

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
KATEDRA APLIKOVANÝCH ROSTLINNÝCH BIOTECHNOLOGIÍ

Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině
Katedra: Katedra aplikovaných rostlinných biotechnologií

**Vliv ošetření elicitory na obsah některých biologicky aktivních látek
ve vybrané rostlině**

Bakalářská práce

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

Autor:
Jindřich Petr

České Budějovice, duben 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma **Vliv ošetření elicitory na obsah některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum L.*)** jsem vypracoval samostatně, pod vedením Prof. Ing. Stanislava Kužela, CSc., pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

České Budejovice, duben 2012

Poděkování:

Děkuji vedoucímu bakalářské práce panu Prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc. za metodické vedení a všestrannou pomoc při zpracování zadaného úkolu této práce. Děkuji také panu Ing. Josefu Marouškovi za pomoc při stanovení obsahu dusíku v půdních vzorcích a paní Ing. Ivetě Marešové za pomoc při stanovování a vyhodnocování obsahu účinných látek v semenech rostlin.

ABSTRAKT

Cílem předložené práce bylo studium účinku elicitorů – ELITiC a Elitic Jack na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.).

Hlavními účinnými látkami ostropestřce mariánského jsou silybin, silydianin, isosilybin, silychristin, označované část jako silymarinový komplex, a taxifolin. Tyto látky mají antihepatotoxické účinky a další ochranné účinky na mnohé buňky a orgány.

Před výzkumnou částí byla provedena literární rešerše o stresu a elicitaci, původu, botanické charakteristice, růstu a pěstování ostropestřce mariánského.

Poté byl založen maloparcelkový experiment v Hluboká nad Vltavou v roce 2010. Rostliny ostropestřce mariánského byly třikrát ošetřeny 2, 000 ml preparátu ELITiC rozpuštěnými v 5 l vody a 2,000 ml preparátu Elitic Jack taktéž rozpuštěnými v 5 l vody.

Příprava extraktů proběhla za použití směsi acetonu, metanolu a vody. Extrakty byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Vliv přípravků ELITiC a Elitic Jack na obsah sledovaných biologicky aktivních látek nebyl v porovnání s kontrolní skupinou rostlin bez aplikace elicitorů statisticky průkazný. Neúčinnost elicitorů mohla být způsobena nevhodně zvolenou koncentrací podobně jako neoptimálním stavem porostu v důsledku působení rozličných abiotických a biotických stresorů.

Klíčová slova: *Silybum marianum*, silymarin, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, flavanolignany

ABSTRACT

The aim of this thesis was to study the effect of two different elicitors - ELITiC and Elitic Jack on the stimulation of plant immunity and thus the influence on the content of the active constituents in *Silybum marianum* L. plants.

The main active constituents of *Silybum marianum* L. seeds are silybine, silydianine, isosilybine, silycristine, usually expressed as silymarin content, and taxifoline. These constituents have antihepatotoxic effect and many different protective effects on numerous organs and cells.

Knowledge about stress and elicitation, origin, botanical characterization, growth, development and cultivation of *Silybum marianum* L. were summarized before the research.

Then the small-plot experiment was set up in Hluboká nad Vltavou in 2010. Plants of *Silybum marianum* were treated three times with 2,000 ml of preparation ELITiC and 2,000 ml of preparation Elitic Jack both diluted in 5 l of water.

The preparation of the extracts was being held with using mixture of acetone, methanol and water. The extracts were determined by High Performance Liquid Chromatography.

The effects of both preparation ELITiC and preparation Elitic Jack on the active constituents in seeds were not statistically proven compared to seeds without application of elicitors. The ineffectiveness of elicitors should have been caused by unsuitable chosen concentration as well as by nonoptimal condition of plants due to various abiotic and biotic stressors.

Key words: *Silybum marianum*, silymarin, High Performance Liquid Chromatography, flavanolignans

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	11
2.1 Stres	11
2.1.1 Stres jako pojem	11
2.1.2 Stresory	12
2.1.3 Průběh stresové reakce	13
2.2 Stimulace, elicitace a rostlinná imunita	14
2.2.1 Elicitace	14
2.2.2 Abiotické elicitory	15
2.2.2.1 Vzácné kovy jako abiotické stresory	15
2.2.2.2 Vliv titanu na rostlinný organismus	16
2.2.3 Biotické elicitory	18
2.3 Ostropestřec mariánský - popis rostliny	20
2.3.1 Původ	20
2.3.2 Botanická charakteristika	20
2.3.3 Pěstování	22
2.3.3.1 Půdní a klimatické podmínky	22
2.3.3.2 Setí	23
2.3.3.3 Hnojení a výživa	25
2.3.3.4 Ochrana proti plevelům	26
2.3.3.5 Ochrana proti chorobám	26
2.3.3.6 Sklizeň	27
2. 4. Účinné látky	28
2.4.1 Lignany	28
2.4.2 Flavanolignany	29
2.4.3 Silyb	30
2.5 Farmakologické účinky	31
2.6. Metody stanovení obsahu účinných látek v rostlině	32
2.6.1 Chromatografie	32
2.6.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC	33
2.6.1.2 Chromatografie na tenké vrstvě TLC	34
2.6.2 Kapilární elektroforéza	35
2.6.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	35
3. METODIKA - VLASTNÍ POKUS	37
3.1 Maloparcelkový experiment	38
3.2 Příprava extraktu	41
3.3 Analýza vzorku	42
4. VÝSLEDKY	43
4.1 Výsledný obsah účinných látek	43
4.2 Vliv elicitorů na obsah účinných látek	47
5. DISKUSE	49
6. ZÁVĚR	51
7. POUŽITÁ LITERATURA	53
8. PŘÍLOHY	

1. ÚVOD

Motto: *φύσις κρύπτεσθαι φιλεῖ*
Přirozenost se ráda skrývá.

Hérakleitos z Efesu, zlomek B 123

Léčivé rostliny jsou v současnosti středem zájmu mnoha společenských skupin. Využívají se k léčení v přírodních a alternativních medicínských systémech či při fytoterapiích, které korespondují s trendem zdravého životního stylu rostoucí části populace západního světa. Slouží ale také jako suroviny pro výrobu léků a léčiv moderní farmacie, která ještě zdaleka neobjevila celý potenciál rostlinné říše. Jejich produkci zajišťuje z převážné části zemědělská činnost pěstitelů, přestože v některých zemích i u nás má dlouhou tradici sběr léčivých rostlin. Pěstování léčivek je v souladu s aktuálními zájmy společné zemědělské politiky EU, neboť odpovídá návratu k pěstování tradičních a krajových rostlin v ekologickém zemědělství s produkcí vysoce kvalitních surovin pro zpracovatelský průmysl, plní také významné mimoprodukční funkce a napomáhá k trvale udržitelnému rozvoji venkova.

Jednou z nejdůležitějších léčivých rostlin je ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.), který je pěstován velkoplošně, a zájem o jeho plody dlouhodobě roste, především pro jejich využití ve farmaceutickém průmyslu. Látky silymarinového komplexu obsažené v semenech ostropestřce mají významné hepatoprotektivní účinky a nejnovější výzkumy dokazují i jejich pozitivní vliv při léčbě některých druhů rakoviny (Dvořáková, 2006).

Rozhodujícím momentem pěstování ostropestřce je kvalita semen, neboť ona rozhoduje o zájmu či nezájmu farmaceutického průmyslu o tuto surovinu, a tím i o ekonomickém výsledku pěstitelů. Kvalitu semen lze ovlivnit aplikací rozličných látek se stimulačním účinkem na rostlinné obranné mechanismy, tzv. elicitorů. Moderní analytické metody poskytují dokonalejší poznání metabolismu a vlivů specifických látek na tvorbu žádoucích metabolitů. Metoda elicitace se tedy jeví jako velmi perspektivní oblast vědeckého zájmu s významnými možnostmi praktické aplikace.

Cíl práce

Cílem práce je studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.).

Cílem práce je vypracovat literární rešerši:

- a) vliv elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.) nebo v jiných vybraných rostlinách
- b) botanická charakteristika, způsob pěstování, agrotechnika, hnojení, ochrana před škůdci a proti chorobám ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L.)
- c) chemické složení a účinné látky v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.) a metody jejich stanovení

Cílem práce je prostřednictvím maloparcelkového pokusu odzkoušet vliv vybraných elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.)

Cílem práce je vypracovat bakalářskou práci dle Opatření děkana č. 13 ze dne 18.12.2009.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Stres

2.1.1 Stres jako pojem

Pojem stres používáme v běžné řeči především jako synonymum pro duševní zátěž, avšak stresem se dnes zabývají přední odborníci mnoha rozličných vědních oborů. Do češtiny bylo toto slovo přejato z anglického „stress“, jež nese sémantické významy jako například tíseň, nesnáz či tlak (Fronek, 1998). Etymologicky lze sledovat původ slova až k latinskému slovesu „stringo, stringere, strinxí, strictum“ s významem utahovati, stahovati, zadržovati (Křivohlavý, 1994).

Jako první použil termín stres v biologickém kontextu maďarský endokrinolog Hans Selye, který se od třicátých let dvacátého století systematicky stresem zabýval. Navázal na práce Clauda Bernarda o stabilitě vnitřního prostředí, „milieu intérieur“ (Skinner, 1991), a Waltera Cannona o homeostázi jakožto schopnosti organismů udržovat své vnitřní prostředí pomocí složitých mechanismů v dynamicky konstantním stavu (Cannon, 1929).

Hans Selye ve svých pozdějších pracích popsal i pozitivní efekty stresu a navrhl rozlišovat mezi pojmy „eustress“ a „distress“. Pozitivní stres, „eustress“, vede ve svém důsledku k posílení organismu a je vnímán jako vítězně překonaná zátěž, zatímco negativní stres je vnímán jako znepokojující zátěž, jejíž překonání stálo mnoho sil. Reakce organismu je v obou případech stejná, záleží pouze na vnímání a hodnocení subjektu (Selye, 1976). Subjektivita je na úrovni vegetativního rostlinného světa záležitostí nevědomou, kterou můžeme vztahovat ke schopnosti „autopoiesis“, tj. ke schopnosti sebevytváření a sebeudržování (Varela et al., 1974). Ačkoli nové teorie poznání (Capra, 2004; Bateson, 2006) spatřují kognitivní proces jako proces ontologický, nepředpokládáme, že by rostlina mohla zažívat stresovou situaci jako hodnotově relevantní. Člověk jako pozorovatel však může vnímat působení stresu pozitivně, vede-li k intenzivnějšímu projevení přirozenosti rostliny v podobě zvýšení obsahu účinných látek.

2.1.2 Stresory

Vše živé má překvapivě složitou vnitřní strukturu, fyzicky realizovanou sítí vnitřních vztahů, skrze kterou komunikuje s okolím. Tím, jak rostlina realizuje za pomoci energie získané metabolismem své možnosti, vyvstává do určitého tvaru a vytváří komunikační rozhraní vůči okolí. Rostlina je udržována průtokem látek a energie, které získává z okolního prostředí, je tedy otevřeným systémem (Kratochvíl, 1994).

Rostlina je bezprostředně začleněna do svého životního okruhu. Její hranice jsou jaksí otevřeny světu. Plessner označil formu pozicionality rostliny jako otevřenou. Rostlina je sama sebou právě skrze své okolí, což je v protikladu ke zvířecí říši, neboť zvíře má své hranice přísně vymezené a uzavřené, jeho pozicionalita je uzavřená (Fischer, 2000). Životní prostředí, které se zpřítomňuje v podobě žitého světa, tzv. „Umwelt“ (Uexküll, 1934), v němž rostlina realizuje svůj životní cyklus, sestává v nejobecnější rovině z přímého a nepřímého působení organismů v komplexu přírodních podmínek. Ekologické faktory tedy dělíme na biotické (vnitrodruhové a mezidruhové vztahy, příp. antropogenní faktor - působení člověka) a abiotické (fyzikální a chemické). Každý organismus je schopen se přizpůsobit určitému rozmezí působení každého jednotlivého faktoru, hovoříme o jeho ekologické valenci, která může být pro určitý faktor relativně široká - druhy euryvalentní, nebo relativně úzká - druhy stenovalentní. Nejvyšší zdatnosti, tj. schopnosti rozmnožit se, dosahuje organismus v pásmu ekologického optima působení faktoru a při dostatečné přítomnosti zdrojů. Pro niku populací platí výše uvedené per analogiam (Begon et al., 1990).

Jestliže určitý faktor působí mimo optimální hodnoty fylogeneticky zakódované v rostlině, tedy zatěžuje rostlinu nad běžnou úroveň (Pulkrábek et al., 2005) a narušuje její homeostázu, vyvolává napětí a stres, bývá klasifikován jako stresor, tj. původce stresu (Kovalčík, Kovalčíková, 1974).

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

2.1.3 Průběh stresové reakce

Působení stresorů vede k mobilizaci obranných či nápravných zařízení (Kovalčík, Kovalčíková, 1974), tedy ke stresové reakci, která probíhá ve čtyřech fázích, a to ve fázi poplachové - fázi restituční - fázi rezistence - fázi vyčerpání.

Poplachová fáze je zahájena bezprostředně po účinku stresoru či spíše kombinace stresorů, kdy jsou jejich působením narušeny buněčné struktury a životní funkce rostliny. V restituční fázi, nedojde-li ovšem k překročení letální meze rostliny a jejímu úhynu, začnou pracovat kompenzační mechanismy. Tyto mechanismy směřují ke zvýšené odolnosti rostliny ve fázi rezistence vůči působícím stresorům. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresorů nemusí být zvýšená odolnost rostliny vždy trvalého charakteru a může dojít opět k jejímu poklesu ve fázi vyčerpání (Bláha et al., 2003).

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

2.2 Stimulace, elicitace a rostlinná imunita

2.2.1 Elicitace

Působení biotických a abiotických stresorů ovlivňuje u rostlin tvorbu sekundárních metabolitů, které mohou obsahovat účinné látky s využitím ve farmaceutickém průmyslu. Pakliže stresor pozitivně ovlivňuje tvorbu žádoucích látek, lze chápat jeho efekt pozitivně jako stimulaci, nabuzení obranných mechanismů rostliny. Elicitory indukují v rámci rostlinných obranných mechanismů tvorbu nízkomolekulárních sekundárních metabolitů fytoalexinů, jako jsou například terpeny, flavonoidy, kumariny, isoflavonoidy, steroidy, stilbeny a další. Využití stimulačního efektu specifických látek se nazývá elicitace (Dicosmo, Misawa, 1985).

Kužel et al. (2005) pak elicitaci definují jako indukci obranných mechanismů rostlinného organismu, například zvýšení tvorby sekundárních metabolitů, vyvolanou aplikací vnějšího stresového faktoru chemického, biologického, světelného, tepelného či mechanického charakteru.

Bláha et al. (2003) označují elicitor naproti tomu v užším smyslu jako látku, která se vytváří po proniknutí patogenu do organismu rostliny a spouští obrannou reakci rostliny. Elicitory dělí na exogenní, které jsou metabolity patogenu, např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy, a endogenní, které se uvolňují z narušovaných buněčných stěn organismů, např. oligoglukany, oligomery chitinu, oligogalakturonany.

Radman et al. (2003) rozdělují elicitory na fyzikální a chemické, ty pak na abiotické a biotické, a ty poté na elicitory komplexního složení a definovaného složení.

TABLE 1

Elicitors of plants

Elicitors					Reported effects on	
Physical Elicitors	Injury				P	
	Abiotic	Metal ions (lanthanum, europium, calcium, silver, cadmium), oxalate			Pc	
		Complex Composition	Yeast cell wall, Mycelia cell wall, Fungal spores		Pc, F	
Chemical Elicitors	Biotic	Defined Composition	Carbohydrates	Polysaccharides	Alginate LBG Pectin Chitosan Guar Gum	Pc, F, B F Pc, F Pc Pc
				Oligosaccharides	Mannuronate Guluronate Mannan Galacturonides	F F F Pc
				Peptides	Glutathione	Pc
				Proteics	Proteins	Cellulase, Elic- itins, Oligandrin
			Lipids		Lipopolysaccharides	Pc
			Glycoproteins		Not characterized	Pc
			Volatiles		C ₆ -C ₁₀	Pc

Abbreviations: P, plants; Pc, plant cell culture; B, bacterial cell culture; F, fungal cell culture.

2.2.2 Abiotické elicitory

Abiotické elicitory jsou středem méně intenzivního zájmu než biotické (Radman et al., 2003) V praxi se nejčastěji využívá chemicky čistých sloučenin, anebo jednoduchých sloučenin obvykle aplikovaných ve vodném roztoku o velmi nízké koncentraci (Dvořáková, 2006).

2.2.2.1 Vzácné kovy jako abiotické stresory

Mnoho kovových prvků se v rostlinném organismu běžně nachází. Z makroelementů jsou to hořčík a vápník, z mikroelementů pak železo, molybden, mangan, kobalt, zinek, měď, lithium, olovo ad. Tyto prvky, které se v rostlinném organismu vyskytují v podobě iontů, organických a anorganických solí, chelátů či oxidů, působí mnohdy jako katalyzátory enzymatických reakcí, uplatňují se například při transportních pochodech či při neutralizaci organických

kyselin, jsou nepostradatelné pro fotosyntézu, biosyntézu chlorofylu a respiraci, ovlivňují také metabolismus rostlinných hormonů (Nováček, 2009).

Obsah těchto prvků v rostlině se v průběhu času přirozeně mění. Perspektivní výsledky by v budoucnu mohly nabídnout výzkumy zaměřené na studium kombinovaného působení několika abiotických elicitorů zároveň, korelace mezi obsahem určitého mikroprvku v rostlinném organismu a účinností rozličných koncentrací na jeho bázi založených elicitorů, vztahu mezi biorytmy rostlin a délkou periody aplikace elicitoru.

Wu et al. (2001) například prokázali zvýšení obsahu taxolu v suspenzní kultuře při použití lanthanu na 280 % bez znatelných změn v produkci biomasy.

Mnohé další vzácné kovy mají stimulační účinky na rostlinný organismus, respektive v nižších koncentracích podporují růst kultury, ve vyšších jej potlačují. Tento efekt byl sledován při působení iontů europia v kalusové kultuře reveně dlanité (*Rheum palmatum*) (Lu et al., 1997) či po přidání iontů ytterbia do kalusové kultury koptisu čínského (*Coptis chinensis*) (Lu et al., 1998).

Produkcí flavonoidů ovlivňují dle Duška et al. (1999) elicitory v podobě chloridu rtuťnatého, chloridu kademnatého, síranu měďnatého, síranu manganatého a dusičnanu olovnatého.

2.2.2.2 Vliv titanu na rostlinný organismus

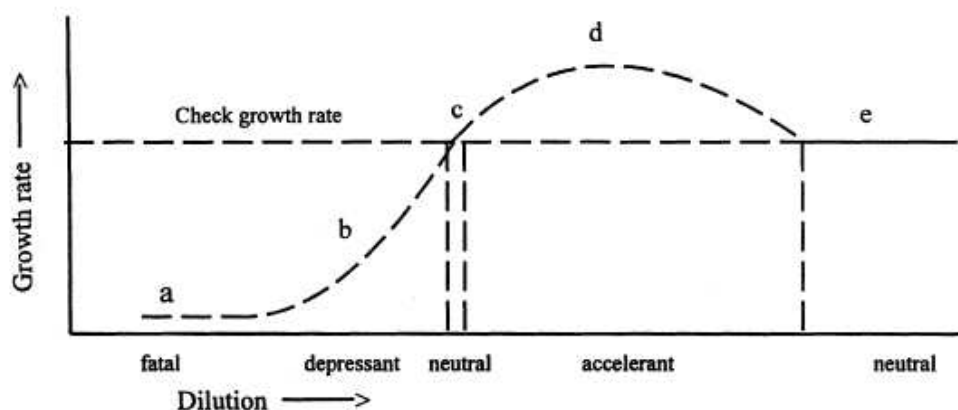
Titan je velmi důležitým fytochemickým prvkem, který se v rostlinných pletivech nachází ve stopovém množství, řadíme jej tedy mezi mikroelementy (10^{-3} - 10^{-5} % obsahu sušiny) (Nováček, 2009). V současné době se používá jako složka komplexních hnojiv obsahujících mikroelementy s aplikací na list. Lze jej řadit mezi užitečné prvky, neboť má kladný vliv na růst, potažmo výnos, jehož zvýšení bylo pro různé plodiny po foliární aplikaci roztoku titanu pozorováno o 10 - 20 % (Pais, 1983). Ošetření rostlin roztokem titanu se projevilo i zvýšením koncentrace některých základních stopových prvků. Stimulace příjmu iontů (draslíku, hořčíku, mědi, zinku, železa a manganu) rostlinou patrně souvisí se stimulací fotosyntézy a navazující syntézy sacharidů, a tím i zvýšené potřeby iontů pro katalyzující enzymy (Pais, 1974).

Tento výzkum potvrdili Giménez et al. (1990), kteří také sledovali benefiční účinek titanu na zvýšení koncentrace některých esenciálních prvků v rostlinách.

Carjaval et al. (1994) prokázali zvýšení obsahu chlorofylu a i b působením titanu. Daood et al. (1988) a Simon et al. (1988) potvrzují vliv titanu na zvýšení aktivity enzymů. Nižší koncentrace titanu mohou působit i jako ochrana rostlin proti stresu způsobenému těžkými kovy (Lesko et al., 2002).

Při vyšších koncentracích může titan působit toxicky a způsobovat např. chlorózy a poruchy růstu (Hrubý et al., 2002). Klíčovým momentem je tedy volba koncentrace, při níž je pozitivní působení obranných mechanismů vyvolaných přítomností titanu silnější, než jeho toxický vliv na rostlinné tkáně. Tento jev spočívající v rozdílném působení toxinu, respektive stresoru, v závislosti na koncentraci či intenzitě se v toxikologii nazývá hormese.

obr. č. 1 - Hormetická β - křivka (True, Gies, 1903)



Hormetická β - křivka znázorňuje rozdílné fyziologické stupně odpovědi organismu na zředění či dávku toxinu, respektive stresoru: a = smrtelná koncentrace, b = přežití s depresivními účinky na organismus, c = neutrální vliv v porovnání s kontrolou, d = akcelerace růstu oproti kontrole, e = neutrální vliv v porovnání s kontrolou (True, Gies, 1903)

Kužel et al. (2003) navrhli následující souhrnnou teorii působení titanu v rostlinách. Titan se po proniknutí do rostlinného organismu naváže na koordinačně aktivní místa důležitých biomolekul (např. nukleové kyseliny) a vytěsňuje tak původně vázané prvky (jako jsou Fe, Mg, Zn) z jejich vazebných míst. Rostlina je nucena zahájit detoxikační proces zahrnující syntézu titan chelatizujících ligandů - organických α -hydroxykyselin a kyseliny askorbové. Ma (2000) popsal podobný

mechanismus interní detoxikace hlíníku s tvorbou Al - citrátu u hortenzií a tvorbou Al-oxalátu u rostlin akumulujících hliník.

Součástí procesu detoxikace je zvýšení syntézy chlorofylů a nitrátoreduktázové, Fe (III)-reduktázové, peroxidázové a katalázové aktivity, což patří k obvyklým ukazatelům stresu rostliny. Zvýšená aktivita nitrátoreduktázy poskytuje rostlině dostatek dusíku pro funkci všech metabolických cest účastnících se detoxikačního procesu. Dochází také ke zvýšenému příjmu Fe a Mg, který pomáhá vrátit komplexotvornou rovnováhu zpět do normálního stavu. Proto se účinky titanu jeví jako benefiční jen v nízkých dávkách, kdy vyvolané obranné reakce překonají jeho toxické působení (Kužel et al., 2003).

Fe je vytěšňováno ze svých přirozených vazebných míst, proto lze při intoxikaci Ti (IV) očekávat fyziologické projevy analogické deficienci Fe, jako jsou exkrece kyselé fosfatázy kořenovým systémem, zvýšení aktivity Fe³⁺ reduktázy na povrchu kořenů, které způsobuje redukci Fe³⁺ přítomného v živném roztoku na Fe²⁺, jenž následně tvoří barevný komplex s Ferrozinem, dále exkrece riboflavinu kořeny do živného roztoku a mobilizaci Fe²⁺ v rostlině jako důsledek aktivace Fe³⁺ reduktázy a zvýšeného příjmu Fe rostlinou (Kužel et al., 2003).

2.2.3 Biotické elicitory

Živé organismy ve svém životním prostředí běžně vstupují do různých vztahů s dalšími organismy svého druhu i mezidruhově. Mezi biotické stresory je možné řadit patogenní mikroorganismy, jako jsou např. viry, bakterie a jiné mikroorganismy, houby, dále hmyzí a živočišné škůdce, ale také rostliny. Biotické elicitory komplexního složení pak bývají nejčastěji homogenáty virů, bakterií a hub (Hnilička et al., 2003).

Marinelli et al. (1994) například prokázali zvýšení akumulace flavonoidů v suspenzní kulturě jehlice rolní (*Ononis arvensis*) elicítací homogenátem z usmrcených buněk z *Escherichie coli* a kroupidláka zemního (*Aspergillus terreus*).

Biotické elicitory na bázi organických sloučenin představují druhou, velmi širokou skupinu látek se stimulačními účinky, přičemž počet nově objasněných molekulárních struktur rozličných biotických elicitorů v poslední době stále stoupá.

Řadíme sem různé proteiny, glykoproteiny, oligosacharidy či rostlinné hormony (Anderson, 1989; Hahn et al., 1989).

Elicitaci samotnou organickou látkou využili ve svém experimentu Tůmová a Dušek (2000), kteří tak prokázali významnou elicitaci aktivitu kyseliny linolové vedoucí ke zvýšené tvorbě fytoalexinů (isoflavonoidů) v listech rostliny fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*). Působení kyseliny linolové je přičítáno blízkosti její struktury ke struktuře kyseliny gama-linolenové, jež je prekurzorem kyseliny jasmínové, jejíž methylester je fytohormonem v obranném metabolismu rostlin (Longland et al., 1987).

Optimální koncentraci stejného elicitoru u různých kultur in vitro v případě jeho pozitivního působení nelze zevšeobecnit a je specifická, mimo jiné pro tu kterou kulturu a dobu elicitace. Účinnost elicitace záleží na mnoha faktorech, které často působí synergicky, jako jsou stáří kultury, fyziologický stav rostliny, koncentrace elicitoru a v jakých časových periodách byl elicitor podáván. Velice důležitou podmínkou je, aby elicitor nesnižoval životaschopnost kultury, proto se obecně užívají nižší koncentrace elicatorů (Pexídr, 2004).

Doposud stále není uspokojivě vysvětlen mechanismus účinku biotických a abiotických elicatorů, jakož ani struktura biosyntetických drah sekundárního metabolismu rostlin (Siatka, Kašparová, 2007).

2.3 Ostropestřec mariánský - popis rostliny

2.3.1 Původ

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.) je jednou z nejdéle známých léčivých rostlin na evropském kontinentě s původem v oblasti Středomoří, odkud se později rozšířil po celém světě. Areál jeho rozšíření zahrnuje oblast Kavkazu, Íránu, Sýrie (Starý 2000), severní Afriku, Kanárské ostrovy, Pyrenejský poloostrov, Madeiru, byl zavlečen i do Ameriky a Austrálie (Husáková, Lhotská 1981). Dnes je ostropestřec pěstován na plantážích v mnoha evropských zemích, severní Africe, Severní a Jižní Americe, středí a západní Asii a jižní Austrálii (Chiavari et al., 1991; Morazzoni, Bombardelli, 1995; Carrier et al., 2002).

Ostropestřec byl vždy považován za jednu z nejúčinnějších léčivých rostlin a zmínky o něm najdeme téměř ve všech významných herbářích od dob středověku, jako například v herbáři abatyše Hildegardy z Bingenu, Hieronyma Bocka, Mattioliho a dalších (Jegorov, 1996). Již od dob antiky byl používán jako jaterní tonikum.

Ostropestřec byl v Evropě také pěstován v zahradách jako zelenina, mladé listy se používaly do salátů jako náhrada za špenát, mladé stonky se upravovaly na způsob chřestu, kořeny se nechávaly přes noc namočené ve vodě, aby ztratily hořkost, a jedly se v úpravách jako černý kořen, květní lůžka připomínající artyčoky byla připravována jako artyčoky (Hedrick, 1919; Grieve, 1931)

Rodové jméno *Silybum* patrně vzniklo z řeckého „silybon“ – střepec, podle tvaru a velikosti úboru. Druhové jméno vychází z legendy o bílém mramorování na listech, které mělo být mlékem Panny Marie (Starý, 2000).

2.3.2 Botanická charakteristika

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.), synonymně *Carduus marianus*, z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*), je bylinou podobnou pcháčům a bodlákům (Husáková, Lhotská, 1981). Podobnost s bodlákem vyjadřují i cizojazyčné názvy, anglicky „milk thistle“, francouzsky „chardon Marie“, německy „Mariendistel“ (Starý, 2000). Na našem území se jedná o jednoletou bylinu,

výjimečně dvouletou (Spitzová, 1997). V příznivých klimatických podmínkách je ozimého charakteru, v našich podmínkách téměř vždy vymrzající (Kubínek, 1987). V teplých zahraničních oblastech je velmi významnou plevelnou rostlinou (Husáková, Lhotská, 1981), jeho nízká odolnost proti mrazu jej však u nás činí pouze vzácnou plevelnou rostlinou (Kubínek 1987). Ostropestřec přechodně zplaňuje na rumišťích, pustých místech, keřnatých a kamenitých stráních (Husáková, Lhotská, 1981).

Ostropestřec rychle a spolehlivě klíčí (Starý, 2000). Vzcházet může v optimálních podmínkách i po 5 dnech, průměrně však 2 - 3 týdny po výsevu. Přízemní růžice velkých, laločnatých listů s dožluta zabarvenými trny (Starý, 2000) se vytvoří do dvou měsíců po výsevu (Kubínek, 1987). Tato fáze má významný vliv na tvorbu a složení silymarinového komplexu (Gromová et al., 1993). Rostlina přechází do generativní fáze začátkem dlouhivého růstu (Starý, 2000) a rychlé tvorby rozvětvené, květonosné lodyhy, která dosahuje konečné výšky 1 – 2 metry, maximálně 2,5 metru (Kubínek, 1987). Lodyha podobná benediktu je silná, dole hustě olistěná, v horní polovině bohatě větvená a řídkěji olistěná.

Listy svým tvarem dobře svádějí vodu ke kořenům (Starý, 2000), jsou zelené, střídavé, tuhé, lesklé, objímavé (Husáková, Lhotská, 1981), podlouhle eliptické a na okrajích ostnitě zubaté (Opletal, Volák, 1999), na žilnatině bíle mramorované (Janča, Zentrich, 1995). Zpravidla je silně vyvinut kulový kořen (Spitzová, 1997).

Povětšinou jednotlivé mohutné úbory, velké 5 až 8 cm (Spitzová 1997), jsou červenofialově kvetoucí (Starý, 2000), zřídka s bílými či bledě fialovými květy (Opletal, Volák, 1999), s lysým, kulovitým zákrovem a ostnitě zubatými listeny, které vybíhají v mohutné, žlábkovité, nazpět ohnuté ostny (Husáková, Lhotská, 1981). Ostropestřec kvete v závislosti na termínu výsevu v červenci až září (Moudrý 2012), je cizosprašný, hlavními opylovači jsou včela a čmelák. Ostropestřec patří mezi významné medonosné rostliny (Spitzová, 1997). V každém úboru je přibližně 190 semen, což v průměru z jedné rostliny při 94% klíčivosti a hmotnosti jednoho semene 22 mg dává 6350 semen (Sindel, 1991).

Plodem ostropestřce je tmavohnědá, žíhaná nažka dlouhá 6 – 7 mm a široká 3 mm (Spitzová, 1997). Pokud je v období tvorby plodů deštivé a chladné počasí, jejich obaly se mnohdy vůbec nezbarví (Czabajska et al., 1989). Semena mají lesklý bílý chmýr, který je u báze srostlý a dlouhý asi 10 – 15 mm (Husáková, Lhotská, 1981). Semena se využívají i s obaly, jelikož se účinné látky nacházejí bezprostředně

pod osemením (Jaroš, 1992), přičemž relativně největší množství účinných látek je v semenech z vrcholových úborů (Gromová et al., 1993). Droga má nahořklou chuť a je bez pachu (Opletal, Volák, 1999).

obr. č. 2 - Detail květu ostropestřce mariánského



Foto: Jindřich Petr

2.3.3 Pěstování

2.3.3.1 Půdní a klimatické podmínky

Ostropestřec mariánský lze pěstovat v širokém pásmu půdních a klimatických podmínek díky jeho relativně vysoké přizpůsobivosti. Podmínky řepařského výrobního typu se nejvíce podobají klimatickým podmínkám areálu jeho původního rozšíření (Spitzová, 1997). Jeho optimální půdní prostředí je bohaté na půdní humus, ve staré půdní síle, s neutrální půdní reakcí a dostatkem vláhy. Nevhodné jsou mělké, písčité, šterkovité a kyselé půdy, stejně jako výsušné jižní svahy, na kterých nemá rostlina dostatek vody zvláště v kritickém období přechodu do generativní fáze spojeného s prudkým nárůstem biomasy v podobě květonosných lodyh (Moudrý

2012). Mimo jiné je ostropestřec při nedostatečném vláhovém režimu náchylnější k napadení půdními houbami z rodu srpovnička (*Fusarium*). Nepřemokřené a neutužené těžké půdy lze k jeho pěstování také využít, ovšem na úkor nižšího výnosu oproti půdám kvalitnějším (Dvořáková, 2006), tedy hlubším hlinitým půdám s velmi dobrou zásobou živin (Ryant, 2005).

2.3.3.2 Setí

Světlá až tmavá semena ostropestřce jsou svým tvarem a velikostí blízká osivu obilnin. Hmotnost tisíce semen činí 25 – 30 g. S rostoucí délkou skladování klesá jejich klíčivost, proto se nedoporučuje požívat osivo skladované déle než 2 roky (Kubínek, 1987).

Vhodnými předplodinami jsou zlepšující plodiny jako leguminózy či organicky hnojené plodiny (Moudrý, 2012), ovšem lze jej zařadit i po obilnině.

Příprava půdy před setím spočívá v hluboké podzimní orbě, podmítce po sklizni předplodiny, na silně proschlé půdy lze doporučit i válení (Dvořáková, 2006).

Výsev je realizován přesnými secími stroji do širokých řádků. Norma výsevu se pohybuje mezi 5 až 8 kg.ha⁻¹. Výsev se provádí podle počasí a regionu v březnu až dubnu (Spitzová, 1997), při teplotě půdy minimálně 5° C. Včasný výsev zajišťuje dostatek vláhy při vzcházení a ochranu před tracheomykózou (Kubínek, 1987). Naproti tomu výsev na konci dubna vede k nižší tvorbě nadzemní biomasy, což usnadňuje mechanizovaný sběr. Zrání úborů se v tomto případě přesouvá do suššího a teplejšího období, a tím se zvyšuje obsah silymarinu v semenech (Gromová et al., 1993). Hnojení půdy ve spojení s pozdějším výsevem má také pozitivní efekt na výnos semen, obsah silymarinu a podíl nenasycených masných kyselin (Andrzejewska, Skinder, 2007)

Hloubka výsevu by měla být 2 – 3 cm. Hlubší výsev do 5 cm za současného zvýšení normy výsevu až na 12 kg.ha⁻¹ je opodstatněný v suchých podmínkách a měl by být doprovázen válením půdy (Moudrý 2012).

Vhodný spon pěstování je mezi 30 x 30 cm až 40 x 40 cm, počet jedinců na 1 m² by se měl pohybovat mezi 6 -12 (Kubínek, 1987). Pro malopěstitele se doporučuje spon širší (Gromová, et al., 1993).

Schulte (1999) uvádí, že množství postranních (laterálních) stonků ostropestřce závisí na hustotě výsevu a klimatických podmínkách. Studie dokládá, že ostropestřec vysetý v nízké hustotě 10 rostlin na metr čtvereční vytváří 10 - 16 laterálních stonků. Dvojnásobný výsev sníží počet postranních stonků o více než polovinu. Ve Španělsku bylo dosaženo nejvyšších výnosů při hustotě výsevu 40 - 50 rostlin na metr čtvereční, v Německu při 20 - 30 rostlinách na metr čtvereční.

Byly prováděny experimenty s velmi nízkou hustotou, 5 - 7 rostlin na metr čtvereční, kde jedna rostlina pokrývá plochu 1500 - 2000 cm² a výnosy se pohybují od 0,7 do 1,4 t.ha⁻¹ (Foldesi, Barsi, 1983; Carruba, la Torre, 2003; Omidbaigi et al., 2003; Geneva et al., 2008).

Při hustotě 30 rostlin na metr čtvereční je plocha rostliny 190 - 370 cm², tj. pětikrát až osmkrát menší, přičemž výnosy byly srovnatelné či vyšší (Rumińska, 1991).

obr. č. 3 - Vyzrálá semena ostropestřce mariánského



Foto: Jana Dvořáková

2.3.3.3 Hnojení a výživa

Aplikace minerálních hnojiv a růstových regulátorů obvykle vede k rozvoji vegetativních částí rostliny díky nastartování primárního metabolismu (Chernyadev, 1994). Pozitivně ovlivňují růst, počet postranních lodyh a počet úborů na jednu rostlinu. Tyto změny jsou spojené s pozměněnou dobou kvetení, kvalitnějším dozráváním semen a zvýšeným výnosem. Vliv na produkci flavonoidů a látek silymarinového komplexu byl sledován také kladný (Geneva et al., 2008). Přesto může vést v některých případech aplikace hnojiva na list k mobilizaci živin do kořenů (Wojcik, 2004).

Přestože mají hnojení a půdní podmínky významný vliv na růst a výnos porostů ostropestřce, bylo prokázáno, že množství srážek během kritického období působí na výnos ostropestřce mnohem více (Kubínek, 1987).

Pozorování v severním Egyptě prokázala pozitivní vliv hnojení dusíkem a fosforem na výnos nažek, obsah oleje a silymarinu v rostlině (Omer et al., 1998). Nejvhodnějším způsobem hnojení se ukázala dělená aplikace síranu amonného ve dvou termínech (Omer et al., 1996). Vysoké dávky dusíkatých a draselných hnojiv vedou k vyššímu výnosu nažek, nicméně obsah oleje a silymarinu v nažkách není vysokými dávkami ovlivněn (Omer et al., 1993; Omer et al., 1995).

V našich podmínkách se doporučuje dělené hnojení dávkou 60 – 90 kg N na hektar, polovina až dvě třetiny se aplikují při jarní předset'ové přípravě půdy, zbytek ve fázi 6 - 8 pravých listů, v suchých a teplých oblastech vše před výsevem. Společně s podzimní hlubokou orbou je vhodně zapravit i organická hnojiva (Kubínek, 1987). Paušálně lze aplikovat předset'ově 300-400 kg NPK na hektar (Ryant, 2005).

Rámcová metodika Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. (Rámcová metodika, 2003) pro pěstování ostropestřce mariánského doporučuje aplikaci 45 - 60 kg N, 17,5 kg P a 33,2 kg K na hektar, což v praxi znamená aplikaci 200 kg NPK (19-19-19) na hektar. V případě vysoké nebo velmi vysoké zásoby draslíku v půdě pak navrhuje aplikovat 100 kg Amofosu na ha na podzim. Na jaře je potom vhodné hnojit 100 až 150 kg dusičnanu amonného před setím nebo ihned po zasetí. Jako nejvhodnější regiony pro pěstování ostropestřce mariánského jsou zde popisovány zemědělská výrobní oblast řepařská nebo obilnářská s hlubší hlinitou půdou a s velmi dobrou zásobou živin.

2.3.3.4 Ochrana proti plevelům

Ostropestřec je konkurenčně velmi silnou rostlinou, nejnebezpečnějšími druhy plevelů jsou pro něj merlíky, lebedy, oves hluchý, hořčice, ohnice, výdrol řepky a obilí, vytrvalé plevele jako pýr a pcháč, a další méně časté plevele, které jej přerůstají ve fázi listové růžice. Pro redukci plevelů se doporučuje mechanická kultivace meziřádků. Vhodné je plečkování rotačními plečkami na cukrovku. Po zapojení porostu je negativní vliv plevelů omezen na minimum (Kubínek, 1987).

Herbicidní přípravky využívané k ochraně ostropestřce zahrnují Gesagard 80, 1,2 - 2 kg.ha⁻¹ a Amfalon 80, 1,5 - 2 kg.ha⁻¹, oba účinkují proti dvouděložným plevelům a aplikují se preemergentně, tedy do 3 dnů po zasetí. Proti jednoděložným plevelům se užívají vhodné graminicidy (Rámcová metodika, 2003).

2.3.3.5 Ochrana proti chorobám

Za nejzávažnější chorobu ostropestřce je považována tracheomykóza – cévní vadnutí (Kubínek, 1987). Původcem této choroby jsou houby rodu srpovnička (*Fusarium*), které za vhodných podmínek, tj. v kyselém, suchém prostředí, za teplot s optimem mezi 26 - 28° C a při celkovém oslabení rostlin, napadají ostropestřec a způsobují více či méně závažná poškození, která mohou vyústit až v úhyn rostliny. Nejefektivnější ochranou je včasný výsev biologicky hodnotného osiva, které je vhodné mořit (Kubínek, 1987). Chemická ochrana proti tracheomykóze se jeví pro praxi příliš nákladná. K moření se doporučuje například přípravek Fundazol (Moudrý, 2012).

Závažné problémy obzvláště v podhorských oblastech způsobuje plíseň šedá (*Botrytis cinerea*) (Spitzová, 1997). Tento saproparazit způsobuje na rostlinách ve fázi kvetení a zrání hnědnutí, černání, zasychání až upadávání celých úborů. Vhodnou ochranou je taktéž včasný výsev mořeného osiva (Kubínek, 1987).

Mezi choroby ostropestřce s marginálním významem se řadí padlí čekankové a skvrnitosti způsobené druhy rodů čerň (*Alternaria*) a braničnatka (*Septoria*) (Kubínek, 1987).

Nejvýznamnějšími živočišnými škůdci jsou mšice, housenky polyfágních škůdců a babočky bodlákové (Spitzová, 1997). Semena mohou po setí vyzobávat

bažanti, dozrávající plody jsou lákavé pro ptáky, především pro zvonky a vrabce (Kubínek, 1987).

2.3.3.6 Sklizeň

Sklizeň ostropestřce je pravděpodobně nejproblematičtějším agrotechnickým zásahem, neboť rozhodující měrou limituje kvalitu a výnos drogy. Úbory ostropestřce dozrávají postupně, odshora dolů, přičemž semena v úborech dozrávají od středu k obvodu (Spitzová, Placr, 1994).

Ve fázi zralosti vyvstává další komplikace v podobě značného množství vegetační vody v rostlině. Sklizeň pouze zralých semen s optimální koncentrací žádoucích látek je tudíž technicky nemožná. Porost by se měl sklízet při 30% zastoupení přezrálých rozevřených úborů, zbylé úbory by měly v té době zasychat. Sklízet by se mělo pomocí techniky pro sklizeň obilovin, tj. vhodně upravenou sklízecí mlátičkou (Kubínek, 1987). Vlhkost nažek by se při ruční sklizni měla pohybovat mezi 13 až 18 % (Gromová et al., 1993).

Nejvhodnější dobou pro sklizeň se jeví vlhké počasí, kdy se úbory uzavírají (Moudrý 2012). Desikace není doporučována vzhledem k riziku obsahu reziduí v droze (Spitzová, Placr, 1994; Kubínek, 1987). Po výmlatu se semena vyčistí, zbaví se chmýru a dosouší se (Opletal, Volák, 1999).

Andrzejewska et al. (2010) dosáhli ve svém pokusu průměrného výnosu plodů $1,23 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$, tj. $26,5 \text{ kg}$ silymarinu na hektar. Při rozdílných vlhkostních a teplotních podmínkách dosahovaly výnosy plodů od $0,55$ do $1,68 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ a výnosy silymarinu od $13,3$ do $35,4 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Pozdější výsev v půlce dubna neměl na výši výnosu vliv, ovšem zvýšil se obsah silymarinu o $0,4 \%$ a výnos silymarinu o $5,3 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Zvýšení výsevu z 12 na $24 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ vedlo k mírnému zvýšení výnosu ($40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$), obsah silymarinu nebyl při vyšším výsevu ovlivněn. Průměrný podíl silymarinové složky v semenech byl $2,18 \%$. Poměr silydianinu k silychristinu byl $1 : 2,2$ a poměr k silydianinu k sumě silybinu a isosilybinu dosáhl hodnot $1 : 3,3$.

Na bohatých, hlubokých a živinami dobře zásobených půdách mohou výnosy semen dosáhnout až $2 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$. Avšak na bohatých půdách obzvláště po silných letních deštích dochází k masivnímu růstu vegetativních částí rostliny, které ztěžují sklizeň (Schulte, 1999; Haban et al. 2009).

2.4 Účinné látky

2.4.1 Lignany

Lignany tvoří skupiny, dnes již více než 500 známých, přírodních sloučenin (Beran, 2007), které vznikají jako produkty sekundárního metabolismu cévnatých rostlin. Skládají se ze dvou fenylypropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální (β) uhlíky obou postranních řetězců (Slanina, 2000).

Lignany byly nalezeny ve všech částech rostlin, obzvláště markantní je jejich přítomnost ve dřevě a kůře stromů, kde některé z nich slouží k syntéze ligninu. U některých druhů nahosemenných a dvouděložných rostlin byl nejvyšší obsah zaznamenán v pryskyřicích či semenech (Slanina, 2000).

Přítomnost lignanů byla prokázána i v krvi a moči savců, kde vznikají přeměnou rostlinných lignanů přijímaných v potravě.

Tyto sloučeniny mají výrazný antimikrobiální, antibiotický, antivirový, antioxidační a antinutriční potenciál. Nepochopitelný charakter pak umožňuje lignanům prostoupit buněčnou stěnou, a ovlivnit tak celou řadu biologických dějů. Jejich využití ve farmaceutickém průmyslu sahá od prevence kardiovaskulárních onemocnění až po vývoj léčiv působících proti viru HIV (Slanina, 2000).

Existuje široká škála látek příbuzných s lignany, které se nazývají neolignany. Sestávají také ze dvou fenylypropanových jednotek, které jsou ale spojeny jinou vazbou než přes centrální (β) uhlíky alifatických řetězců (Slanina, 2000). I tyto látky nabízejí významné možnosti farmaceutického uplatnění. Konoshima et al. (1991) prokázali například inhibiční účinky neolignanů izolovaných z rostliny šácholanu (*Magnolia officinalis*) na virus Epstein-Barrové a poukázali na možnost jejich využití při protinádorové léčbě.

Další skupiny sloučenin, které mají jednu část molekuly tvořenou fenylypropanovou jednotkou a druhou část jinou přírodní látkou, zahrnují například kumarinlignany, flavanolignany a lignin-iridoidy (Slanina, 2000).

2.4.2 Flavanolignany

Flavonoidy jsou látky polyfenolické povahy s přirozeným výskytem ve všech částech rostlin. V roce 1952 bylo objeveno, že aktivními látkami semene ostropestřce jsou právě flavonoidy, přičemž struktura silybinu a silydianinu byla popsána v roce 1960. Směs všech flavonoidů je nazývána silymarin, který mimo shora uvedené obsahuje i silychristin a iso-silybin. Tyto látky jsou tvořeny flavanonem taxifolinem, k němuž je oxidativní adicí připojena molekula koniferylalkoholu, jenž je běžnou součástí ligninu. Proto byl tento typ flavonoidů souhrnně pojmenován flavanolignany (Jegorov, 1996). Látky silymarinového komplexu jsou pak v procentuálně nejvyšším zastoupení, asi 70-80% (Křen, Walterová, 2005), obsaženy v oplodí a osemení plodů (Indrák, Chytilová, 1992).

Podíl flavanolignanů, tj. silymarinu, v sušině se pohybuje nejčastěji od 1 do 3 %, ale může dosáhnout až 4 % (Kozłowski, Hołyńska, 1985; Chiavari et al., 1991).

Semena ostropestřce mimoto obsahují bílkoviny (25 - 30 %), flavonoidy (taxifolin, kvercetin, kemferol), aminy (tyramin, histamin), steroly (kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol), tokoferol (0,6 %) a olej (20 - 30 %) tvořený především kyselinou linolovou, olejovou a palmitovou (Opletal, Volák, 1999).

Indrák, Chytilová (1992) ještě doplňují obsah sacharidů, malého množství silice a konkretizují složení olejového podílu na 60 % kyseliny linolové, 15 - 26 % kyseliny olejové, 2 % kyseliny linoleové a 8 - 12 % nasycených mastných kyselin.

Z terapeutického hlediska nejúčinnější složku silymarinového komplexu představuje silybin, tvořený silybinem A a silybinem B, přibližně v poměru 1 : 1 (Starý, 2000). Nejméně aktivní složku patrně tvoří iso-silybin (Jegorov, 1996). Sersen et al. (2006) zjistili, že proti fenyglykolovým ketylovým radikálům a radikálům DPPH je ze složek silymarinu nejúčinnější silychristin.

Přesnější metody analýzy a separace ukázaly, že silymarin sestává z velkého množství flavanolignanů zahrnujících mimo silybin (SBA, SBB), isosilybin (ISBA, ISBB), silydianin (SD) a silychristin (SC) i další flavanolignany jako dehydrosilybin, desoxysilychristin, desoxysilydianin, silandrin, silybinome, silyhermin a neosilyhermin. Díky svým antioxidačním a stabilizačním vlastnostem chrání tyto složky rozličné orgány a buňky proti poraněním (Kvasnička et al., 2003).

Nyiredy et al. (2008) přišli s celou škálou nových derivátů získaných z variety ostropestřce s bílými květy, kterou nazvali Silymiran. Za proklamovaného použití chromatografických metod popsali látky získané z bílokvěté variety jako cissilybin, isocissilybin, isosilandrin A a B, cissilandrin, ad. Jejich výsledky však popřeli Křen et al. (2010).

Flavanolignany pak byly izolovány i z mnohých dalších rostlin, jako např. z tisu západoamerického (*Taxus brevifolia*) (Arslanian et al., 1995), ostropse (*Onopordum corymbosum*) (Cardona et al., 1990) či ovsa setého (*Avena sativa*) (Wenzig et al., 2005).

2.4.3 Silyb

Hlavním záměrem pěstování ostropestřce je produkce kvalitní drogy s vysokým obsahem látek silymarinového komplexu. Tento cíl je však komplikován nejen vlivem vnějších podmínek a obtížnější agrotechnickou praxí zejména v období sklizně, ale u nešlechtěných rostlin i nízkou koncentrací účinných látek, např. silybinu 0,2-0,6 %. Z toho důvodu byla vyšlechtěna silybinová chemovarieta s obsahem silybinu asi 2,5 % a silychristinu 1,5 % za absence silydianinu, jež byla zapsána do Listiny povolených odrůd v roce 1988 pod názvem Silyb (Indrák, Chytilová, 1992). Při využití nejnovějších farmakologických poznatků může cílené šlechtění pomoci dosáhnout standardní produkce kvalitativně co možná nejhodnotnějších surovin pro farmaceutický průmysl.

2.5 Farmakologické účinky

Ostropestřec mariánský je využíván v evropské medicíně po staletí jako nejúčinnější lék na choroby jater. Systematické studie aktivních složek začaly v 60. letech 20. století. Wagner et al. (1967) poprvé izolovali silymarin ze semen ostropestřce, přičemž později odhalili, že se nejedná o jednu látku, ale celý komplex flavanolignanů. Byly učiněny pokusy získat silymarin biotechnologickými metodami, výsledky zatím nedokazují, že by v blízké budoucnosti mohlo dojít k nahrazení polní plodiny ostropestřce jako základního zdroje farmaceutického materiálu (Cacho et al., 1999; Alikaridis et al., 2000; Sanchez-Sampedro et al., 2008).

Produkce silymarinu a na jeho bázi založených léků celosvětově stále roste, mezi největší producenty se řadí Čína, Španělsko, Česká republika, Indie a Brazílie.

Oceňován je především příznivý účinek na obnovu a stabilizaci buněčných stěn jater a pozitivní vliv na metabolismus hepatocytů. Indikace nejrozšířenějších léků zahrnují především toxickometabolické alterace jater (steatózu, poléková poškození, otravy) a akutní hepatitidy (Kummer et al., 2000).

Látky silymarinového komplexu účinkují pozitivně při bakteriálních, virových, mykotických onemocněních a akutních otravách jaterními jedy tím, že pohlčují volné radikály, inhibují činnost oxidáz a peroxidáz, váží se na buněčné membrány a pronikají i do buněčných jader, kde stimulují syntézu bílkovin, čímž dochází k opravě poškozených buněk a tvorbě nových jaterních enzymů. Tyto účinky jsou příčinou výjimečného vlivu flavanolignanů na jaterní parenchym a jeho regeneraci (Jegorov, 1996).

Studie prokázaly příznivé účinky silymarinu v prevenci a léčbě rakoviny prsou, prostaty a kůže (Pepping, 1999), jakož i rakoviny tlustého střeva (Hogan et al., 2007) či plic (Agarwal et al., 2006).

Lidové léčitelství využívá semena, kořen i listy ostropestřce ve formě odvarů či tinktur. Odvar z kořene pomáhá při bílém výtoku a při slabé menstruaci, odvar z listů pak při žloutence, zánětu pohrudnice a plic a žlučnickových kamenech (Janča, Zentrich, 1999). Semena se mohou využívat celá, mletá či drcená. Jedna čajová lžička drogy se nechá přibližně dvacet minut louhovat a poté se dvě minuty vaří (Jaroš, 1992).

2.6 Metody stanovení obsahu účinných látek v rostlině

2.6.1 Chromatografie

Chromatografické metody, jako jsou například vysokoúčinná kolonová kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GLC) či chromatografie na tenké vrstvě (TLC), slouží k dělení a identifikaci mnoha organických a anorganických látek obsažených v přírodních i technických směsích v širokém koncentračním pásmu. Jedná se tedy o jedny z nejdůležitějších analytických a separačních metod (Drbal, Křížek, 1999), jejichž výstupem jsou kvalitativní a kvantitativní údaje o vzorku (Coufal, 2004a). Mimo počet a kvalitu látek ve vzorku, umožňuje řada metod prokázat i množství přítomných látek či tyto látky izolovat (Chmel et al., 1987).

Jednotlivé složky se rozdělují mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fázi. Stacionární fáze, označovaná jako sorbent, vytváří tzv. chromatografické lože, kterým protéká mobilní fáze, označovaná také jako eluent. Jako mobilní fáze slouží kapalina či plyn, jako stacionární fáze pak tuhé části o velikosti v řádech mikrometrů, kapalina na povrchu inertního nosiče či film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry (Drbal, Křížek, 1999).

Při nástřiku vzorku do chromatografické kolony se nejprve vytvoří směs jednotlivých složek, které se pak pohybují mobilní fází směrem k sorbentu, tzv. vyvíjení, s rozdílnou rychlostí, čímž dochází k jejich separaci. Interakce vedoucí k jejich oddělení mohou být např. adsorpční, rozdělovací či iontově výměnné. Tento proces je většinou podmíněn více mechanismy, v praxi se používá členění na plynovou a kapalinovou chromatografii (Drbal, Křížek, 1999).

Jednotlivé látky v podobě eluátu, tj. roztoku v mobilní fázi, se pohybují kolonou, až dosáhnou jejího konce a jsou zaznamenány detektorem, načež opustí kolonu. Jsou unášeny odlišnou rychlostí v závislosti na distribuční konstantě mezi oběma fázemi, na míře zadržení ve stacionární a mobilní fázi (Chmel et al., 1987). Jejich cestu popisuje tzv. eluční pík (Drbal, Křížek, 1999), jehož vrchol určuje konkrétní látku (kvalitativní analýza) a plocha určuje její koncentraci ve směsi (kvantitativní analýza). Údaje jsou vyhodnocovány porovnáním s tzv. standardní směsí (Chromatografie, 2009).

Výsledkem průtoku mobilní fáze soustavou je chromatogram, který má svůj start na začátku chromatografického děje. Místo, kde se v daném okamžiku nacházejí složky s nulovou aktivitou vůči stacionární fázi, které bylo původně na startu, se nazývá čelo mobilní fáze. Místa výskytu ostatních jednotlivých složek se nazývají pásy, zóny a někdy též skvrny (Hubáček, 1988).

2.6.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC (high performance liquid chromatography)

HPLC je jednou z nejdokonalejších forem sloupcové (kolonové) kapalinové chromatografie využívaných k dělení směsí velmi příbuzných látek. Její vznik souvisel s rozvojem přístrojové techniky, především v oblasti detekce chromatografovaných látek. Velké pozitivum této metody spočívá ve vysoké účinnosti a rozlišovací schopnosti, které jsou však vykoupeny vysokou cenou HPLC chromatografů (Sklenák, 2003).

HPLC probíhá v uzavřeném systému, klíčovou roli má mobilní fáze, která je kapalná a může být do kolony vedena přes odplyňovač a vysokotlaké čerpadlo (při isokratické eluci), nebo přes směšovač a čerpadlo (při gradientové eluci). Čerpadla se používají pulzující membránová či pístová (Drbal, Křížek, 1999).

Tlaky v koloně se běžně pohybují od 1 do 60 MPa, průtoky od 0,1 do 10 ml.min⁻¹, délky rovné kolony od 10 - 100 cm, nejčastěji 10 - 20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm, velikost zrn sorbentu tvořených vysoce homogenními částicemi (Sklenák, 2003) se pohybuje mezi 3 - 50 μm. Vzorokly se dávkují mikrostříkačkou pomocí tzv. stop flow ventilu. (Drbal, Křížek, 1999). Jako kolony se využívají skleněné, kovové (Sklenák, 2003) či křemenné trubice (Štern, 2003).

V separační koloně složené ze sorbentu a eluentu dochází k oddělení jednotlivých složek. Jejich rychlost průtoku může být tak rozdílná, že vytvářejí oddělené zóny, které odpouštějí postupně kolonu ve formě eluátu. Jejich vývoj popisují na vnějším chromatogramu eluční křivky, tzv. eluční píky (Kopřiva, 2002), jejichž plocha je úměrná množství složky (Garaj et al., 1987).

Na výstupu z kolony protéká eluát detektorem, který je nejčastěji v podobě průtokového fotometrického detektoru, fluorimetrického detektoru či tepelně vodivostního detektoru (Drbal, Křížek, 1999). Garaj et al. (1987) rozlišují detektory

HPLC na koncentrační, kam spadají diferenciální refraktometry a fotometrické UV detektory, a selektivní, mezi něž patří elektrochemické detektory, infračervený detektor a fluorescenční detektor. Velmi účinným řešením detekce je i hmotnostní spektrometr, který je však technicky a finančně velmi náročný (Štern, 2003).

Detektor bývá spojen se zapisovacím a vyhodnocovacím zařízením. V současné době mohou automatizované systémy HPLC za pomoci digitalizovaných zařízení pro registraci a vyhodnocení průběhu analýzy uskutečnit až několik set analýz za den (Drbal, Křížek, 1999).

2.6.1.2 Chromatografie na tenké vrstvě TLC (Thin Layer Chromatography)

Chromatografie na tenké vrstvě je rychlou a jednoduchou metodou kapalinové chromatografie, jejíž podstatou je menší množství stacionární fáze, které umožňuje rychlejší analýzu (Coufal, 2004b). K tomuto účelu se využívají stacionární fáze se zrnitostí 5 - 40 μm , jako např. silikagel, celulóza, iontoměničiči polyamid, nanášené na inertní podložky ze skla či hliníku. Mobilní fáze v podobě toluenu, cyklohexanu, acetonu, etanolu, metanolu, vody, amoniaku kyseliny octové či jejich směsí (Coufal, 2004b) vzlíná vrstvou sorbentu a rozdílnou rychlostí unáší jednotlivé dělené složky chromatografickou komorou (Drbal, Křížek, 1999).

Detekce se provádí vysušením chromatogramu a následným nanesením vhodného činidla, prohlížením v ultrafialovém světle či jinou technikou (Drbal, Křížek, 1999). Tyto metody detekce zobrazí na chromatogramu rozdílné skvrny, jejichž porovnáním se standardními vzorky za stejných podmínek se kvalitativně vyhodnocuje chromatogram (Coufal, 2004b). Stanovení analytů lze provést přímo na chromatogramu pomocí fotodozimetry (densitometru) (Coufal, 2004b).

Metoda HPLC v porovnání s TLC vykazuje průkazné rozdíly ve výsledcích analýzy, které mohou být až dvaceti procentní. Je to zapříčiněno především skutečností, že při TLC nedochází na vrstvě silikagelu k separaci silybinu od isosilybinu, zatímco u HPLC k ní dochází. Podstatnými faktory ovlivňujícími výsledek analýzy jsou také stupeň umletí vzorku, doba ponechání mleté drogy před další extrakcí, způsob utěsnění baňky, způsob extrakce a kvalita použitého extrakčního činidla a standardních látek. Vzhledem k průměrné koncentraci silybinu v droze, která činí 2 %, může mít nepřesné měření vlivem nevhodně zvolené metody

či nedodržení podmínek přípravy vzorku k analýze i významné ekonomické následky (Indrák, Chytilová, 1992).

2.6.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je velmi rychlou elektromigrační metodou s vysokou rozlišovací schopností (Coufal, 2004c). Aplikuje se nejčastěji ve vodných roztocích a využívá rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli (Drbal, Křížek, 1999).

Kapilára je ne naplněna základním elektrolytem a její konce jsou ponořeny do zásobníků elektrolytu společně s elektrodami z inertního materiálu. Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 - 30 kV) a fotometrický detektor zachycuje pohyb nabitých částic, který je vyhodnocován v podobě elektroforegramu podobného chromatogramu. Poloha píku vyjadřuje kvalitu, plocha a výška kvantitu (Klouda, 2003)

2.6.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis) čili kapilární elektroforéza ve volném roztoku (Free Solution Capillary Electrophoresis) využívá elektroosmotického toku iontů v kapiláře směrem k detektoru (Drbal, Křížek, 1999). Oba konce kapiláry jsou ponořeny v tlumivém roztoku, kapilára z taveného křemene je potažena ochranným polyamidovým povlakem, který v délce několika milimetrů chybí na katodovém konci, aby byla umožněna fotometrická detekce. Kapilára je dlouhá od 25 do 100 cm (Klouda, 2003) a má běžně průměr 25 - 75 μm (Drbal, Křížek, 1999).

Na anodovém konci je do kapiláry nasáván vzorek v množství přibližně tisíckrát menším než u chromatografických metod (1 - 10 nl). Okolní prostor by měl být striktně termostatický. Svorkové napětí dosahuje hodnot 10-30 kV, což zapříčiňuje velmi vysokou rychlost přenášených iontů (Drbal, Křížek, 1999).

Separace iontů uvnitř kapiláry je dána jejich rozdílnou elektroforetickou rychlostí (Coufal, 2004c), kvalita separace je pak určována délkou kapiláry, pohyblivostí dělených iontů a rychlostí elektroosmotického toku, která je závislá na teplotě a pH roztoku (Drbal, Křížek, 1999).

Přesnost a účinnost metody kapilární zónové elektroforézy byly porovnávány s metodou HPLC (Quaglia et al., 1999; Kvasnička, et al. 2003; Velikinac et al., 2004). Bylo prokázáno, že obě metody poskytují obdobné výsledky, přičemž HPLC stanovuje mírně vyšší obsah flavanolignanů oproti CZE, neboť udává vyšší úroveň silydianinu a silychristinu. Obsah silybinu je u obou metod podobný. Analýza kapilární zónovou elektroforézou je dvakrát rychlejší než metodou HPLC. Metoda CZE umožňuje na rozdíl od HPLC separaci diastereomerů isosilybinu, je tedy citlivější.

3. METODIKA - VLASTNÍ POKUS

Cílem práce bylo studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.).

Za tímto účelem byl proveden maloparcelkový pokus v roce 2010 na zahradě v Hluboké nad Vltavou. V příhodných fázích růstu za vhodného počasí byly aplikovány roztoky elicitorů (ELITiC a Elitic Jack) o doporučené koncentraci na zvolené parcelky. Část z nich byla ponechána jako kontrolní (K) a postřik prováděn pouze vodou.

Použitý elicitor ELITiC je předmětem společného výzkumu AGRA GROUP a.s. Střelské Hoštice a Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. ELITiC je pomocný rostlinný přípravek, který obsahuje v optimálním poměru biokompatibilní vodorozpustný komplex titanu a hydrolyzát bílkovin, jejichž působením dochází v rostlinách ke specifickému ovlivnění zvýšené tvorby sekundárních metabolitů. Hydrolyzát aminokyselin navíc podporuje tvorbu auxinů a cytokininů, které mají vliv na vitalitu a růst rostlin. Přípravek dále obsahuje emulgovaný řepkový olej, který zlepšuje pronikání účinných látek přes kutikulu, a to i v období přísušků, kdy je ochranná vosková vrstva listu špatně prostupná. Přípravek obsahuje též draslík v citrátové formě, který stabilizuje pH. ELITiC významně iniciuje tvorbu sekundárních metabolitů, stimuluje dělení buněk a tvorbu chloroplastů, podporuje fotosyntézu a tím významně přispívá k vysoké a stabilní kvalitě produkce. U chmelu významně ovlivňuje především množství alfa-hořkých kyselin v požadovaném složení. Částečně zvyšuje i přirozenou odolnost rostlin vůči chorobám (dle údajů uvedených na etiketě preparátu ELITiC).

Druhý použitý elicitor Elitic Jack je součástí know how výzkumného kolektivu a v současné době je předmětem patentového řízení, tudíž není možné podat o něm konkrétnější informace.

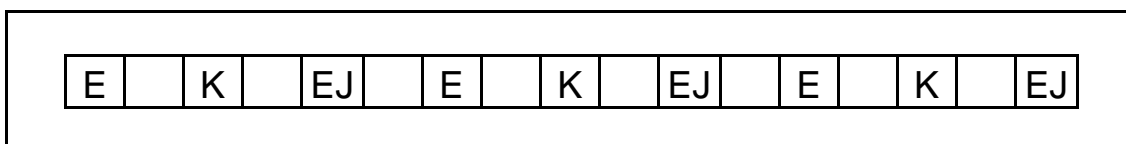
Vypěstovaná semena analyzovala na obsah látek silymarinového komplexu a taxifolin Ing. Iveta Marešová na katedře aplikovaných rostlinných biotechnologií ZF JU metodou HPLC na přístroji Varian, a byly tak získány údaje o obsahu některých účinných látek v závislosti na konkrétním elicitoru.

3.1 Maloparcelkový experiment

Cílem této práce bylo prostřednictvím maloparcelkového pokusu odzkoušet vliv vybraných elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.)

Maloparcelkový experiment byl proveden v roce 2010 na zahradě v Hluboké nad Vltavou, Hosínská 1212, v okrese České Budějovice. V roce 2009 byla provedena navážka půdy do hloubky 30 cm. Půdní typ je hnědá půda, půdní druh střední půda – písčitohlinitá. Na podzim následovala podzimní orba. Pro účely pokusu byl vytvořen záhonek o velikosti 9 x 1 metr s jihozápadní expozicí, který byl rozparcelován na 9 parcelek o velikosti 1 x 1 metr s ochrannými zónami 0,5 m mezi parcelkami a 1 m okolo pokusu a vyseta semena ostropestřce mariánského odrůdy Silyb poskytnutá za účelem pokusu panem Martinem Grbavčicem z firmy Seva Flora Valtice, s.r.o., dle níže uvedeného schématu.

obr. č. 4 - Schéma maloparcelkového pokusu



E - ELITiC	EJ - Elitic Jack	K - kontrola
------------	------------------	--------------

Agrochemické zkoušení půd provedené firmou AGRO-LA, spol. s r.o. mezi 24.4.2010 a 3.5.2010 stanovilo pH(CaCl₂) půdy na 6,15. Dále analýza určila následné průměrné obsahy živin v půdě v přepočtu na 100% sušinu:

tab. č. 2 - Průměrné obsahy živin v půdě (dle protokolů o zkoušce č. 31-P-2010/J a 32-P-2010/J)

Fosfor (P)	73,5 mg.kg ⁻¹
Draslík (K)	60 mg.kg ⁻¹
Hořčík (Mg)	337 mg.kg ⁻¹
Vápník (Ca)	3466,5 mg.kg ⁻¹
Dusík totální (N tot)	0,35%

Stanovení dusičnanového a amonného dusíku v půdě bylo provedeno v laboratoři na Katedře chemie Jihočeské univerzity dle metodiky. Obsah dusičnanového dusíku v půdních vzorcích průměrně dosahoval hodnoty 11,98 mg.kg⁻¹, obsah amonného pak průměrně činil 45,66 mg.kg⁻¹.

Dle Komplexní metodiky výživy a hnojení rostlin (1/1990) je pro střední druh půdy optimální půdní reakce vyjádřená v pHKCl rovna hodnotě 6,5. Vzhledem ke zjištěnému pH byla určena potřeba melioračního vápnění CaO na 1,4 t.ha⁻¹, udržovací dávka vápnění činí 350 kg.ha⁻¹.rok⁻¹, celková dávka CaO tedy vychází 1,75 t.ha⁻¹, tj. 175 g.m⁻². Zásob P byla vyhodnocena jako zásoba střední, potřebná dávka P je pro tento případ stanovena normativy na 88 kg.ha⁻¹. Pro vybraný způsob hnojení P₂O₅ činí tedy potřeba hnojení 46,3 g 19% SPF.m⁻². Zásoba K byla vyhodnocena jako velmi malá. Množství K, které bylo potřebné do půdy dodat, činilo 200 kg.ha⁻¹, ve zvolené podobě K₂O se jednalo o 33,3 g 60% DS.m⁻². Zásoba Mg byla stanovena jako velmi vysoká, nebylo tedy třeba aplikovat hořečnatá hnojiva (Komplexní metodika hnojení, 1990). Potřebu N jsme stanovili na 60 kg.ha⁻¹, tj. 28,6 g (NH₄)₂SO₄.m⁻².

Potřebné hnojení a vápnění bylo provedeno zapravením hnojiv do půdy před založením pokusu po obdržení výsledků analýz půdy a stanovení potřeby hnojení. Aplikace byla realizována s týdenními odstupy, a to nejprve hnojení superfosfátem, poté draselnou solí a nakonec síranem amonným ve výše stanoveném množství.

Výsev semen ostropestřce mariánského byl proveden 27.4.2010 do již urovnané a připravené půdy – minulý rok vápnění a hluboká orba. Na každou parcelku bylo vyseto po pěti semenech do sponu 50 x 50 cm, s hloubkou setí 3 cm. Přebytečné rostliny byly po vyklíčení odstraněny, aby bylo dosaženo požadované hustoty čtyři rostliny na 1 m². Tím byl dosažen celkový počet 36 sledovaných rostlin, 12 s aplikací preparátu ELITiC, 12 s aplikací preparátu Elitic Jack a 12 kontrolních bez aplikace elicitorů, pouze s aplikací vody.

Aplikace elicitorů ELITiC a Elitic Jack byla na příslušných parcelkách provedena na list po dobu vegetace celkem třikrát, buď v dopoledních či podvečerních hodinách za suchého a teplého počasí. První postřik byl uskutečněn 9.7.2010, druhý 31.7.2010 a třetí 20.8.2010.

Ředění obou preparátů pro tento pokus bylo stanoveno na 0,400 ml preparátu na 1 l vody. To odpovídá hektarové dávce 100 ml při objemu postřikové kapaliny

250 l. Vždy na jednu skupinu, tj. tři parcelky, bylo použito 5 l vody s 2,000 ml elicitoru.

Skřízeň byla uskutečněna po dozrání všech úborů 21.9.2010. Při sklizni bylo pozorováno nerovnoměrné dozrání jednotlivých rostlin, většina rostlin, na něž byly aplikovány roztoky elicitorů, byla v té době již značně seschlá, zejména odspodu.

obr. č. 5 - Ostropestřec mariánský - fáze zralosti před rozevřením úboru



Foto: Jindřich Petr

3.2 Příprava extraktu

Extrakce (úprava vzorku) před stanovením analytu je považována za nejdůležitější úkon, který vede k finálnímu zjištění obsahu látky v matrici (Rouhová et al., 2004). Dochází při ní k separaci založené na kontaktu dvou makroskopicky zřetelně oddělených nemísitelných fází a často i k následnému zakoncentrování analytu do malého objemu extrakčního činidla (Šíma, 2004).

Semena pro přípravu extraktů byla vybrána ze sklizených semen maloparcelkového experimentu v co možná nejvyšším stupni dozrání. Semena byla rozdělena na tři skupiny podle použitého elicitoru, resp. vody. Každá skupina zahrnovala dvanáct vzorků semen jednotlivých rostlin.

Vrchotová et al. (2002) shrnují, že volba postupu extrakce je problematická a měla by se volit i dle povahy analyzovaných látek. Různé způsoby extrakce spočívají například v odlišném použití extrakčního činidla, době extrakce atd.

Zajímavé je zjištění, že vyšší čistota extraktu ostropestřce vykazuje nižší antioxidační sílu, vyjádřenou jako tzv. TAS - total antioxidant status. To poukazuje na možnost, že extrakt obsahuje určité nečistoty, které mají větší antioxidační potenciál než identifikované flavanolignany (Kvasnička et al., 2003).

Za účelem extrakce byl do odměrné baňky o objemu 25 ml navážen 1 g jemně pomleté drogy ostropestřce mariánského. K navážce byl přidán 1 ml vody (redestilované) a směs se ponechala 1 hodinu stát. Pak bylo přidáno 23 ml směsi acetonu (p.a.) a metanolu (p.a.) (26:20, v/v). Takto připravená směs byla míchána 1 hodinu pomocí ultrazvuku, poté následovala 12 hodinová macerace. Aceton - metanolová frakce byla filtrována přes nylonový filtr a extrakt byl 6 x zředěn (100 µl vzorku + 500 µl metanolu).

3.3 Analýza vzorku

Extrakty byly analyzovány pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) ve spolupráci s Ing. Ivetou Marešovou na Katedře aplikovaných rostlinných biotechnologií Jihočeské univerzity. Separace probíhala na koloně Nucleosil C 18 o rozměrech 4,6 x 250 mm (zrnění 5 μm). Kolona byla spojena s předkolonou naplněnou sorbentem stejných vlastností jako v koloně.

Jako mobilní fáze byla užitá směs metanolu, acetonitrilu a vody s přidavkem kyseliny fosforečné. Mobilní fáze A: 22 % CH_3OH (metanol) + 15 % CH_3CN (acetonitril) + 63 % H_2O + 0,5 % H_3PO_4 ; mobilní fáze B: 40 % CH_3OH + 20 % CH_3CN + 40 % H_2O + 0,5 % H_3PO_4 . Gradient byl následující: 0 min. – 100 % A; 30 min. 100 % B; 35 min. – 100 % A. Celkový čas analýzy byl 40 minut. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla 0,9 ml/min. Objem dávkovací smyčky byl 20 μl .

Detekce byla provedena pomocí diodového pole (DAD). Data byla zpracována při vlnové délce 288 nm a vyhodnocena pomocí softwaru Interactive Graphics Version 6.5. Kvantitativní hodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím standardních roztoků.

Pro kalibraci kvantitativního stanovení silymarinu byly připraveny zásobní roztoky taxifolinu (TX), silychristinu (SCH), silydianinu (SD), silybinu A a B (SB A,B) a isosilybinu A a B (ISB A,B) v metanolu. Z těchto zásobních roztoků byl připraven směsný standard, jehož naředěním byly dále připraveny směsné standardní roztoky o koncentracích: 2,219 – 142 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ TX; 1,625 – 104 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SCH; 3,313 – 212 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SD; 3,563 – 228 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SB A a B; 0,836 – 53,50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ISB A a 0,352 – 22,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ISB B. Podmínky analýzy byly totožné jako při stanovení silymarinových extraktů.

4. VÝSLEDKY

Cílem maloparcelkového experimentu bylo studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek v rostlině ostropestřci mariánském. Jejich stanovení bylo provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byly sledovány především tyto činné látky: taxifolin, silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A+B. Po provedení analýzy byly naměřené výsledky vyhodnoceny a statisticky zpracovány. Změřené koncentrace byly za tímto účelem přepočítány na $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 100% sušiny. Výsledné koncentrace jednotlivých účinných látek byly otestovány na normalitu (Shapiro – Wilkův test). Protože byla u mnohých vzorků v případě mnoha účinných látek normalita narušena, byl k analýze dat použit Kruskal-Wallisův test (neparametrická ANOVA). Z tohoto důvodu je v grafech znázorňován medián, kvartily a neodlehle/odlehle hodnoty s extrémny.

4.1 Výsledný obsah účinných látek

Extrakty ze semen odebraných z jednotlivých rostlin jednotlivých skupin (E, EJ, K) byly připraveny dle zvolené metodiky a analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s následným vyhodnocením získaných dat o koncentraci některých biologicky účinných látek.

tab. č. 3 - Obsah účinných látek v mg.g⁻¹ v rostlinách s aplikací preparátu Elitic Jack

kód vzorku	taxifolin (mg.g ⁻¹)	silychristin (mg.g ⁻¹)	silydianin (mg.g ⁻¹)	silybin A (mg.g ⁻¹)	silybin B (mg.g ⁻¹)	isosilybin A+B (mg.g ⁻¹)	účinné látky (mg.g ⁻¹)	sušina (%)
1 EJ	3,096	16,271	2,687	19,666	31,072	5,503	78,295	95,897
	3,229	16,967	2,802	20,507	32,402	5,739	81,645	
2 EJ	1,247	9,747	1,611	12,239	19,589	3,477	47,911	95,843
	1,301	10,169	1,681	12,770	20,439	3,628	49,989	
3 EJ	1,021	7,114	1,110	8,692	14,392	2,515	34,844	95,923
	1,064	7,417	1,158	9,061	15,003	2,622	36,325	
4 EJ	0,696	4,745	0,619	5,688	9,500	1,666	22,914	95,713
	0,727	4,958	0,647	5,943	9,926	1,741	23,941	
5 EJ	1,377	8,513	1,389	9,883	16,664	2,852	40,679	95,887
	1,436	8,878	1,449	10,307	17,379	2,974	42,424	
6 EJ	1,892	10,092	1,759	12,275	19,692	3,473	49,183	95,895
	1,973	10,524	1,834	12,800	20,535	3,622	51,289	
7 EJ	1,103	6,576	1,012	7,520	12,862	2,204	31,277	96,659
	1,141	6,803	1,047	7,780	13,307	2,280	32,358	
8 EJ	1,539	8,325	1,039	9,847	16,462	2,956	40,168	97,208
	1,583	8,564	1,069	10,130	16,935	3,041	41,322	
9 EJ	1,504	6,163	12,673	5,491	8,309	2,968	37,107	95,861
	1,568	6,429	13,220	5,728	8,668	3,096	38,709	
10 EJ	0,768	5,812	0,878	6,601	12,467	2,083	28,609	95,930
	0,801	6,059	0,915	6,881	12,996	2,171	29,823	
11 EJ	3,261	6,926	1,045	7,852	13,863	2,376	35,323	97,291
	3,352	7,119	1,074	8,071	14,249	2,442	36,307	
12 EJ	1,202	5,685	0,807	5,410	12,520	1,934	27,559	95,802
	1,254	5,934	0,843	5,647	13,069	2,018	28,766	

účinné látky – silymarin suma + taxifolin

...obsah ve vzorku (i s H₂O)

...přepočít na 100% sušinu

tab. č. 4 - Obsah účinných látek v mg.g⁻¹ v rostlinách s aplikací preparátu ELITiC

kód vzorku	taxifolin (mg.g ⁻¹)	silychristin (mg.g ⁻¹)	silydianin (mg.g ⁻¹)	silybin A (mg.g ⁻¹)	silybin B (mg.g ⁻¹)	isosilybin A+B (mg.g ⁻¹)	účinné látky (mg.g ⁻¹)	sušina (%)
1 E	1,060	7,087	1,094	8,005	14,758	2,467	34,472	95,511
	1,110	7,420	1,145	8,382	15,452	2,583	36,092	
2 E	1,203	6,707	1,046	8,186	13,550	2,333	33,025	96,530
	1,246	6,948	1,084	8,481	14,037	2,417	34,212	
3 E	1,247	7,443	1,151	8,522	14,853	2,501	35,717	96,596
	1,291	7,706	1,192	8,823	15,376	2,589	36,976	
4 E	1,007	6,379	0,995	7,661	12,952	2,203	31,198	95,858
	1,051	6,655	1,038	7,992	13,512	2,298	32,546	
5 E	0,713	4,585	0,569	5,145	9,015	1,532	21,558	95,208
	0,748	4,816	0,598	5,404	9,469	1,609	22,643	
6 E	1,913	8,931	1,547	10,931	18,302	3,104	44,727	95,337
	2,007	9,367	1,623	11,465	19,197	3,255	46,915	
7 E	2,814	7,885	1,295	9,243	16,515	2,739	40,491	95,652
	2,942	8,243	1,354	9,663	17,266	2,864	42,331	
8 E	2,018	9,748	1,681	9,702	21,242	3,273	47,664	95,079
	2,122	10,253	1,768	10,204	22,341	3,443	50,131	
9 E	1,800	9,330	1,510	9,017	20,310	3,175	45,141	95,269
	1,889	9,793	1,585	9,465	21,318	3,333	47,383	
10 E	2,988	6,392	0,932	8,014	13,216	2,313	33,855	95,262
	3,136	6,709	0,979	8,412	13,873	2,428	35,538	
11 E	2,425	7,241	1,126	6,984	16,186	2,466	36,428	94,601
	2,563	7,654	1,190	7,382	17,110	2,607	38,507	
12 E	1,000	6,597	0,894	6,103	14,903	2,268	31,765	94,576
	1,058	6,976	0,945	6,453	15,757	2,398	33,587	

účinné látky – silymarin suma + taxifolin

...obsah ve vzorku (i s H₂O)

...přepočít na 100% sušinu

tab. č. 5 - Obsah účinných látek v mg.g⁻¹ v rostlinách kontrolní skupiny s aplikací vody

kód vzorku	taxifolin (mg.g ⁻¹)	silychristin (mg.g ⁻¹)	silydianin (mg.g ⁻¹)	silybin A (mg.g ⁻¹)	silybin B (mg.g ⁻¹)	isosilybin A+B (mg.g ⁻¹)	účinné látky (mg.g ⁻¹)	sušina (%)
1 K	1,782	11,229	1,841	10,601	25,193	3,829	54,475	95,620
	1,864	11,743	1,925	11,086	26,347	4,005	56,971	
2 K	2,813	12,330	2,245	13,000	26,848	4,147	61,382	95,469
	2,946	12,915	2,351	13,617	28,122	4,344	64,296	
3 K	1,243	6,703	1,087	7,590	13,683	2,277	32,583	95,953
	1,295	6,986	1,133	7,910	14,260	2,373	33,957	
4 K	1,924	8,149	1,309	7,831	17,582	2,739	39,534	96,289
	1,998	8,463	1,359	8,133	18,260	2,845	41,058	
5 K	1,362	7,295	1,192	7,100	16,056	2,496	35,502	95,855
	1,421	7,611	1,243	7,407	16,751	2,604	37,037	
6 K	1,044	6,892	0,982	6,647	15,926	2,415	33,905	96,038
	1,087	7,176	1,022	6,921	16,583	2,514	35,304	
7 K	1,264	8,490	1,345	8,050	19,211	2,886	41,245	96,138
	1,315	8,831	1,399	8,373	19,983	3,002	42,902	
8 K	0,989	8,183	1,220	8,114	18,404	2,817	39,726	96,278
	1,027	8,500	1,267	8,428	19,115	2,925	41,262	
9 K	1,006	6,713	0,905	6,544	15,227	2,327	32,722	94,741
	1,062	7,086	0,955	6,908	16,072	2,456	34,539	
10 K	1,387	8,240	1,397	8,176	18,535	2,810	40,546	96,352
	1,440	8,552	1,450	8,485	19,237	2,917	42,081	
11 K	0,919	6,309	0,897	6,204	14,716	2,250	31,295	96,640
	0,951	6,528	0,928	6,419	15,228	2,328	32,383	
12 K	1,713	9,668	1,514	9,340	21,949	3,309	47,493	96,866
	1,769	9,980	1,563	9,642	22,660	3,417	49,030	

účinné látky – silymarin suma + taxifolin

...obsah ve vzorku (i s H₂O)

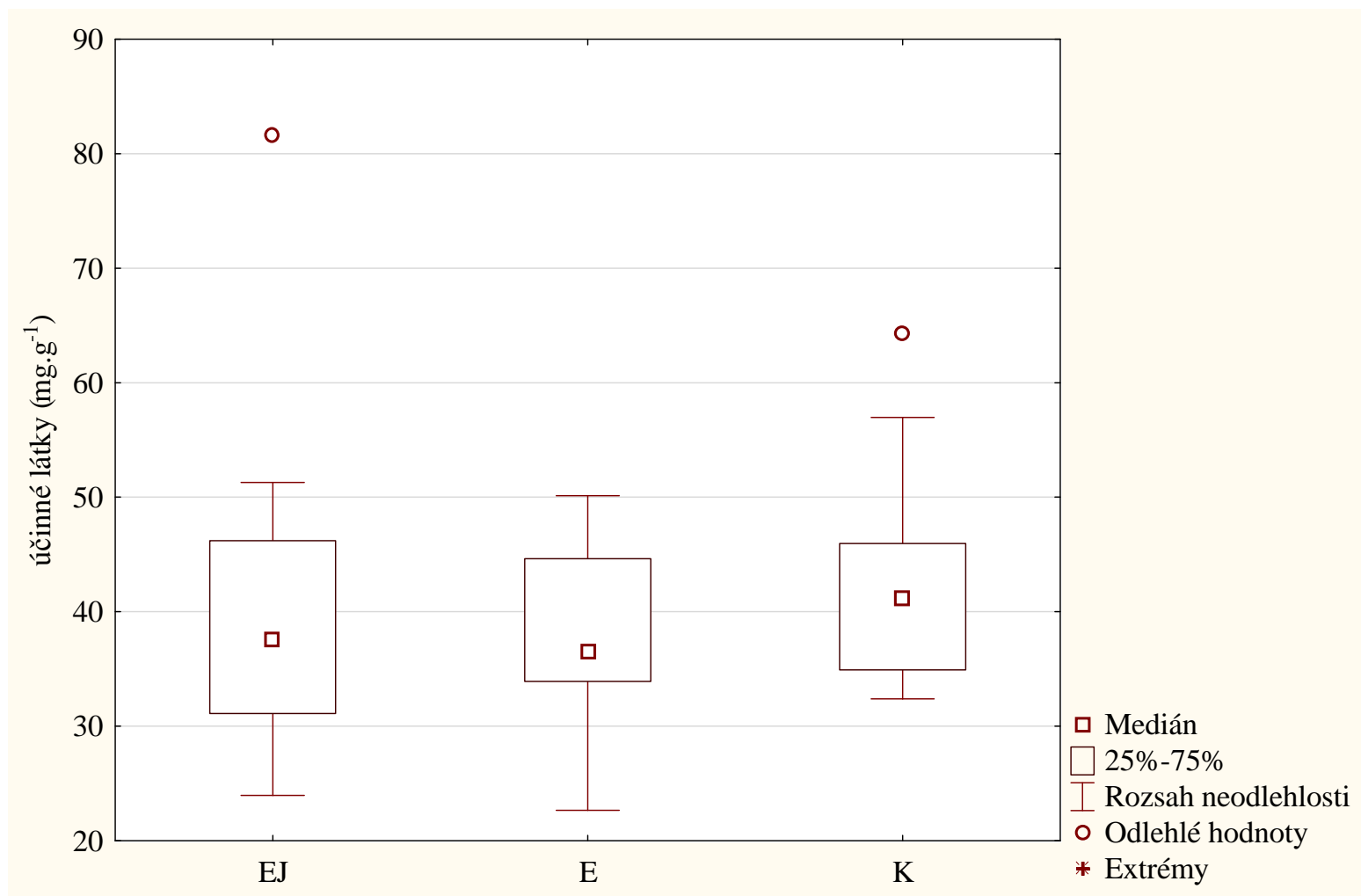
...přepočítáno na 100% sušinu

4.2 Vliv elicitorů na obsah účinných látek

Rozdíl koncentrace celkové sumy účinných látek (látky silymarinového komplexu a taxifolin) u vzorků skupiny rostlin s aplikací preparátu Elitic Jack, skupiny rostlin s aplikací preparátu ELITiC a kontrolní skupiny nebyl statisticky průkazný (Kruskal-Wallis; $H = 0.87$; $p = 0.65$; obr. č. 6).

Podobně rozdíl ve zjištěných koncentracích jednotlivých sledovaných látek mezi vzorky skupiny rostlin s aplikací preparátu ELITiC, skupiny rostlin s aplikací preparátu Elitic Jack a kontrolní skupiny s aplikací vody nebyl statisticky průkazný u žádné účinné látky (silybin B: Kruskal-Wallis; $H = 4.54$; $p = 0.1$; všechna ostatní $p > 0.48$). Grafy vyjadřující závislost obsahu jednotlivých účinných látek na aplikaci elicitorů jsou součástí přílohy 1.

obr. č. 6 - Závislost celkového obsahu účinných látek (silymarin suma + taxifolin) v mg.g^{-1} na aplikaci elicitorů



5. DISKUSE

V předložené práci byl sledován efekt aplikace preparátů ELITiC a Elitic Jack na tvorbu sekundárních metabolitů rostlinami ostropestřce mariánského v porovnání s kontrolní skupinou při maloparcelkovém pokusu v Hluboké nad Vltavou.

Preparát ELITiC je tvořen komplexem titanu a hydrolyzátu bílkovin s dalšími přídatnými látkami. Při aplikaci preparátu ELITiC bylo u chmele otáčivého prokázáno zvýšení obsahu α -hořkých kyselin o 20 – 30 % oproti kontrole a zvýšení výnosu šištic až o 46 % (Kužel et al., 2006).

Preparát Elitic Jack je v současné době předmětem patentního řízení, bližší údaje o jeho složení tedy není možné podat. Preparát Elitic Jack vykazuje v paralelně prováděných pokusech vliv na výnos a kvalitu ozimé pšenice, ozimé řepky a jarního ječmene (ústní sdělení vedoucího práce).

Vlivem působení elicitorů na rostlinu ostropestřec mariánský se zabývala i Dvořáková (2006), která sledovala u poloprovozního experimentu statisticky průkazný pozitivní vliv střední koncentrace elicitoru ASA – kyseliny acetylsalicylové (10^{-4} mol.l⁻¹) na obsah účinných látek v semenech rostlin ostropestřce mariánského (pouze 1 rok). V opakovaném maloparcelkovém pokusu však také nebyly změny v koncentracích účinných látek statisticky průkazné pro žádnou ze zvolených koncentrací.

Taktéž Gramanová (2009) pozorovala pro porost ostropestřce mariánského statisticky průkazný vliv vysoké koncentrace elicitoru ASA (10^{-3} mol.l⁻¹) ve smyslu navýšení obsahu účinných látek. Na paralelně prováděném pokusu na pozemcích v jiné lokalitě však taktéž nesledovala staticky průkazný vliv žádné ze zvolených koncentrací téhož elicitoru.

Maloparcelkový experiment pro účely této práce byl proveden v roce 2010 a získané extrakty ze semen byly následně analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Zjištěné rozdíly v koncentracích účinných látek mezi vzorky skupin s aplikací elicitorů a kontrolní skupiny s aplikací vody nebyly statisticky průkazné.

Výnos semen ostropestřce mariánského a obsah účinných látek závisí na mnoha proměnných faktorech působících komplexně.

Neprokazatelný vliv preparátů mohl být zapříčiněn neoptimálním zdravotním stavem porostu. Na rostliny působí abiotické stresory v podobě průběhu počasí,

nadmořské výšky, emisního a imisního stavu, půdní zásobenosti vláhou a živinami, světelných podmínek a mnoha dalších faktorů podílejících se na růstu rostlin (Pexídr, 2004). V případě, že je rostlina již nucena stresu odolávat, může další aplikace elicitoru vést k přílišné zátěži organismu projevující se snížením obsahu účinných látek a vnějšími fyziologickými poruchami.

Příčinou neprokazatelnosti vlivu preparátů také mohla být jejich zvolená koncentrace, doba aplikace a počet opakování aplikace, neboť aplikace rostlinných elicitorů při parcelkovém pokusu je velmi citlivým zásahem. Zvolené ředění preparátů může vést v souladu s teorií hormese k toxickému, neutrálnímu či stimulačnímu účinku na sledované rostliny.

Dalším problematickým momentem je závislost obsahu účinných látek silymarinového komplexu na stupni vyzrání semen vzhledem k jejich nerovnoměrnému dozrání (Spitzová, Placr, 1994). Důležitou roli pro tvorbu a složení silymarinového komplexu má i délka tvorby a trvání fáze růžice listů (Gromová et al., 1993), při níž byly rostliny všech skupin vystaveny shodnému působení vnějších faktorů.

Průměrný celkový obsah účinných látek (silymarinu + taxifolinu) přepočtený na 100% sušinu činil na kontrolních parcelkách bez aplikace elicitorů 42,568 mg.g⁻¹. Rostliny, na něž byl aplikován elicitor Elitic Jack vykázaly obsah průměrný celkový obsah účinných látek 40,253 mg.g⁻¹. U rostlin s použitím elicitoru ELITiC byl naměřený obsah silymarinu relativně nejmenší a činil v průměru 38,072 mg.g⁻¹. Uvedené koncentrace korespondují s výsledky Dvořákové (2006), která stanovila v letech 2004 a 2005 v maloparcelkových pokusech průměrné obsahy sumy účinných látek v semenech ostropestřce mariánského na 47 mg.g⁻¹ a 31 mg.g⁻¹ a Gramanové (2009), která naměřila v maloparcelkových pokusech roku 2007 průměrné obsahy sumy účinných látek v semenech ostropestřce mariánského 37 mg.g⁻¹ a 47 mg.g⁻¹.

Změny v obsazích jednotlivých účinných látek, které nastaly působením elicitorů nebyly diskutovány vzhledem k jejich statistické neprůkaznosti ve srovnání s kontrolou. Bylo možné sledovat negativní trendy působení preparátů o zvolené koncentraci na porost ostropestřce mariánského, neboť aplikace preparátů Elitic Jack snížila průměrně obsah sledovaných účinných látek v semenech o 5,44 % a aplikace preparátu ELITiC snížila obsah sledovaných účinných látek v semenech o 10,56 % oproti kontrole. Uvedené trendy však nejsou statisticky průkazné a mají pouze orientační charakter.

6. ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo studium účinku elicitorů na stimulatory rostlinné imunity ve smyslu ovlivnění obsahu některých biologicky aktivních látek ve vybrané rostlině ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.) a odzkoušení jejich vlivu prostřednictvím maloparcelkového pokusu, jakož i vypracování literární rešerše se zaměřením na působení elicitorů na obsah některých účinných látek v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.) nebo v jiných vybraných rostlinách, botanickou charakteristiku, způsob pěstování, agrotechniku, hnojení a ochranu před škůdci a proti chorobám ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L.), a chemické a účinné látky v ostropestřci mariánském (*Silybum marianum* L.) a metody jejich stanovení.

Za tímto účelem byla vypracována literární rešerše na stanovená témata. Dále byl v roce 2010 na 9 parcelkách založen porost ostropestřce mariánského, který byl v příhodnou dobu ošetřován preparáty ELITiC a Elitic Jack, přičemž třetina parcelk sloužila jako kontrolní a nebyl na ně aplikován žádný preparát se stimulačními účinky. Odebrané vzorky semen byly analyzovány na Katedře aplikovaných rostlinných biotechnologií Jihočeské univerzity metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Následně byla získaná data zpracována, vyhodnocena a kvantitativně shrnuta v tabulkách č. 3, č. 4 a č. 5.

Vzhledem k narušené normalitě v případě mnohých vzorků pro mnohé účinné látky byl pro statistickou analýzu dat použit Kruskal-Wallisův test (neparametrická ANOVA). Změna koncentrace celkové sumy účinných látek u vzorků jednotlivých skupin rostlin nebyla statisticky průkazná. Rozdíl ve zjištěných koncentracích sledovaných látek mezi vzorky skupiny rostlin s aplikací preparátu ELITiC, skupiny rostlin s aplikací preparátu Elitic Jack a kontrolní skupiny s aplikací vody nebyl statisticky průkazný u žádné účinné látky.

Používání vybraných elicitorů o zvolené koncentraci se tedy jeví jako neúčinné.

Statisticky neprůkazný vliv elicitorů nemusí být zapříčiněn neefektivností či nevhodně zvolenou koncentrací sledovaných elicitorů, ale může být způsoben mnohými vnějšími abiotickými či biotickými vlivy, které na porost rostlin

v maloparcelkovém pokusu nesespecificky působí, a tím ovlivňují i výsledný obsah účinných látek.

S ohledem na skutečnost, že pokus nemohl být opakován v dalším roce a s ohledem na výsledky paralelně prováděných pokusů prokazující pozitivní efekt elicitorů na výnos a kvalitu některých rostlin a účinných látek, by bylo vhodné v opakovaném bádání, zaměřeném blíže i na vliv koncentrace sledovaných elicitorů na výsledný obsah účinných látek, potvrdit či vyvrátit dosažený závěr o jejich neúčinnosti.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Agarwal, R., et al. Anticancer potential of silymarin: From bench to bed side. *Anticancer research*, 2006. vol. 26, no. 6B, s. 4457-4498.

Alikaridis, F., Papadakis, D., Pantelia, K., Kephelas, T. Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root cultures. *Fitoterapia*, 2000. vol. 71, s. 379-384.

Anderson, A.J. The biology of glycoproteins as elicitors. In *Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives*. New York: McGraw Hill Inc, 1989. vol. 3, s. 87-130.

Andrzejewska, J., Skinder, Z. Yield and quality of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) raw material grown in monoculture and crop rotation. Part 2. Milk thistle reaction to potassium fertilization. *Herba Polonica*, 2007. vol. 53, no. 1, s. 5-10. ISSN 0018-0599.

Andrzejewska J., Sadowska K., Mielcarek S. Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. *Industrial Crops and Products*, 2010. vol. 33, no. 2, s.462-468.

Arslanian, R.L., Bailey, D.T., Kent, M.C., Richheimer, S.L., Thornburg, K.R., Timmons, D.W., Zheng, Q. Y. Brevitaxin, a New Diterpenolignan from the Bark of *Taxus brevifolia*. *Journal of Natural Products*, 1995. vol. 58, no. 4, s. 583-585.

Bateson, G. *Mysl a příroda: nezbytná jednota*. Praha: Malvern, 2006. 197 s. ISBN 80-86702-19-7.

Begon, M., Harper J.L., Townsend C.R. *Ecology: individuals, populations, and communities*. 2nd ed. Boston: Blackwell Scientific, 1990. 945 s.

Beran, M. *Vaše dotazy - Naše odpovědi* [online]. Výzkumný ústav potravinářský Praha, 2007 [cit. 2012-02-11]. Dostupný z : <http://www.vupp.cz/czvupp/aktualit/index.htm>.

Bláha, L., Bocková, R., Hnilička, F., Hniličková, H., Holubec, V., Millerová, J., Štolcová, J., Zieglerová, J. *Rostlina a stres*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2003. 156 s.

Cacho, M., Moran, M., Corchete, P., Fernandez-Tarrago, J. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Plant Science*, 1999. vol. 144, s. 77-84.

Cannon, W.B. Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, 1929. vol. 9, no. 3, s. 399 - 431.

Capra, F. *Tkáň života: nová syntéza mysli a hmoty*. Praha: Academia, 2004. 290 s. ISBN 80-200-1169-2.

Cardona, M., Garcia, B., Pedro, J., Sinisterra, J. Flavonoids, flavonolignans and a phenylpropanoid from *Onopordon corymbosum*. *Phytochemistry*, 1990. vol. 29, no. 2, s. 629.

Carjaval, M., Martínez-Sánchez, F., Alcaraz, C.F. Effect of Ti(IV) on some physiological activity indicators of *Capsicum annuum L.* plants. *Journal of Horticultural Science*, 1994. vol. 69, s. 427-432.

Carrier, D.J., Crowe, T., Sokhansanj, S., Wahab, J., Barl, B. Milk thistle, *Silybum marianum L. Gaertn.* flower head development and associated marker compound profile. *J. Herbs Spices Med. Plants*, 2002. vol. 10, s. 65-74.

Carruba, A., la Torre, R. Cultivation trials of milk thistle, *Silybum marianum L. Gaertn.* into the semiarid Mediterranean environment. *Agricoltura mediterranea*, 2003. vol. 133, s. 14-19. ISSN 0394-0438.

Coufal, P. Separation methods [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2004a [cit. 2012-02-12]. Dostupný z: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/sepmet.html>

Coufal, P. Thin layer chromatography, TLC; Paper chromatography, PC [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2004b [cit.2012-02-12]. Dostupný z: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>

Coufal, P. Capillary Electroseparations, CES [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2004c [cit. 2012-02-12]. Dostupný z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html>

Czabajska, W., Kazimierczak, K., Maciolkowska-Ludowicz, E. Studies on the biology of *Silybum marianum Gaertn.*: Development, blooming, fructifying. *Herba - Polonica (Poland)*, 1989. vol. 35, no. 2-3, s. 109-115.

Daood, H.G., Biacs, P., Fehér, M., Hadju, F., Pais, I. Effect of Titanium on the Activity of Lipoxygenase. *Journal of Plant Nutrition*, 1988. vol. 11, s. 505-516.

Dicosmo, F., Misawa, M. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends. Biotechnol.*, 1985. no. 3, s. 318-322.

Drbal, K., Křížek, M. Analytická chemie. Skripta, Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 1999. 185 s. ISBN 80-7040-352-7.

Dušek, J., et al. Studium faktorů ovlivňující biosynthesu terapeuticky významných metabolitů v kulturách in vitro. Závěrečná zpráva grantu 193/1997/B-BIO/FaF, 1999.

Dvořáková J. Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině Ostropestřec mariánský *Silybum marianum (L.) Gaertn.* Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2006. 87 s.

Fischer, J. Excentric positionalität, Plessners Grundkategorie der Philosophischen Anthropologie. Deutsche Zeitschrift für Philosophie, 2000. vol. 48, no. 2, s. 275-276.

Foldesi, D., Barsi, E.. Seeding date and spacing experiments with *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Herba Hungarica, 1983. vol. 22, s. 55-64.

Fronek, J. Anglicko-český, česko-anglický slovník. Praha: LEDA, 1998. 1277 s. ISBN 80-85927-48-9.

Garaj, J., Bustin, D., Hladký, Z. Analytická chémie. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1987. 740 s.

Geneva, M., Stancheva, I., Sichanova, M., Boychinova, M., Georgiev, G., Doležal, M. Improvement of milk thistle (*Silybum marianum* L.) seed yield and quality with foliar fertilization and growth effector MD 148/II. Gen. Appl. Plant Physiology, 2008. vol. 34, no. 3-4, s. 309-318.

Giménez, J.Z., Martínez-Sánchez, F., Moreno, A., Fuentes, J.Z., Alcaraz, C.F. Titanium in Plant Nutrition. III. Effect of Ti (IV) on Yield of *Capsicum annuum* L. In: Spie - uib (ed). Procudings of III. Symposium Nacional de Nutricion Mineral de las Planta, Nitrición Mineral bajo condiciones de Estrés, 1990. s. 123-128.

Gramanová, H. Technologie pěstování ostropestřece mariánského *Silybum marianum* ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2009. 70 s.

Grieve, M. A Modern Herbal. 2 vols. New York: Harcourt, Brace & Company. 1931.

Gromová, Z., et al. Pestovanie špeciálnych plodín. Skripta Vysoká škola poľnohospodárska v Nitre, Agronomická fakulta, Katedra rastlinnej výroby. Nitra: Vydavateľské a edičné stredisko VŠP, 1993. 165 s. ISBN 80-7137-115-7.

Haban, M., Otepka, P., Kobida, L., Habanova, M. Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion. Horticultural Science, 2009. vol. 36, no. 2, s. 25-30.

Hahn, M.G., Bucheli, P., Cervone, F., Doares, S.H., O'Neill, R.A., Darvill, A., Albersheim, P. The roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives. T. Kosuge and E.W. Nester, eds (New York, NY: McGraw Hill Publishing Co.), 1989. vol. 3, s. 131-181.

Hedrick, U. P. (ed.) Sturtevant's Notes on Edible Plants. Part II. State of New York, Dept. of Agriculture, Twenty-seventh Annual Report, 1919. vol. 2.

Hérakleitos z Efesu, zlomek B 123. In: Kratochvíl, Z. Dělský potápěč k Hérakleitově řeči. Praha: Hermann a synové, 2006. 527 s. ISBN 80-87054-00-8.

Hnilička, F., Hniličková, H., Bláha, L., Möllerová, J., Zieglerová, J. Ekologické a fyziologické odezvy rostlin na biotické stresory. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin. In: Sborník příspěvků, 2003. s. 156 - 170.

Hogan, F.S., et al. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *Journal of Surgical Research*, 2007. vol. 143, no. 1, s. 58-65.

Hrubý, M., Cíglér, P., Kužel, S. Contribution to understanding the mechanism of titanium action in Plant. *Journal of Plant Nutrition*, 2002. vol. 25, no. 3, s. 577-598.

Hubáček, J. *Chemie pro vysoké školy zemědělské*, 1. vyd. Praha: SZN, 1988. 767 s.

Husáková, J., Lhotská, M. Ostropestřec mariánský - okrasná a léčivá rostlina. *Živa: časopis pro biologickou práci*, 1981. vol. 28, no. 4, s. 133. ISSN 0044-4812.

Chernyadev, I.I. Effect of 6-benzylaminopurine and thidiazuron on photosynthesis in crop plants. *Photosynthetica*, 1994. vol. 30, s. 287-292.

Chiavari, G., Galletti G.C., Marotti, M., Piccaglia, R. Silymarin content of different *Silybum marianum* L. Gaertn. cultivars. *Herba Hungar.* Vol. 1-2, 1991. s. 23 - 27.

Chmel, K., Cvak, Z., Dědek, M., Gajdůšková, V. *Chromatografie na tenké vrstvě, její využití pro průkaz cizorodých látek v potravinářství a v zemědělství*. 1. vyd. Praha: VÚPP, 1987. 172 s.

Chromatografie [online]. 2009 [cit.2012-02-12]. Dostupný z: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc

Indrák, P., Chytilová, D. K problematice stanovení silybinu v droze ostropestřece mariánského (*Silybum marianum* L. Gaertn.). *Zahradnictví*, 1992. vol. 19, no. 4, s. 309-313.

Janča, J., Zentrich, J.A. *Herbář léčivých rostlin*. 1. vyd. Praha: Eminent, 1995. s. 216 - 219. ISBN 80-85876-14-0.

Jaroš, Z. *Léčivé látky z rostlin*. Dona, 1992. 79 s. ISBN 80-85463-04-0.

Jegorov, A. Flavolignany - novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem. *Chemické listy*, 1996. vol. 90, s. 859-862.

Klouda, P. *Moderní analytické metody* [online]. 2003 [cit. 2012-02-15]. Dostupný z: <http://klouda.webpark.cz/mam.htm>

Komplexní metodika výživy rostlin. Praha: Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, 1990. 328 s.

Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Haruna, M., Ito, K., Tanabe, M. Studies on Inhibitors of Skin Tumor Promotion, IX. Neolignans from *Magnolia officinalis*, Journal of Natural Products, 1991. vol. 54, no. 3, s. 816-822.

Kopřiva, Z. Leuzea saflorová (*Leuzea carthamoides*) jako alternativní rostlina. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2002. 67 s.

Kovalčík, K., Kovalčíková, M. Adaptácia a stres v chove hospodárskych zvierat. Príroda, 1974. 195 s.

Kozłowski, J., Hołyńska, M. Effect of fertilization in a field experiment on the crop of *Silybum marianum* Gaertn. fruits as well as on the content and yield of silymarin. Heba Polonica, 1985. no. 1-2, s. 51-59.

Kratochvíl, Z. Filosofie živé přírody. Praha: Hermann a synové, 1994. 222 s.

Křen, V., Walterová, D. Silybin and Silymarin - New Effects and Applications. Biomed. Papers, 2005. vol. 149, no. 1, s. 29-41.

Křen, V., Gažák, R., Biedermann, D., Marhol, P. Silybin (Silibinin) Structure and Chirality. Chromatographia, 2010. vol. 71, no. 1-2, s. 167-168.

Křivohlavý, J. Jak zvládat stres. Praha: Grada Publishing, Avicenum, 1994. 190 s. ISBN 80-7169-121-6.

Kubínek, J. Ostropestřec mariánský - metodika pěstování. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR, 1987. 21 s.

Kummer, V., Mašková, J., Zralý, Z., Čanderle, J. Vedlejší účinky zkrmování výlisků semen ostropestřce mariánského u krav. Veterinářství, 2000. no. 2, s. 55 - 58.

Kužel, S., Hrubý, M., Cígler, P., Tlustoš, P. Mechanism of physiological effects of titanium leaf sprays on plants grown on soil. Biol. Trace Elem. Res. N.V. Phu., 2003. vol. 91, no. 2, s. 179-189.

Kužel, S., Tříška, J., Kolář, L., Špička, J., Cígler, P., Hrubý, M., Vydra, J., Vrchotová, N. Technologie pěstování rostlin *Echinacea purpurea* a *Schizandra chinensis* a extrakce účinných látek. Závěrečná zpráva o realizaci projektu Kontakt ME 704, 2005. s. 101.

Kužel, S., Cígler, P., Hrubý, M., Pilař M., Kopecký, J. Stimulace obsahu α -hořkých kyselin ve chmelu otáčivém. In: Sborník příspěvků Semináře technologie pěstování chmele, 2006.

Kvasnička, F., Bíba, B., Ševčík, R., Voldřich, M., Krátka, J. Analysis of the active components of silymarin. Journal of Chromatography A, 2003. vol. 990, s. 239-245.

Lesko, K.E., Stefanovits-Banyai, E., Pais, I., Simon-Sarkadi, L. Effects of cadmium and titanium - ascorbate on biological compounds in wheat seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 2002. vol. 25, no. 11, s. 2571-2581.

Longland, A. C., Slusarenko, A. J., Friend, J. Arachidonic and linoleic acid elicit isoflavonoid phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* (French bean). *Journal of Phytopathology*, 1987. vol. 120, s. 289-297.

Lu, K., Chang, Z., Chen, B., Guo, D., Zheng, J., Wang, K. Hormone-like effect of rare earth elements on the plant. *Journal of Beijing Medical University*, 1997. vol. 4, s. 289-291.

Lu, P., Lu, K., Zheng, J., Guo, D. Effect of rare earth elements on callus growth in *Coptis chinensis*. *Journal of Beijing Medical University*, 1998. vol. 5, s. 389-391.

Ma, J.F. Role of Organic Acids in Detoxification of Aluminum in Higher Plants, *Plant Cell Physiology*, 2000. vol. 41, no. 4, s. 383-390.

Marinelli, F., Ronchi, V.N., Salvador, P. Elicitor induction of enzyme activities and 6-methoxymellein production in carrot cell-suspension culture. *Phytochemistry*, 1994. vol. 35, s. 1457-1640.

Morazzoni, P., Bombardelli, E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia*, 1995. vol. 66, s. 3-42.

Moudrý, J. Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) [online]. Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2012. [cit. 2012-02-14]. Dostupný z: www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Ostropestrec_mariansky.htm

Nováček F. *Fytochemické základy botaniky*. Fontána, 2009. 284 s. ISBN 978-80-7336-457-1.

Nyiredy, S., Szűcs, Z., Antus, S., Samu, Z., New Components from *Silybum marianum* L. Fruits: A Theory Comes True. In *Memoriam of Professor Szabolcs Nyiredy (1950–2006)*. *Chromatographia*, 2008. vol. 68, s. 5-11.

Omer, E.A., Refaat, A.M., Ahmed, S.S., Kamel, A., Hammouda, F.M. Effect of spacing and fertilization on the yield and active constituents of milk thistle, *Silybum marianum*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 1993. vol. 1, no. 4, s. 17-23.

Omer, E.A., Ibrahim, M.E., Razin, A.M., Ahmed, S.S. Effect of spacing, nitrogen and potassium fertilization of *Silybum marianum* L. cultivated in newly reclaimed lands. *Egyptian Journal of Horticulture*, 1995. vol. 22, no. 1, s. 97-108.

Omer, E.A. Effect of different nitrogen sources on Romanian *Silybum marianum* cultivated in sandy and clay soils. *Egyptian Journal of Horticulture*, 1996. vol. 23, no. 1, s. 63-76.

Omer, E.A., Ahmed, S.S., Fayed, T.B., Ezzel-Din, A.A. Seed yield of *Silybum marianum* L. as affected by row spacing and fertilization in new reclaimed lands of Egypt. *Egyptian Journal of Horticulture*, 1998. vol. 25, no. 3, s. 281-293.

Omidbaigi, R., Karimzadeh, G., Koshki, M.H. A study on the influence of sowing date and plant density on the productivity of *Silybum marianum* and the characteristics correlation. *Iranian J. Sci. Technol.*, 2003. vol. 1, s. 203-212.

Opletal, L., Volák, J. *Rostliny pro zdraví*. Praha: Aventinum, 1999. 176 s. ISBN 80-7151-074-2.

Pais, I. Objektív kemiai vizs gálatok néhány tápelem szerepéni felderítésére kertészeti növényeben (Disertace). Budapest, Hungarian Academy of Science, 1974. 185 s.

Pais, I. The biological Importance of Titanium. *Journal of Plant Nutrition*, 1983. vol. 6, s. 3-131.

Pepping, J. Milk thistle: *Silybum marianum*. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 1999. vol. 56, no. 12, s. 1195-7.

Pexídr, R. Vliv kyseliny acetylsalicylové na obsah účinných látek ve vybraných léčivkách. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2004. 80 s.

Pulkrábek, J., Jozefyová, L., Urban, J., Šroller, J. Stresové faktory při pěstování cukrovky. *AGRO*, 2005. vol. 6, s. 67.

Quaglia, M.G., Bossu, E., Donati, G., Mazzanti, G., Brandt, A. Determination of silymarine in the extract from dried *silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomeical Analysis*, 1999. no. 19, s. 435-442.

Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavarz, T. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2003. vol. 37, s. 91-102.

Rámcová metodika pěstební technologie ostropestřce mariánského [on line]. Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., 2003 [cit. 2012-02-04]. Dostupné z http://www.agrokrom.cz/texty/METODIKY/RAM_METOD/RAM_METOD_OSTR_OPESTREC_MARIANSKY.pdf

Rouhová, M., Mikulčíková, P., Ventura, K. Extrakce a stanovení kortikosteronu z biologického materiálu. In: *Sborník prací 7. ročníku soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie o cenu firmy Merck*. Praha: Česká společnost chemická, 2004. s. 67-71. ISBN 80-86238-38-5.

Rumińska, A. *Herbs Grower's Guide*. Poznań: PWRiL, 1991. s. 424.

Ryant, P. Alternativní olejniny [online]. Agrochemická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně, 2005 [cit. 2012-02-7]. Dostupný z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/hnojeni_plodin/html/olejniny/alterolejniny.htm

Sanchez-Sampedro, A. A., Fernandez-Tarrago, J., Corchete, P. Some common signal transduction events are not necessary for the elicitor-induced accumulation of silymarin in cell cultures of *Silybum marianum*. *Journal of Plant Physiology*, 2008. vol. 165, s. 1466-1473.

Selye, H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *CMA Journal*, 1976. vol. 115, s. 53-56.

Sersen, F., Vencel, T., Annus, J. Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. *Fitoterapia*, 2006. vol. 77, s. 525-529.

Schulte, E. Die Ertragsbildung bei Nutzung sekundärer Inhaltsstoffe. Ansätze zur Optimierung des Wirkstoffertrages bei *Silybum marianum* (L.), der Mariendistel. Doctoral Dissertation. Institut für Pflanzenbau der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 1999.

Siatka, T., Kašparová, M. Vliv sloučenin vanadu na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Čes. slov. Farm.*, 2007. vol. 56, s. 230–234.

Simon, L., Hajdu, F., Balogh, A., Pais, I. Effect of titanium on growth and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. Part II. Effect of titanium ascorbate on pigment content and chlorophyll metabolism of *Chlorella*. In *Proceedings of the 3rd International Trace Element Symposium*. Budapest, Hungary, 1988. s. 87-101.

Sindel, B.M. A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Research*, 1991. vol. 31, s. 189-201.

Skinner, M.K., *Cell-Cell Interactions in the Testis*, *Endocrine Reviews*, 1991. vol. 12, no. 1, s. 45-77.

Sklenák, L. *Experimentální metody biofyziky*. Učební texty KFY PřF OU. Ostrava: Ostravská univerzita, 2003. 61 s. ISBN 80-7042-899-6.

Slanina, J. Biologická a farmakologická aktivita lignanů. Praha: Česká společnost chemická. *Chemické listy*, 2000. vol. 94, no. 2, s. 111-116. ISSN 0009-2770.

Spitzová, I., Placr, M. Vliv desikantů na biologickou hodnotu semen a kvalitu drog ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L. Gaertn.). *Zahradnictví*, 1994. vol. 24, no. 2, s. 93-101.

Spitzová, I. Ostropestřec mariánský - staronová léčivá rostlina. *Úroda: časopis pro rostlinnou produkci*, 1997. vol. 45, no. 8, s. 28-29. ISSN 0139/6013.

- Starý, F. Léčivé bodláky: Ze světa léčivých rostlin 5. Živa: časopis pro biologickou práci, 2000. vol. 48, no. 5, s. 208-210.
- Šíma, J. Separační metody v analytické chemii [online]. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2004 [cit. 2012-02-07]. Dostupný z: http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm
- Štern, P. Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii [online]. Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha, 2003 [cit. 2012-02-07]. Dostupný z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>
- True, R.H., Gies, W.J. On the physiological action of some of the heavy metals in mixed solutions. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 1903. vol. 30, s. 390-402.
- Tůmová, L., Dušek, J. Vliv kyseliny linolové na produkci sekundárních metabolitů. Československá farmacie, 2000. vol. 49, no. 2, s. 78-81.
- Uexküll, J. von. Streifzüge durch die Umwelten von Tieren und Menschen. Berlin: Springer-Verlag, 1934. 101 s.
- Varela, F.G., Maturana, H.R., Uribe, R. Autopoiesis: The organization of living systems, its characterization and a model. Biosystems, 1974. vol. 5, no. 4, s. 87-196.
- Velikinac, I., et al. Comparison of capillary zone electrophoresis and high liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. IL FARMACO, 2004. vol. 59, no. 5, s. 419-424.
- Vrchotová N., Kužel S., Tříška J., Kolář L., Totušek J. Extrakce a analýza fenolických látek z třapatky nachové (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). Chem. Listy, 2002. vol. 96, s. 636-639.
- Wagner, H., Hörhammer, L., Munster, R. The chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). Arzneimittel-Forschung, 1967. vol. 18, no. 6, s. 688-696.
- Wenzig, E., Kunert, O., Ferreira, D., Schmid, M., Schühly, W., Bauer, R., Hiermann, A. Flavonolignans from *Avena sativa*. Journal of Natural Products, 2005. vol. 68, no. 2, s. 289-92.
- Wojcik, P. Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 2004. vol. 12, s. 201-218.
- Wu J., Wang C., Mei X. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus spp* cell cultures by rare earth chemical lanthanum. Journal of Biotechnology, 2001. vol. 85, s. 67-73.

8 PŘÍLOHY

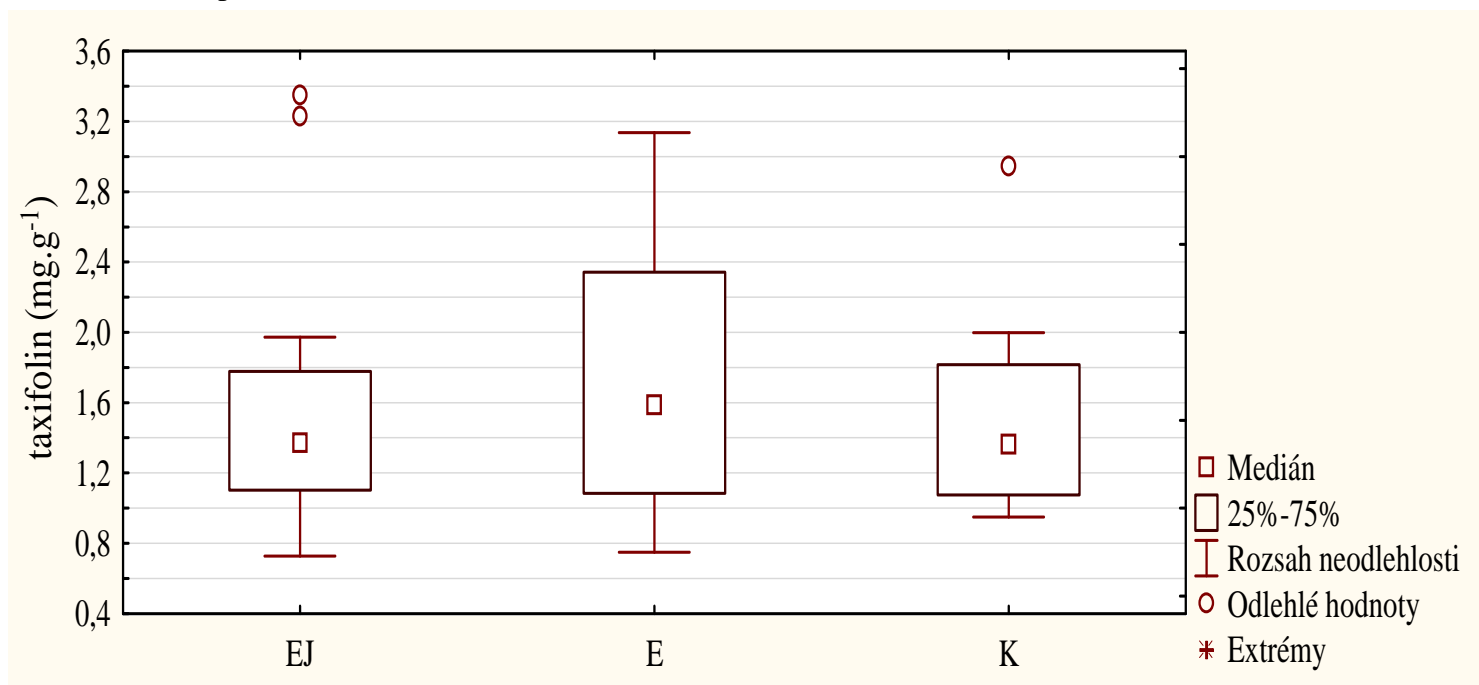
- Příloha 1 - Grafy vyjadřující závislost obsahu jednotlivých účinných látek na aplikaci elicitorů
- Příloha 2 - Etiketa preparátu ELITiC

Příloha 1:

Vliv aplikace elicitorů na koncentraci taxifolinu

Mezi rostlinami s postřikem Elitic Jack, ELITiC a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu taxifolinu (Kruskal-Wallis; $H = 0.24$; $p = 0.88$).

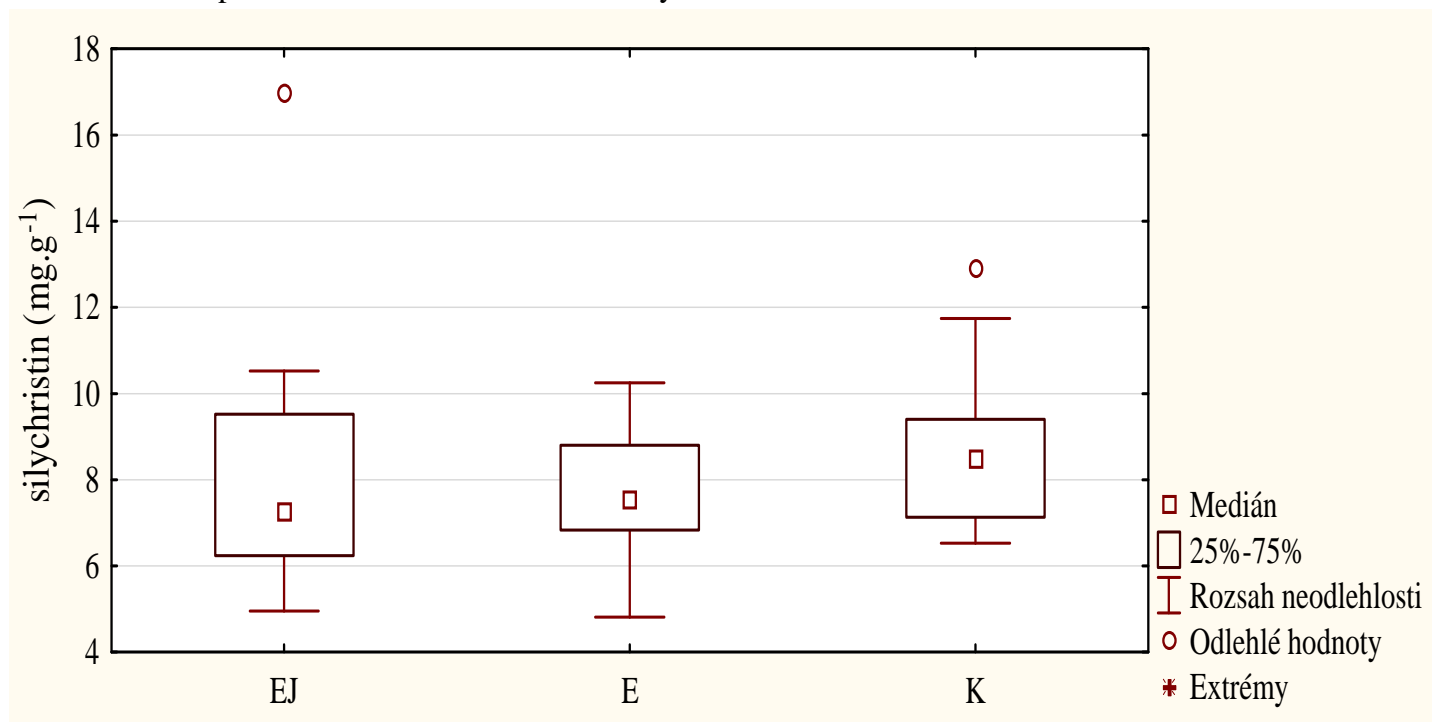
obr. č. 7 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci taxifolinu



Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silychristinu

Mezi rostlinami s postřikem Elitic Jack, ELITiC a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu silychristinu (Kruskal-Wallis; $H = 1.46$; $p = 0.48$).

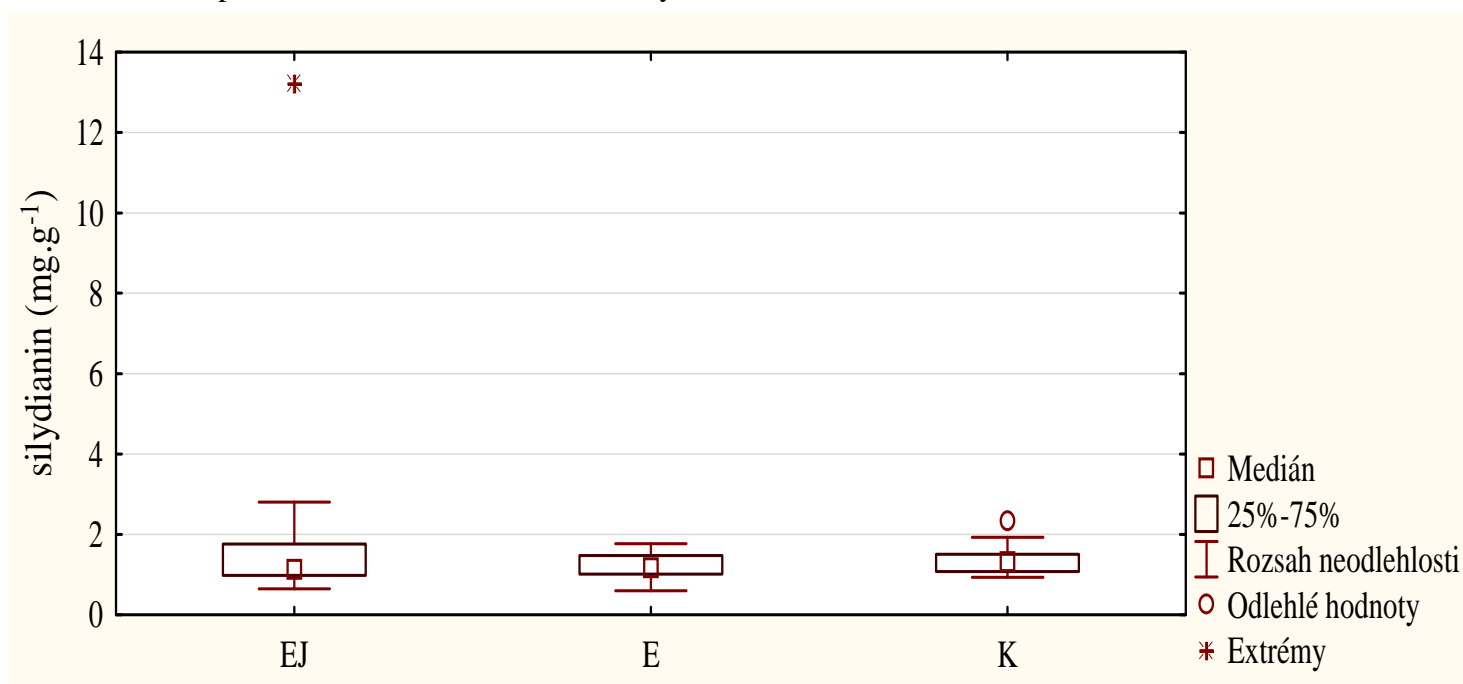
obr. č. 8 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silychristinu



Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silydianinu

Mezi rostlinami s postřikem Elitic Jack, ELITiC a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu silydianinu (Kruskal-Wallis; $H = 0.67$; $p = 0.72$).

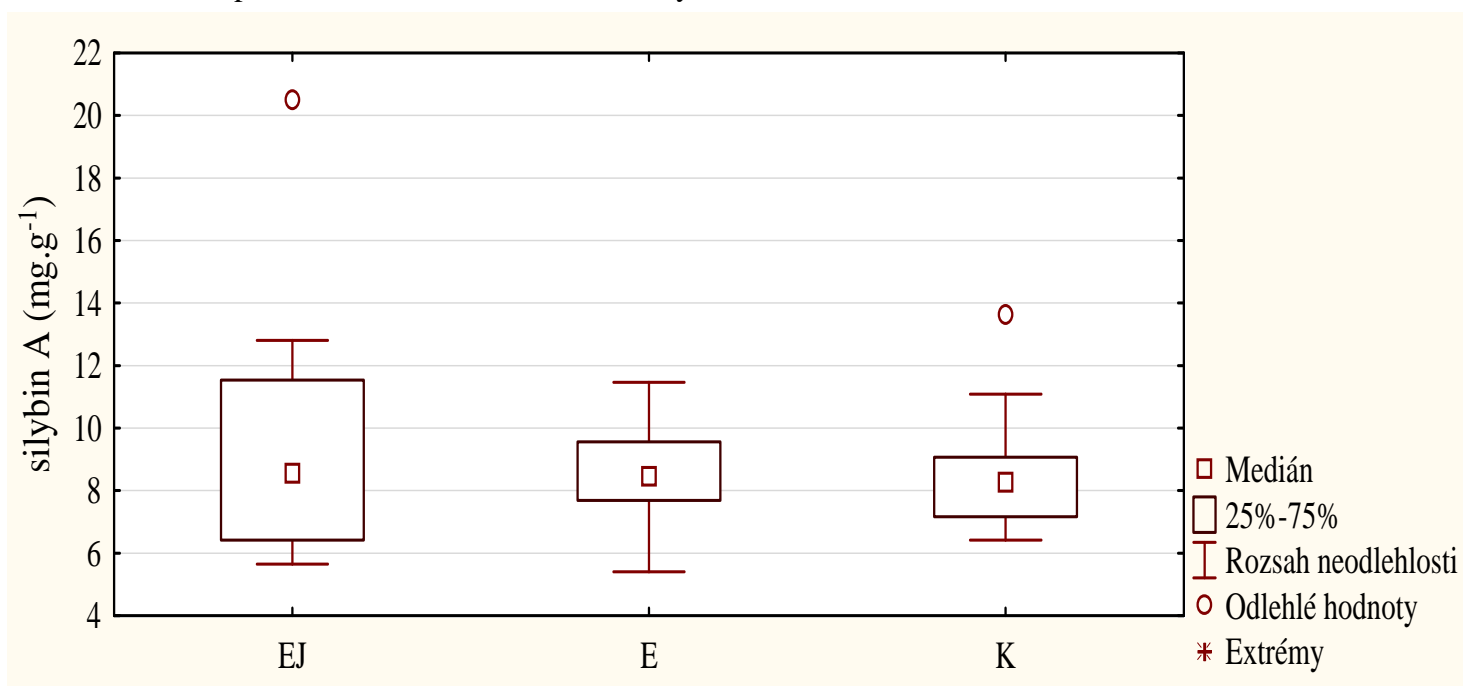
obr. č. 9 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silydianinu



Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silybinu A

Mezi rostlinami s postřikem Elitic Jack, ELITiC a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu silybinu A (Kruskal-Wallis; $H = 0.09$; $p = 0.95$).

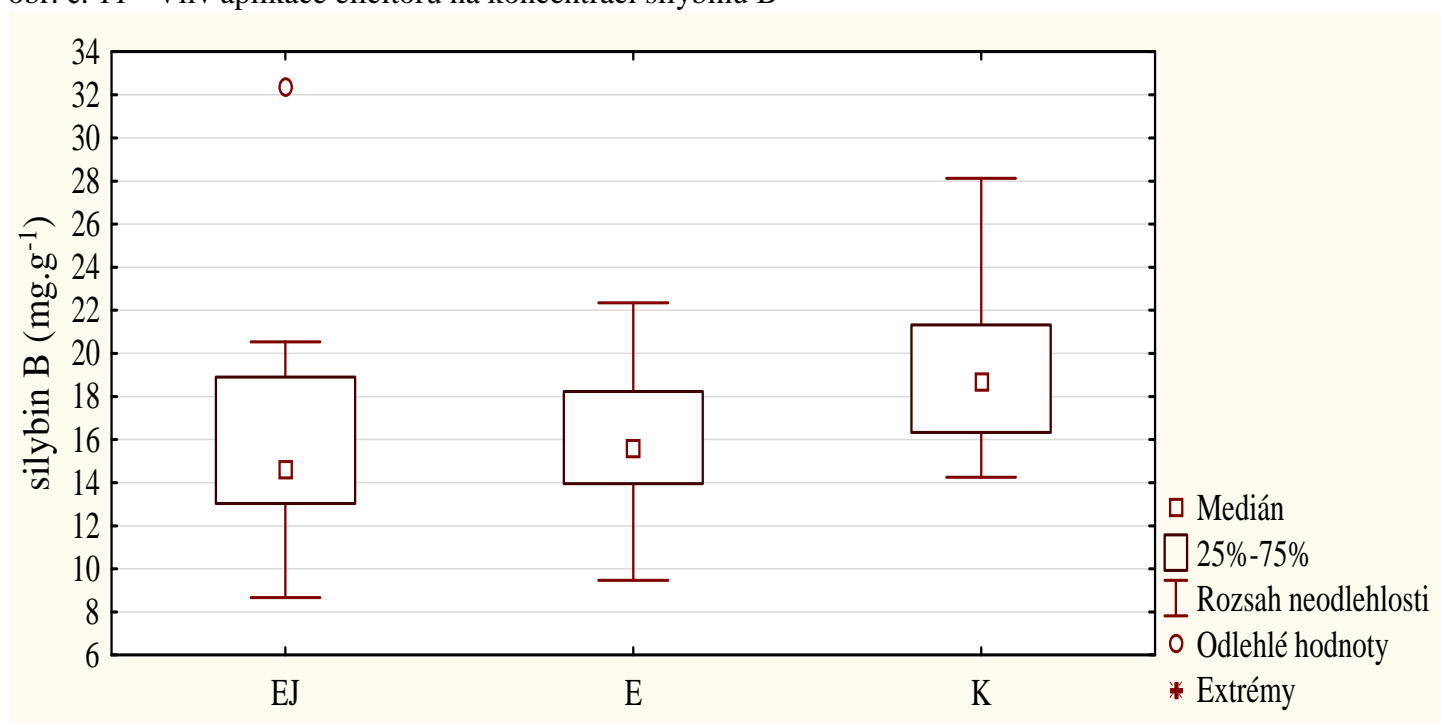
obr. č. 10 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silybinu A



Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silybinu B

Mezi rostlinami s postřikem Elitic Jack, ELITiC a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu silybinu B (Kruskal-Wallis; $H = 4.55$; $p = 0.10$).

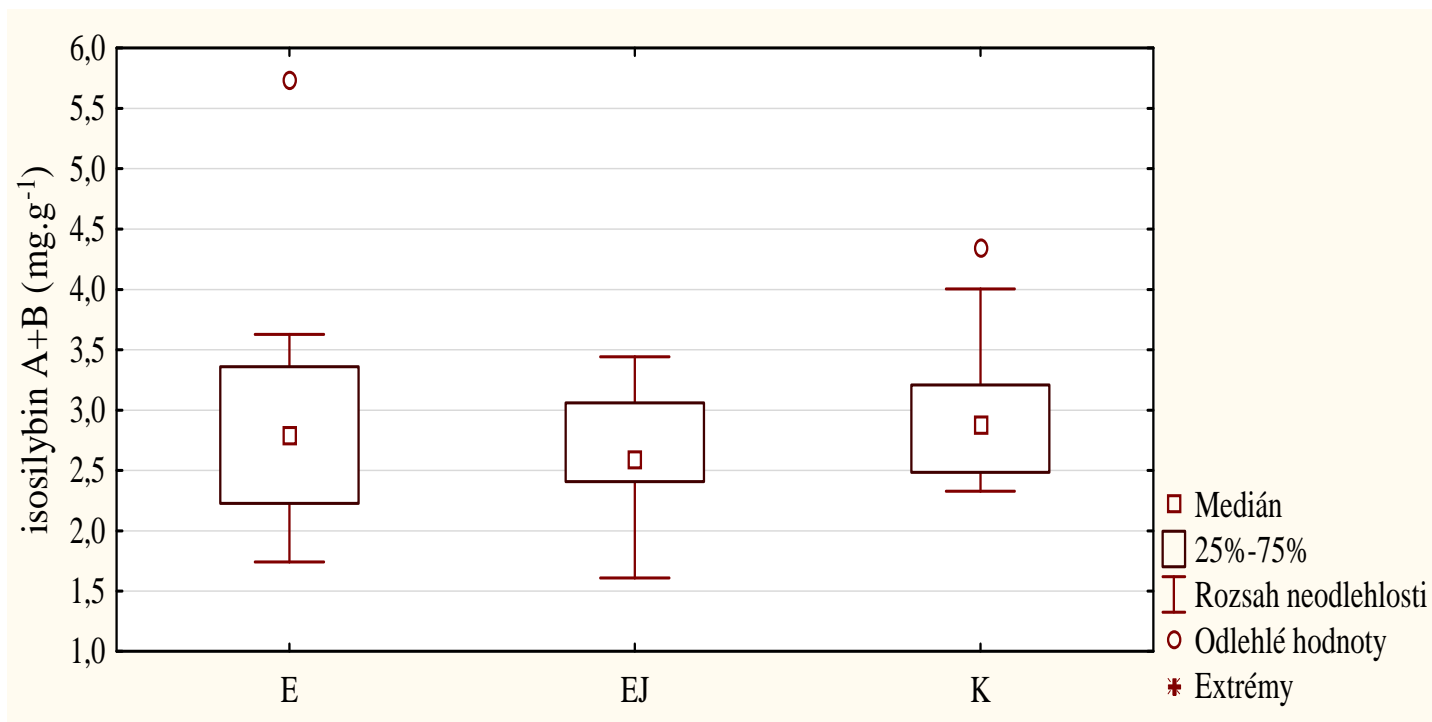
obr. č. 11 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci silybinu B



Vliv aplikace elicitorů na koncentraci isosilybinu A+B

Mezi rostlinami s postřikem Elitic Jack, ELITiC a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v obsahu isosilybinu A+B (Kruskal-Wallis; $H = 1.06$; $p = 0.59$).

obr. č. 12 - Vliv aplikace elicitorů na koncentraci isosilybinu A+B



Příloha 2: Etiketa preparátu ELITiC

ELITiC

Pomocný rostlinný přípravek

Výrobce: AGRA GROUP a.s. Střelské
Hoštice, Tovární 9, 387 15 Střelské Hoštice

Číslo rozhodnutí o registraci: 2501

Chemické a fyzikální vlastnosti:

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

Obsah rizikových prvků v hnojení

Nepřekračuje limitní hodnoty stanovené vyhláškou č. 474/2000Sb.

(Cd < 50mg/kg • Pb < 15 mg/kg • Hg < 1 mg/kg • As < 10 mg/kg • Cr < 150 mg/kg)

ROZSAH A ZPŮSOB POUŽITÍ

ELITiC je pomocný rostlinný přípravek do chmelu, který obsahuje v optimálním poměru

biokompatibilní vodorozpustný komplex titanu a hydrolyzát bílkovin, jejichž působením dochází v rostlinách ke specifickému ovlivnění zvýšené tvorby sekundárních metabolitů. Hydrolyzát aminokyselin navíc podporuje tvorbu auxinů a cytokininů, které mají vliv na vitalitu a růst rostlin.

Přípravek dále obsahuje emulgovaný řepkový olej, který zlepšuje pronikání účinných látek přes kutikulu, a to i v období přísušků, kdy je ochranná vosková vrstva listu špatně propustná.

Přípravek obsahuje též draslík v citrátové formě, který stabilizuje pH. ELITiC významně iniciuje tvorbu sekundárních metabolitů, stimuluje dělení buněk a tvorbu chloroplastů, podporuje fotosyntézu a tím významně přispívá k vysoké a stabilní kvalitě produkce. U chmelu významně ovlivňuje především množství alfa hořkých kyselin v požadovaném složení. Částečně zvyšuje i přirozenou odolnost rostlin vůči chorobám.

Pokyny pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci

Uchovávejte mimo dosah dětí (S2). Uchovávat odděleně od potravin, nápojů a

APLIKACE

Plodina	Dávka na 1 ha	Množství vody	Termín aplikace
Chmel	0,5 l/ha	1500-2000 l vody	první aplikace - začátek kvetení chmele druhá aplikace - cca 14 dní po první aplikaci

krmiv (S13). Zamezit styku s kůží a očima (S24/S25). Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (S26). Uchovávejte při teplotě nepřesahující 35°C (S47).

Doba použitelnosti: 24 měsíců při dodržení podmínek skladování v původních obalech
Balení:

Datum výroby: