od ruských osadníků na Altaji. Ti viděli „jeleny maralu“ (*Cervus elaphus sibiricus*) jak si během tuhých sibiřských zim svými kopytky vyhrabávají zvaldé listy této rostliny a požírají je. Na Altaji panuje tradice, že L. saflorová léčí čtrnáct chorob a omlazuje. Po staletí se jejího kořene využívá v lidové medicíně jako vhodného prostředku při úbytku sil. Tataři L. saflorovou používají jako afrodiziakum. Její farmakologické využití je známé z čínské, ruské, tibetské a mongolské medicíny. V posledních desetiletích se rošiřuje i v Evropě. Extrakty z L. saflorové se používají při léčbě nervových, duševních a kardiovaskulárních poruch. Léčí onemocnění plic a ledvin, známé jsou i tonické a stimulaující účinky. Nejvyšší popularity dosáhla L. saflorová v posledních letech jako adaptogen. V devadesátých letech se stala obzvláště populární v západních zemích, což vedlo k jejímu využití v potravinářství a doplňcích stravy. Spotřebitelský trh dnes z extraktů z L. saflorové nabízí celou řadu komerčních produktů.

2. Literární přehled

2.1.1. Vědecká klasifikace

Leuzea saflorová

Leuzea carthamoides DC.,

čeleď hvězdnicovité (*Asteraceae*)

synonyma: parcha saflorová

leuzea saflorová

maralí kořen

leuzea

věd. synonyma: *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin

Centaurea carthamoides

Cirsium carthamoides

Cnicus carthamoides

Cnicus uniflorus

Halocharis carthamoides

Leuzea altaica

Serratula carthamoides

anglicky Maral root

německy Saflor-Bergscharte

rusky Рапонтикум сафлоровидный

2.1.2. Botanická charakteristika

Leuzea saflorová (*Leuzea carthamoides* DC.) je víceletá léčivá rostlina pocházející z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) (Selivanova, 1979; Bárnet et al., 2015).

Obrázek 1 – Stavba L. saflorové



Foto: Bc. Petr Vytiska

Kořenová soustava se skládá z hustě rozvětvených svazčitých kořenů, které v průběhu vegetace dřevnatí. Kořeny jsou krátké, horizontálně rozvětvené, tmavě hnědé barvy se specifickou vůní.

Obrázek 2 - Sušení L. saflorové



Foto: Bc. Petr Vytiska

Listy dorůstající do délky až 40 cm tvoří na bázi velkou růžici, na lodyze jsou listy střídavé. Spodní listy jsou řapíkaté, hluboce zpeřeně dělené. Horní listy jsou přisedlé a peřenolaločné.

Obrázek 3 – List tvořící růžici L. saflorové



Foto: Bc. Petr Vytiska

Obrázek 4 – Hluboce zpeřený list L. saflorové



Foto: Bc. Petr Vytiska

Lodyhy se nevětví, jsou duté, vzpřímené 50–180 cm dlouhé, mělce rýhované, pavoučité chlupaté nebo lysé (Abramchuk et al., 2016; Абрамчук et al., 2019; Абышева 2001; Кубан et al., 2018).

Obrázek 5 – L. saflorová v květu



Foto: Bc. Petr Vytiska

Květenství tvoří kulový úbor o průměru 4–8 cm, který se skládá z lůžka a hustě nahloučených trubkovitých, světle fialových květů. Květy jsou oboupohlavné s pěti tyčinkami a dvojklanou čnělkou.

Obrázek 6 – Detailní pohled na kulový úbor L. saflorové



Foto: Bc. Petr Vytiska

Plodem je elipsoidní, hnědavě šedá žebnatá nažka, 0,8 cm dlouhá s dvouřadým chmýrem.

Obrázek 7 – Semena *L. saflorové*



Foto: Bc. Petr Vytiska

L. saflorová je endemitem v Altaji a v Saských horách jižní Sibiře. Přirozeně se vyskytuje na alpských a subalpských loukách, podél cedrovo modřínových lesů ve výšce 1200-2300 m nad mořem (Abramchuk et al., 2014; Selivanova 1979; Łotocka, Geszprych 2004; Постников 1995; Федеральный закон 2009; Монгуш, Монгуш 2012; Сосков 1959; Кубан, Дорогина, Жмудь 2018).

Pěstitelsky není příliš náročná, v našich klimatických podmínkách roste bez větších problémů (Fejo 2019). Má vysokou vitalitu, rozmnožovací schopnost a pěstitelskou jistotu. Během posledních několika desetiletí se rostlina rozšířila v regionech střední a východní Evropy, kde se široce pěstuje pro své léčivé vlastnosti (Opletal et al., 1997; Kužel et al., 2002 a, b; Volek et al., 2002).

V odborné literatuře se uvádí dva poddruhy, a to subsp. *Orientalis*, který tvoří kultury převážně ve východní oblasti rozšíření, a subsp. *Eucarthamoides*, která se vyskytuje ve zbylých oblastech (Valíček, Horák 1996).

Zvýšená poptávka, neuvážená a nekontrolovatelná nadměrná sklizeň *L. saflorové* v oblastech Altaje, západní a východní Sibiře, střední Asie a Kazachstánu, z důvodů

jejích léčivých vlastností, přivedlo tuto rostlinu skoro na samý práh jejího vyhubení (Karimian 2012; Jain et al., 2014; Ames et al., 2017; Akshay et al., 2014; Абрамова 2016; Павлова 1966; Тимофеев 2001).

Počet přirozených míst výskytu tohoto druhu se výrazně snížil, proto je v současné době *L. saflorová* zařazena mezi vzácné a ohrožené rostliny Sibiře, do červené knihy chráněných rostlin Altaje, spadající do druhé kategorie ohrožených rostlin (Положий, Суров 1972; Елисафенко 2009; Лащинский 2010; Золотухин 2016; Кубан et al., 2018).

L. saflorová je cenná, léčivá, krmná a medonosná rostlina. Díky svým vlastnostem její populace pomalu, ale jistě mizí, proto je nutné ji chránit a zvyšovat počet přirozeně se vyskytujících jedinců (Буданцева 2013).

Z botanického hlediska je potřeba poznamenat, že nomenklatura rodu je zvláště matoucí, mnohé druhy jiných rodů jsou jí synonymem. Různé druhy rodů, jako například: *Cantaurea*, *Cnicus*, *Fornicium*, *Rhaponticum*, *Serratula* a *Stemacantha* jsou běžně uvedeny v databázi rostlin jako synonyma *L. saflorové*. Vystává tedy otázka, zda používat název *Leuzea carthamoides* DC., nebo *R. carthamoides*. V mnoha farmakologických a fytochemických studiích se vědci přiklání spíše k názvu *R. carthamoides*, což naznačuje že *L. carthamoides* je dalším synonymem (Klein 2004; Greuter 2003; Dittrich 1973; Holub 1973, 1974; Soskov, Yu 1978).

2.1.3. Agrotechnika

L. saflorová nesnáší trvale zamokřené půdy. Příprava pozemku spočívá v provedení hluboké orby na podzim, do hloubky 20–30 cm a na jaře v prokypření a uvláčení pozemku. *L. saflorová* se množí převážně generativně – semeny, ale je možné využít i vegetativního množení – kořenovými oddělky. Při pěstování na malých plochách je možné semena nejprve vysít do skleníku či pařeniště a pikýrované silné rostliny pak vysázet na záhony. Ve velkovýrobě se obvykle provádí přímý výsev. Porovnáním přímého výsevu a pěstováním sadby ve skleníku se nezjistily velké rozdíly ve výnosech nadzemní hmoty ani kořenů. Doporučuje se to pro nákladově příznivější technologie velkovýroby – přímý výsev (Bárnet et al., 2015; Kužel et al., 2002 a, b).

Obrázek 8 – Stratifikovaná semena připravena ke klíčení, skleník JCU



Foto: Bc. Petr Vytiska

Organizace porostu se liší dle jeho využití. Šířka řádku 25 cm je vhodná pro využití L. saflorové především jako pícniny. Pro pěstování na kořen se doporučuje spon alespoň 50–60 x 30 cm. Při pěstování na semeno byly odzkoušeny spony řádků 12,5 x 25 cm.

Obrázek 9 – Meclov, spon rostlin 60 x 30 cm



Foto: Bc. Petr Vytiska

V roce výsevu L. saflorová vytváří přizemní růžici listů dorůstajících do výšky až 50 cm s 6–12 listy v závislosti na termínu výsevu. Rostlina v prvním roce nekvete. Po vyřádkování je doporučená meziřádková kultivace např. řepnou plečkou. V druhém roce pěstování, je vzhledem k velké dynamice růstu, možné provádět

meziřádkové plečkování jen v první polovině vegetace. Agrotechnické zásahy jsou podobné jako při pěstování cukrové řepy, a to zejména v prvních dvou letech (Fejo 2019).

Obrázek 10 – Pohled na listovou růžici L. saflorové v prvním roce



Foto: Bc. Petr Vytiska

Růst L. saflorové na jaře ve druhém a třetím roce pěstování začíná velice brzy. Je jednou z nejdynamičtěji rozvíjejících se kulturních rostlin v jarním období. Ve druhém roce začíná L. saflorová kvést, a to 10–20 % rostlin. Třetím rokem kvete přes 90 % rostlin a ve čtvrtém roce téměř všechny. Rostliny kvetou v průběhu června a července a semena dozrávají v září. Na jedné rostlině se vytváří 1–5 květních lodyh, nejčastěji však 3, jež jsou až 1,5 m vysoké. V jednom květenství je 180 až 280 semen, přičemž z okrajových částí květenství jsou málo vyvinutá a málo klíčivá semena. Zralá semena se mohou velmi rychle rozpadat, ztráta může dosáhnout 35 % a více (Bárnet et al., 2015; Абрамчук et al., 2019; Kužel et al., 2002 a, b). L. saflorová má dvě etapy růstu. První začíná na jaře a končí vytvořením květních lodyh. Druhá etapa začíná po dozrání semen, kdy rostlina začíná vytvářet novou nadzemní hmotu. Vegetace končí v říjnu. U kořene tyto etapy zjištěny nebyly, jeho růst je kontinuální (Bárnet et al., 2015). L. saflorovou můžeme vidět i na zahrádkách, kde se pěstuje jako okrasná rostlina (Абрамчук et al., 2019).

2.1.3.1. Nároky na půdu a příprava plochy

Výběr vhodného stanoviště je prvním a jedním z nejdůležitějších kroků při velkoplošném pěstování L. saflorové. Jednou z nevýhod je množství drobných a hustě nahlučených kořenů. Následná separace a vymývání zeminy je závažným problé-

mem při sklizni a při posklizňové úpravě. Z toho vyplývá, že *L. saflorovou* je ekonomicky a agrotechnicky výhodnější sít do lehčích půd – nejlépe hlinitopísčitých, kde se kořen snadno sklízí. Pozemek by měl mít dostatečně hlubokou orniční vrstvu, aby kořen mohl dobře růst. Výskyt dlouhodobých mokřin na pozemku je nežádoucí, neboť je *L. saflorová* nesnáší. Významná je také vlastnost, kde *L. saflorová* hraje roli přerušovače obilného sledu.

Po sklizni předplodiny by mělo následovat kvalitně provedené zpracování půdy s podmínkou a střední orbou provedenou do hloubky 25–30 cm, se zaoráním hoje a průmyslových hnojiv. Na jaře příštího roku by měla být provedena předseťová příprava, spojená se zapravením dusíkatých hnojiv (Bárnet et al., 2015).

2.1.3.2. Výsadba, výsev

Setí se provádí v dubnu z důvodů využití zimní vláhly, nebo v srpnu či září.

Obrázek 11 – Předpěstování rostlin *L. saflorové* pro vysazení na pozemku ZF JCU



Foto: Bc. Petr Vytiska

Jurčák uvádí výsevek 3,5 kg na hektar. Důležitá je také organizace porostu. Galambosi uvádí vzdálenost řádků minimálně 50 cm. Valíček udává meziřádkový spon 60 x 30 cm (Kužel et al., 2002 a, b).

L. saflorová se množí převážně semeny, v praxi je ale možné využít i kořenových oddělků.

Obrázek 12 – Vyklíčená semena *L. saflorové* skleníků ZF JCU



Foto: Bc. Petr Vytiska

Ve velkovýrobě se provádí přímý výsev. Semena klíčí při teplotě 5–6 °C, optimální teplota je 12–20 °C a klíčivost 60 %. Setí provádíme v dubnu nebo v srpnu. Sejeme v časných jarních měsících z důvodů využití zimní vláhy, ale doba setí nemá přímý vliv na kvalitu přezimování. Ideální hloubka pro zasetí je 3 cm a výsevek na jeden hektar 5–6 kg. Osivo vzchází za 8–20 dní v závislosti na vlhkosti půdy (Bárnet et al., 2015; Kužel et al., 2002 a, b).

2.1.3.3. Hnojení

Dle literatury je doporučené hnojení hnojem v dávce 50 t/ha a následně jeho zao-
rávka hlubokou orbou. Nesmíme opomenout ani zásobní dávku draslíku a fosforu
na podzim, před založením porostu (P 100 kg/ha a K 50 kg/ha). Na jaře příštího
roku se provede předseťová příprava se zapravením dusíkatých hnojiv v dávce
50 kg N/ha. V průběhu vegetace se doporučuje *L. saflorovou* dohnojovat minerál-
ními hnojivy dle potřeby. Nejvyššího pozorovaného výnosu čerstvé nadzemní
hmoty bylo dosaženo dávkou dusíku 100 kg/ha, avšak nejvyššího výnosu kořenů
se dosahovalo při hodnotách 50 kg N/ha (Bárnet et al., 2015).

Dále je nutné v následujících letech v průběhu vegetace přihnojovat *L. sa-
florovou* minerálními hnojivy NPK v poměru 1:2:1. Dobře reaguje na dusíkaté hno-
jení. Maximum nárůstu nadzemní hmoty bylo dosaženo při dávce dusíku
100 kg/ha. Nejvyššího výnosu kořenů a koncentrace 20-hydroxyecdysone bylo do-
saženo 50 kg N/ha (Kužel et al., 2002 a, b).

2.1.3.4. Sklizeň a zpracování sklizeného materiálu

Sklizeň nadzemní hmoty pro sušení a přípravu drogy, na následné využití např. do
čajů, do potravinových doplňků, případně do dalších produktů, je nejvýhodnější

v časných fázích kvetení. Při sklizni je nutné dbát na to, aby nedocházelo ke kontaminaci materiálu zeminou. Následně musí být sklizený materiál zpracován vhodným způsobem např. sušením.

Nadzemní hmotu lze zpracovat na seno, sennou moučku, senáž či přidávat do píce v zeleném stavu (Kužel et al., 2002 b). Krmení zelené hmoty je problematické z hlediska kolísání jednotlivých živin v průběhu vegetační fáze rostliny. Dochází také k postupnému růstu obsahu vlákniny a poklesu stravitelných bílkovin, ale i ostatních živin. Proto není tento způsob využití nadzemní biomasy příliš vhodný. Jako lepší varianta se jeví tedy zpracování na senáž, senné úsušky, případně seno, ale ty jsou z pohledu energetické náročnosti pro zvířata méně ekonomické (Volek et al., 2002).

Nejvhodnější dobou pro sklizeň porostu, z hlediska obsahu živin a jejich stravitelnosti, je fáze před kvetením. Vzhledem k vysokému obsahu bílkovin v poměru k sacharidům patří L. saflorová k hůře konzervovatelným pícninám. Proto bude nutné při její konzervaci využít stejných technologií jako například u vojtěšky.

Výnos sena v jednotlivých letech pěstování, v závislosti na užitkovém roce a počtu sečí, dosahoval až 9 tun na hektar. Výnos zelené nadzemní hmoty činí 40–50 tun z hektaru. Výnos semene dosahuje 200–300 kg z hektaru (Kužel et al., 2002 a, b).

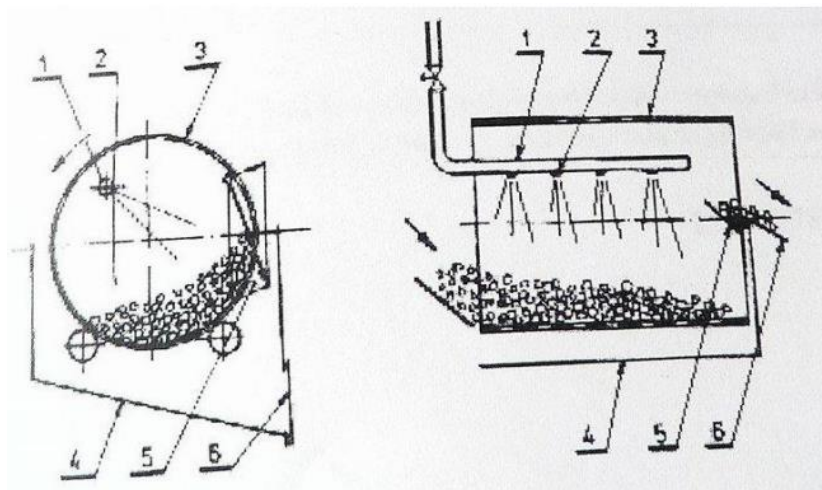
Sklizeň kořene patří k nejnáročnějším pracovním operacím při pěstování L. saflorové. Kořen musí být co nejčistší, bez zeminy. To se samozřejmě odvíjí od volby pozemku a povětrnostních podmínek na stanovišti v době sklizně. Jelikož se kořen sklízí na podzim, kdy je půda většinou poměrně vlhká, je sběr kořenů velice problematický – respektive jeho posklizňová úprava. Pokud tedy budeme sklízet již na podzim, je nutné nejdříve odstranit nadzemní hmotu. Kořen lze sklízet jednořádkovým vyorávačem brambor a následným ručním sběrem.

Pokud by na podzim byly takové podmínky, které by znemožňovaly kvalitní provedení sklizně, lze sběr uskutečnit v jarním období, a to na počátku vegetace rostliny. Půda na jaře lépe osychá a snáze se z kořene odstraňuje. Někteří autoři udávají, že na počátku vegetace je obsah ekdysteroidů vyšší než na podzim. Problémem však bude následné využití pozemku, neboť čas na jeho přípravu pro následnou plodinu bude velmi krátký.

Po sklizni je nutné kořen ošetřit. Posklizňová úprava spočívá v promytí kořene vodou např. v bubnové myčce a v následném sušení. Pokud jsme při pěstování využili vhodný pozemek (hlinitopísčítá půda) a optimální dobu sklizně, můžeme

předpokládat, že kořen bude poměrně čistý, bude příznivá půdní vlhkost a následné mytí nebude příliš dlouhé. Dle literatury dlouhé mytí a máčení ve vodní lázni výrazně snižuje obsah účinných látek a dochází k jejich výluhu do vody. Po mytí kořene by mělo bezprostředně následovat sušení, a to do ideální vlhkosti 13 %, aby nedocházelo k plesnivění produktu. Použitá teplota by neměla být vyšší než 40 °C (Bárnet et al., 2015; Kužel et al., 2002 a, b).

Obrázek 13 – Bubnová pračka na promytí kořene L. saflorové

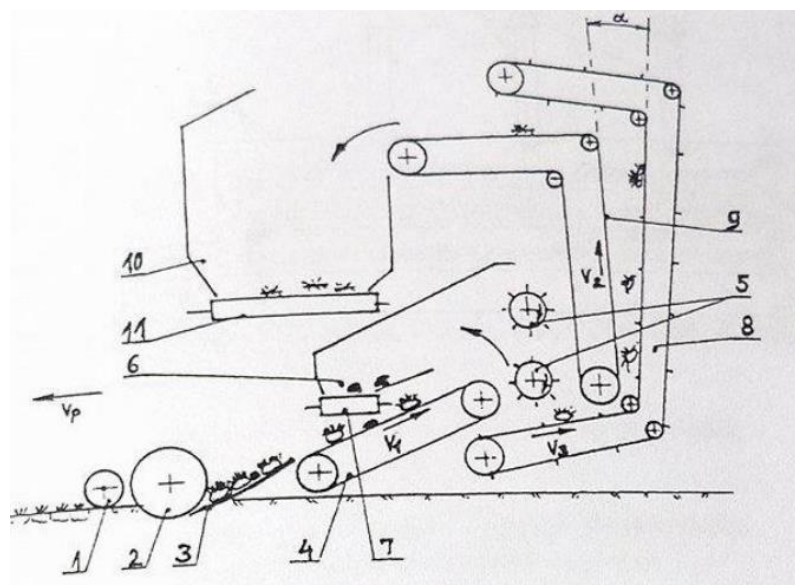


Kužel et al., (2008)

Přívod vody do bubnu¹, trysky², roštový buben³, vana⁴, vynášecí lopatky⁵, skluzová plocha na výpad materiálu⁶ (Kužel et al., 2008).

Semena je možné sklízet klasickým žacím strojem při použití vhodného nastavení (Bárnet et al., 2015). Kořen se sklízí po třech letech na podzim, nebo čtvrtým rokem na jaře, kdy má nejvyšší obsah ekdysteronu. Průměrný výnos suchých kořenů činí 2–3 tuny z hektaru (Kužel et al., 2002 a, b).

Obrázek 14 – Stroj na sběr kořene L. saflorové



Kopírovací kolo¹, kotoučová krojidla², vyorávací radlice³, vrhací a prosévací dopravník⁴, odhazovací bubny⁵, zásobník kamenů⁶, dopravník kamenů⁷, separátor zeminy^{8,9}, prstový dopravník⁸, plnicí dopravník⁹, zásobník kořenů¹⁰, vyprazdňovací dopravník¹¹ (Angelovič 2002).

Kopírovací kolo¹ udržuje vyorávací radlici³ v hloubce 10-20 cm. Šířku řádku určují dvě kotoučová krojidla² po obou stranách vyorávací radlice³. Vyorávaný řádek dále přepadá přes zadní část radlice³ na vrhací dopravník⁴, kdy dochází k trhání řádku. Tento dopravník⁴ částečně prosévá volnou zeminu a dopravovaný materiál směřuje na rychle rotující bubny⁵, ty oddělují kameny od trsů. Tyto trsy rostlin jsou bubny⁵ vráceny zpět do vrhacího dopravníku⁴ nebo jsou bubny⁵ strženy a přemístěny do separátoru^{8,9}. Bubny⁵ odhazují kamenitý materiál do zásobníku kamenů⁶. Ten se vyprazdňuje buď kontinuálně nebo periodicky pomocí dopravníku⁷. Separátory^{8,9} tvořené dopravníky pracují ve svislé poloze pod nastavitelným úhlem. Prstový dopravník⁸ pomocí řídkých prstů dále unáší trsy podle ubývající půdy stále výše. Trsy padají zpět dolů mezi dopravníky⁸ a ⁹. Přes prstový dopravník jsou trsy bez zeminy vyneseny až na vodorovnou část plnicího dopravníku⁹, ten je vrhá do zásobníku kořenů¹⁰. Vyprazdňovací dopravník¹¹ tvoří dno a jednu stěnu zásobníku. Klopení vyprazdňovacího dopravníku¹¹ do vodorovné polohy umožňuje vyprázdnění obsahu zásobníku (Angelovič 2002).

Na stroji se nastavuje:

- vyorávací hloubka,
- pracovní rychlost,

- rychlost vrhacího dopravníku⁴,
- rychlost dopravníků separátoru ^{8,9} a jejich zpětný chod,
- intenzita separace (změnou úhlu a rychlosti) ^{8,9} a místo plnění zásobníku.

2.1.3.5. Sušení

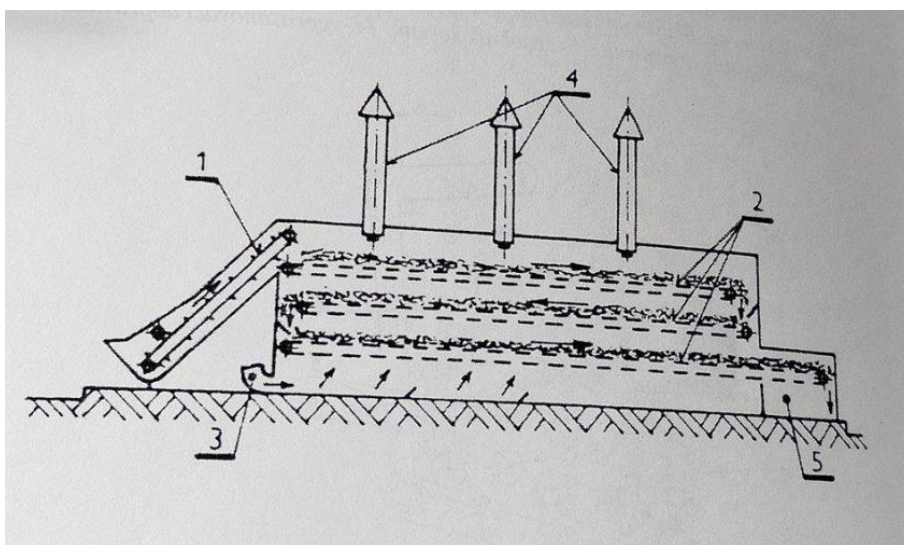
Sklizená nadzemní hmota se ihned suší na dobře větraných místech ve stínu, v tenkých vrstvách, přirozeným anebo umělým teplem v sušárnách s teplotou do 40 °C. Správně usušená droga má světlezelenou barvu. Poměr sesychání je 4-5:1 (Bárnet et al., 2015).

Obrázek 15 – Sušení L. saflorové, skleník ZF JCU



Foto: Bc. Petr Vytiska

Obrázek 16 – Pásová sušárna pro L. saflorovou



Plnicí dopravník¹, sušící dopravníky², vstup horkého vzduchu³, odsávací ventilátory⁴, výpad usušeného materiálu⁵ (Kužel et al., 2008).

2.1.4. Ochrana před škůdci a proti chorobám

L. saflorová netrpí na významné choroby nebo škůdce, z toho hlediska můžeme předpokládat bezproblémové pěstování. Pouze ve vlhčích letech, v době kvetení, dochází k hnilobě květního lůžka, následkem čehož se snižuje výnos semen. V pozdním létě ve vlhčích dnech dochází k padlí listů. Pokud by docházelo k následnému využívání nadzemní hmoty, je nutné provést sklizeň v dostatečném předstihu.

Obrázek 17 – Květ L. saflorové napadený Blýskáčkem (*Meligethes*)

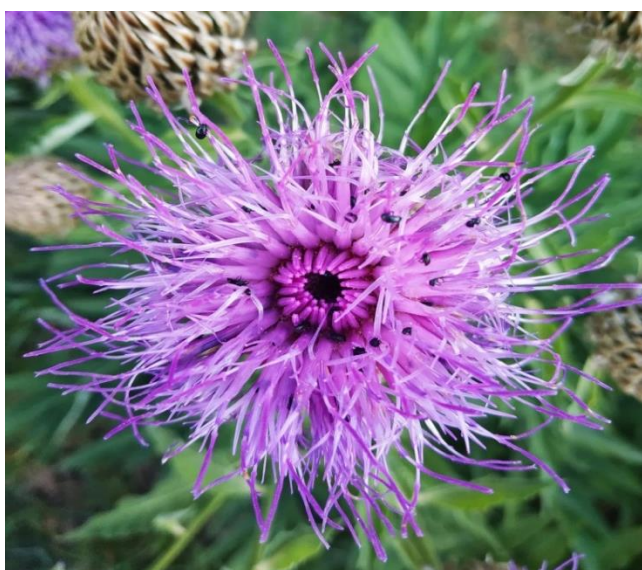


Foto: Bc. Petr Vytiska

Určujícím faktorem pěstování L. saflorové je zajištění bezplevelného stavu porostu. V literatuře se doporučují mechanické zásahy, jako je meziřádková kultivace plečkou. V prvním roce pěstování se tato pracovní operace doporučuje provést minimálně šestkrát během celé vegetace. V následujících letech se doporučuje kultivace pouze v první polovině vegetace, než je porost zcela zapojen. Alternativou může být použití mulčovacích fréz, které by nadrtily celý řádek včetně plevelů. L. saflorová následně bez problémů obroste.

Obrázek 18 – Květ L. saflorové obklopený Zlatohlávkem tmavým (*Oxythyrea funesta*) z poločeledi zlatohlávků (*Scarabaeidae: Cetoniinae*)

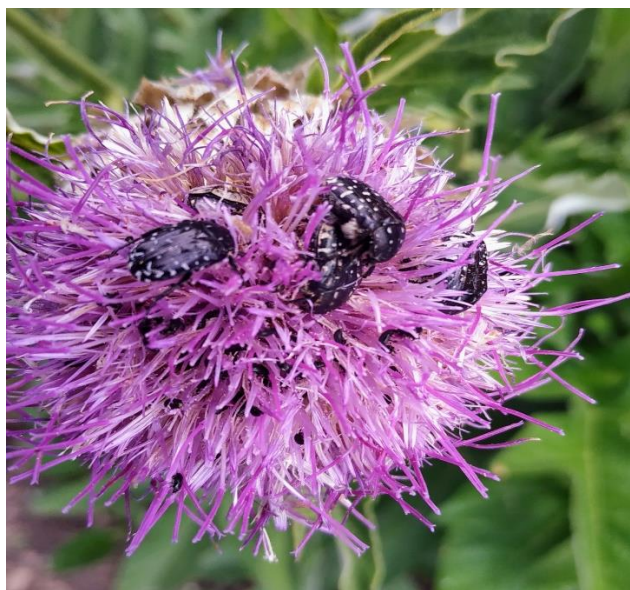


Foto: Bc. Petr Vytiska

V praxi bude nejvhodnější použití kombinované technologie s použitím herbicidních přípravků. Základním předpokladem je zajištění odplevelení pozemku před výsevem a intenzivní regulace hlavně vytrvalých druhů plevelů v předplodině. S výhodou se dají použít preemergentní aplikace herbicidů. V průběhu vegetace je možné bez problémů použít selektivních přípravků na trávovité plevele. Největším problémem je regulace plevelů z čeledi *Asteraceae*. Odkoušené jsou i glyphosatové herbicidy v období, kdy L. saflorová nemá nadzemní hmotu. Nízké dávky glyphosatových přípravků na již regenerované rostliny sice vedlo k odumření nadzemní hmoty, ale v konečném důsledku došlo pouze k mírnému zpomalení ve vývoji. Rostliny následně obrazily a pokračovaly ve vývoji. Tento postup je nutno vždy ověřit s ohledem na použitý genetický materiál a stanoviště (Bárnet et al., 2015; Kužel et al., 2002 a, b).

2.2. Chemické složení a účinné látky

V rostlinách se nachází mnoho skupin přírodních látek, některé z nich se vyskytují v relativně vysokém množství. Označujeme je jako sekundární metabolity a bezprostředně se nezúčastňují základních metabolických procesů, ale jsou pro rostliny často velmi důležité. Ovlivňují například metabolické procesy buněk a jsou součástí obranných mechanismů rostliny. Sekundární metabolity jsou účinnými látkami léčivých rostlin (Kužel et al., 2003, 2006, 2015).

Biologicky účinné látky nacházející se v *L. saflorové* jsou fytoekdysteroidy, hlavně 20-hydroxyekdyson, polypodin B, flavonoidy (kemferol, kvercetagenin, kvercetin, kvercetin 3,3'-dimethylether, kvercetin-5O-glukosid, isorhamnetin, isorhamnetin-5O-glukosid, luteolin), tritepenoidní glykosidy, polyiny na bázi thiofenu („polyacetyleny“, zkráceně DHT-I až DHT-V) a další látky (Bárnet et al., 2015).

Jedna z prvních fytochemických studií týkající se *L. saflorové* objevila a izolovala 20-hydroxyekdyson (20E), dříve známý jako β -ekdyson, polypodin A a inokosteron z kořenů. Další studie identifikovali 20E, jako nejhojnější ekdysteroid s obsahem 0,04-0,81 % v kořenech, 0,03-1,22 % v nadzemních hmotě a 0,27-1,51 % v semenech. Obsahy jsou udávány v sušině. Během více než 30 letého intenzivního výzkumu *L. saflorové*, bylo izolováno 50 různých ekdysteroidních sloučenin, které byly detekovány v celé rostlině. Několik sterolů, jako je β -sitosterol, stigmasterol, D7-avenasterol, kampesterol a cholesterol, byly objeveny v kořenech a cholesterol, stigmasterol, β -sitosterol a β -sitostanol v semenech rostliny (Lamer-Zarawska et al., 1996; Krasnov et al., 1976; Yakubova, Sakharova 1980; Varga et al., 1986; Repcak et al., 1994; Timofeev et al., 1998; Bastaev, Bastaev 1987; Girault et al., 1988; Baltaev 1991, 1992, 1995; Píš et al., 1994; Baltaev et al., 1997; Ramazanov et al., 1997a, b; Sadykov et al., 1997; Borovikova et al., 1999; Borovikova, Baltaev 1999; Vokac et al., 2002; Buděšínský et al., 2008; Khomova et al., 1995; Stransky et al., 1998; Kokoska, Janovska 2009).

Suchá nadzemní hmota obsahuje 12-25 % bílkovin, 3-9 % sacharidů, 13-26 % vlákniny, 17 % minerálních látek, 35-45 mg/100g sušiny provitaminu A, 25-40 mg/100g sušiny vitamínu C, 18 % hrubého proteinu, 45% bezdusíkatých látek výtažkových, 3,3 % tuku, 1,5 % vápníku, 0,7 % fosforu, 4,4% draslíku a 2,8 % hořčíku. Usušené kořeny obsahují 16 % bílkovin, 2,5 % tuku, 16 % vlákniny a 11 % minerálních látek, ekdysteroidy, nepatrné množství alkaloidů, 0,9 % silic, 5–10 % tříslovin, 12 % inulinu, pryskyřice, kumariny a flavonoidy (Kužel et al., 2002 a, b).

Mezi biologicky účinné složky nacházející se v nadzemní hmotě a kořenech

L. saflorové patří fytoekdysteroidy, flavonoidy, triterpenoidní glykosidy, deriváty thiofenu, silice, třísloviny, pryskyřice a kumariny. Hlavní obsahovou skupinou látek L. saflorové jsou fytoekdysteroidy – látky steroidní povahy (Fejo 2019). V určitých případech se vyskytují ve vysokých koncentracích v listech, kořenech a semenech. Určují charakter biologického účinku drogy. Květenství obsahuje flavonoidy, apigenin, kvercetin 3-methylether, chrysantemin a cyanin. Ze semen rostliny byl izolován N-feruloylserotonin, jenž je strukturně podobný serotoninu nebo melatoninu (Kuzel et al., 2002 a, b).

2.2.1. Fytoekdysteroidy

Hlavní skupinou obsahových látek L. saflorové jsou fytoekdysteroidy neboli látky steroidní povahy (deriváty cholest-7-en-6-onu). V podstatě určují charakter biologicky účinné drogy. Rostlinné ekdysteroidy – fytoekdysteroidy (fytoekdysony), jsou analogy hmyzího metamorfozního hormonu ekdysonu. Jsou to hormony, které řídí množství buněk, růst a vývojový cyklus hmyzu a jiných bezobratlých. Tyto hormony se vyskytují z neznámých důvodů v rostlinách, které si nejsou příbuzné. Doposud nebyla objevena žádná jejich fytohormonální funkce. V určitých případech se ekdysteroidy vyskytují ve vysokých koncentracích v listech, kořenech a semenech (Varga et al., 1986).

Nejrozšířenějším ekdysteroidem je 20-hydroxyekdyson, který vykazuje insekticidní účinky. Metamorfozní účinek však vykazuje většina ekdysteroidů, dnes je jich známo více než 300. Význam přítomnosti ekdysteroidů v rostlinách nebyl zatím vysvětlen. Je komplikován značnou polaritou ekdysteroidů, a tudíž jejich neprostupností kutikulou hmyzu, a také omezeným potravním účinkem. Proto se zatím nevyužívá k ochraně proti hmyzím škůdcům. Přírodní ekdysteroidy byly izolovány z vyšších rostlin a hub. Modifikované strukturní analogy byly připraveny chemickou nebo fotochemickou transformací 20-hydroxyekdysonu.

L. saflorová obsahuje podstatné množství 20-hydroxyekdysonu. Tato sloučenina se považuje za hlavního nositele aktivity extraktů, s ní dále inokosteron a další příbuzné ekdysteroidy.

Z publikovaných koncentrací ekdysteroidů v kořenech je patrná značná variabilita koncentrace této látky, a to od 0,1 % do 0,62 %. Co se týče obsahu sekundárních metabolitů a ekdysteronu v nadzemních částech, tam se autoři výrazně rozcházejí a jsou uváděny obsahy do 0,3 %. Dle výzkumu Dr. Harmaty je vyšší obsah účinných látek pouze v nejranějších růstových fázích rostliny na jaře a s rostoucí růstovou fází rychle klesá. Významný vliv na obsah účinných látek má ročník, lokalita a stáří rostliny (Bárnet et al., 2015).

Tabulka 1 – Ekdysteroidní sloučeniny v *L. saflorové*

<i>Číslo struktury</i>	<i>Název sloučeniny</i>	<i>Část rostliny</i>
1	20-Hydroxyecdysone	Kořen, nadzemní část, semeno
2	Polypodine B	Kořen
3	Makisterone A	Kořen
4	2-Deoxyecdysterone	Kořen
5	Integristerone A	Kořen
6	Integristerone B	Kořen
7	Taxisterone	Kořen
8	Ajugasterone C	Kořen
9	α -Ecdysone	Semeno
10	Lesterone	Semeno
11	Rapisterone D	Semeno
12	Inokosterone	Kořen
13	Rapisterone	Kořen
14	20-Hydroxyecdysone 2,3;20,22-diacetonide	Kořen
15	20-Hydroxyecdysone 2,3-monoacetonide	Kořen
16	20-Hydroxyecdysone 20,22-monoacetonide	Kořen
17	22-Oxo-20-hydroxyecdysone	Kořen

18	24(28)-Dehydromakisterone A	Kořen, nadzemní část, semeno
19	(24Z)-29-Hydroxy-24(28)-dehydromakisterone C	Kořen
20	Carthamosterone	Kořen, nadzemní část
21	Rubrosterone	Kořen
22	Dihydrorubrosterone	Kořen
23	Posterone	Kořen
24	Isovitexirone	Kořen
25	Leuzeasterone	Kořen
26	Makisterone C	Kořen, nadzemní část
27	Polypodine B 20,22-acetonide	Kořen
28	Rapisterone B	Semeno
29	Rapisterone C	Semeno
30	Rapisterone D 20-acetate	Semeno
31	24(240)[Z]-Dehydroamarasterone B	Semeno
32	Polypodine B-22-benzoate	Semeno
33	Carthamosterone A	Semeno
34	Carthamosterone B	Semeno
35	Amarasterone A	Kořen

36	Carthamoleosterone	Kořen
37	24(28)-Dehydroamarasterone B	Kořen
38	22-Deoxy-28-hydroxymakisterone C	Kořen
39	3-Epi-20-hydroxyecdysone	Kořen
40	24-Epi-makisterone A	Kořen
41	14-Epi-ponasterone A 22-glucoside	Kořen
42	5-a-20-Hydroxyecdysone	Kořen
43	20-Hydroxyecdysone 2-acetate	Kořen
44	20-Hydroxyecdysone 3-acetate	Kořen
45	1b-Hydroxymakisterone C	Kořen
46	26-Hydroxymakisterone C	Kořen
47	15-Hydroxyponasterone A	Kořen
48	Inokosterone 20,22-acetonide	Kořen
49	Integristerone A 20,22-acetonide	Kořen
50	Turkesterone	Kořen

Autor. Kokoska, Janovska (2009)

2.2.1.1. Vitamín D₁

Výzkum hlavního růstového vitamínu, antirachitického vitamínu D spadá do období 30. let minulého století. Výzkum zjistil, že chemická struktura tohoto vitamínu mohla být v určité souvislosti se strukturou 7-dehydrocholesterolu. Výsledky ukázaly nález chemických látek typu sekosterolů, které byly nazvané vitamin D₂ (ergokalciferol) a D₃ (cholecalciferol). Chemická stavba vitamínu D₁ nebyla dodnes

přesně určena, protože byl jen zběžně pojmenován jako produkt UV-ozáření vitamínu D₂. Stejně jako jiné látky odvozené od cholesterolu, byly tyto vitaminy zařazeny mezi látky rozpustné výhradně v tukových rozpouštědlech (živočišných tucích například tresčí olej nebo máslo). Kromě pozdějších klinických zjištění dodatečné hydroxylace vitamínu D₃ v játrech (D₃-triol), zůstaly uvedené vědomosti o antirachitickém růstovém vitamínu D po celou dobu 20. století a vlastně až do dnešní doby beze změny (Wolf 2004).

O 30 let později, učinil německý chemik P. Karlson náhodný objev při pokusu o izolaci hmyzího svlékacího, a to strukturu polyhydroxylovaného derivátu 7-dehydrocholesterolu, kterou nazval ekdyson. Tato látka byla obecně pokládána vědeckou komunitou za hormon prothorakální žlázy, stimulující vývojové cykly spojené se svlékáním hmyzu (ekdyse). Rozsáhlé pokusy v 70. a 80. letech ukázaly, že polyhydroxylované deriváty 6-keto, 7-dehydrocholesterolu, obsažené hojně v různých druzích nižších i vyšších rostlin, mají význačné anabolické růstové účinky u různých druhů bezobratlých živočichů, obratlovců a savců včetně člověka. Výsledky studií ukázaly, že ekdyson není žádný hormon, protože jeho biologické účinky jsou v rozporu s definicí živočišného hormonu. Všechny tyto výsledky poukázaly na to, že látky typu ekdysonu, hlavně polyhydroxylovaného 6-keto, 7-dehydrocholesterolu, nemají statut živočišného hormonu. Nicméně jsou velice důležité jako růstový faktor u většiny živých organismů, včetně mikroorganismů, hub, rostlin, bezobratlých živočichů i obratlovců a také pro růst kostí a svalů u lidí (Karlson 1966 a, b; Jizba et al., 1967; Sláma, Lafont 2013; Sláma 2019; Sláma, Zhylitskay 2016).

Na základě dlouholetých studií regulace regeneračních pochodů u hmyzu dospěl Sláma (2019) k závěru, že vitamín D byl před sto lety chybně identifikován, protože chemická věda tehdy ještě neznala a nedovedla identifikovat částečně ve vodě rozpustné, polyhydroxylované deriváty cholesterolu. Výsledky nových pokusů ukázaly, že dlouhou dobu zanedbávaný a nedokonale identifikovaný, antirachitický vitamín nazývaný D₁ představuje ve skutečnosti polyhydroxylovaný 6-keto, 7-dehydrocholesterol, který byl mnohem později náhodou objeven při výzkumu svlékacího hormonu hmyzu. Dodnes jsou ve farmakologii mylně pokládány vitamíny D₂ a D₃ za antirachitické sekosteroly, které je nutné aktivovat UV-zářením a dodatečnou hydroxylací v játrech. Na základě rozsáhlých pokusů s regenerací tkání u hmyzu, bylo zjištěno, že dosavadní neznalost skutečných vitaminózních účinků tohoto „hmyzího hormonu“ (ve skutečnosti před sto lety špatně identifikovaného vita-

mínu D₁), je příčinou mnoha nevléčitelných chorob, zaviněných nedostatkem tohoto vitamínu v krvi. Protože avitaminózy se nedají léčit bez znalosti skutečného vitamínu, spočívá dosavadní neschopnosti lékařské vědy vysvětlit poruchy růstu a regenerace. Podle výsledků publikovaných dle Slámy (2019), získaných na bezobratlých živočiších a také zástupcích obratlovců, spočívá problém v tom, že profesionální chemici a biochemici stále notoricky trvají na tom, že v rostlinách velice rozšířený, polyhydroxylovaný 6-keto, 7-dehydrocholesterol je hmyzí hormon a tím brání ve výzkumu jeho skutečné, vitaminózní biologické podstaty (Kumpun et al., 2011).

Ekdysteroidy zahrnují živočišný vitamín D₁ potřebný pro zdravý průběh regeneračních pochodů. Hmyzí buňky obsahují 37 % genů, které jsou stejné jako geny přítomné v lidském genomu. Nedávno bylo zjištěno, že primordiální základy a funkce hmyzích orgánů a tkání jsou orchestrovány stejnými skupinami genů jako v případě orgánů a tkání lidských. Z toho vyplývá, že by vitamin D₁ měl mít stejný vliv, při zabránění maligního růstu buněk u hmyzu, jako u maligního růstu buněk u lidí (Devillers, 2013; Sláma, Santiago-Blay 2017).

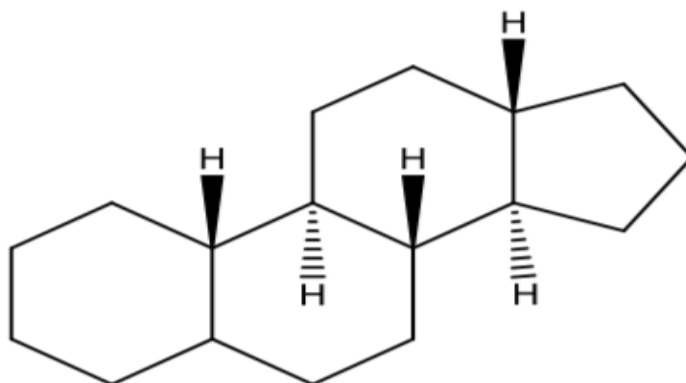
Nedostatek této látky v hemolymfě hmyzu nebo v krvi jiných živočichů a člověka, kteří si ho sami nedovedou vyrobit, brání dokonalému spojení regenerujících buněk a získání tkáňové integrity potřebné k zastavení regeneračního dělení. Nedostatek 20-hydroxyekdysonu vede ke vzniku defektivních regenerujících buněk, které se nepřestanou dělit za vzniku neobvyklých, polynukleárních syncytií, jež jsou charakteristické pro maligní (zhoubné) nádory.

Výsledkem je široké spektrum léčebných vlastností, a to při léčbě a/nebo prevenci poruch růstu a regenerace buněk. Dále také pro snížení hladiny krevního cukru, zejména při léčbě a/nebo prevenci diabetu, diabetu II. typu, poruchy růstu a regenerace kostních a svalových buněk, zejména rakoviny mléčné žlázy, slinné žlázy, prostaty, pankreatu, střeva, kostí, či kůže.

2.2.1.2. Steroidní sloučeniny v L. saflorové

Steroidy jsou deriváty cyklopentanperhydrofenanthrenu neboli steranu a patří mezi farmakologicky významné látky (mezi steroid např. patří i vitamín D, pohlavní hormony, steroly – cholesterol a žlučové kyseliny). Spolu s terpenoidy se řadí do skupiny izoprenoidů. Vzhledem jsou bezbarvé krystalické látky, které se rozpouštějí v organických rozpouštědlech a vznikají oxidací terpenů. Steroidy mají další podmnožiny sloučenin, dělené podle účinku a místa výskytu.

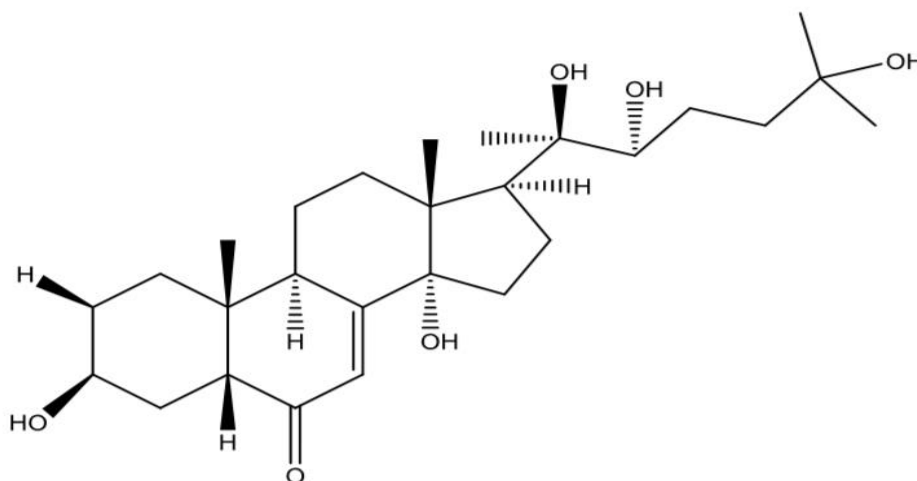
Obrázek 19 – Struktura cyklopentanperhydrofenanthrenu (steranu)



Sovová et al., (2008)

L. saflorová obsahuje ekdysteroidy, polyhydroxylované steroidní sloučeniny, které se označují za hmyzí pohlavní hormon svlékání. U hmyzu totiž způsobují zvětšení pokožkových buněk, které se následně dělí a rozpadají, čímž je umožněna ekdyze – takzvané svlékání hmyzu. Dále jsou zodpovědné za vývoj hmyzu, buněčnou profílaci, růst a apoptózu. Ekdysteroidy jsou rozsáhlou a rozšířenou skupinou mezi rostlinami. Více než 330 jich bylo objeveno v cévnatých rostlinách, houbách, řasách, u bezobratlých živočichů a mořských organismů. V rostlinách ekdysteroidy slouží jako ochranné látky proti škůdcům a jsou součástí tkání, ze kterých se uvolňují (Sovová et al., 2008; Pavela et al., 2005).

Obrázek 20 – Strukturní vzorec sloučeniny 20-hydroxyekdyson



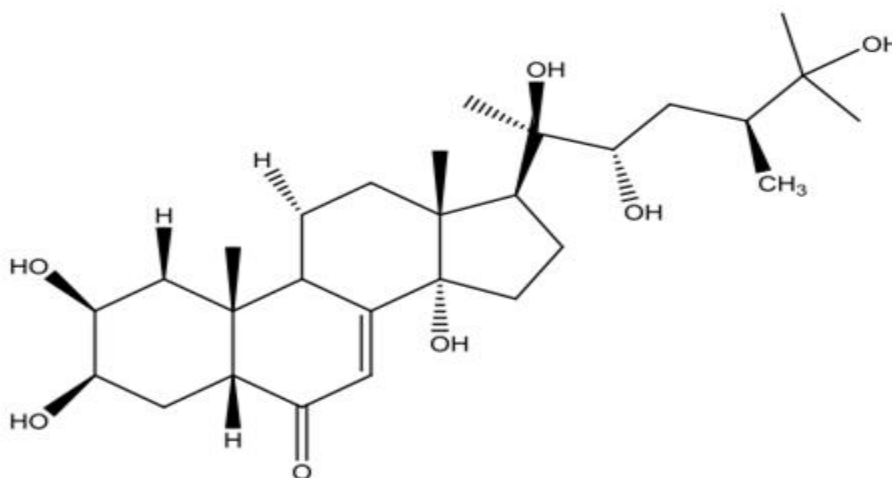
Kokoska, Janovska (2009)

Ekdysteroidy byly objeveny okolo roku 1960, a to díky jejich insekticidním vlastnostem a potenciálnímu využití v ochraně rostlin. Nejvíce popsanych látek

bylo identifikováno v *L. saflorové*. Ve studiích české laboratoře Akademie věd, byl jako zdroj ekdysteroidů zvolen kořen rostliny, část pro biologické testy ukazující afinitu ekdysteroidů k místu hmyzího receptoru, kam se jako lignany navazují. Biologická aktivita fytoekdysteroidů na změnu lidských keratinocytů, která byla patentována a používá se v kosmetice a dermatologii. Další experimenty, spojené s požadovanou produkcí 20-hydroxyecdysteronu a směsí ekdysteroidů z *L. saflorové*, s fixním kvalitativním i kvantitativním složením (Peschel et al., 2011; Vokáč et al., 2002).

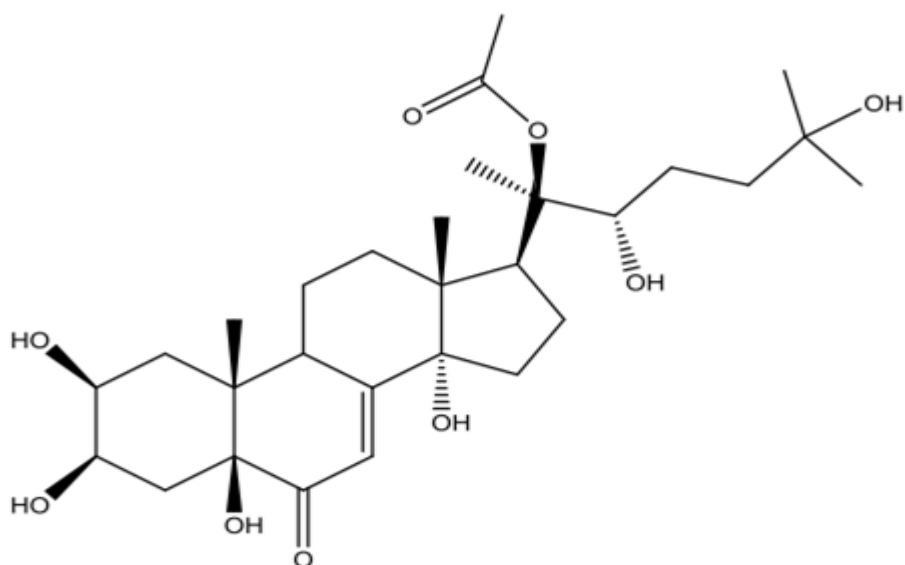
Jeden z prvních vědeckých článků ohledně ekdysteroidů obsažených v *L. saflorové* se zmiňoval o izolaci látky 20-hydroxyecdysteron, známou dříve jako β -ekdyson, ekdysteron, nebo polypodin A, získaný z podzemních částí rostlin. Obsažené látky v kořenech dosahovaly 0,04-0,81 %, v nadzemních částech 0,03-1,22 % a 0,27-1,51 % v semenech v sušině. V dalších letech výzkumu bylo detekováno 49 ekdysteroidů v kořenech, nadzemních částech a semenech (Kokoska, Janovska 2009; Borovikova et al., 1999; Buděšínský et al., 2009).

Obrázek 21 – Strukturní vzorec ekdysteroidu makisteron A



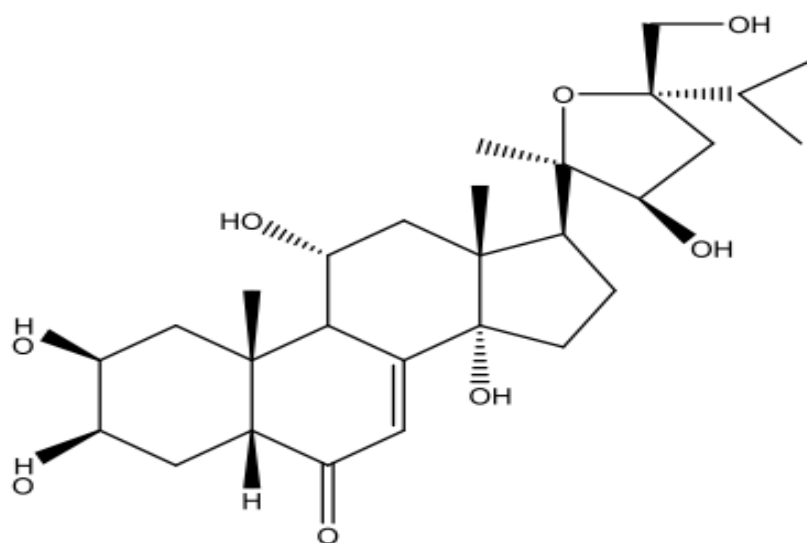
Kokoska, Janovska (2009)

Obrázek 22 – Strukturní vzorec ekdysteroidu rapisterone-D-20-acetate



Kokoska, Janovska (2009)

Obrázek 23 – Strukturní vzorec ekdysteroidu carthamosteron



Kokoska, Janovska (2009)

2.2.2. Fenolové kyseliny a flavonoidy

Dalšími látkami, které tvoří početnou skupinu vyskytující se v L. saflorové, jsou fenoly, resp. polyfenolové sloučeniny. V posledních letech se vědci zaměřili na zkoumání fenolických látek – flavonoidů, jako potenciálního efektivního léčiva s nízkou toxicitou. Flavonoidy jsou velmi bohatou skupinou rostlinných fenolických látek, které patří mezi sekundární metabolity produkované různými druhy rostlin.

Nevznikají primárně při základních metabolických procesech, jako je např. fotosyntéza nebo respirace, ale účastní se aktivně životního cyklu rostliny. Například pokud rostlina reaguje na změny podmínek životního prostředí nebo potřebuje odrazit nápor patogenů. Flavonoidy jsou důležitou složkou fenolicky aktivních látek v rostlinách, a dokonce jsou i běžnou součástí lidské stravy. Obecně jsou známy antioxidační účinky kakaa nebo vína a jejich účinky na posílení a regeneraci cév a kapilár. Mezi nejznámější patří rutin. Flavonoidy se podle struktury dělí na různé podskupiny – flavony, flavonoly, flavonony, katechiny, anthokyaniny a tyto podtypy mohou být souhrnně označeny jako glykosidy (Faizieva et al., 1999; Harmatha 2005; Sharaf et al., 2001).

Tabulka 2 – Flavonoidy a příbuzné sloučeniny v *L. saflorové*

<i>Číslo struktury</i>	<i>Název sloučeniny</i>	<i>Část rostliny</i>
51	6-Hydroxykaempferol-7-O-(6''-O-acetyl-b-D-glucopyranoside)	Nadzemní část
52	Patuletin	Nadzemní část
53	6-Hydroxykaempferol-7-glukoside	Nadzemní část
54	Quercetagitrin	Nadzemní část
55	6-Methoxykempferol	Nadzemní část
56	Quercetin-5-glucoside	Nadzemní část, kořen
57	Isorhamnetin-5-glucoside	Nadzemní část, kořen
58	Quercetin-3,30 -dimethyl ether	Nadzemní část, kořen
59	Quercetin	Kořen
60	Quercetagetin	Kořen
61	Luteolin	Květ, kořen

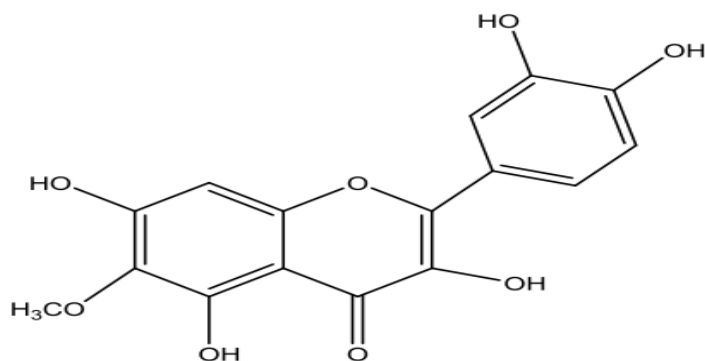
62	Kaempferol	Kořen
63	Isorhamnetin	Kořen
64	Quercetin-3-methyl ether	Květ, kořen
65	Quercetine-5-O-b-D-galactoside	Kořen
66	Isorhamnetine 5-O-a-L-rhamnoside	Kořen
67	Quercetagetin-7-O-b-gluco-pyranoside	Kořen
68	6-Hydroxykaempferol-7-O-b-gluco-pyranoside	Kořen
69	Quercetagetin-7-O-(6-O-acetyl-b-gluco-pyranoside)	Kořen
70	6-Methoxykaempferol-3-O-b-gluco-pyranoside	Kořen
71	6-Hydroxykaempferol-7-O-(6''-O-acetyl-b-Dgluco-pyranoside)	Kořen
72	Quercimeritrin	Kořen
73	Apigenin	Květ
74	Eriodictyol	Nadzemní část
75	Eriodictyol-7-b-gluco-pyranoside	Nadzemní část
76	Hesperetin	Kořen
77	Chrysanthemín	Květ, kořen
78	Cyanin+	Květ, kořen

Kokoska, Janovska (2009)

Studium těchto přírodních produktů nabízí i mnoho praktických využití. Zkoumání přirozených obranných mechanismů rostlin proti škůdcům, nebo nepříznivým vlivům okolí, by mohlo pomoci při vyvinutí nových metod ochrany rostlin bez

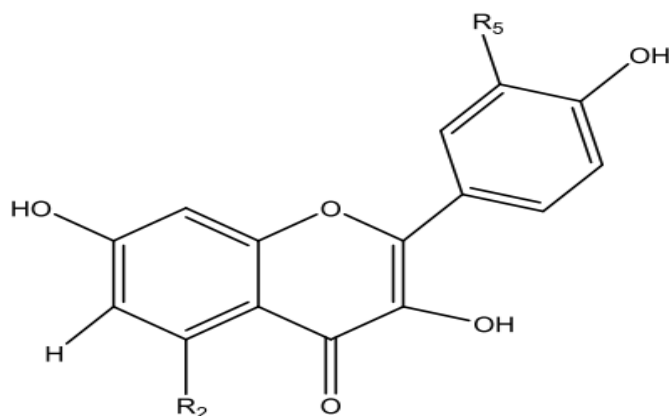
použití pesticidů. Dále by bylo možné využít poznatky v genovém inženýrství, farmacii, parfumerii nebo výrobě materiálů.

Obrázek 24 – Struktura flavonoidu patuletin



Kokoska, Janovska (2009)

Obrázek 25 – Struktura flavonoidu v L. saflorové kvercetin-5-O- β -D-galaktosid



Kokoska, Janovska (2009)

Kromě flavonoidů se mezi fenolové sloučeniny, které byly izolovány v nadzemních i podzemních částech rostliny řadí také fenolové kyseliny, lignany a taniny. Mimo zástupce fenylypropanoidů-flavonoidů a lignanů, byly ze semen L. saflorové izolovány lignanové glykosidy a také vzácné serotoninové fenylypropanoidy. Další kategorií nalezených sloučenin v L. saflorové byla skupina polyacetylenů, seskviterpenových laktonů a triterpenoidních glykosidů (Yamamotova et al., 2007; Kokoska, Janovska 2009).

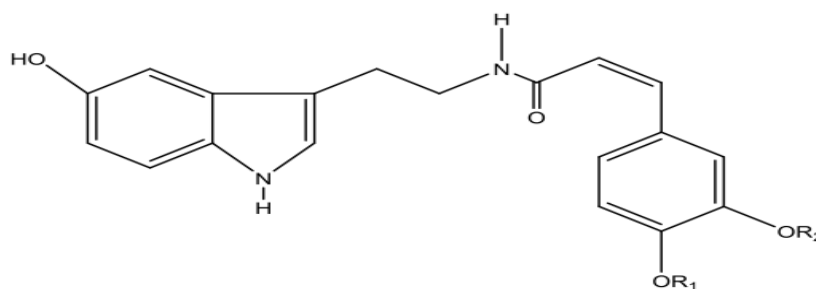
Tabulka 3 – Fenolové kyseliny v L. saflorové

*Číslo struk-
tury* *Název sloučeniny*

79	Benzoic acid
80	m-Hydroxybenzoic acid
81	p-Hydroxybenzoic acid
82	Salicylic acid
83	Protocatechuic acid
84	Gentisic acid
85	Vanillic acid
86	Gallic acid
87	Syringic acid
88	o-Coumaric acid
89	p-Coumaric acid
90	Caffeic acid
91	Ferulic acid
92	Sinapic acid
93	o-Hydroxyphenylacetic acid
94	p-Hydroxyphenylacetic acid
95	Chlorogenic
96	Neochlorogenic
97	Isochlorogenic acid a
98	Isochlorogenic acid b

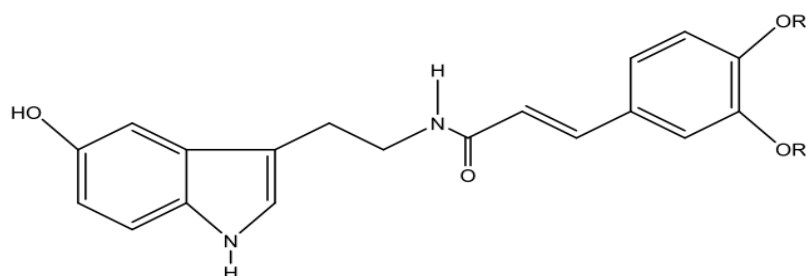
Kokoska, Janovska (2009)

Obrázek 26 – Struktura (*Z*) izomerů serotoninových fenylpropanoidů, *N*-(*Z*)-feruloylserotonin, *N*-(*Z*)-isoferuloylserotonin



Kokoska, Janovska (2009)

Obrázek 27 – Struktura (*E*) izomerů serotoninových fenylpropanoidů, *N*-(*Z*)-feruloylserotonin, *N*-(*Z*)-isoferuloylserotonin



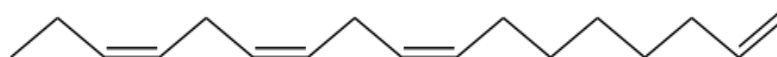
Kokoska, Janovska (2009)

2.2.3. Esenciální olej

Esenciální olej se získává z nadzemních a kořenových částí *L. saflorové* a příbuzných rodů *Carthamoides*. Olej má tmavě žlutou barvu a svými olfaktometrickými vlastnostmi připomíná pach čerstvě nasekaných kořenů. Pomocí specifických metod – plynové chromatografie (GC), hmotnostní spektrofotometrie (GC-MS) a plynové chromatografie s Fourierovou transformací (GC-FTIR), byly stanoveny tři hlavní složky v esenciálním oleji. Jedná se o aplotaxene (21,2 %), cyperene (17,9 %) a 13-norcypera-1(5),11(12)dien (22,6 %). Celkově bylo určeno 30 sloučenin, které představovaly 98% hmotnosti, z toho 69,6 % tvořily seskviterpenové uhlovodíky. V *L. saflorové* se seskviterpenové laktony vyskytují ve všech částech rostliny, seskviterpenové uhlovodíky obsažené v esenciálním oleji mohou představovat meziprodukt biosyntetické dráhy. Ve starších studiích se uvádí obsah silice obsažené v sušině rostlinného materiálu v rozmezí od 0,07 % do 0,11 % hmotnosti a 0,08 % až 0,09 % v podzemních orgánech a listech. Monoterpeny – geraniol 17,04 % až

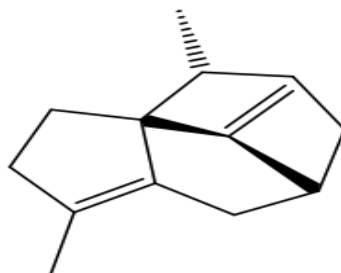
18,27 % hmotnosti – jsou hlavními látkami v oleji získaném z kořenů a oddenků, zatímco v oleji z listů je nejvíce obsažen seskviterpen β -caryophyllen a to v množství 24,65 % až 32,20 % hmotnosti. Vysoké procento linaloolu (8,88 % – 12,07 % hmotnosti) bylo naměřeno v oddencích a kořenech (Geszprych 2002; Havlik et al., 2009).

Obrázek 28 – Struktura aplotaxenu, uhlovodíku obsaženého v esenciálním oleji



Geszprych (2002)

Obrázek 29 – Struktura 13-norcypera-1(5),11(12)-dienu obsaženého v esenciálním oleji



Geszprych (2002)

2.3. Metody stanovení účinných látek

2.3.1. Extrakce pomocí organických rozpouštědel

Jedná se o metodu získávání obsažených látek z rostlinného materiálu, kdy je rostlinný materiál přiměřeně dlouhou dobu macerován v některém z typů organického rozpouštědla. Pro zlepšení procesu macerování rostlinné hmoty se provádí míchání a protřepávání macerátů. Po přiměřeně dlouhé době se provede za zvýšené teploty a tlaku odpaření organického rozpouštědla, čímž získáme příslušný extrakt. Pro získávání extraktu L. saflorové jsou dle způsobu následného využití nejvhodnější pro použití jako rozpouštědla alkoholy metanol případně etanol (Vrchotová et al., 2002).

Specifickou metodou je Soxhletova metoda extrakce. Při této metodě dochází při maceraci k zahřívání celého objemu macerátů. Tato metoda má výhodu vyšší výtěžnosti obsažených látek, ale dochází při ní k rozkladu termolabilních látek (Bárnet et al., 2015).

2.3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

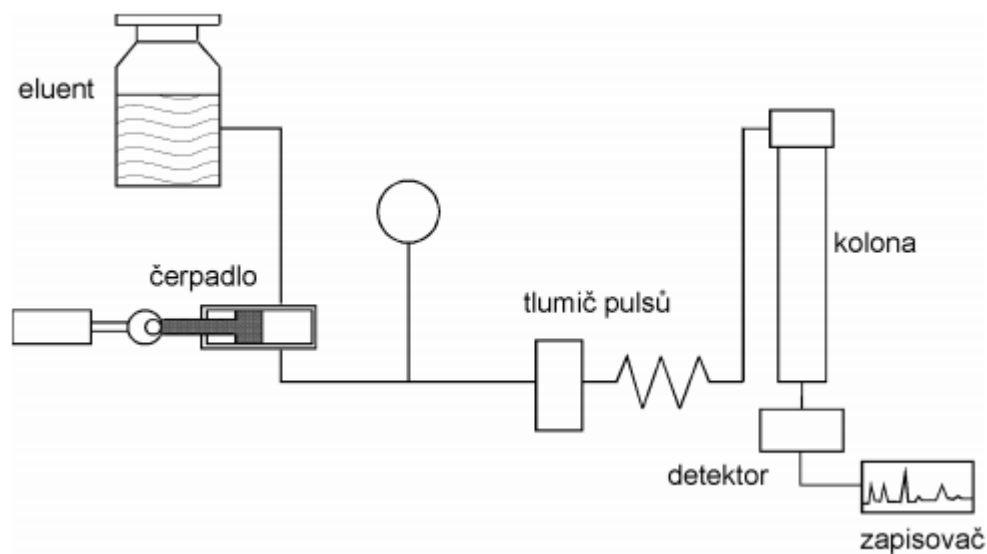
Princip a podstata separačních dějů využívaných v kapalinové chromatografii se v zásadě neliší od plynové chromatografie. Hlavní rozdíl spočívá v minimální kompresibilitě mobilní fáze, malému vlivu teploty na separaci a významně aktivní úloze mobilní fáze.

Kapalinová chromatografie zahrnuje všechny způsoby chromatografické separace, kde je mobilní fáze separace kapalná. Z pohledu experimentálního uspořádání hovoříme o kapalinové chromatografii v otevřeném systému tenkovrstvé chromatografie (Kopřiva 2002, Votavová 2004) a v uzavřeném systému dnes zejména využívané vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC (Kužel et al., 2009; Křížek, Šíma 2015).

2.3.3. Přístroje pro kapalinovou chromatografii

Mezi plynovými a kapalinovými chromatografy existuje jistá podobnost. Mobilní fáze je při isokratické eluci vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla, při gradientové eluci se komponenty mobilní fáze přivádějí ze zásobníku do směšovače, kde se mísí ve zvoleném poměru a teprve pak postupují do čerpadla. Odtud je mobilní fáze vedena přes tlumič pulzů čerpadla do kolony. Kolona bývá obvykle vyrobena z nerezové oceli, nebo speciálního skla a bezprostředně za ní je napojen detektor. Ten je spojen se zařízením pro registraci průběhu analýzy (zapisovač, nebo PC s hardwarovou úpravou a vyhodnocovacím softwarem). Někdy bývá za detektor zařazen sběrač frakcí mobilní fáze, jenž umožňuje zachytit separovanou složku vzorku, pro následnou detailní identifikaci (Křížek, Šíma 2015).

Obrázek 30 – Schéma isokratické kapalinové chromatografie



Křížek, Šíma (2015)

2.3.4. Čerpadla pro HPLC

Běžně se u HPLC pracuje s tlaky od 1 do 60 MPa, při průtocích mobilní fáze v rozsahu od 0,1 do 10 ml.min⁻¹.

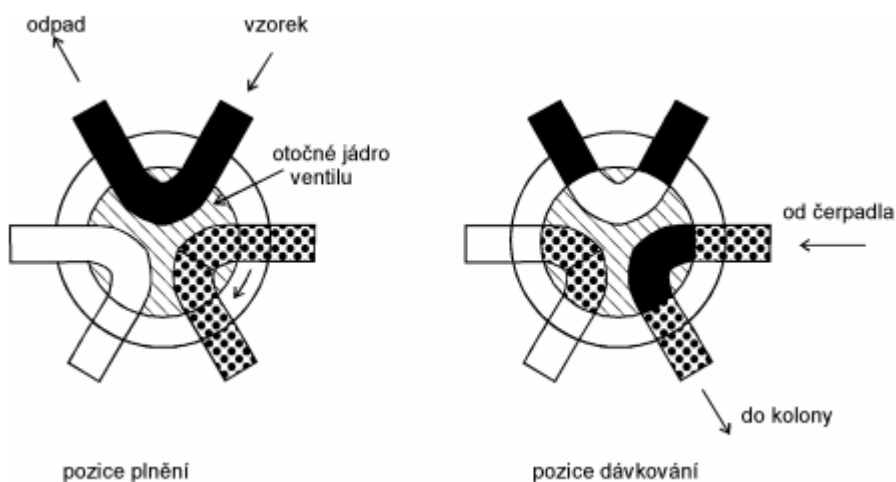
Dnes se v praxi využívají kontinuálně pulzující čerpadla, která jsou buď pístového, nebo membránového charakteru. Při každém pohybu pístu, nebo membrány vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do systému. Pulzace je tlumena zařazením dalšího čerpadla pracujícího v opačné fázi „dual head pumps“, nebo zařazením tlumiče pulzů. Tlumičem bývá odporový element z několika závitů svinuté kapiláry, nebo kapacitní elementy o malém vnitřním objemu, kde se k tlumení pulzů využívá slačitelnosti vnitřního jádra elementu zhotoveného z pružného plastu. Moderní čerpadla jsou doplněna elektronicky řízenými zpětnovazebními systémy, reziduální tlakové pulzace přímo ovládají otáčky motoru (Křížek, Šíma 2015).

2.3.5. Dávkování vzorku

Dávkování vzorků u HPLC lze provádět podobně jako u GC perforací pryžového septa mikrostříkačkou. Popsaný způsob se však vzhledem k vysokým provozním tlakům v koloně používá jen velmi zřídka. Více běžným, i když dnes rovněž ustupujícím způsobem, je nástřik mikrostříkačkou pomocí „stop flow“ ventilu, který umožňuje krátkodobé rozpojení systému čerpadla – kolona. Po nástřiku dojde k opětovnému propojení těchto částí systému.

Převažujícím způsobem nástřiku vzorku je použití šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Smyčka o známém konstantním objemu se nejprve naplní roztokem, poté se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a vnese vzorek do kolony (Křížek, Šíma 2015).

Obrázek 31 – Schéma dávkovacího ventilu



Křížek, Šíma (2015)

2.3.6. Kolony pro HPLC

Pro HPLC se používají rovné kolony o délce 10-100 cm, nejčastěji 10-20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm. Při dělení složitějších směsí se někdy kolony řadí za sebou. U přírodních vzorků obsahujících mnoho balastních látek, které by mohly vyvolat předčasné znehodnocení kolony, se často před vlastní kolonu zařazuje ochranná předkolona. Včasnou výměnou předkolony chráníme separační kolonu. Velikost sorbentu, kerým se HPLC kolony plní, se pohybují mezi 3-50 μm , nejčastěji mezi 5-10 μm (Křížek, Šíma 2015).

2.3.7. Náplně a eluenty

V klasické kapalinové chromatografii se obvykle používají polární silikagely jako stacionární fáze a spíše nepolární rozpouštědla jako mobilní fáze. Historicky mladší je použití hydrofobizovaného silikagelu, který je nepolární, jako stacionární fáze a spíše polární mobilní fáze. Tento systém se nazývá chromatografie na reverzní fázi. Jako mobilní fáze se nejčastěji používá binární, nebo ternární směsi vody, methanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu či dioxanu. Změnou pH mobilní fáze můžeme významně měnit retenční parametry mnohých látek. Zvýšením pH se zvyšují retenční časy bazických složek a snižují retenční časy složek kyselých. Revezního efektu docílíme snížením pH mobilní fáze. Chromatografie s reverzními fázemi se dnes používá u 80 % aplikací HPLC (Křížek, Šíma 2015).

2.3.8. Detektory

Kapalinová chromatografie takřka postrádá univerzální detektor, jakým je u GC plamenový izolační detektor nebo tepelně vodivostní detektor. Velmi hojně používaný je průtokový fotometrický nebo fluorimetrický detektor. Eluát protéká měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou, obvykle $V = 5-10 \mu\text{l}$, $l = 10 \text{ mm}$. Při vhodně zvolené vlnové délce je registrována absorbance eluátu. Moderní přístroje jsou obvykle vybaveny detektory s proměnlivou a programově měnitelnou vlnovou délkou - „diode array“ detektorem, schopným proměřit ve zvoleném okamžiku celé UV/VIS spektrum složky. Získaná informace je důležitou kvalitativní informací o sledované složce (Křížek, Šíma 2015).

2.3.9. Kvalitativní chromatografická analýza

Základní způsob kvalitativního vyhodnocování chromatogramů je založen na znalosti retenčních dat chromatografovaných látek. Identifikace spočívá v porovnání retenčního času neznámé látky a standardu separovaného za stejných podmínek. Toto porovnání se provádí ve dvou odlišných chromatografických systémech. Jedním z nejlepších způsobů identifikace eluovaných látek je napojení plynového či kapalinového chromatografu na hmotnostní spektrometr. Spojení GC-MS či LC-MS patří k nejlepším analytickým separačním a identifikačním systémům vůbec.

Metoda HPLC se dnes široce využívá v průmyslu, zdravotnictví, farmacii a mnoha dalších oborech (Křížek, Šíma 2015).

2.3.10. Kvantitativní analýza

Kvantitativním údajem detektorů je plocha pod eluční křivkou. Plochu je možno měřit řadou způsobů. Nejběžněji se postupuje násobením výšky píku jeho šířkou. Moderní chromatografy jsou však pravidelně vybaveny integrátorem plochy píků, jenž je dnes často součástí řídicího počítače chromatografu (Křížek, Šíma 2015).

2.3.11. Separace ekdysteroidů

Vhodné metody, které se využívají pro separaci, identifikaci a izolaci ekdysteroidů jsou techniky HPLC/TLC v režimech RP, NP-HILIC, nebo NP, i přesto se zdá být analýza ekdysteroidů obtížným analytickým problémem, na který je potřeba se ještě zaměřit (Kopřiva 2002).

Rostlinné ekdysteroidy jsou předmětem zájmu farmaceutického průmyslu a sportovní medicíny, hlavně díky jejich předpokládaným adaptogenním a anabolickým vlastnostem. Značný problém přináší vysoký obsah příbuzných ekdysteroidních i nepříbuzných sloučenin v extraktu, které komplikují chromatografické

metody izolující látku. Jednou z možností je využití dvourozměrné separace – 2D HPLC, nebo 2D TLC (Głazowska et al., 2018).

2.4. Farmakologické účinky některých účinných látek

L. saflorová, byla vždy spjata s obyvateli Sibíře, přinášela jim blahodárné účinky, a to i v lidovém léčitelství, kde hrála roli léku proti únavě, léčila impotenci a povzbuzovala organismus při rekonvalescenci po dlouhých nemocech. Tradičně se využívaly hlavně kořeny a oddenky, přičemž byla L. saflorová považována za tonikum nebo roborans (posilující, osvěžující lék a stimulant). Literatura uvádí že L. saflorová může mít příznivý vliv na paměť například při studiu či při léčbě návykového chování. Látky obsažené v L. saflorové mohou být dále nápomocné při potřebě zvětšení pracovní kapacity kosterního svalstva, při uvolňování neuróz, mohou zlepšit metabolismus lipidů a sacharidů a jinak přispívat k celkovému dobrému stavu organismu svými anabolickými a adaptogenními účinky, které se týkají především obsažených ekdysteroidů.

Díky ekdysteroidům se rostlina těší velké oblibě mezi sportovci, u kterých funguje jako anabolický doplněk stravy. Dále se s ekdysteroidy můžeme setkat v kosmetickém průmyslu. Z pohledu dalších skupin aktivních látek, kam patří flavonoidy je využití rostliny jako přírodního léčiva velmi zajímavé. Obecně u flavonoidů platí, že mají efekt na zpevnění kapilár a disponují hepatoprotektivním účinkem.

L. saflorová představuje z úhlu pohledu průměrného člověka skrytý klenot. Nalézá a přináší řešení mnoha civilizačních chorob. Svým působením na centrální nervovou soustavu a kardiovaskulární systém zlepšuje spánek, chuť k jídlu, náladu, stabilizuje mentální a psychický stav, napomáhá tělu se lépe vyrovnat se stresem, zvyšuje imunitu a rezistenci vůči nemocem a léčí gastrointestinální choroby.

Pokud se zaměříme na obecné účinky biologicky aktivních látek obsažených v extraktu z L. saflorové, vyvstává otázka komplexního farmakologického potenciálu rostliny, v podobě nedostatku hodnotně vypovídajících vědeckých studií (Havlik et al., 2009; Stodulka et al., 2008; Harmatha et al., 2007; Faizieva et al., 1999; Yamamoto et al., 2007).

2.4.1. Efekt na proteosyntézu a pracovní kapacitu

Různé in vivo testy na zvířatech a klinické testy na atletech, prováděné v SSSR, potvrdily signifikantní pozitivní efekt extraktu L. saflorové, hlavně ekdysteroidních složek (20E), na zvýšení syntézy proteinů a pracovní kapacitu testovaných subjektů. Tyto výsledky následně vedly k vývoji některých přípravků používaných ke

zvýšení síly, vytrvalosti a nárůstu svalové hmoty, hlavně u sportovců. Od roku 1970 je potvrzen anabolický efekt na experimentálních zvířatech, kdy jim byla podávána látka 20-hydroxyekdyson v dávce 5 mg/kg po dobu 7 dnů. Její působení se projevilo nárůstem váhy srdečního svalu, jater, ledvin a předního bércevního svalu. Další studie prokázaly, že denní podání stejné dávky intraperitoneálně urychlila růst mláďat, ale pouze u samečků. Anabolický efekt L. saflorové ve smyslu růstu svalové hmoty u obratlovců byl dokázán i při testování japonských křepelek, které byly krmeny rozdrčenými semeny v práškové formě. Nárůst živé hmotnosti se projevil již po 37 dnech (Stopka et al., 1999; Kokoska, Janovska 2009; Sovová et al., 2008).

Poslední studie prokazují zvýšenou biosyntézu makromolekul u potkanů po podání extraktu L. saflorové do dutiny břišní, hlavně proteinů, RNA a DNA (Todorov et al., 2000 a, b).

Skutečnost, že 20-hydroxyekdyson vykazuje anabolickou aktivitu u teplokrevných živočichů, kteří nejsou schopni vytvářet tento hormon endogenně, dává jasný důvod k předpokladu, že extrakt z L. saflorové bude rovněž vzbuzovat anabolický efekt díky vysokému obsahu ekdysteroidů. Je ověřeno, že ekdysteron stimuluje biosyntézu cytoplazmatické a nukleární RNA a zvyšuje obsah proteinů a glykogenu v srdci, játrech a svalech.

Účinky ekdysteroidů již byly testovány i v klinických studiích, a to zejména na atletech. Studie pracovaly s perorálním podáním preparátu Ecdysten (aktivní látka v něm obsažená je 20E), Levetone a Prime Plus. Ecdysten byl po dobu dvaceti dní užíván vždy v době denního aerobně-anaerobního tréninku. Po takto relativně krátké době došlo k markantním změnám v těle, například ke snížení obsahu tuku v organismu či k nárůstu svalové hmoty v porovnání s kontrolní skupinou. Perorální podávání Levetonu současně s tinkturou z L. saflorové způsobilo zřetelnou redukci krevní srážlivosti s nárůstem restituečních a pracovních kapacit u pozorovaných atletů v intenzivním tréninku. Užívání také ovlivnilo humorální imunitu atletů, protože užívání Levetonu s tinkturou signifikantně přispělo k regeneraci snížených hladin imunoglobulinů IgA, IgG a složky C3 komplementu (humorální nespecifická složka plazmy). Následné studie s 20 denním dávkováním Levetonu vedly k redukci malondialdehydu (MDA) v moči u vysoce trénovaných atletů a ke zvýšení fyzické aktivity na bicyklové ergometrii při postupném zvětšování zátěže.

MDA je jedním z meziproductů peroxidace lipidů, který se považuje za „marker“ oxidačního stresu. Pokud v lidském těle existuje nerovnováha mezi produkcí reaktivního radikálu kyslíku a antioxidační kapacitou organismu neboli dojde k oxidačnímu stresu.

dačnímu stresu, mohou být vlivem peroxidace lipidů poškozeny i fosfolipidy membrán buněk, což může mít za následek choroby jako je diabetes mellitus, ateroskleróza, zánětlivé onemocnění a další (Todorov et al., 2000 a, b; Gadzhieva et al., 1995; Gems 2008).

2.4.2. Vliv na kardiovaskulární systém a krev

Experimentální test in vivo na kočkách a potkanech, kterým se podával ethanolový extrakt z L. saflorové do tenkého střeva a dvanáctníku v dávce 200 mg/kg, způsobil pokles krevního tlaku u sledovaných skupin o 25-30 % v porovnání s kontrolními skupinami.

Perorální podání přípravku obsahujícího 20-hydroxyekdyson v dávce 5 mg/kg, zvýšil sekreci a viditelně zlepšil chemickou charakteristiku kvality žluče. To vedlo ke zlepšení celkových parametrů u potkanů s toxickým poškozením jater, indukovaným podáním heliotrinu. Při podávání ethanolového extraktu získaného z kořene rostliny krysám a myším, se účinek vyznačoval antidiabetickými vlastnostmi, tedy snížením krevní hladiny glukózy a zvýšením zredukovaných hladin jaterního glykogenu.

Dále byl extrakt podáván krysám s vysokým krevním tlakem. Pětidenní podávání 150 mg/kg u krys s infarktem myokardu zlepšil krevní viskozitu jak krve, tak i plazmy. Zvýšila se spontánní agregabilita erytrocytů, koncentrace fibrinogenu a došlo ke zvýšení deformability erytrocytů a jejich pohyblivosti. Opakované preventivní podávání preparátu z listů rostliny vedlo k antiarytmickému efektu, a to u uměle vytvořené arytmie pomocí adrenalinu u krys. Literatura dále uvádí stimulační efekt L. saflorové na inzulin a aktivitu vedoucí ke snižování hladin krevní glukózy. Dalším opakovaným podáváním 20E v extraktu L. saflorové se podařilo zvýšit počet erytrocytů a obsah hemoglobinu. Znatelný efekt byl pozorován i při regeneraci červené krevní řady u toxické anémie vyvolané fenylhydrazinem (Syrov et al., 1986; Plotnikov et al., 2001; Kokoska, Janovska 2009).

Flavonoidy izolované z L. saflorové hesperetin, kvercetin, luteolin, kaempferol, isorhamnetin, chrsanthemin a cyanin, vkazují dobré vlastnosti v rámci prevence akumulace cholesterolu a triglyceridů v léčbě hyperlipidémie u krys vyvolané tritonem. U králíků jejich účinek měl vliv na manifestaci aterosklerotického procesu, prostřednictvím posilování odolnosti cévní stěny. Terapeutický účinek flavonoidů je spojen s kapacitou flavonoidů inhibovat lokální mechanismus aterogeneze a dále s hypolipidémickou aktivitou. Jedna z posledních studií pouka-

zuje na inhibici slučování humánních krevních destiček, využitím surového ethanolového extraktu z *L. saflorové* získaného z nadzemní části rostliny (Khushbaktova, Syrov 1989; Koleckar et al., 2008).

2.4.3. Efekt na nervový systém včetně mozku u savců

Efektem na nervový systém se vyznačují zejména účinné látky extrahované z kořene, a to ecdysteroidy a izomery N-feruloylserotoninu. Při podávání dávky 500 mg/kg, hodinu před fyzickou zátěží, bylo výsledkem zlepšení pohyblivosti, tendence ke snížení narkotického efektu chloralhydrátu a zvýšení excitability centrální nervové soustavy. Dále se extrakt projevoval ve zlepšení schopnosti učit se, zlepšením paměti a eliminace poškození paměti způsobenou skopolaminem.

Při perorálním podávání 40 % extraktu ethanolu se sušinou rostliny, vedla dávka 150 mg/kg ke snížení hustoty synapsí v kůře mozkové u krys trpících mozkovou ischemií. Přípravek Ecdysten v dávce 5-10 mg/kg u králíků vedl k aktivaci elektroencefalogramu (přístroj zaznamenávající mozkovou aktivitu), k budicímu efektu a redukoval uměle navozený hypnogení stav thiopentalem. Ecdysten vykazoval antihypnogení aktivitu, a to redukcí spánku v experimentu na myších, kterým se nejprve podal k navození spánku chloralhydrát a hexenel. Několikanásobné podání Ecdystenu potkanům stimulovalo jejich emocionální a průzkumnou aktivitu při zkrácení času rozvoje vzniku podmíněných reflexů. Jedna z dalších studií poukazovala na selektivní vlastnosti N-feruloylserotoninu, které přispívají k redukcí stresu. Pouze v jedné klinické studii, kde byl testován odvar kořene z *L. saflorové* bylo dosaženo úpravy manifestace deprese u alkoholiků. Prospěšně působící byl také odvar z oddenku v léčbě závislosti na alkoholu. Odvar z kořene přispěl k dosažení zlepšení zdravotního stavu u pacientů s bolestmi trávicího traktu, které byly způsobeny somatickým působením (Logvinov et al., 2001; Syrov, Khushbaktova 2005; Yamamoto et al., 2007; Sovová et al., 2008).

L. saflorová je zdrojem serotoninových fenylypropanoidů, tedy fenylypropanoidů, které jsou konjugované se serotoninem a strukturně jsou podobné melatoninu. Při pohledu na jejich strukturu lze přisuzovat těmto látkám vliv na serotonergní dráhy. Serotonergní neurotransmiterový systém je jedním ze systémů, který ovládá reakci těla na stres a bolest. Jedním z velkých vědeckých témat jsou právě různé implikace mezi stresem a bolestí na neuronální úrovni. Stres pravděpodobně aktivuje inhibici bolesti v rámci několika specifických neuronálních okruhů, samotná inhibice potom probíhá buď opioidním, nebo neopoidním mechanismem. Stres tedy přirozeně aktivuje endogenní analgetický systém, a do-

konce i snižuje efektivitu působení analgetik. Extrakt z L. saflorové je tradičně využíván k redukci stresu, zvýšením rezistence a imunity. Tato kritéria jsou přisuzována adaptogenu, za který je rostlina považována. Díky přítomným izomerům N-feruloylserotoninu se předpokládá, že by rostlina měla snížit intenzitu navozené analgezie po působení stresu a měla by snížit i pocit úzkosti. V rámci studie na potkaních se testoval účinek N-feruloylserotoninu na nociceptivní reakci, a to jak za normálních, tak za stresových podmínek. Druhotnou úlohou bylo zjistit efekt na úzkost (Harmatha et al., 2007; Yamada, Nabeshima 1995).

Serotoninové fenylpropanoidy lze nalézt v semenech rostliny. Z nich byla získána krystalická frakce, která obsahovala kvalitativně 4 izomerické sloučeniny-izomery (Z) a (E) N-feruloylserotoninu a N-isoferuloylserotoninu, s kvantitativně nejobsáhlejším N-(E)-isoferuloylserotoninem (Harmatha et al., 2007).

Podrobení potkanů „tail-flick“ testu vedlo k výsledkům, kde izomery N-feruloylserotoninu neměly žádný vliv na bazální nocicepci. U skupiny s vysokým prahem bolesti docházelo ke zmírnění analgezie v průběhu stresových testů po podání látky N-feruloylserotoninu. Jeho anxiolytických účinek byl potvrzen u potkanů s vysokým prahem bolesti, kteří po podání dávky začali v průzkumné činnosti bludiště. Jejich vstup do částí s otevřenými rameny byl frekventovanější (Yamamoto et al., 2007).

2.4.4. Neurologie

2.4.4.1. Úzkost

Intraperitoneální injekce izomerů N-feruloylserotoninu (látko izolovaná ze semen L. saflorové) v dávce 10 mg/kg u potkanů snížila úzkost u zvířat s vysokým prahem bolesti (jednalo se hlavně o více úzkostné jedince) (Yamamoto et al., 2007).

2.4.5. Interakce s metabolismem glukózy

2.4.5.1. Glukóza v krvi

Při koncentracích 10 μ M byl 20-hydroxyecdysol schopen inhibovat produkci glukózy *in vitro* v krevním séru hepatomových krysích buňkách (H4IIE) s podobnou účinností, jako fyziologicky relevantní koncentrace inzulínu (10 μ M). Inhibice produkce glukózy byla závislá na aktivaci PI3K. Tato inhibice produkce glukózy byla spojena s potlačením aktivace glukózo-6-fosfatázy (G6Pase) a fosfoenolpyruvát karboxykinázy (PEPCK), což jsou dva glukosové enzymy omezující rychlost tvorby

glukózy pod kontrolou inzulínu (Kizelsztejn et al., 2009; Wu et al., 2005; Hanson, Reshef 1997; Chen et al., 2006).

2.4.6. Kosterní svalstvo a fyzická zdatnost

2.4.6.1. Hypertrofie

Ekdysteroidy, včetně 20-hydroxyecdysonu, jsou zapojeny do syntézy svalových proteinů (MPS) v izolovaných svalových buňkách prostřednictvím mechanismu závislého na fosfoinositid-3-kináze (PI3K). Předpokládá se, že aktivace Akt/PI3K vede ke svalové syntéze vyvolané 20-hydroxyecdysonem, ke které dochází za zvýšené hladiny intracelulárního vápníku, způsobené domělným receptorem vázaným na G-protein (GPCR), navázaným na fosfolipázu C (PLC) / inositol 3-fosfát (IP3).

I když přesné mechanismy 20-hydroxyecdysonu na syntézu svalového proteinu nejsou zcela objasněny, zdá se, že zahrnuje rychlé zvýšení vápníku v buňce (cytosol), což způsobuje aktivaci signalizace Akt / PI3K. Tato aktivace pak indukuje syntézu svalových proteinů.

Ve studii sledující potkany, kterým bylo perorálně podáváno 20 mg/kg 20-hydroxyecdysteronu denně po dobu deseti dnů, byl zjištěn nárůst tělesné hmotnosti o 51,9 % vyšší než u kontrolních skupin. Ecdysteron triacetát a tetraacetát byly také účinné (nárůst o 30,8-36,5 % vyšší než kontrola) a účinky 20-hydroxyecdysonu se zdály být silně závislé na hormonálním stavu potkanů, protože hypofyzektomizované a impuberální krysy vykazovaly malou, nebo žádnou rychlost zlepšení růstu (Gorelick-Feldman et al., 2008; Gorelick-Feldman et al., 2010; Cheng et al., 2013; Tóth et al., 2008; Minamimoto et al., 2008; Syrov 2000; Seidlova-Wuttke et al., 2010 a).

2.4.6.2. Účinky na výkon

Bylo zaznamenáno, že 50 mg/kg 20-hydroxyecdysonu v krmné dávce potkanů v průběhu 28 dnů zvyšuje sílu o 18 % ve srovnání s kontrolní skupinou. V současné době neprobíhají žádné studie hodnotící tuto vlastnost suplementace na lidech (Minamimoto et al., 2008; Chermnykh et al., 1988; Gorelick-Feldman et al., 2008).

2.4.7. Imunologie a zánětlivé onemocnění

2.4.7.1. Interleukiny

Extrakt z L. saflorové potlačuje sekreci zánětlivých cytokinů, včetně TF- α , z HeLa buněk transferovaných IL-6 geny in vitro. Celý rostlinný extrakt byl v potlačení zánětlivých onemocnění účinnější než čistý 20-hydroxyecdysyon. U potkanů byl nárůst

TNF-a (2,7krát) a IL-6 (3,1krát) vyšší v důsledku diety s vysokým obsahem tuků po období osmi týdnů (Peschel et al., 2011; Dushkin et al., 2014).

2.4.7.2. Neutrofily

Izomery N-feruloylserotoninu v koncentracích od 10 do 100 μM izolovaných ze semen *L. saflorové* inkubované z lidského séra, byly schopny silně potlačit aktivaci forbol-myristát-acetátů (PMA). Zdá se, že inhibice je částečně způsobena inhibicí fosforylace PKC a ovlivňuje nárazovou reakci neutrofilu (Nosál et al., 2011; Nosál et al., 2010).

2.4.8. Efekt na reprodukci a sexuální funkce

Z pohledu afrodiziakálního působení u lidí byl prokázán pozitivní vliv na reprodukci a sexuální funkci. Předmětem klinické studie byl preparát Ecdysten, jehož komplexní účinek zahrnuje i vliv na zlepšení sexuálních funkcí a kvality spermií u mužů trpících neplodností. Podobného zjištění se dostalo i při testování mužů po infarktu myokardu (Mirzaev et al., 2000).

2.4.9. Efekt na libido

Studie prováděné na kancích, u nichž se testoval vliv dopňku *L. saflorové* a jiných rostlin (*Eurycoma longifolia* Jack a *Tribulus terrestris*) na plodnost a libido, který byl podáván denně, prokázaly nárůst koncentrace spermatu v objemu ejakulátu. Libido se u testovaných jedinců zvýšilo o 20 % ve srovnání s výchozími hodnotami v experimentální skupině (Frydrychová et al., 2011).

2.4.10. Interakce s hormony

2.4.10.1. Kortikosteroidy

Podávání 300 mg/kg 2,2% *L. saflorové* po dobu osmi týdnů, vedlo u potkanů v dietě s vysokým obsahem tuků ke zvýšení kortikosteronu až o 27 % v séru. Toto navýšení je srovnatelné v rozsahu podobné dávky extraktu z granátového jablka obsahující 40 % kyselinu ellagovou. *L. saflorová* byla také schopna obnovit koncentraci kortikosteronu v nadledvinkách, která byla vyčerpána o 25 % (Dushkin et al., 2014).

2.4.10.2. Hormony štítné žlázy

U ovariectomizovaných (chirurgické odstranění vaječnicků) samic potkanů, kterým byl podáván 20-hydroxyecdyson v krmivu v rozmezí 1 až 6 g/kg, neovlivnil přípravek v porovnání s kontrolní skupinou funkci štítné žlázy. V současné době neexistují žádné podobné studie na lidech (Seidlova-Wuttke et al., 2010 a).

2.4.10.3. Estrogeny

U ovariectomizovaných krys, kterým byl podáván 20-hydroxyecdysol v množství od 8 do 115 mg/kg tělesné hmotnosti, nebylo zaznamenáno žádné zvýšení hmotnosti dělohy nebo zvýšené koncentrace estradiolů v séru, což nenaznačuje významný estrogení účinek.

Nezdá se, že by ekdysteroidy interagovaly s estrogenovými receptory (Seidlova-Wuttke et al., 2010 a; Seidlova-Wuttke et al., 2010 b; Kapur et al., 2010).

2.4.10.4. Androgeny

20-hydroxyecdysol se nedokázal navázat na androgenní receptory v koncentracích mezi 1 až 100 μM , což je koncentrační rozmezí, ve kterém dochází ke zvýšené syntéze proteinů. Perorální podání 5 mg/kg denně po dobu deseti dnů nezpůsobilo žádné změny ve ventrální hmotnosti prostaty a semených váčků, což naznačuje negativní androgenní aktivitu (Gorelick-Feldman et al., 2008; Syrov 2000).

2.4.10.5. Antioxidační imunomodulační a protinádorová aktivita

Protirakovinné vlastnosti *L. saflorové* jsou v poslední době předmětem různých studií. Jedna z nich se věnuje apoptóze v lidských buněčných liniích gliomů různého stupně, za pomoci kořenového extraktu z *L. saflorové*. Z výsledku je patrné, že TR (transformovaný kořenový) extrakt vykazuje protirakovinnou aktivitu (gliomové buňky II. a III. stupně) inhibicí proliferace gliomových buněk a indukci apoptotické buněčné smrti, kde může být TR extrakt použit jako slibné protirakovinné činidlo.

Transformované kořenové extrakty *L. saflorové* vykazují protinádorovou aktivitu u buněčných linií lidské leukémie a plicního adenokarcinomu. Kořeny transformované *Agrobacterium rhizogenes* jsou bohaté na deriváty kyseliny caffeoylchinové, známé jako silné antioxidační sloučeniny. Výsledky naznačují, že extrakt Rc TR inhiboval životaschopnost buněk všech testovaných buněčných linií (leukemické buňky K-562 a CCRF-CEM a buňky plicního adenokarcinomu A549). Navíc extrakt Rc TR snižuje potenciál mitochondriální membrány a vykazuje genotoxicitu proti testovaným buněčným liniím zvýšením mitochondriálních DNA lézí (geny ND1 a ND5 působí poškození nukleové DNA v genu TP53). Výsledky ukazují, že extrakt Rc TR může účinně léčit rakovinné buňky indukci dysfunkce mitochondrií. Role mtDNA může být navíc slibným faktorem v chemoterapii (Skała et al., 2018).

2.4.10.6. Interakce s rakovinovým mechanismem

U žen s rakovinou vaječníků, které při léčbě užívaly podpůrný adaptogenní přípravek ze směsi bylin obsahující *L. saflorovou*, *Rhodiola rosea*, *Eleutherococcus senticosus* a *Schisandra chinensis*, vedl vedle probíhající chemoterapie k mírnému zvýšení T-buněk, zmírňoval stres a únavu a posiloval imunitní systém (Kormosh et al., 2006).

2.4.11. Bezpečnost a toxikologie

Samotný 20-hydroxyecdyson má velký terapeutický index a velmi nízké riziko akutní toxicity. V současné době ještě nebyly provedeny studie u *L. saflorové* na chronickou toxicitu (Matsuda et al., 1970).

2.5. Současné využití rostliny a jejích účinných látek v ČR a ve světě

2.5.1. Využití ve farmacii

Působením na lidský organismus je *L. saflorová* podobná ženšenu. Jako první upozornil na její léčivé účinky A. A. Saratikov v roce 1947, kdy její účinky zkoumal u pacientů trpících všeobecnou slabostí a depresemi. Biologický účinek nevykazují pouze rostliny pocházející ze své domoviny, ale též rostliny vypěstované v monokultuře při odlišných geografických podmínkách.

L. saflorová se používá převážně jako neurostimulátor, afrodisiakum a při psychické a fyzické zátěži organismu. Při stavech vyčerpání zvyšuje vitalitu pacientů. Při intenzivní práci se zlepšují funkční ukazatele organismu: zvyšuje se praceschopnost, síla zádočných svalů, hbitost rukou a jejich vytrvalost vykonávat statickou práci, přesnost a koordinace pohybů. Dále pomáhá zvyšovat také vitální kapacitu plic a zkracuje regenerační periodu organismu. Použití extraktu z *L. saflorové* přináší větší efekt v případech předcházející únavy. U jedinců s normální zásobou energie má jen nepatrný vliv. Nepůsobí na posun hranice maximálních možností organismu, ale na její efektivní využití následkem stabilizace obsahu makroergních fosfátů ve svalech a ekonomičtějšího využití glykogenu.

L. saflorová působí velmi dobře při astenii a depresích, což ji předurčuje k využití v psychiatrické a neurologické praxi, kde zlepšuje náladu pacientů a podstatně snižuje intenzitu depresivních projevů. Také byla s úspěchem použita při léčbě lehčích forem diabetu. *L. saflorová* se užívá při rekonvalescenci a bolestech hlavy. Podporuje trávení a odstraňuje nechutenství. Mírně zvyšuje krevní tlak, avšak některé klinické pokusy ukázaly opačné účinky. Dobrých výsledků bylo dosaženo také při léčení impotence. Působí anabolicky, snižuje hladinu cukru, tuků

a cholesterolu v krvi, má příznivý vliv na činnost jater a také na kardiovaskulární systém. Extrakty mají vliv na syntézu bílkovin, obdobně jako anabolické hormony na bázi testosteronu, ovšem bez nežádoucích vedlejších účinků. L. saflorová má schopnost snižovat obsah glukózy v krvi při adrenalinové hyperglykémii, zároveň však brání rozvinutí hypoglykemické reakce navozené aplikací inzulínu. Pomáhá urychlit reparační procesy a normalizovat strukturu jaterní tkáně při hepatitidě. Pomáhá lépe zásobit mozek kyslíkem, což je pravděpodobně způsobeno dilatací cév, které mají nutritivní funkci. Velmi zajímavá je schopnost usnadňovat vybavení dynamického stereotypu, určitou dobu necvičeného, zlepšení učení a fixace paměťové stopy.

Na rozdíl od některých jiných adaptogenních rostlin jsou rizika spojená s užíváním L. saflorové prakticky zanedbatelná – jediným větším rizikem je nízký krevní tlak. U některých osob nastává po vyšších než doporučených dávkách zvýšené podráždění mozku, které je vystřídáno spavostí. Vyčištěné sumární extrakty, které obsahují především jen ekdysteroidy a flavonoidy, jsou prakticky bez vedlejších účinků.

Neužívanější částí rostliny je kořen, ale může se užít i list případně semena (velmi málo uváděno). Nejvíce látek z rostliny vyluhujeme formou tinktury, kdy kořen dáváme do 50-60% alkoholu. Nadzemní část se využívá například jako čajovina, která se sklízí v době kvetení porostu (Bárnet et al., 2015).

2.5.2. Ecdysten

Jedná se nehormonální anabolický přípravek, který byl testován v klinických studiích, kde se projevil anaboličtěji než Dianabol. Neobsahuje androgeny a po jeho užití nehrozí vedlejší účinky. Jeho aktivní složkou je Ecdysteron získaný z L. saflorové, která je získávána přímo z Ruska.

Obrázek 32 – Přípravek Ecdysten

Supplement Facts	
Serving Size: 1 Capsule Servings Per Container: 90	
Amount Per Serving	
Ecdysterone (Ecdypure™)	15mg
BioPerine®	5mg
Other Ingredients: Rice powder and magnesium stearate	
Suggested Use: As a dietary supplement take 1 to 2 capsules 3 times a day. For best results it is also recommended to increase your daily protein intake while using this product.	
WARNING: Consult your physician before ingesting any new dietary supplement.	
9351 MFG 04/11	



Zdroj: eVitamins

Prováděné klinické studie na lidech, kteří trpěli perzistující a akutní giardiózou neboli lambliózou (onemocnění vyvolané prvokem *Lambliie* střevní), pomohl potvrdit léčebný účinek přípravku Ecdysten obsahující L. saflorovou (Janovská et al., 2008; Chobot et al., 2003; Osipova et al., 2002).

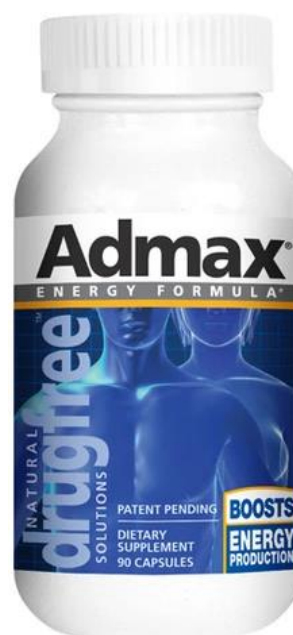
2.5.3. Admax

Admax je přípravek s adaptogeny neboli látkami, které zvyšují odolnost těla vůči stresu. Dvě klinické studie potvrdily, že pomáhá navýšit energetický výdej těla.

Obrázek 33 – Preparát Admax

ADMAX contains adaptogens, substances that help increase the body's resistance to stress. Two clinical studies have found it enhances the body's energy production.*

Supplement Facts	
Serving Size 2 capsules Servings Per Container 45	
Amount Per Serving	% DV
Adaptogen Blend 650 mg	
Leuzea carthamoides root extract *	
Rhodiola rosea root extract *	
Eleutherococcus senticosus root extract *	
Schisandra chinensis berry extract *	
Daily Value not established.	
OTHER INGREDIENTS: Cellulose, gelatin (Kosher and Halal certified), water.	



Zdroj: Genext NUTRITION

Byla provedena klinická studie preparátu Admax (kombinace *L. carthamoides*, *Rhodiola rosea*, *Eleutherococcus senticosus* a *Schizandra chinensis*), jejíž předmětem bylo pozorování vlivu preparátu na imunitní systém u pacientek s karcinomem vaječníků. Pacientky užívající Admax měly vyšší hladinu T lymfocytů (hladiny IgG a IgM byly vyšší) než ty, které preparát neužívaly. Výsledkem bylo posílení imunity u pacientek s karcinomem ovaria léčených chemoterapeutiky (Miliauskas et al., 2005; Harmatha et al., 2008; Hamburger et al., 2006).

2.5.4. Využití ve výživě zvířat

Pro zkrmování *L. saflorové* hovoří její živinové složení, které je srovnatelné s běžnými píceňinami. Jedním z kritérií zařazování krmiv rostlinného původu do krmných dávek monogastrických zvířat je jejich aminokyselinové složení, jež je v případě *L. saflorové* velice příznivé. Abychom však získali kvalitní krmivo, je nutné sklizeň provést včas. Pro správné využití nadzemní hmoty *L. saflorové* je nezbytné dodržovat termíny sklizně. Porost sklizený s květy má v posledních fázích kvetení značně vyšší obsah vlákniny, což snižuje celkovou stravitelnost (Kužel et al., 2002 b).

Nadzemní hmotu lze zkrmovat v zeleném stavu, přidávat do siláží, ale i sušit. Siláž běžně připravovaná z nadzemní části rostliny je charakteristická vysokým obsahem kyseliny mléčné a zanedbatelným množstvím kyseliny máselné. Produkce senné moučky umožňuje zařazení *L. saflorové* ve výživě menších druhů hospodářských zvířat jako jsou například prasata, drůbež nebo králíci. Možné je i zkrmovat semena drůbeži (Kužel et al., 2002 b).

Z publikované literatury vyplývá, že zkrmování objemných krmiv z *L. saflorové* do 10 % krmné dávky má pozitivní vliv na vývoj a hlavně zdravotní stav. U zvířat, u kterých jsou zkrmována krmiva z *L. saflorové*, byl také stanoven vyšší obsah fytoekdysteroidů v mase a mléce (Bárnet et al., 2015).

2.5.5. Využití v ochraně rostlin

Přípravky na bázi rostlinných extraktů jsou převážně používány pro ochranu skleníkových kultur, při ochraně před parazity u domácích a hospodářských zvířat, ale také v ochraně ovoce a zeleniny, kdy jsou využívány především ekologickými zemědělci a drobnými pěstiteli.

Přípravky na ochranu rostlin obsahující extrakt z *L. saflorové* nejsou v České republice prozatím registrovány. Potenciál jejich využití pro ochranu rostlin před hmyzími škůdci, a to jak preventivně, tak kurativně, je zejména proti sviluškám, molicím, mšicím, housenkám, larvám a dospělcům listožravých brouků. Přípravky se aplikují ve formě postřiků na užitkové a okrasné rostliny na pěstebních plochách

(volné půdě), krytých pěstebních zařízeních (pařeniště, skleníky, foliovníky) i v domácnostech (Bárnet et al., 2015).

2.6. Vliv technologie pěstování na obsah účinných látek

2.6.1. Biotické a abiotické faktory působící na rostlinu

V průběhu vývoje se rostliny vystavují různým vlivům okolního prostředí, které mohou měnit jejich základní metabolismus. K úspěšnému dokončení životního cyklu se musí rostlina vyrovnat s ekologickými omezeními zahrnujícími patogenní napadení, extrémní výkyvy teplot, vodní deficit a vysokou intenzitu světla. Pokud některý z faktorů překročí kritickou mez, mohou být rostliny pod tlakem nebo ve stresu. To následně může vést ke snížení rychlosti růstu, nižší produktivitě a v extrémních případech k úhynu rostliny. Faktory, které ovlivňují životní prostředí rostlin, se rozdělují do dvou hlavních skupin na biotické a abiotické (Bartwal et al., 2013; Kužel et al., 2006, 2015).

Za biotický stres se považuje napadení rostliny biologickými činiteli, jejichž účastníky jsou houby, viry, bakterie a hlístice. Kromě různých patogenních organismů se do biotických faktorů zahrnují také plevely, hmyz, býložravci a další predátoři (Verma, Shukla 2015; Bartwal et al., 2013; Zhao et al., 2005).

Během vývoje rostlina interaguje s okolním prostředím a přichází do styku s různými abiotickými složkami jako je voda, světlo, teplota, půda a chemické látky (hnojiva/minerály). Mezi abiotické stresory patří látky znečišťující ovzduší, extrémní teploty, sucho, vysoká intenzita světla, mechanické poškození a salinita (Verma, Shukla 2015; Bartwal et al., 2013).

Stres vyvolaný v rostlinách, ať již biotický či abiotický, má za následek nadprodukcí reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species – ROS). Tyto reaktivní formy mají tendenci oxidovat různé buněčné biomolekuly, jako jsou bílkoviny, lipidy, nuleové kyseliny apod. Rostliny disponují složitým antioxidačním obranným mechanismem, aby zabránily hromadění ROS a tím zajistily své životní pochody. Antioxidační obranný mechanismus se skládá z různých enzymatických a neenzymatických molekul, produkovaných proti nepříznivým vlivům okolního prostředí. Značná část těchto molekul patří do kategorie sloučenin zvaných sekundární metabolity (Shabala 2012; Bartwal et al., 2013).

2.6.2. Sekundární metabolity rostlin

Za hlavní funkci sekundárních metabolitů se považuje odolnost proti antagonistickým organismům, např. proti býložravcům. Mohou fungovat jako odpuzovače, jedy, látky snižující stravitelnost, nebo naopak atraktanty pro příznivé nepřátele

býložravců. Z důvodu absence imunitního systému u rostlin, vykazují rostliny odolnost proti patogenům prostřednictvím sekundárních metabolitů. Některé sekundární metabolity mají antimikrobiální účinky (např. fytoalexiny), které fungují jako obranný systém rostlin po napadení mikroorganismy (Kessler 2015; Verma, Shukla 2015).

Sekundární metabolity nejsou přímo zapojeny do růstu, vývoje nebo reprodukce rostlin. Nehrají roli v syntéze proteinů, dýchání, asimilaci živin nebo fotosyntéze, a tudíž nemají významný vliv na primární životní pochody rostlin (Bartwal et al., 2013; Kužel et al., 2003).

Bourgaud et al. uvádí přímý vliv sekundárních metabolitů na schopnost adaptace rostlin na jejich okolní prostředí. Působí také jako alelopatické látky a tím omezují růst, nebo klíčivost potencionálně konkurenčních rostlin (Bourgaud et al., 2001).

Sekundární metabolity přispívají ke specifickému zápachu, barvě a chuti rostlin. Mají významné praktické využití ve zdravotnictví, kosmetice a potravinářském průmyslu. Obecně jsou v rostlinách přítomny v nízkých koncentracích (méně než 1 % sušiny) a jejich obsah závisí na fyziologické a vývojové fázi rostlin (Akula, Ravishankar 2011).

2.6.3. Elicitace

Jedním ze způsobů, jak v rostlině zvýšit obsah účinných látek může být elicítace (Kužel et al., 2006, 2015).

Obranná funkce rostliny může být spuštěna při použití celé řady sloučenin nebo faktorů nazývaných elicitory. Termín elicitory označuje všechny podněty, které stimulují jakýkoliv typ obrany rostlin (Fejo 2019).

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

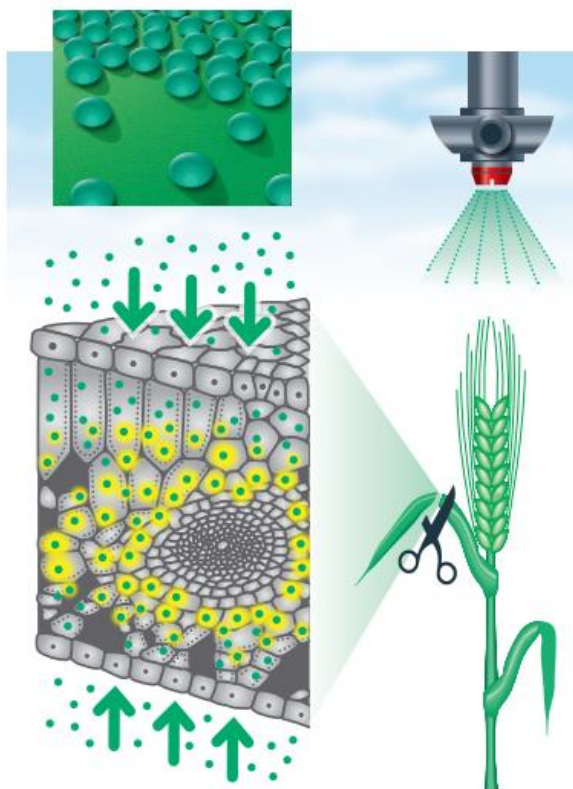
Aplikací elicitorů docílíme navýšení obsahu fytochemických látek v rostlinách. Je možné je používat samostatně nebo v kombinaci ve vybraných růstových fázích rostliny (Kužel et al., 2006, 2015). Často se jedná o komplexní biologické přípravky, ve kterých není známa molekulární struktura účinných látek. Příkladem takového elicitoru jsou roztoky kyseliny acetylsalicylové nebo komerčně prodávaného přípravku Nanofyt Si®.

Obrázek 34 – Pomocný přípravek s nanočásticemi křemíku a přírodních esterů



Zdroj. Agra Group

Obrázek 35 – Princip přípravku Nanofyt Si®



Stabilizované nanočástice SiO₂ snadno pronikají do rostlin. Vytvářejí obrovské aktivní povrchy a ve spojení s přírodními estery, které se postupně uvolňují, příznivě ovlivňují kondici pěstovaných rostlin a omezují stres.

Zdroj: Agra Group

Použitá koncentrace a interval mezi jednotlivými aplikacemi a sklizní, vyvolává různé reakce charakteristické pro daný druh rostlin, což je nutné zohlednit a najít odpovídající účinnou dávku a čas postřiku.

Elicitaci můžeme provádět namáčením semen nebo sazenic do vody s elicitory, postřikem na listy či případně zapojením elicitorů v hydroponickém systému pěstování. Komerčně se také využívají po sklizni pro zvýšení obsah fytochemických látek v produktu (Baenas et al., 2014).

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

Elicitory se rozdělují na biotické a abiotické. Nicméně za elicitory lze považovat také rostlinné hormony (Baenas et al., 2014; Kužel et al., 2006, 2015).

2.6.4. Biotické elicitory

Mezi biotické elicitory zahrnujeme:

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

2.6.5. Abiotické chemické elicitory

Do abiotických elicitorů zahrnujeme:

- Kyselina octová
- Ethylen
- Ethanol
- Silikon

- Benzothiadiazol
- Bioregulátor prohexadione
- Anorganické soli
 - Chlorid rtuťnatý, síran měďnatý, chlorid vápenatý, síran vanadylu
- Kovové ionty
 - Fe^{2+} , Al^{3+} , Ag^+ , Ag^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} (Baenas et al., 2014)
 - ionty lanthanu, europa, vápníku
- Polyaminy
- Oxid dusnatý (Akula, Ravishankar 2011)
Přípravky na bázi titanu (Kužel et al., 2003, 2006, 2015)

2.6.6. Abiotické fyzikální elicitory

Mezi abiotické fyzikální elicitory řadíme:

- Sucho
- Extrémní teplotní šok
- Vysoký tlak
- UV záření
- Salinita
- Mechanické poškození
- CO_2
- Ozon (Baenas et al., 2014)
- pH
- Vysoká nebo nízká teplota
- Zaplavení (Akula, Ravishankar 2011)

2.6.7. Fytohormony

Fytohormony jsou přírodní produkty s nízkou molekulovou hmotností, které působí v mikromolárních koncentracích a působí na fyziologické vývojové procesy během životního cyklu rostliny. Tyto strukturálně různorodé sloučeniny zahrnují:

- kyselinu abscisovou,
- auxiny,
- brassinosteroidy,
- cytokininy,
- gibereliny,
- ethylen,
- kyselinu jasmonovou případně methyljasmonát (Piotrowska, Bajguz 2011), kyselinu salicylovou (Kužel et al., 2009, 2006, 2015)

methyalsicylát (Kužel et al., 2009; 2006; 2015; Baenas et al., 2014),
kyselinu acetylsalicylovou (Kužel et al., 2009, 2006, 2015)

2.6.8. Elicitace kyselinou acetylsalicylovou

Kyselina acetylsalicylová (ASA) má podobu bílého krystalického prášku, který je běžně známý pod názvem Aspirin nebo Acylpyrin. Její chemický systematický název je kyselina 2-acetyloxybenzoová (Myers 2007).

Více jak 400 let před naším letopočtem se vědělo, že vysoké horečky se dají snížit žvýkáním vrbové kůry. Počátkem 19. století bylo zjištěno, že účinnou látkou je v tomto případě salicin. Salicin se hydrolýzou převádí na salicylalkohol a ten následně oxidací na salicylovou kyselinu (SA). Přeměnou fenolické skupiny – OH na ester s kyselinou octovou je připravena kyselina acetylsalicylová (MCMurry 2007).

Průmyslově se kyselina acetylsalicylová vyrábí acylací o-hydroxybenzoové (salicylové) kyseliny acetanhydridem (Pacák 2007).

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

Kyselina acetylsalicylová podstupuje v rostlinách spontánní hydrolýzu na kyselinu salicylovou a obě tyto sloučeniny mají podobný účinek (Khan et al., 2015; Kužel et al., 2006, 2015).

Například u barvínkovce růžového (*Catharanthus roseus*) kultivovaného in vitro vedlo přidání různých koncentrací (0,5-20 mM) kyseliny acetylsalicylové k pozoruhodným účinkům na produkci sekundárních metabolitů. Došlo k nárůstu o 505 % u celkových alkaloidů, 1587 % u celkových fenolických látek, 612 % u celkových furanokumarinů a 1476 % u celkových anthokyanů (Godoy-Hernández, Loyola-Vargas 1997).

Účinky elicítace pomocí kyseliny acetylsalicylové na produkci glucotropaeolinu a aktivity myrosinasy byly studovány v kořenové kultuře lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*). Kyselina acetylsalicylová indukovala trojnásobné zvýšení produkce glucotropaeolinu oproti kontrolnímu vzorku (Wielanek, Urbanek 2006).

Z pokusů prováděných v České republice lze uvést práce zaměřené na zhodnocení vlivu elicítace kyselinou acetylsalicylovou na obsah vybraných účinných látek například v semenech ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*).

Kyselina acetylsalicylová byla použita ve třech různých koncentracích, a to 10^{-5} mol.l⁻¹ označena jako nízká, 10^{-4} mol.l⁻¹ jako střední a 10^{-3} mol.l⁻¹ jako vysoká koncentrace. Na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích byl prokázán vliv elicitoru na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského. Při aplikaci kyseliny acetylsalicylové ve vysoké koncentraci vzrostl procentický obsah silymarinu o 16,48 %, u nízké koncentrace o 9,12 % a u střední koncentrace o 4,21 %. Na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic však nebyl ani v jednom případě účinek kyseliny acetylsalicylové na zvýšení obsahu silymarinové složky prokázán, dokonce došlo ke snížení obsahu účinných látek při aplikaci ve střední a vysoké koncentraci (Gramanová 2009).

Další práce zaměřená na studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek u ostropestřce mariánského uvádí, že aplikace kyseliny acetylsalicylové o vysoké koncentraci je nevhodná. Při aplikaci dochází k redukci obsahu účinných látek v semenech. Takto vysoká koncentrace elicitoru je zřejmě pro rostlinu již toxická (Dvořáková 2009).

Přírodní rostlinné stresory a jejich deriváty (kyselina acetylsalicylová, kyselina salicylová a methyl salicylát), jakož i biokompatibilní elicitor na bázi askorbátu titanu, byly použity ve formě listové aplikace u léčivé rostliny třapatky nachové (*Echinacea purpurea*) pěstované v půdě pro zvýšení obsahu biologicky aktivních fenolických látek. Bylo dosaženo významného nárůstu fenolických látek (až desetinásobku ve srovnání s kontrolou) a stimulace výtěžku biomasy. Metoda představuje výhodnou alternativu k pěstování rostlin v buněčné suspenzi nebo hydroponických kulturách a nabízí široké uplatnění v zemědělské praxi (Kužel et al., 2009; Kužel et al., 2006, 2015).

2.6.9. Vliv dusíku na obsah účinných látek

Dostupná literatura uvádí závislost obsahu β -ekdysonu v listech a kořenech *L. saflorové* na dusíkatém hnojení. Optimální se zdá být jednorázová dávka dusíku v rozmezí 60-90 kg N/ha aplikovaná v časně jarní fázi vývoje rostlin, při zahájení vegetačního období přezimujících rostlin. Dále rostlině prospívá přihnojování porostu dusíkem během vegetace v období před květem, a to postřikem močoviny v dávce do 30 kg N/ha (Bárnet et al., 2015).

3. Cíl práce a definice pracovních hypotéz

Cílem této diplomové práce bylo prostřednictvím maloparcelkového pěstování ověřit vliv elicitorů na obsah vybraných účinných látek v *Leuzee saflorové* (*Leuzea*

carthamoides DC.). Použitým elicitorem byla kyselina acetylsalicylová o třech různých koncentracích (10^{-3} mol.l⁻¹, 10^{-4} mol.l⁻¹, 10^{-5} mol.l⁻¹) aplikovaná postřikem na list (Kužel et al., 2006, 2015) a komerční přípravek Nanofyt Si® od společnosti AGRA GROUP a.s. v doporučené koncentraci 1 ml na 10 l vody. Kontrolní porost Leuzeje saflorové byl postřikován pouze vodou.

Předpokladem je, že alespoň jeden z aplikovaných elicitorů bude mít pozitivní vliv na tvorbu sekundárních metabolitů v tomto případě 20-hydroxyecdysonu a Polypodinu B.

U vypěstovaných rostlin byla provedena UHPLC-MS/MS analýza fytoekdysteroidů, pro potvrzení nebo vyvrácení předkládané hypotézy.

Cíl diplomové práce byl naplněn maloparcelkovým pokusem společně s výsledky rozborů poskytnutými Laboratoří forenzní analýzy biologicky aktivních látek VŠCHT Praha.

4. Metodický postup

Stručná metodika práce:

- Předpěstování rostlin leuzeje saflorové ve skleníku;
- umístění rostlin na pokusná stanoviště;
- provedení elicitace;
- odebrání vzorků;
- vyhodnocení obsahu účinných látek ve vzorcích UHPLC-MS/MS metodou;
- porovnání výsledků s literaturou (potvrzení, vyvrácení hypotéz).

4.1. Předpěstování ve skleníku

Začátkem dubna (11. 4. 2019) byl proveden výsev stratifikovaných semen L. saflorové do připravených sadbovacích misek naplněných klasickým zahradním substrátem, který obsahoval základní dávku živin.

Obrázek 36 – Výsev semen *L. saflorové*



Foto: Bc. Petr Vytiska

Počet semen byl 1200 ks, průměrná hloubka výsevu 1 cm. Semena byla před výsevem preventivně ošetřena přípravkem Previcur (ve vodní lázni po dobu 10 minut) proti plísním v dávce 2 ml/5 l vody. Nasledně byla provedena první závlivka v celkovém objemu 14 l čisté vody.

Obrázek 37 – Semena *L. saforové*



Foto: Bc. Petr Vytiska

Obrázek 38 – Makrofoto semen



Foto: Bc. Petr Vytiska

Pro předpěstování byl zvolen univerzální pěstební substrát s označením MR. GARDEN se základní dávkou živin na 6 týdnů vyrobený z rašeliny a vyžralého

kompostu, zaručující optimální provzdušnění kořenového balu. Díky vysoké nasáka-
vosti dobře zásobuje rostlinu vodou.

Chemické a fyzikální vlastnosti:

- pH 5,0 až 6,5;
- spalitelné látky min. 70,0 %;
- elektrická vodivost 0,2-0,65 mS.cm⁻¹

Ve skleníku byla použita automatizovaná technologie zavlažování od firmy Gar-
dena. Rostliny byly zavlažovány vodní mlhou z rozstřikovačů, a to v časovém inter-
valu 2x denně (v 8:00 a v 20:00) po dobu 15 min (celkově spotřebovaná voda na
den – 31 l). Celková plocha prostor skleníku činila 12 m².

Obrázek 39 – Vodní mlha se zavlažovacími časovači od firmy Gardena



Foto: Bc. Petr Vytiska

Už jedenáctý den (22. 4. 2019) od výsevu do sadbovacích misek vyklíčily
první rostliny v poměru 1:8, což představovalo 150 rostlin.

Obrázek 40 – Čerstvě vyklíčené rostliny, 11 dní od zasetí



Foto: Bc. Petr Vytiska

V následujících dnech docházelo k postupnému klíčení dalších rostlin. Teplota ve skleníku se pohybovala mezi 20 až 28 °C, vzdušná vlhkost dosahovala až 85 %.

Obrázek 41 – Rostliny *L. saflorové* 19 dní po vzejití



Foto: Bc. Petr Vytiska

Celková reálná klíčivost *L. saflorové* se pohybovala okolo 65 %, což z celkového počtu vysetých rostlin činilo 780 rostlin. Použité semeno bylo zakoupeno od Ing. Bohumila Branda – Planta naturalis v červenci roku 2019. Cena jednoho gramu se pohybovala okolo 15 Kč.

Většina autorů, hlavně Bárnét et al., 2015; Kužel et al., 2002 a, b uvádí klíčivost přes 90 % za optimální teploty 12 až 20 °C, kdy nejnižší přípustná teplota nesmí klesnout pod 5 až 6 °C. Při technologii předpěstování ve skleníku, mohou být rostliny vystaveny různým patogením působením v podobě škůdců, plísní atd. Od doby, co byly rostliny vysazeny byl výskyt škůdců, plevelů a plísní téměř nulový.

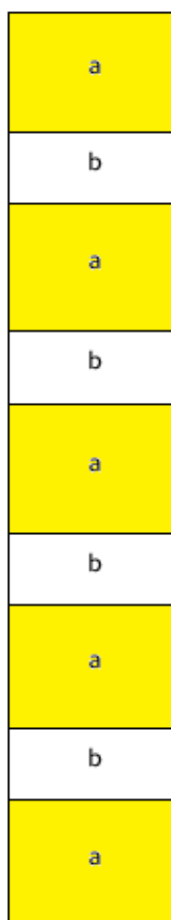
Dne 23. 4. 2019 byl proveden preventivní postřik rostlin previcurem v dávce 1 ml/5 l vody. Pro dostatečnou délku světelného dne nebylo potřeba rostliny uměle dosvětlovat. Rostliny projevovaly vitální, rychlý a zdavý růst.

Dvacet sedm dní (7. 5. 2019) od vyklíčení byly rostliny vysazeny na pokusný pozemek ZF JCU (280 ks), zbylé rostliny (500 ks) byly 20. 5. 2019 převezeny k pěstování do Meclova.

4.2. Pěstování ZF JCU

Za účelem provedení experimentu byl v roce 2019 na školním pozemku ZF JCU v Českých Budějovicích založen maloparcelkový pokus.

Obrázek 42 – Schéma maloparcelkového pokusu



a – pokusné parcelky; b – ochranný pás 1 m široký

Předpěstované rostliny *L. saflorové* byly 7. května 2019 umístěny na školní pozemek (v počtu 280 ks) a rozděleny do pěti parcel dle testovaných koncentrací a kontroly. Na jednu testovanou koncentraci připadlo 56 rostlin *L. saflorové*. Zvolený spon mezi rostlinami byl 30 cm x 60 cm (Kužel et al., 2002 a, b) z důvodu dostatečného prostoru pro dynamický růst rostliny.

Obrázek 43 – *L. saflorová* na pozemku ZF JCU



Foto: Bc. Petr Vytiska

U takto časného výsevu, byly vzaty v potaz povětrnostní podmínky, které byly příznivé a meteorologická předpověď hlásila teploty pohybující se nad bodem mrazu. Teploty blížíící se 0 °C by mohly ohrozit čerstvě vysazené mladé rostliny.

Před vysazením *L. saflorové* na pozemek ZF JCU předcházela pokusu agrotechnická příprava půdy, která spočívala v provedení střední orby, na podzim roku 2018. Následném ponechání pozemku ladem přes zimu (vymrznutí plevelů). Časně z jara 2019 byla provedena předseťová příprava vláčením. Čtrnáct dní před výsadbou *L. saflorové* na pozemku byla provedena mechanická likvidace plevelů, kombinací smyk a brány, která zajistila dostatečné potlačení již vzešlých plevelných druhů.

Rostliny byly přesazeny do vyhloubených jamek (5 cm hlubokých) a důkladně zavlaženy vodou. Velká sucha a vysoké teploty v tomto roce (2019) rostliny

snášely překvapivě dobře. Na pozemku se ujmul 99 % rostlin. Následkem absence netkané geotextílie pod rostlinami se na parcelkách rozrostl ve velké míře plevel, který ale neměl významnější vliv na růst *L. saflorové*. Ta si svou silnou dynamikou vytvořila dostatečný prostor pro zdravý a silný růst.

Obrázek 44 – Silné a zdravé rostliny *Leuzey saflorové* ZF JCU



Foto: Bc. Petr Vytiska

Z důvodů přehlednosti a odlišení parcelk bylo nutné během vegetace parcelky několikrát proplít. Pokusný pozemek nebyl nijak vyhnojován, hodnoty vybraných půdních ukazatelů jsou uvedeny v kapitole o AZP.

4.3. Elicitace

Postřik jednotlivými koncentracemi použitých elicitorů byl vždy oddělený, každá koncentrace měla vlastní postřikovač. Aplikace postřiku probíhala od nejnižší koncentrace (u kyseliny acetylsalicylové) po nejvyšší. Na každou parcelku připadalo 56 rostlin *L. saflorové*, s meziřádkovými vzdálenostmi 30 cm x 60 cm. Aplikace přípravků probíhala vždy na list. Postřikovače byly nastaveny na vytváření nejjemnější mlhy, pro lepší vstřebávání aplikované látky přes list do rostliny. Aplikace byla

ukončena po dosažení spojení a následném stékání kapek postřiku z listu. Mezi jednotlivými parcelkami (koncentracemi) byly ochranné pásy minimálně 1 m široké z důvodu možného rozptylu postřiku. Elicitory byly aplikovány během dopoledne, za úplného bezvětří.

Obrázek 45 – Rozparcelkovaný pozemek na ZF JCU podle schématu



Foto: Bc. Petr Vytiska

Ve sledovaném pokusu byly použity elicitory:

Kyselina acetylsalicylová (ASA), ve třech koncentracích:

- Nízká ASA v koncentraci $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$
- Střední ASA v koncentraci $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$
- Vysoká ASA v koncentraci $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$

Přípravek NanoFYT Si® v koncentraci 1 ml na 10 l vody.

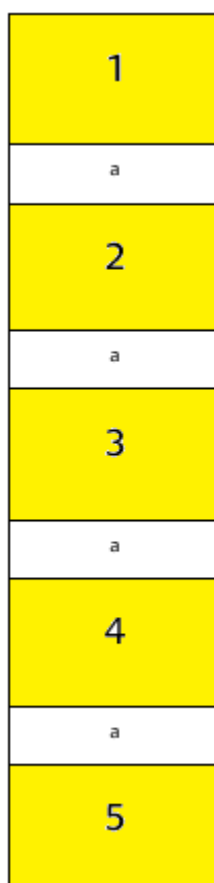
H₂O jako kontrola.

Obrázek 46 – Každá koncentrace s vlastním postřikovačem



Foto: Bc. Petr Vytiska

Obrázek 47 – Schéma elicítace na parcelkách na pozemku ZF JCU



1. Nízká koncentrace kyseliny acetylsalicylové 10^{-5} mol.l⁻¹;
2. střední koncentrace kyseliny acetylsalicylové 10^{-4} mol.l⁻¹;
3. vysoká koncentrace kyseliny acetylsalicylové 10^{-3} mol.l⁻¹;

4. nanoFYT Si®;
5. H₂O kontrola.

a – Kontrolní pás 1 m široký.

Samotná aplikace proběhla třikrát během vegetace. První postřik proběhl 4. 7. 2019. Rostliny byly mírně zaplevelené, což nemělo významný vliv na L. saflorovou (je vysoce konkureční rostlinou). Celková dávka na jednu parcelku činila 0,75 l elicitoru (kontrola 0,75 l H₂O).

Dne 15. 7. 2019 byl proveden první odběr vzorků z pozemku ZF JCU. Vzorky byly odděleně sušeny podle koncentrací, při pokojové teplotě (7-10 dní) a poté uskladněny v papírových pytlích bez přístupu světla a vlhkosti. Zaplevelení parcellek bylo potřeba vyplít, aby nedošlo k porušení vytyčených hranic.

Obrázek 48 – Rostliny L. saflorové na pokusném pozemku ZF JCU



Foto: Bc. Petr Vytiska

Dne 27. 7. 2019 byla provedena druhá elicítace, množství postřiku na parcelku bylo sníženo na 0,5 l. Rostliny L. saflorové postupně přerůstají okolní vegetaci, dochází k nárůstu délky listů a jejich množství. V prvním roce růstu L. saflorová nevytváří květní lodyhy a veškerou svojí energii směřuje pro vytvoření rostlinné základny, na které úspěšně přezimuje. V dalším roce bylo možné pozorovat nesmírnou dynamiku růstu ihned z jara, díky strategii růstu uplatněné v prvním roce života.

Obrázek 49 – Aplikace elicitoru na list



Foto: Bc. Petr Vytiska

Dne 20. 8. 2019 byly rostliny po třetí ošetřeny elicitory, na každou rostlinu bylo aplikováno 0,5 l roztoku.

Dne 1. 10. 2019 proběhla druhá sklizeň L. saflorové na pozemku ZF JCU. Následné sušení oddělených vzorků podle koncentrací probíhalo za pokojové teploty v rozmezí 7 až 10 dní. Suché rostliny byly následně zabaleny do papírových pytlů a uskladněny v suchých a tmavých prostorách.

Obrázek 50 – Rostliny L. saflorové během vegetace 23. 7. 2019 ZF JCU



Foto: Bc. Petr Vytiska

4.4. Pěstování v Meclově

Rostliny L. saflorové (500 ks) byly vysazeny na předem připravený pozemek v Meclovské vzájemné a. s.

Samotné výsadbě předcházela příprava pokusného pozemku o rozloze 50 m². Bylo provedeno kontrolní AZP viz tabulka 9. Plocha byla ošetřena střední orbou na podzim 2018, na jaře 2019 předsetovou přípravou „vláčení“ a aplikací totálních herbicidů ke zničení potenciálních plevelů a zajištění bezproblémového růstu L. saflorové.

Obrázek 51– Rostliny L. saflorové připravené k přesazení v Meclově



Foto: Bc. Petr Vytiska

Obrázek 52 – Sazení rostlin L. saflorvé



Foto: Bc. Petr Vytiska

V den výsadby (20. 5. 2019) byla na pozemku natažena netkaná geotextílie (z důvodů zamezení vzcházení plevelů) a s pomocí armovacích sítí (které zajišťovaly přesné umístění rostlin) byl nastaven spon 30 cm x 60 cm. Následně se nařezala oka a vyhloubila zemina (5 cm), dle kořenového balu. Rostliny se po zasazení pečlivě zavlažily vodou. Následně probíhalo zalévání každý den z důvodu nedostatku srážek a vysokých teplot. Každých 14 dní probíhala kontrola vegetace. Po vysazení se ujmul 99 % rostlin, což představovalo 495 ks. Rostlinám se během celého pokusu dařilo výborně. Míra zaplevelení, výskyt škůdců a chorob byl minimální.

Obrázek 53 – Dynamika růstu *L. saflorové* (25. 8. 2019)



Foto: Bc. Jaroslav Neumann

Obrázek 54 – Rostliny *Leuzey saflorové* těsně před sklizní



Foto: Bc. Petr Vytiska

Dne 25. 9. 2019 proběhla sklizeň *L. saflorové*. Protože *L. saflorová* je víceletá rostlina, sklizeň kořene se provádí 3. rok na podzim nebo 4. rok z jara, kdy je obsah účinných látek v kořenu nejvyšší. Sklizena byla jen nadzemní hmota (ručně) a celá pracovní operace zabrala při tomto množství rostlin 2 hodiny (listy dosahovaly délky 30 cm). Následně proběhlo sušení sklizené nadzemní hmoty odpadním teplem z bioplynové stanice.

Obrázek 55 – Sklizeň *L. saflorové*



Foto: Bc. Jaroslav Neumann

Takto ostříhané rostliny dobře přezimují, následný rok bez problémů obrostou a pokračují ve svém životním cyklu, který v místech přirozeného výskytu trvá 75 až 150 let. Rostliny *L. saflorové* po celou dobu růstu v Meclově netrpěly na škůdce ani na jiné patogeny, jako jsou plísňe nebo infekce. Projevovaly zdravý a silný růst. Podnební podmínky pro další růst se zdají být vyhovující. Část odebraných rostlin na vzorky k analýze byla sušena za pokojové teploty (7-10 dní) a poté skladována v papírových pytlích bez přístupu světla.

Obrázek 56 – Sušení vzorků L. saflorové



Foto: Bc. Petr Vytiska

4.5. Počasí

Tabulka 4 - Územní teploty v roce 2019 v Jihočeském kraji

Kraj		Měsíc												Rok
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
Jihočeský	T	-1,9	1,0	5,1	8,6	9,9	20,0	18,6	18,3	12,8	8,9	4,3	1,5	8,9
	N ₁	-2,8	-1,3	2,3	6,9	11,8	15,1	16,7	16,0	12,5	7,5	2,4	-1,2	7,1
	O ₁	0,9	2,3	2,8	1,7	-1,9	4,9	1,9	2,3	0,3	1,4	1,9	2,7	1,8
	N ₂	-2,2	-1,3	2,5	7,2	12,5	15,3	17,3	16,7	12,3	7,6	2,4	-1,2	7,4
	O ₂	0,3	2,3	2,6	1,4	-2,6	4,7	1,3	1,6	0,5	1,3	1,9	2,7	1,5

Zdroj. Český hydrometeorologický ústav

Vysvětlivky:

T = teplota vzduchu [°C]

N₁ = dlouhodobý normál teploty vzduchu 1961-1990 [°C]

O₁ = odchylka od normálu [°C]

N₂ = dlouhodobý normál teploty vzduchu 1981-2010 [°C]

O₂ = odchylka od normálu [°C]

Uvedené hodnoty Českého statistického ústavu porovnávají územní teploty v roce 2019, tedy roce mého výzkumu na pozemku (T), s dlouhodobým teplotním normálem (N₁ a N₂) za 58 let. K největší změně teplot došlo až v posledních 19 letech, kdy se zvýšila průměrná teplota vzduchu v rozmezí +1,5 °C až +1,8 °C na rozdíl od dlouhodobého normálu. Průběh celého roku 2019 byl teplejší, avšak v měsíci červnu nastal největší teplotní výkyv v rozmezí +4,7 °C až +4,9 °C.

Tabulka 5 - Územní srážky v roce 2019 v Jihočeském kraji

Kraj		Měsíc												Rok
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
Jihočeský	S	66	35	49	16	85	69	69	70	50	37	33	33	612
	N ₁	34	33	39	49	75	94	83	82	51	37	43	39	659
	% ₁	194	106	126	33	113	73	83	85	98	100	77	85	93
	N ₂	40	35	49	41	71	85	92	85	57	43	44	44	687
	% ₂	165	100	100	39	120	81	75	82	88	86	75	75	89

Zdroj: Český hydrometeorologický ústav

Vysvětlivky:

S = úhrn srážek [mm]

N₁ = dlouhodobý srážkový normál 1961-1990 [mm]

%₁ = úhrn srážek v % normálu 1961-1990

N₂ = dlouhodobý srážkový normál 1981-2010 [mm]

%₂ = úhrn srážek v % normálu 1981-2010

Celkový úhrn srážek byl v roce 2019 (S) nižší, a to o 47 (N₁) až 75 mm (N₂) oproti dlouhodobému srážkovému normálu (N₁ a N₂). To například představovalo 93 % získaných srážek na rozdíl od let 1961-1990 nebo 89 % z období 1981-2010. Statistické hodnoty naznačují klesající množství srážek v mm/rok. Nejhorším měsícem z pohledu srážek byl duben, v tomto měsíci spadlo pouhých 16 mm srážek, což je hluboko pod dlouhodobým srážkovým normálem.

Tabulka 6 - Územní teploty v roce 2019 pro Plzeňský kraj

Kraj		Měsíc												Rok
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
Plzeň- ský	T	- 1,4	1,6	5,3	8,9	10,2	20,3	18,9	18,0	12,9	9,1	4,2	1,8	9,2
	N ₁	- 2,7	- 1,3	2,3	6,8	11,7	15,0	16,5	15,9	12,5	7,5	2,3	- 1,1	7,1
	O ₁	1,3	2,9	3,0	2,1	-1,5	5,3	2,4	2,1	0,4	1,6	1,9	2,9	2,1
	N ₂	- 1,8	- 1,0	2,8	7,4	12,5	15,4	17,4	16,8	12,4	7,6	2,5	- 0,8	7,6
	O ₂	0,4	2,6	2,5	1,5	-2,3	4,9	1,5	1,2	0,5	1,5	1,7	2,6	1,6

Zdroj. Český hydrometeorologický ústav

Vysvětlivky:

T = teplota vzduchu [°C]

N₁ = dlouhodobý normál teploty vzduchu 1961-1990 [°C]

O₁ = odchylka od normálu [°C]

N₂ = dlouhodobý normál teploty vzduchu 1981-2010 [°C]

O₂ = odchylka od normálu [°C]

Hodnoty získané měřením se v roce 2019 lišily od normálu. Stanovená odchylka od normálu v rozmezí let 1961–1990 činila +2,1 °C.

Z pohledu průměrných teplot na obou pozorovaných lokalitách (Meclov a pozemek ZF JCU) je patrné, že za posledních 19 let došlo v obou lokalitách ke

zvýšení dlouhodobé normální teploty vzduchu. Vyšší průměrnou teplotou disponuje Meclov a to 9,2 °C, která je o tři desetiny vyšší než na pokusném pozemku ZF JCU. Dosažené průměrné teploty vzduchu jsou příznivé pro pěstování L. saflorové.

Tabulka 7 - Územní srážky v roce 2019 pro Plzeňský kraj

Kraj		Měsíc												Rok
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
Plzeňský	S	53	35	57	21	71	51	53	86	50	41	32	31	579
	N ₁	41	38	44	50	70	78	77	78	53	42	47	46	656
	% ₁	129	92	130	42	101	65	69	110	94	98	68	67	88
	N ₂	45	39	49	42	67	78	84	81	52	47	48	51	684
	% ₂	118	90	116	50	106	65	63	106	96	87	67	61	85

Zdroj. Český hydrometeorologický ústav

Vysvětlivky:

S = úhrn srážek [mm]

N₁ = dlouhodobý srážkový normál 1961-1990 [mm]

%₁ = úhrn srážek v % normálu 1961-1990

N₂ = dlouhodobý srážkový normál 1981-2010 [mm]

%₂ = úhrn srážek v % normálu 1981-2010

Množství průměrných srážek se za posledních 19 let snížilo oproti normálu N₁ o 77 mm (1961-1990) a proti dlouhodobému srážkovému normálu z let 1981-2010 až o 105 mm.

Sledované oblasti (Meclov a ZF JCU) mají přibližně stejný dlouhodobý srážkový normál. V Meclově spadlo za posledních 19 let v průměru o 33 mm srážek méně než na pokusném pozemku ZF JCU. Přesto jsou tyto hodnoty příznivé pro růst L. saflorové.

4.6. Rozbory půd

4.6.1. AZP pokusného pozemku ZF JCU

Tabulka 8 – Hodnoty vybraných ukazatelů

<i>Ukazatel</i>	<i>Ve</i>	<i>V pův.</i>	<i>V lab.</i>	<i>Jednotka</i>	<i>Nejistota</i>	<i>Použitá</i>
	<i>100%</i>	<i>hmotě</i>	<i>sušiny</i>		<i>měření</i>	<i>metoda</i>
	<i>sušiny</i>					
<i>fosfor</i> <i>(P)</i>	130	111	129	mg/kg	±20 %	(A) SOP 43-2
<i>hořčík</i> <i>(Mg)</i>	86,6	74,0	86,0	mg/kg	±15 %	(A) SOP 42
<i>draslík</i> <i>(K)</i>	111	94,6	110	mg/kg	±20 %	(A) SOP 42
<i>vápník</i> <i>(Ca)</i>	907	775	901	mg/kg	±20 %	(A) SOP 42
<i>pH</i> <i>(CaCl₂)</i>			6,25	-	±0,1 pH	(A) SOP 44

<i>Ukazatel</i>	<i>V pův. hmotě</i>	<i>Jednotka</i>	<i>Nejistota mě-</i>	<i>Použitá me-</i>
			<i>ření</i>	<i>todo</i>
<i>sušina</i>	85,4	%	±15 %	(A) SOP 39-2

Zdroj: AGRO-LA s.r.o.

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

4.6.2. Vyhodnocení dle metodického pokynu č.9/SZV

Hodnota fosforu (P) v původní hmotě je 111 mg.kg-1. Dle tabulky č. 8 metodického pokynu č. 9/SZV je obsah fosforu dobrý.

Hodnota hořčíku (Mg) v původní hmotě je 74,0 mg.kg-1. Dle tabulky č. 8 metodického pokynu č. 9/SZV je obsah hořčíku nízký.

Hodnota draslíku (K) v původní hmotě je 94,6 mg.kg-1. Dle tabulky č. 8 metodického pokynu č. 9/SZV je obsah draslíku v půdě nízký.

Hodnota vápníku (Ca) v původní hmotě je 775 mg.kg-1. Dle tabulky č. 8 metodického pokynu č. 9/SZV je obsah vápníku nízký.

4.6.3. AZP Meclov

Tabulka 9 – Hodnoty vybraných ukazatelů

<i>Ukazatel</i>	<i>Ve 100% sušině</i>	<i>V pův. hmotě</i>	<i>V lab. sušině</i>	<i>Jednotka</i>	<i>Nejis- tota měření</i>	<i>Pou- žitá me- toda</i>
<i>fosfor (P)</i>	150	125	148	mg/kg	±20 %	(A) SOP 43-2
<i>hořčík (Mg)</i>	217	181	214	mg/kg	±15 %	(A) SOP 42
<i>draslík (K)</i>	219	182	216	mg/kg	±20 %	(A) SOP 42
<i>vápník (Ca)</i>	1540	1280	1520	mg/kg	±20 %	(A) SOP 42
<i>pH (CaCl₂)</i>			5,65	-	±0,1 pH	(A) SOP 44

<i>Ukazatel</i>	<i>V pův. hmotě</i>	<i>Jednotka</i>	<i>Nejistota měření</i>	<i>Použitá metoda</i>
<i>sušina</i>	83,2	%	±5 %	(A) SOP 39-2

Zdroj: AGRO-LA s.r.o.

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

4.6.4. Vyhodnocení dle metodického pokynu č. 9/SZV

Hodnota fosforu (P) v původní hmotě je 125 mg.kg⁻¹. Dle tabulky č. 9 metodického pokynu č. 9/SZV je obsah fosforu vysoký.

Hodnota hořčíku (Mg) v původní hmotě je 181 mg.kg⁻¹. Dle tabulky č. 9 metodického pokynu č. 9/SZV je obsah hořčíku dobrý.

Hodnota draslíku (K) v původní hmotě je 182 mg.kg⁻¹. Dle tabulky č. 9 metodického pokynu č. 9/SZV je obsah draslíku v půdě dobrý.

Hodnota vápníku (Ca) v původní hmotě je 1280 mg.kg⁻¹. Dle tabulky č. 9 metodického pokynu č. 9/SZV je obsah vápníku vyhovující.

Hodnoty AZP se na obou testovaných pozemcích značně liší.

Půda v Meclově byla celkově bohatší na obsah živin než pozemek ZF JCU, kde je patrný menší obsah přístupných živin s vyšším pH. Na pozemku ZF JCU byla na podzim předešlého roku provedena příprava půdy orbou. Na jaře roku 2019 znovu s předsetovou přípravou „vláčením“. Pozemek nebyl nijak hnojen.

Díky dobrým výsledkům AZP provedených AGRO-LA spol. s.r.o. na pozemku v Meclově, již nebylo potřeba další zásobení půdy živinami. Pro růst *Leuzeu saflo-rové* byly tyto podmínky ideální.

4.7. UHPLC-MS/MS analýza 20-hydroxyecdysonu a polypodinu B

Pro analýzu byla použita metodika vyvinutá v Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha. Analýzy byly provedeny pracovníky laboratoře pod vedením Ing. Kuchaře, Ph.D.

4.7.1. Použité chemikálie

Methanol (LC-MS grade, Honeywell, USA), fluorid amonný (Sigma-Aldrich, USA), 20-hydroxyecdysone, polypodin B, kortizol-d4 (Sigma-Aldrich, USA).

4.7.2. Příprava vzorku

Sušené vzorky byly rozemlety na jemno pomocí elektrického mlýnku (IKA A 11; IKA Werke GmbH&Co.KG, Německo). Půl gramu rostlinného materiálu se extrahovalo 10 ml 70% methanolu, který obsahoval deuterovaný kortizol o koncentraci 1 µg/ml jako vnitřní standard. Vzorky se dvě hodiny třepaly při laboratorní teplotě. Poté byly extrakty centrifugovány (10 minut, 10000 rpm, Centrifuga Hettich Universal 320R, Hettich, Německo), následně bylo 60 µl extraktu ředěno 940 µl 20% methanolu. Pro stanovení 20-hydroxyecdysonu ve vzorcích kořenů byl tento roztok dále ředěn 20x. Roztoky byly použity pro UHPLC-MS/MS analýzu. Vzorky byly připraveny ve třech opakováních.

4.8. UHPLC-MS/MS stanovení obsahu 20-hydroxyecdysonu a polypodinu B

Pro UHPLC-MS/MS analýzu 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); 1 min – 50:50; 5 min – 30:70; 6 min – 0:100; 7 min – 0:100; 7,2 min 20:80; 8,5 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) – 150 °C; průtok sušícího plynu – 15 l/min; teplota zmlžovacího plynu (dusík) – 375 °C; průtok zmlžovacího plynu – 12 l/min; tlak v nebulizéru – 25 psi; napětí na kapiláře – 3500 V. V tzv. auto MS/MS módu byly sledovány m/z v rozsahu 50–1500

a sbírána byla MS/MS spektra při kolizní energii 20 V. Pro akvizici dat a vyhodnocení výsledků byl použit software Agilent MassHunter verze B.05.01 (Agilent Technologies, USA).

Kalibrační křivky pro kvantitativní analýzu 20-hydroxyecdysonu a polypodinu B byly sestaveny z osmi bodů (koncentrace 200, 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 g/ml).

5. Výsledky a diskuse

5.1.1. Analýza na katedře aplikované chemie ZF JCU

Dne 15. 7. 2019 byly odebrány první vzorky z pozemku ZF JCU k analýze, která se prováděla na katedře aplikované chemie ZF JCU v Českých Budějovicích. Vzorky byly určeny k použití pro vývoj metody stanovení 20-hydroxyecdysonu a Polypodinu B. Odebráno bylo 10 vzorků o hmotnosti 50 g, které byly následně v laboratoři rozemlety.

Obrázek 57 – Rozemleté vzorky L. saflorové

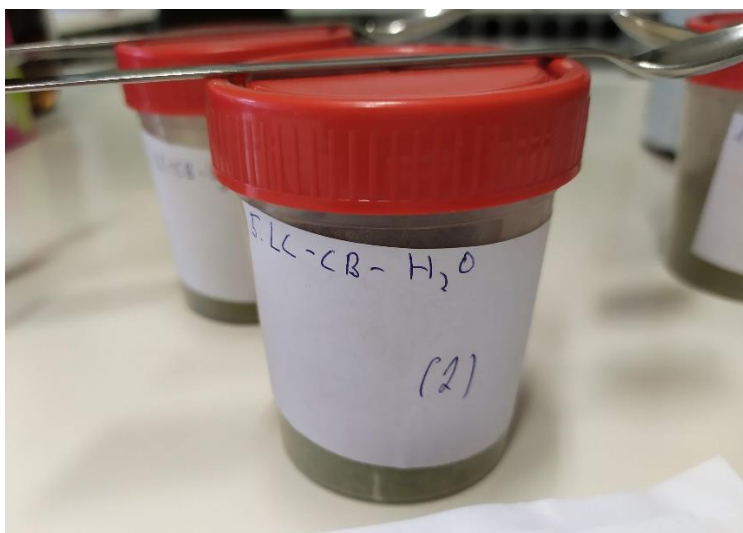


Foto: Bc. Petr Vytiska

Z každého vzorku bylo naváženo 0,25 g ve dvou opakováních. Poté se nadržené rostliny smíchaly se 40% metylalkoholem a po dobu 7 dní nechaly macerovat. Po sedmi dnech byly vloženy na 5 min do ultrazvukové lázně za účelem lepší homogenizace. Dále následovalo odstředění na centrifuze po dobu 10 min při 3500 otáčkách za minutu.

Obrázek 58 – Odstředění vzorků



Foto: Bc. Petr Vytiska

Obrázek 59 – Standartizace vzorků přidáním 40% methylalkoholu



Foto: Bc. Petr Vytiska

Obrázek 60 – Příprava pro finální filtraci vzorků



Foto: Bc. Petr Vytiska

Po odstředění proběhlo dolití metylalkoholu po rysku. Byla provedena následná filtrace a vzorky byly připravené k umístění do HPLC pro následnou analýzu.

Obrázek 61 – Vzorky připravené pro HPLC analýzu



Foto: Bc. Petr Vytiska

Analýza biologicky účinných látek na katedře aplikované chemie ZF JCU byla neúspěšná. Metodiku stanovení 20-hydroxyecdysonu a Polypodinu B se nepoda-

řilo vyvinout. S potřebnou přesností se nepodařilo stanovit ani jednu ze sledovaných látek v produktu. Z důvodů časové posloupnosti a aplikace elicitorů, která probíhala v pevně daných termínech, se nepodařilo vzorky po prvním ošetření rostlin odebrat opakovaně.

Vzorky stanovené na VŠCHT byly odebrány v souladu s metodikou pokusu z rostlin sklizených po třetím postřiku. Výsledky a statistické vyhodnocení vychází z dat získaných ze vzorků stanovených v Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek VŠCHT Praha.

5.2. Výsledky UHPLC-MS/MS obsahu 20-hydroxyecdysonu a Polypodinu B

V tabulkách jsou uvedeny hodnoty naměřených vzorků po třetím postřiku elicitorů, kontrolní parcelky (H₂O) a vzorků z Meclova (kde neproběhla žádá elicítace). Vzorky z Meclova sloužily jako porovnání s pozemkem ZF JCU v Č.B.

Tabulka 10 – Obsah 20-hydroxyecdysonu a Polypodinu B v naťi

Nať	20-hydroxyecdysone		Polypodin B	
	µg/g	RSD (µg/g)	µg/g	RSD (µg/g)
ASA vysoká	14,1	1,4	1,4	0,1
ASA střední	30,7	3,3	4,3	0,4
ASA nízká	48,2	5,0	5,6	0,3
Nanofyt Si	16,3	2,0	1,8	0,1
H ₂ O	19,5	1,1	2,7	0,3
Meclov	5,4	0,3	1,0	0,1

Zdroj. Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha

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, a naopak velká směrodatná odchylka signalizuje velké vzájemné odlišnosti.

Tabulka 11 – Obsah 20-hydroxyecdysonu a Polypodinu B v kořenu

<i>kořen</i>	<i>20-hydroxyecdysone</i>		<i>Polypodin B</i>	
	$\mu\text{g/g}$	RSD ($\mu\text{g/g}$)	$\mu\text{g/g}$	RSD ($\mu\text{g/g}$)
<i>ASA vysoká</i>	543,4	7,6	30,7	0,8
<i>ASA střední</i>	567,3	11,9	38,7	2,9
<i>ASA nízká</i>	803,9	42,8	48,7	3,2
<i>Nanofyt Si</i>	696,5	47,9	42,3	4,4
<i>H₂O</i>	744,5	46,4	41,4	1,2
<i>Meclov</i>	159,9	10,3	5,7	0,3

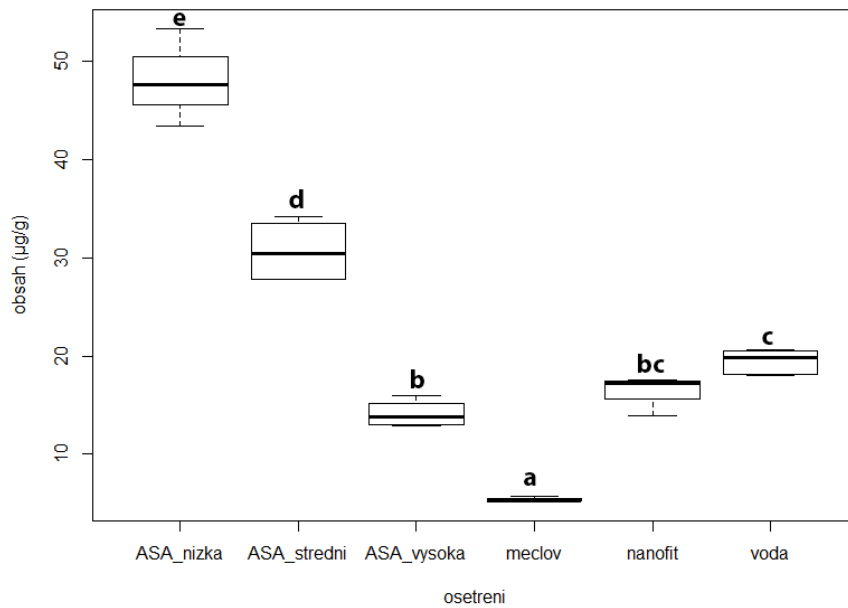
Zdroj. Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha

5.3. Statistické zpracování dat

5.3.1. 20-hydroxyecdysone nať

Obsah 20-hydroxyekdysonu v nati *L. saflorové* je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí Welchova F-testu, [$F_{(5,5467)} = 191.34$, $P = 5.74 \times 10^{-7}$]. Porovnání jednotlivých variant bylo *post-hoc* provedeno testem TukeyC (výsledky viz výpis z R a graf).

Graf 1 – Obsah 20-hydroxyekdysonu v naří L. saflorové



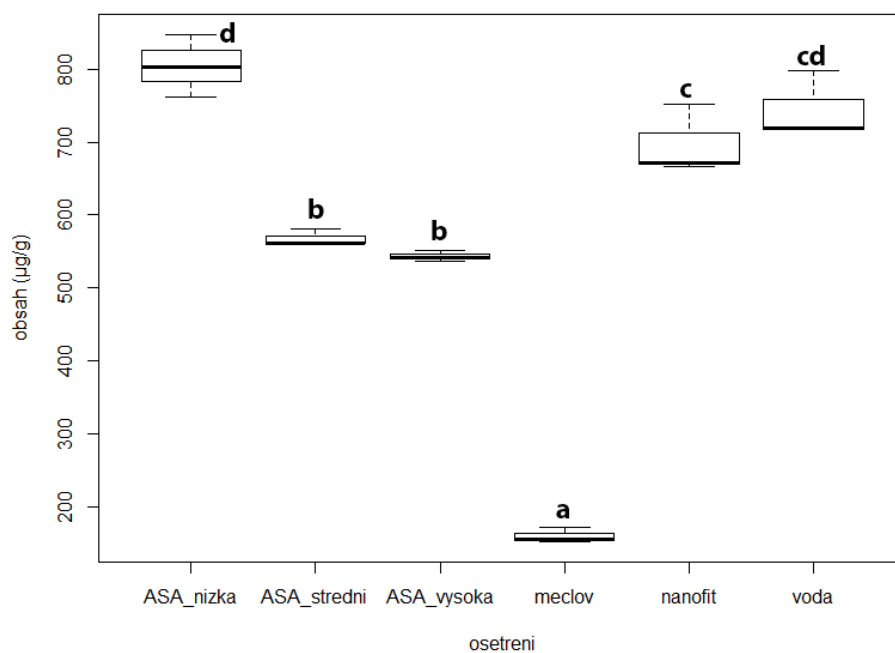
Zdroj: R core team (2019)

Poznámka: nanofit v grafu = NanoFyt Si®

5.3.2. 20-hydroxyekdyson kořen

Obsah 20-hydroxyekdysonu v kořeni L. saflorové je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí Welchova F-testu, [$F_{(5,5.36)} = 469.68, P = 4.84 \times 10^{-7}$]. Porovnání jednotlivých variant bylo *post-hoc* provedeno testem TukeyC.

Graf 2 – Obsah 20-hydroxyekdysonu v kořeni L. saflorové



Zdroj. R core team (2019)

Poznámka: nanofit v grafu = NanoFyt Si®

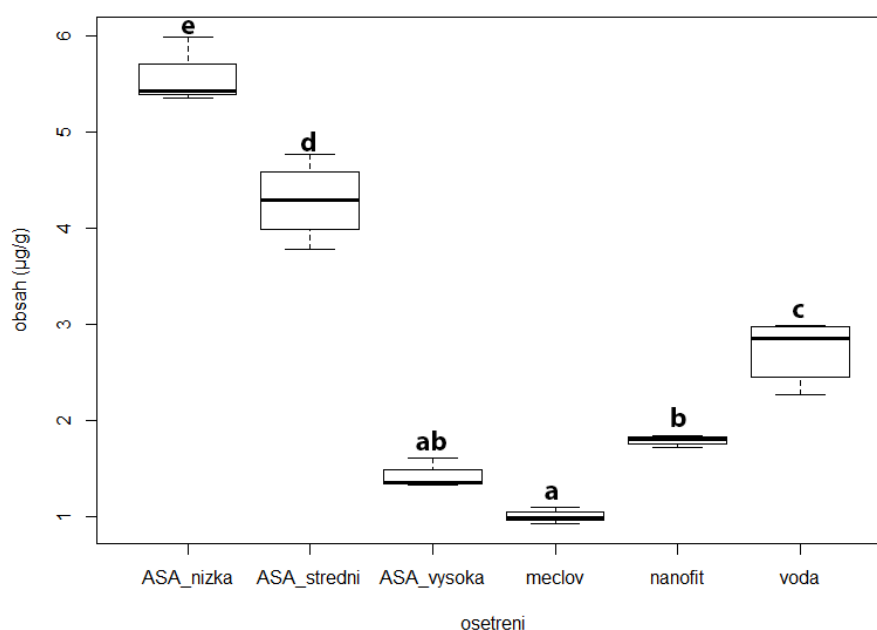
5.3.3. 20-hydroxyekdysonu interakce rostlina*ošetření

Obsah 20-hydroxyekdysonu je u L. saflorové průkazně ovlivněn interakcí mezi rostlinou a ošetřením. Ošetření má tedy u L. saflorové jiný efekt na obsah 20-hydroxyekdysonu v nati a v kořeni. Testováno pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (two-way ANOVA), [$F_{(5,29)} = 44.4, P < 1.02 \times 10^{-12}$] (Ito 1980).

5.3.4. Polypodin B nať

Obsah polypodinu B v nati L. saflorové je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí Welchova F-testu, [$F_{(5,7.22)} = 118.7, P = 9.34 \times 10^{-7}$]. Porovnání jednotlivých variant bylo *post-hoc* provedeno testem TukeyC.

Graf 3 – Obsah Polypodinu B v nati L. saflorové



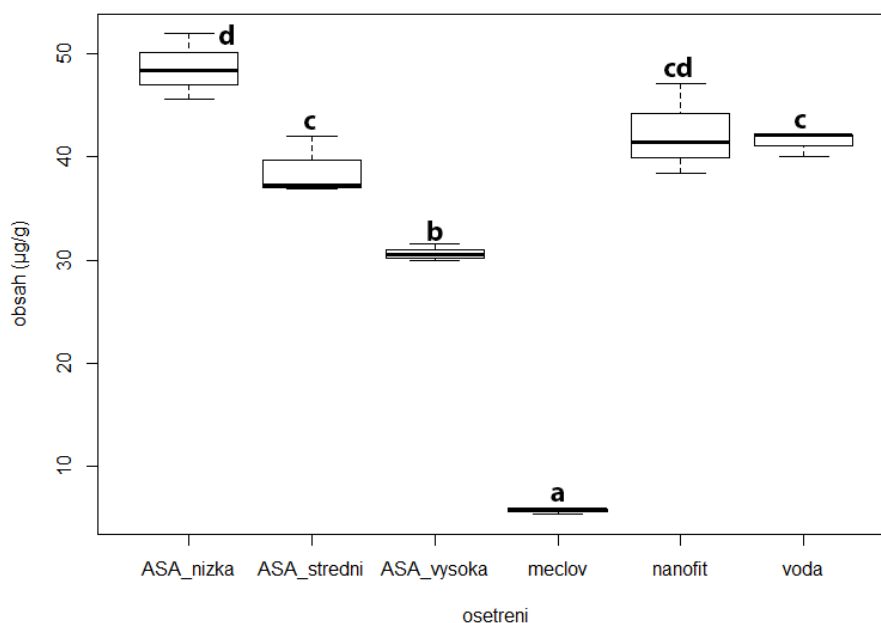
Zdroj. R core team (2019)

Poznámka: nanofit v grafu = NanoFyt Si®

5.3.5. Polypodin B kořen

Obsah polypodinu B v kořeni L. saflorové je průkazně ovlivněn zvolenými způsoby ošetření. Testováno pomocí Welchova F-testu, [$F_{(5,5.02)} = 703.72, P = 3.86 \times 10^{-7}$]. Porovnání jednotlivých variant bylo *post-hoc* provedeno testem TukeyC.

Graf 4 – Obsah Polypodinu B v kořeni L. saflorové



Zdroj: R core team (2019)

Poznámka: nanofit v grafu = NanoFyt Si®

5.3.6. Polygodin B interakce rostlina*ošetření

Obsah polygodinu B je u L. saflorové průkazně ovlivněn interakcí mezi rostlinou a ošetřením. Ošetření má tedy u L. saflorové jiný efekt na obsah polygodinu B v nati a v kořeni. Testováno pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (two-way ANOVA), [F_(5,24) = 74.59, P < 1.18 × 10⁻¹⁵] (Ito 1980).

5.3.7. Kalkulace nákladů aplikace elicitorů ve srovnání s jejich působením

Sledovaný elicitor: Kyselina Acetylsalicylová

Sledovaná rostlina: Leuzea saflorová

Aplikace na plochu: 1 ha

5.3.7.1. Příprava roztoku

Příprava roztoku kyseliny Acetylsalicylové na jeden hektar. Koncentrace aplikovaných roztoků c₁ ASA nízká 10⁻⁵ mol.l⁻¹; c₂ ASA střední 10⁻⁴ mol.l⁻¹; c₃ ASA vysoká 10⁻³ mol.l⁻¹. Molární hmotnost kyseliny acetylsalicylové 180,16 g.mol⁻¹.

Řešení:

Znamé hodnoty:

V = 300l; c₁ 10⁻⁵ mol.l⁻¹; c₂ 10⁻⁴ mol.l⁻¹; c₃ 10⁻³ mol.l⁻¹; M = 180,16 g.mol⁻¹

Výpočet hmotnosti kyseliny acetylsalicylové:

$$c = n/V \quad n = c_1 \times V = 10^{-5} \times 300 = 0,003 \text{ mol}$$

$$n = c_2 \times V = 10^{-4} \times 300 = 0,03 \text{ mol}$$

$$n = c_3 \times V = 10^{-3} \times 300 = 0,3 \text{ mol}$$

$$n = m/M \quad m = n_1 \times M = 0,003 \times 180,16 = 0,54084 \text{ g}$$

$$m = n_2 \times M = 0,03 \times 180,16 = 5,4048 \text{ g}$$

$$m = n_3 \times M = 0,3 \times 180,16 = 54,048 \text{ g}$$

5.3.7.2. Aplikace

Aplikace kyseliny acetylsalicylové u L. saflorové by měla probíhat ve třech po sobě následujících přejezdech po pozemku s rozestupy 20 dní pro maximální účinnost elicítace.

Termín aplikace: Začátek června do konce srpna.

Vhodná aplikační dávka: 300 l/ha.

Pro přípravu roztoku kyseliny acetylsalicylové o nízké koncentraci $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ bude zapotřebí 0,54048 g ASA rozpuštěných v 300 l H₂O.

Cenová kalkulace pro jednu dávku ASA nízká:

100 g 99% kyseliny acetylsalicylové = 800 Kč

100 g.....800 Kč

0,54048 g.....4,32 Kč

0,54048 g kyseliny acetylsalicylové = 4,32 Kč

Zdroj. Merck

1 m³ H₂O = 85,26 Kč

300 l.....25,57 Kč

300 l H₂O = 25,57 Kč

Zdroj. Nadační fond PRAVDA O VODĚ

Pracovní operace postřik nad 210 l/ha = 400 Kč

Cena vychází z ceníku poskytovaných služeb. Zdroj. Školní zemědělský podnik Lány

Celková cena aplikace (ASA nízká):

400 + 25,57 + 4,32 = 429,89 Kč

Počet aplikací za rok (ASA nízká):

429,89 x 3 = 1 289,67 Kč

Pokud se zaměříme na obsah 20-hydroxyecdysonu v nati *L. saflorové*, nejlepším elicitorem se zde stala ASA v nízká 10^{-5} mol.l⁻¹ aplikovaná foliárně.

5.3.7.3. ASA nízká - nať

ASA nízká 48,2 µg/g 20-hydroxyecdysone

Kontrola H₂O 19,5 µg/g

ASA Nízká 48,2 µg/g = 0.0000482 g

H₂O 19,5 µg/g = 0.0000195 g

Výnos suchého materiálu 9 t/ha = 9 000 000 g/rok

ASA Nízká 0,0000482 g x 9 000 000 g = 433,8 g 20-hydroxyecdysonu

H₂O 0,0000195 g x 9 000 000 g = 175,5 g 20-hydroxyecdysonu

Rozdíl nať:

28,7 µg/g = 0,0000287 g

0,0000287 x 9 000 000 = 258,3 g 20-hydroxyecdysonu

Cena jednoho gramu 20-hydroxyecdysonu jako doplňku stravy, se na trhu pohybuje v rozmezí 2,15-3 \$. V teoretické kalkulaci budeme počítat s nižší cenou 2,15 \$ = 54,3154 Kč Zdroj. Amazon.

258,3 x 54,3154 = 14 029,66782 Kč

Při aplikaci třech dávek elicitoru ASA nízká v koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ by došlo ke zvýšení výnosu 20-hydroxyecdysonu v nati oproti kontrolnímu postřiku H₂O o 258,3 g, v závislosti na množství sklizené hmoty z hektaru, v tomto případě 9 t suché nadzemní hmoty, průměrně za každý vegetační rok. V úvahu musíme brát meziřádkovou vzdálenost a množství rostlin na jednom hektaru (při meziřádkovém sponu 30 cm x 60 cm je to 55 000 rostlin/ha). Samotná cena aplikace elicatorů činí 1 289,67 Kč za jeden rok.

Teoretický zisk (ASA nízké) z hektaru tedy činí oproti kontrole H₂O za jeden rok:

14 029,66782 - 1 289,67 (náklady na aplikaci) ÷ +12 740 Kč/ha

Teoretický zisk (ASA nízké) za celé vegetační období (tři roky):

12 740 x 3 ÷ + 38 220 Kč/ha

5.3.7.4. ASA nízká – kořen

Nejvyššího obsahu 20-hydroxyecdysonu v kořeni L. saflorové bylo dosaženo aplikací kyseliny acetylsalicylové v koncentraci $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (nízká) s naměřenou hodnotou 803,9 $\mu\text{g/g}$. Průměrný výnos suchého kořene činí 2-3 t/ha, toto množství odpovídá sklizenému materiálu na konci třetího roku vegetace. Při současných hodnotách obsahu účinných látek by získané množství 20-hydroxyecdysonu vypadalo takto:

ASA nízká 803,9 $\mu\text{g/g}$ 20-hydroxyecdysone

Kontrola H₂O 744,5 $\mu\text{g/g}$

ASA Nízká 803,9 $\mu\text{g/g}$ = 0,0008039 g

H₂O 744,5 $\mu\text{g/g}$ = 0,0007445 g

Výnos suchého materiálu 2,5 t/ha = 2 500 000 g (střízlivý odhad množství kořene z ha)

ASA Nízká 0,0008039 g x 2 500 000 g = 2 009,75 g 20-hydroxyecdysonu (za tři roky)

H₂O 0,0007445 g x 2 500 000 g = 1 861,25 g 20-hydroxyecdysonu (za tři roky)

Rozdíl kořen:

59,4 $\mu\text{g/g}$ = 0,0000594 g

0,0000594 x 2 500 000 = 148,5 g 20-hydroxyecdysonu „za tři roky“

Cena jednoho gramu 20-hydroxyecdysonu jako doplňku stravy, se na trhu pohybuje v rozmezí 2,15-3 \$. V teoretické kalkulaci budeme počítat s nižší cenou 2,15 \$ = 54,3154 Kč Zdroj. Amazon.

148,5 x 54,3154 = 8 065,8369 Kč

Při aplikaci devíti dávek (aplikace za tři roky) elicitoru ASA nízké v koncentraci $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ by se teoreticky zvýšil výnos 20-hydroxyecdysonu kořenu oproti kontrolnímu postřiku H₂O o 148,5 g. Cena samotné aplikace elicitorů by dosahovala výše 3 869,01 Kč na tři roky.

Teoretický zisk z kořene při použití ASA nízké činí z hektaru oproti kontrole H₂O:

8 065,8369 - 3 869,01 = + 4 197 Kč/ha (za tři roky)

Celková vypočtená hodnota v korunách, při použití elicitoru „ASA nízká“ v provnání s H₂O za celé vegetančí období (tři roky):

Nať + 38 220 Kč/ha

Kořen + 4 197 Kč/ha

Celkem 38 220 + 4 197 = 42 417 Kč

Z nadzemní biomasy a kořene je nutno extrahovat 20-hydroxyecdysyon. Je tedy nutno uvést, že extrakce bude realizována za stejnou cenu v případě použití elicitoru i v případě bez použití elicitoru.

Pokud bude v materiálu vyšší obsah 20-hydroxyecdysyonu, potom bude pro extrakci stejného množství 20-hydroxyecdysyonu nutno použít menší množství materiálu. Extrakce tedy bude teoreticky levnější.

Z uvedených výpočtů je patrné, že aplikace kyseliny acetylsalicylové v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ má významný vliv na obsah 20-hydroxyecdysyonu v L. saflorové. Tato metoda přispívá k vyšším výnosům 20-hydroxyecdysyonu z nati a kořene rostlin při zachování minimálních nákladů na aplikaci.

5.4. Diskuse

5.4.1. 20-hydroxyekdyson v nati

Jak je z grafu 1 patrné, prokazatelně nejvyššího statisticky průkazného obsahu 20-hydroxyekdysonu v nati (48,2 µg/g) bylo dosaženo elicitací kyselinou acetylsalicylovou (e) v koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ (ASA nízká). Naopak nejnižší naměřenou hodnotu obsahoval vzorek z Meclova (a), (5,4 µg/g). Střední koncentrace ASA 10^{-4} mol.l⁻¹ (d), (30,7 µg/g) měla také statisticky průkazný zvyšující vliv na obsah 20-hydroxyekdysonu oproti kontrolnímu postřiku vodou (c). Postřik ASA ve vysoké koncentraci 10^{-3} mol.l⁻¹ snížil obsah 20-hydroxyekdysonu na 14,1 µg/g (b) a postřik komerčním preparátem NanoFyt Si® snížil obsah 20-hydroxyekdysonu na 16,3 µg/g (bc). V obou případech statisticky neprůkazně oproti kontrole (c).

5.4.2. 20-hydroxyekdyson v kořenu

Graf 2 porovnává hodnoty 20-hydroxyekdysonu naměřených v kořeni L. saflorové. Z výsledků je zřejmé, že nejvyššího obsahu 20-hydroxyekdysonu bylo dosaženo aplikací kyseliny acetylsalicylové v koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ na grafu označenou písmenkem (d) s naměřenou hodnotou 803,9 µg/g. Zvýšení oproti kontrole (744,5 µg/g) (cd) nebylo statisticky průkazné. Nejnižší naměřená hodnota byla stanovena u vzorku z Meclova (a), (159,9 µg/g). Aplikace ASA ve střední koncentraci (10^{-4} mol.l⁻¹) průkazně snížila obsah 20-hydroxyekdysonu v kořeni (567,3 µg/g), (b). Aplikace ASA ve vysoké koncentraci (10^{-3} mol.l⁻¹) taktéž obsah 20-hydroxyekdysonu v kořeni

snížila (543,4 µg/g), (b). Obě oproti kontrole (744,5 µg/g), (cd). Komerční preparát NanoFyt Si® snížil obsah 20-hydroxyekdysonu na 696,5 µg/g (c).

5.4.3. Diskuse 20-hydroxyekdyson

Prováděná elicitace kyselinou acetylsalicylovou v nízké koncentraci (10^{-5}mol.l^{-1}) měla významný vliv na zvýšení obsahu 20-hydroxyekdysonu v L. saflorové jak v nati (statisticky průkazný), tak i v kořenech (statisticky neprůkazný). V porovnání s kontrolou mimo kyseliny ASA nízké, je potřeba ještě zmínit vliv ASA střední (d) na grafu 1, která také působila pozitivně na statisticky průkazné zvýšení obsahu 20-hydroxyekdysonu v nati. Vliv ASA ve vysoké koncentraci (10^{-3}mol.l^{-1}) a komerčního preparátu NanoFyt Si® byl statisticky neprůkazný.

Zajímavým se stává porovnání obou pokusných lokalit, a to ZF JCU a Meclova. Až na menší rozdíly v AZP, které hrály ve prospěch Meclova, měly obě stanoviště totožné podmínky pro maloparcelkový pokus, ale v rostlinách byly naprosto rozdílné obsahy účinných látek. Při porovnání naměřených výsledků je patrné, že elicitace prováděná na pozemku na ZF JU v CB hrála významnou roli při tvorbě 20-hydroxyekdysonu v L. saflorové a významně ovlivnila jeho obsah v rostlině.

5.4.4. Polypodin B nať

Jak je patrné z grafu 3 nejvyššího statisticky průkazného zvýšení obsahu Polypodinu B v nati L. saflorové bylo dosaženo elitací kyseliny acetylsalicylové v nízké koncentraci (10^{-5}mol.l^{-1}), značenou v grafu (e) s naměřeným množstvím 5,6 µg/g. Statisticky významné bylo i působení ASA ve střední koncentraci (10^{-4}mol.l^{-1}), která měla také vliv na zvýšení obsahu Polypodinu B (4,3 µg/g) (d) ve srovnání s kontrolním postřikem vodou (2,7 µg/g) (c). Nejnižší obsah polypodinu v nati byl naměřen v Meclově 1,0 µg/g (a).

5.4.5. Polypodin B kořen

Jak je vidět v grafu 4, nejvyššího statisticky průkazného zvýšení obsahu Polypodinu B bylo dosaženo aplikací ASA nízké (d) v koncentraci 10^{-5}mol.l^{-1} s naměřenou hodnotou 48,7 µg/g. Nejnižší hodnota byla stanovena v Meclově (a), a to 5,7 µg/g. Působení ostatních elicitorů obsah Polypodinu B snižovalo ve srovnání s kontrolou.

5.4.6. Diskuse Polypodin B

Provedená elicitace kyselinou acetylsalicylovou v nízké koncentraci (10^{-5}mol.l^{-1}) měla významný vliv na obsah Polypodinu B v L. saflorové. Naměřené hodnoty, jak

v nati, tak i v kořenech *L. saflorové*, byly statisticky průkazně vyšší v porovnání s kontrolou. Působení ASA v nízké koncentraci ($10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) snižovalo obsah Polypodinu B v *L. saflorové*. V kořeni a nati statisticky průkazně. Elicitor NanoFyt Si[®] snižoval obsah Polypodinu B v kořeni a nati *L. saflorové*. V nati statisticky průkazně, v kořeni neprůkazně.

Stejně jako u 20-hydroxyekdysonu i u Polypodinu B byly zjištěné nejnižší naměřené hodnoty z pozemku Meclov.

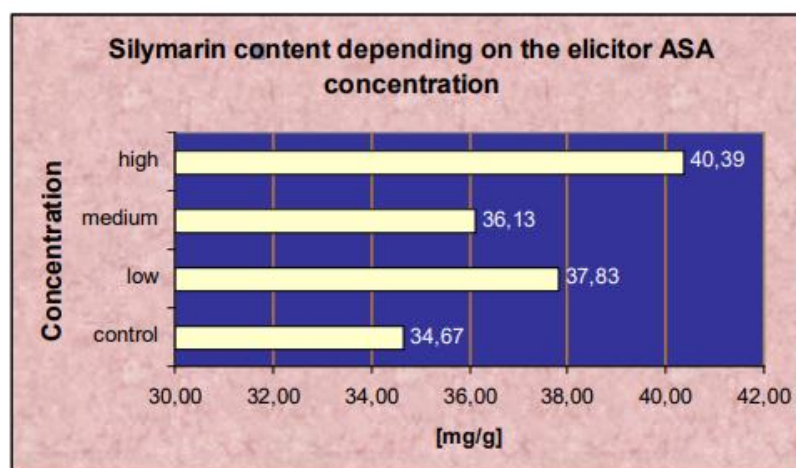
Ohledně obsahu Polypodinu B v nati nebyl dosud publikovaný žádný článek popisující Polypodin B v nati *L. saflorové*. Literatura (Ramazanov et al., 1997 a; Bastaev, Abubakirov 1987; Kokoska, Janovska 2009) uvádí jako hlavní místa výskytu Polypodinu B u *L. saflorové* semena a kořeny rostliny.

5.5. Porovnání elicitorů s literaturou

Účinky kyseliny acetylsalicylové můžeme porovnat s pracemi jiných autorů.

Příkladem může být diplomová práce Bc. Hany Gramarové z roku 2009, která se zaměřila na technologii pěstování ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Popsaná elicítace v práci proběhla ve třech různých koncentracích, ASA vysoká $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, ASA střední $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ a ASA nízká $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Projevem elicítace kyseliny acetylsalicylové bylo zvýšení obsahu silymarinu v semenech ostropestřce, a to o 16 % aplikací ASA vysoké, při aplikaci ASA nízké došlo ke zvýšení koncentrace silymarinu o 9 % a při aplikaci ASA střední došlo k nárůst o 4 % (Gramanová 2009).

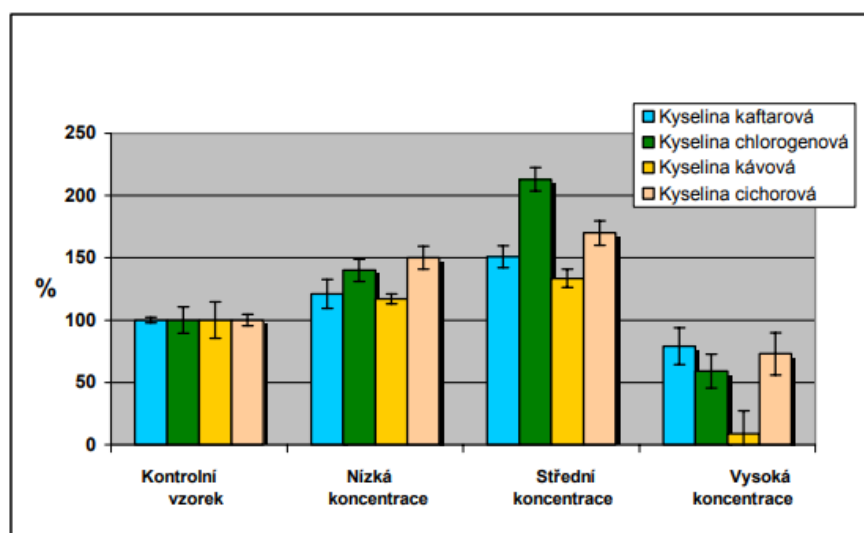
Graf 5 – Obsah silymarinu v závislosti na koncentraci ASA při elicitaci v semenech ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2007



Gramanová (2009)

Další práce, která se zabývala vlivem elicitorů na obsah účinných látek u léčivých rostlin byla diplomová práce J. Šrámka, která byla publikována v roce 2007. Ten zkoumal vliv působení kyseliny acetylsalicylové ve třech koncentracích ASA střední, ASA nízká a ASA vysoká na obsah účinných látek u rostliny *Echinacea purpurea*. Konkrétně u kyseliny cichorové, chlorogenové, kaftarové a kávové v nati a kořeni. Pozitivní vliv elicitace se projevil zejména v kořenech Třapatky, při aplikaci nízké 10^{-5} mol.l⁻¹ a střední 10^{-4} mol.l⁻¹ koncentrace kyseliny acetylsalicylové viz graf 6. Vysoká koncentrace ASA 10^{-3} mol.l⁻¹ výrazně snižovala obsah všech sledovaných látek, především kyseliny kávové (Šrámek 2007).

Graf 6 – Procentický obsah sledovaných látek v kořenu v závislosti na koncentraci elicitoru v roce 2002



Šrámek (2007)

Studie Danaee et al., z roku 2015 popisuje výzkum aplikace kyseliny salicylové u *Phyllanthus pulcher* z čeledi *Phyllanthus*. Kyselina salicylová měla efekt nejen na obsah účinných látek, ale také na zvýšení biomasy *Phyllanthus pulcher*. Různé koncentrace kyseliny salicylové příznivě ovlivnily množství biomasy a měli vliv na obsah flavonoidů, fenolů a antioxidantů v *Phyllanthus pulcher*. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo aplikací 20 mg.l⁻¹ viz tabulka 12. (Danaee et al., 2015).

Tabulka 12 – Vliv různých koncentrací kyseliny salicylové (SA) na flavonoidy (TFC^a), fenoly (TPC^b) a antioxidanty (AX) v *Phyllanthus pulcher*

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

Danaee et al., (2015)

5.6. Porovnání 20-hydroxyekdysonu s literaturou

Během třicetiletého intenzivního výzkumu, bylo detekováno nejméně 50 různých ekdysteroidních sloučenin v *L. saflorové*. 20-hydroxyekdysteroid byl identifikován jako jeden z nejvíce zastoupených ekdysteroidů s obsahem 0,04-0,81 % v kořenech, 0,03-1,22 % v nadzemních hmotě a 0,27-1,51 % v semenech (hodnoty uváděné v sušině) (Lamer-Zarawska et al. 1996; Krasnov et al. 1976; Yakubova, Sakharova 1980; Varga et al. 1986; Repcak et al. 1994; Timofeev et al. 1998; Bastaev, Bastaev 1987; Girault et al. 1988; Baltaev 1991, 1992, 1995; Píš et al. 1994; Baltaev et al. 1997; Ramazanov et al. 1997a, b; Sadykov et al., 1997; Borovikova et al. 1999; Borovikova, Baltaev 1999; Vokac et al. 2002; Buděšínský et al. 2008; Khomova et al. 1995; Stransky et al. 1998; Kokoska, Janovska 2009).

Bárnet et al. 2015 popisuje ve své práci o *L. saflorové* možnost značné variability koncentrace ekdysteroidů, a to od 0,1 % do 0,62 %. Co se týče sekundárních metabolitů obsažených v nadzemní hmotě *L. saflorové*, literatura se ohledně tohoto tématu značně rozchází a jsou uváděny obsahy ekdysteroidů do 0,3 %. Podle Dr. Harmaty a Timofejeva (Левзея сафлоровидная) je nejvyšší obsah účinných látek pouze v nejranějších růstových fázích na jaře a s rostoucí růstovou fází jejich obsah rychle klesá. Významný vliv na obsah účinných látek v *Leuzee saflorové* má také podnebí, lokalita a stáří rostlin.

Zjištěné výsledky naměřených hodnot v této diplomové práci dosahovaly obsahů 0,016 % - 0,08 % 20-hydroxyekdysonu v kořenech a 0,005 % - 0,048 % v nati.

Z pohledu porovnání výsledků s literaturou se mohou zdát naměřené hodnoty nízké, ale musíme si uvědomit, že tyto vzorky byly odebrány v prvním roce vegetace rostliny. Literatura vychází z rozborů rostlin provedených v dalších letech růstu, kdy logicky obsah účinných látek bude jiný.

5.7. Porovnání Polypodinu B s literaturou

Jak bylo zmíněno výše obsah Polypodinu B v nati rostliny *L. saflorové* nebyl dosud publikován. Výsledky Polypodinu B můžeme porovnat například s rostlinou *Serratula coronata* L. z čeledi *Asteraceae*. Obsahy Polypodinu B v nati publikované Odínokovem et al., v roce 2002 stanovené HPLC analýzou dosáhly výsledku 0,7 % v sušině. V provnání *L. saflorové* odebraná na pozemku v ZF JCU obsahovala 0,00056 % Polypodinu B v nati. V naší práci jsou patrné několikanásobně nižší naměřené hodnoty. Příčinou může být fakt, že *Serratula coronata* L. je jednoletou rostlinou, která podle Novel'skaya et al., (1981) je jedním z nejslibnějších zdrojů fytoekdysteroidů.

5.8. Výsledky stanovené hypotézy

Předpokladem sledované hypotézy bylo docílit prostřednictvím elicitace zvýšení aspoň jedné ze dvou sledovaných látek v *L. saflorové*, a to 20-hydroxyekdysonu nebo Polypodinu B. Tato hypotéza byla úspěšně potvrzena aplikací kyseliny acetylsalicylové v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ v maloparcelkovém pokusu na pozemku ZF JCU.

V nati kde byl sledován 20-hydroxyekdyson, byla nejúčinnějším elicitorem ASA v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ (48,2 µg/g). Pozitivně působila také ASA ve střední koncentraci 10^{-4} mol.l⁻¹ (30,7 µg/g) oproti kontrolnímu postřiku vodou (19,5 µg/g). V kořeni se projevil vliv ASA v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹, která oproti kontrolnímu stanovišti (H₂O) (744,5 µg/g) obsahovala 803,9 µg/g.

U Polypodinu B bylo dosaženo také kladných výsledků. V nati nejlépe zafungovala ASA v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ s hodnotou 5,6 µg/g - oproti kontrole 2,7 µg/g. Dále byla účinná i ASA ve střední koncentraci 10^{-4} mol.l⁻¹ s hodnotou 4,3 µg/g. Pokud se jedná o Polypodin B naměřený v kořenech, nejúspěšnějším elcito-

rem zde byla ASA v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ s hodnotou 48,7 µg/g a dále Nanofyt Si® s naměřenou hodnotou 42,3 µg/g. Kontrola v kořeni měla hodnotu 41,4 µg/g.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo studium vlivu technologie pěstování Leuzezy saflorové (*Leuzea carthamoides* DC.) na obsah vybraných biologicky aktivních látek v produktu. Úkolem bylo vypracovat literární rešerši na zadané téma a provést maloparcelkový pokus s pěstováním L. saflorové. Statisticky vyhodnotit vliv použité technologie – v tomto případě elicítace – na obsah vybraných, biologicky aktivních látek v produktu a získané výsledky diskutovat a porovnat s publikovanou literaturou.

Součástí této práce je popis pěstování L. saflorové ve skleníku a následného vysazení na pole. Na poli byla jako elicitor použita kyselina acetylsalicylová ve třech koncentracích ASA vysoká 10^{-3} mol.l⁻¹, ASA střední 10^{-4} mol.l⁻¹, ASA nízká 10^{-5} mol.l⁻¹ a komerční přípravek NanoFyt Si®. 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 ve vzorcích stanoveny látky 20-hydroxyekdysonu a Polypodin B.

Podíváme-li se na obsah 20-hydroxyekdysonu v nati L. saflorové, nejlepším elicitem se zde stala ASA v nízké 10^{-5} mol.l⁻¹ a střední koncentraci 10^{-4} mol.l⁻¹, aplikovaná foliárně. Podobně tomu tak bylo i u kořene, kde se výborně vedlo kyselině acetylsalicylové v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ v porovnání s kontrolou.

Pokud se zaměříme na obsah Polypodinu B v nati, výsledky ukazují, že pro dosažení nejvyššího obsahu bylo zapotřebí rostliny ošetřit foliárně kyselinou acetylsalicylovou v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Podobně tomu tak bylo i u obsahu Polypodinu B v kořenech, kde se podařilo navýšit jeho obsah aplikací kyseliny acetylsalicylové v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹, v maloparcelkovém pokuse provedeném na pozemku ZF JCU v Českých Budějovicích.

Tato diplomová práce došla k závěru, že působení kyseliny acetylsalicylové (ASA) v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ bylo v maloparcelkovém pokuse provedeném v Českých Budějovicích na katedře Agroekosystémů na Zemědělské fakultě Jihočeské Univerzity průkazné. Kyselina acetylsalicylová (ASA) v nízké koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ měla pozitivní vliv na zvýšení obsahu 20hydroxyekdysonu a Polypodinu B v nati a kořenech L. saflorové.

7. Seznam citované literatury

1. **Abramchuk, A. V., & Saraeva, A. V. (2016).** Elements of the introduction of adaptogenic plants. *Youth and science*, (6), 34-37.
2. **Abramchuk, A. V., Kartasheva, G. G., Mingalev, S. K., & Karpukhin, M. Y. (2014).** Lekarstvennaya flora Urala: uchebnik dlya agro-\$ nomicheskikh spetsial'nostej vuzov [Medicinal flora of the Urals: a textbook for agronomic specialties].
3. **Agra Group.** Dostupné z: <http://www.agra.cz/>.
4. **Akshay, K. R., Sudharani, N., Anjali, K. B., & Deepak, T. M. (2014).** Biodiversity and strategies for conservation of rare, endangered and threatened medicinal plants. *Res Rev: J Pharmacogn Phytochem*, 2, 12-20.
5. **Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011).** Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav* 6: 1720–1731.
6. **Amazon.** Dostupné z: <https://www.amazon.com/Grams-ECDYSTERONE-Powder-20-Hydroxyecdysone-96-9/dp/B07JFTR135>
7. **Ames, G. M., Wall, W. A., Hohmann, M. G., & Wright, J. P. (2017).** Trait space of rare plants in a fire-dependent ecosystem. *Conservation Biology*, 31(4), 903-911.
8. **Angelovič M., (2002).** Návrh stroje na sběr kořenů léčivých rostlin, In: *Technika v procesech trvale udržitelného hospodaření a produkce bezpečných potravin*. Brno, MZLU.
9. **Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014).** Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19(9), 13541-13563.
10. **Baltaev, U. A. (1991).** Phytoecdysteroids of *Rhaponticum carthamoides*. II. Rhapisterone B. *Chemistry of Natural Compounds*, 27(6), 712-713.
11. **Baltaev, U. A. (1992).** Phytoecdysteroids of *Rhaponticum carthamoides* III. Rhapisterone C. *Chemistry of Natural Compounds*, 28(2), 198-200.
12. **Baltaev, U. A. (1995).** Rapisterone D, a phytoecdysteroid from *Rhaponticum carthamoides*. *Phytochemistry*, 38(3), 799-800.
13. **Baltayev, U. A., Dinan, L., Girault, J. P., & Lafont, R. (1997).** 24 (241)[Z]-dehydroamarasterone B, a phytoecdysteroid from seeds of *Leuzea carthamoides*. *Phytochemistry*, 46(1), 103-105.
14. **Bárnet, M., Pavela, R., Pilař, M., Mráz, J., Pluhař, P., Vosátka, M. (2015):** Alternativní plodina parcha saflorovitá (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) liljin) pěstování, význam, využití v ochraně rostlin, *Botanický ústav AV ČR*, 23 str.

15. **Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., & Arora, S. (2013).** Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of plant growth regulation*, 32(1), 216-232.
16. **Bastaev, U. A., & Abubakirov, N. K. (1987).** Phytoecdysteroids of *Rhaponticum carthamoides*. *Chemistry of Natural Compounds*, 23(5), 565-568.
17. **Bernas J., (2018).** Environmentální, energetické a ekonomické aspekty pěstování vybraných energetických rostlin, České Budějovice, Disertační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
18. **Borovikova, E. B., & Baltaev, U. A. (1999).** Lesterone, a new phytoecdysteroid from the seeds of *Leuzea carthamoides*. *Chemistry of natural compounds*, 35(2), 182-183.
19. **Borovikova, E. B., Shangaraeva, G. S., & Baltaev, U. A. (1999).** Rhapisterone D 20-acetate from the seeds of *Leuzea carthamoides*. *Chemistry of natural compounds*, 35(2), 184-185.
20. **Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
21. **Buděšínský, M., Vokáč, K., Harmatha, J., & Cvačka, J. (2008).** Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*. *Steroids*, 73(5), 502-514.
22. **Buděšínský, M., Vokáč, K., Harmatha, J., & Cvačka, J. (2009).** Corrigendum to "Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*" [*Steroids* 73 (2008) 502–514]. *Steroids*, 12(74), 1003-1004.
23. **Český hydrometeorologický ústav.** Dostupné z: <http://portal.chmi.cz/>
24. **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.
25. **Devillers, J., (2013):** CRC Press, Boca Raton, Florida, 387pp.
26. **Dittrich, M., (1973).** Proposal to conserve the generic name *Rhaponticum* Hill (1762) ("Rhapontica"), orth. mut. Lam. Nomen conservandum propositum. *Taxon* 22, 314–315.
27. **Dushkin, M., Khrapova, M., Kovshik, G., Chasovskikh, M., Menshchikova, E., Trufakin, V., ... & Vereschagin, E. (2014).** Effects of *rhaponticum carthamoides* versus *glycyrrhiza glabra* and *punica granatum* extracts on metabolic

- syndrome signs in rats. BMC complementary and alternative medicine, 14(1), 33.
28. **Dvořáková Jana, (2006)**. Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině Ostropestřec mariánský *Silybum marianum* (L.) Gaertn. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
29. **eVitamins**. Dostupné z: <https://www.evitamins.com/>.
30. **Faizieva, S. K., Khushbaktova, Z. A., Syrov, V. N., Yuldashev, M. P., Batirov, É. K., & Sagdullaev, S. S. (1999)**. The total flavonoids from *Thermopsis alterniflora*, *Th. dolichocarpa*, *Vexibia alopecuroides*, and *Rhaponticum carthamoides* and their hypolipidemic activity. Chemistry of natural compounds, 35(2), 155-158.
31. **Fejo E. (2019)**. Technologie pěstování Leuzezy saflorové (*Leuzea carthamoides* DC.) a využití produktu. Bakalářská práce ZF JU v Č.B., 48s.
32. **Frydrychová, S., Opletal, L., Macáková, K., Lustyková, A., Rozkot, M., & Lipenský, J. (2011)**. Effects of herbal preparation on libido and semen quality in boars. Reproduction in domestic animals, 46(4), 573-578.
33. **Gadzhieva, R. M., Portugalov, S. N., Paniushkin, V. V., & Kondrat'eva, I. I. (1995)**. A comparative study of the anabolic action of ecdysten, leveton and Prime Plus, preparations of plant origin. Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya, 58(5), 46-48.
34. **Gems D., P. L. (2008)**. Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". Cell Metab.roč.7, čís.3, 200-203.
35. **Genext NUTRITION**. Dostupné z: <https://www.shopgenext.com/>.
36. **Geszprych, A., & Weglarz, Z. (2002)**. Composition of essential oil from underground and aboveground organs of *Rhaponticum carthamoides* [Willd.] Iljin. Herba polonica, 48(4).
37. **Girault, J. P., Lafont, R., Varga, E., Hajdu, Z., Herke, I., & Szendrei, K. (1988)**. Ecdysteroids from *Leuzea carthamoides*. Phytochemistry, 27(3), 737-741.
38. **Głazowska, J., Kamiński, M. M., & Kamiński, M. (2018)**. Chromatographic separation, determination and identification of ecdysteroids: Focus on Maral root (*Rhaponticum carthamoides*, *Leuzea carthamoides*). Journal of separation science, 41(23), 4304-4314.
39. **Godoy-Hernández, G., & Loyola-Vargas, V. M. (1997)**. Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. Plant cell reports, 16(5), 287-290.

40. **Gorelick-Feldman, J., Cohick, W., & Raskin, I. (2010).** Ecdysteroids elicit a rapid Ca²⁺ flux leading to Akt activation and increased protein synthesis in skeletal muscle cells. *Steroids*, 75(10), 632-637.
41. **Gorelick-Feldman, J., MacLean, D., Ilic, N., Poulev, A., Lila, M. A., Cheng, D., & Raskin, I. (2008).** Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10), 3532-3537.
42. **Gramanová H., (2009).** Technologie pěstování ostropestřece mariánského *Silybum marianum* ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
43. **Greuter, W. (2003).** The Euro Med treatment of Cardueae (Compositae)—generic concepts and required new names. *Willdenowia*, 33(1), 49-61.
44. **Hamburger, M., Gaube, F., Wöfl, S., Pusch, L., Kroll, T., Riese, U., & Schrenk, D. (2006).** Effects of *Leuzea carthamoides* DC. on human breast cancer MCF-7 cells detected by gene expression profiling. *Planta Medica*, 72(11), P_026.
45. **Hanson, R. W., & Reshef, L. (1997).** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual review of biochemistry*, 66(1), 581-611.
46. **Harmatha, J. (2005).** Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenyylpropanoidů. *Chemické listy* 99, 622-632.
47. **Harmatha, J., Buděšínský, M., Vokáč, K., Pavlík, M., Grüner, K., & Laudová, V. (2007).** Lignan glucosides and serotonin phenylpropanoids from the seeds of *Leuzea carthamoides*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 72(3), 334-346.
48. **Harmatha, J., Vokáč, K., Kmoníčková, E., & Zídek, Z. (2008).** Lack of interference of common phytoecdysteroids with production of nitric oxide by immune-activated mammalian macrophages. *Steroids*, 73(4), 466-471.
49. **Havlik, J., Budesinsky, M., Kloucek, P., Kokoska, L., Valterova, I., Vasickova, S., & Zeleny, V. (2009).** Norsesquiterpene hydrocarbon, chemical composition and antimicrobial activity of *Rhaponticum carthamoides* root essential oil. *Phytochemistry*, 70(3), 414-418.
50. **Holub, J. (1973).** Contribution to the taxonomy and nomenclature of *Leuzea* DC. and *Rhaponticum* auct. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 8(4), 377-395.
51. **Holub, J. (1974).** The conservation of *Rhaponticum*. *Taxon*, 23(2/3), 424-425.

52. **Chen, Q., Xia, Y., & Qiu, Z. (2006).** Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro. *Life sciences*, 78(10), 1108-1113.
53. **Cheng, D. M., Kutzler, L. W., Boler, D. D., Drnevich, J., Killefer, J., & Lila, M. A. (2013).** Continuous Infusion of 20 – Hydroxyecdysone Increased Mass of Triiceps Brachii in C57BL/6 Mice. *Phytotherapy Research*, 27(1), 107-111.
54. **Chermnykh, N. S., Shimanovskii, N. L., Shutko, G. V., & Syrov, V. N. (1988).** The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles. *Farmakologiya i toksikologiya*, 51(6), 57-60.
55. **Chobot, V., Buchta, V., Jahodářová, H., Pour, M., Opletal, L., Jahodář, L., & Harant, P. (2003).** Antifungal activity of a thiophene polyine from *Leuzea carthamoides*. *Fitoterapia*, 74(3), 288-290.
56. **Ito, K. (1980).** Robustness of ANOVA and MANOVA test procedures, edited by: Krishnaiah, PR, *Handbook of Statistics*, Vol. 1.
57. **Jain, M., Flynn, D. F., Prager, C. M., Hart, G. M., DeVan, C. M., Ahrestani, F. S., ... & Naeem, S. (2014).** The importance of rare species: A trait-based assessment of rare species contributions to functional diversity and possible ecosystem function in tall-grass prairies. *Ecology and Evolution*, 4(1), 104
58. **Janovská, D., Klouček, P., Urban, J., Vaněk, T., Rada, V., & Kokoška, L. (2008).** Susceptibility of some clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to fractions from the aerial parts of *Leuzea carthamoides*. *Biologia*, 63(5), 607-609.
59. **Jizba, J., Herout, V., & Šorm, F. (1967).** Isolation of ecdysterone (crustecdysone) from *polypodium vulgare* L. Rhizomes. *Tetrahedron Letters*, 8(18), 1689-1691.
60. **Kapur, P., Wuttke, W., Jarry, H., & Seidlova-Wuttke, D. (2010).** Beneficial effects of β -Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine*, 17(5), 350-355.
61. **Karimian, A. A. (2012).** Rare Plant Species of the Protected Area of Kalmand-Bahadoran, Yazd Province, Iran. In *International Conference on Applied Life Sciences*. IntechOpen.
62. **Karlson, P. (1966a).** Ecdyson, das Häutungshormon der Insekten. *Naturwissenschaften*, 53(18), 445-453.
63. **Karlson, P. (1966b).** Ecdysone, the molting hormone of insects. *Die Naturwissenschaften*, 53(18), 445.

64. **Kessler, A. (2015).** The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 47-53.
65. **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.
66. **Khomova, T. V., Guskova, S. D., & Glushenkova, A. I. (1995).** Lipids from ecdysterone production wastes. *Chemistry of Natural Compounds*, 31(2), 172-174.
67. **Khushbaktova, Z. A., & Syrov, V. N. (1989).** Hypolipidemic activity of flavonoids from *Pseudosophora alopecuroides* and *Rhaponticum carthamoides*. In *Dokl. Akad. Nauk UzSSR* (Vol. 10, pp. 45-47).
68. **Kizelsztejn, P., Govorko, D., Komarnytsky, S., Evans, A., Wang, Z., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2009).** 20 – Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(3), E433-E439.
69. **Klein, R., (2004).** Phytoecdysteroids. *J. Am. Herb. Guild* 5, 18–28.
70. **Kokoska, L., & Janovska, D. (2009).** Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review. *Phytochemistry*, 70(7), 842-855.
71. **Koleckar, V., Brojerova, E., Rehakova, Z., Kubikova, K., Cervenka, F., Kuca, K., ... & Opletal, L. (2008).** In vitro antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug and chemical toxicology*, 31(1), 27-35.
72. **Kopřiva Z. (2002).** *Leuzea saflorová (Leuzea carthamoides) jako alternativní rostlina*. Diplomová práce ZF JU v Č.B., 67 s.
73. **Kormosh, N., Laktionov, K., & Antoshechkina, M. (2006).** Effect of a combination of extract from several plants on Cell-mediated and humoral immunity of patients with advanced ovarian cancer. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(5), 424-425.
74. **Krasnov, E. A., Saratikov, A. S., & Iakunina, G. D. (1976).** Inokosterone and ecdysterone from *Rhaponticum carthamoides*. *Khimiia prirodnykh soedinenii*.
75. **Křížek, M., Šíma, J., (2015).** *Analytická chemie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

76. **Kumpun, S., Maria, A., Crouzet, S., Evrard-Todeschi, N., Girault, J. P., & Lafont, R. (2011).** Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa* Willd., an ancient Andean crop of high nutritional value. *Food Chemistry*, 125(4), 1226-1234.
77. **Kužel S., Cígler P., Hrubý M. (2015).** The preparation for the induction of increased formativ of bioactive compounds in plants and its use. Evropský patentový úřad. EP 1750507
78. **Kužel S., Cígler P., Hrubý M., (2006):** "Přípravek pro indukci zvýšení tvorby bioaktivních sloučenin". CZ-296300, ÚPV Praha.
79. **Kužel, S., Hruby, 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.
80. **Kužel, S., Vydra, J. A. N., Triska, J. A. N., 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.
81. **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.
82. **Kužel, S.; Kopřiva, Z.; Grbavčić M. (2002b).** Leuzea saflorová (*Rhaponticum carthamoides*) – zemědělská plodina marginálních oblastí – součást racionální výživy hospodářských zvířat. Agregion 2002: konference FYTO – trvale udržitelné hospodaření na zemědělské půdě. 43. 97-101. České Budějovice, České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.
83. **Kužel, S.; Kopřiva, Z.; Grbavčić, M.; Volek, T. (2002a).** Leuzea saflorová (*Rhaponticum carthamoides*) - alternativní rostlina pro marginální zemědělské oblasti. Agregion 2002: konference FYTO – trvale udržitelné hospodaření na zemědělské půdě. 43. 89-91. České Budějovice, České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.
84. **Lamer-Zarawska, E., Serafinowicz, W., Gasiorowski, K., & Brokos, B. (1996).** Immunomodulatory activity of polysaccharide-rich fraction from *Rhaponticum carthamoides* leaves. *Fitoterapia (Milano)*, 67(4), 371-372.
85. **Logvinov, S. V., Pugachenko, N. V., Potapov, A. V., Krasnov, E. A., Plotnikov, M. B., Maslov, M. Y., ... & Tyukavkina, N. A. (2001).** Ischemia-induced changes in synaptoarchitectonics of brain cortex and their correction with ascovertin

- and leuzea extract. Bulletin of experimental biology and medicine, 132(4), 1017-1020.
86. **Łotocka, B., & Geszprych, A. (2004).** Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 144(2), 207-233.
 87. **Matsuda, H., Kawaba, T., & Yamamoto, Y. (1970).** Pharmacological studies of insect metamorphic steroids. Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica, 66(5), 551-563.
 88. **MCMurry, John, (2007).** Organická chemie. V Brně: VUTIUM. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
 89. **Merck.** Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
 90. **Miliauskas, G., van Beek, T. A., de Waard, P., Venskutonis, R. P., & Sudhölter, E. J. (2005).** Identification of Radical Scavenging Compounds in *Rhaponticum c arthamoides* by Means of LC-DAD-SPE-NMR. Journal of Natural Products, 68(2), 168-172.
 91. **Minamimoto, R., Hamabe, Y., Miyaoka, T., Hara, T., Yoshida, K., Oka, T., & Inoue, T. (2008).** Guidance for industry, estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers Guidance for industry, estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, 2005. Annals of nuclear medicine, 22(10), 883-889.
 92. **Mirzaev, I., Syrov, V. N., Khrushev, S. A., & Iskanderova, S. D. (2000).** Effect of ecdystene on parameters of the sexual function under experimental and clinical conditions. Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija, 63(4), 35-37.
 93. **Myers, R. L. (2007).** The 100 most important chemical compounds: a reference guide. ABC-CLIO.
 94. **Nadační fond PRAVDA O VODĚ.** Dostupné z: <https://pravdaovode.cz/>
 95. **Nosál, R., Perečko, T., Jančinová, V., Drábiková, K., Harmatha, J., & Sviteková, K. (2010).** Suppression of oxidative burst in human neutrophils with the naturally occurring serotonin derivative isomer from *Leuzea carthamoides*. Neuroendocrinology Letters, 31(2), 69.
 96. **Nosál, R., Perečko, T., Jančinová, V., Drábiková, K., Harmatha, J., & Sviteková, K. (2011).** Naturally appearing N-feruloylserotonin isomers suppress oxidative

- burst of human neutrophils at the protein kinase C level. *Pharmacological Reports*, 63(3), 790-798.
97. **Odinokov, V. N., Galyautdinov, I. V., Nedopekin, D. V., Khalilov, L. M., Shashkov, A. S., Kachala, V. V., ... & Lafont, R. (2002)**. Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L.(Asteraceae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(2), 161-165.
98. **Opletal, L., Sovova, M., Dittrich, M., Solich, P., Dvorak, J., Krátký, F., ... & Hofbauer, J. (1997)**. Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. 6. *Leuzea carthamoides* (WILLD.) DC: the status of research and possible use of the taxon. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolocnosti a Slovenske farmaceuticke spolocnosti*, 46(6), 247-255.
99. **Osipova, S. O., Islamova, Z., Syrov, V. N., Badalova, N. S., & Khushbaktova, Z. A. (2002)**. Ecdysten in the treatment of giardiasis. *Meditinskaja parazitologija i parazitarnye bolezni*, (1), 29-33.
100. **Pacák, J. (2010)**. Jak porozumět organické chemii. Karolinum.
101. **Pavela, R., Harmatha, J., Bárnet, M., & Vokác, K. (2005)**. Systemic effects of phytoecdysteroids on the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (Stenorrhyncha: Aphididae). *European Journal of Entomology*, 102(4), 647.
102. **Peschel, W., Kump, A., & Prieto, J. M. (2011)**. Effects of 20-hydroxyecdysone, *Leuzea carthamoides* extracts, dexamethasone and their combinations on the NF- κ B activation in HeLa cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(11), 1483-1495.
103. **Piotrowska, A., & Bajguz, A. (2011)**. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry*, 72(17), 2097-2112.
104. **Píš, J., Buděšínský, M., Vokáč, K., Laudová, V., & Harmatha, J. (1994)**. Ecdysteroids from the roots of *Leuzea carthamoides*. *Phytochemistry*, 37(3), 707-711.
105. **Plotnikov, M. B., Aliev, O. I., Vasil'ev, A. S., Maslov, M., Dmitruk, S. E., & Krasnov, E. A. (2001)**. Effect of *Rhaponticum carthamoides* extract on hemorheological properties of blood in rats with arterial hypertension. *Ekspierimental'naia i kliničeskaia farmakologija*, 64(6), 45-47.
106. **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/>.

107. **Ramazanov, N. S., Maksimov, E. S., Saatov, Z., Mamatkhanov, A. U., Abdullaev, N. D., (1997a).** Phytoecdysteroids of plants of the genus *Rhaponticum* I. Carthamosterone A from *R. carthamoides*. *Chem. Nat. Compd.* 33, 301–302.
108. **Ramazanov, N. Sh., Maksimov, E. S., Saatov, Z., Abdullaev, N. D., (1997b).** Phytoecdysteroids of plants of the genus *Rhaponticum* II. Carthamosterone B from *R. carthamoides*. *Chem. Nat. Compd.* 33, 303–304.
109. **Repcak, M., Oslacka, J., & Jurcak, S. (1994).** The content of 20-hydroxyecdysone in cultivated population of *Leuzea carthamoides*. *Zahradnictvi-UZPI (Czech Republic)*.
110. **Sadykov, Z. T., Ramazanov, N. S., & Saatov, Z. (1997).** Phytoecdysteroids of plants of the genus *Rhaponticum* polypodin B 22-O-benzoate from *Rhaponticum carthamoides*. *Chemistry of natural compounds*, 33(6), 665-666.
111. **Seidlova-Wuttke, D., Ehrhardt, C., & Wuttke, W. (2010a).** Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 119(3-5), 121-126.
112. **Seidlova-Wuttke, D., Christel, D., Kapur, P., Nguyen, B. T., Jarry, H., & Wuttke, W. (2010b).** β -Ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine*, 17(11), 884-889.
113. **Selivanova, O. K. (1979).** [Biologically characteristic features and variability of morphological characters of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin cultivated in the Karelian ASSR [RSFSR-in-Europe]]. [Russian]. *Rastitel'nye Resursy*.
114. **Shabala, Sergey, (2012),** ed. *Plant stress physiology*. Wallingford: CABI. ISBN 978-1-84593-995-3.
115. **Sharaf, M., Skiba, A., Weglarz, Z., & El-Ansari, M. A. (2001).** Two flavonol 5-O-glycosides from the roots of *Leuzea carthamoides*. *Fitoterapia*, 72(8), 940-942.
116. **Skąła, E., Kowalczyk, T., Toma, M., Szemraj, J., Radek, M., Pytel, D., ... & Sitarek, P. (2018).** Induction of apoptosis in human glioma cell lines of various grades through the ROS-mediated mitochondrial pathway and caspase activation by *Rhaponticum carthamoides* transformed root extract. *Molecular and cellular biochemistry*, 445(1-2), 89-97.
117. **Sláma, K. (2019).** Vitamin D1 versus ecdysteroids: Growth effects on cell regeneration and malignant growth in insects are similar to those in humans. *European Journal of Entomology*, 116.

118. **Sláma, K., & Lafont, R. (2013).** Insect hormones-ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *EJE*, 92(1), 355-377.
119. **Sláma, K., & Santiago-Blay, J. A. (2017).** Terrestrial insects with tracheae breath by actively regulating ventilatory movements: physiological similarities to humans. *Life Excit. Biol*, 5, 4-70.
120. **Sláma, K., & Zhylitskaya, H. (2016).** Comprehensive physiology and toxicology of ecdysogens—The metabolically activated porphyrin-ecdysteroid complexes in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 181, 55-67.
121. **Soskov, Yu.D., (1978).** New nomenclature combination and series in the genus *Rhaponticum* Adans. *Novit. Syst. Pl. Vasc.* 8, 275–276 (article in Russian).
122. **Sovová, H., Opletal, L., Sajfřtová, M., & Bártlová, M. (2008).** Supercritical fluid extraction of cynaropicrin and 20-hydroxyecdysone from *Leuzea carthamoides* DC. *Journal of separation science*, 31(8), 1387-1392.
123. **Stodulka, P., Kolečkar, V., Jun, D., Kuca, K., Rehakova, Z., Kubikova, K., ... & Opletal, L. (2008).** High-performance liquid chromatography analysis of four *Leuzea carthamoides* flavonoids. *Journal of chromatographic science*, 46(2), 162-164.
124. **Stopka, P., Stancl, J., & Sláma, K. (1999).** Effect of insect hormone, 20-hydroxyecdysone on growth and reproduction in mice. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 63, 367-378.
125. **Stransky, K., Nemeč, V., & Sláma, K. (1998).** Lipid composition of the seeds of an ecdysteroid-containing plant, *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC (*Asteraceae*). *Russian journal of plant physiology*, 45(3), 333-338.
126. **Syrov, V. N. (2000).** Comparative experimental investigation of the anabolic activity of phytoecdysteroids and steranabols. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 34(4), 193-197.
127. **Syrov, V. N., & Khushbaktova, Z. A. (2005).** P. 4.042 Experimental and clinical evaluation of neurotropic effect of ecdysten. *European Neuropsychopharmacology*, (15), S195-S196.
128. **Syrov, V. N., Nabiev, A. N., & Sultanov, M. B. (1986).** Action of phytoecdysteroids on the bile-secretory function of the normal liver and in experimental hepatitis. *Farmakologija i toksikologija*, 49(3), 100-103.
129. **Školní zemědělský podnik Lány.** Dostupné z: <https://lany.czu.cz/cs/>

130. **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.
131. **Timofeev, N. P., Volodin, V. V., & Frolov, Y. M. (1998).** Distribution of 20-hydroxyecdysone in the structure of the above-ground biomass of *Rhaponiticum carthamoides* (Willd.) Iljin under conditions of agrocoenosis in Komi Republic. *Rastitel'nye Resursy*, 34, 63-68.
132. **Todorov, I. N., Mitrokhin, Y. I., Efremova, O. I., & Sidorenko, L. I. (2000a).** The effect of ecdysterone on the biosynthesis of proteins and nucleic acids in mice. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 34(9), 455-458.
133. **Todorov, I. N., Mitrokhin, Y. I., Efremova, O. I., & Sidorenko, L. I. (2000b).** Effect of extract from *Rhaponiticum carthamoides* on RNA and protein biosynthesis in mice. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 34(9), 479-481.
134. **Tóth, N., Szabó, A., Kacsala, P., Héger, J., & Zádor, E. (2008).** 20 – Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine*, 15(9), 691-698.
135. **Valíček, P., a Horák, V. (1996).** *Leuzea saflorová*, Institut tropického a subtropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita v Praze, REMEDIA 6, č. 6, str. 352-355.
136. **Varga, E., Szendrei, K., Hajdu, Z., Hornok, L., & Csaki, G. (1986).** Study of the compounds contained in hungarian-grown *Leuzea carthamoides* DC (*Asteraceae*), with special regard to the ecdysteroids. *Herb. Hung*, 25, 115-133.
137. **Verma, N., & Shukla, S. (2015).** Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
138. **Vokáč, K., Buděšínský, M., & Harmatha, J. (2002).** Minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*. *Collection of Czechoslovak chemical communications*, 67(1), 124-139.
139. **Volek T., Kužel S., Kopřiva Z. (2002).** Ekonomické zhodnocení využití *Rhaponiticum carthamoides* jako alternativní plodiny. *Agroregion 2002: konference FYTO – trvale udržitelné hospodaření na zemědělské půdě*. 43. 92-96. České Budějovice, České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.
140. **Votavová, V. (2004).** Stanovení účinných látek chromatografií na tenké vrstvě v rostlině *Echinacea purpurea*. Diplomová práce, Zemědělská fakulta Jihočeská univerzita, České Budějovice, 72 s.

141. **Vrchotová, N., Kužel, S., Tříška, J., Kolář L., Totušek, J. (2002).** Extrakce a analýza fenolických látek z třapatky nachové. *Chemické listy*, 96, 7, s. 636-639.
142. **Vytiska P. (2018).** Technologie pěstování Leuzeý saflorová (*Rhaponticum carthamoides*) a její využití. Bakalářská práce ZF JU v Č.B., 68 s.
143. **Wielanek, M., & Urbanek, H. (2006).** Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(2), 177-186.
144. **Wolf, G. (2004).** The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *The Journal of nutrition*, 134(6), 1299-1302.
145. **Wu, C., Okar, D. A., Kang, J., & Lange, A. J. (2005).** Reduction of hepatic glucose production as a therapeutic target in the treatment of diabetes. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 5(1), 51-59.
146. **Yakubova, M. R., & Sakharova, N. A. (1980).** Dinamika sodержaniya ekdis-terona v podzemnikh organakh *Rhaponticum carthamoides*. *Rastit. Resur*, 16, 98-100.
147. **Yamada, K., & Nabeshima, T. (1995).** Stress-induced behavioral responses and multiple opioid systems in the brain. *Behavioural brain research*, 67(2), 133-145.
148. **Yamamotova, A., Pometlova, M., Harmatha, J., Rašková, H., & Rokyta, R. (2007).** The selective effect of N-feruloylserotonins isolated from *Leuzea carthamoides* on nociception and anxiety in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 112(2), 368-374.
149. **Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005).** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.
150. **Абрамова, Л. М., Каримова, О. А., Вафин, Р. В., & Миронова, Л. Н. (2016).** Редкие виды Урала и поволжья в коллекциях Ботанического сада города Уфы. *Фиторазнообразие Восточной Европы*, 10(3).
151. **Абрамчук, А. В., Мингалев, С. К., & Карпухин, М. Ю. (2019).** Перспективы возделывания иммуностимулирующих растений на Среднем Урале. *Аграрный вестник Урала*, (8 (187)).
152. **Абышева, Л. Н., Беленовская, Л. М., Бобылева, Н. С., Быкова, О. П., Кондратенкова, Т. Д., Маркова, Л. П., ... & Уличева, Г. М. (2001).** Дикорастущие полезные растения России.

153. Буданцева, А. (2013). Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. СПб.; М., Т. 5, ч. 2. 314 с.
154. Елисафенко, Т. В. (2009). Оценка результатов интродукционной работы на примере редких видов сибирской флоры. Растительный мир азиатской России, (2), 89-95.
155. Золотухин, Н. И. (2016). Растения из Красной книги России в лесостепной долине реки Чулышман (Восточный Алтай) по материалам Алтайского и Центрально-Черноземного заповедников.
156. Кубан, И. Н., Дорогина, О. В., & Жмудь, Е. В. (2018). СОСТОЯНИЕ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ РЕДКОГО ВИДА *Rhaponticum Carthamoides* (Asteraceae) В РЕСПУБЛИКЕ АЛТАЙ. Растительный мир Азиатской России, (3), 66-76.
157. Кубан, И. Н., Дорогина, О. В., & Жмудь, Е. В. (2018). СОСТОЯНИЕ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ РЕДКОГО ВИДА *Rhaponticum Carthamoides* (Asteraceae) В РЕСПУБЛИКЕ АЛТАЙ. Растительный мир Азиатской России, (3), 66-76.
158. Лащинский, Н. Н., Королюк, А. Ю., Лащинская, Н. В., & Королюк, Е. А. (2010). Находки редких и заносных видов сосудистых растений в Омской, Новосибирской и Тюменской областях и Алтайском крае. Turczaninowia, 13(1).
159. Левзея сафлоровидная. Dostupné z: <https://leuzea.ru/index.htm#glav>.
160. Монгуш К.Ч.-Д., Монгуш А.К., (2012). Растения Республики Тыва, применяемые в восточной народной медицине. 1–2 части. Кызыл. 128 с.
161. Павлова Н. В. / Флора Казахстана – Алматы: АН КазССР, (1966). – Т. 9. – С. 654.
162. Положий, А. В., & Суров, Ю. П. (1972). Ареалы, фитоценотическая приуроченность и прогнозы запасов левзеи сафлоровидной и родиолы розовой в Южной Сибири. Ресурсы дикорастущих лекарств. растений СССР, 113-116.
163. Постников, Б. А. (1995). Маралий корень и основы введения его в культуру. Российская академия наук, Сибирское отд-ние, Центр. сибирский ботанический сад.
164. Сосков, Ю. Д. (1959). Некоторые биологические особенности *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin (маральего корня). Ботанический журнал, 44(4), 507-513.

165. **Тимофеев, Н. П. (2001).** Левзея сафлоровидная: Проблемы интродукции и перспективы использования в качестве биологически активных добавок. Сб. науч. трудов. Москва: РАЕН, (5), 108-134.
166. **Федеральный закон, (2009).** от 22 июня 1998 г. № 86-ФЗ «О лекарственных средствах» (с изменениями 30 декабря 2008 г.). М. 115 с.