

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
KATEDRA OBECNÉ PRODUKCE ROSTLINNÉ

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Provozně podnikatelský obor



Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině
Ostropestřec mariánský *Silybum marianum* (L.) Gaertn

Diplomová práce

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

Autor:
Jana Dvořáková

2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: Jana Dvořáková

Studijní program: M 4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Provozně podnikatelský obor

Název tématu: Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině
Ostropestřec mariánský *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

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

Cílem práce je studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých účinných látek v rostlině Ostropestřec mariánský *Silybum marianum* (L.) Gaertn. syn. *Carduus marianus* L., Asteraceae.

1. Proved'te literární rešerši: a) Vliv stimulatorů rostlinné imunity na obsah účinných látek; b) Botanická charakteristika, způsob pěstování, agrotechnika, hnojení – Ostropestřec mariánský; c) Chemické složení a účinné látky rostliny Ostropestřec mariánský.
2. Popište metody ke stanovení některých účinných látek v této rostlině.
3. Proved'te vybranou metodu (metody) stanovení některých účinných látek v rostlině Ostropestřec mariánský z pohledu studia působení elicitorů.
4. Vypracujte technologický návrh pro pěstování této rostliny na ploše 1 – 5 ha včetně ekonomické kalkulace.
5. Diplomovou práci vypracujte v souladu s materiálem „Obecné zásady pro vypracování diplomové práce.“

Rozsah grafických prací: dle potřeby po dohodě s vedoucím práce

Rozsah průvodní zprávy: cca 50 stran

Seznam odborné literatury:

Jegorov A. (1996): Flavonolignany – novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem. Chem. listy 90, 859-862

Slanina J. (2000): Biologická a farmakologická aktivita lignanů. Chem. listy 94, 111-116

Kurkin V. et al. (2001): Flavolignans of *Silybum marianum* Fruit. Chemistry of natural compounds 37: (4), 318-321

Hammouda F.M. et al. (1993): Evaluation of the silymarin content in *Silybum marianum*(L) Gaertn. Cultivated under different agricultural conditions. Phytoterapy research 7:(1) 90-91

Bondarenko L. T., Kiryanov A. A., Perelson M. E. (1980): Chromatospectrophotometric method for quantitative determination of Silybin in *Silybum marianum* Fruit. Khimiko-farmatsevticheski Zhurnal 14: (4), 57-60


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


Konzultant: Martin Grbavčic, SEVA Flora Valtice s.r.o.

Datum zadání diplomové práce: 8. 3. 2004

Termín odevzdání diplomové práce: 30. 4. 2006

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


prof. Ing. Rostislav Ledvina, CSc.
Vedoucí katedry


doc. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.
Děkan

V Českých Budějovicích dne 8. 3.

2004

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině Ostropestřec mariánský Silybum marianum (L.) Gaertn* vypracovala samostatně, pod vedením Prof. Ing. Stanislava Kužela, CSc. a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

České Budějovice, duben 2006

Dvořáková

Poděkování:

Děkuji vedoucímu diplomové práce panu Prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc. za metodické vedení a všestrannou pomoc při zpracovávání zadaného úkolu této práce. Rovněž děkuji panu Martinu Grbavčicovi a společnosti Seva Flora Valtice s.r.o., za poskytnutí části pěstební plochy ostropestřce mariánského k poloprovoznímu experimentu, vytvořené pokusné podmínky a veškeré odborné konzultace. Mé poděkování současně náleží paní Ing. Tamaře Pelikánové a panu Doc. Ing. Jiřímu Špičkoví, CSc. za trpělivou pomoc a cenné rady při stanovování a vyhodnocování obsahu účinných látek v semenech rostliny.

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1.	VYSVĚTLENÍ ZÁKLADNÍCH POJMŮ	3
2.1.1.	Stres	3
2.1.2.	Stresory	4
2.1.3.	Průběh stresové reakce	4
2.1.4.	Stimulátory	5
2.1.5.	Elicitory a rostlinná imunita	5
2.1.6.	Abiotické stresory	6
2.1.7.	Biotické stresory	7
2.1.7.1.	<i>Živé organismy jako biotické stresory</i>	7
2.1.7.2.	<i>Organické látky jako biotické stresory</i>	8
2.1.8.	Kyselina acetylsalicylová jako elicitor	9
2.1.9.	Kyselina acetylsalicylová – původ, popis a využití	10
2.2.	OSTROPESTŘEC MARIÁNSKÝ – POPIS ROSTLINY	11
2.2.1.	Původ rostliny	11
2.2.2.	Botanická charakteristika rostliny	12
2.2.3.	Pěstování rostliny	13
2.2.3.1.	<i>Půdní a klimatické nároky</i>	13
2.2.3.2.	<i>Zařazení v osevním postupu</i>	14
2.2.3.3.	<i>Výživa a hnojení</i>	14
2.2.3.4.	<i>Předseřová příprava půdy, osivo a setí</i>	16
2.2.3.5.	<i>Kultivace během vegetace</i>	18
2.2.3.6.	<i>Ochrana proti chorobám a škůdcům</i>	18
2.2.3.7.	<i>Sklizení</i>	19
2.2.3.8.	<i>Současná situace na trhu</i>	21
2.3.	CHEMICKÉ SLOŽENÍ A ÚČINNÉ LÁTKY ROSTLINY	22
2.3.1.	Obecná charakteristika lignanů	22
2.3.2.	Struktura flavanolignanů a další obsahové látky ostropestřce	22
2.3.3.	Chemické složení a obsah účinných látek kultivaru Silyb	25
2.4.	FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY A VYUŽÍVÁNÍ OSTROPESTŘCE MARIÁNSKÉHO	27

2.5.	METODY STANOVENÍ NĚKTERÝCH ÚČINNÝCH LÁTEK V ROSTLINĚ	29
2.5.1.	Chromatografické metody.....	29
2.5.1.1.	<i>Vysokotlaká kolonová kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	<i>30</i>
2.5.1.2.	<i>Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)</i>	<i>33</i>
2.5.1.3.	<i>Porovnání užití metody HPLC a TLC při analýze ostropestřce</i>	<i>35</i>
2.5.2.	Kapilární elektroforéza.....	37
2.5.2.1.	<i>Kapilární zónová elektroforéza.....</i>	<i>37</i>
2.5.2.2.	<i>Porovnání užití metody HPLC a CZE při analýze ostropestřce</i>	<i>39</i>
3.	METODIKA – VLASTNÍ POKUS.....	40
3.1.	POLOPROVOZNÍ EXPERIMENT	41
3.2.	MALOPARCELKOVÝ EXPERIMENT	41
3.2.1.	Maloparcelkový experiment realizovaný v roce 2004.....	43
3.2.2.	Maloparcelkový experiment realizovaný v roce 2005	44
3.3.	PŘÍPRAVA EXTRAKTU	46
3.4.	ANALÝZA VZORKŮ.....	46
4.	VÝSLEDKY.....	47
4.1.	VÝSLEDNÝ OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK.....	47
4.1.1.	Poloprovozní experiment – 2004	47
4.1.2.	Maloparcelkový experiment - 2004	49
4.1.2.	Maloparcelkový experiment - 2005	52
4.1.3.	Zhodnocení výnosových prvků maloparcelkových experimentů	55
4.2.	TECHNOLOGICKÝ NÁVRH PĚSTOVÁNÍ OSTROPESTRČE MARIÁNSKÉHO.....	56
4.2.1.	Výběr pozemku a příprava půdy na podzim	56
4.2.2.	Jarní příprava půdy, aplikace hnojiv, ochrana proti plevelům	57
4.2.3.	Setí.....	57
4.2.4.	Ošetřování porostu během vegetace.....	58
4.2.5.	Sklizeň.....	59
4.3.	EKONOMICKÉ ZHODNOCENÍ NAVRHOVANÉ TECHNOLOGIE.....	60
4.3.1.	Současná dotační politika podporující pěstování léčivých rostlin	61
4.3.2.	Ekonomické kalkulace navrhovaných technologií pěstování	63
4.3.2.1.	<i>Intenzivní způsob pěstování.....</i>	<i>63</i>
4.3.2.2.	<i>Extenzivní způsob pěstování.....</i>	<i>65</i>

5.	DISKUSE	68
6.	ZÁVĚR.....	71
7.	POUŽITÁ LITERATURA.....	73
8.	SUMMARY	
9.	PŘÍLOHY	

1. ÚVOD

Vlivem negativních účinků zhoršeného životního prostředí a nevhodného životního stylu se lidé z moderního světa stále častěji obracují k užívání produktů z rostlin. Celosvětový nárůst zájmu v posledních letech zaznamenávají především léčivé rostliny, a to jak ze strany spotřebitelů, tak ze strany pěstitelů. Příčinami jsou nejen nové vědecké poznatky a využití léčivých rostlin v nejrůznějších odvětvích, ale i návrat k tradičním hodnotám zemědělství, potravinářství, medicíny i farmacie, produkci látek, extraktů a bioproduktů. V současnosti se z léčivých rostlin vyrábí asi 65 % léčiv a léků. Také společná zemědělská politika EU směřuje k alternativnímu zemědělství a trvale udržitelnému rozvoji venkova, podporuje mimoprodukční funkce zemědělství, a tak poskytuje prostor právě pro pěstování léčivých rostlin.

Celosvětově je popsáno 15 000 druhů rostlin s léčivými účinky, pocházejících z velkoplošného či maloplošného pěstování a ze sběru ve volné přírodě. V EU se užívá asi 2 000 druhů, z toho v ČR se uvádí využití přibližně 300 druhů. Největší podíl na celkové produkci představují právě velkoplošně pěstované druhy, které mají zvláštní postavení především v návaznosti na odběratele a zpracování. Zpracovatel vyžaduje zajistit potřebné množství hmoty s maximální výtěžností žádoucích látek, o které se medicína a farmacie vyspělých zemí eminentně zajímá. Z pohledu zemědělce je nutné při pěstování takovéto plodiny docílit nejen odběratelem požadované kvality suroviny, ale současně dosáhnout dostatečné efektivity výroby.

Jednou z léčivých rostlin, která v současné době zaznamenává rychlý rozvoj pěstování, je i ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.). Důvodem je zájem vnitřního i zahraničního farmaceutického průmyslu o drogu, v tomto případě plody – *Fructus cardui mariae*, obsahující účinné látky ze skupiny flavolignanů, tzv. silymarinový komplex. Terapeutické využití těchto látek je známo již od dob antické medicíny. Mechanismus účinku spočívá v hepatoprotektivním vlivu silymarinového komplexu na jaterní buňky. Indikační oblast tak zahrnuje choroby jater a žlučníku, obecně všechny stavy, kdy došlo k poškození jaterních buněk. Nejenom že chrání každou buňku jater od toxinů, ale zároveň s tím podporuje samočištění jater od škodlivých látek, jako je alkohol, drogy, léky, rtuť a těžké kovy, pesticidy a dokonce většina otrav houbami. Rovněž jsou prokázány blahodárné účinky při léčbě některých druhů rakoviny.

Protože jde o choroby nyní značně rozšířené a často také obtížně terapeuticky zvládnutelné, je každý nový preparát proti těmto chorobám nejen důležitý, nýbrž i ekonomicky zajímavý pro

výrobce. Silymarinový komplex je součástí účinných látek některých hromadně vyráběných léčivých přípravků, například německého léčiva Legalon, švýcarského léčiva Simepar a také Flavobionu české provenience.

Jako každá surovina, tedy i nažky ostropestřce musí být dostupné v potřebném množství a kvalitě. Kvalitou v daném případě rozumíme obsah a složení účinných látek, vyhovující zájmům farmaceutického průmyslu. S rozvojem poznání analytických metod a současnými možnostmi využívání laboratorního přístrojového vybavení a techniky se v posledních letech výrazně urychlil a zdokonalil výzkum metabolických pochodů v rostlinách a prohloubilo se tak i celkové poznání na tomto úseku. Do provozní praxe jsou v resortu zemědělství zaváděny i nové netradiční formy pěstebních zásahů a postupů umožňující ovlivňování nejen růstu a vývinu rostlin, ale i jejich kvalitativní hodnoty jako např. specifickou aktivitu vybraných žádoucích metabolitů v rostlinné hmotě a podobně.

Cíl práce

Cílem této práce bylo připravit extrakty účinných látek z vypěstovaných rostlin ostropestřce mariánského, ošetřených různými elicitory, a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovit obsah účinných látek silymarinového komplexu a vyhodnotit vliv elicatorů na tento obsah. Dílčím cílem práce bylo navrhnout technologii pěstování ostropestřce mariánského na ploše 1 - 5 hektarů včetně ekonomického zhodnocení návrhu technologie.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Vysvětlení základních pojmů

2.1.1. Stres

Stres je slovo, které se v současné době skloňuje ve všech pádech a v obecném povědomí se týká hlavně člověka a živočichů. Stres však postihuje také rostliny a téma „rostlina a stres“ je předmětem seriózního vědeckého bádání. V současnosti je stres u rostlin zkoumán z různých hledisek, od velkých ekosystémů až po biologické regulace rostliny na molekulární úrovni (BLÁHA, *et al.*, 2003).

Zakladatelem nauky o stresu je maďarsko-německo-kanadský fyziolog Hans Seley. Jeho původní definice, ještě z doby těsně před druhou světovou válkou, zní: „Stres je nespecifická (tj. nastávající po různých zátěžích stereotypně) fyziologická reakce na jakýkoli nárok na organismus kladený.“ Slovo nárok zde má v sobě složku nadměrnosti, a tak učitel českých endokrinologů, Josef Charvát, zavedl pojem zátěž. Mluvíme tedy o reakcích zátěžových nebo stresových (KOPŘIVA, 2002).

Postupem času byla tato definice různými autory mnohokrát obměňována a zpřesňována. Například BLÁHA, *et al.* (2003) definují stres rostliny jako stav, navozený nepříznivými faktory prostředí, přesahující jejich běžnou úroveň a které u rostliny vyvolají tzv. „poplachovou“ odpověď jako reakci na stávající podmínky.

PULKRÁBEK, *et al.* (2005) ve svém článku označují pod pojmem stres odchylky od optima vyvolávající napětí, neboli zátěž vznikající v důsledku nadměrného působení faktorů prostředí nad úroveň, která přesahuje fylogeneticky zakódované požadavky rostliny.

V neposlední řadě jsou KOVALČIK a KOVALČIKOVÁ (1974) zastánci toho, že: „Pojmem stres rozumíme stav, ve kterém se nachází živý systém při mobilizování obranných nebo nápravných zařízení, kterými odpovídá na nespecifické stimuly z prostředí. Příčina, která stres vyvolala se nazývá *stresor*.“

2.1.2. Stresory

Pro jednotlivé vlivy prostředí lze s určitou opatrností stanovit meze, které nejsou pro vývoj a růst rostliny optimální a kdy jsou nutné změny vlastností rostlin pro další úspěšné rozmnožování a vývoj. Na živé organizmy však nikdy nepůsobí pouze jednotlivé faktory vnějšího prostředí, ale celý komplex vlivů, *abiotických* (fyzikálních a chemických) a *biotických* faktorů (živých organismů, člověka), které vstupují do vzájemných interakcí.

Proto není možné definovat přesně hranici, kdy se jedná jen o silný tlak komplexu negativních vnějších podmínek, vůči kterým je rostlina ještě přizpůsobena a je schopna se s nimi v průběhu vegetace vyrovnat, a od kdy již rostlina „strádá“, tj. kdy je již nutná „obránná reakce“ rostliny či dokonce změna genetické výbavy.

Negativní vnější vlivy – stresory, působí na celou rostlinu, tj. na kořeny, nadzemní část i na vyvíjející se semena. Rostliny jsou přizpůsobeny k vykonávání všech velmi důležitých životních funkcí za poměrně značného kolísání faktorů vnějšího prostředí. Při působení stresorů může rostlina dosáhnout nového rovnovážného stavu na základě činnosti kompenzačních procesů. Při nezvládnutí vlivu stresorů dojde až k uhynutí rostliny (BLÁHA, *et al.*, 2003).

2.1.3. Průběh stresové reakce

Skupina reakcí, které se spustí pod vlivem stresorů, se nazývá *stresová reakce* a probíhá ve čtyřech fázích, a to ve fázi poplachové – fázi restituční – fázi rezistence – fázi vyčerpání.

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

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

2.1.4. Stimulátory

Stimulátory jsou pro tuto práci brány v úvahu jako látky, přípravky, preparáty, případně v širším pojetí postupy at' biologické, fyzikální či chemické a jiné, které mají schopnost ovlivňovat přímo, anebo nepřímo růst či vývin (resp. vývoj) rostlin, případně v tkáních v nadzemní hmotě, anebo podzemní hmotě rostlin více, nebo méně obsah žádoucích ale i nežádoucích metabolitů. Tyto metabolity obsahují velké množství látek, z nichž některé jsou zároveň látkami účinnými. V tomto případě lze stimulátory nazvat i pojmem stresory, protože tlak působící na rostlinu vede k obranným reakcím s následným utvářením sekundárních metabolitů (*ústní sdělení vedoucího práce*).

2.1.5. Elicitory a rostlinná imunita

V odborné literatuře a metodikách, které se zabývají využíváním stimulatorů – stresorů je tato problematika označována jako tzv. *metoda elicítace*, která se začala používat teprve nedávno a souvisí s rozvojem kultivace rostlin *in vitro*.

Jak uvedli *DICOSMO* a *MISAWA (1985)*, jedná se o metodu, která využívá schopnosti rostlin reagovat na různá infekční agens celou řadou reakcí, na jejichž konci nastává zvýšená tvorba sekundárních metabolitů, které představují důležité suroviny pro farmaceutický průmysl. Rostlinné buňky jsou schopny se bránit stresovým faktorům vnějšího prostředí. Při stresu dochází k uvolňování látek z buněčných stěn rostlin a následně k vytvoření nízkomolekulárních látek (fytoalexinů), představujících obrannou reakci rostliny. Sekundární metabolity se tedy mohou tvořit v rostlině jako součást reakce obranného mechanismu na přítomnost patogenu. Fytoalexiny představují jednu z možností iniciace genové aktivity za vzniku určitých enzymů, které katalyzují vytváření antimikrobiálně působících sekundárních metabolitů. Patří sem například flavonoidy, isoflavonoidy, terpeny, steroidy, stilbeny a další.

Elicitory užití při kultivaci rostlin *in vitro* ve farmaceutickém průmyslu nebo i na menších zemědělských plochách mohou být organického i anorganického původu. Optimální koncentraci stejného elicitoru u různých kultur *in vitro* v případě jeho pozitivního působení nelze zevšeobecnit a je specifická, mimo jiné pro tu kterou kulturu a dobu elicítace. Účinnost elicítace záleží na mnoha faktorech, které často působí synergicky, jako jsou stáří kultury, koncentrace elicitoru a v jakých časových periodách byl elicitor podáván. Velice důležitou podmínkou je, aby

elicitor nesnižoval životaschopnost kultury, proto se obecně užívají nižší koncentrace elicitorů (PEXÍDR, 2004).

BLÁHA, *et al.* (2003), kteří mimo jiné označují elicitor jako látku, která se vytváří po proniknutí patogena do organismu rostliny a spouští obrannou reakci rostliny, rozděluje elicitory ve své práci do dvou skupin, a to na exogenní elicitory a endogenní elicitory. Exogenní elicitory vznikají činností patogena a jedná se o jeho metabolity. Z chemického hlediska do této skupiny řadíme např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy. Endogenní elicitory se uvolňují z narušovaných buněčných stěn organismů. Mezi ně patří oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky.

2.1.6. Abiotické stresory

V širším pojetí působí jako abiotický stresor průběh počasí, nadmořská výška, emisní a imisní stav, půdní zásobenost vláhou či živinami, případně i světelné podmínky a mnoho dalších faktorů podílejících se na růstu rostlin. Z abiotických stresorů se pro experimenty velmi často využívá látek chemicky čistých prvků, anebo jejich jednoduchých sloučenin obvykle aplikovaných ve vodném roztoku o velmi nízké koncentraci.

V uvedeném pokusu byl sledován vliv abiotického elicitoru chloridu chromitého na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis L.* po 12; 24; 48; 72 a 168 hodinové aplikaci. Testovaný elicitor ovlivňoval pozitivně tvorbu flavonoidů. Statisticky významný nárůst produkce flavonoidů u kalusové kultury byl zaznamenán při použití roztoku chloridu chromitého v koncentraci c1 po 24; 48; 72 a 168 hodinách, u koncentrace c2 po 24; 48 a 72 hodinách a u koncentrace c3 po 12; 24 a 48 hodinách. U suspenzní kultury statisticky významně zvyšovaly produkci flavonoidů koncentrace c1 po 12 a 72 hodinách, koncentrace c2 po 12; 24; 48 a 72 hodinách a koncentrace c3 po 12; 24; 48 a 72 hodinách. Maximální zvýšení tvorby flavonoidů o 98 % nastalo v kalusové kultuře po elicitaci roztokem chloridu chromitého v koncentraci c3 po 48 hodinách aplikace a v suspenzní kultuře po elicitaci CrCl_3 o koncentraci c2 po 12 hodinách o 100 % (PEXÍDR, 2004).

2.1.7. Biotické stresory

V odborné literatuře jsou některými autory do biotických stresorů zahrnovány pouze živé organismy včetně člověka, avšak jinou skupinou autorů jsou mezi biotické stresory řazeny rovněž i sloučeniny organických látek.

2.1.7.1. Živé organismy jako biotické stresory

V rámci této skupiny *HNILÍČKA, et al. (2003)* uvádí, že se jedná o živé organismy, které obývají určité životní prostředí a vstupují do různých vztahů s ostatními organismy a prostředím. Ovlivňují se v rámci jednoho druhu i mezidruhově a svými životními aktivitami mění i neživé prostředí, které osidlují. Mezi biotické stresory je možné zařadit patogenní mikroorganismy, jako jsou např. viry, bakterie a jiné mikroorganismy, houby, dále hmyzí a živočišné škůdce, ale také rostliny. K elicitaci se pak využívá homogenátu mikroorganismů a až na výjimky charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* je nízká produkce sekundárních metabolitů těmito kulturami. Jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšení produkce přírodních látek v kulturách *in vitro*, je elicitace buněčných kultur.

K působení živých organismů se vztahuje pokus, který prováděli *MARINELLI, et al. (1994)*, v němž se hlouběji zabývali elicitací s využitím homogenátu z usmrcených buněk z *Escherichia coli* a *Aspergillus terreus* na produkci flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis L.* a zjistili, že uvedené elicitory zvyšovaly akumulaci flavonoidů zejména po 24 hod nebo po 48 hod elicitace. Při použití elicitoru - usmrcených buněk *Pseudomonas aeruginosa* v koncentraci I (1 g buněčného materiálu byl dán do 100 ml odměrné baňky, která byla po značku doplněna destilovanou vodou) u kalusové kultury došlo po 24 hod ke snížení obsahu flavonoidů v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak po 48 hod nastalo zvýšení obsahu flavonoidů. Po 7 dnech elicitace obsah flavonoidů opět poklesl pod úroveň kontrolní skupiny. Po aplikaci elicitoru v koncentraci II, která se připravila tak, že byl odpipetován 1 ml suspenze o koncentraci I do 100 ml odměrné baňky a po značku doplněn destilovanou vodou, byl v kalusové kultuře po 24 hod zaznamenán nižší obsah flavonoidů než v kontrolní skupině, avšak po 48 hod elicitace produkce flavonoidů převýšila kontrolní skupinu a po 7 dnech elicitace dosáhla maxima. Po aplikaci elicitoru v koncentraci III, která se připravila odpipetováním 1 ml suspenze o koncentraci II do 100 ml

odměrné baňky a doplněním destilované vody po značku byl ke kalusové kultuře po 4 hodinové elicitaci obsah flavonoidů nepatrně nižší než u kontroly, ale po 48 hodinách došlo ještě k většímu poklesu. Ani po 7 dnech elicitace nedošlo k převýšení obsahu flavonoidů získaných u kontrolní skupiny. U suspenzní kultury při použití koncentrace I došlo k výraznému nárůstu obsahu flavonoidů po 48 hodinách. Ostatní hodnoty obsahu flavonoidů byly nižší než u kontrolních skupin. Koncentrace elicitoru II způsobila postupné snižování produkce flavonoidů v suspenzní kultuře. Produkce flavonoidů zjištěná po 24 hod elicitaci byla sice nejvyšší, ale statisticky nevýznamná v porovnání s kontrolou. Pouze nejnižší testovaná koncentrace elicitoru III dokázala převýšit obsah flavonoidů nad úroveň kontrolních skupin, a to ve všech časových intervalech. Nejvyšší obsah flavonoidů byl naměřen po 7 dnech elicitace. Při hodnocení všech dosažených výsledků lze říci, že u kalusových kultur vyvolal maximální produkci elicitor o koncentraci II po 7 dnech elicitace. Tato hodnota byla vyšší o 83 % vzhledem ke kontrole.

2.1.7.2. Organické látky jako biotické stresory

Druhou významnou skupinou bioelicitorů jsou sloučeniny na bázi organických sloučenin. Neustále jsou vyhledávány a vyvíjeny nové a nové organické látky, které jsou experimentálně zkoušeny jako elicitory při elicitaci testovaných kultur pěstovaných *in vitro* nebo *in vivo*.

Jeden z experimentů se zabýval využitím kyseliny linolové. Při hodnocení produkce flavonoidů v čase během elicitace kyselinou linolovou TŮMOVÁ a DUŠEK (2000) zjistili, že u většiny pokusných koncentrací je obsah flavonoidů nejvyšší 24 hod po aplikaci elicitoru a poté klesá (u koncentrací 0,01; 0,10; 0,20; a 1,0 mg/ml). U koncentrací 0,02 a 2,0 mg/ml je maximální produkce po 48 hodinové elicitaci. Při porovnávání dosažených hodnot v závislosti na koncentraci elicitoru byl nejvyšší obsah flavonoidů zaznamenán v kultuře vystavené působení kyseliny linolové o koncentraci 2,0 mg/ml a 1,0 mg/ml. Významný byl nárůst obsahu flavonoidů také u koncentrací 0,01 a 0,20 mg/ml. Nevýznamný nárůst produkce flavonoidů byl zjištěn při působení koncentrace 0,02 mg/ml za 24 a 48 hodin a u koncentrace 2,0 mg/ml po 24 hodinách. Při srovnání produkce flavonoidů u elicitovaných kultur s kontrolními konstatovali, že elicitované kultury vykazovaly vyšší obsah flavonoidů zejména po 24 hodinách při koncentraci 0,01; 0,20 a 1,0 mg/ml. Po 48 hod pak byla produkce vůči kontrolním vzorkům většinou nižší s

výjimkou koncentrace 1,0 a 2,0 mg/ml. Po 7 dnech působením kyseliny linolové měly všechny kontrolní kultury vyšší obsah flavonoidů než kultury elicitované. Nejvyšší nárůst tvorby flavonoidů byl zaznamenán při použití elicitoru o koncentraci 2,0 mg/ml a o době působení 48 hod a to o 118 %. Při 24 hodinovém působení elicitoru o koncentraci 1,0 mg/ml došlo ke zvýšení produkce flavonoidů o 94 %. Je zřejmé, že po dosažení maximální produkce flavonoidů dochází už jen ke snižování jejich obsahu, což je pravděpodobně způsobeno jejich metabolizací. Na odbourávání se nejspíše podílí i elicitor (*PEXÍDR, 2004*).

2.1.8. Kyselina acetylsalicylová jako elicitor

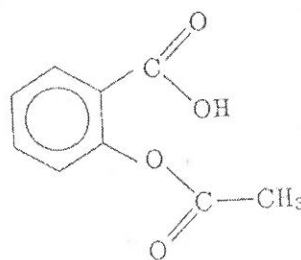
Velký zájem vědeckých pracovišť se v posledních letech soustředil na využívání elicitoru kyseliny acetylsalicylové (ASA) u hospodářsky významných plodin. Například *BERGMANN, et al. (1994)* experimentálně ověřovali aplikaci ASA ve vodném roztoku (0,2 - 2 mg/rostlina nebo 1-2 kg/ha) na rostliny (ječmen, brambory, cukrovky), kdy se významně zvýšil výnos a efektivita využití vody (například v ječmenu až 20 % a v cukrovce 10 %). Účinek aplikace ASA byl porovnatelný s 6ti-ošetřeními phytohormonem kyselinou abscisovou (ABA). V nestresových podmínkách se ASA chovala jako antitranspirant a zvyšovala osmotický tlak (n). Nicméně po následujícím suchém období byla v ošetřených rostlinách zvýšená hodnota (n) menší než v rostlinách neošetřených (50%).

Účinek acetylsalicylové kyseliny, tentokrát na sekundární metabolismus suspenzní kultury *Catharanthus roseus*, zjišťovali také *GODOY-HERNÁNDEZ* a *LOYOLO-VARGAS (1997)*, kdy přidávkem různých koncentrací (0,5 - 20 mM) acetylsalicylové kyseliny do zmíněné kultury zjistili zvýšení celkových alkaloidů o 505 %, 1 587 % fenolických látek, 612 % furanokumarinu a 1476 % anthokyaninu. Dosaženými výsledky naznačili, že acetylsalicylová kyselina může působit jako nový elicitor na tvorbu metabolitů v buněčné kultuře *Catharanthus roseus*.

2.1.9. Kyselina acetylsalicylová – původ, popis a využití

Kyselina acetylsalicylová (ASA) byla u této práce největší měrou využita k foliární aplikaci, za účelem ověření účinku stimulatoru rostlinné imunity, ve formě vodného roztoku ve 3 různých koncentracích.

Jedná se o 2-acetoxybenzoovou kyselinu ($C_9H_8O_4$, $M_r=180,160$), viz obrázek 1 (PEXÍDR., 2004).



Obr. 1 - Kyselina acetylsalicylová

Podle historických záznamů už Hippocrates předepisoval svým pacientům kůru a listy z vrby (Salix) ke zmírnění bolesti a horečky. Účinek byl připisován příbuzné látce - salicinu, na který je vrba bohatá.

První syntéza ASA byla uskutečněna v roce 1879 a přestože od jejího prvního léčebného použití uplynulo více jak 100 let, je i nadále tato látka předmětem zájmu medicínální praxe a výzkumu. Stabilní formu ASA syntetizoval německý chemik Felix Hoffmann u Bayerů v Leverkusenu. Později byla účinná látka nazvána aspirinem spojením "a" jako zkratky acetyl, dále částice "spir" ze slova spirea, tj. jména rostliny, která byla zdrojem salicinu a nový název léku dostal koncovku "in", po léta pro medikamenty oblíbenou. Acetylsalicylová kyselina se neuzívá pouze pro zmírnění bolesti či horečky, ale také jako prevence tvorby krevních sraženin - prevence ucpaní tepen, tj. tedy i proti vzniku infarktu myokardu (snížení agregability destiček) nebo mozkové mrtvice jak uvádí ve své práci PEXÍDR (2004).

Pro tuto práci byla použita k experimentálnímu ověření laboratorně připravená čistá kyselina acetylsalicylová rozpuštěná ve vodném roztoku ve stanovených koncentracích označovaných v postříkové jíše vodného roztoku ASA jako dávka nízká, střední a vysoká.

2.2. Ostropestřec mariánský – popis rostliny

2.2.1. Původ rostliny

Ostropestřec mariánský – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L., Asteraceae) patří mezi nejdéle známé léčivé rostliny. Pravděpodobně poprvé je popisován již ve spisech Theophrasta (4.st.p.n.l.) pod názvem „Pternix“. Zatímco mnohé medicínské poznatky byly zapomenuty v temnotách středověku a poté byly znovu objevovány, ostropestřec mariánský je popisován ve všech významných herbářích léčivých rostlin, např. abatyše Hildegardy z Bingenu (1098 - 1179) a dalších až do současnosti (JEGOROV, 1996).

Zprvu se používala k léčení celá rostlina, přisuzovala se jí moc všeléku. V málo přehledném souboru indikací zaujme tvrzení, že droga pomáhá od bolestí v boku, patrně způsobených nemocí jater a žlučníku. Až známý německý lékař Rademacher (1851) vyjádřil jasně, že ostropestřec účinkuje proti jaterním onemocněním a k tomu účelu doporučoval velmi slavnou a dlouho používanou tinkturu ze semen – *Tinktura Cardu mariae*. Madaus v *Lehrbuch der biologischen Heilmittel*, v učebnici léčiv biologického původu, která vyšla v Lipsku r. 1938, věnuje ostropestřci značnou pozornost. Není proto divu, že s jeho jménem spojená farmaceutická továrna byla první, která tuto léčivku zhodnotila ve hromadně vyráběném léčivém přípravku s názvem Legalon. Stejného složení je i u nás vyráběný Flavobion (STARÝ, 2000).

Bez nadsázky tedy můžeme říci, že od doby, kdy byly léčivé účinky této rostliny poprvé nalezeny až do současnosti, kdy se podařilo izolovat aktivní komponenty a objasnit alespoň částečně jejich mechanismus účinku, uplynulo již více než dva tisíce let (JEGOROV, 1996).

Předpokládá se, že rodové jméno *Silybum* vzniklo z řeckého silybon – střepec, zřejmě podle tvaru a velikosti úboru. Druhové jméno *marianum* se opírá o legendu, že bílé mramorování na listech pochází od mateřského mléka bohorodičky (STARÝ, 2000).

Ostropestřec nepatří mezi typické kulturní plodiny, není ani původním zástupcem naší domácí květeny. Původní areál sahá od Pyrenejského poloostrova přes jižní Evropu po Kavkaz a Írán, dále roste v severní Africe a na Kanárských ostrovech. Výskyt ve střední Evropě náleží již druhotnému areálu, který na sever sahá až do Anglie. Druh byl zavlečen i do Ameriky a do Austrálie (HUSÁKOVÁ a LHOTSKÁ, 1981). Někdy roste na kamenitých stráních a rumišťích divoče, v naší republice je však plevelný výskyt vzácný (KUBÍNEK, 1987).

2.2.2. Botanická charakteristika rostliny

Ostropěstřec patří do čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). V našich klimatických podmínkách je jednoletou, výjimečně dvouletou bylinou (*SPITZOVÁ, 1997*), v příznivých podmínkách ozimého charakteru, u nás však téměř vždy vymrzající (*KUBÍNEK, 1987*). Malá odolnost vůči mrazu je důvodem, proč u nás ostropěstřec nezdomeňkuje, ale jen přechodně zplaňuje. V teplých oblastech, například v asijských stepích, jihoamerických a jihoaustralských pustinách, je však obtížným plevelem, vyskytujícím se v obrovském množství (*HUSÁKOVÁ a LHOTSKÁ, 1981*).

Ostropěstřec rychle a spolehlivě klíčí, poměrně rychle roste (*STARÝ, 2000*). Vzácházení počíná 2 - 3 týdny po výsevu, v optimálních podmínkách i po 5 dnech. Do dvou měsíců po výsevu se vytvoří přízemní růžice laločnatých listů (*KUBÍNEK, 1987*). Délka tvorby a trvání fáze růžice listů má významnou roli při tvorbě a složení silymarinu (*GROMOVÁ, et al., 1993*). Přejít do generativní fáze je charakterizován tvorbou rozvětvené květonosné lodyhy, která dosahuje konečné výšky (zejména v závislosti na množství srážek) mezi 1 – 2 m, s maximy až 2,5 m (*KUBÍNEK, 1987*) a je v horní polovině bohatě větvená, pavučinatá, lesklá, v dolní polovině hustě olistěná. Listy jsou střídavé, přisedlé, tuhé, lesklé, podlouhle, laločnaté, na okraji vlnité a ostnitě zubaté se žlutými ostny (*HUSÁKOVÁ a LHOTSKÁ, 1981*), svou strukturou dobře svádějí dešťovou vodu ke kořenům (*STARÝ, 2000*). Díky výrazné ostnatosti celé rostliny bývá lidově označována jako „bodlák“. Charakteristickým znakem je bílé mramorování listů (*KUBÍNEK, 1987*). Kořenový systém je značně variabilní, zpravidla je mohutně vyvinut kulový kořen (*SPITZOVÁ, 1997*). Úbory jsou na konci většinou bezlistých stopek jednotlivé, přímé (*HUSÁKOVÁ a LHOTSKÁ, 1981*), červeno fialově kvetoucí, velké 5 až 8 cm (*SPITZOVÁ, 1997*) s lysým zákrovem a ostnitě zubatými listeny, které vybíhají v mohutné, žlábkovité, nazpět ohnuté ostny (*HUSÁKOVÁ a LHOTSKÁ, 1981*). V každém úboru je asi 190 semen, což dává z rostliny průměrně 6 350 semen při 94 % klíčivosti a přibližné hmotnosti jednoho semene 22 mg (*SINDEL, 1991*).

Zralá semena jsou nevýrazně tmavohnědě žíhaná, průměrná velikost je 6,5 x 3 mm (*SPITZOVÁ, 1997*). Barva obalů závisí na meteorologických podmínkách v období tvorby plodů, tzn. že když je chladné a deštivé počasí mnoho semen se vůbec nezbarví (*CZABAJSKA, et al., 1989*). Semena mají 1,5 cm dlouhý, bílý chmýr. Dozrávají v závislosti na termínu výsevu od července do září. Ostropěstřec je cizosprašný, hlavními opylovači jsou včela a čmelák (*SPITZOVÁ, 1997*). Samosprašení rovněž vede k vývinu plodů s podstatně sníženou

biologickou hodnotou. Na jednotlivých větvích lodyhy postupně dozrávají v úborech plody, které tvoří zároveň drogu i osivo a bývají běžně označovány jako semena (KUBÍNEK, 1987). Semena se získávají i se slupkou, neboť účinné látky se nacházejí bezprostředně pod osemením (JAROŠ, 1992). Droga má šedohnědou barvu, je bez pachu a chutná nahořkle (OPLETAL a VOLÁK, 1999). Nejvyšší obsah silymarinu je v nažkách z vrcholových úborů (GROMOVÁ, et al., 1993).

2.2.3. Pěstování rostliny

2.2.3.1. Půdní a klimatické nároky

Ostropestřec je relativně přizpůsobivý půdním podmínkám. Ve srovnání s obilninami je však na málo úrodné půdy citlivější. Nejvyšší výnosy jsou dosahovány na obecně nejkvalitnějších půdách. Velký význam má přítomnost organické hmoty, nejlépe trvalého půdního humusu se všemi jeho pozitivními vlastnostmi, neutrální půdní reakce ve spojení s dobrou zásobou vápníku a v neposlední řadě struktura půdy vytvářející příznivý vzdušný tepelný a vláhový režim. Na lehkých půdách ostropestřec v suchých letech trpí nedostatkem vláhy a je náchylnější k napadení půdními houbami z rodu *Fusarium*. Odchylka od optima směrem k těžkým půdám je zde přípustná, nesmějí se však přemokřovat a být utužené. Zcela nevhodné jsou půdy mělké, výrazně písčité, štěrkovité, silně kyselé. Při výběru pozemku je třeba se vyhnout výsušným jižním svahům.

Z hlediska podnebí lze ostropestřec úspěšně pěstovat v širokých klimatických podmínkách naší republiky (KUBÍNEK, 1987), je to rostlina značně plastická. Obecně nejvyšších výnosů je dosahováno na kvalitní půdě v klimatických podmínkách blízkých areálů původního rozšíření. Těm zhruba odpovídají podmínky řepařského výrobního typu (SPITZOVÁ, 1997).

Vegetační doba od výsevu po sklizeň činí obvykle asi 4 měsíce - od poloviny dubna do poloviny srpna. V chladných a deštivých letech, zvláště ve vyšších polohách, se sklizeň posouvá až na září. Výhodou teplých nížin je kratší vegetační doba, větší jistota dozrání za příznivých podmínek pro sklizeň. Výnosy zde bývají vyšší – pokud srážky přijdou včas a v dostatečné míře. Tzv. kritickým obdobím je fáze intenzivního růstu při přechodu k tvorbě květonosné lodyhy. Prudký nárůst biomasy vyžaduje hodně vody. Nejvyšších výnosů dosahují porosty, jejichž průměrná výška se blíží 2 m (KUBÍNEK, 1987).

2.2.3.2. Zařazení v osevním postupu

Otázka předplodiny nebyla dosud u ostropestřce ve větší míře specificky zkoumána. Předpokládá se, že na předplodinu není zvlášť náročný (KUBÍNEK, 1987). Lze doporučit předplodiny obecně zlepšující, jako jsou jeteloviny apod. Nejsou však rozhodující podmínkou úspěchu. V praxi je většinou využíváno zařazení po obilovině (SPITZOVÁ, 1997).

GROMOVÁ, *et al.* (1993) na základě svých pokusů navrhuje pro ostropestřec určený pro postupný ruční sběr jako předplodinu hnojené okopaniny a zeleniny. Pro mechanizovaný přímý sběr je vhodná ozimá pšenice, koriandr případně nehnojené zeleniny, např. cibule.

Zařazování ostropestřce po sobě více let na jednom pozemku se v praxi sice dělá, důvodem je obava ze zaplevelení následné plodiny ostropestřcem, je však lépe se tomu vyhnout, neboť lze předpokládat negativní vliv na výnos. Hluboko v půdě semena neklíčí a nevymrzají, takže na pozemku, kde byl jednou pěstován, se ostropestřec jako plevel objevuje i po mnoho let. V osevním postupu je ostropestřec považován za zlepšující plodinu, zvláště byl-li organicky hnojen. Po sklizni se do půdy dostane velké množství organické hmoty (KUBÍNEK, 1987).

2.2.3.3. Výživa a hnojení

V názorech na výživu dospívají autoři k odlišným závěrům. SPITZOVÁ (1997) se domnívá, že vzhledem k velkému nárůstu nadzemní hmoty vyžaduje ostropestřec značné množství živin. Optimální je půda ve staré půdní síle, se zásobeností živin dle rozborů AZP dobrou, popřípadě vysokou.

Experimentální výsledky potvrzují, že množství srážek během kritického období má mnohem větší vliv na výnos plodů ostropestřce než běžné půdní podmínky a hnojení. Hnojení ostropestřce má tedy svůj důležitý význam, který se však ne vždy musí výrazně projevit zvýšením výnosu (KUBÍNEK, 1987).

Hmotnost sušiny nadzemní části stoupá až do fáze kvetení, kdy hodnota sušiny na jednu rostlinu dosahuje maxima. Tehdy je i nejvyšší odběr veškerých makroživin. Porost dosahuje optimální hodnoty listové pokrývnosti ve fázi plného květu. Poté fotosyntetická aktivita listů postupně klesá, začínají převládat katabolické pochody. Z listů se přesouvají rezervní látky do mladších orgánů rostliny, listy začínají stárnout. S dozráváním se sušina snižuje. V této fázi

rostlina odčerpá okolo 93 kg N.ha⁻¹, semeno 42,9 kg N. Fosforu rostlina odčerpá 9,6 kg, semeno 11,4 kg, draslíku semeno odčerpá 12,2 kg, rostlina až 200 kg (*GROMOVÁ, et al., 1993*).

Diferencované hnojení fosforem, draslíkem a hořčíkem slouží nejen pro optimální výživu plodin, ale i k zvýšení obsahu živin v půdách těmito živinami málo zásobených. Těmito živinami nehnojíme rostlinu, ale usiluje se o vytvoření trvalé optimální hladiny živin v půdě.

Dle literatury lze doporučit dávky N v rozmezí 60 – 90 kg.ha⁻¹ s ohledem na ekologické a půdně klimatické podmínky a zařazení v osevním postupu. Nejčastější zařazení v osevním postupu bývá v třetí a čtvrté trati po organicky hojené plodině. V tomto případě bude dávka N vyšší. Dusíkatá hnojiva se aplikují na jaře ve spojení s předset'ovou přípravou půdy. Podobně tak se používá dusík v kombinovaných hnojivech. Jedna polovina až dvě třetiny N se zapraví do půdy před výsevem, zbytek ve fázi 6 – 8 pravých listů. V teplých a suchých oblastech se zapraví celková dávka dusíku před výsevem. Pro základní hnojení vyhovují všechna dostupná dusíkatá hnojiva, ke hnojení na list se použije ledek vápenatý nebo ledek amonný s vápencem. Organické hnojení přímo k ostropestřci je vhodné. Zapraví se hlubokou orbou na podzim. Hnůj má na růst kultury pozitivní účinky a může být významným přínosem k stabilizaci úrody (*KUBÍNEK, 1987*). Paušálně je možné aplikovat na hektar asi 300 - 400 kg NPK předset'ově (*RYANT, 2005*).

Podle rámcové metodiky pěstování ostropestřce mariánského Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž (Rámcová metodika 2, 2003), s.r.o. je pro podmínky ČR doporučováno aplikovat 45 - 60 kg N, 17,5 kg P a 33,2 kg K na ha. V praxi to znamená aplikovat 200 kg.ha⁻¹ NPK (19-19-19), v případě vysoké nebo velmi vysoké zásoby K v půdě 100 kg Amofosu na ha na podzim. Na jaře je potom vhodné aplikovat 100 - 150 kg dusičnanu amonného před setím nebo ihned po zasetí (*RYANT, 2005*).

Problematikou optimální výživy ostropestřce se detailně věnují především v oblasti severního Egypta. Na písčitých půdách této oblasti je popisováno pozitivní působení dávek dusíku (120 až 240 kg.ha⁻¹), resp. fosforu (62 kg.ha⁻¹) na výnos nažek, výnos oleje a silymarinu (*OMER, et al., 1998*).

Při srovnání různých druhů dusíkatých hnojiv (močovina, síran amonný a dusičnan amonný; všechny v dávce N 143 kg.ha⁻¹) poskytuje nejvyšší výnos nažek síran amonný a jeho dělená aplikace ve dvou termínech poskytuje také vyšší výnos oleje a všech složek silymarinu (*OMER, 1996*).

Také při sledování vlivu dvou dávek dusíku (70 a 140 kg.ha⁻¹) a tří dávek draslíku (46, 71 a 95 kg K na ha) působí nejvyšší dávky nárůst výnosu nažek, výnosu oleje a obsahu oleje v nažkách ve srovnání s nižší hladinou hnojení, avšak nemají významný vliv na obsah flavonolignanů (OMER, *et al.*, 1993).

Ostropestřec je zde pěstován také pod závlahami, kde při vysokých dávkách dusíkatých a draselných hnojiv (476 kg N na ha v dusičnanu amonném a 99 kg K na ha v síranu draselném) dosahuje vyššího výnosu nažek, výnosu oleje a silymarinu ve srovnání s nižší úrovní hnojení dusíkem a draslíkem (238 kg N na ha a 99 kg K na ha) (OMER, *et al.*, 1995).

Efekt dusíkatého hnojení ostropestřce mariánského byl zkoumán také v Německu, avšak výnos nažek byl ovlivněn negativně a obsah silymarinu se lišil od dusíkem nehnojených rostlin pouze o 0,03 % (SCHUNKE, 1992).

2.2.3.4. Předset'ová příprava půdy, osivo a setí

Půda pro ostropestřec se připravuje stejným způsobem jako pro jarní obiloviny s tím rozdílem, že podzimní orba má být hluboká (0,30 m). Válení po výsevu je žádoucí pouze na silně proschlé půdě u opožděných výsevů. Je-li předplodinou obilnina, jetelovina, luskovina nebo olejnína, neměla by být vynechána podmítka.

Semena svými průměrnými rozměry přibližně 6,5 x 3 mm zhruba odpovídají osivu obilnin. Kvalitní osivo je složeno ze světlých až tmavých semen plného tvaru a hmotností tisíce semen (HTS) 25 – 30 g. K výsevu není vhodné používat osivo skladované déle než 2 roky, neboť během skladování klíčivost osiva klesá (KUBÍNEK, 1987).

V současné době se preferuje širokořádkový výsev přesnými secími stroji. Norma výsevu je dána aktuální klíčivostí a kolísá mezi 5 až 8 kg.ha⁻¹ (SPITZOVÁ, 1997). Hloubka výsevu je 2 – 3 cm. Jen při pozdním výsevu v suchých podmínkách lze sít do hloubky maximálně 5 cm při současném zvýšení normy výsevu. A jen v tomto případě je po výsevu žádoucí válení půdy.

Teoretický spon se pohybuje v rozmezí 0,30 x 0,30 m až 0,40 x 0,40 m. Na 1 m² by mělo růst 6 – 12 jedinců, tj. 60 – 120 000 rostlin na 1 ha. Husté porosty (až do 200 000 jedinců na 1 ha) jsou také možné, výhodou je zde omezení větvení rostlin, avšak při větším množství srážek a silném větru poléhají (KUBÍNEK, 1987).

Počet jedinců na hektar určujeme dle technologie pěstování, zvláště způsobu sběru. Pro malopěstitele se doporučuje porost zakládat v širším sponu, kde se rostliny více větví a tvorba výnosových prvků je tak výraznější. Doporučuje se vysévat v pásech 2 - 3 řádky, mezi kterými se vynechává manipulační cesta. Pro velkoplošné pěstování více vyhovují hustější porosty, počet větví je nižší a tím je zabezpečeno jednotnější dozrávání nažek (*GROMOVÁ, et al., 1993*).

Optimální termín výsevu je časné jaro. Teplota půdy má být minimálně 5° C a přiměřená vlhkost půdy. Agrotechnická lhůta setí se podle klimatických regionů pohybuje mezi 15. – 25. dubnem. Optimum je 25. březen – 10. duben. Včasný výsev je nejučinnější ochranou před tracheomykózou a zároveň zajišťuje větší vláhovou jistotu při vzcházení (*KUBÍNEK, 1987*).

Termín setí je důležitý hlavně z hlediska výnosu. Pro vyšší násadu úborů jsou nejvhodnější termíny setí koncem března a začátkem dubna. Rostliny zůstávají delší čas ve fázi růžice, ve které se vytváří počet větví. Tento termín je vhodnější při realizaci ručního sběru.

Výsev koncem dubna poskytuje rostlině kratší období trvání fáze přizemní růžice, redukuje se počet větvení, což je vhodnější pro mechanizovaný sběr, neboť rostlina vytváří méně nadzemní biomasy. Tím, že počet úborů je nižší a jejich tvorba přechází do teplejšího a suššího období, zvláště fáze zrání, se zvyšuje obsah silymarinu (*GROMOVÁ, et al., 1993*).

Stejně tak se otázkou nejvhodnějšího termínu výsevu ve svých pokusech zabývali *POLÁK* a *ŠUSTROVÁ* (1991). Zajímalo je, zda jiný termín výsevu, lépe využívající jarní, resp. zimní vláhy, by nebyl výhodnější. Pokus byl motivován snahou o nalezení alternativních termínů setí ostropestřce. Provozní pěstování vychází z výše uvedené metodiky z roku 1987. Po vyhodnocení výsledků dvou pokusných let se jako optimální projevily dvě výrazně oddělené skupiny výsevu:

1. skupina pozdně letních a předzimních výsevů s přezimováním rostlin v listové růžici.
2. skupina zimních a časných jarních výsevů, které se ukázaly jako jednoznačně nejlepší.

V obou případech je start rostlin daleko rychlejší, využitelná doba setrvání kultury na poli se prodlužuje a i v případě nepříznivých klimatických podmínek v květnu a červnu ostropestřec bezpečně dozrává. U obou skupin bylo možné sklídit semeno o 1 - 2 měsíce dříve než u provozních kultur, setých obvykle po 2. dekádě dubna i později. Semeno sklizené z těchto výsevů bylo dobře vyztřelé, s průměrnou HTS a velmi dobrou klíčivostí. Rozšířený interval termínu setí lze uplatnit hlavně v klimaticky a srážkově „nenormálních“ letech pro zajištění aspoň průměrné sklizně drogy.

2.2.3.5. Kultivace během vegetace

Kultivační práce během vegetace mohou zahrnovat přihnojení dusíkatými hnojivými, postřiky proti chorobám a škůdcům, popřípadě i závlahy. Hlavní opatření však spočívají v boji proti plevelům.

Ostropestřec se vyznačuje velmi dobrou konkurenční schopností vůči plevelům, zvláště trávovitým. Tato léčivá rostlina se dá pěstovat i extenzivním způsobem. Při intenzivní výrobě však boj proti plevelům vynechat nelze. Z plevelných druhů jsou nejnebezpečnější merlíky, lebedy, ohnice, hořčice, vydrol řepky a obilí, oves hluchý a některé další, méně časté plevele, které ostropestřec ve fázi listové růžice přerůstají a připravují jej tak nejen o vláhu a živiny, ale i o světlo. Velmi také škodí plevele vytrvalé, zejména pýr a pcháč. Platí, že v časnějších výsevech jsou plevele nebezpečnější, neboť ostropestřec za nízkých teplot roste oproti plevelům pomaleji.

Základem ničení plevelů by měla být mechanická kultivace meziřádků, obvykle ve fázi okolo 6 pravých listů ostropestřce. Při silném zaplevelení je vhodné plečkování již v počátečních fázích vývoje kultury. Po zapojení vyrovnaného, nemezerovitého porostu je růst jednoletých plevelů prakticky vyloučen. Jde tedy o to, udržet kulturu po dva měsíce čistou, než se porost zapojí. Pro plečkování se nejlépe osvědčují rotační plečky na cukrovku (KUBÍNEK, 1987).

Herbicidní ochrana je víceméně vyřešena (SPITZOVÁ, 1997). Rezidua pesticidů v droze jsou kontrolována, obsah nesmí překročit přípustnou normu (KUBÍNEK, 1987).

2.2.3.6. Ochrana proti chorobám a škůdcům

Zdravotním problémem, zejména podhorských oblastí, je plíseň šedá (SPITZOVÁ, 1997). KUBÍNEK (1987) tuto plíseň podrobněji popisuje jako polyfágního, velmi rozšířeného saproparazita, který napadá ostropestřec ve fázi kvetení a zrání. Napadení se projevuje hnědnutím, černáním, zasycháním, kroucením a zaškrcováním částí stonku pod úborem, někdy až té míry, že úbor upadne. Byl zaznamenán i případ, kdy napadené, avšak zdánlivě zdravé rostliny nevytvářely plody. Zvláště nežádoucí je pak infekce semen. Tím vzniká další důvod k moření osiva. Prevencí proti této chorobě je včasný výsev.

SPITZOVÁ (1997) jako další chorobu uvádí houby rodu *Fusarium*, které dle KUBÍNEKA (1987) způsobují nejzávažnější chorobu ostropestřce, a tou je tracheomykóza – cévní vadnutí. Za vhodných podmínek – teplotní optimum 26 – 28° C, kyselé prostředí, sucho, při fyziologickém

oslabení rostliny, se stávají z všudypřítomných fusarií paraziti. Projevy choroby vedoucí až k úhynu rostlin se začínají masově objevovat od fáze listové růžice. Je to postupné vadnutí, žloutnutí až hnědnutí a nekrotizace celé rostliny. Při slabším infekčním tlaku napadení v pozdějších vývojových fázích může v porostu dojít k plynulé řadě poškození různého stupně – od silné retardace růstu až po nepatrné příznaky poškození, jako je např. poškození nebo nevytváření semen. Chemická ochrana proti cévnímu vadnutí je velmi obtížná a značně nákladná, takže se dá jen stěží uplatnit v praxi, snad s výjimkou zvláště cenných kultur, pěstovaných na malých plochách. Nejjistější a zároveň nejjednodušší ochranou proti tracheomykóze je včasný výsev biologicky hodnotného osiva. Osivo je vhodné mořit (KUBÍNEK, 1987).

Čas od času je zaznamenán výskyt padlí čekankového a v poslední době i skvrnitosti způsobené druhy rodu *Alternaria* a *Septoria* (SPITZOVÁ, 1997). Podstatný vliv na výnos a kvalitu drogy však nemají (KUBÍNEK, 1987).

Z živočišných škůdců škodí mšice, v posledních letech byl zaznamenán i žír housenek polyfágních škůdců a babočky bodlákové (SPITZOVÁ, 1997). Zasetá semena mohou vyzobávat bažanti, dozrávající plody jsou atraktivní pro ptáky, hlavně zvonky a vrabce (KUBÍNEK, 1987)

2.2.3.7. Sklizeň

SPITZOVÁ a PLACR (1994) označují sklizeň za největší úskalí pěstování ostropestřce, neboť limituje jak výnos, tak kvalitu drogy. Sklizeň pouze zcela biologicky zralých semen je ve velkoplošných podmínkách technicky neproveditelná. Problémy vyplývají z biologických vlastností rostliny, resp. z postupného dozrávání. Úbory zrají odshora dolů, semena v úborech od středu k obvodu. Navíc zralá semena spontánně vypadávají. Situaci dále komplikuje skutečnost, že obsah účinných látek v tzv. silymarinovém komplexu a do jisté míry i jejich vzájemný poměr, stejně jako biologická hodnota, závisí na stupni vyžrání semen.

Hlavní problémem je i velké množství vegetační vody v rostlinách v době technologické zralosti. Termín sklizně musí být kompromisem mezi stupněm vyžrání semen a velikostí sklizňových ztrát. Porost ostropestřce vhodný ke sklizni by měl mít 30 % přezrávajících úborů, dobře rozeznatelných za suchého počasí podle rozevření a bílého chmýří. Většina zbývajících úborů by v té době měla zasychat. Sklízet lze pomocí techniky pro sklizeň obilovin (KUBÍNEK, 1987). Pro ruční sklizeň je optimální vlhkost nažek mezi 13 až 18 % (GROMOVÁ, et al., 1993).

Problémy související se sklizní může do jisté míry řešit desikace, která však mnohdy bývá nežádoucí vzhledem k riziku obsahu reziduí v droze. Je tedy použitelná pouze tehdy, neovlivní-li současně obsah účinných látek a výnos, u semenářských porostů pak biologickou hodnotu semen. Všechna tato kritéria musí sledovat výběr desikantu (*SPITZOVÁ a PLACR, 1994*).

KUBÍNEK (1987) ve své metodice pěstování upozorňuje, že desikace přípravkem Reglone výrazně snižuje výnos plodů, obsah silymarinu a klíčivost semen. To je způsobeno s největší pravděpodobností tím, že po aplikaci desikantu Reglone dojde velmi záhy k přerušení všech biologických pochodů v nadzemní části rostliny a vývoj semen se zastaví. Výsledky nejlepších pěstitelů ukazují, že sklizeň bez desikace je nejen možná, ale i výnosná.

SPITZOVÁ a PLACR (1994) se na základě výše uvedené skutečnosti v parcelkových a následně provozních pokusech zabývala sledováním vlivu vybraných desikačních přípravků na kvalitu drogy a biologickou hodnotu semen s těmito závěry:

1. Při použití desikačních přípravků je ve vztahu ke kvalitě drogy rozhodující termín aplikace, nikoliv přípravek. Pomaleji působící desikanty jsou méně rizikové. Zatímco při postřiku 11 dní před sklizní je ve srovnání s kontrolou obsah silybinu o 1,55 % nižší, při ošetření 5 dní před sklizní je naopak o 0,51 % vyšší než u kontroly. Vyslovená hypotéza tedy platí, nikoliv však absolutně. Pokud se desikant použije předčasně, může to maskovat genetický potenciál rostlin, jak názorně dokumentuje obsah 1,06 % silybinu při postřiku 11 dní před sklizní. Obdobně ovlivňuje předčasná desikace obsah silychristinu. Zhruba stejnou zákonitost, nízký obsah silybinu ve srovnání s kontrolou jako důsledek předčasného ošetření, lze vysledovat i u přípravku Roundup. Ve všech ostatních případech je obsah silybinu ve srovnání s kontrolou sice nižší, nicméně pokles dosahuje maximálně 0,31 %. Počítáme-li se subjektivní a objektivní chybou analytické metody, můžeme tento rozdíl označit z praktického hlediska za nepodstatný.

2. Do kultur ostropestřce lze použít přípravky Harvade 25F a Roundup v dávce 3 l/ha při aplikaci jeden týden před předpokládaným termínem sklizně. Přípravky Reglone v dávce 3 l/ha, DAM 390 (200 l/ha) a mix Reglone + DAM 390 (3 + 100 l/ha) je nutno aplikovat dva dny před sklizní. Při dodržení výše uvedených podmínek nemají zmíněné přípravky negativní vliv na klíčivost, HTS a obsah účinných látek.

3. Droga pocházející z ošetřených porostů je použitelná pouze pro průmyslové zpracování na izolaci účinných látek.

2.2.3.8. Současná situace na trhu

KUBÍNEK (1987) řadí ostropestřec mezi plodiny ekonomicky výhodné a zároveň málo rizikové, pokud je dodržen především včasný kvalitní výsev do dobré půdy, správná aplikace herbicidů a sklizeň v pravý čas a ve vysoké kvalitě.

Průměrný hektarový výnos zkušených pěstitelů dosahuje přibližně 1 tuny (*SPITZOVÁ, 1997*). Při postupném ručním sběru výnos přesahuje i 3 tuny, neboť zde dochází pouze k minimálním ztrátám výpadem již zralých semen (*GROMOVÁ, et al., 1993*). Náklady na pěstování jsou zhruba porovnatelné s jarní obilovinou. Při průměrném hektarovém výnosu 1 tuny je čistý zisk v porovnání s obilovinou vyšší (*SPITZOVÁ, 1997*).

Výkupní cena je výrazně ovlivňována především poptávkou na trhu a kvalitou i množstvím domácí produkce, závisí rovněž i na objemech dovozu (*LAKR, 2004*). Výkupní ceny za kg semene v posledních letech na tuzemském trhu víceméně stagnují a pohybují se okolo 24 Kč (*ústní sdělení konzultanta*). Podstatně jiná situace panuje na trhu USA, kde řadí ostropestřec mezi jednu z nejprodávanějších bylin. Ceny se zde odvíjejí od úrody, sklizně a podílu dovozu z Evropy a Jižní Ameriky. V roce 2005 se výkupní ceny pohybovaly mezi \$3,20 - \$26,50/lb (*JANKE, et al., 2005*). V přepočtu, kdy 1 libra je cca 0,454 kg a uvažovaný kurzu dolaru cca 24 Kč, dosahují tržby v USA 168 – 1 392 Kč.kg⁻¹.

Získání dat o zpracování léčivých rostlin včetně ostropestřce je v ČR velmi problematické, sdílení informací závisí pouze na spolupráci jednotlivých zpracovatelů. Ve většině případů jsou v ČR pěstitelé v těsném kontaktu s velkými zákazníky a trendy v pěstování určuje trh. Pěstitelskou alternativou je získávání léčivých rostlin z ekologického zemědělství. Takto získané produkty se využívají především k výrobě čajovin. Úplné informace o pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin (dále jen LAKR) nejsou k dispozici ani ve světě. Statistiky se této komoditě věnují jen okrajově. Pro pěstitele LAKR v ČR a EU i ve světě není povinnost registrovat pěstební plochy. Důsledkem toho jsou přehledy a zprávy velmi odlišné (*LAKR, 2004*).

Dle *DRAŠNAROVÉ (2005)* se plocha pěstování ostropestřce v ČR v posledních letech výrazně neměnila. Odběratelé kladou vysoké nároky na kvalitu suroviny, a proto dávají přednost stálému osvědčenému pěstiteli. V současné době se v celoevropském měřítku uplatňuje trend pěstování léčivých rostlin na zakázku, kdy zpracovatel dodává celou technologii včetně osiva. Dosud poslední evidovaná plocha statistickým úřadem je z roku 2003, a to 2 500 ha ostropestřce mariánského a výnos 0,62 t z hektaru.

2.3. Chemické složení a účinné látky rostliny

2.3.1. Obecná charakteristika lignanů

Jako lignany je označována poměrně rozsáhlá skupina sekundárních metabolitů cévnatých rostlin se zajímavými fyziologickými účinky. Skládají se ze dvou fenylypropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální (β) uhlíky obou postranních řetězců.

V současnosti je známo více jak 200 lignanů nacházejících se ve více než 70 čeledích rostlin. Byly nalezeny prakticky ve všech částech rostlin, typická je jejich přítomnost ve dřevě a kůře stromů a v pryskyřicích. U některých druhů byl nejvyšší obsah lignanů nalezen v semenech.

Málo je známo o fyziologické funkci lignanů v rostlinách. Protože se jedná o sloučeniny, které vykazují antimikrobiální, antibiotické, antivirové, antioxidační a antinutriční vlastnosti, předpokládá se, že podobně jako jiné sekundární metabolity zvyšují rezistenci rostlin proti různým patogenům. Nepochopitelný charakter lignanů umožňuje jejich snadnou prostupnost buněčnými membránami a schopnost ovlivnit v buňkách řadu biologických dějů. Některé lignany se používají jako léčiva. Vykazují také výraznou antivirovou aktivitu, včetně aktivity vůči viru HIV. Lignany byly také nalezeny v krvi a moči savců, včetně člověka. Tyto „živočišné“ lignany vznikají ve střevech savců transformací rostlinných lignanů, v těle účinkují jako fytoestrogeny, pravděpodobně působí preventivně proti vzniku některých rakovinových onemocnění.

V rostlinách se vyskytují sloučeniny, které mají podobné strukturní znaky jako lignany. Mezi tyto příbuzné sloučeniny patří především neolignany, ve kterých jsou dvě fenylypropanové jednotky spojeny jinou vazbou, než je vazba přes centrální (β) uhlíky alifatických řetězců. Existují také hybridní lignany jako jsou flavanolignany, kumarinolignany a lignin-iridoidy, v nichž jedna část molekuly je tvořena fenylypropanovou jednotkou a druhá část jinou přírodní látkou (SLANINA, 1994).

2.3.2. Struktura flavanolignanů a další obsahové látky ostropestřce

O flavanolignanech podrobněji ve svém článku pojednává i JEGOROV (1996). Uvádí, že aktivní složkou semen ostropestřce jsou látky flavonoidní povahy, což se podařilo zjistit v roce 1952. Struktura dvou flavanonů – *silybinu* a *silydianinu* pak byla objasněna o 8 let později.

Dalšími komponentami směsi flavonoidů, souhrnně označované jako silymarin, jsou *silychristin* a *iso-silybin*. Všechny tyto látky jsou tvořeny flavanonem *taxifolinem* k němuž je oxidativní adicí připojena molekula koniferylalkoholu. Vzhledem k tomu, že koniferylalkohol je rovněž obvyklou složkou ligninu, dostal tento nový typ flavonoidů souhrnné označení flavanolignany. Vzorce hlavních účinných látek ostropestřce mariánského jsou znázorněny na obrázku 2.

Mimo tyto látky obsahují semena histamin a thyramin, hořčinu, sacharidy, malé množství sílice a 18 - 27 % oleje s hlavním podílem kyseliny linolové (60 %), olejové (15 - 26 %) a linoleové (2 %) a 8 - 12 % nasycených mastných kyselin (*INDRÁK* a *CHYTILOVÁ*, 1992).

V pokusech ČZU v Praze bylo dosaženo průměrné olejnatosti 24,5 %, přičemž značné rozdíly byly způsobovány rozbory nestejně zralých nažek (*RYANT*, 2005).

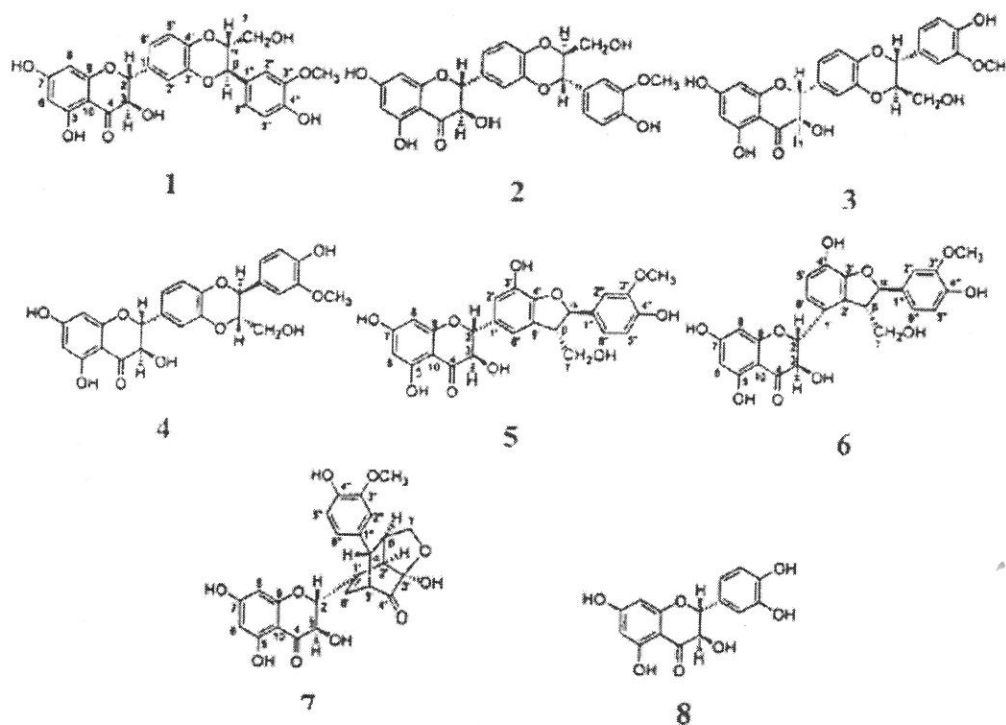
Nejdůležitější z obsahových látek – silymarinový komplex, je směs látek s majoritním zastoupením silybinu, silydianinu, silychristinu a také isosilybinu. Z těchto čtyř chemických komponent je terapeuticky využíván, vzhledem k výraznému hepatoprotektivnímu účinku, silydianin a zejména silybinin (*INDRÁK* a *CHYTILOVÁ*, 1992). Za nejúčinnější složku je považován právě silybinin, což je souhrnné označením pro silybinin A a silybinin B (*STARÝ*, 2000). Iso-silybin je pravděpodobně nejméně aktivní (*JEGOROV*, 1996). Standardní extrakt ostropestřce obsahuje 70 – 80 % silymarinu (*PEPPING*, 1999). Z pohledu *OPLETALA* a *VOLÁKA* (1999) je obsah účinných látek ostropestřce rozdělen na flavanolignany označované jako silymarin (1,5 - 3 %), flavonoidy (taxifolin, kvercetin, kemferol), aminy (tyramin, histamin), mastný olej (20 - 30 %; kyseliny linolová, olejová, palmitová), tokoferol (0,6 %), steroly (kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol) a bílkoviny (25 - 30 %). *FOSTER* (1996) uvádí obsah účinných látek ve zralých semenech v koncentracích vyšší, a to asi 4 – 6 %.

JEGOROV (1996) uvádí, že silybin, silydianin, silychristin a iso-silybin tvoří spolu s taxifolinem a kvercetinem podstatnou část flavonoidů extrahovaných ze semen ostropestřce. Jako minoritní složky byly izolovány analogické flavony odvozené od kvercetinu, např. dehydrosilybin, které pravděpodobně vznikají v důsledku snadné oxidace flavanonů na flavony. Podrobnostmi izolace a syntézy dehydrosilybinu se ve své práci zabývají *KURKIN, et al* (2001).

Zatímco biosyntéza flavonoidů z fenylalaninu představuje řadu velmi specifických enzymatických reakcí, nízká stereospecifita následné oxidativní adice koniferylalkoholu je v souladu s předpokládaným radikálovým mechanismem této reakce probíhající jak *in vitro*, tak *in vivo*. Struktura flavanolignanů je pak neobyčejnou ukázkou stereochemických možností

oxidativní adice olefinu (koniferylalkoholu) na fenol (taxifolin). Tvorba 1,4-benzodioxanů, při níž reagují obě sousední fenolické skupiny (3', 4'), poskytuje čtyři stereomery nalezené v přírodní směsi: dva silybiny, kde je α -uhlík koniferylalkoholu vázán na 3'-O a dva iso-silybiny u nichž je α -uhlík koniferylalkoholu vázán na 4'-O náležející C-kruhu taxifolinu. Vzhledem k přítomnosti dalších chirálních center v molekule mají jednotlivé stereomery odlišné vlastnosti a lze je tudíž rozlišit kapalinovou chromatografií v achirálním systému. Podle pořadí eluce byly jednotlivé silybiny a iso-silybiny označeny A a B. Koniferylalkohol se může adovat i na pozici jedné ze dvou OH skupin C-kruhu taxifolinu (3' nebo 4') a současně na jeden ze sousedících uhlíků (2' nebo 5') jako je tomu v případě silychristinu (4'-O- α , 5'-C- β), iso-silychristinu (3'-O- α , 2'-C- β), silyherminu (4'-O- α , 5'-C- β = 3-deoxy-silychristin) nebo neo-silyherminu A (3'-O- α , 2'-C- β = 3-deoxy-iso-silychristin). Ještě lepší trojrozměrnou představivost vyžadují struktury silydianinu a silymoninu (3-deoxy-silydianin), kde je koniferylalkohol navázán ve třech místech C-kruhu taxifolinu (5'-C- α , 2'-C- β , 3'-O- γ -O). Tento typ adice vede k jedinému stereomeru, jehož absolutní konfigurace byla prokázána RTG-difrakcí (JEGOROV, 1996).

1 silybin A 2 silybin B 3 isosilybin A 4 isosilybin B 5 silychristin 6 isosilychristin 7 silydianin 8 taxifolin



Obr. 2 - Struktura hlavních účinných látek (NAM-CHEOL KIM, et al., 2003)

2.3.3. Chemické složení a obsah účinných látek kultivaru Silyb

V posledních letech se dostává do popředí hlavně otázka kvality drogy (*SPITZOVÁ a PLACR, 1994*). V daném případě nažky ostropestřce je to výroba kvalitní suroviny s odpovídajícím kvalitním a kvantitativním složením silymarinového komplexu (*SPITZOVÁ, 1997*).

Vzhledem k tomu, že v původně pěstovaném nešlechtěném materiálu byly koncentrace silybinu nízké (0,2 - 0,6 %) a vzájemný poměr silybin : silydianin kolísal (*INDRÁK a CHYTILOVÁ, 1992*) a z toho důvodu představovala přirozená populace v tomto směru velice nesourodý rostlinný materiál, nepoužitelný jako standardní surovinový zdroj (*SPITZOVÁ, 1997*), byla v uplynulých letech vyšlechtěna silybinová chemovarieta cv. Silyb (*INDRÁK a CHYTILOVÁ, 1992*) zapsaná do Listiny povolených odrůd v roce 1984 (*SPITZOVÁ, 1997*). Z toho vyplývá, že droga jako průmyslová surovina by měla mít v silymarinovém komplexu zastoupen především silybin, a to v množství, které umožní jeho ekonomickou izolaci (*SPITZOVÁ, 1991*).

Obsah účinných látek byl tedy šlechtěním posunut na vyšší kvantitativní hladinu. Složení silymarinového komplexu bylo posunuto směrem k maximálnímu terapeutickému efektu. Konkrétně to znamená obsah 2,5 % silybinu a 1,5 % silychristinu při absenci silydianinu v silymarinovém komplexu (*SPITZOVÁ a PLACR, 1994*). Z toho vyplývá, že zmíněný kultivar je použitelný pro izolaci čistého silybinu s možným využitím jak v humánní, tak veterinární praxi (*SPITZOVÁ, 1991*).

Tento kultivar se obsahem účinných látek zcela jednoznačně liší od dalších u nás pěstovaných chemoras, které nemají ani legislativně ani fakticky charakter odrůd. Pro praktického zemědělce je rozhodující skutečnost, že vlastníkem kultivaru je akciová společnost Galena Opava a kultivar podléhá právní ochraně ve smyslu zákona 132/89 Sb. Není tedy volně dostupný. Jeho využívání podléhá uzavření licenční smlouvy s vlastníkem. Ten také provádí udržovací šlechtění a prostřednictvím smluvních množitelů i výrobu osiv všech stupňů.

Součástí podnikového know-how Galeny Opava a.s. jsou i podrobné agrotechnické údaje obsaženy ve speciální agrotechnice. Tato organizace také zajišťuje pěstování a výkup drogy u smluvních pěstitelů. Těm je na základě licenční smlouvy prodáno osivo a zajištěn poradenský servis.

Filozofii zpracovatele drogy je intenzifikace veškerých činností, tedy i pěstování a zpracování ostropestřce mariánského. Předpokladem je stálý přísun kvalitní drogy. Pro pěstitele to znamená trvale dosahovat stabilních výnosů i obsahů účinných látek v droze. To nelze zabezpečit při extenzivním způsobu pěstování, bez odpovídajícího technického zázemí pro posklizňovou úpravu a manipulaci s drogou. Se zřetelem na všechny výše uvedené skutečnosti je prováděn výběr pěstitelů. V současné době je okruh pěstitelů již relativně stálý, nové zájemce o pěstování lze přijmout pouze náhradou za pěstitele nevyhovující či jako rezervu v případě dalšího nárůstu pěstebních ploch (*SPITZOVÁ, 1997*).

V průběhu pěstování výše zmíněného kultivaru byla podchycena celá řada genotypů odlišných kvalitativním i kvantitativním složením účinných látek. Z nich nejzajímavější jsou individua umožňující v dosti krátké době vyšlechtění kultivaru, v němž chybí silybin, ale je vhodný k izolaci čistého silydianinu. Vzhledem k existenci prací dokumentujících hepatoprotektivní účinek při různém poměru silybinu a silydianinu ve finálních výrobcích by takto cílené šlechtění bylo žádoucí. Současně by se tak odstranilo nekontrolované pěstování populace nejasného původu obsahující silydianin, ohrožující navíc odrůdovou čistotu cv. Silyb (*SPITZOVÁ, 1991*).

2.4. Farmakologické účinky a využívání ostropestřce mariánského

Ostropestřec mariánský, jeho semena, listy, plody i kořeny jsou po staletí užívány v tradiční evropské medicíně na léčení různých chorob jater. Systematické studie aktivních komponent se datují zhruba od 60. let a pokračují dodnes.

Výroba léků na bázi extraktů ze semen ostropestřce, obsahujících silymarin, tj. směs flavonoidů s převahou silybinu, izosilybinu, silydianinu a silychristinu, má vzestupnou tendenci. Světová roční produkce silymarinu činí okolo 200 tun, největšími producenty jsou Španělsko, Česká republika, Čína, Indie a Brazílie. Počet specialit obsahujících silymarin se na našem trhu stále rozšiřuje (např. Flavobion, Legalon, Lagosa). Uvedená fytofarmaka jsou indikována při toxickometabolických alteracích jater (steatóza, poléková poškození, otravy) a při akutních chronických hepatitidách. Příznivě působí na metabolismus hepatocytů, napomáhají obnově jejich činnosti a stabilizují extra i endoplazmatické buněčné membrány (KUMMER, *et al.*, 2000).

Při akutní otravě např. toxiny muchomůrky zelené brání přítomnost silymarinu navázání toxinů na buněčný povrch a aktivnímu transportu dovnitř buňky. Vliv silymarinu na propustnost membrán se zde jeví jako primární ochranný efekt a jeho včasné podání podstatně zvyšuje naději na přežití. Účinek dalších jaterních jedů, např. CCl₄, thalných solí, ethanolu a dalších spočívá v tvorbě volných radikálů. Při tomto typu otrav převažuje účinek silymarinu jako lapače volných radikálů, jeho inhibiční účinek na různé oxygenasy a peroxidasy a naopak pozitivní efekt na stabilizaci koncentrace neredukovaného glutathionu. V souladu s tím jsou silymarin, jeho jednotlivé konstituenty nebo deriváty zahrnuty do standardních medicínských postupů při akutních otravách. Silymarin se neváže pouze na buněčné membrány, ale proniká rovněž do buněčných jader, kde působí jako stimulátor syntézy bílkovin a stimulátor syntézy DNA. Stimulace proteosyntézy je významným krokem umožňujícím opravu poškozených buněčných struktur a náhradu enzymů poškozených jaterními toxiny. Stimulace syntézy DNA vede k aktivaci buněčného dělení a regeneraci jaterních buněk. Zdá se, že právě tento efekt činí flavanolignany výjimečnými léky se specifickým účinkem na obnovu jaterního parenchymu i u chronicky poškozených jater. Použití silybinu, který lze nejnáze získat v čistém stavu, omezuje především jeho velmi nízká rozpustnost. V současnosti je proto studována celá řada derivátů s vyšší rozpustností (JEGOROV, 1996).

Studie na zvířatech prokázaly, že používání silymarinu je žádoucí i v prevenci a léčbě určité rakoviny zahrnující prsa, prostatu a rakovinu kůže (*PEPPING, 1999*). Komplex obsahových látek rovněž zvyšuje vylučování žluči a uvolňuje křeče. Obsahové látky drogy se dnes využívají spíše ve formě čistého komplexu. Pokud se z drogy připravují odvary, má být vždy čerstvě mletá; díky vysokému obsahu mastného oleje totiž žlukne (*OPLETAL a VOLÁK, 1999*). Semena získaná případným individuálním sběrem z rostlin se doporučuje rozdrtit, 2 minuty vařit a pít odvar po předchozím asi 20 minutovém vyluhování. V lidovém léčitelství se pití tohoto odvaru doporučuje i u onemocnění žlučníku, dvanáctníku a sleziny a zevní použití ke koupelím (i z natě a kořenů) při hemeroidech a křečových žilách. Účinek pití tohoto odvaru při chorobách žlučníku může podpořit obsah hořčin a silice (*JAROŠ, 1992*).

Semena ostropestřce se v lidovém léčitelství zpracovávají buď celá nebo drcená. Obě receptury se používají takřka od nepaměti a zachovávají maximální množství účinných látek, které jsou obsaženy zejména v obalu – barvivu semen. Odzkoušeno je následující homeopatické zpracování: Do 0,5 litru vody se přidá 45 gramů dobře zralých, černých semen a vše se pomalu vaří přikryté, až zůstane 250 až 300 ml. Odvar se slije a pak se přidá 250 ml lihu 90%. Vzniklou tinkturu ředíme na potenci D4 lihem 40%. Obecně ji užíváme v potenci D3 nebo D4 s dávkováním 3krát denně 10 kapek, po jídle.

Kromě semen se v lidovém léčitelství užívá i list a kořen. Odvar ze sušených listů aplikujeme například při žloutence, zánětu pohrudnice a plic a žlučnickových kamenech. V případě bílého výtoku a chybějící menstruaci užíváme odvar z kořene (*JANČA a ZENTRICH, 1999*). Mladé listy přízemní růžice se mohou použít jako zelenina podobně jako špenát.

Ostropestřec má rovněž využití ve veterinární medicíně pro ozdravné účinky při horečce u hovězího dobytka (*GROMOVÁ, et al., 1993*). Ne vždy jsou však vykazovány pouze pozitivní účinky, což je zřejmé ze studie vlivu vedlejších účinků zkrmování výlisků semen ostropestřce mariánského u krav. Zde byly zjištěny strukturální a funkční změny, které svědčí o „slabém“ estrogenním účinku. V provozních podmínkách by proto délka doby příjmu těchto výlisků v použitém dávkování (denní přírůstek do krmné dávky 500 g výlisků) neměla přesáhnout 4 - 5 týdnů po porodu, neboť další prodlužování tohoto období může být příčinou snížené plodnosti krav (*KUMMER, et al., 2000*).

2.5. Metody stanovení některých účinných látek v rostlině

2.5.1. Chromatografické metody

Chromatografie, jedna z nejvýznamnějších analytických a zároveň separačních metod, umožňuje dělení a identifikaci velkého počtu organických i anorganických látek (*DRBAL a KŘÍŽEK, 1999*). Do této skupiny metod patří např. metoda HPLC-vysokotlaká kolonová kapalinová chromatografie, GLC-plynová chromatografie, TLC-chromatografie na tenké vrstvě.

Rozdělované složky se distribuují mezi nepohyblivou a pohyblivou fází (*KOPŘIVA, 2002*). Fází stacionární mohou být částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, může to být kapalina umístěná na povrchu inertního nosiče či film kapaliny na vnitřní straně kapiláry. Pro jednoduchost je zvykem užívat pro jakoukoliv formu označení *sorbent* (*DRBAL a KŘÍŽEK, 1999*). Stacionární fáze vytváří tzv. chromatografické lože, které může mít různý tvar a jímž protéká fáze mobilní (*KOPŘIVA, 2002*). Jako mobilní fáze se nejčastěji používají binární či ternární směsi vody, methanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu či dioxinu.

Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami vzorku dochází k vzájemným interakcím, které rozhodují o průběhu separačního procesu (*DRBAL a KŘÍŽEK, 1999*). V takovéto soustavě se jednotlivé složky pohybují souhlasně se směrem pohybu mobilní fáze nestejnou rychlostí v přibližné závislosti na hodnotě své distribuční konstanty. V důsledku rozdílných rychlostí urazí za stejný čas jednotlivé složky různou dráhu a tím dojde k jejich rozdělení. Pokud po ukončení procesu zůstávají složky v loži a určíme jejich polohu, získáme tzv. vnitřní chromatogram (TLC). Opustí-li složky před skončením procesu soustavu, je třeba zjistit v závislosti na čase změny jejich množství nebo koncentrace při výstupu ze soustavy, získáme tzv. vnější chromatogram (HPLC, GLC).

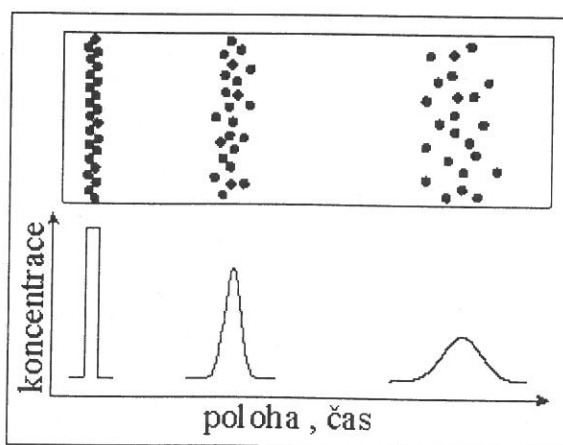
Průtok mobilní fáze soustavou, jehož výsledkem je chromatogram se nazývá *vyvíjení*. Zjišťování přítomnosti dělených složek se obecně nazývá *detekce* (*KOPŘIVA, 2002*). Podle typů těchto interakcí je možno dělit jednotlivé metody. Mluvíme např. o adsorpční, rozdělovací, iontově výměnné či gelové chromatografii. Názvy jsou odvozeny z mechanismu, na jehož základě dochází k separaci. Jelikož v řadě případů je celkový průběh separace podmíněn dvěma i více mechanismy, používá se v praxi nejběžněji členění na plynovou a kapalinovou chromatografii (*DRBAL a KŘÍŽEK, 1999*).

2.5.1.1. Vysokotlaká kolonová kapalinová chromatografie (HPLC)

Mobilní fáze je při isokratické eluci (směs zůstává stejná) vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla, při gradientové eluci (složení směsi se mění) se komponenty mobilní fáze přivádějí ze zásobníku do směšovače, kde se programově mísí ve zvoleném poměru a teprve pak postupují do čerpadla. Odtud je mobilní fáze vedena přes tlumič pulzů do kolony.

Běžně se v HPLC pracuje s tlaky od 1 do 60 MPa, při průtocích mobilní fáze v rozsahu od 0,1 do 10 ml.min⁻¹. 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. Kolony pro HPLC jsou dnes plněny výhradně profesionálně, velikost zrn sorbentu se pohybuje mezi 3 – 50 μm (DRBAL a KRÍŽEK, 1999). V separační koloně, která obsahuje stacionární fázi (*sorbent*) a mobilní fázi (*eluent*), probíhá dělení. Rozdílné analyty jsou rozdílně zadržovány a zpozdovány. Průtokem mobilní fáze dochází k prostupu jednotlivých složek kolonou. Při vhodně zvolených podmínkách je jejich rychlost natolik odlišná, že jednotlivé složky vytvoří oddělené zóny, které postupně opouštějí kolonu ve formě tzv. *eluátu*, což je roztok složky v mobilní fázi (KOPŘIVA, 2002).

Zóny dělených látek se během postupu kolonou rozšiřují (COUFAL, 2004). Koncentrace složky v příslušných podílech eluátu nejprve stoupá, po dosažení maxima opět klesá, což se projeví na vnějším chromatogramu jako tzv. pík (KOPŘIVA, 2002), neboli eluční křivka, jehož plocha je úměrná množství složky, tzn. charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně. Viz obrázek 3 (COUFAL, 2004).



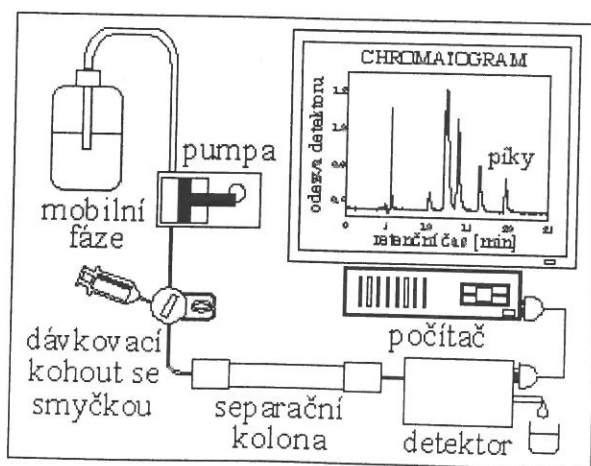
Obr. 3 - Závislost plochy píku na množství složky

Při volbě správných podmínek jsou píky jednotlivých složek navzájem oddělené. Po opuštění kolony *eluát* prochází detektorem (KOPŘIVA, 2002). Kapalinová chromatografie postrádá takřka univerzální detektor. Velmi je rozšířen průtokový fotometrický či fluorimetrický detektor či tepelně vodivostní detektor.

Detektor je spojen se zařízením pro registraci průběhu analýzy (zapisovač, či takřka výhradně PC s hardwarovou úpravou s vyhodnocovacím softwarem) (DRBAL a KŘÍŽEK, 1999) a zaznamenávají formou vnějšího chromatogramu (KOPŘIVA, 2002). Někdy bývá za detektor zařazen tzv. sběrač frakcí mobilní fáze, jenž umožňuje zachytit separovanou složku vzorku, např. pro následnou detailní identifikaci.

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.

Kvantitativním údajem detektorů je plocha pod eluční křivkou. Plochu je možno měřit řadou způsobů. Nejběžněji se postupuje násobením výšky píku šířkou v polovině výšky píku. Moderní chromatografy jsou však pravidelně vybaveny integrátorem plochy píků, jenž je dnes často součástí řídicího počítače chromatografu (viz obrázek 4 dle COUFALA, 2004).



Obr. 4 - Kapalinový chromatograf

Dnes již existují plně automatizované HPLC systémy schopné nepřetržitého provozu, kde lze udělat i několik set analýz za 24 hodin (DRBAL a KŘÍŽEK, 1999).

Příklad použití HPLC při analýze ostropestřce

Stanovením silymarinu v semenech ostropestřce HPLC (high performance liquid chromatography) se zabývali i *HAMMOUDA, et al. (1992)*, když sledovali účinnost odlišných vodních režimů a odlišných dávek dusíkatého hnojení na obsah silymarinu v rostlinách pěstovaných na nově zkulturnovaných pustých půdách v Egyptě, za účelem získání nejvyššího silymarinového obsahu v rostlině pro komerční výrobu k farmaceutickému využití. Nejvyšší obsah silymarinu byl získán při hnojení dusíkem při dávce 100, 150 kg/4200 m² a při 60% vodním režimu bez hnojení v porovnání se silymarinem v divoce rostoucích rostlinách.

Příprava vzorků:

Kvantitativní stanovení silymarinu bylo provedeno externí standardní metodou. Kalibrační křivka silybinu A a B jako standardu byla zakreslena s pěti odlišnými množstvími silybinu, které byly vstříknuty do kolony HPLC a vyznačeny ve formě píků. Vstříknutí množství a plochy vrcholu vykazovaly dobrou linearitu a odezvu, faktor (F) byl počítán následující rovnicí: $F = im/Y$, kde *im* je vstříknuté množství a *Y* je plocha vrcholu. Odpovídající faktor byl konstantní pro každé vstříknuté množství a jeho odpovídající plochu vrcholu.

Semena každého zpracovávaného vzorku (100 g) byla rozdrčena a odtučněna petrolejovým etherem (40 - 60° C). Odtučněné vzorky byly sušeny a extrahovány octanem ethylnatým v Soxhletově přístroji až do vyčerpání tekutiny. Extrakty octanu ethylnatého byly odpařovány pod sníženým tlakem do vysušení a rozpuštěny v 10 ml methanolu. Ustálené množství každého preparovaného vzorku bylo analyzováno metodou HPLC, kolona U-bondapak C-18 (3,9 nm x 30 cm) s rychlostí toku 1,5 ml.min⁻¹. Vrcholy flavonolignanů byly zaznamenány UV detekcí při 288 nm. Rozpouštědlem byl lineární gradient 15 minut 35% - 50% čerpadlo A, poté 5 minut, kde čerpadlo A bylo 5% AcOH v MeOH a čerpadlo B bylo 5% AcOH ve vodě. Reprodukovatelnost metod byla dosažena vstříknutím dvojitého množství HPLC, ze kterého byl vzat průměr hodnot. Procentický podíl každé složky silymarinové skupiny v extraktu octanu ethylnatého (Z) byl počítán užitím následující rovnice: $Z = 100 (F \times Y) / \text{koncentrace extraktu vzorku}$.

Metodou HPLC se při stanovování obsahu účinných látek ostropestřce zabýval v roce 2001 například i ruský vědecký tým *MINAKHMETOV, et al.*

2.5.1.2. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

TLC je jednoduchá, rychlá a často používaná metoda, se kterou se dají realizovat všechny metody kapalinové chromatografie.

Na tenké vrstvě je podstatně méně stacionární fáze, a tudíž analýza na tenké vrstvě může být velmi rychlá v porovnání s kolonou. Všechny nanesené látky se musí objevit mezi startem a čelem rozpouštědla; nic nemůže zůstat v koloně (COUFAL, 2004).

Stacionární fází je tenká vrstva sorbentu nanesená na vhodnou podložku z inertního materiálu (sklo, kovová fólie) (KOPŘIVA, 2002). Používají se prakticky všechny stacionární fáze jako pro kolonovou chromatografii se zrnitostí 5 až 40 μm (oxid hlinitý, silikagel, celulóza, iontoměniče, polyamid a silikagel s -C18, -NH₂ nebo -CN skupinami). Vzorky rozpuštěné v těkavém rozpouštědle se nanáší ve formě malé kulaté skvrnky na start (COUFAL, 2004), který je na desce předem vyznačený (KOPŘIVA, 2002). Nanášíme 0,1% až 5% roztoky v množství 200 nl až 20 μl do skvrn o průměru 2 až 6 mm (COUFAL, 2004).

Po odpaření rozpouštědla se deska umístí do chromatografické komory, do níž se předem umístí určité množství mobilní fáze a komora se nechá saturovat parami rozpouštědel (DRBAL a KŘÍŽEK, 1999). Mobilní fáze (cyclohexan, toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, ethanol, methanol, voda, amoniak, kyselina octová a jejich směsi) unáší dělené látky ze vzorku, které se více či méně zpožďují interakcí (rozpuštění nebo adsorpce) se stacionární fází, a tím se vzájemně dělí (KOPŘIVA, 2002).

Vyvíjení chromatogramů u TLC se obvykle provádí vzestupně, tzn. že okraj desky se ponoří do rozpouštědla šikmo tak, aby skvrna vzorku (start) byla nad jeho hladinou. Rozpouštědlo vzlíná vrstvou sorbentu a unáší s sebou dělené složky (DRBAL a KŘÍŽEK, 1999), jejichž pohyb je zbrzděn v souladu s hodnotami distribučních konstant (KOPŘIVA, 2002).

Vyvíjení se ukončí vybráním chromatogramu z vyvíjecí komory, když čelo mobilní fáze dosáhne téměř protilehlého okraje tenké vrstvy (COUFAL, 2004). Chromatogram se vysuší a vhodným způsobem detekce se zjistí, kam doputovaly látky obsažené ve vzorku.

Detekce probíhá nejčastěji vybarvením skvrn jednotlivých složek po nástřiku chromatogramu vhodným činidlem (reakce s H₂SO₄, KMnO₄, K₂Cr₂O₇), nebo prohlížením chromatogramu v ultrafialovém světle či jinou technikou (DRBAL a KŘÍŽEK, 1999).

Kvalitativní vyhodnocování chromatogramu se provádí změřením hodnot jednotlivých složek tzv. retardačním faktorem (R_F) a jejich porovnáním se standardními vzorky chromatografovanými za stejných podmínek, viz obrázek 5 (COUFAL, 2004).

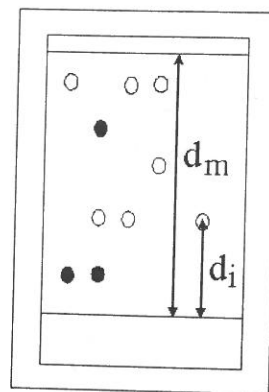
$$R_{F,i} = \frac{u_i}{u_m} = \frac{d_i}{d_m} = \frac{1}{1+k_i}$$

u_i = rychlost skvrny i-tého analytu

u_m = rychlost (čela) mobilní fáze

d_i = vzdálenost středu skvrny i-tého analytu od startu

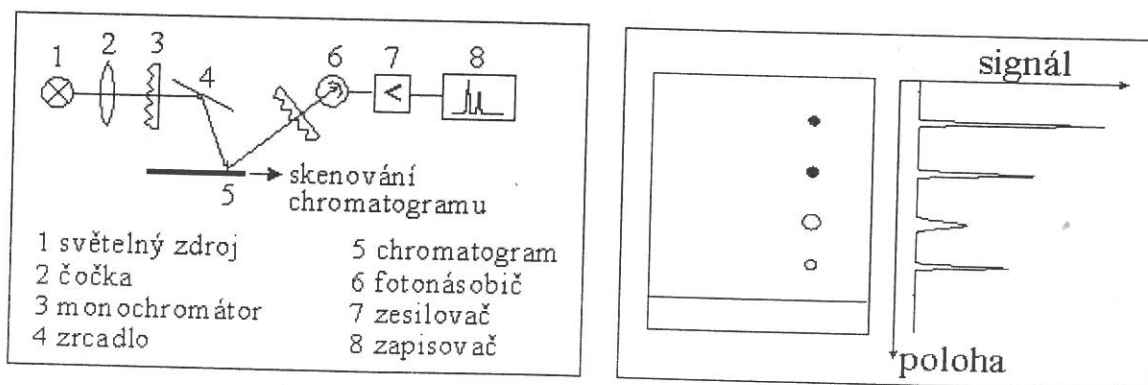
d_m = vzdálenost čela mobilní fáze od startu



Obr. 5 – Měření hodnot retardačním faktorem

Kvalitativní vyhodnocování je možno provádět několika způsoby, z nichž nejjednodušší je vizuální porovnání velikosti skvrn stanovené složky ve vzorku a ve standardu. Jinou možností je vymytí skvrn jednotlivých složek a použití ke stanovení některé z technik kvantitativní analýzy (např. fotometrie) (DRBAL a KRÍŽEK, 1999).

Analyty můžeme stanovit přímo na chromatogramu pomocí fotodozimetru (densitometru), který nám převede skvrny analytů na chromatogram s píky, jejichž plocha je úměrná množství příslušného analytu ve skvrně, což pro upřesnění zachycuje obrázek 6 (COUFAL, 2004).



Obr. 6 - Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu

Příklad použití TLC při analýze ostropestřce

SPITZOVÁ a PLACR (1994) sledovali vliv desikantů na biologickou hodnotu semen a kvalitu drogy ostropestřce. Metoda stanovení je vypracovaná ve VÚFB Praha. 5 g drogy se jemně umele s 30 g suchého ledu. Poté se mletá droga vloží na 30 min do sušárny vyhřáté na 50 – 60°C. K 1,0 g dobře promísené drogy se přidají 2,0 ml acetonu a třepe se zvolna po dobu 16 hodin.

Na Silufol UV 254 20 x 20 cm se na start vzdálený 15 mm od okraje nanese ve formě příčné čáry délky 20 mm vždy 50,0 µl čirého extraktu spolu se standardy silybinu a silydianinu v koncentraci 16 µg/ml. Vyvíjí se směsí chloroformoctan etylnatý-aceton-kyselina mravenčí (6,5:3,0:0,5:0,4) na přetečení po dobu 150 minut. Skvrny silybinu, silydianinu a silychristinu se zakreslí při 254 nm, vystříhnou, vloží do zábrusových zkumavek, přidá se 75% metanol (8 ml pro skvrnu silybinu u drogy silybinového typu a 4 ml pro skvrnu silydianinu a silychristinu). Třepe se v šikmé poloze po dobu 60 minut.

K 0,3 ml eluátu se přidá 1,0 ml diazotované kyseliny sulfanilové (k 50 ml 0,1% kyseliny sulfanilové v 0,1 mol/l HCl se v čase potřeby přidá 2,5 ml 20% NaNO₂ a protřepe se) a přidá 1,0 ml pufru (42 g H₃BO₃ + 22,4 g NaOH v 1 000 ml), protřepe se a po 30 min se přidá 1,0 ml 4mol/l HCl. Protřepe se a po 30 min se měří absorbance při vlnové délce 420 nm proti slepému pokusu připravenému z čistého Silufolu stejné plochy jako skvrna vzorku při dodržení stejného postupu. Množství se odečte z kalibračního grafu.

2.5.1.3. Porovnání užití metody HPLC a TLC při analýze ostropestřce

INDRÁK a CHYTILOVÁ (1992) se rovněž zabývali problematikou stanovení silybininu v droze ostropestřce a došli k závěru, že výsledky metody HPLC a fotometrického stanovení po rozdělení pomocí metody TLC vykazovaly průkazné diference, které mohou být způsobeny mnoha faktory. Jeden z nejvýznamnějších je ten, že při TLC rozdělení nedochází na vrstvě silikagelu k separaci silybinu od isosilybinu, kdežto při stanovení pomocí HPLC ano. Tato chyba může být až 20 %. TLC stanovení vykazují obecně vyšší výsledky než stanovení pomocí HPLC.

Popis metody:

Odvážená semena ostropestřce (5 g) po dobu 3 min chladíme v kapalném dusíku (-196°C) a ihned 3 minuty meleme na tříštivém mlýnku. Takto umletou drogu přesejeme přes síto s otvory

0,40 mesh, sušíme v předeřáté sušárně při teplotě 50 – 60°C po dobu 30 min a navážíme 1 g drogy. V zábrusové baňce k navážce přidáme 2 ml 2% kyseliny vinné, dobře promícháme a ponecháme 1 hodinu stát při laboratorní teplotě. Dále do baňky přidáme 23,0 ml acetonu, zazátkujeme a zábrusovou zátku zafixujeme. Baňku upevníme v třepačce a 16 h třepeme. Po 16 extrakci na třepačce přefiltrujeme alikvótní část extraktu přes mikrofiltr a přímo nastříkneme na kolonu kapalinového chromatografu.

Stanovení silybinu bylo provedeno kapalinovou chromatografií a spektrofotometrickou metodou. Při spektrofotometrické metodě stanovení je nejprve výluh rozdělen na jednotlivé komponenty pomocí chromatografie na tenké vrstvě, zóna odpovídající silybinu je vyextrahována 75 % metanolem, k takto získanému extraktu je přidána diazotovaná kyselina sulfanilová. Vlastní stanovení je provedeno při vlnové délce $\lambda = 420$ nm. U obou metod byla koncentrace silybinu kvantitativně vyhodnocena metodou kalibrační křivky.

Podmínky HPLC: kapalinový chromatograf Spectra-Physics s autosamplerem a smyčkou 10 μ l, mobilní fáze metanol – voda v poměru 1:1 s deseti procenty kyseliny octové, kolona 250 x 4 mm Silasorb C18 (7,5 μ l), UV detekce při 288 nm, průtok mobilní fáze 0,2 ml.min⁻¹.

U TLC stanovení nalezneme vždy vyšší koncentrace silybinu, i když příprava vzorku k analýze jak TLC, tak i HPLC je stejná, protože proběhne reakce mezi diazotovanou kyselinou sulfanilovou a silybinem i isosilybinem, které nejsou na tenké vrstvě rozděleny. U HPLC stanovení odečítáme koncentraci pouze silybinu, resp. Isosilybinu, protože u těchto komponent dojde na koloně k rozdělení a jsou detegovány samostatně.

Vliv na výsledek má rovněž i stupeň umletí semen (rozdíl až 26 %), doba ponechání mleté drogy před další extrakcí (rozdíl až 12 %), způsob utěsnění baňky – vlivem netěsnosti může dojít k částečnému odpaření extrakčního činidla, a tím vlastně k zkoncentrování silybinu (rozdíl až 13 %), způsob extrakce (rozdíl až 7 %) a kvalita použitého extrakčního činidla a standardních látek. Silybin jako hlavní účinná látka ostropestřece je terapeutiky, a tím i komerčně využíván. Proto je rozdíl mezi TLC a HPLC stanovením vzhledem k průměrně 2% koncentraci silybinu v droze dosti podstatný a může činit až 20 %, což je při ceně silybinu značná částka. Statisticky bylo prokázáno, že mezi stanovením metodou HPLC a spektrofotometrickou metodou, po rozdělení na jednotlivé komponenty pomocí TLC, existuje vysoce průkazný rozdíl a pro tento typ analýzy bude nutné používat HPLC metodu stanovení a přísně dodržovat zejména podmínky přípravy vzorku k analýze, které ve většině případů bývají limitujícími faktory přesného stanovení.

2.5.2. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je rychlá, má vysokou rozlišovací schopnost a nízkou spotřebu vzorku (COUFAL, 2004). Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud. Konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu (Pt). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 – 30 kV). Malý objem vzorku se dávkuje do konce kapiláry. Kapilára prochází přes detektor, obvykle fotometrický. Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforegram, je podobný chromatogramu. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků kvantitu.

Je vypracována celá řada separačních technik, které doplňují prostou kapilární elektroforézu o další možnosti. Jednou z nich je i kapilární zónová elektroforéza (*Capillary Zone Electrophoresis*, CZE) neboli kapilární elektroforéza ve volném roztoku (*Free Solution Capillary Electrophoresis*, FSCE) (KLOUDA, 2005).

2.5.2.1. Kapilární zónová elektroforéza

Na principu klasické elektroforézy je založena nová vysoce moderní a perspektivní analytická technika – kapilární zónová elektroforéza (CZE), též nazývaná vysokoúčinná kapilární elektroforéza HPCE. Při CZE jsou rezervoáry s tlumivým roztokem propojeny kapilárou vyplněnou rovněž tlumivým roztokem. Skutečnost, že separace probíhá v uzavřené tenké kapiláře, uděluje elektroforéze v tomto provedení kvalitativně zcela nové vlastnosti. Běžné kapiláry užívané v CZE mají vnitřní průměr 25 – 75 μm a jejich povrch není nijak upravován. Délka kapiláry se pohybuje od 15 cm do 100 cm, je vyrobena ze syntetického křemene a před mechanickým poškozením je chráněna polyimínovým pokryvem. Poblíž katodového konce kapiláry je její vnější polyimínový povrch v délce několika milimetrů odstraněn, tak vzniká okénko, kterým příčně prochází ultrafialové či viditelné záření ze zdroje do detektoru. Nejobvyklejší je fotometrická detekce.

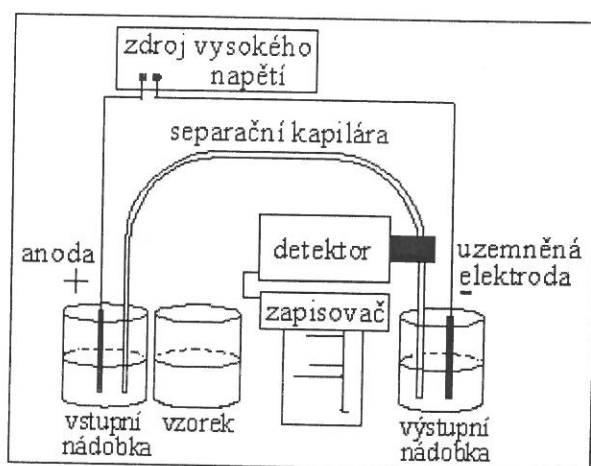
Do kapiláry je na jejím anodovém konci zaveden vzorek (1 – 10 nl). Dávkované množství je tedy přibližně 1000x nižší než u chromatografických metod. Oba konce kapiláry jsou ponořeny do vhodného tlumivého roztoku. Rezervoáry s tlumivým roztokem i vzorkovnice bývají umístěny v karuselech a jsou měnitelné podle předvoleného programu. Vzorek, tlumivý či promývací roztok je do kapiláry nasáván buď přetlakem či pod tlakem na příslušném konci kapiláry, která je

umístěna v termostatovaném prostoru. Stabilita teploty v jejím okolí je velmi důležitá pro reprodukovatelnost analýz. Při 10 – 30 kV zde dochází k elektroosmotickému toku (EOT), kterým jsou jak kationty, tak anionty transportovány směrem k detektoru (DRBAL a KRÍŽEK, 1999).

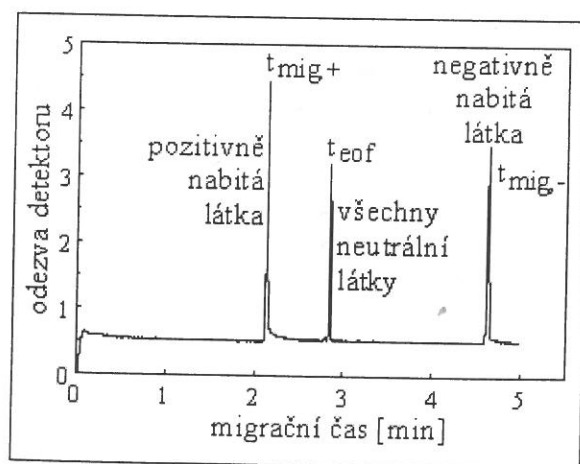
Kapilární zónová elektroforéza dělí molekuly s nábojem (ionty) na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí (mobilit). Elektroosmotický tok separačního pufru uvnitř kapiláry unáší kladné i záporné ionty k detektoru, tyto ionty navíc migrují svými rozdílnými elektroforetickými rychlostmi uvnitř pufru, a tím se vzájemně dělí. Během jednoho experimentu lze dělit a detekovat oba dva druhy iontů (kladné i záporné). Kapilární zónová elektroforéza je použitelná pouze pro nabitě molekuly (ionty) (COUFAL, 2004). O kvalitě dělení rozhoduje zejména délka kapiláry, rychlost EOT, pohyblivost dělených iontů, jež je u protolytů závislá na pH roztoku a teplotě, při níž separace probíhá.

Hlavní výhodou elektroforézy v kapilárním provedení je možnost zvyšovat svorkové napětí přístroje až k hodnotám 30 kV. U běžné elektroforézy by při takovýchto hodnotách napětí došlo k značnému ohřevu tlumivého roztoku. Následné zvýšení difúze a turbulence v roztoku by analýzy zcela znehodnotilo. V CZE je však i při těchto hodnotách vloženého napětí generované teplo odvedeno stěnou kapiláry do okolního termostatovaného prostoru. Rychlost částice je přímo úměrná její pohyblivosti a intenzitě elektrického pole. V CZE jsou proto rychlosti migrujících iontů vyšší oproti klasické elektroforéze (DRBAL a KRÍŽEK, 1999).

Přístroj pro kapilární zónovou elektroforézu zachycuje obrázek 7, závislost odezvy detektoru na čase je znázorněn elektroforegramem na obrázku 8 (COUFAL, 2004).



Obr. 7 – Kapilární zónová elektroforéza



Obr. 8 – Elektroforegram

2.5.2.2. Porovnání užití metody HPLC a CZE při analýze ostropestřce

QUAGLIA, et al. (1999) ve svém referátu podrobně popisují metodiky získávání jednotlivých částí silymarinu z extraktů semen ostropestřce. Všechny extrakty byly analyzovány metodou HPLC a zároveň metodou HPCE (CZE). Účelem bylo vzájemné porovnávání získaných kvantitativních i kvalitativních dat z obou těchto metod a zjištění vhodnosti používání výše uvedených technik. Toto šetření vedlo k závěru, že stanovení silymarinu v semenech ostropestřce metodou HPLC a zároveň metodou HPCE poskytuje podobné výsledky. HPLC navíc umožňuje získat přesnější kvalitativní a kvantitativní analytický profil.

Porovnáním těchto dvou metod při analýze hlavních složek silymarinu se zabývali i *KVASNIČKA, et al. (2003)*. I zde bylo opět prokázáno, že stanovení složek silymarinu v různých vzorcích metodou HPLC a CZE dává srovnatelné výsledky. Vedle porovnání metod HPLC a CZE byly zároveň studovány antioxidační vlastnosti složek silymarinu vyjádřené jako *celkový antioxidační charakter*. Výsledky *celkového antioxidačního charakteru* byly porovnány s elektroferogramem a chromatogramem. Rozdíl mezi elektroferogramem a chromatogramem extraktu silymarinu stejného vzorku dle *KVASNIČKY, et al. (2003)* je znázorněn v příloze 1.

Bylo prokázáno, že metoda HPLC dává nepatrně vyšší celkový obsah flavonolignanů než metoda CZE. Je to způsobeno vyšší úrovní silydianinu a silychristinu nalezenou metodou HPLC v porovnání s CZE. Metodou CZE i HPLC byla nalezena podobná úroveň hlavní složky silymarinu - silybinu. Analýza prováděná metodou CZE je dvakrát kratší než HPLC.

Z výsledků *celkového antioxidačního charakteru* je zřejmé, že antioxidační schopnost je značně proměnlivá pro odlišné vzorky, zatímco pro standardy jako silybin, isosilybin a silydianin je podobná. Porovnání *antioxidační schopnosti* a obsahu identifikovaných flavonolignanů ukazuje, že čím vyšší čistota extraktů ostropestřce, tím nižší antioxidační schopnost. To znamená, že extrakt pravděpodobně obsahuje „nečistoty“ s vyšší antioxidační schopností než zjištěných flavonolignanů.

3. METODIKA – VLASTNÍ POKUS

Dle zadání práce byl ověřován účinek různých elicitorů na obsah některých účinných látek v semenech rostliny ostropestřec mariánský ve smyslu ovlivnění, nejlépe zvýšení, obsahu vybraných účinných látek.

K tomuto účelu byl v roce 2004 zajištěn poloprovozní experiment ve spolupráci se Seva Flora, s. r. o., Valtice. Společnost Seva Flora umožnila na vlastní pěstované ploše ostropestřce vytyčit pro výzkumné účely celkem 26 parcel, z nichž jedna parcela byla kontrolní, tudíž stříkána pouze čistou vodou, a na ostatní parcely bylo následně aplikováno 25 odlišných elicitorů a jejich směsí o různých koncentracích. Aplikace se od růstové fáze rostliny těsně před květem opakovala vždy po dvaceti dnech až do fáze zralosti semen.

Jelikož nemohl být tento experiment z provozních důvodů společnosti Seva Flora Valtice, s.r.o. opakován i v následném roce 2005, nejsou výsledky získané z 26 parcel pro práci stěžejní a jsou uváděny pouze pro bližší představu o možném působení různých elicitorů na obsah účinných látek v semenech ostropestřce. Tyto elicitory představují know how výzkumného kolektivu a jsou součástí patentového řízení, proto není v práci možno uvést jejich jakoukoliv bližší charakteristiku.

Další maloparcelkový pokus byl realizován na zahradě v místě mého bydliště na Benešovsku ve středních Čechách. Zde byl v roce 2004 a následně i v roce 2005 prováděn experiment se třemi různými koncentracemi kyseliny acetylsalicylové a kontrolou.

U obou experimentů byla využita jako osivo směs různých blíže nespecifikovaných odrůd ostropestřce mariánského.

Ze získaných semen takto pěstovaných rostlin ve dvou po sobě následujících letech, byly v laboratořích Katedry chemie ZF JČU v Českých Budějovicích provedeny analýzy obsahu vybraných účinných látek metodou HPLC, na základě kterých následovalo vlastní vyhodnocení dosažených výsledků.

Dílčím cílem práce bylo navrhnout technologii pěstování ostropestřce mariánského na ploše 1 - 5 hektarů včetně ekonomického zhodnocení návrhu technologie.

3.1. Poloprovozní experiment

Poloprovozní experiment byl realizován za spolupráce s vedoucím diplomové práce na pěstební ploše, kterou obhospodařovala Seva Flora, s. r. o. působící ve Valticích na Moravě. Na základě informací poskytnutých hlavním agronomem panem Martinem Grbavčicem převažuje v těchto pěstebních podmínkách písčítá půda. Předplodinou ostropestřce byla cibule na konzum, po jejíž sklizni následovala podzimní orba, na jaře smykování. Hnojem na pozemku v minulých letech nebylo hnojeno. Ostropestřec byl v těchto podmínkách vyséván 21. března 2004 neseným secím strojem. Při přípravě pozemku proběhla aplikace Synfloranu ($1,5 \text{ l}\cdot\text{ha}^{-1}$). Po zasetí následovalo zaválení pozemku a aplikace herbicidu Afalon ($1,2 \text{ l}\cdot\text{ha}^{-1}$). Během vegetace byl použit Fusilade na pýr ($3 \text{ l}\cdot\text{ha}^{-1}$).

Na 26 parcelách, kde na jednu parcelu připadalo 10 m^2 , se aplikovaly příslušné elicitory a jejich směsi, a to zádoovým postřikovačem o objemu 10 l. První foliární aplikace elicitoru proběhla 8. června 2004 - porost se nacházel ve fázi těsně před květem. 28. června 2004 následovala druhá aplikace (viz fotodokumentace v příloze 5). Třetí aplikace již realizována nebyla, důvodem byl vysoký stupeň zralosti semen.

Sklizeň semen proběhla 7. srpna 2004. Semena z 26 parcel určených pro výzkumné účely byla sklizena speciálním motorovým vysavačem značky Partner – Tornádo BW 25 (viz fotodokumentace v příloze 5). Tento speciálně uzpůsobený vysavač však může být využit pouze u malopěstitelů, ve velkoplošném pěstování sklizeň probíhá výhradně pomocí techniky používané pro sklizeň obilovin.

3.2. Maloparcelkový experiment

Maloparcelkový experiment byl zajištěn na pěstební ploše v k.ú. Nesvačily, na zahradě č.p. 52, okres Benešov u Prahy. Půda (půdní typ – hnědá půda) je v těchto podmínkách jílovito-hlinitá, poměrně dobře zásobena živinami, každý třetí rok je hnojena hnojem, poté následuje podzimní orba, na jaře smykování.

V průběhu vegetace byly odebrány půdní vzorky ke stanovení půdní zásobenosti živinami.

U odebraných vzorků půdy bližší analýza stanovila:

- výměnnou reakci ve výluhu 1 M KCl $pH_{KCl} = 6,6$ což je půda neutrální
- množství humusu resp. obsah celkového uhlíku $C_{ox} = 2,8 \%$ a to poukazuje na obsah vysoký. Důvodem takto vysokého obsahu je zřejmě předplodina hnojená poměrně vysokou dávkou hnoje kombinovanou s kompostem. Frakcionací a následným zpracováním byly stanoveny humusové látky (HL = 14,1 mg.g⁻¹), fulvokyseliny (FK = 6,9 mg.g⁻¹) a huminové kyseliny (HK = 7,2 mg.g⁻¹). Poměr HK:FK je 1,04.
- měřením potenciálu pomocí iontově selektivní elektrody množství dusičnanového (N-NO₃ = 13,2 mg.g⁻¹) a amonného dusíku (N-NH₄ = 11,2 mg.kg⁻¹) s následným stanovením a výpočtem minerálního (N_{min} = 24,4 mg.kg⁻¹) a mineralizovatelného dusíku (N_{miner} = 17,9 mg.kg⁻¹).
- laboratoří v Jindřichově Hradci množství základních živin v půdě uvedené v tabulce 1.

Tab. 1 - *Obsah základních živin v půdě*

Průměrný obsah živin v půdě				
N _{tot} (%)	P (mg.kg ⁻¹)	K (mg.kg ⁻¹)	Mg (mg.kg ⁻¹)	Ca (mg.kg ⁻¹)
0,18	398	257	156	2977

Z výše uvedeného vyplývá, že půda je poměrně dobře zásobena humusovým materiálem i živinami, a to i bez anorganického hnojení. Předplodinou v roce 2004 i v roce 2005 byly brambory. V průběhu pokusu nedocházelo k přihnojování ani k dalším chemickým zásahům proti chorobám a škůdcům, porost byl ošetřován pouze mechanickým okopáváním, pletím a záhlvkou.

Vlastní aplikace kyseliny acetylsalicylové (dále jen ASA) o třech různých koncentracích ve vodném roztoku byla provedena v roce 2004 ručním postřikovačem o objemu 1 l, v následujícím roce zádočným postřikovačem o objemu 10 l (viz fotodokumentace v příloze 5), vždy po důkladném vypláchnutí postřikovače mezi jednotlivými aplikacemi.

Úbory s plody z jednotlivých rostlin a parcel byly skladovány odděleně v papírových pytlících při pokojové teplotě a následně ručně oddělovány z okvěti a čištěny od chmýru a ostatních nežádoucích příměsí.

3.2.1. Maloparcelkový experiment realizovaný v roce 2004

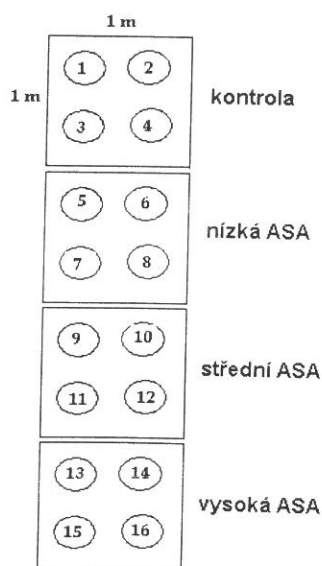
Na přesně rozměřeném pokusném pozemku s urovnaným povrchem byly 22. dubna 2004 založeny 4 pokusné parcelky s rostlinami ostropestřce mariánského. Každá parcelka zaujímala 1 m^2 , zde byla ručně vyseta semena rostliny do přesného sponu $50 \times 50 \text{ cm}$, z čehož vyplývá hustota 4 rostliny na 1 m^2 , hloubka setí 3 cm .

Pro informativní zjištění klíčivosti semen bylo na každé místo vyseto 10 semen, což 15. května 2004 prokázalo 76% klíčivost. Poté byly přebytečné rostliny odstraněny.

Plocha experimentu o rozloze 4 m^2 zahrnovala 16 rostlin, z nichž čtveřice rostlin na prvé parcele sloužila jako kontrola, zbylé parcelky byly pozorovány jako pokusné a ošetřeny příslušnými dávkami elicitoru (ASA) o různé koncentraci. Sled aplikace znázorňuje obrázek 13.

Rovnoměrná aplikace elicitoru (ASA) na parcelky:

- **Kontrola** → 1 l vody
- **Nízká koncentrace** → 1 l vody + 0,01 ml roztoku
- **Střední koncentrace** → 1 l vody + 0,1 ml roztoku
- **Vysoká koncentrace** → 1 l vody + 1 ml roztoku



Obr. 13 – Sled aplikace elicitoru na parcelkách

Foliární aplikace elicitoru ASA byla uskutečněna dle metodiky výše uvedenými dávkami. První postřik proběhl 18. června 2004, tedy v období těsně před květem, v množství vždy 1 litr na 1 m² roztoku elicitoru o požadované koncentraci. Druhé ošetření proběhlo 5. července 2004, třetí 22. července 2004 a poslední, v pořadí čtvrtá aplikace, byla provedena 9. srpna 2004.

Od 5. srpna 2004 začaly plně dozrávat první květy a následovala několikadenní postupná sklizeň. 29. srpna 2004 došlo k totální likvidaci všech rostlin, neboť začaly od spodních částí rychle žloutnout a zasychat, na listech se objevily tmavé skvrny, což bylo nevíce zřetelné na parcele s aplikovanou vysokou koncentrací ASA.

3.2.2. Maloparcelkový experiment realizovaný v roce 2005

Vyměřená plocha pro experiment v roce 2005 zaujímala 35 m². V porovnání s předchozím rokem došlo k navýšení počtu parcelek o velikosti 1 m² ze 4 parcelek na parcelek 12. Toto navýšení zajistilo přesnější výsledky experimentu, neboť jednotlivé varianty aplikace elicitoru byly prováděny vždy ve třech opakováních. Mezi jednotlivými parcelkami byl vynechán 1 metr široký pás z důvodu snazší průchodnosti a možné aplikace elicitorů.

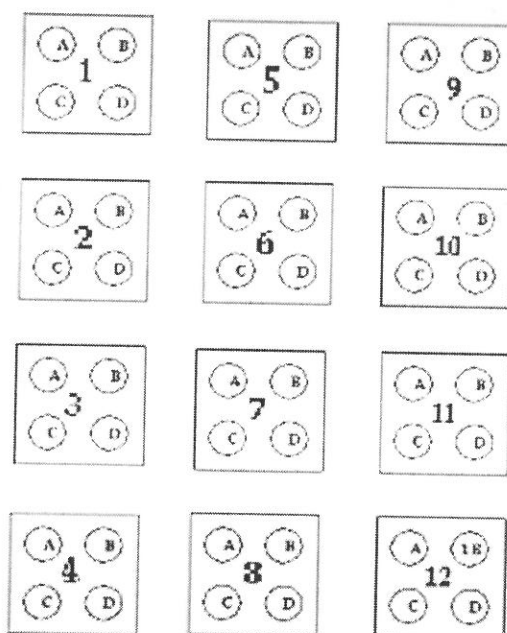
Dne 21. dubna 2004 byla semena rostliny ručně vyseta do přesného sponu 50 x 50 cm, z čehož vyplývá hustota 4 rostliny na 1 m², hloubka setí 3 cm.

Pro oba dva pokusné roky bylo použito shodné osivo. Zkouška klíčivosti prokázala 22. května 70% klíčivost, to značí 6 % pokles klíčivosti semen za rok.

Na celkové ploše experimentu o rozloze 35 m² bylo pozorováno 48 rostlin na 12 parcelkách, z nichž 3 kontrolní parcely zůstaly bez ošetření elicitorem, na zbylé parcelky byly aplikovány příslušné dávky elicitoru (ASA) o různé koncentraci ve vodném roztoku, viz obrázek 14.

Rovnoměrná aplikace elicitoru (ASA) na parcelky:

- **Kontrola** 1, 5, 9 → 5 litrů vody
- **Nízká koncentrace** 2, 6, 10 → 5 litrů vody + 0,05 ml vzorku ASA
- **Střední koncentrace** 3, 7, 11 → 5 litrů vody + 0,5 ml vzorku ASA
- **Vysoká koncentrace** 4, 8, 12 → 5 litrů vody + 5 ml vzorku ASA



Obr. 14 - Sled aplikace elicitoru na parcelkách

Foliární aplikace elicitoru ASA byla uskutečněna podle metodiky výše uvedenými dávkami. První aplikace proběhla těsně před květem 21. června 2005. K druhému ošetření došlo 11. července 2005 a třetí aplikace elicitoru proběhla 1. srpna 2005.

První květy se začaly objevovat 7. července 2005. Postupná sklizeň byla započata 6. srpna 2005. 18. srpna 2005 proběhla totální likvidace celých rostlin i se zbylými nedozrálými květy, což bylo zapříčiněno poměrně velkým a deštivým počasím v měsíci srpnu.

4. VÝSLEDKY

Po provedené analýze extraktů metodou HPLC byly naměřené výsledky vyhodnoceny a statisticky zpracovány.

Obsah sledovaných účinných látek (taxifolin, silychristin, silydianin, silybinin A, silybinin B, isosilybinin A+B) a výnosové prvky pěstovaných rostlin ostropestřce jsou vyjádřeny graficky, včetně tabulkového zpracování. Formou úsečky je zobrazena směrodatná odchylka měření.

4.1. Výsledný obsah účinných látek

4.1.1. Poloprovozní experiment – 2004

Koncentrace účinných látek v semenech ostropestřce mariánského zjištěné u kontrolní skupiny a u vzorků extrahovaných z rostlin, kde byly aplikovány elicitory, jsou shrnuty v tabulce 2 a graficky znázorněny v grafu 1.

Na základě vyhodnocení získaných výsledků ze vzorků semen z 26 parcel je zřejmé, že ve všech případech, s výjimkou aplikace elicitoru číslo 5, došlo k navýšení obsahu účinných látek.

Aplikace elicitoru číslo 4, 5, 11, 18, 20, 22 a 26 se přesto jeví jako neúčinná, neboť tyto elicitory nezpůsobily v porovnání s kontrolou na 5% hladině významnosti statisticky významnou změnu koncentrace účinných látek.

Naopak statistická průkaznost byla zjištěna u parcely číslo 2, 3, 6 – 10, 12 – 17, 19, 21, 23 – 25, kde lze potvrdit pravděpodobný pozitivní vliv působení elicitorů. Procentické vyjádření toto navýšení v případě elicitoru číslo 2, 9, 14, 16 a 23 přesahuje i 40 %.

Jelikož však nemohl být tento experiment z provozních důvodů společnosti Seva Flora Valtice, s.r.o. opakován i v následném roce 2005, nejsou výsledky získané z 26 parcel ověřené opakovaným experimentem, tudíž nejsou pro tuto práci stěžejní.

Tab. 2 – Koncentrace účinných látek po aplikaci elicitorů

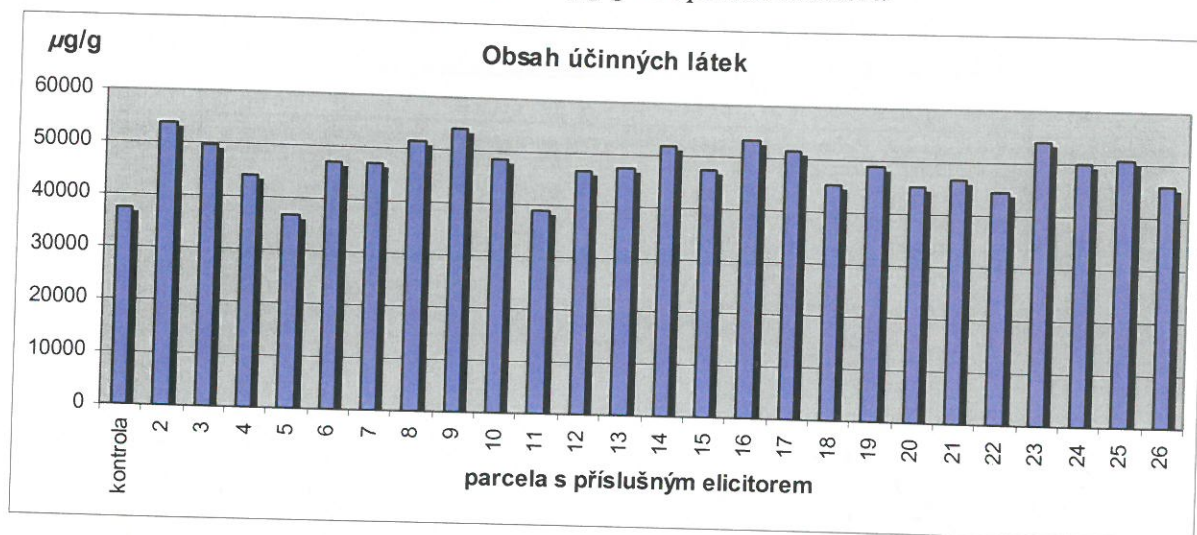
Elicitor	účinné látky ($\mu\text{g/g}$ semene) n = 1	% množství účinných látek	t
kontrola	37265,80	100	0,000
2	53693,50	144	5,200
3	49615,91	133	3,909
4	44009,31	118	2,135
5	36822,08	99	0,140
6	47048,44	126	3,097
7	46876,08	126	3,042
8	51455,27	138	4,491
9	53987,00	145	5,293
10	48629,01	131	3,597
11	39073,87	105	0,573
12	46695,31	125	2,985
13	47291,84	127	3,174
14	52030,55	140	4,674
15	47317,71	127	3,182
16	53267,95	143	5,065
17	51323,63	138	4,450
18	45066,45	121	2,450
19	48752,33	131	3,636
20	45185,51	121	2,507
21	46635,57	125	2,966
22	44590,89	120	2,319
23	54103,50	145	5,330
24	50092,84	134	4,060
25	50698,74	136	4,252
26	46018,53	124	2,771

Pozn.: n = počet vzorků

t = hladina významnosti ($\alpha = 0,05 \rightarrow t_0 = 2,776$)

Je-li $t > t_0 \rightarrow$ statisticky významný rozdíl

Graf 1 – Závislost obsahu účinných látek v $\mu\text{g/g}$ na aplikaci elicitorů



4.1.2. Maloparcelkový experiment - 2004

Koncentrace účinných látek v semenech ostropestřce zjištěné u kontrolní skupiny a u vzorků extrahovaných ze semen rostlin, kde byla aplikována jako elicitor ASA o třech různých koncentracích, jsou shrnuty v tabulce 3 a znázorněny v grafu 2. Graf 3 vyjadřuje procentickou změnu obsahu jednotlivých účinných složek silymarinu a taxifolinu, naměřené hodnoty jednotlivých účinných látek viz příloha 2. Tabulka 4 charakterizuje rostliny a jejich výnosové prvky. Výtěžnost účinných látek z jednotlivých parcel je zachycena v grafu 4.

U maloparcelkového experimentu pro rok 2004 byl po aplikaci elicitoru ASA v **nízké koncentraci** prokázán oproti kontrole nepatrný pokles obsahu účinných látek o necelá 3 %. **Střední koncentrace** ASA hladinu účinných látek mírně zvýšila, a to přibližně o 8 %. Aplikací **vysoké koncentrace** elicitoru ASA došlo opět k poklesu obsahu účinných látek, naměřené hodnoty byly o 15 % nižší než hodnoty prokázané u kontroly.

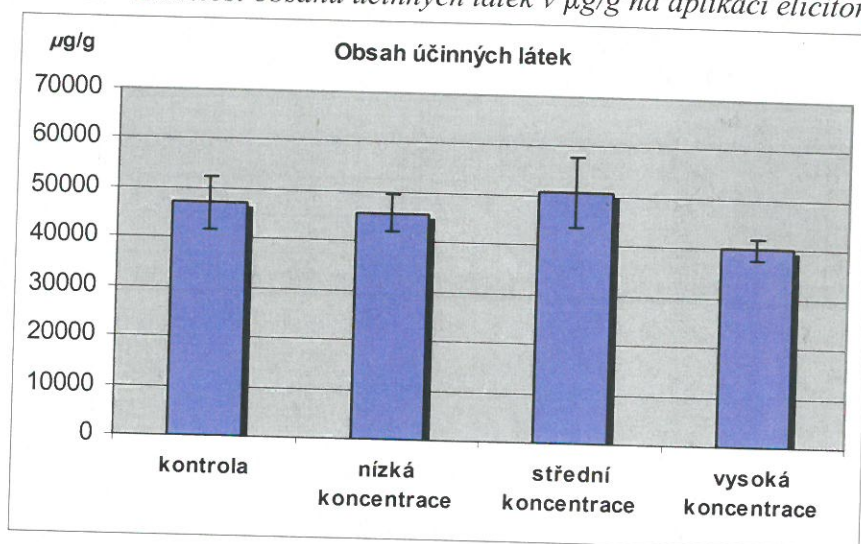
Při celkovém zhodnocení došlo ve všech případech k téměř zanedbatelným změnám hodnot, aplikace elicitoru ASA o třech různých koncentracích se jeví jako neúčinná. Statistická neprůkaznost toho experimentu byla potvrzena posouzením hodnot v Excelu využitím dvouvýběrového t-testu s nerovností rozptylů na 5 % hladině významnosti.

Tab. 3 - Koncentrace účinných látek po aplikaci elicitorů

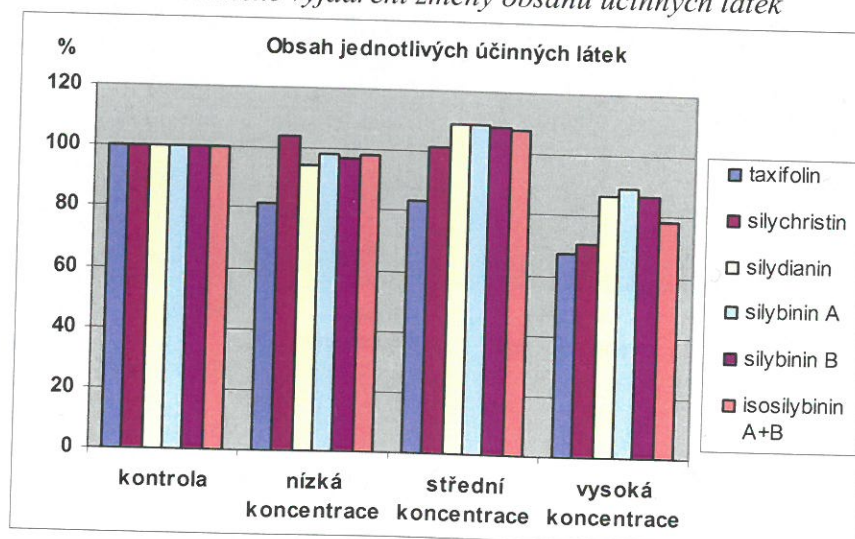
Elicitor	účinné látky ($\mu\text{g/g}$) n = 4	SMODCH	% množství účinných látek
kontrola	47071,17	5334,27	100
nízká ASA	45792,83	3829,54	97,28
střední ASA	50717,38	7132,28	107,75
vysoká ASA	40037,57	2188,76	85,06

Pozn.: n = počet vzorků

Graf 2 – Závislost obsahu účinných látek v $\mu\text{g/g}$ na aplikaci elicitorů



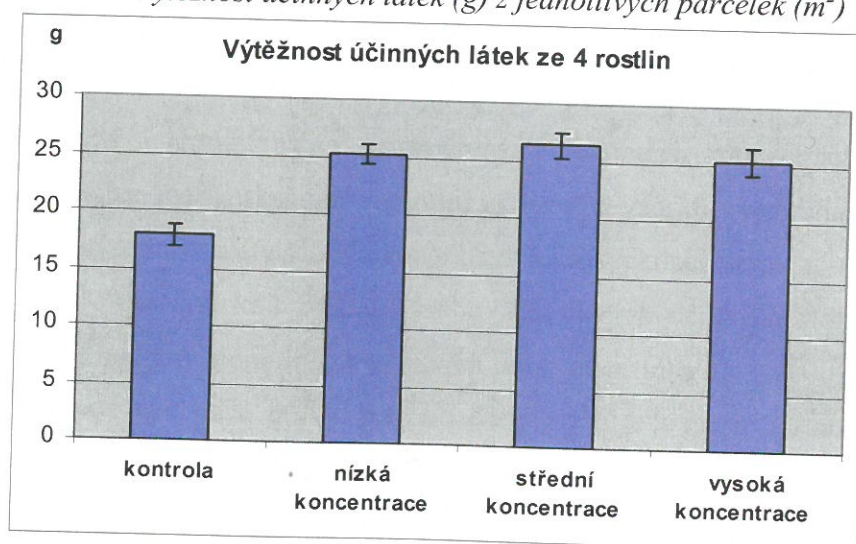
Graf 3 – Procentické vyjádření změny obsahu účinných látek



Tab. 4 – Charakteristika rostlin a výnos semen

rostlina č.	výška (cm)	lodyha +odnože	sklizené květy	hmotnost semen (g)	průměrná hmotnost semen z rostliny (g)	výnos z parcely (g)	nedožralá poupata
1	205	1 + 4	29	80	95	380	10
2	194	1 + 1	24	90			4
3	186	1 + 0	22	90			6
4	217	1 + 7	42	120			16
5	215	1 + 8	42	120	137,5	550	11
6	226	1 + 7	49	140			11
7	240	1 + 6	53	160			22
8	205	1 + 10	40	130			20
9	228	1 + 9	40	130	130	520	22
10	246	1 + 12	44	140			33
11	226	1 + 6	43	120			17
12	242	1 + 7	37	130			32
13	212	1 + 11	51	150	157,5	630	30
14	224	1 + 14	53	180			30
15	222	1 + 12	51	170			33
16	210	1 + 8	36	130			12

Graf 4 – Výtěžnost účinných látek (g) z jednotlivých parcel (m²)



4.1.2. Maloparcelkový experiment - 2005

U opakovaného maloparcelkového experimentu v následném roce 2005 bylo zjištěno, že aplikací elicitoru ASA v **nízké koncentraci** došlo oproti kontrole k nepatrnému snížení obsahu účinných látek o necelá 0,5 %. Tento výsledek odpovídá výsledku získanému v roce 2004, tedy nebyla prokázána žádná podstatná změna.

Významnější nárůst obsahu účinných látek v porovnání s kontrolou přibližně o 22,5 % způsobila aplikace **střední koncentrace** ASA, což značí i 15 % nárůst oproti navýšení u střední koncentrace v roce předešlém.

Aplikací **vysoké koncentrace** elicitoru ASA došlo k téměř 43% poklesu obsahu účinných látek. Tímto zjištěním byl pokles u vysoké koncentrace prokázán stejně výrazně jako u experimentu v roce předcházejícím.

Při celkovém zhodnocení nastaly po všech aplikacích elicitoru ASA menší i výraznější poklesy či navýšení hodnot. Statistická průkaznost na 5% hladině významnosti dvouvýběrovým t-testem s nerovností rozptylů programu Excel však nebyla prokázána, a to ani v případě aplikace vysoké koncentrace elicitoru ASA, kde došlo oproti kontrole k nežádoucímu přibližně 43 % poklesu obsahu účinných látek. Tuto statistickou neprůkaznost lze odůvodnit velkou rozdílností hodnot, kterou vykazují jednotlivé analyzované vzorky semen z parcel ošetřených shodnými koncentracemi elicitoru.

Tabulka 5 a graf 5 shrnují údaje o naměřených hodnotách koncentrací účinných látek v semenech ostropestřce mariánského u kontrolní skupiny a vzorků vyextrahovaných z rostlin, které byly ošetřeny kyselinou acetylsalicylovou o třech různých koncentracích.

Graf 6 vyjadřuje procentickou změnu obsahu jednotlivých účinných složek silymarinu a taxifolinu, naměřené hodnoty jednotlivých účinných látek viz příloha 3.

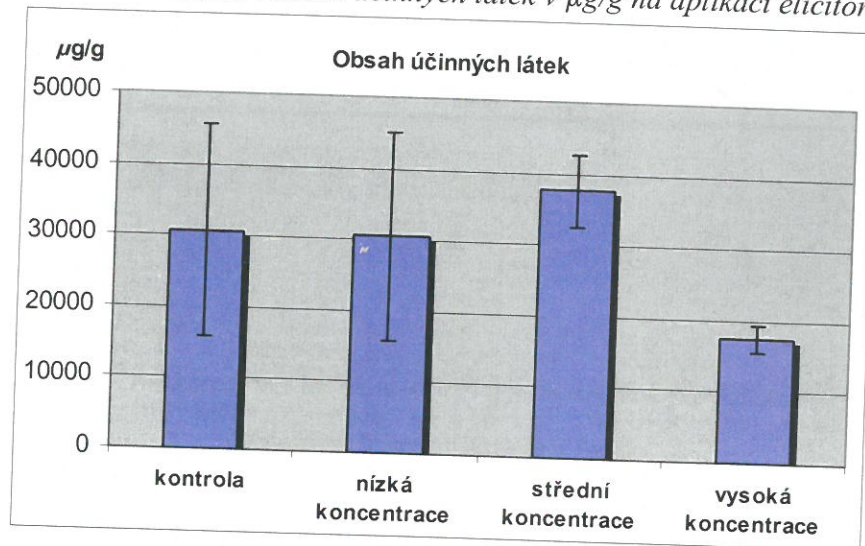
Tabulka 6 shrnuje výnosové prvky, na základě kterých je v grafu 7 stanovena výtěžnost účinných látek.

Tab. 5 – Koncentrace účinných látek po aplikaci elicitorů

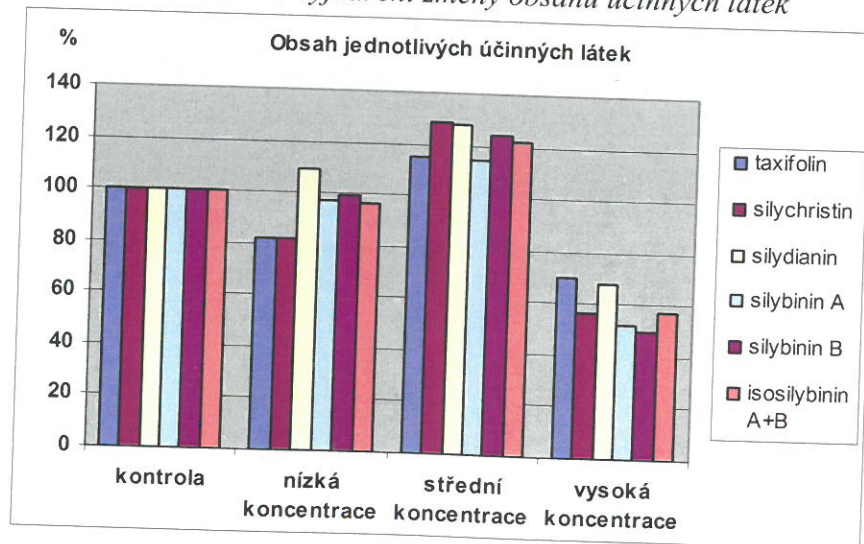
Elicitor	účinné látky ($\mu\text{g/g}$) n = 3	SMODCH	% množství účinných látek
kontrola	30 705,92	14 861,21	100
nízká ASA	30 513,25	14 600,09	99,37
střední ASA	37 627,45	5 044,92	122,54
vysoká ASA	17 504,97	1 851,10	57,01

Pozn.: n = počet vzorků

Graf 5 - Závislost obsahu účinných látek v $\mu\text{g/g}$ na aplikaci elicitorů



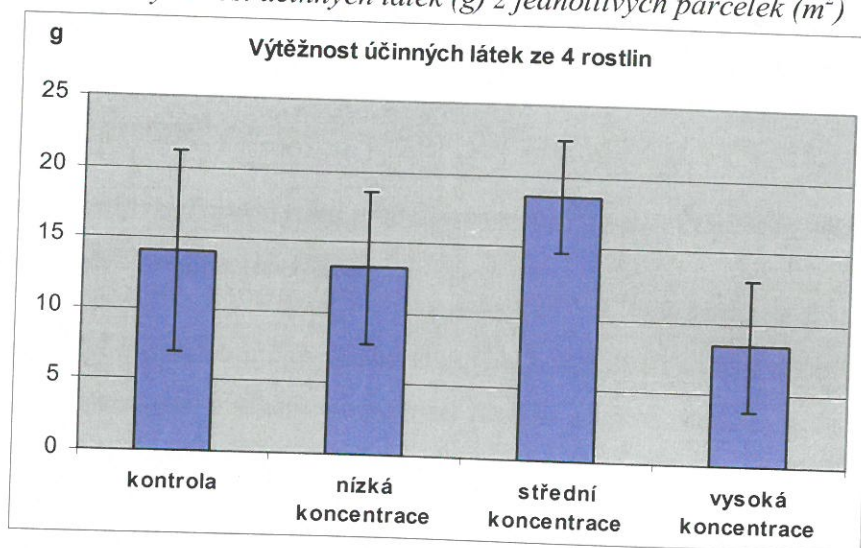
Graf 6 – Procentické vyjádření změny obsahu účinných látek



Tab. 6 – Počet květů a výnos semen z parcelky

parcela č.	sklizené květy	výnos z parcel (g)	průměrná hmotnost semen z rostliny (g)	průměrný výnos z parcely (g)	nedožralá poupata
1	118	400	100	460	152
5	138	460	115		131
9	170	520	130		107
2	145	480	120	433	164
6	120	400	100		101
10	120	420	105		142
3	128	440	110	493	106
7	140	480	120		122
11	160	560	140		117
4	180	520	130	480	126
8	138	480	120		119
12	130	440	110		132

Graf 7 - Výtěžnost účinných látek (g) z jednotlivých parcel (m²)



4.1.3. Zhodnocení výnosových prvků maloparcelkových experimentů

Maloparcelkový experiment 2004

Rostliny ostropestřce mariánského číslo 1 – 4 rostly v polostínu, což je ve srovnání s ostatními rostlinami nejpravděpodobnější příčinou celkově nižšího vzrůstu rostlin a z toho vyplývajícího nejnižšího výnosu semen.

U všech rostlin bylo od počátku dozrávání semen zaznamenáno postupné zasychání a odumírání listů, tento jev byl nejvíce zřetelný na rostlinách po aplikaci elicitoru o nejvyšší koncentraci ASA. V době totální likvidace na konci srpna měly rostliny pouze minimum zelených listů, z tohoto důvodu nedozrála zbylá poupata.

Na základě dosažených výnosů z 1 m² lze při zachování stejné hustoty porostu stanovit teoretický maximální možný hektarový výnos, a to v rozmezí 3,8 – 6,3 t. Způsob postupné ruční sklizně s minimálními ztrátami je však ve velkoplošném pěstování nereálný, proto je v praxi běžně dosahováno několikanásobně nižšího výnosu - je uváděno 0,8 - 1,2 t.ha⁻¹.

Maloparcelkový experiment 2005

Počet parcel i rostlin byl oproti roku předcházejícímu podstatně navýšen, tudíž nebylo možné sledovat výnosové prvky rostlin jednotlivě.

V důsledku častého deště a méně příznivého počasí v letních měsících výnos semen v roce 2005 dosahoval v porovnání s rokem předešlým nižších hodnot. Podstatná část semen nebyla sklizena, neboť v poupatech vlivem nepřízně počasí zplesnivěla.

Zhoršené podmínky způsobené nepřízní počasí se rovněž promítly v nižší výtěžnosti obsahu účinných látek (viz graf 7), která oproti předešlému roku poklesla přibližně o 20 000 µg.g⁻¹.

Z dosažených výnosů z 1 m² lze na základě experimentu teoretický maximální možný výnos stanovit na 4,6 – 4,9 t.ha⁻¹.

4.2. Technologický návrh pěstování ostropestřce mariánského

Přes provedená šetření v odborné literatuře, která jsou podrobněji uvedena v kapitole 2.2., se názory na pěstování a optimální agrotechniku ostropestřce mariánského i ve srovnatelných podmínkách u mnoha autorů různí. Návrh technologie je tudíž pouze jedním z několika možných přijatelných řešení pěstování ostropestřce vyhovující především podmínkám pěstování naší republiky. Volba metodiky pěstování ostropestřce z velké části závisí na pěstebních podmínkách, ale i na způsobu hospodaření a finančních možnostech pěstitele.

4.2.1. Výběr pozemku a příprava půdy na podzim

U ostropestřce mariánského jsou velmi důležité agroekologické podmínky pěstování, i když je z hlediska půdních podmínek relativně adaptabilní a vyhovující jsou široké klimatické podmínky naší republiky. Ekonomicky a agronomicky je výhodnější ostropestřec sít do hlubších hlinitých půd s velmi dobrou zásobeností živin, a to především v zemědělské výrobní oblasti řepařské nebo obilnářské.

Zpracování půdy by mělo být započato včasnou a kvalitní podmínkou po sklizené předplodině. Před zimou by měla následovat hluboká orba (0,25 - 0,30 m). U možností-li to možnosti pěstitele, je k ostropestřci hlubokou orbou vhodné zapravení organického hnojení. Hnůj má na růst kultury pozitivní účinky a může být významným přínosem ke stabilizaci úrody.

Pro podmínky ČR je některými autory doporučeno aplikovat na podzim na 1 hektar asi 200 kg NPK, neboť toto hnojivo udržuje půdu v dobrém výživném stavu, avšak jiní autoři se domnívají, že těmito živinami rostlinu nehnojíme, ale usilujeme o vytvoření trvalé optimální hladiny živin v půdě.

Experimentální výsledky různých autorů potvrzují, že množství srážek během kritického období má mnohem větší vliv na výnos plodů ostropestřce než běžné půdní podmínky a hnojení.

Na základě výše uvedených skutečností lze předpokládat, že je ostropestřec mariánský možno úspěšně pěstovat *intenzivním*, ale i *extenzivním* způsobem.

4.2.2. Jarní příprava půdy, aplikace hnojiv, ochrana proti plevelům

Při intenzivním způsobu pěstování bývá jarní předset'ová příprava půdy většinou spojena se zapravením průmyslových hnojiv. Hnojení průmyslovými hnojivy, aplikace herbicidů a další agrotechnické zásahy musí být pečlivě voleny a registrovány s přihlédnutím na sklizeň kvalitní drogy. Povoleny jsou pouze některé přípravky.

K ostropestřci se v jarním období dle potřeby aplikují především dusíkatá hnojiva. Jedním z hnojiv, které je vhodné aplikovat před setím je dusičnan amonný. **Dusičnan amonný** obsahuje 34 až 35 % N, z toho polovinu v nitrátové a polovinu v amonné formě. Používá se k jarnímu regeneračnímu přihnojování ozimů a k jarnímu produkčnímu přihnojování. Pokud je to možné, doporučuje se hnojivo zapravovat do půdy. Dusičnan amonný je velmi dobře rozpustný, a proto je vhodný k přípravě vlastních kapalných hnojiv v zemědělském podniku. Doporučená dávka pro ostropestřec je $150 - 200 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$.

Jako nejvhodnější způsob hubení plevelů v ostropestřci se jeví použití povolených přípravků na bázi účinné látky trifluralinu. Mezi tyto přípravky patří: Synfloran 48 EC, dále Treflan 48 EC a Triflurex 48 EC. Přípravek **Synfloran 48 EC** je vysoce selektivní přípravek, určený k hubení jednoletých trávovitých a jednoletých dvouděložných plevelů. Synfloran 48 EC zabraňuje klíčení semen plevelů v půdě. Nepůsobí na vzešlé plevele. Přípravek se k ostropestřci aplikuje předset'ově bez zapravení či se zapravením do půdy. Herbicidní účinnost není závislá na půdní vlhkosti a dešťových srážkách. Doporučená dávka pro ostropestřec je $1,5 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$.

Zcela jiná situace panuje u extenzivního způsobu pěstování ostropestřce mariánského, kdy při jarní předset'ové přípravě veškeré aplikace průmyslových hnojiv a chemických prostředků proti plevelům vynecháváme.

4.2.3. Setí

Jako nejvýhodnější termín setí se dle klimatických regionů jeví agrotechnická lhůta mezi 15. – 25. dubnem. Včasný výsev je nejúčinnější ochranou před některými chorobami a zajišťuje dostatek vláhy pro počáteční růst.

Výsev se provádí do širokých řádků přesným secím strojem. Spon se pohybuje v rozmezí 0,30 x 0,30 m až 0,40 x 0,40 m. Na 1 m² by mělo být 6 – 12 jedinců, tj. 60 – 120 000 rostlin na 1 ha. Výsev závisí na aktuální klíčivosti a pohybuje se mezi 5 - 8 kg.ha⁻¹.

Hloubka výsevu je přibližně 2 – 3 cm. Válení se provádí pouze u opožděných výsevů.

4.2.4. Ošetřování porostu během vegetace

Ošetřování porostu ostropestřce během vegetace zahrnuje při intenzivním způsobu pěstování především přihnojení dusíkatými hnojivy a postřiky proti plevelům.

Pokud bylo aplikováno dusíkaté hnojivo před setím ostropestřce, jeho aplikace se již těsně po zasetí nebo v průběhu vegetace zpravidla neopakuje.

Ačkoliv má ostropestřec velmi dobrou konkurenční schopností vůči plevelům, při intenzivní výrobě však boj proti plevelům vynechat nelze. Mechanická kultivace meziřádků je ve velkoplošných podmínkách často hůře proveditelná, proto je i během vegetace v hojné míře využívána především herbicidní ochrana.

Pro zvýšení herbicidní účinnosti na dvouděložné plevele vzcházející na podzim jsou vhodné kombinace Synfloranu 48 EC aplikovaného před setím s přípravkem **Afalon 45 SC**. Účinná látka je zde 450 g linuronu v 1 litru přípravku. Afalon 45 SC je selektivní herbicid přijímaný rostlinami přes kořeny a listy. Příznaky působení se projevují žloutnutím a později uhynutím plevelů. Délka účinku závisí na použité dávce, druhu půdy, srážek a trvá 3-4 měsíce. Afalon je vhodné aplikovat i hned po zasetí v doporučené dávce **1 l.ha⁻¹**.

Jelikož ani jeden z přípravků nepůsobí na hlubokokořenicí plevele, mezi které se řadí například pcháč oset, svlačec rolní a pýr plazivý, lze jako selektivní postřikový herbicid určený k postemergentnímu hubení jednoděložných jednoletých a vytrvalých plevelů použít **Agil 100 EC** v doporučené dávce **1,2 l.ha⁻¹**. Účinná látka přípravku propaquizalop je trávami rychle absorbována a uvnitř rostlin systémově rozváděna do listů, stonků, stolonů, oddenků, rhizomů a kořenů. Plevelné trávy ošetřené přípravkem Agil 100 EC již 1 - 2 dny po aplikaci zastavují svůj růst a vývoj. Oddenky pýru plazivého a víceletých trav hnědnou směrem od špiček, postupně odumírají a rozkládají se.

Ostropestřec lze pěstovat *extenzivním způsobem* i vzhledem ke své velmi dobré konkurenční schopnosti vůči plevelům. K ničení plevelů by zde měla být využívána dle potřeby mechanická kultivace meziřádků, obvykle ve fázi okolo 6 pravých listů. Při silném zaplevelení je vhodné plečkování již v počátečních fázích vývoje kultury. Po zapojení vyrovnaného, nemezerovitého porostu je růst jednoletých plevelů prakticky vyloučen. Jde tedy o to, udržet kulturu po dva měsíce čistou, než se porost zapojí.

4.2.5. Sklizeň

Sklizeň je nejnáročnějším úkonem pěstování ostropestřce, neboť limituje výnos i kvalitu drogy. Situaci komplikuje nerovnoměrné dozrávání semen a skutečnost, že obsah účinných látek v tzv. silymarinovém komplexu, stejně jako biologická hodnota, závisí na stupni vyžrání semen. Sklízet lze pomocí techniky používané pro sklizeň obilovin.

Termín sklizně musí být kompromisem mezi stupněm vyžrání semen a velikostí sklizňových ztrát. V omezených případech lze využít před sklizní při *intenzivním způsobu pěstování* desikaci, což je pro *extenzivním způsob pěstování* pochopitelně vyloučeno.

Provizorním řešením, které je však možno uplatit pouze na malých pozemcích, je motorový vysavač Partner – Tornádo BW 25 (viz fotodokumentace v příloze 5). Ve velkoplošném pěstování se sklizeň provádí výlučně vhodně upraveným kombajnem pro sklizeň obilovin.

4.3. Ekonomické zhodnocení navrhované technologie

Rozsah pěstování rostlin ostropestřce v provozních podmínkách závisí na odbytových možnostech a především na nákupních cenách, za které je rostlinná hmota vykupována od pěstitelů. Údaje o cenách jsou však velice problematičtě dostupné.

Ekonomické výsledky výroby ostropestřce jsou obecně závislé na vztahu mezi nabídkou a poptávkou. K základním faktorům působícím na straně nabídky, tzn. na straně pěstitelů, patří plocha ostropestřce, jeho hektarový výnos a z něho podíl ostropestřce požadované kvality. Další jsou velikost nákladů na hektar a zisk požadovaný pěstiteli z hektaru nebo z jedné tuny.

Pěstitelé mají samozřejmě snahu realizovat co nejvyšší podíl ostropestřce za co nejvyšší cenu. Neodvratně dochází k neustálému vzestupu cen průmyslových hnojiv, přípravků na ochranu rostlin, pohonných hmot, energie, rozšiřuje se nasazení nových strojů s vyššími pořizovacími cenami, stejně tak nejsou zanedbatelnými položkami finanční náklady související s daněmi a poplatky. Je tedy zřejmé, že snahou pěstitele je regulovat (minimalizovat) úroveň nákladů na hektar, a to snížením naturální potřeby především hnojiv a chemických ochranných přípravků, případně vypouštěním nebo spojováním některých pracovních operací. Podstatným hlediskem při pěstování ostropestřce je rovněž i přihlídnutí k výši možných podpor získaných od státu.

V dostupné literatuře domácích autorů se ekonomikou pěstování zabýval pouze *KUBÍNEK*, a to již v roce 1987. Tehdy uváděl jako průměrný výnos $0,75 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. V optimálních podmínkách bylo možno docílit výnosů i přes $1,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Celkové náklady na 1 ha kultury byly odhadovány ve výši 5 – 7 tisíc Kč. Při ceně 21 Kč za 1 kg drogy I. jakosti, kterou bylo snadno docílit, a průměrném výnosu činil zisk asi $10\,000 \text{ Kč}\cdot\text{ha}^{-1}$. Při výnosu $0,4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ odpovídal zisk pšenici a ječmeni s výnosy nad $4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Pracnost není o mnoho vyšší než u těchto obilovin.

V posledních letech se žádný z dostupných autorů této problematice nevěnoval, proto byla v práci dále provedena orientační finanční kalkulace na výrobu a realizaci drogy ostropestřce. Ekonomické zhodnocení navrhovaných technologií pěstování bylo stanoveno na základě normativů jednotlivých pracovních operací, jež jsou uvedeny v publikaci Normativy pro zemědělskou a potravinářskou výrobu vydané MZe ČR v roce 2003. Zároveň bylo přihlídnuto k získání možné finanční podpory od státu.

4.3.1. Současná dotační politika podporující pěstování léčivých rostlin

V současné době poskytuje dotační politika MZe ČR prostor pro podporu pěstování léčivých rostlin těmito prostředky:

➤ **Přímé platby – platba na plochu; „top-up“ národní doplňkové platby**

Principem reformy Společné zemědělské politiky EU je odpoutání plateb od produkce (decoupling) s tím, že členské státy mohou rozhodnout u některých plateb o plném nebo částečném spojení některých přímých plateb s produkcí. V ČR je prozatím od roku 2004 na tři roky s možností prodloužení zaveden tzv. **SAPS** (zjednodušený systém platby na plochu).

Doplňkové platby „top-up“ se týkají v rostlinné výrobě pouze rostlin pěstovaných na orné půdě jmenovitě uvedených ve stanoveném seznamu plodin.

➤ **Operační program „Rozvoj multifunkčního zemědělství“**

Dále mají pěstitelé a zpracovatelé léčivých rostlin možnost čerpat od roku 2004 finanční prostředky na základě podpůrných opatření Operačního programu „Rozvoj venkova a multifunkční zemědělství“, který je směřován především na podporu zemědělské prvovýroby a zpracování zemědělských produktů, podporu lesního a vodního hospodářství a zajištění trvale udržitelného rozvoje venkova. Operační program navazuje na program SAPARD, stejně jako u něj je potřeba k získání finančních prostředků předložit projekt, který je po schválení spolufinancován zhruba z 50 % u projektů přinášejících zisk a ze 100 % u neziskových projektů z unijních prostředků, konkrétně z orientační sekce EAGGF a z FIG.

Výběr opatření a některých podopatření, které skrývají prostor pro pěstitelé léčivých rostlin:

- investice do zemědělského majetku zemědělských podniků
- investice do zemědělského majetku a podpora začínajícím zemědělcům (zavedení technologií nezatažujících životní prostředí, zemědělské stroje)
- prohloubení diverzifikace zemědělských činností (podporu lze poskytnout na výrobu, zpracování a přímý prodej zemědělských výrobků. Předmětem podpory může být též výroba a zpracování nepotravinářských zemědělských výrobků a jejich uvádění na trh.)

➤ **Program HRDP „Horizontální plán rozvoje venkova“**

Od roku 1998 podporuje Ministerstvo zemědělství tzv. mimoprodukční funkce zemědělství. Podporuje se především hospodaření zemědělců v méně příznivých oblastech, ve zvláště chráněných územích, péče údržba krajiny pastvou hospodářských zvířat, ekologické zemědělství, zatravnování, zalesňování nebo pěstování rychle rostoucích dřevin.

Výběr opatření a některých podopatření, která skrývají prostor pěstitelům léčivých rostlin:

- předčasné ukončení zemědělské činnosti
- méně příznivé oblasti a oblasti s environmentálními omezeními
- agroenvironmentální opatření (ekologické zemědělství, ošetřování travních porostů, zatravnování orné půdy, tvorba travnatých pásů na svažitéch půdách, pěstování meziplodin, trvale podmáčené louky a rašelinné louky, ptačí lokality na travních porostech, biopásy, osevní postup v ochranných zónách jeskyní)

➤ **Národní podpory „state-aid“**

Národní podpory jsou účelové programy, sloužící k podpoře restrukturalizace a zvýšení konkurenceschopnosti českého agrárního sektoru. Některé z nich byly zrušeny dnem našeho vstupu do EU, ostatní, které jsou kompatibilní s právním řádem EU budou zachovány.

V současnosti mohou pěstitelé léčivých rostlin využít například tyto dotační tituly:

- podpora komplexní sklizně máku setého
- podpora ozdravování polních a speciálních plodin
- speciální poradenství pro rostlinou výrobu
- podpora poradenství v zemědělství

➤ **Podpůrný a garanční rolnický a lesnický fond PGRLF**

Dalším zdrojem, ze kterého jsou vypláceny národní podpory je PGRLF. Jeho hlavní činností je poskytování podpor ve formě dotací části úroků z úvěru a garancí části jistiny úvěrů na ekonomicky návratné podnikatelské záměry subjektů z resortu zemědělství.

4.3.2. Ekonomické kalkulace navrhovaných technologií pěstování

4.3.2.1. Intenzivní způsob pěstování

V prvním případě ekonomické kalkulace je brána v potaz skutečnost, že by se pěstováním ostropestřce zabýval intenzivně hospodařící zemědělský subjekt, který vlastní veškerou technickou základnu. Uvažovaná výměra porostu je 1 - 5 hektarů.

Ekonomické zhodnocení navrhované technologie pěstování ostropestřce bylo provedeno na základě normativů jednotlivých pracovních operací, jež jsou uvedeny v publikaci Normativy pro zemědělskou a potravinářskou výrobu vydané MZe ČR v roce 2003. Na základě norem a cen byly nejprve stanoveny náklady prací a výkonů na jednotlivé operace prováděné při pěstování, viz tabulka 7. Náklady na osiva a výkupní ceny ostropestřce byly uvedeny dle informací získaných od agronoma pana Grbavčice ze Seva Flora Valtice, s.r.o. Hnojiva a herbicidní ochrana byla vyčíslena dle současných aktuálních cen dostupných u distributorů těchto přípravků, je počítáno s průměrnou cenou, viz tabulka 8 a 9. Veškeré ceny jsou uváděny bez DPH.

Tab. 7 - Náklady na pracovní operace během pěstování

Pracovní operace	Cena (Kč.ha ⁻¹)	Provedení (za rok)	Náklady (Kč.ha ⁻¹)
Podmítka (talířový podmítač)	520	1	520
Hluboká orba	1 350	1	1 350
Předseťová příprava (smykování a vláčení)	470	1	470
Rozmetání prům. hnojiv (dusičnan amonný 200 kg.ha ⁻¹)	185	1	185
Aplikace herbicidu (Synfloran 48 EC; 1,5 l.ha ⁻¹)	220	1	220
Setí přesným secím strojem	750	1	750
Aplikace herbicidu (Afalon 45 SC; 1 l.ha ⁻¹)	220	1	220
Aplikace herbicidu (Agil 100 EC; 1,2 l.ha ⁻¹)	220	1	220
Sklizeň semen	1750	1	1 750
CELKEM			5 685

Tab. 8 – Náklady na osivo a hnojivo

Položka	m.j.	Cena za m.j. (Kč)	Počet m.j.ha ⁻¹	Náklady (Kč.ha ⁻¹)
Osivo	kg	24	8	192
Dusičnan amonný (34,4 % N)	t	6 200	0,2	1 240
CELKEM				1 432

Tab. 9 – Náklady na herbicidy

Položka	m.j.	Cena za m.j. (Kč)	Počet m.j.ha ⁻¹	Náklady (Kč.ha ⁻¹)
Synfloran 48 EC	l	228	1,5	342
Afalon 45 SC	l	517	1	517
Agil 100 EC	l	998	1,2	1 198
CELKEM				2 057

Celkové náklady na pěstování ostropestřce mariánského při intenzivním způsobu hospodaření činí 9 174 Kč.ha⁻¹.

Dle Grbavčice se průměrný výnos ostropestřce při velkoplošném pěstování pohybuje v rozmezí 0,8 - 1,2 t.ha⁻¹. Výkupní cena je v tuzemských podmínkách udávána ve výši **24 Kč** za 1 kg drogy. Za předpokladu, že by průměrný hektarový výnos dosahoval **1 tuny**, je tržba z prodeje semen z jednoho hektaru **24 000 Kč**.

$$\text{Výnosy} = \text{tržby} + \text{dotace}$$

Uplatníme-li nárok na poskytované dotace na plochu (SAPS), jejichž výše pro rok 2005 byla **2 110,70 Kč.ha⁻¹**, celkové výnosy z jednoho hektaru jsou 26 110 Kč.

$$\text{Zisk} = \text{výnosy} - \text{náklady}$$

Po odečtení vykalkulovaných nákladů, vyplývajících z intenzivního způsobu pěstování plodiny, od předpokládaných výnosů z prodeje semen ostropestřce a poskytnuté podpory od státu může být dosaženo zisku ve výši **16 936 Kč.ha⁻¹**, což činí z pěstební plochy o velikosti 5 hektarů **84 680 Kč**. (Při využití možné úspory související s vynecháním hnojení ostropestřce by tento zisk mohl být přibližně i o 1 425 Kč.ha⁻¹ vyšší, dosahoval by 18 361 Kč.ha⁻¹).

4.3.2.2. Extenzivní způsob pěstování

V druhém případě výpočtu je brána v potaz skutečnost, že by se o pěstování ostropestřce zajímal subjekt, specializující se na rostlinnou výrobu v rámci ekologického způsobu hospodaření a vlastníci veškerou technickou základnu.

V rámci extenzivního způsobu pěstování odpadají náklady na průmyslová hnojiva a herbicidy a rovněž se naskýtají další prostory v možné podpoře od státu. V kalkulaci je však nutno uvažovat se zvýšením podílu agrotechnických opatření zaměřených na regulaci plevelů. Rovněž dojde k navýšení nákladů v důsledku aplikace hnoje, která však je pro ostropestřec vhodná, nikoli nezbytná. Předpokládaný nižší výnos semen u extenzivního způsobu hospodaření v případě pěstování ostropestřce není nuzné zohlednit, neboť se většina autorů domnívá, že se hnojení této plodiny nemá na zvýšení výnosu přímý vliv.

Ekonomické zhodnocení navrhované technologie pěstování ostropestřce bylo provedeno na základě normativů jednotlivých pracovních operací, jež jsou uvedeny v publikaci Normativy pro zemědělskou a potravinářskou výrobu vydané MZe ČR v roce 2003. Na základě norem a cen byly nejprve stanoveny náklady prací a výkonů na jednotlivé operace prováděné při pěstování, viz tabulka 10. Náklady na osiva a výkupní ceny ostropestřce byly uvedeny dle informací získaných od agronoma pana Grbavčice ze Seva Flora Valtice, s.r.o. Veškeré ceny jsou uváděny bez DPH.

Tab. 10 - Náklady na pracovní operace během pěstování

Pracovní operace	Cena (Kč.ha ⁻¹)	Provedení (za rok)	Náklady (Kč.ha ⁻¹)
Podmítka (talířový podmítač)	520	1	520
Rozmetání hnoje (20 t.ha ⁻¹) včetně dopravy a nakládání	* 1200	1	1 200
Hluboká orba	1 350	1	1 350
Předset'ová příprava (smykování a vláčeni)	470	1	470
Setí přesným secím strojem	750	1	750
Plečkování (rotační plečky na cukrovku)	460	2	920
Sklizeň semen	1750	1	1 750
CELKEM			6 960

* 60 Kč/t rozmetaného hnoje

Tab. 11 – Náklady na osivo a hnůj

Položka	m.j.	Cena za m.j. (Kč)	Počet m.j.ha ⁻¹	Náklady (Kč.ha ⁻¹)
Osivo	kg	23	8	184
Hnůj (nakupovaný)	t	200	20	4 000
CELKEM				4 184

Celkové náklady na pěstování ostropestřce mariánského extenzivním způsobem v rámci ekologického hospodaření činí 11 144 Kč.ha⁻¹.

Dle Grbavčice se průměrný výnos ostropestřce při intenzivním způsobu hospodaření pohybuje v rozmezí 0,8 - 1,2 t.ha⁻¹. Jelikož většina autorů uvádí, že hnojení na výnos ostropestřce nemá přímý vliv, je možné předpokládat, že stejného výnosu bude dosaženo i při extenzivním způsobu hospodaření.

Výkupní cena je v tuzemských podmínkách udávána rovněž **24 Kč** za 1 kg drogy, neboť v současné době není u ostropestřce významnou měrou podporováno zpeněžení vypěstované bioprodukce za vyšší cenu oproti stejné komoditě konvenčního původu. Za předpokladu, že by průměrný hektarový výnos dosahoval rovněž **1 tuny**, je uvažovaná tržba z prodeje semen z jednoho hektaru **24 000 Kč**.

$$\text{Výnosy} = \text{tržby} + \text{dotace}$$

V případě extenzivního pěstování ostropestřce máme nárok na uplatnění dotace na plochu (SAPS), jejíž výše pro rok 2005 byla **2 110,70 Kč.ha⁻¹**, vedle této platby mohou v rámci agroenvironmentální opatření Horizontálního plánu rozvoje venkova uplatnit nárok na dotaci na ekologicky obhospodařovanou ornou půdu, která je v současné době **3 520 Kč.ha⁻¹**, celkové výnosy z hektaru poté dosahují 29 631 Kč.

$$\text{Zisk} = \text{výnosy} - \text{náklady}$$

Po odečtení vykalkulovaných nákladů od předpokládaných výnosů z prodeje semen ostropestřce a poskytnutých dotací může být dosaženo zisku ve výši 18 487 Kč.ha⁻¹. Z 5 hektarů obhospodařovaných extenzivním a zároveň ekologickým způsobem zisk činí 92 435 Kč.

Za předpokladu, že by bylo při extenzivním způsobu pěstování vynecháno organické hnojení, které je k ostropestřci podle některých autorů vhodné, avšak v praxi se většinou nevyužívá – dle Grbavčice ze Seva Flora Valtice není v jejich pěstebních podmínkách hnojeno organicky ani anorganicky při zachování výnosu $0,8 - 1,2 \text{ t.ha}^{-1}$ – mohl by být zisk z hektaru až o 5 200 Kč vyšší, dosahovat by 23 687 Kč.ha⁻¹.

5. DISKUSE

Dané téma experimentu za využití několika elicitorů, s významnějším zaměřením na elicitor ASA ve třech různých koncentracích, u rostliny ostropestřec mariánský je novým zatím vědecky velmi omezeně prozkoumaným úsekem. V odborné literatuře se použití ASA vyskytuje pouze u jiných rostlin pěstovaných *in vitro* a v ojedinělém případě prací u hospodářsky významných plodin, kde prováděli šetření BERGMANN, *et al.* (1994). Proto bylo dosažené výsledky této práce obtížné porovnávat se zkušenostmi a důkazy jiných prací prováděných s rostlinami ostropestřce za využití elicitorů, zvláště pak elicitoru ASA.

Provedeným poloprovodním experimentem byl vliv různých elicitorů a jejich směsí na tvorbu sekundárních metabolitů ve sledovaných rostlinách potvrzen. Aplikací elicitorů na 26 pokusných parcelách došlo ve 24 případech k navýšení obsahu sledovaných účinných látek. Z toho statisticky průkazné změny na 5% hladině významnosti byly prokázány v převážně většině testovaných elicitorů, toto průkazné navýšení v některých případech přesahuje i 40 %. Jelikož však nemohl být experiment z provozních důvodů Seva Flora Valtice, s.r.o. realizován i v následném roce, nebylo možno výsledky opakovaným experimentem ověřit, tudíž pro práci nejsou stěžejní.

Maloparcelkový experiment byl založen za účelem aplikace elicitoru ASA ve třech různých koncentracích. U experimentu realizovaného v roce 2004 byl po aplikaci elicitoru ASA v nízké koncentraci prokázán oproti kontrole nepatrný pokles obsahu účinných látek o necelá 3 %. Střední koncentrace ASA hladinu účinných látek mírně zvýšila, a to přibližně o 8 %. Aplikací vysoké koncentrace došlo opět k poklesu obsahu účinných látek, naměřené hodnoty byly o 15 % nižší než hodnoty prokázané u kontroly. U opakovaného experimentu v následném roce 2005 byl pokles obsahu účinných látek u nízké aplikace elicitoru ASA potvrzen opětovným nepatrným snížením, tentokrát o necelá 0,5 %. Významnější nárůst přibližně o 22,5 % způsobila aplikace střední koncentrace ASA, což značí i 15 % nárůst oproti navýšení u této koncentrace v roce předešlém. Aplikace vysoké koncentrace elicitoru způsobila téměř 43% pokles obsahu účinných látek, čímž bylo potvrzeno i zjištění z roku předcházejícího. Při celkovém zhodnocení došlo v případě elicitoru ASA o třech různých koncentracích k téměř zanedbatelným změnám hodnot. Statistická průkaznost na 5% hladině významnosti nebyla potvrzena, a to ani v případě 43% poklesu obsahu účinných látek v plodech z rostlin ošetřených vysokou koncentrací elicitoru.

V předložené práci je u kontrolní skupiny maloparcelkového experimentu pro rok 2004 zjištěná průměrná koncentrace obsahu účinných látek 47 071,17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ semena, v následném roce 2005 kontrolní skupina rostlin ostropestřce pěstovaná na stejném pozemku naprosto shodným postupem vykazuje tento obsah podstatně nižší, a to 30 705,92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ semena. Dle *SPITZOVÉ* a *PLACRA (1994)* situaci komplikuje skutečnost, že obsah účinných látek v tzv. silymarinovém komplexu a do jisté míry i jejich vzájemný poměr, stejně jako biologická hodnota, závisí na stupni vyžrání semen. Podle *GROMOVÉ, et al. (1993)* má významnou roli při tvorbě a složení silymarinu i délka tvorby a trvání fáze růžice listů. Nejvyšší obsah silymarinu je v nažkách z vrcholových úborů. Tím, že počet úborů na rostlině je nižší a jejich tvorba přechází do teplejšího a suššího období, zvláště fáze zrání, se obsah silymarinu zvyšuje. Jak uvádí ve své práci *PEXÍD (2004)*, na rostliny působí jako abiotický stresor průběh počasí, nadmořská výška, emisní a imisní stav, půdní zásobenost vláhou či živinami, světelné podmínky a mnoho dalších faktorů podílejících se na růstu rostlin. V případě tohoto experimentu byl rok 2005 v porovnání s rokem předešlým velmi deštivý a chladný, což zapříčinilo špatné dozrávání semen a následný nižší výnos semen a pravděpodobně i nižší obsah účinných látek. Je tudíž zřejmé, že výnos drogy a výtěžnost účinných látek záleží na mnoha faktorech, které jsou při pěstování pouze velmi málo ovlivnitelné. Z tohoto pohledu jsou semena ostropestřce velice nesourodým materiálem.

V porovnání s průměrnými hodnotami silymarinu, které stanovili ve své práci na základě rozdílných termínů setí *GROMOVÁ, et al. (1993)*, v rozmezí 78 000 – 106 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ semena, jsou hodnoty získané v této práci výrazně nižší. *KVASNIČKA, et al. (2003)* udává průměrné hodnoty v závislosti na použité analytické metodě v rozmezí 18 300 – 21 700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ při analýze metodou CZE a 35 400 – 42 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ za užití metody HPLC. Tomuto rozsahu plně odpovídají i výsledné hodnoty účinných látek v předložené práci, které byly stanoveny využitím metody HPLC. *GROMOVÁ, et al., (1993)* rovněž udávají průměrnou hmotnost semen z jedné rostliny v rozmezí pouze 3 – 4,8 g. Toto tvrzení se neslučuje s mým zjištěním, neboť výnos maloparcelkového experimentu se pohyboval v závislosti na výšce rostlin mezi 95 -157,5 g z jedné rostliny. V každém úboru bylo přibližně 190 semen, což odpovídá zmínce *SINDELA (1991)*, který uvádí, že každá hlava vyprodukuje asi 190 semen, průměr dává 6 350 semen na rostlinu, semeno váží přibližně 22 mg.

Na základě dosažených výnosů semen z maloparcelkových experimentů z plochy 1 m² lze stanovit maximální teoretický možný výnos, a to v rozmezí 3,8 – 6,3 t.ha⁻¹. Tento teoretický výnos převyšuje více než o polovinu tvrzení *SPITZOVÉ (1994)*. Sklizeň veškerých zralých semen je však ve velkoplošném pěstování technicky neproveditelná. Problémy vyplývají z postupného dozrávání a vypadávání zralých semen. V praxi se dosahuje hektarových výnosů pouze kolem 1 tuny, což potvrzuje *GRBAVČIC (agronom Seva Flora Valtice, s.r.o.)* i *KUBÍNEK (1987)*.

Dílčím cílem předložené práce je řešení technologie pěstování ostropestřce mariánského včetně ekonomické kalkulace na pěstební ploše 1 – 5 hektarů, a to již od výběru pozemku až po sklizeň hlavního produktu. V dostupné literatuře domácích autorů se ekonomikou pěstování zabýval pouze v roce 1987 *KUBÍNEK*. V posledních letech se žádný z dostupných autorů této problematice hlouběji nevěnoval, *SPITZOVÁ (1997)* pouze uvádí, že náklady na pěstování jsou zhruba porovnatelné s jarní obilovinou. Při průměrném hektarovém výnosu 1 t semen ostropestřce je čistý zisk v porovnání s obilovinou vyšší.

Proto byla v práci dále orientačně provedena finanční kalkulace na výrobu a realizaci drogy ostropestřce při současných cenách pracovních výkonů s přihlédnutím na intenzivní způsob pěstování a extenzivní způsob pěstování i s využitím současné finanční podpory od státu.

Po odečtení vykalkulovaných nákladů od předpokládaných výnosů z prodeje drogy je možno dosáhnout zisku, který činí při intenzivním způsobu hospodaření 16 936 Kč.ha⁻¹. (Při využití možné úspory související s vynecháním hnojení ostropestřce by tento zisk mohl dosahovat až 18 361 Kč.ha⁻¹).

Při extenzivním ekologicky zaměřeném způsobu hospodaření možný zisk činí 18 487 Kč.ha⁻¹. (Za předpokladu, že by bylo vynecháno organické hnojení, které je k ostropestřci podle některých autorů vhodné, avšak v praxi se většinou nevyužívá, mohl by zisk z hektaru dosahovat až 23 687 Kč.ha⁻¹).

6. ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit účinek foliární aplikace elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu zvýšení obsahu účinných látek v léčivé rostlině ostropestřec mariánský. Za tímto účelem byl založen, veden a vyhodnocen poloprovozní experiment ve spolupráci se Seva Flora Valtice, s.r.o. a maloparcelový experiment realizovaný v místě mého bydliště na Benešovsku ve středních Čechách se třemi různými koncentracemi kyseliny acetylsalicylové a kontrolou vždy v několika opakováních. Odebrané vzorky semen byly analyzovány metodou HPLC v laboratořích Katedry obecné produkce rostlinné a Katedry chemie ZF JČU v Českých Budějovicích.

U poloprovozního experimentu byl prokázán statisticky významný vliv působení většiny blíže nespecifikovaných elicitorů. Jelikož nemohl být tento experiment z provozních důvodů společnosti Seva Flora, s.r.o. opakován i v následném roce, nejsou výsledky pro práci s těžební. Blíže nespecifikované elicitory použité u poloprovozního experimentu za spolupráce Seva Flora Valtice, s.r.o. se jeví jako účinné. V převažujícím množství elicitory vyvolaly zvýšení obsahu účinných látek. Doporučuji v opakovaném bádání potvrdit či zpochybnit předpoklad, že tyto elicitory stimulují tvorbu sledovaných látek v semenech rostliny. Elicitace rostlin těmito elicitory by mohla zabezpečit pěstitelům vyšší efekt z výroby, odbytu a zpeněžování vyrobené produkce.

Dosažené výsledky u ve dvou letech opakovaného maloparcelkového experimentu prokazují, že se obsah sledovaných látek většinou lineárně nemění se zvyšující se koncentrací užitého elicitoru ASA a ve výsledcích se vyskytly rozdílné hodnoty z blíže nespecifikovaných příčin. Aplikace elicitoru ASA o vysoké koncentraci na rostlinu ostropestřec mariánský je zcela nevhodná, neboť podstatně redukuje obsah účinných látek v semenech. Vysoká koncentrace elicitoru ASA je zřejmě již pro ostropestřec toxická. Vzhledem ke statisticky neprůkazným změnám v koncentracích účinných látek v semenech rostliny ostropestřec mariánský po aplikaci elicitoru ASA je jejich používání neúčinné a ekonomicky neefektivní.

Dle analýzou získaných hodnot došlo k významnějšímu navýšení obsahu sledovaných látek pouze po aplikaci střední dávky elicitoru ASA. Toto zjištění by bylo zajímavé dále ověřovat. Je však opodstatněné přihlídnout ke skutečnosti, že veškeré poloprovozní či maloparcelové

experimenty nemusí vykazovat dostatečně objektivní výsledky, a to v důsledku nepřeborného množství vnějších faktorů, které na obsah a složení silymarinu v semenech rostliny působí.

Dílčím cílem práce bylo navržení technologie pěstování ostropestřce mariánského na pěstební ploše 1 – 5 hektaru. Jelikož je ostropestřec rostlinou značně plastickou, dobře konkuruje plevelům a podle některých autorů má množství srážek během kritického období mnohem větší vliv na výnos plodů než běžné půdní podmínky a hnojení, navíc je vhodnou pěstitelskou alternativou získávání léčivých rostlin z ekologického zemědělství, zpracovala jsem a ekonomicky zhodnotila nejen návrh intenzivní způsobu pěstování této rostliny, ale i ekonomickou kalkulaci pro případ extenzivního způsobu pěstování.

Na základě provedeného ekonomického rozboru v této práci, se i za stávajících podmínek v resortu zemědělství jeví pěstování této významné léčivky jako ekonomicky zajímavé a doporučuji pěstovat ostropestřec mariánský rovněž jako perspektivní plodinu v méně intenzivních způsobech hospodaření. V obou případech pěstování navrhuji se maximálně soustředit na zakládání vyrovnaného porostu a nalezení co nejvhodnějšího termínu sklizně semen této nestejně dozrávající rostliny, neboť je v praxi dosahováno několikanásobně nižších výnosů, než udává na základě mého zjištění biologický potenciál rostliny.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. **BLÁHA, L., BOCKOVÁ, R., HNILÍČKA, F., HNILÍČKOVÁ, H., HOLUBEC, V., MILLEROVÁ, J., ŠTOLCOVÁ, J., ZIEGLEROVÁ, J.** *Rostlina a stres*. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2003 156 s. ISBN 80-86555-32-1.
2. **BEIDERBECK, R., REICHLING, J.** *Pflanzenkulturen in Forschung und Praxis*. Bd. 2. [s.l.] : [s.n.], 1989. s. 453-464
3. **BERGMANN, H., LEINHOS, V., MACHELETT, B.** *Increase of stress resistance in crop plants by using phenolic compounds*. Acta Hort. 381 : (International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance, International Society for Horticultural Science). Vol. 1.. [s.l.] : [s.n.], 1994. s. 390-397.
4. **BOSTOCK, R.M., KUC, J.A., LAINE, R.A.** *Eicosapentanoic and arachidonic acids from Phytophthora infestans elicit fungitoxic sesquiterpens in potato*. Science. 1981, no. 12, s. 67-69.
5. **COUFAL, P.** *High Performance Liquid Chromatography, HPLC* [online]. 11. 3. 2000 [cit. 2005-02-01]. Dostupný z WWW: <<http://www1.lfl.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>>
6. **COUFAL, P.** *High Performance Liquid Chromatography, HPLC* [online]. 28. 7. 2004 [cit. 2005-02-01]. Dostupný z WWW: <www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
7. **COUFAL, P.** *Thin Layer Chromatography, TLC* [online]. 28. 7. 2004 [cit. 2005-02-01]. Dostupný z WWW: <www.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>.
8. **CZABAJSKA, W., KAZIMIERCZAK, K., MACIOLKOWSKA-LUDOWICZ, E.** *Studies on the biology of Silybum marianum Gaertn. : Development, blooming and fructifying*. Herba-Polonica (Poland). 1989, no. 35(2-3), s. 109-115.
9. **DICOSMO, F., MISAWA, M.** *Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures*. Trends. Biotechnol. 1985, no. 3, s. 318 – 322.
10. **DRAŠNAROVÁ, O** *léčivých, aromatických a kořeninových rostlinách v ČR*. Úroda. 2005, č. 3, s. 54-55.
11. **DRBAL, K., KŘÍŽEK, M.** *Analytická chemie : Skripta Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta*. [s.l.] : [s.n.], 1999. 185 s. ISBN 80-7040-352-7.
12. **FOSTER, S.** *Milk Thistle Silybum marianum* : Botanical Series No 305. 2nd ed. American Botanical Council, Austin, Texas. 1996
13. **GODOY-HERNÁNDEZ, G., LOYOLA-VARGAS, V.M.** *Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of Catharanthus roseus tumor suspension cultures*. Plant Cell Reports. 1997, no. 5, s. 287 - 290.
14. **GROMOVÁ, Z., et al.** *Pestovanie špeciálnych plodín : Skripta Vysoká škola poľnohospodárska v Nitre, Agronomická fakulta, Katedra rastlinnej výroby*. Nitra : Vydavateľské a edičné stredisko VŠP, 1993. 165 s. ISBN 80-7137-115-7.

15. HAMMOUDA, F.M., ISMAIL, S.I., HASSAN, N.M., ZAKI, A.K., KAMEL, A. *Evaluation of the Silymarin Content in Silybum marianum (L.) Gaertn. Cultivated under Different Agricultural Conditions*. Phytotherapy research. 1993, no. 7, s. 90-91.
16. HNILIČKA, F., HNILIČKOVÁ, H., BLÁHA, L., MÖLLEROVÁ, J., ZIEGLEROVÁ, J. *Ekologické a fyziologické odezvy rostlin na biotické stresory. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin*. In Sborník příspěvků . 8. 10. 2003. vyd. [s.l.] : [s.n.], s. 156-170.
17. HUSÁKOVÁ, J, LHOTSKÁ, M. *Ostropestřec mariánský – okrasná a léčivá rostlina*. Živa '81 – časopis pro biologickou práci. 1981, roč. 29, s. 133.
18. INDRÁK, P, CHYTILOVÁ, D. *K problematice stanovení silybinu v droze ostropestřece mariánského (Silybum marianum /L./ Gaertn.)*. Zahradnictví. 1992, roč. 19, č. 4, s. 309-313.
19. JANČA, J., ZENTRICH, J.A. *Herbář léčivých rostlin*. Sv. 3. [s.l.] : Eminent., 1995. s. 216-220.
20. JANKE, R., DeARMOND, J., COLTRAIN, D. *Farming a Few Acres of Herbs: An Herb Growers Handbook; Milk Thistle (Silybum marianum)* [online]. 2005 [cit. 2006-02-12]. Dostupný z WWW: <http://www.oznet.ksu.edu/ksherbs/milk_thistle.htm>.
21. JAROŠ, Z. *Léčivé látky z rostlin*. [s.l.] : Dona, 1992. s. 46.
22. JEGOROV, A. *Flavonolignany – novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem*. Chemické Listy 90. 1996, s. 859 – 862.
23. KAVKA, M. *Normativy pro zemědělskou a potravinářskou výrobu : Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha* . [s.l.] : [s.n.], 6. vydání, 2003. 344 s. ISBN 80-7271-136-9.
24. KAVKA, M., et al. *Normativy zemědělských výrobních technologií : Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha* . [s.l.] : [s.n.], 4. vydání, 2003. 360 s. ISBN 80-7271-135-0.
25. KIM, N.CH., GRAF, T.N., SPARECINO, CH.M., WANI, M.C., WALL, M.E. *Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (Silybum marianum)*. Org. Biomol. Chem. 2003, no. 1, s. 1684-1689.
26. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody* [online]. 4. 9. 2005 [cit. 2005-02-01]. Dostupný z WWW: <<http://klouda.webpark.cz/mam.htm>>.
27. KOPŘIVA, Z. *Leuzea saflorová (Leuzea carthamoides) jako alternativní rostlina*. [s.l.], 2002. 67 s. Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích, Katedra obecné produkce rostlinné. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.
28. KOVALČIK, K., KOVALČIKOVÁ, M. *Adaptácia a stres v chove hospodárskych zvierat*. Príroda. 1974, 195 s.
29. KUBÍNEK, J. *Ostropestřec mariánský – metodika pěstování*. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR : [s.n.], 1987. 21 s.

30. KUMMER, V., MAŠKOVÁ, J., ZRALÝ, Z., ČANDERLE, J. *Vedlejší účinky zkrmování vylisků semen ostropestřce mariánského u krav.* Veterinářství. roč. 2000, č. 2, s. 55 – 58.
31. KURKIN, V.A., ZAPESOCHNAYA G.G., VOLOTSUEVA, A.V., AVDEEVA, E.V., PIMENOV, K.S. *Flavolignans of Silybum marianum Fruit.* Chemistry of Natural Compounds. 2001, vol. 37, no. 4, s. 315-317.
32. KVASNIČKA, F., BÍBA, B., ŠEVČÍK, F., VOLDŘICH, M., KRÁTKÁ, J. *Analysis of the active components of silymarin.* Journal of Chromatography A. 2003, no. 990, s. 239-245.
33. MARINELI, F., RONCHI, V.N., SALVADOR, P. *Elicitor induction of enzyme activities and 6-methoxymellein production in carrot cell-suspension culture.* Phytochemistry. 1994, no. 35, s. 1457 – 1640.
34. Manažer svého zdraví. In *MEDICÍNA - odborné fórum lékařů a farmaceutů : medicína 2/VI.* [s.l.] : [s.n.], 1999. s. 18.
35. MINAKHMETOV, R.A., ONUCHAK, L.A., KURKIN, V.A., AVDEEVA, E.A., VOLOTSUEVA A.V. *Analysis of flavonoids in Silybum marianum fruit by HPLC.* Chemistry of Natural Compounds. 2001, vol. 37, no. 4, s. 318-321.
36. Ministerstvo zemědělství ČR. *LAKR - léčivé, aromatické a kořenové rostliny. : Situační a výhledová zpráva - listopad 2004.* [s.l.] : [s.n.], 2004. 256 s. ISBN 80-7084-317-9.
37. OMER, E.A., REFAAT, A.M., AHMED, S.S., KAMEL, A., HAMMOUDA, F.M. *Effect of spacing and fertilization on the yield and active constituents of milk thistle, Silybum marianum.* Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants. 1993, vol. 1, no. 4, s. 17-23.
38. OMER, E.A., IBRAHIM, M.E., RAZIN, A.M., AHMED, S.S. *Effect of spacing, nitrogen and potassium fertilization of Silybum marianum L. cultivated in newly reclaimed lands.* Egyptian Journal of Horticulture. 1995, vol. 22, no. 1, s. 97-108.
39. OMER, E.A. *Effect of different nitrogen sources on Romanian Silybum marianum cultivated in sandy and clay soils.* Egyptian Journal of Horticulture. 1996, vol. 23, no. 1, s. 63-76.
40. OMER, E.A., AHMED, S.S., FAYED, T.B., EZZEL-DIN, A.A. *Seed yield of Silybum marianum L. as affected by row spacing and fertilization in new reclaimed lands of Egypt.* Egyptian Journal of Horticulture. 1998, vol. 25, no. 3, s. 281-293.
41. OPLETAL, L., VOLÁK, J. *Rostliny pro zdraví (Ostropestřec mariánský).* Aventinum. 1999, s. 151
42. OTYEPKOVÁ, E., et al. *Chromatografie* [online]. 2002 [cit. 2005-02-01]. Dostupný z WWW: <http://chemie.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm>.
43. QUAGLIA, M.G., BOSSU, E., DONATI, G., MAZZANTI, G., BRANDT, A. *Determination of silymarin in the extract from the dried silybum marianum fruits by high performance liquid*

- chromatography and capillary electrophoresis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1999, no. 19, s. 435-442.
44. **PEXÍDR, R.** *Vliv kyseliny acetylsalicylové na obsah účinných látek ve vybraných léčivkách*. [s.l.], 2004. 80 s. Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích, Katedra obecné produkce rostlinné. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.
 45. **POLÁK, P., ŠUSTROVÁ, H.** Příspěvek k agrotechnice polního pěstování ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.). *Zahradnictví*. 1991, č. 18, s. 305-314.
 46. **PULKRÁBEK, J., JOZEFYOVÁ, L., URBAN, J., ŠROLLER, J.** *Stresové faktory při pěstování cukrovky*. AGRO. 2005, č. 6, s. 67.
 47. **RYANT, P.** *Alternativní olejniny*. [online]. Agrochemická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně, 25. 1. 2005 [cit. 2005-06-12]. Dostupný z WWW: <http://www.af.mendelu.cz/agrochem/multitexty_2/html/olejniny/alterolejniny.htm#ostropestrec>.
 48. **TŮMOVÁ, L., DUŠEK, J.** *Vliv kyseliny linolové na produkci sekundárních metabolitů*. Čes. Slov. Farm. 2000, roč. 49, č. 2, s. 78 - 81.
 49. **TŮMOVÁ, L., DUŠEK, J.** *Závěrečná zpráva grantu 193/1997 /B - BIO/FaF*. In Závěrečná zpráva z grantu. [s.l.] : [s.n.], 2000. s. 28.
 50. **TŮMOVÁ, L., BLAŽKOVÁ, R.** *Vliv tvorby flavonoidu v kultuře *Ononis arvensis* L. in vitro působením CrCl3*. Čes. Slov. Farm. 2002, roč. 51, č. 1, s. 44 - 46.
 51. **SCHUNKE, U.** *Holy thistle. First experiences with cultivation and harvest*. Landtechnik. 1992, vol. 47, no. 11, s. 548-550.
 52. **SINDEL, B.M.** *A review of the ecology and control of thistles in Australia*. Weed Research. 1991, vol. 31, s. 189 -201
 53. **SLANINA, J.** *Biologická a farmakologická aktivita lignanů*. Chemické Listy 94. 1994, s. 111-116.
 54. **SPITZOVÁ, I.** *Ostropestřec mariánský a jeho význam pro farmaceutický průmysl*. Živa 1981. roč. 29, s. 125.
 55. **SPITZOVÁ, I.** *Kultivar Silyb, nová surovina farmaceutického průmyslu*. ŽIVA 1991. 1991, roč. 39, s. 132.
 56. **SPITZOVÁ, I., PLACR, M.** *Vliv desikantů na biologickou hodnotu semen a kvalitu drogy ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.)*. Zahradnictví. 1994, roč. 24, č. 2, s. 93 -101.
 57. **SPITZOVÁ, I.** *Ostropestřec mariánský – staronová léčivá rostlina*. Úroda. 1997, č. 8, s. 28-29.
 58. **STARÝ, F.** *Léčivé bodláky*. Živa. 2000, roč. 48, s. 208 – 210.
 59. **SINDEL, B.M.** *A review of the ekology and kontrol of thistles in Australia*. Weed Research. 1991, vol. 31, s. 189-201.
 60. **PEPPING, J.** *Alternative Therapies*. Am J Health-Syst. Pharm. 1999, vol. 56, s. 1195-1197.

8. SUMMARY

The aim of this graduation thesis is a study on the influence of elicitors on the content of active components in the Milk thistle (*Silybum marianum*). The present work deals with the study on the influence of elicitors in order to obtain the highest silymarin content in the plant for its commercial production for pharmaceutical use.

The main active flavanoids are isosilybine, silycristine, silydianine and taxifoline. The concentrations of these compounds, excepted taxifoline, are all together usually expressed as silymarin content. Silymarin is an antihepatotoxic substance isolated from the dried fruits of *Silybum marianum*. The compounds have been shown to protect different organs and cells against a number of insults.

Before the research were summarized knowledge about origin, botanical characterization, growth and development and cultivation and production of *Silybum marianum*.

In this present work were described several analytic methods applied for the quantitative determination of silymarin, the most recent is the detection by high performance liquid chromatography (HPLC). The content and composition of the active components of silymarin (flavonolignans) from the seeds of *Silybum marianum* were analysed using HPLC method in this graduation thesis. Results of HPLC were correlated with chromatograms.

The present work also deals with proposal for growing in the conditions of Czech Republic and economic appraisal of cultivation.

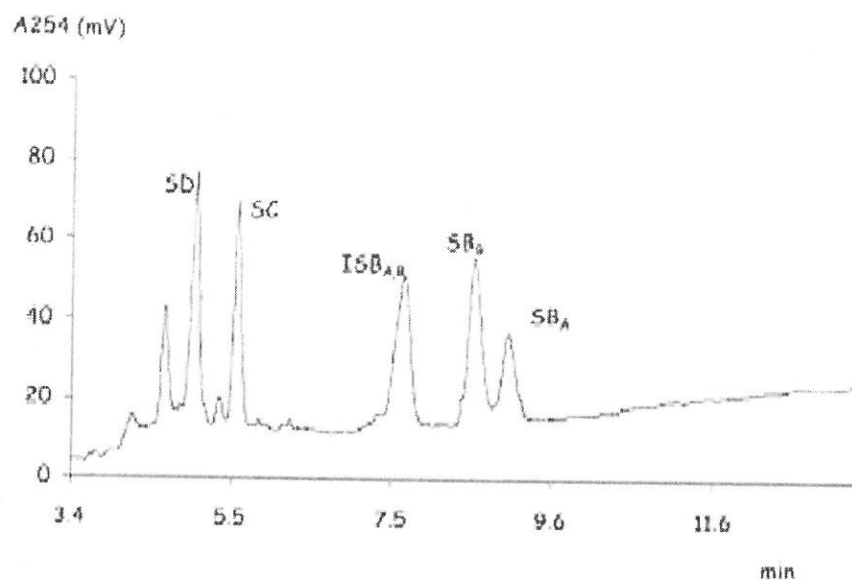
Keywords: *Silybum marianum*, fruit, silymarin, flavolignans, high performance liquid chromatography

9. PŘÍLOHY

- **Příloha 1** – Rozdíl mezi elektroferogramem a chromatogramem extraktu silymarinu stejného vzorku
- **Příloha 2** – Maloparcelkový experiment 2004 – výsledné koncentrace jednotlivých účinných látek v $\mu\text{g/g}$ semene
- **Příloha 3** – Maloparcelkový experiment 2005 – výsledné koncentrace jednotlivých účinných látek v $\mu\text{g/g}$ semene
- **Příloha 4** – Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů
- **Příloha 5** – Fotodokumentace

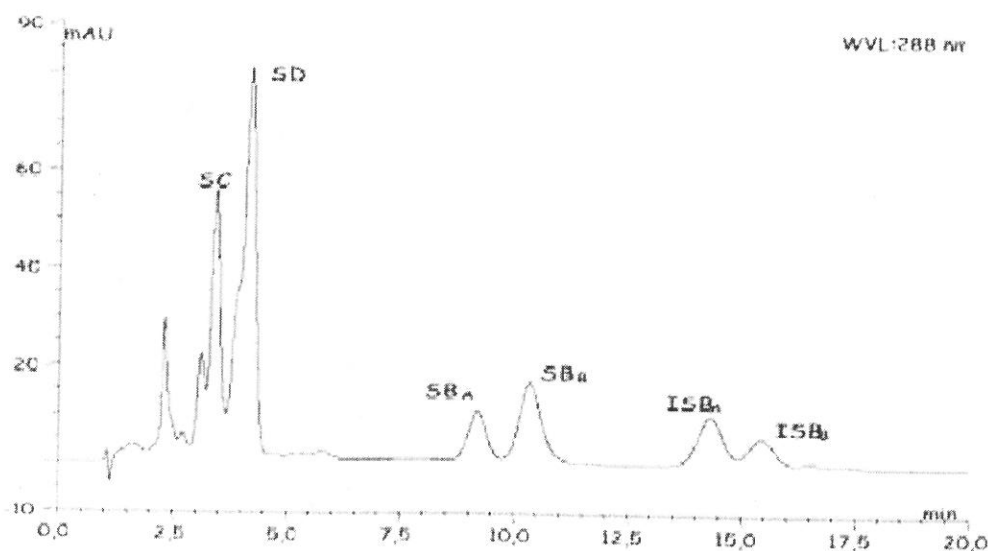
Příloha 1: Rozdíl mezi elektroferogramem a chromatogramem extraktu silymarinu stejného vzorku (KVASNIČKA, et al., 2003)

ELEKTROFEROGRAM



Electropherogram of silymarin batch 017 (200 µg/ml). The carrier electrolyte used for CZE analysis consisted of 10 mM EACA + 100 mM ammonium hydroxide + 0.5% PVP10 + 0.1% HEC; constant driving current was set at 100 µA. Silymarin components were detected at 254 nm.

CHROMATOGRAM



Chromatogram of silymarin batch 017 (200 µg/ml). HPLC analysis was carried out on Purospher RP18 (150×4 mm, 5 µm) using mixture of 85% phosphoric acid methanol water (0.5:46:64, v/v) as mobile phase (isocratic elution) at a flow-rate 1 ml/min. Flavonolignans of silymarin were detected at 288 nm.

Příloha 2: Maloparcelkový experiment 2004 – výsledné koncentrace jednotlivých účinných látek v $\mu\text{g/g}$

	taxifolin	silychristin	silydianin		silybinin A		silybinin B		isosilybinin A+B	
1	553,91	2 737,71	9 275,13	x = 11 211,67	9 962,85	x = 11 955,95	12 420,94	x = 14 383,97	4 824,22	x = 5 473,98
2	870,63	3 248,82	12 558,19	% = 100	13 038,56	% = 100	15 471,13	% = 100	6 048,91	% = 100
3	695,60	4 191,05	12 086,31	s = 1461,66	12 974,35	s = 1436,81	15 274,64	s = 1393,90	5 636,94	s = 512,20
4	1 083,72	2 800,94	10 927,04		11 848,05		14 369,18		5 385,86	
5	810,90	3 317,14	11 376,47	x = 10 593,52	12 476,58	x = 11 755,65	14 988,41	x = 13 956,57	5 649,23	x = 5 367,58
6	678,35	3 664,05	10 875,34	% = 94,49	12 947,80	% = 98,32	15 072,36	% = 97,03	5 968,47	% = 98,06
7	621,70	3 642,60	10 423,91	s = 712,40	11 179,47	s = 1163,36	13 389,42	s = 1307,58	4 980,09	s = 527,77
8	504,58	3 238,72	9 698,35		10 418,75		12 376,07		4 872,53	
9	671,71	3 814,41	14 086,25	x = 12 211,88	14 970,36	x = 13 030,08	17 666,93	x = 15 617,16	6 856,99	x = 5 907,33
10	765,54	3 366,57	12 513,07	% = 108,92	12 844,21	% = 108,98	15 629,73	% = 108,57	5 878,16	% = 107,92
11	554,53	2 784,69	9 701,52	s = 1827,38	10 681,64	s = 1795,11	12 627,90	s = 2159,98	4 661,14	s = 924,08
12	677,25	3 169,06	12 546,67		13 624,10		16 544,06		6 233,01	
13	452,49	2 131,98	9 003,65	x = 9 728,45	9 548,07	x = 10 680,62	11 485,81	x = 12 493,55	4 442,34	x = 4 296,24
14	574,17	2 460,40	9 897,27	% = 86,77	10 894,91	% = 89,33	13 185,60	% = 86,86	4 502,30	% = 78,48
15	574,03	2 334,80	9 981,00	s = 486,38	11 564,88	s = 838,98	13 502,85	s = 999,04	3 884,24	s = 281,15
16	562,70	2 264,26	10 031,88		10 714,62		11 799,96		4 356,08	

Příloha 3: Maloparcelkový experiment 2005 – výsledné koncentrace jednotlivých účinných látek v $\mu\text{g/g}$

	taxifolin	silychristin	silydianin	silybinin A	silybinin B	isosilybinin A+B			
1	1 900,84 x = 1 199,75 % = 100 s = 631,60	2 589,59 1 245,14 1 651,31	1 0523,38 4 391,75 9 367,09	8 798,60 2 565,59 9 649,24	x = 7 004,48 % = 100 s = 3 867,64	12 171,13 3 237,40 12 354,44	x = 9 254,32 % = 100 s = 5 211,62	4 052,95 1 453,11 4 467,76	x = 3 324,61 % = 100 s = 1 633,98
2	1 223,78 x = 987,40 % = 82,30 s = 312,52	1 555,13 2 225,14 712,67	7 351,11 13 285,96 5 895,42	5 663,85 10 522,89 4 258,57	x = 6 815,10 % = 97,30 s = 3 287,01	7 380,63 14 721,53 5 414,68	x = 9 172,28 % = 99,11 s = 4 905,29	2 355,11 5 091,79 2 143,06	x = 3 196,65 % = 96,15 s = 1 644,66
3	1 878,26 x = 1 379,73 % = 115,00 s = 464,00	2 664,56 2 147,30 2 251,74	8 834,01 9 532,34 12 677,42	6 859,59 8 851,20 8 292,32	x = 8 001,03 % = 114,23 s = 1 027,26	9 620,54 10 834,49 13 978,86	x = 11 477,96 % = 124,03 s = 2 249,29	3 189,65 4 135,50 4 873,67	x = 4 066,27 % = 122,31 s = 844,14
4	985,74 x = 843,29 % = 70,29 s = 123,47	1 322,84 881,04 912,38	4 839,88 6 365,77 5 210,22	2 958,48 3 886,46 4 073,08	x = 3 639,34 % = 51,96 s = 596,98	3 700,84 5 006,61 5 099,50	x = 4 602,32 % = 49,73 s = 782,08	1 694,93 2 246,94 1 786,07	x = 1 909,32 % = 57,43 s = 295,92

Příloha 4: Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů

Maloparcelkový experiment 2004

kontrola proti nízké koncentraci		
	Soubor 1	Soubor 2
Stř. hodnota	47071,17	45792,825
Rozptyl	28454384	14665383,91
Pozorování	4	4
Hyp. rozdíl		
stř. hodnot	0	
Rozdíl	5	
t stat	0,3893497	
P(T<=t) (1)	0,356524	
t krit (1)	2,0150492	
P(T<=t) (2)	0,713048	
t krit (2)	2,5705776	

Maloparcelkový experiment 2005

kontrola proti nízké koncentraci		
	Soubor 1	Soubor 2
Stř. hodnota	30705,9	30513,26667
Rozptyl	220855834	213163245,8
Pozorování	3	3
Hyp. rozdíl		
stř. hodnot	0	
Rozdíl	4	
t stat	0,016015395	
P(T<=t) (1)	0,493994548	
t krit (1)	2,131846486	
P(T<=t) (2)	0,987989096	
t krit (2)	2,776450856	

kontrola proti střední koncentraci		
	Soubor 1	Soubor 2
Stř. hodnota	47071,17	50717,3825
Rozptyl	28454384	50869466,66
Pozorování	4	4
Hyp. rozdíl		
stř. hodnot	0	
Rozdíl	6	
t stat	-0,8187854	
P(T<=t) (1)	0,2221025	
t krit (1)	1,9431809	
P(T<=t) (2)	0,4442051	
t krit (2)	2,4469136	

kontrola proti střední koncentraci		
	Soubor 1	Soubor 2
Stř. hodnota	30705,9	37627,46667
Rozptyl	220855834	25451450,12
Pozorování	3	3
Hyp. rozdíl		
stř. hodnot	0	
Rozdíl	2	
t stat	-0,763882227	
P(T<=t) (1)	0,262375713	
t krit (1)	2,91998731	
P(T<=t) (2)	0,524751425	
t krit (2)	4,302655725	

kontrola proti vysoké koncentraci		
	Soubor 1	Soubor 2
Stř. hodnota	47071,17	40037,57
Rozptyl	28454384	4790659,631
Pozorování	4	4
Hyp. rozdíl		
stř. hodnot	0	
Rozdíl	4	
t stat	2,4597437	
P(T<=t) (1)	0,0356141	
t krit (1)	2,1318465	
P(T<=t) (2)	0,0712281	
t krit (2)	2,7764509	

kontrola proti vysoké koncentraci		
	Soubor 1	Soubor 2
Stř. hodnota	30705,9	17504,967
Rozptyl	220855834	3426578,3
Pozorování	3	3
Hyp. rozdíl		
stř. hodnot	0	
Rozdíl	2	
t stat	1,52674904	
P(T<=t) (1)	0,13318639	
t krit (1)	2,91998731	
P(T<=t) (2)	0,26637278	
t krit (2)	4,30265573	

Je-li $t \text{ stat} > t \text{ krit} (2) \rightarrow$ statisticky významná změna

Poloprovozní experiment 2004, Valtice - Seva Flora, s. r. o.



první aplikace elicitorů; 8. 6. 2004



druhá aplikace elicitorů; 28. 6. 2004



stav porostu 28. 6. 2004



stav porostu 18. 7. 2004



vyzrálá semena; 18. 7. 2004



motorový vysavač Partner - Tornádo BW 25

Maloparcelkový experiment 2005



založení experimentu; 29. 4. 2005



stav porostu 28.5.2005



fáze přízemní růžice; 1. 6. 2005



stav porostu 21.6.2005



první aplikace elicitorů; 21. 6. 2005



fáze porostu 21. 6. 2005



druhá aplikace elicitorů; 11. 7. 2005



stav porostu 11. 7. 2005



detail květu



stav porostu 25. 7. 2005



třetí aplikace elicitorů; 1. 8. 2005



fáze zralosti; 6. 8. 2005