

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2019-614

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.10.2019**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.06.2019**
(32) Číslo prioritní přihlášky: **P.430248**
(32) Země priority: **PL**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **30.12.2020**
(Věstník č. 53/2020)

A01N 43/28 (2006.01)
A01N 43/38 (2006.01)
A01N 37/10 (2006.01)
A01N 59/26 (2006.01)
A01N 59/08 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Uniwersytet Śląski w Katowicach, Katowice 40-007, PL
Univerzita Karlova v Praze, Praha 1, Staré Město, CZ

(72) Původce:
Maciej Kapkowski, Przysów 42-248, PL
Michał Ludynia, Częstochowa 42-202, PL
Jarosław Polański, Katowice 40-750, PL
Marzena Dzida, Czechowice-Dziedzice 43-502, PL
Małgorzata Rudnicka, Piekary Śląskie 41-940, PL
Katarzyna Balin, Siemianowice Śląskie 41-106, PL
Martin Doležal, Hradec Králové, Nový Hradec Králové, CZ
Petr Kastner, Hradec Králové, Pražské Předměstí, CZ

(74) Zástupce:
Rott, Růžička & Guttman a spol., Vyskočilova 1566, 140 00 Praha 4, Michle

s tím, že koncentrace obsahu 1,3-dioxolanu činí od 0,00001 do 9,5 % hmotn. v poměru k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji $\leq 1,0$ % hmotn. Směsi v souladu s vynálezem jsou rozpustné ve vodě, snadno biodegradabilní a netoxické, aplikovány přímo na vnější orgány rostlin, obsahující biologicky aktivní látky, bez dodatečných pomocných látek, ovlivňující posílení nebo inhibici růstu a vývoje rostlin.

(54) Název přihlášky vynálezu:
Směs zlepšující penetraci biologicky aktivních látek povrchem rostlinných orgánů

(57) Anotace:
Předmětem předloženého řešení je směs zlepšující penetraci biologicky aktivních látek povrchem rostlinných orgánů, která se vyznačuje tím, že je – připravena ve vodném roztoku nebo stabilizačním pufru s hodnotou pH v rozsahu od 3 do 12 – směsí alespoň jednoho nízkomolekulárního 1,3-dioxolanu s obecným vzorcem I:
ve kterém jednotlivé substituenty R^1 , R^2 , R^3 , R^4 značí nezávisle na sobě atom vodíku (-H) nebo hydroxylovou skupinu (-OH) nebo hydroxymethylovou skupinu (-CH₂OH) nebo alkylovou skupinu (C₁-C₃), a s alespoň jednou sloučeninou zvolenou z:
- látky indikující růst rostlin, nebo
- anorganické soli, nebo
- nesteroidního protizánětlivého léčiva (NSAID),

Směs zlepšující penetraci biologicky aktivních látek povrchem rostlinných orgánů

Oblast techniky

Předmětem vynálezu je směs zlepšující penetraci biologicky aktivních látek povrchem rostlinných orgánů.

Dosavadní stav techniky

Idea využívání látek, které vykazují pomocnou činnost jako prostředky zvětšující pronikání biologickými membránami a podporující působení jiných látek je známa už od padesátých let XX. století. Výzkum v této oblasti se významně rozrostl a zesílil v 80. letech dvacátého století. Penetrující látka by měla napomáhat rozpouštět biologicky aktivní látky, napomáhat jejich průniku biologickými membránami, být neškodná a rychle podléhat metabolismu. Použití penetrující látky je omezeno strukturou aktivní látky, jejíž hmotnost by neměla překračovat 500 g/mol, hodnota log *P* (lipofilita) by se měla pohybovat mezi 1 a 3, a teplota tání by neměla překročit 200 °C. V současnosti je známo více než 350 chemických látek podporujících penetraci (ang. chemical penetration enhancers - CPE) biologickými membránami. Z hlediska chemické struktury rozdělujeme penetranty do několika skupin: sulfoxidy a jejich deriváty, alkoholy a polyoly, acyklické a cyklické amidy, mastné kyseliny a jejich estery, aminy, aminokyseliny a jejich deriváty, terpeny, cykloextriny, tenzidy a další organické sloučeniny [J. Jampilek, K. Brychtova, Med Res Rev. 32 (2012) 907–947].

Jednou skupinou látek vyznačujících se schopností pronikat tkáněmi jsou látky se strukturou obsahující dioxolan (preferovány 1,3-dioxoacyklopentany) a dioxan (preferovány 1,3-dioxoacyklohexany) s různými postranními řetězci. Například nejznámější penetrant z této skupiny je SEPA (2-*N*-nonylo-1,3-dioxolan), který představuje patentovanou třídu sloučenin obsahujících různé substituenty pro vedoucí strukturu 1,3-dioxolanu, kde substituent R jsou alkylové skupiny C₄-C₁₈, zejména pak C₆-C₁₂. Rozsah aplikací těchto skupin sloučenin zahrnuje zvýšení absorpce léčiv přes kožní bariéru u lidí a zvířat. Tyto přípravky s obsahem farmaceutické substance a penetrantu jsou na bázi hydrogelu s hydrofilním či hydrofobním charakterem. Aktivními látkami popsány v příkladech byly progesteron, indometacin a kofein [C. M. Samour, S. Daskalakis, *Percutaneous absorption enhancers, compositions containing same and method of use*, US4861764A, 1989]. Vysoký stupeň bezpečnosti používání těchto sloučenin je spojený s nízkou toxicitou na centrální nervovou soustavu (CNS), rychlým metabolismem, snadnou eliminací a jsou bez dalších nežádoucích farmakologických účinků. Tato jejich vysoká míra bezpečnosti je umožňuje klasifikovat jako tzv. „měkké enhancery“ (ang. soft enhancer) [K. A. Walters, *Dermatological and Transdermal Formulations*, Marcel Dekker, inc. 2002, New York].

Příkladem využití tohoto typu penetrantu je léčba akné vyvolaná *Propionibacterium acnes* aplikováním směsi obsahující tyčinky mléčné kyseliny, získávané fermentací žita, dále dialkyloisosorbidu, fosfolipidů a ethoxylovaného esteru mastných kyselin se sorbitanem. V přípravku byl kromě jiných penetrantů použit SEPA (2-*N*-nonyl-1,3-dioxolan) a byl stanoven obsah podporujících látek a/nebo penetrujících látek ve směsi ve množství od 0,01 až 10,0 % hmotn. Řešení souvisí také se způsobem přípravy a složením přípravku, použitím aplikátoru typu roll-up, který obsahuje přípravek pro léčbu akné [E. E. Brand-Gamys, *Formulation and treatment for acne*, US20170143776A1, 2017].

V jiném patentu je zveřejněno také využití derivátů 1,3-dioxolanů jako prostředků, které jsou penetrujícími látkami a látkami podporujícími aktivitu účinných látek. Vynález se týká transdermálního terapeutického systému pro aplikaci na kůži a/nebo na sliznici sestávajícího se z alespoň jedné aktivní látky formou stálé disperze ve spojení s alespoň jedním destrukčním prostředkem a/nebo prostředkem formujícím strukturu ve společné matici. V přihlášce je popsán

způsob přípravy laminátu s alespoň jednou farmaceuticky aktivní látkou nebo její farmaceuticky přípustnou solí a prostředky zvětšujícími penetraci a také způsob aplikace vytvořeného laminátu. Přípravek podporující penetraci má vedoucí strukturu 1,3-dioxolanu, kde jednotlivé substituenty R^1 , R^2 jsou identickými nebo jinými skupinami radikálů alkylových C_1 - C_6 , zas substituent R^3 je radikálem hydroxyalkylovým C_1 - C_6 . Řešení popisuje různé formulace pro farmaceutické přípravky s obsahem hormonů (testosteron nebo estradiol) ve směsi s přísadou penetrantů v množství nejméně 10 % hmotn. a nejvýše než 90 % hmotn. [M. Dittgen, S. Fricke, C. Völkel, K. Ahrens, H. Gerecke, K. Köpke, *Transdermal compositions with enhanced skin penetration properties*, US6238284B1, 2001].

V dalším z patentů je uvedeno řešení obsahující použití hydrofilových penetrujících prostředků aplikovaných na nehtovou ploténku s aktivními látkami ze skupiny allylaminů zlepšujícími jejich působení jako antimykotických léčiv. Aktivními látkami uvedenými v příkladech byly terbinafin-hydrochlorid nebo naftifin ve spojení s alespoň jedním z hydrofilových penetrujících prostředků vybraných především z: glykolů, monoetherů glykolu, dietherů glykolu, dimethylsulfoxidu, kaprolaktamu, dimethylisosorbidu, isopropylidenoglycerolu, dimethylimidazolidinonu, ethyl-laktátu, polyoxyethylenovaných glyceridů C_8 - C_{10} , polyethylenového glykolu (PEG-20), dimethyloacetamidu za použití rozpouštědla typu směsi vody a ethanolu, se kterým penetrující prostředek a aktivní látka je alespoň částečně mísitelná. Terapeutický přípravek se aplikuje lokálně na nehtovou ploténku formou roztoku nebo gelu, ve kterém koncentrace léčebné látky činí 2 až 30%, zatímco obsah výše zmíněných penetrantů činí 1 až 60 % hmotn. pro glykoly nebo 10 až 90 % hmotn. pro alkanoly C_2 - C_8 v poměru k celkové hmotnosti přípravku [J. P. Laugier, M. F. Rude, P. Touzan, F. Rigenbach, *Use of hydrophilic penetration agents in dermatological compositions for the treatment of onychomycoses, and corresponding compositions*, US5814305A, 1998].

V dalším řešení je představeno použití cyklických acetalů nebo ketalů za účelem zlepšení pronikání farmaceutických prostředků do buněk a orgánů. Jako skupiny penetrujících prostředků ve směsi s antibiotiky (fluorochinolony) a antiparazitiky (deriváty benzimidazolu) jsou uvedeny vždy dva z čtyř-, pěti- nebo šestičlenných 1,3-dioxolanů v poměru 9:1 se substituenty obsahujícími radikál alkylový, alkenylový nebo lub alkynylový, které mají alespoň 2 až 30 atomů uhlíku a/nebo jsou substituovány jedním nebo více atomy halogenu. Tento přípravek se aplikuje pomocí farmaceuticky vhodného nosiče. Byly doporučeny gastrointestinální (perorální, nasální, rektální) nebo parenterální (nitrožilní, peritoneální, podkožní a intramuskulární) způsoby podání [A. Harder, I. Heep, S. Hermann, J. L. Grunkemeyer, J. Kalbe, H. Mehlhorn, J. Schmidt, G. Schmahl, *Penetration of active substances into cells and organs*, US7652071B2, 2010].

Známo je také řešení určeno pro léčbu onychomykózy, založeno na použití jako penetrujících prostředků směsí 1,3-dioxolanů s různými strukturami a různými množstevními kombinacemi. Ve směsi aktivních látek byly fungicidně účinná množství z následujících skupin léků: polyeny, allylaminy, imidazoly, triazoly, ciklopirox, undecylenová kyselina a amorolfín. Patentové nároky definují základní strukturu penetrantů jako pěti- nebo šestičlenné cykly tvořených 1,3-dioxolany a/nebo 1,3-dioxany s uhlovodíkovými zbytky C_7 - C_{14} . Směs po aplikaci na nehtovou ploténku a po odpaření těkavého rozpouštědla zajišťuje tvrdou, transparentní, vodotěsnou membránu (lak), ze které se postupně uvolňuje příslušné antimykotikum k léčbě nebo k prevenci plísňových infekcí. Kromě toho ve směsi nachází se také steroidní protizánětlivé léčivo, alespoň jeden ze zmíněných léků: hydrokortizon, triamcinolon, betametason, klobestol nebo jejich soli. Jako plastifikátor je ve směsi použita sloučenina ze skupiny zahrnující glykoly, estery glykolů, estery kyseliny ftalové, estery kyseliny citronové, polyethylenglykol, dipropylenglykol a polypropylenglykol. Sloučeninami, které zvyšují penetraci léčiv, jsou látky vybrané ze skupiny 2-N-nonyl-1,3-dioxolanu, decyl-diethylacetátu a decyl-dimethylacetátu přidaného do přípravku v množství 0,5 až 35 % hmotn. Přípravky navíc obsahují další pomocné látky potřebné k přípravě vlastní lékové formy [C. M. Samour, S. F. Krauser, *Antifungal nail lacquer and method using same*, US6224887B1, 2001].

Je také popsán přípravek pro lokální použití ibuprofenu ve formě krému a emulze s konvenčními emulgátory O/W nebo bez nich. Zlepšený transdermální transport soli ibuprofenu v tomto přípravku je dosaženo použitím penetrantu 2-*N*-nonyl-1,3-dioxolanu nebo decyl-dimethylacetátu v olejové fázi emulze. Řešení patentu podrobně popisuje penetranty zvyšujících průnik ibuprofenu membránami, strukturně jsou odvozeny od 1,3-dioxolanů, 1,3-dioxanů nebo esterů octové kyseliny s uhlovodíkovými řetězci C7-C14, a/nebo makrocyclickými ketony a laktony nebo jejich deriváty, a/nebo *N*-alkyllaktamy a *N*-alkylazacykloheptany a/nebo estery mastných kyselin. Obsah penetrantů je uveden odděleně, protože v přípravku je specifikován buďto v emulzi, nebo v krému, a to v rozmezí 5-10 hmotnostních %. Dalšími látkami obsaženými v přípravku jsou pomocné látky, například emulgátory, konzervanty a flavoranty [S. F. Krauser, *Ibuprofen salt emulsifiers and cream formulations containing same*, US20050032900A1, 2005].

Rovněž je popsán nárok, zahrnující aplikace sloučenin zvyšujících kožní penetraci, což jsou jeden nebo více esterů s dlouhými řetězci (délka alkylů C8-C18) s těmito kyselinami: paraaminobenzoová, dimethylparaaminobenzoová, skořicová, methoxyskořicová a salicylová. Množství použitého penetrantu v přípravku činilo 10 až 10 000 % hmotnosti účinného léčiva či proléčiva. Biologicky účinnou látkou v přípravku může být steroid, derivát hormonů, nesteroidní antirevmatikum, antiepileptikum, analgetikum, antiemetikum, antiestrogen, inhibitor aromatázy, inhibitor 5 α -reduktázy, anxiolytikum, prostaglandin, antivirotikum, antimigrenikum, antihypertenzivum, antimalarikum, bronchodilátor, antidepresiva, léčivo Alzheimerovy choroby, neuroleptikum a antipsychotikum, antiparkinsonikum, antiandrogen, nebo léčivo proti anorexii. Přípravek obsahuje jednak fyziologicky účinnou látkou nebo proléčivo, jednak sloučeninu typu penetrantu, která se podává jako aerosol nebo sprej přímo na kůži nebo sliznice [B. L. Reed, T. M. Morgan, B. C. Finnin, *Dermal penetration enhancers and drug delivery systems involving same*, US6818226B2, 2004].

Známo je také řešení zahrnující farmaceutickou směs formou gelu nebo roztoku pro aplikaci kůží nebo sliznicí alespoň jedné aktivní látky. Promotorem absorpce v případě aplikace kůží je alespoň jedna mastná kyselina, alespoň jeden alkoholový nosič a také alespoň jeden stabilizátor nutný pro stabilizování mastné kyseliny. Obsah aktivní látky ve směsi určený v rozsahu 0,01 až 5 % hmotn. v poměru k 100 g farmaceutické směsi. Ve farmaceutické směsi byl obsah mastné kyseliny stanoven v rozsahu od 0,1 až 20 % hmotn. v poměru k 100 g směsi. Používanými mastnými kyselinami mohou být: kyselina kapronová, laurová kyselina, kyselina myristová, kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina olejová, kyselina palmitová, kyselina linolová a/nebo kyselina linolenová. Stabilizátory jsou pufrы s pH 4-10 a/nebo estery zmíněných mastných kyselin. Tyto přípravky navíc obsahují rozpouštědla, to je glycerol, propylenglykol a polyethylenglykol a jejich směsi [B. Taravella, V. Masini-Eteve, *Pharmaceutical composition for transdermal or transmucous administration*, US20040175416A1, 2004].

Další známé řešení zahrnuje použití haloacetamidu (herbicidu) pro antagonizování herbicidu, tj. obecně sloučenin o různé struktuře používaných jako sloučenin pro kontrolu růstu plevelů při pěstování plodin, zejména kukuřice. Určen je také rozsah dávek použitých sloučenin 0,001 – 10 kg/ha nebo 0,005 – 0,5 kg/ha v závislosti na struktuře používané sloučeniny [J. Glock, M. Hudetz, *Selective herbicidal composition*, US20030224937A1, 2003]. Podobný nárok zahrnuje použití selektivních herbicidních přípravků pro likvidaci plevelů u plodin pěstovaných na orné půdě. Směs obsahuje ve složení kromě neutrálních nosičů a podporujících látek jako aktivní ingredienci směs aktivní látky *N*-fenylsulfonyl-*N'*-triazinylmočovinu s různými substituenty pro antagonizování herbicidů, antidotálně účinným množstvím ochranné látky typu chinolinu s různými substituenty [J. Glock, M. Hudetz, E. Kerber, *Selective safened herbicidal composition*, US5618774A, 1997].

Dostupná patentová literatura popisuje také složení herbicidů, které regulují růst rostlin. Bylo nalezeno jedno řešení, které popisuje různé deriváty fenylylsulfonylmočoviny se specifickými substituenty na fenylovém kruhu, které je možno používat výhodně jako herbicidy a regulátory růstu rostlin. Struktura popsaných sloučenin a mechanismus synergického působení s veřejně přístupnými prostředky ochrany rostlin však se však liší od složení 1,3-dioxolanů, na něž se

vztahuje tato patentová přihláška, s vybranými induktory a/nebo inhibitory růstu rostlin a/nebo anorganickými solemi [K. Lorenz, L. Willms, K. Bauer, H. Bieringer, *Phenylsulfonyleureas, Processes for their-preparation, and their use as herbicides and plant growth regulators*, US5648315A, 1997].

5

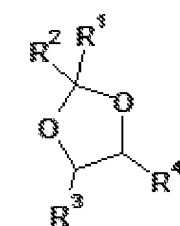
Je popsán rovněž přípravek s obsahem alespoň jedné fungicidní látky ze skupiny triazolů (cyprokonazol, epoxykonazol, metkonazol, propikonazol, tebukonazol) a/nebo povrchové aktivní látky a alespoň jednoho azolpyrimidinového derivátu substituovaného nezávisle na sobě skupinou: alkylovou C₁-C₆, alkylenovou C₃-C₈, alkenylovou C₃-C₆, fluoralkylovou C₁-C₆, atomy fluoru a/nebo atomu vodíku. Řešení umožňuje způsob kontrolování růstu fytopatogenních hub pomocí synergického použití alespoň jedné azolpyrimidiny a fungicidního prostředku [H. Van Tuyl Cotter, L. May, G. Reichert, E. Sieverding, *Fungicidal mixtures*, US6518275B1, 2003].

Jako shrnutí dosavadního stavu techniky lze konstatovat, že většina známých řešení neodhalila, že nízkomolekulární cyklické acetaly (molekulová hmotnost nižší než 300 g/mol) mají zvláště dobré vlastnosti pro zlepšení penetrace do rostlinných orgánů, ale pouze popsala, že složení velkých molekulárních sloučenin (molekulová hmotnost nad 500 g/mol) s přidáním účinných látek a několika pomocných látek (emulgátory, konzervační látky, antioxidanty, stabilizátory) mají určitý pozitivní vliv na penetraci přes kůži. Navíc většina řešení zahrnovala použití penetrujících prostředků ve formě mastí, laků, gelů nebo krémů aplikovaných lokálně. V uvedených řešeních efekt penetrace zvířecími tkáněmi může být také efektem aditivní synergie činnosti penetrujících prostředků, aktivních látek a pomocných látek.

25 Podstata vynálezu

Cílem původců tohoto vynálezu bylo připravit ve vodě rozpustnou, snadno biodegradovatelnou a netoxickou kompozici, používanou přímo na nadzemní části rostlin. Směs obsahuje biologicky aktivní látky, bez nutnosti přidavku dalších pomocných látek pro posílení nebo zpomalení růstu a vývoje rostlin.

Základem vynálezu je směs zlepšující penetraci biologicky aktivních látek povrchem rostlinných orgánů vyznačující se tím, že je – připravena ve vodném roztoku nebo stabilizačním pufru s hodnotou pH v rozsahu od 3 do 12 – směs obsahuje alespoň jednu sloučeninu s méně než cca 100 atomy v molekule 1,3-dioxolanu obecného vzorce 1:



Obecný vzorec 1

ve kterém jednotlivé substituenty R¹, R², R³, R⁴ označují nezávisle na sobě atom vodíku (-H) nebo skupinu hydroxylovou (-OH) nebo skupinu hydroxymethylovou (-CH₂OH) nebo skupinu alkylovou (C₁-C₃),

s alespoň jednou sloučeninou vybranou z:

- látka podporující růst rostlin, nebo

- anorganická sůl, nebo

- nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID),

přičemž koncentrace obsahu 1,3-dioxolanu je od 0,00001 do 9,5 % hmotn. v poměru k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji ≤ 1,0 % hmotn.

Výhodně je látkou indikující růst rostlin přírodní auxin, vybraný ze solí: kyseliny indolyl-3-octové, kyseliny indolyl-3-másečné, kyseliny fenyl-octové, indolylacetonitrilu, nebo kyseliny 3-indolylpyrohroznové.

- 5 Výhodně je látkou indikující růst rostlin syntetický regulátor růstu s vlastnostmi podobnými auxinu, vybraný z: kyseliny naftyl-1-octové, kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové, kyseliny 2,4,5-trichlorfenoxycetové, kyseliny 2-methoxy-3,6-dichlorbenzoové, nebo kyseliny 4-amino-3,5,6-trichlorpikolinové.

- 10 Výhodně je, že koncentrace látky indukující růst rostlin činí 10^{-10} až 10 mol/l v poměru k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji 10^{-4} mol/l.

- Výhodně je, že anorganickou sůl tvoří dusičnan (V), nebo dusitan (III), nebo uhličitan (IV), nebo siřičitan (IV), nebo síran (VI), nebo fosforitan (III), nebo fosforečnan (V), nebo chlorid (I)
15 s následujícími prvky: Na, Ca, K, Mg, Mo, B, Fe, Mn, Zn, Cu.

Výhodně je, že koncentrace anorganických solí činí 10^{-10} až 10 mol/l, v poměru k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji $8,3 \times 10^{-2}$ mol/l.

- 20 Výhodně je, že nesteroidním protizánětlivým léčivem jsou deriváty propionové kyseliny, především naproxen, nebo ibuprofen, ve formě sodné soli.

Výhodně je, že nesteroidním protizánětlivým léčivem je derivát kyseliny octové, především diklofenak, ve formě sodné soli.

- 25 Výhodně je, že koncentrace nesteroidního protizánětlivého léčiva činí 10^{-10} až 10 mol/l, v poměru k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji 10^{-2} mol/l.

- Výhodně je, že pro stabilizaci hodnoty pH v rozsahu od 3 do 12 jsou použity tyto pufrы: borátový, nebo hydrogenfosfátový, nebo amonný, nebo uhličitanový, nebo acetátový, nebo citrátový, nebo laktátový, nebo mravenčanový, nebo butyrátový, nebo malonový, nebo maleinový, nebo bis-tris, nebo ADA, nebo ACES, nebo TRPSO, nebo MOPSO, nebo PIPES, nebo BES, nebo TES, nebo HEPES, nebo DIPSA, nebo TAPSO, nebo TEA, nebo POPSO, nebo HEPPSO, nebo TRIS, nebo TAPS, nebo AMPD, nebo PBS, nebo CHES, nebo CAPSO, nebo AMP, nebo CAPS, nebo CABS.

- 35 Podstata řešení spočívá v použití nižších než standardně používaných koncentrací výše uvedených skupin biologicky aktivních látek. Konečným výsledkem v použití směsi podle vynálezu je zvýšená penetrace velkého množství organických látek a anorganických solí do rostlinných orgánů, čímž se posílí jejich účinek a sníží potřeba nadměrného používání těchto látek. Řešení je v souladu
40 s ekologickým trendem zahrnujícím omezování používání chemických sloučenin, kterými jsou promotory, nebo inhibitory růstu rostlin a umělých hnojiv, a pomáhá tak snížit jejich používání v životním prostředí.

- Nevýhodou nároku známých řešení z dosavadního stavu techniky, včetně těch popsanych výše, je
45 jejich dlouhodobá biotransformace a možnost akumulace látek pronikajících do tkáně. Naopak nízkomolekulární cyklické acetalý používané v tomto vynálezu se rychle rozkládají a zařazují do metabolických cest rostlin. Poslední zmíněná charakteristika je příznivá zejména pro rostlinné buňky, které dostávají dodatkovou dávku jednoduchých organických sloučenin, které urychlují jejich růst a vývoj. Další výhodou vynálezu - oproti dosud známým řešením - je menší lipofilita a
50 větší afinita nízkomolekulárních cyklických acetalů k biologickým membránám díky jejich strukturám s dlouhými uhlovodíkovými řetězy. Důsledkem je zvýšení průniku nízkomolekulárních 1,3-dioxolanů do rostlinných orgánů. Navíc nízkomolekulární 1,3-dioxolany lze použít v nižších koncentracích téměř jako fyziologické roztoky, což usnadňuje jejich aplikaci na povrch vnějších rostlinných orgánů ve formě aerosolů. To je hlavní odlišnost od zveřejněných derivátů 1,3-dioxolanů s vyšší molekulovou hmotností, například SEPA, které vyžadují používání emulgátorů.
55

Kromě toho žádné ze zatím popsaných známých řešení nepopisuje použití penetrantů v přípravcích ve vodném roztoku bez pomocných látek.

V patentu [A. Harder, I. Heep, S. Herrmann, J. L. Grunkemeyer, J. Kalbe, H. Mehlhorn, J. Schmidt, G. Schmahl, *Penetration of active substances into cells and organs*, US7652071B2, 2010] byla použita směs pěti- a šestičlenných 1,3-dioxolanů, avšak jejich koncentrace ve směsi s aktivními látkami a pomocnými látkami byly vyšší než 10% hmotn. V nabízeném řešení dle tohoto vynálezu se používá výhodně pouze 1 % hmotn. koncentrace, a to s obsahem 1 až 6 výlučně pětičlenných cyklických acetalů. Dle názoru autorů vynálezu používání koncentrací cyklických acetalů ve vodě s koncentrací přes 9,5 % hmotn. není ekonomicky odůvodněno. Kromě toho se přihlášený přípravek vyhotovuje těsně před aplikací na povrch nadzemních částí rostlinných orgánů ze základu obsahujícího vodu s výhodným obsahem vybraných cyklických acetalů, poté lze přidat jednu nebo několik biologicky aktivních látek. Tento vynález tedy nevyžaduje použití konzervačních nebo pomocných látek, což zjednodušuje používání přípravku. Je třeba poznamenat, že aplikace a předpověď účinků nízkomolekulárních 1,3-dioxolanů jako penetrantů pro zvýšení nebo oslabení aktivity biologicky aktivních látek, které vyvolávají růst nebo inhibici rostlin, není zcela jasná, navzdory popisu sloučenin s vedoucí strukturou 1,3-dioxolanu v literatuře.

Řešení v souladu s vynálezem bylo podrobněji uvedeno na níže uvedených příkladech a na obrázku, na kterém Obr. 1 je graf uvádějící poměr délky výhonků kukuřice sedmý den po postřiku (výsledky jsou prezentované v procentech délky výhonků, postříkaných přípravkem od č. 2 do 8, a délky výhonků postříkaných kontrolní směsí), a Obr. 2 - je graf představující poměr čerstvé hmoty kukuřičných výhonků sedmý den po postřiku (výsledky jsou prezentované jako procento hmotnosti výhonků postříkaných přípravkem od č. 2 až do č. 8, k hmotnosti výhonků postříkaných kontrolní směsí). Výhody řešení vynálezu lze navíc lépe pochopit analýzou přiložených tabulek s výsledky zkoušek, přičemž v tabulce 1 je uvedeno měření délky nadzemní části včetně statistické analýzy, analýzy variací a testu *post hoc* – testu NIR (rozdíly statisticky závažné označeno jinými písmeny; průměrná délka je uvedena v cm); v tabulce 2 - měření čerstvé hmoty nadzemní části včetně statistické analýzy, analýzy variací a testu *post hoc* – testu NIR (rozdíly statisticky závažné označeno jinými písmeny; průměrná hodnota je uvedena v gramech); v tabulce 3 - měření suché hmotnosti nadzemní části včetně statistické analýzy, analýzy variací a testu *post hoc* – testu NIR (rozdíly statisticky závažné jsou označeny jinými písmeny; průměrná hodnota je uvedena v gramech); v tabulce 4 - měření koncentrace H_2O_2 nadzemní části včetně statistické analýzy, analýzy variací a testu *post hoc* – testu NIR (zvýšená produkce H_2O_2 potvrzuje mezi jinými zrychlený metabolismus; měření provedeno spektrofotometricky, koncentrace H_2O_2 označeno na základě kalibrační křivky; statisticky závažné rozdílly jsou označeny jinými písmeny; průměrná koncentrace H_2O_2 je uvedena v $\mu\text{mol/g}$ čerstvé hmoty); v tabulce 5 - měření délky, čerstvé a suché hmoty nadzemní a kořenové části a koncentrace peroxidu vodíku a fluorescence *chlorofylu a* v listech (procentní přehled vybraných fyziologických parametrů vzorků kukuřice postříkané směsí č. 3 ve srovnání s kontrolními zkouškami č. 1 a 2 a směsí č. 6 ve srovnání s kontrolními zkouškami č. 4 a 5); v tabulce 6 - procentní přehled vybraných fyziologických parametrů vzorků kukuřice postříkané směsí č. 6 ve srovnání s kukuřicí, na kterou byla aplikována směs č. 3 a kontrolní zkoušky 4 a 5; v tabulce 7 - atomová koncentrace prvků a poměr atomové koncentrace ve srovnání s atomovou koncentrací dusíku pro vzorky označené izotopově (1i až 4i) a kontrolní zkoušky (1 až 4) určeny pomocí techniky XPS; v tabulce 8 - hmotnostní koncentrace prvků a poměr hmotnostní koncentrace k hmotnostní koncentraci dusíku u vzorků označených izotopově (1i až 4i) a kontrolní zkoušky (1 až 4) určené pomocí techniky XPS; v tabulce 9 - porovnání hmotnosti rostlin, na které byla aplikována směs s izotopů (1i až 4i) a kontrolní zkoušky bez izotopů (1 až 4).

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Směs draselné soli auxinu IAA (indolyl-3-octanu draselného) v koncentraci 10^{-4} mol/l rozpuštěná v pufru (PBS) s přísadou 1 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanu (DMD).

Roztoky, které jsou kontrolními zkouškami:

5

- 1 – pufr PBS (1000 ml PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , pH=7,3),
- 2 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným),
- 3 – pufr PBS s 1 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD,

10

Složení směsi dle vynálezu:

- 4 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 1 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD.

15

Experimenty byly prováděny na sazenicích kukuřice (*Zea mays* L. cv. Cosmo 230). Zrna kukuřice po dvouhodinovém ponoření ve vlažné vodě z vodovodu se vysévala v nádobách vybavených vlhkou buničinou a byla umístěna na čtyři dny ve tmě v inkubátorech udržujících teplotu 27 °C. Čtyřdenní sazenice byly přemístěny do skleníku a umístěny po 8 kusech v nádobách s objemem 2,4 L obsahujících kultivační médium podle Hoaglanda (Taiz and Zeiger, 2010). Po dalších třech dnech růstu ve skleníku za podmínek dlouhého dne (16 h) a s teplotou 22 °C byly sedmidenní sazenice poprvé postříkány. Pokaždé byl postřik aplikován na 12 nádob s 8 rostlinami, bylo vždy použito 5 ml přípravku 4 nebo roztoků 1 až 3 pro kontrolní zkoušky. Průběžně se v prvním, čtvrtém a sedmém dnu po postřiku odebíraly rostliny, u kterých byla provedena měření délky výhonků, vážení čerstvé a usušené hmoty nadzemní části rostlin. Průměrné hodnoty spolu se statistickou analýzou jsou uvedeny v tabulkách 1 až 4.

25

Použití směsi č. 4 (PBS+IAA+DMD) má pozitivní vliv na růst nadzemních částí kukuřice, výsledek je viditelný po 7 dnech od postřikání. Délka nadzemní části činí průměrně 23,14 cm a ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 1 (PBS) je větší o cca 20 % (Tabulka 1 pol. 1 až 4). Měření čerstvé hmoty neukazuje statisticky významný rozdíl mezi všemi zkouškami, ačkoliv je vidět, že směs č. 4 zvyšuje hmotnost nadzemních částí kukuřice o více než 15 % z hodnoty 0,58 u kontrolní zkoušky na 0,69 g (Tabulka 2 pol. 1 až 4). Použití směsi č. 4 (PBS+IAA+DMD) má pozitivní vliv na zvýšení suché hmotnosti nadzemních částí sazenic kukuřice, výsledek je viditelný po 7 dnech od postřikání. Získána hodnota suché hmotnosti nadzemní části rostlin postříkaných směsí č. 4 činí průměrně 0,069 g a ve srovnání s kontrolní zkouškou (PBS) její vzrůst je větší o 71 % (Tabulka 3 pol. 1 až 4). Použití směsi č. 4 (PBS+IAA+DMD) má pozitivní vliv na urychlení (zvýšení) metabolismu zkoušených rostlin. Statisticky závažné rozdíly jsou už viditelné po 24 hodinách od postřikání. Zrychlený metabolismus se udržuje během celého experimentu. V sedmém dnu od postřikání zrychlení metabolismu činí skoro 68 % v poměru ke kontrolní zkoušce. Je také třeba zdůraznit, že přísada 1 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanu (DMD) v počátečním období má vliv na snížení produkce H_2O_2 , zatímco po 7 dnech od postřikání se produkce peroxidu vodíku podobá hodnotám získaných používáním směsi č. 4 (Tabulka 4 pol. 1 až 4).

35

40

Příklad 2

45

Směs draselné soli auxinu IAA (indolyl-3-octanu draselného) v koncentraci 10^{-4} mol/l rozpouštěná v pufru (PBS) s přísadou 1 % obj. 2,2,4-trimethyl-1,3-dioxolanu (TMD).

Roztoky, které jsou kontrolními zkouškami:

50

- 5 – pufr PBS (1000 ml PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , pH=7,3),
- 6 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným),
- 7 – pufr PBS s 1 % obj. 2,2,4-trimethyl-1,3-dioxolanem - TMD,

55

Složení směsi dle vynálezu:

8 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 1 % obj. 2,2,4-trimethyl-1,3-dioxolanem - TMD.

Experimenty byly prováděny na sazenicích kukuřice (*Zea mays* L. cv. Cosmo 230). Zrna kukuřice po dvouhodinovém ponoření ve vlažné vodě z vodovodu se vysévala v nádobách vybavených vlhkou buničinou a umístěna na čtyři dny ve tmě v inkubátorech udržujících teplotu 27 °C. Čtyřdenní sazenice byly přemístěny do skleníku a umístěno po 8 kusech v nádobách s objemem 2,4 L obsahujících kultivační médium podle Hoaglanda (Taiz and Zeiger, 2010). Po třech dnech růstu ve skleníku za podmínek dlouhého dne (16 h) a s teplotou 22 °C byly sedmidenní sazenice poprvé postříkány příslušným roztokem. Pokaždé byl postřík aplikován na 12 nádob s 8 rostlinami, bylo vždy použito 5 ml přípravku 8 nebo roztoků 5 až 7 pro kontrolní zkoušky. Následně se v prvním, čtvrtém a sedmém dni po postřiku odebíraly rostliny, u kterých byla provedena měření délky výhonků, vážení čerstvé a usušené hmoty nadzemní části rostlin. Průměrné hodnoty spolu se statistickou analýzou jsou uvedeny v tabulkách 1 až 4.

Délka nadzemní části se nezměnila statisticky závažným způsobem v případě použití směsi č. 8 ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 5. Zjištěn slabý efekt zamezující vzrůstu, který činil cca 3 % ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 5 (PBS) (Tabulka 1 pol. 5 až 8). Měření čerstvé hmotnosti neukázalo existenci statisticky závažných rozdílů mezi zkouškami č. 5 až 8. Například roztok č. 5 zmenšuje hmotnost nadzemních částí kukuřice o cca 5 % z hodnoty 0,56 g pro sazenice kontrolních rostlin na hodnotu 0,53 g pro sazenice, na které byla aplikována směs č. 8 (Tabulka 2 pol. 5 až 8). Použité směsi nemají statisticky závažný vliv na změny čerstvé hmotnosti nadzemních orgánů semenáčů kukuřice. Bylo zjištěno slabé zamezení růstu v případě směsi č. 8, které činilo cca 4 % ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 5. Postřikání směsí č. 8 má negativní účinek na nárůst suché hmotnosti listů kukuřice, byl zjištěn pokles suché hmotnosti o 16 % ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 5 (Tabulka 3 pol. 5 až 8). Použití směsi č. 8 (PBS+IAA+TMD) vyvolává největší výkyvy koncentrace H_2O_2 . Ve čtvrtém dnu po postřikání dochází ke snížení produkce H_2O_2 , zpomaluje se metabolismus a dochází k inhibici růstu rostlin. Po 7 dnech od postřiku je metabolismus rostlin vyšší než kontrolní zkouška č. 5 o 15 %, což by mohlo znamenat opoždění růstu sazenic kukuřice postříkaných touto směsí (Tabulka 4 pol. 5 až 8).

Příklad 3

Směs draselné soli auxinu IAA (indolyl-3-octanu draselného) v koncentraci 10^{-4} mol/l rozpouštěná v pufru (PBS) s přísadou 1 % obj. (2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanolu – DDM.

Roztoky, které jsou kontrolními zkouškami:

9 – pufr PBS (1000 ml PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,45 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, 0,2 g KH_2PO_4 , pH=7,3),

10 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným),

11 – pufr PBS s 1 % obj. (2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanolem - DDM,

Složení směsi dle vynálezu:

12 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octan draselný) s přísadou 1 % obj. (2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)metanolu - DDM.

Experimenty byly prováděny na sazenicích kukuřice (*Zea mays* L. cv. Cosmo 230). Zrna kukuřice po dvouhodinovém ponoření ve vlažné vodě z vodovodu se vysévala v nádobách vybavených vlhkou buničinou a byla umístěna na čtyři dny ve tmě v inkubátorech udržujících teplotu 27 °C. Čtyřdenní sazenice byly přemístěny do skleníku a umístěny po 8 kusech v nádobách s objemem 2,4 L obsahujících kultivační médium podle Hoaglanda (Taiz and Zeiger, 2010). Po třech dnech růstu ve skleníku za podmínek dlouhého dne (16 h) a s teplotou 22 °C byly sedmidenní sazenice poprvé postříkány. Pokaždé byl postřík aplikován na 12 nádob s 8 rostlinami, bylo vždy použito 5 ml přípravku 12 nebo roztoků 9 až 11 pro kontrolní zkoušky. Průběžně se v prvním, čtvrtém a sedmém dnu po postřiku odebíraly rostliny, u kterých byla provedena měření délky výhonků, vážení čerstvé a usušené hmoty nadzemní části rostlin. Průměrné hodnoty spolu se statistickou analýzou jsou uvedeny v tabulkách 1 až 4.

Použití směsi č. 12 (PBS+IAA+DDM) má pozitivní vliv na nárůst délky nadzemních částí kukuřice, efekt je viditelný v prvním dnu od postřiku. Od čtvrtého dne je vzrůst sazenic kukuřice postřikovaných směsí č. 12 větší než kontrolní zkoušky č. 9 až 11. Délka nadzemní části činí průměrně 20,39 cm a ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 9 je větší o 6 % (Tabulka 1 pol. 9 až 12).

5 Postřikání výše uvedenými směsí nemá statistický vliv na změny čerstvé hmotnosti vážených orgánů (Tabulka 2 pol. 9 až 12) a na změny suché hmotnosti vážených orgánů (Tabulka 3 pol. 9 až 12). Použití směsi č. 12 statisticky závažným způsobem zvyšuje metabolismus rostlin, což bylo zjištěno už od prvního do čtvrtého dne po postřikání. Efektem je zvětšení délky nadzemních orgánů sazenic kukuřice, konkrétně ve čtvrtém a sedmém dni zkoušení. V sedmém dni po postřiku se

10 metabolismus rostlin, na které byla aplikována směs č. 12, vrátí na úroveň hodnot kontrolních rostlin, což znamená, že vyčerpaly se aktivní sloučeniny obsažené ve směsi č. 12 (Tabulka 4 pol. 9 až 12).

Příklad 4

15 Směs umělého auxinu 2,4-D (kyselina dichlorfenoxycetová) v koncentraci 10^{-6} mol/l rozpouštěná ve vodném roztoku s koncentrací 1 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanu (DMD); 2,2,4-trimethyl-1,3-dioxolanu (TMD); (2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanolu (DDM) v molárním poměru 1:1:1 - (DMD:TMD:DDM=1:1:1).

20 Roztoky, které jsou kontrolními zkouškami:

1 – destilovaná voda

2 – destilovaná voda s 10^{-6} mol/l 2,4-D (kyselinou dichlorfenoxycetovou),

25 Složení směsi podle vynálezu:

3 – destilovaná voda s 10^{-6} mol/l 2,4-D (kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová) a vodný roztok s koncentrací 1 % obj.: 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanu (DMD); 2,2,4-trimethyl-1,3-dioxolanu (TMD);

30 (2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanolu (DDM) v molárním poměru 1:1:1 - (DMD:TMD:DDM = 1:1:1).

Experimenty byly prováděny na sazenicích kukuřice (*Zea mays* L. cv. Cosmo 230). Zrna kukuřice po dvouhodinovém ponoření ve vlažné vodě z vodovodu se vysévala v nádobách vybavených

35 vlhkou buničinou a umístěna na čtyři dny ve tmě v inkubátorech udržujících teplotu 27 °C. Čtyřdenní sazenice byly přemístěny do skleníku a umístěno po 8 kusech v nádobách s objemem 2,4 L obsahujících kultivační médium podle Hoaglanda (Taiz and Zeiger, 2010). Po třech dnech růstu ve skleníku za podmínek dlouhého dne (16 h) a s teplotou 22 °C byly sedmidenní sazenice

40 poprvé postřikány směsí č. 3 nebo kontrolními roztoky 1, 2. Bylo potvrzeno, že 1 ml roztoku použitého k postřikání stačil na jednorázový postřik 2 nádob, každá obsahující 8 rostlin. Postřik byl proveden třikrát: poprvé kdy sazenice měly 7 dnů, pak 10 dnů, další po 13 dnech. Po třech postřicích byly 14denní sazenice sklizeny a byly zahájeny analýzy jejich zvolených fyziologických parametrů. Průměrné hodnoty včetně statistické analýzy jsou uvedeny v tabulce 5.

45 Pouze ve třech zkoumaných parametrech byly zjištěny důležité rozdíly mezi směsí č. 3 a kontrolními zkouškami č. 1 a 2. Rozdíl byl zjištěn v označení suché hmotnosti nadzemních orgánů (vzrůst o 12,7 % ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 1 a vzrůst o 30 % ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 2) a v označení suché hmotnosti kořenů (vzrůst o 34 % ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 2 a vzrůst přes 50 % ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 1). Vzrůst orgánů sazenic byl

50 vyšší navzdory metabolické aktivitě, zjištěné sledováním produkce peroxidu vodíku, a menší než v případě rostlin z kontrolní zkoušky č. 1. Byl zjištěn také nárůst následujících parametrů rostlin po aplikaci směsi č. 3 ve srovnání s rostlinami z kontrolní zkoušky č. 1:

- o 9,5 % delší nadzemní části,
- 55 • o 11 % větší hmotnost nadzemních orgánů,

- o 5 % větší hodnota nulové fluorescence *chlorofylu a* rostlin přizpůsobených tmě,
- o 12,7 % vyšší hmotnost kořenů.

Příklad 5

5

Směs umělého auxinu 2,4-D (kyselina dichlorfenoxyoctová) v koncentraci 10^{-6} mol/l rozpouštěná ve vodném roztoku v koncentraci 1 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanu (DMD).

Roztoky, které jsou kontrolními zkouškami:

10

4 – destilovaná voda

5 – destilovaná voda s 10^{-6} mol/l 2,4-D (kyselina dichlorfenoxyoctová),

Složení směsi podle vynálezu:

15

6 – destilovaná voda s 10^{-6} mol/l 2,4-D (kyselina dichlorfenoxyoctová) vodný roztok v koncentraci 1 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanu - (DMD).

Experimenty byly prováděny na sazenicích kukuřice (*Zea mays* L. cv. Cosmo 230). Zrna kukuřice po dvouhodinovém ponoření ve vlažné vodě z vodovodu se vysévala v nádobách vybavených vlhkou buničinou a umístěna na čtyři dny ve tmě v inkubátorech udržujících teplotu 27 °C. Čtyřdenní sazenice byly přemístěny do skleníku a umístěno po 8 kusech v nádobách s objemem 2,4 L obsahujících kultivační médium podle Hoaglanda (Taiz and Zeiger, 2010). Po třech dnech růstu ve skleníku za podmínek dlouhého dne (16 h) a s teplotou 22 °C byly sedmidenní sazenice poprvé postříkány směsí č. 6 nebo kontrolními roztoky 4 a 5. Bylo potvrzeno, že 1 ml roztoku použitého k postřikání stačil na jednorázový postřik 2 nádob, každá obsahující 8 rostlin. Postřik byl proveden třikrát: poprvé, když sazenice měly 7 dnů, pak 10 dnů, další po 13 dnech. Po třech postřicích byly 14denní sazenice sklizeny a byly zahájeny analýzy jejich zvolených fyziologických parametrů. Průměrné hodnoty včetně statistické analýzy jsou uvedeny v tabulce 5. Bylo zjištěno, že směs č. 6 je jedna z nejlepších v porovnání s kontrolními zkouškami č. 4 a 5. Stimuluje většinu sledovaných parametrů. Procentní nárůst vybraných fyziologických parametrů u kukuřice pro směs č. 6 ve srovnání s kontrolními zkouškami č. 3, 4 a 5 je uveden v tabulce č. 6. Směs č. 6 zvyšuje statisticky významným způsobem následující fyziologické parametry rostlin ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 4:

35

- délka nadzemních orgánů je vyšší o 11,7 %,
- suchá hmotnost nadzemních orgánů se zvýšila o 3,2 %,
- délka kořenů byla zvýšena o 33,2 %,
- čerstvá hmotnost kořenů o 25,5 %,
- suchá hmotnost kořenů o 24,0 %.

40

Zvětšuje se, avšak již statisticky nevýznamně čerstvá hmotnost nadzemních orgánů o 2,0 % a maximální fluorescence *chlorofylu a* rostlin přizpůsobených tmě o cca 20 % (tabulka 5 a 6). Výše uvedené parametry vzrostly navzdory tomu, že metabolismus rostlin, vyjádřený pomocí koncentrace H_2O_2 , je nižší cca o 7 % než u rostlin s aplikovanou směsí č. 4 (tabulka 5).

45

Při srovnání směsi č. 3 viz Příkladu 4, se směsí č. 6 (tabulka 6) bylo zjištěno, že směs č. 6 má vliv na zlepšení některých zkoumaných parametrů. Směs č. 6 stimuluje zvýšení následujících parametrů v poměru ke směsi č. 3 (tabulka 6):

50

- délka nadzemních orgánů je vyšší o 2,0 %,
- maximální fluorescenci chlorofylu a rostlin přizpůsobených tmě je větší o cca 20,0 %,
- délka kořenů je větší o 26,5 %,
- čerstvá hmotnost kořenů je vyšší o 10,1 %.

55

Kromě toho směs č. 6 působí tímto způsobem, že následující parametry se zmenšují ve srovnání se směsí č. 3 (tabulka 6):

- čerstvá hmotnost nadzemních orgánů je nižší o 8,1 %,
- 5 • suchá hmotnost nadzemních orgánů je nižší o 9,3 %,
- suchá hmotnost kořenů pokles je nižší o 3,2 %.

Lze konstatovat, že směs č. 6 napomáhá zlepšení parametrů spojených s růstem rostlin v oblasti délky, zatímco směs č. 3 stimuluje růst hmotnosti orgánů, především nadzemních orgánů rostlin (tabulka 6).

Příklad 6.

Směs 1 % obj. roztoků 1,3-dioxolanů a v nich rozpuštěných solí označených izotopově ^{13}C a ^{15}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3 : \text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr) v koncentraci $8,3 \times 10^{-2}$ mol/l.

Roztoky, které jsou kontrolními zkouškami:

- 1 – vodný roztok solí označených izotopově ^{12}C a ^{14}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $\text{Cm} = 0,083$ mol/l) s přísadou 1 % obj. roztoku (DMD:TMD = 1:1 molární poměr),
- 20 2 – vodný roztok solí označených izotopově ^{12}C i ^{14}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $\text{Cm} = 0,083$ mol/l) s přísadou 1 % obj. roztoku (DDM:TMD = 1:1 molární poměr),
- 3 – vodný roztok solí označených izotopově ^{12}C i ^{14}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $\text{Cm} = 0,083$ mol/l) s přísadou 1 % obj. roztoku (DDM:TMD:DMD = 1:1:1 molární poměr),
- 25 4 – vodný roztok solí označených izotopově ^{12}C i ^{14}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $\text{Cm} = 0,083$ mol/l) ve vodě.

Složení zkušných směsí podle vynálezu:

- 30 1i – vodný roztok solí označených izotopově ^{13}C i ^{15}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $\text{Cm} = 0,083$ mol/l) s přísadou 1 % obj. roztoku (DMD:TMD = 1:1 molární poměr),
- 2i – vodný roztok solí označených izotopově ^{13}C i ^{15}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $\text{Cm} = 0,083$ mol/l) s přísadou 1 % obj. roztoku (DDM:TMD = 1:1 molární poměr),
- 3i – vodný roztok solí označených izotopově ^{13}C i ^{15}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $\text{Cm} = 0,083$ mol/l) s přísadou 1 % obj. roztoku (DDM:TMD:DMD = 1:1:1 molární poměr),
- 35 4i – vodný roztok solí označených izotopově ^{13}C i ^{15}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $\text{Cm} = 0,083$ mol/l) ve vodě.

Experimenty byly prováděny na sazenicích kukuřice (*Zea mays* L. cv. Cosmo 230). Zrna kukuřice po dvouhodinovém ponoření ve vlažné vodě z vodovodu se vysévala v nádobách vybavených vlhkou buničinou a umístěna na čtyři dny ve tmě v inkubátorech udržujících teplotu 27 °C. Čtyřdenní sazenice byly přemístěny do skleníku a umístěno po 8 kusech v nádobách s objemem 2,4 L obsahujících kultivační médium podle Hoaglanda (Taiz and Zeiger, 2010). Po třech dnech růstu ve skleníku za podmínek dlouhého dne (16 h) a s teplotou 22 °C byl na listy sazenic pomocí štětce aplikován kontrolní roztok nebo směs. Aplikace zkušných látek na povrch listů byla prováděna třikrát: poprvé, kdy sazenice měly 7 dnů, pak 10 dnů, a další po 13 dnech. Po 14 dnech pěstování byly rostliny sklizeny a podrobeny analýzám.

Pro účely dalších zkoušek bylo vždy naváženo po 1,000 g čerstvých listů kukuřice shromážděných ze vzorku 1 až 4 (kontrolní) a 1i až 4i (označeny izotopově). Zvážená hmota listů byla rozetřena v hmoždíři na kaši, kvantitativně byla přemístěna do přístroje typu Soxhleta v 200 ml 99% methanolu (Avantor). Směs byla extrahována během cca 2,5 hodin do ukončení třech plných cyklů extrakce. Poté byl obsah baňky s extraktem odpařen do sucha a byl získán zbytek v podobě suchého zeleného prášku. Obsah izotopů ^{12}C a ^{13}C a také ^{14}N a ^{15}N byl zjištěn pomocí spektrometru fotoelektronů vzbuzovaných rentgenovým zářením (X-Ray Photoemission Spectroscopy - XPS) PHI5700 firmy

Physical Electronics. Každý ze vzorků 1 až 4 a 1i až 4i byl nanesen na monokrystalický křemík, povrch vzorků vyrovnáno pomocí laboratorního skla a umístěno ve vakuu, zkoušky byly prováděny v ultravysokém vakuu $\sim 2 \times 10^{-9}$ mbar. Pro analýzu byl využit monochromatický svazek paprsků rentgenového záření s energií 1486 eV (rentgenová lampka s hliníkovou anodou a monochromátorem). Vlivem rentgenového záření na zkoušený vzorek došlo k emisi fotoelektronů z povrchu zkušeneho preparátu. Byla analyzována emitovaná kinetická energie z daného elektronového obalu fotoelektronu, a nepřímo vazebná energie. Na základě znalosti vazebné energie byla provedena identifikace prvků, které tvoří zkoušený vzorek a byly provedeny výpočty atomové a hmotnostní koncentrace jednotlivých prvků, které tvoří zkoumané vzorky (C, N, O, Na, Si, P, S, Cl). Výsledky zkoušek jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8. Množství dusíku bylo udržováno na poměrně nízké, ale relativně stále úrovni. Ostatní chemické prvky se vyskytují v malém množství, blízkém limitu detekce chemických prvků pomocí metody XPS, s výjimkou křemíku, jehož procentní podíl je poměrně velký, v tomto případě existuje podezření, že křemík se ocitl na povrchu vzorku v průběhu přípravy vzorků k měření (použito laboratorní skla k vyrovnání povrchu zkušeneých materiálů). Byl zjištěn pokles atomové koncentrace dusíku v poměru k atomové koncentraci uhlíku pro vzorek č. 1 ve srovnání se vzorkem č. 1i. Pro vzorky č. 2 až 4 v poměru k analogickým zkouškám č. 2i až 4i byl zjištěn opačný jev spočívající v zmenšení atomové koncentrace dusíku v poměru k atomové koncentraci uhlíku. Největší rozdíl atomové koncentrace C1s/N1s byl zachycen mezi vzorky č. 4 a 4i. Výsledky zkoušek atomové koncentrace chemických prvků jsou uvedeny v tabulce 7. Přehled stejných výsledků v přepočtu na atomovou koncentraci jednotlivých chemických prvků je uveden v tabulce 8. U zkoušek 1i a 3i byl zjištěn vzrůst hmotnostní koncentrace atomů uhlíku a dusíku v poměru ke kontrolním zkouškám č. 1 a 3. Například hmotnostní poměr uhlíku ve vzorcích 1 a 1i činí 68,18:71,77, zatímco u dusíku 1,44:1,58. Opačná situace byla zjištěna u vzorků č. 2 a 2i a také 4 a 4i. Například poměr uhlíku ve vzorcích 4 a 4i činí 67,07 : 64,46, zatímco u dusíku 1,45:1,14. Lze konstatovat, že směs č. 1i solí označených izotopově ^{13}C a ^{15}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $C_m = 0,083$ mol/l) s přísadou 1 % obj. roztoku (DMD:TMD = 1:1 molární poměr) zvyšuje absorpci izotopů ^{13}C rostlinou cca o 5,0 % a ^{15}N cca o 8,8 %. Porovnáme-li směs č. 1i s kontrolní zkouškou 4 a se směsí č. 4i, která je vodným roztokem solí označených izotopově ^{13}C a ^{15}N ($\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaNO}_3 = 1:1$ molární poměr, $C_m = 0,083$ mol/l), ve vodě, absorpce izotopů ^{13}C a ^{15}N sazenic kukuřice je snížena cca o 3,9 % a o cca 21,4 %. Lze shrnout, že, směsi č. 1i a 3i přispívají k absorpci rostlinou atomů prvků ^{13}C a ^{15}N ze solí označených izotopově v poměru k analogickým kontrolním zkouškám se solí chemických prvků ^{12}C i ^{14}N . Kromě toho na základě hmotností rostlin, na které byly aplikovány roztoky 1 až 4 a 1i až 4i, je možno jednoznačně odůvodnit efekt stimulace nebo inhibice růstu pro jednotlivé směsi (Tabulka 9). Nejlépe penetrující směsi 1i a 2i způsobily zvýšený transport izotopů do rostlinných orgánů, které nejsou absorbovány rostlinami a nemohou být zabudovány do jejich tkání. Výsledkem je nedostatek těchto prvků a slabší růst ve srovnání s rostlinami s aplikovaným postřikem solí obsahujícími chemické prvky ^{12}C a ^{14}N .

40 Příklad 7.

Směs 1 % obj. roztoku (DMD:TMD = 1:1 molární poměr) a sodné soli naproxenu v koncentraci 10^{-2} mol/l jako inhibitoru růstu rostlin.

45 Složení směsi podle vynálezu:

1 – roztok sodné soli naproxenu s přísadou 1 % obj. DMD:TMD = 1:1 molární poměr,

Roztoky, které jsou kontrolními zkouškami:

50

2 – roztok sodné soli naproxenu ve vodě,

3 – voda.

Experimenty byly prováděny na sazenicích kukuřice (*Zea mays* L. cv. Cosmo 230). Zrna kukuřice po dvouhodinovém ponoření ve vlažné vodě z vodovodu se vysévala v nádobách vybavených

55

vlhkou buničinou a umístěna na čtyři dny ve tmě v inkubátorech udržujících teplotu 27 °C. Čtyřdenní sazenice byly přemístěny do skleníku a umístěno po 8 kusech v nádobách s objemem 2,4 L obsahujících kultivační médium podle Hoaglanda (Taiz and Zeiger, 2010). Po třech dnech růstu ve skleníku za podmínek dlouhého dne (16 h) a s teplotou 22 °C byly na listy sazenic pomocí štětce aplikovány zkušební směs č. 1 a za účelem srovnání také kontrolní roztoky č. 2 a 3.

Aplikování zkoušených látek na povrch listů se konalo třikrát: poprvé, když sazenice měly 7 dnů, pak 10 dnů, další po 13 dnech. Po 14 dnech pěstování byly rostliny sklizeny a podrobeny analýzám. K dalším zkouškám bylo zváženo 0,4577 g čerstvých listů kukuřice shromážděných ze vzorku č. 1 nebo 2. Zvážená hmota listů byla roztřena v hmoždíři na kaši, kvantitativně přemístěna do přístroje typu Soxhleta v 200 ml 99% methanolu (Avantor). Směs byla extrahována během cca 2,5 hodiny do ukončení třech plných cyklů. Koncentrace sodné soli naproxenu v roztocích před aplikováním na listy a po extrakci byly zjištěny chromatograficky (pomocí HPLC), za podmínek podobných obdobné látce popsané v Evropském lékopisu verze 9.0. Separační kolona RP: Symmetry C18, 5 µm, 4,6 x 150 mm (Waters). Teplota: 50 °C. Eluent: 42 objemu acetonitrilu a 58 objemu dihydrogenfosforečnanu draselného v koncentraci 1,36 g/l s pH = 2,0 přidavkem kyseliny fosforečné. Průtok: 1 ml/min. Detektor: spektrofotometr s vlnovou délkou 230 nm. Nástřik zkoušených roztoků: 5 µl pro každý vzorek roztoků používaných na listy, 20 µl pro každý extrakt z listů kukuřice.

Níže jsou uvedeny získané výsledky pro konečné roztoky používané k aplikaci na listy kukuřice a po extrakci 14-denních sazenic. Koncentrace sodné soli naproxenu označené v poměru k vzorci 0,1 mg/ml používaných na listy kukuřice v roztocích č.1 a 2 činila:

1 - $0,0629 \pm 0,0008$ mg/ml - roztok sodné soli naproxenu ve vodě s obsahem 1 % obj. DMD : TMD = 1 : 1 molární poměr,
2 - $0,1472 \pm 0,0003$ mg/l - roztok naproxenu ve vodě (kontrolní zkouška)

Koncentrace sodné soli naproxenu v listech po extrakci v přístroji typu Soxhleta ve vzorcích 1e a 2e odečítáno z kalibrační křivky pro sodnou sůl naproxenu v koncentraci 5, 10 a 1000 ng/ml činila:
1e – $27,19791 \pm 0,45712$ ng/ml
2e – $17,47815 \pm 0,846142$ ng/ml

Zvážené hmotnosti 8 nadzemních částí rostlin nad koleoptylem přímo po sběru:

1m – 0,4854 g
2m – 0,5439 g
3m – 0,7148 g.

Lze konstatovat, že efekt inhibice růstu sazenic kukuřice je zvlášť viditelný po aplikaci na povrch listů v případě směsi č. 1 s koncentrací sodné soli naproxenu a je menší než u roztoku č. 2 (kontrolní zkouška), kde koncentrace sodné soli naproxenu je více než dvakrát vyšší (0,0629 mg/l vs. 0,1472 mg/l. Přítomnost cyklických acetalů, především TMD - 2,2,4-trimethyl-1,3-dioxolanu a DMD - 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanu v koncentraci do 1 % obj. napomáhá průniku biologickými membránami naproxenu, jehož koncentrace v listech (1e) je vyšší než pro kontrolní zkoušku s vodou a sodnou solí naproxenu (2e). Efekt inhibice je možno pozorovat po změření hmotnosti celých rostlin po ukončení experimentu. Zkouška č. 3m kde byla na listy kukuřice aplikována jen voda má nejvyšší hmotnost, zatímco vzorky sazenic kukuřice označené čísly 1m a 2m vykazují výrazně menší hmotnost.

Příklad 8.

Směs draselné soli auxinu IAA (indolyl-3-octanu draselného) v koncentraci 10^{-4} mol/l rozpouštěné v pufru (PBS) s přísadou 0,1 až 12,0 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanu (DMD).

Roztok, který je kontrolní zkouškou:

1 – pufr PBS (1000 ml PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , pH=7,3) s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným),

Složení směsi podle vynálezu:

- 2 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 0,1 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD.
- 3 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 0,5 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD.
- 4 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 1,0 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD.
- 5 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 3,0 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD.
- 6 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 6,0 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD.
- 7 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 9,0 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD.
- 8 – pufr PBS s 10^{-4} mol/l draselnou solí IAA (indolyl-3-octanem draselným) a 12,0 % obj. 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanem - DMD.

Experimenty byly prováděny na sazenicích kukuřice (*Zea mays* L. cv. Cosmo 230). Zrna kukuřice po dvouhodinovém ponoření ve vlažné vodě z vodovodu se vysévala v nádobách vybavených vlhkou buničinou a umístěna na čtyři dny ve tmě v inkubátorech udržujících teplotu 27 °C. Čtyřdenní sazenice byly přemístěny do skleníku a umístěno po 8 kusech v nádobách s objemem 2,4 L obsahujících kultivační médium podle Hoaglanda (Taiz and Zeiger, 2010). Po třech dnech růstu ve skleníku za podmínek dlouhého dne (16 h) a s teplotou 22 °C byly sedmidenní sazenice postříkány kontrolním roztokem (1) a směsí (2 až 8). Pro postřik jedné nádoby obsahující 8 rostlin bylo použito po 5 ml roztoku. Následně týden po postřikání byly rostliny sklizeny a byla prováděna vážení čerstvé hmoty a měření délky nadzemních částí. Výsledky jsou uvedeny formou lineárních grafů (Graf – Obr. 1, Graf – Obr. 2). Graf na Obr. 1 ukazuje měření délky výhonků kukuřice v sedmém dni po postřiku. Výsledky jsou znázorněny jako procentní poměr délky výhonků postříkaných směsí od 2 do 8 k délce výhonků rostlin postříkaných kontrolním roztokem. Graf na Obr. 2 ukazuje měření čerstvé hmotnosti prýtů kukuřice v sedmém dnu po postřikání. Výsledky ukázáno jako procentní poměr hmoty výhonků postříkaných směsí od 2 do 8 k hmotnosti výhonků rostlin postříkaných kontrolním roztokem.

Byly porovnány různé koncentrace DMD ve zkoušených směsích (od 0,1 do 12,0 % obj.) a bylo potvrzeno, že v případě koncentrace od 1,0 do 6,0 % obj. 1,3-dioxolanu ve směsích číslo 4, 5 a 6 byla zjištěna stimulaci růstu délky výhonků kukuřice ve srovnání s kontrolní zkouškou (Graf - Obr. 1). Vzrůst délky výhonků pro směs č. 4, 5 a 6 činila: 5,6 %; 9 %; 0,8 % ve srovnání s kontrolní zkouškou č. 1. Nejrychlejší vzrůst byl zjištěn pro směs č. 5, obsahující 3,0 % obj. DMD. V případě měření čerstvé hmoty výhonků byl zjištěn nárůst hmotnosti v oblasti směsí od 2 do 7 (Graf – Obr. 2). Největší stimulace vzrůstu čerstvé hmotnosti nadzemních orgánů bylo zjištěno, podobně jako v případě měření délky těchto orgánů, pro směs č. 5, s obsahem 3,0 % obj. DMD. Z provedených experimentů vyplývá, že stimulující účinek DMD ve směsích 2 až 8 je v rozsahu od 0,1 do přes 9,0 % obj.

Směsi v souladu s vynálezem mohou být používány za účelem zlepšení penetrace biologicky aktivních látek nadzemními orgány rostlin. Biologicky aktivními látkami se rozumí především: přírodní rostlinné hormony (auxiny), syntetické regulátory růstu obsahující vlastnosti podobné jako mají přírodní růstové hormony (2,4-D), anorganické soli (umělá hnojiva), prostředky na ochranu rostlin (pesticidy), inhibitory nebo promotory růstu rostlin (nesteroidní protizánětlivá léčiva). Efekt zlepšení penetrace pomocí použití směsi podle vynálezu má pozitivní vliv na možnost omezení nebo zrychlení rychlosti růstu rostlin. Kromě toho směsi podle vynálezu umožňují relativně velké zlepšení transportu nadzemními orgány rostlin, což umožňuje omezení příliš velkého používání umělých hnojiv a pesticidů, což snižuje jejich nepříznivý vliv na životní prostředí. Hlavní oblastí používání vynálezu je šlechtění a kultivace rostlin.

Tabulka 1

Poř.č.	Období po postřikání / varianta experimentu	Měření délky nadzemních částí (mezokotyl + listy)		
		24 h	96 h	168 h
1	PBS	9,89 (a)	13,53 (a)	19,19 (a)
2	PBS + IAA	9,33 (a)	12,19 (a)	19,86 (a)
3	PBS + DMD	9,48 (a)	11,50 (a)	20,76 (a)
4	PBS + IAA + DMD	10,00 (a)	13,20 (a)	23,14 (b)
5	PBS	9,89 (a)	13,53 (a)	19,19 (a)
6	PBS + IAA	9,33 (a)	12,19 (a)	19,86 (a)
7	PBS + TMD	9,64 (a)	13,19 (a)	16,77 (a)
8	PBS + IAA + TMD	9,91 (a)	13,26 (a)	18,63 (a)
9	PBS	9,89 (a)	13,53 (a)	19,19 (a)
10	PBS + IAA	9,33 (a)	12,19 (a)	19,86 (a)
11	PBS + DDM	9,01 (a)	12,50 (a)	17,49 (a)
12	PBS + IAA + DDM	10,40 (a)	16,29 (b)	20,39 (b)

5 Tabulka 2

Poř.č.	Období po postřikání / varianta experimentu	Měření čerstvé hmotnosti nadzemních částí (mezokotyl + listy)		
		24 h	96 h	168 h
1	PBS	0,26 (a)	0,39 (a)	0,58 (a)
2	PBS + IAA	0,24 (a)	0,36 (a)	0,52 (a)
3	PBS + DMD	0,23 (a)	0,40 (a)	0,64 (a)
4	PBS + IAA + DMD	0,22 (a)	0,33 (a)	0,69 (a)
5	PBS	0,26 (a)	0,40 (a)	0,56 (a)
6	PBS + IAA	0,24 (a)	0,36 (a)	0,52 (a)
7	PBS + TMD	0,29 (a)	0,34 (a)	0,44 (a)
8	PBS + IAA + TMD	0,28 (a)	0,34 (a)	0,53 (a)
9	PBS	0,26 (a)	0,40 (a)	0,58 (a)
10	PBS + IAA	0,24 (a)	0,36 (a)	0,52 (a)
11	PBS + DDM	0,27 (a)	0,35 (a)	0,53 (a)
12	PBS + IAA + DDM	0,31 (a)	0,45 (a)	0,56 (a)

Tabulka 3

Poř.č.	Období po postřiku/ varianta experimentu	Měření hmotnosti suchých nadzemních částí (mezokotyl + listy)		
		24 h	96 h	168 h
1	PBS	0,021 (a)	0,030 (a)	0,049 (a)
2	PBS + IAA	0,020 (a)	0,028 (a)	0,045 (a)
3	PBS + DMD	0,020 (a)	0,027 (a)	0,049 (a)
4	PBS + IAA + DMD	0,018 (a)	0,027 (a)	0,069 (a)
5	PBS	0,021 (a)	0,031 (a)	0,049 (a)
6	PBS + IAA	0,020 (a)	0,028 (a)	0,045 (a)
7	PBS + TMD	0,023 (a)	0,030 (a)	0,041 (a)
8	PBS + IAA + TMD	0,020 (a)	0,027 (a)	0,047 (a)
9	PBS	0,021 (a)	0,031 (a)	0,049 (a)
10	PBS + IAA	0,020 (a)	0,028 (a)	0,045 (a)
11	PBS + DDM	0,018 (a)	0,029 (a)	0,046 (a)
12	PBS + IAA + DDM	0,025 (a)	0,039 (a)	0,048 (a)

Tabulka 4

Poř.č.	Období po postřiku / varianta experimentu	Koncentrace H ₂ O ₂ v nadzemních částích sazenic (mezokotyl + listy)		
		24 h	96 h	168 h
1	PBS	6,31 (a)	6,38 (b)	6,47 (a)
2	PBS + IAA	6,32 (a)	6,27 (b)	8,02 (b)
3	PBS + DMD	5,82 (a)	5,75 (a)	9,31 (c)
4	PBS + IAA + DMD	7,08 (b)	7,06 (c)	9,46 (c)
5	PBS	6,31 (a)	6,38 (b)	6,47 (a)
6	PBS + IAA	6,32 (a)	6,27 (b)	8,02 (b)
7	PBS + TMD	6,60 (a)	5,76 (a i b)	5,89 (a)
8	PBS + IAA + TMD	6,05 (a)	4,84 (a)	7,47 (b)
9	PBS	6,31 (a)	6,38 (a)	6,47 (a)
10	PBS + IAA	6,32 (a)	6,28 (a)	8,02 (c)
11	PBS + DDM	7,43 (b)	7,15 (b)	7,11 (b)
12	PBS + IAA + DDM	6,90 (b)	7,31 (b)	6,10 (a)

Tabulka 5

5

Poř. č.	Varianta experimentu / označovaný parametr	Č. směsi / kontrolní zkoušky					
		1	2	3	4	5	6
1	délka nadzemních orgánů [cm]	20,88 (a)	19,20 (a)	22,87 (a)	20,88 (a)	19,20 (a)	23,32 (b)
2	hmotnost čerstvých nadzemních orgánů [g]	0,99 (a)	0,88 (a)	1,10 (a)	0,99 (a)	0,88 (a)	1,01 (a)
3	hmotnost vysušených nadzemních orgánů [g]	0,094 (a)	0,072 (a)	0,106 (b)	0,094 (a)	0,072 (a)	0,097 (b)
4	koncentrace H ₂ O ₂ [μmol/g] v čerstvé hmotě	14,61 (b)	8,32 (a)	10,37 (a)	14,61 (b)	8,32 (a)	12,63 (a)
5	F ₀ nulová fluorescence <i>chlorofylu a</i>	2,91 (a)	2,55 (a)	3,06 (a)	2,91 (a)	2,55 (a)	2,69 (a)
6	F _M maximální fluorescence <i>chlorofylu a</i>	0,50 (a)	0,59 (a)	0,48 (a)	0,50 (a)	0,59 (a)	0,60 (a)
7	délka kořenů [cm]	14,75 (a)	15,07 (a)	14,45 (a)	14,75 (a)	15,07 (a)	19,65 (b)
8	hmotnost čerstvých kořenů [g]	0,55 (a)	0,46 (a)	0,62 (a)	0,55 (a)	0,46 (a)	0,69 (b)
9	hmotnost vysušených kořenů [g]	0,025 (a)	0,021 (a)	0,032 (b)	0,025 (a)	0,021 (a)	0,031 (b)

Tabulka 6

Poř. č.	Parametr	Porost kukuřice postříkané směsí č. 6 v poměru k		
		směsí 3	Kontrolní zkoušce 4	Kontrolní zkoušce 5
1	délka nadzemních orgánů [cm]	1,9 %	11,7 %	21,5 %
2	hmotnost čerstvých nadzemních orgánů [g]	-8,1 %	2,0 %	14,8 %
3	hmotnost vysušených nadzemních orgánů [g]	-9,3 %	3,2 %	34,7 %
4	F _M maximální fluorescence <i>chlorofylu a</i>	20,0 %	20,0 %	1,7 %

5	délka kořenů [cm]	26,5 %	33,2 %	30,4 %
6	hmotnost čerstvých kořenů [g]	10,1 %	25,5 %	50,0 %
7	hmotnost vysušených kořenů [g]	-3,2 %	24,0 %	47,6 %

Tabulka 7

Atomová koncentrace [%at.]								
Vzorek	C1s	N1s	O1s	Na1s	Si2p	P2p	S2p	Cl2p
1	75,73	1,37	19,84	0,24	2,07	0,39	0,11	0,24
1i	78,08	1,47	18,87	0,25	0,70	0,28	0,07	0,28
2	81,28	1,37	13,96	0,35	2,28	0,44	0,06	0,26
2i	78,93	1,28	17,17	0,15	1,77	0,46	0,14	0,11
3	75,77	1,45	17,26	0,19	4,28	0,36	0,52	0,17
3i	78,02	1,45	17,25	0,22	2,31	0,48	0,17	0,1
4	75,39	1,4	19,02	0,29	2,89	0,47	0,21	0,32
4i	74,65	1,13	16,84	0,09	6,68	0,3	0,21	0,09
Atomová koncentrace daného chemického prvku / atomová koncentrace dusíku								
Vzorek	C1s /N1s	N1s /N1s	O1s /N1s	Na1s /N1s	Si2p /N1s	P2p /N1s	S2p /N1s	Cl2p /N1s
1	55,28	1,00	14,48	0,18	1,51	0,28	0,08	0,18
1i	53,12	1,00	12,84	0,17	0,48	0,19	0,05	0,19
2	59,33	1,00	10,19	0,26	1,66	0,32	0,04	0,19
2i	61,66	1,00	13,41	0,12	1,38	0,36	0,11	0,09
3	52,26	1,00	11,90	0,13	2,95	0,25	0,36	0,12
3i	53,81	1,00	11,90	0,15	1,59	0,33	0,12	0,07
4	53,85	1,00	13,59	0,21	2,06	0,34	0,15	0,23
4i	66,06	1,00	14,90	0,08	5,91	0,27	0,19	0,08

5 Tabulka 8

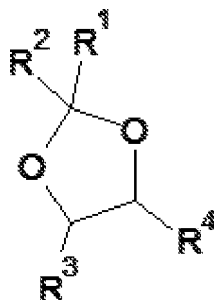
hmotnostní koncentrace [% hmotn.]								
Vzorek	C1s	N1s	O1s	Na1s	Si2p	P2p	S2p	Cl2p
1	68,18	1,44	23,8	0,41	4,36	0,91	0,27	0,64
1i	71,77	1,58	23,11	0,44	1,5	0,67	0,17	0,77
2	74,19	1,46	16,98	0,61	4,88	1,03	0,15	0,71
2i	72,03	1,36	20,88	0,26	3,78	1,08	0,34	0,28
3	66,67	1,49	20,22	0,32	8,81	0,83	1,23	0,44
3i	70,61	1,53	20,79	0,38	4,9	1,12	0,41	0,27
4	67,07	1,45	22,54	0,49	6,02	1,08	0,51	0,83
4i	64,46	1,14	19,37	0,15	13,49	0,68	0,48	0,23
Poměr hmotnostních koncentrací daného chemického prvku v poměru ke koncentraci dusíku								
Vzorek	C1s /N1s	N1s /N1s	O1s /N1s	Na1s /N1s	Si2p /N1s	P2p /N1s	S2p /N1s	Cl2p /N1s
1	47,35	1,00	16,53	0,28	3,03	0,63	0,19	0,44
1i	45,42	1,00	14,63	0,28	0,95	0,42	0,11	0,49
2	50,82	1,00	11,63	0,42	3,34	0,71	0,10	0,49
2i	52,96	1,00	15,35	0,19	2,78	0,79	0,25	0,21
3	44,74	1,00	13,57	0,21	5,91	0,56	0,83	0,30
3i	46,15	1,00	13,59	0,25	3,20	0,73	0,27	0,18
4	46,26	1,00	15,54	0,34	4,15	0,74	0,35	0,57
4i	56,54	1,00	16,99	0,13	11,83	0,60	0,42	0,20

Tabulka 9

Hmotnost listů pocházejících ze 6 rostlin [g]				nárůst hmotnosti rostlin s izotopy [%]
bez izotopů		s izotopy		
1	3,2365	1i	2,8704	-12,75
2	2,9764	2i	2,5345	-17,44
3	2,7523	3i	3,2119	14,31
4	2,8926	4i	3,4913	17,15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Směs zlepšující penetraci biologicky aktivních látek povrchem rostlinných orgánů, **vyznačující se tím**, že připravena ve vodném roztoku nebo stabilizačním pufru s hodnotou pH v rozsahu od 3 do 12, směs obsahuje alespoň jeden nízkomolekulární 1,3-dioxolan obecného vzorce 1:



Vzorec 1

10

ve kterém jednotlivé substituenty R^1 , R^2 , R^3 , R^4 značí nezávisle na sobě atom vodíku (-H), nebo hydroxylová skupina (-OH), nebo hydroxymethylová skupina (-CH₂OH), nebo alkylová skupina (C₁-C₃);

- 15 - alespoň jednu sloučeninu indikující růst rostlin, nebo
 - alespoň jednu anorganickou sůl, nebo
 - alespoň jedno nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID),
 přičemž koncentrace obsahu 1,3-dioxolanu je v rozsahu od 0,00001 do 9,5 % hmotn. vztaženo
 k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji $\leq 1,0$ % hmotn.,
 20 přičemž směs je ve vodě rozpustná, biodegradabilní a netoxická.

25

2. Směs podle nároku 1 se **vyznačuje tím**, že látkou indukující vzrůst rostlin je přírodní auxin, zvolen ze solí: kyseliny indolyl-3-octové, kyseliny indolyl-3-máselné, fenyloctové kyseliny, indolylacetonitrilu, nebo kyseliny 3-indolylpyrohroznové.

30

3. Směs podle nároku 1 se **vyznačuje tím**, že látkou indukující vzrůst rostlin je syntetický regulátor růstu s vlastnostmi podobnými jako mají auxiny, zvolen z následujících kyselin: kyselina 1-naftyloctová, kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová, kyselina 2-methoxy-3,6-dichlorbenzoová, nebo kyselina 4-amino-3,5,6-trichlorpikolinová.

35

4. Směs podle nároku od 1 do 3 se **vyznačuje tím**, že koncentrace látky indukující růst rostlin činí 10^{-10} – 10 mol/l v poměru k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji 10^{-4} mol/l.

40

5. Směs podle nároku 1 se **vyznačuje tím**, že anorganickou solí je dusičnan (V), nebo dusičnan (III), nebo uhličitan (V), nebo siřičitan (IV), nebo síran (VI), nebo fosforitan (III), nebo fosforečnan (V), nebo chlorid (I) následujících chemických prvků: Na, Ca, K, Mg, Mo, B, Fe, Mn, Zn, Cu.

6. Směs podle nároku 1 nebo 5 se **vyznačuje tím**, že koncentrace anorganické soli činí 10^{-10} - 10 mol/l v poměru k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji $8,3 \times 10^{-2}$ mol/l.

7. Směs podle nároku 1 se **vyznačuje tím**, že nesteroidním protizánětlivým léčivem je derivát propionové kyseliny, zejména naproxen nebo ibuprofen, ve formě sodné soli.

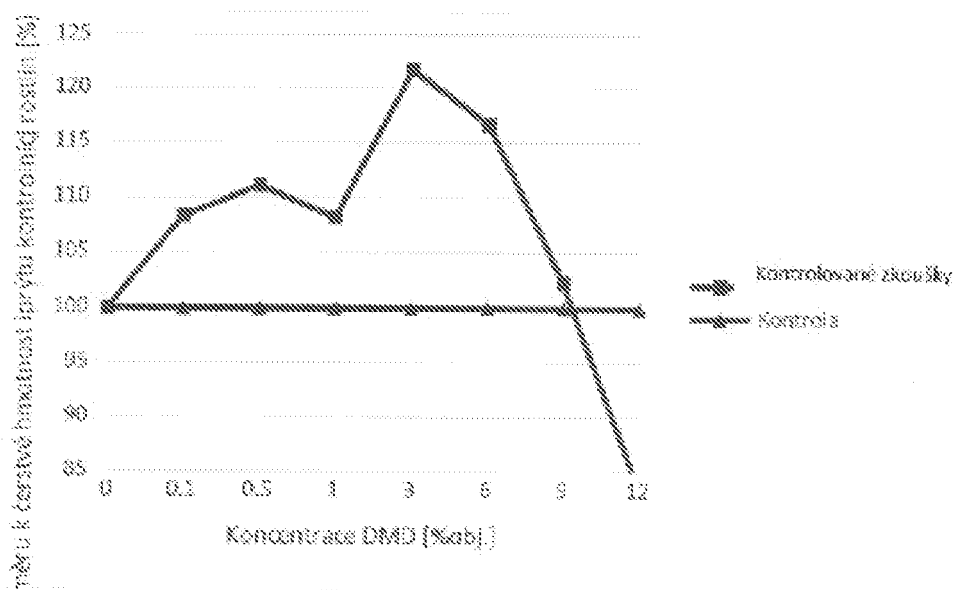
45

8. Směs podle nároku 1 se **vyznačuje tím**, že nesteroidním protizánětlivým léčivem je derivát octové kyseliny, zejména diklofenak, ve formě sodné soli.

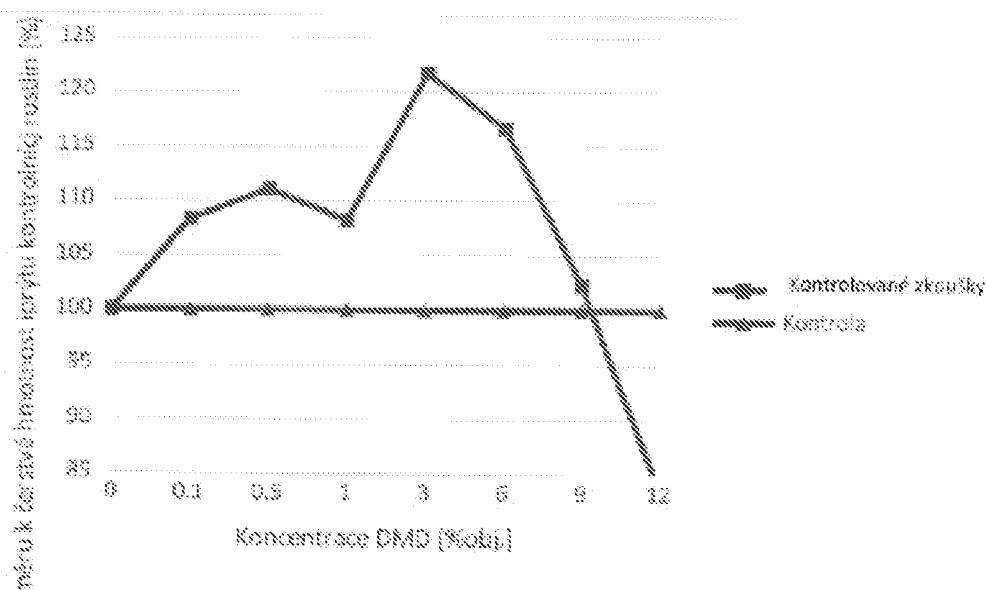
9. Směs podle nároku 1 nebo 7 nebo 8 se **vyznačuje tím**, že koncentrace nesteroidního protizánětlivého léčiva činí 10^{-10} – 10 mol/l v poměru k celkové hmotnosti směsi, nejvýhodněji 10^{-2} mol/l.
- 5 10. Směs podle nároku 1 se vyznačuje tím, že stabilizační pufr s hodnotou pH v rozsahu od 3 do 12 je pufr: borátový, nebo hydrogenfosfátový, nebo amonný, nebo uhličitanový, nebo acetátový, nebo citrátový, nebo laktátový, nebo mravenčanový, nebo butyrátový, nebo malonový, nebo maleinový, nebo bis-tris, nebo ADA, nebo ACES, nebo TRPSO, nebo MOPSO, nebo PIPES, nebo BES, nebo TES, nebo HEPES, nebo DIPSA, nebo TAPSO, nebo TEA, nebo POPSO, nebo
- 10 HEPPSO, nebo TRIS, nebo TAPS, nebo AMPD, nebo PBS, nebo CHES, nebo CAPSO, nebo AMP, nebo CAPS, nebo CABS.
11. Použití směsi definované v nárocích 1 až 10 pro přímé aplikování na nadzemní orgány rostlin, ovlivňuje stimulaci, nebo inhibici vzrůstu a vývoje rostlin.

15

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2