JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**Katedra ekologie**

**Studijní program:** zemědělství

**Studijní obor:** agroekologie

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

# Fenolické látky a alelopatie u druhů rodu *Reynoutria*

**Vedoucí práce:** Ing. Karel Suchý, Ph.D.

**Konzultanti :** RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc.

RNDr. Božena Šerá, Ph.D.

**Autor:** Kateřina Cvrčková

**2006**

**Poděkování:**

Touto cestou si dovoluji poděkovat panu ing. Karlu Suchému za odborné vedení a rady při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantům mé bakalářské práce paní RNDr. Naděždě Vrchotové a paní RNDr. Boženě Šeré za ochotu a vstřícnost při poskytování informací a materiálů potřebných k mé práci a za rady a připomínky, kterých se mi při zpracování této práce dostalo.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „ Fenolické látky a alelopatie u druhů rodu *Reynoutria*“ vypracovala samostatně a s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích **……..**

**OBSAH**

**1 ÚVOD** ..... **1**
**2 LITERÁRNÍ PŘEHLED** ..... **3**
**2.1 Křídlatky** ..... 3
2.1.1 Zástupci rodu křídlatka ..... 3
2.1.2 Původní areál ..... 3
2.1.3 Historie a rozšíření ..... 4
2.1.4 Alelopatické účinky taxonů rodu *Reynoutria* na invadovanou vegetaci ..... 4
2.1.5 Způsoby likvidace křídlatek ..... 4
**2.2 Alelopatie** ..... 5
**2.3 Sekundární metabolismus** ..... 6
2.3.1 Sekundární metabolity ..... 6
2.3.2 Biologicky aktivní sekundární metabolity ..... 7
**2.4 Rostlinné fenolické látky** ..... 8
2.4.1 Chemické vlastnosti fenolických látek ..... 8
2.4.2 Struktura a výskyt fenolických látek ..... 9
2.4.3 Metabolismus fenolických látek ..... 13
2.4.4 Fyziologické účinky fenolických látek ..... 15
2.4.5 Faktory ovlivňující alelopatické účinky biologicky aktivních fenolických látek ..... 15
**2.5 Extrakce, izolace a identifikace fenolických alelochemikálií** ..... 16
**3 METODIKA** ..... **19**
**3.1 Obecný přístup** ..... 19
**3.2 Charakteristika druhů rodu *Reynoutria*** ..... 19
**3.3 Charakteristika testovacího organizmu** ..... 20
**3.4 Sběr a úprava rostlinného materiálu** ..... 22
**3.5 Příprava extraktů** ..... 22
3.5.1 Příprava extraktů ze sušených listů křídlatky japonské ..... 23
3.5.2 Příprava extraktů z čerstvých listů křídlatky japonské ..... 23
3.5.3 Příprava extraktů z podzemních částí křídlatek japonské, sachalinské a české ..... 23
3.5.4 Příprava roztoků standardu kvercetinu ..... 24
**3.6 Testy klíčivosti** ..... 24
**3.7 Přístroje a pomůcky** ..... 25
**3.8 Chemikálie** ..... 25
**3.9 Vyhodnocení naměřených hodnot** ..... 25
3.9.1 Zpracování v programu EXCEL ..... 26
3.9.2 Zpracování v programu STATISTIKA ..... 26
**3.10 Měření na HPLC** ..... 26
**4 VÝSLEDKY A DISKUSE** ..... **27**
**4.1 Testy klíčivosti** ..... 27
**4.2 Chromatogramy** ..... 34
**5 ZÁVĚR** ..... **36**

**6 SEZNAM LITERATURY ..... 37**
**7 PŘÍLOHY ..... 39**

# 1 ÚVOD

Rostlinné invaze nejsou žádným výdobytkem moderní doby. Se zmínkami o nečekaném nálezu výskytu nepůvodních rostlin se setkáme již ve zprávách z cest po jižní Americe, kde se Charles Darwin již v roce 1833 setkal se dvěmi původně kulturními rostlinami ze Středozemí: artyčokem kardovým (*Cynara carduculus*) a ostropestřcem mariánským (*Silibum marianum*). Za historickou kolébku biologických invazí je považováno Středozemí a jejich hnací silou kulturně historické procesy. (PYŠEK a SÁDLO, 2004). Počátky procesu invazí však sahají až do neolitu, doby kdy člověk začal přírodu přetvářet k uspokojení svých vlastních potřeb. Druhy starého světa mají vyšší invazní potenciál než druhy z jiných kontinentů. Získaly jej během vývoje po boku člověka, který je vystavil častým různorodým jevům narušujícím jejich stanoviště a díky pozitivní zpětné vazbě, jež si na tyto jevy vytvořily. Průlomem v oblasti rostlinných invazí pak bylo objevení Ameriky. Následně se otevřela cesta mnohým druhům, protože došlo k prolomení bariéry oddělující biogeografické oblasti.

V současné době jsou biologické invaze právem považovány za jeden z hlavních globálních problémů světa. Mnoho druhů, které se šíří jako invazivní, je schopno v nepůvodním areálu napáchat nevratné škody v ekosystémech. Invaze jsou ilustrativním příkladem dějů, které v dnešní přírodě probíhají, a které ji rychle a zásadně mění. Jsou totiž zároveň motorem krajinných změn i jejich dílčím důsledkem.

 2.5 Extrak*Reynoutria* patří v České republice k nejvíce nebezpečným invazivním rostlinám. Jedná se o karanténní plevele a boj s nimi stojí velké množství času, námahy i peněz. Způsoby likvidace těchto rostlin se zabývá mnoho prací, avšak zatím nebyl upřesněn jednotný a vysoce účinný postup. Tyto rostliny jsou však ve své domovině v oblastech Asie považovány za velmi užitečné „pomocníky“ s možností různorodého využití, například v léčitelství.

Hlavním pilířem úspěšnosti boje s těmito rostlinami je tedy dokonalé prostudování faktorů, které jejich populace v původním areálu udržují na ustáleném počtu bez expanzivního šíření.

Neméně důležité jsou také faktory, jež těmto rostlinám přináší výhody v mezidruhovém konkurenčním boji. U druhů rodu *Reynoutria* je to v prvé řadě velice masivní růst biomasy, ohromná regenerační schopnost oddenků a také alelopatické účinky některých sekundárních metabolitů (především na klíčivost semen okolních rostlin). Rostliny potřebují k životu prostor a alelopatie je tedy jednou ze strategií boje mezi druhy

o tento prostor. Je to typ chemické kompetice, který křídlatky užívají při expanzi na nových stanovištích.

V laboratorních podmínkách byla alelopatie prokázána u celé řady rostlin: ořešák černý (*Juglans nigra*), pajasan žlaznatý (*Ailanthus altissima*), čirok (*Sorghum*), pelyněk pravý (*Artemisia absintium*), smrk obecný (*Picea abies*), trnovník akát (*Robinia pseudoacacia*), pýr plazivý (*Elytrigia repens*). V přírodě jsou však celkové životní podmínky rostlin složitější. Nutno je především zohlednit půdu a půdní procesy, protože např. některé inhibitory růstu mohou být v půdě inaktivovány adsorpcí na půdní koloidy (MÁCHOLÁN, 2003). Alelopatické vztahy mohou být složité, mohou zahrnovat interakci rozdílných chemikálií: fenolické sloučeniny, flavonoidy, terpenoidy, alkaloidy, steroidy, aminokyseliny. Jejich obsah v jednotlivých rostlinných částech může být značně rozdílný. Navíc byla prokázána i genotypová odlišnost v produkci alelochemikálií a jejich odlišná účinnost na různé rostlinné druhy a na různé genotypy téhož druhu.

Rostlinné fenolické sloučeniny jsou jednou z významných skupin sekundárních metabolitů podílejících se podstatnou rolí na alelopatickém působení. Jejich vliv v rámci je sledován především z hlediska inhibičního působení přirozeného růstu. Fakt, že takové látky mohou mít v budoucnu pestré užití, lze dokladovat na příkladu objevení acylpyrinu.

V současné době máme již několik možností užití vhodných biotestů na ověření biologické aktivity fenolických látek, zjištění vlivů půdních a biotických faktorů k pochopení účinků a interakcí fenolických sloučenin v ekosystémech. Máme možnost užití takových technik, jenž nám umožní přesnou identifikaci fenolických látek a poskytnou informace o struktuře těchto látek. Tyto poznatky o fyziologických vlastnostech a účincích těchto látek nám přináší potenciální možnost jejich budoucího využití jako přírodních k životnímu prostředí šetrnějších pesticidů a růstových regulátorů.

Cílem mé práce bylo prokázat biologickou aktivitu vybraných fenolických látek získaných z extraktů z kořenů nebo listů druhů křídlatek (rod *Reynoutria*). Tyto látky pravděpodobně negativně ovlivňují klíčivost semen a růst semenáčků. Alelopatické působení bude prokazováno pomocí testů toxicity se semeny hořčice bílé (*Leucosinapis alba*).

# 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 2.1 Křídlatky

### 2.1.1 Zástupci rodu křídlatka

Mezi asi deset představitelů rodu *Reynoutria* Houtt. (křídlatka, synonima: *Fallopia* sect. *Reynoutria* (Houtt.) Ronse Decraene, *Polygonum* sect. *Pleuropterus* (Turcz.) (Bentham et Hooker)) jsou řazeny námi sledované tři druhy (NORSETI, 2005). Jsou to právě ty, které se nekontrolovatelně šíří mimo svůj původní areál rozšíření. Taxonomické názvosloví je převzato podle KUBÁTA et al. 2002:

- křídlatka japonská (*R. japonica* (Houtt.) Ronse Decr.), která se v Evropě vyskytuje ve dvou varietách a to jako křídlatka japonská pravá (*R. japonica* var. *japonica*) a křídlatka japonská tuhá (*R. japonica* var. *compacta*)
- křídlatka sachalinská (*R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai)
- křídlatka česká (*R.* x *bohemica (*Chrtek et Chrtková)), která je jejich ustáleným křížencem

Díky neustálenému vývoji v poznání biologického materiálu, poznávání nových vztahů mezi příbuznými druhy atd., byl vývoj taxonomického řazení, a tudíž i pojmenování druhu poměrně složitý. V 80. letech minulého století byl pro křídlatky vyčleněn zvláštní rod „křídlatka“ (*Reynoutria*), používaný zejména ve Střední Evropě (ANONYMUS, 2004).

### 2.1.2 Původní areál

Křídlatka japonská (*Reynoutria japonica*) se původně vyskytovala jenom v oblasti východní Ásie (Japonsko, Korea, Čína). Do Evropy byla dovezena roku 1825 jako okrasná a medonosná rostlina. Původní areál výskytu křídlatky sachalinské (*R. sachalinensis*) je Sachalin. Roku 1869 k nám byla dovezena jako ozdobná zahradní rostlina (HAVRÁNEK, 2001). K rozšíření kříženec křídlatky české (*R.* x *bohemica*) v původním areálu není možno říci nic jistého (údaje v literatuře chybí), kromě toho, že se vyskytuje v severním Japonsku. Tedy tam, kde se společně vyskytují oba rodičovské druhy (ANONYMUS, 2004). Ani současné rozšíření tohoto kříženec není ve světě příliš známé, nebývá totiž biology odlišován od svých rodičů. V České republice je tento druh značně rozšířený a pravděpodobně nejinvazivnější ze všech křídlatek (PYŠEK et al., 2001).

### 2.1.3 Historie a rozšíření

Nepůvodní areál zahrnuje většinu Evropy, Severní Ameriku a Nový zéland. V České republice se křídlatky vyskytují v místech osídlení, v blízkostí řek, podél silnic, železnic a v parcích. Obvykle se rostliny vyskytují od nížin až do výšky 700 m nad mořem. Dobře rostou na půdách písčitohlinitých až po oblázkový štěrk (HEJNÝ a SLAVÍK, 1993; VYDROVÁ, 2000).

I přes velikou variabilitu stanovištních a půdních charakteristik, které upřednostňuje křídlatka, je zřejmé, že jako jedna z mála invazivních druhů, vyžaduje pro svůj růst a vývoj dobré zásobení živinami, především pak dusíkem a bazickými kationty. Je tedy možné předpokládat výskyt křídlatky všude tam, kde je pravděpodobnost vyplavování dusičnanů do vod. Z tohoto důvodu lze výskyt křídlatek označit za indikátor eutrofizace. Značná odolnost křídlatek (např. k acidifikaci) umožnuje jejich šíření i v podmínkách kyselých půd, což je dalším faktorem zlepšujícím jejich celkovou kompetiční schopnost (MANDÁK, 2004).

### 2.1.4 Alelopatické účinky taxonů rodu *Reynoutria* na invadovanou vegetaci

MANDÁK (2004) uvádí, že vliv taxonů rodu *Reynoutria* na invadovanou vegetaci byl testován pomocí vlivu výluhu z listů a oddenků křídlatek a simulovaným zástinem listů (zelená folie) na druhy *Urtica dioica* a *Calamagrostis epigejos*. Podle autora výsledky ukazují, že klíčení semen obou sledovaných druhů nebylo inhibováno simulovaným zástinem listů, ale bylo inhibováno výluhy z listů křídlatek.

### 2.1.5 Způsoby likvidace křídlatek

Podle BÍMOVÉ et al. (2001) nejefektivnější způsob likvidace je kombinace zrytí porostu a následného chemického ošetření Roundupem. Zmíněná metoda se dá použít v případě druhů *R. japonica* a *R. sachalinensis*, kdy dojde k úplnému zničení porostu. Bohužel v případě křížence *R.* × *bohemica* nebyla nalezena vhodná metoda likvidace.

V plánech péče o invadovaná území Krkonošského NP uvádí JIŘIŠTĚ (2000) tři základní způsoby likvidace porostů křídlatek:

- mechanické: pokos, vyrýpání oddenku, pálení zbytku
- chemické: aplikace herbicidu Roundup na list
- biologické: není znám tento účinný způsob hubení

Za nejefektivnější způsob revitalizace porostu považuje jednorázový postřik herbicidem Roundup v účinné koncentraci 15%, přičemž termín zásahu záleží především

na poloze stanoviště a průběhu počasí. Jako nejvhodnější postup uvádí postřik biologickým herbicidem Roundup, odstranění zbytku nadzemních a podzemních částí a následné osetí a mulčování ploch místními druhy rostlin (JIŘIŠTĚ, 2000).

Další autor uvádí jako biologickou metodu likvidace možnost spásání ovcemi nebo skotem, jež se ukazuje jako účinná metoda regulace výskytu křídlatky. Pastva se na dané lokalitě musí zahájit včas, aby rostliny nebyly přerostlé a zvířata je přijímala. (MORÁVKOVÁ, 2003).

## 2.2 Alelopatie

Všechny živé rostliny bez vyjímky jsou v úzké dialektické vazbě se svým prostředím biotickým i biotickým. Faktorem, který vzájemné vztahy mezi rostlinami a mezi nimi a prostředím výrazně ovlivňuje, je relativní stálost rostlin v biotopu, jejich upevnění v půdě (LAŠTŮVKA, 1986).

Půda je otevřený dynamický systém, ve kterém probíhá výměna energií a hmoty s prostředím. Je nositelkou rostlinného a živočišného života; ovlivňuje vývoj nejen vegetace, ale všech suchozemských cenoz. Důležitou vlastností půdy je její úrodnost, jež je dána schopností zajišťovat vyšším rostlinám dostatek vody, vzduchu, živin a poskytnout možnost upevnění v půdě (NOVOTNÁ, 2001).

U autotrofních organismů (především fytolithotrofů) jsou velmi důležité právě vazby na toto biotické prostředí. Proces utváření vazeb se neděje *sua sponte,* ale na základě informací, tedy i „ poznání“ parazita či symbionta nebo vzájemného rozpoznání organismů v populaci. Přenos těchto informací se uskutečňuje pomocí specifických chemických sloučenin, které jsou organismem vylučovány do prostředí (nadzemními i podzemními částmi rostlin, pokožkou, exkrementy atd.) (KEJDUS a KUBÁŇ, 1999). Vymezení vztahů a vazeb je v praxi důležité pro tvorbu a ochranu kulturních cenoz, poznání života biocenoz a jejich využití (BURKHOLDER, 1952). Vzájemné vztahy mezi rostlinami a mezi rostlinami a prostředím můžeme rozdělit do tří kategorií – akce, reakce a koakce a obecně je zahrnout pod pojem alelopatie (vzájemné ovlivnění) (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999).

NOVOTNÁ (2001) tento pojem určuje, jako vzájemný vztah mezi organismy ve společenstvu, kdy jeden jedinec vytváří a vylučuje do prostředí toxické látky negativně ovlivňující jedince jiného druhu, popřípadě stejného druhu (autoalelopatie). KUBAYSHI (2004) upřesňuje termín alelopatie, jako produkci speciálních sekundárních metabolitů, kde biomolekuly, produkované rostlinou, se dostávají do jejího nejbližšího prostředí a zde následně ovlivňují růst a rozvoj sousedních rostlin.

Významným rysem alelopatie je tedy přítomnost tzv. alelopatik, jež fungují jako přenašeče informací (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999). Mezi alelopatika zařazujeme obecně všechny látky vesměs sekundárního metabolismu např. blastokoliny, nivotoxiny, fytoalexiny, eleiny, exohormony, koliny, ferohormony, fytoncidy atd. (LAŠTŮVKA, 1986). Alelopatické účinky jsou mimořádně významné pro vzájemné vztahy mezi rostlinnými druhy jak v přirozených ekosystémech, tak v agroekosystémech (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999).

## 2.3 Sekundární metabolismus

### 2.3.1 Sekundární metabolity

Podle ŠEBÁNKA, PROCHÁZKY a LAŠTŮVKY (1989) můžeme sekundární látky definovat jako rostlinné látky, vzniklé či odvozené od sacharidů, bílkovin a tuků, jež byly dříve dosti často považovány za nezpracované zbytky metabolismu, bez zjevné funkce. Avšak podle autorů byla tato hypotéza zcela mylná, neboť mají zcela zjevné místo v obranných mechanismech buňky a rostlin.

Metabolismem (látkovým a energetickým) rozumíme soubor regulovaných biochemických reakcí zajišťující stavební látky a nezbytnou energii pro jejich funkce. Jednotlivé reakce jsou řazeny do reakčních řetězců – do tzv. metabolických drah. Ty mohou sloužit buď k biosyntéze látek (anabolismus), nebo k jejich štěpení (katabolismus). Základní metabolické dráhy, jako je glykolýza, fotosyntéza, pentosový cyklus lze zahrnout pod pojem primární metabolismus. Od něj se pak odvíjí biosyntéza a degradace látek zahrnovaných dnes do sekundárního metabolismu (MÁCHOLÁN, 2003).

Rozdělení metabolitů na primární a sekundární zřejmě pochází od rostlinných fyziologů, kteří tak chtěli odlišit látky vznikající běžně u všech rostlin (bílkoviny, sacharidy, lipidy, chlorofyl) od těch, které lze dokázat jen u nemnoha čeledí nebo druhů, a které nemají obecnější metabolický význam (terpeny, glykosidy, alkaloidy) (MÁCHOLÁN, 2003). Počet známých zástupců je značný (LAŠTŮVKA, 1986). Mají velmi rozmanitou chemickou strukturu, způsoby jejich tvorby byly objasněny až s rozvojem metod využívajících látek značených izotopy $^{14}C$, $^{2}H$, $^{3}H$, $^{18}O$, $^{15}N$, $^{32}P$, $^{35}S$ (MÁCHOLÁN, 2003).

I při obrovské rozmanitosti těchto látek je obdivuhodně málo metabolických cest jejich syntézy (LAŠTŮVKA, 1986).

Metody studia biosyntézy sekundárních metabolitů je obecně možno shrnout do šesti etap:

- isolace metabolitu a určení jeho struktury prostředky organické chemie
- nárys molekulární architektury na základě srovnání struktury podobných látek
- určení prekursoru pomocí isotopicky značených látek
- nástin biogenese – včetně modelových syntéz
- enzymologický výzkum dílčích reakčních kroků metabolických drah
- studium regulace syntézy a odbourávání daného metabolitu

Jedním z cílů experimentálních prací v oblasti sekundárního metabolismu je určení místa v primárním metabolismu z něhož vychází syntéza dané sloučeniny, jde tedy o určení prekursoru – látky od níž se odvíjí příslušná specifická metabolická dráha (MÁCHOLÁN, 1998).

LAŠTŮVKA (1986) uvádí dvě hlavní cesty syntézy sekundárních látek: přes pyruvát a acetát a druhá přes kyselinu šikimovou a aminokyseliny. Existují ovšem i látky vzniklé spojením obou cest, např. flavonoidy.

Mnohé přírodní látky lze řadit do biogenetických skupin charakterizovaných jedním typem prekursoru, jiné však ke svému vzniku vyžadují dva či více prekursorů. Např. flavonoidní pigmenty obsahují dva aromatické cykly, z nichž jeden pochází z kyseliny p-kumarové (metabolit fenylalaninu) a druhé ze tří molekul kyseliny octové (polyketidová syntéza) (MÁCHOLÁN, 1998).

### 2.3.2 Biologicky aktivní sekundární metabolity

WHITTOKER a FLENY (1971) in LAŠTŮVKA (1986) zahrnuli alelopatika pod pojem alelochemikálie a rozdělili je na dvě skupiny, fungující jednak mezi druhy (alelochemický efekt: allomony, kairomony a depresanta), jednak uvnitř druhu (interspecifický chemický efekt: autotoxiny, adaptivní autoinhibitory a feromony).

Existují velmi přesné poznatky o funkci většiny hlavních sekundárních látek, tedy látek nikoli výživné povahy, ve fyziologických reakcích rostlin (LAŠTŮVKA, 1986).

V některých případech však jejich funkce v rostlinách nejsou ještě zcela prozkoumány (VRCHOTOVÁ, ŠERÁ a TŘÍSKA, 2005). Sekundární látky mají úlohu informační nebo jsou fyziologickou součástí procesů obrany a útoku (LAŠTŮVKA, 1986). Bylo zjištěno, že při působení stresových faktorů (např. houbové a virové nákazy, zvýšení UV záření) se v těle zvyšuje obsah některých sekundárních metabolitů. Tyto díky svým fungicidním, antibakteriálním a antioxidačním vlastnostem chrání rostliny před poškozením (VRCHOTOVÁ, ŠERÁ a TŘÍSKA, 2005).

Rostliny se díky neuvěřitelnému mistrovství syntézy těchto látek ve srovnání s živočichy (SCHWARZE, 1958 in LAŠTŮVKA, 1986) mohly adaptovat na nejrůznější trofické či jiné vazby a vytvořit na každý podnět z prostředí odpovídající geneticky determinovanou odpověď.

Zkoumání různých forem biotických vztahů vedlo ke pojmenování každé skupiny alelopatik, fungujících v dané formě (LAŠTŮVKA, 1986).

Tak GRUNER (1955) in LAŠTŮVKA (1986) pro oblast alelopatického ovlivnění mezi vyššími rostlinami navrhuje pro účinné látky termín koliny. Navíc však existují látky, jež jsou funkčně rovnocenné s alelopatiky a jsou zahrnuty pod pojem blastokoliny, tj. látky inhibující klíčení semen (LAŠTŮVKA, 1986). Sem bychom mohli zahrnout látky z rostlin, vylučující alelochemikálie, které v počátečním stádiu vývoje retardují klíčení semen nebo vývoj jiných rostlin ve svém okolí. Tak si pro sebe zabezpečují energii a živiny. Tyto chemické látky jsou produkováný v různých orgánech s různou intenzitou (jak v prostoru, tak čase) a mohou být kumulovány v různých rostlinných částech (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999).

## 2.4 Rostlinné fenolické látky

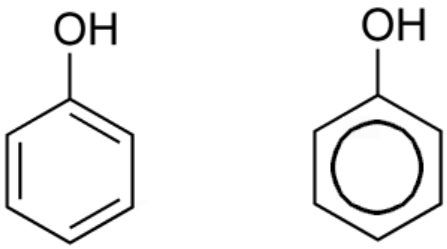
### 2.4.1 Chemické vlastnosti fenolických látek

Tato skupina sloučenin je chemicky značně různorodá a v důsledku toho jsou pestré i vlastnosti a biologické účinky. Fenolické skupiny vnášejí do těchto látek polaritu, která ovlivňuje:

- rozpustnost ve vodě ( v závislosti na poměru počtu těchto skupin k velikosti uhlíkového skeletu)
- tvorbu vodíkových můstků
- slabě kyselý charakter

Fenolické skupiny umožňují vznik esterových a etherových vazeb. Pokud jsou navzájem v polohách *ortho-* či *para-* , snadno se oxidují na chinony (KALAČ, 2001).

Fenoly jsou látky blízce příbuzné s enoly. Mají skupinu *-OH* připojenou přímo na aromatické jádro. Fenolická hydroxylová skupina je vázána na uhlík zapojený do mesomerního aromatického systému. Fenolátový ion má tak k dispozici řadu mesomeriích forem; fenoly jsou proto slabými kyselinami. Nejjednodušším z nich je fenol. Jeho fenolická hydroxylová skupina může tvořit estery a étery (KARLSON, 1981).




Obr. č. 1: Vzorec fenolu (KARLSON, 1981).

### 2.4.2 Struktura a výskyt fenolických látek

Do této skupiny patří látky od jednoduchých derivátů benzenu, kyseliny benzoové a skořicové, přez flavonoidy, anthokyany a kumariny až po látky tak složité, jako jsou třísloviny nebo lignin (PROCHÁZKA, ŠEBÁNEK a kol., 1997).

Třísloviny (taniny, ang. tannins) jsou rostlinné polyfenoly rozpustné ve vodě, mající schopnost srážet bílkoviny (BUCHAR a kol., 1973). Vyznačují se trpkou chutí. Dělí se na třísloviny kondenzované a hydrolyzované a jejich chemická struktura je odlišná. Hydrolyzované třísloviny jsou typické pro duby (kůra, dřevo, duběnky) a řadu léčivých bylin. Patří sem např. kyselina galová. Kondenzované třísloviny se odvozují od základního skeletu flavonu. Substitucí na obou aromatických jádrech vzniká např. katechim, jako monomer, který kondenzuje v složitější sloučeniny. Na každých 100 jednotek relativní molekulové hmotnosti připadají 2 – 3 fenolické skupiny. Kondenzované třísloviny se vyskytují častěji. Jsou součástí mnoha volně rostoucích rostlin, především dvouděložných bylin, některých pícnin, ovoce a zeleniny (KALAČ, 2001).

Ligniny ( z lat. lignum = dřevo) je název pro složité polyfenoly jednotného složení. V nenarušených buněčných stěnách je lignin kovalentně vázán na hemicelulosy (KALAČ, 2001). Je součástí rostlinných vláken, dává jim tuhost a pevnost (REJMAN, 1966). Příbuzné ligninů jsou lignany, jsou to dimery až oligomery přítomny např. jako antioxidanty v květech, semenech, stoncích, listech i kořenech (ANONYMUS, 2001).

Flavonoidy (anthoxanthiny) jsou žluté až oranžové látky květů, listů a plodů převážně dvouděložných rostlin (flavus = žlutý). Příkladem flavonolu s jednou hydroxylovou skupinou vázanou na benzenovém jádře je např. kvercetin .

Anthokyany vznikají biochemickou redukcí flavonoidů; barviva červených, fialových až modrých květů, listů a plodů četných rostlin. Jsou obsaženy v buněčných vakuolách a jsou též vázány na pektiny. Jsou to glykosidy, jejichž aglykony se nazývají anthokyanidiny, jejichž redukcí vznikají katechiny, jež jsou přirozeně obsaženy v čaji, smrkové kůře a dubové kůře(název od keře *Acacia catechu*)**.** Jsou to bezbarvé látky, které

snadno polymerují na hnědé produkty – tzv. kondensované třísloviny. Jsou slabě kancerogenní.

Kumariny se tvoří z o-hydroxiskořicových kyselin přes svoje glukosidy jako meziprodukty (vůně sena). Jsou regulátory klíčení semen (blastokolinový účinek – klíčení nastává až po jejich vyplavení vodou) a jsou známe svým antagonismem k vitaminu K (MÁCHOLÁN, 2003).

Stilbeny mají své místo v ochraně rostlin proti bakteriálním a houbovým patogenům, působí jako inhibitory klíčení (ANONYMUS, 2001) . Např. resveratrol a jeho deriváty patří mezi účinné alelochemikálie (ovlivňuje klíčivost a růst rostlin (VRCHOTOVÁ,ŠERÁ a TŘÍSKA 2005).

K dalším rostlinným fenolům lze zařadit běžné fenolické kyseliny odvozené od:

- benzoové kyseliny (kys. gallová, kys. vanilinová a dal.)
- trans skořicové kyseliny ( fenylpropeny, fenylpropanoidy: kys. p-kumarová, kys. sinapová, kys. kávová a dal.) (KALAČ, 2001).

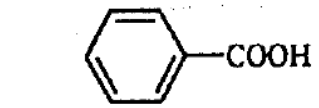
Kyselina benzoová (kys. benzenkarboxylová, $C_6H_5COOH$) je nejjednodušší a současně nejdéle známá arylkarboxylová kyselina. V přírodě je přítomna v živici a černouhelném dehtě. Má silné antiseptické účinky (BUCHAR a kol., 1973). Její deriváty:

Kyselina gallová (kys. 3,4,5-trihydroxybenzoová) (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999) patří mezi nejdéle známe a současně nejrozšířenější rostlinné organické kyseliny. V přírodě se nachází především ve formě esterů a glykosidů. Vyskytuje se i v duběnkách, dubové kůře, v listech čajovníku apod., kde je právě hlavní složkou třísloviny (BUCHAR a kol., 1973).

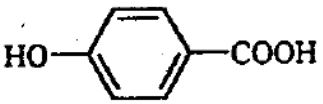
Kyselina vanilová (kys. 3-hydroxy-4-methoxybenzoová) je další biologicky aktivní látkou; derivátem kyseliny benzoové .

Kyselina syringová (kys. 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová)

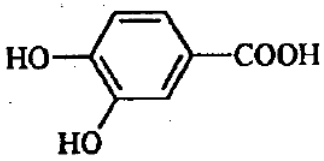
Kyselina protokatechová (kys. 3,4-dihydroxybenzoová) (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999) je poslední zmiňovanou z řady derivátů odvozených od kyseliny benzoové. Deriváty této kyseliny byly identifikovány v rostlinách rodu *Oxalis* a jsou řazeny mezi účinné turgoriny, které jsou schopny zajistit v rámci tigmonastie šíření vzruchu chemickým signálem (SCHILDKNECHT, 1983 in PROCHÁZKA, ŠEBÁNEK a kol., 1997).



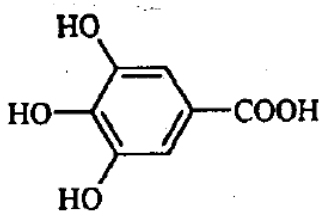

**kyselina benzoová**



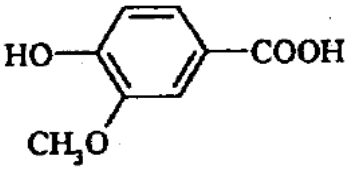

**kyselina 4-hydroxybenzoová**



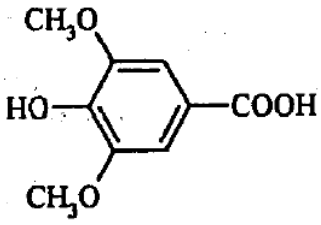

**kyselina protokatechová**




**kyselina gallová**




**kyselina vanilová**




**kyselina syringová**

Obr. č. 2: Deriváty kyseliny benzoové (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1997).

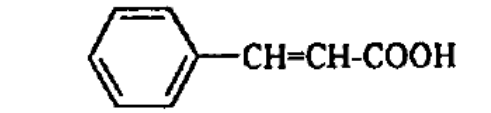
Kyselina skořicová (kys. trans-fenylakrylová , $C_6H_5$-CH=CH-COOH) se nachází v přírodě buď volná, nebo jako ester v některých silicích, především však v silici skořicové, proto se takto nazývá. Tato kyselina i její deriváty jsou pro své vlastnosti hojně užívány ve výrobě parfémů (BUCHAR a kol., 1973). Její deriváty:

Kyselina p-kumarová (kys.4-hydroxyskořicová)

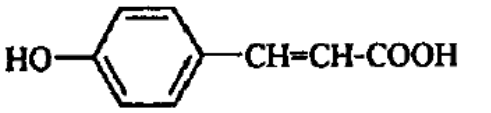
Kyselina kávová (kys. 3,4-dihydroxyskořicová)

Kyselina ferulová (kys. 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicová)

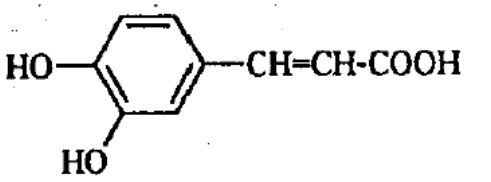
(KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999)



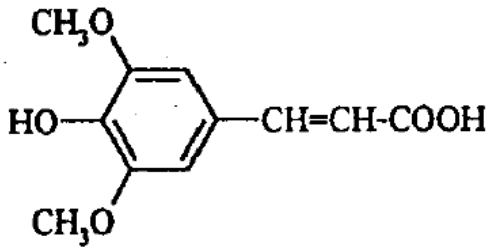

**kyselina skořicová**




**kyselina *p*-kumarová**




**kyselina kávová**




**kyselina felurová**

Obr. č. 3: Deriváty kyseliny skořicové (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1997).

V současné době je známo asi osm tisíc významných rostlinných fenolů (ang. plant phenolics) (KALAČ, 2001).

Fenolický hydroxyl je pro buňky toxický, proto bývá často blokován glykosilací a methylací. Tak lze dospět od skořicové kyseliny k variantám, které mohou být prekursory dalších látek (MÁCHOLÁN, 2003).

Fenolické látky jsou rozšířeny obecně v celé rostlinné říši, vyskytují se často ve značně vysokých koncentracích, většinou uloženy ve vakuolách (KALAČ, 2001). Jejich výskyt je znám obecně v řadě rostlin (meduňka, šalvěj, máta, zemědým) volné i konjugované (např. kyselina rosmarinová je esterem kyseliny kávové a mléčné). Jsou jim připisovány léčivé, hlavně antioxidační účinky, často srovnatelné s vitaminem E. Některé z nich lze řadit do skupiny regulátorů růstu (MÁCHOLÁN, 2003).

Tabulka č. 1: Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách seřazené podle počtu uhlíků (HARMATHA, 2005).

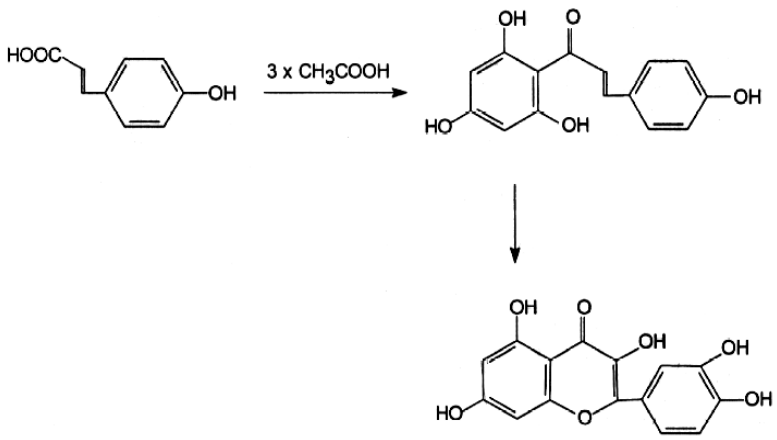
| Složení | Počet uhlíků | Typy fenolických látek | Příklady |
|---|---|---|---|
| $C_6$ | 6 | jednoduché fenoly, benzochinony | katechol, hydrochinon |
| $C_6$-$C_1$ | 7 | fenolické kyseliny / aldehydy | kyselina salycilová |
| $C_6$-$C_2$ | 8 | acetofenony, benzofurany | isobenzofuranon |
| $C_6$-$C_3$ | 9 | fenylpropanoidy, benzopyrany (kumariny) | viz obr. 7, chromen |
| $C_6$-$C_4$ | 10 | naftochinony | juglon, plumbagin |
| $C_6$-$C_5$ | 11 | ageratochromeny (prekoceny) | prekocen I, II |
| $(C_6)_2$ | 12 | dibenzofurany, dibenzochinony, bifenyly | difenyleter, PCB |
| $C_6$-$C_1$-$C_6$ | 13 | dibenzopyrany, benzofenony, xantony | difenylmetan, fluoren |
| $C_6$-$C_2$-$C_6$ | 14 | stilbeny, antrachinony, fenantreny | resveratrol, emodin |
| $C_6$-$C_3$-$C_6$ | 15 | flavonoidy, izoflavony, chalkony, aurony | kvercetin, genistein |
| $C_6$-$C_4$-$C_6$ | 16 | norlignany (difenylbutadieny) | viz obr. 6, hinokiresinol |
| $C_6$-$C_5$-$C_6$ | 17 | norlignany (conioidy) | viz obr. 6, sugiresinol |
| $(C_6$-$C_3)_2$ | 18 | lignany, neolignany | viz obr.1, 5, 8 a 9 |
| $(C_6$-$C_3$-$C_6)_2$ | 30 | biflavonoidy | amentoflavon |
| $(C_6$-$C_3$-$C_6)_n$ | *n* | kondenzované taniny (flavolany) | gallotaniny, ellagitaniny |
| $(C_6$-$C_3)_n$ | *n* | ligniny | viz obr. 7 |
| $(C_6)_n$ | *n* | katecholmelaniny | rostlinné pigmenty |

## 2.4.3 Metabolismus fenolických látek

Lidské tělo nedokáže tvořit látky s benzenovým jádrem, proto jsou např. fenylalanin a tryptofan esenciální. V rostlinách a mikroorganismech se však benzenové jádro může biosynteticky tvořit dvojím způsobem:

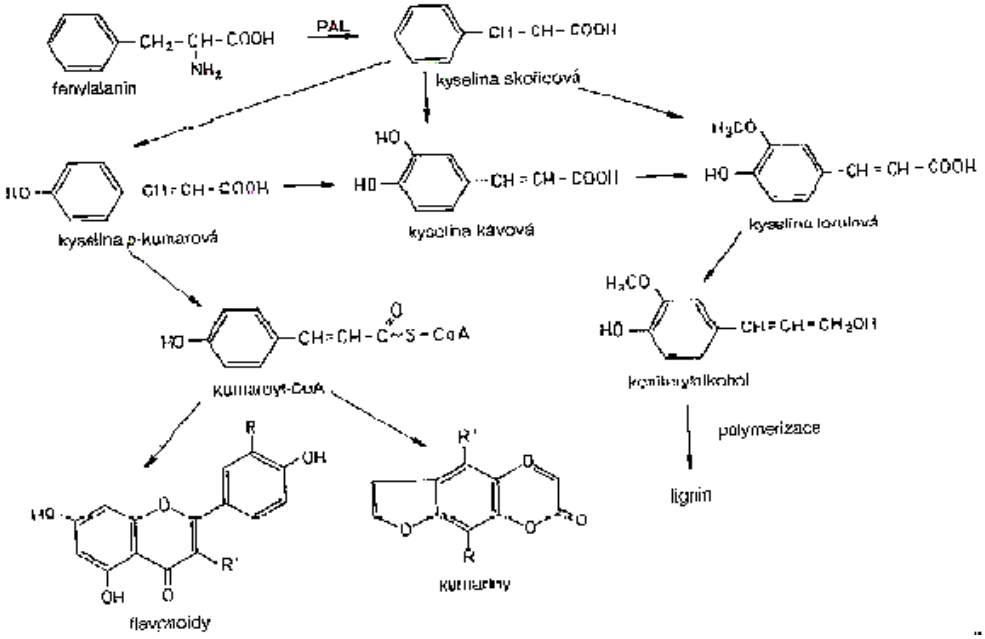
- z cukerných metabolitů dráhou šikimátovou
- lineární kondenzací kyseliny octové (dráhou polyketidovou)
- popřípadě kombinací obou výše uvedených drah

Např. obě možnosti výstavby aromatického jádra se uplatňují společně při tvorbě fenylchromových glykosidů, které tvoří nevelkou skupinu barviv květů, listů a plodů dvouděložných rostlin. Příkladem je biosyntéza žlutého barviva kvercetinu (pův. objeven v kůře dubu – *Quercus*). Postranní aromatické jádro se tvoří šikimátovou cestou přes fenylalanin, kyselinu skořicovou a p-kumarovou, která je startérovou molekulou pro vytvoření triketidu z kyseliny octové. Cyklizací vzniká druhé aromatické jádro intermediálního chalkonu. Uzavřením benzopyronového cyklu a hydroxylacemi dojdeme ke kvercetinu (MÁCHOLÁN, 2003).




Obr. č. 4: Biosyntéza kvercetinu (upraveno dle MÁCHOLÁNA, 2003)

Syntéza fenolických látek vychází z fenylalaninu, který je za katalýzy enzymem fenylalaninamoniaklyázou (PAL) přeměněn na kyselinu skořicovou, do jejíž molekuly se pak zavádějí hydroxylové a metoxylové skupiny (HOHLBROCK a SCHEEL, 1989 in PROCHÁZKA, ŠEBÁNEK a kol., 1997). Tyto látky mohou být polymerizovány na lignin, suberin a třísloviny, ale mohou z nich vzniknout i kumariny, flavonoidy apod. Většina jich je pravděpodobně transportována ve formě glykosidů. Degradace není příliš prostudována – rostlinná pletiva mohou hromadit dosti vysoká množství fenolických látek a není jasné, do jaké míry jsou tyto látky v rostlině degradovány (PROCHÁZKA, ŠEBÁNEK a kol., 1997).




Obr. č. 5: Schéma biosyntézy derivátů kyseliny skořicové, flavonoidů, antokyanů a ligninu (upraveno dle Procházky, Šebánka a kol., 1997).

Obě biosyntetické cesty výstavby aromátů mají svoje společné základní etapy: nejprve se vytváří základní skelet, který je pak následně modifikován event. transformován pomocí několika málo specifických enzymů do konečné podoby často velmi podobných metabolitů tvořících tzv. metabolickou síť (metabolit grid), jež representuje soubor paralerních transformací, katalyzovaných enzymy se širší substrátovou specifikou. Tak lze pomocí 3 až 4 enzymů dospět z jednoho substrátu k velkému počtu produktů (MÁCHOLÁN, 2003).

### 2.4.4 Fyziologické účinky fenolických látek

Rostlinné fenolické sloučeniny mají funkci v obraně rostlin před poškozením, k tomu využívají svých fungicidních, antioxidačních a antibakteriálních vlastností (VRCHOTOVÁ, ŠERÁ a TŘÍSKA, 2005).

Některé fenolické látky, zejména deriváty kyseliny skořicové (p-kumarová, kávová, ferulová) benzoové a některých flavonoidů inhibují přirozený a dlouživý růst indukovaný IAA (kys. idoly-3-octová; auxin), což je rostlinný hormon, stimulující růst rostlin. Tyto účinky se nejčastěji vysvětlují vlivem zmíněných fenolů na peroxidázou katalyzovanou degradaci IAA, která je in vitro stimulována monofenoly a m-difenoly a inhibována *o*- a *p*- difenoly. Jiné vysvětlení je v tom, že deriváty kyseliny skořicové, zejména kyselina felurová, jsou přímým prekurzorem stavebních jednotek ligninu a lignifikace omezuje dlouživý růst (PROCHÁZKA, ŠEBÁNEK a kol., 1997).

Všechny alelochemikálie však v určitém rozmezí koncentrací fyziologicky ovlivňují (stimulují či inhibují) růst a vývin rostlin. Celá řada jich má tedy vliv na klíčení, jiné způsobují depresi transpirace rostlin nebo inhibují fosforylační mechanismus. Jiné depolarizují membránový potenciál buňky, mění strukturu a vlastnosti membrán a tím příjem živin (KLEJDUS A KUBÁŇ, 1999).

Obecně rozšířené fenolické látky mají své místo i v obraně rostlin před mikroorganismy, pro něž jsou zpravidla toxické již ve velmi malých koncentracích ($10^{-4}$ – $10^{-6}$M) (MÁCHOLÁN, 2003).

### 2.4.5 Faktory ovlivňující alelopatické účinky biologicky aktivních fenolických látek

### 2.4.6

Abiotické faktory: nejdůležitějším abiotickým faktorem je podle KLEJDUSE a KUBÁNĚ (1999) půda, jako složitý fyzikální, chemický a biologický systém. Jednotlivé fenolické biologicky aktivní látky vstupují do půdního systému, jsou vystaveny procesům

jako retence, transformace a transport. Na alelopatické působení těchto látek mají vliv rovněž půdní charakteristiky jako vodní režim, obsah živin, teplota, pH a obsah organické hmoty.

Alelopatika se do půdy dostávají buď aktivním vyloučením z kořenů rostlin, či se pasivně uvolňují z rostlinných částí listů, stonků, plodů a semen vymývány deštěm, jako látky ve vodě rozpustné nebo při dekompozici a postupné humifikaci rostlinných zbytků (LAŠTŮVKA, 1986).

Biotické faktory, k nimž patří: např. hustota porostu, růstová stádia, mikrobiální aspekty a stáří rostlin, se významně podílí na aktivitě fenolických sloučenin. Je prokázáno, že koncentrace fenolických sloučenin v půdě je významným faktorem pro růst a diferenciaci rostlin. Pokles fytotoxicity vzrůstá s hustotou porostu (plant denzity), poněvadž při vyšší hustotě přijímá každá rostlina menší množství potencionální alelochemikálie (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999). Je třeba rozlišit, zda má daná látka letální či neletální účinky (LAŠTŮVKA, 1986). Je taktéž důležité, že obsah alelochemikálií se v rostlině mění v různém růstovém stádiu (GALLET a LEBRETON in KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999). Autoři uvádějí, že pouze jedna až tři minoritní fenolické sloučeniny získané ze zeleného listí, byly také nalezeny v hnědém listí. Kyseliny protokatechová a p-kumarová byly zastoupeny v hnědém listí z 20 – 30% z původního obsahu. Některé další z hnědého listí úplně vymizely. Dokonce i metabolity převážně půdních mikroorganismů sehrávají důležitou roli ve fytotoxicitě zbytků rostlinných orgánů (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999).

## 2.5 Extrakce, izolace a identifikace fenolických alelochemikálií

Přírodní organické látky bývají jen zřídka čisté (chemická individua). Zpravidla jsou to jednodušší či složitější směsi, jejichž součásti musíme od sebe oddělovat různými metodami (BUCHAR a kol., 1973).

Většina fenolických sloučenin, identifikovaných jako alelochemikálie, byla extrahována z rostlinného materiálu (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999). Pojem extrakce vysvětluje (REJMAN, 1966) jako vyluhování; převedení látky z jedné fáze do druhé.

Metody extrakce a izolace fenolických látek z rostlinného materiálu jsou založeny převážně na aciditě karboxylových a hydroxylových skupin vázaných na aromatickém jádře (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999).

K oddělování jednotlivých částí látek, je možno obecně užít metody dvojího typů: fyzikální a chemické. Z fyzikálních metod používáme k čištění a izolaci organických

sloučenin např. jednoduché promývání, filtraci, odstřeďování, sublimaci a destilaci. Za velmi jednoduchou, avšak účinnou je považována tzv. chromatografie. Dají se tak dělit i komplikované směsi organických látek na základě jejich různé adsorpce rozličnými, většinou organickými materiály.

Z chemických metod užíváme k čištění některých látek srážení na základě změny pH roztoku nebo na základě tvorby nerozpustných sloučenin. Například některé organické kyseliny a zásady nerozpustné ve vodě tvoří soli ve vodě dobře rozpustné. Roztoky těchto solí se dají čistit filtrací, krystalizací apod. Přidáním kyseliny nebo zásady k roztoku se ze solí uvolní příslušná nerozpustná kyselina nebo zásada, kterou je možno izolovat (BUCHAR a kol., 1973). Izolace je z chemického hlediska pochod, jímž se z dané soustavy látek vylučuje jedna složka (REJMAN, 1966).

U různých matric pevných vzorků, jako jsou půda a rostliny, bývá v první fázi prováděna účinná a rychlá ultrasonifikace, prostá extrakce kapalinou, někdy pouze digesce rozpouštědlem, v němž jsou vzorky dobře rozpustné.

V poslední době se stále více využívá kombinace separačních a obohacovacích technik, které zajišťují prekoncentraci sledovaných analytů a případně i odstranění nežádoucích komponent z analyzovaného materiálu. Pevné místo v této oblasti zaujímá extrakce tuhým sorbetem (Solid Phase Extraction – SPE). Při této technice přečištění a izolace fenolických látek z rostlinného materiálu se užívá SPE kolonek plněných různými sorbenty.

Koncentrace fenolických sloučenin může být stanovena jak chemickou metodou, která využívá redoxní reakce kovové vazby a postupy založené na specifické chemické aktivitě, tak tzv. protein – „binding essay“, která využívá stanovení tanninové kapacity fenolických sloučenin.

Pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin v půdě bývá využito adice fytotoxických látek a srovnání jejich koncentrace v půdě před touto adicí. Autoři poukazují na možnost negativního ovlivnění výsledku extrakce použitím organických rozpouštědel a mletím vzorku pro extrakci. Podle nich může např. dojít k uvolnění takových látek (enzymů, solí atd.), které nemohou být jinak uvolňovány během přirozených podmínek.

Pro separaci fenolických sloučenin z půdy je k dispozici řada metod. Např. pro extrakci volných a reversibilně vázaných fenolických sloučenin je možno užít vodu a EDTA. Další metodou je alkalická hydrolýza s použitím 0,5 % roztoku $Ca(OH)_2$ a 2-M NaOH. Metoda, která se využívá pro určení přítomnosti aktivních fenolických sloučenin v půdě využívá extrakci z neutrálního prostředí s použitím vody a NA2EDTA o pH 7,5

jako chelačního činidla. Správný výběr metody extrakce je důležitý pro získání relevantních výsledků (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999).

Stupně čistoty organické sloučeniny se zjišťují určením specifických fyzikálních konstant, jako je teplota tání, varu, hustota, index lomu apod. Látku je považována považovat za chemicky čistou, jestliže se hodnoty uvedených konstant dalším čištěním nemění (BUCHAR a kol., 1973).

Strategickou roli v alelopatickém výzkumu hraje detekce a identifikace aktivních látek. Mezi orientační techniky patří chromatografie na tenké vrstvě TLC popř. na koloně CC (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999). Papírová a tenkovrstvá chromatografie jsou vhodné zejména pro dělení a předběžnou identifikaci látek; jsou často užívány v kombinaci s biotesty či pro preparativní účely. Chromatografie na tenké vrstvě má výhodu rychlého provedení, ostřejšího oddělení a většího výběru detekčních činidel .Častou nevýhodou při preparativním postupu jsou dosti vysoké ztráty. Detekční limit těchto metod bývá okolo stovek pmol. (PROCHÁZKA, ŠEBÁNEK a kol., 1997).

Pro kvalitativní a kvantitativní stanovení jednotlivých fenolických sloučenin v půdě a rostlinných extraktech či kořenových exudátech jsou s úspěchem používány především chromatografické a elektromigrační metody – HPLC, GC a CE (ve srovnání s plynovou chromatografií je HPLC univerzálnější; lze stanovit i látky netěkavé, (MÁCHOLÁN, 1997), hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetická rezonance (NMR). Je využíváno několika typů sorbentů. Detekce jednotlivých látek se po proběhlé chromatografii provádí např. spektrofotometricky v UV oblasti (220 – 300 nm). Identifikace jednotlivých látek pak spočívá v porovnání retenčních časů s časy standardů, což podle autora vede v mnoha případech k omylům. Výsledky identifikace silně závisí na účinnosti extrakčních techniky a postupu a citlivosti detekce (KLEJDUS a KUBÁŇ, 1999).

# 3 METODIKA

## 3.1 Obecný přístup

Alelopatický účinek biologicky aktivních rostlinných fenolických látek je v přirozeném prostředí závislý na řadě faktorů. K stanovení alelopatického potenciálu v laboratorních podmínkách mohou být použity rozdílné typy laboratorních metod mezi které řadíme např.: testy semichronické toxicity na semenech *Leucosinapis alba*, testy akutní toxicity na referenčních látkách atd. Pro prokázání přítomnosti biologicky aktivních fenolických látek a jejich alelopatického potenciálu v extraktech rostlinných částí rodu *Reynoutria* bylo použito prvnního jmenovaného způsobu a to jednoduchého testu klíčení semen. Testován byl vliv extraktů na klíčení semene, růst hypokotylu (článku naděložního) a růst kořene (klíčku) u klíčících semen hořčice bílé (*Leucosinapis alba*) v počátečních stádiích vývoje.

Prvý test byl prováděn na dvou testovacích organismech, hořčici bílé (*Leucosinapis alba*) a salátu setém jarním (*Lactuca sativa*). Semena salátu však v době odečtu vykazovala nízkou klíčivost a vysokou zaplísněnost a tak bylo od testování na tomto organismu odstoupeno. Zároveň byla také upravena délka kultivace (z původních 78 hodin) na 48 hodin a to z téhož důvodu, neboť se na kulturách 3. den kultivace objevovala plíseň.

Test kontrolou klíčivosti spočívá v kultivaci semen na podložkách nasycených roztoky extraktů ve srovnání se semeny, které rostou na podložce nasycené destilovanou vodou. K těmto účelům je možno použít jednak extrakty připravené z celých rostlin nebo jejich částí nebo přímo izolované chemické sloučeniny nebo jejich směsi. V našem případě bylo užito extraktů ze sušených a živých listů či podzemních částí křídlatek a roztoků standardu kvercetinu.

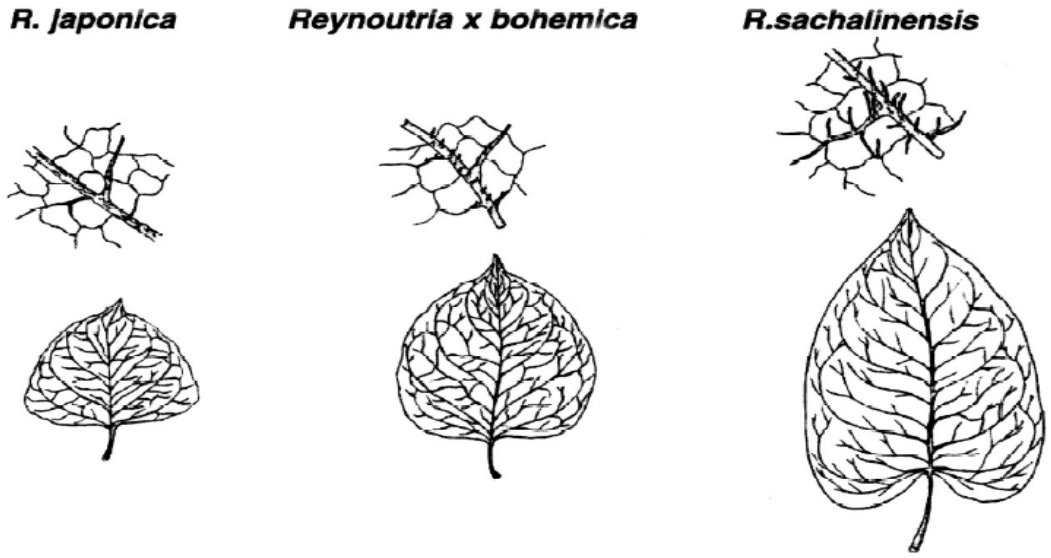
Vybrané extrakty byly analyzovány metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) a tímto způsobem v nich byly identifikovány vybrané biologicky aktivní fenolické látky.

## 3.2 Charakteristika druhů rodu *Reynoutria*

Křídlatka japonská (*R. japonica*) je vytrvalá bylina s dlouhými, silnými a bohatě rozvětvenými podzemními oddenky. Lodyhy jsou přímé, křehké a duté v horní části větvené, často červeně skvrnité. Dorůstají až do výšky 2,5 m. Listy jsou řapíkaté, podlouhle až široce vejčité, čepel listu je široce trojúhelníkovitá. Květy jsou malé, bílé, slabě růžové nebo zelenobílé a vytvářejí květenství, tzv. latu. Kvete od července do září.

Plodem jsou nažky. Křídlatka sachalinská (*Reynoutria sachalinensis*) se od křídlatky japonské liší především mohutnějším vzrůstem a velikostí a tvarem listů. Lodyhy dorůstají do výšky 4 m. Až 30 cm dlouhé listy vyrůstající na krátké stopce mají podlouhle oválný tvar, na bázi jsou mělce srdčité, ke špičce zúžené. Křídlatka česká (*R. x bohemica*) je křížencem křídlatky japonské a sachalinské. Byla popsána ze středních Čech a šíří se rychleji než rodičovské druhy. Jednotlivé rostliny nejsou jednotného vzhledu, ale tvoří řadu přechodných forem (MORÁVKOVÁ, 2006).

Křídlatka sachalinská má mnoho společných znaků s křídlatkou japonskou. Hlavní rozlišení je v listech. Křídlatka sachalinská (Obr.6) má větší listovou čepel, většinou podlouhlého vejčitého tvaru, v dolní části je čepel srdčitá (PYŠEK a MANDÁK, 2001).




Obr. č. 6: Listy druhů rodu *Reynoutria*

## 3.3 Charakteristika testovacího organizmu

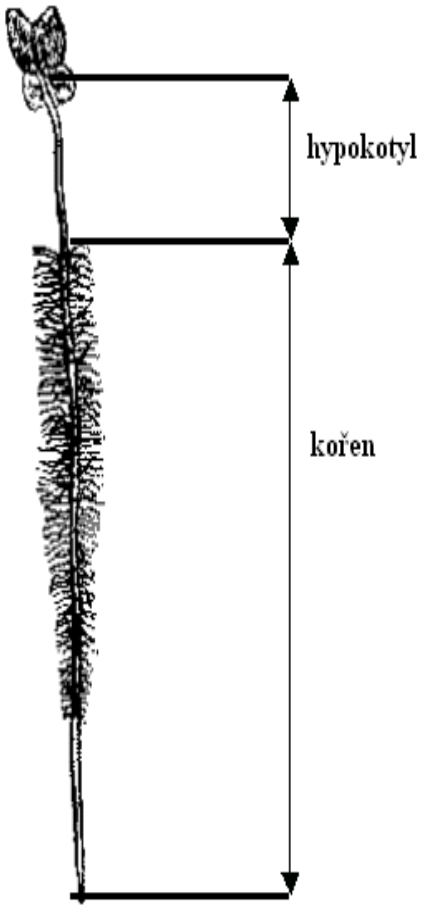
Hořčice bílá, (*Leucosinapis alba* (L.) Spach, synonyma: *Sinapis alba* L.,. B*rassica alba* L.) patří do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Je to jednoletá, časně jarní rostlina, v zemědělství využívaná jako olejnina.

V půdě setrvává tenkým vřetenovitým kořenem. Lodyhu má vzpřímenou, až 150 cm vysokou s listy jasně zelené barvy. Květy jsou oboupohlavné. Při jarním výsevu květiny kvetou v květnu až červenci, při letním lze kvetoucí hořčice vidět až do pozdního podzimu. Plody jsou odstálé, bíle stětinaté šešule. Kvetoucí rostliny jsou opylovány hmyzem, nejčastěji včelami, jimž poskytují pastvu v letním a podzimním období. Pěstuje se především pro semeno. Olej, kterého obsahuje semeno 24 - 32 %, je využíván v potravinářském průmyslu i pro technické účely na výrobu mýdel, ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.

Hořčice pochází z jihovýchodního Středomoří, kde byla pěstována starověkými civilizacemi již 2000 let před naším letopočtem. V Evropě začala být pěstována v ranném středověku. Největší plochy hořčice bílé jsou v Rusku, Indii a Číně.

Semeno rostliny je na brukvovité rostliny poměrně velké, je žluté nebo bělavě žluté kulovitého tvaru. Dosahuje průměru 1,5 – 4 mm, hmotnost tisíce semen HTS se pohybuje od 3 do 6,8 g. Po vyklíčení vyrůstá jednoduchý kořen s hypokotylem (Obr. 7). Později je kulovitý a bohatě větvený. Rostlině se nejlépe daří na středně hlinitých nebo hlinitopísčitých půdách, dobře hnojených, s dostatkem vápníku a s neutrální až mírně alkalickou půdní reakcí (KOČÍ et. al., 2001).

Pro náš experiment byla použita semena hořčice bílé (zlata), což je dle distributora plastická, středně pozdní odrůda vhodná pro všechny oblasti, přinášející vysoký výnos zelené hmoty i semene, odolná proti poléhání. HTS je poměrně vysoká (7,2 – 8g), semena mají okrově žlutou barvu.




Obr. č. 7: Nákres mladé rostlinky hořčice bílé ( dle autora)

## 3.4 Sběr a úprava rostlinného materiálu

Pro jednotlivé testy bylo použito extraktů ze dvou hlavních částí rostlin křídlatek (listů a podzemních částí) s předpokládaným nejvyšším obsahem alelopaticky účinných látek.Rostlinný materiál pro přípravu extraktů byl odebrán na různých lokalitách standardním způsobem.

Podzemní části křídlatky japonské a sachalinské byly odebrány z rostlin rostoucích na lokalitě Slavkov u Českého Krumlova, podzemní orgány křídlatky české byly odebrány z rostlin rostoucích v lokalitě Český Krumlov. Sběr byl prováděn na konci léta 26.8. 2003. Byly odebrány mladší, ještě ne příliš zdřevnatělé části. Čerstvý materiál byl rozemlet na nožovém mlýnku na kusy velikosti asi 1 cm a zmražen. Následně byl lyofilizován (způsob sušení materiálu, kdy se z něj ve vákuu při teplotě -50°C odpařuje voda – přístroj lyofilizátor) a až do doby užití byl uchováván v mrazničce při teplotě -20°C.

Podzemní části křídlatky japonské byly odebrány z čtyřech rostlin přičemž každý vzorek byl sušen a uchováván zvlášť. Pro přípravu extraktů byl vytvořen směsný vzorek, k jehož přípravě bylo smícháno 0,5g sušeného materiálu z každé rostliny. Podzemní části křídlatky sachalinské i české byly odebrány ze tří rostlin a směsný vzorek byl připravován shodným způsobem (opět 0,5 g z každé rostliny), jako tomu bylo u křídlatky japonské.

Listy křídlatky japonské určené na sušení byly sbírány z jedné rostliny na lokalitě Slavkov. Sběr listů se uskutečnil na počátku léta 31.5. 2002, v suchém slunném počasí, v pozdních ranních hodinách (cca. $10^{00}$ hod), kdy na rostlinách již nebyla rosa. Byly sbírány pouze takové listy, které nejevily známky zasychání, okusu či jiného poškození. Tyto listy byly následně sušeny při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Materiál byl rozdrcen na mlýnku a uchováván v plastových či skleněných vzorkovnicích bez přístupu světla až do doby užití.

Čerstvý rostlinný materiál (listy křídlatky japonské) byl odebrán z rostlin rostoucích v areálu AV ČR na Branišovské dne 21.6. 2005 a tento byl ihned použit k extrakci a přípravě vodných živných výluhů.

## 3.5 Příprava extraktů

Pro jednotlivé testy byly připraveny extrakty z listů či oddenků křídlatek popř. roztoky standardu kvercetinu, které byly užívány pro kultivaci semen hořčice.

### 3.5.1 Příprava extraktů ze sušených listů křídlatky japonské

- bylo naváženo 2 g směsného vzorku (viz 2.3. Sběr a úprava rostlinného materiálu) sušených listů křídlatky japonské
- k navážce bylo přilito 40 ml vroucí dest. vody
- směs byla dvě hodiny extrahována za častého protřepávání
- po dvou hodinách byl extrakt přefiltrován přes skleněný filtr, zbytek byl promyt destilovanou vodou a přefiltrován
- byl změřen výsledný objem extraktu (35 ml) a takto připravený extrakt byl použit při kultivaci semen hořčice

### 3.5.2 Příprava extraktů z čerstvých listů křídlatky japonské

- listy byly lehce opláchnuty destilovanou vodou
- následně byly natrhány na menší části (část cca. 10 $cm^2$ ) a přesně zváženy váha činila 18,6 g
- rostlinný materiál byl zalit 400 ml vroucí destilovanou vodou a 10 minut pozvolna vařen
- povařený materiál byl rozmixován mixérem a ponechán 2 hodiny odstát
- následně byl extrakt přefiltrován přes papírový filtr a použit pro kultivaci semen hořčice

### 3.5.3 Příprava extraktů z podzemních částí křídlatek japonské, sachalinské a české

- byly naváženy jednotlivé navážky směsných vzorků (viz 2.3.Sběr a úprava rostlinného materiálu)
- k navážkám byla přilita vroucí destilovaná voda a to takto:
  - křídlatka japonská: 2g vzorku + 35 ml destilované vody
  - křídlatka sachalinská: 1,5g vzorku + 26 ml destilované vody
  - křídlatka česká: 1,5g vzorku + 26 ml destilované vody
- směs byla dvě hodiny extrahována za častého protřepávání
- po dvou hodinách byl extrakt přefiltrován přes skleněný filtr, zbytek byl promyt destilovanou vodou a přefiltrován
- byl změřen výsledný objem extraktu (32 ml k. japonská, 24 ml k. sachalinská a 24 ml k. česká) a takto připravený extrakt byl použit při kultivaci semen hořčice

### 3.5.4 Příprava roztoků standardu kvercetinu

- roztoky kvercetinu byly připraveny ve dvou ředěních o různých koncentracích standardu
- bylo naváženo 4 mg a 40 mg standardu kvercetinu
- jednotlivé navážky byly rozpuštěny v 8 ml metanolu ($CH_3OH$)
- takto připravené roztoky kvercetinu (Q 4mg a Q 40 mg) byli užity k nanášení na filtrační papír v Petriho miskách

## 3.6 Testy klíčivosti

Každý extrakt účinných látek byl testován čtyřmi paralerními stanoveními (na čtyřech Petriho miskách), kontrola byla testována dvěmi paralerními stanoveními (na dvou Petriho miskách).

Do Petriho misek o průměru devět centimetrů byly vloženy tři kusy filtračního papíru (KA4). Na vrstvu filtračního papíru byl rovnoměrně nanesen roztok extraktu či destilované vody (u kontroly) o objemu 6 ml a následně byla do Petriho misky dle šablony rovnoměrně vložena semena hořčice bílé v počtu 30 kusů na misku. Takto nasazená semena byla kultivována po dobu 48 hodin za stálé laboratorní teploty bez přístupu světla.

U testů klíčivosti prováděných s roztoky standardu kvercetinu bylo z důvodu jeho špatné rozpustnosti užito k rozpuštění metanolu. Připravené roztoky byly naneseny na Petriho misky v objemu 2 ml. Následně byly misky umístěny na dobu 30 minut do temna, aby došlo k odpaření metanolu. Po odpaření metanolu byl na filtrační papír v každé misce přidána destilovaná voda o objemu 6 ml. Do misek byla vložena semena a test toxicity dále probíhal za shodných podmínek, jaké uvádím výše. U tohoto experimentu byla navíc kromě standardní kontroly s 6 ml destilované vody zařazena speciální kontrola, ve které bylo užito 2 ml methanolu a po jeho odpaření 6 ml destilované vody. K tomuto bylo přistoupeno, aby byl otestován možný vliv methanolu na výsledek testu. Tento vliv však nebyl prokázán. Testovací podmínky jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Po uplynutí kultivační doby 48 hodin byla u každého semene změřena přesná délka kořene a hypokotylu. Kromě délky obou segmentů bylo sledováno i procento rostlin, které nevyklíčily vůbec. Dále bylo sledováno, zda se na kulturách objevují závažné změny, jako je přítomnost plísní či hniloby. Změřené hodnoty byly zaznamenány do připravených tabulek a zpracovány na počítači v programech EXCEL a STATISTICA.

Tab. č. 2: Souhrn testovacích podmínek

| | |
|---|---|
| **Testovací organismus** | *Sinapis alba* |
| **Barva semen** | Okrově žlutá |
| **Počet semen v jedné Petriho misce** | 30 ks |
| **Sledovaná odezva** | Růst kořene a hypokotylu ve srovnání s kontrolou |
| **Podmínky testu** | Stálá teplota 20 °C, temno |
| **Počet paralerních stanovení** | 4 pro extrakt, 2 pro kontrolu |
| **Objem testované koncentrace** | 6 ml na 1 Petriho misku |
| **Doba expozice** | 48 hodin |
| **Chemikálie:** | Výchozí roztok testovaného extraktu, destilovaná voda, metanol, kvercetin |

## 3.7 Přístroje a pomůcky

Seznam užitých laboratorních pomůcek: kádinky, odměrné válce, skleněné filtry, odměrné baňky, pipety, střičky, filtrační papír (KA4) prům. 90mm, Petriho misky o vnitřním prům. 90 mm.

Seznam užité techniky a přístrojů: předvážky, analytické váhy, mixér, nožový mlýnek, přístroj HPLC.

Přístroj HPLC: pumpa HP1050, DAD detektor Agilent1100, kolona Phenomenex Luna 3n C18(2).

## 3.8 Chemikálie

Seznam užitých chemikálií: destilovaná voda, methanol a acetonitril (LiChrosolv MERCK) , kvercetin (Aldrich), kyselina orthofosforečná.

## 3.9 Vyhodnocení naměřených hodnot

Naměřené hodnoty délek kořenů a hypokotylů byly zpracovávány za použití běžné výpočetní techniky. K vytvoření kvalitních a dostatečně vypovídajících statistických výstupů, tabulek a obrázků (grafů) byly užity dva standardní softwerové programy EXCEL a STATISTICA.

### 3.9.1 Zpracování v programu EXCEL

Při zapisování a následném zpracování dat bylo vycházeno ze základní pracovní tabulky (Tab. 3). Jednotlivá paralelní měření (2 pro kontrolu, 4 pro vzorek) byla sloučena a byla vypočtena jejich průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Z těchto hodnot byl vytvořen sloupcový graf, který názorně zobrazuje rozdíl délek kořenů a hypokotylů mezi kontrolou a testovaným extraktem. K tomuto grafu byla vytvořena chybová úsečka dle vypočtených SMODCH (směrodatných odchylek). Pro účely slovního zhodnocení bylo dále v programu EXCEL vypočteno procento semen, které nevyklíčily vůbec.

### 3.9.2 Zpracování v programu STATISTIKA

V tomto programu byly počítány základní statistické parametry měřených hodnot (průměr, medián, standardní odchylka, standardní chyba a variance). Bylo zjištěno, že rozložení naměřených hodnot je bližší normálnímu rozložení než jaké je u těchto dat po jejich logaritmování. Proto nebyla před statistickým hodnocením žádná data logaritmicky transformována.

Pro zjištění signifikantní odlišnosti mezi různými úrovněmi jednotlivých měření a kontrolou byl použit balík Basic Statiscic and Tables a statistické zhodnocení bylo prováděno těmito testy: t-test pro závislé soubory, jednocestná ANOVA a Tukey HSD test, a to na hladině významnosti $\alpha<0.05$ (STATISTICA 1999). Grafické výstupy nebyly v tomto programu generovány.

## 3.10 Měření na HPLC

Analýza vybraných extraktů užívaných ke kultivaci semen byla prováděna na HPLC. Podmínky analýzy: mobilní fáze A (5% acetonitril + 0,1% kyseliny fosforečné + $H_2O$), mobilní fáze B (80% acetonitril + 0,1% kyseliny fosforečné + $H_2O$). Gradient: 2% B – 50% B … 55. min; 50% B – 90% B … 65. min. Průtok 0,25 $ml.min^{-1}$.

Záznam byl prováděn v celém rozahu spektra – 190 až 600nm. Chromatogramy jsou uvedeny při 220 nm a 315 nm.

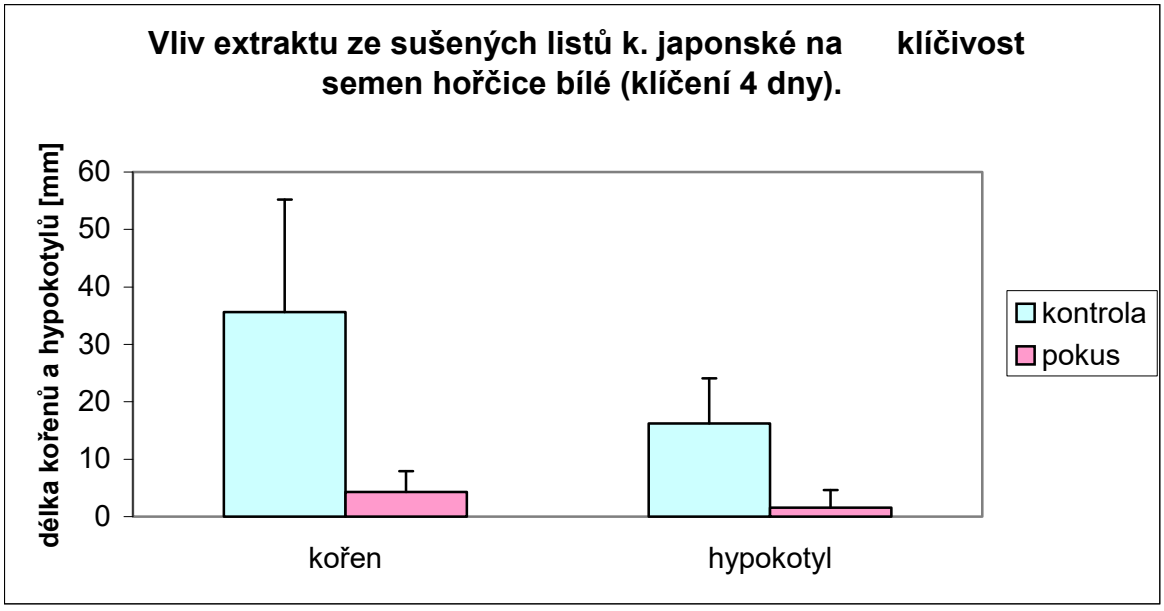
Vyhodnocení probíhalo pomocí standardů čistých látek, jako např. epikatechin, resveratrol, piceid.

# 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

## 4.1 Testy klíčivosti

Obrázek č. 8 zobrazuje rozdíly hodnot délek kořenů a hypokotylů u testu klíčivosti semen při jejich kultivaci extraktem ze sušeného listu křídlatky japonské. Doba kultivace u tohoto testu byla 96 hodin. Jelikož se však u tohoto testu objevila třetí den na kulturách plíseň, byla doba kultivace u následných testů zkrácena na 48 hodin. Klíčivost semen v kontrole byla 100 %. Klíčivost semen v pokusu s extraktem křídlatky japonské byla 71%. Z obrázku je patrný značný rozdíl v délkách obou měřených částí na klíčících semenech. Byl prokázán značný alelopatický potenciál u extraktů ze sušených listů křídlatky japonské a to jak na délku hypokotylu, tak i kořene (t-test, $P<0.05$). Obdobné signifikantní rozdíly byly zaznamenány i u dalších měření (viz Obr. 9-12).

Konstatováním alelopatického potenciálu rostlin rodu *Reynoutria* byly potvrzeny výsledky, které uvádí MANDÁK (2004) při polním pokusu s extrakty z křídlatek (viz. 2.1.4 Alelopatické účinky taxonů rodu *Reynoutria* na invadovanou vegetaci).

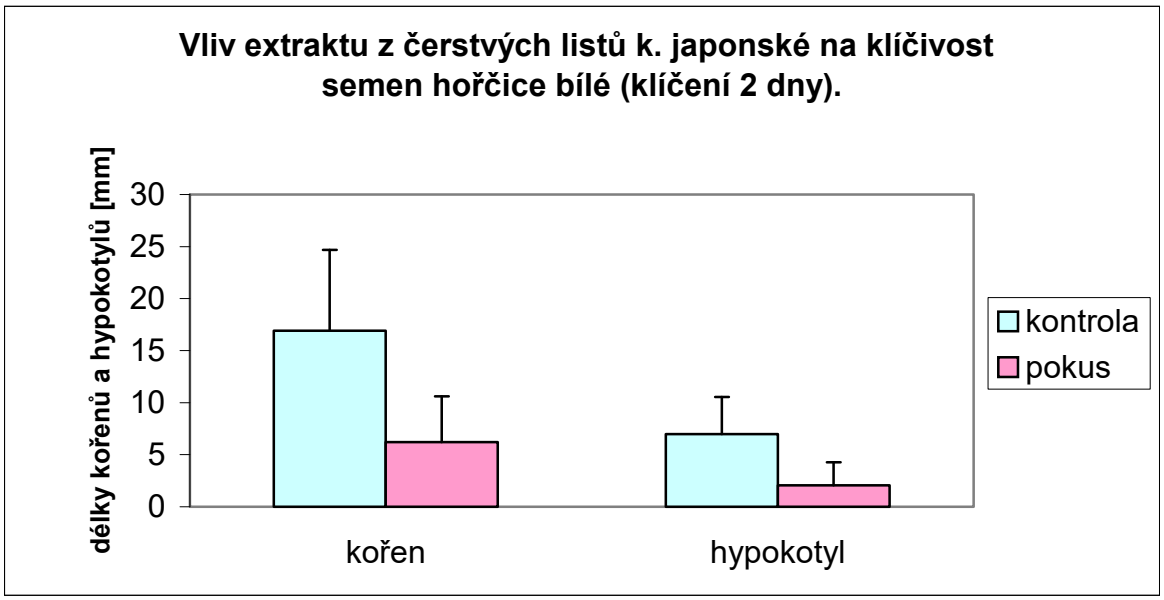



Obr. č. 8: Graf vlivu extraktu ze suchých listů křídlatky japonské v porovnání s kontrolou.

Na obrázku číslo 9 jsou zobrazeny rozdíly hodnot délek měřených částí semen u testu s extrakty z čerstvých listů křídlatky japonské. Kultivační doba byla již 48 hodin. Klíčivost semen v kontrole byla 100%. Klíčivost semen v testu byla 87,5%. Podle jednotlivých hodnot klíčivostí bylo možno u testu se sušenými a čerstvými listy (po přepočtení na stejné odpovídající koncentrace) křídlatky japonské určit, že alelopatický potenciál, neboli inhibiční aktivita biologicky účinných sekundárních metabolitů na růst

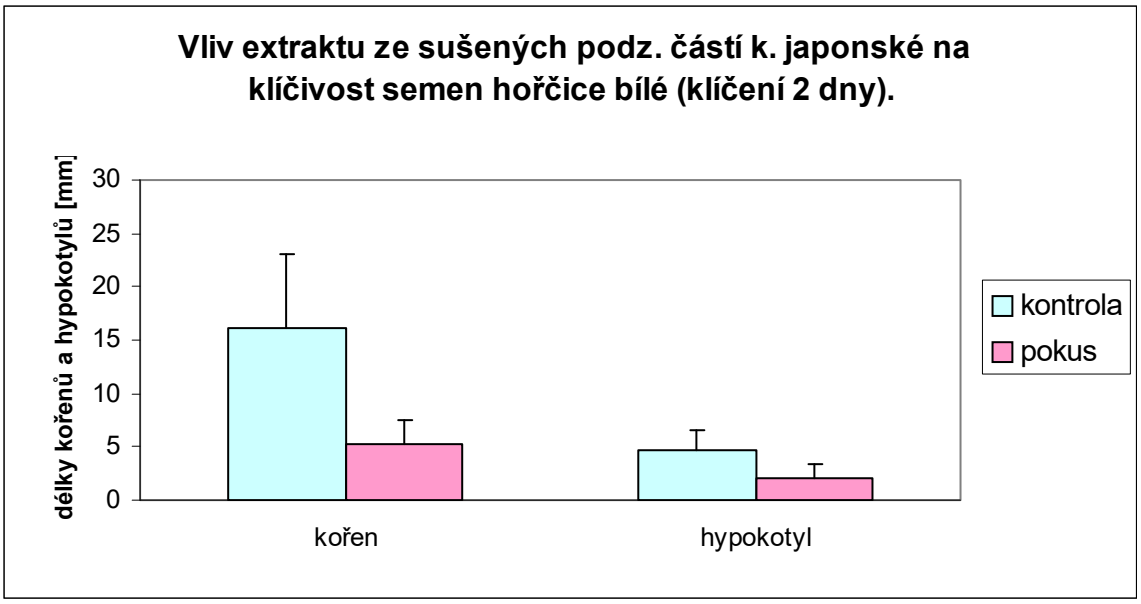
a klíčení semen, je vyšší u extraktů ze suchého materiálu oproti materiálu z čerstvých rostlin.

Je zajímavé, že byl zjištěn tento signifikantní rozdíl mezi vlivem zálivky ze suchých a čerstvých listů, mezi sušenými listy a sušenými kořeny, přičemž ale nebyl potvrzen rozdíl mezi živými listy a zálivkou z kořenů (one way ANOVA, Tukey HSD test, $P<0.05$). Tedy alelopatický vliv zálivky z čerstvých listů a kořenů měl obdobný vliv. Vliv extraktu ze sušených listů byl výrazně vyšší a to jak na hypokotyl tak i kořen klíčících semen.



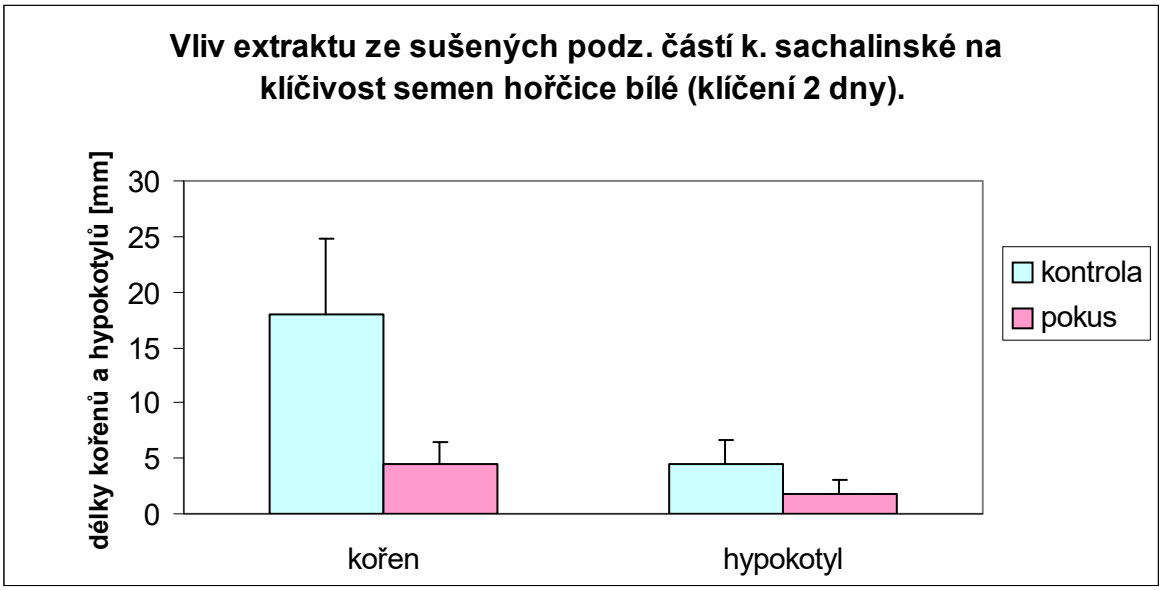

Obr. č. 9: Graf vlivu extraktu z čerstvých listů křídlatky japonské v porovnání s kontrolou.

Obrázek 10 zobrazuje graf vytvořený z naměřených hodnot délek podzemních částí semen u testu s extrakty ze sušených podzemních částí křídlatky japonské. Klíčivost semen v kontrole byla 100%. Klíčivost semen v pokusu 96,6 %. Klíčivost je tedy podstatně vyšší, než tomu bylo u předchozích testů ( obr. 8, 9) s extrakty z listů křídlatky japonské. Tento výsledek potvrzuje, že z hlediska alelopatického působení v přirozeném prostředí jsou listy pravděpodobně důležitějším faktorem než oddenky. Listy každoročně na podzim padají na povrch půdy, zde se rozkládají a dochází tak k rychlému a účinnému uvolňování aktivních látek. Jak již bylo uvedeno výše, i u tohoto testu byl statisticky prokázán značný elelopatický potenciál extraktu, který lze vyčíst i z přiloženého obrázku.



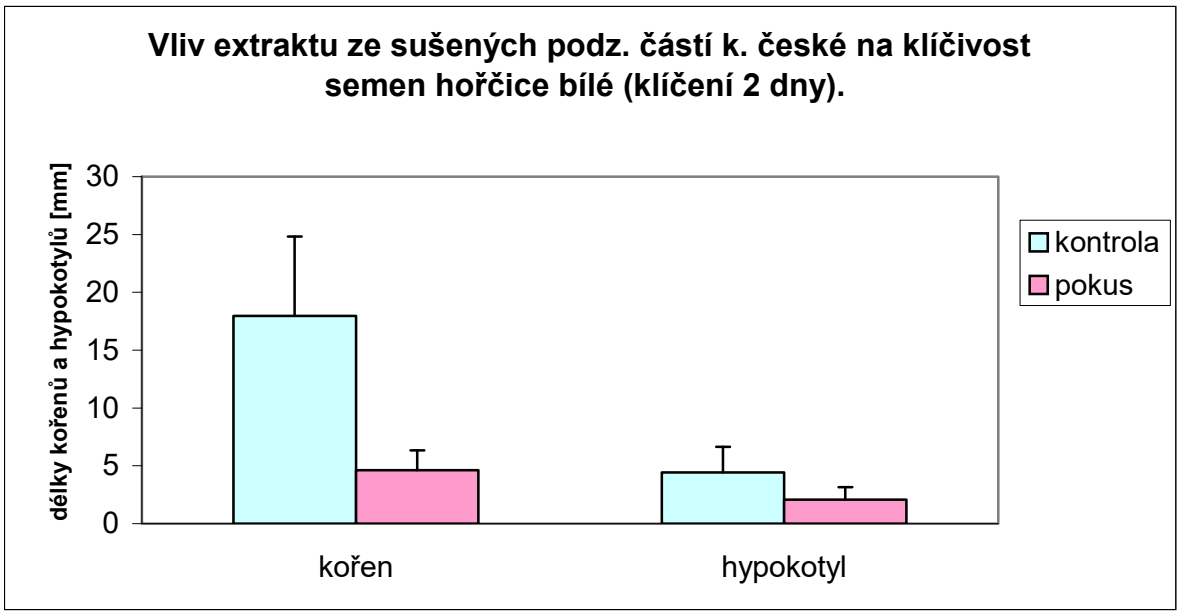

Obr. č. 10: Graf vlivu extraktu z oddenků křídlatky japonské v porovnání s kontrolou.

Na obrázku č. 11 je znázorněn graf zobrazující rozdíly hodnot délek podzemních částí semen u testu s extrakty ze sušených podzemních částí křídlatky sachalinské. Klíčivost semen v kontrole byla při tomto testu 95 %, přičemž se v miskách neobjevily žádné známky zaplesnivění či hniloby. Snížená klíčivost byla patrně způsobena stárnutím semen. Klíčivost semen v pokusu byla prakticky shodná s klíčivostí semen kontroly 95,5%. I u podzemních částí křídlatky sachalinské, stejně jako u k. japonské, se potvrdil předpoklad, že vliv extraktů na celkovou klíčivost semen hořčice je nižší ve srovnání s extrakty z listů.




Obr. č. 11: Graf vlivu extraktu z oddenků křídlatky sachalinské v porovnání s kontrolou.

Obrázek č. 12 zobrazuje rozdíly hodnot délek podzemních částí semen u testu s extrakty ze sušených podzemních částí křídlatky české. Klíčivost semen v kontrole byla při tomto testu 95 %, přičemž se ani v tomto případě v miskách neobjevily žádné známky zaplesnivění či hniloby. Klíčivost semen v pokusu byla 90,8 %. Je zde patrný rozdíl oproti křídlatce sachalinské. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben odlišným obsahem jednotlivých alelopaticky účinných látek u jednotlivých druhů rodu *Reynoutria*. Na fakt, že mezi druhy křídlatek je značný rozdíl nejen v habitatu, ale i v obsahu fenolických látek v podzemních orgánech upozorňuje práce VRCHOTOVÉ a kol. (2005). Autoři zjistili, že obsah resveratrolu a jeho derivátů je v křídlatce japonské až 70x větší než v křídlatce sachalinské. Podle nich je značný rozdíl i v obsahu dalších sledovaných látek např. resveratrolu a jeho derivátů, katechinu a epikatechinu. Obecně uvádějí, že v podzemních částech k. japonské převládaly stilbeny (resveratrol a jeho deriváty), zatímco u křídlatky sachalinské byly dominantní katechiny.




Obr. č. 12: Graf vlivu extraktu z oddenků křídlatky české v porovnání s kontrolou.

Obrázek 13 zobrazuje rozdíly hodnot délek sledovaných částí semen u testů s roztoky standardu kvercetinu o dvou různých koncentracích (značeno Q 4 – to je 1 mg na jednu Petriho misku; Q 40 – to je 10 mg na jednu misku; čtyři opakování a čistá kontrola). U tohoto pokusu byla zařazena navíc druhá kontrola a to s methanolem (značená M., viz Metodika). Celková klíčivost čisté kontroly byla 96,7 %, klíčivost kontroly s metanolem 97,8 %, klíčivost roztoku se 4 mg kvercetinu (Q4mg) 98,3 % a klíčivost roztoku se 40 mg kvercetinu (Q40mg) byla 99,3 %. Tedy při vyšších koncentracích kvercetinu byla zaznamenána vyšší klíčivost než u čisté kontroly (o 2,6%).

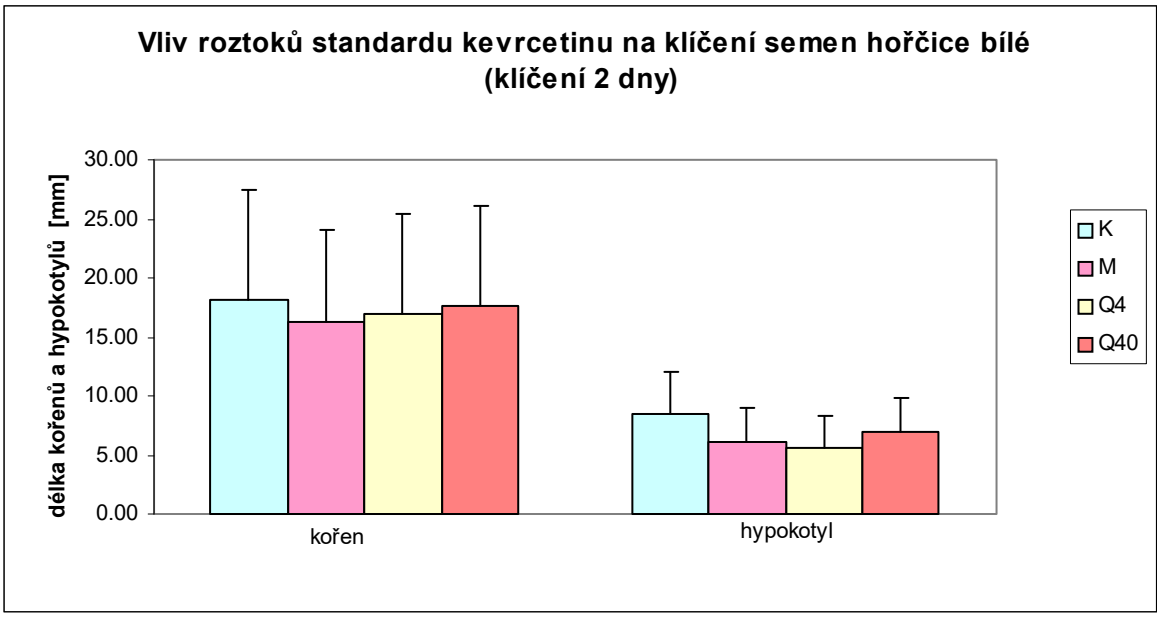
Při pokusu byl prokázán výrazný vliv obou testovaných koncentrací kvercetinu na růst hypokotylů semen hořčice. Byl potvrzen rozdíl v délkách hypokotylů (nikoli kořenů) semenáčků mezi kontrolami a pokusnými testy s kvercetinem (t-test, detailnější výsledky viz Tabulka č. 4). Při inhibičním působení na klíčení semen pravděpodobně dochází k tomu, že rostliny spíše „obětují“ hypokotyl (záruku nadzemní lodyhy a listů), než kořeny, které nutně potřebují k získávání živin a vláhy z půdy. Tedy obětují budoucnost ve prospěch nutné přítomnosti. Je pravděpodobné, že při vyšších koncentracích (než jaké byly v pokusu použité) by došlo k alelopatickému působení i na kořeny.

Dále bylo zjištěn signifikantní rozdíl u hypokotylů mezi čistou kontrolou a kontrolou metanolem, ale mezi kontrolou metanolem a kvercetinem rozdíl zaznamenán nebyl (Tabulka č.4). Metanol má tedy částečný vliv na růst hypokotylu.

Obě výše zmíněné problematiky budou podrobněji řešeny v budoucích pokusech (magisterská práce).

Kvercetin má tedy vliv na klíčení a růst podzemních orgánů semenáčků. V naší práci jsem však testovala pouze dvě koncentrace kvercetinu. Jak uvádí KUBÁŇ a KLEJDUS (1999) je alelopatický efekt biologicky aktivních fenolických látek závislý nejen na typu přítomné alelochemikálie, ale i na její koncentraci v rostlině, neboť některé látky mohou za různých koncentrací vykazovat protichůdné účinky. Látky mohou při určitých koncentracích inhibovat a při jiných stimulovat růst. Z tohoto důvodu je studium alelopatických účinků značně složité.

Měla bych otestovat větší škálu koncentrací, abych mohla učinit širší závěry. Otestování většího spektra koncentrací bude proto náplní navazující magisterské práce.




Obr. č. 13: Graf vlivů roztoků kvercetinu (Q4 a Q40) na délky kořenů a hypokotylů ve srovnání s kontrolami (K a M).

Tab. č. 3: Výsledky T-testu pro pokus s kvercetinem ( p < 0,050)

| Kořen | | | hypokotyl | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **K** | **K** | | **K** | **K** | |
| **M** | 0,317 | **M** | **M** | 0,000 | **M** |
| **KQ4** | 0,366 | 0,951 | **HQ4** | 0,000 | 0,639 |
| **KQ40** | 0,322 | 0,989 | **HQ40** | 0,002 | 0,443 |

Vysvětlivky k Tab. č. 3: K – kontrola, M – kontrola s metanolem, KQ4 – kořen Q4, KQ40 – kořen Q40, HQ4 – hypokotyl Q4, HQ40 – hypokotyl Q40

Tabulka č. 4 uvádí základní statistické hodnoty naměřené v jednotlivých pokusech. Důležitý je zde především průměr, standardní odchylka a medián. Hodnoty uvedené pod RSRK a RSRP (viz.vysvětlivky) nebyly dále zpracovávány, i když se jedná o významný faktor sledovaný především v produkční ekologii. Zpracování a vyhodnocení hodnot těchto proměnných bude předmětem další práce (magisterská práce).

Tab. č. 4: Základní statistické hodnoty naměřené v pokusu

| **Statistické hodnoty naměřené v pokusech s extrakty** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **KK** | **KK** | **KK** | **KK** | **KK** |
| | | **Means** | **N** | **Std.Dev.** | **Variance** | **Median** |
| **RJ** | **LS** | 35 | 60 | 20 | 399 | 33 |
| **RJ** | **LC** | 17 | 60 | 8 | 59 | 17 |
| **RJ** | **KS** | 16 | 60 | 7 | 47 | 17 |
| **RS** | **LS** | | 0 | | | |
| **RS** | **LC** | | 0 | | | |
| **RS** | **KS** | 17 | 60 | 8 | 61 | 20 |
| **RB** | **LS** | | 0 | | | |
| **RB** | **LC** | | 0 | | | |
| **RB** | **KS** | 17 | 60 | 8 | 61 | 20 |
| **All Groups** | | 20 | 300 | 13 | 178 | 20 |
| | | | | | | |
| | | **KH** | **KH** | **KH** | **KH** | **KH** |
| | | **Means** | **N** | **Std.Dev.** | **Variance** | **Median** |
| **RJ** | **LS** | 16 | 60 | 8 | 66 | 17 |
| **RJ** | **LC** | 7 | 60 | 4 | 12 | 7 |
| **RJ** | **KS** | 5 | 60 | 2 | 4 | 5 |
| **RS** | **LS** | | 0 | | | |
| **RS** | **LC** | | 0 | | | |
| **RS** | **KS** | 4 | 60 | 2 | 6 | 4 |
| **RB** | **LS** | | 0 | | | |
| **RB** | **LC** | | 0 | | | |
| **RB** | **KS** | 4 | 60 | 2 | 6 | 4 |
| **All Groups** | | 7 | 300 | 6 | 39 | 6 |

| | | **PK** | **PK** | **PK** | **PK** | **PK** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Means** | **N** | **Std.Dev.** | **Variance** | **Median** |
| **RJ** | **LS** | 3 | 120 | 4 | 13 | 2 |
| **RJ** | **LC** | 5 | 120 | 4 | 19 | 5 |
| **RJ** | **KS** | 5 | 120 | 2 | 6 | 5 |
| **RS** | **LS** | | 0 | | | |
| **RS** | **LC** | | 0 | | | |
| **RS** | **KS** | 4 | 90 | 2 | 5 | 4 |
| **RB** | **LS** | | 0 | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **RB LC** | | 0 | | | |
| **RB KS** | 4 | 120 | 2 | 4 | 4 |
| **All Groups** | 4 | 570 | 3 | 10 | 4 |

| | PH | PH | PH | PH | PH |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Means** | **N** | **Std.Dev.** | **Variance** | **Median** |
| **RJ LS** | 1 | 120 | 3 | 7 | 0 |
| **RJ LC** | 2 | 120 | 2 | 5 | 1 |
| **RJ KS** | 2 | 120 | 1 | 2 | 2 |
| **RS LS** | | 0 | | | |
| **RS LC** | | 0 | | | |
| **RS KS** | 2 | 90 | 1 | 2 | 2 |
| **RB LS** | | 0 | | | |
| **RB LC** | | 0 | | | |
| **RB KS** | 2 | 120 | 1 | 1 | 2 |
| **All Groups** | 2 | 570 | 2 | 4 | 1 |

| | RSRK | RSRK | RSRK | RSRK | RSRK |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Means** | **N** | **Std.Dev.** | **Variance** | **Median** |
| **RJ LS** | 3 | 59 | 2 | 2 | 2 |
| **RJ LC** | 302 | 60 | 1305 | 1703605 | 2 |
| **RJ KS** | 137 | 60 | 649 | 421696 | 3 |
| **RS LS** | | 0 | | | |
| **RS LC** | | 0 | | | |
| **RS KS** | 548 | 57 | 2970 | 8819233 | 4 |
| **RB LS** | | 0 | | | |
| **RB LC** | | 0 | | | |
| **RB KS** | 548 | 57 | 2970 | 8819233 | 4 |
| **All Groups** | 304 | 293 | 1965 | 3859527 | 3 |

| | RSRP | RSRP | RSRP | RSRP | RSRP |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Means** | **N** | **Std.Dev.** | **Variance** | **Median** |
| **RJ LS** | 1896 | 86 | 1976 | 3904453 | 2000 |
| **RJ LC** | 1126 | 105 | 1701 | 2894035 | 4 |
| **RJ KS** | 98 | 116 | 510 | 259981 | 3 |
| **RS LS** | | 0 | | | |
| **RS LC** | | 0 | | | |
| **RS KS** | 177 | 86 | 689 | 474169 | 3 |
| **RB LS** | | 0 | | | |
| **RB LC** | | 0 | | | |
| **RB KS** | 122 | 109 | 588 | 346177 | 2 |
| **All Groups** | 640 | 502 | 1401 | 1961475 | 3 |

| **Statistické hodnoty naměřené v pokusu s kvercetinem** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Means** | **Valid N** | **Std.Dev.** | **Variance** | **Median** |
| **KK** | 17 | 60 | 10 | 101 | 21 |
| **KM** | 16 | 60 | 8 | 69 | 18 |
| **KG4** | 17 | 120 | 9 | 74 | 19 |
| **KG40** | 18 | 120 | 9 | 74 | 19 |
| **KE4** | 18 | 120 | 8 | 63 | 19 |
| **HK** | 8 | 60 | 4 | 16 | 8 |
| **HM** | 6 | 60 | 3 | 10 | 5 |
| **HG4** | 6 | 120 | 3 | 8 | 6 |
| **HG40** | 7 | 120 | 3 | 9 | 7 |
| **RSRK** | 90 | 57 | 391 | 152520 | 2 |
| | | | | | |
| **RSRM** | 3 | 57 | 2 | 2 | 3 |
| **RSRG4** | 139 | 118 | 905 | 818230 | 3 |
| **RSRG40** | 71 | 118 | 466 | 217216 | 3 |

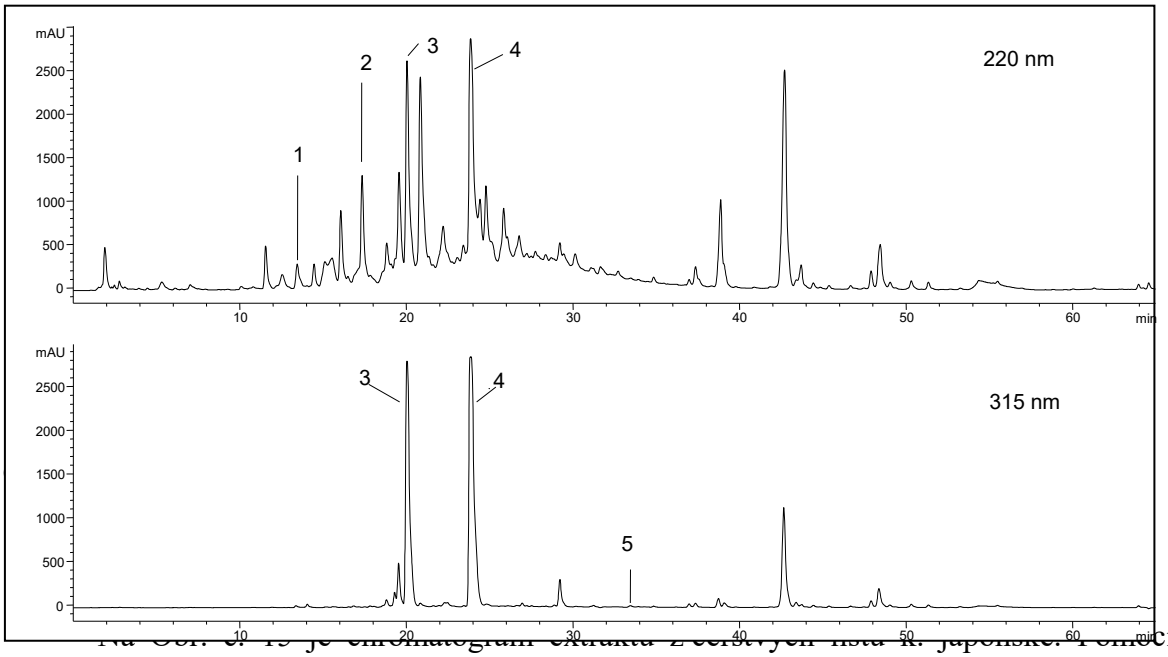
Vysvětlivky k Tab. č. 4:

RJ, RS, RB = k. japonská, sachalinská a česká, LS = list sušený, LC = list čerstvý, KS = kořen sušený, KK = kontrola kořen, KH = kontrola hypokotyl, PK = pokus kořen, PH = pokus hypokotyl, RSRK a RSRP = podíl mezi kořenem a hypokotylem, MEANS = průměr, N = počet stanovení, VARIANCE = variance, MEDIÁN = medián, STD. DEV.= standardní odchylka (ostatní viz předchozí tabulka č. 3)

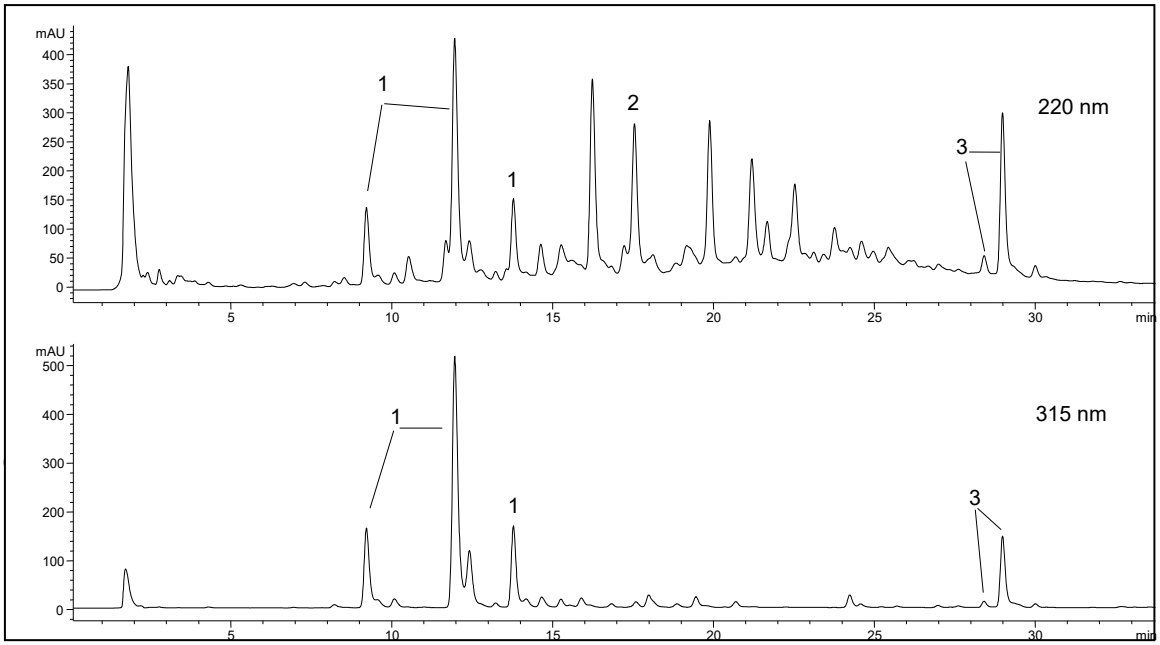
## 4.2 Chromatogramy

Extrakty z podzemních částí a suchých listů křídlatky japonské byly analyzovány metodou HPLC.

Na chromatogramu extraktu z podzemních částí křídlatky japonské jsme identifikovali následující biologicky aktivní látky: katechin, epikatechin, derivát resveratrolu, piceid, rasveratrol (Obr. č. 14). Vyhodnotili jsme pouze ty peaky, které můžeme přesně identifikovat pomocí standardů. Na chromatogramu jsou i další dominantní peaky. Jelikož k nim nebyly k dispozici finančně nákladné standardy, podle kterých bych je mohla identifikovat, nebyly na chromatogramu označeny a vyhodnoceny.




Na Obr. č. 15 je chromatogram extraktu z čerstvých listů k. japonské. Pomocí standardů byly metodou HPLC identifikovány tyto biologicky aktivní fenolické látky: deriváty kyseliny kávové, epikatechin a deriváty kvercetinu.Volného kvercetinu je však v rostlinách málo, zato je však hodně jeho derivátů a to především derivátů s cukry.


mAU
400
350
300
250
200
150
100
50
0
1
1
2
3
220 nm
5
10
15
20
25
30
min
mAU
500
400
300
200
100
0
1
1
3
315 nm
5
10
15
20
25
30
min

# 5 ZÁVĚR

Všechny provedené experimenty potvrdily předpoklady mnoha autorů o alelopatickém potenciálu všech tří druhů rodu *Reynoutria* (křídlatka japonská, k. sachalinská, k. česká). Pomocí testů klíčivosti byl prokázán vliv výluhů z jednotlivých rostlinných částí křídlatek (oddenky, listy) na klíčení semen i růst klíčků a hypokotylů. Výluhy z listů se ukázaly z alelopatického hlediska účinnější než výluhy z podzemních částí rostlin. Tedy klíčení semen bylo nižší než u kontroly a délky klíčících orgánů semen byly kratší než u kontroly. Při testování vlivu roztoků čistého standardu kvercetinu na klíčení semen byl také prokázán inhibiční vliv na klíčící semena.

Metodou HPLC byly ve vybraných extraktech identifikovány následující fenolické látky: katechin, epikatechin, deriváty resveratrolu, piceid, resveratrol a deriváty kvercetinu

Další výzkum v oblasti alelopaticky aktivních látek lokalizovaných u druhů rodu *Reynoutria* by v budoucnu mohl přinést výsledky v podobě herbicidů postavených čistě na biologickém základě, jenž by byly šetrnější k životnímu prostředí.

Tato práce přinesla nejen nové výsledky, ale i nastolila další otázky k řešení, které jsou specifikované v textu. Tato problematika bude náplní navazující magisterské práce.

# 6 SEZNAM LITERATURY


1. BUCHAR, E. (1973): Organická chemie pro pedagogické fakulty. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 370 s.

2. HARMATHA, J. (2005): Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů . Chemické Listy 99: 622 – 632.

3. HEJNÝ S., SLAVÍK, S. (1993): Květena České republiky 2. Academia, Praha, 544 s.

4. KARLSON, P. (1981): Základy biochemie. Academia, Praha, 504 s.

5. KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. (1999): Rostlinné fenoly v alelopatii. Chemické listy 93: 243–248.

6. KOBAYSHI, K. (2004): Factors affecting phytotoxical activity of alelochemicals in soil. Weed Biology and Management 4: 1 – 7.

7. KOČÍ, V., RAKOVICKÝ, T., ŠVAGR, A. (2001): Testy semichronické toxicity se semeny Sinapis alba. VŠCHT, Praha, 7s.

8. KUBÁT, K., HROUDA, L., CHRTEK, J. jun., KAPLAN, Z., KIRSCHNER, J. a ŠŤEPÁNEK, J. [eds] (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha, 928 s.

9. LAŠTŮVKA, Z. (1986): Koakce a kompetice vyšších rostlin. Academia, Praha, 206 s.

10. MÁCHOLÁN, L. (2003): Sekundární metabolity. Masarykova univerzita, Brno, 147 s.

11. PYŠEK, P. a MANDÁK, B. (2001): Křídlatka japonská, k. sachalinská a k. česká. In: PYŠEK, P. a TICHÝ, L. (eds.) (2001). Rostlinné invaze. Brno, 23 – 25 s.

12. PYŠEK, P. , SÁDLO, J. (2004): Zelení cizinci a nové krajiny 1, Zavlečené rostliny – sklízíme, co jsme zaseli? Vesmír 83: 35 – 40.

13. PROCHÁZKA, S., ŠEBÁNEK, J. a kol. (1997): Regulátory rostlinného růstu. Academia, Praha, 395 s.

14. REJMAN, L. (1966): Slovník cizích slov. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 589 s.

15. STATISTICA (1999): STATISTICA for Windows (Volume I.). General conventions & statistics I (2nd Ed.). Kumulus. Oecologia 76: 330-335.

16. VRCHOTOVÁ, N., ŠERÁ, B., TŘÍSKA, J. (2005): Fenolické látky v oddencích křídlatky japonské a křídlatky sachalinské. Zprávy Čes. Bot. Společnosti 20: 147 – 152.

17. ANONYMUS (2001): Sekundární metabolismus. http://kfrserver.natur.cuni.cz/cz/edu/biochemie/Biochemie_4.pdf

18. ANONYMUS (2004): Křídlatky – Biologické invaze. http://www.ibot.cas.cz/invaze/druhy/seznam/kridlatka.html

19. HAVRÁNEK J. (2001): Invazivní druhy rostlin – celosvětový problém.www.priroda.cz/clanky.php?detail=284

20. JIŘIŠTĚ, L. (2000): Invazivní rostliny v Krkonoších . Ochrana přírody. http://krkonose.krnap.cz/2000/0700invaze.php

21. MANDÁK, B. (2004): Biologická, ekologická a genetická studie invazních druhů rodu Reynoutria (Polygonaceae) v České republice. http://www.ibot.cas.cz/invaze/projekty/mandak_reynoutria.html

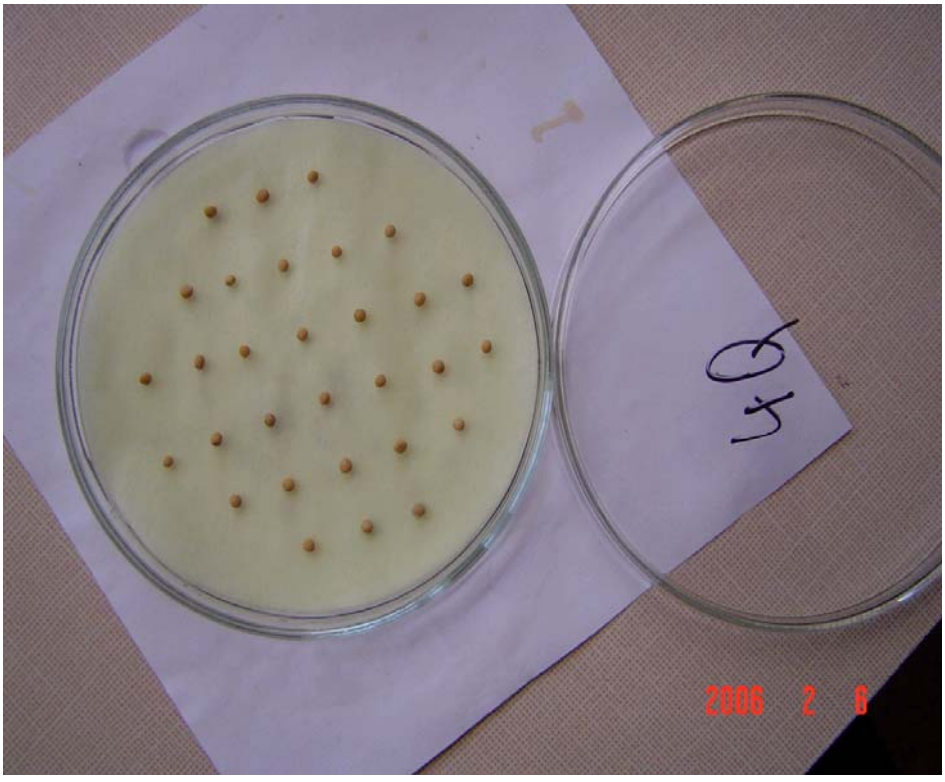
22. MORÁVKOVÁ, K.(2003): Reynoutria. http://www.volny.cz/kmoravkova/mapa.htm

23. NOSRETI, D. (2005): Pěstování a využití různých druhů rodu křídlatka. http://www.darius.cz/archeus/B_kridlat.html

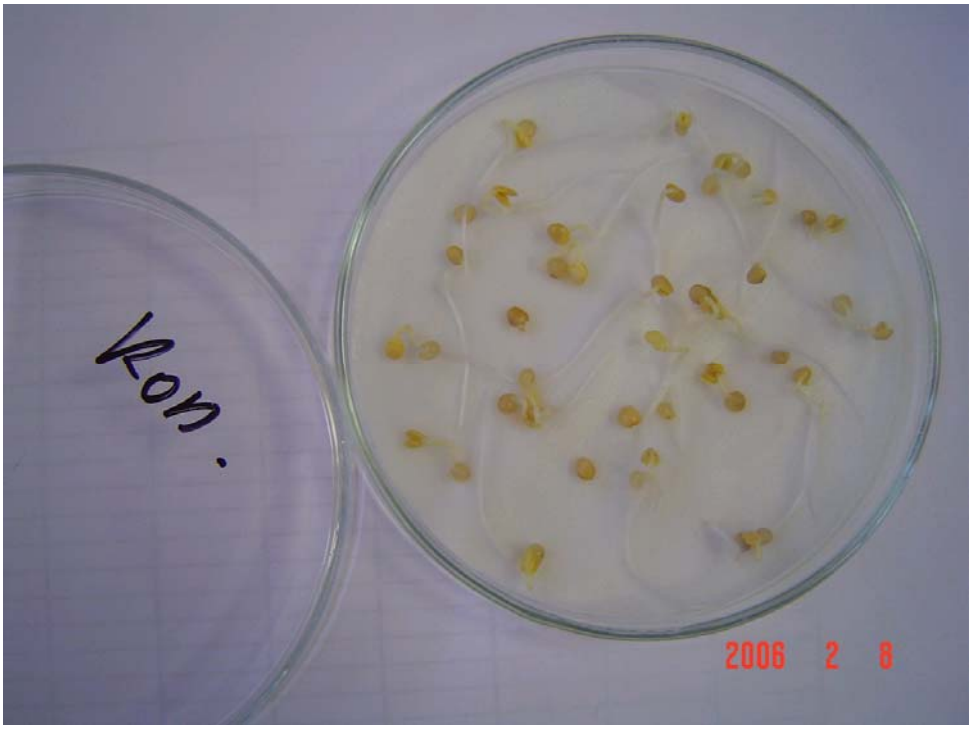
24.VYDROVÁ, A. (2000): Naše druhy křídlatek. http://www.ckrumlov.cz/cz1250//aktual/region/t_ho0600.htm

# 7 PŘÍLOHY

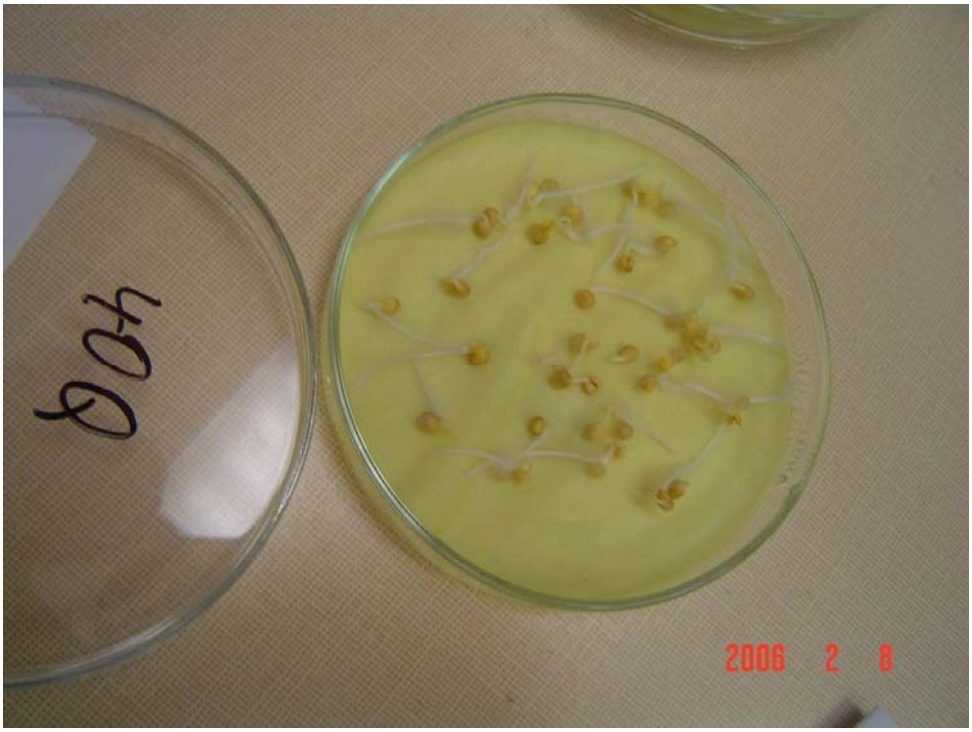
Semena hořčice bílé před kultivací (kontrola)




Semena hořčice bílé před kultivací (pokus s 4 mg kvercetinu)




Naklíčená semena hořčice bílé – 2 dny kultivace (kontrola)




Naklíčená semena hořčice bílé – 2 dny kultivace (pokus s 40 mg kvercetinu)

Sběr rostlinného materiálu křídlatky sachalinské