Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Hormonální regulace sekundárního metabolismu heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla* L.)

Diplomová práce

Autor: Bc. Natálie Horáková

Studijní program: N1501 / Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Hradec Králové květen 2021

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

Zadání diplomové práce

Autor:	**Bc. Natálie Horáková**
Studium:	S18BI004NP
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Název diplomové práce:	**Hormonální regulace sekundárního metabolizmu heřmánku pravého**
Název diplomové práce AJ:	Hormonal regulation of secondary metabolism of chamomile plants

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Cílem práce je studovat vlyv signálnych molekúl hornonální povahy na sekundární metabolizmus heřmnánku kamilkového, zejména látky fenolové povahy.

Franke R, Schilcher H. Chemomile: Industrial Profiles. CRC Press, 2012.

odborné články dostupné v databázích (Scopus, Web of Science)

Garantující pracoviště:	Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta
Vedoucí práce:	RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.
Datum zadání závěrečné práce:	6.1.2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne Natálie Horáková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a trpělivost s vedením této diplomové práce. Také děkuji za finanční podporu Specifickému výzkumu č. 2105/2019 (Vliv vybraných rostlinných hormonů na akumulaci sekundárních metabolitů heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla* L.)).

Anotace

HORÁKOVÁ, N. *Hormonální regulace sekundárního metabolismu heřmánku pravého (Matricaria chamomilla L.)*. Hradec Králové, 2021. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Zuzana Kovalíková. 55 s.

V této práci jsme se zabývali vlivem kyseliny salicylové (SA) na sekundární metabolismus heřmánku a porovnáním obsahu sekundárních metabolitů v běžně dostupných komerčních heřmánkových čajích. V metanolových i vodných extraktech získaných z úborů ošetřených SA (0 - 3 mM) a z komerčních směsí jsme zjišťovali celkový obsah fenolů, flavonoidů a taninů, obsah jednotlivých fenolových kyselin a antioxidační aktivitu pomocí metody DPPH. Naše výsledky potvrdily, že SA má vliv na produkci sekundárních metabolitů heřmánku. Ve vodném výluhu, který odpovídá nejobvyklejší dietetické formě příjmu této byliny, tedy čaji, jsme zjistili, že u celkových rozpustných fenolů, flavonoidů i taninů působí aplikace 0,5 mM SA inhibičně. U fenolů se projevil výrazný nárůst při aplikaci 2 mM SA. Aplikace 3 mM SA vedla k opětovnému poklesu. U flavonoidů a taninů nebyl statisticky významný nárůst u žádné z koncentrací SA oproti kontrolní skupině. Aplikace SA vedla ke snížení akumulace kyseliny kávové a benzoové. Ostatní zjišťované kyseliny projevily nárůst alespoň při některých koncentracích SA. Antioxidační aktivita nevykazovala statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině. Porovnání vodných výluhů z našich rostlin a z komerčních čajovin ukázalo, že celkový obsah rozpustných fenolů je u obou skupin srovnatelný. Výrazně vyšší obsah byl zaznamenán jen u našich rostlin ošetřených 2 mM SA. Obsah flavonoidů v komerčních čajovinách byl u některých výrobců vyšší a u jiných nižší než v našich vzorcích ošetřených 2 mM SA, které vykazovaly nejvyšší obsah flavonoidů z našich rostlin. Obsah taninů v komerčních čajovinách nepřesáhl obsah v našich vzorcích po ošetření 1 mM SA. Antioxidační aktivita byla vyšší u našich vzorků, ale rozdíly byly do 5 %. Obsah fenolových kyselin byl vyšší v komerčních čajovinách.

Klíčová slova: heřmánek pravý, kyselina salicylová, fenoly, flavonoidy, taniny, DPPH, čaj

Annotation

HORÁKOVÁ, N. *Hormonal regulation of secondary metabolism of chamomile (Matricaria chamomilla L.).* Hradec Králové, 2021. Diploma thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Zuzana Kovalíková. 55 p.

This study focuses on the effect of salicylic acid (SA) on the chamomile secondary metabolism and comparison of the content of secondary metabolites in commonly available commercial chamomile teas. The total content of phenols, flavonoids and tannins, the content of individual phenolic acids and also the antioxidant activity were determined in methanol and aqueous extracts obtained from flowers treated with SA (0 – 3 mM) and from commercial teas. Our results confirmed that SA has an effect on the production of chamomile secondary metabolites. In the aqueous extract, which corresponds to the most common dietary form of intake of this herb (i.e. tea), we found that the application of 0,5 mM SA has an inhibitory effect on total soluble phenols, flavonoids and tannins. Phenols showed a significant increase with 2 mM SA. Application of 3 mM SA led to a further decrease. For flavonoids and tannins, there was no statistically significant increase in any of the SA concentrations compared to the control group. The application of SA led to a reduction in the accumulation of caffeic acid and benzoic acid. Other detected acids showed an increase at least at some concentrations of SA. The antioxidant activity determined by the DPPH method also did not show a statistically significant difference compared to the control group. A comparison of aqueous extracts from our plants and commercial teas showed that the total content of soluble phenols is similar in both groups. Significantly higher content was found only in our plants treated with 2 mM SA. The content of flavonoids in commercial teas was higher for some producers and lower for others compared to our samples treated with 2 mM SA, which showed the highest content of flavonoids from our plants. The amount of tannins in commercial teas did not exceed the content in our samples after treatment with 1 mM SA. Antioxidant activity was higher in our samples, but the differences were up to 5%. The phenolic acid content was higher in commercial teas.

Key words: Chamomile, salicylic acid, phenols, flavonoids, tannins, DPPH, tea

Obsah

Úvod 9
1. Literární rešerše 10
1.1 Charakteristika heřmánku pravého 10
1.2 Sekundární metabolity heřmánku 11
Seskviterpeny a seskviterpenoidy 12
Fenoly 12
Flavonoidy 13
Kumariny 15
Taniny 16
1.3 Kyselina salicylová 17
Vliv exogenní aplikace SA 19
2. Materiál a metody 21
2.1 Použité chemikálie 21
2.2. Přístrojové vybavení 21
2.3 Rostlinný materiál 22
Charakteristika odrůdy Lutea 22
Pěstování 22
Aplikace kyseliny salicylové 23
Vzorky čajovin 23
2.4. Analýzy 24
Příprava metanolových extraktů 24
Příprava vodných výluhů 24
Stanovení celkových rozpustných fenolů 24
Stanovení flavonoidů 24
Stanovení taninů 24
Stanovení fenolových kyselin 25
Stanovení antioxidační aktivity 25
Statistické zpracování dat 26
3. Výsledky 27
3.1. Vliv SA na velikost úborů 27
3.2. Vliv SA na obsah fenolů, flavonoidů a taninů 27
3.3. Vliv SA na obsah fenolových kyselin a vybraných flavonoidů 29

3.4. Vliv SA na zhášení radikálu DPPH 32
3.5. Obsah fenolů, flavonoidů a taninů v čajovinách 33
3.6. Zhášení radikálu DPPH v čajovinách 35
3.7. Obsah fenolových kyselin a flavonoidů v komerčních čajovinách 36
4. Diskuse 39
4.1. Vliv SA na sekundární metabolismus 39
4.2. Vliv metody extrakce 42
Závěry 46
Porovnání komerčních čajovin a našich vzorků 46
Vliv SA na naše vzorky 47
Seznam použité literatury 48
Přílohy 55

Úvod

Rostliny si vytvořily během evoluce různé fyzikální i biochemické adaptace jako odpověď na působení biotických a abiotických stresorů. Významnou úlohu v těchto obranných mechanismech představují rostlinné hormony, mezi které patří i kyselina salicylová. Rostliny také syntetizují sekundární metabolity, které se díky svým specifickým vlastnostem dokáží uplatnit při obranných reakcích na široké spektrum stresorů.

Sekundární metabolity jsou ale také velmi často vyhledávané pro své léčivé účinky. Metody zajišťující zvýšení syntézy těchto látek v rostlinných pletivech jsou proto velice atraktivní pro farmaceutický průmysl. Vyšší zastoupení sekundárních metabolitů vede k lepším terapeutickým účinkům léčivých rostlin.

Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla* L.) je známý pro své léčivé účinky už od pradávna a je velmi ceněnou rostlinou v tradiční medicíně. Jeho pozitivní působení na lidský organismus je využíván nejen ve farmaceutickém, ale i v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Extrakty a čaje získané z jeho úborů jsou uplatnitelné při léčbě širokého spektra zdravotních problémů od zánětlivých onemocnění až po hyperglykemii. Výzkum heřmánku se soustředí především na jeho silici a v ní obsažené látky, jako fenolové, terpenové a polyacetylénové sloučeniny. Tato práce se zabývá především fenolovým metabolismem heřmánku a také možností jeho ovlivnění pomocí aplikace kyseliny salicylové, coby známého rostlinného hormonu.

1. Literární rešerše

1.1 Charakteristika heřmánku pravého

Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla* L., *Chamomilla recutita* L., *Matricaria recutita* L. Rauschert) je jednoletá rostlina z čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*) s charakteristickou příjemnou lehce nahořklou vůní, vysoká 10-80 cm. Původní areál výskytu je jižní a východní Evropa a severní a západní Asie. V současnosti se ale rostlina rozšířila i do severní Ameriky a Austrálie. Heřmánek pravý nejlépe prosperuje v rozmezí teplot 7-26 °C. Vyhovují mu osluněná místa a preferuje písčkovité až jílovité půdy. Není náročný a dokáže si poradit i se širokým rozmezím pH od 4,8 do 8,5. Jedná se o mělce kořenující rostlinu s většinou hojně rozvětveným stonkem. Listy jsou střídavé, dvakrát až třikrát zpeřené v čárkovité úkrojky. Úbory jsou umístěny odděleně, v průměru 10-30 mm velké, stopkaté. Kvete od května do srpna. V úboru jsou květy dvojího typu. Zlatožluté, oboupohlavné, trubkovité, pětičetné květy jsou umístěny na terči květu, jsou 1,5-2,5 mm dlouhé. Na okraji vyklenutého, uvnitř dutého květního lůžka, je 11 až 27 bílých, samičích nebo sterilních, jazykovitých květů, dlouhých 6-11 mm. Pylové zrno je pokryto krátkými ostny a má tři klíční otvory. Plodem je zakřivená a lehce zploštělá nažka, žlutohnědé až hnědé barvy, dlouhá 0,8-1,3 mm, asi 0,3 mm široká, s 4-5 žebry (Franke et Schilcher 2012, Lim 2014).

Obr. 1: Heřmánek pravý (převzato z botanika.wendys.cz)

Heřmánek se od nepaměti využívá pro své antiflogistické, spazmolytické, bakteriostatické a fungicidní účinky. Látky z něj získané se uplatňují nejen ve farmaceutických produktech, ale i v potravinářství a kosmetice (Franke et Schilcher 2012).

V České republice je zaregistrováno pět odrůd heřmánku pravého, a to 'Bona', 'Goral', 'Lutea' a 'Novbona' slovenského původu a 'Bohemia' (Franke et Schilcher 2012).

Heřmánkový květ (*Matricariae flos*) je usušený úbor druhu *Matricaria chamomilla* L. Droga má hlavně lékařské využití. Její požadovaná kvalita je dána českým lékopisem: obsahuje nejméně 4 ml modře zbarvené silice na kilogram vysušené drogy a nejméně 0,25 % celkového apigenin-7-glukosidu, vztaženo na vysušenou drogu (ČL 2017).

Alkoholové extrakty (metanolové i etanolové) mají pozitivní účinky například při léčbě zánětlivých onemocnění a hyperglykémie. Vodný roztok (čaj) z heřmánkových květů napomáhá při léčení ran a při prevenci osteoporózy. Silice získané z úborů vykazují antimikrobiální aktivitu, odpuzují některé parazity (například vši) a jejich doposud zjištěné virucidní vlastnosti naznačují, že by mohly být úspěšně využity například při léčbě genitálního herpesu (Gupta et al. 2010). Účinky heřmánkových extraktů na léčbu úzkostných poruch a depresí zatím nejsou zcela průkazné (Amsterdam et al. 2019, Amsterdam et al. 2012). Pokusy na myších ale ukazují, že heřmánek může pomáhat vyrovnávat se se stresovými podmínkami (Gupta et al. 2010). Louhováním se do čaje dostane cca 10-15 % silic z květů (McKay et Blumberg 2006).

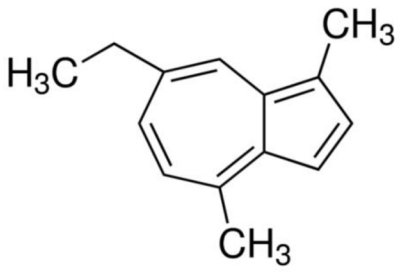
1.2 Sekundární metabolity heřmánku

Silice je obsažena ve všech rostlinných orgánech, nejvíce v květech a nejméně v kořenech. Obsah silice se mění v průběhu ontogeneze rostliny. Nejvyšší koncentrace je možno zaznamenat těsně před rozkvětem. Hlavní složkou silice jsou deriváty seskviterpenů a mohou tvořit 75-90 % silice obsažené ve květech. Naopak monoterpeny jsou zastoupeny jen ve stopovém množství. Mezi nejvíce zastoupené látky patří konkrétně α-bisabolol (levomenol), α-bisabololoxid A, α-bisabololoxid B, chamazulen a (*E*)-β-farnezén (Franke et Schilcher 2012). Kvalitativní a kvantitativní obsah silic heřmánku není výrazně ovlivněn růstovými podmínkami

(přihnojování, zavlažování, aplikace pesticidů), ale může se lišit mezi regiony, kulturními odrůdami a divoce rostoucími populacemi a různými způsoby zpracování (McKay et Blumberg 2006).

Seskviterpeny a seskviterpenoidy

Seskviterpeny jsou skupina terpenů skládající se ze tří izoprenových jednotek. Za nejvíce ceněné se považuje α-bisabolol a chamazulen. Chamazulen (Obr. 2) je modrá látka s antiflogistickým účinkem. Jeho prekurzor matricin lze získat z trubkovitých i jazykovitých květů, ale nevyskytuje se v květním lůžku. Matricin je nestálá látka, která se snadno rozkládá obzvláště ve vodném roztoku. Chamazulen vzniká z matricinu deacetylací, dehydratací a dekarboxylací při destilaci. Meziproduktem při této reakci je chamazulen karboxylová kyselina. Obsah matricinu a chamazulenu je variabilní mezi jednotlivými kultivary heřmánku. Ukázalo se, že tetraploidní kultivar 'Złoty Łan' obsahuje vyšší koncentrace chamazulenu než planě rostoucí rostliny a to až o 25 % obsahu silice. U jiných kultivarů bylo v silici detekováno i méně než 2 % chamazulenu (Franke et Schilcher 2012).



Obr. 2: Chamazulen

Fenoly

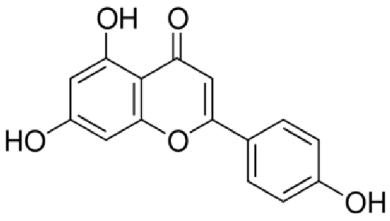
Fenolové látky představují různorodou skupinu sekundárních metabolitů, které se uplatňují při růstu a vývoji rostlin, ale také při obranných reakcích. Mezi fenolové sloučeniny se řadí široké spektrum látek od relativně jednoduchých sloučenin typu fenylpropanů, kumarinů, lignanů a flavonoidů až po polyfenolické třísloviny. Jedná se o sloučeniny obsahující jednu nebo více hydroxylových skupin připojených přímo na aromatické jádro (Vermerris et Nicholson 2007). Většina fenolických látek má dvě nebo více hydroxylových skupin. Rostliny využívají fenolické sloučeniny k pigmentaci, růstu, reprodukci, patogenové rezistenci a mnoha dalším funkcím.

Pozitivní korelace mezi antioxidační kapacitou a obsahem fenolických sloučenin v léčivých rostlinách naznačuje, že tyto látky by mohly mít hlavní podíl na léčivých účincích (Oksana et al. 2012). Velice širokou skupinu fenolických látek tvoří flavonoidy. Dále byla zjištěna přítomnost velkého množství derivátů kyseliny skořicové, kyseliny ferulové, kyseliny kávové a jiných neidentifikovaných fenolických derivátů. Málo zastoupené byli kumariny herniarin a umbelliferon. Všechny tyto složky (včetně flavonoidů) jsou rozpustné v horké vodě a konzumací heřmánkového čaje se dá získat alespoň část těchto látek (McKay et Blumberg 2006).

Flavonoidy

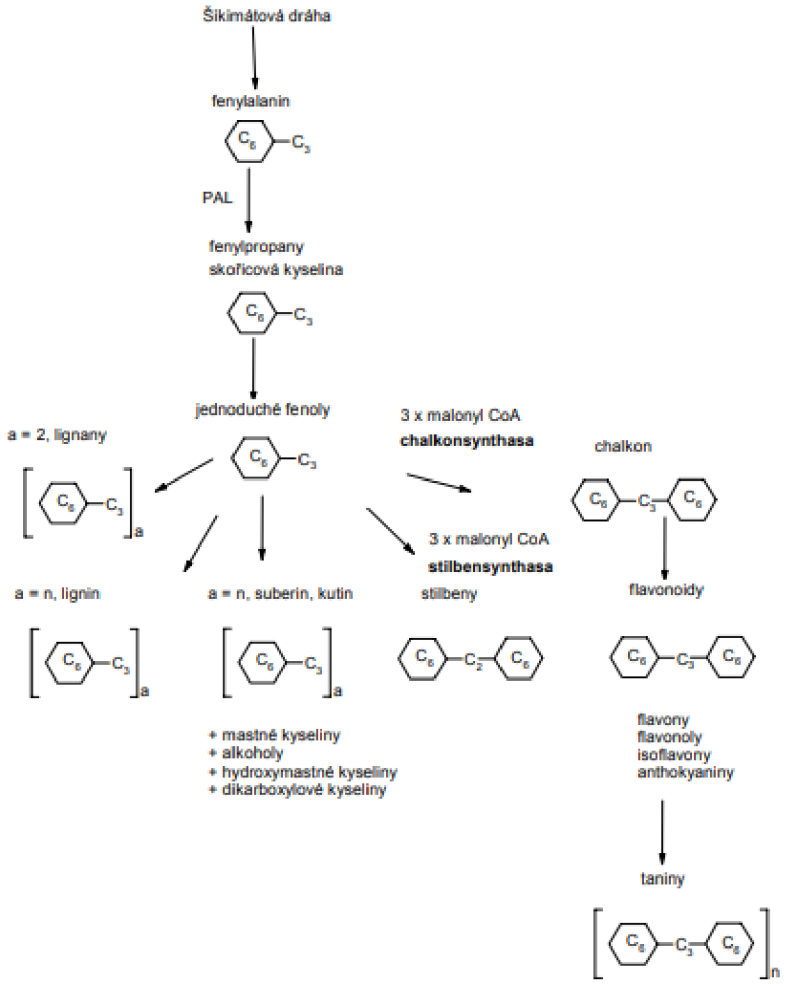
Flavonoidy jsou patnáctiuhlíkaté sloučeniny, které vždy vykazují strukturální vzorec C_6-C_3-C_6; tedy propojení dvou benzenových jader tříuhlíkatým řetězcem (Švehlíková et al. 2004).

Představují hlavní složku ve vodě rozpustných látek obsažených v heřmánku. Jsou využívány ve farmaceutickém průmyslu, kde se uplatňují jako spasmolytika a antiflogistika. Prvním flavonoidem, který se podařilo z heřmánku izolovat, je apigenin (Obr. 3). Apigenin se akumuluje v bílých, jazykovitých květech ve formě apigenin-7-*O*-glukosidu nebo některého z acylovaných derivátů (Franke et Schilcher 2012, Vermerris et Nicholson 2007, Švehlíková et al. 2004). Flavonoidy nejvíce zastoupené celkově v úborech heřmánku jsou apigenin (16,8 %), kvercetin (9,9 %), patuletin (6,5 %), luteolin (1,9 %) a jejich glukosidy. Zastoupení těchto látek v jednotlivých částech květenství se ale liší. Například apigenin je výrazně zastoupen v jazykovitých květech (68 %), ale jeho koncentrace v květním lůžku (0,8 %) a trubkovitých květech (0,9 %) je podstatně nižší. Naopak kvercetin je obsažen hlavně v trubkovitých květech (12,4 %) a květním lůžku (10 %), zatímco v jazykovitých květech (2,1 %) se vyskytuje v menších koncentracích (McKay et Blumberg 2006). V trubkovitých květech, nikoliv však v jazykovitých, se vyskytují flavonoidy jaceidin a chrysosplenetin (Repčák et al. 1999). V květech heřmánku se dále vyskytují například chrysosplenon, eupatoletin, spinacetin, axillarin a eupalitin (Exner et al. 1981).



Obr. 3: Apigenin

Biosyntéza flavonoidů (Obr. 4) vychází z kyseliny šikimové. Produkty šikimátové dráhy vedou ke vzniku aromatických aminokyselin (např. thyrosinu a fenylalaninu). Fenylalanin je pomocí enzymu PAL (phenylalanine ammonia lyase) přeměněn na kyselinu skořicovou, která je prekurzorem řady fenylpropanoidů. U některých rostlin probíhá biosyntéza přes kyselinu 4-hydroxyskořicovou, která vzniká obdobným způsobem z tyrosinu. Z acetátové dráhy přichází tři molekuly malonyl-CoA. Velice důležitý je poté enzym chalkon syntáza, který zajišťuje za-cyklení kruhů. Konkrétní rostliny mají své specifické skupiny enzymů (např. izomerázy, reduktázy, hydroxylázy), které dále upravují základní strukturu, což vede ke vzniku různých podskupin flavonoidů (Dewick 1997, Ma et al. 2014).

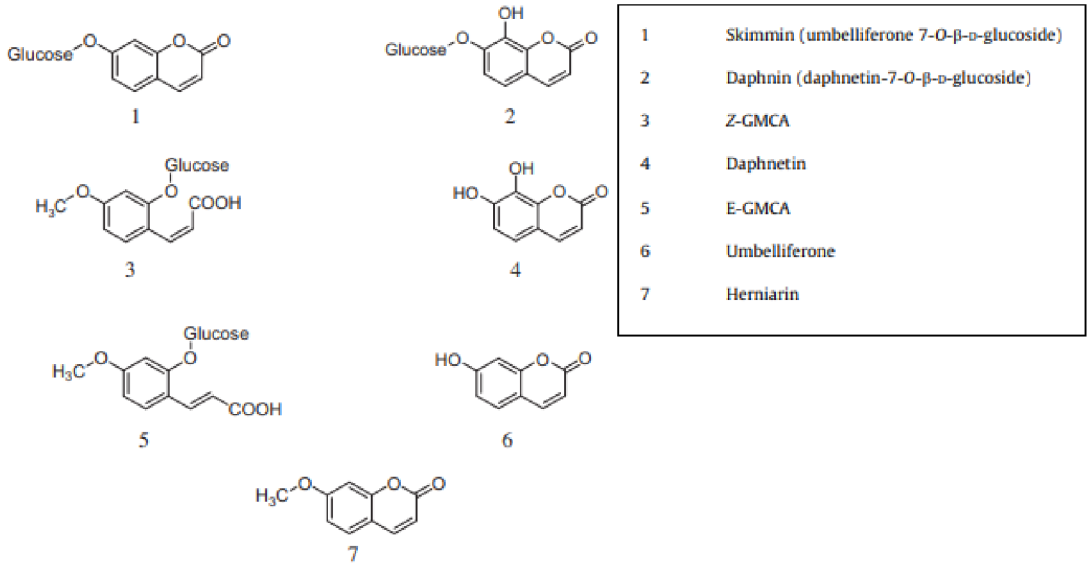


Obr. 4: Biosyntéza flavonoidů (převzato z Adámková et al. 2006)

Kumariny

Kumariny (1,2-benzopyrany) se nachází ve velkém počtu vyšších rostlin. Účastní se obranných reakcí při abiotickém stresu, proti patogenům a škůdcům a při hormonální regulaci. Jedná se o spojení tříuhlíkatého heterocyklu obsahující kyslík s benzenovým jádrem. V jazykovitých i trubkovitých květech heřmánku jsou přítomny herniarin (7-metoxykumarin) a umbeliferon (7-hydroxykumarin). Oba jsou předmětem farmakologického zájmu. Prekurzorem herniarinu je kyselina (*Z*)- a (*E*)-2-β-D-glukopyranozyloxy-4-metoxyskořicová (GMCA). *Z*-GMCA se po hydrolýze β-glukosidázou laktonizuje a vzniká herniarin. Při stresu se hladina GMCA zvyšuje a dochází tak i k navýšení herniarinu. Podobně se při stresu zvyšuje i množství umbeliferonu. Mezi další kumariny obsažené v květech heřmánku patří isoskopoletin, eskuletin a skopoletin. Na Obr. 5 je přehled některých mono-

a disubstituovaných kumarinů a jejich prekurzorů. Biosyntéza kumarinů vychází stejně jako biosyntéza flavonoidů z kyseliny skořicové. Její hydroxylací vzniká kyselina kumarová. Ta je poté laktonizována za vzniku kumarinu. Kumariny se vyskytují v rostlinách buď v glykosidické formě, nebo jako aglykony. Glykosidům sekundárních metabolitů se obecně připisuje snížená chemická aktivita, ale díky lepší rozpustnosti se uplatňují jako zásobní a transportní formy. Při působení stresu glykosidická vazba zaniká vlivem specifického enzymu a vzniká účinnější aglykon (Bourgaud et al. 2006, Chong et al. 2002, Franke et Schilcher 2012, Petruľová-Poracká et al. 2013, Repčák et al. 2009).



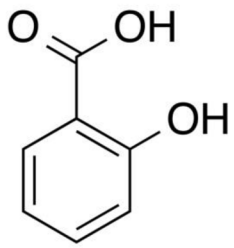
Obr. 5: Substituované kumariny heřmánku a jejich prekurzory

Taniny

Taniny, označované také jako třísloviny, patří do skupiny polyfenolů. Jedná se o ve vodě rozpustné látky se střední až vysokou molekulovou hmotností. Dokáží vytvářet nerozpustné komplexy se sacharidy, proteiny a trávicími enzymy, čímž snižují stravitelnost potravin. Mají typickou svíravou chuť, která ale může být v nižších koncentracích příjemná. Nadměrný příjem taninů je spojován s výskytem některých druhů rakovinných onemocnění, zejména rakoviny jícnu. U některých taninů byla ale zjištěna antimikrobiální aktivita, schopnost snižovat krevní tlak a pozitivní účinky na imunitní systém. V heřmánku se taniny vyskytují v množství menším než 1 % (Reľat et al. 2008, Zadeh et al. 2014).

1.3 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA)(Obr. 6) patří do skupiny fenolických látek. Považuje se za důležitý rostlinný hormon, který se uplatňuje při řízení růstu a vývoje. Podstatnou roli má také při odpovědi na abiotický i biotický stres. V minulosti byla SA zkoumána jen pro farmaceutické využití. Až v devadesátých letech dvacátého století bylo zjištěno, jak velký význam má pro rostliny. Tato její funkce byla dlouho neznámá nejspíše i proto, že koncentrace SA v rostlinách je poměrně nízká (Ding et Ding 2020).



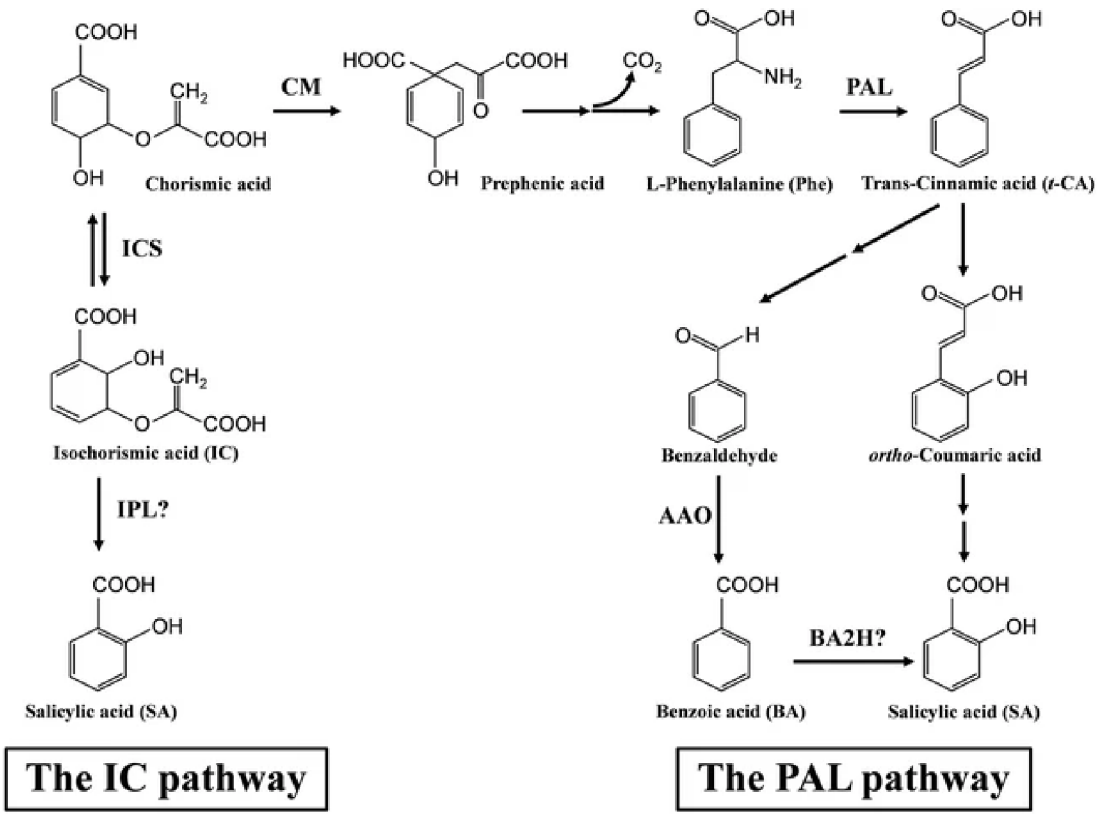
Obr. 6: Kyselina salicylová

Kyselina salicylová je důležitým obranným hormonem. První náznaky, že by SA mohla mít imunitní funkci, jsou už z roku 1979, kdy Raymond F. White popsal vliv aplikace aspirinu (kyselina acetylsalicylová) na resistenci tabáku vůči viru tabákové mozaiky. V nízkých koncentracích se SA vyskytuje v celé rostlině a přispívá k systémově získané resistenci (SAR). Ve větších koncentracích se nachází v místě průniků patogenu. SA pozitivně působí na syntézu proteinů souvisejících s patogenezí (PR proteiny). PR proteiny jsou skupina proteinů, které se uvolňují po inokulaci patogenu a fungují jako signální molekuly nebo mohou mít přímo antimikrobiální účinky. Zvýšení koncentrace SA v rostlinných pletivech může také vést k hypersensitivní odpovědi (HR), kdy rostlina obklopí místo vstupu patogenu nekrotickou tkání, která brání/zpomaluje šíření patogenu (Ding et Ding 2020, Dzhavakhiya et al. 2007).

Rostliny využívají k syntéze SA dva možné způsoby (Obr. 7). Ačkoli žádná cesta pro biosyntézu SA není zcela pochopena, je známo, že obě dráhy vychází z chorizmátu, což je meziprodukt fenylpropanoidové dráhy. První dráha probíhá v chloroplastech syntézou z kyseliny chorizmové. Ta je přeměněna izochorizmát

syntázou (ICS) na kyselinu izochorizmovou (IC). Konečný krok přeměny kyseliny izochorizmové na SA je katalyzován izochorizmát pyruvát lyázou (IPL). Tato dráha byla popsána na základě hypotézy, že rostliny syntetizují SA podobně jako bakterie. U mnoha druhů rostlin byly skutečně identifikovány geny kódující ICS, avšak nebyl už nalezen žádný rostlinný gen, který by odpovídal bakteriální IPL (Dempsey et Klessig 2017).

V druhé dráze probíhající v cytoplasmě se přeměňuje fenylalanin na kyselinu *trans*-skořicovou (*t*-CA). V závislosti na druhu rostliny je *t*-CA převedena na SA prostřednictvím meziproduktů kyseliny *orto*-kumarové nebo kyseliny benzoové (BA). K přeměně BA na SA pravděpodobně dochází hydroxylací enzymem hydroxylázou (BA2H) (Dempsey et Klessig 2017).



Obr. 7: Biosyntéza SA (převzato z Dempsey et Klessig 2017)

Vliv exogenní aplikace SA

Exogenní aplikace SA může vyvolat v rostlině mnoho reakcí. U několika rostlin byl prokázán vliv postřiků nebo máčení semen rostlin na jejich růst a produkci biomasy. SA může také zvyšovat zastoupení fotosyntetických pigmentů. Některé studie ukazují, že účinky SA jsou závislé na koncentraci. Nižší koncentrace mají pozitivní vliv na růst i fotosyntézu, ale koncentrace vyšší mají tendenci působit inhibičně. Důležitou úlohu má SA ve stresových reakcích. Studie zabývající se vlivem SA na biotický stres ukázaly, že exogenně aplikovaná SA indukuje expresi PR a podílí se na rezistenci vůči patogenům různého původu (Hayat et al. 2010). SA také dokáže zlepšit toleranci rostlin k různým abiotickým stresům. Bylo zjištěno, že aplikace SA zvyšuje toleranci k některým těžkým kovům, například mědi, olovu nebo kadmiu. Snižuje také dopady rtuťnatých a olovnatých kationtů na klíčivost a růst některých rostlin (Horváth et al. 2007, Khan et al. 2015). Postřik SA zvyšuje odolnost rostlin vůči tepelnému stresu, jak bylo ukázáno například na rostlinách tabáku, hořčice nebo kukuřice (Horváth et al. 2007). Zvýšení tolerance záviselo na koncentraci SA a projevovalo se jen u nízkých koncentrací. Na rostlinách okurky se také projevil pozitivní efekt postřiku SA na toleranci vysokých teplot, ale stejné koncentrace SA podávané rostlině hydroponicky měly opačný efekt (Shi et al. 2006). Postřik nebo přidávání SA do hydroponického roztoku měli pozitivní efekt na zlepšení tolerance vůči nízkým teplotám nad bodem mrazu například u rostlin kukuřice, rýže nebo okurky (Miura et Tada 2014). Vliv SA na odolnost vůči mrazu není jasný. Vliv SA na osmotický stres a stres zasolením není jednoznačný (Horváth et al. 2007).

SA také ovlivňuje produkci sekundárních metabolitů. Exogenní aplikace SA může být použita jako velmi přínosná ekologická metoda pro získávání farmakologicky aktivních látek, pro které jsou rostliny využívány v léčitelství a farmaceutickém průmyslu. Existuje již mnoho studií o využití aplikace SA na zvýšení produkce sekundárních metabolitů především na rostlinných buněčných kulturách, ale i na intaktních rostlinách v polních podmínkách. Přesto nebývá tato metoda využívána při komerční produkci léčivých rostlin (Sadeghian et al. 2013).

Bylo zjištěno, že exogenní aplikací SA v různých koncentracích (0,01, 0,1 a 1 mM) na listy šafránu setého (*Crocus sativus*) se zvýší produkce flavonoidů a fenolických sloučenin. Obsah sekundárních metabolitů se lišil v závislosti na použité koncen-

traci SA (Tajik et al. 2019). Ke zvýšené produkci flavonoidů, konkrétně anthokyanů, došlo i u hroznů vinné révy (*Vitis vinifera*) po sprejové aplikaci různých koncentrací SA (50, 100 a 200 mM). Výrazné zvýšení obsahu anthokyanů se dostavilo u koncentrací 100 a 200 mM. Exogenní aplikace SA před sběrem hroznů by mohla být efektivní metoda zlepšování kvality a nutričních hodnot vinných hroznů (Oraei et al. 2019). Aplikace SA na listy moráče zákrovnatého (*Ammi visnaga*) vystaveného stresu suchem se také potvrdila jako stimulant pro produkci sekundárních metabolitů. Nejvyššího obsahu fenolických látek bylo dosaženo při aplikaci 2 mM SA (Osama et al. 2019). Polní studie zabývající se vlivem listové aplikace SA a kyseliny jasmonové (JA) na sekundární metabolity meduňky lékařské (*Melissa officinalis*) ukazuje, že oba hormony mohou podpořit tvorbu některých sekundárních metabolitů, především pak monoterpenů a seskviterpenů (Pirbalouti et al. 2019). Do živného roztoku hydroponicky pěstovaných rostlin ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) byla přidávána SA v různých koncentracích (100, 200 a 400 µM) a bylo zjišťováno množství silibininu, isosilibininu a silychristinu v plodech. Plody sklízené z rostlin, které byly vystaveny 200 µM SA po pět dní vykazovaly vyšší hladinu všech flavonolignanů (Ahmed et al. 2020). Ve studii zabývající se vlivem SA na stimulaci biosyntézy terpenových trilaktonů jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*) bylo potvrzeno, že SA má pozitivní účinek na zvyšování obsahu sekundárních metabolitů (Ye et al. 2020). Studie zkoumající účinek exogenní aplikace SA a kyseliny giberelové (GA) na výhonky léčivého zběhovce (*Ajuga integrifolia*) ukázala, že SA podporuje fytochemickou produkci v těchto kulturách, zatímco GA biosyntézu snižuje. Optimální koncentrace SA pro zvýšení akumulace většiny měřených látek byla stanovena na 150 µM. Ošetření touto koncentrací vedlo také ke zvýšení *in vitro* antioxidačních a protizánětlivých procesů (Abbasi et al. 2020). Ošetření semenáčků řečíku pistáciového (*Pistacia vera*) SA o koncentracích 1 a 4 mM vedlo ke zvýšení obsahu fenolických látek a aktivity PAL. Statistické analýzy prokázaly, že účinky SA nejsou závislé jen na koncentraci, ale také na čase. Nejlepší výsledky se projevily 3-9 dní po aplikaci (Ghamari et al. 2020). Výsledky studie zabývající se vlivem aplikace SA a růst-podporující rhizobakterií (PGPR) na mátu peprnou (*Mentha piperita*) ukázaly pozitivní účinky SA na obsah fenolických látek. Společná aplikace SA a PGPR měla srovnatelný vliv jako aplikace samotné SA (Cappellari et al. 2020).

2. Materiál a metody

2.1 Použité chemikálie

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH): Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Acetonitril: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Folin-Ciocalteu činidlo: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Chlorid hlinitý: Penta s.r.o. (Praha, CZ)

Kempferol: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kožní prášek: Merck (Darmstadt, Německo)

Kvercetin: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina benzoová: Acros Organics (New Jersey, USA)

Kyselina gallová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina chlorogenová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina kávová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina mravenčí: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina *p*-hydroxybenzoová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina *p*-kumarová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina protokatechová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina salicylová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina syringová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina *trans*-ferulová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina *trans*-skořicová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina vanilová: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Luteolin: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Metanol: Penta s.r.o. (Praha, CZ)

Uhličitan sodný: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.2. Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Ohaus, Švýcarsko)

Mikrocentrifuga MPW 55 (MPW Med Instruments, Polsko)

Třepačka Multi Reax (Německo)

Sušárna Memmert UF450 (Memmert, Německo)

Dvoupaprskový spektrofotometr (Cintra, Francie)
Chromatografická kolona Zorbax RRHD Eclipse plus C18 (2.1 mm x 50 mm, 1.8 μm) (Agilent, USA)
Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem (6470 Triple Quadrupole LC/MS Systém; Agilent, USA)

2.3 Rostlinný materiál

Charakteristika odrůdy Lutea

Pro studii jsme použili tetraploidní odrůdu 'Lutea' (autoři: Repčák M., Oravec V., Černaj P. (Štátna odrodová kniha SR, ev. č. 3333/1997)), která je pěstována pro svůj vysoký obsah matricinu, chamazulenu a bisabololu. Vznikla na konci osmdesátých let dvacátého století z odrůdy 'Goral'. Jedná se o středně vysoké rostliny, se středně zelenými listy, střední výškou úrovně květů, s velkým průměrem úborů bez i s jazykovitými květy. Tato odrůda se vyznačuje stabilním chemotypovým složením populace (více než 92 % (-)-α-bisabololových rostlin). Obsah silic odpovídá 1,2 %. Silice obsahuje hlavně (-)-α-bisabolol (43,3 %) a chamazulen (21,2 %)(Franke et Schilcher 2012).

Pěstování

Rostliny jsme předpěstovali v laboratorních podmínkách ve fytotronu. Průměrná teplota byla nastavena na 22 °C/20 °C (den/noc) a vlhkost vzduchu na 65 %. Fotoperioda byla 12 h/12 h (den/noc). Semena (osivo získané z Univerzity P. J. Šafárika v Košicích, SR) jsme vyseli do vypraného písku a pravidelně zalévali. Po 4 týdnech jsme přesadili jednotlivé rostlinky do samostatných rašelinových zakořeňovačů se zahradnickým substrátem a opět je umístili do fytotronu a pravidelně zalévali. Po dalších 5 týdnech jsme rostliny přesázeli na pole v areálu Botanické zahrady léčivých rostlin Farmaceutické fakulty UK.

Na analýzu jsme použili květy, které představují léčivou drogu. Při sběru jsme se řídili prací Repčák et Krausová (2009), kteří fázi kvetení rozdělili na šest stádií, přičemž nejvyšší obsah účinných látek (např. apigenin a jeho deriváty) se zaznamenal v 3. a 4. fáze kvetení, tedy když jsou jazykovité květy plně vyvinuté a ½ až ⅔ rourkovitých květů je rozvinutá (Obr. 8). Květy jsme následně analyzovali po vol-

ném usušení při laboratorní teplotě po dobu 14 dní. Zaměřili jsme se na celkový vizuální stav úborů, čerstvou a suchou hmotnost, sekundární metabolity a antioxidační aktivitu extraktů.

3. fáze

4. fáze

Obr. 8: Vybrané fáze vývoje květu heřmánku (foto: Z. Kovalíková)

Aplikace kyseliny salicylové

Pomocí rozprašovače jsme provedli aplikaci SA o koncentracích 0,5 mM, 1 mM, 2mM a 3 mM ve fázi pupenů (3-4 dny před rozkvětem).

Vzorky čajovin

V potravinách a v lékárnách jsme zakoupili 12 různých běžně dostupných výrobků obsahujících rozemletou drogu heřmánku pravého porcovanou do čajových sáčků, nebo preparáty tvořené celými úbory. Specifikace výrobků je uvedená v Tab. 1.

Tab. 1: Specifikace čajovin

výrobce		původ	doporučená příprava	doba louhování
Herbex	porcovaný	Slovensko	2,5 g/500 ml	10 minut
Megafyt Pharma	porcovaný	ČR	1 g/250 ml	10 minut
Leros bio	porcovaný	ČR	1 g/250 ml	10 minut
Dr. Max	sypaný	ČR	0,87 g/250 ml	15 minut
Leros	sypaný	ČR	0,87 g/250 ml	15 minut
Fytofarma	sypaný	Slovensko	0,87 g/250 ml	15 minut
Apothéke dětský Bio	porcovaný	ČR	1 g/250 ml	10 minut
Hipp bio	porcovaný	Německo	1,5 g/250 ml	10 minut
Tea cz Natur (výrobce Leros)	porcovaný	ČR	1 g/250 ml	10 minut
Pickwick	porcovaný	Nizozemsko	1,5 g/250 ml	10 minut
Apothéke	porcovaný	ČR	1,5 g/250 ml	15 minut
Teekanne	porcovaný	Rakousko	1 g/250 ml	10 minut

2.4. Analýzy

Příprava metanolových extraktů

Extrakty jsme připravili homogenizací 0,5 g sušených úborů společně s 10 ml 80% metanolu (ředění 0,05 g FW/1 ml metanolu). Homogenáty jsme centrifugovali při 4 500 rpm po dobu 15 minut. Metanolové extrakty čajovin jsme připravili stejným způsobem.

Příprava vodných výluhů

Vodný výluh jsme připravili zalitím 1 g sušených úborů 250 ml vroucí vody (ředění 0,004 g FW/1 ml vody). Směs jsme nechali louhovat po dobu 10 minut. U dostupných čajů navážka i doba louhování odpovídala doporučením výrobce uvedeným na obalu zakoupených čajových směsí (Tab. 1.).

Stanovení celkových rozpustných fenolů

Ke 30 µl metanolového nebo vodního extraktu jsme přidali 470 µl destilované vody. Po promíchání jsme přidali 975 µl 2% Na_2CO_3 a 25 µl 2 N Folin-Ciocalteu činidla. Vzorky jsme nechali inkubovat v sušárně při 45 °C po dobu 1 hodiny. Po ochlazení na laboratorní teplotu jsme vzorky analyzovali ve spektrofotometru při nastavené absorbanci 750 nm. Extrakt byl ve slepém vzorku nahrazen destilovanou vodou. Jako standardní látku pro sestrojení kalibrační křivky jsme použili kyselinu gallovou (vyobrazena v příloze). Výsledky jsme vyjádřili jako mg g^{-1} DW (Singleton et Rossi 1965).

Stanovení flavonoidů

Ke 1 000 µl metanolového nebo vodního extraktu jsme přidali 1 000 µl 2% $AlCl_3$ ve 100% metanolu. Vzorky jsme nechali inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě. K měření byl použit spektrofotometr o nastavené absorbanci 420 nm. V slepém vzorku byl extrakt nahrazen 1 000 µl 80% metanolu. Jako standardní látka pro sestrojení kalibrační křivky byl použitý kvercetin (vyobrazena v příloze). Výsledky jsme vyjádřili jako mg g^{-1} DW (Ordoñez et al. 2006).

Stanovení taninů

Extrakt o objemu 1 ml jsme promíchali s 0,05 g kožního prášku (hide powder). Vzorky jsme nechali 1 hodinu třepat v třepačce Multireax Shaker a následně jsme

je centrifugovali při 4 500 rpm po dobu 10 minut. Poté jsme využili metodu na stanovení fenolu popsanou výše.

Stanovení fenolových kyselin

Obsah fenolových kyselin a vybraných flavonoidů jsme stanovili metodou UHPLC-MS ve spolupráci s Katedrou chemie. UHPLC separace látek proběhla na koloně Zorbax RRHD Eclipse plus C18 (2,1 mm x 50 mm, 1,8 μm) s trojitým kvadrupólem jako detektorem (elektrosprejová ionizace - režim negativních iontů). Eluenty mobilní fáze byly (A) 0,05% kyselina mravenčí ve vodě; (B) 0,05% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Pro každou sloučeninu byly sledovány vybrané přechody MRM: kyselina protokatechová (153,0 => 109,0, 91,0), kyselina *p*-hydroxybenzoová (137,0 => 108,0, 92,0), kyselina benzoová (121,0 => 77,1), kyselina kávová (179,0 => 135,0, 107,0), kyselina chlorogenová (353,1 => 191,0, 127,0), kyselina *trans*-skořicová (147,1 => 103,0, 77,0), kyselina ferulová (193,1 => 134,1, 178,0), kyselina gallová (169,0 => 125,0, 119,0), kempferol (185,1 => 1185,0, 239,0), luteolin (285,1 => 133,0, 151,0), kyselina *p*-kumarová (163,1 => 119,0, 104,9), kvercetin (301,0 => 151,0, 179,0), kyselina salicylová (137,0 => 93,0, 65,0), kyselina syringová (197,1 => 182,0, 123,0), kyselina vanilová (167,0 => 152,0, 108,0) (Kovalíková et al. 2019). Kalibrační křivky pro jednotlivé metabolity jsou uvedeny v příloze.

Stanovení antioxidační aktivity

DPPH (1,1-difenyl 2-pikrylhydrazyl) je stabilní volný radikál. Ačkoliv má volný elektron nedochází k dimerizaci. Ve chvíli, kdy dojde ke spárování volného elektronu s jiným elektronem poskytnutým antioxidantem, dochází ke změně zbarvení z temně fialové na světlejší odstíny až bledě žlutou barvu (Molyneux 2004).

Při analýze jsme využili 60 μM DPPH (2,4 mg DPPH/100 ml 100% metanolu). Ku 1,5 ml roztoku DPPH jsme přidali 100 μl metanolového nebo vodného extraktu a nechali 30 minut reagovat ve tmě. Dále jsme měřili na spektrofotometru při 515 nm absorbanci. „Zhášecí“ aktivitu extraktů jsme vypočítali dle vzorce:

$$\% \text{ zhášení DPPH} = \frac{A_v - A_k}{A_v} \text{ x } 100,$$

kde A_v = absorbance testovaného vzorku a A_K = absorbance kontrolního vzorku (metanol).

Statistické zpracování dat

Naměřené údaje jsme vyjádřili v podobě základních statistických parametrů (průměrná hodnota a směrodatná odchylka). Pro vyhodnocení signifikance získaných dat jsme použili jednorozměrnou analýzu variance (ANOVA) a Tukeyův test na hladině $P<0,05$ (program Statistica). Hodnoty ve sloupcích a řádcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl.

3. Výsledky

3.1. Vliv SA na velikost úborů

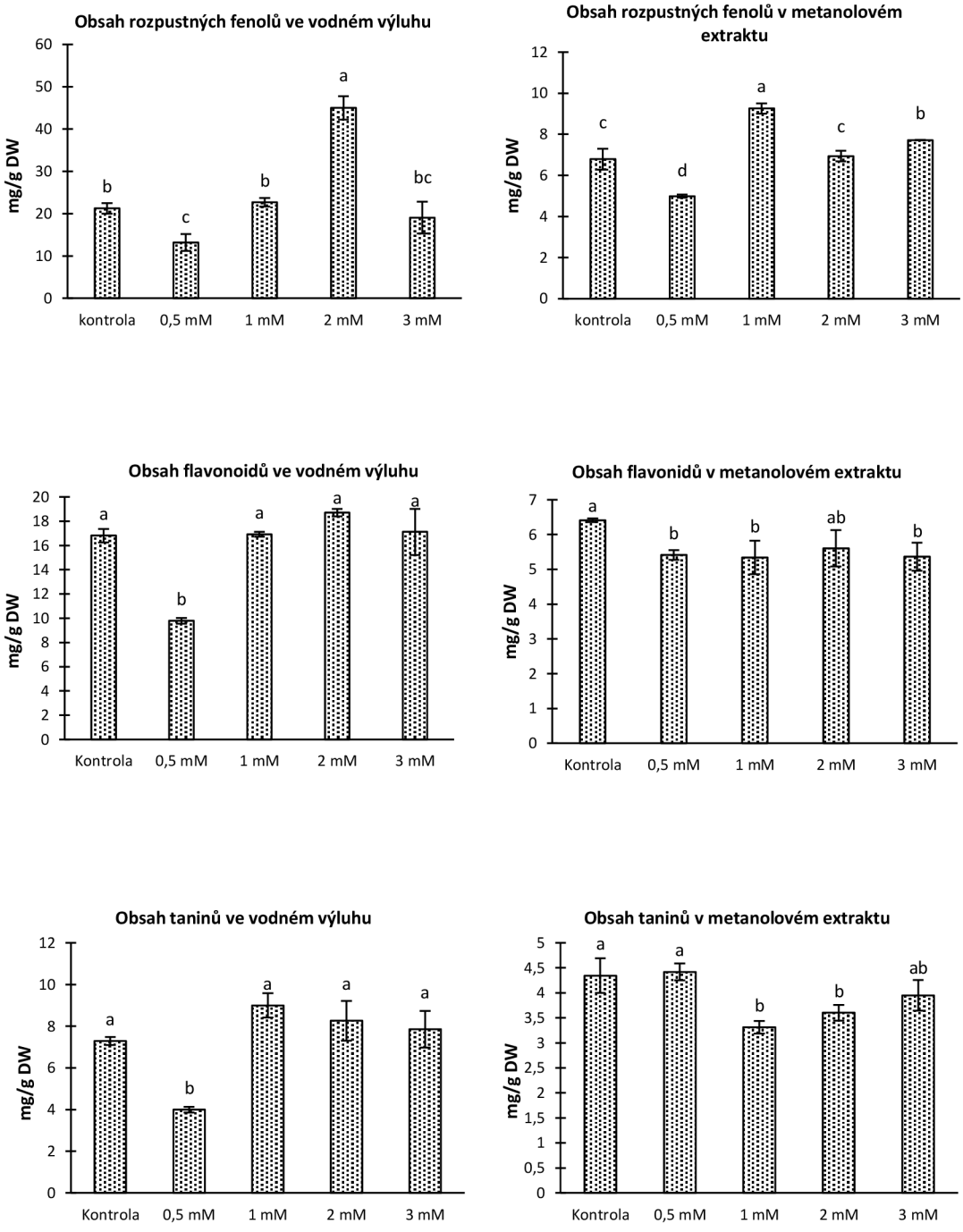
Vážení úborů heřmánku jsme provedli v den sběru a po kompletním usušení. Z tab. 2 je viditelný nárůst biomasy (po usušení) po aplikaci SA oproti kontrolní skupině. Nejvyšší nárůst biomasy se projevil po aplikaci 1 mM a 2 mM SA. Rostoucí koncentrace SA se také projevila ve zvyšujícím se obsahu vody v pletivech. Nejvyšší obsah vody byl u úborů ošetřených 3 mM SA.

Tab. 2: Vliv různých koncentrací SA na hmotnost úborů

	Koncentrace SA				
	Kontrola	**0,5 mM**	**1 mM**	**2 mM**	**3 mM**
Biomasa (mg DW/úbor)	37,40	40,36	43,38	43,71	40,52
Obsah vody (%)	77,21	79,26	79,21	79,46	81,32

3.2. Vliv SA na obsah fenolů, flavonoidů a taninů

Ze sekundárních metabolitů jsme pro zjišťování vlivu SA vybrali celkový obsah fenolů, obsah flavonoidů a taninů. Výsledky jsou uvedené v grafech na Obr. 8. a v tabulce v přílohách. Všechny tyto metabolity jsme měřili, jak ve vodném výluhu, tak i v metanolovém extraktu. Ze získaných dat není viditelný jednoznačný vliv SA na produkci fenolových metabolitů v podobě kontinuálního nárůstu metabolitů s rostoucí koncentrací SA. U vodných výluhů je zjištěný obsah metabolitů vyšší než u metanolových extraktů, v průměru 2 až 4 násobně (flavonoidy a fenoly). Při aplikaci 0,5 mM SA je u všech zjišťovaných metabolitů (vyjma taninů u metanolového extraktu) vidět signifikantní pokles. Nejvyšší obsah rozpustných fenolů byl ve vodném výluhu u vzorků ošetřených 2 mM SA a v metanolovém extraktu u vzorků ošetřených 1 mM SA. Nejvyšší obsah flavonoidů ve vodném výluhu vykazovaly vzorky ošetřené 2mM SA a v případě metanolových extraktů u neošetřených, kontrolních, rostlin. V případě taninů jsme mírné zvýšení pozorovali jen u vodného výluhu, a to u koncentrací 1 a 2 mM. V metanolových extraktech došlo naopak k poklesu.



Obr. 8: Obsah sekundárních metabolitů (fenoly, flavonoidy, taniny) po aplikaci SA o různé koncentraci. Hodnoty ve sloupcích označených stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl na hladině 0,05 podle Tukeyho testu. Úsečky představují směrodatné odchylky.

3.3. Vliv SA na obsah fenolových kyselin a vybraných flavonoidů

Vliv SA na fenolové kyseliny a vybrané flavonoidy jsme zjišťovali v metanolovém extraktu i vodném výluhu. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 3 a Tab. 4).

Celkově jsme v metanolových extraktech stanovili 11 fenolických kyselin a tři flavonoidy. Pokles v obsahu u metanolového výluhu jsme zaznamenali u 6 kyselin a nárůst u 4 kyselin. Nejvýraznější pokles byl u kyseliny syringové (2,5-násobný) a protokatechové (2-násobný) při nejvyšší použité koncentraci. Obsah kyseliny kávové se stoupající koncentrací výrazně narůstal až do maxima při 2mM SA. Mírný nárůst jsme zaznamenali i u kyseliny skořicové, salicylové a vanilové, kde se maximum pohybovalo mezi 2 mM a 3 mM koncentrací. U všech studovaných flavonoidů došlo se stoupající koncentrací k signifikantnímu nárůstu, nejvýrazněji v případě kempferolu, a to 2,2-násobně.

Obsah studovaných fenolových kyselin byl ve vodním výluhu nižší, v některých případech 10-100 násobně (např. kyseliny *p*-hydroxybenzoová, chlorogenová, kávová). Výjimkou je kyselina vanilová, kde byly hodnoty naopak vyšší. Ve vodném výluhu se studované flavonoidy nepodařilo detekovat. Ze stanovených 11 fenolových kyselin jsme zaznamenali pokles u 2, a to kyseliny kávové a benzoové. Nejvýraznější pokles kyseliny kávové byl při koncentraci 0,5 mM (3,8-násobný) a kyseliny benzoové při 1 mM (1,9-násobný). Zbylých 9 kyselin reagovalo alespoň na některé koncentrace nárůstem. Nejvyšší nárůst jsme pozorovali u kyseliny *p*-hydroxybenzoové (10,3-násobný) při koncentraci 3 mM a kyseliny skořicové (4,3-násobný) při koncentraci 1 mM SA.

	Fenolové kyseliny a vybrané flavonoidy - metanolový extrakt				
Fenolové kyseliny	**kontrola**	**0,5 mM SA**	**1,0 mM SA**	**2,0 mM SA**	**3,0 mM SA**
Hydroxyskořicové kyseliny					
chlorogenová	1104,21±58,01a	797,43±84,74bc	1056,03±90,2ab	1015,84±166,16ab	694,83±61,63c
ferulová	3,77±0,4b	5,36±0,54a	3,92±0,87ab	2,63±0,34b	2,6±0,51b
kávová	45,31±1,27c	74,81±5,11b	93,68±3,94a	100,28±7,87a	71,45±2,58b
p-kumarová	5,33±0,1b	6,9±0,46a	3,96±0,81c	3,72±0,07c	3,57±0,05c
skořicová	1,09±0,06d	1,49±0,18c	1,67±0,02bc	1,89±0,06ab	1,92±0,04a
Hydroxybenzoové kyseliny					
p-hydroxybenzoová	2,49±0,2a	2,10±0,11ab	2,48±0,25a	2,37±0,1a	1,77±0,03b
gallová	1,09±0,12a	0,92±0,09a	0,58±0,01b	1,03±0,19a	0,48±0,02b
protokatechová	23,36±1,85a	18,12±1,4b	17,67±0,11bc	14,89±0,52c	11,38±0,4d
salicylová	1,77±0,03c	2,1±0,11bc	2,46±0,26ab	2,87±0,2a	2,52±0,2ab
syringová	1,27±0,19a	0,93±0,03b	0,76±0,04bc	0,75±0,05bc	0,53±0,05c
vanilová	9,46±0,22c	18,94±0,99a	17,58±2,97a	16,54±1,099ab	13,2±0,1bc
Flavonoidy					
kvercetín	38,56±0,69c	44,44±7,12bc	50,88±0,99b	53,06±2,36ab	62,29±1,82a
luteolin	10,46±1,62c	12,73±0,23bc	13,51±0,28b	14,89±0,25ab	16,64±0,96a
kempferol	3,72±0,31d	5,31±0,2c	6,90±0,09b	6,68±0,25b	8,39±0,61a

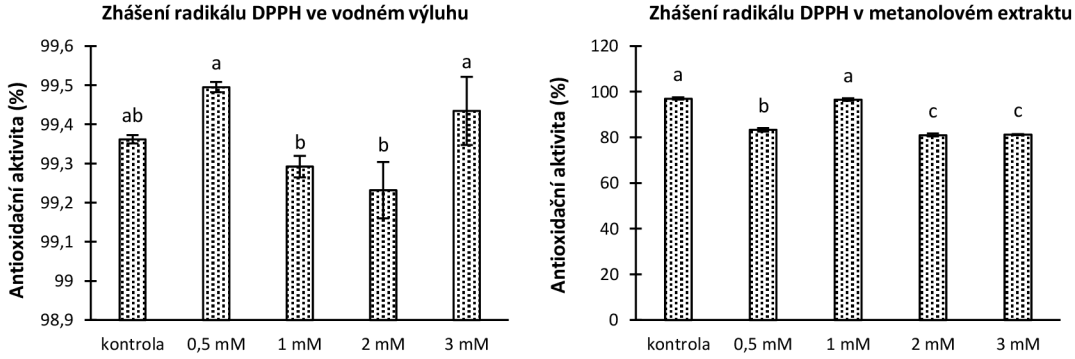
Tab. 3: Obsah fenolových kyselin (µg/g DW) a vybraných flavonoidů (µg/g DW) v metanolovém extraktu po aplikaci SA o různé koncentraci. Hodnoty v řádcích označených stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl na hladině 0,05 podle Tukeyho testu. Hodnoty představují průměr ± směrodajní odchylka.

	Fenolové kyseliny – vodný výluh				
	kontrola	**0,5 mM SA**	**1,0 mM**	**2,0 mM**	**3,0 mM**
Hydroxyskořicové kyseliny					
chlorogenová	9,56±0,02b	4,44±0,03d	5,01±0,18c	4,77±0,06cd	10,34±0,32a
ferulová	1,186±0,006a	0,865±0,022c	0,634±0,020d	1,039±0,035b	1,239±0,011a
kávová	0,0394±0,0003a	0,0104±0,0003e	0,0125±0,0002d	0,0131±0,0001c	0,0290±0,0000b
p-kumarová	1,062±0,024c	1,059±0,022c	0,936±0,03d	1,137±0,009b	1,396±0,014a
skořicová	0,191±0,002d	0,133±0,002e	0,814±0,004a	0,533±0,018b	0,466±0,004c
Hydroxybenzoové kyseliny					
p-hydroxybenzoová	0,014±0,002e	0,043±0,003d	0,068±0,004c	0,115±0,001b	0,144±0,002a
gallová	1,210±0,027a	0,953±0,024c	0,633±0,023e	0,864±0,016d	1,096±0,050b
protokatechová	16,82±0,08b	15,42±0,14c	15,39±0,11c	16,91±0,16b	21,12±0,49a
salicylová	2,857±0,069b	2,540±0,019c	2,376±0,016d	2,532±0,015c	3,948±0,026a
syringová	0,634±0,020b	0,509±0,017cd	0,476±0,014d	0,555±0,006c	0,846±0,040a
vanilová	55,54±0,99b	51,12±0,66b	51,37±0,44b	53,17±1,18b	66,06±3,45a

Tab. 4: Obsah fenolových kyselin (µg/g DW) a vybraných flavonoidů (µg/g DW) ve vodním výluhu po aplikaci SA o různé koncentraci. Ostatní detaily jsou stejné jako v Tab. 3.

3.4. Vliv SA na zhášení radikálu DPPH

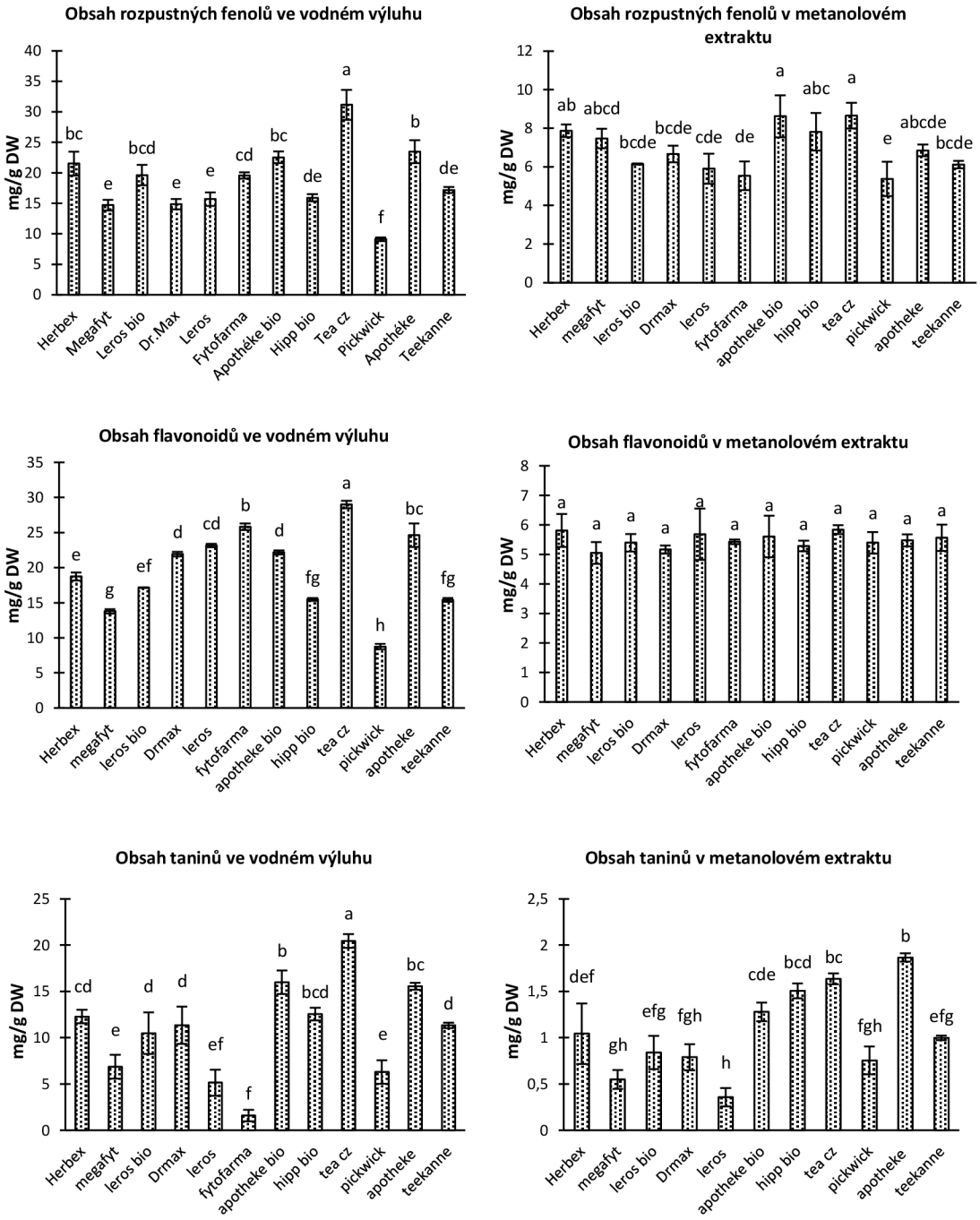
Měření antioxidační aktivity metodou DPPH jsme provedli ve vodném výluhu i metanolovém extraktu. Výsledky jsou uvedené na Obr. 9. Antioxidační aktivita ve vodném výluhu je nejvyšší u vzorků získaných z rostlin, na které byla aplikována 0,5 mM SA a 3 mM SA. U ostatních vzorků je antioxidační aktivita nižší než u vzorků z kontrolní skupiny. U metanolových extraktů byla nejvyšší naměřená antioxidační aktivita zjištěna u vzorků z kontrolní skupiny a vzorků po aplikaci 1 mM SA.



Obr. 9: Antioxidační aktivita (%) po aplikaci SA o různé koncentraci. Ostatní detaily jsou stejné jako v Obr. 8.

3.5. Obsah fenolů, flavonoidů a taninů v čajovinách

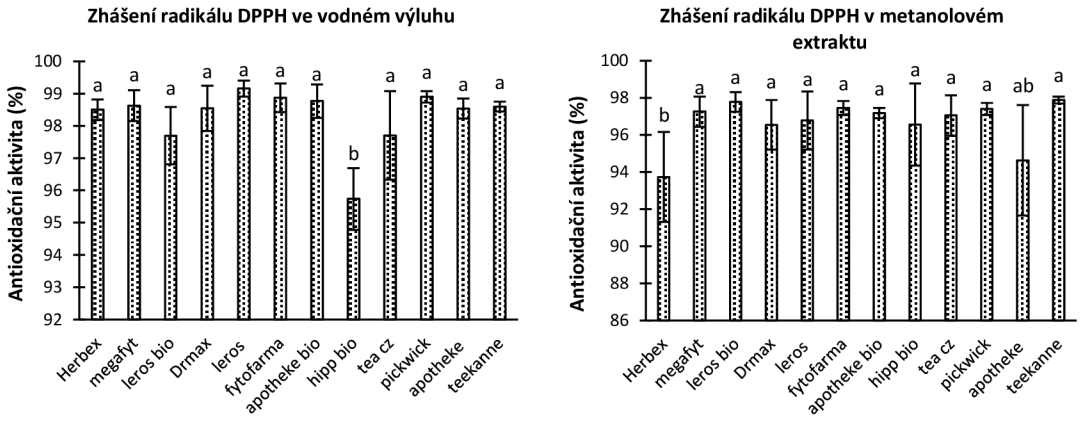
V zakoupených čajovinách jsme měřili celkový obsah rozpustných fenolů, obsah flavonoidů a taninů ve vodném výluhu i metanolovém extraktu. Výsledky jsou zobrazeny v grafech na Obr. 10 a v tabulce v přílohách. Nejvyšší obsah fenolů byl ve vodném výluhu u vzorku Tea CZ a v metanolovém extraktu Tea CZ a Apothéke bio. Nejnižší byl v obou případech u vzorku Pickwick. Obsah flavonoidů ve vodném výluhu byl nejvyšší opět u vzorku Tea CZ a nejnižší u vzorku Pickwick. Obsah flavonoidů v metanolovém extraktu byl srovnatelný u všech vzorků. Větší rozdíly byly mezi zjištěnými obsahy taninů. Ve vodném výluhu jsme zaznamenali nejvyšší obsah taninů u vzorku Tea CZ a nejnižší u vzorku Fytofarma. V metanolovém extraktu byl nejvyšší obsah taninů u vzorku Apothéke. Výsledný obsah taninů v metanolovém extraktu vzorku Fytofarma není v grafu uveden. I po opakovaném měření se nám nepodařilo získat relevantní data.



Obr. 10: Obsah sekundárních metabolitů (fenoly, flavonoidy, taniny) v čajovinách. Ostatní detaily jsou stejné jako v Obr. 8.

3.6. Zhášení radikálu DPPH v čajovinách

Zjištěná antioxidační aktivita je zobrazena na Obr. 11. Zhášení radikálu ve vodném výluhu bylo srovnatelné u všech vzorků kromě Hipp bio, který vykazoval nižší antioxidační aktivitu. V metanolovém extraktu byly výsledky všech vzorků také podobné s výjimkou nižší antioxidační aktivity u vzorku Herbex.



Obr. 11: Antioxidační aktivita (%) čajovin. Ostatní detaily jsou stejné jako v Obr. 8.

3.7. Obsah fenolových kyselin a flavonoidů v komerčních čajovinách

Měření fenolových kyselin a vybraných flavonoidů komerčních čajovin jsme provedli v metanolovém extraktu i vodném výluhu. Zjištěné obsahy jsou uvedeny v Tab. 5 a Tab. 6.

V metanolovém extraktu jsme stanovili 11 fenolových kyselin a tři flavonoidy. Největší rozdíly mezi čajovinami jsme zaznamenali u kyseliny salicylové a gallové. Nejvyšší obsah kyseliny salicylové byl u čaje Leros a nejnižší u Hipp bio (8,2-násobně méně). Nejvyšší obsah kyseliny gallové byl u čaje Leros bio a nejnižší opět u Hipp bio (7,2-násobně méně). Velké rozdíly jsme pozorovali i u kyseliny syringové a to 4-násobně vyšší obsah v čaji Teekanne oproti nejnižšímu obsahu ve vzorku Fytofarma. U kyseliny skořicové byl nejvyšší obsah v čaji Fytofarma a 3,3-násobně nižší v čaji Teekanne. Obsah kyseliny vanilové byl 3-násobně vyšší u čaje Pickwick než u čaje DrMax. Obdobný (2,9-násobný) byl i rozdíl v obsahu kyseliny kávové mezi čaji Leros a Pickwick. U ostatních kyselin byly rozdíly menší ale stále výrazné (1,3 až 2,2-násobné). Rozdíly mezi jednotlivými flavonoidy byly také signifikantní. Největší rozdíly byly v obsahu kvercetinu, který byl naměřen v 4,3-násobně vyšším množství u čaje Leros oproti Hipp bio. Obsah kempferolu byl nejvyšší v čaji DrMax a 3,5-krát nižší u čaje Hipp bio. Nejvyšší obsah luteolinu byl u čaje Pickwick a nejnižší u čaje DrMax (2,7-násobně méně).

Celkem jsme ve vodném výluhu stanovili 11 fenolových kyselin a pouze jeden flavonoid. Největší rozdíly jsme pozorovali u kyseliny skořicové. Její obsah byl 16,5-krát vyšší v čaji Fytofarma než v čaji značky Teekanne. Obsah kyseliny kávové byl 7,6-násobně vyšší v čaji Fytofarma oproti čaji Hipp bio. Nejvyšší obsah kyseliny gallové byl u čaje DrMax a to 7,3-násobně vyšší než v čaji Pickwick. Obsah kyseliny salicylové byl 6,4-násobně vyšší v čaji Fytofarma než v čaji Hipp bio. Rozdíly v obsahu ostatních fenolových kyselin mezi jednotlivými čaji byly také výrazné (1,7 až 4,5-násobné). Obsah luteolinu byl nejvyšší v čaji značky Apothéke a to 5,3-vyšší než u čaje Hipp bio.

Obsah fenolových kyselin a flavonoidů – metanolový extrakt												
Fenolové kyseliny	**Herbex**	**Megafyt**	**Leros bio**	**DrMax**	**Leros**	**Fytofarma**	**Apothéke bio**	**Hipp bio**	**Tea CZ**	**Pickwick**	**Apothéke**	**Teekanne**
Hydroxyskořicové kyseliny												
chlorogenová	226,79 ±10,26a	192,21 ±1,70bcd	211,04 ±8,29ab	196,88 ±6,41bc	209,26 ±5,38ab	212,68 ±6,69ab	222,10 ±16,37a	223,43 ±2,78a	222,05 ±3,05a	176,52 ±2,24cd	192,40 ±1,85bcd	175,38 ±3,25d
ferulová	6,14 ±0,27f	7,17 ±0,04de	8,81 ±0,75ab	6,12 ±0,27f	6,98 ±0,22def	6,58 ±0,53ef	9,72 ±0,08a	7,79 ±0,15cd	7,72 ±0,27cd	6,93 ±0,46def	7,41 ±0,24cde	8,40 ±0,14bc
kávová	39,11 ±1,20c	40,16 ±0,45c	32,60 ±1,16d	29,00 ±0,54ef	50,84 ±0,71a	46,93 ±3,09b	26,93 ±0,62ef	13,56 ±0,11h	39,19 ±0,39c	17,47 ±0,16g	30,18 ±0,89de	26,13 ±1,55f
p-kumarová	13,64 ±0,12c	13,57 ±0,07c	14,26 ±0,16b	9,55 ±0,11e	13,78 ±0,13bc	14,34 ±0,07b	13,76 ±0,15bc	16,94 ±0,20a	13,64 ±0,11c	11,51 ±0,21d	13,55 ±0,45c	13,97 ±0,28bc
skořicová	0,77 ±0,01ef	1,06 ±0,07d	1,50 ±0,08b	0,67 ±0,01f	0,86 ±0,04ef	1,76 ±0,03a	1,15 ±0,01cd	1,18 ±0,03cd	0,74 ±0,02f	0,77 ±0,01ef	0,85 ±0,04ef	0,54 ±0,01g
Hydroxybenzoové kyseliny												
gallová	13,37 ±0,66efg	26,40 ±1,32c	16,89 ±0,20def	48,51 ±3,71b	64,64 ±3,53a	47,09 5,84b	18,67 ±0,49de	8,94 ±0,11g	21,57 ±2,15cd	13,59 ±0,09efg	23,75 ±2,64cd	10,54 ±0,71fg
p-hydroxybenzoová	3,47 ±0,17a	2,23 ±0,16c	2,80 ±0,16b	3,48 ±0,05a	2,23 ±0,16c	2,16 ±0,10cd	1,20 ±0,01e	1,38 ±0,04e	1,45 ±0,05e	3,32 ±0,13a	1,90 ±0,03d	3,37 ±0,05a
protokatechová	10,92 ±0,43a	10,73 ±0,10a	7,93 ±0,11b	5,11 ±0,61e	5,18 ±0,65e	6,91 ±0,21bc	6,41 ±0,29cd	5,51 ±0,19de	7,39 ±0,52bc	11,23 ±0,28a	10,15 ±0,54a	11,34 ±0,42a
salicylová	2,15 ±0,20f	5,61 ±0,35bc	3,51 ±0,13e	4,24 ±0,19d	6,80 ±0,32a	3,67 ±0,09e	1,26 ±0,04g	0,83 ±0,02g	3,47 ±0,06e	5,25 ±0,18c	4,26 ±0,24d	5,97 ±0,10b
syringová	2,46 ±0,12e	1,96 ±0,03g	2,38 ±0,09ef	1,95 ±0,01g	2,26 ±0,06efg	1,56 ±0,01h	3,73 ±0,03d	4,20 ±0,18c	2,07 ±0,09fg	5,46 ±0,25b	2,37 ±0,02ef	6,24 ±0,17a
vanilová	17,38 ±0,21d	19,35 ±0,30c	17,07 ±0,91d	10,18 ±0,10g	11,51 ±0,21fg	12,04 ±0,24f	17,70 ±0,18d	21,86 ±1,21b	15,44 ±0,05e	30,62 ±0,23a	20,81 ±0,43bc	30,20 ±0,89a
Flavonoidy												
kvercetín	7,54 ±0,37f	8,48 ±0,06e	9,59 ±0,07d	17,43 ±0,17b	19,03 ±0,17a	15,09 ±0,60c	5,64 ±0,28h	4,44 ±0,37i	5,87 ±0,11gh	4,77 ±0,29i	6,60 ±0,14g	6,49 ±0,33gh
luteolin	12,13 ±0,07c	13,55 ±0,47ab	14,29 ±0,12a	5,12 ±0,13g	5,51 ±0,18g	7,43 ±0,21f	9,49 ±0,24e	9,45 ±0,52e	10,44 ±0,41d	13,94 ±0,30a	10,83 ±0,14d	12,83 ±0,20bc
kempferol	1,19 ±0,05d	0,98 ±0,04e	1,29 ±0,03c	1,74 ±0,03a	1,58 ±0,01b	1,55 ±0,01b	0,78 ±0,01f	0,50 ±0,03g	1,06 ±0,03e	0,97 ±0,04e	0,96 ±0,02e	0,85 ±0,04f

Tab. 5: Obsah fenolových kyselin (µg/g DW) a vybraných flavonoidů (µg/g DW) v metanolovém extraktu čajovin. Ostatní detaily jsou stejné jako v Tab. 3.

	Fenolové kyseliny a flavonoidy – vodný výluh											
	Herbex	**Megafyt**	**Leros bio**	**DrMax**	**Leros**	**Fytofarma**	**Apothéke bio**	**Hipp bio**	**Tea CZ**	**Pickwick**	**Apothéke**	**Teekanne**
Hydroxyskořicové kyseliny												
chlorogenová	1540,51	1121,68	2965,26	1292,83	990,48	1956,21	1864,64	1200,43	1527,36	685,47	1077,65	971,57
	±16,51a	±24,80a	±2857,42a	±23,27a	±31,53a	±22,71a	±12,46a	±15,08a	±7,76a	±13,56a	±14,81a	±16,61a
ferulová	8,85	8,36	11,61	12,44	7,82	17,55	14,29	9,61	9,71	6,40	7,29	9,99
	±0,12e	±0,14f	±0,20d	±0,20c	±0,32g	±0,16a	±0,05b	±0,15e	±0,18e	±0,08i	±0,22h	±0,18e
kávová	43,45	49,29	63,57	43,09	49,72	99,72	69,20	13,08	86,82	40,83	46,74	29,80
	±0,27g	±0,48ef	±1,03d	±0,96g	±1,34e	±1,56a	±1,07c	±0,14i	±0,71b	±0,50g	±1,13f	±0,32h
p-kumarová	14,07	12,14	16,27	17,78	11,93	19,91	18,26	19,09	15,29	13,03	12,16	14,65
	±0,28f	±0,14gh	±0,62d	±0,08c	±0,46h	±0,11a	±0,30bc	±0,27ab	±0,49de	±0,28gh	±0,15gh	±0,45ef
skořicová	5,56	3,02	7,97	7,63	2,03	13,16	8,03	5,65	1,14	5,17	3,10	0,80
	±0,31c	±0,15d	±0,22b	±0,24b	±0,05e	±0,45a	±0,40b	±0,18c	±0,03f	±0,03c	±0,18d	±0,03f
Hydroxybenzoové kyseliny												
gallová	43,17	36,07	14,86	78,59	63,49	73,43	15,53	13,02	25,80	10,72	17,64	13,18
	±0,36d	±0,39e	±0,35hi	±1,36a	±0,24c	±1,21b	±0,30h	±0,11j	±0,65e	±0,36k	±0,19g	±0,46ij
p-hydroxybenzoová	6,51	2,66	6,58	6,31	4,67	5,04	2,99	2,72	2,98	5,31	2,17	6,08
	±0,28a	±0,27cd	±0,32a	±0,48a	±0,16b	±0,23b	±0,09cd	±0,13cd	±0,20c	±0,30b	±0,07d	±0,18a
protokatechová	257,00	332,22	267,35	438,84	494,01	446,86	328,42	108,86	315,39	177,38	245,67	216,01
	±12,72d	±9,94c	±12,01d	±22,51b	±6,01a	±16,09b	±8,81c	±3,74g	±8,49c	±6,79f	±6,95de	±2,85e
salicylová	15,20	21,51	16,20	29,89	28,51	34,53	20,79	5,43	21,33	25,29	12,16	16,49
	±0,56e	±0,57d	±0,57e	±1,15b	±0,47b	±0,46a	±0,79d	±0,22g	±0,38d	±0,95c	±0,15f	±0,22e
syringová	2,44	2,01	2,08	2,39	4,64	5,25	4,11	2,77	1,82	4,23	1,55	5,67
	±0,09de	±0,27ef	±0,35ef	±0,40de	±0,20bc	±0,36ab	±0,14c	±0,07d	±0,15ef	±0,05c	±0,10f	±0,23a
vanilová	342,12	382,79	383,09	657,66	586,45	591,36	532,08	171,24	488,59	239,54	287,85	293,56
	±1,63f	±3,22e	±2,89e	±25,63a	±5,06b	±1,86b	±19,85c	±1,28i	±6,43d	±9,34h	±2,62g	±17,34g
Flavonoidy												
luteolin	11,88	19,31	12,19	16,25	6,79	16,33	19,67	5,76	24,04	9,50	30,71	12,07
	±0,46e	±0,14c	±0,07e	±0,36d	±0,51g	±0,35d	±0,26c	±0,54g	±0,12b	±0,29f	±0,74a	±0,61e

Tab. 6: O Obsah fenolových kyselin (µg/g DW) a vybraných flavonoidů (µg/g DW) ve vodním výluhu čajovin. Ostatní detaily jsou stejné jako v Tab. 3.

4. Diskuse

Metabolismus sekundárních metabolitů rostlin může být ovlivňován mnohými podněty. U více rostlinných druhů bylo prokázáno, že ke zvýšené syntéze a akumulaci těchto látek dochází v důsledku odpovědi na biotické (houbové a bakteriální infekce) i abiotické stresory (těžké kovy, zvýšené radiace a další). Sekundární metabolity neovlivňují jen odolnost rostlin vůči stresu, ale i jejich tržní cenu, neboť právě tyto látky často zvyšují jejich nutriční hodnoty a hlavně léčebné účinky. Zvýšení produkce sekundárních metabolitů lze docílit aplikací vhodného elicitoru. V buněčných kulturách ale i intaktních rostlinách se jako účinné elicitory osvědčily SA, methyljasmonát nebo etefon. Studium akumulace sekundárních metabolitů má význam nejen pro farmaceutický průmysl, ale i pro zemědělství, kde se dá využít potenciálu těchto látek při obraně proti bakteriálním infekcím i škůdcům.

Fenoly jsou všeobecně známé díky svým antioxidačním vlastnostem. Předpokládá se, že aktivace fenolového metabolizmu je během stresových podmínek a aklimatizačních procesů nejstimulovanější biosyntetická dráha.

4.1. Vliv SA na sekundární metabolismus

Akumulace fenolů a flavonoidů v kalusech podláku (*Fagonia indica*), který je využíván pro své protinádorové, antimikrobiální a antioxidační vlastnosti, byla pozitivně ovlivněna ošetřením SA (20 μM). Flavonoidy a fenoly se významně podílí na antioxidačním potenciálu rostlin. To se také projevilo při analýzách aktivity DPPH. Schopnost zhášet volné radikály vzrostla z 87 % u kontrolní skupiny na 92 % po ošetření SA (Khan et al. 2019).

Aplikace SA (50, 100 a 250 μM) na buněčné kultury třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) vedla až ke zdvojnásobení obsahu hypericinu a pseudohypericinu, farmaceuticky významných látek pro své antivirální a protirakovinné účinky. Také došlo k výraznému nárůstu flavonolů a flavanolů, zatímco na antokyaniny neměla aplikace SA vliv (Gadzovska et al. 2013).

Časově nebo koncentračně závislá elicitace SA taktéž vedla ke zvýšené akumulaci volných a vázaných hydroxybenzoových a hydroxyskořicových kyselin a jejich de-

rivátů (Sahu 2013). Můžeme jmenovat např. kyselinu chlorogenovou, kávovou, *p*-kumarovou a ferulovou z *Vitis vinifera* (Chen et al. 2006), nebo kyselinu kávovou a rozmarýnovou z *Thymus membranaceus* (Pérez-Tortosa et al. 2012). U buněčných kultur šalvěje červenokořenné (*Salvia miltiorrhiza*) došlo vlivem SA (0,16 mM) k nárůstu obsahu kyseliny šalvějové B a kyseliny kávové. Akumulace obou fenolových kyselin dosáhla během doby pozorování dvou vrcholů a to pro každou kyselinu v jiném čase. Kyselina šalvějová B měla první „peak" po 8 h a druhý po 96 h. U kyseliny kávové se vrcholy na křivce objevily po 4 a 80 h. Kyselina kávová tedy reagovala na elicitor rychleji než kyselina šalvějová B. Ve studii se také ukázal protichůdný efekt různých koncentrací SA. Zatímco nízké koncentrace (0,02-016 mM) stimulovaly akumulaci obou fenolových kyselin, koncentrace vysoké (0,23-0,36 mM) vedly ke snížení jejich obsahu v buněčných kulturách (Dong et al. 2010). Obdobné výsledky zaznamenali i v práci Kováčik et al. (2009). Ošetření listových růžic heřmánku SA o koncentracích 50 a 250 μM po dobu až 7 dní ukázalo, že vyšší dávka SA má toxický efekt. Aplikace SA způsobila vysoký nárůst aktivity enzymu PAL následovaný zvýšením obsahu celkových rozpustných fenolů a většiny z 11 zjišťovaných fenolových kyselin. Mezi kyseliny, které projevily nejvyšší nárůst po aplikaci SA (po 24 h) patří kyselina protokatechová a vanilová. Kyselina syringová a *p*-hydroxybenzoová nebyly aplikací SA téměř vůbec ovlivněny. U kyselin s antioxidačními vlastnostmi jako kyselina chlorogenová nebo kávová se projevil nárůst až ke konci experimentu.

Když se zaměříme na vlastnosti jednotlivých kyselin, tak můžeme říct, že lepší antioxidační potenciál mají hydroxyskořicové kyseliny a jejich deriváty a to li -CH=CH–COOH skupině, ve srovnání s deriváty hydroxybenzoových kyselin s COOH skupinou (Nair et al. 2013). Sato et al. (2011) ve svých *in vitro* a *in vivo* studiích poukázali, že ač má kyselina kávová vyšší antioxidační potenciál, kyselina chlorogenová se díky degradaci na kyselinu kávovou v trávicím traktu může též podílet na detoxikačních účincích. V našem experimentu jsme zaznamenali nárůst kyseliny kávové se současným poklesem kyseliny chlorogenové. Avšak ve vodném výluhu hladina obou kyselin s rostoucí koncentrací SA poklesla.

Funkční deriváty SA, jako metylsalicylát a acetylsalicylát, také stimulují akumulaci fenolových kyselin, přičemž nejefektivnější se ukázala samotná SA (Nair et al. 2013).

Mezi významné fenolové metabolity patří i kumariny. Aplikace SA o koncentracích 1 a 2 mM na listové růžice heřmánku se projevila nárůstem herniarinu, ale zároveň snížením obsahu jeho prekurzoru GMCA. Došlo také ke zvýšení obsahu umbelliferonu. Exogenní aplikace SA se také projevila na snižujícím se obsahu endogenní SA (Pastírová et al. 2004).

Studie Mahmood et al. (2017) se zabývá vlivem sucha na sekundární metabolity heřmánku a řebříčku. Obsah fenolových sloučenin a flavonoidů jako kyselina kávová, apigenin-7-glukosid, umbelliferon a luteolin se u rostlin heřmánku výrazně zvýšil. Zatímco u rostlin řebříčku došlo ke snížení obsahu většiny sledovaných sekundárních metabolitů. Ze studie také vyplývá, že heřmánek je působení sucha mnohem odolnější než řebříček.

Vliv aplikace různých koncentrací (50, 100, 150 mg/l) tří aminokyselin (ornitin, proline, fenylalnin) na složení silice heřmánku se lišil v závislosti na koncentraci i u jednotlivých sloučenin. Hlavními zjištěnými složkami silice byly farnsen, bisabolol oxide B, α-bisabolol, chamazulen a bisabolol oxid A. Ošetření rostlin všemi koncentracemi aminokyselin vedlo ke zvýšení obsahu farnesenu, α-bisabolol oxidu B a α-bisabololu (s výjimkou 150 mg/l ornithinu a 150 mg/l prolinu). Všechny koncentrace aminokyselin způsobily snížení obsahu chamazulenu, zatímco 150 mg/l fenilalanin obsah chamazulenu zvýšil. Aplikace 50 mg/l ornitinu, 100 a 150 mg/l prolinu a 50 mg/l fenylalaninu vedla ke zvýšené obsahu α-bisabolol oxidu A, zatímco ostatní koncentrace aminokyselin jeho obsah snížily (El-Din et Abd El-Wahed 2005).

Další ze studií zaměřených na vliv SA (0,07, 0,2 a 0,7 mM) na sekundární metabolismus heřmánku se zaměřila na porovnání vlivu za normálních podmínek a za stresu vyvolaným vysokými teplotami. Experiment proběhl na třech kultivarech ('Bushehr', 'Bona' a 'Bodegold'). V silici byl měřený například obsah bisabolol oxidu B, který byl nejvyšší u rostlin kultivaru 'Bodegold' neošetřených SA za normálních podmínek a nejnižší u kultivaru 'Bona' při 0,2 mM SA a teplotním stresu. Za-

tímco α-bisabolol dosahoval nejvyšších hodnot u kultivaru Bona po aplikaci 0,7 mM za normálních podmínek a nejméně bylo této látky naměřeno u rostlin 'Bushehr' ošetřených 0,2 mM SA za působení teplotního stresu. Nejvyšší obsah chamazulenu měly rostliny 'Bona' ošetřené 0,07 mM SA při působení stresu a nejnižší byl u kultivaru 'Bodegold' po ošetření 0,2 mM SA při působení stresu (Ghasemi et al. 2016).

Z dalších farmaceuticky významných rostlin můžeme zmínit např. zvýšenou akumulaci saponinu glycyrrhizinu z lékořice lysé (*Glycyrrhiza glabra*) po aplikaci 0,1 a 1 mM SA. Vyšší koncentrace nevykazovaly pozitivní elicitační účinky (Shabani et al. 2009). U šruchy zelné (*Portulaca oleracea*) s prokazatelnými protivirovými a antibakteriálními účinky se naopak jako účinnější elicitor produkce dopaminu překázal metyljasmonát o nižších koncentracích (100, 150, 200 μM) než SA (125, 250 a 500 μM) (Moghadam et al. 2013). K prokazatelnému nárůstu dicentrinu u *Stephania venosa*, farmaceuticky ceněnému alkaloidu pro své antiarytmické a protinádorové účinky, došlo po ošetření buněčných kultur SA o koncentraci 0,1 μM. Při použití jiných koncentrací (4 a 7 μM) se elicitační účinek neprojevil (Kitisripanya et al. 2013).

4.2. Vliv metody extrakce

Kvalita rostlin využívaných ve farmaceutickém průmyslu se obvykle posuzuje na základě obsahu účinných látek. Zvýšení jejich obsahu je hlavním cílem šlechtění rostlin. U heřmánku se vyšlechtilo více typů zaměřených konkrétně na vybrané účinné látky. Známé jsou chemotypy bohaté na matricin nebo látky bisabolánového typu. Dalším z možných přístupů je stimulace obsahu účinných látek změnou ploidie rostlin. Tetraploidní odrůda 'Lutea' sice produkuje větší úbory než diploidní odrůda 'Novbona', avšak výrazné rozdíly v obsahu metabolitů byly zaznamenané jen v případě aminokyselin a fenolových látek, kde tetraploidní odrůda vykazovala vyšší hladiny celkových fenolů, flavonoidů (kvercetin, kempferol a apigenin) a fenolových kyselin (Kováčik et al. 2012). V případě monitoringu kumarinů v listových růžicích se ukázalo, že kvantitativní zastoupení sekundárních metabolitů se u jednotlivých kultivarů výrazně liší. Ošetření diploidního a tetraploidního kultivaru heřmánku SA o koncentracích 0,7 mM, 1,4 mM, 3,5 mM, 7 mM, 10,5 mM a 15 mM se projevilo nárůstem obsahu umbelliferonu, herniarinu i jeho prekurzoru

GMCA u obou kultivarů, avšak obsah *Z*-GMCA byl až dvojnásobně vyšší u diploidních rostlin, zatímco umbelliferon se nacházel v tetraploidních rostlinách až v trojnásobném množství oproti diploidnímu kultivaru. Aplikace SA vedla u obou kultivarů k poklesu kyseliny chlorogenové (Dučaiová et al. 2013).

Hladiny sekundárních metabolitů mohou kolísat i v závislosti na ontogenetickém stádiu úboru. Repčák a Krausová (2009) ve svojí práci rozdělili fázi kvetení na šest stádií, přičemž nejvyšší obsah účinných látek (jako např. apigenín a jeho deriváty, anebo kumaríny) byl zaznamenán ve 3. a 4. fázi kvetení, tedy kdy jsou jazykovité květy plně vyvinuté a ½ až ⅔ rourkovitých květů je rozvinutých. V našem experimentu jsme zohlednili výsledky předcházející práce a všechny zaznamenané údaje pochází z úborů právě v tomto ontogenetickém stádiu.

Zásadní vliv na obsah účinných látek a celkovou biologickou aktivitu má i metoda extrakce. Z našich výsledků jsou viditelné velké rozdíly mezi zjištěnými hodnotami sekundárních metabolitů v metanolových extraktech a vodných nálevech. Metoda extrakce má podstatný vliv na výsledek analýzy. Toto potvrzují mnohé dřívější studie. Gerolis et al. (2017) porovnávali vliv gama záření na antioxidační potenciál několika pro čaj využívaných rostlin (včetně heřmánku). Hodnoty sekundárních metabolitů v kontrolních (neošetřených) skupinách z vodných extraktů a metanolových extraktů se lišili. Zvolená metoda extrakce měla také vliv na projev působení gama záření. V případě heřmánku byly velké rozdíly obzvláště v obsahu flavonoidů neošetřených rostlin, který byl zjištěn skoro o 70 % vyšší v metanolovém extraktu.

Cvetanović et al. (2015) porovnávali heřmánkové extrakty získané čtyřmi různými metodami (Soxhlet, extrakce podporovaná mikrovlnami, extrakce podporovaná ultrazvukem a extrakce subkritickou vodou). Při srovnávání se zaměřili na bioaktivitu (antioxidační, antimikrobiální a cytotoxickou aktivitu) a zároveň na obsah sekundárních metabolitů, a to akumulaci fenolů a flavonoidů. Extrakce subkritickou vodou se ukázala jako velmi efektivní metoda pro získávání extraktu heřmánku z hlediska bioaktivity. Pomocí této metody se také podařilo získat vyšší procento celkových fenolických látek oproti ostatním metodám. U této metody sehrával zásadní roli i použitý tlak, kdy se jako optimální jevil tlak o velikosti 30 a 45 barů. Pro extrakci flavonoidů bylo nejúčinnější využití metody Soxhlet.

Studie Roby et al. (2013) se mimo jiné zabývá porovnáním extrakčních metod při získávání fenolových látek ze semen fenyklu a květů heřmánku. Pro extrakci byla vybrána 4 rozpouštědla a to metanol, etanol, diethylether a hexan. Porovnání takto vzniklých extraktů ukázalo, že dle výtěžnosti lze rozpouštědla seřadit: metanol > etanol > diethylether > hexan. Toto pořadí platilo u obou rostlinných materiálů. Stejně dopadlo i u porovnání antioxidační aktivity extraktů pomocí metody DPPH.

Účinnosti extraktů heřmánku vůči *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* se zabývala i studie Mawlood (2011). Pro komparaci byly vybrány tři typy extraktů (hydrodestilavná silice, petroleterový extrakt a metanolový extrakt), které byly aplikovány na médium v různém množství (5-30 mg/ml). Nejlepší antibakteriální vlastnosti ze všech porovnávaných prokázala silice. Petroleterové a metanolové extrakty byly účinné jenom proti *Staphylococcus aureus*.

Ve studii Guimarães et al. (2013), která se zabývala porovnáním tří druhů extraktů (metanolový extrakt, nálev a odvar) heřmánku, se opět ukazuje, že typ extrakce má velký vliv na výsledné množství získaných sekundárních metabolitů a bioaktivitu extraktu. Například fenolových kyselin a flavonoidů se podařilo získat nejvíce v metanolovém extraktu. Zatímco odvar a nálev poskytl více organických kyselin. Při testování protinádorové aktivity se osvědčil metanolový extrakt i nálev. Odvar heřmánku ale neprokázal žádnou protinádorovou aktivitu, což naznačuje, že tuto schopnost mají látky, kterých se v odvaru nepodařilo uvolnit dostatečné množství.

Na složení extraktu má vliv i způsob sušení rostlinného materiálu. Harbourne et al. (2009) se zaměřili na různé metody sušení heřmánku pro výrobu čaje. Ze získané sušiny se následně připravil nálev (voda o teplotě 90 °C, louhování 20 minut). Autoři posuzovali celkový obsah fenolů, obsah apigenin 7-glukosidu, zákal a barvu extraktu. Z testovaných metod (sušení mrazem, volné sušení a sušení teplem při 40 nebo 80 °C) se ukázala jako nejvhodnější varianta sušení při 40 °C. Ale zjištěný obsah sekundárních metabolitů se u této metody výrazně nelišil od volného sušení a sušení mrazem.

Heřmánek představuje léčivou rostlinu hojně využívanou ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Obsah účinných látek v komerčně dostupných čajo-

vých směsích od různých výrobců může značně kolísat, jako to mimo naší práce dokazují i studie Petruľová-Poracká et al. (2013) a Raal et al. (2012). Usušené květy se jako surovina do čajového průmyslu, obchodů s bylinkami anebo ostatních prodejen dodává většinou jako surovina z kontrolované kultivace anebo sběrem z přírody. Příčiny rozdílného chemického složení mohou být různé, jako např. použitý kultivar, načasování jeho výsadby, klimatické změny, dostupnost živin v půdě, samosběr a jiné. A právě materiál pocházející od sběračů se ukázal jako nejméně kvalitní, což může být způsobené záměrným / neúmyslným nahrazením jinými rostlinami připomínající heřmánek (Guzelmeric et al. 2017).

Závěry

Porovnání komerčních čajovin a našich vzorků

Nejběžnější formou pro konzumaci heřmánku je čaj, proto jsme se při porovnání výsledků našich rostlin a zakoupených čajovin, soustředili na vodný výluh. Z analýzy celkových rozpustných fenolů v čajovinách jsou viditelné velké rozdíly mezi jednotlivými značkami. Až na vzorek Pickwick, který má opravdu velice malé zastoupení fenolů, jsou ale výsledky srovnatelné s výsledky našich rostlin. Výjimku tvoří vzorky ošetřené 2 mM SA, které jsou téměř 1,5-násobné oproti komerčnímu čaji s nejvyšším obsahem fenolů (Tea CZ). Výsledky flavonoidů u našich rostlin ukázali nejvyšší hodnoty u 2 mM SA. Některé komerční čajoviny mají nižší zastoupení flavonoidů (např. Pickwick, Teekanne, Megafyt), ale jiné mají zastoupení naopak vyšší a to až 1,6-násobně (Tea CZ). Pro akumulaci taninů se u našich rostlin ukázalo nejefektivnější ošetření 1 mM SA. Některé čajoviny měly nižší obsah taninů a to až 1,5- násobně (např. Pickwick, Leros, Megafyt), velice nízké zastoupení taninů vykazovala Fytofarma a to 5,7-násobně oproti našim rostlinám. Extrémně nízký obsah taninů u tohoto vzorku mohl být způsoben chybou v měření.

Rozdíly ve fenolových kyselinách našich vzorků a zakoupených čajovin jsou obrovské. Zjištěný obsah všech fenolových kyselin čajovin je vyšší než v našich vzorcích a to až téměř 500-násobně.

Ve vodném výluhu se nám nepodařilo změřit konkrétní flavonoidy, proto jsme porovnali flavonoidy v metanolovém extraktu. Oproti fenolovým kyselinám nebyly rozdíly mezi čajovinami a našimi vzorky tak markantní. Akumulace kvercetínu byla vyšší u všech našich vzorků. Z čajovin dopadl nejlépe Leros, který měl i přesto 2-násobně menší obsah kvercetínu v porovnání s naší kontrolní skupinou a 3,3-násobně menší než naše vzorky ošetřené 3 mM SA. Porovnání luteolinu už nebylo tak jednoznačné, některé čajoviny měly v porovnání s našimi vzorky více tohoto flavonoidu a jiné naopak méně. Nicméně naše vzorky ošetřené 3 mM SA měly více luteoninu než všechny komerční čajoviny. Z čajovin dopadl nejlépe Leros Bio, který měl oproti 3 mM SA 1,2-násobně méně luteoninu. Zjištěný obsah kempferolu byl podobně jako u kvercetínu vyšší u všech našich vzorků. Z čajovin si vedl nejlépe

Dr.Max, který měl 2-násobně méně kempferolu než vzorky z kontrolní skupiny a 4,8-násobně méně než vzorky ošetřené 3 mM SA.

Zhášecí aktivita byla vyšší u všech našich rostlinných vzorků, ale rozdíly byly maximálně do 5 %. Z komerčních čajovin se našim vzorkům nejvíce blížil Leros a jako druhý paradoxně Pickwick, který v jiných analýzách značně zaostával.

Vliv SA na naše vzorky

Naše výsledky potvrdily, že exogenní aplikace SA má vliv na produkci sekundárních metabolitů heřmánku. Při zaměření se na vodný výluh, který odpovídá nejobvyklejší dietetické formě příjmu této byliny, tedy čaji, jsme zjistili, že u celkových rozpustných fenolů, flavonoidů i taninů působí aplikace 0,5 mM SA na produkci těchto metabolitů inhibičně. U fenolů se projevil výrazný (2-násobný) nárůst při aplikaci 2 mM SA. Aplikace 3 mM SA ale vedla k opětovnému poklesu fenolů ve vodném výluhu. U flavonoidů a taninů došlo s aplikací 1,2 a 3 mM SA ke zvýšení produkce jen v řádech jednotek a tento rozdíl nebyl statisticky významný oproti kontrolní skupině. Tři sledované flavonoidy (kvercetin, luteolin a kempferol) se ve vodném výluhu nepodařilo zachytit.

Z výsledků fenolových kyselin je opět patrný vliv SA. Aplikace SA vedla ke snížení akumulace kyseliny kávové a benzoové. Zbylých 9 zjišťovaných kyselin projevilo nárůst alespoň při některých koncentracích SA. Nejvyšší zvýšení akumulace jsme zaznamenali u kyseliny *p*-hydroxybenzoové (10,3-násobný) při koncentraci 3 mM SA a u kyseliny skořicové (4,3-násobný) při koncentraci 1 mM SA. Z našich výsledků lze pozorovat, že vliv SA je individuální pro každý sledovaný metabolit (skupinu metabolitů) a liší se pro různé koncentrace SA.

Antioxidační aktivita zjišťovaná metodou DPPH také nevykazovala statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině.

Seznam použité literatury

1) ABBASI B. H., ULLAH B. A., NADEEM M., TUNGMUNNITHUM D., HANO C. 2020. Exogenous application of salicylic acid and gibberellic acid on biomass accumulation, antioxidant and anti-inflammatory secondary metabolites production in multiple shoot culture of *Ajuga integrifolia* Buch. Ham. ex D.Don. In: *Industrial Crops & Products.* ISSN 0926-6690, vol. 145, 112098.
2) ADÁMKOVÁ, Š., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M., PEČ, P. 2006. Role l-fenylalaninamoniumlyasy při obranné reakci rostlin. In: *Chemické Listy*. ISSN 1213-7103, vol. 100, no. 7, p. 486–494.
3) AHMED H. S., MOAWAD A. S., ABOUZID S. F., OWIS A. I. 2020. Salicylic acid increases flavonolignans accumulation in the fruits of hydroponically cultured *Silybum marianum*. In: *Saudi Pharmaceutical Journal*. ISSN 1319-0164, vol. 28, no. 5, p. 593-598.
4) AMSTERDAM J. D., LI Q. S., XIE S. X., MAO J. J. 2019. Putative Antidepressant Effect of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Oral Extract in Subjects with Comorbid Generalized Anxiety Disorder and Depression. In: *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. ISSN 1557-7708, vol. 26, no. 9, p. 815-821.
5) AMSTERDAM J. D., SHULTS J., SOELLER I., MAO J. J., ROCKWELL K., NEWBERG A. B. 2012. Chamomile (*Matricaria recutita*) may have antidepressant activity in anxious depressed humans-an exploratory study. In: *Alternative Therapies in Health and Medicine*. ISSN 1078-6791, vol. 18, no. 5, p. 44-49.
6) BOURGAUD F., HEHN A., LARBAT R., DOERPER S., GONTIER E., KELLNER S., MATERN U. 2006. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. In: *Phytochemistry Reviews*. ISSN 1568-7767, vol. 5, no. 2-3, p. 293-308.
7) CAPPELLARI L. D., SANTORO M. V., SCHMIDT A., GERSHENZON J., BANCHIO E. 2020. Improving Phenolic Total Content and Monoterpene in *Mentha* x *piperita* by Using Salicylic Acid or Methyl Jasmonate Combined with Rhizobacteria Inoculation. In: *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067, vol. 21, no. 1, 50.
8) CVETANOVIĆ, A., ŠVARC-GAJIĆ, J., MAŠKOVIĆ, P., SAVIĆ, S., NIKOLIĆ, L. 2015. Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. In: *Industrial Crops and Products*. ISSN 0926-6690, vol. 65, p. 582-591.
9) ČESKÝ LÉKOPIS. 2017, Praha: Grada Publishing. 4912 p. ISBN 978-80-271-0500-7.
10) DEMPSEY, D. M. A., KLESSIG, D. F. 2017. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans?. In: *BMC biology*. ISSN 1741-7007, vol. 15, no. 1, p. 1-11.

11) DEWICK P. M. 1997. Medicinal Natural Products: A Biosyntetic Approach, J. Wiley and Sons Ltd., Chichester. 550 p. ISBN: 978-0-470-74168-9.
12) DING P., DING Y. 2020. Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. In: *Trends in Plant Science*. ISSN 1360-1385, vol. 25, no. 6, p. 549-565.
13) DONG, J., WAN, G., LIANG, Z. 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. In: *Journal of biotechnology*. ISSN 1873-4863, vol. *148*, no. 2-3, p. 99-104.
14) DUČAIOVÁ, Z., PETRUĽOVÁ, V., REPČÁK, M. 2013. Salicylic acid regulates secondary metabolites content in leaves of *Matricaria chamomilla*. In: *Biologia*. ISSN 1336-9563, vol. 68, no. 5, p. 904-909.
15) DZHAVAKHIYA V. G., OZERETSKOVSKAYA O. L., ZINOVYEVA S. V. 2007. Chapter 10 - Immune response. In: *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. Elsevier Science. ISBN 1-280-75181-9, p. 265-314.
16) EL-DIN, K. M. G., ABD EL-WAHED, M. S. A. 2005. Effect of some amino acids on growth and essential oil content of chamomile plant. In: *International Journal of Agriculture and Biology*. ISSN 1814-9596, vol. *7*, no. 3, p. 376-380.
17) EXNER, J., REICHLING, J., COLE, T. C. H., BECKER, H. 1981. Methylated flavonoid-aglycones from ''*Matricariae flos*''. In: *Planta Medica*. ISSN 0032-0943, vol. 41, no. 2, p. 198-200.
18) FRANKE R., SCHILCHER H. 2012. *Chamomile: Industrial profiles*. London: CRC Press., 289 p. ISBN 0-415-33463-2.
19) GADZOVSKA, S., MAURY, S., DELAUNAY, A., SPASENOSKI, M., HAGÈGE, D., COURTOIS, D., JOSEPH, C. 2013. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, ISSN 1573-5044, vol. 113, no. 1, p. 25-39.
20) GEROLIS, L. G. L., LAMEIRAS, F. S., KRAMBROCK, K., NEVES, M. J. 2017. Effect of gamma radiation on antioxidant capacity of green tea, yerba mate, and chamomile tea as evaluated by different methods. In: *Radiation Physics and Chemistry*. ISSN 0969-806X, vol. 130, p. 177-185.
21) GHAMARI M., HOSSEININAVEH V., TALEBI K., NOZARI J., ALLAHYARI H. 2020. Biochemical Characterization of the Induced Immune System of Pistachio (*Pistacia vera*) by Salicylic Acid. In*: International Journal of Fruit Science*. ISSN 1553-8621, vol. 20, no. 2, p. 117-132.
22) GHASEMI, M., BABAEIAN JELODAR, N., MODARRESI, M., BAGHERI, N., JAMALI, A. 2016. Increase of Chamazulene and α-Bisabolol Contents of the Essential Oil of German Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Using Salicylic Acid Treatments under Normal and Heat Stress Conditions. In: *Foods*. ISSN 2304-8158, vol. 5, no. 3, 56.
23) GUIMARÃES, R., BARROS, L., DUEÑAS, M., CALHELHA, R. C., CARVALHO, A. M., SANTOS-BUELGA, C., FERREIRA, I. C. 2013. Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and

phenolic compounds. In: *Food Chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. *136*, no. 2, p. 947-954.

24) GUPTA V., MITTAL P., BANSAL P., KHOKRA S. L., KAUSHIK D. 2010. Pharmacological potential of *Matricaria recutita* – A review. In*: International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. ISSN 0975-248X, vol. 2, no. 1, p. 12-16.
25) GUZELMERIC, E., RISTIVOJEVIĆ, P., VOVK, I., MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D., YESILADA, E. 2017. Quality assessment of marketed chamomile tea products by a validated HPTLC method combined with multivariate analysis. In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. ISSN 0731-7085, vol. 132, p. 35-45.
26) HARBOURNE, N., JACQUIER, J. C., O'RIORDAN, D. 2009. Optimisation of the extraction and processing conditions of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) for incorporation into a beverage. In: *Food chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. 115, no. 1, p. 15-19.
27) HAYAT, Q., HAYAT, S. M., AHMAD, A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. In: *Environmental and Experimental Botany*. ISSN 0098-8472, vol. 68, no. 1, p. 14–25.
28) HORVÁTH, E., SZALAI, G., JANDA, T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. In: *Journal of Plant Growth Regulation*. ISSN 0721-7595, vol. 26, no. 3, p. 290-300.
29) CHEN, J. Y., WEN, P. F., KONG, W. F., PAN, Q. H., ZHAN, J. C., LI, J. M., HUANG, W. D. 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. In: *Postharvest Biology and Technology*. ISSN 0925-5214, vol. 40, no. 1, p. 64-72.
30) CHONG, J., BALTZ, R., SCHMITT, C., BEFFA, R., FRITIG, B., SAINDRENAN, P. 2002. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. In: *The Plant Cell*. ISSN 1040-4651, vol. 14, no. 5, p. 1093-1107.
31) KHAN, M. I. R., FATMA, M., PER, T. S., ANJUM, N. A., KHAN, N. A. 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. In: *Frontiers in plant science*. ISSN 1664-462X, vol. 6, 462.
32) KHAN, T., KHAN, T., HANO, C., ABBASI, B. H. 2019. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. In: *Industrial Crops and Products*. ISSN 0926-6690, vol. 129, p. 525-535.
33) KITISRIPANYA, T., KOMAIKUL, J., TAWINKAN, N., ATSAWINKOWIT, C., PUTALUN, W. 2013. Dicentrine production in callus and cell suspension cultures of *Stephania venosa*. In: *Natural product communications*. ISSN 1555-9475, vol. 8, no. 4, p. 443-445.
34) KOVÁČIK, J., GRÚZ, J., BAČKOR, M., STRNAD, M., REPČÁK, M. 2009. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria cha-*

momilla plants. In: *Plant cell reports*. ISSN 0721-7714, vol. 28, no. 1, p. 135-143.

35) KOVÁČIK, J., GRÚZ, J., KLEJDUS, B., ŠTORK, F., HEDBAVNY, J. 2012. Accumulation of metals and selected nutritional parameters in the field-grown chamomile anthodia. In: *Food chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. 131, no. 1, p. 55-62.
36) KOVALIKOVA, Z., KUBES, J., SKALICKY, M., KUCHTICKOVA, N., MASKOVA, L., TUMA, J., HEJNAK, V. 2019. Changes in content of polyphenols and ascorbic acid in leaves of white cabbage after pest infestation. In: *Molecules*. ISSN 1420-3049, vol. 24, no. 14, 2622.
37) LIM, T. K. 2014. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 7, Flowers. Springer Science+Business Media Dordrecht. 397 p. ISBN 978-94-007-7395-0.
38) MA, D., SUN, D., WANG, C., LI, Y., GUO, T. 2014. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. In: *Plant Physiology and Biochemistry*. ISSN 0981-9428, vol. 80, p. 60-66.
39) MAHMOOD, B., RIHAN, H., FOULKES, M., BURCHETT, S. 2017. The Effect of Drought on Phytochemical active Compounds Content in Chamomile and Yarrow. In: *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*. ISSN 2471-6774, vol. 12, no. 4, 555855.
40) MAWLOOD, S. I. 2011. Chemical and biological study of Iraqi Kurdistan chamomile flower (*Matricaria recutita* L). In: *Baghdad Science Journal*. ISSN 2078-8665, vol. 8, no. 3, p. 736-740.
41) MCKAY, D. L., BLUMBERG, J. B. 2006. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). In: *Phytotherapy research*. ISSN 1099-1573, vol. 20, no. 7, p. 519-530.
42) MIURA, K., TADA, Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. In: *Frontiers in plant science*. ISSN 1664-462X, vol. 5, 4.
43) MOGHADAM, Y. A., PIRI, K. H., BAHRAMNEJAD, B., HABIBI, P. 2013. Methyl Jasmonate and Salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (purslan). In: *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. ISSN 2277-1808, vol. 2, no. 6, p. 89-94.
44) MOLYNEUX, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. In: *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. ISSN 0125-3395, vol. 26, no. 2, p. 211-219.
45) NAIR, V. D., PANNEERSELVAM, R., GOPI, R., HONG-BO, S. 2013. Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. In: *Industrial crops and products*. ISSN 0926-6690, vol. 45, p. 406-415.
46) OKSANA, S., MARIAN, B., MAHENDRA, R., BO, S. H. 2012. Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. In*: Journal of Medicinal Plants Research*. ISSN 1996-0875, vol. 6, no. 13, p. 2526-2539.

47) ORAEI, M., PANAHIRAD, S., ZAARE-NAHANDIB, F., GOHAR, G. 2019. Pre-véraison treatment of salicylic acid to enhance anthocyanin content of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ISSN 1097-0010, vol. 99, no. 13, p. 5946-5952.
48) ORDOÑEZ, A. A. L., GOMEZ, J. D., VATTUONE, M. A. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. In: *Food chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. 97, no. 3, p. 452-458.
49) OSAMA, S., EL SHEREI, M., AL-MAHDY, D. A., BISHR, M., SALAMA, O. 2019. Effect of Salicylic acid foliar spraying on growth parameters, γ-pyrones, phenolic content and radical scavenging activity of drought stressed *Ammi visnaga* L. plant. In: *Industrial Crops and Products*. ISSN 0926-6690, vol. 134, p. 1-10.
50) PASTÍROVÁ, A., REPČÁK, M., ELIAŠOVÁ, A. 2004. Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. In: *Plant science*. ISSN 0168-9452, vol. 167, no. 4, p. 819-824.
51) PÉREZ-TORTOSA, V., LÓPEZ-ORENES, A., MARTÍNEZ-PÉREZ, A., FERRER, M. A., CALDERÓN, A. A. 2012. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. In: *Food chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. 130, no. 2, p. 362-369.
52) PETRUĽOVÁ-PORACKÁ, V., REPČÁK, M., VILKOVÁ, M., IMRICH, J. 2013. Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: aglycones and glycosides. In: *Food chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. 141, no. 1, p. 54-59.
53) PIRBALOUTI, A. G., NEKOEI, M., RAHIMMALEK, M., MALEKPOOR, F. 2019. Chemical composition and yield of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under foliar applications of jasmonic and salicylic acids. In: *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. ISSN 1878-8181, vol. 19, 101144.
54) RAAL, A., ORAV, A., PÜSSA, T., VALNER, C., MALMISTE, B., ARAK, E. 2012. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. In: *Food Chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. 131, no. 2, p. 632-638.
55) REF'AT, A. A.; HAMED, R. T. AND HEBA, A. 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. In: *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. ISSN 1815-8625, vol. 4, no. 3, p. 265-274.
56) REPČÁK, M., KRAUSOVÁ, T. 2009. Phenolic glucosides in the course of ligulate flower development in diploid and tetraploid *Matricaria chamomilla*. In: *Food Chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. 116, no. 1, p. 19-22.
57) REPČÁK, M., ŠMAJDA, B., KOVÁČIK, J., ELIÁŠOVÁ, A. 2009. Circadian rhythm of (*Z*)- and (*E*)-2-β-D-glucopyranosyloxy-4- methoxy cinnamic acids and herniarin in leaves of *Matricaria chamomilla*. In: *Plant Cell Reports*. ISSN 0721-7714, vol. 28, no. 7, p. 1137–1143.
58) REPČÁK, M., ŠVEHLÍKOVÁ, V., IMRICH, J., PIHLAJA, K. 1999. Jaceidin and chrysosplenetin chemotypes of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. ISSN 0305-1978, vol. 27, no. 7, p. 727-732.

59) ROBY, M. H. H., SARHAN, M. A., SELIM, K. A.-H., KHALEL, K. I. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). In: *Industrial Crops and Products*. ISSN 0926-6690, vol. 44, p. 437–445.
60) SADEGHIAN, F., HADIAN, J., HADAVI, M., MOHAMADI, A., GHORBANPOUR, M., GHAFARZADEGAN, R. 2013. Effects of Exogenous Salicylic Acid Application on Growth, Metabolic Activities and Essential Oil Composition of *Satureja khuzistanica* Jamzad. In*: Journal of Medicinal Plants*. ISSN 1684-0240, vol. 12, no. 47, p. 70-82.
61) SAHU, G. K. 2013. Salicylic acid: Role in plant physiology and stress tolerance. In: *Molecular stress physiology of plants*. Springer, India. ISBN: 978-81-322-0807-5, p. 217-239.
62) SATO, Y., ITAGAKI, S., KUROKAWA, T., OGURA, J., KOBAYASHI, M., HIRANO, T., ISEKI, K. 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. In: *International journal of pharmaceutics*. ISSN 0378-5173, vol. 403, no. 1-2, p. 136-138.
63) SHABANI, L., EHSANPOUR, A. A., ASGHARI, G., EMAMI, J. 2009. Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. In: *Russian Journal of Plant Physiology*. ISSN 1021-4437, vol. 56, no. 5, p. 621-626.
64) SHI, Q., BAO, Z., ZHU, Z., YING, Q., QIAN, Q. 2006. Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativ*a L. In: *Plant growth regulation*. ISSN 0167-6903, vol. 48, no. 2, p. 127–135.
65) SINGLETON, V. L., ROSSI, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. In: *America Journal of Enology and Viticulture*. ISSN 0002-9254, vol. 16, no. 3, p. 144-158.
66) ŠVEHLÍKOVÁ, V., BENNETT, R. N., MELLON, F. A., NEEDS, P. W., PIACENTE, S., KROON, P. A., BAO, Y. 2004. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). In: *Phytochemistry*. ISSN 0031-9422, vol. 65, no. 16, p. 2323-2332.
67) TAJIK S., ZARINKAMARA F., SOLTANIB B. M., NAZARIA M. 2019. Induction of phenolic and flavonoid compounds in leaves of saffron (*Crocus sativus* L.) by salicylic acid. In: *Scientia Horticulturae*. ISSN 03044238, vol. 257, 108751.
68) VERMERRIS W., NICHOLSON R. 2007. Phenolic Compound Biochemistry. Springer Science & Business Media. 276 p. ISBN 978-1-4020-5164-7.
69) YE J., MAO D., CHENG S., ZHANG X., TAN J., ZHENG J, XU F. 2020. Comparative transcriptome analysis reveals the potential stimulatory mechanism of terpene trilactone biosynthesis by exogenous salicylic acid in *Ginkgo biloba*. In: *Industrial Crops and Products*. ISSN 0926-6690, vol. 145, 112104.

70) ZADEH, J. B., KOR, N. M., KOR, Z. M. 2014. Chamomile (*Matricaria recutita*) As a Valuable Medicinal Plant. In: *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. ISSN 2383-2762, vol. 2, no. 3, p. 823-829.

Přílohy

Seznam příloh

Příloha č. 1: Kalibrační křivka kempferolu

Příloha č. 2: Kalibrační křivka kvercetinu

Příloha č. 3: Kalibrační křivka kyseliny benzoové

Příloha č. 4: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Příloha č. 5: Kalibrační křivka kyseliny chlorogenové

Příloha č. 6: Kalibrační křivka kyseliny kávové

Příloha č. 7: Kalibrační křivka kyseliny *p*-hydroxybenzoové

Příloha č. 8: Kalibrační křivka kyselina *p*-kumarové

Příloha č. 9: Kalibrační křivka kyseliny protokatechové

Příloha č. 10: Kalibrační křivka kyseliny salicylové

Příloha č. 11: Kalibrační křivka kyseliny syringové

Příloha č. 12: Kalibrační křivka kyseliny *trans*-ferulové

Příloha č. 13: Kalibrační křivka kyseliny *trans*-skořicové

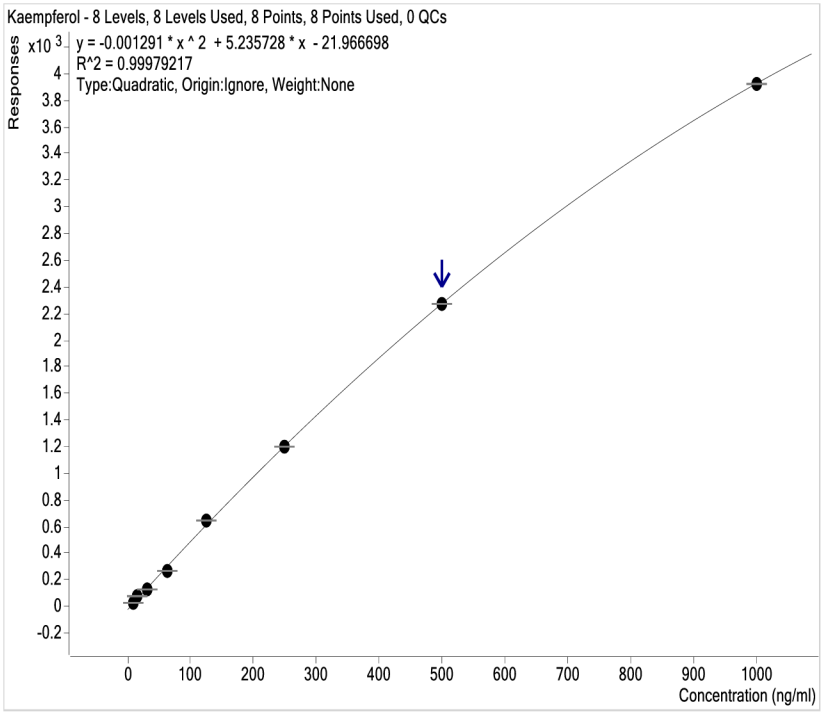
Příloha č. 14: Kalibrační křivka kyseliny vanilové

Příloha č. 15: Kalibrační křivka luteolinu

Příloha č. 16: Obsahu sekundárních metabolitů a antioxidační aktivita po aplikaci SA o různé koncentraci

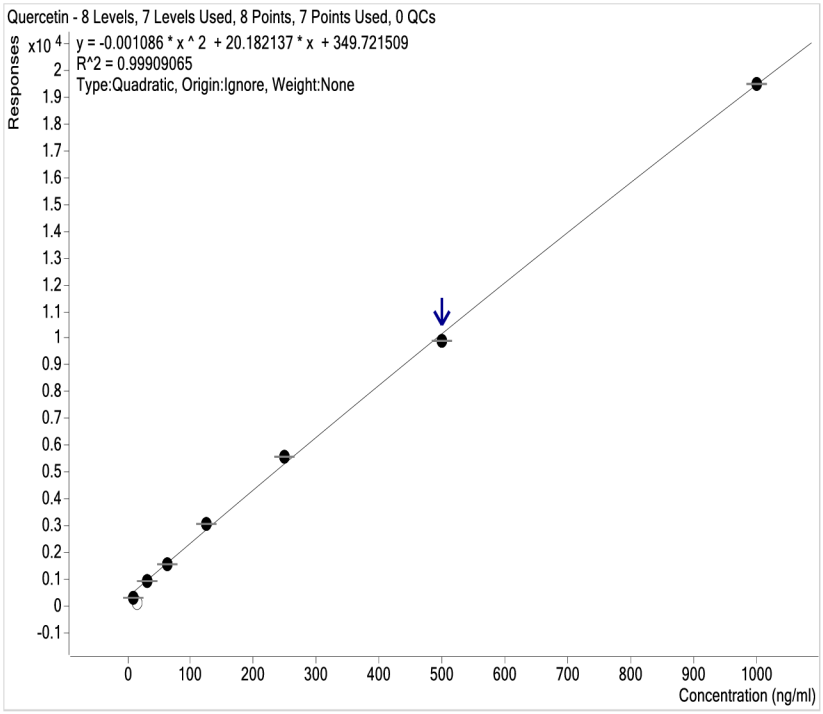
Příloha č. 17: Obsah sekundárních metabolitů a antioxidační aktivita komerčních čajovin

Příloha č. 1



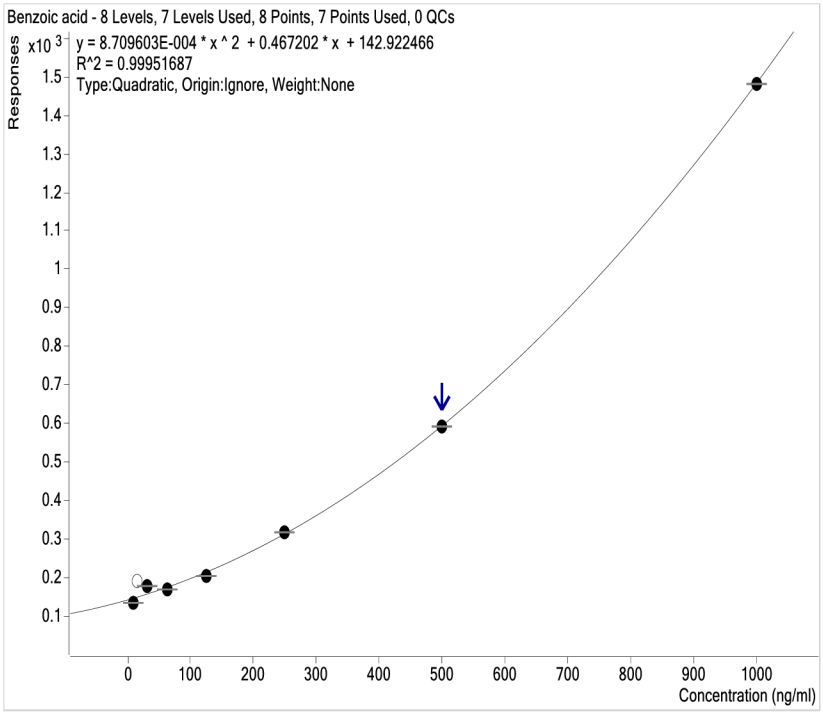
Příloha č. 1: Kalibrační křivka kempferolu

Příloha č. 2



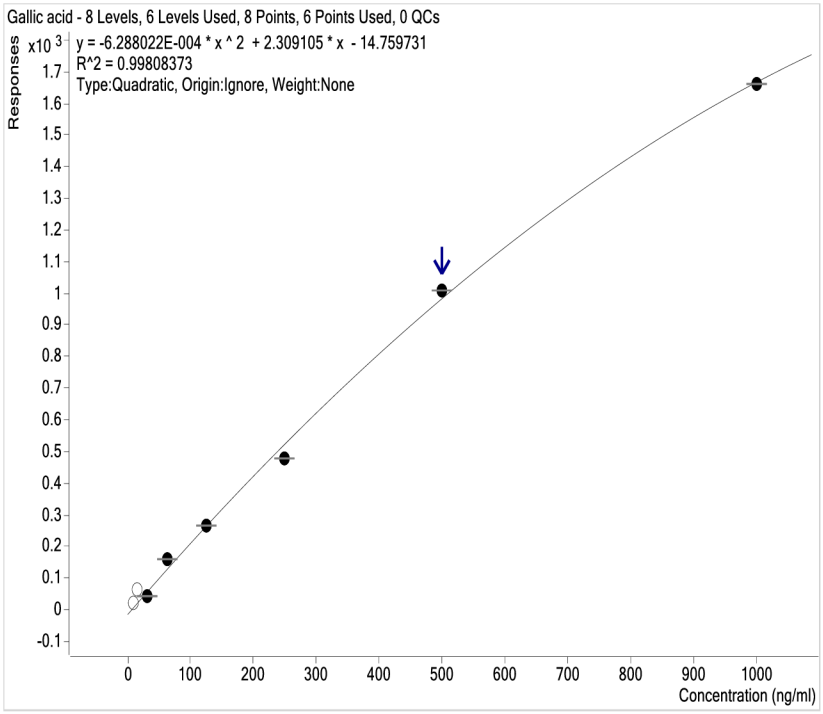
Příloha č. 1: Kalibrační křivka kvercetinu

Příloha č. 3



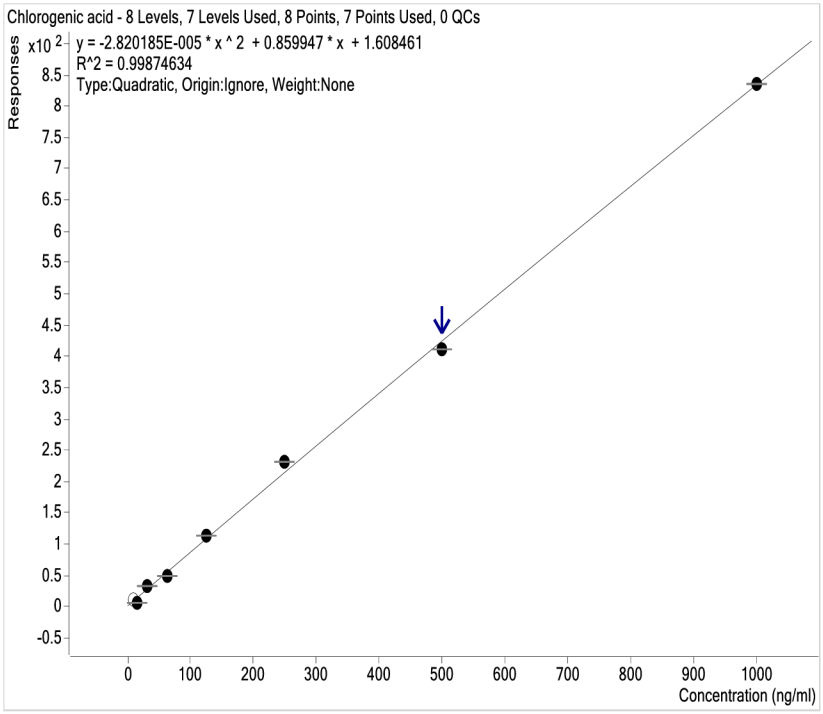
Příloha č. 2: Kalibrační křivka kyseliny benzoové

Příloha č. 4



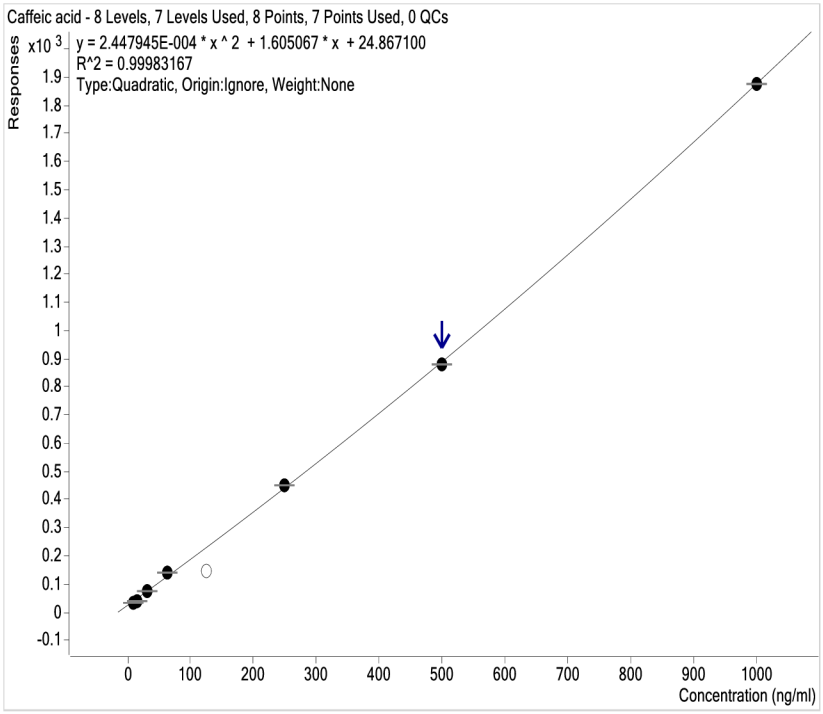
Příloha č. 3: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Příloha č. 5



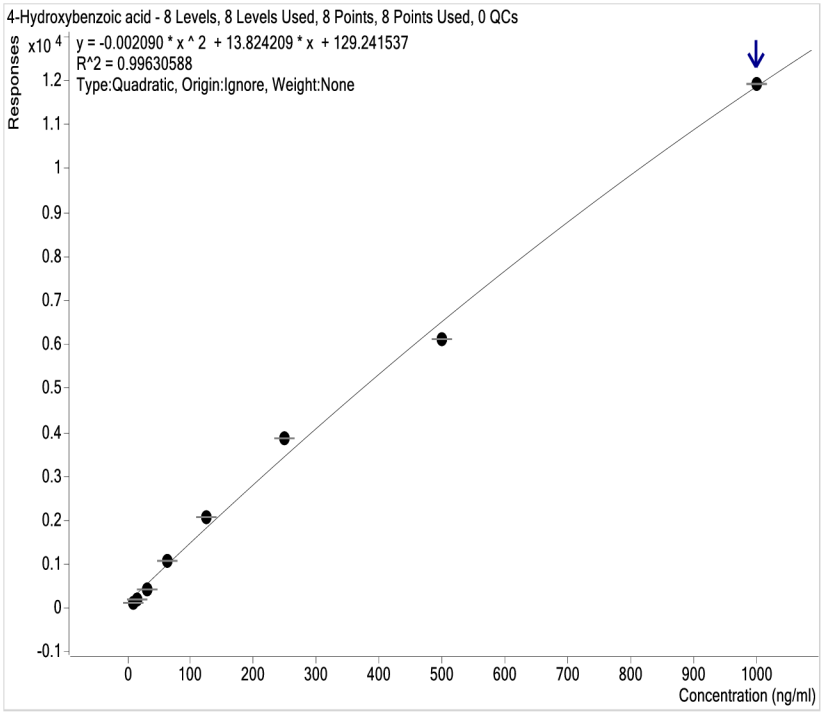
Příloha č. 4: Kalibrační křivka kyseliny chlorogenové

Příloha č. 6



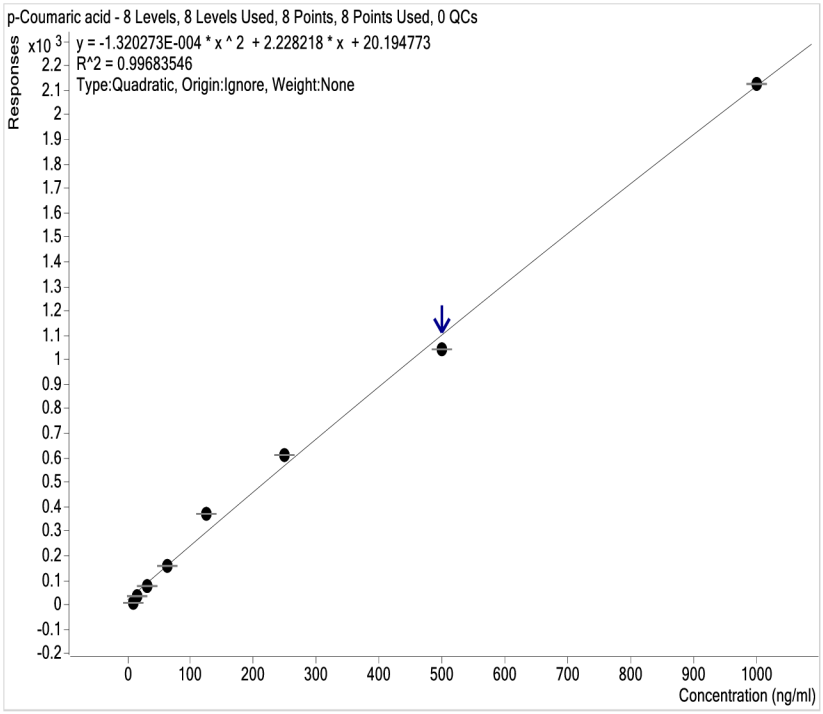
Příloha č. 5: Kalibrační křivka kyseliny kávové

Příloha č. 7



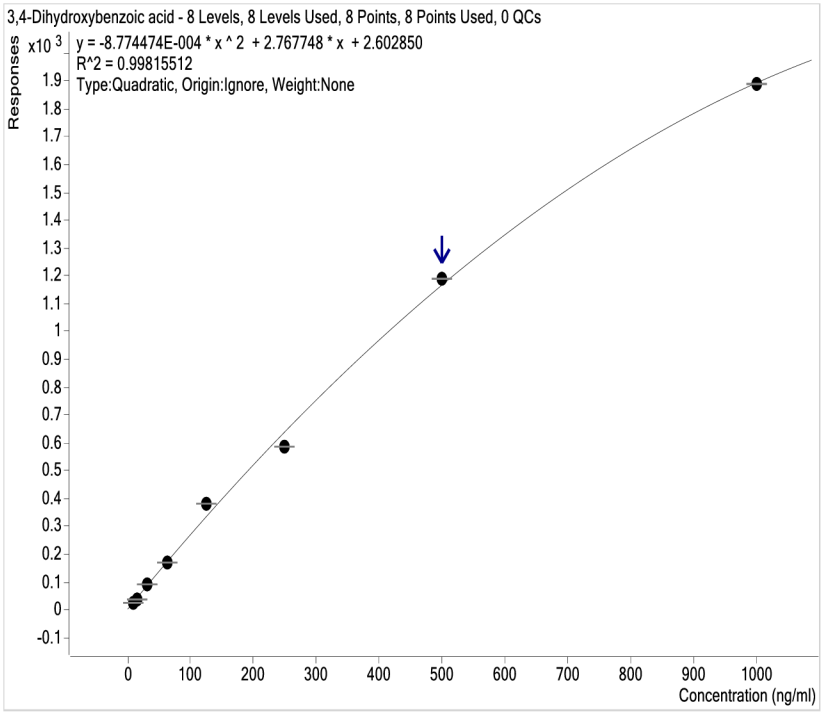
Příloha č. 6: Kalibrační křivka kyseliny *p*-hydroxybenzoové

Příloha č. 8



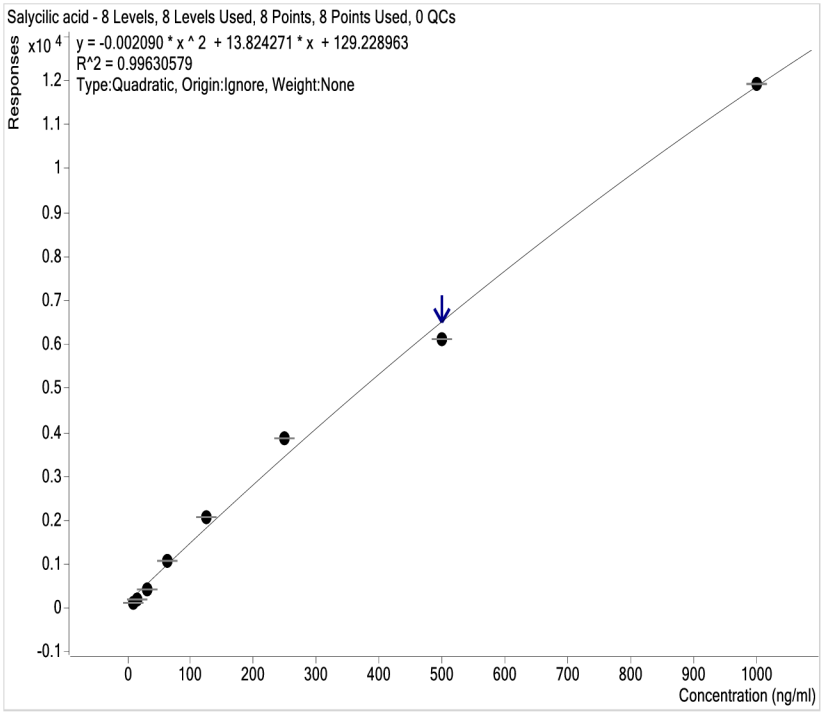
Příloha č. 7: Kalibrační křivka kyseliny *p*-kumarové

Příloha č. 9



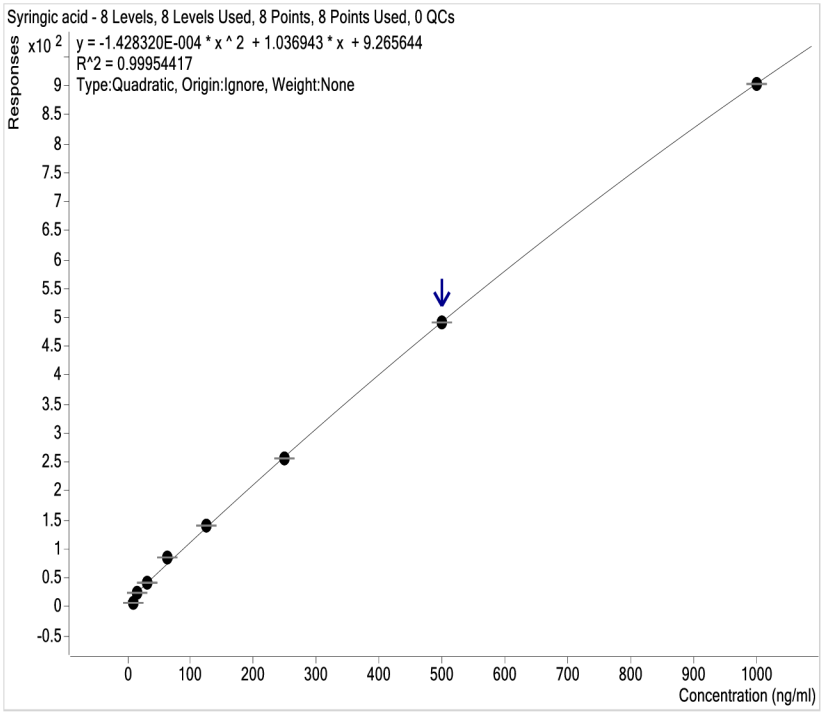
Příloha č. 8: Kalibrační křivka kyseliny protokatechové

Příloha č. 10



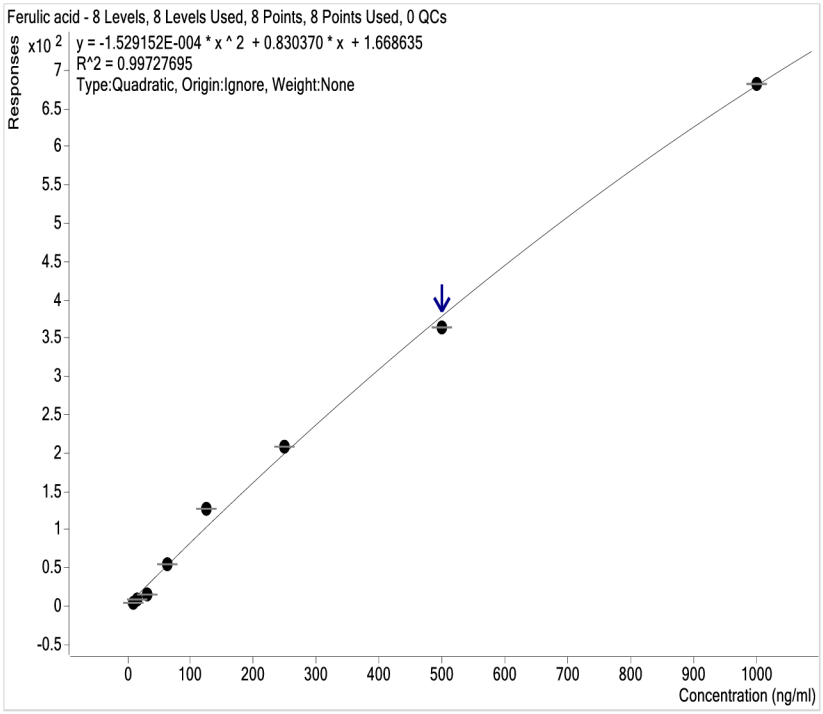
Příloha č. 9: Kalibrační křivka kyseliny salicylové

Příloha č. 11



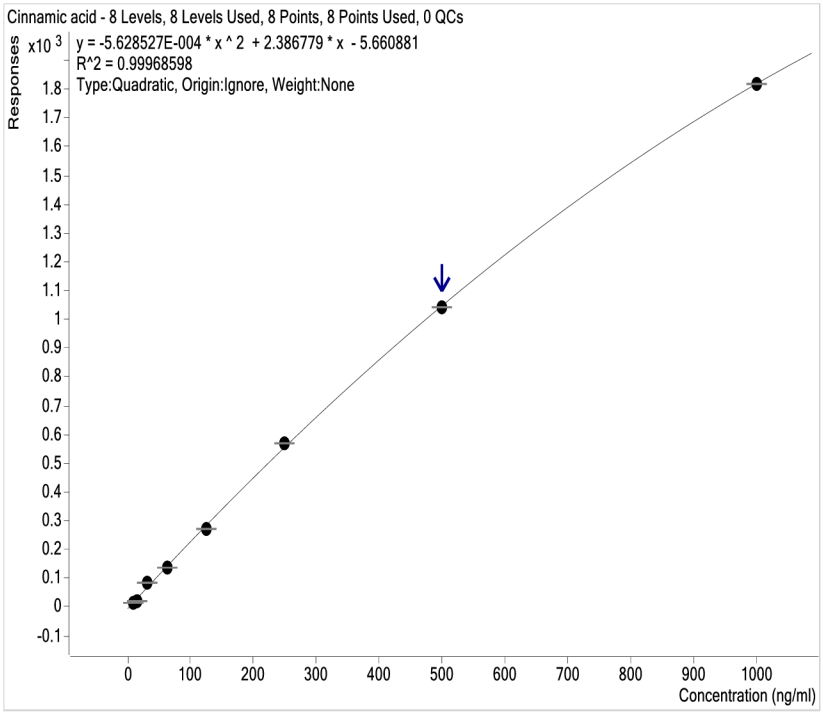
Příloha č. 10: Kalibrační křivka kyseliny syringové

Příloha č. 12



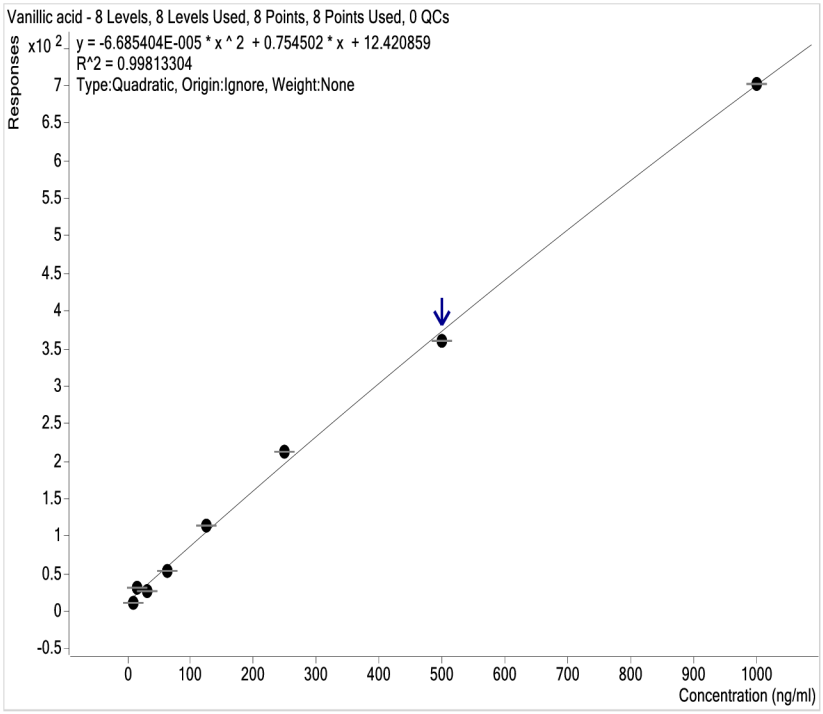
Příloha č. 11: Kalibrační křivka kyseliny *trans*-ferulové

Příloha č. 13



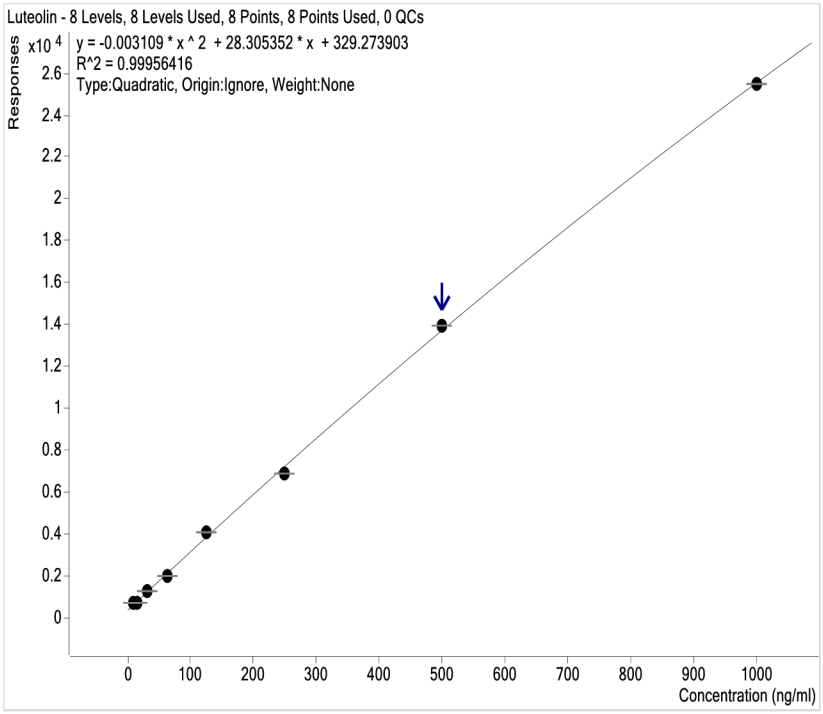
Příloha č. 12: Kalibrační křivka kyseliny *trans*-skořicové

Příloha č. 14



Příloha č. 13: Kalibrační křivka kyseliny vanilové

Příloha č. 15



Příloha č. 14: Kalibrační křivka luteolinu

	Koncentrace SA				
	Kontrola	**0,5 mM**	**1 mM**	**2 mM**	**3 mM**
Vodný výluh					
Fenoly	21,25±1,25b	13,18±1,99c	22,66±1,01b	45,01±2,78a	19,05±3,75bc
Flavonoidy	16,81±0,56a	9,79±0,25b	16,92±0,2a	18,7±0,3a	17,11±1,91a
Taniny	7,29±0,19a	4±0,14b	9±0,58a	8,26±0,96a	7,86±0,88a
DPPH	99,36±0,01ab	99,5±0,01a	99,29±0,03b	99,23±0,07b	99,43±0,09a
Metanolový extrakt					
Fenoly	6,79±0,51c	4,99±0,08d	9,26±0,25a	6,94±0,25c	7,72±0,01b
Flavonoidy	6,41±0,06a	5,41±0,14b	5,34±0,48b	5,6±0,52ab	5,36±0,4b
Taniny	4,34±0,35a	4,42±0,17a	3,31±0,12b	3,6±0,16b	3,95±0,31ab
DPPH	96,98±0,51a	83,35±0,77b	96,51±0,53a	81,06±0,64c	81,2±0,26c

Příloha č. 16: Obsah sekundárních metabolitů (mg/g DW) a antioxidační aktivita (%) po aplikaci SA o různé koncentraci. Hodnoty v řádcích označených stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl na hladině 0,05 podle Tukeyho testu. Hodnoty představují průměr ± směrodajní odchylka.

	Komerční čajoviny											
	Herbex	**Megafyt**	**Leros bio**	**DrMax**	**Leros**	**Fytofarma**	**Apothéke bio**	**Hipp bio**	**Tea CZ**	**Pickwick**	**Apothéke**	**Teekanne**
Vodný výluh												
Fenoly	21,52 ±1,95bc	14,69 ±0,88e	19,62 ±1,68bcd	14,85 ±0,85e	15,68 ±1,1e	19,56 ±0,52cd	22,54 ±0,95bc	15,9 ±0,58de	31,16 ±2,47a	9,12 ±0,31f	23,48 ±1,88b	17,17 ±0,5de
Flavonoidy	18,74 ±0,57e	13,78 ±0,3g	17,14 ±0,04ef	21,94 ±0,31d	23,14 ±0,24cd	25,83 ±0,47b	22,18 ±0,29d	15,47 ±0,19fg	29 ±0,53a	8,74 ±0,38h	24,63 ±1,67bc	15,41 ±0,25fg
Taniny	12,27 ±0,73cd	6,85 ±1,28e	10,48 ±2,25d	11,33 ±2,01d	5,14 ±1,41ef	1,59 ±0,63f	15,98 ±1,25b	12,55 ±0,68bcd	20,44 ±0,73a	6,29 ±1,26e	15,55 ±0,38bc	11,34 ±0,29d
DPPH	98,5 ±0,32a	98,62 ±0,48a	97,69 ±0,89a	98,54 ±0,7a	99,16 ±0,25a	98,87 ±0,44a	98,77 ±0,52a	95,74 ±0,96b	97,7 ±1,38a	98,9 ±0,18a	98,53 ±0,31a	98,6 ±0,16a
Metanolový extrakt												
Fenoly	7,86 ±0,32ab	7,47 ±0,51abcd	6,14 ±0,03bcde	6,66 ±0,43bcde	5,9 ±0,78cde	5,54 ±0,74de	8,62 ±1,09a	7,81 ±0,98abc	8,65 ±0,67a	5,36 ±0,89e	6,85 ±0,31abcde	6,12 ±0,19bcde
Flavonoidy	5,81 ±0,56a	5,05 ±0,37a	5,4 ±0,29a	5,17 ±0,14a	5,69 ±0,87a	5,43 ±0,08a	5,61 ±0,71a	5,29 ±0,18a	5,84 ±0,15a	5,4 ±0,36a	5,48 ±0,2a	5,56 ±0,44a
Taniny	1,04 ±0,33def	0,55± 0,1gh	0,84 ±0,18efg	0,79 ±0,14fgh	0,36 ±0,1h	6,46 ±0,27a	1,28 ±0,1cde	1,51 ±0,08bcd	1,64 ±0,06bc	0,75 ±0,15fgh	1,87 ±0,05b	1 ±0,03efg
DPPH	93,73 ±2,42b	97,25 ±0,82a	97,77 ±0,54a	96,54 ±1,33a	96,77 ±1,57a	97,45 ±0,38a	97,17 ±0,28a	96,56 ±2,21a	97,04 ±1,09a	97,39 ±0,33a	94,62 ±2,97ab	97,87 ±0,19a

Příloha č. 17: Obsah sekundárních metabolitů (mg/g DW) a antioxidační aktivita (%) komerčních čajovin. Hodnoty v řádcích označených stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl na hladině 0,05 podle Tukeyho testu. Hodnoty představují průměr ± směrodajní odchylka.