

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů



Studium fytoekdysteroidů během ontogeneze
špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Mašková
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Mašková
Název práce	Studium fytoekdysteroidů během ontogeneze špenátu setého (<i>Spinacia oleracea</i> L.)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	Hlavním tématem této diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro další studium fytoekdysteroidů (PECs). Modelovou rostlinou se v této práci stal špenát setý, u něhož bylo snahou vyvinout vhodnou metodu kultivace. Z použitých technik se ukázalo být nadějně pěstování na perlitu. V rámci této práce bylo potvrzeno, že s postupujícím vývojem rostliny hladiny testovaných PECs klesají a biosyntéza je zahájena nejspíš až v pozdějších stádiích vývoje. Dále bylo skrínováno 19 různých kultivarů špenátu pro obsah PECs. S ohledem na poměrně vysoké hladiny PECs a největší úspěšnost pěstování, byly nejlépe hodnoceny japonské kultivary Wakakusa, Flaylander a New Japan. Hladiny PECs byly stanoveny pomocí metody UHPLC-MS/MS. V rámci této práce byla navíc vyvinuta metoda stanovení obsahu těchto látek pomocí SFC-UV-MS, kterou byly změřeny některé reálné vzorky. Posledním dílčím cílem byla izolace chloroplastů z pletiv špenátu a následná kvantifikace PECs v těchto organelách. V souvislosti s tím bylo také provedeno ověření čistoty získané frakce imunodetekční metodou.
Klíčová slova	ekdysteroidy, 20-hydroxyekdyson, polypodin B, špenát setý, ontogeneze, metabolismus, extrakce tuhou fází, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, superkritická fluidní chromatografie
Počet stran	92
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Kateřina Mašková
Title of thesis	Study of phytoecdysteroids during the ontogenesis of spinach (<i>Spinacia oleracea</i> L.)
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	M.Sc. Danuše Tarkowská, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>The main aim of this thesis was appearance of optimal conditions for further study of phytoecdysteroids (PECs). Plant model became spinach in this diploma and was an effort to optimize of method of cultivation. Growing on perlite seemed suitable techniques, how effectively to get sufficient quantity of plant material. Experiments in this work confirmed, that levels of PECs decrease during early development of spinach. PECs were also screened in 19 varieties of spinach. Japanese cultivars – Wakakusa, Flaylander and New Japan were evaluated positively for their relatively high levels of PECs and for success of their cultivation. Levels of PECs were determined using UHPLC-MS/MS and for analysis the compounds was also developed a method SFC-UV-MS, through which were measure some real samples. The last step was to isolated chloroplasts from spinach tissues and quantification PECs in these organelles. In this context was verified of purify of the chloroplast fraction by immunodetection method.</p>
Keywords	ecdysteroids, 20-hydroxyecdysone, polypodine B, spinach, ontogeny, metabolism, solid phase extraction, liquid chromatography, supercritical fluid chromatography, mass spectrometry
Number of pages	92
Number of appendices	0
Language	Czech

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Danuše Tarkowské, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 6. 5. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování vedoucí diplomové práce Mgr. Danuši Tarkowské, Ph.D. za cenné rady, odborné a vstřícné vedení a za předané zkušenosti při řešení dané problematiky. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Vladimíru Skalickému za vedení v oblasti izolace chloroplastů, Bc. Pavlu Kopeckému z VÚRV, v.v.i. a p. Vladislavě Gregorové ze společnosti MoravoSeed CZ, a.s. za odbornou pomoc při kultivaci špenátu. Dále bych ráda poděkovala kolektivu Oddělení chemické biologie a genetiky, CRH a hlavně kolektivu Laboratoře růstových regulátorů za vytvoření přátelské atmosféry a všestrannou pomoc při realizaci experimentální části. Děkuji také společnosti Waters Gesellschaft m.b.H. za zapůjčení přístroje pro SFC-UV-MS analýzu. Moje díky patří také mému rodině za veškerou podporu.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ ÚVOD	8
1 ÚVOD	10
2 CÍLE PRÁCE	12
3 TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1 Ekdysteroidy – historie.....	13
3.2 Fitoeckdysteroidy – biosyntéza a metabolismus	14
3.2.1 20-hydroxyekdyson	17
3.2.2 polypodin B	18
3.3 Chemické a fyzikální vlastnosti eckdysteroidů.....	19
3.4 Izolace a čištění fitoeckdysteroidů z rostlinného materiálu	20
3.5 Metody stanovení fitoeckdysteroidů	22
3.6 Rostliny s obsahem fitoeckdysteroidů.....	27
3.6.1 Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i> L.).....	28
3.6.2 Kultivary špenátu setého.....	31
3.6.3 Význam špenátu pro zdraví člověka.....	31
3.7 Buněčné organely	35
3.7.1 Izolace chloroplastů.....	36
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1 Chemikálie.....	38
4.2 Rostlinný materiál.....	38
4.3 Přístrojové vybavení a materiál	38
4.4 Metody.....	38
4.4.1 Kultivace merlíku a špenátu	38
4.4.1.1 Sterilizace semen	38
4.4.2 Extrakce a izolace fitoeckdysteroidů z rostlinných pletiv extrakcí tuhou fází	38
4.4.2.1 Studium matričního efektu	38
4.4.3 UHPLC-MS/MS analýza	38

4.4.4 SFC-UV-MS analýza.....	38
4.4.5 Izolace chloroplastů.....	38
4.4.5.1 SDS-PAGE a Western blot.....	38
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1 Porovnání kultivačních metod	39
5.2 Vyhodnocení matričního efektu.....	39
5.3 Porovnání UHPLC-MS a SFC-UV-MS analýzy	39
5.3.1 Vyhodnocení vlivu stáří rostlin špenátu na hladinu fytoekdysteroidů	39
5.3.2 Distribuce fytoekdysteroidů mezi kořenem a prýtem semenáčku špenátu	39
5.3.3 Vyhodnocení obsahu fytoekdysteroidů u různých kultivarů špenátu	39
5.4 Určení obsahu fytoekdysteroidů ve frakci chloroplastů	39
5.4.1 Vyhodnocení čistoty chloroplastové frakce	39
5.5 Diskuze	39
6 ZÁVĚR	40
7 POUŽITÁ LITERATURA	41

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

20E	20-hydroxyekdyson
AA	octan amonný
Ab	protilátka
AF	mravenčan amonný
ABPR	automatický regulátor zpětného tlaku
ajuC	ajugasteron C
BSA	hovězí sérový albumin
CCD	protiproudá extrakce
CE	kapilární elektroforéza
CI	chemická ionizace
CIB	pufr pro izolaci chloroplastů
CID	kolizně indukovaná asociace
CV	kapilární napětí
DCCC	kapková protiproudá chromatografie
DMAPP	dimetylallyl difosfát
DOXP	1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfátová dráha
DW	vysušená hmota
E	ekdyson
ECs	ekdysteroidy
EI	elektronová ionizace
ER	endoplazmatické retikulum
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FTIR	infračervený detektor s Fournierovou transformací
FW	čerstvá hmota
GA	Golgiho aparát
GC	plynová chromatografie

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSCCC	vysokorychlostní protiproudá chromatografie
IPP	isopentenyl difosfát
LC	kapalinová chromatografie
MECK	micelární elektrokinetická chromatografie
MEP	2C-metyleritritol fosfátová dráha
MF	mobilní fáze
MRM	monitorování rozpadu iontu
MS	hmotnostní spektroskopie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektroskopie
MVA	kyselina mevalonová
NP	normální fáze
PDA	detektor s fotodiodovým polem
PECs	fytoekdysteroidy
polB	polypodin B
ponA	ponasteron A
RP	reverzní fáze
SP	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SIR	monitorování jednoho nebo několika iontů
SPE	extrakce na pevné fázi
stachC	stachysteron C
TBS-T	Tris/HCl pufr s 0.05% detergentem Tween 20
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TOF	průletový analyzátor
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
UHPSFC	ultraúčinná superkritická fluidní chromatografie

1 ÚVOD

Fytoekdysteroidy (PECs, z *angl.* phytoecdysteroids) jsou přirozeně se vyskytující polyhydroxylované látky steroidní povahy. Jde o tetracyklické sloučeniny složené buď z 27, nebo 28–29 atomů uhlíku, neboť jsou biosynteticky odvozeny od cholesterolu (27 uhlíků) nebo jiných rostlinných sterolů. Jejich fyziologické role v rostlinách zatím nebyly zcela prozkoumány a jejich výskyt není univerzální. Nicméně mnohé studie ukazují, že jsou přítomny ve vysokých koncentracích v různých rostlinných druzích včetně některých běžně konzumovaných druhů zelenin. U savců bylo prokázáno široké spektrum farmakologických a léčivých vlastností ekdysteroidů včetně účinků hepatoprotektivních, hypoglykemických, antimikrobiálních či protinádorových. V neposlední řadě je znám jejich anabolický efekt, kdy jsou schopny podporovat růst svalové hmoty bez vedlejších androgenních účinků. Nelze také opominout jejich schopnost zvýšit resistenci organismu vůči stresu zvýšením vitality a fyzického výkonu organismu. Látky tohoto typu jsou obecně označovány jako tzv. adaptogeny.

PECs jsou analoga hmyzích steroidních hormonů ekdysteroidů (ECs, z *angl.* ecdysteroids) a právě jako hormony regulující svlékání kutikuly a metamorfózu u hmyzu byly ECs poprvé popsány. Dnes už ale víme, že u hmyzu, stejně jako u korýšů, regulují mnoho jiných biochemických a fyziologických procesů ve všech stádiích jejich vývoje. ECs se ale nenacházejí jen u rostlin a živočichů, ale na počátku 90. let byly látky podobné struktury objeveny i v houbách. Byly označeny jako mykoekdysteroidy, analogicky jako byly ECs získané z živočichů nazvány zoekdysteroidy a z rostlin PECs. Rozdělení ECs na jednotlivé skupiny ale není zcela striktní, protože některé z nich se vyskytují jak v rostlinné, tak v živočišné říši. Dnes se mezi ekdysteroidní látky řadí bez mála 500 různých sloučenin (z toho zhruba 300 sloučenin se řadí mezi PECs), jejichž chemické a fyzikální vlastnosti, včetně jejich přírodního zdroje, jsou přehledně shrnuty ve volně přístupné databázi na webovém portále Ecdybase (<http://ecdybase.org>). Nomenklatura ECs je obecně odvozena od názvu ekdysonu. Triviální název, zejména u PECs, je spojen s názvem organismu, ze kterého byl poprvé izolován.

Na rozdíl od velmi dobře známé hormonální funkce ECs u hmyzu nebylo u rostlin prokázáno, že by měly tyto sloučeniny charakter hormonu. Jednak vykazují velice slabou nebo nulovou aktivitu v běžně používaných biotestech pro jednotlivé skupiny rostlinných hormonů (fytohormonů), mimoto nebyl dodnes v rostlinách nalezen jejich receptor a rovněž jejich koncentrace je v rostlinných pletivech příliš vysoká na to, aby mohly být za hormony, působící obvykle ve velice nízkých koncentracích, považovány. Proti jejich hormonální vlastnosti hovoří rovněž fakt, že se nevyskytují univerzálně u všech rostlinných druhů, ale pouze u zhruba 6 % všech dodnes prozkoumaných suchozemských rostlin. Z těchto všech důvodů jsou tedy zatím řazeny mezi sekundární metabolity. Navzdory svým nehormonálním vlastnostem se ale přesto určitým způsobem podílejí na regulaci řady fyziologických procesů *in planta*. Hlavní hypotézou

týkající se funkce PECs v rostlinách je, že poskytují rostlině ochranu proti bezobratlým škůdcům. Zvýšením endogenních hladin PECs nebo modulací jejich profilu pomocí šlechtění nebo genetickými modifikacemi lze takto docílit ochrany některých zemědělsky významných kulturních rostlin.

Některé PECs produkované rostlinami také působí jako alelochemikálie, tj. sloučeniny, které jsou uvolňovány rostlinami do půdy a stimulují nebo negativně ovlivňují růst a/nebo vývoj sousedících organismů (rostlin, hmyzu, hub, popř. mikrobů). Poslední zatím publikovanou fyziologickou funkcí PECs je jejich účast na regulaci fotosyntézy u rostlin. Exogenní aplikací PECs lze docílit jak zvýšení rychlosti fotosyntézy, tak zvýšení výtěžku ribulózy-1,5-bisfosfátu, tj. produktu první reakce Kalvinova cyklu (temnostní fáze fotosyntézy).

Tato práce se věnuje studiu vybraných PECs během ontogeneze špenátu setého *Spinacia oleracea* L., rostliny která byla pro tuto práci vybrána jako modelová. Špenát setý je jednoletá krytosemenná rostlina z čeledi laskavcovitých, jenž je významnou listovou zeleninou a zároveň patří mezi rostliny produkující významná množství PECs.

2 CÍLE PRÁCE

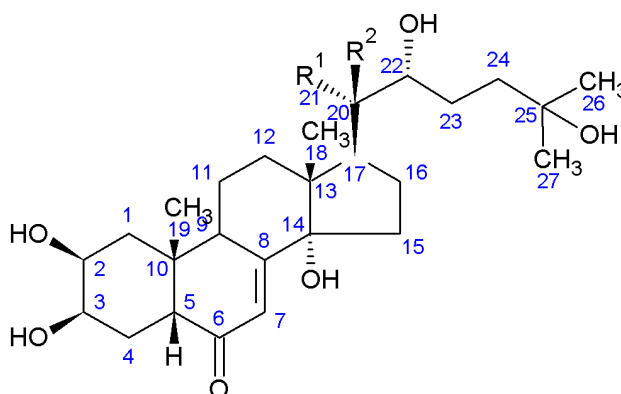
Cíle této diplomové práce byly stanoveny takto:

- vypracovat literární rešerši na téma fytoekdysteroidy, jejich biosyntéza, metabolismus a výskyt v rostlinách z čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*)
- vyvinout metodu vhodnou pro kultivaci rostlin špenátu setého *Spinacia oleracea* L. jak za podmínek *in vitro*, tak i *ex vitro*
- vyvinout metodu pro stanovení vybraných fytoekdysteroidů pomocí superkritické fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní a UV detekcí (SFC-UV-MS) a aplikovat tuto metodu na vybrané reálné vzorky extraktů špenátu setého *Spinacia oleracea* L.
- kvantifikovat hladiny 20-hydroxyekdysonu (20E) a polypodinu B (polB) jako hlavních fytoekdysteroidů v pletivech špenátu setého během vegetativní fáze jeho ontogenetického vývoje pomocí UHPLC-MS/MS
- na základě získaných výsledků porovnat obě použité instrumentální metody pro stanovení fytoekdysteroidů v rostlinných pletivech
- provést diskuzi k výsledkům týkajících se hladin 20E a polB během vývoje semenáčků špenátu setého a porovnat ji s výsledky již dříve publikovanými v odborné literatuře
- kvantifikovat hladiny 20E a polB v chloroplastech vyizolovaných z pletiv špenátu setého

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 EKDYSTEROIDY – HISTORIE

Výzkum v živočišných vědách je většinou o krok napřed před výzkumem ve vědách rostlinných, proto bývají často přírodní látky objevovány nejdříve v živočišné říši a pak až následně v říši rostlinné. To je i případ ECs, které byly nejdříve objeveny u hmyzu a až později se zjistilo, že se vyskytují hojně také v rostlinách. První EC se podařilo vyizolovat z kukly bource morušového *Bombyx mori* v roce 1954 (Butenand a Karlson, 1954). Nazvali jej ekdyson (E; Obr. 1), protože bylo zároveň zjištěno, že má hormonální funkci spočívající v kontrole svlékání (*angl.* ecdysis) a metamorfózy hmyzu. Jeho struktura ale byla popsána až roku 1965 Huberem a Hoppem pomocí X-ray krystalografie (Huber a Hopp, 1965).



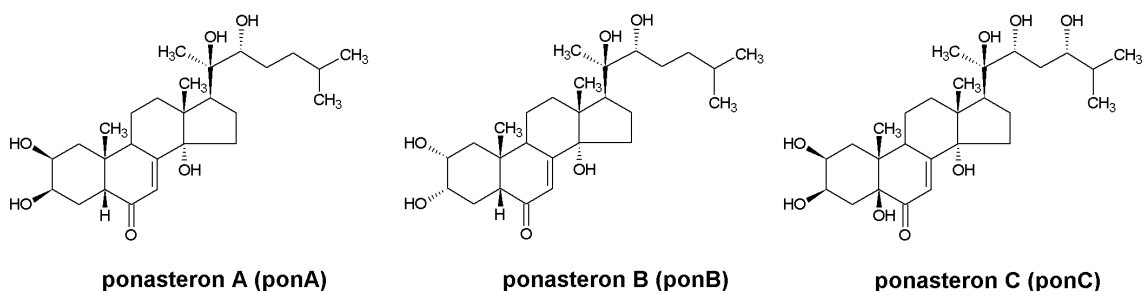
Ekdyson, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

20-hydroxyekdyson, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{OH}$

Obr. 1: Struktura ekdysonu (E) a 20-hydroxyekdysonu (20E) s vyznačením číslování atomů molekuly.

První izolace ECs z rostlinného materiálu byla dílem náhody. Když Nakanishi *et al.* (1966) studoval chemické složení listů jehličnanu *Podocarpus nakaii* se snahou objevit látky s protinádorovou aktivitou, podařilo se mu vyizolovat polyhydroxylované steroidy ekdysonového typu, ponasteron A (ponA), ponasteron B a C (Obr. 2). O rok později byl izolován 20-hydroxyekdyson (20E; Obr. 1) a inokosteron z kořenů rostliny *Achyranthes fauriei* (Takemoto *et al.*, 1967a). V této době byl 20E nalezen také ve dřevě stromu *Podocarpus elatus* (Galbraith a Horn, 1966), v oddencích kapradiny osladiče obecného *Polypodium vulgare*

(Heinrich a Hoffmeister, 1967) a v listech jiné kapradiny – hasivky orličí *Pteridium aquilinum* (Kaplaniš *et al.*, 1967).



Obr. 2: Chemické struktury ponasteronu A (ponA), ponasteronu B (ponB) a ponasteronu C (ponC).

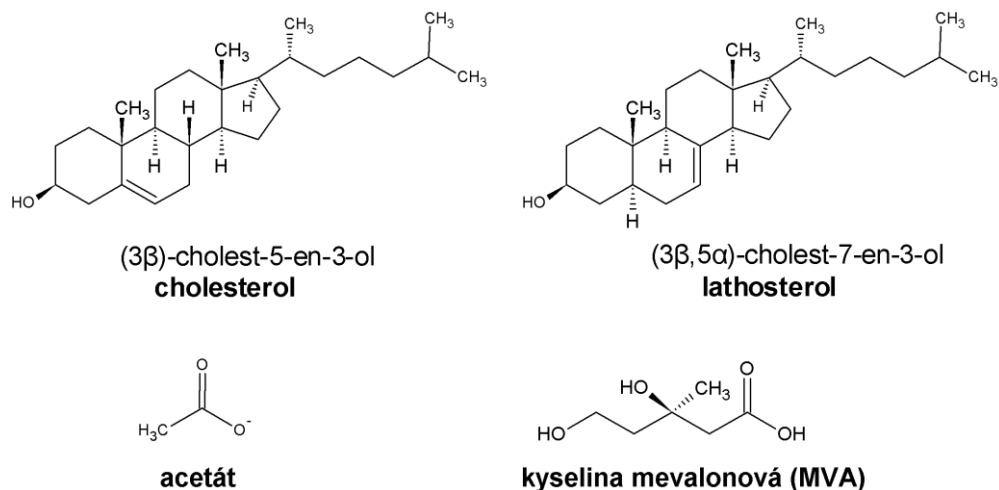
Skupina přirozeně se vyskytujících ECs v rostlinách byla pojmenována jako fytoekdysteroidy, aby byly tyto látky odlišeny od těch, které byly izolovány z živočišných zdrojů. Nicméně, jak již bylo zmíněno, toto rozdělení není striktní, neboť některé ECs jsou přítomny jak v rostlinách, tak i v živočiších (např. E, 20E a ajugasteron C –ajuC). Mimo cévnaté (vyšší) rostliny byly ECs nalezeny i v rostlinách nižších jako jsou houby a řasy (Dinan *et al.*, 2009).

3.2 FYTOEKDYSTEROIDY – BIOSYNTÉZA A METABOLISMUS

Znalosti o biosyntetických drahách PECs jsou omezené, přestože první studie biosyntézy PECs začaly už cca před 30 lety, hned poté, co byly PECs objeveny a přibližně ve stejnou dobu, kdy se začínala studovat biosyntéza ECs u hmyzu. Díky vysokým hladinám PECs u některých rostlinných druhů, by se mohlo zdát, že objasnění biosyntézy nebude složitý úkol, ale tyto vysoké hladiny jsou výsledkem dlouhodobé akumulace, což nevyžaduje vysokou rychlost biosyntézy stejně jako je tomu třeba u hmyzu. Kromě toho nejsou známá přesná místa produkce PECs. Není jasné, jestli biosyntéza probíhá ve všech buňkách nebo jen v některých, specializovaných, avšak doposud neidentifikovaných buňkách (Greibenok *et al.*, 1996; Canals *et al.*, 2005). Co bylo ale v 90. letech prokázáno, je, že aktivní biosyntéza PECs probíhá ve vyvíjejících se pletivech (Greibenok a Adler, 1991; Grebenok a Adler, 1993) a následně jsou PECs transportovány do jiných orgánů (Ripa *et al.*, 1990; Grebenok a Adler, 1991; Tomáš *et al.*, 1993).

Hmyz a členovci nejsou schopni syntetizovat steroly, neboť postrádají schopnost cyklizovat skvalen (30uhlíkatý nenasycený alifatický uhlovodík složený z isoprenoidních

jednotek) za vzniku cyklických terpenoidů. Protože je potřebují zejména na stavbu buněčných membrán a jako prekurzory ECs, nezbývá jim než je získat ze své rostlinné potravy (Nes a McKean, 1977). Pro tvorbu ECs u hmyzu jsou zapotřebí C₂₇ steroly, k čemuž slouží několik biosyntetických drah umožňujících metabolizovat C₂₈ a C₂₉ rostlinné steroly (fytosteroly). Na rozdíl od živočichů (hmyzu) jsou rostliny vybaveny kompletním biosyntetickým aparátem schopným produkovat ECs (ačkoli naše znalost jejich biosyntézy a lokalizace biosyntetických enzymů není zcela kompletní). Z historického pohledu byla biosyntéza rostlinných sterolů (triterpenoidů) popisována nejdříve jako cytosolická dráha vycházející z kyseliny mevalonové (MVA) jako prekurzoru (tzv. mevalonátová dráha; Goldstein a Brown, 1990). O několik let později bylo ale zjištěno, že isoprenoidní stavební jednotky (isopentenyl difosfát a dimetyllallyl difosfát; IPP a DMAPP) potřebné pro syntézu terpenů nevznikají pouze MVA dráhou v cytosolu rostlinných buněk, ale také v plastidech tzv. 2C-metyl-erytritol-4-fosfátovou dráhou (MEP), někdy nazývanou jako dráha 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfátová (DOXP; Lichtenthaler 1999; Rohmer 1999). IPP slouží jako základní pětiuhlíkatá stavební jednotka pro biosyntézu všech terpenoidů včetně C₃₀ triterpenoidních sterolů (Piironen *et al.*, 2000). Bylo prokázáno, že IPP, který je použit na jejich syntézu, pochází výhradně z MVA dráhy. Jiné studie ale ukazují, že např. v klíčících zrnech kukuřice nemůže být MVA původcem isoprenoidních jednotek pro syntézu fytosterolů a IPP musí být tedy tvořen jinými drahami (Guo *et al.*, 1995). Na základě těchto skutečností tedy vznikají pochyby o stěžejní roli MVA dráhy v syntéze fytosterolů. Do současné doby ale byly v rámci objasnění biosyntézy PECs použity jen ty postupy, jichž se účastní molekuly zapojené do dráhy mevalonátové, tzn., že se předpokládá, že biosyntéza PECs je lokalizována v cytosolu (Grebek a Adler 1993; Bakrim *et al.*, 2008), to bylo studováno na několika rostlinách, např. *Spinacia oleracea* (Grebek a Adler, 1993; Bakrim *et al.*, 2008), *Zea mays* (Devarenne *et al.*, 1995), *Polypodium vulgare* (Reixach *et al.*, 1999) a *Ajuga reptans* (Ohyama *et al.*, 1999; Hyodo a Fujimoto, 2000). Strategie pro objasnění biosyntetické dráhy PECs jsou založeny zejména na použití molekuly prekurzorů biosyntézy isoprenoidních látek, které nesou radioaktivní značku, např. tritium (³H) nebo radioaktivní izotop uhlíku (¹⁴C) a sledování zda jsou zabudovány do molekuly PECs. To může být provedeno např. s acetátem nebo mevalonátem, se steroly (cholesterol) nebo s jinými dostupnými meziprodukty (Grebek a Adler, 1993). Tyto látky mohou být použity také pro charakterizaci enzymů zapojených do biosyntetické dráhy. Dalším způsobem studia biosyntézy ECs je použití stabilních izotopů vodíku (²H) nebo uhlíku (¹³C) s následnou NMR analýzou (Hyodo a Fujimoto, 2000). Na kukuřici seté byl například proveden experiment s radioaktivně značenými prekurzory – s kyselinou mevalonovou, cholesterolem (Obr. 3) a E, jež vedly k tvorbě radioaktivně značených konjugátů E a 20E (Devarenne *et al.*, 1995). Dalším prekurzorem pro ECs může být acetát (Obr. 3), který je přeměňován v biosyntéze C₂₇, C₂₈ a C₂₉ ECs (Tomás *et al.*, 1993) nebo lathosterol (Obr. 3; Grebek a Adler, 1993).

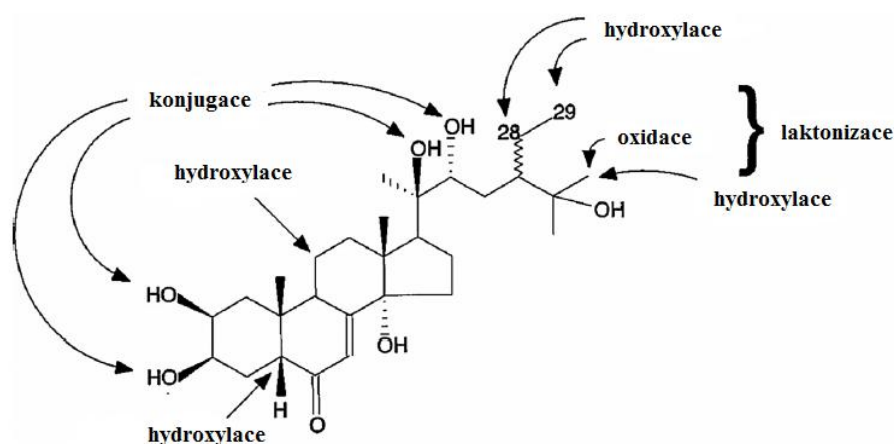


Obr. 3: Struktury některých prekurzorů biosyntézy ECs.

Zároveň není vyloučeno, že C_{28} a C_{29} steroly by mohly být prekurzory pro odpovídající ECs, např. clerosterol pro cyasteron (Okuzumi *et al.*, 2003). Studium biosyntézy s hydroxylovanými deriváty cholesterolu, tedy 25-hydroxycholesterolem a 22*R*-hydroxycholesterolem, bylo provedeno na kalusu a proklu (stélkatý haploidní útvar v životním cyklu kaprad'orostů) osladiče obecného, kde byly tyto molekuly velmi účinně přeměňovány na E a 20E (Reixach *et al.*, 1999). Testy s hydroxylovanými deriváty cholesterolu byly uskutečněny i s jinými rostlinami, např. se stálezeleným jehličnanem *Podocarpus elatus* (Joly *et al.*, 1969). Ty však byly hodnoceny negativně.

ECs jsou inaktivovány hlavními dvěma cestami: 1) přeměna na polárnější metabolity nebo 2) konjugací, a to nejčastěji s mastnými kyselinami (Snyder a Chang, 1991a; 1992; Kuppert *et al.*, 1978) a sacharidy – glukózou a galaktózou (O'Reilly *et al.*, 1992). Dále mohou vznikat (poly)fosforylované konjugáty, které byly objeveny ve špenátu a podle Grebenoka *et al.*, (1994) mohou být spoluodpovědné za „down“ regulaci biosyntézy ECs. Přeměny ECs na polárnější metabolity využívají např. některé druhy hmyzu při detoxikaci ECs přijatých z rostlin (Rharrabe *et al.*, 2007). Tato metabolická reakce vyžaduje modifikaci postranního řetězce na pozici C-26 a to buď hydroxylací, nebo oxidací. 20E může být metabolizován za účasti CYP26-hydroxylázy (Williams *et al.*, 2000) na 20,26-dihydroxyekdyson a ponA pak na inokosteron (25-deoxy-20,26-dihydroxyekdyson; Bocking *et al.*, 1995; Snyder a Chang, 1991a; 1991b; 1992; Lachaise a Lafont, 1984). Oxidací v poloze C-26 vznikají ekdysonové kyseliny. Např. z 20E vzniká 20-hydroxyekdysonová kyselina a z ponA vzniká potom kyselina 25-deoxy-20-hydroxyekdysonová (Snyder a Chang, 1991a; 1991b; 1992; Lachaise a Lafont, 1984; Lafont *et al.*, 1986). ECs mohou být také převedeny pomocí 3α-reduktázy na své 3α-hydroxy epimery (Ikeda a Naya, 1993).

ECs jsou látky velmi strukturně rozmanité a do budoucna bude potřeba provést více biosyntetických studií, které by objasnily vznik různorodé škály přírodních ECs, především těch rostlinných (Dinan *et al.*, 2009). Pokud vezmeme v úvahu kombinace různých modifikací (Obr. 4), je možné předpokládat, že existuje více než 1000 individuálních struktur, které se mohou v rostlinách vyskytnout (Dinan *et al.*, 1999). Mnohé z těchto modifikací, nacházejících se u PECs, se vyskytují i u jiných skupin rostlinných triterpenoidů (např. brassinosteroidů, popř. jiných fytosterolů). Tento fakt vede k předpokladu, že enzymy metabolických drah těchto látek jsou u rostlin společné. Nedostatečná specifita těchto enzymů může způsobit vznik různých metabolitů nebo biosyntetických produktů, aniž by bylo nutné, aby rostlina měla nadbytečné množství genů, které by odpovídaly těmto enzymům (Kreis a Müller-Uri, 2010).



Obr. 4: Některá běžná místa modifikací PECs (převzato a upraveno z Kreis a Müller-Uri, 2010).

3.2.1 20-HYDROXYEKDYSON

Polyhydroxylovaný steroid 20E je spolu s E (oba Obr. 1, kap. 3.1) druhým základním regulačním hormonem, který ovlivňuje vývojové pochody většiny druhů hmyzu a dalších členovců. Je iniciátorem svlékání kutikuly a dalších morfogenetických procesů, včetně růstu a metamorfózy (Henrich *et al.*, 1999).

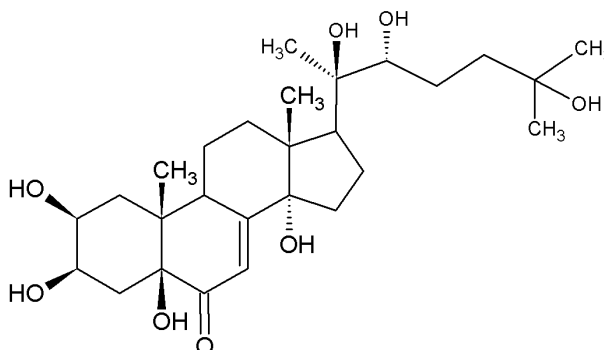
20E je produktem hydroxylace E v poloze C-20, kterou zprostředkovává E-20-monooxygenasa. E je tedy prekurzorem pro 20E, přestože i on sám může působit jako hormon (Warren a Gilbert, 1986; Hiruma *et al.*, 1997). Tuto reakci Grebenok *et al.* (1996) prokázal za použití mikrozomální frakce izolované z listů špenátu. Přestože je známé, že se enzym E-20-monooxygenasa nachází v endoplasmatickém retikulu (Feyereisen a Durst, 1978)

a mitochondriích (Bollenbacher *et al.*, 1977; Blais a Lafont, 1986), nepodařilo se ho ani purifikovat ani zaklonovat jemu odpovídající gen (Petryk *et al.*, 2003).

20E je nejhojněji zastoupeným PEC v rostlinné říši, jehož funkcí, jak již bylo uvedeno, je nejspíš obrana rostliny před bezobratlými škůdci (Dinan, 2001; Lafont *et al.*, 2002). Navíc vznikla studie, která naznačuje, že 20E zvyšuje antioxidační ochranu, přesněji ovlivňuje askorbát-glutathionový cyklus, a umožňuje rostlinám lépe odolávat stresu vyvolanému působením těžkých kovů (Lamhamdi *et al.*, 2016). Také byla provedena studie, kdy použitím exogenního 20E, bylo dosaženo stimulace elongace koleoptile u pšenice *Triticum vulgare* (Golovatskaya, 2004). V jiné studii bylo pozorováno, že po přidání 20E nebo E ke kultuře jednobuněčné zelené řasy *Chlorella vulgaris* se zvýšilo buněčného dělení a došlo ke změnám metabolických drah (Bajguz a Dinan, 2004). 20E má také vliv mj. na klíčení. U semen rajčat ošetřených 20E (10^{-4} a 10^{-5} M) byla následně pozorována stimulace jejich klíčení a akumulace proteinogenní aminokyseliny prolinu (Bakrim *et al.*, 2007). Tyto studie naznačují, že PECs nebudou mít nejspíš v rostlinách jen roli obrany proti škůdcům. Na rozdíl od hmyzu u nich ale nebyla prokázána hormonální funkce (Hendrix a Jones, 1972; Dreier a Towers, 1988; Macháčková *et al.*, 1995).

3.2.2 POLYPODIN B

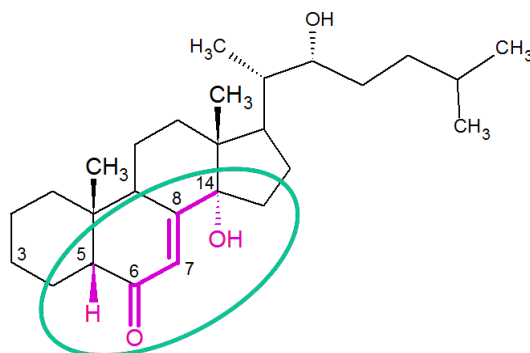
Druhým nejčastěji se vyskytujícím PEC u rostlin je polypodin B (polB; Obr. 5; Buděšínský *et al.*, 2008). Tento steroid byl poprvé izolován v roce 1967 z osladiče obecného *Polypodium vulgare* (kapradina) a byl označen jako nejvíce hydroxylovaný EC. Nese celkem sedm hydroxylových skupin (Jizba *et al.*, 1967) a od 20E se liší tím, že obsahuje navíc jednu hydroxylovou skupinu v poloze C-5. Proto ho lze v literatuře nalézt i pod názvem 5 β , 20-dihydroxyekdyson (Harmatha a Dinan, 1997).



Obr. 5: Struktura polypodinu B (pol B).

3.3 CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI EKDYSTEROIDŮ

ECs mohou být charakterizované buď podle jejich biologické aktivity (svlékáci hormony), nebo podle jejich struktury. ECs reprezentují specifickou skupinu sloučenin, které nesou společné strukturální rysy ve steroidním jádře (Obr. 6): *cis* (5 β -H) spojení kruhů A a B, 7-en-6-on chromofor v B kruhu a *trans* (14 α -OH nebo -H) spojení kruhů C a D (Lafont *et al.*, 2012).



Obr. 6: Společné strukturální rysy ECs. Hlavní charakteristiky jsou barevně označeny.

Spousta ECs si nese ze svého prekurzoru hydroxylovou skupinu v poloze 3 β , ale mohou obsahovat i další hydroxylové skupiny, a to jak na steroidním jádře, tak na postranním řetězci, což činí ECs poměrně rozpustné ve vodě. Největší rozmanitost ECs vyplývá právě z rozdílného počtu a různých pozic hydroxylových skupin. ECs se mezi sebou liší také v postranních řetězcích i počtem uhlíků (od C₁₉ po C₂₉ a někdy i C₃₀, především ale od C₂₇ do C₂₉). Mohou obsahovat různé hydroxy-, oxo-, oxy-, isopropoxy-, acyloyl-, aryloyl-, glykosyl- a další substituenty. Největší škála ECs byla nalezena ve vajíčkách a embryích hmyzu u skupin rovnokřídlí a motýli, pravděpodobně proto, že obsahují velké množství těchto látek – víc než 40 mg/g čerstvé hmoty (FW, z *angl.* fresh weight), tj. deseti až stonásobná koncentrace detekovaná u larev a kulek (Lafont *et al.*, 2012; Dinan *et al.*, 2009)

Díky 7-en-6-on chromoforu v B kruhu (Obr. 6) lze ECs detekovat pomocí UV spektroskopie. Uhlíkový skelet 7-en-6-on má v etanolu (EtOH) relativně silnou absorbanci při $\lambda_{\max} \sim 243$ nm s molárním absorpčním koeficientem $\varepsilon \sim 10\text{--}16 \cdot 10^3$ l \cdot mol⁻¹ \cdot cm⁻¹. Například E absorbuje při $\lambda_{\max} \sim 242$ nm s $\varepsilon \sim 12,4 \cdot 10^3$ l \cdot mol⁻¹ \cdot cm⁻¹. Toto absorpční maximum se ve vodě posouvá na $\lambda_{\max} \sim 247$ nm (Lafont *et al.*, 2012).

U ECs je indukována fluorescence v přítomnosti kyseliny sírové nebo ve vodném roztoku amoniaku (Horn, 1971). Typické hodnoty pro excitační a emisní vlnové délky jsou v oblasti

380 a 430 nm, ale u některých ECs jsou tyto vlnové délky odlišné, mimo to lze také pozorovat rozdíly v intenzitě fluorescence (Koolman, 1980).

Přítomnost hydroxylových skupin zajišťuje u většiny ECs silnou absorpci paprsků infračerveného spektra v oblasti 3340–3500 cm^{-1} (Louden *et al.*, 2001; 2002).

3.4 IZOLACE A ČIŠTĚNÍ FYTOEKDYSTEROIDŮ Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

Před samotnou extrakcí a následnou izolací PECs je potřeba rostlinný materiál, ať je vysušený (DW, z *angl.* dry weight) nebo ve formě FW, zhomogenizovat kvůli rozbití buněčných stěn v pletivu (Harrison, 2011). Obvykle se homogenizace provádí drcením pomocí třecí misky s tloučkem pod kapalným dusíkem a následným mletím v homogenizátoru. Po homogenizaci v třecí misce je rostlinný materiál přemístěn do mikrozkuavek, poté je přidáno vhodné extrakční činidlo s homogenizačními kuličkami (z karbidu wolframu nebo oxidu zirkoničitého) a následně je provedeno mletí na kulovém mlýnku (Tarkovská *et al.*, 2014).

PECs tvoří skupinu poměrně polárních sloučenin, a proto se při jejich extrakci obvykle používá polární rozpouštědlo, jako je např. metanol (MeOH). Další krok představuje většinou použití jednoho nebo více rozpouštědel s cílem odstranit převážnou část polárních a nepolárních nečistot před samotnou analýzou (Lafont *et al.*, 2012).

Přestože se nejčastěji používá k extrakci MeOH, alternativou mohou být i jeho směsi s vodou, méně toxický EtOH nebo aceton, příp. acetonitril (ACN). Extrakce se může provádět při pokojové teplotě, ale mírným zahříváním ($< 60^\circ\text{C}$) nebo dokonce při použití Soxhletova extraktoru se může účinnost extrakce významně zvýšit (Lafont *et al.*, 2012).

Surový extrakt se zahustí za sníženého tlaku a tím vznikne koncentrát olejovitého charakteru. Polarita PECs umožňuje jejich purifikaci pomocí rozdělovacích metod. V případě, kdy jsou přítomné jak polární tak nepolární PECs (např. fosfátové konjugáty a acylové estery) je jasné, že se tyto deriváty budou purifikovat odlišnými způsoby v závislosti na jejich polaritě a že tedy může dojít ke ztrátě jedné z těchto dvou skupin. V raných studiích (Horn, 1971) bylo rozdělování provedeno pomocí vodného roztoku a 1-butanolu. Butanolvý zbytek, do kterého se vyextrahovaly PECs, se rozdělil mezi vodný roztok MeOH a hexan za účelem odstranění nepolárních látek jako jsou např. lipidy. Následně ale bylo zjištěno, že obrácený postup byl výhodnější. Vedl ke snížení tvorby emulze v průběhu rozdělování a bylo méně problémů s pěněním při odpařování. Dalším vhodným rozpouštědlem pro odstranění lipidů je směs hexan/MeOH (7:3, v/v), lehký petrolej (o teplotě varu $40 - 60^\circ\text{C}$) nebo směs hexan/1-propanol (1:3, v/v), přičemž ECs zůstávají ve vodné bázi. Také se zjistilo, že přidání síranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zlepšuje separaci fází. Separace polárních nečistot od PECs může být dosaženo

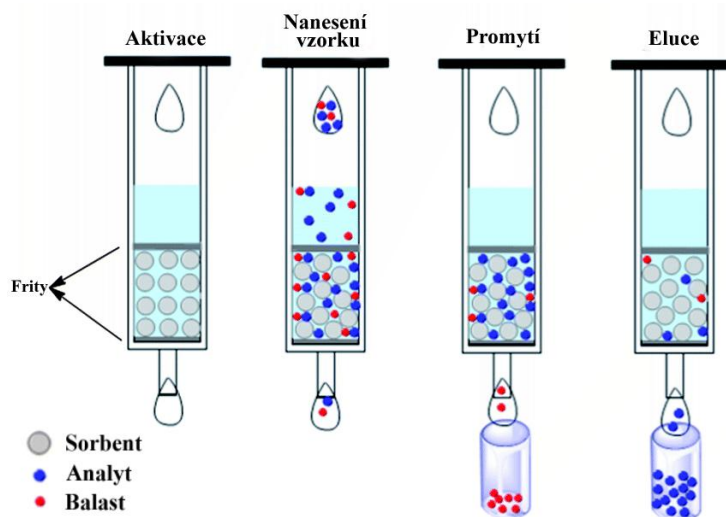
rozdělením mezi vodu/1-butanol (PECs zůstávají v organické fázi) a vodu/etylacetát (PECs zůstávají ve vodné fázi). Mezi hlavní faktory, kterými se řídí výběr rozdělovací techniky, je typ nečistoty, která má být odstraněna (např. snaha zbavit se hlavně lipidů nebo hlavně polárních látek apod.), a povaha PECs, které mají být izolovány. Kombinace dvou po sobě jdoucích purifikačních kroků umožňuje eliminaci jak polárních tak nepolárních nečistot. Použitím dvou kroků, které mají jedno společné rozpouštědlo, se lze vyhnout odpařování mezi těmito kroky. Je tedy možné kombinovat chloroform/voda a voda/1-butanol (chloroform může být nahrazen polárnějším rozpouštědlem, např. isobutylacetátem) a PECs zůstávají ve vodné fázi (Matsumoto a Kubo, 1989).

Protiproudá extrakce (CCD, z *angl.* counter-current distribution) mezi 1-butanol a vodu je účinná při odstraňování polárních nečistot (Horn a Bergamasco, 1985). Butenand a Karlson (1954) použili pro purifikaci E z kukel bource metodu Craigovy protiproudé extrakce s použitím rozpouštědel butanol/cyklohexan/voda (6:4:10 v/v/v). Tato metoda umožnila účinnou separaci dvou různých frakcí obsahující E a 20E. Stejně dva ECs byly později také izolovány z extraktu kukel bzučivky (Karlson, 1956).

Kapková protiproudá chromatografie (DCCC, z *angl.* droplet counter-current chromatography) zajišťuje účinnou purifikaci vzorků (až v hodnotách gramů) a patří do skupin chromatografických metod založených na dělení v systému kapalina-kapalina. Za příznivých podmínek lze získat pomocí tohoto postupu i čisté sloučeniny (Kubo *et al.*, 1985). Obecně ale platí, že pro získání čistých PECs je nutné dále použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC, z *angl.* high-performance liquid chromatography). Novější verzí protiproudé chromatografie je vysokorychlostní protiproudá chromatografie (HSCCC, z *angl.* high speed counter-current chromatography), kdy kolonou je vícevrstevná spirála, v ní je kapalná stacionární fáze a za pomoci odstředivé síly je kapalná mobilní fáze (MF) tlačena přes kolonu. Tato metoda poskytuje vysoký výtěžek a čistotu látky a separace je dosaženo během několika hodin na místo dnů jako je tomu u DCCC (Ito, 1986; Sethi *et al.*, 2009).

Další technikou izolace PECs může být nízkotlaká kolonová chromatografie. Pomocí preparativních kolon může být vzorek snadno obohacen. Lze použít buď systému normálních fází (NP, z *angl.* normal phase – např. silikagel nebo alumina gel), nebo systému z reverzních fází (RP, z *angl.* reversed phase – např. hydrofobní pryskyřice, polyamid, C18). Eluce obvykle probíhá použitím MF se zvýšenou eluční silou, frakce se sbírají a následně separují pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC, z *angl.* thin-layer chromatography) nebo dnes častěji pomocí HPLC. Malé kartridže nebo stříkačky obsahující 0.2 - 1 g RP-HPLC se ideálně hodí pro rychlé vyčištění malých vzorků. Mohou být také použity pro účely odsolení, např. lze přímo adsorbovat PECs z kultivačního média nebo z pufru používaného pro enzymatickou hydrolyzu konjugátů (Lafont *et al.*, 2012).

V této práci byla pro purifikaci PECs použita technika extrakce na pevné fázi (SPE, z *angl.* solid-phase extraction; Obr. 7), která je dnes hojně využívána k purifikaci různých látek, ale lze ji použít i pro izolaci čistých látek. SPE slouží k obohacení analytů, např. právě PECs, efektivním odstraněním některých balastních látek s odlišnou polaritou. Jako stacionární fáze se často využívá polyamid a jeho poměr může být ke vzorku okolo 1:10 (w/w). PECs jsou na polyamidu eluovány dřív než nečistoty, např. fenoly, čímž se výrazně snižuje riziko kontaminace (Báthori, 2002).



Obr. 7: Obecné schéma izolace analytu pomocí SPE kolony, kde dochází nejdříve k eluci nečistot a následně k eluci analytu (upraveno dle Su *et al.*, 2014).

3.5 METODY STANOVENÍ FYTOEKDYSTEROIDŮ

Pro separaci PECs je nejpobulárnější technikou HPLC a to jak pro analytické, tak pro preparativní účely. U NP systémů (stac. fázi je silikagel) se obvykle používá směs chlorovaného rozpouštědla (např. dichlormetan CH_2Cl_2) a alkoholu (např. MeOH, EtOH, 2-propanol). Následně se přidává voda kvůli symetrii píků. Příslušné podíly těchto tří komponent se optimalizují podle polaritu vzorku (Lafont *et al.*, 1979). Mohou být použity i kolony s modifikovaným silikagelem jako např. aminopropylsilan (APS), které se ukázaly být efektivní při separaci $3\alpha\text{-OH}$, $3\beta\text{-OH}$ a 3-oxo PECs (Dinan *et al.*, 1981). RP systémy (stac. fáze na bázi C18) jsou používány nejvíce a pro eluci se používá např. směs MeOH/voda. Pro polární konjugáty a 26-kyseliny je zde naprosto nezbytná suprese iontů, např. použitím kyselejších pufrů (Lafont *et al.*, 2012).

V této práci byla použita technika ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC, z *angl.* ultra-high performance liquid chromatography). Díky tomuto formátu LC došlo oproti HPLC k urychlení analýzy a ke zvýšení schopnosti rozlišení separovaných látek, a to díky vývoji kolon s porézními částicemi o velikosti méně než 2 μm . S použitím takto malých částic je ale potřeba systém, který je schopný odolávat velmi vysokým tlakům (vyšším než 400 bar). Proto je např. první volbou mobilní fáze ACN oproti MeOH, který je více viskózní. Systém by měl být také upraven na provoz v rychlém režimu, čehož se dosahuje snížením objemu kolony. Kolony s menším průměrem jsou sice limitovány zahříváním, které vzniká třením způsobeným vysokými tlaky a velkým průtokem. Na druhou stranu se tím ale snižuje spotřeba solventů (Guillarme a Veuthey, 2008).

Další vhodnou metodou pro separaci steroidů může být superkritická fluidní chromatografie (SFC), která využívá jako MF kapalinu v superkritickém stavu. Jde o látku (nejčastěji plyn) stlačenou nad kritický tlak (p_c) a zahřátou nad její kritickou teplotu (T_c). Superkritické kapaliny jsou známy už zhruba sto let, ale jejich obrovský potenciál byl registrován teprve od roku 1980, kdy se použily pro chemickou syntézu (Lancaster, 2002). První uskutečněná separace za teploty a tlaku přesahující kritické hodnoty byla uskutečněna už v roce 1962 a svým instrumentálním uspořádáním se podobala spíše plynové chromatografii (GC, z *angl.* gas chromatography; Klesper *et al.*, 1962). První komerční přístroj pro SFC byl uveden na trh až o dvacet let později jako rozšíření chromatografu pro HPLC. Po různých vývojových změnách se dnešní SFC chromatografy podobají HPLC přístrojům, od nichž se odlišují hlavně regulátorem zpětného tlaku (ABPR, z *angl.* automated back pressure regulator). Kolony pro SFC jsou převážně náplňové o rozměrech 15 až 30 cm s vnitřním průměrem 2 až 4,6 mm a velikostí částic 3 až 5 mm. Pro ultraúčinnou SFC (UHPSFC) se využívají kolony obsahující částice menší než 2 μm a vzhledem k parametrům dnešních přístrojů mívají rozměr 3,0×100 mm. Stacionární fáze (SP, z *angl.* stationary phase) kolony jsou materiálově podobné SP používaným v HPLC, silikagel, popř. jeho modifikace s polárními (kyanopropyl, aminopropyl, diol) nebo nepolárními skupinami (oktyl, dodecyl nebo oktadecyl). Superkritická kapalina má hustotu blízkou kapalinám, viskozitu podobnou plynům a nulové povrchové napětí. Jednou z hlavních a velmi důležitých vlastností je rozpustnost látek v těchto kapalinách, která při konstantní teplotě roste s jejich hustotou. Díky nízké viskozitě superkritické kapaliny je přenos hmoty velmi rychlý a analýza může proběhnout v krátkém čase při zachování její efektivity. MF je obvykle nadkritický oxid uhličitý CO_2 ($T_c = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $p_c = 75\text{ bar} = 7.5\text{ MPa}$) obsahující malé množství organického činidla, např. MeOH. Nadkritický CO_2 je nepolární, a proto je SFC více méně ekvivalentní s NP-HPLC. Chromatografické parametry, které mohou být optimalizovány, jsou teplota, tlak a podíl organického rozpouštědla, kterým lze regulovat eluční sílu (Morgan *et al.*, 1988; Raynor *et al.*, 1988, 1989). Výhodou SFC před HPLC jsou kratší retenční časy a možnost použití FTIR detektorů (*angl.* Fourier transform infrared),

protože CO₂ neovlivňuje absorpci IR paprsků (Lafont *et al.*, 2000). Oproti GC má SFC i LC v případě analýzy steroidů výhodu v tom, že není nutná jejich derivatizace. Z tohoto důvodu není GC v dnešní době tak hojně pro analýzu PECs využívána (Lafont *et al.*, 2012).

Kapilární elektroforéza (CE, z *angl.* capillary electrophoresis) umožňuje také efektivní separaci celé řady biologicky významných látek až do molekulových hmotností cca 10⁶. S relativním úspěchem byla použita i pro separaci PECs (Demlová, Bakalářská práce, 2015; Large *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1993). CE je velmi účinnou separační technikou pro širokou škálu ionizovaných i neionizovaných látek. Analyty putují kapilárou od anody (nástříkový prostor) směrem ke katodě (detektor) vlivem elektroforézy, elektroosmózy a zejména díky elektroosmotickému toku (Kašička, 1997). Separace probíhá na základě jejich elektroforetické pohyblivosti μ , která je funkcí celkového náboje částice, její hmotnosti, tvaru a odporu (viskozity) okolního prostředí. Protože většina PECs nemá iontový charakter, je možné tyto látky pomocí CE separovat pouze ve formě micel, tj. tzv. micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC, z *angl.* micellar electrokinetic chromatography). Do nosného (základního) elektrolytu se v tomto případě přidá povrchově aktivní látka (surfaktant, např. dodecylsulfát sodný, SDS), a to o koncentraci vyšší než je jeho kritická micelární koncentrace (CMC; koncentrace, při níž začíná docházet k tvorbě micel). Micely jsou částice skládající se z hydrofobní části (hydrofobní řetězce) a části hydrofilní (hlavička). Hydrofilní hlavička je orientovaná do vodného prostředí a hydrofobní část tvoří nepolární jádro, které může rozpouštět složky vzorku. Nejčastěji mají micely kulovitý tvar, ale mohou vytvářet i elipsoidy, válce a dvojvrstvy. Nepolární jádra vytvářejí tzv. pseudostacionární fázi. Micely SDS mají záporný náboj a migrují proti elektroosmotickému toku, který je dostatečně silný na to, aby je unášel k detektoru. Složky vzorku se rozdělují mezi pseudostacionární fázi v micelách a vodný pufr jako MF, přičemž nastává jejich retence obdobně jako v HPLC. Látky více zadržované v micelách mají delší migrační časy (t_m) a naopak (Český lékopis, 2009).

PECs lze v eluátu detekovat několika způsoby. Jak již bylo řečeno, tyto látky absorbují záření při cca 245 nm, což umožňuje jejich snadnou detekci pomocí UV detektoru. S výhodou lze použít detektor s diodovým polem, kde je možné odečíst absorpční spektra všech eluovaných píků (Lafont *et al.*, 2012).

Hmotnostní spektroskopie (MS, z *angl.* mass spectrometry) byla při objasňování ekdysteroidové struktury neocenitelná a je zvláště užitečná pro stanovení PECs ve vzorcích s nízkou hladinou těchto látek. Ve většině raných studií bylo používáno relativně nesofistikovaných technik MS s přímým nástřikem (např. elektronová ionizace – EI), ale použitím nových ionizačních technik se využití MS zvýšilo. Při EI, řadí se k tzv. „tvrdým“ ionizačním technikám, se používá svazek rychle letících elektronů, které z molekuly analytu v plynném stavu vyrazí elektron za vzniku kladně nabitého iontradikálu, jenž je dále štěpen na množství fragmentů (Friedecký a Lemr, 2012). Pro netěkavé relativně hydrofobní látky, jako

jsou PECs, se používá ionizační napětí okolo 70 eV. Technika poskytuje bohatá fragmentační spektra umožňující identifikaci analyzované sloučeniny. Pro steroidy lze nalézt fragmenty odpovídající steroidnímu jádru a dále fragmenty náležející postrannímu řetězci. Jde tedy o techniku s vysokou vypovídací hodnotou zejména pro kvalitativní analýzu, tj. pro objasnění struktury steroidu. Alternativou EI může být využití chemické ionizace (CI). U této techniky je nejprve ionizován reakční plyn, např. metan, a až potom molekuly analytu. Těm je při ionizaci předáváno méně energie a nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci jako u EI. Analyt poskytuje $[M+H]^+$ iont a umožňuje tak získat jeho molekulovou hmotnost. Metoda byla úspěšně aplikována i pro stanovení molekulových hmotností PECs (Lafont *et al.*, 1981). Ionizace urychlenými atomy využívá paprsku neutrálních atomů (argonu nebo xenonu) nesoucí vysokou kinetickou energii. Používá se pro ionizaci netěkavých iontových nebo neiontových sloučenin v pevném skupenství nebo v glycerolové matrici. Tato technika je vhodná zejména pro polární PECs, tedy fosfátové konjugáty (Isaac *et al.*, 1981; Modde *et al.*, 1984), ekdysonové kyseliny (Isaac *et al.*, 1984), ale funguje i s neiontovými PECs (Rees a Isaac, 1985). Metodu lze použít v pozitivním módu (charakterizace derivátů mastných kyselin; Dinan, 1988) i v módu negativním (Wilson *et al.*, 1982). Ionizací urychlenými atomy lze stanovit také počet hydroxylových skupin v molekule za použití deuterované matrice (Pis a Vaisar, 1997). Pro analýzu biologických vzorků se v současné době široce využívá ionizace elektrosprejem (ESI, z *angl.* electrospray ionisation). ESI patří k „měkkým“ ionizačním technikám a umožňuje získání iontů s vysokou intenzitou. Je určena pro molekuly, které by při ionizaci některou z „tvrdých“ ionizačních technik poskytly spoustu fragmentů, ale nízké intenzity (Hellou *et al.*, 1994). Ionizace probíhá za atmosférického tlaku vložením vysokého napětí na elektrodu (2-5 kV). Nejčastěji se pracuje ve spojení s LC, kdy na hrotu elektrody/kapiláry vznikají nabitě kapičky – aerosol, do kterého vstupuje roztok (MF s analyty). Tvorba aerosolu je podporována koaxiálně proudícím zmlžujícím plynem a rozpouštědlo je z nabitých kapiček během velmi krátkého času postupně odpařováno proudem plynu za zvýšené teploty, čímž se docílí zvýšení jejich povrchového náboje. Coulombické odpuzování v jistém okamžiku překoná povrchové napětí a dochází k explozi nabitě kapičky. Tím dojde k uvolnění iontů z jejich povrchu do plynné fáze. ESI je robustní ionizační technikou použitelnou pro valnou většinu analytů vyjma solí, které způsobují potlačení tvorby iontů analytu (ion suppression; Fridecký a Lemr, 2012).

Podstatnou součástí každého hmotnostního spektrometru je analyzátor, který je zodpovědný za separaci iontů na základě poměru hmotnosti k náboji (m/z). Analyzátor lze rozdělit do několika skupin podle způsobu separace iontů a jejich propouštění k detektoru. První skupinu tvoří analyzátor, které kontinuálně v čase separují a vysílají k detektoru ionty s určitou hodnotou m/z . Typickými zástupci jsou kvadrupólové analyzátor nebo sektorové přístroje. Druhá skupina analyzátorů pouští všechny ionty současně do letové trubice, kde pak dochází

k jejich separaci díky rozdílné době letu (závisí na hmotnosti iontu) k detektoru. Jde o tzv. průletové analyzátoři (TOF, z *angl.* time of flight). Nejrozšířenějším analyzátořem je pak kvadrupól. Jedná se o kombinaci čtyř tyčů, na které je přivedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí (elektrody naproti sobě mají vždy stejnou polaritu). Na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku se ionty s určitou hodnotou m/z pohybují po stabilní trajektorii dále k detektoru, popř. další části analyzátořu. V této práci byla použita tandemová hmotnostní spektroskopie (MS/MS) využívající tzv. trojitý kvadrupól. Jde o soustavu dvou kvadrupólů, mezi nimiž je umístěna kolizní cela. Ionty letící z prvního kvadrupólu (prekurzorové ionty) jsou v kolizní cele vystaveny srážkám s molekulami či atomy kolizního plynu (dusík, argon) a za současně aplikovaného elektrického pole (kolizní energie) jsou urychleny, čímž dojde ke zvýšení jejich vnitřní energie, a tím k jejich fragmentaci na specifické fragmenty (produktové ionty). Ty následně vstupují do druhého kvadrupólu. Jedná se o tzv. kolizně indukovanou disociaci (CID, z *angl.* collision-induced dissociation). Trojitý kvadrupól může pracovat ve čtyřech režimech: 1) sken produktových iontů, 2) sken prekurzorových iontů, 3) sken neutrální ztráty a 4) monitorování rozpadu iontu (MRM, z *angl.* multiple reaction monitoring) – Friedecký a Lemr, 2012. Poslední ze zmíněných skenovacích režimů trojitého kvadrupólu byl použit pro kvantifikaci PECs v této práci.

Fragmentacím PECs dominují ionty odpovídající steroidnímu jádru a postrannímu řetězci (Nakanishi, 1971). Vzhledem k tomu, že při EI-MS se snadno odštěpuje z polyhydroxylovaných PECs voda, molekulární ionty jsou obvykle slabé (< 1 %) a ionty s $m/z = 18$ jsou často jasně patrné. Oblast spektra PECs má sklon být tedy charakterizována pomocí iontů s $m/z = 18$, které odpovídají postupným ztrátám vody (Horn, 1971). Přítomnost 20,22-diolu umožňuje štěpení bočního řetězce, což vede ke vzniku nápadných fragmentů o $m/z = 99$ pro 20E (hodnota m/z závisí na struktuře postranního řetězce), který často tvoří základní pík EI spektra. Ionť o $m/z = 81$ je také často pozorován, což je pravděpodobně důsledek odštěpení vody z fragmentu postranního řetězce (Horn, 1971; Nakanishi, 1971). Při absenci 20,22-diolu je pozorována fragmentace mezi uhlíkem C-17 a C-20, což je méně obvyklá fragmentace. V případě, že v postranním řetězci byl přítomen na uhlíku C-24 metyl nebo etyl (např. u makisteronu A nebo C) jsou fragmenty o $m/z = 99$ a 81 vyšší o 14 nebo 28 hmotnostních jednotek (Nakanishi, 1971).

Pro stanovení struktury PECs lze také použít metodu nukleární magnetické rezonance, kde se obecně používá $^1\text{H-NMR}$ nebo $^{13}\text{C-NMR}$ a u fosfátových konjugátů pak $^{31}\text{P-NMR}$ (Hetru *et al.*, 1985; Rees a Isaac, 1985).

Mimo fyzikálně-chemických technik byly v minulosti také používány biotesty a imunoanalytické metody. K analýzám se používalo surových extraktů nebo frakcí odebraných ze separací např. pomocí TLC nebo HPLC. Imunoanalytické metody využívají protilátky

získané imunizací zvířat pomocí vhodně upraveného PEC, který sám není imunogenní. Nejčastěji se k tomuto účelu používalo připojení k vhodnému proteinu. Tím vznikl protein-ekdysonový komplex, který už byl silně imunogenní (Lafont *et al.*, 2012). Ke stanovení koncentrace ECs v živočišných nebo rostlinných extraktech byly používány i různé druhy *in vitro* a *in vivo* biotestů (Butenand a Karlson, 1954). Ty zároveň sloužily ke stanovení relativní biologické aktivity různých ECs.

3.6 ROSTLINY S OBSAHEM FYTOEKDYSTEROIDŮ

V rámci vyšších rostlin byly PECs nalezeny jak u nahosemenných, tak u krytosemenných rostlin, u jedno- i víceletých, stejně jako u jedno- i dvoudomých. Předpokládá se, že významné hladiny těchto látek se nachází u zhruba 5-6 % suchozemských rostlin (Imai *et al.*, 1969; Dinan, 1995a). Je ovšem potřeba zdůraznit, že do současné doby bylo na obsah PECs testováno pouze cca 2 % pozemské flóry (Dinan, 2001). Od dob objevu prvních ekdysteroidů je k dnešnímu dni známo již více než 300 sloučenin ekdysteroidního charakteru rostlinného původu, které byly detekovány ve více než 100 druzích suchozemských rostlin, přičemž 20E je nejrozšířenější se vyskytující z nich (Lafont *et al.*, 2002). Má se za to, že většina rostlin si udržuje genetickou schopnost produkovat PECs (mají všechny geny pro biosyntetické enzymy PECs), ale zároveň i většina druhů potlačuje jejich akumulaci (Hikino *et al.*, 1973; Yen *et al.*, 1974). Je zajímavé, že ke skupině rostlin zmonitorované na obsah PECs nespadá většina potravinářských plodin. Důvodem může být fakt, že pěstované rostliny byly šlechtěné pro produktivitu a tím ztratily svou schopnost vytvářet sekundární metabolity včetně PECs. Mezi plodiny, které obsahují významná množství PECs, se řadí špenát, merlík čilský známý spíše jako quinoa (*Chenopodium quinoa*), jam (*Dioscorea* sp.), který je podobný batátu a někdy je nazývaný smldinec nebo „světelný kořen“, a také žampion. Většina ostatních plodin používaných v potravinářství, které byly na výskyt PECs testovány, obsahovala buď malé, nebo žádné množství těchto látek (Dinan, 1995b; Grebenok a Adler, 1991; Findeisen, 2004; Sautour *et al.*, 2008). Na druhou stranu u mnoha rostlin používaných v tradiční medicíně byly PECs detekovány ve významném množství (Sláma a Lafont, 1995; Lafont, 1998; Báthori, 2002). Tyto rostliny většinou obsahují velmi složitou směs těchto látek a řadí se mezi ně zejména sibiřská bylina parcha saflorová (*Leuzea cathamoides*; Vokáč *et al.*, 2002) nebo srpice barvířská (*Serratula tinctoria*; Rudel *et al.*, 1992). Parcha patří mezi trvalky a bylo prokázáno, že u ní obsah PECs během roční sezóny kolísá. Během jara jsou nejvyšší hladiny nalezeny v nadzemní části, zatímco na podzim dosahují hladiny PECs nejvyšších hodnot v části kořenové (Grebenok *et al.*, 1991). U jednoletých rostlin, jako je např. špenát, je nejvyšší koncentrace těchto látek nalezena zpravidla v mladých listech nebo obecně v těch pletivech, které jsou považovány za zásadní

pro přežití rostlin - prášníky, semena apod. (Dinan, 1992a; Grebenok a Adler, 1993; Dinan *et al.*, 2009).

Biologický význam PECs je stále předmětem diskuze. Nejpravděpodobnější hypotézou o jejich funkci v rostlinách je, že přispívají k ochraně proti bezobratlým škůdcům tak, že je donutí ke snížení spotřeby rostlinného materiálu nebo se dokonce díky PECs naruší endokrinní systém škůdce, což způsobí jeho úhyn. PECs takto působí buď samostatně, nebo ve spojení s jinými sekundárními metabolity (Dinan *et al.*, 2009). Tato hypotéza byla podpořena několika experimenty s využitím exogenní aplikace PECs nebo využitím transgenních rostlin se zvýšenou hladinou endogenních PECs. Např. Udalova *et al.* (2004) zjistila, že sprejování rostlin rajčete roztokem α -E vede k redukci zamoření škůdcem *Meloidogyne inkognita*, což je hlístice napadající kořenový systém rostliny. Podobně Soriano *et al.* (2004) pozoroval, že vystavení cyst hlístic, které škodí obilninám, exogenně aplikovanému 20E o koncentraci vyšší než 10^{-6} M výrazně redukovalo jejich kapacitu napadnout kořeny testované rostliny pšenice. Bylo zjištěno, že parazitující hlístice vystavené exogennímu 20E nebo zvýšeným endogenní hladinám této substance v rostlině vykazují abnormální ekdysi, imobilitu, sníženou invazivnost a poruchy vývoje vedoucí k jejich úhynu. V neposlední řadě Schmelz *et al.* (1999) pozoroval, že rostliny špenátu, jež byly inokulované dvěma typy obilných hlístic a jedním typem hlístic napadajících kořeny, byly méně poškozeny, jestliže hladiny endogenních PECs byly zvýšeny v důsledku ošetření rostlin metyl jasmonátem (MeJA).

3.6.1 ŠPENÁT SETÝ (*SPINACIA OLERACEA* L.)

Špenát patří mezi rostliny, které jsou bohaté na PECs (Dinan, 1995b). Dříve se špenát řadil do čeledi merlíkovité (*Chenopodiaceae*), což byla velká skupina rostlin (kolem 100 rodů zahrnující asi 1500 druhů), jejichž výskyt byl zaznamenán v mnoha částech světa. Řadilo se mezi ně mnoho zemědělsky významných rostlin, ať už šlo o užitkové rostliny nebo plevelné rostliny. Přítomnost PECs v rámci této čeledi byla potvrzena u spousty druhů, např. u léčivé byliny merlíku všedobru (*Chenopodium bonus-henricus*), kterému se lidově také říká „planý špenát“ (Bathory *et al.*, 1982) či u merlíku bílého (*Chenopodium album*; Toth *et al.*, 1981), což je jedna z nejčastěji se vyskytujících se rostlin na planetě. Informace o distribuci PECs ve skupině merlíkovitých jsou přehledně shrnuty v článku od Dinana *et al.* (1998) a v databázi Ecdybase (www.ecdybase.org).

Dnes se řadí, jak rod *Chenopodium*, tak rod *Spinacia* do čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*). Kvůli rozdílným morfologickým znakům byly dříve laskavcovité a merlíkovité rozdělovány do samostatných skupin, ale pomocí molekulárních metod bylo zjištěno, že tradiční zařazení některých rodů neodpovídá prokázaným evolučním vztahům

a při poslední úpravě taxonomického systému APG III v roce 2009 (Angiosperm Phylogeny Group - taxonomický systém krytosemenných rostlin) bylo uznáno za vhodnější čeleď rozšířit, celou čeleď merlíkovitých zařadit do čeledi laskavcovitých a označení merlíkovité užívat jako synonymum (Grulich, 2013). Laskavcovité je čeleď rostlin z řádu hvozdíkotvaré, která je druhově velmi rozsáhlá, a některé z jejích rostlin jsou relativně starobylé. Lze tak usoudit z toho, že jejich pyl byl nalezen ve fosiliích z rozhraní druhohor a třetihor (cca před 65 miliony lety; Welsh *et al.*, 2004). V roce 2013 se řadilo mezi laskavcovité asi 170 rodů a 2100-2500 druhů rostlin (Grulich, 2013). Kromě merlíkovitých byl prokázán výskyt PECs v rámci laskavcovitých také u dalších asi 25 rostlin z 11 rodů. Jedním z nich jsou pestrovky (*Gomphrena*), např. pestrovka Haageova (*G. Haageana*; Sarker *et al.*, 1996; Savchenko 1998), což je vytrvalá endemická bylina z Madreánské oblasti Severní Ameriky (Kovář, 2014), dále druh *G. celosioides* (Banerji *et al.*, 1971) a *G. dispersa* (Savchenko, 1998). Také byl prokázán výskyt u rostlin rodu *Cyathula* (Hikino *et al.*, 1968; Shah a De Souza, 1971) a u jihoamerických bylin rodu *Pfaffia* (Nishimoto *et al.*, 1987; Shiobara *et al.* 1993). PECs izolované z rostlin posledních dvou jmenovaných rodů (ale nejen těch) se běžně používají pro komerční účely - od hedvábnictví a včelařství až po výrobu potravinových doplňků a kosmetiky (Lafont a Dinan, 2009). PECs byly také objeveny u vytrvalé byliny *Achyranthes bidentata* (Li *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2005), jejíž kořeny se hojně používají v tradiční čínské medicíně díky svým mnohým farmakologickým účinkům (Meng a Li; 2001). Dále byl prokázán výskyt např. u rostlin rodu *Amaranthus* (Takemoto *et al.*, 1967b; Wong *et al.*, 1979; Bratoeff *et al.*, 1996) nebo *Alternanthera* (Wong *et al.*, 1979; Takemoto *et al.*, 1967b).

Špenát je chladnomilná rostlina dlouhého dne (při vysokých teplotách a dlouhém dnu vybíhají do květu), a proto se vyžívá jako jarní nebo ozimá zelenina. Rostliny špenátu jsou lysé až na mladé listy mající měchýřkovité trichomy, které tím získávají pomoučený vzhled. Špenát vytváří přizemní růžice se sytě zelenými listy, jež mívají trojúhelníkovitě vejčitou čepel (Kubát *et al.*, 2002), mohou se ale tvarově lišit (Skorňakov *et al.*, 1988). Později se vytváří vysoká lodyha s květenstvím, která může dorůstat výšky 30 cm až 1 m. Lodyžní listy jsou zaobleně střelovité až hrálovité. Z hospodářského hlediska je tvorba květu nežádoucí, protože kvetoucí špenát má hořkou chuť. Špenát je terofyt, tzn., že je jednoletou rostlinou bez obnovovacích pupenů a nepříznivá období přežívá pouze v semenech. (Kubát *et al.*, 2002; Skorňakov *et al.*, 1988).

Původní planá forma není známá, ale nejpravděpodobněji se vyvinul z druhu *Spinacia tetrandra*, který roste planě v Přední a Střední Asii (*S. oleracea* může také i dnes zplaňovat, avšak k tomu dochází jen vzácně; Kubát *et al.*, 2002). Poprvé je špenát popisován Čiňany jako bylina Persie – oblast dnešního Íránu (Nonnicke, 1989; Swiader a Ware, 2002). Odtud pronikl přes Sýrii nejprve do dalších arabských zemí a do severní Afriky a od konce starověku (6. až 7. století) se objevuje ve Španělsku. První recepty, ve kterých se používá špenát, jsou dochovány

v anglické kuchařské knize „The Forme of Cury“ z roku 1390 (sestaveno Mistry kuchaři krále Richarda II.). Ze středomoří se pěstování špenátu později rozšířilo i do dalších částí Evropy, byl zadokumentován v Německu a od konce 16. století byl již všeobecně znám a pěstován na téměř celém evropském kontinentě (Dicoteau, 2000; Swiader a Ware, 2002). S výjimkou tropických oblastí je špenát v současné době pěstován skoro po celém světě. V roce 2013 dosahovala světová produkce špenátu podle FAO (Food and Agriculture Organization) 23 miliónů tun, na kterých se z 90 % podílela Čína následovaná Spojenými Státy (1.5 %), Japonskem (1.1 %) a Tureckem (1.0 %). Česká republika se v tomto roce podílela na celkové světové produkci 0.01 % (Food and Agriculture Organization, 2013).

Špenát je původně dvoudomá rostlina a samčí rostliny je možné rozlišit tak, že vybíhají dříve do květu a jsou méně olistěné, v potravinářství jsou proto méně hodnotné než rostliny samičí. Dnes ale existují i kultivary jednodomé (Troníčková, 1985).

Tuto rostlinu je možné sklízet několikrát do roka díky poměrně krátké vegetační době (asi 30 až 45 dní). V období kvetení lze pozorovat drobné, žlutozelené květy, které jsou nahloučené v paždí listů (Obr. 8). Plodem je nažka s velmi tvrdým zelenavým oplodím. Přestože špenát pochází z teplejších oblastí, uvádí se, že je odolný vůči nízkým teplotám (až dokonce mrazuvzdorný) a pokud nejsou silné holomrazy, celkem dobře přezimuje. Je ale náročný na vláhu a vyžaduje humózní a zásadité půdy s dostatečnou zásobou živin, hlavně dusíku (Dolejší, 1982; Skorňakov, 1988; Troníčková, 1985).



Obr. 8: Špenát setý *Spinacia oleracea* L. (A) kultivovaný na perlitu po dobu 29 dní na pracovišti VÚRV, v.v.i. (viz kap. 4.4.1). Jedná se o japonský kultivar Flaylander. Detail květenství na téže rostlině (B).

3.6.2. KULTIVARY ŠPENÁTU

Jednotkou taxonomie kulturních rostlin je kultivar. Jde o jednotku nižší než je druh. Název kultivar vychází z anglického „cultivated variety“, zkracuje se jako „cv.“ a označuje uměle vypěstovaný nebo nalezený užitečný organismus, který má vlastnosti, jež jej odlišují od ostatních podobných a tyto vlastnosti si podržuje i po rozmnožení (viz zákon č. 219/2003 Sb. o oběhu osiva a sadby). Špenát existuje ve více než 400 kultivarech (Pandy a Kalloo, 1993). Hybridní kultivary špenátu byly zavedeny v 50. letech 20. století a staly se hlavními pěstovanými typy (Morelock a Correll, 2008). Nicméně farmáři z Íránu (země původu špenátu, kap. 3.6.1) v současné době stále využívají domorodé druhy této rostliny, které mají dobrou adaptabilitu vůči různým lokálním podmínkám pěstování. Jejich výnos je ale velmi nízký (obvykle cca 2000 kg/ha) ve srovnání s nejvyššími výnosy špenátu např. v Japonsku (12 471 kg/ha; Sabaghnia *et al.*, 2014), kde je v současnosti k dispozici až 182 kultivarů špenátu, a to převážně hybridních (Kaminishi a Kita, 2006). V rámci této diplomové práce bylo použito několik kultivarů (viz kap. 4.2), z nichž většina pochází z genových bank Holandska, dále z České republiky, Japonska, USA a Francie. Jednotlivé kultivary se vyznačují zejména různou rezistencí vůči vysokým teplotám, rozdílným kolísáním obsahu šťavelanu (význam viz kap. 3.6.3) během růstu rostliny, rozdílným obsahem karotenoidů či různou rychlostí klíčení a s tím související různou celkovou rychlostí růstu rostliny. Některé z těchto dějů závisí na různé odezvě rostliny na environmentální faktory, jako je délka dne a teplota, tzn., že kultivary jsou šlechtěny tak, aby reagovaly každý jinak na jinou délku dne (fotoperioda), popř. vyžadovaly/nevyžadovaly nízké teploty k indukci kvetení (jarovizaci). Divoký špenát roste nejlépe za nižších teplot na jaře a na podzim, zatímco rané a pozdní kultivary mohou sezónu pěstování prodloužit až do léta a zimy.

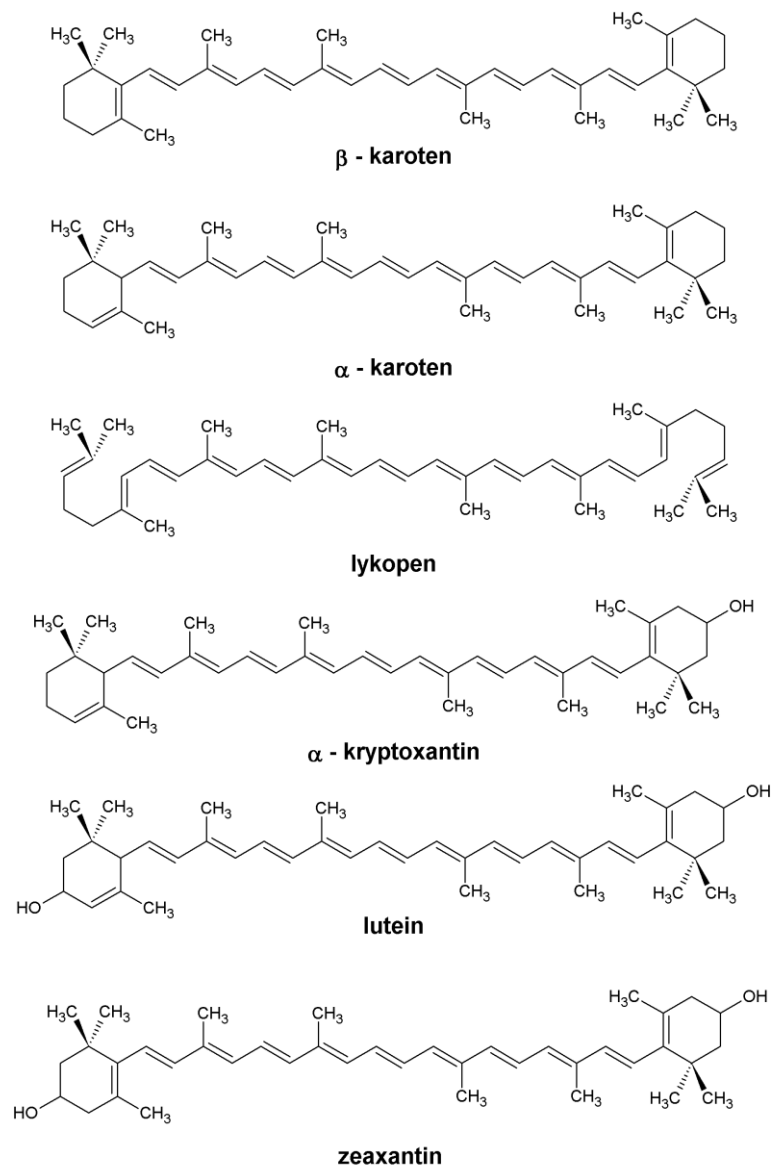
3.6.3 VÝZNAM ŠPENÁTU PRO ZDRAVÍ ČLOVĚKA

Špenát si dlouhodobě drží špičkové místo v prodeji a konzumu listové zeleniny. Je to zejména pro vysoký obsah karotenoidů, vitamínu C a kyseliny listové. Rostliny mohou u některých kultivarů obsahovat vysoké hladiny kyseliny šťavelové, jež je schopna chelatovat některé kationy a odvádět je tak bez užitku z organismu (Libert a Franceschi, 1987). Jde zejména o ionty vápníku a železa. Navíc tato kyselina může způsobovat problémy lidem trpícím tvorbou oxalátových kamenů ve vylučovacím traktu (Massey *et al.*, 1993). Kromě vápníku a železa obsahuje špenát z minerálních látek také např. jód, sodík, draslík a fosfor (Dolejší, 1982; Skorňakov *et al.*, 1988). Z aniontů je potřeba sledovat obsah dusičnanů v rostlině, neboť ty způsobují v krevním řečišti oxidaci hemoglobinu na methemoglobin (metHb), v důsledku

čehož může dojít až k methemoglobinémii (Gangolli *et al.*, 1994). Tento stav je ohrožující hlavně pro děti a projevuje se tak, že tato forma hemoglobinu není schopna přenášet kyslík do tkání a tím dochází ke tkáňové hypoxii (zasahuje hlavně mozek, srdce, plíce).

Co se týká vitamínů, současné kultivary nejsou bohaté pouze na vitamín C, ale také na vitamín K, E, a vitamíny skupiny B, konkrétně B₁, B₂ a B₉ – kyselinu listovou (Maeda *et al.*, 2010). Ta je ve vodě rozpustným vitamínem nezbytným pro syntézu nukleových kyselin, pro krvetvorbu a v neposlední řadě pro normální růst a vývod plodu (hlavně mozku a míchy, tj. nervové soustavy). Proto se její zvýšené množství doporučuje v době těhotenství a také před ním.

Špenát se ale pěstuje hlavně pro své významné fytonutriční složky zvané karotenoidy (Bunea *et al.*, 2008). Karotenoidy jsou skupinou pigmentů, které jsou syntetizovány rostlinami a mikroorganismy, avšak živočichové tuto schopnost pozbývají (Rao a Rao, 2007). Proto jsou ovoce a zelenina hlavními zdroji karotenoidů v lidské stravě (Mangels *et al.*, 1993; Johnson, 2002; Agarwal a Rao, 2000). Bylo prokázáno, že karotenoidy prospívají lidskému zdraví hlavně jako prevence kardiovaskulárních, nádorových a jiných chronických onemocnění jako je osteoporóza nebo diabetes (Paiva a Russell, 1999; Astrog *et al.*, 1997). V rostlinách se karotenoidy účastní fotosyntézy a poskytují jim ochranu proti poškození vlivem slunečního záření (antioxidační funkce). Karotenoidy jsou důležitým potravinovým zdrojem vitamínu A (retinol) a v poslední době byly hojně studovány především jejich antioxidační vlastnosti (Paiva a Russell, 1999). Karotenoidy si svou antioxidační vlastnost při přechodu do živočišné tkáně zachovávají a působí tím pádem antioxidačně i zde. Do současné doby bylo v přírodě identifikováno přes 600 karotenoidů (Rao a Rao, 2007). Pouze 40 z nich je jich ale přítomno v potravě člověka a jen 20 z těchto 40 karotenoidů bylo identifikováno v lidské krvi a tkáních. Valnou většinu (90 %) z těchto dvaceti karotenoidů reprezentuje β -karoten, α -karoten, lykopen a α -kryptoxantin (Gerster, 1997; Obr. 9).



Obr. 9: Struktury hlavních karotenoidů v potravě člověka.

Bylo zjištěno, že žlutooranžově zbarvené ovoce a zelenina poskytuje hlavně β -karoten a α -karoten, oranžové plodiny jsou zdrojem spíše α -kryptoxantinu, zatímco zelené zeleniny obsahují lutein a rajčata a výrobky z nich pak lykopen (Obr. 9; Mangels *et al.*, 1993; Ong a Tee, 1992).

Špenát se vyznačuje vysokými koncentracemi hned několika karotenoidů, zvláště pak luteinu a zeaxanthinu (Obr. 9). Tyto dva významné pigmenty jsou selektivně ukládány v sítnici očí, a to přesně v místě nejostřejšího vidění, v tzv. žluté skvrně neboli makule (centrální část oční sítnice). Makulární pigment je zodpovědný za filtrování škodlivého ultrafialové záření a pomáhá zabraňovat nemocem oka, jako je například šedý zákal (katarakta; dle WHO ve 48 % příčina slepoty v dospělosti), a makulárním degeneracím vyskytujícím se v souvislosti s věkem

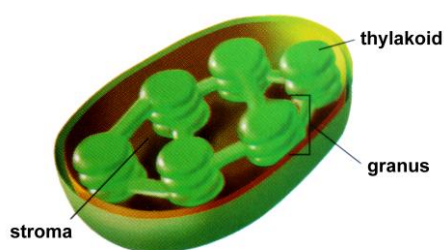
(vedou až ke slepotě, postihuje lidi starší 50 let, spíše ženy než muže). Výzkumné studie zaměřené na výživu prokázaly spojení mezi zvýšenou spotřebou karotenoidů a zvýšeným makulárním pigmentem v očích člověka. Když lidé stárnou, jejich strava se mění a starší dospělí často čerstvou zeleninu nekonzumují vůbec nebo v nedostatečné míře. Omezení spotřeby zeleniny snižuje příjem karotenoidů a klesá obsah makulárního pigmentu. Jeden ze současných amerických výzkumných projektů zaměřený na nutriční hodnoty špenátu ukázal, že koncentrace karotenoidů a prvků, jako například vápník, hořčík a draslík se mezi různými odrůdami a kultivary špenátu lišily až dva a půlkrát. Např. kultivar Spinner je kultivarem špenátu akumulující vysoký obsah luteinu, zatímco kultivar Springer je naopak kultivarem špenátu s nízkým obsahem tohoto karotenoidu (Kopsell, 2007). Z tohoto pohledu se tedy vyšší obsahy živin pro určité kultivary mohou stát komerční výhodou a ti, kteří chtějí propagovat zdravotní vlastnosti svých plodin, potřebují znát dopad selekce kultivaru na obsah živin. U špenátu prodávaného bez odlišení kultivarů tato možnost odpadá. Tato informace je rovněž významná i pro ty spotřebitele, kteří si přejí držet dietu bohatou na karotenoidy.

Krom již relativně dobře prostudovaných karotenoidů (polyisoprenoidní struktury, většinou lineární nebo s cyklizovanými konci řetězců - viz Obr. 9) obsahuje špenát i významná množství PECs (cyklické isoprenoidy), které jsou předmětem této práce. Ve vztahu k člověku mají i tyto sloučeniny veskrze pozitivní vliv. Jsou známy jejich antibakteriální a antimykotické účinky (Ahmad *et al.*, 1996), účinky antidiabetické (Graf *et al.*, 2014), antiosteoporetické, imunoprotektivní, hepatoprotektivní a zejména anaboličké bez vedlejších androgenních účinků (Gorelick-Feldman *et al.*, 2008; Sláma a Lafont, 1995; Kapur *et al.*, 2010; Seidlova-Wuttke *et al.*, 2010; Syrov a Khushbaktova, 1996; Lafont a Dinan, 2003; Badal'yants *et al.*, 1996; Koudela *et al.*, 1995). Posledně zmíněné stojí zřejmě za růstem svalové hmoty i u pohádkové postavičky Pepka námořníka (Kennedy, 2014). Původní teorie o vysokém obsahu železa v listech špenátu způsobující nárůst svalů (von Wolff, 1871) platná ještě ve 20. letech 20. století, kdy pohádková postavička vznikla (The Popeye the Sailor, Disney, 1929), vyvolala „špenátománii“, ale už záhy poté byla vyvrácena prof. Schuphanem (Schuphan, 1940), který zjistil, že obsah železa dosahuje pouze 10 %. Železo je nicméně důležité pro tvorbu červených krvinek (hemoglobin), červeného svalového barviva (myoglobinu) a ve formě Fe^{2+} hraje rovněž důležitou roli v přenosu kyslíku, tudíž je potřebné pro zásobení mozku, srdce, jater a jiných tkání, včetně svalů, kyslíkem.

Špenát je (vedle brokolice) rovněž doporučován jako jedna z nejalkaličtějších potravin (pH ~ 10), kterou lze využít na vykompenzování pH organismu při konzumaci většího množství potravin kyselého charakteru (maso, vejce, sýry, uzeniny, „soft drinks“) nebo těch co samy kyselé nejsou, ale při trávení kyselost vyvolávají (pečivo, těstoviny, rýže a jiné obilniny, atd.).

3.7 BUNĚČNÉ ORGANELY

Rostliny patří mezi eukaryotní organismy, tj. takové, jejichž buňky obsahují jádra. To je informačním centrem buňky a je považováno za její nejdůležitější organelu. Obsahuje dlouhé polymerní řetězce molekul DNA (deoxyribonukleová kyselina), které fungují jako sklad genetické informace a jsou uzavřeny mezi dvě soustředné membrány – obal jádra. Dalšími organelami rostlinné buňky jsou pak mitochondrie, chloroplasty, endoplasmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA), vakuoly, ribozomy a peroxizomy. Vodný gel vyplňující prostor mezi jednotlivými organelami je pak označován jako cytosol. Ve většině buněk tvoří její největší část a je místem mnoha chemických reakcí včetně syntézy proteinů – jednoho z klíčových dějů v buňce. Ribozomy jsou nejmenší organely v buňce, jsou tvořeny z ribozomální RNA a bazických proteinů. Podílejí se na syntéze a translokaci polypeptidů. ER je továrnou na materiál, z něhož se vyrábí složky buněčných membrán a materiálu určených pro export z buňky. GA přijímá, a mnohdy mění, molekuly vyrobené v ER. Peroxizomy jsou pak sférické buněčné organely obklopené membránou, které se tvoří v ER. Mezi jejich hlavní funkce patří syntéza cholesterolu a žlučových kyselin, β -oxidace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (> 24 uhlíků) a α -oxidace mastných kyselin (metabolismus chlorofylu z potravy). Mitochondrie obsahují svou vlastní DNA a rozmnožují se dělením. Pro buňku fungují jako generátor chemické energie. Tu získávají z oxidace molekul potravy, např. ze sacharidů. Mimoto produkují základní palivo pro pohon buňky, a tím je ATP (adenosintrifosfát). Předmětem zájmu pro tuto diplomovou práci byly zejména chloroplasty (Obr. 10; Alberts *et al.*, 1998).



Obr. 10: Schematické znázornění chloroplastu (upraveno dle Rozsypala, 2003).

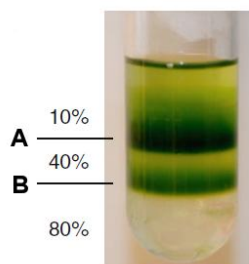
Ty obsahují rovněž svou vlastní DNA (cpDNA), rozmnožují se dělením a předpokládá se, že se vyvinuly ze sinic, které byly pohlceny ranou eukaryotní buňkou. Jde o organely, které rostlinám umožňují získávat energii k růstu, životu a reprodukci přímo ze slunečního světla, na rozdíl od živočichů, kteří mohou využívat pouze energii získanou potravou. Hlavní úlohou

chloroplastů je zachycovat energii slunečního světla v molekulách chlorofylu a využívat ji k výrobě sacharidů (energeticky bohatých molekul), tj. provádět fotosyntézu (Alberts *et al.*, 1998).

3.7.1 IZOLACE CHLOROPLASTŮ

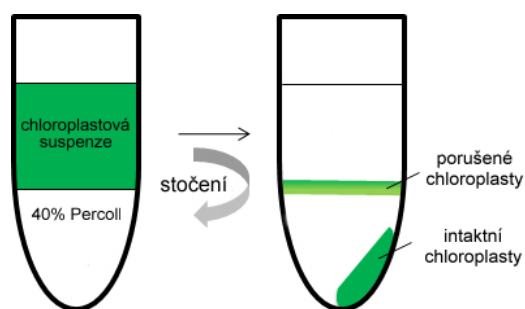
Chloroplasty jsou z rostlinných buněk nejčastěji izolovány pro studium fotosyntetických procesů. Pro tuto diplomovou práci však byly izolovány kvůli studiu biosyntézy PECs s cílem zjistit, zda je rostlinná buňka schopná tyto látky v této organelle syntetizovat. Prvním krokem frakcionace buněk, a zároveň i prvním krokem purifikace/izolace vysoko- i nízkomolekulárních látek z buněk, je homogenizace pletiv (pro rostlinná pletiva většinou mechanická nebo chemická). Po homogenizaci lze k frakcionaci buněk obecně použít tyto základní metody: diferenciální (frakční) centrifugace, hustotní gradientová a izopyknická centrifugace (Alberts *et al.*, 1998). Diferenciální centrifugace je opakovanou centrifugací, přičemž každý centrifugační krok se provádí při vyšší rychlosti než krok předchozí. To umožní frakcionaci homogenátu na různé složky lišící se hmotností. Při nízkoobrátkové centrifugaci ($1\ 000 - 7\ 000 \times g$) se oddělí celé neporušené buňky, jádra a cytoskelet (soustava dlouhých jemných vláken proteinů obsažených v cytosolu). Středněobrátková centrifugace ($15\ 000 - 20\ 000 \times g$), která probíhá omezenou dobu (10 – 15 min), pak vede k izolaci těžších organel, jako jsou mitochondrie, lysozomy, peroxizomy a chloroplasty. Při zvýšení otáček alespoň na $100\ 000 \times g$ po dobu minimálně 30 min lze pak docílit separace lehčích organel, jako jsou mikrozomy (buněčné organely vznikající uměle z ER jako váčky při homogenizaci pletiva), ER a GA (Vertommen *et al.*, 2011). Nejlehčí ze všech buněčných organel (ribozomy) je pak možné izolovat po ultracentrifugaci při cca $150\ 000 \times g$ trvající 3 hod (Stanley a Bock, 1965). Tato metoda však nezajišťuje úplně čistou frakci určitého typu organel a často tato frakce obsahuje i organely mající podobnou sedimentační rychlost. Lze ji ale využít pro obohacení směsi o určitý typ organel, která se dále rozděluje např. pomocí hustotního gradientu (Lee *et al.*, 2010).

Hustotní (gradientová i izopyknická) centrifugace je založena na principu rozdílu hustoty částic nezávisle na jejich ostatních vlastnostech (Alberts *et al.*, 1998). U hustotní gradientové centrifugace se pro separaci používá prostředí o měnící se hustotě (u izopyknické je hustota prostředí konstantní), přičemž rozsah hustot (hustotní gradient) leží v oblasti očekávaných hustot dělených částic. Bod, v němž je hustota částice shodná s hustotou média, se nazývá izopyknický bod. Při průchodu jednotlivých složek buněk takovýmto gradientem dojde k jejich rozdělení do pásů (Obr. 11), které pak lze odděleně odebírat (Alberts *et al.*, 1998; de Araujo *et al.*, 2008).



Obr. 11: Pásky frakcí po hustotní gradientové centrifugaci. Lze vidět frakci porušených chloroplastů (A) a intaktních chloroplastů (B). Různé vrstvy jsou dány hustotním gradientem, kterého bylo docíleno pomocí různé koncentrace roztoku Percollu (upraveno dle Lang *et al.*, 2011).

Hustotní gradient může být kontinuální (změna hustoty je plynulá v celém rozsahu dráhy, tj. zkumavky) nebo diskontinuální (gradient je tvořen několika různě hustými vrstvami, dělené částice určité hustoty se soustředí na hranici mezi dvěma vrstvami). K separaci pomocí hustotní centrifugace se používají roztoky sacharózy, polymerů (dextran, albumin, PEG nebo Percoll), popř. roztoky solí (CsCl). Pro izolaci chloroplastů byla v této práci použita diferenciální centrifugace a následná izopyknická centrifugace za použití 40% Percollu, pro separaci frakcí intaktních a porušených chloroplastů (Obr. 12). Percoll je koloidní roztok částic oxidu křemičitého o velikosti 15–30 nm potažených polyvinylpyrolidonem (PVP). Není toxický a vykazuje nízkou osmolaritu (Pertoft *et al.*, 1978).



Obr. 12: Schéma izopyknické centrifugace v případě izolace intaktních chloroplastů (upraveno dle Klinkenberg, 2014).

Pro získání frakce intaktních chloroplastů se doporučuje centrifugace při $6\,000 \times g$ po dobu 5 min. Výtěžek izolace bývá 0.150–0.250 mg chloroplastových proteinů/g FW (Lang *et al.*, 2011). V případě izolace thylakoidních membrán by bylo zapotřebí dále izolované chloroplasty suspendovat v hypotonickém roztoku, aby došlo k osmotickému šoku, tzn., popraskání membrán chloroplastů a uvolnění thylakoidních membrán do pufru (Casano *et al.*, 1994).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

(nelze zveřejnit)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

(nelze zveřejnit)

6 ZÁVĚR

(nelze zveřejnit)

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Ahmad V.U., Khaliq S.M., Ali M.S., Perveen S., Ahmad W.** (1996) *An antimicrobial ecdysone from Asparagus dumosus*. Fitoterapia 67:88-91
- Agarwal S., Rao A.V.** (2000) *Carotenoids and chronic diseases*. Drug Metab Drug Interact 17:189-210
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J. et al.** (1998) *Základy buněčné biologie*. Espero publishing s.r.o., Ústí nad Labem. pp. ISBN: 80-902906-0-4
- Alcorn S.M., Kurtz E.B.** (1959) *Some factors affecting the germination of seed of the saguaro cactus (Carnegiea gigantea)*. Am J Bot 46:526-529
- Astrog P., Gradelet S., Berges R., Suschetet M.** (1997) *Dietary lycopene decreases initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in rat*. Nutr Cancer 29:60-68
- Badal'yants K.L., Nabiev A.N., Khushbaktova Z.A., Syrov V.N.** (1996) *Mechanism of hepatoprotective action of ecdystene in acute heliotrine intoxication*. Doklady Akademii Nauk Respublinki Uzbekistan 46-48
- Bajguz A., Dinan L.** (2004) *Effects of ecdysteroids on Chlorella vulgaris*. Physiol Plant 121:349-357
- Bakrim A., Lamhamdi M., Sayah F., Chibi F.** (2007) *Effects of plant hormones and 20-hydroxyecdysone on tomato (Lycopersicon esculentum) seed germination and seedlings growth*. Afr J Biotechnol 6:2792-2802
- Bakrim A., Maria A., Sayah F., Lafont R., Takvorian N.** (2008) *Ecdysteroids in spinach (Spinacia oleracea L.): biosynthesis, transport and regulation of levels*. Plant Physiol Biochem 46:844-854
- Banerji A., Chintalwar G.J., Joshi N.K., Chadha M.S.** (1971) *Isolation of ecdysterone from Indian plants*. Phytochemistry 10:2225-2226
- Báthori M.** (2002) *Phytoecdysteroids effects on mammals, isolation and analysis*. Mini Rev Med Chem 2:285-293
- Bathory M., Toth I., Szendrei K., Reisch J.** (1982) *Ecdysteroids in Spinacia oleracea and Chenopodium bonus-henricus*. Phytochemistry 21:236-238
- Bathory M., Toth I., Szendrei K., Rattai M., Minker E., Blazso, G.** (1984) *Determination and isolation of ecdysteroids in native goosefoot species*. Herba Hungarica 23:131-145
- Biksa E.** (2015) *Growing Hydroponic Spinach. Cultivating Nutritious & Clean Greens FAST*. <http://www.grozone.com/2015/02/22/growing-hydroponic-spinach/> (Staženo 28.4.2016)
- Blais C., Lafont R.** (1986) *Ecdysone 20-hydroxylation in imaginal wing discs of Pieris brassicae (lepidoptera): Correlations with ecdysone and 20-hydroxyecdysone titers in pupae*. Arch Insect Biochem Physiol 3:501-512
- Bocking D., Dauphin-Villemant C., Lafont R.** (1995) *Metabolism of 3-dehydroecdysone in the crayfish Orconectes limosus (Crustacea: Decapoda)* Eur J Entomol 92:63-74
- Bollenbacher W. E., Smith S., Wielgus J., Gilbert L. I.** (1977) *Evidence for an α -ecdysone cytochrome P-450 mixed function oxidase in insect fat body mitochondria* Nature 268:660-663
- Bratoeff E., Perez-amador M.C., Ramirez E.** (1996) *Ecdysteroids and other secondary metabolites from Amaranthus indica Mill (Amaranthaceae)*. Phytol - Int J Exp Bot 58: 119-123
- Brown J.A., Fry S.C.** (1993) *Novel O-D-Galacturonoyl Esters in the Pectic Polysaccharides of Suspension-Cultured Plant Cells*. Plant Physiol 103:993-999
- Buděšínský M., Vokáč K., Harmatha J., Cvačka J.** (2008) *Additional minor ecdysteroid components of Leuzea carthamoides*. Steroids 73: 502–514
- Bunea A., Andjelkovic M., Socaciu C., Bobis O., Neacsu M., Verhé R., Van Camp J.** (2008) *Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (Spinacia oleracea L.)*. Food Chem 108:649-656
- Butenandt A., Karlson P.** (1954) *Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in kristallisierter Form*. Z Naturforsch 9b:389-391

- Canals D., Irrure-Santilari J., Casas J.** (2005) *The first cytochrome P450 in ferns. Evidence for its involvement in phytoecdysteroid biosynthesis in Polypodium vulgare.* FEBS J 272: 4817-4825
- Casano L. M., Lascano H. R., Trippi V. S.** (1994). *Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in light-and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplasts.* Plant Cell Physiol 35:145-152
- Český lékopis** (2009) *Kapilární elektroforéza.* Grada Publishing, a.s., Praha, pp. 147, ISBN: 978-80-247-2994-7
- Davis P., Lafont R., Large T., Morgan E.D., Wilson I.D.** (1993) *Micellar capillary electrophoresis of the ecdysteroids.* Chromatographia 37:37-42
- de Araujo M. E., Huber L. A., Stasyk T.** (2008) *Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation.* Methods Mol Biol 424:317-331
- Demlová J.** (2015) *Profilování farmakologicky významných fytoekdysteroidů ve vybraných rostlinných druzích.* Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
- Devarenne T.P., Sen-Michael B., Adler J.H.** (1995) *Biosynthesis of ecdysteroids in Zea mays.* Phytochemistry 40:1125-1131
- Dicoteau D.R.** (2000) Vegetable Crops. 221-237. Prentice Hall, New Jersey, USA
- Dinan L., Donnahey P.L., Rees H.H., Goodwin T.W.** (1981) *High-performance liquid chromatography of ecdysteroids and their 3-epi, 3-dehydro and 26-hydroxy derivatives.* J Chromatogr 205:139-145
- Dinan L.** (1988) *The chemical synthesis of ecdysone 22- long-chain fatty acyl esters in high yield.* J Steroid Biochem 31:237-245
- Dinan L., Riseborough S., Brading M., Clément C.Y., Witts D.J., Smith J., Colombé S., Pettitt V., Wheeler D.A., Greenwood D.R.** (1991) *Phytoecdysteroids in the Chenopodiaceae (Goosefoots).* In: Insect Chemical Ecology (Ed. Hrdý I.), Academia Prague, pp. 215-220
- Dinan L.** (1992a) *The analysis of phytoecdysteroids in single (pre-flowering stage) specimens of fat hen, Chenopodium album.* Phytochem Anal 3:132-138
- Dinan L.** (1992b) *The association of phytoecdysteroids with flowering in fat hen, Chenopodium album, and other members of the Chenopodiaceae.* Experientia 48:305-308.
- Dinan L.** (1995a) *A strategy for the identification of ecdystereoid receptor agonists and antagonists from plants.* Eur J Entomol 92:271-283
- Dinan L.** (1995b) *Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of species of the Chenopodiaceae.* Eur J Entomol 92:295-300
- Dinan L., Whiting P., Scott A. J.** (1998) *Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the Chenopodiaceae.* Biochem Syst Ecol 26:553-576
- Dinan L., Sarker S., Bourne P., Whiting P., Sik V., Rees H.** (1999) *Phytoecdysteroids in seeds and plants of Rhagodia baccata (Labill.) Moq. (Chenopodiaceae).* Arch Insect Biochem Physiol 41:18-23
- Dinan L.** (2001) *Phytoecdysteroids: biological aspects.* Phytochemistry 57:325-339
- Dinan L., Harmatha J., Volodin V., Lafont R.** (2009) *Phytoecdysteroids: diversity, biosynthesis and distribution.* In: Smaghe G. (Ed.), Ecdysone: structures and functions. Springer Science, New Yourk, pp. 42-84
- Dolejší A.** (1982) *Špenát zelný (Spinacia oleracea L.)* In: Zelenina na zahrádce, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, pp. 162-163
- Dreier S.I., Towers G.H.N.** (1988) *Activity of ecdysterone in selected plant growth bioassays.* J Plant Physiol 132:509-512
- Findeisen E.** (2004) *Ecdysteroide in der menschlichen Nahrung.* Ph.D. thesis, University of Marburg (Germany)
- Feyereisen R., Durst F.** (1978) *Ecdysterone Biosynthesis: A Microsomal Cytochrome-P-450-Linked Ecdysone 20-Monooxygenase from Tissues of the African Migratory Locust.* Eur J Biochem 88:37-47
- Friedecký D., Lemr K.** (2012) *Úvod do hmotnostní spektrometrie.* Klin Biochem Metab 20:152-157

- Food and Agriculture Organization** (2013) FAO STAT database <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (Staženo 20. 4. 2016)
- Fry S. C.** (1980) *Gibberellin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells.* Phytochemistry 19:735-740
- Galbraith M.N., Horn D.H.S.** (1966) *An insect-moulting hormone from a plant.* J Chem Soc, Chem Commun 905-906
- Gangolli S.D., van den Brandt P.A., Feron V.J., Janzowsky C., Koeman J.H., Speijers G.J., Spiegelhalter B., Walker R., Wishnok J.S.** (1994) Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Eur J Pharmacol 291:1-38
- Gerster H. (1997) *The potential role of lycopene for human health.* J Am Coll Nutr 16:109-126
- Golovatskaya I.F.** (2004) *Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants.* Russ J Plant Physiol 51:407-413
- Goldstein J.L., Brown M.S.** (1990) *Regulation of the mevalonate pathway.* Nature 343:425-430
- Gorelick-Feldman J., MacLean D., Ilic N., Poulev A., Lila M.A., Cheng D., Raskin I.** (2008) *Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells.* J Agr Food Chem 56:3532-3537
- Graf B. L., Poulev A., Kuhn P., Grace M. H., Lila M. A., Raskin, I.** (2014) *Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties.* Food chemistry 163:178-185
- Grebenok R.J., Adler J.H.** (1991) *Ecdysteroid distribution during development of spinach.* Phytochemistry 30:2905-2910
- Grebenok R. J., Ripa P. V., Adler J. H.** (1991) *Occurrence and levels of ecdysteroids in spinach.* Lipids 26:666-668
- Grebenok R.J., Adler J.H.** (1993) *Ecdysteroid biosynthesis during the ontogeny of spinach leaves.* Phytochemistry 33:341-347
- Grebenok R.J., Venkatachari S., Adler J.H.** (1994) *Biosynthesis of ecdysone and ecdysone phosphates in spinach.* Phytochemistry 36:1399-1408
- Grebenok R.J., Galbraith D.W., Benveniste I., Feyereisen R.** (1996) *Ecdysone 20-monoxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach Spinacia oleracea.* Phytochemistry 42:927-933
- Grulich V.** (2013) *Amarantaceae Juss. – laskavcovité / láskavcovité.* Hoskovec L. (Ed.) <http://botany.cz/cs/amaranthaceae/> (Staženo 14.4.2016)
- Guillarme D., Veuthey J. L.** (2008) *Guidelines for the use of UHPLC Instruments* <http://unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/Guidelines>, 20. (Staženo 1.4.2016)
- Guo D.A., Vekatramesh M., Nes W.D.** (1995) *Developmental regulation of sterol biosynthesis in Zea mays.* Lipids 30:203-219
- Harrison S.T.L.** (2011) *Cell disruption.* In: Moo-Young M (Ed.) *Comprehensive biotechnology*, 2nd edn. Elsevier. Oxford, pp. 619-640
- Harmatha J., Dinan L.** (1997) *Biological Activity of Natural and Synthetic Ecdysteroids in the BII Bioassay.* Arch Insect Biochem 35:219-225
- Heinrich G., Hoffmeister H.** (1967) *Ecdyson als Begleitsubstanz des Ecdysterons in Polypodium vulgare L.* Experientia 23:995-995
- Hellou J., Banoub J., Gentil E., Taylor D.M., O'Keefe P.G.** (1994) *Electrospray tandem mass spectrometry of ecdysteroid moulting hormones.* Spectroscopy 12:43-53
- Hendrix S.D., Jones R.L.** (1972) *The activity of β -ecdysone in four gibberellin bioassays.* Plant Physiol 50:199-200
- Henrich V. C., Rybczynski R., Gilbert L. I.** (1999) *Peptide hormones, steroid hormones, and puffs : Mechanisms and models in insect development.* Vitam Horm 55:73-125
- Hetru C., Luu B., Hoffmann J.A.** (1985) *Ecdysone conjugates: isolation and identification.* Methods Enzymol 111:411-419
- Hikino H., Hikino Y., Nomoto K., Takemoto T.** (1968). *Cyasterone, an insect metamorphosing substance from cyathula capitata: structure.* Tetrahedron 24:4895-4906

- Hikino H., Okuyama T., Jin H., Takemoto T.** (1973) *Screening of Japanese ferns for phytoecdysones*. *J. Chem Pharm Bull* 21:2292-2302
- Hiruma K., Bocking D., Lafont R., Riddiford L. M.** (1997) *Action of different ecdysteroids on the regulation of mRNAs for the ecdysone receptor, MHR3, dopa decarboxylase, and a larval cuticle protein in the larval epidermis of the tobacco hornworm, Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol* 107:84-97
- Horn D.H.S.** (1971) *The ecdysones*. In: Jacobson M., Crosby D.G. (Eds.), *Naturally Occurring Insecticides*. Marcel Dekker. New York, pp. 333-459
- Horn D.H.S., Bergamasco R.** (1985) *Chemistry of ecdysteroids*. In: Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 7. Pergamon Press. Oxford, pp. 185-248.
- Hrubec T. C., Robinson J. M., Donaldson R. P.** (1985) *Isolation of mitochondria from soybean leaves on discontinuous Percoll gradients*. *Plant physiology* 77:1010-1012
- Huber R., Hoppe W.** (1965) *Die Kristall- und Molekulstrukturanalyse des Insekt enverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekulmethode*. *Chem Ber* 98:2403-2404
- Hyodo R., Fujimoto Y.** (2000) *Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in Ajuga hairy roots: the possibility of 7-ene introduction at a late stage*. *Phytochemistry* 53:733-737
- Ikeda M., Naya Y.** (1993) *The biotransformation of tritiated 3-dehydroecdysone by crayfish, Procambarus klarkii*. *Experientia* 49:1101-1105
- Imai S., Toyosato T., Sakai M., Sato Y., Fujioka S., Murata E., Goto M.** (1969) *Screening results of plants for phytoecdysones*. *Chem Pharm Bull* 17:335-339
- Isaac R.E., Rees H.H., Goodwin T.W.** (1981) *Isolation of ecdysone 3-acetate as a major ecdysteroid from the developing eggs of the desert locust, Schistocerca gregaria*. *J Chem Soc Chem Commun* 594-595
- Isaac R.E., Desmond H.P., Rees H.H.** (1984) *Isolation and identification of 3-acetyl-ecdysone 2-phosphate, a metabolite of ecdysone, from developing eggs of Schistocerca gregaria*. *Biochem J* 217:239-243.
- Ito Y.** (1986) *Trends in Countercurrent chromatography*. *Trends Anal Chem* 5:142-147
- Janda M., Navrátil O., Heisel D., Jindřichová B., Burketová L., Čerovská L., Moravec T.** (2014) *Porostou vám vaše rostliny i pod LEDEM?* In: Krekule J., *Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, Sborník abstrakt pro Sympozium 6. Metodické dny, 2014, Seč, ČR*, p. 72
- Jizba J., Herout V., Sorm F.** (1967) *Polypodine B — A novel ecdysone-like substance from plant material*. *Tetrahedron Lett* 51:5139-5143
- Joly R., Svahn C.M., Bennett R.D., Heftmann E.** (1969) *Investigation of intermediate steps in the biosynthesis of ecdysterone from cholesterol in Podocarpus elata*. *Phytochemistry* 8:1917-1920
- Johnson E.J.** (2002) *The role of carotenoids in human health*. *Nutr Clin Care* 5:47-49
- Kaminishi A., Kita N.** (2006) *Seasonal change of nitrate and oxalate concentration in relation to the growth rate of spinach cultivars*. *HortScience* 41:1589-1595
- Kaplanis J.N., Thompson M.J., Robbins W.E., Bryce M.** (1967) *Insect hormones: alpha ecdysone and 20-hydroxyecdysone in bracken fern*. *Science* 157:1436-1438
- Kapur P., Wuttke W., Jarry H., Seidlova-Wuttke D.** (2010) *Beneficial effects of beta-ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats*. *Phytomedicine* 17:350-355
- Karlson P.** (1956) *Biochemical studies on insect hormones*. *Vit Horm* 14:227-266
- Kašička V.** (1997) *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*. *Chem. Listy* 91:320-329
- Kennedy D.O.** (2014) *Ecdysteroids*. In: *Plants and the Human Brain*. Oxford University press, New York, ISBN 978-0-19-991-401, pp 208-209

- Klesper E., Corwin A.H., Turner D.A.** (1962) *High pressure gas chromatography above critical temperatures*. J Org Chem 27:700-706.
- Klinkenberg J.** (2014) *Extraction of Chloroplast Proteins from Transiently Transformed Nicotiana benthamiana Leaves*. <http://www.bio-protocol.org/e1238> (Staženo 12.4.2016)
- Klouček P., Landa P., Vaněk T.** (2005) *Rosliny in vitro – továrny na léčiva?* <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/rostliny-in-vitro-tovarny-na-leciva.pdf> (Staženo 20.4.2006)
- Koolman J.** (1980) *Analysis of ecdysteroids by fluorometry*. Insect Biochem 10:381-386
- Kopsell D.** (2007) *Choice of spinach cultivar influences eye health*. Sprouts. Tennessee Vegetable News 1:2 <http://vegetables.tennessee.edu/pdfs/Newsletter0102.pdf> (Staženo 4.5.2016)
- Koudela K., Tenora J., Bajer J., Mathova A., Sláma K.** (1995) *Stimulation of growth and development in Japanese quails after oral administration of ecdysteroid-containing diet*. Eur J Entomol 92:349-354
- Kovář L.** (2014) *Gomphrena Haageana Klotzsch – pestrovka Haageova*. Hoskovec L. (Ed.) <http://botany.cz/cs/gomphrena-haageana/> (Staženo 14.4.2016)
- Kreis W., Müller-Uri F.** (2010) *Biochemistry of sterols, cardiac glycosides, brassinosteroids, phytoecdysteroids and steroid saponins*. Annu Plant Revi 40:304-363
- Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. a Štěpánek J.** (Eds.), (2002) *Klíč ke květeně České republiky*. Academia, Praha, pp. 180
- Kubo I., Matsumoto A., Asano S.** (1985) *Efficient isolation of ecdysteroids from the silkworm, Bombyx mori by droplet counter-current chromatography*. Insect Biochem 15:45-47
- Kuppert P., Büchler M., Spindler K.D.** (1978) *Distribution and transport of molting hormones in the crayfish, Orconectes limbus*. Z Naturforsch 33C:437-441
- Lachaise F., Lafont R.** (1984) *Ecdysteroid metabolism in a crab: Carcinus maenas L*. Steroids 43:243-259
- Lafont R., Somme-Martin C., Chambet J.C.** (1979) *Separation of ecdysteroids by using high pressure liquid chromatography on microparticulate supports*. J Chromatogr 170:185-194
- Lafont R., Beydon P., Mauchamp B., Somme-Martin G., Andrianjafintrimo M., et al.** (1981) *Recent progress in ecdysteroid analytical methods*. In: Sehnal F., Zabza A., Cymborowski B. (Eds.), Regulation of Insect Development and Behaviour. Technical University of Wrocław Press, pp. 125-144
- Lafont R., Beydon P., Blais C., Garcia M., Lachaise F., Riera F., Somme G., Girault J.P.** (1986) *Ecdysteroid metabolism – a comparative study*. Insect Biochem 16:11-16
- Lafont R.** (1998) *Phytoecdysteroids in the World flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution*. Russ J Plant Physiol 45:276-295
- Lafont R., Blais C., Harmatha J., Wilson I. D.** (2000) *Ecdysteroids: chromatography*. Stain Technology 49:235:240
- Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I.D.** (2002) Ecdybase, a free ecdysteroid database. <http://ecdybase.org>
- Lafont R., Dinan L.** (2003) *Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update*. J Insect Sci 3:7
- Lafont R., Dinan L.** (2009) *Innovative and Future Applications for Ecdysteroids*. In: Smagghe G. (Ed.), Ecdysone: structures and functions. Springer Science, New Yourk, pp. 571-598
- Lafont R., Dauphin-Villemant C., Warren J. T., Rees H.** (2012) *Ecdysteroid chemistry and biochemistry*. In: Gilbert L.I. (Ed.), Insect endokrinology. Elsevier, pp. 106-176, ISBN: 978-0-12-384749-2
- Lamhamdi M., Lafont R., Rharrabe K., Sayah F., Aarab A., Bakrim A.** (2016) *20-Hydroxyecdysone protects wheat seedlings (Triticum aestivum L.) against lead stress*. Plant Physiol and Biochem 98:64-71
- Lancaster M.** (2002) *Supercritical fluids*. In: Green Chemistry. An introductory text. University New York. The Royal Society of Chemistry, UK, pp.136, ISBN: 0-85404-620-8

- Lang E.G.E., Mueller S.J., Hoernstein S.N.W., Porankiewicz-Asplund J., Vervliet-Scheebaum M., Reski R.** (2011) *Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics*. *Plant Cell Rep* 30:205-215
- Large T., Lafont R., Morgan E.D., Wilson I.D.** (1992) *Micellar capillary electrophoresis of ecdysteroids*. *Anal Proc* 29:386-388
- Lee Y. H., Tan H. T., Chung, M.** (2010) *Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics*. *Proteomics*, 10:3935-3956.
- Li X., Zhao W.T., Meng D.L., Qiao A.M.** (2007) *A new phytosterone from the roots of *Achyranthes bidentata**. *Fitoterapia* 78:607-608
- Libert B., Franceschi V.R.** (1987) *Oxalate in crop plants*. *J Agr Food Chem* 35:926-938
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R.** (1983) *Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*. *Biochem Soc Trans* 11:591-592
- Lichtenthaler H.K.** (1999) *The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:47-65
- Louden D., Handley A., Taylor S., Lenz E., Miller S., Wilson I.D., Sage A., Lafont R.** (2001) *Spectroscopic characterization and identification of ecdysteroids using high performance liquid chromatography combined with on-line diodearray, FT-infrared, H-Nuclear Magnetic Resonance and time-of-flight mass spectrometry*. *J Chromatogr A* 910:237-246
- Louden D., Handley A., Lafont R., Taylor S., Sinclair I., Lenz E., Orton T., Wilson I.D.** (2002) *HPLC analysis of ecdysteroids in plant extracts using superheated deuterium oxide with multiple on-line spectroscopic analysis (UV, IR, ¹H NMR, and MS)*. *Anal Chem* 74:288-294
- Lucier G., Allshouse J., Lin B.H.** (2004) *Factors Affecting Spinach Consumption in the United States*. *Econ Res Serv US Dep Agric VGS-300-01*
- Macháčková I., Vagner M., Sláma K.** (1995) *Comparison between the effects of 20-hydroxyecdysone and phytohormones on growth and development in plants*. *Eur J Entomol* 92:309-316
- Maeda N., Yoshida H., Mizushima Y.** (2010) *Spinach and health: anticancer effect*. In: Watson RR, Preedy VR (eds) *Bioactive foods in promoting health: fruit and vegetables*. Elsevier, Amsterdam, pp 393-405
- Mangels A.R., Holden J.M., Beecher G.R., Forman M.R., Lanza E.** (1993) *Carotenoid contents of fruits and vegetables: an evaluation of analytical data*. *J Am Diet Assoc* 93:284-296
- Massey L.K., Roman-Smith H., Sutton R.A.** (1993) *Effect of dietary oxalate and calcium on urinary oxalate and risk of formation of calcium oxalate kidney stones*. *J Amer Diet Assoc* 93:901-906
- Matsumoto T., Kubo I.** (1989) *Ecdysone from *Vitex strickeri* as insect growth inhibitor*. Application JP 87-295802 (cited in Chemical Abstracts 111: 169367)
- McDonough W.** (1964) *Germination responses of *Carnegieia gigantea* and *Lemaireocereus thurberi**. *Ecology* 45:155-159
- Meng D.L., Li,X.** (2001) *The research development of *Achyranthes bidentata* Bl.* *Chin J Med Chem* 11:120-124
- Meng D.L., Li X., Wang J.H., Li W.** (2005) *A new phytosterone from *Achyranthes bidentata* Bl.* *J Asian Nat Prod Res* 7:181-184
- Metodika zkoušení osiva a sadby** (2014) Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. K dispozici na <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/dokumenty-a-publikace/osivo-a-sadba/metodika-zkouseni-osiv-a-sadby/> (Staženo 23.4.2016)
- Modde J.F., Lafont R., Hoffmann J.A.** (1984) *Ecdysone metabolism in *Locusta migratoria* larvae and adults*. *Int J Invert Reprod Devel* 7:161-183
- Morelock T.E., Correll J.C.** (2008) *Spinach*. In: Prohens J., Nuez F. (Eds.), *Vegetables I. Handbook of Plant Breeding*, Springer Press, pp. 189-218
- Morgan E.D., Murphy S.J., Games D.E., Mylchreest I.** (1988) *Analysis of ecdysteroids by supercritical-fluid chromatography*. *J Chromatogr* 441:165-169

- Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki L., Chang M.L., Hsu H.Y.** (1966) *Insect hormones I. the structure of ponasterone A, an insect molting hormone from the leaves of Podocarpus nakaii Hay.* J Chem Soc Chem Commun, 915-917
- Nakanishi K.** (1971) *The ecdysones.* Pure Appl Chem 25:167-195
- Nes W.R., McKean M.L.** (1977) *Biochemistry of steroids and other isopentenoids.* University Park Press, Baltimore, pp 411-533
- Nishimoto N., Shiobara Y., Fujino M., Inoue S-S., Takemoto T., de Oliveira F., Akisue G., Akisue M.K., Hashimoto G., Tanaka O., Kasai R., Matsuura H.** (1987) *Ecdysteroids from Pfaffia irsinoides and reassignment of some ¹³C NMR chemical shifts.* Phytochemistry 26:2505-2507
- Nonnicke I.L.** (1989) *Vegetable Production* 476-484 Van Nostrand Runhold.
- Ohyama K., Kushiro T., Nakamura K., Fujimoto Y.** (1999) *Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in Ajuga hairy roots: fate of 6 α - and 6 β -hydrogens of lathosterol.* Bioorg Med Chem 7:2925-2930
- Okuzumi K., Hara N., Fujimoto Y., Yamada J., Nakamura A., Takahashi K., Morisaki M.** (2003) *Biosynthesis of phytoecdysteroids in Ajuga hairy roots: clerosterol as a precursor of cyasterone, isocyasterone and 29-norcyasterone.* Tetrahedron Lett 44:323-326
- Ong A.S.H., Tee E.S.** (1992) *Natural sources of carotenoids from plants and oils.* Methods Enzymol 213:142-167
- O'Reilly D.R., Brown M.R., Miller L.K.** (1992) *Alteration of ecdysteroid metabolism due to baculovirus infection of the fall armyworm Spodoptera frugiperda: host ecdysteroids are conjugated with galactose.* Insect Biochem Molec 22:313-320
- Paiva S., Russell R.** (1999) *Beta carotene and other carotenoids as antioxidants.* J Am Coll Nutr 18:426-433
- Pandy S.C., Kalloo G.** (1993) *Spinach Spinacia oleracea L.* In: G. Kalloo, B.O. Bergh (Eds.). Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon Press, Oxford, Velká Británie, pp. 325-336
- Pertoft H., Laurent T.C., Laas T., Kagedal L.** (1978) *Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll).* Anal Biochem 88:271-282
- Petryk A., Warren J. T., Marqués G., Jarcho M. P., Gilbert L. I., Kahler J., Parvy J.P., Li Y., Dauphin-Villemant C., O'Connor M.B.** (2003) *Shade is the Drosophila P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone.* Proc Natl Acad Sci USA 100:13773-13778
- Piironen V., Lindsay D.G., Miettinen T.A., Toivo J., Lampi A.-M.** (2000) *Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition.* J Sci Food Agric 80:939-966
- Pis J., Vaisar T.** (1997) *H/D isotopic exchange in the Fast Atom Bombardment of ecdysteroids.* J Mass Spectrom 32:1050-1056
- Potter, I., Fry, S. C.** (1994). *Changes in xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity during hormone-induced growth in lettuce and cucumber hypocotyls and spinach veil suspension cultures.* J Exp Bot 45:1703-1710
- Rao A.V., Rao L.G.** (2007) *Carotenoids and human health.* Pharmacol Res 55:207-216
- Raynor W.M., Kithinji J.P., Barker I.K., Bartle K.D., Wilson I.D.** (1988) *Supercritical fluid chromatography of ecdysteroids.* J Chromatogr 436:497-502.
- Raynor W.M., Kithinji J.P., Bartle K.D., Games D.E., MylchReest I.C., Lafont R., Morgan D.E., Wilson I.D.** (1989) *Packed column supercritical fluid chromatography and linked supercritical fluid chromatography – mass spectrometry for the analysis of phytoecdysteroids from Silene nutans and Silene otites.* J Chromatogr 467:292-298
- Rees H.H., Isaac R.E.** (1985) *Biosynthesis and metabolism of ecdysteroids and methods of isolation and identification of the free and conjugated compounds.* Methods Enzymol 111:377-410
- Reixach N., Lafont R., Camps F., Casas J.** (1999) *Biotransformations of putative phytoecdysteroid biosynthetic precursors in tissue cultures of Polypodium vulgare.* Eur J Biochem 266:608-615
- Rharrabe K., Alla S., Maria A., Sayah F., Lafont R.** (2007) *Diversity of detoxification pathways of ingested ecdysteroids among phytophagous insects.* Arch Insect Biochem Physiol 65:65-73

- Ripa P.V., Martin E.A., Cocciolone S.M., Adler J.H.** (1990) *Fluctuation of phytoecdysteroids in developing shoots of Taxus cuspidata*. *Phytochemistry* 29:425-427
- Rohmer M.** (1999) *The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants*. *Nat Prod Rep* 16:565-574
- Rojas-Arechiga M., Orozco-Segovia A., Vázquez-Yanes C.** (1997). *Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México* *J Arid Environ* 36:571-578.
- Rozsypal S.** (2003) Membránové orgány. In: *Nový přehled biologie*. Scientia, Praha, pp. 45-49, ISBN 978-80-86960-23-4
- Rudel D., Báthori M., Gharbi J., Giault J.P., Racz I., Melis K., Szendrei K., Lafont R.** (1992) *New ecdysteroids from Serratula tinctoria*. *Planta Med* 58:358-364
- Sabaghnia N., Asadi-Gharneh H.A., Janmohammadi M.** (2014) *Genetic diversity of spinach (Spinacia oleracea L.) landraces collected in Iran using some morphological traits*. *Acta Agriculturae Slovenica* 103:101-111
- Sarker S.D., Girault J.P., Lafont R., Dinan R.** (1996) *Ecdysteroids from Gomphrena haageana (Amaranthaceae)*. *Biochem Syst Ecol* 24:177-178
- Sautour M., Canon F., Miyamoto T., Dongmo A., Lacaille-Dubois M.A.** (2008) *A new ecdysteroid and other constituents from two Dioscorea species*. *Biochem Syst Ecol* 36:559-563
- Savchenko T., Whiting P., Sarker S. D., Dinan L.** (1998). *Distribution and identity of phytoecdysteroids in Gomphrena spp.(Amaranthaceae)*. *Bioch Syst Ecol* 26:337-346
- Schmelz E. A., Grebenok R. J., Galbraith D. W., Bowers W. S.** (1998) *Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: a rapid root response involving the octadecanoic acid pathway*. *J Chem Ecol* 24:339-360
- Schmelz E.A., Grebenok R.J., Galbraith D.W., Bowers W.S.** (1999) *Insect-induced synthesis of phytoecdysteroids in spinach, Spinacia oleracea*. *J Chem Ecol* 25:1739-1757
- Schuphan W.** (1940) *Über den Einfluss der Chlorid- und Sulfatdüngung auf Ertrag, Marktgängigkeit und biologischen Wert verschiedener Gemüse unter Berücksichtigung edaphischer und klimatischer Faktoren*. *Bodenkunde und Pflanzenernährung* 19:265-315
- Seidlova-Wuttke D., Christel D., Kapur P., Nguyen B.T., Jarry H., Wuttke W.** (2010) *Beta-ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats*. *Phytomedicine* 17:884-889
- Sethi N., Anand A., Sharma A., Chandrul K.K., Jain G., Srinivasa K.S.** (2009) *High speed counter current chromatography: A support-free LC technique*. *J Pharm Bioall Sci* 1:8-15
- Shah V. C., De Souza N. J.** (1971). *Amaranthaceae: ecdysterone from Cyathula prostrata*. *Phytochemistry* 10:1398-1399
- Shiobara Y., Inoue S.-S., Kato K., Nishiguchi Y., Oishi Y., Nishimoto N., de Oliveira F, Akisue G., Akisue M.K., Hashimoto G.** (1993) *A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry* 32:1527-1530
- Skorňakov S.** (1988) *Špenát setý* In: Jeník J. Větvíčka V. (Trs.) *Zelená kuchyně*, Lidové nakladatelství, Praha, pp. 160-162
- Sláma K., Lafont R.** (1995) *Insect hormones - ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates*. *Eur J Entomol* 92:355-377
- Snyder M.J., Chang E.S.** (1991a) *Metabolism and excretion of injected [³H]-ecdysone by female lobsters, Homarus americanus*. *Biol Bull* 180:475-484
- Snyder M.J., Chang E.S.** (1991b) *Ecdysteroids in relation to the molt cycle of the American lobster, Homarus americanus. II. Excretion of metabolites*. *Gen Comp Endocrinol* 83:118-131
- Snyder M.J., Chang E.S.** (1992) *Role of the midgut gland in metabolism and excretion of ecdysteroids by lobsters, Homarus americanus*. *Gen Comp Endocrinol* 85:286-296
- Soriano I.R., Riley I.T., Potter M.J., Bowers W.S.** (2004) *Phytoecdysteroids: a novel defense against plantparasitic nematodes*. *J Chem Ecol* 30:651-654
- Stanley Jr. W. M., Bock R. M.** (1965) *Isolation and Physical Properties of the Ribosomal Ribonucleic Acid of Escherichia coli**. *Biochemistry*, 4:1302-1311.

- Su P., Wang R., Yu Y., Yang Y.** (2014) *Microwave-assisted synthesis of ionic liquid-modified silica as a sorbent for the solid-phase extraction of phenolic compounds from water.* [Anal Methods](#) 6:704-709
- Swiader J.M., Ware G.W.** (2002) *Producing vegetable crops* 5th ed. 481-498 Interstate.
- Syrov V.N., Khushbaktova Z.A.** (1996) *Wound-healing effects of ecdysteroids.* Doklady Akademii Nauk Respubliki Uzbekistana 12:47-50
- Štorchová H.** (2009) *Merlík červený – staronový model pro studium regulace kvetení.* <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/merlik-cervený-staronový-model-pro-studium-regulac.pdf> (Staženo 20.4.2016)
- Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M.** (2014) *Quo vadis plant hormone analysis?* *Planta* 240:55-76
- Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N.** (1967a) *Studies on the constituents of Achyranthis radix. I.* *Yakugaku Zasshi* 87:1463-1468
- Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., Arihara S. and Bue K.** (1967b) *Insect moulting activity of crude drugs and plants* (1). *Yakugaku Zasshi* 87, 1414-1418 [in Japanese, with an English abstract]
- The Angiosperm Phylogeny Group.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 8. říjen 2009, svazek 161, čís. 2, s. 105-121. Dostupné online. ISSN 1095-8339. DOI:10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x
- Toth I., Bathory M., Szendrei K., Minker E., Blazsa G.** (1981) *Ecdysteroids in Chenopodiaceae: Chenopodium album.* *Fitoterapia* 52:77-80
- Tomás J., Camps F., Coll J., Melé E., Messeguer J.** (1993) *Phytoecdysteroid production by Ajuga reptans tissue cultures.* *Phytochemistry* 32:317-324
- Troničková E.** (1985) *Špenát (Spinacia oleracea)* In: Zelenina, Artia, Praha, pp. 102-103
- Udalova Z.V., Zinov'eva S.V., Vasil'eva I.S., Paseshnikchenko V.A.** (2004) *Correlation between the structure of plant steroids and their effects on phytoparasitic nematodes.* *Appl Biochem Microbiol* 40:93-97
- Vertommen A., Panis B., Swennen R., Carpentier S. C.** (2011) *Challenges and solutions for the identification of membrane proteins in non-model plants.* *J Proteomics* 74:1165-1181.
- Vokáč K., Budešínský M., Harmatha J.** (2002) *Minor ecdysteroid components of Leuzea carthamoides.* *Coll Czech Chem Commun* 67:124-139
- Warren J. T., Gilbert L. I.** (1986) *Ecdysone metabolism and distribution during the pupal-adult development of Manduca sexta.* *Insect Biochem* 16:65-82
- Welsh S.H., Crompton C.W., Clemants S.E.** (2004) *Chenopodiaceae Ventenat.* *FNA* 4:258, http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=10185 (Staženo 20.4.2016)
- Williams D.R., Fisher M.J., Rees H.H.** (2000) *Characterization of ecdysteroid 26-hydroxylase: an enzyme involved in molting hormone inactivation.* *Arch Biochem Biophys* 376:389-398
- Wilson I.D., Bielby C.R., Morgan E.D.** (1982) *Evaluation of some phytoecdysteroids as internal standards for the chromatographic analysis of ecdysone and 20-hydroxyecdysone in arthropods.* *J Chromatogr* 236:224-229
- Wolff E.** (1871) *Aschen-Analysen von Landwirthschaftlichen Producten Fabrik - Abflällen und Wildwachsenden Pflanzen.* Berlin, Wiegandt & Hempel
- Wong L.Z., Li H.Y., Chang Y.Y., Zhu G.Q., Shong S.X., Li X.H., Ye J.S.** (1979) *Identification and physiological tests of phytoecdysones from Chinese flora with the silkworm Bombyx mori L.* *Acta Entomol Sin* 22:396-403
- Yen K.Y., Yang L.L., Okuyama T., Hikino H., Takemoto T.** (1974) *Screening of Formosan ferns for phytoecdysones. I.* *Chem Pharm Bull* 22: 805-808