

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Vliv agrotechniky a biologické ochrany rostlin na produkci
sekundárních metabolitů *Papaver somniferum* L.

Influence of agronomical practices and plant biological protection on
production of secondary metabolites of *Papaver somniferum* L.

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Linda Röslerová

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum

podpis

.....

Poděkování

Děkuji vedoucí diplomové práce RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D., za odborné rady, ochotu, odbornou pomoc, cenné připomínky a podporu při zpracování této diplomové práce.

Děkuji také všem ostatním, kteří se podíleli na vzniku této diplomové práce a nebyli jmenováni.

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV UK 267 002.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce.....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Biologie máku setého	10
3.1.1	Morfologie máku setého.....	10
3.1.2	Požadavky máku na prostředí.....	11
3.2	Agrotechnika máku	12
3.3	Význam máku setého	13
3.4	Obsahové látky máku setého.....	14
3.4.1	Morfin.....	16
3.4.2	Kodein	17
3.4.3	Papaverin	18
3.4.4	Narkotin.....	18
3.4.5	Thebain.....	19
3.5	Faktory ovlivňující produkci alkaloidů.....	20
3.5.1	Abiotické faktory.....	20
3.5.2	Biotické faktory	20
3.6	Makrofenologická stupnice BBCH	21
3.7	Škůdci máku.....	23
3.7.1	Krytonosec kořenový (<i>Stenocarus ruficornis</i>)	23
3.7.2	Krytonosec makovicový (<i>Neoglocianus maculaalba</i>)	24
3.7.3	Mšice maková (<i>Aphis fabae</i>).....	24
3.8	Choroby máku	25
3.8.1	Helmintosporióza	25
3.8.2	Plíseň maková.....	26

3.8.3	Srdéčková hniloba	27
3.8.4	Fyziologická spála máku	27
3.9	Odrůdy máku setého	28
3.9.1	Orfeus	28
3.9.2	OP-P-13	28
3.10	Těžké kovy v máku	29
3.11	Biologická ochrana rostlin.....	29
3.11.1	Polyversum.....	29
4	Experimentální část	31
4.1	Výsev.....	31
4.2	Záznam klimatických podmínek.....	31
4.3	Uspořádání osevní plochy	33
4.4	Ošetření máku Polyversem	35
4.5	Napadení rostlin chorobami	35
4.5.1	Listy.....	36
4.5.2	Stonky.....	36
4.5.3	Tobolky	37
4.6	Sklizeň máku	37
4.7	Zpracování tobolek.....	37
4.8	Stanovení alkaloidů z makovic	38
4.8.1	Princip metody HPLC	38
4.8.2	Příprava vzorku pro HPLC analýzu	38
4.8.3	Hodnocení metodou HPLC	40
4.8.4	Metoda tenkovrstvé chromatografie.....	44
5	Výsledková část.....	46
5.1	Helmintosporióza a plíseň maková	46

5.1.1	Odrůda OP-P-13	46
5.1.2	Odrůda Orfeus	49
5.2	Alkaloidy	52
5.2.1	Odrůda OP-P-13	53
5.2.2	Odrůda Orfeus	55
6	Diskuze	57
7	Závěr	63
8	Seznam použitých zkratk	65
9	Seznam použité literatury:	66

1 Úvod

Papaver somniferum (mák setý) je rostlina, kterou jsme si se studentkou Veronikou Cincibuchovou vybraly jako objekt zájmu naší diplomové práce.

Rostlina původně pochází z předoasijského centra (z Malé Asie, Iránu a Turkmenie). Z Asie, zejména Afghánistánu, pochází téměř veškeré množství, které se spotřebuje k výrobě nelegálních omamných látek. Již v 5. tisíciletí př. n. l. se z máku vyrábělo opium. Řecký lékař a filozof Galénos považoval opium za nejsilnější ze všech tehdy známých léků, který je zároveň nebezpečný a při předávkování může způsobit smrt (1). V Evropě se mák produkuje pro farmacii i potravinářství.

V České republice se mák pěstuje od nepaměti. Mák setý byl a je důležitým exportním artiklem (2). Česká republika patří mezi velké producenty máku setého. Mák setý zde má uplatnění v domácnostech a pekárnách. Část rostliny se zpracovává pro olej.

Mezi základní předpoklady, které mohou zvýšit produkci a učinit pěstování máku velmi výnosným, patří:

- Dosáhnout optimálního počtu vysoce produktivních rostlin na plošné jednotce.
- Udržovat pozemek nezaplevelený a zbavit se úporných plevelů, zejména těch, jejichž semena se obtížně ze sklizeného máku setého odstraňují.
- Vyvarovat se zbytečných ztrát při sklizni, včetně poškození semen.
- Vyvarovat se během pěstování i sklizně a posklizňové úpravy možností, které by mohly způsobit hygienické závady na sklizeném produktu (např. obsah nežádoucích látek, předčasné žluknutí atd.) (2).

Mák setý je rostlina starého kulturního původu, dnes s mnoha kultivary. Plodem je kulovitá tobolka (čili makovice), která obsahuje četná, malá semena. Směs alkaloidů se získává pod označením opium, což je vlastně zaschlá mléčná šťáva z naříznutých nezralých tobolek nebo získaná izolací z makoviny (3). Makovinou se rozumí nadzemní části máku setého kromě semen (4).

Český lékopis 2009 obsahuje články *Opium crudum*, *Opii extractum siccum normatum*, *Opii pulvis normatus* a *Opii tinctura normata*. Pojem „opium” pochází z řeckého slova opos (šťáva) (1). Makovina obsahuje 0,3 až 1,2 % opiových alkaloidů, třebaže surové opium jich obsahuje až 14 %, je makovina přesto ekonomicky výhodnou surovinou (5). Hlavními alkaloidy jsou morfin, kodein a papaverin (3). Tyto alkaloidy se používají buď samostatně, nebo v kombinaci s dalšími látkami. Ty se pak používají v analgeticky působících hromadně vyráběných léčivých přípravcích. Morfin byl ze surového opia izolován poprvé v roce 1806 německým lékárníkem F. Sertürnerem a od té doby nabyl v medicíně velkého významu (1).

Pro farmaceutické účely je snaha dosáhnout co největšího zastoupení alkaloidů. Výskyt a obsahové zastoupení alkaloidů se v různých odrůdách máku liší.

Pro potravinářské účely se používají semena a pěstují se odrůdy s jejich vyšším výnosem a lepší chutí. Pro farmaceutické využití je směrodatný obsah alkaloidů v makovině. Z požadavků jednotlivých odvětví plyne, že se pěstují rozdílné odrůdy. Makovina z potravinářského máku má také určitý obsah alkaloidů a je farmaceutickým průmyslem vykupována, ale samozřejmě za nižší ceny.

Finanční náklady na pěstování se neustále zvyšují. Chemické přípravky k hubení nežádoucích organismů (pesticidy) představují dnes vzhledem k velmi rozšířenému užívání vážné nebezpečí pro živou přírodu. Riziko spočívá zejména v možnosti jejich nevhodné aplikace, která vede k otravám necílových organismů a k hromadění jedovatých látek ve vodě, půdě, rostlinných a živočišných organizmech a jejich pronikání do potravních řetězců (6). Na významu nabývá biologická ochrana rostlin.

Na náš pokus byl použit přípravek Polyversum obsahující *Pythium oligandrum*, je to houbový mikroorganismus bojující proti fytopatogenním houbám.

2 Cíl práce

Cílem teoretické části bylo zmapovat nové informace o problematice pěstování máku, obzvlášť využití biologické ochrany rostlin a seznámit se s požadavky na pěstování máku setého.

Cílem experimentální části bylo ověřit schopnost biofungicidního přípravku Polyversum bojovat proti patogenním houbám, zjistit jeho vliv na produkci alkaloidů v makovicích máku setého za použití ošetřených a neošetřených (kontrolních) odrůd. Dále zjistit, jaké jiné faktory mají vliv na výnos rostlin máku setého, a zaměřit se na způsoby prevence ochrany rostlin máku setého.

3 Teoretická část

3.1 Biologie máku setého

3.1.1 Morfologie máku setého

oddělení: Magnoliophyta

třída: Magnoliopsida

podtřída: *Ranunculidae*

řád: Papaverales

čeleď: Papaveraceae

rod: *Papaver*

druh: *Papaver somniferum* L. (autor Carl Linné) (3)

Mák setý je bylina jednoletá. Lodyha je přímá, zpravidla jenom jedna. Květy jsou jednotlivé, na dlouhých stopkách, koncové, obojaké, s volnými, dvoučetnými obaly. Kališní lístky jsou dva, korunní lístky (2+2) jsou bílé až fialové. Tyčinek je mnoho. Semeník je svrchní (5). Květní vzorec: $\checkmark^* K_2 C_{2+2} A_{\infty} \underline{G}_{(\infty)}$ (3).



Obrázek 1: Květ máku setého

Plodem je kulovitá tobolka (makovice). Semena jsou nejčastěji modrošedá, mohou ale být i žlutá, bílá, hnědá a černá. V semenech je obsažen olej (1). Semena máku jsou ledvinovitého tvaru, dlouhá jsou asi 1,0 až 1,5 mm (7).

Listy jsou střídavé, s podlouhlým až vejčítým tvarem, mají zubatý zvlněný okraj. (1). Největší listovou plochu po vytvoření stonku mívá rostlina v době tvorby tobolek (8).

Šťáva získaná nařezáváním nezralých makovic se nazývá opium (*Latex papaveris*, *Opium crudum*). Obsahuje ze 75 % látky typické pro mléčné šťávy (sliz, kaučuk, pryskyřice). Zbýlých 25 % pojmají alkaloidy morfinového a papaverinového typu, dále i organické kyseliny (kyselina mléčná, mekonová, opiánová) (1).

Mák se pěstuje ve dvou základních typech (mák opiový a mák semenný) (9).

Rod *Papaver* zahrnuje i další druhy, např. *Papaver setigerum* (také produkuje morfin), *Papaver bracteatum* (označovaný jako thebainový mák, neprodukuje morfin), *Papaver rhoeas* (jednoletý plevel, v ČL 2009 uveden článek *Papaveris rhoeados flos*) (3, 10).

3.1.2 Požadavky máku na prostředí

Mák nepožaduje žádné zvláštní požadavky na prostředí, u nás ho lze úspěšně pěstovat především v bramborářské a řepařské výrobní oblasti. Přesto ale velmi citlivě reaguje na nevyrovnanost a odchylky v půdě, výživě a na povětrnostní podmínky (2).

3.1.2.1 Světlo

Nedostatek světla se na máku projeví celkovým oslabením, snížením výnosu semen i nižším obsahem alkaloidů v tobolkách. Žádoucí je teplé a slunečné počasí v období kvetení a v době dozrávání tobolek. Světlo nemá na vlastní klíčení vliv, ale na již vyklíčené rostliny máku má vliv velmi silný (2).

3.1.2.2 Teplota

Teplota je rozhodujícím faktorem pro klíčení semene máku. Při teplotě 10 °C semena vyklíčí během 5 až 6 dnů, při teplotě 18 až 20 °C během 3 až 4 dnů. Další zvýšení teploty rychlost klíčení již podstatně nezrychlí, ale sníží klíčivost. Nároky na teplo se během vegetace mění. Do doby rychlého růstu snáší nízké teploty. Vzcházející rostliny hynou při -6 až -8 °C. S nástupem rychlého růstu stonku odolnost vůči nízkým teplotám prudce klesá. V dalších fázích růstu je už mák na teplo náročný (2).

3.1.2.3 Voda

Rostlina požaduje vláhu od vzejití až do rozkvětu, poté se požadavky na vláhu zmenšují. Celkové nároky na vodu se během vegetace odhadují přibližně na 250 až 350 litrů na 1 m² při jarním výsevu, při podzimním výsevu se o 50 litrů zvyšuje. Nadměrné vlhko a teplo v době vzcházení je vhodným prostředím pro šíření houbových chorob na mladých rostlinách (2).

3.1.2.4 Půda a živiny

Nejlépe se rostlině daří v nezamokřené, vápnité, humózní půdě (1). Mladým rostlinám, obzvláště při vzcházení, škodí půdní škraloup, proto by se mák neměl pěstovat na půdách se sklonem ke kornatění (2).

Půdní reakce by se měla blížit neutrální a půda by měla mít dostatek základních živin, hlavně draslíku a fosforu. Fosfor nejčastěji limituje využití ostatních živin, to se nakonec projeví ve vyšší výnosu semen i makovic. Nadměrné zásobení dusíkem zhoršuje některé znaky a vlastnosti rostlin máku, které jsou nežádoucí pro tvorbu výnosu (2).

3.2 Agrotechnika máku

Nejvhodnější je pěstovat mák v nadmořské výšce 300 až 600 metrů. Je důležité, aby půda měla drobtovitou strukturu.

Mák se doporučuje vysévat na stejném pozemku ve čtyřletých až pětiletých cyklech. Je nepřípustné mák zasít po předplodině, která byla ošetřena herbicidy, jejichž rezidua by mák poškodila. Nejlepší předplodinou pro mák jsou okopaniny nebo luskoviny a jeteloviny. Mák se zasévá brzy na jaře (2).

Mák setý se vysévá do řádků, které jsou od sebe vzdálené přibližně 30 cm (1). Předpokladem rovnoměrného vzcházení máku setého je mělký výsev do hloubky 1 až 1,5 cm (2). Když mák vytvoří 3 až 4 listy, vyjednotí se na vzdálenost asi 10 až 15 cm nebo se ponechají 2 až 3 rostliny u sebe a jednotlivé skupinky se vyjednotí na vzdálenost přibližně 25 cm (1).

Jako doplňkový zásah při pěstování máku se používá chemická ochrana proti plevelům. Je nutné řídit se každoročně schvalovanými metodickými příručkami pro ochranu rostlin, používat pouze přípravky pro mák povolené a dodržovat hygienická nařízení a opatření. Semena máku se konzumují často bez zvláštní úpravy, a proto jsou zbytky herbicidů nežádoucí (2).

3.3 Význam máku setého

Mák se využívá pro izolaci farmaceuticky významných látek. Je také vyhledávanou pochutinou. V České republice převládá pěstování máku na semeno, makovina jako vedlejší produkt se z části vykupuje jako surovina pro farmaceutický průmysl.

Opium má široké použití. Používá se jako analgetikum, sedativum, antidiarhoikum atd. Hlavními alkaloidy jsou morfin, kodein a papaverin. Jejich schopnost tlumit bolesti i při rozsáhlých poraněních se využívá v chirurgii, ve vnitřním lékařství se uplatňují při tlumení bolestí při žlučnickových a ledvinových kolikách a u rakovinových onemocnění. (5).

Jako opioidy se označují látky, které jsou schopné působit na organismus prostřednictvím opioidních receptorů. Za opiáty jsou považovány látky, které mají podobnou chemickou strukturu jako morfin (12).

Problém se zneužíváním opia stále narůstá. Největším nelegálním producentem opia je Afghánistán, kde Spojené národy nyní registrují o milion úmrtí souvisejících s opiáty více než v předchozích letech (13). Druhým a třetím nejvýznamnějším producentem opia je Barma a Laos (14).

V České republice je zneužívání návykových látek chráněno zákonem. Osoby pěstující mák setý nebo konopí na celkové ploše větší než 100 m² jsou povinny podle zákona č. 167/1998Sb. o návykových látkách, ust. § 29 předat hlášení místně příslušnému celnímu orgánu podle místa pěstování písemně nebo v elektronické podobě podepsané zaručeným elektronickým podpisem (4).

3.4 Obsahové látky máku setého

Nejvýznamnější obsahové látky jsou alkaloidy. Alkaloidy jsou sekundární metabolity. Jsou to dusíkaté sloučeniny (většinou heterocyklické), vyskytují se hlavně v rostlinné říši (15).

Alkaloidy vznikají z aminokyselin. Rostlina většinou obsahuje jeden hlavní alkaloid a ten je doprovázen řadou alkaloidů vedlejších (16). Mnoho alkaloidů je velmi toxických.

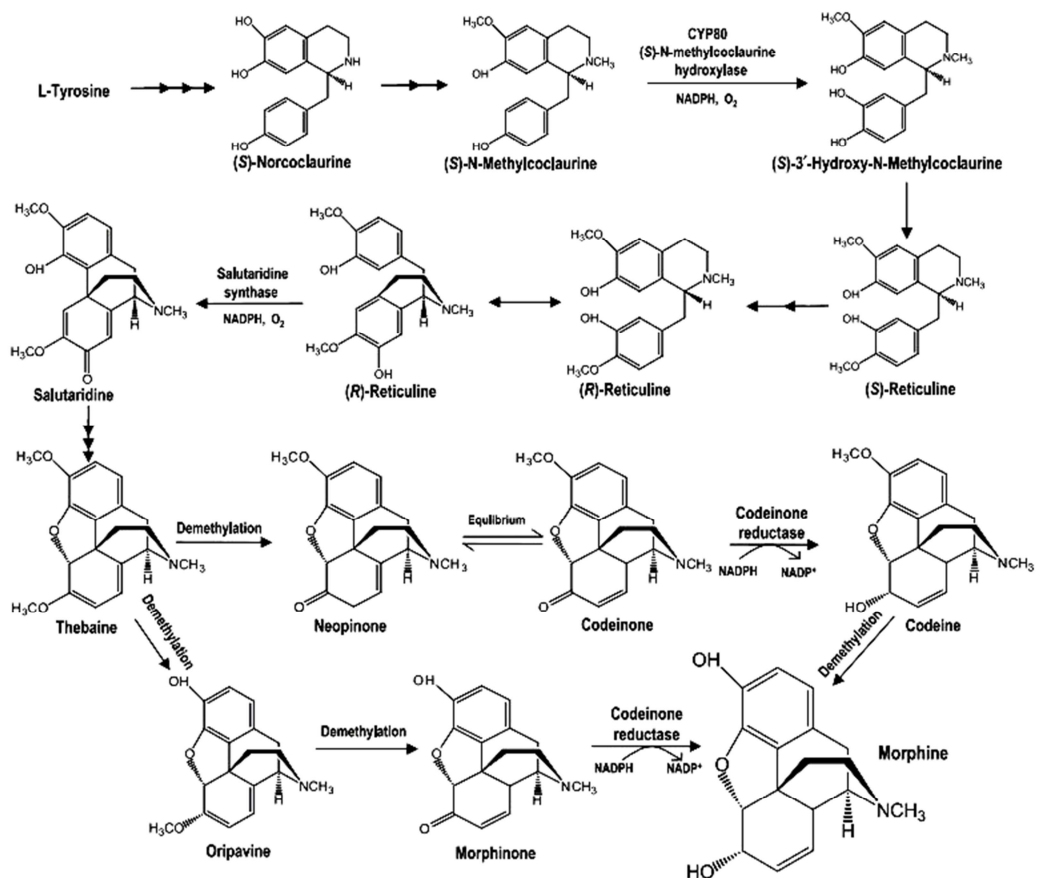
Druh *Papaver somniferum* produkuje přibližně 80 alkaloidů zařazených do různých tetrahydrobenzylisochinolinových skupin (17). Jednu čtvrtinu surového opia tvoří alkaloidy s organickými kyselinami. Izolují se z opia i makoviny.

Mák obsahuje především tyto typy alkaloidů:

- **morfinanové (fenanthrenové):** morfin, kodein, thebain, neopin, pseudomorfin, hydrokodein
- **benzylisochinolinové:** papaverin, laudanin, laudanosin, laudanidin, papaveraldin, paladin, kodamin
- **ftalylisochinolinové:** narkotin, narcein, normarcein
- **protoberberinové:** berberin

- **tetrahydroisochinolinové:** hydrokotarnin
- **protopinové:** protopin, kryptopin
- **aporfínové:** korytuberin, magnoflorin, isoboldin, papaverrubin, glaudin
- **alkaloidy neznámé struktury:** lanthopin, papaveramin (18).

Papaver somniferum produkuje kromě alkaloidů i další látky, např. kyseliny (jantarová, jablečná, citrónová, octová, mléčná), tuky, sacharidy, pryskyřice, vosky, slizy, bílkoviny, polypeptidy a aminokyseliny (18).



© Obrázek 2: Syntéza alkaloidů máku setého (19)

3.4.1 Morfin

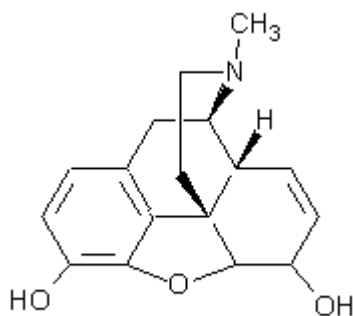
Systematický název morfinu je (5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5 α -epoxy-17-methylmorfinan-3,6-diol (20). Je jedním z nejdůležitějších a nejrozšířenějších opioidů pro léčbu akutní a chronické bolesti (21). Byl izolován v roce 1803 německým lékárníkem Sertürnerem (22). Morfin svou strukturou napodobuje látky tělu vlastní natolik, že dokáže vstoupit do interakcí s receptory, na které se za normálních okolností váží látky tělu vlastní. Hlavním účinkem je silné analgetické působení (23). V 70. letech byly objeveny tři typy receptorů pro opioidní látky. Tyto receptory vedly k prozkoumání látek tělu vlastních, které se na tyto receptory váží (enkefaliny, dynorfin, β endorfin). Jsou to látky označované jako endogenní opioidní peptidy (24).

Morfin není konečným metabolickým produktem. Během vývoje se morfin metabolizuje. Tato přeměna probíhá hlavně v makovině. Metabolizované formy morfinu jsou přemístěny do semen (25).

Hlavním zdrojem je makovina. Značná část morfinu se převádí na kodein methyloací fenolického hydroxyly v poloze 3.

Základem struktury je morfinan. Aminový dusík v poloze 17 je terciární. Ve struktuře morfinu jsou tři kyslíkové atomy. Jeden kyslíkový atom je součástí heterocyklu, druhý kyslík je součástí fenolické skupiny, třetí kyslík je součástí skupiny alkoholické.

Biosynteticky je morfin odvozen od aminokyseliny tyrosinu (26).

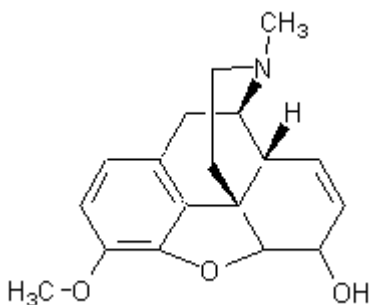


Obrázek 3: Strukturní vzorec morfinu, nakresleno v programu ChemSketch

Morfin je součástí léčivých přípravků, např. Morphin Biotika 1% injekční roztok, Sevredol potahované tablety (27).

3.4.2 Kodein

Kodein patří také mezi hlavní alkaloidy opia. Používá se k tišení kašle (16). Alkylací fenolické hydroxyskupiny je analgetické působení tohoto derivátu morfinu značně oslabeno. Inhibice centra pro kašel zůstává však zachována (23). Systematický název kodeinu je (5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorfinan-6-ol (20).

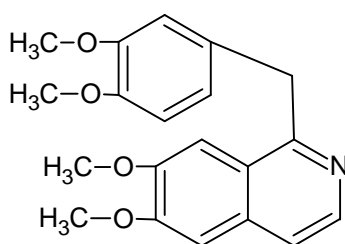


Obrázek 4: Strukturní vzorec kodeinu, nakresleno v programu ChemSketch

Kodein je součástí léčivých přípravků, např. Codein Slovakofarma tablety, Korylan tablety, Panadol Ultra tablety (27).

3.4.3 Papaverin

Papaverin je benzyloisochinolinový alkaloid. Dnes se převážně připravuje synteticky (20). Papaverin se v rostlině vyskytuje ve velmi malé míře nebo dokonce chybí. Všechny kyslíky papaverinu jsou methylované (28). Systematický název papaverinu je 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxyisochinolin (10). Byl prakticky až do třicátých let jediným používaným spasmolytikem muskulotropního typu (29). Papaverin se používá k léčení křečí gastrointestinálního traktu a žlučových cest.

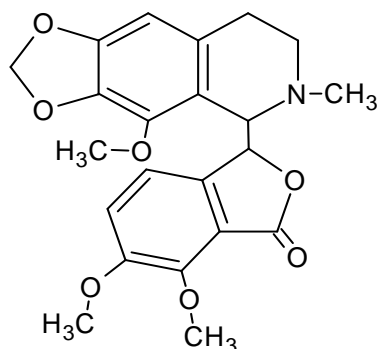


Obrázek 5: Strukturální vzorec papaverinu, nakresleno v programu ChemSketch

3.4.4 Narkotin

Narkotin (synonymum noskabin) zesiluje analgetický účinek morfinu, tiší kašel, vyrábějí se z něho další deriváty působící jako hemostatika při děložním krvácení (16).

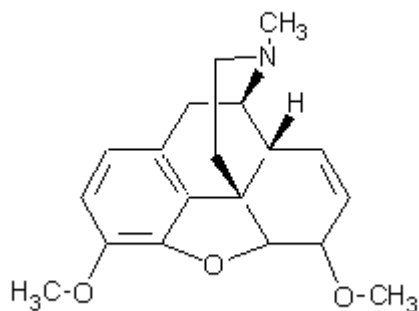
Systematický název narkotinu je (3S)-6,7-dimethoxy-3-[(5R)-4-methoxy-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isochinolin-5-yl]isobenzofuran-1-(3H)-on (10). Není součástí léčivých přípravků.



Obrázek 6: Strukturální vzorec narkotinu, nakresleno v programu ChemSketch

3.4.5 Thebain

Analgetická účinnost thebainu je zanedbatelná, je však cennou surovinou pro přípravu tzv. polysyntetických morfinanů (20). Je hlavním alkaloidem máku listnatého. Při biosyntéze alkaloidů máku se nejdříve tvoří thebain, který se postupně demethyluje na kodein a posléze na morfin (16). Systematický název thebainu je 4,5 α -epoxy-3-methoxy-17-methylmorfinan-6-on (10). Thebain není součástí léčivých přípravků.



Obrázek 7: Strukturální vzorec thebainu, nakreslené v programu ChemSketch

3.5 Faktory ovlivňující produkci alkaloidů

Tvorba alkaloidů může být ovlivněna mnoha faktory, protože rostlina reaguje na stresové podněty, které na ni působí.

Syntéza morfinu silně podléhá působení vnějšího prostředí, hlavně vlivu klimatických podmínek (30). Výskyt alkaloidů dále závisí na pěstované odrůdě máku, obsahu organických a anorganických látek v půdě a ovzduší, či způsobu pěstování. Snížení výnosu může být zapříčiněno také pozdním výsevem (18).

Následující přehled uvádí nejdůležitější stresové faktory, se kterými se rostliny v přírodě setkávají.

3.5.1 Abiotické faktory

3.5.1.1 fyzikální:

- mechanické účinky větru
- nadměrné záření (UV, viditelné)
- extrémní teploty

3.5.1.2 chemické:

- nedostatek vody a kyslíku
- nedostatečné množství živin v půdě
- nadbytek iontů solí a vodíku v půdě
- toxické kovy
- jedovaté plyny ve vzduchu

3.5.2 Biotické faktory

- živočichové (spásání, poranění)
- patogenní mikroorganizmy (viry, bakterie, houby)
- vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitizmus) (31)

3.6 Makrofenologická stupnice BBCH

Je systém pro jednotné kódování růstových fází jednoděložných a dvouděložných rostlin. Tato stupnice byla v diplomové práci použita k určení vhodného stádia pro aplikaci přípravku Polyversum.

Fáze	Charakteristika růstové fáze
00	suché semeno
01	počátek bobtnání semen
03	konec bobtnání semen
05	kořínek vystoupil ze semene
06	prodlužování kořínků, tvorba kořenových vlásků
11	první pravý list, pár listů nebo přeslen je vyvinutý
12	2 pravé listy, listové páry nebo přesleny rozvinuty
13	3 pravé listy, listové páry nebo přesleny rozvinuty
14	4 pravé listy, listové páry nebo přesleny rozvinuty
15	5 pravých listů, listových párů nebo přeslenů rozvinuto
16	6 pravých listů, listových párů nebo přeslenů rozvinuto
17	7 pravých listů, listových párů nebo přeslenů rozvinuto
18	8 pravých listů, listových párů nebo přeslenů rozvinuto
19	9 nebo více pravých listů, listových párů nebo přeslenů rozvinuto
21	první postranní výhon viditelný
22	2 postranní výhony viditelné
23	3 postranní výhony viditelné
24	4 postranní výhony viditelné
25	5 postranních výhonů viditelných
26	6 postranních výhonů viditelných
27	7 postranních výhonů viditelných
28	8 postranních výhonů viditelných
29	9 nebo více postranních výhonů viditelných
31	stonek (růžice) dosáhl 10 % konečné délky (konečného průměru)
32	stonek (růžice) dosáhl 20 % konečné délky (konečného průměru)
33	stonek (růžice) dosáhl 30 % konečné délky (konečného průměru)
34	stonek (růžice) dosáhl 40 % konečné délky (konečného průměru)
35	stonek (růžice) dosáhl 50 % konečné délky (konečného průměru)
36	stonek (růžice) dosáhl 60 % konečné délky (konečného průměru)
37	stonek (růžice) dosáhl 70 % konečné délky (konečného průměru)
38	stonek (růžice) dosáhl 80 % konečné délky (konečného průměru)
39	stonek dosáhl konečné délky, nebo růžice konečného průměru
41	skliditelné vegetativní části rostliny se začínají vyvíjet

43	skliditelné vegetativní části rostliny dosáhly 30 % konečné velikosti
45	skliditelné vegetativní části rostliny dosáhly 50 % konečné velikosti
47	skliditelné vegetativní části rostliny dosáhly 70 % konečné velikosti
49	skliditelné vegetativní části rostliny dosáhly konečné velikosti
51	viditelné květenství nebo květní poupata
55	první jednotlivé květy jsou viditelné
59	první korunní plátky viditelné
61	počátek kvetení: 10 % květů otevřených nebo 10 % kvetoucích rostlin
63	30 % květů otevřených nebo 30 % kvetoucích rostlin
65	plný květ, 50 % květů otevřených nebo 50 % kvetoucích rostlin, první korunní plátky opadávají
67	dokvětání, většina květních plátků opadlých nebo zaschlých
69	konec kvetení, viditelná násada plodů
71	malé plody viditelné, nebo plody dosáhly 10 % konečné velikosti
73	první plody dosáhly konečné velikosti, nebo plod dosáhl 30 % konečné velikosti
75	50 % plodů dosáhlo konečné velikosti, nebo plod dosáhl 50 % konečné velikosti
77	70 % plodů dosáhlo konečné velikosti
79	téměř všechny plody dosáhly konečné, pro druh nebo odrůdu typické velikosti
81	počátek zrání nebo vybarvování plodů
85	pokročilé zrání nebo pro druh nebo odrůdu typické vybarvování plodů
88	plody začínají měknout (druhy s dužnatými plody)
89	plná zralost, plody jsou plně pro druh nebo odrůdu typicky vybarvené, počátek opadávání plodů
93	listy začínají měnit barvu nebo opadávat
95	50 % listů změnilo barvu nebo opadlo
97	konec opadávání listů, rostliny nebo jejich nadzemní části odumřely nebo jsou v deformaci
99	sklizené produkty (v této fázi se sklizené nebo skladované produkty ošetřují)

Tabulka 1: Mezinárodní makrofenologická stupnice vývojových fází BBCH (32)

3.7 Škůdci máku

3.7.1 Krytonosec kořenový (*Stenocarus ruficornis*)

Poškozuje zejména vzcházející mák. Přezimuje jako dospělec v půdě a na jaře migruje na vzcházející porosty máku, kde škodí žírem. Samičky kladou vajíčka do vyhlodaných dutinek v pletivu na spodní straně listů, larvy se vylíhnou do týdne. Svůj cyklus zakončují na kořenech máku. Kuklí se v půdě a po 14 dnech se z nich vylíhnou brouci. Je to suchomilný a teplomilný škůdce (33). Škodí bělavými larvami na kořenech mladých rostlin. Silně poškozená rostlina vadne, žloutne a postupně vysychá. Pokud jsou napadeny kořeny, chemická ochrana již není příliš účinná (2). Nebezpečí silného poškození zmenšují časné výsevy a všechny zásahy urychlující růst rostlin.



© Obrázek 8: Dospělec krytonosce kořenového (34)

3.7.2 Krytonosec makovicový (*Neoglocianus maculaalba*)

Je vážným škůdcem na tobočkách máku, typická je pro něho bílá skvrna na bázi tmavošedých krovek. Vyrůstající se larvy vyžírají vnitřní přihrádky a brání tak vývinu semen (2). Larvy vylézající z tobolky tvoří otvory, které následně bývají vstupní branou pro patogeny hub, např. pro helmintosporiózu. Zničená semena jsou znehodnocená (35).

3.7.3 Mšice maková (*Aphis fabae*)

Původcem je *Aphis fabae*. Napadá listy, květy i tobolky. Sáním poškozené rostliny se svinují, ostatní napadené části jsou zdeformované a rostliny oslabené. Při silném napadení pokrývají kolonie mšic velké části tobolek, v nichž se tvoří méněcenná semena (2).



Obrázek 9: Mšice maková na rostlině máku setého

3.8 Choroby máku

Nejzávažnější choroby máku jsou helmintosporióza, plíseň maková, srdéčková hniloba a spála máku.

3.8.1 Helmintosporióza

Původci se označují *Dendryphion penicillatum* a *Pleospora papaveracea*. Dříve vžitý název původce *Helminthosporium papaveris* dnes již neplatí (36). Helmintosporióza je nejzhubnější chorobou. Může snížit výnosy semen až o 80 % (2). Šíří se z posklizňových zbytků, ale také infikovaným semenem, kde jsou konidie zachycené na povrchu. Za příznivých podmínek mycelium z konidií přeroste na děložní lístky, nebo napadne mladé rostlinky, které může i zničit. Další vývoj probíhá na listech, které následkem choroby předčasně usychají. Napadeny mohou být i tobolky, kde je chorobě vstupní branou poškození makovic, způsobené krytonoscem makovicovým. Houba se tak může dostat až dovnitř makovice a znehodnotit semena máku (37).

Houba napadá všechny části rostlin po celou dobu vegetace. Choroba se nejvíce projevuje v době rychlého růstu rostlin v podobě hnědých, později černých skvrn a modročerných proužků na stoncích. Napadené tobolky bývají menší, objevují se na nich tmavé šedo zelené plstnaté povlaky. Uvnitř tobolek jsou nevyvinutá, zdeformovaná semena, spojená vatovými shluky mycelia houby (2).



Obrázek 10: Helmintosporiíza na listu máku setého

3.8.2 Plíseň maková

Jako původce se označuje *Peronospora arborescens*. Přenáší se semenem. Listy se často svinují a jsou zkadeřené. Projevuje se v podobě žlutohnědých skvrn na spodní straně listů v období přízemního růstu. Skvrny na spodní straně šednou, objevují se nafialovělé povlaky houbového mycelia (2). Je na rostlinách máku nejlépe patrná v době zrání makovic. U napadených rostlin se deformuje stoněk pod tobolkou. Stoněk černá a je pokroucený. Na povrchu stonku je povlak konidioforů. Plíseň *Peronospora arborescens* napadá také listy a způsobuje jejich usychání (37).

Někdy není snadné rozlišit *Peronospora arborescens* od *Peronospora cristata*, protože mají některé společné znaky a napadají podobné hostitele (38). Většina rostlin se systémovou infekcí umírá ještě nevyzrálá. Rostliny s topickou infekcí přežívají, ale mají menší vzrůst, menší semena a jejich výnos je minimální (39).



© Obrázek 11: Plíseň maková (40)

3.8.3 Srdéčková hniloba

Je způsobena nedostatkem bóru v půdě. Nemocné rostliny se opožďují v růstu, nejmladší rostliny hnědnou. Poupata hnědnou a posléze odumírají. Prevence spočívá ve zvýšení obsahu bóru v půdě (2).

3.8.4 Fyziologická spála máku

Objevuje se na slévavých půdách se škraloupem. Rostliny jsou následně napadené houbovými chorobami a vzniká zaškrcení kořenového krčku u vzcházejících rostlin. Rostliny padají a hynou (2).

3.9 Odrůdy máku setého

Rozlišují se jarní a ozimé odrůdy máku. V České republice se dává přednost jarním odrůdám, např. Orfeus. Z ozimých odrůd lze jmenovat Zeno 2002. Používání jarních odrůd na podzim je rizikové, protože jim hrozí vymrznutí. Výhoda ale spočívá v lepším překonávání jarních stresů, například sucha (41).

Dlouhodobým záměrem je vyšlechtit mák univerzálního typu s vysokým výnosem semene, konkrétní barvy a vysokým obsahem alkaloidů v makovicích.

V rámci této diplomové práce byly sledovány dvě odrůdy (Orfeus a OPP-13).

3.9.1 Orfeus

Orfeus je odrůda určená k produkci semen modré barvy a makoviny pro farmaceutické účely. V registračních zkouškách SR dosáhla výnosu semen 101,8 % vzhledem ke kontrolním odrůdám Opal a Major. Je středně raný, středně vysoký, dobře odolný proti poléhání. Obsah morfinu v makovině je 0,40 % (42).

Pro tuto odrůdu je charakteristický střední až nižší obsah morfinu. Je odolnější k houbovým chorobám (43).

3.9.2 OP-P-13

Je odrůda s nižším obsahem morfinu, středně odolná k houbovým chorobám. Tato odrůda zatím není registrována (43).

3.10 Těžké kovy v máku

Po producentech máku setého se často požaduje prokázání obsahu těžkých kovů, především kadmia, zinku a olova. Mák má totiž velkou schopnost kumulace těžkých kovů z půdy, zejména zmíněného kadmia a olova. Množství těchto prvků je sledované. Ke kontaminaci půd dochází přirozeným obsahem cizorodých prvků v půdě a atmosférickými depozicemi (11).

3.11 Biologická ochrana rostlin

Mák je velmi citlivý na rezidua chemické ochrany (herbicidů, fungicidů, insekticidů). Proto se neustále hledají metody jak k ochraně rostlin, tak ke zvyšování produkce. Biologická ochrana rostlin je šetrná k životnímu prostředí a má nízkou nebo nulovou toxicitu k necílovým druhům (44).

Biologická ochrana znamená potlačování škůdců pomocí jejich přirozených nepřátel (mikroorganismy, cizopasníci napadající škůdce, dravci, opylovači). Většina odborníků dnes považuje biologickou ochranu za ekologicky, hygienicky i ekonomicky nejvhodnější metodu potlačování škůdců (6). Biologická ochrana rostlin pomůže kulturám, aniž bychom se museli zabývat jedovatými zbytky látek. Přispívá se tak ke zdravému růstu rostlin, ale také k ochraně životního prostředí (45). Základním předpokladem úspěšné práce je znalost ekologických nároků a správného poměru škůdců a jejich přirozených nepřátel (6).

V našem experimentu byl použit přípravek Polyversum, obsahující spóry *Pythium oligandrum* jako aktivní komponentu (parazitickou houbu), která v rostlině indukuje obranné reakce (46).

3.11.1 Polyversum

Základním mechanismem účinku je mykoparazitismus. *Pythium oligandrum* napadá fytopatogenní houby, enzymaticky rozkládá jejich mycelia, sklerocia a takto získané živiny využívá pro vlastní výživu. Kromě toho produkuje protein oligandrin, ten

v rostlinách navozuje přirozenou odolnost proti foliárním houbovým chorobám (47). Nepředpokládá se, že by *Pythium oligandrum* produkovalo toxiny, které by působily proti jiným houbám (48).

Pythium oligandrum je účinný proti houbovým chorobám kořenů a nadzemních částí rostlin. Hyfy houby mohou penetrovat buněčnou stěnou patogena (49). *Pythium oligandrum* účinkuje proti patogenním houbám z rodů *Phoma*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Botrytis*, kromě toho indukuje zvýšenou odolnost rostlin k houbovým chorobám, jako jsou např. *Alternaria brassicae*, *Peronospora*, *Helminthosporium* (47).

4 Experimentální část

V rámci této diplomové práce byl pěstován mák v Botanické zahradě léčivých rostlin při Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

V experimentu byly sledovány dvě odrůdy máku setého (Orfeus a OP-P-13). Každá odrůda byla ve dvou variantách (ošetřená/neošetřená přípravkem Polyversum obsahujícím houbu *Pythium oligandrum*). Každá varianta měla tři opakování.

Paralelně se mnou pracovala kolegyně Veronika Cincibuchová, která sledovala dvě jiné odrůdy (Lazur a Orbis). Výsev byl uskutečněn na jednom poli, které bylo rozděleno na 24 menších záhonů (parcel). Každý záhon měl rozlohu 10,4 m².

V průběhu vegetace rostlin se objevili škůdci krytonosec kořenový a mšice maková. Krytonosec kořenový se na rostlinách objevil 30. 4. 2012 a k jeho mohutnému rozmnožení došlo 4. 5. 2012. Také choroby helmintosporióza a plíseň maková napadly rostliny máku. Proto byl vyhodnocen i stupeň poškození máku chorobami.

4.1 Výsev

Semena poskytl Výzkumný ústav olejin Opava. Semena nebyla před výsevem mořena ani insekticidně ošetřena.

Na poli, na kterém byl mák vyset, byl rok předtím pěstován měsíček zahradní. Půda měla pH 7,1. Pole nebylo žádným způsobem ošetřeno. Vyseto bylo do nekrytého lůžka, do nahrubo připraveného pozemku. Výsev proběhl ve dnech 26. a 27. 3. 2012. Vzdálenost řádků byla 15 cm. Rostliny byly po vzejití vyjednoceny na vzdálenost 10 cm.

4.2 Záznam klimatických podmínek

Pro zjištění faktorů, které ovlivnily produkci a odolnost rostlin, byly zaznamenávány i klimatické podmínky. Konkrétně teplota vzduchu, dlouhodobý normál

teploty vzduchu (v letech 1961 až 1990), odchylky teplot od normálu, úhrn srážek, dlouhodobý srážkový normál a odchylky srážek od normálu.

Všechny tyto meteorologické hodnoty byly naměřené z meteorologické stanice Hradec Králové.

měsíc	11/11	12/11	1/12	2/12	3/12	4/12	5/12	6/12	7/12	8/12	9/12
teplota vzduchu (°C)	2,6	1,5	-0,8	-5,6	4,5	8,1	14,4	16,5	18	17,7	12,6
dlouhodobý normál teploty vzduchu 1961-1990 (°C)	2,4	-1,4	-3,2	-1,6	1,9	6,6	11,8	14,9	16,1	15,8	12,3
odchylka od normálu (°C)	0,2	2,9	2,4	-4	2,6	1,5	2,6	1,6	1,9	1,9	0,3

Tabulka 2: Záznam teplot v Hradci Králové (od listopadu r. 2011 do září r. 2012) (50)

měsíc	11/11	12/11	1/12	2/12	3/12	4/12	5/12	6/12	7/12	8/12	9/12
úhrn srážek (mm)	1	87	100	50	14	33	62	77	156	86	50
dlouhodobý srážkový normál 1961-1990 (mm)	62	70	60	47	49	48	76	86	83	84	60
odchylka od normálu (%)	1	125	167	106	29	69	82	90	188	102	83

Tabulka 3: Záznam srážek v Hradci Králové (od listopadu r. 2011 do září r. 2012) (51)

4.3 Uspořádání osevní plochy

Vysvětlivky:

ORF (odrůda Orfeus)

OP (odrůda OP-P-13)

ORB (odrůda Orbis)

LA (odrůda Lazur)

Zkratky odrůd podbarvené žlutou barvou značí parcely ošetřené přípravkem Polyversum.

Parcely F1 až F4 byly kvůli stromům více zastíněné než ostatní parcely.

F1 ORF b3	F2 OP a2	F3 ORF b2	F4 OP a3
E1 LA b3	E2 ORB b3	E3 LA a3	E4 ORB a3
D1 ORF a3	D2 OP a1	D3 ORB b2	D4 LA b2
C1 LA a2	C2 ORB b1	C3 OP b3	C4 ORF a2
B1 OP b1	B2 ORF a1	B3 LA a1	B4 OP b2
A1 ORB a1	A2 LA b1	A3 ORB a2	A4 ORF b1

Tabulka 4: Schéma uspořádání osevní plochy

4.4 Ošetření máku Polyversem

Jak již bylo zmíněno výše, jako biologická ochrana byl zvolen přípravek Polyversum obsahující *Pythium oligandrum*.

Pro přípravu aplikační formy bylo postupováno podle návodu od firmy Biopreparáty s.r.o. Do čisté uzavíratelné plastové nádoby byl vložen filtrační sáček, do něhož bylo nasypáno odměřené množství přípravku Polyversum. Filtrační sáček byl poté zavázán. Nádoba byla zalita 20 litry čisté vody. Filtrační sáček byl ponechán v nádobě několik hodin. Tímto vylouhováním vznikla suspenze, která byla přimíchána do nádrže postřikovače.

Na ošetřené rostliny (viz Schéma uspořádání osevní plochy), byla aplikována ochrana dvakrát. První ošetření bylo 24. 4. 2012 v makrofenologické fázi BBCH 12 až 19 a druhé ošetření 29. 5. 2012 v makrofenologické fázi BBCH 31. Dávka přípravku Polyversum pro ošetření máku setého byla 0,1 kg/ha. Polyversum bylo aplikováno pomocí ručního postřikovače.

4.5 Napadení rostlin chorobami

V průběhu pěstování rostlin máku setého došlo k jejich velkému napadení helmintosporiózou a plísní makovou. Stupnici, podle které se určuje rozsah napadení rostlin helmintosporiózou a plísní makovou poskytl Výzkumný ústav olejin Opava. Kontrola se provádí vizuálně. Hodnocen byl zvlášť každý záhon. Hodnocení bylo realizováno zvlášť u makovic, stonků i listů rostlin. Výsledky hodnocení jsou uvedeny ve Výsledkové části této diplomové práce.

4.5.1 Listy

Hodnotí se jednotlivé rostliny (30 kusů rovnoměrně vybraných z parcely) podle následující stupnice s třídami jako středními hodnotami:

Střední hodnota	Popis	Napadení
0%	bez napadení	0 % listové plochy napadeno
5%	slabé napadení	do 10 % listové plochy napadeno
20%	střední napadení	10 až 30 % listové plochy napadeno
40%	silné napadení	30 až 50 % listové plochy napadeno
75%	velmi silné napadení	50 až 100 % listové plochy napadeno

Tabulka 5: Stupnice hodnocení napadení listů chorobami

4.5.2 Stonky

Hodnotí se jednotlivé stonky (na 30 rostlinách rovnoměrně vybraných z parcely) podle následující stupnice s třídami jako středními hodnotami:

Střední hodnota	Popis	Napadení
0%	bez napadení	0 % stonku napadeno
5%	slabé napadení	do 10 % celé rostliny napadeno
20%	střední napadení	10 až 30 % z celé rostliny napadeno
40%	silné napadení	30 až 50 % z celé rostliny napadeno
75%	velmi silné napadení	50 až 100 % z celé rostliny napadeno

Tabulka 6: Stupnice hodnocení napadení stonků chorobami

4.5.3 Tobolky

Hodnotí se jednotlivé tobolky (30 kusů rovnoměrně vybraných tobolek z parcely z hlavního stonku) podle následující stupnice s třídami jako středními hodnotami:

Střední hodnota	Popis	Napadení
0%	bez napadení	0 % tobolka bez napadení
5%	slabé napadení	do 10 % povrchu vnitřku tobolky napadeno
20%	střední napadení	10 až 30 % povrchu vnitřku tobolky napadeno
40%	silné napadení	30 až 50 % povrchu vnitřku tobolky napadeno
75%	velmi silné napadení	50 až 100 % povrchu vnitřku tobolky napadeno

Tabulka 7: Stupnice napadení tobolek chorobami

4.6 Sklizeň máku

Makovice byly sklizeny ručně v srpnu 2012 zcela zralé a suché (semena byla oddělena od lamel a při zatřesení tobolkou mák šustil).

4.7 Zpracování tobolek

Usušené makovice, které byly použity pro analýzu, byly zváženy. Makovice byly před rozemletím pro extrakci očištěny, zbylá semena máku byla odstraněna.

4.8 Stanovení alkaloidů z makovic

Pro kvalitativní a kvantitativní stanovení alkaloidů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) bylo třeba nejprve makovice upravit tak, aby bylo možné alkaloidy izolovat.

4.8.1 Princip metody HPLC

HPLC je separační metoda, která umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu. Při separaci analytů dochází k opakovanému vytváření rovnovážného stavu dělených analytů mezi mobilní a stacionární fází (52).

HPLC je metoda v kolonovém uspořádání, oproti tomu TLC má plošné uspořádání. U obou metod je mobilní fází kapalina.

Kvalitativní charakteristika je retenční čas (tj. čas od nástřiku vzorku na kolonu po maximum píku). Kvantitativní charakteristika je plocha (nebo výška) pod píkem (53). Cílem HPLC je rozdělit směs analytů na sérii píků v přijatelném čase, přičemž každý pík představuje jeden analyt ze vzorku.

Pro analýzu alkaloidů v této diplomové práci bylo použito UV/VIS detektoru. To znamená proměňování absorpance elektromagnetického záření složkami eluátu.

Totožnost alkaloidů byla určena na základně retenčního času standardů. Množství alkaloidů bylo počítáno metodou kalibrační křivky v programu Excel, kdy se stanoví vztah mezi měřeným signálem (y) a koncentrací stanovované látky (x) a vypočítá se kalibrační funkce.

4.8.2 Příprava vzorku pro HPLC analýzu

Pomůcky: mlýnek, odměrný válec, odměrné baňky, zpětný chladič, varné kamínky, filtrační papír, nálevka, laboratorní lžička, frita, vata, křemelina, dělicí nálevka, kádinky, pH papírky, penicilínové lahvičky, špachtle.

Přístrojové vybavení:

- analytické váhy Kern ABT 120-5DM
- vakuová odparka Heidolph Laborota 4000
- ultrazvuková lázeň Sonorex super 10P digital (Bandelin)
- elektromagnetické míchadlo Heidolph MR 3001 K
- chromatografický systém Agilent 1260 Infinity

Chemikálie:

- ethanol 96% denaturovaný methanolem, C_2H_5OH
- deionizovaná voda, H_2O
- kyselina chlorovodíková 2% (Penta), HCl
- diethylether (Penta), $(C_2H_5)_2O$
- ethylacetát (Penta), $CH_3COOC_2H_5$
- chloroform (Penta), $CHCl_3$
- uhličitan sodný 10% (w/w) bezvodý (Lachema), Na_2CO_3
- síran sodný bezvodý (Penta), Na_2SO_4
- hydroxylamin (Penta), NH_2OH
- acetonitril (Penta), CH_3CN

Pro HPLC analýzu byly použity tyto standardy:

- morfin (ČL 2009, Dopl. 2012: morfin-hydrochlorid trihydrát, MW 375,85 = 1 mol)
- kodein (ČL 2009, Dopl. 2012: kodein-fosfát hemihydrát, MW 406,37 = 1 mol)
- thebain izolovaný v laboratoři
- papaverin (ČL 2009, Dopl. 2012, papaverin-hydrochlorid, MW 375,85 = 1 mol)
- narkotin = (S,R)-noskapin (Sigma Aldrich, Praha)

Všechna činidla i chemikálie musí být určené pro HPLC, případně čistoty p. a.

Rozemleté makovice navážené v množství 4,00 gramů byly podrobeny varu s 50 ml ethanolu ve varné baňce pod zpětným chladičem. Tento výluh byl zfiltrován. Ulpívající zbytky byly ještě dvakrát podrobeny varu s 50 ml ethanolu za účelem zefektivnění zkoušky. Takto získané extrakty byly smíchány a přefiltrovány přes fritu. Následně byl filtrát odpařen do sucha na vakuové odparce. K získanému koncentrátu bylo přidáno 50 ml 2% kyseliny chlorovodíkové. Poté byl rozpuštěný vzorek v dělicí nálevce třikrát vytřepáván s 20 ml diethyletheru. Etherový podíl byl vyřazován, vodná vrstva byla vracena zpět do dělicí nálevky, ke které bylo přidáno 20 ml ethylacetátu a uhličitán sodný pro úpravu pH na hodnotu 9 až 10. Ethylacetátem se vytřepávalo celkem třikrát. Ethylacetátová část byla vysušena síranem sodným a přefiltrována přes filtrační papír a na vakuové odparce odpařena při 30 °C. Takto získaný extrakt byl rozpuštěn v chloroformu, převeden do předem zvážených a označených ampulek a zahuštěn. Ampulky byly uchovávány ve vakuu. Z tohoto stádia bylo možné navázat 1 mg na HPLC analýzu obsahových látek v makovicích. Tento postup izolace alkaloidů poskytl prof. Opletal a jeho pracovní tým z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, katedry Farmaceutické botaniky a ekologie.

4.8.3 Hodnocení metodou HPLC

Roztoky vzorků s analyzovanými alkaloidy měřil Ing. Miroslav Ločárek z Katedry farmaceutické botaniky a ekologie na Farmaceutické fakultě Hradec Králové.

chromatografický systém:	Agilent 1260 Infinity, pumpa G1311C
dávkovač:	G1329B
detektor:	UV/VIS detektor G1365D
kolona:	Merck LiChroCART 250-4 column (Purospher STAR RP-18e, 5 μ m)
mobilitní fáze:	voda : NH ₄ OH, 1000 : 1 (solvent A), acetonitril (solvent B)
charakter eluce:	gradientová eluce voda : hydroxylamin 1000 : 1 (solvent A), acetonitril (solvent B), gradientový profil 0-5 min 5-25 % B, 5-7 min 25 % B, 7-15 min 25-45 % B, 15-19 min 45-90 % B, 19-22 min 95 % B, 22-25 min 95-5 % B, 25-28 min 5 % B
vlnová délka:	254 nm (UV oblast)
teplota kolony:	30 °C
rychlost průtoku:	1ml/min
doba eluce:	28 min.

Tabulka 8: Parametry HPLC pro analýzu alkaloidů z makovic

Proměřeny byly jak jednotlivé roztoky vzorků, tak standardů (standardy obsahovaly morfin, kodein, papaverin, thebain a narkotin ve známém množství). Standardů bylo celkem pět, všechny obsahovaly tyto alkaloidy, ale s rozdílnou koncentrací. Na základě získání závislosti odezvy na koncentraci alkaloidů bylo možné sestojit kalibrační křivku.

Závislost průměrných ploch píků standardních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese. Následně mohla být vypočítána koncentrace alkaloidů v jednotkách μ g/ml v extraktech z makovic. Poté byly tyto hodnoty přepočítány na procentuální obsah alkaloidů v makovicích (za předpokladu známého množství extraktu, který vznikl z makovic, a přesné navážky mletého materiálu z makovic).

	morfin ($\mu\text{g/ml}$)	kodein ($\mu\text{g/ml}$)	papaverin ($\mu\text{g/ml}$)	thebain ($\mu\text{g/ml}$)	narkotin ($\mu\text{g/ml}$)
standard č. 1	400	200	100	100	100
standard č. 2	200	100	50	50	50
standard č. 3	100	50	25	25	25
standard č. 4	20	10	5	5	5
standard č. 5	4	2	1	1	1

Tabulka 9: Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) alkaloidů v jednotlivých roztocích standardů

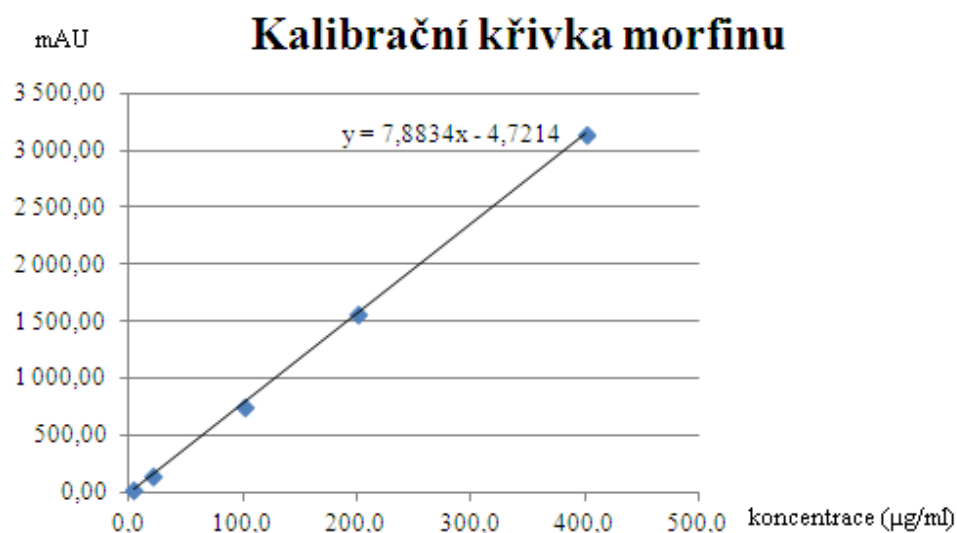
název alkaloidu	retenční čas (min)
morfin	10,421
kodein	17,117
papaverin	21,517
thebain	22,381
narkotin	23,482

Tabulka 10: Retenční časy jednotlivých alkaloidů v roztocích standardů

koncentrace morfinu v roztocích standardů ($\mu\text{g/ml}$)	plocha píku (mAU)
400,0	3 148,70
200,0	1 583,95
100,0	757,20
20,0	163,50
4,0	30,65

Tabulka 11: Závislost plochy píku na koncentraci morfinu v roztocích standardů

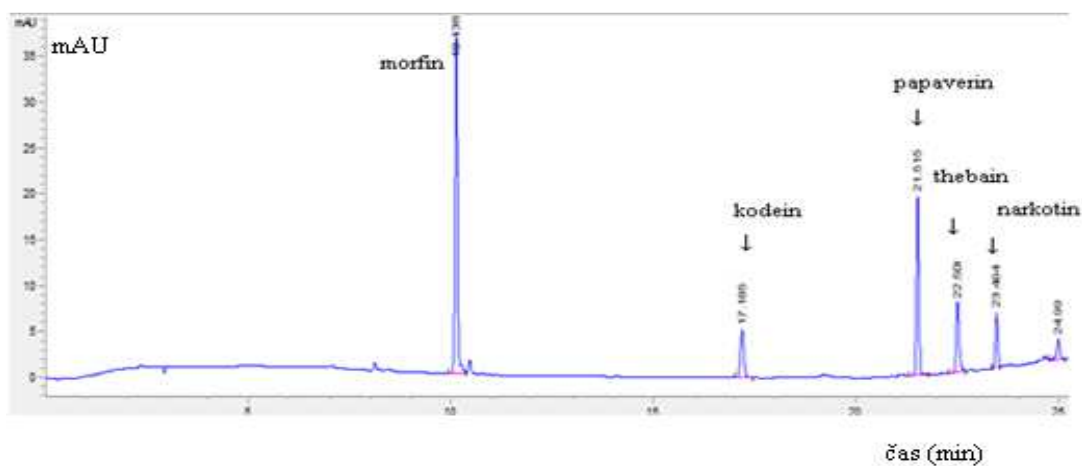
Ze závislosti plochy píku na koncentraci bylo možné sestavit kalibrační křivku:



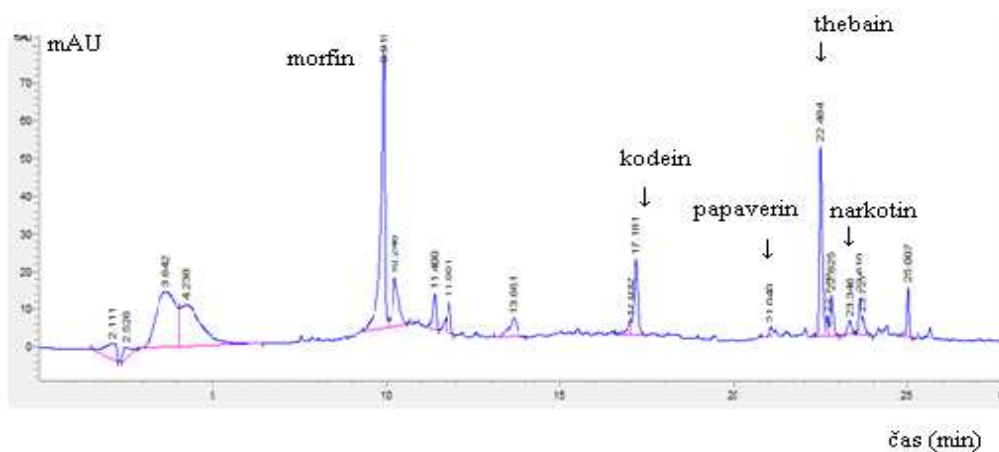
Obrázek 12: Graf kalibrační křivky morfinu

Kalibrační křivka byla sestrojena i pro ostatní alkaloidy. Pro demonstraci je v diplomové práci uvedena pouze křivka morfinu.

4.8.3.1 Příklady chromatogramů měřených alkaloidů:



Obrázek 13: Chromatogram standardu č. 4, na ose x čas, na ose y odezva chromatografu



Obrázek 14: Chromatogram vzorku odrůdy Orfeus ošetřené Polyversem, na ose x čas, na ose y odezva

4.8.4 Metoda tenkovrstvé chromatografie

Alkaloid papaverin nebylo možné ve většině vzorků z makovic detekovat, proto byl vzorek podroben zkoušce tenkovrstvé chromatografie, aby bylo ověřeno, že papaverin se ve vzorku nevyskytuje.

Tenkovrstvá chromatografie je lékopisná metoda sloužící k důkazům totožnosti a k ověření čistoty. Jako sorbent v tomto pokusu byl použit silikagel. Mobilní fází byla kapalina.

Pomůcky: desky hliníkové folie Silikagel 60 F 254 (tloušťka vrstvy 0,2 mm), chromatografická vana s krycím sklem, tenkostěnné kapilárky, tužka, pravítko.

Chemikálie:

- toluen p. a. (Penta), $C_6H_5CH_3$
- aceton p. a. (Penta), CH_3COCH_3
- hydroxylamin p. a. (Penta), NH_2OH
- ethanol, C_2H_5OH

Přístrojové vybavení: UV lampa Camag

Na start byl nanesen vzorek odrůdy OP-P-13 neošetřené Polyversem (z parcely B4) a standard papaverinu. Chromatograf byl vyvíjen ve směsi toluen : aceton : hydroxylamin : ethanol (45 : 45 : 3 : 7). Vzdálenost start-čelo byla 13,4 cm. Záměrem bylo ověřit, zda je papaverin v makovicích skutečně v tak malém množství, že metodou HPLC ho nebylo možné ve vzorku prokázat. Po skončení vyvíjení chromatografu se pod UV lampou zobrazila nepatrná skvrna odpovídající papaverinu, která byla obtažena tužkou. V našem případě se metoda TLC jevila jako citlivější pro detekci papaverinu.



Obrázek 15: TLC chromatograf vzorku OP-P-13 z parcely B4 neošetřené Polyversem

5 Výsledková část

5.1 Helmintosporióza a plíseň maková

Napadení chorobami bylo hodnoceno u každé parcely se záměrem porovnat procentuální napadení u ošetřených i neošetřených odrůd. Každá odrůda byla ve dvou variantách (ošetřená/neošetřená Polyversem). Každá varianta měla tři opakování, proto byly u každé varianty posuzovány 3 parcely, u kterých bylo zaznamenáváno procentuální napadení chorobami. Jak již bylo vysvětleno výše, hodnotí se zvlášť listy, stonky, tobolky.

5.1.1 Odrůda OP-P-13

5.1.1.1 Neošetřené parcely odrůdy OP-P-13

1. parcela (B1)	2. parcela (B4)	3. parcela (C3)
helmintosporióza	helmintosporióza	helmintosporióza
L: 92 % rostlin 40 % napadení	L: 90 % rostlin 75 % napadení	L: 50 % rostlin 75 % napadení
8 % rostlin 75 % napadení	10 % rostlin 20 % napadení	50 % rostlin 40 % napadení
S: 80 % rostlin 0 % napadení	S: 90 % rostlin 5 % napadení	S: 100 % rostlin 5 % napadení
20 % rostlin 5 % napadení	10 % rostlin 75 % napadení	
T: 60 % rostlin 40 % napadení	T: 60 % rostlin 20 % napadení	T: 40 % rostlin 40 % napadení
32 % rostlin 5 % napadení	20 % rostlin 5 % napadení	30 % rostlin 5 % napadení
8 % rostlin 75 % napadení	10 % rostlin 75 % napadení	30 % rostlin 0 % napadení
	10 % rostlin 0 % napadení	
plíseň maková	plíseň maková	plíseň maková
90 % rostlin 0 % napadení	95 % rostlin 0 % napadení	100 % rostlin 0 % napadení
10 % rostlin 5 %	5 % rostlin 75 %	
(L, S i T)	(L, S i T)	(L, S i T)

Tabulka 12: Procentuální napadení chorobami odrůdy OP-P-13 neošetřené biologickou ochranou

L...listy S...stonky T...tobolky H...helmintosporióza P...plíseň maková

5.1.1.2 Ošetřené parcely odrůdy OP-P-13

1. parcela (D2)	2. parcela (F2)	3. parcela (F4)
helmintosporióza	helmintosporióza	helmintosporióza
L: 80 % rostlin 75 % napadení	L: 93 % rostlin 75 % napadení	L: 70 % rostlin 75 % napadení
20 % rostlin 40 % napadení	7 % rostlin 5 % napadení	30 % rostlin 40 % napadení
S: 100 % rostlin 5 % napadení	S: 97 % rostlin 5 % napadení	S: 100 % rostlin 5 % napadení
	3 % rostlin 75 % napadení	
T: 70 % rostlin 40 % napadení	T: 60 % rostlin 20 % napadení	T: 50 % rostlin 20 % napadení
18 % rostlin 75 % napadení	35 % rostlin 40 % napadení	25 % rostlin 40 % napadení
10 % rostlin 5 % napadení	3 % rostlin 75 % napadení	25 % rostlin 5 % napadení
2 % rostlin 0 % napadení	2 % rostlin 0 % napadení	
plíseň maková	plíseň maková	plíseň maková
100 % rostlin 0 % napadení	100 % rostlin 0 % napadení	2 % rostlin 5 % napadení
(L, S i T)	(L, S i T)	(L, S, T)

Tabulka 13: Procentuální napadení chorobami odrůdy OP-P-13 ošetřené biologickou ochranou

L...listy S...stonky T...tobolky H...helmintosporióza P...plíseň maková

Pro lepší přehled o napadení rostlin chorobami byla použita matematická funkce vážený průměr v programu Excel. Funkce popisuje charakteristiku statistického souboru v případě, že hodnoty mají různou váhu, různou důležitost.

OPP-13 neošetřená

helmintosporióza	listy	56,6 %
	stonky	6 %
	tobolky	23,2 %
plíseň maková	listy, stonky, tobolky	1,42 %

Tabulka 14: Procentuální napadení plochy rostlin neošetřené odrůdy OPP-13 chorobami, vypočteno funkcí vážený průměr

OPP-13 ošetřená

helmintosporiíza	listy	67,53 %
	stonky	5,7 %
	tobolky	30,5 %
plíseň maková	listy, stonky, tobolky	0,03 %

Tabulka 15: Procentuální napadení plochy rostlin ošetřené odrůdy OP-P-13 chorobami, vypočteno funkcí vážený průměr

Helmintosporiíza:

Listy byly napadené více u ošetřených variant (o 10,9 %). Stonky byly napadené téměř shodně u ošetřených i neošetřených variant. Tobolky byly napadené více u ošetřených variant (o 7,3 %).

Plíseň maková:

Nebyl zjištěn významný rozdíl, nepatrně více byly napadené neošetřené varianty (o 1,4 %).

5.1.2 Odrůda Orfeus

5.1.2.1 Neošetřené parcely odrůdy Orfeus

1. parcela (A4)	2. parcela (F1)	3. parcela (F3)
helmintosporióza	helmintosporióza	helmintosporióza
L: 80 % rostlin 40 % napadení	L: 70 % rostlin 75 % napadení	L: 72 % rostlin 75 % napadení
15 % rostlin 75 % napadení	30 % rostlin 20 % napadení	28 % rostlin 40 % napadení
5 % rostlin 20 % napadení		
S: 85 % rostlin 5 % napadení	S:100 % rostlin 5 % napadení	S:98 % rostlin 5 % napadení
15 % rostlin 75 % napadení		2 % rostlin 75 % napadení
T: 65 % rostlin 20 % napadení	T: 60 % rostlin 20 % napadení	T: 59 % rostlin 5 % napadení
20 % rostlin 5 % napadení	35 % rostlin 40 % napadení	34 % rostlin 20 % napadení
15 % rostlin 75 % napadení	5 % rostlin 0 % napadení	5 % rostlin 0 % napadení
		2 % rostlin 75 % napadení
plíseň maková	plíseň maková	plíseň maková
75 % rostlin 0 % napadení	2 % rostlin 5 % napadení	100 % rostlin 0 % napadení
15 % rostlin 75 % napadení		
(L, S i T)	(L, S i T)	(L, S i T)

Tabulka 16: Procentuální napadení chorobami odrůdy Orfeus neošetřené biologickou ochranou

L...listy S...stonky T...tobolky H...helmintosporióza P...plíseň maková

5.1.2.2 Ošetřené parcely odrůdy Orfeus

1. parcela (B2)	2. parcela (C4)	3. parcela (D1)
helmintosporióza	helmintosporióza	helmintosporióza
L: 80 % rostlin 75 % napadení	L: 100 % rostlin 40 % napadení	L: 60 % rostlin 5 % napadení
20 % rostlin 40 % napadení		40% rostlin 40 % napadení
S: 100 % rostlin 5 % napadení	S: 80 % rostlin 5 % napadení	S: 95 % rostlin 5 % napadení
	20 % rostlin 0 % napadení	5 % rostlin 0 % napadení
T: 80 % rostlin 40 % napadení	T: 60 % rostlin 20 % napadení	T: 80 % rostlin 40 % napadení
20 % rostlin 5 % napadení	20 % rostlin 5 % napadení	19 % rostlin 5 % napadení
	15 % rostlin 40 % napadení	1 % rostlin 0 % napadení
	5 % rostlin 0 % napadení	
plíseň maková	plíseň maková	plíseň maková
100 % rostlin 0 % napadení	100 % rostlin 0 % napadení	100 % rostlin 0 % napadení
(L, S i T)	(L, S i T)	(L, S, T)

Tabulka 17: Procentuální napadení chorobami odrůdy Orfeus ošetřené biologickou ochranou

L...listy S...stonky T...tobolky H...helmintosporióza P...plíseň maková

Orfeus neošetřená

helmintosporióza	listy	56 %
	stonky	8,97 %
	tobolky	20,8 %
plíseň maková	listy, stonky, tobolky	4,2 %

Tabulka 18: Procentuální napadení plochy rostlin neošetřené odrůdy Orfeus chorobami, vypočteno funkcí vážený průměr

Orfeus ošetřená

helmintosporióza	listy	42,30%
	stonky	4,58%
	tobolky	28,30%
plíseň maková	listy, stonky, tobolky	0%

Tabulka 19: Procentuální napadení plochy rostlin ošetřené odrůdy Orfeus chorobami, vypočteno funkcí vážený průměr

Helmintosporióza:

Listy byly napadené více u neošetřené varianty (o 13,7 %). Stonky byly napadené více u neošetřených variant (o 4,4 %). Tobolky byly napadené více u ošetřených variant než neošetřených o (7,5 %).

Plíseň maková:

Plíseň maková napadla pouze neošetřené varianty.

U odrůdy Orfeus bylo zjištěno menší napadení chorobami u variant ošetřených přípravkem Polyversem. Pouze u tobolek neošetřených Polyversem bylo napadení chorobami neočekávaně menší.

5.2 Alkaloidy

Kvalitativní i kvantitativní zastoupení alkaloidů bylo v makovicích stanoveno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Hodnoceny byly majoritní alkaloidy (morfin, kodein, papaverin, thebain a narkotin) na základě kalibrační křivky získané z proměření roztoků standardů (koncentrace osa x versus odezva osa y). Z každé parcely byl připraven vzorek, každý vzorek byl na HPLC proměřený dvakrát.

Přestože HPLC je metoda velmi citlivá, obsah papaverinu a narkotinu byl v některých vzorcích tak nízký, že ho nebylo možné detekovat (hodnota byla pod hladinou detekce). Vzhledem k použití metody kalibrační závislosti byly některé hodnoty pod mezí stanovitelnosti.

V následujících tabulkách jsou uvedeny vypočtené hodnoty obsahu včetně směrodatných odchylek jednotlivých alkaloidů v makovicích. V diplomové práci byl zjišťován pouze obsah alkaloidů v makovicích.

V následujících tabulkách jsou uvedeny jak koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ extraktu, tak procentuální hodnoty alkaloidů v makovicích (zaokrouhlené na 2 desetinná místa). Hodnoty v procentech byly spočítány za předpokladu známého množství extraktu, které vzniklo izolací ze vzorků.

5.2.1 Odrůda OP-P-13

5.2.1.1 Neošetřené parcely

	parcela B1 (µg/ml)	parcela B4 (µg/ml)	parcela C3 (µg/ml)
morfin	229,04 ± 0,08	454,37 ± 0,63	349,64 ± 0,63
kodein	41,72 ± 0,03	115,2 ± 0,01	101,96 ± 0,85
papaverin	< LOD	< LOD	8,42 ± 0,07
narkotin	44,17 ± 1,12	30,38 ± 0,02	11,26 ± 0,09
thebain	13,09 ± 0,06	14,0 ± 0	43,31 ± 0,34

Tabulka 20: Množství alkaloidů v extraktu z makovic neošetřené odrůdy OP-P-13 (v jednotkách µg/ml)

vysvětlivky: LOD pod mez detekce LOQ pod mez stanovitelnosti

	parcela B1 (%)	parcela B4 (%)	parcela C3 (%)
morfin	0,13 ± 0	0,32 ± 0	0,27 ± 0
kodein	0,02 ± 0	0,08 ± 0	0,08 ± 0
papaverin	< LOD	< LOD	0,01 ± 0
narkotin	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,01 ± 0
thebain	0,01 ± 0	0,01 ± 0	0,03 ± 0

Tabulka 21: Procentuální množství alkaloidů v makovicích neošetřené odrůdy OP-P-13

vysvětlivky: LOD pod mez detekce LOQ pod mez stanovitelnosti

5.2.1.2 Ošetřené parcely

	parcela D2 (µg/ml)	parcela F2 (µg/ml)	parcela F4 (µg/ml)
morfin	363,54 ± 4,87	277,59 ± 2,76	381,32 ± 2,14
kodein	88,49 ± 1,02	11,78 ± 0,14	21,67 ± 0,16
papaverin	< LOD	< LOD	< LOD
narkotin	31,08 ± 0,0	15,5 ± 0,2	28,64 ± 0,18
thebain	28,72 ± 0,45	7,78±0	3,84 ± 0,06

Tabulka 22: Množství alkaloidů v extraktu z makovic ošetřené odrůdy OP-P-13 (v jednotkách µg/ml)

vysvětlivky: LOD pod mez detekce LOQ pod mez stanovitelnosti

	parcela D2 (%)	parcela F2 (%)	parcela F4 (%)
morfin	0,24 ± 0	0,20 ± 0	0,30 ± 0
kodein	0,06 ± 0	0,01 ± 0	0,02 ± 0
papaverin	< LOD	< LOD	< LOD
narkotin	0,02 ± 0	0,01 ± 0	0,02 ± 0
thebain	0,02 ± 0	0,00	0,00

Tabulka 23: Procentuální množství alkaloidů v makovicích ošetřené odrůdy OP-P-13

vysvětlivky: LOD pod mez detekce LOQ pod mez stanovitelnosti

U odrůdy OP-P-13 bylo zjištěno kolísání hodnot morfinu i kodeinu v rámci každé varianty.

Vyšší hodnoty kodeinu byly získány z parcel neošetřených Polyversem. Na rozdíl od odrůdy Orfeus, odrůda OPP-13 obsahovala větší množství narkotinu.

5.2.2 Odrůda Orfeus

5.2.2.1 Neošetřené parcely

	parcela A4 (µg/ml)	parcela F1 (µg/ml)	parcela F3 (µg/ml)
morfin	391,18 ± 3,02	362,22 ± 1,78	375,63 ± 3,38
kodein	65,84 ± 0,69	65,27 ± 0,29	65,11 ± 0,66
papaverin	< LOD	< LOD	< LOD
narkotin	< LOD	< LOD	< LOD
thebain	170,71 ± 1,08	56,41 ± 0,36	119,23 ± 1,14

Tabulka 24: Množství alkaloidů v extraktu z makovic neošetřené odrůdy Orfeus (v jednotkách µg/ml)

vysvětlivky: LOD pod mez detekce LOQ pod mez stanovitelnosti

	parcela A4 (%)	parcela F1 (%)	parcela F3 (%)
morfin	0,33 ± 0,01	0,28±0	0,30±0
kodein	0,06±0	0,05±0	0,05±0
papaverin	< LOD	< LOD	< LOD
narkotin	< LOD	< LOD	< LOD
thebain	0,15 ±0	0,04±0	0,09±0

Tabulka 25: Procentuální množství alkaloidů v makovicích neošetřené odrůdy Orfeus

vysvětlivky: LOD pod mez detekce LOQ pod mez stanovitelnosti;

5.2.2.2 Ošetřené parcely

	parcela B2 (µg/ml)	parcela C4 (µg/ml)	parcela D1 (µg/ml)
morfin	369,51 ± 1,13	351,16 ± 0,22	348,72 ± 0,69
kodein	67,91 ± 0	83,4 ± 0,05	79,16 ± 0
papaverin	1,95 ± 0,01	< LOQ	< LOD
narkotin	< LOD	< LOD	< LOD
thebain	138,33 ± 0,07	119,02 ± 0	69,55 ± 0,1

Tabulka 26: Množství alkaloidů v extraktu z makovic ošetřené odrůdy Orfeus (v jednotkách µg/ml)

vysvětlivky: LOD pod mez detekce LOQ pod mez stanovitelnosti

	parcela B2 (%)	parcela C4 (%)	parcela D1 (%)
morfin	0,34 ± 0	0,33 ± 0	0,32 ± 0
kodein	0,06 ± 0	0,08 ± 0	0,07 ± 0
papaverin	0,00	< LOQ	< LOD
narkotin	< LOD	< LOD	< LOD
thebain	0,13 ± 0	0,11 ± 0	0,06 ± 0

Tabulka 27: Procentuální množství alkaloidů v makovicích ošetřené odrůdy Orfeus

vysvětlivky: LOD pod mez detekce LOQ pod mez stanovitelnosti

U ošetřené varianty odrůdy Orfeus, se vyskytovalo více morfinu a kodeinu než u neošetřené odrůdy Orfeus.

Množství narkotinu bylo tak malé, že ho nebylo možné detekovat. Množství papaverinu bylo možné detekovat v makovicích pouze v jednom případě (u vzorku z ošetřené parcely B2). Množství thebainu bylo u ošetřených i neošetřených variant přibližně stejné.

6 Diskuze

V této diplomové práci byl sledován vliv houby *Pythium oligandrum* v přípravku Polyversum na produkci alkaloidů máku setého s použitím kontrolních (neošetřených) rostlin.

Námi získané hodnoty alkaloidů byly porovnány s daty Výzkumného ústavu olejin Opava (VÚOO), získanými při pokusu v roce 2012. VÚOO pěstuje mák setý tradičním komerčním neekologickým způsobem. Semena před výsevem moří a používá chemickou ochranu. VÚOO se zabývá především sledováním výkonnosti odrůd máku setého.

Pro výpočet alkaloidů obsažených v makovině bylo nutné znát hodnoty z vrcholových částí stonku. Tyto hodnoty poskytla Veronika Cincibuchová, která se ve své diplomové práci věnovala jak hodnotám z makovic u odrůd Orbis a Lazur, tak hodnotám z makoviny odrůd Orfeus, OP-P-13, Orbis a Lazur.

Výzkumný ústav sledoval pouze tři alkaloidy obsažené v makovině (morfin, kodein, thebain).

Odrůda OP-P-13

alkaloidy	VÚOO (%)	naše výsledky (%)	
		ošetřené Ø	neošetřené Ø
morfin	0,35	0,21	0,20
kodein	0,19	0,03	0,05
thebain	0,02	0,01	0,02

Tabulka 28: Srovnání procentuálního množství alkaloidů v makovině odrůdy OP-P-13 získaných VÚOO a naším experimentem

Z tabulky 28 vyplývá, že získané hodnoty morfinu a kodeinu odrůdy OP-P-13 v makovině obou variant a hodnota thebainu u ošetřených variant jsou nižší než hodnoty VÚOO. Námi získané množství thebainu u neošetřených variant je stejné jako získal VÚOO.

Odrůda Orfeus

alkaloidy	VÚOO (%)	naše výsledky (%)	
		ošetřené Ø	neošetřené Ø
morfin	0,47	0,28	0,26
kodein	0,07	0,06	0,05
thebain	0,01	0,06	0,04

Tabulka 29: Srovnání procentuálního množství alkaloidů v makovině odrůdy Orfeus získaných VÚOO a naším experimentem

Množství morfinu i kodeinu v makovině u odrůdy Orfeus bylo u obou variant nižší, než získal VÚOO, oproti tomu hodnota thebainu byla u obou variant vyšší.

Kolegyně Veronika Cincibuchová pracovala na podobném úkolu, ale zabývala se jinými dvěma odrůdami. Měla tedy pro svůj experiment naprosto stejné podmínky (půda, klimatické faktory...). Pro účely této diplomové práce poskytla výsledky množství alkaloidů v makovicích jí sledovaných odrůd Orbis a Lazur. Jak již bylo uvedeno výše, každá odrůda byla ve dvou variantách (ošetřená/neošetřená Polyversem), každá varianta měla tři opakování.

V následující tabulce jsou uvedena rozmezí hodnot alkaloidů z makovic všech odrůd.

	morfin (%)	kodein (%)	thebain (%)
Orfeus ošetřená	(0,32-0,34)	(0,06-0,08)	(0,06-0,13)
Orfeus neošetřená	(0,28-0,33)	(0,05-0,06)	(0,04-0,15)
OP-P-13 ošetřená	(0,20-0,30)	(0,01-0,06)	(0,00-0,02)
OP-P-13 neošetřená	(0,13-0,32)	(0,02-0,08)	(0,01-0,03)
Lazur ošetřená	(0,17-0,35)	(0,03-0,06)	(0,01-0,03)
Lazur neošetřená	(0,19-0,26)	(0,13-0,21)	(0,01-0,14)
Orbis ošetřená	(0,20-0,29)	(0,04-0,07)	(0,04-0,06)
Orbis neošetřená	(0,22-0,36)	(0,05-0,14)	(0,05-0,12)

Tabulka 30: Rozmezí hodnot alkaloidů v makovicích ze tří měření získaných v našem experimentu u 6 odrůd ze všech parcel

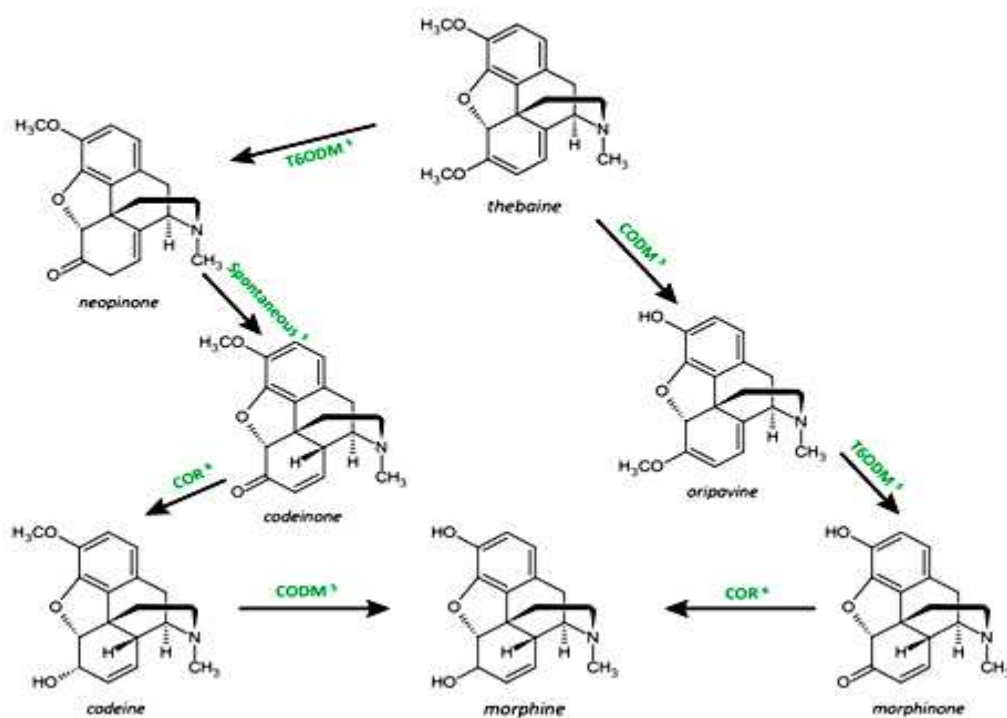
Jak již bylo zmíněno, množství hlavního alkaloidu morfinu bylo v našem experimentu nižší než VÚOO. Morfin je stěžejní alkaloid získávaný z makoviny.

Technologická hodnota makoviny je charakterizována právě obsahem tohoto alkaloidu. Dobrá výtěžnost morfinu začíná podle požadavků zpracovatele (Zentiva a.s.) nad hranicí 0,5 % (54).

Syntéza morfinu silně podléhá působení vnějšího prostředí, hlavně vlivu klimatických podmínek (30).

Nižší hodnoty morfinu, kodeinu a vyšší množství thebainu by mohlo značit neúplnou přeměnu alkaloidu thebainu na morfin. Produkce alkaloidů se tedy zřejmě u odrůdy Orfeus zastavila na metabolitu thebainu. Biosyntéza morfinu probíhá přes meziprodukt thebain a kodein (16, 24). Thebain může být metabolizován na morfin dvěma cestami:

- přes metabolity neopinon, kodeinon, kodein za účasti enzymů thebain-6-O-demethylázy, kodeinonreduktázy, kodein-O-demethylázy
- přes metabolity oripavin, morfinon, za účasti enzymů kodein-O-demethylázy, thebain-6-O-demethylázy, kodeinonreduktázy (24)



© Obrázek 16: Syntéza kodeinu a morfinu z thebainu (24)

Celkový výskyt alkaloidů závisí na pěstované odrůdě máku, stanovišti, obsahu organických a anorganických látek v půdě i v ovzduší, počasí, způsobu pěstování, termínu výsevu a době sběru. Snížené množství může být zapříčiněno vyplavením alkaloidů ze zrajících makovic deštěm a kroupami (18). Vyskytuje se i rozdílné množství alkaloidů během dne (syntéza alkaloidů není kontinuální a v průběhu dne dochází k jejich tvorbě i odbourávání). Největší množství morfinu je v makovicích po poledni, protože se v noci syntetizovaný morfin přesouvá do nadzemních částí (42). Sekundární metabolity se tvoří jako signální molekuly pro přivábění opylovačů, a také jako obrana proti býložravcům, mikrobům, virům a konkurenčním rostlinám. Jsou tedy důležité pro přežití rostliny a její reprodukci. Alkaloidy jako sloučeniny dusíku mohou sloužit také jako odpadní produkty (55, 56, 42).

U odrůdy OP-P-13 bylo zjištěno kolísání hodnot morfinu i kodeinu v rámci každé varianty. Tento jev by mohl být vysvětlen možnou nesouměrnou saturací živin na pozemku.

Příčina rozsáhlého napadení rostlin chorobami mohla být zapříčiněna tím, že semena máku nebyla před výsevem žádným způsobem ošetřena ani namořena (57). Helmintosporióza se šíří z posklizňových zbytků, ale také infikovaným semenem, kde jsou konidie zachycené na povrchu. Za příznivých podmínek pak mycelium z konidií přeroste na děložní lístky, nebo napadne mladé rostlinky, které může i zničit (37). Rizikovým faktorem jsou také těžké, slévací půdy (36, 42). Udržovat pozemek zcela nezaplevelený po celou dobu vegetace se nepodařilo, což také přispělo ke snížení odolnosti máku setého proti chorobám. Napadené rostliny máku se nesmí použít pro farmaceutický průmysl ani pro potravinářství.

Lepší odolnosti rostlin vůči helmintosporióze a plísni makové by mohlo být dosaženo ošetřením Polyversem před výsevem i během vegetace.

Zdrojem infekce plísni makovou jsou plané máky, zamořený pozemek a osivo. Podle studií doc. Prokinové z ČZU se předpokládá, že přípravek Polyversum má stimulační účinek, posiluje pouze odolnost rostlin proti této chorobě (58).

Z pokusů na máku setém z let 2006 až 2011 uskutečněných v Budyni nad Ohří vyplývá výhodnost kombinace přípravku Polyversum nebo Supresivit s fyzikálním ošetřením osiva (např. E-ventus) proti chorobám (59). Supresivit obsahuje spóry *Trichoderma harzianum* (60). Technologie E-Ventus je založena na ošetření semen elektricky (61).

Vzhledem k tomu, že obrana proti chorobám máku je obtížná, se v praxi stále dává přednost chemickým fungicidům na obranu proti helmintosporióze, plísni makové a škůdcům. Nejsou ovšem určeny pro ekologickou produkci.

Pro rok 2013 jsou pro použití u máku registrovány tyto přípravky:

Callisto 480 SC	mesotrion 480 g/l, 0,2l/ha	herbucid
Caramba	metconazol 60 g/l, 1,0 l/ha	fungicid
Talstar 10 EC	bifenthrin 100 g/l, 1,0l	insekticid
Nurelle D	cypermethrin 50 g/l, 0,6 l/ha	insekticid

Tabulka 31: Chemické přípravky registrované pro ochranu máku setého (62)

K velkému rozmnožení krytonosce kořenového mohla přispět nadprůměrná teplota a podprůměrný úhrn srážek v roce 2012, protože krytonosec je teplomilný a suchomilný (33).

Lepší obranu proti krytonosci kořenovému zajišťuje časný výsev a všechny zásahy, které vedou k urychlení růstu (stimulátory). Jako chemická ochrana proti krytonosci se používají látky ze skupiny pyrethroidů. Z ekologických přípravků proti škůdcům se studovali např. Spruzit (přírodní pyrethrum), Neem Azal (azadirachtin) (59). V roce 2013 nejsou pro ošetření máku registrovány.

Na výsledky této diplomové práce mělo vliv více faktorů (těžká půda se sklonem ke kornatění, pozdní výsev, výskyt škůdců). V souladu s literárními zdroji bylo potvrzeno, že v půdách těžkých lze pěstovat mák setý jen velmi obtížně (2, 36).

Optimálním řešením se jeví provést obdobný experiment i v jiných oblastech ČR a současně na témže pozemku, přičemž by dosažené výsledky z obou lokalit byly porovnány.

7 Závěr

Úkolem této práce bylo posoudit vliv pěstování a aplikace přípravku Polyversum na produkci hlavních sekundárních metabolitů v máku setém a porovnání odolnosti proti chorobám, které se na máku během růstu objevily. Testovány byly dvě odrůdy (Orfeus a OP-P-13). Jako kontrola sloužily tyto odrůdy bez ošetření biologickou ochranou. Analýza alkaloidů se uskutečnila metodou HPLC. Sledovány byly alkaloidy morfin, kodein, papaverin, thebain a narkotin. Vyhodnocovány byly v makovicích.

- **Morfin:** nejvyšší koncentrace bylo dosaženo u odrůdy Orfeus, ošetřené varianty. Potvrdilo se, že odrůda OP-P-13 patří mezi odrůdy obsahující méně morfinu než Orfeus.
- **Kodein:** nejvyšší množství bylo získáno u odrůdy Orfeus ošetřené Polyversem. U odrůdy OP-P-13 došlo ke kolísání hodnot v rámci obou variant.
- **Papaverin:** Tento alkaloid se vyskytoval v makovicích v tak malé míře, že ho nebylo téměř možné detekovat.
- **Narkotin:** tento alkaloid bylo možné stanovit pouze u odrůdy OP-P-13, obou variant.
- **Thebain:** odrůda Orfeus vykazovala vyšší množství než odrůda OP-P-13.

Orfeus patří mezi odolnější odrůdy proti houbovým chorobám. Mák na ošetřených parcelách byl méně napadený chorobami. Plíseň maková nenapadla mák na ošetřených parcelách, helmintosporiózou byly ošetřené parcely napadené méně.

Listy byly napadené helmintosporiózou více u neošetřené varianty (o 13,7 %). Stonky byly napadené více u neošetřených variant (o 4,4 %). Tobolky byly helmintosporiózou napadené více u ošetřených variant (o 7,5 %).

OP-P-13 je odrůda méně odolná proti chorobám než odrůda Orfeus. Rostliny této odrůdy (kromě tobolek) byly napadeny helmintosporiózou více na ošetřených parcelách. Plíseň maková napadla mírně obě varianty, u neošetřené varianty se vyskytovala více.

Listy byly napadené helmintosporiózou více u ošetřených variant (o 10,9 %). V napadení stonků nebyl významný rozdíl. Tobolky byly napadené více u ošetřených variant (o 7,3 %).

Hypotéza o výhodnosti použití biologické ochrany rostlin se v našem experimentu potvrdila u odrůdy Orfeus, která je sama o sobě více odolná.

8 Seznam použitých zkratk

BBCH	system pro jednotné kódování fenologických růstových fází
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LA	odrůda Lazur
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
OP	odrůda OP-P-13
ORB	odrůda Orbis
ORF	odrůda Orfeus
p. a.	zkratka pro čistotu chemických látek
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelná složka záření

9 Seznam použité literatury:

1. Kubánek V., Konopí a mák (pěstování, výroby, legislativa), 1. vyd. Brno: Tribun EU, 2008, 152 s.
2. Bechyně M., Základy pěstování máku, 1. vyd. Praha: IVVMZe ČR, 1993, 36 s.
3. Jahodář L., Farmakobotanika: semenné rostliny, 1. vyd. Praha: nakladatelství Karolinum, 2006, 258 s.
4. Sbírka zákonů, ust. § 29 zákona 167/1998 Sb. o návykových látkách, v platném znění od 1. 4. 2013.
5. Jirásek V., Starý F., Kapesní atlas léčivých rostlin, 1. vyd. Praha: SPN, 1986, 319 s.
6. Tichá K., Biologická ochrana rostlin, 1. vyd. Praha: Grada, 2001, 86 s.
7. Hejný S., Slavík B., Květena České socialistické republiky, 1. vyd. Praha: Academia, 1988, 557 s.
8. Bechyně, M., Novák, J., Biologie máku a systém jeho produkce, 1. vyd. VŠZ Praha, 1987, 92 s.
9. Dvořáková E., Stránská I., Novák J., Hodnocení genových zdrojů máku setého *Papaver somniferum* L., Sborník z konference „Prosperující olejniny” konané 12. až 14. 12. 2007 v Praze 6, s. 87-89.
10. Český lékopis 2009, Praha: Grada Publishing, 2009, 3968 s.
11. Richter R., Lošák T., Škarpa P., Správná výživa nezvyšuje obsah kadmia v semeni máku, 7. *Makový občasník*, 2008, s. 38-46.
12. Marečková J., Orlíková B., Minařík J., Koryntová G., Justinová J., *et al*, Drogy: otázky a odpovědi, 1. vyd. Praha: Portál, 2007, 198 s.
13. Attaran A., Boozary A., For peace and pain: the medical legitimisation of

- Afghanistan's poppy crop, *J. Epidemiol. Community Health*, 2011, 65, s. 396-398.
14. Chouvy P. A., Afghanistan's opium production in perspective, *China and Euroasia forum quarterly*, 2006, 4, s. 21-24.
15. <http://goldbook.iupac.org/A00220.html>, staženo 2. 4. 2013.
16. Moravcová J., *Biologicky aktivní přírodní látky*, VŠCHT Praha, 2006, 108 s.
17. Weid M., Ziegler J., Kutchan T. M.: The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*, 2004, 101, s. 13957-13962.
18. Blaschek W., Ebel S., Hilgenfeldt U., Holzgrabe U., Reichling J., *et al*, HagerRom 2008, Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2008.
19. Larkin P. J., Miller J. A. C., Allen R. S., Chitty J. A., Gerlach W. L., *et al*, Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*, *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5, s. 26-37.
20. Hampl F., Rádl S., Paleček J., *Farmakochemie*, 2. rozš. vyd. Praha: VŠCHT, 2007, 448 s.
21. De Gregori S., De Gregori M., Ranzani G. N., Allegri M., Minella C., *et al*, Morphine metabolism, transport and brain disposition, *Metab. brain. dis.*, 2012, 27, s. 1-5.
22. Staněk J., *Alkaloidy*, 1. Vyd. Praha: ČSAV, 1957, 653 s.
23. Lüllmann, H., Mohr K., Wehling M., *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*, 2. vyd. české, Praha: Grada, 2004, 725 s.
24. Laux-Biehlmann A., Mouheiche J., Vérièpe J., Goumon Y., Endogenous morphine and its metabolites in mammals, history, synthesis, localization and perspectives, *Neuroscience*, 2013, 233, s. 95-117.

25. Fairbairn, J. W., Steele, M. J.: Bound forms of alkaloids in *Papaver somniferum* and *P. bracteatum*, *Phytochemistry*, 1980, 19, s. 2317-2321.
26. http://www.us.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9780702029332/9780702029332_2.pdf , staženo 2. 4.2013
27. www.sukl.cz , staženo 3. 4. 2013.
28. Han, X., Lamshöft, M., Grobe, N., Ren, X., Fist J. A., *et al*, The biosynthesis of papaverine proceeds via (S)-reticuline. *Phytochemistry*, 2010, 71, s. 1305-1312.
29. Doležal M., Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém, 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2009, 134 s.
30. Felklová, M., Veverková, Š.: Výnos makoviny a obsah morfinu *Papaver somniferum* L. v různých klimatických podmínkách, *Československá farmacie*, 1983, 32, s. 133-139.
31. Procházka S., Fyziologie rostlin, 1. vyd. Praha: Academia, 1998, 484 s.
32. Smutný V., Vondra M., Kocourek V., Stanovení optimálních dávek herbicidů s využitím přístrojů založených na měření změn v absorpci záření a fluorescence chlorofylu: metodika pro praxi, 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011, 38 s.
33. Rotrekl J., Krytonosec kořenový (*Stenocarus ruficornis*) na máku a možnosti ochrany, Výzkumný ústav pícninářský, 8 s., dostupné z http://www.vuvt.cz/content/files/pub_06/rot_06_10.pdf, staženo 12. 2. 2013
34. <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id98596/>, staženo 21. 4. 2013
35. Kolařík P., Rotrekl J., Jak na krytonosce makovicového a bejlmorku makovou, *Agromanuál*, 2013, 8, s 32-33.
36. Bittner V., Biotická poškození máku (3. část): Helmintosporiíza máku, *Agromanuál*, 2009, 5, s. 51.

37. Spitzer, T., Mák, choroby, fungicidy. Mohou fungicidy ovlivnit obsah těžkých kovů v semenech máku a makovině?, *Obilnářské listy*, 2000, 3 s. 53-55.
38. Landa B. B., Montes-Borrego M., Muñoz-Ledesma F. J., Jiménez-Díaz R. M., Phylogenetic Analysis of Downy Mildew Pathogens of Opium Poppy and PCR-Based In Planta and Seed Detection of *Peronospora arborescens*, *Phytopathology*, 2007, 97, s. 1380-1390.
39. Dubey M. K., Shasany A. K., Dhawan O. P., Shukla A. K., Khanuja S. P., Genetic variation revealed in the chloroplast-encoded RNA polymerase beta' subunit of downy mildew-resistant genotype of opium poppy, *J. Hered.*, 2009, 100, s. 76-85.
40. <http://www.agromanual.cz/cz/atlas/choroby/choroba/helmintosporioza-maku.html>, staženo 10. 4. 2013.
41. Venclová B., Je pěstování máku perspektivní?, dostupné z http://www.uroda.cz/@AGRO/informacni-servis/Je-pestovani-maku-perspektivni_s457x30220.html, staženo 18. 4. 2013.
42. Vašák J. (ed.), *et al*, Mák, 1. vyd. Praha: ČZU, 2010, 336 s.
43. Vrbovský V., Výzkumný ústav olejin Opava, písemné sdělení
44. <http://www.biocont.cz/>, staženo 10. 2. 2013.
45. Kreuter, M. L., Lockeretz W., Niggli U., Biologická ochrana rostlin: přirozená obrana proti škůdcům a chorobám, 1. vyd. Čestlice: Rebo Productions, 2002, 95 s.
- 46., Veselý, D., Polyversum as an effective seeddresser in wheat, 13th International IFOAM Scientific Conference, Convention Center Basel, konference konaná 28. až 31. 8. 2000 v Amsterdamu.
47. Bioeparáty s r.o., tištěné materiály, 12 s.
48. Foley M. F., Deacon J. W., Susceptibility of *Pythium* spp and other fungi to antagonism by the mycoparasite *Pythium Oligandrum*, *Soil Biol. Biochem.*, 1986, 18, s. 91-95.

49. Picard K., Tirilly Y., Benhamou N., Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, s. 4305-4314.
50. http://portal.chmi.cz/portal/dt?action=content&provider=JSPTabContainer&menu=JSPTabContainer/P4_Historicka_data/P4_1_Pocasi/P4_1_4_Uzemni_teploty&nc=1&portal_lang=cs#PP_Uzemni_teploty, staženo 1. 5. 2013.
51. http://portal.chmi.cz/portal/dt?action=content&provider=JSPTabContainer&menu=JSPTabContainer/P4_Historicka_data/P4_1_Pocasi/P4_1_5_Uzemni_srazky&nc=1&portal_lang=cs#PP_Uzemni_srazky, staženo 20. 5. 2013.
52. Komárek K., Churáček J., Franc J., Reakční chromatografie v organické analýze, 1. vyd. Praha: SNTL, 1989, 288 s.
53. Klimeš J., Kontrola léčiv I., 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002, 141 s.
54. Doležalová J., Zukalová H., Cihlár P., Pšenička P., Vašák J., Význam odrůdy a agrotechnických opatření pro výnos a obsah morfinu u máku (*Papaver soniferum* L.), Sborník z konference „Prosperující olejniny” konané 10. 12. 2008 v Praze 6, s. 38-42.
55. Wink M., Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry*, 2003, 64, s. 3-19.
56. Theis N., Lerdau M., The evolution of function in plant secondary metabolites, *Int. J. Plant. Sci.*, 164, s. 93-102.
57. Kuchtová P., Mák setý v ekologickém zemědělství, *Zemědělec*, 2012, 36, s. 31.
58. Prokinová E., Mák a jeho nejrozšířenější onemocnění, *Agromanuál*, 2009, 5, s. 46-48.
59. Kuchtová P., Hájková M., Dvořák P., Plachká E., Kazda J., Jak dělat ekologický mák za dvojnásobnou cenu, 11. Makový občasník, 2012, s. 29-37.
60. Soukup F., Oak mildew – possibilities of its control, *Journal of forest science*, 2005, 51 s. 195-202.

61. Eschrig U., Stahl M., Delincée H., Schaller H. J., Röder O., Electron seed dressing of barley - aspects of its verification, *Eur. food res. technol.*, 2007, 224, s. 489-497.
62. http://sdruzeni.ceskymak.cz/pripravky_na_ochranu_rostlin, staženo 28. 7. 2013.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor: Linda Röslerová

Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Vliv agrotechniky a biologické ochrany rostlin na produkci sekundárních metabolitů *Papaver somniferum* L.

Pěstování máku setého v České republice má dlouhou tradici a stále narůstá problém napadení máku setého škůdci a chorobami, proto je zájem sledovat faktory ovlivňující výnosnost máku. Tato diplomová práce vznikla s cílem sledovat napadení máku setého ošetřeného přípravkem Polyversum chorobami plísňí makovou a helmintosporiózou. Biologická ochrana rostlin je nová moderní metoda k ošetření rostlin. Zjištěné výsledky byly porovnány s kontrolními rostlinami (neošetřenými žádnou ochranou). V rámci experimentu byl hodnocen sekundární metabolismus (obsah majoritních alkaloidů morfinu, kodeinu, papaverinu, thebainu a narkotinu) v odrůdách Orfeus a OP-P-13 metodou HPLC. Rostliny z parcel odrůdy Orfeus ošetřené Polyversem nebyly napadené plísňí makovou a byly méně napadené helmintosporiózou oproti neošetřeným parcelám. Odrůda Orfeus ošetřená Polyversem vykazovala vyšší množství morfinu než neošetřená. Odrůda OP-P-13 byla téměř shodně napadená u ošetřených i neošetřených variant plísňí makovou; helmintosporiózou byly více napadené rostliny z ošetřených parcel. Vyšší množství morfinu bylo získáno u ošetřených parcel.

Klíčová slova: mák setý, biologická ochrana rostlin, helmintosporióza, plíseň maková, krytonosec kořenový, mšice maková, morfin, kodein.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Author: Linda Röslerová

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of diploma thesis:

Influence of agronomical practices and plant biological protection on production of secondary metabolites of *Papaver somniferum* L.

Poppy cultivation in the Czech Republic has a long tradition and the problem of poppy attacks by pests and diseases is increasing, therefore there is an interest to pursue the factors affecting the profitability of the poppy. The purpose of this diploma thesis is to monitor the infestation of the poppy treated by biopreparation Polyversum by helminthosporiosis and the mold of the poppy. Biological protection of plants is an innovative new method for treatment plants. The obtained results have been compared with control plants (plants with no protection). The contents of the majority alkaloids (morphine, codeine, papaverine, thebaine and narcotine) have been evaluated in the varieties Orpheus and OP-P-13 by the method HPLC. Plants from plots of variety Orpheus treated by Polyversum were not affected by the mold of poppy and were less contested by helminthosporiosis. Orpheus treated by Polyversum showed higher levels of morphine than the untreated one. Variety OP-P-13 were almost equally contested in treated and untreated mold poppy; treated plots were more contested by helminthosporiosis. Higher amounts of morphine were obtained in the treated plots.

Key words: *Papaver somniferum*, biological protection of plants, helminthosporiosis, *Aphis fabae*, *Stenocarus ruficornis*, morphine, codeine.

Přílohy:



Obrázek 17: Rostlina odrůdy Orfeus z parcely A4 neošetřené Polyversem, pořízeno 12. 6. 2012



Obrázek 18: Rostlina odrůdy OP-P-13 z parcely B1 neošetřené Polyversem, pořízeno 12. 6. 2012



Obrázek 19: Rostliny odrůdy Orfeus z parcely D1 ošetřené Polyversem, pořízeno 12. 6. 2012



Obrázek 20: Makovice rostliny odrůdy Orfeus z parcely B2 ošetřené Polyversem, pořízeno 18. 7. 2012